



NUEVAS FORMAS SÓLIDAS DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA: PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

TESIS DOCTORAL

Fandiño Octavio Ezequiel

2021



Universidad
Nacional
de Córdoba



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



Departamento de
CIENCIAS
FARMACÉUTICAS



Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Químicas realizado en:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Sperandeo Norma R.

COMISIÓN DE TESIS

Dra. Mazzieri Maria R.

Dra. Chiapello Laura S.

Dr. De Paoli Juan M.

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Leonardi Darío

De nuestros miedos nacen los corajes
y en nuestras dudas viven nuestras certezas.

Los sueños anuncian otra realidad posible
y los delirios, otra razón.

En los extravíos nos esperan hallazgos,
porque es preciso perderse
para volver a encontrarse...

Eduardo Galeano

A mi mamá y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado durante la realización de este Trabajo de Tesis:

A mi directora Dra. Norma Rebeca Sperandeo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de Tesis Doctoral, por haberme guiado durante el desarrollo de la misma, por sus aportes, por todo lo que me ha enseñado y por la paciencia que me tuvo durante todos estos años.

A la comisión evaluadora Dra. Mazzieri Maria Rosa, Dra. Chiapello Laura Silvina y Dr. De Paoli Juan Martin, por sus aportes y sus palabras alentadoras durante todo el seguimiento de este trabajo, al Dr. Leonardi Darío, evaluador externo, quien aceptó evaluar esta Tesis.

Un agradecimiento especial a la Dra. Mazzieri, quien confió en mí plenamente, me guió en mis primeros pasos en la docencia y quien me ayudo cada vez que tuve una dificultad con algún experimento, la quiero mucho doc.

Al Dr. Caira Mino, quien colaboró y ayudo a poder resolver las estructuras cristalinas descubiertas en el trabajo de tesis, gracias por toda su dedicación y trabajo.

Al Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas, la escuela de posgrado de la FCQ, la UNC, FONCyT y CONICET.

A mi mamá y hermanos, los pilares esenciales de mi vida, son las personas que siempre creen más en mí, y me brindaron todas las facilidades y apoyo para lograr mis metas, los amo hasta el infinito.

A Hilda, Inés, Estela y Enrique, a ustedes les agradezco haberme criado y haberme cuidado como si fuese su hijo, gracias por enseñarme tantas cosas y por amarme incondicionalmente, los amo a los cuatro, siempre.

A mis primos y tíos, Maru, Marina, Marcos, Ale y Rubén, gracias por todo el cariño que siempre me brindaron y su preocupación por mí, los amo.

A Euge Grau, mi amiga, que digo amiga si es como una hermana, gracias mi negris, que junto a mi familia siempre confiaste, apoyaste, acompañaste y celebraste cada una de mis decisiones, que fuiste gran parte del sostén para que no me caiga en el camino, gracias por el amor que me brindas siempre, te amo.

A mis amigos Dami y Nico, gracias por escucharme siempre y aconsejarme, y sobre todo gracias por su amistad y cariño brindado, los amo gordons.

A Sarita, gracias por todas tus palabras y cariño, te quiero mucho.

A Andesito, mi perri bello, muchas gracias por todo, sos un amigo de fierro, gracias por bancarme en cada una de mis locuras, te quiero muchísimo.

A Marro, Vero, Rita y Ramon, gracias por todo el amor que me dan y por bancarme en todas, los quiero mucho.

A Anita Manrique y Romi Clemente, mis saritas bellas, gracias por su amistad y el cariño, siempre alentándome y escuchándome, las quiero mucho.

A Marina, Soledad y Carlos, mis amigos incondicionales de la facu, gracias por todo el apoyo y por el amor que siempre me dieron, los amo.

A Veronica Sotola, realmente la palabra gracias me queda pequeña, me enseñaste a creer en mí, a confiar y a hacerme valer, muchas gracias por todo, te quiero mucho.

Al grupo de bueno amigos, Cata, Guille, Cami, Paco, Emi, Marianito, Pancho y Eli, gracias por su amistad y escucharme siempre, los quiero mucho.

A Sole Gualdesi, gracias por tus mates, por enseñarme HPLC, por confiar en mí y por apoyarme constantemente, te quiero mucho Sol.

A la Dra. Ortiz, Jime y Cinthia, gracias por las charlas, las risas y los almuerzos.

A Santiago Palma, gracias por ayudarme y por creer en mí, gracias por hacerme el contacto y ayudarme con todos los papeles para la beca en España, sos un capo.

A Analia y Gabriel Aragno, gracias por recibirme en vuestro hogar en Madrid y por ayudarme con todo en España, gracias por vuestro cariño y amistad, los amo.

A todos mis amigos de Madrid, quienes me abrieron la puerta de su hogar y me hicieron sentir como en casa, especialmente a David y Jesús, los quiero mucho.

A Antonio y Marisa, quienes me recibieron muy afectuosamente en Sevilla, gracias por enseñarme y acompañarme durante mi estancia en vuestra Universidad.

A Ilaria y Jasmin, mis tanas del alma, gracias por ser incondicionales y por brindarme cariño desde el primer momento, como si nos hubiésemos conocido desde siempre, las quiero y extraño muchísimo.

A Moni García, gracias por todo tu apoyo, por compartir todos los bellos momentos que vivimos y gracias por enseñarme, te quiero moniii.

A quienes me apoyaron y acompañaron en el inicio de este camino, Mini, Flora, Juli, Meli, Laurita, Carola, Lu, Lina, Caro B., y a las chicas que luego se unieron, Agus, Paulita y Anto, las quiero mucho chicas.

A mis compañeras de docencia, Paulina, Silvana y Perla, gracias por todo, las quiero.

Al universo, por haberme permitido vivir este momento y avanzar siempre hacia nuevos rumbos...

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	5
LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	7
OBJETIVOS	10
CAPÍTULO 1	
EL ESTADO SÓLIDO DE LOS FÁRMACOS Y SU IMPORTANCIA PARA LOS	
MEDICAMENTOS	
1.1 Introducción.....	12
1.2 La problemática actual del diseño y desarrollo de fármacos.....	13
1.3 El estado sólido de los compuestos farmacéuticos.....	15
1.4 Cocrisales.....	18
1.4.1 Definición de cocrisales.....	18
1.4.2 Diseño de cocrisales.....	19
1.4.3 Métodos de obtención de cocrisales.....	21
1.4.4 Diversidad estructural y relevancia farmacéutica de los cocrisales.....	22
1.5 Nanocristales.....	24
1.5.1 Métodos de preparación de nanocristales.....	25
1.5.2 Relevancia farmacéutica de los nanocristales.....	27
1.6 Referencias.....	28
CAPÍTULO 2	
CARACTERIZACIÓN DE FORMAS SÓLIDAS DE FÁRMACOS	
2.1 Introducción.....	31
2.2 Caracterización de las formas sólidas de fármacos: necesidad de múltiples técnicas analíticas.....	31
2.3 Técnicas espectroscópicas.....	33
2.3.1 Espectroscopia infrarroja.....	34
2.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido.....	36
2.4 Difracción de rayos X.....	37
2.4.1 Difracción de rayos X de monocristal.....	39
2.4.2 Difracción de rayos X de polvo.....	40
2.5 Análisis térmico.....	41
2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido.....	42
2.5.2 Termogravimetría.....	43
2.5.3 Termomicroscopía.....	44

2.6 Microscopías.....	45
2.6.1 Microscopia óptica de luz convencional y polarizada.....	45
2.6.2 Microscopia electrónica de barrido.....	46
2.7 Solubilidad y velocidad de disolución <i>in vitro</i>	47
2.7.1 Solubilidad.....	47
2.7.2 Velocidad de disolución.....	50
2.8 Referencias.....	52

CAPÍTULO 3

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COCRISTALES DEL TINIDAZOL

3.1 Introducción.....	55
3.2 Características físicas, fisicoquímicas y biológicas del Tinidazol.....	56
3.3 Sección experimental.....	58
3.3.1 Materiales.....	58
3.3.2 Métodos.....	59
3.3.2.1 Preparación de mezclas físicas.....	59
3.3.2.2 Preparación de cocrystalos de TNZ.....	59
3.3.2.3 Preparación de monocristales TNZ-COF.....	60
3.3.2.4 Microscopía óptica y de luz polarizada (MO y MLP).....	62
3.3.2.5 Difracción de Rayos X de polvos (PXRD).....	62
3.3.2.6 Difracción de rayos X de monocristal (SCXRD).....	62
3.3.2.7 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR)....	63
3.3.2.8 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT).....	63
3.3.2.9 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TG).....	64
3.3.2.10 Microscopía de platina calentable con luz polarizada (HSM).....	64
3.3.2.11 Determinación de la solubilidad acuosa.....	64
3.3.2.12 Estudios de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	65
3.3.2.13 Ensayo de fotoestabilidad en estado sólido.....	66
3.4 Resultados y discusión.....	67
3.4.1 Selección de los coformadores.....	67
3.4.2 Métodos de cocrystalización, puntos de fusión y morfología de las muestras sólidas preparadas.....	69
3.4.3 PXRD.....	74
3.4.4 SCXRD de TNZ-PABA _{CRIS-t-BuOH} y de TNZ-SA _{CRIS-ACE}	78
3.4.5 ¹³ C-SSNMR.....	83
3.4.6 DRIFT.....	88
3.4.7 DSC, TG y HSM.....	90
3.4.8 Solubilidad acuosa.....	98
3.4.9 Fotoestabilidad en estado sólido.....	101

3.5 Conclusiones.....	104
3.6 Referencias.....	105

CAPÍTULO 4

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCRISTALES DEL *p*-NITRO-BENCENOSULFONIL-1,2,3,4-TETRAHIDROQUINOLINA

4.1 Introducción.....	110
4.2 Características físicas, fisicoquímicas y biológicas del <i>p</i> -NO ₂ -BSTHQ.....	111
4.3 Aspectos fundamentales de algunas tecnologías de solubilización para sustancias hidrofóbicas escasamente solubles en agua.....	113
4.3.1 Nanomolienda asistida por microesferas (NAM).....	114
4.4 Sección experimental.....	116
4.4.1 Materiales.....	116
4.4.2 Métodos.....	117
4.4.2.1 Preparación de nanocrisales de <i>p</i> -NO ₂ -BSTHQ.....	117
4.4.2.2 Preparación de cocrisales.....	118
4.4.2.3 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z.....	118
4.4.2.4 Microscopía electrónica de barrido.....	119
4.4.2.5 Determinación de la solubilidad en equilibrio.....	119
4.4.2.6 Estudios de velocidad de disolución <i>in vitro</i>	120
4.4.2.7 Estudios de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	120
4.4.2.8 Evaluación del estado cristalino de las muestras secas.....	121
4.4.2.8.1 Difracción de Rayos X de polvos (PXRD).....	121
4.4.2.8.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR).....	122
4.4.2.8.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía de platina calentable con luz polarizada (HSM).....	122
4.5 Resultados y discusión.....	122
4.5.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial Z y microscopía electrónica de barrido.....	122
4.5.2 Solubilidad en equilibrio.....	126
4.5.3 Velocidad de disolución de los NC del <i>p</i> -NO ₂ -BSTHQ.....	127
4.5.4 Evaluación del estado cristalino de las muestras secas.....	130
4.5.4.1 PXRD.....	130
4.5.4.2 ATR.....	131
4.5.4.3 DSC y HSM.....	132
4.6 Búsqueda de cocrisales.....	135
4.7 Conclusiones.....	136
4.8 Referencias.....	137

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

5.1 Conclusiones generales..... 141

5.2 Proyecciones..... 143

PRODUCCION CIENTIFICA..... 145

ANEXO 1..... 148

ANEXO 2..... 160

Resumen

Las enfermedades parasitarias siguen siendo una de las principales preocupaciones para la salud pública de los países en desarrollo. Entre ellas, las causadas por protozoos tienen un gran impacto porque han resurgido en los últimos decenios como amenazas importantes. En particular, se pueden mencionar la Enfermedad de Chagas, la malaria y la leishmaniasis, que a pesar de su alta prevalencia, su farmacoterapia ha variado poco en los últimos 40 años y los pocos fármacos disponibles presentan, en general, propiedades fisicoquímicas o biofarmacéuticas desfavorables. Debido a esto, existe la urgente necesidad de optimizarlos o de contar con nuevos ingredientes farmacéuticos activos.

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue optimizar las propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas del tinidazol (TNZ) y del *p*-nitro-bencenosulfonil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (*p*-NO₂-BSTHQ). El TNZ es un antiparasitario de amplio espectro que presenta eficacia establecida, pero exhibe baja solubilidad acuosa e inestabilidad fotoquímica. Además, se seleccionó al *p*-NO₂-BSTHQ, una nueva entidad química (NEQ) en etapa de investigación preclínica. Este presenta actividad *in vitro* frente a los agentes etiológicos de la Enfermedad de Chagas, la malaria y la leishmaniasis, pero presenta muy baja solubilidad acuosa.

En este trabajo de investigación, se seleccionó la síntesis de cocrystalos (CC) para el TNZ, y la preparación de nanocrystalos (NC) para el *p*-NO₂-BSTHQ, dos estrategias actualmente disponibles para optimizar propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas desfavorables de ingredientes farmacéuticos activos (IFA) y NEQ.

A los fines de exponer los resultados obtenidos en este trabajo, la presentación se organizó de la siguiente manera:

En el Capítulo 1 se describe la problemática actual del diseño y desarrollo de fármacos y la importancia del estado sólido de los fármacos y su manipulación, mediante la preparación de nuevas formas sólidas multicomponentes y la reducción del tamaño de partículas a escala nanométrica. Además, se resumen los métodos de preparación y la relevancia farmacéutica y biofarmacéutica de los CC y NC como estrategias para la optimización de propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas desfavorables de IFA y NEQ.

En el Capítulo 2 se presenta una breve descripción de las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de CC y NC, y de dos propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas

claves para evaluar el desempeño *in vitro* de estas nuevas formas sólidas, la solubilidad acuosa (Sa) y velocidad de disolución (VD).

En el Capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos en la búsqueda de CC del TNZ, y se detalla la caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica de los tres nuevos CC (TNZ-CA, TNZ-PABA y TNZ-SA) y los dos eutécticos (TNZ-NA y TNZ-SUC) obtenidos. La caracterización llevada a cabo demostró que los 3 CC obtenidos mejoraron la fotoestabilidad en estado sólido de TNZ. Estos resultados demostraron que la cocrystalización es una aproximación válida para mejorar las propiedades fisicoquímicas de este IFA.

En el Capítulo 4 se describe la preparación de NC del *p*-NO₂-BSTHQ mediante nanomolienda asistida por microesferas y se presentan los detalles de su caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica. Los resultados demostraron que la nanometrización es una estrategia válida para optimizar la escasa solubilidad acuosa en equilibrio y nula VD de la NEQ.

Por último, en el Capítulo 5 se presentan las conclusiones generales y proyecciones de este trabajo de Tesis Doctoral.

Listado de abreviaturas, acrónimos y símbolos

ΔH	Cambio de entalpía
Å	Ångström
AB	Ácido benzoico
ACE	Acetona
ACN	Acetonitrilo
ARG	Arginina
AT	Análisis Térmico
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> (Reflectancia Total Atenuada)
β	Velocidad de calentamiento
BD	Biodisponibilidad
C	Concentración
°C	Grados Celsius
C_{sol}	Concentración de la sustancia en el medio de disolución a un dado tiempo
C_{sat}	Concentración de Saturación
C_{max}	Concentración Plasmática Máxima
CA	Acido cítrico
CAF	Cafeína
CC	Cocristales
¹³C CP/MAS	<i>Carbon 13 Cross Polarization/ Magic angle spin</i> (Combinación de Polarización Cruzada y Giro de Ángulo Mágico de carbono 13)
CDCl₃	Cloroformo deuterado
COF	Coformador
Cp	Capacidad calorífica
CP	<i>Cross Polarization</i> (Polarización cruzada)
CRIS	Cristalización por evaporación de solvente
dH	Diámetro hidrodinámico
DRIFTS	<i>Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy</i> (Espectroscopía Infrarroja de Reflectancia Difusa con Transformada de Fourier)
DRX	Difracción de Rayos X
DS	Dispersión sólida
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetría Diferencial de Barrido)
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i> (Base de Datos Estructural de la Cambridge)
DTG	<i>Derivative thermogravimetry</i> (Termogravimétrica derivada)
EUA	Estados Unidos de Norte América
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Agencia Europea de Medicamentos)
ETD	Enfermedades tropicales desatendidas
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Medicamentos y Alimentos)
FIR	<i>Far-infrared</i> (Infrarrojo lejano)
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier)
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i> (Generalmente reconocidos como seguros)
H	Hidrógeno
h	Hora
HBA	<i>Hydrogen Bond Aceptor</i> (Aceptor de enlaces de hidrogeno)
HBD	<i>Hydrogen Bond Donor</i> (Donor de enlaces de hidrogeno)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HSM	<i>Hot Stage Microscopy</i> (Microscopía de Platina Calentable)
I + D	Investigación y Desarrollo
ICH	<i>International conference on harmonisation</i> (Conferencia Internacional sobre

	armonización)
ICTAC	<i>International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry</i> (Confederación Internacional para el análisis térmico y la calorimetría)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Unión internacional de química pura y aplicada)
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IR	Infrarrojo
K	Grados Kelvin
K_0	Constante de velocidad de disolución
LAG	<i>Liquid-assisted grinding</i> (Molienda asistida por solvente)
Log	Logaritmo
M	Concentración Molar
<i>m</i>	Masa
MAS	<i>Magic angle spin</i> (Giro de Ángulo Mágico)
MAN	Manitol
MeOH	Metanol
MF	Mezcla física
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min.	Minutos
MIR	<i>Mid-infrared</i> (Infrarrojo medio)
mL	Mililitro
MLP	Microscopía óptica de luz polarizada
mm	Milímetro
MO	Microscopía Óptica
NC	Nanocristales
NEQ	Nueva entidad química
NG	<i>Neat grinding</i> (Molienda en seco)
NA	Nicotinamida
NAM	Nanomolienda asistida por microesferas
NIR	<i>Near-infrared</i> (Infrarrojo cercano)
nm	Nanómetro
OH	Hidroxilo
P/P	Peso en peso
<i>p.f.</i>	Punto de fusión
<i>p</i>-NO₂-BSTHQ	<i>p</i> -nitrobenzenosulfonil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
pKa	-Log de la constante de disociación ácida
PM	Peso molecular
POL188	Poloxamer 188
ppm	Partes por millón
PRO	Prolina
PXRD	<i>Powder X Ray Diffraction</i> (Difracción de rayos X de polvos)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Solubilidad
Sa	Solubilidad Acuosa
S_{ap}	Solubilidad aparente
SA	Ácido salicílico
SCB	Sistema de clasificación biofarmacéutico
SCXRD	<i>Single-Crystal X-Ray Diffraction</i> (Difracción de rayos X de monocristal)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopía electrónica de Barrido)
S_{eq}	Solubilidad en equilibrio

SSNMR	<i>Solid State Nuclear Magnetic Resonance</i> (Resonancia magnética nuclear en estado sólido)
¹³C-SSNMR	<i>Carbon 13 Solid State Nuclear Magnetic Resonance</i> (Resonancia magnética nuclear en estado sólido de carbono 13)
SUC	Ácido succínico
t₅₀	Tiempo de vida media
T	Temperatura
t	Tiempo
t-BuOH	<i>Ter</i> -butanol
Te	Temperatura de inicio de pico extrapolada
TG	Termogravimetría
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> (Análisis termogravimétrico)
TLC	<i>Thin layer chromatography</i> (Cromatografía en capa delgada)
TNZ	Tinidazol
Tp	Temperatura de pico
tr	Tiempo de retención
TRIP	Triptófano
U	Urea
UA	Unidad asimétrica
UK	<i>United Kingdom</i> (Reino Unido)
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> (Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica)
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
µg	Microgramo
µL	Microlitro
VD	Velocidad de disolución

OBJETIVOS DE LA TESIS

OBJETIVO GENERAL

Las enfermedades parasitarias siguen siendo una de las principales preocupaciones para la salud pública de la mayoría de los países en desarrollo. Entre ellas, las causadas por protozoos tienen gran impacto porque han resurgido en los últimos decenios como amenazas importantes para la salud humana. De gran preocupación son la Enfermedad de Chagas, la malaria y la leishmaniasis, que se han generalizado sobre todo en países ubicados en zonas tropicales y subtropicales, y tienen una prevalencia mundial de más de 238 millones de personas afectadas. En la ausencia de vacunas eficaces, la quimioterapia desempeña un papel crítico en el control de dichas enfermedades. Lamentablemente, el tratamiento farmacológico para dichas patologías ha variado poco en los últimos 40 años, a pesar de que los pocos fármacos existentes para su tratamiento presentan propiedades biofarmacéuticas y toxicológicas desfavorables.

En la actualidad existe la necesidad de contar con tratamientos farmacoterapéuticos mejorados o con nuevos fármacos para las enfermedades parasitarias. El objetivo general de este trabajo de Tesis fue optimizar las propiedades físicas y biofarmacéuticas desfavorables del tinidazol (TNZ) y del *p*-nitro-bencenosulfonil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina (*p*-NO₂-BSTHQ) con el fin de contribuir a la quimioterapia de dichas enfermedades. El TNZ es un ingrediente farmacéutico activo antiparasitario de reconocida utilidad terapéutica con baja solubilidad acuosa y que es fotoinestable en estado sólido y en solución. El *p*-NO₂-BSTHQ una nueva entidad química en etapa de investigación preclínica que presenta actividad *in vitro* frente a los agentes etiológicos de la Enfermedad de Chagas, la malaria y la leishmaniasis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente formas sólidas alternativas multicomponentes del tinidazol, en particular cocrisales y eutécticos.
- Preparar y caracterizar fisicoquímicamente nanocristales, cocrisales y dispersiones sólidas de la *p*-nitro-bencenosulfonil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina.
- Obtener monocristales de buena calidad para resolver las estructuras cristalinas de las nuevas formas sólidas obtenidas por difracción de Rayos X de monocristal.
- Evaluar propiedades físicas y biofarmacéuticas *in vitro* de las nuevas formas sólidas del tinidazol y la *p*-nitro-bencenosulfonil-1,2,3,4-tetrahidroquinolina.

Capítulo

1

- 1.1 Introducción
- 1.2 La problemática actual del diseño y desarrollo de fármacos
- 1.3 El estado sólido de los compuestos farmacéuticos
- 1.4 Cocristales
 - 1.4.1 Definición de cocristales
 - 1.4.2 Diseño de cocristales
 - 1.4.3 Métodos de obtención de cocristales
 - 1.4.4 Diversidad estructural y relevancia farmacéutica de los cocristales
- 1.5 Nanocristales
 - 1.5.1 Métodos de preparación de nanocristales
 - 1.5.2 Relevancia farmacéutica de los nanocristales
- 1.6 Referencias

1

EL ESTADO SÓLIDO DE LOS FÁRMACOS Y SU IMPORTANCIA PARA LOS MEDICAMENTOS

1.1 Introducción

Actualmente, la mayoría de los productos farmacéuticos, y de las formulaciones en etapas de desarrollo, son formas de dosificación sólidas (comprimidos, cápsulas y suspensiones, entre otras) que contienen uno o más ingredientes farmacéuticos activos (IFA) en estado sólido (Domingos *et al.*, 2015; Zhang y Zhou, 2017). Las ventajas de formularlos en dicho estado procede principalmente de su capacidad de cristalizar, y por ende de purificar, de su facilidad de manipular, y de una mejor estabilidad química y física, en comparación con los líquidos (Domingos *et al.*, 2015; Zhang y Zhou, 2017). De allí que, de los varios estados de la materia en los que una sustancia puede existir, el estado sólido es el que se encuentra más comúnmente en los IFA, y es el más importante y relevante para el desarrollo farmacéutico.

El estudio del estado sólido es fundamental para la selección de la forma sólida* en la que se administrarán los IFA, y es un requisito regulatorio para la aprobación de cada fármaco nuevo. Además, el estado sólido de un IFA, de nuevas entidades químicas (NEQ) de interés farmacéutico y aun de medicamentos, se puede diseñar y manipular. Esto permite eventualmente alterar favorablemente propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas desfavorables (Olusanmi *et al.*, 2014; Domingos *et al.*, 2015).

* Formas sólidas: cada una de las diferentes fases cristalinas o amorfas que puede adoptar una sustancia en estado sólido.

Precisamente, la manipulación del estado sólido ha surgido como una estrategia de gran relevancia en el área farmacéutica (Domingos *et al.*, 2015). Esto es debido a que un alto porcentaje de los IFA y NEQ actuales pertenecen a la clase II (baja solubilidad acuosa (S_a) y alta permeabilidad intestinal) del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) de IFA (Olusanmi *et al.*, 2014). En el caso de esos IFA y NEQ, la biodisponibilidad (BD) es controlada por la liberación del IFA o NEQ desde la forma de dosificación, debido a su baja S_a o lenta velocidad de disolución (Olusanmi *et al.*, 2014). Ambas características (al igual que otras propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas desfavorables) se pueden alterar favorablemente mediante el diseño y síntesis de nuevas formas sólidas cristalinas, o amorfas, así como por estrategias de ingeniería de partículas (Domingos *et al.*, 2015; Saravanan *et al.*, 2020).

El objetivo de este capítulo es ubicar este trabajo de Tesis doctoral en el contexto de las estrategias farmacéuticas actuales para la optimización de las propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas desfavorables de IFA y NEQ. Para ello, se resumirán algunos aspectos de la problemática actual del descubrimiento y desarrollo de medicamentos. Luego, se describirán varios principios fundamentales del estado sólido de los IFA, particularmente las distintas formas sólidas en que pueden presentarse. Finalmente, se presentarán dos estrategias recientes para optimizar las propiedades desfavorables de IFA conocidos y NEQ: la preparación de nuevas formas sólidas y la ingeniería de partículas.

1.2 La problemática actual del diseño y desarrollo de fármacos

En la actualidad el proceso de investigación y desarrollo (I+D) de nuevos medicamentos es costoso y carente de eficiencia. En efecto, en las últimas décadas el gasto en I+D para el desarrollo de nuevos IFA ha experimentado un aumento sustancial que no ha sido acompañado por un crecimiento equivalente en el número de nuevos medicamentos lanzados al mercado. Algunas estimaciones colocan este costo en alrededor de 2 billones de dólares estadounidenses (Lim, 2020). Además, de las 5000 a 10000 moléculas que inician el proceso de I+D, se calcula que solo 250 llegan a la etapa preclínica, 5 se prueban en ensayos clínicos y solo una recibe aprobación para su comercialización (Figura 1.1) (Brake *et al.*, 2017).

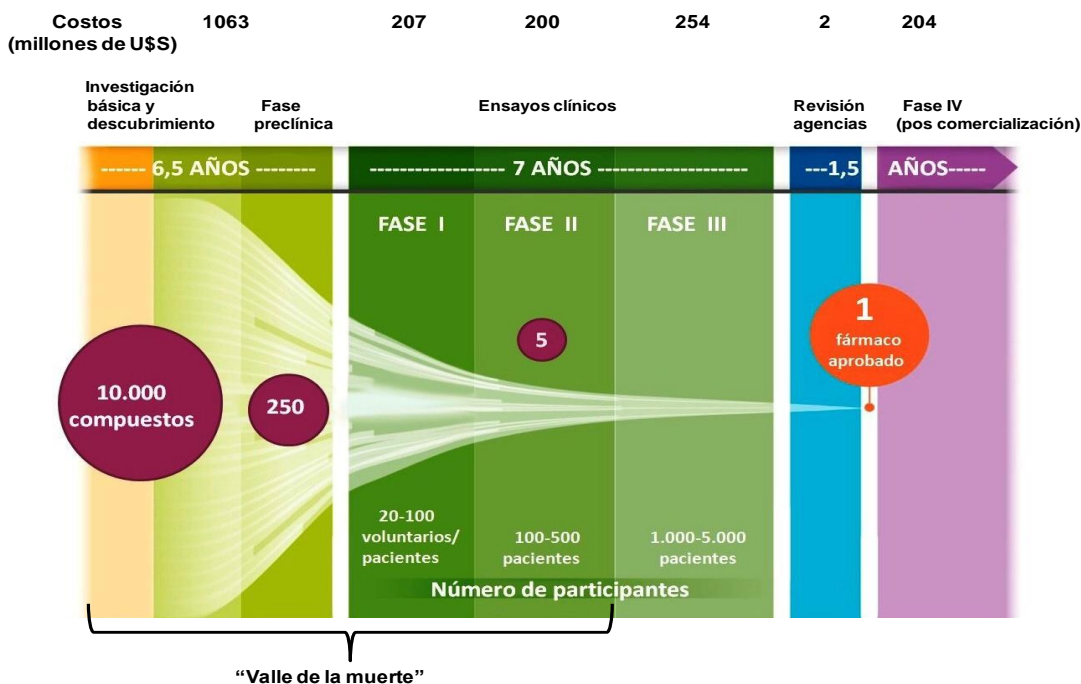


Figura 1.1. Representación gráfica del proceso de I+D de nuevos IFA (Adaptada de Zurdo, 2013; Brake *et al.*, 2017; Lim, 2020).

Tradicionalmente, la potencia y selectividad han sido los parámetros claves a considerar en el descubrimiento de nuevos IFA. Sin embargo, en los últimos años se ha comprendido que los IFA se mueven a través del organismo y actúan a escala molecular, y para hacerlo necesitan poseer propiedades físicas y biofarmacéuticas adecuadas, en particular buena Sa y adecuada permeabilidad intestinal (Shah y Agnihotri, 2011). Lamentablemente, aproximadamente el 40% de los IFA aprobados y el 80% de los fármacos que se encuentran en desarrollo (Karagianni *et al.*, 2018) pertenecen a la clase II del SCB, para la cual la absorción oral es limitada por la baja Sa. Por lo tanto, el creciente número de NEQ que presentan baja Sa es uno de los problemas más comunes que obstaculizan el desarrollo de nuevos IFA (Karagianni *et al.*, 2018).

Las causas de la baja Sa y baja permeabilidad intestinal están relacionadas con las nuevas tecnologías de diseño y síntesis de NEQ, y las características moleculares de los candidatos obtenidos en las etapas preclínicas, los cuales en general son compuestos orgánicos con pesos moleculares relativamente altos (Zurdo, 2013; Olusanmi *et al.*, 2014; Domingos *et al.*, 2015). Además, las muestras utilizadas en los ensayos iniciales a menudo varían considerablemente en el tamaño

de partícula, cristalinidad y forma polimórfica, y ello genera problemas adicionales en la etapa de investigación preclínica, ya que dichas propiedades suelen no ser estudiadas ni optimizadas en la etapa de investigación mencionada (Shah y Agnihotri, 2011).

Debido a que las NEQ presentan altas tasas de fracaso, costos elevados, un ritmo lento de su I + D y que los IFA se encuentran formulados en su mayoría disponibles como formas de dosificación sólidas (Domingos *et al.*, 2015), el desarrollo de nuevas formas sólidas de IFA conocidos ofrece una nueva estrategia para la mejora de su eficiencia optimizando su Sa, disolución, estabilidad, BD o farmacocinética (Domingos *et al.*, 2015). Dicha optimización de las propiedades físicas, químicas y biofarmacéuticas desfavorables de fármacos "antiguos" ha surgido como un tema de relevancia académica e industrial que ha llevado a un mundo en expansión de formas sólidas, con varios IFA exitosamente optimizados (Domingos *et al.*, 2015). Como esta estrategia implica el uso de compuestos conocidos, los costos generales de desarrollo son potencialmente más bajos y los plazos de desarrollo más cortos (Domingos *et al.*, 2015). Si bien esta estrategia ha conducido a resultados muy satisfactorios en varios IFA, puede no resultar adecuada para compuestos con muy baja Sa. En esos casos, las aproximaciones de la ingeniería de partículas resultan más apropiadas, como se discutirá en próximas secciones.

1.3 El estado sólido de los compuestos farmacéuticos

La mayoría de los IFA son sólidos y pueden existir en muchas formas sólidas (Figura 1.2), las cuales difieren en sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y biofarmacéuticas (Gokhale y Mantri, 2017). Ellas se pueden clasificar sobre la base de su estructura interna en: formas **cristalinas** (sus moléculas, iones o átomos forman arreglos ordenados y periódicos de corto y largo alcance) y **amorfas** (no poseen orden de largo alcance) (Zhang y Zhou, 2017; Healy *et al.*, 2017). Cabe señalar que el "orden de corto alcance" se refiere a la manera (coordinación molecular) con que los átomos, moléculas o iones vecinos se acomodan uno al lado del otro. En cambio, el "orden de largo alcance" se refiere a la regularidad o periodicidad con que átomos, moléculas o iones se agregan, primero a través de "vecinos" (de corto alcance) y después se propagan a una distancia "apreciable"

para formar una fase (Zhang y Zhou, 2017). Tales diferencias en el rango de orden molecular o atómico y propiedades de empaquetamiento pueden impactar en propiedades farmacéuticas y biofarmacéuticas relevantes como la fluidez, compresión, dureza, densidad, Sa y BD (Healy *et al.*, 2017). La gran mayoría de los sólidos farmacéuticos entran en la categoría de sólidos cristalinos (Healy *et al.*, 2017).

Los sólidos cristalinos se pueden clasificar en varios subtipos según el número de componentes que, de manera homogénea, integren la red cristalina. Así, pueden ser de **componente único** (poseen una única entidad química, por ejemplo un IFA) o de **componentes múltiples** (contienen una, dos, tres, etc., especies químicas adicionales al IFA) (Figura 1.2), conocidos también como aductos (Zhang y Zhou, 2017). Aunque el número de especies adicionales puede aumentar sin límite, este suele ser entero y relativamente pequeño (Zhang y Zhou, 2017).

Para los sólidos de componentes múltiples también se pueden distinguir varios subtipos (Figura 1.2). Así, según el estado de ionización de las especies que los forman se pueden clasificar en iónicos (contienen cationes y aniones), moleculares (contienen moléculas neutras) o iónicos/moleculares (Zhang y Zhou, 2017). Los aductos binarios iónicos se denominan sales y normalmente están formados por sustancias ácidas y básicas, o iones dipolares (zwitteriones) (Karagianni *et al.*, 2018). Los aductos moleculares que contienen moléculas de solvente o agua se denominan **solvatos o hidratos** respectivamente. Cuando contienen moléculas de un compuesto orgánico se llaman **cocristales** (CC) (Figura 1.2), y estos pueden ser anhidros o solvatados, o sales de CC (Karagianni *et al.*, 2018).

Es de remarcar, que la composición química global de los sólidos farmacéuticos puede ser la misma, pero pueden presentar diferencias al nivel de la estructura interna. La capacidad de una sustancia para existir como dos o más fases sólidas con diferentes disposiciones o conformaciones de las moléculas en una red cristalina, se denomina polimorfismo y las diferentes fases se denominan polimorfos o modificaciones cristalinas (Zhang y Zhou, 2017). El polimorfismo es relevante tanto para los sólidos de componente único como para los de componentes múltiples (Aitipamula *et al.*, 2012; Gokhale y Mantri, 2017; Zhang y Zhou, 2017).

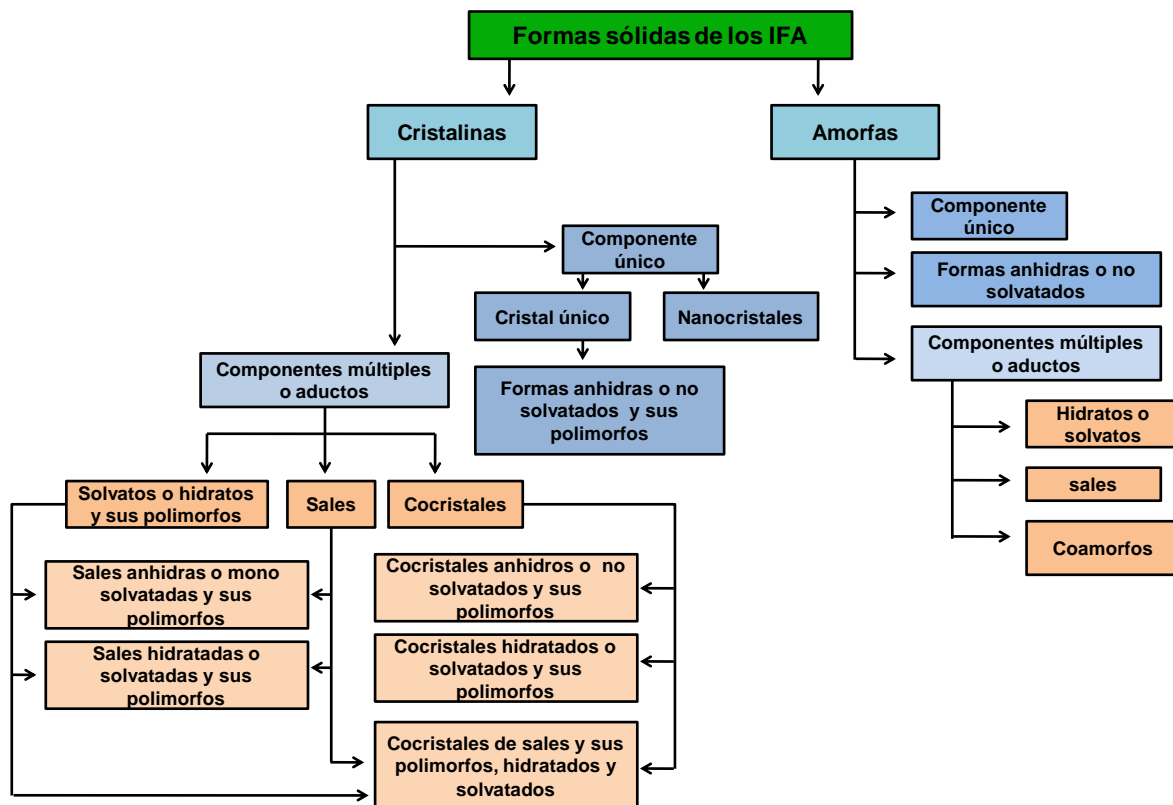


Figura 1.2. Clasificación de las formas sólidas de un fármaco sobre la base de su estructura y composición (Adaptada de Karagianni *et al.*, 2018 y Healy *et al.*, 2017).

Para mejorar las propiedades fisicoquímicas de NEQ e IFA se pueden utilizar tanto formas sólidas cristalinas o amorfas tradicionales (polimorfos, sales y solvatos/hidratos, Figura 1.2) como novedosas (CC y coamorfos, Sección 1.4.4, Tabla 1.2). Sin embargo, esta aproximación tiene algunas limitaciones. Por ejemplo, la formación de sales requiere de IFA capaces de formar iones, y no todos poseen grupos ácidos y básicos. Además, el desarrollo de formas salinas no es siempre beneficioso, porque pueden tener, por ejemplo, mayor higroscopicidad y electrostática, punto de fusión más altos, etc. (Olusanmi *et al.*, 2014). En esos casos, la formación de CC puede ser una alternativa más adecuada, porque no se necesitan grupos ionizables sino grupos dadores o aceptores de hidrógeno o con la posibilidad de formar otro tipo de interacciones no-covalentes. También, se puede recurrir a aproximaciones tecnológicas como el uso de agentes solubilizantes, la formación de complejos de inclusión, la incorporación del IFA a microemulsiones, liposomas o dispersiones sólidas. Otra estrategia es la modificaciones de las propiedades del IFA al nivel particulado, por ejemplo, la reducción del tamaño de

partículas, entre las que se destaca la obtención de nanocristales (NC) farmacéuticos (Malamatari *et al.*, 2018).

Dado que en este trabajo de Tesis, se prepararon y caracterizaron CC y NC, a continuación se describirán algunos aspectos relevantes sobre su obtención, caracterización y aplicaciones farmacéuticas

1.4 Cocristales

1.4.1 Definición de cocristales

Los CC representan una clase de compuestos químicos conocidos desde mediados del siglo XIX (Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, el término científico CC es reciente, ya que fue propuesto por Schmidt y Snipes, en 1967, para describir a un complejo formado por enlaces de hidrógeno entre la 9-metiladenina y la 1-metiltimina (Karagianni *et al.*, 2018). Posteriormente, el término se popularizó en la química del estado sólido, gracias a los estudios sobre los enlaces de hidrógeno llevados a cabo por Margaret Etter en la década de 1980 (Zhang *et al.*, 2019).

Después de un período de aproximadamente 20 años de inactividad en el campo de los CC, a partir de 2003, su estudio y preparación adquirió gran importancia en el área farmacéutica. Ello motivó, por ejemplo, que en 2006 M.J. Zaworotko recomendara la utilización del término **cocrystal farmacéutico** a los CC que contuvieran un IFA (Zhang *et al.*, 2019). El interés renovado por los CC trajo también aparejados debates sobre su nombre y definición, incluso sobre el uso o no de un guion en la palabra (cocrystal vs. co-crystal) (Zhang *et al.*, 2019). Dichos debates no han concluido (Zhang *et al.*, 2019).

De las varias definiciones de cocrystal que se han publicado, la más aceptada en el área farmacéutica es la acuñada en 2012 por una comisión de 46 científicos (Aitipamula *et al.*, 2012). Según esta definición **los CC son sólidos que son materiales cristalinos monofásicos, constituidos por dos o más compuestos moleculares o iónicos diferentes, que están generalmente en una proporción estequiométrica y que no son ni solvatos ni sales simples** (Aitipamula *et al.*, 2012),

Dada la importancia de los CC en el campo farmacéutico, su definición no es solo una cuestión de terminología científica correcta, sino que también tiene

implicaciones regulatorias (Zhang *et al.*, 2019). Por ejemplo, la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA, por su sigla en inglés) de Estados Unidos de Norteamérica (EUA) redefinió en 2018 a los CC como **materiales cristalinos compuestos por dos o más moléculas diferentes, típicamente un ingrediente farmacéutico activo (IFA) y formadores de cocrystalales ("Coformadores") en la misma red cristalina** (FDA, 2018). Por su parte, la Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*, EMA, por su sigla en inglés) definió a los CC como **estructuras cristalinas homogéneas (de una sola fase) formadas por dos o más componentes en una relación estequiométrica definida donde la disposición en la red cristalina no se basa en enlaces iónicos (como en las sales)** (EMA, 2015).

Si bien las numerosas definiciones de CC presentan diferencias más o menos significativas, todas ellas coinciden en que son sólidos cristalinos que contienen en la misma celda unitaria dos o más especies químicas diferentes que se mantienen unidas mediante interacciones intermoleculares débiles (no-covalentes y no-iónicas) tales como enlaces de hidrógeno, enlaces π - π y de van der Waals (Karagianni *et al.*, 2018); por eso, se los categoriza también como derivados no-covalentes (Stoler y Warner, 2015). Dichas interacciones conducen a un aducto, el cual es termodinámicamente más estable que el IFA y el coformador (COF) por separado (Karagianni *et al.*, 2018), de allí la relevancia farmacéutica de los CC.

1.4.2 Diseño de cocrystalales

Los CC se obtienen por una síntesis supramolecular mediante la formación de enlaces de hidrógeno fuertes u otros enlaces no covalentes (Domingos *et al.*, 2015). Por tanto, el diseño de un CC se basa en el concepto del sintón supramolecular, término acuñado por E. J. Corey en 1967, y que Desiraju usó principalmente para referirse a **unidades estructurales en la supramolecula que pueden formarse o ensamblarse mediante interacciones intra o intermoleculares conocidas o posibles**, al describir una serie de CC farmacéuticos (Karagianni *et al.*, 2018). Es decir, los sintones supramoleculares representan los bloques de construcción responsables de que una estructura cristalina exista, y cuando se agregan a un

grupo específico de estructuras cristalinas regulan su arquitectura (Karagianni *et al.*, 2018).

A partir del análisis de un gran número de estructuras cristalinas depositadas en la Base de Datos Estructurales de Cambridge (CSD, por sus iniciales en inglés), se han definido algunas reglas de predicción para la formación de CC, basándose en la frecuencia de aparición de ciertos sintones formados por enlaces de hidrógeno. Si bien este proceso no puede denominarse una verdadera predicción, puede servir como una guía para seleccionar el COF y, por tanto, diseñar el CC. En este sentido, el enlace de hidrógeno es la fuerza intermolecular más frecuente y versátil encontrada en los CC, y los sintones formados mediante la utilización de enlaces de hidrogeno pueden ser entre el mismo (homosintón) o diferentes grupos funcionales (heterosintones). En la Figura 1.3 se representan los sintones supramoleculares más comúnmente encontrados. Es de señalar que en los CC farmacéuticos, los heterosintones son más frecuentes que los homosintones (Rajesh Goud, *et al.*, 2011).

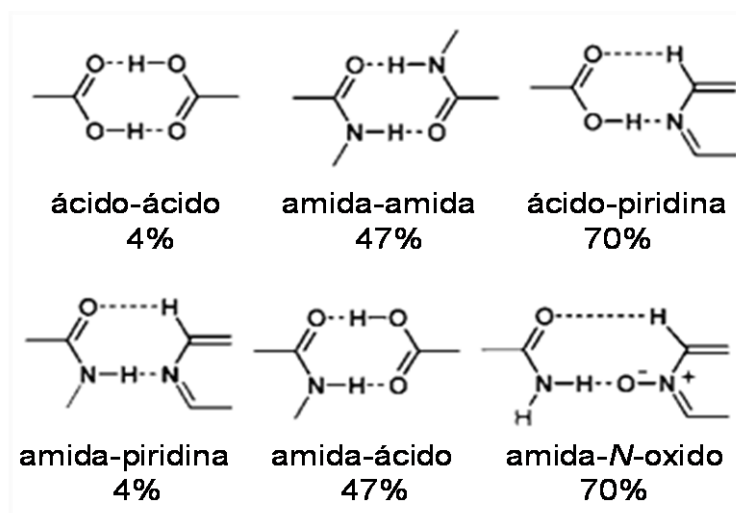


Figura 1.3. Esquema de enlace tipo puente hidrogeno, homosintones y heterosintones, con su probabilidad de ocurrencia (Adaptada de Rajesh Goud *et al.*, 2011).

Un aspecto importante a considerar en la preparación de CC farmacéuticos es que el COF debe ser aceptable desde el punto de vista farmacéutico (Steed, 2013). Es decir, no debe ser tóxico y no debe producir efectos secundarios adversos y, además, debiera estar incluido en el listado de los compuestos sólidos **generalmente reconocidos como seguros** (*Generally Regarded As Safe*, GRAS, en la terminología inglesa) para uso en humanos, el cual incluye a aproximadamente 100 compuestos sólidos (Steed, 2013). También, pueden utilizarse IFA como COF,

lo cual da lugar a los CC fármaco-fármaco, llamados también CC duales de fármacos (Ngilirabanga *et al.*, 2020). Por tanto, el espacio para los CC farmacéuticos es, *a priori*, enorme, con muchas posibilidades para un mismo IFA, especialmente cuando este presenta al menos dos grupos funcionales capaces de formar enlaces de hidrógeno (Healy *et al.*, 2017).

1.4.3 Métodos de obtención de cocristales

Los métodos de obtención de CC pueden clasificarse, en términos generales, en técnicas en estado sólido o en solución (Chavan *et al.*, 2018; Karimi-Jafari *et al.*, 2018). En la Tabla 1.1 se consignan algunos de los métodos de obtención de CC y se resumen sus principales características.

Tabla 1.1. Algunos de los métodos de obtención de CC y sus principales características (Adaptada de Karimi-Jafari *et al.*, 2018).

Categoría	Nombre del método	Características del método
Métodos en estado sólido (Mecanoquímica)	Molienda en seco (<i>Neat grinding</i>)	Mezclado de IFA y COF por molienda manual o mecánica, durante un período de tiempo y con frecuencia fija.
	Molienda asistida por solvente (<i>Liquid assisted grinding</i>)	Mezclado de IFA y COF en presencia de una cantidad muy pequeña de solvente para moler de manera manual o mecánica, por un período de tiempo y con frecuencia fija.
	Extrusión	Combinación de de IFA y COF en equipos extrusores (tornillo simple o doble) con la incorporación o no de un aglutinante líquido.
Métodos en solución	Conversión isotérmica en suspensión	Adición de IFA y COF, sólidos, a un solvente o una mezcla de solventes y agitado de la suspensión resultante durante un período de tiempo fijo a temperatura constante.
	Cocrystalización por evaporación de solvente	Eliminación del disolvente de una solución de IFA y COF mediante evaporación en condiciones ambientales, a altas temperaturas, a presión reducida o una combinación de ambas.
	Precipitación	(i) Combinación de soluciones individuales del IFA y el COF o (ii) adición de un COF sólido a una solución del IFA, o viceversa, con el resultado de una cocrystalización espontánea repentina.
	Cocrystalización por antisolventia	Cocrystalización que ocurre como resultado de la adición de un antisolvente a una solución de IFA y COF

Las técnicas en estado sólido se basan en la mecanoquímica, la cual en un sentido amplio hace referencia a las reacciones entre sólidos inducidas por la acción de energía mecánica, como la molienda (James *et al.*, 2012), e incluyen métodos en los cuales se emplean muy poca cantidad o nada de solvente, tales como la molienda en seco (*Neat grinding*, NG en la terminología inglesa) y la molienda asistida por solvente (*Liquid-assisted grinding*, LAG por su sigla en inglés conocida también como *Solvent-drop grinding*) (Domingos *et al.*, 2015). En cambio, los métodos en solución involucran un exceso de solvente y requieren de una etapa de aislamiento para separar el producto cristalino formado de sus aguas madres (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). En este trabajo de Tesis se utilizaron métodos en estado sólido y en solución para la obtención de CC, como se indicará en el Capítulo 3.

1.4.4 Diversidad estructural y relevancia farmacéutica de los cocrisales

Teóricamente, los compuestos débilmente ácidos, básicos e incluso los neutros pueden formar CC. Además, un mismo IFA puede cocrystalizar con diferentes COF, lo cual puede originar una gran diversidad estructural para sus CC y ampliar enormemente las formas sólidas de un IFA (Healy *et al.*, 2017). Incluso, los CC pueden existir como diferentes polimorfos, hidratos y solvatos (Figura 1.4), los cuales a su vez tendrán propiedades físicas y estructurales únicas (Healy *et al.*, 2017), aumentando así aún más su diversidad estructural.

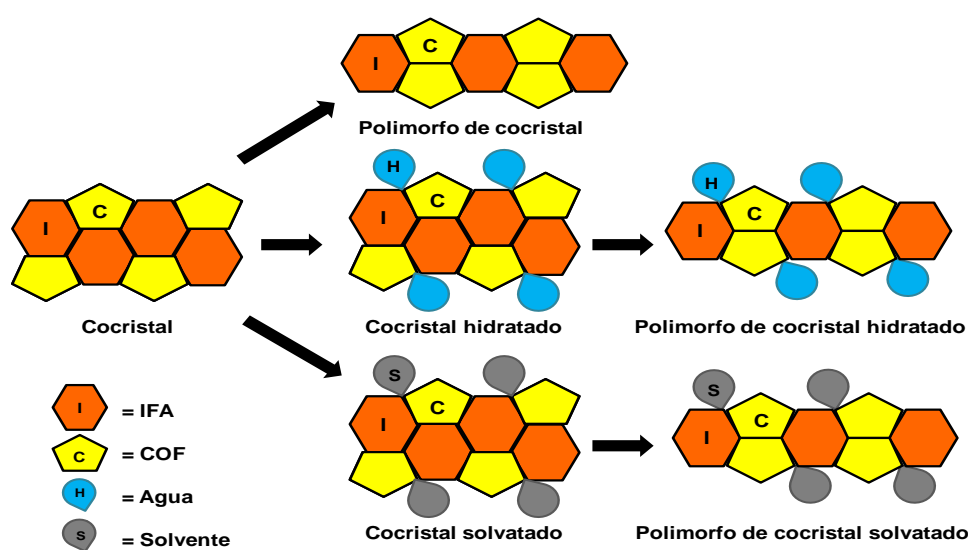


Figura 1.4. Variaciones más comunes encontradas en los CC (Adaptada de Healy *et al.*, 2017).

Los CC también pueden exhibir diversidad estequiométrica; es decir, un mismo IFA y COF pueden cocrystalizar con diferentes proporciones de sus componentes, dando lugar a diferentes CC. Por ejemplo, la carbamazepina forma con el ácido 4-aminobenzoico cocrystalales con estequiometrias 1:1, 2:1 y 4:1 (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). Si bien es importante conocer las fases cristalinas y amorfas de un IFA, la principal motivación para la investigación de los CC es influir de manera directa sobre las propiedades de su estado sólido. Esto impactará directamente en sus propiedades físicas, químicas, mecánicas o biofarmacéuticas, ya que ellas dependen del orden molecular en la forma sólida. Por lo tanto, los cambios e interacciones entre diferentes moléculas del IFA y el COF suelen tener un efecto directo sobre las propiedades mencionadas (Malamatari *et al.*, 2018).

En la Tabla 1.2 se resumen algunas de las propiedades de los IFA que se pueden alterar por la cocrystalización. También, se indican algunos CC farmacéuticos que presentaron mejoras en sus propiedades originales. Vale mencionar que dentro de los ejemplos consignados se encuentran algunas especialidades farmacéuticas.

Tabla 1.2. Algunas propiedades físicas y biofarmacéuticas que se han optimizado por la preparación de CC farmacéuticos.

Propiedades alteradas		Ejemplos de cocrystalales farmacéuticos
Fisicoquímicas	Punto de fusión	Carbamazepina-Nicotinamida. ^a
	Estabilidad en solución, y fotoestabilidad en estado sólido (humedad, calor, luz)	Suglat® (Pragliflozin- <i>L</i> -prolina) ^b y Teofilina-Sacarina. ^c
	Solubilidad acuosa	Sildenafil-Ácido acetil salicílico ^d
Biofarmacéuticas	Biodisponibilidad	Entresto® (Valsartan-Sacubitril) ^b ; Quercetin-Cafeína, Quercetin-Isonicotinamida y Quercetin-Teobromina. ^c
	Velocidad de disolución	Teofilina-Sacarina. ^c
	Propiedades mecánicas (densidad aparente, friabilidad)	Paracetamol-Ácido 5-nitroisoftálico . ^a

^aKaragianni *et al.*, 2018. ^bChavan *et al.*, 2018. ^cKarimi-Jafari *et al.*, 2018. ^dYadav *et al.*, 2009.

1.5 Nanocristales

Más del 75% de las NEQ presentan baja o muy baja Sa, lo que plantea numerosos e importantes problemas para su formulación porque pueden mostrar baja BD, alta variabilidad en estado de ayuno o alimentación, un inicio de acción retardado y falta de proporcionalidad de la dosis (Malamatari *et al.*, 2018). Para superar estos problemas se han propuesto diversas aproximaciones, entre las que se destaca la obtención de formas sólidas alternativas (Sección 1.3) y la reducción del tamaño de partícula (Domingos *et al.*, 2015; Malamatari *et al.*, 2018), mediante micronización y nanonización.

La micronización (reducción del tamaño de partícula hasta valores entre 1 y 20 μm) ha permitido incrementar la Sa y BD oral de muchos IFA (Williams *et al.*, 2013). Lamentablemente, esta técnica puede inducir transiciones polimórficas, aumentar el desorden cristalino e inducir la aglomeración de partículas, entre otros problemas, con un efecto negativo sobre la Sa y la BD (Saravanan *et al.*, 2020). Por ello, en la década de 1990 se desarrollaron procedimientos para obtener partículas cristalinas submicrométricas (con tamaños entre 50 y 1000 nm, Figura 1.5), conocidas como nanocristales.

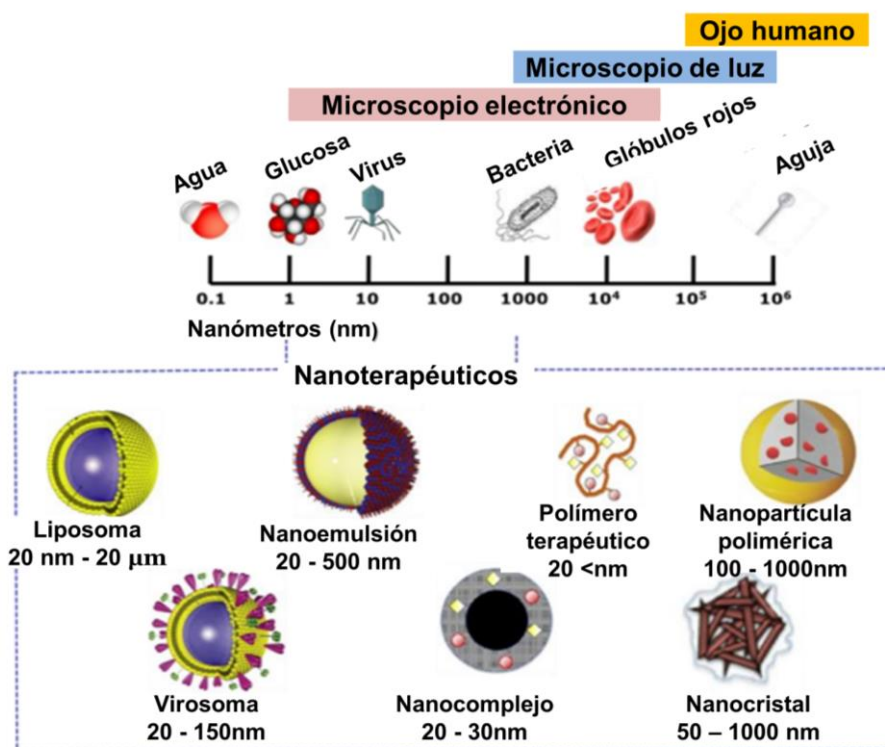


Figura 1.5. Representación comparativa de los nanocristales con otros materiales nanoterapéuticos (Adaptada de Malamatari *et al.*, 2018).

Una característica importante de los NC es que poseen un contenido cercano al 100% (Figura 1.6) del IFA o de la NEQ, en contraste con las nanopartículas de matriz que consisten, por ejemplo, en una matriz polimérica (nanopartículas poliméricas) o lipídica (nanoemulsiones y liposomas) y una dosis de IFA. El alto contenido de los NC los hace muy eficientes en el transporte de los IFA y las NEQ hacia o dentro de las células.

Los NC se producen típicamente en forma de nanosuspensiones, es decir, dispersiones submicrónicas (coloidales) de partículas de IFA, o NEQ con un tamaño medio de partícula <1000 nm (Figura 1.5), que son estabilizadas por tensioactivos, polímeros o por una mezcla de ambos (Müller *et al.*, 2011).

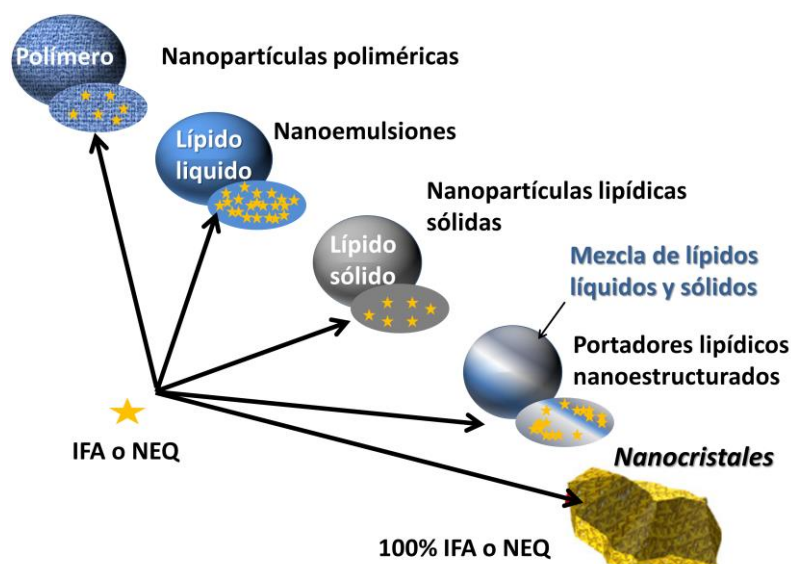


Figura 1.6. Representación estructural esquemática y comparación de carga de IFA, o NEQ, para nanopartículas poliméricas, nanoemulsiones, nanopartículas lipídicas sólidas, portadores lipídicos nanoestructurados y nanocristales (Adaptada de Müller *et al.*, 2011).

1.5.1 Métodos de preparación de nanocristales

Para la obtención de NC existen actualmente varios métodos bien establecidos, los cuales pueden clasificarse en general en tres tipos: los métodos ascendentes, (*bottom up*, en la terminología anglosajona), los descendentes (*top down*, en la terminología inglesa) y las aproximaciones combinadas (Chenga *et al.*, 2018).

En los ascendentes se parte de moléculas en solución; es decir, la muestra a nanonizarse se disuelve en un solvente y a la solución resultante se le agrega un

antisolvente, lo cual ocasiona la precipitación del IFA o de la NEQ. En este proceso es crucial controlar la naturaleza de las partículas formadas (amorphas vs. cristalinas) y evitar el crecimiento de los cristales en el rango de tamaño de μm (Müller *et al.*, 2011). Existen varias tecnologías ascendentes, como por ejemplo, la precipitación controlada de alta gravedad y la sonocrystalización. Una desventaja básica de muchos procesos de precipitación es el uso de solventes orgánicos, los cuales deben eliminarse completamente de los productos obtenidos (Müller *et al.*, 2011).

En los métodos descendentes, el material de partida está compuesto por partículas sólidas de gran tamaño (en el rango de los μm) y por procesos mecánicos se procede a la reducción del tamaño de partículas hasta llegar al tamaño nanométrico (Chenga *et al.*, 2018). Dentro de estos se encuentran la molienda húmeda, la homogeneización a alta presión y la microfluidización.

La principal ventaja de los métodos descendentes sobre los ascendentes es la producción de nanosuspensiones con una alta carga de IFA o NEQ, casi del 100% (Figura 1.6). Además, no utilizan solventes orgánicos, ya que el proceso requiere que el IFA o NEQ se encuentre disperso y no solubilizado en ellos. Más aún, en la mayoría de los casos se utiliza agua, ya que el método es aplicado en IFA o NEQ poco solubles en agua, lo que hace que los métodos descendentes sean más ecológicos. Por ello, la mayoría de las formulaciones farmacéuticas comerciales que contienen NC se producen por métodos descendentes (Malamatari *et al.*, 2018).

Un aspecto importante de la preparación de NC es su caracterización, la cual requiere también de una batería de técnicas analíticas que permitan determinar, por ejemplo, su estructura y morfología, distribución del tamaño de partícula, cristalinidad y propiedades reológicas (Chenga *et al.*, 2018). En la Tabla 1.3 se indican las técnicas de caracterización de NC más comúnmente empleadas.

Tabla 1.3. Algunas técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de nanocristales (Adaptada de Chenga *et al.*, 2018).

Parámetros de caracterización	Ejemplos de métodos analíticos
Estructura y morfología	Microscopía óptica, de barrido electrónico, de transmisión electrónica de barrido por emisión de campo, de fuerza atómica.
Tamaño de partícula y distribución del tamaño de partícula	Dispersión dinámica de luz láser, difracción láser.
Carga superficial	Potencial Zeta, Titulación coloide.
Análisis de estado sólido (cristalinidad)	Difracción de rayos X de polvo, calorimetría diferencial de barrido.
Propiedades reológicas (para nanosuspensiones líquidas)	Viscosimetría, reometría

En este trabajo de tesis se utilizaron métodos descendentes, y dentro de ellos la molienda húmeda (conocida también como nanomolienda en suspensión), para obtener NC, metodología que se detallará en el capítulo 4.

1.5.2 Relevancia farmacéutica de los nanocristales

Los NC son los transportadores de nanopartículas más exitosos (Müller *et al.*, 2011) y su éxito se debe principalmente a su tamaño nanométrico. En la Tabla 1.4 se presentan algunas especialidades farmacéuticas que contienen NC. Cabe remarcar que esta aproximación solo puede aplicarse a IFA y NEQ poco solubles en agua, y que los IFA con alta Sa no pueden formularse como NC (al menos no en un medio de dispersión acuoso) (Müller *et al.*, 2011).

Tabla 1.4. Ejemplos de especialidades farmacéuticas que incorporan IFA en forma de nanocristales (Adaptado de Chenga *et al.*, 2018).

IFA	Nombre comercial	Agencia	Fecha de aprobación	Indicaciones
Sirolimus	RAPAMUNE®	FDA ^a	15/09/1999	Rechazo de injertos, trasplante de riñón
		EMA ^b	13/03/2001	
Aprepitant	EMEND®	FDA ^a	26/03/2003	Prevención de náuseas y vómitos en la quimioterapia del cáncer.
		EMA ^b	11/11/2003	
		PMDA ^c	16/10/2009	
Fenofibrato	TRICOR®	FDA ^a	11/05/2004	Hipercolesterolemia

^aAdministración de Medicamentos y Alimentos de EUA. ^bAgencia Europea de Medicamentos. ^cAgencia de Productos Farmacéuticos y Dispositivos Médicos de Japón.

La formulación como NC de los IFA poco solubles en agua puede resolver sus problemas biofarmacéuticos, como la baja BD oral o penetración en la piel, un volumen de inyección demasiado grande para la administración intravenosa y efectos secundarios no deseados después de la administración intravenosa de formulaciones tradicionales. Esto es posible debido a las características especiales de los NC, entre ellas, el aumento de la velocidad de saturación, de la velocidad de disolución y de la adhesividad a las superficies o membranas celulares, comparado con los polvos de tamaño micrométrico. Estas características se producen porque la nanodimensión cambia las propiedades fisicoquímicas de los materiales (Müller *et al.*, 2011). Otra gran ventaja de los NC de IFA y NEQ es que se pueden formular en todo tipo de formas de dosificación (comprimidos, gránulos, cápsulas) y utilizar diferentes vías de administración (oral, intravenosa, ocular, entre otras).

1.6 Referencias

- Aitipamula, S.; Banerjee, R.; Bansal, A.K.; Biradha, K.; Cheney, M.L.; Choudhury A.R, *et al.*, Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?. *Cryst Growth Des.* 2012, 12, 2147–52. DOI: 10.1021/cg3002948
- Brake, K.; Gumireddy, A.; Tiwari, A.; Chauhan, H.; Kumari, D. In vivo Studies for Drug Development via Oral Delivery: Challenges, Animal Models and Techniques. *Pharm. Anal. Acta.* 2017, 8, 1-11. DOI:10.4172/2153-2435.1000560
- Chavan, R.B.; Thipparaboina, R.; Yadav, B. Shastri, N.R. Continuous manufacturing of co-crystals: challenges and prospects. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2018, 8, 1726-39. DOI:10.1007/s13346-018-0479-7
- Chenga, Z.; Lian, Y.; Kamal, Z. X.; Ma, X.; Chen, J.; Zhou, X.; *et al.*, Nanocrystals Technology for Pharmaceutical Science. *Curr. Pharm. Des.* 2018, 24, 1-11. DOI: 10.2174/13816128246661805180824205
- Domingos, S.; Andréa, V.; Quaresma, S.; Martins, I.C.B.; Minas da Piedade, M.F., Duarte, M.T. New forms of old drugs: improving without changing. *J. Pharm. Pharmacol.* 2015, 67, 830-46. DOI:10.1111/jphp.12384
- European Medicines Agency (EMA). Reflection paper on the use of cocrystals of active substances in medicinal products. London, UK. *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)*. 2015. [Consultado 12 de mayo 2021]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-use-cocrystals-active-substances-medicinal-products_en.pdf#page=6&zoom=100,80,94.
- Food and Drug Administration (FDA). Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals Guidance for Industry. U.S. *Department of Health and Human Services Food and Drug*

- Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2018. [Consultado 10 de mayo 2021]. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Regulatory-Classification-of-Pharmaceutical-Co-Crystals.pdf>.
- Gokhale, M.Y.; Mantri, R.V. Chapter 4: API Solid-Form Screening and Selection. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice 2nd Edition*. Oiu, Y.; Chen, Y.; Zhang, G.Z.; editors.. Oxford, UK: Elsevier Inc.. 2017, 85–112. DOI:10.1016/b978-0-12-802447-8.00004-2
- Healy, A.M.; Worku, Z.A.; Kumar, D.; Madi, A.M. Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystal. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017, 117, 25–46. DOI: 10.1016/j.addr.2017.03.002
- James, S.L.; Adams, C.L.; Bolm, C.; Braga, D.; Paul Collier, P.; Friščić, T.; *et al.* Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 413-47. DOI: 10.1039/C1CS15171A
- Karagianni, A.; Malamataris, M.; Kachrimanis, K. Pharmaceutical Cocrystals: New Solid Phase Modification Approaches for the Formulation of APIs. *Pharmaceutics*. 2018, 10, 1-30. DOI:10.3390/pharmaceutics10010018
- Karimi-Jafari, M.; Padrela, L.; Walker, G.M.; Croker, D.M. Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18, 6370-87. DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00933
- Lim, S. The Process and Costs of Drug Development. (June 28, 2018 · Updated May 31, 2020). U.S. [Consultado 5 de mayo 2021]. Disponible en: <https://theskepticalchemist.com/process-costs-drug-development/>
- Malamataris, M.; Taylor, K.M.G.; Malamataris, S.; Douroumis, D. Kachrimanis, K. Pharmaceutical nanocrystals: Production by wet milling and applications. *Drug Discov. Today*. 2018, 23, 534-547. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.01.016
- Müller, R.H.; Gohla, S.; Keck, C.M. State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, 78, 1–9. DOI:10.1016/j.ejpb.2011.01.007
- Ngilirabanga, J.B.; Rosa, P.P.; Aucamp, M.; Kippie, Y.; Samsodien, H. Dual-drug co-crystal synthesis for synergistic in vitro effect of three key first-line antiretroviral drugs. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020, 60, 1-36. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101958
- Olusanmi, D.; Jayawickrama, D.; Bu, D.; McGeorge, G.; Sailes, H.; Kelleher, *et al.* A control strategy for bioavailability enhancement by size reduction: Effect of micronisation conditions on the bulk, surface and blending characteristics of an active pharmaceutical ingredient. *Powder Technology*. 2014, 258, 222- 33. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.03.032
- Rajesh Goud, N.; Jagadeesh Babu, N.; Nangia, A. Sulfonamide_Pyridine-N-oxide Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2011, 11, 1930–39. DOI: 10.1021/cg200094x
- Saravanan, D.; Prakash, M.; Khullar, P.; Venis, R. Micronization and Agglomeration: Understanding the Impact of API Particle Properties on Dissolution and Permeability Using Solid State and Biopharmaceutical “Toolbox”. *J. Pharm. Innov.* 2020, 16, 136-51. DOI: 10.1007/s12247-019-09424-1

- Shah, A.K.; Agnihotri, S.A. Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: An overview. *J. Control Release.* 2011, 156, 281-96. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.003
- Steed, J.W. The Role of Cocrystals in Pharmaceutical Design. *Trends. Pharmacol Sci.* 2013; 34: 185-93. DOI: 10.1016/j.tips.2012.12.003
- Stoler, E.; Warner, J.C.; Non-Covalent Derivatives: Cocrystals and Eutectics. *Molecules* 2015, 20, 14833-48. DOI:10.3390/molecules200814833
- Williams, H.D.; Trevaskis, N.L.; Charman, S.A.; Shanker, R.M.; Charman, W.N.; Pouton, C.W, et al., Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol. Rev.* 2013, 65, 315–499, DOI: 10.1124/pr.112.005660
- Yadav, A.V.; Shete, A.S.; Dabke, A.P.; Kulkarni, P.V. Sakhare, S.S. Co-Crystals: A Novel Approach to Modify Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *Indian J. Pharm. Sci.* 2009, 71, 359-70. DOI: 10.4103/0250-474X.57283
- Zhang, C.; Xiong, Y.; Jiao, F.; Wang, M. Li, H. Redefining the Term of “Cocrystal” and Broadening Its Intention. *Cryst. Growth Des.* 2019, 19, 1471–78. DOI: 10.1021/acs.cgd.8b01537
- Zhang G.G.Z.; Zhou D. Chapter 2: *Crystalline and Amorphous Solids. Developing Solid Oral DosageForms: Pharmaceutical Theory and Practice 2nd Edition.* Oiu, Y.; Chen, Y.; Zhang, G.Z.; editors. Oxford, UK: Elsevier Inc. 2017. DOI:10.1016/B978-0-12-802447-8.00002-9
- Zurdo, J. Developability assessment as an early de-risking tool for biopharmaceutical development. *Pharm. Bioprocess.* 2013, 1(1), 29–50. DOI: 10.4155/pbp.13.3

Capítulo

2

- 2.1 Introducción
- 2.2 Caracterización de las formas sólidas de fármacos: necesidad de múltiples técnicas analíticas
- 2.3 Técnicas espectroscópicas
 - 2.3.1 Espectroscopia infrarroja
 - 2.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido
- 2.4 Difracción de rayos X
 - 2.4.1 Difracción de rayos X de monocristal
 - 2.4.2 Difracción de rayos X de polvo
- 2.5 Análisis térmico
 - 2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido
 - 2.5.2 Termogravimetría
 - 2.5.3 Termomicroscopía
- 2.6 Microscopías
 - 2.6.1 Microscopia óptica de luz convencional y polarizada
 - 2.6.2 Microscopia electrónica de barrido
- 2.7 Solubilidad y velocidad de disolución *in vitro*
 - 2.7.1 Solubilidad
 - 2.7.2 Velocidad de disolución
- 2.8 Referencias

2

CARACTERIZACIÓN DE FORMAS SÓLIDAS DE FÁRMACOS

2.1 Introducción

Como se indicó en el Capítulo 1, el bajo número de nuevos fármacos descubiertos durante la última década impulsó la I + D de nuevas formas sólidas de IFA conocidos (Pindelska *et al.*, 2017) con el fin de mejorar sus propiedades físicas, químicas, biofarmacéuticas o mecánicas desfavorables. De esta manera se pudo contar con herramientas farmacoterapéuticas optimizadas y opciones adicionales para la gestión regulatoria y el ciclo de vida de los IFA (Pindelska *et al.*, 2017).

Ahora bien, la existencia de diferentes formas sólidas debe establecerse fehacientemente, y para ello es necesario la utilización de varias técnicas analíticas de caracterización complementarias. Una única técnica puede conducir a caracterizaciones incompletas o equivocadas del estado sólido de los IFA. Ejemplos de esto son los casos del clorhidrato de pioglitazona, gliburida, irbesartan y el clorhidrato de ropinirol (Sawant y Naik, 2013).

En este Capítulo se presenta una breve descripción de las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de las formas sólidas obtenidas en este trabajo de Tesis Doctoral. Cabe mencionar, que para su descripción se han omitido desarrollos matemáticos y detalles experimentales relativos a la instrumentación.

2.2 Caracterización de las formas sólidas de fármacos: necesidad de múltiples técnicas analíticas

Para la caracterización de los polimorfos, solvatos/hidratos, cocrisales o formas amorfas de un IFA, las cuales se describen en conjunto como formas sólidas (Pindelska *et al.*, 2017), se podría utilizar, en principio, cualquier técnica analítica

que mida las propiedades del estado sólido de un material (Brittain, 2009). Sin embargo, algunas técnicas son sensibles a las diferencias en la estructura cristalina o al entorno molecular, pero no todas. Algunas son capaces de distinguir entre conjuntos particulares de polimorfos, solvatos y sólidos amorfos, otras no (Brittain, 2009). Por ello, para la correcta caracterización de las formas sólidas de los IFA se debe utilizar una batería de técnicas analíticas, de modo que los datos de cada una se puedan cointerpretar, para formar una imagen más completa del estado sólido (Gokhale y Mantri, 2017).

Las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización del estado sólido de los IFA incluyen una variedad de métodos físicos, térmicos, espectroscópicos y difractométricos (Gokhale y Mantri, 2017). Estos abarcan la interfaz entre la química, física, la ciencia de los materiales, la ciencia de la superficie y la química supramolecular. Proporcionan conocimiento y comprensión de fenómenos complejos como el polimorfismo, el desorden en el estado cristalino, las interacciones al nivel molecular en materiales cristalinos y amorfos, entre otros aspectos. La Figura 2.1 presenta las técnicas analíticas típicamente utilizadas para la caracterización de las formas sólidas de los IFA, y la Tabla 2.1 describe las potenciales aplicaciones de varias de las técnicas indicadas en la Figura 2.1.



Figura 2.1. Algunas de las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de formas sólidas de los IFA (Adaptada de Healy *et al.*, 2017).

Tabla 2.1. Potenciales aplicaciones de las técnicas analíticas típicamente utilizadas en la caracterización de las formas sólidas de los IFA (Adaptada de Pindelska *et al.*, 2017).

Aplicaciones	Técnicas ^a						
	SCXRD ^b	PXRD ^c	MIR ^d	SSNMR ^e	DSC ^f	TG ^g	HSM ^h
Identificación/cuantificación del contenido de fase cristalina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Estructura cristalina	✓	✓		✓			
Estructura molecular			✓	✓			
Información geométrica de moléculas y red cristalina	✓	✓		✓			
Interacción por enlace tipo puente hidrogeno	✓	✓	✓	✓			
Interacciones débiles	✓	✓					
Estabilidad térmica		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Transformación de fases		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Punto de fusión y transición vítrea					✓		
Deshidratación/hidratación	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sustancias amorfas			✓	✓	✓		
Habito/Morfología							✓

^aPor sus siglas en inglés: ^bsingle crystal X-ray diffractometry; ^cpowder X-ray diffractometry; ^dmid-infrared; ^esolid state nuclear magnetic resonance; ^fdifferential scanning calorimetry; ^gthermogravimetry; ^hhot stage microscopy.

La descripción de las técnicas analíticas empleadas en este trabajo de Tesis se iniciará con las espectroscopías infrarroja (IR) y de resonancia magnética nuclear (RMN), se continuará con la difracción de rayos X (DRX), los métodos de análisis térmicos (AT) y las microscopías ópticas (MO). Para finalizar, se hará una breve descripción de dos propiedades que son también claves para la caracterización de las formas sólidas de un IFA: la solubilidad (S) y velocidad de disolución (VD) *in vitro*.

2.3 Técnicas espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas son fundamentales para obtener información detallada sobre la estructura de átomos y moléculas. Dentro de ellas, la Infrarroja y la de resonancia magnética nuclear en estado sólido han encontrado amplia utilización en el área farmacéutica por sus diversas aplicaciones. Así, se pueden aplicar para: identificar sustancias orgánicas cristalinas y amorfas; realizar su caracterización estructural (distribución espacial de moléculas); determinar su orden y desorden; estudiar sus conformaciones moleculares e interacciones intra- e intermoleculares; investigar la dinámica molecular y las transiciones de fase en el

estado sólido (por ejemplo, transiciones polimórficas); monitorear reacciones y procesos tales como la cristalización y desolvatación, y el análisis cuantitativo (Pindelska *et al.*, 2017). A continuación, se describen algunos aspectos relevantes de ambas técnicas.

2.3.1 Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia IR es una técnica analítica rápida, originalmente desarrollada para identificar los grupos funcionales de compuestos químicos, pero en los últimos años se ha aplicado para identificar polimorfos, CC, sales y fases amorfas (Healy *et al.*, 2017). Se basa en la medición de la cantidad de radiación que es absorbida (o emitida) por una muestra en función de la longitud de onda IR, lo cual da lugar al denominado espectro IR (Bunaciu *et al.*, 2010). Cabe señalar, que esta región comprende tres subregiones: el infrarrojo lejano ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$), el infrarrojo medio ($4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo cercano ($13.000\text{-}4.000\text{ cm}^{-1}$). Ello ha dado lugar a tres espectroscopías IR diferentes: la espectroscopía en el IR lejano (FIR), la del IR medio (MIR) y la del IR cercano (NIR), cuyas respectivas siglas provienen del inglés (Bunaciu *et al.*, 2010).

La introducción de la transformada de Fourier en la instrumentación IR generó una verdadera revolución y dio lugar a la espectroscopia FTIR (del inglés *Fourier Transform Infra-red*), la cual mejoró notablemente la resolución de la técnica (Bunaciu *et al.*, 2010).

La gran mayoría de las moléculas orgánicas exhiben muchas bandas de absorción en la región del IR medio, la cual comprende principalmente al estiramiento (tensión) y flexión de bandas fundamentales de IR. Las formas sólidas pueden diferir en el número, posiciones y absorbancias de esas bandas (Pindelska *et al.*, 2017), de allí la importancia de los espectros MIR. Pero, no siempre resultan definitorios en el caso de los polimorfos, ya que estos pueden presentar espectros similares, particularmente si se utilizan el método de la pastilla de KBr. La muestra puede experimentar transiciones de fases inducidas por el mortereado y la compresión, dos procedimientos habituales para obtener dichas pastillas (Pindelska *et al.*, 2017). En esos casos, y en el de muestras que presentan alguna dificultad analítica utilizando pastillas de KBr, se suele recurrir a la FTIR de reflectancia total atenuada, más comúnmente denominada Reflectancia Total Atenuada (ATR por su

sigla inglesa, Figura 2.2) y a la FTIR de reflectancia difusa (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*, DRIFTS, por su sigla en inglés, Figura 2.3), dos técnicas que permiten medir la intensidad reflejada por una muestra, en lugar de la absorbida (Bunaciu *et al.*, 2010).

La ATR, igualmente conocida como espectroscopía de onda evanescente (USP 42, 2019, p. 8911), se basa en el fenómeno óptico de la radiación pasando a través de un medio con un alto índice de refracción (Figura 2.2), a un cierto ángulo de incidencia que se refleja totalmente de manera interna en un borde que está en contacto con un material con un índice de refracción más bajo (USP 42, 2019, p. 7214). El medio con alto índice de refracción y excelentes propiedades de transmisión IR se conoce como elemento de reflexión interna o cristal ATR (USP 42, 2019, p. 7214).

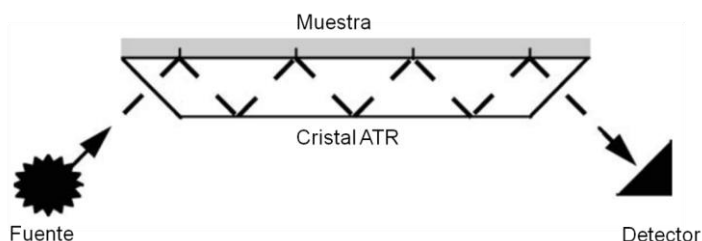


Figura 2.2. Representación esquemática de la reflexión total atenuada en un cristal ATR (Traducida de Bunaciu *et al.*, 2010).

Para obtener el espectro ATR, la muestra en análisis debe colocarse en contacto cercano con el elemento de reflexión interna (diamante, germanio u otro material adecuado con un alto índice de refracción, USP 42, 2019, p. 7214). En el área farmacéutica se usan accesorios ATR colocados en posición horizontal (Figura 2.2) con área de contacto pequeña y ángulo de reflexión fija, que no requieren preparación de muestra. Permiten registrar un espectro MIR de manera simple y rápida, a partir una cantidad pequeña de cualquier material en fase condensada (USP 42, 2019, p. 8912).

En la DRIFTS, la muestra (polvos sin ser compactados para formar una pastilla, diluidos o no con KBr, y superficies rugosas) se irradia con un haz de luz IR en cualquiera de sus tres subregiones. Como consecuencia de la interacción de la luz IR con la muestra, el haz de luz puede sufrir absorción, reflexión o dispersión, pero solo la parte de la luz dispersada dentro de la muestra y que retorna a la superficie,

se considera **reflexión difusa** (Figura 2.3) y será captada por el detector del espectrómetro (Bunaciu *et al.*, 2010).

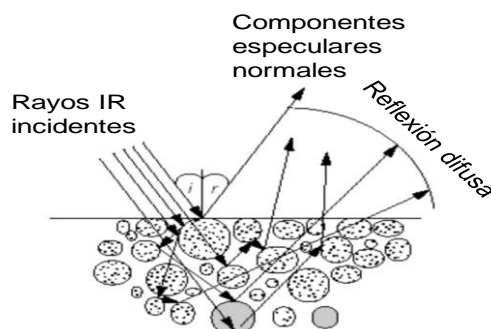


Figura 2.3. Representación esquemática de la reflexión difusa en un material particulado analizado por DRIFTS.

Los DRIFTS, en su mayoría resultan de fotones que han sido transmitidos a través de decenas de partículas. Por ello, tienen una apariencia similar a los espectros de transmisión, aunque no obedecen a la Ley de Lambert y Beer (USP 42, 2019, p. 8913). Son la representación de las unidades lineales Kubelka-Munk (que corresponden aproximadamente a la absorbancia en la FTIR, usando la pastilla de KBr) en función de números de onda o frecuencias en cm^{-1} (USP 42, 2019, p. 8913).

2.3.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido

La espectroscopía de RMN es una técnica analítica basada en las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos (USP 42, 2019, p. 7043). Al igual que con otras espectroscopías, la absorción o emisión de energía electromagnética a frecuencias características proporciona información sobre la estructura molecular (USP 42, 2019, p. 7043). Sin embargo, en la RMN los niveles discretos de energía entre los que ocurren las transiciones se presentan solo cuando el núcleo se somete a un campo magnético (USP 42, 2019, p. 7043).

Dentro de las técnicas de RMN, la resonancia magnética nuclear en estado sólido (*Solid state nuclear magnetic resonance*, SSNMR, por su sigla en inglés) ha demostrado una enorme importancia y potencial en la caracterización de CC, polimorfos, hidratos y solvatos (Healy *et al.*, 2017). No es destructiva y proporciona información relacionada con el entorno molecular local; el número de moléculas en la unidad asimétrica, y los desplazamientos químicos característicos relacionados con

formas sólidas particulares. La SSNMR también puede emplearse para dilucidar estructuras cristalinas, si estas no se pueden determinar utilizando técnicas basadas en la difracción de rayos X. En efecto, la SSNMR se considera una técnica complementaria a las técnicas de difracción de rayos X (Healy *et al.*, 2017), ya que permite el acceso a una variedad de experimentos unidimensionales y bidimensionales (1D y 2D), que se enfocan en diferentes núcleos y pueden probar la conectividad internuclear (Healy *et al.*, 2017).

Los espectros de SSNMR, que se caracterizan por la presencia de picos, cuyo número indica el número de núcleos activos de la sustancia analizada y su desplazamiento químico (frecuencia), indica el tipo de átomos presentes. Se obtienen habitualmente mediante **técnicas de alta resolución**. Estas involucran el desacoplamiento de alta potencia y el giro de ángulo mágico (*Magic angle spin*, MAS, por su sigla en inglés), que permiten eliminar el ensanchamiento de línea inducido por los componentes anisotrópicos de las interacciones. También aumentar la intensidad de las señales por transferencia de polarización de protones (espines abundantes) a los núcleos de ^{13}C y ^{15}N observados (espines diluidos) una técnica conocida como polarización cruzada (del inglés *Cross Polarization*, CP) (Pindelska *et al.*, 2017). Precisamente, la combinación CP/MAS permite tanto mejorar la sensibilidad de la RMN para los sólidos, como superar los problemas asociados con el hecho de que la movilidad molecular es relativamente baja en este estado (Harris *et al.*, 2007). Para los polimorfos farmacéuticos, CC, sales y solvatos, la SSNMR se utiliza habitualmente en su versión de alta resolución para registrar espectros CP/MAS de ^{13}C y ^{15}N (Pindelska *et al.*, 2017).

2.4 Difracción de rayos X

La DRX es una herramienta básica en la caracterización de materiales cristalinos, porque brinda información fundamental sobre la estructura cristalina de una sustancia

La DRX resulta de la interacción entre los rayos X y las nubes de electrones de los átomos, iones y moléculas que componen una dada sustancia cristalina. Dependiendo del ordenamiento atómico, pueden surgir interferencias constructivas o destructivas de los rayos X dispersados. Estas interferencias son constructivas cuando la diferencia de recorrido entre dos ondas de rayos X difractadas es un

múltiplo entero de la longitud de onda (Figura 2.4, USP 42, 2019, p. 7259). Esta condición de difracción está descrita por la ecuación de Bragg (Ec. 2.1, USP 42, 2019, p. 7259):

$$2d_{hkl} \text{sen}\Theta_{hkl} = n\lambda \quad \text{Ec. 2.1}$$

en donde la longitud de onda, λ , de los rayos X es del mismo orden de magnitud que la distancia entre planos sucesivos de la red cristalina (Ångström 10^{-10} metros), o d_{hkl} (también llamada espaciamiento d); Θ_{hkl} es el ángulo entre el rayo incidente y la familia de planos reticulares (hkl) y $\text{sen}\Theta_{hkl}$ es inversamente proporcional al espaciamiento d (USP 42, 2019, p. 7259).

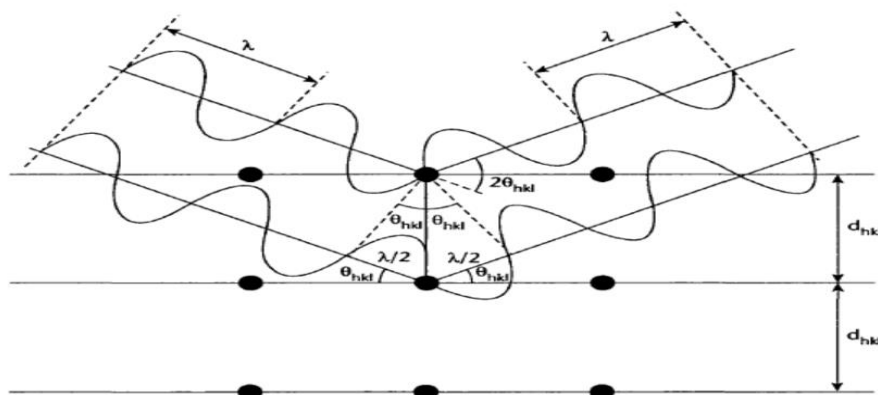


Figura 2.4. Representación esquemática de un conjunto de planos que verifican la difracción de Bragg (Tomado de la USP 42, 2019, p. 7259).

La dirección y espaciado de los planos con referencia a los ejes de la celda unidad, cuyas dimensiones están dadas por los espaciamientos a , b y c , y los ángulos entre ellos α , β y γ (USP 42, 2019, p. 7259), están definidos por los índices de Miller $\{hkl\}$, que son los recíprocos, reducidos al número entero inmediatamente inferior, de las intersecciones que realiza un plano con los ejes de la celda unidad. Cada conjunto de planos de una estructura cristalina tiene un ángulo de Bragg correspondiente, Θ_{hkl} , asociado con él, para una λ específica (USP 42, 2019, p. 7259).

La intensidad de los picos de difracción depende de la cantidad de electrones que contienen las nubes electrónicas de los átomos o iones que forman la estructura cristalina (llamado factor de dispersión). Es por ello que la determinación de la posición de átomos livianos es poco precisa, como por ejemplo, el átomo de hidrógeno

En el área farmacéutica tiene aplicaciones en todo el proceso de I+D y comercialización de fármacos, desde el descubrimiento hasta la liberación de lotes, ya que en este tipo de procesos es clave el estudio de materiales policristalinos[✧] y de cristales únicos (monocristales[†]).

2.4.1 Difracción de rayos X de monocristal

Para lograr una completa caracterización de las formas sólidas de un IFA es muy importante conocer sus estructuras cristalinas, y la DRX de monocristal (*Single Crystal X-ray Diffraction*, SCXRD, por su sigla en inglés) es la técnica analítica más importante para determinarlas (Pindelska *et al.*, 2017). La SCXRD se basa en la difracción de rayos X, producida por las nubes electrónicas de los átomos o iones que constituyen la estructura cristalina, y ello la hace comparativamente insensible a las posiciones de los átomos de H (Healy *et al.*, 2017). La determinación de la estructura cristalina mediante esta técnica es la manera más precisa de dilucidar y comprender la estructura cristalina 3D y las propiedades físicas de una forma cristalina frente a otra (Gokhale y Mantri, 2017). Por eso, la SCXRD se considera el "estándar de oro" para la caracterización estructural de cristales, CC, hidratos y solvatos (Healy *et al.*, 2017).

La estructura cristalina determinada por SCXRD revela la composición química del cristal, y también brinda información geométrica sobre las moléculas, átomos o iones que la constituyen (longitudes y ángulos de enlace, y ángulos de torsión), así como las distancias interplanares y la geometría de las interacciones intermoleculares (Pindelska *et al.*, 2017). La SCXRD también proporciona información sobre el patrón de enlace de hidrógeno, la densidad y el desorden cristalino (Gokhale y Mantri, 2017). Además, es una herramienta poderosa para evaluar la pureza de la fase estudiada, denominada pureza de fase, lo cual hace referencia a la presencia de una sola fase cristalina dominante, que es un atributo deseable para un IFA (Gokhale y Mantri, 2017). Las impurezas de fase son típicamente niveles bajos de otras formas sólidas que pueden estar presentes junto.

39

[✧] Un material **policristalino** es un agregado de pequeños cristales de cualquier sustancia, a los cuales, por su forma irregular, a menudo, se les denomina cristalitas o granos cristalinos. La mayoría de los sólidos cristalinos son un conjunto de cristales pequeños o granos. Durante la cristalización aparecen pequeños cristales o núcleos en distintas posiciones. Estas orientaciones cristalográficas son completamente al azar.

[†] Un **monocristal o material monocristalino** es un cristal que consiste en una repetición ininterrumpida de la celda unitaria en tres dimensiones, con propiedades ópticas uniformes. Es un cristal único libre de impurezas, inclusiones e imperfecciones

con la deseada e impactan sobre la estabilidad y potencialmente el desempeño del medicamento (Gokhale y Mantri, 2017). Cabe destacar que en la SCXRD, las características estructurales se definen sobre la base del monocristal analizado (Pindelska *et al.*, 2017) y este puede no ser representativo de la muestra global porque podría ser un polimorfo o una impureza. Por lo tanto, las mediciones de SCXRD deben complementarse con el patrón de PXRD de la muestra sólida a granel. Una vez resuelta la estructura a partir de los datos de SCXRD, se debe calcular el patrón de PXRD teórico correspondiente a dicha estructura cristalina y compararlo con el experimental obtenido de la muestra a granel. Si ambos patrones son coincidentes se puede afirmar que la muestra sólida a granel es una fase con la misma estructura que el monocristal seleccionado para el experimento SCXRD. Pero, si el patrón experimental contiene más picos que el calculado, la muestra a granel puede ser una mezcla de dos o más fases cristalinas (Pindelska *et al.*, 2017).

2.4.2 Difracción de rayos X de polvo

Una limitación importante y natural de la SCXRD es la necesidad de contar con monocristales adecuados para resolver la estructura cristalina (Gokhale y Mantri, 2017), los cuales son difíciles de obtener para los compuestos orgánicos en general, y para los IFA y sus formas sólidas en particular. En efecto, la mayoría de las sustancias farmacéuticas solo se pueden preparar como polvos microcristalinos. Además, durante una evaluación de rutina del IFA, generalmente, es suficiente establecer su forma polimórfica o verificar la formación de una sal o un CC. Por este motivo, y por la sencillez de su funcionamiento y como los datos a analizar son generados por una muestra en polvo sin necesidad de obtener monocristales (Gokhale y Mantri, 2017), la difracción de rayos X de polvo (*Powder X-ray diffraction*, PXRD por su sigla en inglés) es la técnica predominante para la caracterización de sólidos farmacéuticos.

Se supone que una muestra en polvo es policristalina, de manera que si se la irradia con rayos X en cualquier ángulo Θ_{hkl} habrá siempre cristalitas en una orientación que permitan la difracción de esos rayos de acuerdo con la ley de Bragg (Ec. 2.1, USP 42, 2019, p. 7259). Esto permitirá obtener un patrón característico de difracción de rayos X para una dada λ de los rayos X, el cual es la representación de

la intensidad de los rayos X difractados en función del doble del ángulo de Bragg Θ (Ec. 2.1) o de los espaciamentos d . Los patrones de polvos, o difractogramas, se caracterizan por la presencia de picos de difracción (también conocidos como "líneas", "reflexiones" o "reflexiones de Bragg") (USP 42, 2019, p. 7260). Las posiciones de dichos picos son características de la red cristalina (espaciamentos d) y sus intensidades teóricas dependen del contenido de la celda unidad cristalográfica (naturaleza y posiciones de los átomos) y los perfiles de las líneas dependen de la perfección y extensión de la red cristalina. Bajo estas condiciones, el pico de difracción tiene una intensidad finita que depende del arreglo atómico, tipo de átomos, desplazamiento térmico e imperfecciones estructurales, así como de las características del instrumento (USP 42, 2019, p. 7260).

En esencia, de un patrón de difracción de un polvo se pueden obtener tres tipos de información: la posición angular de las líneas de difracción (dependiendo de la geometría y el tamaño de la celda unidad); las intensidades de las líneas de difracción (dependiendo principalmente del tipo y arreglo de los átomos y de la orientación de las partículas dentro de la muestra), y los perfiles de las líneas de difracción (dependiendo de la resolución instrumental, el tamaño de los cristalitos, la tensión y el espesor de la muestra) (USP 42, 2019, p. 7259).

La relación entre fase cristalina y patrón de polvo hace posible la *identificación de fases cristalinas*, la aplicación más extendida de la PXRD. Dado que distintos patrones de PXRD corresponden a diferentes estructuras cristalinas, estos pueden considerarse como "huellas dactilares" de fases cristalinas específicas (diferentes IFA, polimorfos, solvatos, sales y CC de un mismo IFA) (Pindelska *et al.*, 2017).

Como la PXRD es sensible al orden estructural también se la utiliza para la caracterización del tipo de orden presente en el IFA y los excipientes (cristalino o amorfo); la identificación de la forma sólida del IFA y de los excipientes presentes en un medicamento; el monitoreo de la conversión de la forma sólida del IFA durante la fabricación; la detección de impurezas cristalinas en materias primas y medicamentos, entre otras aplicaciones (Ivanisevic *et al.*, 2010).

2.5 Análisis térmico

El análisis térmico (AT), es decir el estudio de la relación entre una propiedad de una muestra y su temperatura a medida que la muestra es calentada o enfriada

de manera controlada (Lever *et al.*, 2014). Es fundamental para la caracterización de las formas sólidas de los IFA, sean estas amorfas o cristalinas, monocomponentes o multicomponentes (Healy *et al.*, 2017). De las varias técnicas del AT, las más utilizadas en el área farmacéutica son la calorimetría diferencial de barrido (DSC); la termogravimetría (TG) o análisis termogravimétrico (TGA), y la termomicroscopía o microscopía de platina calentable (HSM), cuyas respectivas siglas provienen del inglés. A continuación, se describen algunos aspectos generales de esas tres técnicas.

2.5.1 Calorimetría diferencial de barrido

La DSC es una técnica cualitativa y cuantitativa rápida que mide el calor absorbido o liberado por unidad de tiempo (es decir, la velocidad de flujo calórico o simplemente el flujo calórico) por una muestra, en comparación con una referencia térmicamente inerte, cuando esta es calentada, enfriada o mantenida a una temperatura fija (USP 42, 2019, p. 7235). El flujo de calor se deriva de la diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia térmicamente inerte, o de la diferencia de potencia eléctrica entre la muestra y la referencia, según se trate de analizadores DSC de flujo de calor (*Heat-flow DSC*, en la terminología anglosajora) o de compensación de potencia (*Power-compensation DSC*, en idioma inglés), respectivamente (USP 42, 2019, p. 7235).

Como es sabido, al calentar o enfriar una muestra, esta puede absorber calor (proceso endotérmico), liberar calor (proceso exotérmico) o cambiar su capacidad calorífica (C_p). Los procesos endotérmicos como la fusión, deshidratación/desolvatación, evaporación, sublimación y termodegradación endotérmica (Healy *et al.*, 2017), se observarán en una **curva DSC** (la cual es una gráfica del flujo de calor en función de la temperatura o el tiempo) como picos endotérmicos. En cambio, los procesos exotérmicos, como la cristalización o la descomposición exotérmica, se visualizarán en la curva DSC como picos exotérmicos (Healy *et al.*, 2017). El área bajo la curva de esos picos DSC es directamente proporcional al cambio de entalpía (ΔH) involucrado en el proceso, y ello permite determinar de manera sencilla y con buena precisión, entalpías de fusión, cristalización, desolvatación o de transición (USP 42, 2019, p. 7236). En cambio, los procesos en donde haya solo un cambio en

la Cp de la muestra darán lugar a escalones en las curvas DSC, y a partir de ellos se podrán calcular los ΔC_p asociados a dichos procesos (Abraham *et al.*, 2018).

En la caracterización de las formas sólidas del IFA, la DSC es una herramienta fundamental para la determinación de puntos de fusión; temperaturas de transición vítrea; ΔH y temperaturas de transición (fusión, cristalización, transiciones sólido-sólido); grado de cristalinidad y pureza térmica; contenido de fases amorfas, entre otras aplicaciones, para IFA y medicamentos y, en general para materiales sólidos, semisólidos y líquidos (USP 42, 2019, p. 7235).

La DSC es también muy útil para la caracterización de cocrystalos, ya que permite detectar su formación e incluso predecir si una mezcla binaria tiene la capacidad de cocrystalizar (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014; Saganowska y Wesolowski, 2018). En efecto, la DSC se puede utilizar para evaluar la formación de CC *in situ* (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014) porque cuando se calientan mezclas de dos reactantes capaces de formar un CC, dichas mezclas generalmente producen dos endotermas de fusión (a temperaturas diferentes a las de los componentes de partida) y un pequeño evento exotérmico entre ellas, aunque este último puede no estar presente (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014). La primera endoterma corresponde a la fusión del eutéctico IFA-COF; la segunda a la fusión del CC, y el pico exotérmico es indicativo del proceso de cocrystalización (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014). En algunas mezclas binarias, en lugar de solo dos endotermas, se pueden observar varias endotermas, cuyas temperaturas características (inicio y pico) son diferentes a las de los componentes puros, y se asocian a las fusiones de una mezcla eutéctica metaestable, de una mezcla eutéctica y del CC formado (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014). En cambio, las curvas DSC de las mezclas binarias que no forman CC exhiben una exoterma pequeña, previa a la endoterma de fusión del componente de menor punto de fusión, la cual está asociada a la fusión de la mezcla eutéctica (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014; Karagianni, *et al.*, 2018).

2.5.2 Termogravimetría

La TG o TGA es una técnica de AT que mide la masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo en una atmósfera controlada (Pindelska *et al.*, 2017). Por lo tanto, la TG es útil para caracterizar materiales que exhiben pérdidas o

ganancias de masa ocasionadas por cambios físicos (sorción o desorción de agua o solventes) y químicos (descomposición, oxidación y reducción).

Los datos obtenidos en un experimento TG son un conjunto de valores medidos de masa, en función de la temperatura (T) o el tiempo (t), y su representación gráfica se conoce como **curva TG o curva TGA**. Se caracteriza por la presencia de saltos o escalones, y es única para cada material. A fin de visualizar mejor los cambios de masa, la curva TG normalmente se acompaña con la **curva DTG** (del inglés *derivative thermogravimetry*), la cual es la representación de la derivada primera de la masa con respecto al t o T, y se caracteriza por presentar picos en lugar de saltos como la curva TG. Por ello, la determinación del inicio y finalización de los eventos de pérdida de masa es más precisa en la DTG que en la TG, y esta es una de sus aplicaciones principales.

En el área farmacéutica la TG es valiosa para estudiar la desolvatación o deshidratación de materias primas y productos farmacéuticos; determinar el contenido de humedad y solventes (Pindelska *et al.*, 2017); optimizar y elegir las condiciones de secado de productos liofilizados y para diferenciar transiciones sólido-sólido de desolvataciones o deshidrataciones. La TG también es útil para estudiar y predecir la estabilidad térmica y oxidativa de los materiales; la vida útil de un producto; la cinética de descomposición, y el efecto de atmósferas reactivas o corrosivas sobre los materiales.

2.5.3 Termomicroscopía

La HSM, también conocida como termomicroscopía, es una técnica analítica que combina la microscopía y el AT para la caracterización del estado sólido de materiales en función de la T o el t, entre -200 y 500 °C (Pindelska *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2020).

Hay varias razones por las que la TM se utiliza para caracterizar el estado sólido de los IFA. Entre ellas, permite la observación de la propiedad más obvia de un material, a saber, la apariencia física. Además, es un método simple y relativamente económico, ya que la configuración del instrumento consta básicamente de un microscopio, un portamuestras y un sistema que permite la captura de imágenes y la medición de T (Stieger *et al.*, 2012). Otra de sus grandes ventajas es que se pueden realizar observaciones durante el calentamiento y

enfriamiento de unos pocos miligramos de una muestra colocada en un portaobjetos de un microscopio (Pindelska *et al.*, 2017), utilizando luz normal o polarizada. En este último caso, se agregan filtros de luz polarizada en el microscopio, lo cual permite detectar con mayor facilidad los procesos de fusión, sublimación y cristalización de las muestras (Pindelska *et al.*, 2017).

En estudios farmacéuticos, la HSM se puede utilizar para evaluar la morfología y las propiedades del estado sólido de los IFA y otros compuestos farmacéuticamente relevantes (Kumar *et al.*, 2020). Básicamente, se puede usar para determinar rangos de fusión; observar procesos de nucleación y crecimiento de cristales (que se pueden usar en la búsqueda de nuevas formas polimórficas); detectar transformaciones sólido-sólido y procesos de sublimación o evaporación o solidificación, así como para el cribado de polimorfos y CC (Pindelska *et al.*, 2017). Además, es valiosa para la interpretación de los resultados DSC y TG, los cuales pueden confirmarse con éxito mediante experimentos de HSM (Pindelska *et al.*, 2017).

2.6 Microscopías

El ojo humano es capaz de resolver dos puntos que están separados 0.2 mm entre sí; de allí que, cualquier valor por debajo de 0,1- 0,2 mm requiera algún tipo de aumento. Por ello, y con el fin de superar las limitaciones de la vista humana, se desarrolló el microscopio (Akhtar *et al.*, 2018), el cual se puede dividir, según la fuente para producir la imagen, en dos categorías: el microscopio óptico y el electrónico. La aplicación de cada uno de ellos da lugar a la microscopía óptica y la electrónica, respectivamente (Akhtar *et al.*, 2018). A continuación, se describen algunos aspectos relevantes de ambas técnicas.

2.6.1 Microscopia óptica de luz convencional y polarizada

La MO es una técnica apropiada para caracterizar partículas no esféricas (USP 42, 2019, p. 7059) y con un tamaño de 1 μm o superior. Se basa en la incidencia de un haz de luz visible sobre una muestra (colocada en el portaobjeto de un microscopio óptico) que puede reflejar o transmitir dicha luz para ser detectada, después de la amplificación, mediante sistemas ópticos, el ojo humano o por

cámaras de video (Murphy, 2001). La adición de filtros polarizadores genera el microscopio de luz polarizada, o microscopio petrográfico, y su utilización da lugar a la microscopía óptica de luz polarizada (MOP).

La MO y la MOP se utilizan en el área farmacéutica para la evaluación de la morfología (hábito) de las partículas de los polvos farmacéuticos y detectar la presencia de aglomerados o agregados de partículas. También se utilizan para diferenciar entre sustancias cristalinas y amorfas, ya que las primeras al ser examinadas con luz polarizada presentan birrefringencia (interferencia de colores y posiciones de extinción al girar la platina del microscopio) y las segundas no (USP 42, 2019, p. 7059).

2.6.2 Microscopia electrónica de barrido

La microscopia electrónica de barrido (*Scanning electronic microscopy*, SEM, por su sigla en inglés) es una técnica polivalente que utiliza un microscopio electrónico avanzado y versátil para observar las superficies de materiales sólidos. Por ello, es capaz de examinar y analizar materiales sólidos al nivel submicrónico con alta resolución, logrando una imagen detallada de una partícula con una resolución espacial y de alta calidad con un tamaño de 1 nm (Akhtar *et al.*, 2018).

Las muestras a examinar por SEM deben ser colocadas siempre sobre materiales conductores (cintas adhesivas de C, Al o Cu, pinturas de C o Ag y portamuestras de Al) y cubiertas con una fina capa de algún elemento conductor, generalmente Au, Au-Pd, Cr o C, para posteriormente ser irradiadas con un haz de electrones de alta energía, lo cual provoca la emisión de electrones/rayos X. Esos electrones o rayos X salientes proporcionan información cualitativa de muestras sólidas, incluida su morfología (forma y tamaño), topografía (características de la superficie de un objeto, su textura y rugosidad), composición (elementos y compuestos que constituyen el material), orientación de los granos, información cristalográfica, etc., de un material (Akhtar *et al.*, 2018). Aunque la SEM se usa solo para obtener imágenes de la superficie de un material y no proporciona información sobre la estructura interna del material, se considera una herramienta poderosa que puede usarse para caracterizar materiales sólidos y determinar si han ocurrido cambios morfológicos en la superficie de las partículas del material luego de que

estos se someten a procesos en los que se involucren otras moléculas que puedan modificar su superficie (Akhtar *et al.*, 2018).

2.7 Solubilidad y velocidad de disolución *in vitro*

En la determinación tanto de la eficacia como de la actividad de un IFA, la S y VD desempeñan roles fundamentales. Muchas de las NEQ tienen una aplicación limitada debido a sus deficientes perfiles de solubilidad y disolución, y alrededor del 40 % de los IFA poseen baja S acuosa. Por eso, el desafío esencial para un desarrollo exitoso de productos farmacéuticos es mejorar el perfil de solubilidad y disolución del IFA poco soluble, sin alterar su estructura molecular (Yang *et al.*, 2016). A continuación, se describen conceptos relacionados a estas dos propiedades fundamentales de los IFA y medicamentos.

2.7.1 Solubilidad

La baja S acuosa es una barrera para la administración satisfactoria del IFA y, como tal, a menudo impide que un medicamento sea adecuado para su propósito (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). Como término la S refleja la propiedad de una “sustancia” de disolverse en otra “sustancia” (en donde la palabra "sustancia" incluye sólidos, líquidos y gases) para proporcionar una solución homogénea (Deb *et al.*, 2018).

La S de una sustancia se puede expresar de diferentes maneras (Deb *et al.*, 2018). Si se determina midiendo la concentración de saturación de la solución formada, dicha cantidad corresponde a la **solubilidad en equilibrio** (S_{eq}), la cual es *la concentración de un compuesto en una solución que está en contacto con una cantidad en exceso del compuesto sólido, cuando la concentración y la forma sólida no cambian con el tiempo* (Sugano *et al.*, 2007). Es decir, la S_{eq} depende de la forma física del soluto, la naturaleza y composición del medio en el cual ocurre la solubilización, la temperatura y presión empleada y, es independiente del tamaño de partícula y hábito cristalino (Sugano *et al.*, 2007), si el rango de tamaño de partículas es igual o mayor que un micrómetro. Por el contrario, en el caso de las partículas submicrónicas, la S_{eq} depende de su tamaño y se informa como **solubilidad por saturación aparente** (Malamatari *et al.*, 2018).

En las primeras etapas del descubrimiento de IFA es impráctico determinar la S_{eq} porque no es necesario confirmar que no hay cambios en la concentración y en la forma sólida. Pero, se puede establecer un tiempo razonablemente largo (generalmente de varias horas a un día), y la concentración del compuesto en la solución que está en contacto con el sólido será su **solubilidad aparente** (S_{ap}) (Sugano *et al.*, 2007). Incluso si el soluto es cristalino, la S medida se puede considerar como su S_{eq} , solo si se confirma que la concentración no ha cambiado en el tiempo (Sugano *et al.*, 2007).

Cabe remarcar que, la absorción de un IFA en el tracto gastrointestinal no está limitada por su S_{eq} , sino por la fracción disuelta, los métodos tradicionales de solubilización que solo pueden aumentar la S_{eq} no pueden facilitar la permeación celular. Varios estudios han demostrado que los IFA podrían existir en el tracto gastrointestinal en un estado de solución a una concentración superior a su S_{eq} , es decir, en sobresaturación (Yang *et al.*, 2016).

Como se indicó en el Capítulo 1, la preparación de nuevas formas sólidas, entre ellas los CC y nanocristales, ha surgido como una estrategia para la optimización de la S_a de los IFA. En el caso de un CC, este tendrá, inherentemente, una S distinta a la del IFA y del COF, porque su estructura cristalina será diferente a la de cada uno de ellos (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). La alteración de la S puede ser en cualquier dirección (Karimi-Jafari *et al.*, 2018) dependiendo del COF utilizado. En cambio, en los NC la S_{eq} aumenta debido a la reducción del tamaño de partícula (Müller *et al.*, 2011; Malamatarí *et al.*, 2018), siendo este aumento más pronunciado para tamaños de partícula menores a 100 nm (Müller *et al.*, 2011).

Respecto de la S de los CC farmacéuticos, cabe recordar que estos se componen de un IFA y un COF, los que están conectados por enlaces débiles, normalmente, enlaces de hidrógeno (Bavishi y Borkhataria, 2016). De hecho, el 86% de los CC conocidos están formados por tales enlaces (Karagianni *et al.*, 2018). Por ello, los CC unidos por enlaces de H se disocian rápidamente en un medio acuoso y, en la mayoría de los casos, el aumento de la cantidad de CC disuelto se produce en poco tiempo (<30 min) y se mantiene durante un tiempo suficientemente prolongado (4-6 h) (Bavisiéuhi y Borkhataria, 2016). Esa mayor cantidad de CC disuelto está relacionada con fenómenos de sobresaturación que son característicos de los IFA amorfos (Karagianni *et al.*, 2018), y el mecanismo hipotético que interpreta los sistemas de administración de los IFA sobresaturados (Bavishi y Borkhataria, 2016;

Yang *et al*, 2016) es la teoría del **resorte y paracaídas** (*Spring-parachute effect*, en la terminología inglesa) que se ilustra en la Figura 2.5.

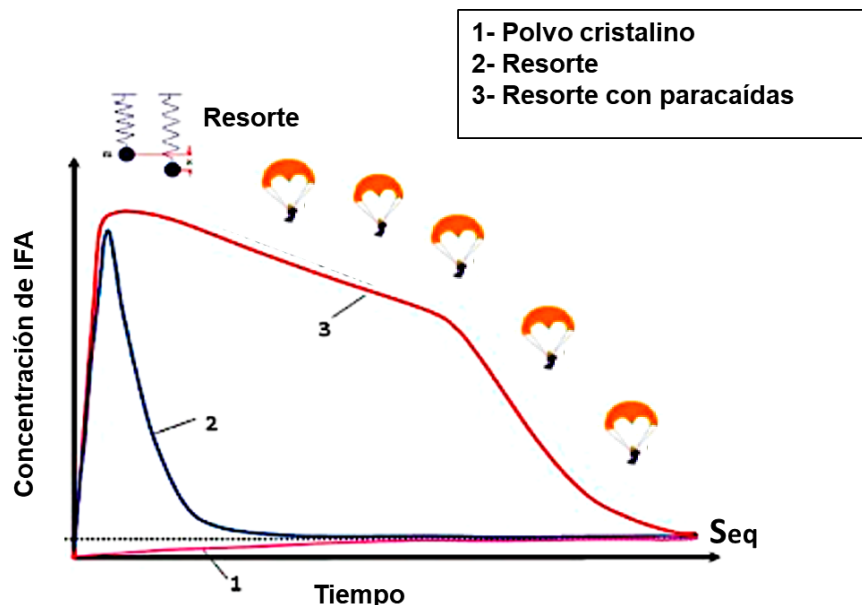


Figura 2.5. Ilustración gráfica del concepto del resorte y paracaídas para lograr una alta S_{ap} en IFA poco solubles en agua, 1). La forma cristalina (estable) del IFA tiene baja S_a , 2) Una forma metaestable (sal, forma amorfa, dispersión amorfa, cocrystal) genera un pico de S (sobresaturación transitoria de alta energía o *efecto resorte*) pero rápidamente decae (min. a horas) a la S_{eq} de la forma cristalina, 3) Una forma sólida de alta S_a prolonga el estado de sobresaturación por horas (efecto resorte con paracaídas = sobresaturación metaestable prolongada) (Adaptada de Bavishi y Borkhataria, 2016).

Después de la disociación del CC, el COF que es el componente más soluble en agua en los CC farmacéuticos se extrae de la red cristalina al medio acuoso (Bavishi y Borkhataria, 2016), lo cual provoca que las moléculas del IFA hidrófobo se sobresaturen en el medio acuoso y produzcan un pico de S (Figura 2.5, curva 2); es decir, una sobresaturación transitoria de alta energía denominada **efecto resorte**. Como el estado sobresaturado es una condición termodinámicamente inestable, el resorte precipita rápidamente (en minutos a una hora) para dar agrupaciones poco agregadas (Bavishi y Borkhataria, 2016), y finalmente alcanza la S_{eq} de la forma cristalina estable de baja S_a (Figura 2.5, curva 1). Para obtener los beneficios del estado sobresaturado *in vivo*, este debe mantenerse durante un período de tiempo suficiente para la absorción, lo cual puede requerir una inhibición fugaz de la precipitación mediante el uso de excipientes farmacéuticos u otros componentes que intervienen en la nucleación y crecimiento de cristales; a esos inhibidores de

precipitación se los denomina **paracaídas** (Figura 2.5, curva 3). La fase **resorte con paracaídas** dura el tiempo suficiente (120 a 300 min.) para solubilizar una alta cantidad de la dosis, porque la transformación de los grupos amorfos en fases cristalinas estables o el crecimiento de cristales será un proceso lento en el medio de disolución (efecto paracaídas). La solución rica en fase amorfa de alta energía se transmutará en un polimorfo metaestable del IFA, que tendrá una mayor S y finalmente en una forma estable siguiendo la Ley de Etapas de Ostwald (Bavishi y Borkhataria, 2016; Karagianni *et al.*, 2018). La principal ventaja del CC es que mejora la S y la disolución del IFA poco soluble sin alterar su estructura molecular (Bavishi y Borkhataria, 2016).

2.7.2 Velocidad de disolución

La VD por lo general se expresa como la masa de soluto que aparece en el medio de disolución por unidad de tiempo (por ejemplo, masa/seg) (USP 42, 2019, p. 7787). La ecuación de Noyes-Whitney describe la disolución de una sustancia:

$$dm/dt = k_1A (C_{\text{sat}} - C_{\text{sol}}) \quad \text{Ec. 2.2}$$

donde, dm/dt es la velocidad de disolución; k_1 es la constante de disolución; A es el área superficial del sólido que se disuelve; C_{sat} es la concentración de saturación o S_{eq} de la sustancia en el solvente o medio de disolución utilizado, y C_{sol} es la concentración de la sustancia en el solvente o medio de disolución a un dado tiempo (Gray y Rosanske, 2020). De la Ec. 2.2 se deduce claramente que la S_{eq} es una de las fuerzas impulsoras principales para la VD, pero también se ve influenciada por las propiedades intrínsecas del estado sólido de la sustancia que se disuelve, tales como el estado cristalino (incluyendo polimorfos y solvatos), así como por el grado de no cristalinidad (USP 42, 2019, p. 7787). El efecto de las impurezas asociadas con el material también pueden alterar significativamente sus propiedades de disolución (USP 42, 2019, p. 7787). Estos también se ven influenciadas por factores extrínsecos, como el área superficial, la hidrodinámica y las características del medio de disolución, incluyendo el disolvente (por lo general, agua), la presencia de surfactantes, la temperatura, la viscosidad del líquido, el pH y el tipo y concentración de la solución amortiguadora (USP 42, 2019, p. 7787).

La disolución o liberación *in vitro* del IFA, desde su forma de dosificación, en un medio típicamente de base acuosa, está vinculada a la liberación del IFA *in vivo*, la cual es un prerrequisito para la absorción, su llegada a la circulación sistémica y el efecto terapéutico o clínico. Por ello, la determinación de la VD *in vitro* es una herramienta fundamental para controlar la calidad biofarmacéutica de los medicamentos ya que permite evaluar la liberación del IFA desde la forma de dosificación que lo contiene. La determinación de la VD también es importante durante el desarrollo de NEQ, puesto que en ocasiones permite predecir problemas potenciales de BD (USP 42, 2019, p. 7787).

La evaluación de la VD de NEQ e IFA puros, y sus diferentes formas sólidas, se puede efectuar mediante métodos que utilizan una superficie constante de muestra [discos rotantes o estacionarios que permiten evaluar la velocidad de disolución intrínseca aparente (USP 42, 2019, p.7787)] o un polvo [método de disolución de polvo (Lötter *et al.*, 1983)]. Los primeros requieren que la muestra pulverulenta se compacte, pero esto no siempre puede efectuarse porque muchas de ellas no se compactan fácilmente por compresión (Lötter *et al.*, 1983); experimentan transformaciones polimórficas durante la compresión, o los discos tienden a desintegrarse cuando se ponen en contacto con el medio de disolución (Lötter *et al.*, 1983). Para esas sustancias, el método de disolución de polvo resulta más conveniente, ya que se emplea un polvo, normalmente constituido por partículas con diferentes tamaños (polvo polidisperso), el cual se transfiere cuantitativamente a un medio de disolución en agitación (Lötter *et al.*, 1983). En el caso de sustancias muy hidrofóbicas (que tienden a agregarse en medios acuosos) se debe efectuar un procedimiento previo de desagregación para que la VD de polvo sea reproducible y correlacione con el tamaño de partícula de la muestra (Lötter *et al.*, 1983). En este trabajo de Tesis Doctoral, se utilizó el método de disolución de polvo, empleando el aparato 2 (método de paletas) de la Farmacopea de los Estados Unidos de América (*United States Pharmacopeia*, USP, por su sigla en inglés), el cual es uno de los aparatos oficiales utilizados para los estudios de VD de polvos.

2.8 Referencias

- Abraham, J.; Mohammed, A. P.; Ajith Kumar, M. P.; George, S. C.; Thomas, S. Chapter 8, Thermoanalytical Techniques of Nanomaterials. *Characterization of Nanomaterials*,. Bhagyaraj, S.M.; Oluwafemi, O.S. and Kalarikkal, N.; editors. New York USA. Ed. Springer International Publishing. 2018, 213-36. DOI:10.1016/b978-0-08-101973-3.00008-0
- Akhtar, K.; Khan, S.A.; Khan, S.B.; Asiri, A.M. Chapter 4: Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. *Handbook of Materials Characterization*. Sharma, S.K.; editors. New York USA. Ed. Springer International Publishing. 2018, 113-45. DOI: 10.1007/978-3-319-92955-2_4
- Brittain, H.G. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. 2nd ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc.; 2009.
- Bunaciu, A.A.; Aboul-Enein, H.Y.; Fleschin, S. Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2010;45(3):206-19. DOI: 10.1080/00387011003601044
- Gokhale, M.Y.; Mantri, R.V. Chapter 4: API Solid-Form Screening and Selection. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice 2nd Edition*. Oiu, Y.; Chen, Y.; Zhang, G.Z.; editors. Oxford, UK: Elsevier Inc.. 2017, 85–112. DOI:10.1016/b978-0-12-802447-8.00004-2
- Gray, V.A.; Rosanske, T.W. Chapter 18: Dissolution. *Specification of Drug Substances and Products Development and Validation of Analytical Methods, 2nd Edition*. Riley, C.M.; Rosanske, T.W.; Reid, G. editors. Elsevier Ltd, Amsterdam, Netherlands. 2020.
- Harris, R.K. Applications of Solid-State NMR to Pharmaceutical Polymorphism and Related Matters. *J. Pharm. Pharmacol.* 2007;59:225-39. DOI: 10.1211/jpp.59.2.0009
- Healy, A.M.; Worku, Z.A.; Kumar, D.; Madi, A.M. Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystal. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017, 117, 25-46. DOI: 10.1016/j.addr.2017.03.002
- Ivanisevic, I.; McClurg, R.B.; Schields, P.J. Uses of X-Ray Powder Diffraction in the Pharmaceutical Industry. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*. Editor, Gad, S.C.; USA, New York: John Wiley & Sons, Inc. 2010. DOI: 10.1002/9780470571224.pse414
- Karagianni, A.; Malamataris, M.; Kachrimanis, K. Pharmaceutical Cocrystals: New Solid Phase Modification Approaches for the Formulation of APIs. *Pharmaceutics*. 2018,10,18. DOI:10.3390/pharmaceutics10010018
- Karimi-Jafari, M.; Padrela, L.; Gavin, M.; Walker, G.M.; Croker, D.M. Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications. *Cryst. Growth Des.* 2018,18,6370-87. DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00933
- Kumar, A.; Singh, P.; Nanda, A. Hot stage microscopy and its applications in pharmaceutical characterization. *Appl. Microsc.* 2020, 50, 1-11. DOI:10.1186/s42649-020-00032-9
- Lever, T.; Haines, P.; Rouquerol, J.; Charsley, E.L.; Van Eckeren, P.; Burlett, D.J. ICTAC Nomenclature of Thermal Analysis (IUPAC Recommendations 2014). *Pure Appl. Chem.* 2014; 86, 545-53. DOI: 10.1515/pac-2012-0609

- Lötter, A.P.; Flanagan, D.R.; Palepu, N.R.; Guillory, J.K. A simple reproducible method for determining dissolution rates of hydrophobic powders. *Pharm Technol.* 1983, 7, 55-66.
- Malamatari, M.; Taylor, K.M.G.; Malamataris, S.; Douroumis, D. Kachrimanis, K. Pharmaceutical nanocrystals: Production by wet milling and applications. *Drug Discov. Today.* 2018, 23, 534-47. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.01.016
- Müller, R.H.; Gohla, S.; Keck, C.M. State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011,78,1–9. DOI:10.1016/j.ejpb.2011.01.007
- Murphy, D.B. Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Murphy, D.B.; Davidson, M.W. USA, New York: John Wiley & Sons, Ed. 2001.
- Pindelska, E.; Sokal, A.; Kolodziejski, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017, 117, 111-46. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.014.
- Saganowska, P.; Wesolowski, M. DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2018, 133, 785-95. DOI: 10.1007/s10973-017-6858-3
- Sawant, K.D.; Naik, T.A. Necessity of Establishing Chemical Integrity of Polymorphs of Drug Substance Using a Combination of NMR, HPLC, Elemental Analysis, and Solid-State Characterization Techniques: Case Studies. *Org. Process Res. Dev.* 2013, 17, 519–532. DOI:10.1021/op300229k
- Stieger, N.; Aucamp, M.E.; Zhang, S.W.; De Villiers, M.M. Hot-stage Optical Microscopy as an Analytical Tool to Understand Solid-state Changes in Pharmaceutical Materials. *Am Pharm Rev.* 2012.. [Consultado: 21 de mayo 2021]. Disponible en: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/39283-Hot-stage-Optical-Microscopy-as-an-Analytical-Tool-to-Understand-Solid-state-Changes-in-Pharmaceutical-Materials/>.
- Sugano, K.; Okazaki, A.; Sugimoto, S.; Tavornvipas, S.; Omura, A.; Mano, T. Solubility and Dissolution Profile Assessment in Drug Discovery. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007, 22, 225–54. DOI:10.2133/dmpk.22.225
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <761> Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear, pag. 7043-7052.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019.
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <776> Microscopía Óptica, pág. 7059-62.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <854> Espectroscopía en el Infrarrojo Medio, pág. 7212-16.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019.

- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <891> Análisis Térmico, pág. 7234-39.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <941> Caracterización de Sólidos Cristalinos y Parcialmente Cristalinos por Difracción de Rayos X Sobre Polvo, pág. 7259-66.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019.
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <1087> Disolución Intrínseca Aparente – Procedimientos de Pruebas de Disolución para Disco Rotatorio y Disco Estacionario, pag. 7787-7792.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 42. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 37. Formulario Nacional. <1854> Espectroscopía en el Infrarrojo Medio – Teoría y Práctica, pág. 8907-17.* United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2019.
- Yamashita, H.; Hirakura, Y.; Yuda, M.; Teramura, T.; Terada, K. Detection of Cocrystal Formation Based on Binary Phase Diagrams Using Thermal Analysis. *Pharm. Res.* 2013, 30, 70–80. DOI: 10.1007/s11095-012-0850-1
- Yamashita, H.; Hirakura, Y.; Yuda, M.; Terada, K. Coformer Screening Using Thermal Analysis Based on Binary Phase Diagrams. *Pharm. Res.* 2014, 31, 1946-57. DOI: 10.1007/s11095-014-1296-4
- Yang, M.; Gong, W.; Wang, Y.; Shan, L.; Li, Y.; Gao, C. Bioavailability Improvement Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs Based on the Supersaturation Mechanism: An Update. *J. Pharm. Sci.* 2016, 19, 208-25. DOI: 10.18433/J3W904.

- 3.1 Introducción
- 3.2 Características físicas, fisicoquímicas y biológicas del Tinidazol
- 3.3 Sección experimental
 - 3.3.1 Materiales
 - 3.3.2 Métodos
 - 3.3.2.1 Preparación de mezclas físicas
 - 3.3.2.2 Preparación de cocrystalos de TNZ
 - 3.3.2.3 Preparación de monocristales TNZ-COF
 - 3.3.2.4 Microscopía óptica y de luz polarizada (MO y MLP)
 - 3.3.2.5 Difracción de Rayos X de polvos (PXRD)
 - 3.3.2.6 Difracción de rayos X de monocristal (SCXRD)
 - 3.3.2.7 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido (SSNMR)
 - 3.3.2.8 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT)
 - 3.3.2.9 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TG)
 - 3.3.2.10 Microscopía de platina calentable con luz polarizada (HSM)
 - 3.3.2.11 Determinación de la solubilidad acuosa
 - 3.3.2.12 Estudios de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
 - 3.3.2.13 Ensayo de fotoestabilidad en estado sólido
- 3.4 Resultados y discusión
 - 3.4.1 Selección de los coformadores
 - 3.4.2 Métodos de cocrystalización, puntos de fusión y morfología de las muestras sólidas preparadas
 - 3.4.3 PXRD
 - 3.4.4 SCXRD de TNZ-PABA_{CRIS-*t*BuOH} y de TNZ-SA_{CRIS-*AcE*}
 - 3.4.5 ¹³C-SSNMR
 - 3.4.6 FTIR y DRIFT
 - 3.4.7 DSC, TG y HSM
 - 3.4.8 Solubilidad acuosa
 - 3.4.9 Fotoestabilidad en estado sólido
- 3.5 Conclusiones
- 3.6 Referencias

Capítulo

3

3

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COCRISTALES DEL TINIDAZOL

3.1 Introducción

El diseño de nuevas formas sólidas multicomponentes de IFA antiguos ha cobrado gran auge durante la última década. (Domingos *et al.*, 2015). Dentro de ellas, se destacan los CC farmacéuticos, los cuales son sólidos (Sección 1.4.1) que contienen al menos, un IFA y un COF. Este último no debe ser tóxico ni producir efectos secundarios adversos.

La presencia de un COF en la red cristalina de los CC farmacéuticos determina que tengan propiedades físicas, químicas, mecánicas y biofarmacéuticas diferentes a las de los IFA puros. Se comprende, entonces, que la principal motivación para la investigación de los CC sea influir de manera directa sobre las propiedades del estado sólido, lo cual impactará en propiedades tales como el punto de fusión, hábito cristalino, densidad, solubilidad, compresibilidad, friabilidad, higroscopicidad, estabilidad física y química, velocidad de disolución y biodisponibilidad (Karagianni *et al.*, 2018). Precisamente, dichas propiedades se pueden modificar selectivamente por medio de la selección del COF adecuado.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la búsqueda de CC que pudieran optimizar las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas desfavorables del TNZ, en particular su baja solubilidad acuosa y pobre fotoestabilidad en estado sólido. Previo a la presentación de los resultados, se describirán brevemente algunas propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas de este IFA.

3.2 Características físicas, fisicoquímicas y biológicas del tinidazol

El tinidazol, cuyo nombre químico sistemático es 1-(2-etilsulfoniletil)-2-metil-5-nitroimidazol (TNZ, Figura 3.1) es un fármaco antimicrobiano perteneciente a la familia de los 5-nitroimidazoles. Es utilizado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaeróbicas y ciertos protozoos anaeróbicos tales como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Filgueiras *et al.*, 2016). También, se lo utiliza como parte de una terapia combinada para la erradicación del *Helicobacter pylori* (Madan *et al.*, 2018).

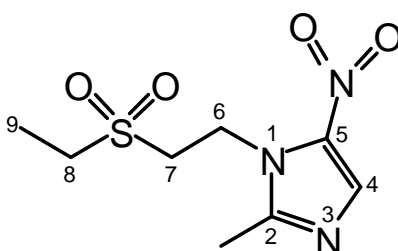


Figura 3.1. Estructura química de TNZ, y la numeración sistemática de sus átomos.

Su mecanismo de acción farmacológico, al igual que el de otros nitroimidazoles antimicrobianos, se basa en la reducción del grupo nitro (Figura 3.1) por una enzima nitrorreductasa tal como la tiorredoxina reductasa o la ferredoxina (Mushtaque *et al.*, 2016). El anión radical nitro resultante, el cual se considera el responsable de la acción antimicrobiana, sufre luego una reducción adicional para producir especies altamente reactivas del nitrógeno, las cuales se unen a materiales genéticos, proteínas u otras biomoléculas para inhibir la actividad de protozoos (Mushtaque *et al.*, 2016). En el caso particular de TNZ se sabe que, en células protozoarias y bacterianas sensibles, es reducido a intermediarios citotóxicos que se unen covalentemente al ADN, causando daño irreversible (Fung y Doan, 2005).

El peso molecular del TNZ es 247,273 g/mol y se lo comercializa como un sólido cristalino. Es soluble en solventes orgánicos pero presenta baja solubilidad en *buffers* acuosos [pH 2: 0,0324 M = 8,01 mg/mL; pH 6: 0,0301 M = 7,44 mg/mL, 37 °C (Chadha *et al.*, 2007)]. Como tiene alta permeabilidad y se administra en dosis orales elevadas (dosis única de 2 g/día = 4 comprimidos de 500 mg), se lo clasifica como un IFA clase II del SCB (Patnala *et al.*, 2017), la clase en la que las propiedades del

estado sólido pueden impactar sobre el comportamiento *in vivo* de los medicamentos.

El TNZ fue sintetizado en 1969 (Miller *et al.*, 1969) y hasta el presente se ha reportado una única forma polimórfica CSD (Groom *et al.*, 2016) [*Refcode* CEPSIZ], cuya estructura cristalina se resolvió en el año 1984 (Chasseaud *et al.*, 1984). En esa forma cristalina, el TNZ posee una unidad asimétrica (Figura 3.2a), en la cual se destacan dos enlaces de hidrógeno intramoleculares S=O••HC, lo cual determina que los átomos de oxígeno del grupo sulfona no apunten hacia el anillo imidazol (Alfaro-Fuentes *et al.*, 2014). La celda unitaria del TNZ contiene cuatro moléculas del TNZ ($Z = 4$) y estas forman un tetrámero mediante enlaces oxígeno-hidrógeno (Figura 3.2b). En el tetrámero se observan dos interacciones π - π cooperativas (las cuales se forman entre los átomos de oxígeno del grupo nitro y el anillo imidazol), cuatro enlaces NO••HC y dos enlaces S=O••HC bifurcados (Figura 3.2b), los cuales contribuyen a su estabilización (Alfaro-Fuentes *et al.*, 2014).

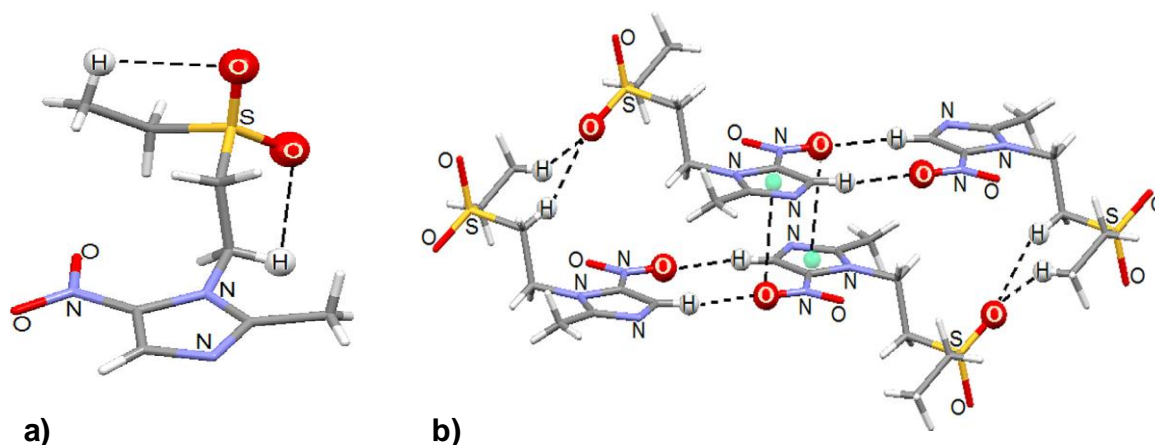


Figura 3.2. a) Unidad asimétrica del TNZ. b) Celda unitaria cristalina del TNZ (Tomada de Alfaro-Fuentes *et al.*, 2014).

Si bien el TNZ es un fármaco con eficacia establecida, alta biodisponibilidad oral (Fung y Doan, 2005), tolerabilidad aceptable (Fung y Doan, 2005) y una toxicidad menos perdurable que la de otros nitroimidazoles (Mushtaque *et al.*, 2016), presenta algunas desventajas importantes. Una de ellas es su baja solubilidad acuosa, y ello ha motivado la utilización de diversas estrategias farmacotécnicas tendientes a optimizar su solubilidad acuosa tales como la preparación de polimorfos (Udupa, 1987; Udupa, 1990), complejos de inclusión con β -ciclodextrinas (Jagdale *et*

al., 2016), dispersiones sólidas (Sahoo y Bhilegaonkar, 2015; Vargas Escobar *et al.*, 2016), microcristales (Sabitha Reddy *et al.*, 2011), nanofibras (Khan *et al.*, 2017), sales (Patnala *et al.*, 2017) y cocrystalos (Paun *et al.*, 2017; Madan *et al.*, 2018; Zheng, *et al.*, 2020). Cabe señalar que la evidencia experimental provista por Paun *et al.* (2017) y Madan *et al.* (2018), no avaló que se formaran CC de TNZ con los compuestos ensayados. En cambio, Zheng *et al.* (2020) demostraron la formación de un CC de TNZ con ácido vainillínico, pero este se reportó en el transcurso de la escritura de este trabajo de Tesis, con posterioridad al descubrimiento y publicación de los 3 CC que se describirán a continuación (página 142, Producción Científica).

Otra de sus desventajas, es su fotoinestabilidad en solución y en estado sólido (Marciniec y Bujag, 1994; Marciniec *et al.*, 1997), lo cual determina que la materia prima y sus formulaciones deban protegerse de la luz (Ph. Eur., 2010; USP, 2016) pero, a diferencia de lo ocurrido con la problemática de su solubilidad acuosa, no se ha reportado la obtención de formas sólidas multicomponentes que pudieran optimizar su fotoestabilidad.

Dado que el TNZ es un IFA clase II del SCB, que se administra en dosis muy altas, y que al inicio de este trabajo de Tesis Doctoral no existían datos bibliográficos sobre la utilización de estrategias de la ingeniería de cristales, se hipotetizó que el descubrimiento y desarrollo de CC del TNZ podía ser relevante tanto para contribuir al conocimiento del espacio cristalino de este IFA, como para optimizar sus propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas desfavorables, en particular su fotoinestabilidad.

3.3 Sección experimental

3.3.1 Materiales

Como sustancia de partida se utilizó una materia prima comercial del TNZ (lote N° 100696, pureza = 99,67%, Parafarm®). El ácido cítrico (CA), ácido salicílico (SA), ácido succínico (SUC), arginina (ARG), cafeína (CAF), nicotinamida (NA), prolina (PRO) y triptófano (TRIP) se adquirieron comercialmente (pureza >99%) y se utilizaron sin purificación previa. El ácido *p*-aminobenzoico (PABA) se purificó por recristalización de una mezcla de etanol-agua (2:8 v/v). El KBr utilizado fue de grado espectroscópico (Merck, Alemania) y se secó 24 h a 80 °C previo a la preparación

de pastillas o dispersiones para estudios FTIR. El papel de filtro (2,7 μm , Whatman 542, Reino Unido), membranas de Nylon® (0,45 μm , *Pall Corporation*, EUA) y placas para cromatografía en placa delgada (CCD, sílica gel 60 F254, Merck KGaA, Alemania) se adquirieron comercialmente. El agua se purificó por medio de un sistema de purificación Milli-Q® (*Millipore, Bedford*, EUA). Todos los solventes y demás reactivos fueron de calidad analítica o HPLC, y se utilizaron sin purificación previa. Los solventes utilizados se designarán de aquí en adelante con las siguientes siglas: acetona (ACE); acetonitrilo (ACN); etanol (EtOH); metanol (MeOH) y *tert*-butanol (*t*-BuOH).

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Preparación de mezclas físicas

Para la preparación de mezclas físicas (MF) binarias del TNZ y cada COF ensayado, se colocaron en un mortero de ágata cantidades exactamente pesadas del TNZ y COF (en relaciones molares 1:1) y se mezclaron suavemente con espátula de acero durante 3 minutos. Las MF resultantes se guardaron al abrigo de la luz en desecadores, con vacío y CaCl_2 , hasta su caracterización. De aquí en adelante, las MF se designarán con la sigla del IFA y el COF, y la abreviatura MF se colocará como subíndice, es decir TNZ-COF_{MF}.

3.3.2.2 Preparación de cocrisales de TNZ

Para la obtención de CC se aplicaron los siguientes procedimientos:

A) Mortereado asistido con solvente (*Liquid-assisted grinding, LAG*, Friscic *et al.*, 2009): en un mortero de ágata se molieron cantidades exactamente pesadas del TNZ y COF en relación estequiométrica 1:1. El mortereado inicial se efectuó durante 30 minutos, adicionando unas pocas gotas de ACE, tras lo cual se determinaron los puntos de fusión (*p.f.*) de las mezclas molidas. El mortereado se continuó, en intervalos de 30 min, hasta 120 minutos con el agregado de gotitas de ACE. Las muestras obtenidas se almacenaron en un desecador (utilizando vacío, CaCl_2 y sílica gel como desecantes). Cabe señalar que, el mortereado antes indicado se realizó también con otros solventes y antisolventes, pero solo con ACE

se obtuvieron resultados interesantes y reproducibles, como se indicará en secciones posteriores.

B) Mortereado sin solvente (*Neat grinding, NG*): se repitió el procedimiento **A**, pero sin agregar solvente. Este procedimiento se utilizó solo con el PABA.

C) Cristalización por evaporación lenta (CRIS): en un vaso de precipitados se colocaron cantidades exactamente pesadas del TNZ y COF (en relaciones molares 1:1), se mezclaron con espátula de acero y a la mezcla resultante se le agregó gota a gota la menor cantidad necesaria de una mezcla de solventes (en la que ambos compuestos fueran solubles a temperatura ambiente = 20-25 °C) para obtener una solución. Para favorecer la solubilización del IFA y el COF se recurrió a la sonicación con ultrasonido (Sonicador Ultrasonic Cleaner, Testlab 02, Argentina) por cortos intervalos de tiempo (1-2 min). Los vasos de precipitados se taparon con papel de filtro y dejaron al abrigo de la luz y a temperatura ambiente hasta la aparición de cristales. Estos se filtraron al vacío y secaron en desecador con vacío (sobre CaCl₂ y sílica gel).

Cabe señalar que en los ensayos de cocrystalización antes indicados se utilizó la relación estequiométrica 1:1 porque dicha proporción maximiza la posibilidad de interacción supramolecular entre un IFA y el COF. Como se detallará en las siguientes secciones, con dicha relación se obtuvieron CC y eutécticos; por tanto, no se ensayaron otras proporciones.

A todas las muestras preparadas se les controló su pureza química por CCD, y se las caracterizó mediante determinaciones de *p.f.*, PXRD, FTIR o DRIFT. A muestras seleccionadas se las caracterizó, además, por SSNMR, DSC, TG, SCXRD y MO o MLP. De aquí en adelante, las muestras obtenidas se designarán con las siglas del IFA y el COF (separadas por un guion) y la abreviatura del procedimiento de obtención (el cual se indicará como subíndice), es decir TNZ-COF_{PROCEDIMIENTO}. En el caso del procedimiento C, se indicará también el solvente utilizado.

3.3.2.3 Preparación de monocristales TNZ-COF

Para la preparación de monocristales se seleccionaron tres COF (PABA, SA y CA) y se siguieron los procedimientos que se detallan a continuación:

TNZ-PABA: en un mortero de ágata se colocaron cantidades exactamente pesadas del TNZ y COF (relación molar 1:1), y se morterearon siguiendo el

procedimiento **A**. De la mezcla resultante, se tomaron dos alícuotas de 50,0 mg y se colocaron en sendos vasos de precipitados, y a cada uno de ellos se les agregó el menor volumen necesario de una mezcla de solventes en la que tanto el IFA como el COF fueran solubles a temperatura ambiente. Como mezclas de solventes se utilizaron ACE-EtOH (4:1, v/v) y *t*-BuOH-ACE (1:1, v/v). Las dos soluciones obtenidas se filtraron al vacío, usando papel de filtro Whatman 542, cubrieron con papel de aluminio con pequeñas perforaciones y dejaron en reposo (a 20-25 °C) y al abrigo de la luz hasta la aparición de cristales. Los cristales formados se extrajeron con espátula de acero y secaron en desecador con vacío (sobre CaCl₂ y sílica gel). Con la mezcla *t*-BuOH-ACE se obtuvieron monocristales de tamaño adecuado para estudios de SCXRD.

TNZ-SA: se utilizaron dos procedimientos de preparación. **i)** En un vaso de precipitados se colocaron 30,0 mg (0,12 mmol) del TNZ y 17,0 mg (0,12 mmol) de SA y se mezclaron con espátula de acero. Luego, se agregó el menor volumen necesario (10 mL) de EtOH-Agua (5:2, v/v) para solubilizar completamente los dos compuestos a temperatura ambiente. **ii)** Se pesaron exactamente 30,0 mg de TNZ-SALAG y se agregó el menor volumen necesario (10 mL) de ACE-Agua (1:4, v/v) para solubilizar la muestra a temperatura ambiente. Las soluciones preparadas se filtraron al vacío, usando papel de filtro Whatman 542, se cubrieron con papel de aluminio con pequeñas perforaciones y dejaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz hasta la aparición de cristales (2-3 días). Los cristales formados se extrajeron con espátula de acero y secaron en desecador con vacío (sobre CaCl₂ y sílica gel). Con el procedimiento ii) se obtuvieron monocristales de tamaño adecuado para estudios de SCXRD.

TNZ-CA: se colocaron cantidades exactamente pesadas de TNZ-CALAG (50,0 mg) en vasos de precipitados ($n = 9$) y a cada uno de ellos se agregó el menor volumen necesario de una dada mezcla de solventes (ACE-EtOH, ACE-Agua o *t*-BuOH-ACE, preparadas en tres proporciones diferentes: 1:1, 1:2 y 1:4, v/v) que permitiera solubilizar la muestra a temperatura ambiente. Las soluciones resultantes se filtraron al vacío (papel de filtro Whatman 542), cubrieron con papel de aluminio con pequeñas perforaciones y se dejaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz hasta la aparición de cristales. Con ninguna de las mezclas ensayadas se obtuvieron cristales adecuados para estudios de SCXRD.

3.3.2.4 Microscopía óptica y de luz polarizada (MO y MLP)

La observación de la morfología de las muestras sólidas se realizó a través de una lupa estereoscópica (StereoZoom® Leica S8 APO con zoom apocromático 8:1, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplada a una cámara digital Canon, o de un microscopio de fusión Kofler (Leitz, Wetzlar, Germany) al cual se le adaptó la cámara del celular iPhone X. Para evaluar la birrefringencia de las muestras se utilizó un microscopio de luz polarizada (Olympus BX41-P) con un sistema de cámara adaptada (Olympus, Tokio, Japón).

3.3.2.5 Difracción de Rayos X de polvos (PXRD)

Los patrones de PXRD se obtuvieron a 20-25 °C en un difractómetro de polvo Bruker AXS D8 Advance (Bruker, Alemania) con filtro de Ni y ánodo de Cu con radiación $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), 40 kV y 40 mA. El escaneo se llevó a cabo entre 2 y 40° 2θ , usando un tamaño de paso de 0,05° y una velocidad de rotación de las muestras de 30 rpm. Para uniformar el tamaño de partícula y reducir el fenómeno de orientación preferencial, las muestras se mortearon suavemente con pilón en un mortero de ágata y se depositaron en un portamuestras de Si (monocristal).

3.3.2.6 Difracción de rayos X de monocristal (SCXRD)

Los estudios de SCXRD se realizaron en un difractómetro para monocristal Bruker Apex Duo (Alemania) con goniómetro de tres círculos D8, detector APEX II, tubo sellado de Mo y microfuelle Incoatec ImS de Cu (radiación Mo- $K\alpha$, $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$), equipado con una corriente criogénica de nitrógeno. Para optimizar la calidad de la difracción, los monocristales (TNZ-PABA_{CRIS t-BuOH} y TNZ-SA_{CRIS ACE}) se enfriaron a 173 K. Los procedimientos de reducción de datos, la resolución y el refinamiento de las estructuras cristalinas. Las figuras se produjeron con el programa POV-Ray para Windows v.3.6, y las imágenes se procesaron con el programa GIMP 2.10.1 (GNU *Image Manipulation Program*). Estos estudios se realizaron en colaboración con el Prof. Dr. Mino R. Caira de la Universidad de Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

3.3.2.7 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear en estado sólido (^{13}C -SSNMR)

Los espectros de alta resolución de ^{13}C -SSNMR se obtuvieron por la técnica CP/MAS (polarización cruzada al ángulo mágico) en un espectrómetro Bruker Avance II (Bruker, Alemania) con una frecuencia de 300,13 MHz para protones y de 75,46 MHz para los átomos de carbono, equipado con una sonda MAS de 4 mm, a una velocidad de giro de 10 kHz y empleando un pulso para la CP (polarización cruzada) de amplitud variable (tiempo de contacto de 2 ms). Para el desacoplamiento heteronuclear durante la adquisición (40,96 ms) se utilizó la secuencia de pulsos SPINAL-64, con un campo de protones H_{1H} que satisface $\omega_{1H} / 2\pi = \gamma_H H_{1H} / 2\pi = 50,0$ kHz. Como referencia externa se utilizó glicina (45,6 y 176,5 ppm). La asignación de las señales de los espectros ^{13}C CP/MAS se efectuó mediante experimentos de desfase dipolar [que producen solo carbonos cuaternarios y el correspondiente espectro de supresión no cuaternaria (NQS por su sigla en inglés)] y comparación con los espectros ^{13}C -SSNMR de los compuestos puros (TNZ, PABA, SA, CA, SUC, y NA). Para obtener una buena relación señal/ruido, el número de mediciones varió entre 96 y 504 para las diferentes muestras. Las demoras de reciclado fueron: TNZ, 60 s; PABA, 200 s; TNZ-PABA, 20 s; SA, 125 s; TNZ-SA, 35 s; CA, 400 s y TNZ-CA, 400 s. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Prof. Dr. G.A. Monti, la Dra. Y. Garro Link y la Lic. A. Reviglio de la Facultad de Astronomía Física y Matemáticas de la UNC.

3.3.2.8 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia difusa (DRIFT)

Los espectros IR y DRIFT se adquirieron con un microscopio IR Nicolet iN10 (Thermo Fisher Scientific Inc.), que cuenta con un accesorio de reflectancia difusa. Para obtener los espectros IR microscópicos, se colocaron las muestras (polvos o cristales triturados suavemente con espátula) sobre una pastilla de KBr, y se acumularon 16 barridos a una resolución de 8 cm^{-1} . Para la obtención de los espectros DRIFT, se prepararon dispersiones muestra-diluyente al 2% p/p en KBr seco, las cuales se prepararon en un mortero de ágata, moliendo la mezcla suavemente. Las dispersiones se colocaron en un portamuestras de reflectancia

difusa de 13 mm de diámetro, y el exceso de material se eliminó con un portaobjetos de vidrio para lograr una superficie nivelada pero rugosa. Los espectros DRIFT se adquirieron acumulando 64 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} , y como blanco se utilizó KBr seco. Los espectros se procesaron con el programa OMNIC E.S.P. 5.1 (Nicolet Corp.).

3.3.2.9. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Termogravimetría (TG)

Las curvas DSC y TG se obtuvieron con los analizadores Discovery DSC y Discovery TGA (TA Instrument Inc.), respectivamente, a una velocidad de calentamiento (β) de 10 °C/min bajo atmósfera de N_2 (pureza 99,99 %) dinámica (velocidad de flujo de 50 mL/min). Para las mediciones de DSC se utilizaron cápsulas de aluminio cerradas no herméticamente y masas de muestra de 2-4 mg. Como referencias para las determinaciones DSC se emplearon cápsulas de aluminio vacías cerradas no-herméticamente. Las escalas de temperatura DSC y TG se calibraron con indio (pureza 99,99 %, *p.f.* = $156,598\text{ °C}$) y Ni (determinación de punto Curie = $358,2\text{ °C}$), respectivamente. Los datos DSC y TG se procesaron con el programa TRIOS Full_v4.1.1.33073 (TA Instruments Inc.).

3.3.2.10 Microscopía de platina calentable con luz polarizada (HSM)

Los cambios físicos y morfológicos ocurridos durante el calentamiento de las muestras se observaron a través de un microscopio polarizador (Olympus BX51), equipado con una platina de calentamiento (Linkam LTS420), utilizando un objetivo de 10X y polarizadores cruzados. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital (Olympus, Tokio, Japón). Para efectuar las observaciones se colocó una pequeña cantidad de polvo, o unos pocos cristallitos, en un portaobjetos, el cual se cubrió con un cubreobjetos. La velocidad de calentamiento fue de 10 °C/min , y las muestras se calentaron desde 25 °C hasta $2-5\text{ °C}$ por encima de sus respectivos *p.f.*

3.3.2.11 Determinación de la solubilidad acuosa

La solubilidad en agua se evaluó a 37 °C por el método del tubo (Murdande *et al.*, 2011). Para ello, se colocó un exceso de muestra en un tubo de vidrio con tapa

a rosca, se adicionaron 5 mL de agua Milli Q® (pH 5,5) y la suspensión resultante se sonicó con ultrasonido (Sonicador Ultrasonic Cleaner Testlab 02) por 2 min. Luego de ello, el tubo se colocó en un baño de agua termostatzado a 37 °C con tapa y se mantuvieron con agitación constante durante 24 h (tiempo necesario para que TNZ alcance el equilibrio de saturación, el cual se determinó tomando alícuotas a tiempos prefijados entre 1 y 48 h), protegidos de la luz ambiente. Transcurrido ese periodo, se separaron alícuotas de 1 mL, se las filtró (membranas de Nylon® de 0,45 µm) y analizó por HPLC, para determinar la cantidad de TNZ disuelta, utilizando el método analítico descrito por (Meshram *et al.*, 2009). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

3.3.2.12 Estudios de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El sistema HPLC consistió en un cromatógrafo líquido Agilent® S1100, un inyector automático de *loop* variable (Agilent 1100 serie G-1313 A) prefijado en 20 µL, y un detector UV-Visible variable Agilent serie G1365B. Se utilizó una columna de fase reversa de C18 (Phenomenex®) de 250 mm x 4,6 mm con partículas de relleno con un diámetro de 4,0 µm. La fase móvil consistió en una mezcla de solución *buffer* de fosfato monobásico de potasio, 0,05 M (pH 3,25, ajustado con ácido ortofosfórico) y ACN (82:18, v/v) (Meshram *et al.*, 2009) la cual se filtró a través de membranas de Nylon® (0,45 µm) y se desgasificó mediante vacío. El análisis se llevó a cabo en modo isocrático a 40 °C, utilizando un caudal de 1,5 mL/min. La detección se realizó a 210 y 300 nm. En todos los casos, se realizaron tres inyecciones de 20 µL cada una. La determinación de los tiempos de retención (*tr*) y el cálculo de las áreas de los picos se efectuó con el programa Chemstation Rev. A.10.02®.

Para la construcción de la curva de calibrado del TNZ se prepararon 3 soluciones estándar (*stock*) del TNZ, pesando exactamente (en matraces de 50 mL) 3 alícuotas (10 mg) del TNZ materia prima finamente pulverizado. Luego, se agregó a cada matraz 1 mL de ACN (solvente en el que TNZ es soluble) y a las suspensiones resultantes se completó a volumen con fase móvil hasta la disolución completa del IFA. Después, se transfirieron 5 alícuotas de cada solución *stock* del TNZ a matraces de 10 mL, cubriendo el intervalo de concentraciones de 100-1200 µg/mL y se completaron a volumen con fase móvil. Las soluciones se filtraron a

través de membranas de 0,45 μm y se analizaron por HPLC, utilizando las condiciones arriba descritas. La linealidad se evaluó por el método de los cuadrados mínimos y ANOVA, utilizando las herramientas estadísticas de Microsoft EXCEL®.

3.3.2.13 Ensayo de fotoestabilidad en estado sólido

Para investigar el efecto de la luz sobre la apariencia y la fotoestabilidad de las nuevas formas sólidas del TNZ se utilizó una lámpara de luz UV (Philips *Sunlight* MLU 220, 300 W) que emite luz en el intervalo de 283 a 750 nm. Cabe señalar que el estudio no cumplió estrictamente con lo establecido en las normas internacionales sobre ensayos de fotoestabilidad de medicamentos (ICH Q1B, 1998); sin embargo, aportó resultados confiables sobre el comportamiento de las nuevas formas sólidas de TNZ frente a la acción de la luz UV-Visible. Para el ensayo, se colocaron alrededor de 100 mg de muestra ($n = 2$) en un pocillo de 9,2 cm^2 [placas de cultivo de poliestireno CELLSTAR® de 6 pocillos (Greiner Bio-One GmbH), transparentes y resistentes a la luz UV)], y con una espátula se extendieron cuidadosamente a fin de que toda la superficie del pocillo quedara cubierta con muestra. Las placas se ubicaron en el interior de una cabina, debajo de la lámpara Phillips y a una distancia de 40 cm para una exposición uniforme a la luz UV-Visible. El aumento de la temperatura ambiente, debido a la radiación UV-Visible, no se impidió, pero se determinó que la temperatura nunca fue mayor a 50 °C. Como blancos se utilizaron las mismas cantidades de cada una de las fases ensayadas, pero las placas se protegieron de la luz. Dado que varias muestras experimentaron un cambio drástico de color luego de 4 horas de irradiación, el estudio no se extendió más allá de ese tiempo. Después de la exposición a la luz, se tomaron porciones ($n = 3$) de cada una de las muestras, se pesaron exactamente y disolvieron en ACN. Las soluciones resultantes se filtraron (membranas de 0,45 μm) y el contenido del TNZ se determinó utilizando el método de HPLC descrito en la Sección 3.2.3.12. Además, se tomaron alícuotas de las muestras irradiadas y de los controles y se analizaron por DRIFT.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Selección de los coformadores

La síntesis de un CC puede verse afectada por muchas variables, que en su mayoría dependen de los compuestos de partida (IFA y COF) y la naturaleza del solvente, si es que se utilizan solventes en el proceso de obtención (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). Por ejemplo, la presencia de ciertos grupos funcionales en el IFA y el COF y sus solubilidades, además de las condiciones experimentales (relación estequiométrica del COF e IFA, temperatura de reacción, agitación, entre otras) son fundamentales para la obtención de un CC (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). Otro aspecto muy importante a tener en cuenta es que el COF debe poseer grupos capaces de formar enlaces no-covalentes con el IFA a modificar supramolecularmente y, además, debe ser seguro para uso en humanos.

Para la selección de los potenciales COF del TNZ se tomaron en cuenta los grupos funcionales presentes en su molécula y su potencialidad para actuar como donores o aceptores de hidrógenos. Este análisis indicó que el TNZ presenta un considerable potencial para interaccionar intermolecularmente a través de:

- el grupo nitro, el cual es capaz de actuar como aceptor de enlaces de hidrógeno (*hydrogen bond acceptor*, *HBA* por su sigla en inglés);
- el grupo sulfona, que es capaz de actuar como *HBA*, y
- los átomos de nitrógeno y azufre del anillo imidazol, los cuales son capaces de actuar como *HBA*.

Dado que el enlace no-covalente más importante para la formación de CC es el enlace de hidrógeno, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar posibles sintones para los grupos funcionales y átomos antes indicados. Así, se determinó que:

- ✓ el grupo nitro del imidazol es capaz de aceptar protones de grupos donores de hidrógeno [Y-H donde Y= O, N, C (Robinson *et al.*, 2000)] formando homo y heterosintones tales como los mostrados en la Figura 3.3.

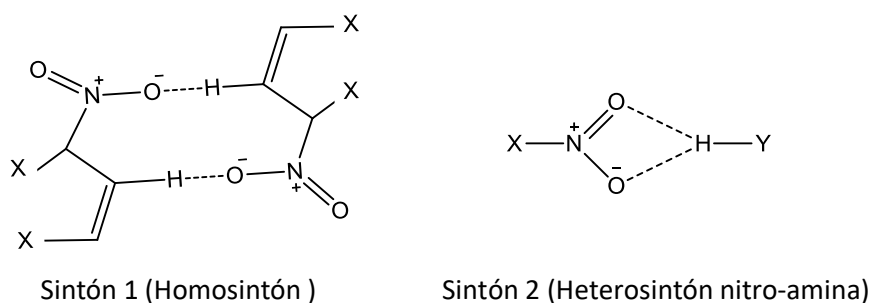


Figura 3.3. Posibles sintones para el grupo nitro del TNZ.

- ✓ el grupo sulfona es capaz de interactuar de manera no covalente con COF que contengan grupos amino aromáticos primarios, formando el heterosintón sulfona-amina aromática (Jiang *et al.*, 2014) (Figura 3.4).

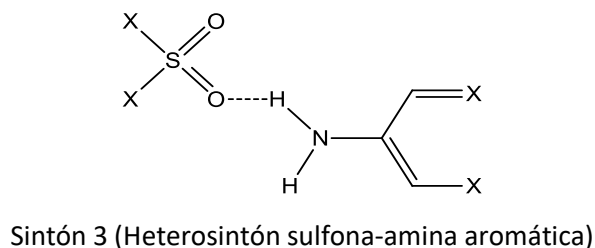


Figura 3.4. Posible heterosintón para el grupo sulfona del TNZ.

- ✓ el N3 del imidazol (Figura 3.1) podría aceptar protones de ácidos carboxílicos, alcoholes y amidas primarias (Figura 3.5), formando los heterosintones azol-ácido carboxílico, azol-alcohol y azol-amida, y de ellos, el sintón azol-ácido carboxílico tiene una alta probabilidad de ocurrencia (Cheney *et al.*, 2010).

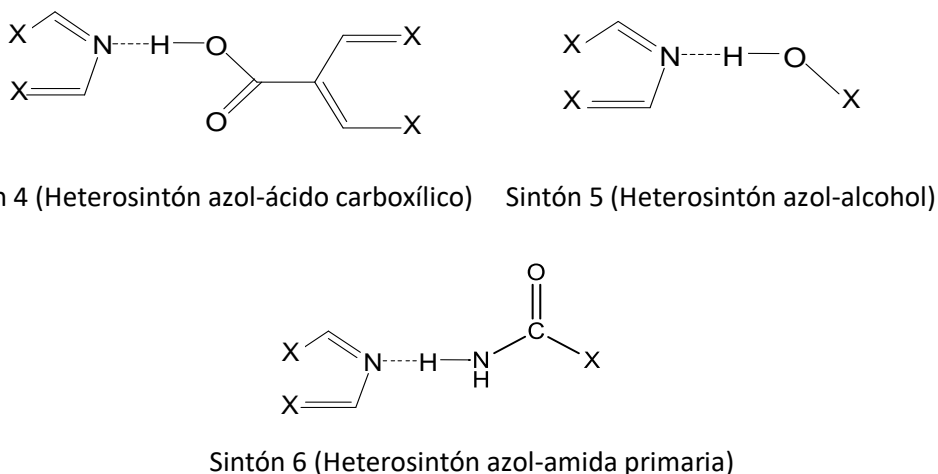


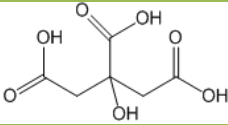
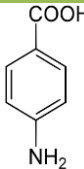
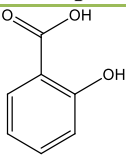
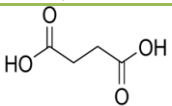
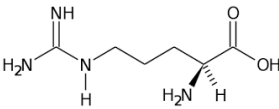
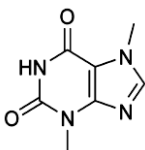
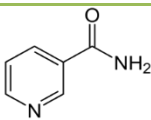
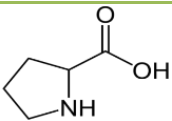
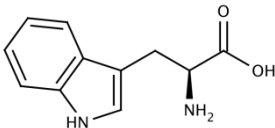
Figura 3.5. Posibles heterosintones para el anillo imidazol del TNZ.

3.4.2 Métodos de cocrystalización, puntos de fusión y morfología de las muestras sólidas preparadas

Tomando en cuenta los sintones posibles para el TNZ (Figuras 3.3-3.5), y que el sintón azol-ácido carboxílico tiene altas probabilidades de formación, se seleccionaron 5 ácidos carboxílicos GRAS, 3 aminoácidos, y dos amidas GRAS. En la Tabla 3.1 se presentan las estructuras químicas de los COF seleccionados, y se detallan también algunas de sus propiedades físicas y químicas. Cabe señalar que, si bien existen varias aproximaciones para predecir la formación de CC, determinar que un IFA cocrystalizará con un dado COF sigue siendo un ejercicio empírico. Por lo cual, se deben emplear diferentes métodos de cribado y varios COF (Karagianni *et al.*, 2018). De esos métodos, las técnicas mecanoquímicas (Capítulo 1), y en particular la molienda asistida con solvente (LAG), han adquirido gran relevancia como métodos iniciales de cribado. Son sencillos y eficaces para la formación de CC, ya que el solvente humedece al sólido y actúa como catalizador, acelerando la formación de CC (Karimi-Jafari *et al.*, 2018). Por tanto, la capacidad de cocrystalizar del TNZ con los COF, seleccionados se evaluó en primer lugar con dicha metodología, mortereando manualmente cantidades equimolares del TNZ y el COF con solventes y antisolventes. En segundo lugar, se ensayó un método en solución ya que la cristalización en solución es el medio más favorable para obtener CC puros, a la vez que se facilita el escalado (Fabián *et al.*, 2011)].

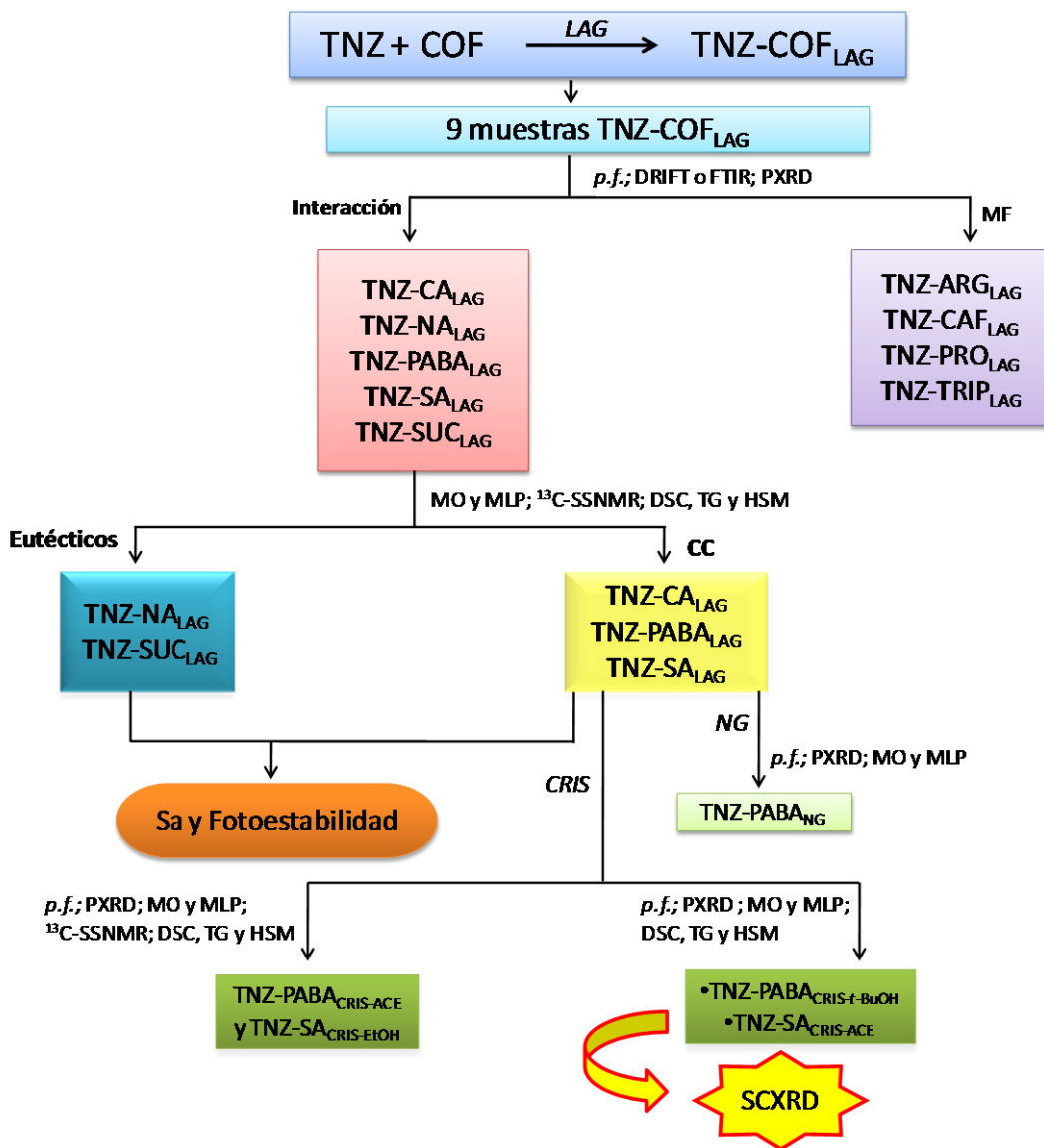
Como criterio inicial de formación de los CC, se utilizó el o los *p.f.* de las mezclas TNZ-COF obtenidas. Ellos se compararon con los de los componentes puros porque, en general, los CC exhiben una temperatura de fusión que suele estar entre las del IFA y del COF. También, hay CC cuyos *p.f.* son menores a los de los componentes puros (Schultheiss y Newman, 2009). Menos frecuentes son aquellos con *p.f.* mayores a los del IFA y del COF, y muy raras veces se observan CC con *p.f.* iguales a los de alguno de los componentes puros (Schultheiss y Newman, 2009). Además, se evaluaron las características morfológicas de las muestras obtenidas mediante MO o MLP.

Tabla 3.1. Estructuras químicas y propiedades físicas y químicas seleccionadas de los COF utilizados en los ensayos de cocrystalización del TNZ.

Coformador	Estructura química	PM ^a (g/mol)	<i>p.f.</i> ^b (°C)	pK _a ^d
Ácido cítrico (CA)		192,12	153,0	2,79
Ácido <i>p</i> -amino benzoico (PABA)		137,14	188,5	2,38 (pKa1) 4,35 (pKa2)
Ácido salicílico (SA)		138,12	158,0	2,98 (pKa1) 13,6 (pKa2)
Ácido succínico (SUC)		118,09	184,0	4,21 (pKa1) 5,64 (pKa2)
Arginina (ARG)		174,20	244,0 desc.	2,18 (pKa1) 9,09 (pKa2) 13,2 (pKa3)
Cafeína (CAF)		194,19	235,0	14
Nicotinamida (NA)		122,12	128,8	3,35 (pKa del ácido conjugado)
Prolina (PRO)		115,13	221,0 desc.	1,94 (pKa1) 11,33 (pKa2)
Triptófano (TRIP)		204,22	290,5 desc.	2,38 (pKa1) 9,39 (pKa2)

^{a,b y d} Kim *et al.*, 2021. ^c Yalkowski *et al.*, 2010. ^e 36,6 °C; ^f 37°C; ^g 35 °C; ^h 25 °C.

La Tabla 3.2 resume los ensayos de cocrystalización entre el TNZ y los 9 COF ensayados, indicándose los métodos de preparación utilizados, los *p.f.* observados y la predicción de posibles interacciones. A su vez en el Esquema 3.1 condensa la metodología de caracterización empleada para las distintas muestras obtenidas de TNZ.



Esquema 3.1. Metodologías de obtención y caracterización de muestras sólidas multicomponentes de TNZ.

Como se observa en las entradas # 2-5 (Tabla 3.2), TNZ por LAG con los COF ARG, CAF, PRO y TRIP condujo a 4 muestras (TNZ-ARG, TNZ-CAF, TNZ-PRO y TNZ-TRIP) que presentaron dos eventos térmicos a 126,0 y 190,0 °C. Estas fueron coincidentes con el *p.f.* del TNZ puro (# 1, 126,0 °C, Tabla 3.2) y la T del inicio de su descomposición (190 °C, transformación de la fase fundida en un líquido pardo-negruzco; Ferraz Pinto *et al.*, 2010). Por ello, se concluyó que las muestras obtenidas representaban MF y no nuevas formas sólidas. Esto indicó que el TNZ no interaccionaría supramolecularmente con ninguno de los 4 COF anteriormente mencionados.

Tabla 3.2. Métodos de cocrystalización, *p.f.* de las muestras TNZ-COF y predicción de posibles interacciones.

#	Muestra	Método, ^a Solvente o mezcla de solventes ^b	<i>p.f.</i> , °C ^c	Posible interacción ^d
1	TNZ	---	126,0	---
2	TNZ-ARG _{LAG}	A, ACN	126,0 y 190,0 (desc.)	NO
3	TNZ-CAF _{LAG}	A, ACN	126,0 y 190,0 (desc.)	
4	TNZ-PRO _{LAG}	A, ACN	126,0 y 190,0 (desc.)	
5	TNZ-TRIP _{LAG}	A, ACN	126,0 y 190,0 (desc.)	
6	TNZ-CA _{LAG}	A, ACE	121,6	SI
7	TNZ-NA _{LAG}	A, ACE	102,0	
8	TNZ-PABA _{NG}	B	132,0	
9	TNZ-PABA _{LAG}	A, ACE	112,8 y 134,0	
10	TNZ-PABA _{CRIS-ACE}	C, ACE-EtOH 4:1	113,1 y 133,5	
11	TNZ-PABA _{CRIS-t-BuOH}	C, <i>t</i> -BuOH-ACE 1:1	113,6 y 132,8	
12	TNZ-SA _{LAG}	A, ACE	118,0	
13	TNZ-SA _{CRIS-EtOH}	C, EtOH-Agua 5:2	118,4	
14	TNZ-SA _{CRIS-ACE}	C, ACE-Agua 1:4	118,6	
15	TNZ-SUC _{LAG}	A, ACE	106,0	

^a A: LAG; B: NG y C: CRIS. ^b v/v. ^c Método del capilar cerrado, Incerteza $\pm 1^\circ\text{C}$. ^d Diferencia en los *p.f.* de las muestras obtenidas con los productos puros de partida.

La aplicación de la metodología LAG con TNZ y los COF CA, NA, SA y SUC condujo a sólidos criptocristalinos (Figura 3.6h,l,n,p) que exhibieron un único *p.f.* (# 6-7, 12 y 15, Tabla 3.2), el cual fue diferente al del TNZ y al de los COF puros. Esto sugirió una posible interacción entre el TNZ y los 4 COF antes indicados. Es digno de destacar que, con el COF PABA, tanto la NG como la LAG provocaron un cambio paulatino en la coloración de la muestra, la cual pasó del blanco inicial al amarillo intenso. Se debe tener en cuenta que el TNZ era un sólido criptocristalino blanco (Figura 3.6a) y el PABA estaba constituido por cristales aciculares transparentes e incoloros (Figura 3.6b). En efecto, la molienda manual condujo a sólidos criptocristalinos de color amarillo intenso (Figura 3.6c,d). En cuanto al comportamiento frente al calor, el TNZ-PABA_{NG} exhibió un solo *p.f.* (132,0 °C, #8, Tabla 3.2), en tanto que el TNZ-PABA_{LAG} mostró dos *p.f.* (112,8 y 134,0 °C, # 9, Tabla 3.2). Cabe destacar la similitud entre el *p.f.* de TNZ-PABA_{NG} y el segundo de TNZ-PABA_{LAG}. Además, estos fueron mayores al de TNZ puro (126 °C, # 1, Tabla 3.2) y menores al de PABA puro (188 °C, Tabla 3.1), comportamiento típico de la mayoría de los CC (Schultheiss y Newman, 2009). Esto sugirió, junto al cambio de

coloración de las muestras, que TNZ interaccionaría supramolecularmente con PABA.

Dado que, con los COF PABA, SA, CA, NA y SUC se obtuvieron muestras con *p.f.* diferentes a los de los materiales de partida. se decidió ensayar la cocrystalización en solución. Para ello, se seleccionaron mezclas de solventes en las cuales el TNZ y los 5 COF fueran solubles (Fabián *et al.*, 2011). Como indica la Tabla 3.2, por evaporación lenta de soluciones del TNZ y PABA, y del TNZ y SA, se lograron aislar cristales de TNZ-PABA_{CRIS-ACE}, TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH}, TNZ-SA_{CRIS-EtOH} y TNZ-SA_{CRIS-ACE}. Estos presentaron *p.f.* (# 10, 11, 13 y 14, Tabla 3.2) similares a los de las respectivas muestras obtenidas por LAG (# 9 y 12, Tabla 3.2).

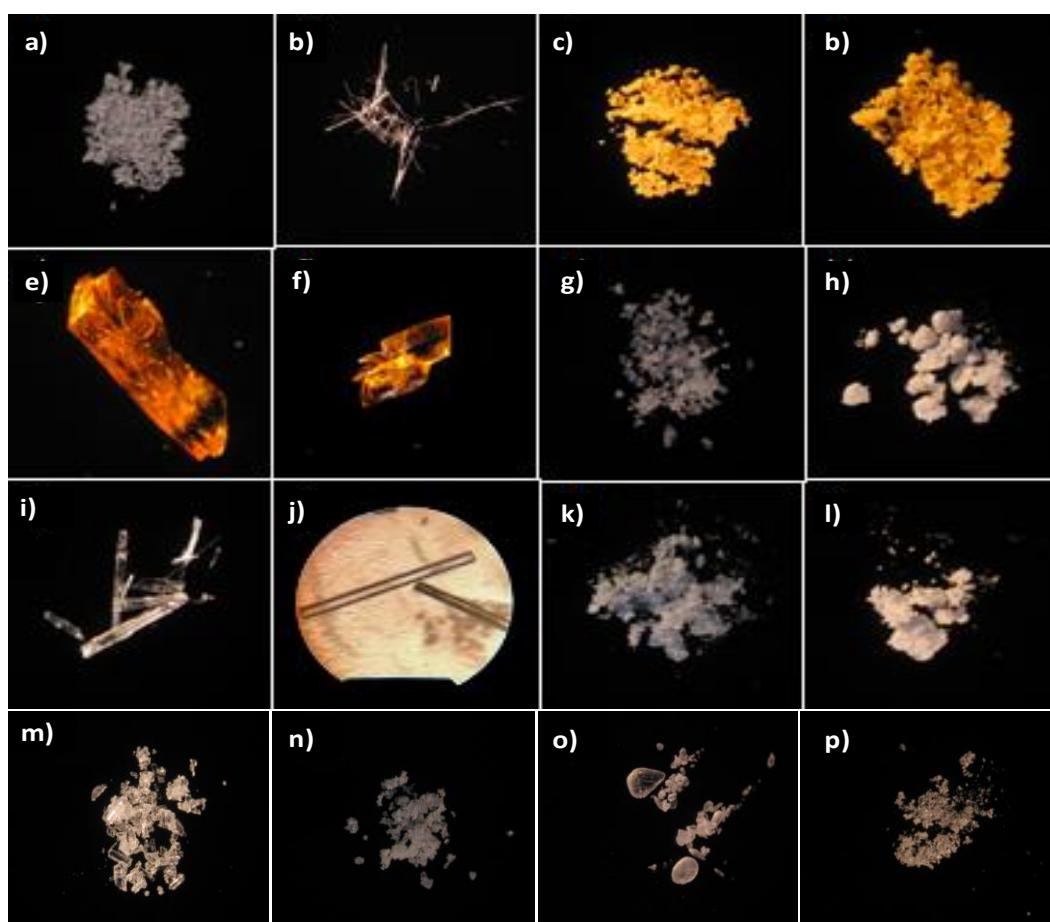


Figura 3.6. Imágenes del TNZ, los cinco COF que condujeron a nuevas formas sólidas y los productos TNZ-COF. a) TNZ (4,0X); b) PABA (1,0X); c) TNZ-PABA_{NG} (2,5X); d) TNZ-PABA_{LAG} (5,0X); e) TNZ-PABA_{CRIS-ACE} (2,5X); f) TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH} (3,0X); g) SA (4,0X); h) TNZ-SA_{LAG} (4,0X); i) TNZ-SA_{CRIS-EtOH} (1,0X); j) TNZ-SA_{CRIS-ACE} (10x); k) CA (1,0X); l) TNZ-CA_{LAG} (3,0X); m) NA (3,5X); n) 1:1 TNZ-NA_{LAG} (3,0X); o) SUC (5,0X) y p) 1:1 TNZ-SUC_{LAG} (5,0X). Todas las imágenes, exceptuando la j, se tomaron con la lupa estereoscópica StereoZoom® y una cámara digital Canon. La imagen j) se tomó con la cámara del iPhone X, colocando el celular sobre el microscopio de fusión Kofler.

Como rasgos distintivos puede señalarse, que a partir de soluciones del TNZ y PABA se obtuvieron cristales prismáticos de color anaranjado transparente (Figura 3.6e,f). En cambio, de las soluciones del TNZ y SA se aislaron cristales aciculares incoloros (Figura 3.6i,j).

Por otra parte, con los COF CA, NA y SUC, los intentos de cristalización condujeron a la formación de cristales cuyos *p.f.* fueron coincidentes con el del TNZ. Ello sugirió que este último no cocrystalizaba con dichos COF bajo las condiciones ensayadas. En efecto, la cocrystalización en solución requiere de condiciones experimentales, que están fuertemente condicionadas por el diagrama de fase ternario IFA-COF-SOLVENTE, especialmente si las fases cocrystalinas presentan una región de estabilidad muy estrecha (Fabián *et al.*, 2011)].

Como se describió previamente (Esquema 3.1), entre el TNZ y el PABA, el SA, el CA, la NA y el SUC se obtuvieron muestras con *p.f.* diferentes a los productos de partida. Con el fin de confirmar que fueran nuevas fases sólidas, se recurrió a la PXRD, una técnica diagnóstica, útil para diferenciar fases cocrystalinas de mezclas físicas y eutécticas.

3.4.3 PXRD

En las Figuras 3.7-3.11 se presentan los patrones de PXRD del TNZ y de los COF PABA, SA, CA, NA y SUC, sus respectivas MF y los productos obtenidos de sus ensayos de cocrystalización.

Como se aprecia en la Figura 3.7, los patrones de PXRD del TNZ-PABA_{LAG} (Figura 3.7d), TNZ-PABA_{NG} (Figura 3.7e) y TNZ-PABA_{CRIS-ACE} (Figura 3.7f) fueron coincidentes entre sí pero diferentes a los de los componentes puros (Figura 3.7a,b) y al de TNZ-PABA_{MF} (Figura 3.7c). Este fue la suma de los patrones de PXRD de los componentes puros, como era esperable. Ello evidenció que con los tres métodos de cocrystalización utilizados se obtenía la misma fase cristalina, posiblemente un CC o sal molecular del TNZ y PABA.

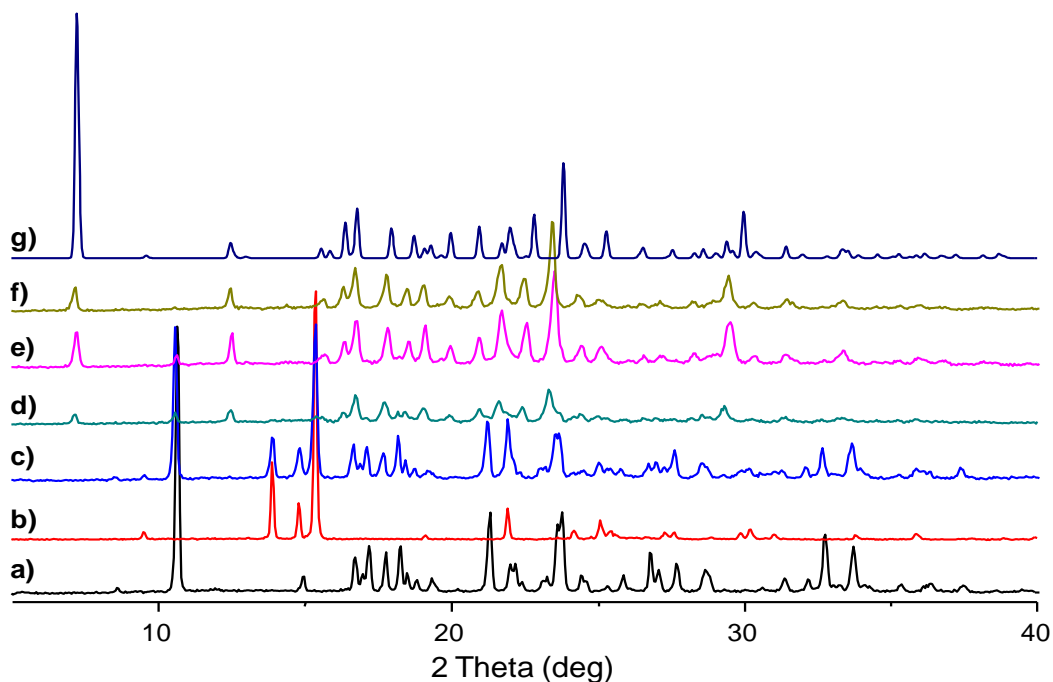


Figura 3.7. Patrones de PXRD experimentales de: (a) TNZ; (b) PABA; (c) TNZ-PABA_{MF}; (d) TNZ-PABA_{NG}; (e) TNZ-PABA_{LAG}, y (f) TNZ-PABA_{CRIS-ACE}. A los fines de la comparación también se incluye el patrón de PXRD simulado (g, Cu K α_1 $\lambda = 1,54056\text{\AA}$) a partir de datos de SCXRD para un monocristal de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH}.

En la Figura 3.8 se exhiben los patrones PXRD del TNZ, SA, TNZ-SA_{MF}, TNZ-SA_{LAG} y TNZ-SA_{CRIS-EtOH}. Los patrones de PXRD de TNZ-SA_{LAG} (Figura 3.8d) y TNZ-SA_{CRIS-EtOH} (Figura 3.8e) fueron superponibles entre sí, pero mostraron claras diferencias con los patrones de los componentes puros. En efecto, dichos patrones no fueron la superposición de las reflexiones del TNZ (Figura 3.8a) y SA (Figura 3.8b), tal como el de TNZ-SA_{MF} (Figura 3.8c), y ello indicaría que mediante los procedimientos de LAG y CRIS se obtiene la misma fase cristalina, posiblemente un CC o una sal molecular del TNZ y SA.

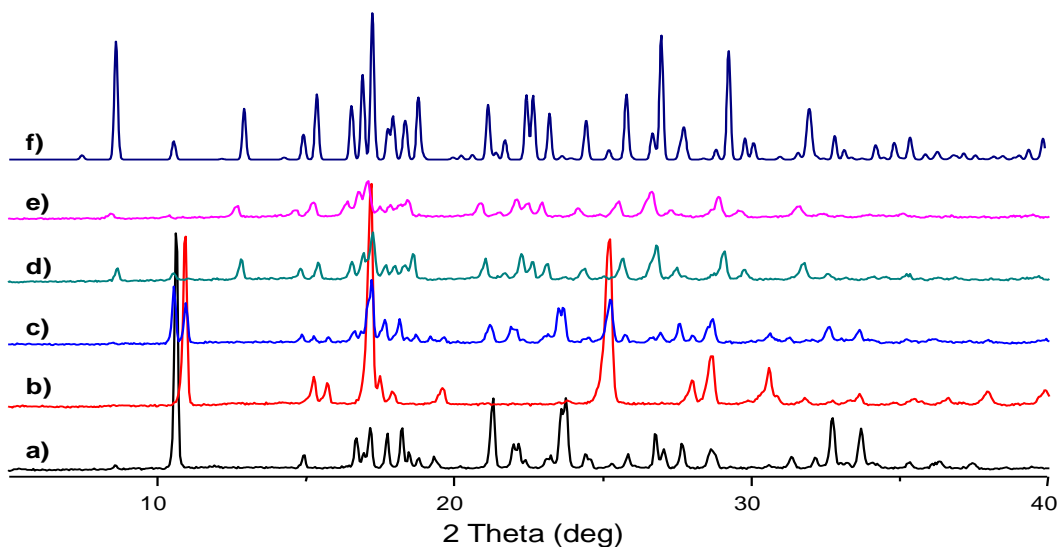


Figura 3.8. Patrones de PXRd experimentales de: (a) TNZ; (b) SA; (c) TNZ-SA_{MF}; (d) TNZ-SA_{LAG}, y (e) TNZ-SA_{CRIS-ETOH}. A los fines de la comparación también se incluye el patrón de PXRd simulado (f, Cu K α_1 , $\lambda = 1,54056\text{\AA}$) a partir de datos de SCXRD para un monocristal de TNZ-SA_{CRIS}.

Los patrones de PXRd del TNZ, CA, TNZ-CA_{MF} y TNZ-CA_{LAG} se exhiben en la Figura 3.9. Del análisis de la figura surge claramente que el patrón de PXRd de TNZ-CA_{LAG} (Figura 3.9d) no fue la suma de los patrones de polvo del TNZ (Figura 3.9a) y CA (Figura 3.9b), tal como el de TNZ-CA_{MF} (Figura 3.9c), lo cual indicó que TNZ-CA representaría una nueva fase cristalina, probablemente un CC o una sal molecular del TNZ y CA.

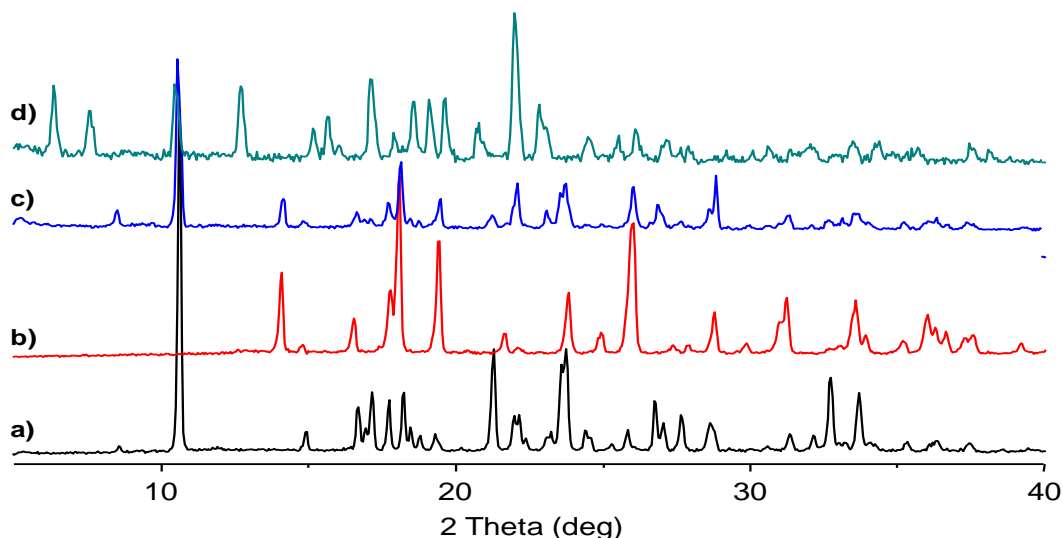


Figura 3.9. Patrones de PXRd experimentales de: (a) TNZ; (b) CA; (c) TNZ-CA_{MF}, y (d) TNZ-CA_{LAG}.

En contraste, los patrones de PXRD de TNZ-NA_{LAG} (Figura 3.10) y TNZ-SUC_{LAG} (Figura 3.11) fueron claramente la suma de las reflexiones de los respectivos materiales de partida, al igual que los de TNZ-NA_{MF} (Figura 3.10c) y TNZ-SUC_{MF} (Figura 3.11c). Esto indicó que, ambas muestras eran mezclas físicas o eutécticos, pero no serían CC o sales moleculares. Por tanto, se concluyó que, utilizando la técnica LAG, tanto NA como SUC no cocrystalizan con el TNZ.

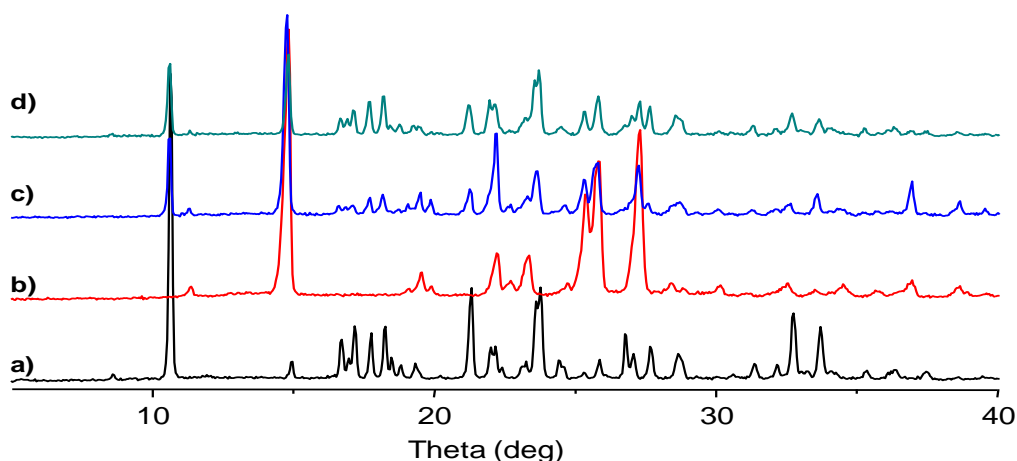


Figura 3.10. Patrones de PXRD experimentales de: (a) TNZ; (b) NA; (c) TNZ-NA_{MF}, y (d) TNZ-NA_{LAG}.

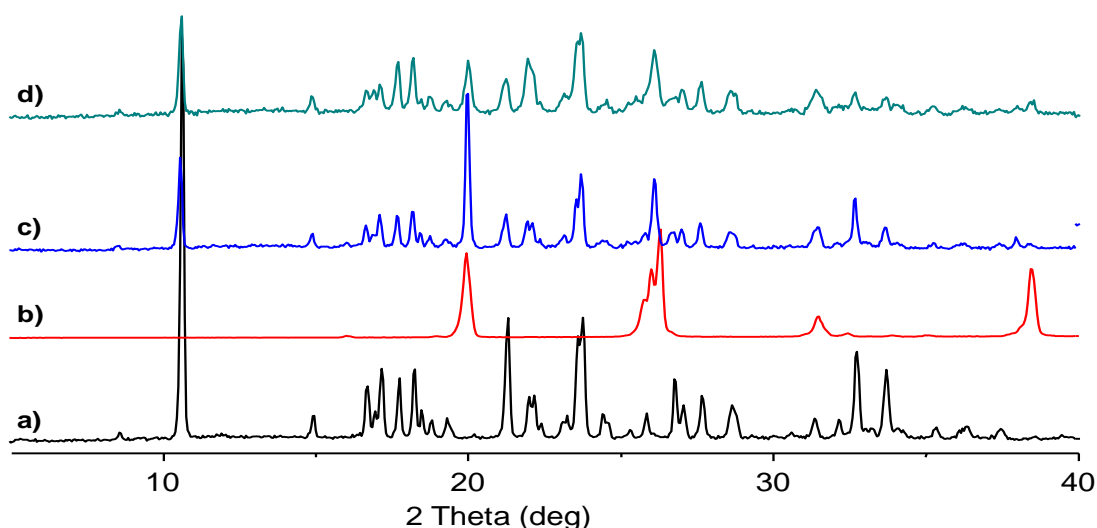


Figura 3.11. Patrones de PXRD experimentales de: (a) TNZ; (b) SUC; (c) TNZ-SUC_{MF}, y (d) TNZ-SUC_{LAG}.

Los datos de PXRD indicaron que con PABA, SA y CA se obtuvieron nuevas fases cristalinas. Por esta razón se intentó resolver sus estructuras cristalinas por

SCXRD a fin de determinar si dichas fases eran cocristales o sales moleculares.. Sin embargo, solo se pudieron obtener monocristales del TNZ con el PABA, y del TNZ con el SA (Sección 3.3.2.3). A continuación, se describen los resultados de dichos estudios.

3.4.4 SCXRD de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} y de TNZ-SA_{CRIS-ACE}

Mediante cocrystalización en solución, utilizando las mezclas de solventes y procedimientos indicados en la Sección 3.3.2.3, se lograron obtener los monocristales TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} y TNZ-SA_{CRIS-ACE}, los cuales resultaron útiles para resolver sus estructuras cristalinas. Los tamaños de los cristales, parámetros de las celdas unitarias y los detalles del refinamiento de ambas estructuras cristalinas (Figuras 3.12 y 3.13) se presentan en el Anexo 1 (Tablas S1 y S2).

En el caso de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH}, los resultados de SCXRD (Figura 3.12), (Tabla S1, Anexo 1) indicaron inequívocamente que el TNZ cocrystaliza con PABA formando un CC solvatado, ya que su unidad asimétrica (UA) contiene una molécula del TNZ, una del PABA y un complemento de disolvente en estado desordenado. La estructura cristalina pertenece al sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$ (No. 14) (Tabla S1, Anexo 1) y como se muestra en la Figura 3.12a, las moléculas del TNZ y PABA se unen mediante el enlace puente hidrógeno fuerte y lineal O24-H24 \cdots N3, cuya distancia O \cdots N es de 2,679(3) Å y el ángulo de enlace OH \cdots N es de 179°. Además, el anillo imidazol de TNZ y el bencénico de PABA son casi coplanares [ángulo interplanar = 13,6 (1) °].

Las UA del CC TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} se ensamblan entre sí mediante enlaces de hidrógeno formando una cinta, una parte de la cual se muestra en la Figura 3.12b. En la cinta se pueden observar anillos concatenados mediante enlaces puente hidrógeno idénticos, en una disposición en zigzag. Cada uno de esos anillos contiene 20 átomos, y hay 4 átomos dadores de H y 4 átomos aceptores de H [es decir $R_4^4(20)$, conforme a la representación gráfica de redes de enlaces de hidrógenos de M. Etter (1990)].

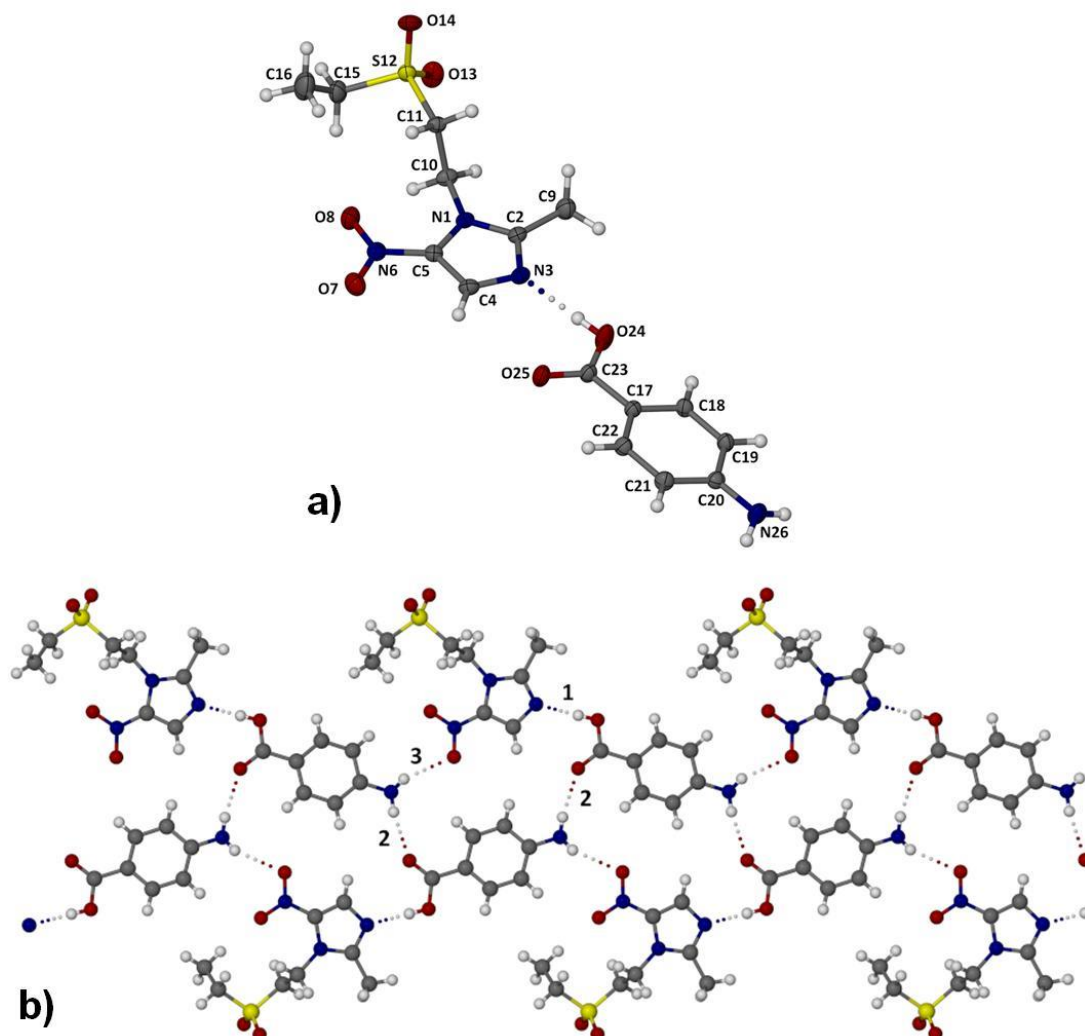


Figura 3.12. (a) Unidad asimétrica en la estructura de TNZ-PABA_{CrIS-t-BuOH}. Los átomos se dibujaron como elipsoides (50% de probabilidad) y se omitió el disolvente desordenado para mayor claridad. (b) Empaquetamiento cristalino de TNZ-PABA_{CrIS-t-BuOH} con los enlaces de hidrógeno numerados para indicar los anillos representativos que se forman.

Los anillos concatenados se forman por 3 enlaces de H: el H1 es el que se muestra en la Figura 3.12a,b y forma el sintón azol-carboxílico (entre el N3 del anillo imidazol y el grupo OH del carboxilo de PABA); el H2 ocurre dos veces e involucra al O del grupo carboxílico de PABA de una UA y un protón del grupo amino de la molécula de PABA de otra UA, tiene una distancia O...N de 2,984(3) Å y un ángulo de 168(4)°, y el H3 se forma entre un oxígeno del grupo NO₂ de una molécula de TNZ de una UA y un protón del grupo amino de una molécula de PABA de otra UA, tiene una distancia N...O de 3,067(3) Å y un ángulo de 151(2)°.

Los bordes de una cinta están unidos a cintas vecinas a través de una serie de enlaces de hidrógeno intermoleculares metileno–oxígeno formados entre C11-H11A...O13-S12 (sulfonilo) con una distancia C...O de 3,317(3) Å y un ángulo de enlace de 138°. Las cintas sucesivas no son coplanares, sino que cada una de ellas está ligeramente desplazada de la cinta anterior, y ello origina capas escalonadas (dichas capas no se representan en la Figura 3.12).

La identificación del disolvente incluido en los cristales de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} se efectuó a partir del análisis por ¹H-NMR de una solución de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} preparada en CDCl₃ (Figura S1, Anexo 1). Pero, como para poder realizar el refinamiento de la estructura cristalina de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} se precisaba un valor confiable para la ocupación de sitio del *t*-BuOH desordenado, obtenido a partir de una técnica analítica independiente, se intentó determinar el contenido de solvente mediante TG convencional, dada su capacidad para cuantificar el contenido de volátiles de muestras sólidas. Sin embargo, el análisis TG indicó que TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} experimenta procesos de desolvatación y descomposición concurrentes (Sección 3.4.7), con lo cual la TG convencional no resultó útil para determinar el contenido de solvente. Ante ello, considerando que la TG de alta resolución (*HiRES* TG®, TA Instruments Inc.) permite resolver eventos de pérdidas de masa solapados, se decidió analizar la muestra mediante dicha técnica. La *HiRES* TG® logró, en efecto, resolver los eventos de desolvatación y descomposición, y arrojó una pérdida de solvente del 7,3%, la cual se atribuyó al *t*-BuOH, conforme a lo indicado por ¹H-NMR (Figura S1, Anexo 1) e indicó, que por mol de TNZ-PABA había 0,4 mol de *t*-BuOH. Por lo tanto, se estableció la siguiente composición para TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH}: TNZ:PABA:*t*-BuOH 1:1:0,4 (Tabla S1, Anexo1).

La naturaleza del solvente incluido en el cristal de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} (*t*-BuOH con un factor de ocupación de sitio de 0,4) y su rol en el cristal se hace evidente en la Figura 3.13, la cual es la proyección de la estructura cristalina en el eje **a**. Como se aprecia, los dos componentes desordenados de las moléculas de *t*-BuOH están relacionados por inversión, y se ubican en posiciones especiales: en el centro de la celda unitaria y en sus esquinas. Como la longitud del eje **a** es de ~6 Å, se dedujo que las moléculas desordenadas del solvente se ubicaron en canales infinitos paralelos a la dirección x; que actúan como rellenos de estos y que están rodeados por las cintas que se muestran en la Figura 3.12b.

Los datos de refinamiento de la estructura cristalina de TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH} (CSD *Refcode* MUKXIC, Tabla S1, Anexo 1) se utilizaron para calcular su patrón de polvo simulado a 173 K (con radiación Cu K α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Como se aprecia en la Figura 3.7, el patrón PXRD calculado (Figura 3.7g) concordó con los patrones PXRD experimentales de las muestras de TNZ-PABA obtenidas por NG, LAG y cristalización de ACE-EtOH (Figura 3.7d-f), lo cual indicó que las cuatro muestras representan la misma fase cristalina. La ubicación del solvente en canales infinitos, evidentemente, determina que se formen CC solvatados isoestructurales. La concordancia entre los patrones simulados y experimentales reveló, además, que no se produjo un cambio estructural significativo en TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH} al enfriar su monocristal desde temperatura ambiente (294 K) hasta 173 K (temperatura utilizada para resolver su estructura cristalina).

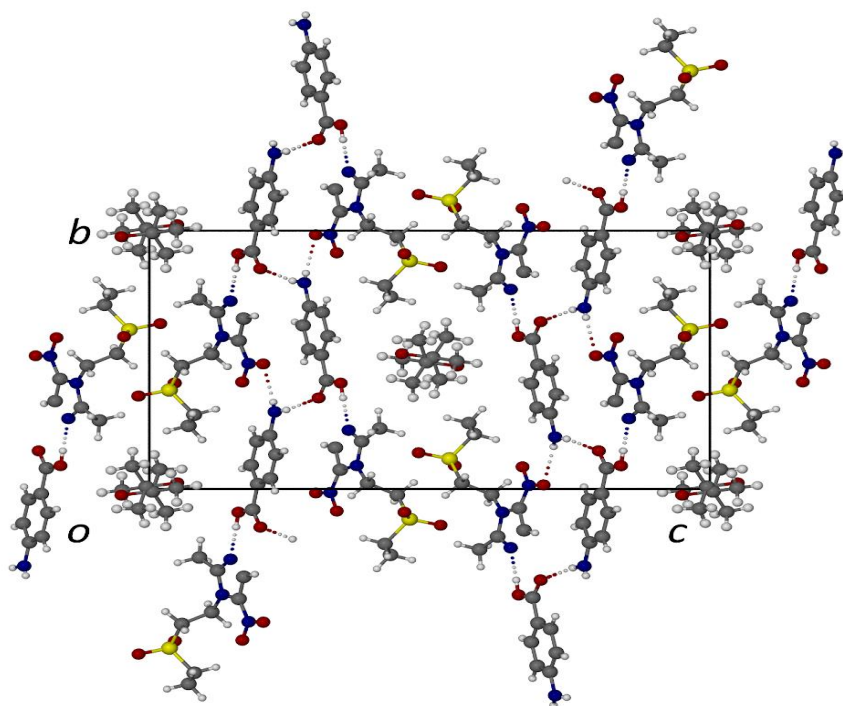


Figura 3.13. Proyección de la estructura cristalina de TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH} sobre el eje *a*. Se muestran dos componentes superpuestos de la molécula de *t*-BuOH en cada centro de inversión.

La Figura 3.14 presenta la UA y el empaquetamiento cristalino de TNZ-SA_{CRIS-ACE}. Como se visualiza, los datos de SCXRD permitieron establecer que TNZ también cocrystaliza con SA, formando un CC no solvatado, cuya estructura cristalina (CSD *Refcode* MUKXOI, Tabla S2, Anexo 1) también pertenece al sistema cristalino

monoclínico, y al mismo grupo espacial que TNZ-PABA [P21/c (N° 14)]. La UA de TNZ-SA_{CRIS-ACE} (Figura 3.14a) contiene una molécula de TNZ y una molécula de SA, las cuales están unidas por un enlace de hidrógeno fuerte entre el nitrógeno N3 del anillo imidazol y el protón carboxílico del SA (O25-H25 \cdots N3, distancia O \cdots N = 2,629(2) Å y ángulo de enlace de 168°).

Como rasgos distintivos puede señalarse que en el TNZ-SA_{CRIS-ACE} se forma el mismo sintón supramolecular que da origen a la formación del CC de TNZ-PABA (Figura 3.12a), es decir el sintón azol-ácido carboxílico. Pero, la comparación de las Figuras 3.12a y 3.14a indicó que el grupo 2-etilsulfoniletilo de TNZ adopta una conformación significativamente diferente en ambos CC y que las estructuras supramoleculares de estos dos CC son totalmente diferentes debido a la presencia del grupo amina en PABA y a los pocos grupos funcionales del SA.

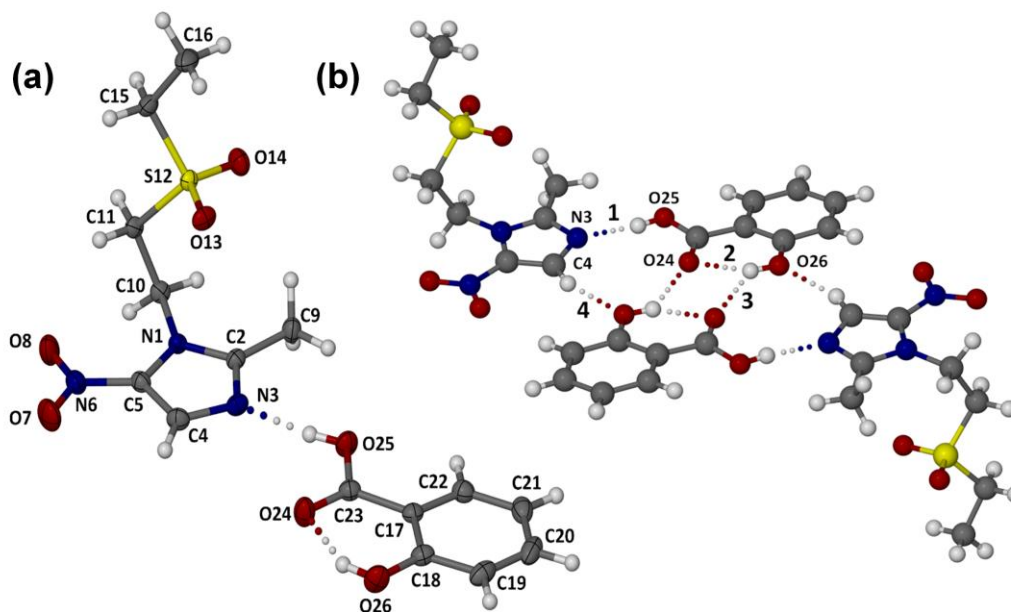


Figura 3.14. (a) Unidad estructural del CC de TNZ-SA_{CRIS-ACE}. Los átomos se dibujaron como elipsoides (50% de probabilidad). (b) Motivo supramolecular centrosimétrico que ocurre en TNZ-SA. Los átomos participantes en los enlaces de hidrógeno y los cuatro enlaces de H relevantes se indicaron con números arábigos.

En el cocrystal TNZ-SA_{CRIS-ACE} se observó, además, que el anillo fenol del SA participa en la formación de un enlace puente hidrógeno intramolecular con el oxígeno carbonílico, como era esperable, y el anillo fenilo del SA es casi coplanar con el anillo imidazol (ángulo interplanar = 7,8 (1)°. También, ocurre un motivo supramolecular (Figura 3.14b) que no está aislado sino fuertemente vinculado a una contraparte centrosimétrica mediante cuatro enlaces de hidrógeno y ello da como resultado el motivo dimérico que se muestra en la Figura 3.14b. El enlace **1** es intermolecular y el **2** intramolecular y se describieron con referencia a la UA de TNZ-SA_{CRIS-ACE} (Figura 3.14a). A su vez, el OH fenólico (O26-H) está involucrado en un enlace de hidrógeno bifurcado, uno de ellos es el designado como **2** (Figura 3.14b) y el otro el **3** (distancia O...O = 3,034(2) Å). Finalmente, el grupo ácido C4-H del TNZ (Figura 3.14b) se comporta como donador de H en el enlace 4 (distancia C...O = 3,228(2) Å). Los motivos diméricos en la estructura cristalina del TNZ-SA están unidos mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares adicionales del tipo C-H...O y, aunque los motivos planos mostrados en la Figura 3.14a están apilados en el cristal con una distancia interplanar de ~3,4 Å, están desplazados lateralmente entre sí de manera que los residuos aromáticos no participan en un apilamiento π .

Los datos de la estructura cristalina refinada del TNZ-SA_{CRIS-ACE} también se utilizaron para calcular su patrón de polvo de rayos X simulado a 173 K (con radiación Cu K α , $\lambda = 1,5418$ Å). La comparación del patrón PXRD simulado (Figura 3.8f) con los patrones experimentales de TNZ-SA_{LAG} (Figura 3.8d) y TNZ-SA_{CRIS-EtOH} (Figura 3.8e) mostró una excelente correspondencia en la posición de los picos, lo cual evidenció que las tres muestras eran isoestructurales, y que no se produjo un cambio estructural significativo al enfriar el monocristal de TNZ-SA_{CRIS-ACE} desde temperatura ambiente (294 K) hasta 173 K.

3.4.5 ¹³C-SSNMR

La SSNMR ha surgido como una herramienta poderosa para evidenciar la formación de CC (Zhao *et al.*, 2018). Por esta razón, fue importante incluir esta metodología al estudio estructural de los CC obtenidos en este trabajo de investigación. Con este fin, se registraron y compararon los espectros ¹³C CP/MAS de muestras de TNZ-PABA y TNZ-SA con la de TNZ-CA_{LAG}. Se tenía especial interés en determinar si la SSNMR podía proveer evidencia de la existencia de una

interacción supramolecular entre el TNZ y CA, tomando en cuenta que no se lograron obtener monocristales de TNZ-CA. Para ello, se consideraron las principales perturbaciones del espectro ^{13}C CP/MAS de TNZ-CA_{LAG} y sus similitudes espectrales con los CC de TNZ-PABA y de TNZ-SA.

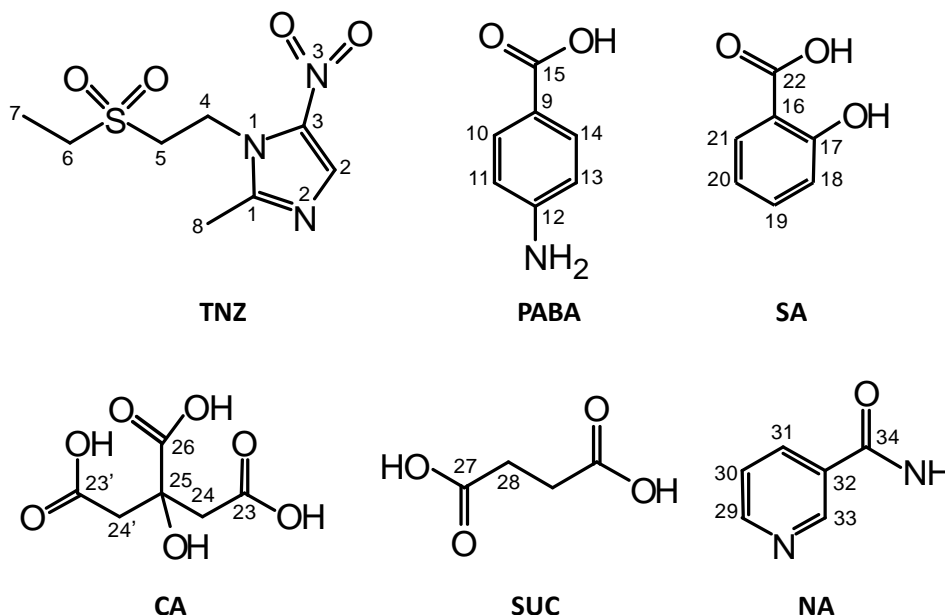


Figura 3.15. Numeración atómica utilizada en el estudio de ^{13}C -SSNMR para el TNZ y los 5 COF que dieron lugar a CC y mezclas con *p.f.* diferentes a los de TNZ y los COF puros.

Los espectros ^{13}C CP/MAS de los TNZ-PABA, TNZ-SA, TNZ-CA_{LAG} y sus respectivos compuestos de partida se exhiben en la Figura 3.16, mientras que los de las MF se muestran en la Figura S2 (Anexo 1). Los valores de los corrimientos químicos (asignados siguiendo la numeración mostrada en la Figura 3.15) se presentan en las Tablas S3-S5 (Anexo 1). También, se registraron los espectros ^{13}C CP/MAS de TNZ-SUC_{LAG} y de TNZ-NA_{LAG} y los de sus respectivos compuestos de partida (Figuras S3-4, Anexo 1).

Como se observa en la Figura 3.16, los espectros ^{13}C CP/MAS de TNZ-PABA_{LAG} (Figura 3.16e) y TNZ-PABA_{CRIS-ACE} (Figura 3.16f) fueron coincidentes. Así mismo, estos fueron congruentes con aquellos obtenidos por PXRD y SCXRD, los que indicaron que por LAG y por cristalización se obtiene la misma fase.

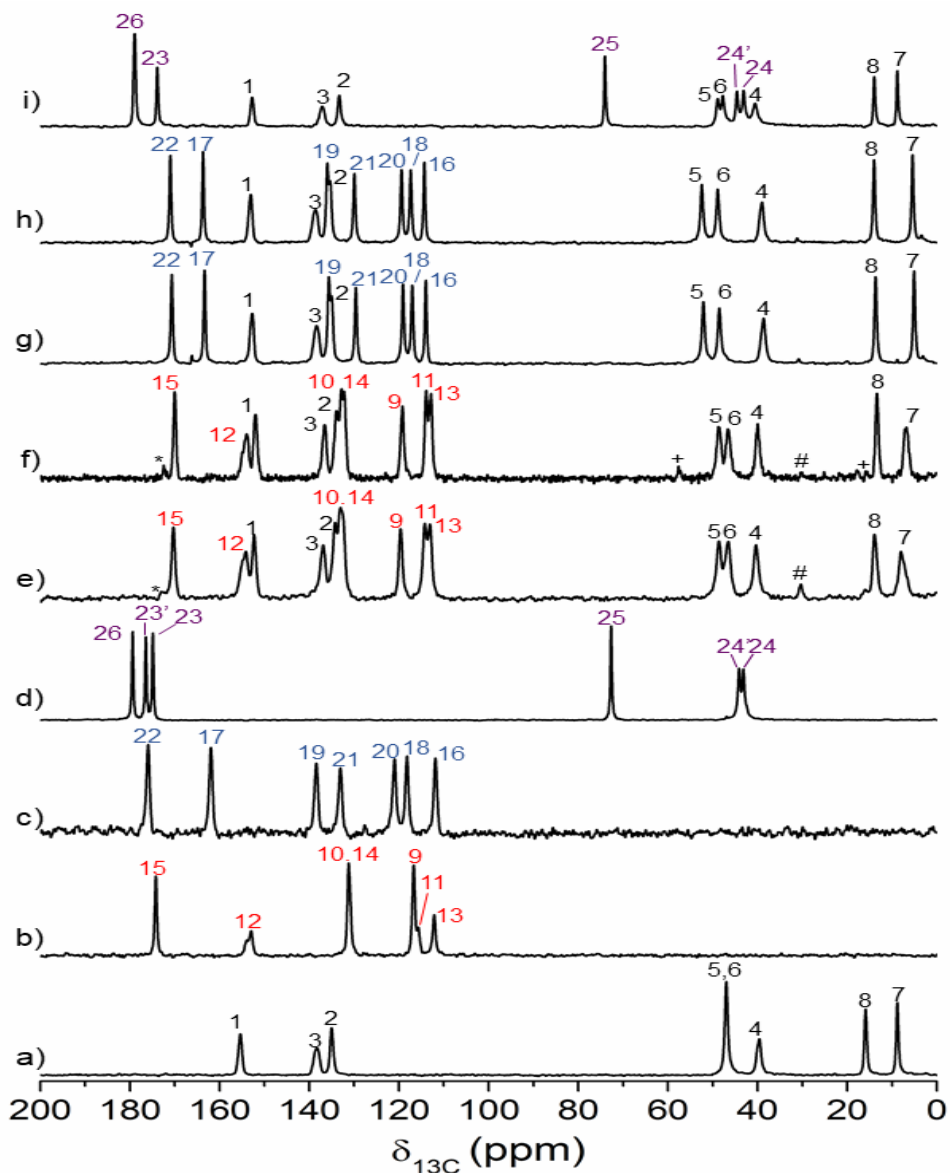


Figura 3.16. Espectros ^{13}C CP/MAS de: (a) TNZ; (b) PABA; (c) SA; (d) CA; (e) TNZ-PABA_{LAG}; (f) TNZ-PABA_{CRIS-ACE}; (g) TNZ-SA_{LAG}; (h) TNZ-SA_{CRIS-EIOH} y (i) TNZ-CA_{LAG}. Los símbolos *, # y + corresponden a las bandas rotacionales del C-4, los grupos metilo de la acetona y los átomos de C del EtOH, respectivamente.

Respecto de las principales perturbaciones de los espectros de los CC TNZ-PABA (Figura 3.16e,f), el enlace de H que involucra al ácido carboxílico del PABA y al nitrógeno N2 (Figura 3.15) del TNZ debiera afectar principalmente a los corrimientos químicos de los carbonos del imidazol y al carbono carboxílico del PABA (C-15, Figura 3.15). En efecto, las señales de dichos carbonos se desplazaron a frecuencias más bajas en el CC del TNZ-PABA. El C-1 de TNZ puro (Figura 3.16a), que se encuentra a 155,3 ppm, se desplazó a 152,2 ppm en el CC (Figura

3.16e, f y Tabla S3, Anexo 1). En tanto que el C-15 (Figura 3.16b), ubicado a 174,4 ppm, se vio desplazado a ~170,3 ppm en el CC (Figura 3.16e, f y Tabla S3, Anexo 1). El desplazamiento hacia frecuencias más bajas del C-15 fue consistente con un menor desapantallamiento debido a la formación de un enlace de H más débil. De hecho, el OH carboxílico del PABA está unido al N2 del imidazol en el CC de TNZ-PABA (Figura 3.12a) mientras que, en el PABA puro forma el homosintón supramolecular ácido carboxílico-ácido carboxílico (Lai y Marsh, 1967). Otro rasgo distintivo en el espectro del CC (Figura 3.16e, f) es el desplazamiento y resolución de los átomos C-5 y C-6. Estos se visualizaron como dos señales separadas a ~48,6 y 46,5 ppm, respectivamente (Tabla S3, Anexo 1), en contraposición con el del TNZ puro, que exhibe una única señal a 47,0 ppm (Figura 3.16a y Tabla S3 del Anexo 1). La resolución de los átomos, C-5 y C-6, que se observó en el CC, es consistente con las diferencias entre los patrones de enlaces de hidrógeno intermoleculares del TNZ puro (Figura 3.16a). y su participación en el CC (Figura 3.16e, f).

Por otro lado, es de destacar, que los espectros de TNZ-PABA_{LAG} y TNZ-PABA_{CRIS-ACE} exhibieron varias resonancias de baja intensidad que indicaron la presencia de solvente en ambos. Por ejemplo, la señal a 30,7 ppm (Figura 3.16e) se corresponde con la resonancia típica de los carbonos del metilo de la ACE, indicando su presencia en la red cristalina de TNZ-PABA_{LAG}. A su vez, en el espectro de TNZ-PABA_{CRIS-ACE} (Figura 3.16f), además de la misma señal del carbono de la ACE, se identificaron otras dos señales a 58,0 y 18,2 ppm, correspondientes a las resonancias de los carbonos del EtOH. Esto evidenció la presencia de ambos solventes en la red cristalina del CC. La identificación de la ACE en el CC de TNZ-PABA_{LAG} y del EtOH y la ACE en el CC de TNZ-PABA_{CRIS-ACE}, se puede conciliar con los datos de SCXRD, los cuales demostraron la existencia de canales en la estructura cristalina de TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH}. Evidentemente, la presencia de dichos canales admite la incorporación de diferentes solventes en la red cristalina, tales como ACE, EtOH o *t*-BuOH (Figura 3.13).

Los espectros ¹³C CP/MAS del TNZ-SA_{LAG} (Figura 3.16g) y del TNZ-SA_{CRIS-EtOH} (Figura 3.16h) fueron idénticos, lo cual indicó que por LAG y cristalización se obtenía la misma fase, en coincidencia con lo mostrado por la PXR. Es de remarcar que en ambos espectros, al igual que en los del CC TNZ-PABA (Figura 3.16e,f), el C-1 del TNZ y el carbono carboxílico del SA (C-22), están significativamente desplazados

hacia frecuencias más bajas. La señal del C-1 de TNZ puro (155,3 ppm) se vio desplazada en igual magnitud, dentro del error experimental, en el TNZ-SA (152,2 ppm) y en el TNZ-PABA (152,7 ppm) (Tabla S3 y S4 del Anexo 1). Este resultado, reveló que la formación del sintón azol-ácido carboxílico afectaría de modo similar a ambos átomos. Por otra parte, el C-22 (176,3 ppm) del SA puro (Volovšek, 1983) se vio desplazado hacia frecuencias más bajas en el CC (170,6 ppm) (Tabla S4 del Anexo 1), indicando que dicho carbono estaría menos desprotegido en dicho CC. También, las señales de los C-5 y C-6 se desplazaron y resolvieron, al igual que en el CC de TNZ-PABA. Este resultado es consistente con las diferencias en los patrones de enlaces de hidrógeno intermoleculares del TNZ puro y de este en el CC de TNZ-SA.

El espectro del ^{13}C CP/MAS del TNZ-CA_{LAG} (Figura 3.16i) no fue la superposición de los espectros de los compuestos de partida, cumpliendo con el primer criterio básico de formación de CC (Chadha *et al.*, 2012). En efecto, se observaron claras diferencias con los del TNZ (Figura 3.16a) y CA puros (Figura 3.16d). Por ejemplo, la Figura 3.16i exhibe una única resonancia (173,9 ppm, Tabla S5, Anexo 1) para los carbonos carboxílicos terminales del CA [C-23 y C-23'] mientras que en el CA puro aparecen dos señales a 176,4 (C-23') y a 174,9 (C-23) ppm. El colapso de estas en TNZ-CA evidencia que el entorno químico alrededor de esos grupos es similar. Por el contrario, los grupos COOH terminales en el CA puro tienen diferentes entornos químicos, debido a que el C23'OOH (Figura 3.15) participa en la formación del homodímero ácido carboxílico y el otro no (Pickworth Glusker *et al.*, 1969). La estructura cristalina del CA puro se modifica en el TNZ-CA_{LAG}, y ello puede atribuirse a la formación del sintón azol-ácido carboxílico.

Por otra parte, es de importancia remarcar, que el espectro del TNZ-CA_{LAG}, mostró estrechas similitudes con los CC de TNZ-PABA (Figura 3.16e,g) y de los TNZ-SA (Figura 3.16f,h). Por ejemplo, las señales del C-1, C-5 y C-6 se desplazaron y resolvieron de igual manera (Tabla S4, Anexo 1). Ello indicaría que la estructura cristalina del TNZ puro no se mantiene en el CC de TNZ-CA, sino que se modifica tal como que en los CC de TNZ-PABA y TNZ-SA. Esto se explicaría de igual manera con la formación del sintón azol-ácido carboxílico. Otro aspecto importante a destacar es la similitud de los corrimientos químicos de los C-2, C-3 y C-4, entre los espectros del TNZ-CA_{LAG} y del TNZ-PABA (Tabla S3 y S5, Anexo 1). Esto sugiere, que la estructura molecular y el patrón de enlaces de H del TNZ en ambos CC,

serían muy similares. En ausencia de datos de SCXRD, la SSNMR proporcionaría una clara evidencia de que el TNZ y CA están asociados al nivel molecular, al igual que TNZ-PABA y TNZ-SA.

Los espectros ^{13}C CP/MAS de TNZ-SUC_{LAG} y TNZ-NA_{LAG} (Figuras S3 y S4, Anexo 1), a diferencia de los de TNZ-PABA, TNZ-SA y TNZ-CA, fueron la suma de los espectros de los componentes puros. La concordancia de dicha información, junto con la obtenida por PXRD, confirmaría que ambas muestras no son nuevas fases cristalinas, sino MF o eutécticos.

3.4.6 FTIR y DRIFT

Los datos de ^{13}C -SSNMR avalaron la formación de un CC entre el TNZ y el CA. Con el fin de determinar si la MIR podía brindar evidencia adicional sobre la interacción supramolecular entre ambos, se decidió comparar el espectro DRIFT del TNZ-CA_{LAG} con los del TNZ-PABA y del TNZ-SA. Los espectros DRIFT del TNZ-CA_{LAG}, del TNZ y del CA se exhiben en la Figura 3.17, y los de TNZ-PABA, TNZ-SA, PABA y SA se muestran las Figuras S5 y S6 (Anexo 1). Además, en el Anexo 1 se presentan los espectros FTIR del TNZ-SUC (Figura S7) y del TNZ-NA (Figura S8), junto a los de sus respectivos compuestos de partida.

Como se aprecia en la Figura 3.17c, el espectro DRIFT de TNZ-CA_{LAG} no fue la suma de los espectros del TNZ (Figura 3.17a) y CA (Figura 3.17b). Ello fue consistente con lo observado por PXRD y ^{13}C -SSNMR, ya que ambas técnicas coincidieron en que TNZ-CA_{LAG} es una nueva fase cristalina. El espectro DRIFT de TNZ-CA_{LAG} presentó similitudes con los del TNZ-PABA (Figura S5, Anexo 1) y del TNZ-SA (Figura S6, Anexo 1). Por ejemplo, la vibración de estiramiento asimétrica del grupo NO_2 del TNZ aparece a 1522 cm^{-1} (Figura 3.17a) (Marciniec y Bujag, 1994; Marciniec *et al.*, 1997; Filgueiras *et al.*, 2017), en tanto que en el CC experimentó un corrimiento hipsocrómico. Este comportamiento fue similar al observado en los CC del TNZ-PABA y del TNZ-SA. En efecto, dicha banda se situó a 1540 cm^{-1} en el TNZ-CA (Figura 3.17), a 1539 cm^{-1} en el TNZ-PABA y 1537 cm^{-1} en el TNZ-SA (Figuras S5 y S6, Anexo 1).

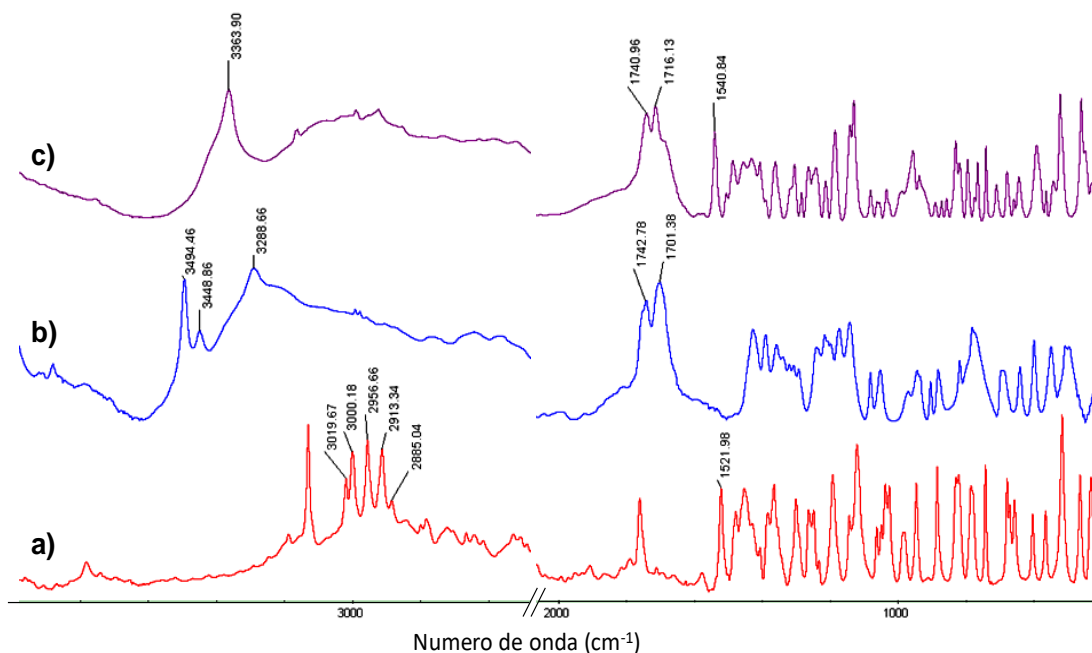


Figura 3.17. Espectros DRIFT (dispersión al 2% p/p en KBr) de: (a) TNZ; (b) CA, y (c) TNZ- CA_{LAG} .

El corrimiento hacia frecuencias mayores de la banda de estiramiento asimétrica del NO_2 del TNZ-CA es consistente con enlaces de H débiles y con la ruptura del tetrámero del TNZ puro. En efecto, el empaquetamiento cristalino de la estructura reportada del TNZ (*CSD Refcode* CEPSIZ) se observa un tetrámero unido por enlaces de hidrógeno del tipo $CH \cdots O$, con las unidades C-H formando cuatro enlaces de hidrógeno $CH \cdots O=N$ y dos enlaces de hidrógeno $CH \cdots O=S$ bifurcados (Alfaro-Fuentes *et al.*, 2014). Un comportamiento similar se observó en las estructuras cristalinas del TNZ-PABA_{CRIS-t-BUOH} (Figura 3.12) y del TNZ-SA_{CRIS-ACE} (Figura 3.14). Esto permitió afirmar que la estructura cristalina del TNZ presenta cambios en los CC del TNZ-CA, TNZ-PABA y TNZ-SA.

Las frecuencias vibracionales de los grupos -OH y -COOH del componente CA puro (Figura 3.17b) experimentaron corrimientos significativos en el TNZ-CA (Figura 3.17c), al igual que se observó para los componentes PABA y SA en sus CC (Figura S5 y S6 Anexo 1). Ello sugirió que el sintón azol-acido carboxílico también se formaría en TNZ-CA. Asimismo, es de notar que las bandas de estiramiento del -OH en el espectro del CA puro se sitúan a 3498, 3446 y 3291 cm^{-1} (Bichara *et al.*, 2011), en tanto que en el TNZ-CA aparecieron como una sola banda centrada a 3363 cm^{-1} . Esto indicaría que en el TNZ-CA se forma una nueva red supramolecular de enlaces

de hidrógeno. Igualmente, es de destacar que en el espectro de TNZ-CA, solo una de las dos vibraciones de estiramiento de C=O esperables (de los COOH central y terminal de CA puro, Bichara *et al.*, 2011) se desplazó, indicando que no todos los grupos COOH del componente CA participaban en los nuevos enlaces de H. De hecho, las bandas de estiramiento de C=O, que se sitúan a 1742 y 1701 cm^{-1} en CA puro, se ubicaron a 1740 y 1716 cm^{-1} en TNZ-CA. Ello reveló que solo la banda de frecuencia más baja se desplazaba hipsocrómicamente 15 cm^{-1} . También es de notar que, en el espectro de TNZ-PABA (Figura S5, Anexo 1) de los dos modos de estiramiento del C=O de PABA (1676 y 1624 cm^{-1}) (Samsonowicz *et al.*, 2005), solo uno se desplazó. En efecto, las dos bandas se observaron a 1676 y 1648 cm^{-1} en el CC. Por lo tanto, la situada a 1624 cm^{-1} se desplazó batocromicamente 24 cm^{-1} (Figura S5, Anexo 1). Precisamente, dicha banda se asocia con los grupos C=O de los dímeros ácidos que interactúan con los grupos NH_2 en el PABA puro (Sullivan *et al.*, 2014). Este hallazgo concordó con los datos de SCXRD que indicaron que dicho dímero (Lai y Marsh, 1967) no está presente en TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH}.

3.4.7 DSC, TG) y HSM

En los últimos años, la DSC ha emergido como una técnica diagnóstica rápida para diferenciar una mezcla eutéctica de un CC (Cherukuvada y Guru Row, 2014; Cherukuvada y Nangia, 2014), así como para el cribado *in situ* y caracterización térmica de CC (Lu *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014). Por ello, se evaluó el comportamiento frente al calentamiento de todas las muestras que habían mostrado *p.f.* diferentes a los de los compuestos de partida (TNZ-PABA, TNZ-SA, TNZ-CA, TNZ-SUC y TNZ-NA), mediante DSC, TG y HSM. Era de principal interés, a establecer si TNZ-SUC y TNZ-NA eran eutécticos o mezclas físicas. A este respecto, cabe señalar que la caracterización de los eutécticos es un verdadero desafío porque la depresión en el *p.f.* es el único indicador de formación de una mezcla eutéctica (Cherukuvada y Nangia, 2014).

La Figura 3.18 muestra las curvas DSC (obtenidas en cápsulas cerradas no-herméticamente) y TG del TNZ, PABA, TNZ-PABA_{MF}, TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-PABA_{CRIS-ACE} y TNZ-PABA_{CRIS-tBuOH}. Las curvas DSC del TNZ y PABA mostraron sendas endotermas agudas situadas a 125,3 °C (TNZ) y 188,0 °C (PABA) (temperaturas de inicio extrapoladas, T_e), correspondientes a la fusión de esos compuestos.

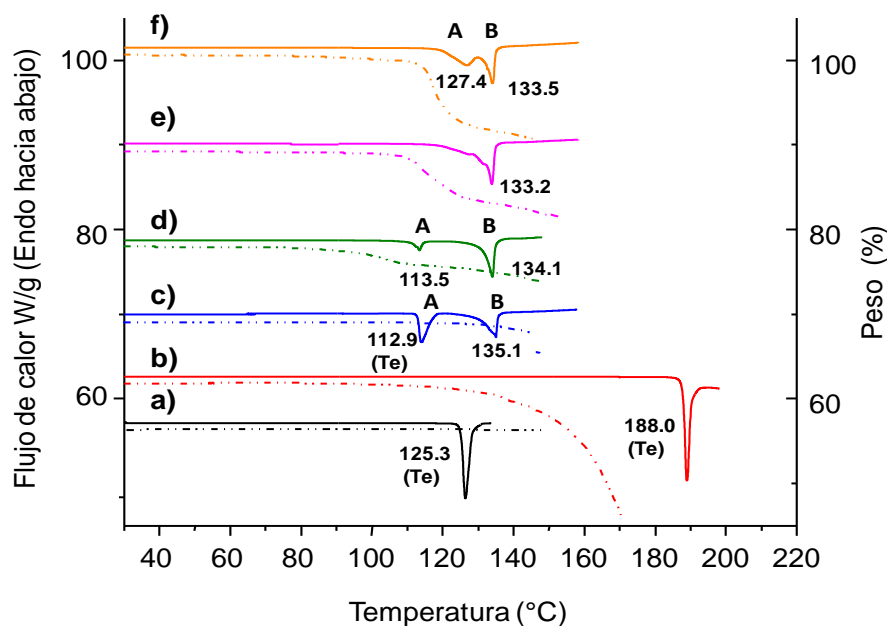


Figura 3.18. Curvas DSC y TG ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min}$, flujo de $\text{N}_2 = 50 \text{ mL/min}$) de: (a) TNZ; (b) PABA; (c) TNZ-PABA_{MF}; (d) TNZ-PABA_{LAG}; (e) TNZ-PABA_{CRIS-ACE}, y (f) TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH}. Los valores acompañados de la sigla (Te) corresponden a las temperaturas de inicio extrapoladas, el resto son temperaturas de pico.

Cabe mencionar que la curva TG del PABA exhibió una pérdida de masa a partir de $\sim 110 \text{ }^\circ\text{C}$, provocada por la sublimación del PABA, conforme a lo indicado por observaciones efectuadas por HSM. Dicho proceso se vio favorecido en la determinación TG porque se utilizó una cápsula abierta; pero, se vio desfavorecido en la determinación DSC, ya que esta se efectuó utilizando una cápsula cerrada no herméticamente; por tanto, la muestra logró fundir.

En el caso de TNZ-PABA_{MF} y de los productos de cocrystalización TNZ-PABA_{LAG}, y TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH}, sus curvas DSC exhibieron, entre $25\text{-}150 \text{ }^\circ\text{C}$, dos endotermas (designadas con las letras A y B, Figura 3.18c,d,f). En el caso del CC TNZ-PABA_{CRIS-ACE} se observó una endoterma con un hombro endotérmico en su ladera izquierda (Figura 3.18e). La endoterma A se observó a $\sim 113 \text{ }^\circ\text{C}$ en TNZ-PABA_{MF} y en TNZ-PABA_{LAG}, a $\sim 127 \text{ }^\circ\text{C}$ en TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} (Figura 3.18c,d,f) respectivamente. Vale destacar que la endoterma A de TNZ-PABA_{MF} no tuvo pérdidas de masa asociadas en la curva TG respectiva (Figura 3.18c). En tanto que las de TNZ-PABA_{LAG} y TNZ-PABA_{CRIS-t-BuOH} (Figura 3.18d,f), al igual que el hombro de TNZ-PABA_{CRIS-ACE} (Figura 3.18e), mostraron asociadas una pérdida de masa que continuó a temperaturas más

altas, mostrado por las respectivas curvas TG. Ello, sugirió que la endoterma A de TNZ-PABA_{MF} era una endoterma de fusión y no de desolvatación, en cambio las de TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-PABA_{CRIS-*t*-BuOH} y el hombro de TNZ-PABA_{CRIS-ACE} eran de desolvatación. La interpretación de los eventos térmicos antes descriptos se complementó con las observaciones efectuadas por HSM. En efecto, el examen termomicroscópico reveló una fusión parcial del material en el TNZ-PABA_{MF} a ~110 °C. En cambio, para las otras 3 muestras (TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-PABA_{CRIS-*t*-BuOH} y TNZ-PABA_{CRIS-ACE}) se detectó por HSM la pérdida de solventes, observándose la formación de burbujas como es típico de los procesos de desolvatación. Debido a ello, y con el objetivo de identificar los solventes presentes en dichas muestras, se efectuaron estudios de ¹H NMR en solución y los resultados obtenidos se compararon con los datos de ¹³C-SSNMR. De esos estudios surgió que TNZ-PABA_{LAG} (¹³C-SSNMR y ¹H NMR, CDCl₃), TNZ-PABA_{CRIS-ACE} (¹³C-SSNMR) y TNZ-PABA_{CRIS-*t*-BuOH} (¹H NMR, CDCl₃) contenían solventes en sus respectivas redes cristalinas. Para TNZ-PABA_{LAG} se detectó ACE; en TNZ-PABA_{CRIS-ACE}, ACE y EtOH, y en TNZ-PABA_{CRIS-*t*-BuOH}, *t*-BuOH y una proporción muy baja de ACE (Figura S1, Anexo 1).

La endoterma B se observó a las siguientes T_p, 135,1 °C en TNZ-PABA_{MF}; a 134,1°C en TNZ-PABA_{LAG}, y a 133,5 °C en TNZ-PABA_{CRIS-*t*-BuOH}. Todas ellas estuvieron acompañadas de pérdidas de masas en las respectivas curvas TG, sugiriendo que las muestras fundían con descomposición. La interpretación de los eventos térmicos antes descriptos se complementó con las observaciones efectuadas por HSM. Estas mostraron que todas las muestras fundían a ~132 °C, tal como lo indicaba la DSC, y que con el aumento de la temperatura las fases fundidas se oscurecían, típico de un proceso de descomposición. Por lo tanto, los resultados de DSC y TG confirmaron que TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-PABA_{CRIS-ACE} y TNZ-PABA_{CRIS-*t*-BuOH} eran muestras solvatadas, que se desolvataban y luego fundían con descomposición.

El comportamiento frente al calentamiento de TNZ-PABA_{MF} merece un breve comentario, ya que su curva DSC (Figura 3.18c) exhibió dos endotermas de fusión. A este respecto cabe mencionar que dicho comportamiento DSC es similar al de otras MF binarias cuyos componentes son capaces de formar CC (Lu, *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014; Manin, *et al.*, 2014; Saganowska y

Wesolowski, 2018). En efecto, se observó que tales MF exhibían, al calentarse, dos comportamientos DSC característicos: a) presentan dos picos endotérmicos (con T_e y T_p diferentes a las temperaturas de fusión (T_e) de los componentes puros), atribuidos a la fusión eutéctica y la fusión del CC formado por calentamiento. Además, un pequeño efecto exotérmico (indicativo de la cocrystalización de los componentes) que se ubica después de la primer endoterma (Lu *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014; Manin *et al.*, 2014; Saganowska y Wesolowski, 2018). b) exhiben varios picos endotérmicos (cuyas T_e o T_p son diferentes a los *p.f.* de los componentes puros), correspondientes a la fusión de diferentes fases sólidas formadas por el calentamiento, a saber, eutécticos metaestables, eutécticos y el CC, respectivamente (Yamashita *et al.*, 2013).

Aunque en el TNZ-PABA_{MF} no se observó ningún pico exotérmico después de la endoterma A (Figura 3.18c). Su ausencia no justifica para descartar la formación del CC de TNZ y PABA a partir del calentamiento de la MF, ya que se comprobó que la presencia, o no, del pico exotérmico depende de varios factores tales como la cinética de formación del CC, la velocidad de calentamiento empleada en la determinación DSC, e incluso de la técnica de preparación de la MF. En particular, se comprobó que el mortereado de la MF es un factor determinante para la aparición del pico exotérmico, ya que las MF sin morterear como TNZ-PABA_{MF}, no mostraron picos exotérmicos (Yamashita *et al.*, 2013). Por tanto, los datos DSC del TNZ-PABA_{MF} indicaron, también, que el TNZ y PABA son compuestos formadores de CC, como lo indicó la SCXRD.

La Figura 3.19 exhibe las curvas DSC y TG del TNZ, el SA, la MF de ambos, TNZ-SALAG y el TNZ-SACRIS-ETOH. La curva DSC de SA (Figura 3.19b) presenta, entre 25 y 165 °C, un pico agudo endotérmico de fusión situado a 158,5 °C (T_e), que es acompañado de una pequeña pérdida de masa en la curva TG respectiva, debida a la sublimación parcial de este COF.

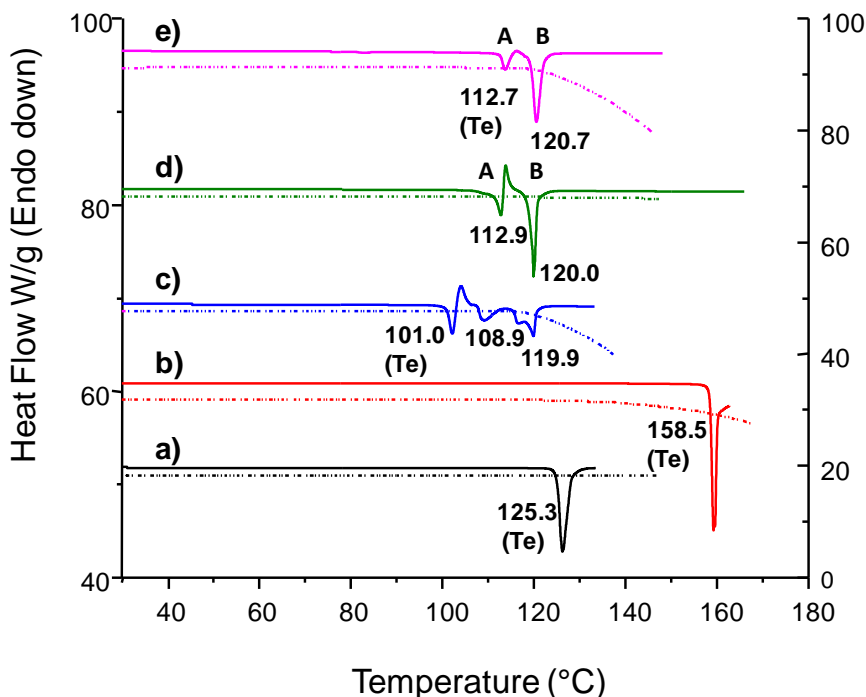


Figura 3.19. Curvas DSC y TG ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min}$, flujo de $\text{N}_2 = 50 \text{ mL/min}$) de: (a) TNZ; (b) SA; (c) TNZ- SA_{MF} ; (d) TNZ- SA_{LAG} , y (e) TNZ- $\text{SA}_{\text{CRIS-EtOH}}$. Los valores acompañados de la sigla (Te) corresponden a las temperaturas de inicio extrapoladas, el resto son temperaturas de pico.

En cambio, las curvas DSC del TNZ- SA_{LAG} (Figura 3.19d) y TNZ- $\text{SA}_{\text{CRIS-EtOH}}$ (Figura 3.19e) mostraron, entre 25 y 160°C , dos endotermas (A y B) y un pico exotérmico pequeño superpuesto con la endoterma A, los cuales no están acompañados de pérdida de masa en las curvas TG respectivas. Por ello, se descartó que las muestras experimentaran procesos de desolvatación y se asoció ese comportamiento DSC a la ocurrencia del fenómeno de la doble fusión (Giron, 1995). En efecto, ciertos polimorfos cristalinos presentan en sus curvas DSC dos endotermas de fusión y un pico exotérmico entre ellas, comportamiento que es indicativo de la fusión de un polimorfo cristalino de baja temperatura de fusión, el cual funde y se transforma, a partir de la fase fundida, en otro polimorfo, el cual posteriormente funde a una temperatura más alta (Giron, 1995).

A fin de interpretar los eventos DSC observados en la Figura 3.19d,e, se recurrió a la HSM. Para ello, se colocó una pequeña muestra de TNZ- SA_{LAG} o de TNZ- $\text{SA}_{\text{CRIS-EtOH}}$ en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y la muestra se calentó desde 25 hasta $\sim 170^\circ\text{C}$. Entre 25 y 100°C , no se observaron cambios en la forma, color o tamaño de las partículas, pero a $\sim 110^\circ\text{C}$, las partículas (que eran

birrefringentes a la luz polarizada) comenzaron a fundir, terminando de fundir a ~ 112 °C. A aproximadamente 115 °C, se observaron luces brillantes de diferentes colores que parecían fuegos artificiales en un cielo oscuro (masa fundida isotrópica de color negro a la luz polarizada), tras lo cual se visualizaron nuevos cristales birrefringentes, los cuales fundieron completamente a aproximadamente 123 °C. Estos resultados indicaron claramente que las endotermas A y B (Figura 3.19d,e) son endotermas de fusión; que la endoterma A corresponde a la fusión del CC del TNZ-SA, y que a partir de la masa fundida cristaliza una nueva fase que funde a mayor temperatura (endoterma B), la cual posiblemente corresponde a un polimorfo de TNZ-SA de mayor *p.f.*. La obtención y caracterización del posible polimorfo de alta fusión escapa a los alcances de esta Tesis Doctoral, pero constituye una proyección muy importante de este trabajo, dado que la búsqueda y caracterización de polimorfos de CC es un tema novedoso y de creciente interés científico.

El comportamiento DSC de TNZ-SAMF, al igual que el de TNZ-PABAMF, merece una breve discusión ya que su curva DSC (Figura 3.19c) exhibió cuatro endotermas y un pico exotérmico superpuesto con la primera endoterma. Las primeras tres endotermas presentaron valores de T_e y T_p más bajos que las endotermas de fusión de TNZ (Figura 3.19a), SA (Figura 3.19b) y los productos de cocrystalización (Figura 3.19d,e) y no estuvieron acompañadas de pérdidas de masa en la curva TG respectiva, como es típico en procesos de fusión congruentes. En cambio, la T_p de la cuarta endoterma (119,9 °C) fue similar a la de las endotermas B de TNZ-SALAG (Figura 3.19d) y TNZ-SACRIS-EtOH (Figura 3.19e). Vale destacar, que Yamashita *et al.* (2013) también observaron que ciertas mezclas binarias capaces de formar cocrystalales mostraban varias endotermas a temperaturas inferiores a las temperaturas de fusión de los componentes puros, las cuales se asociaron con las fusiones de un eutéctico metastable y un eutéctico estable, y la fusión del CC propiamente dicho, respectivamente. A fin de confirmar la ocurrencia de tales eventos térmicos para el TNZ-SAMF, se recurrió a la HSM. Al calentar una porción de TNZ-SAMF entre 25 y 85 °C, no se observaron transformaciones de fase o evaporaciones. Sin embargo al continuar el calentamiento se visualizaron varios procesos de fusión parciales, produciéndose la fusión completa del material a aproximadamente 125 °C. Estos resultados permitieron confirmar que las endotermas observadas en la Figura 3.19c eran endotermas de fusión y que el comportamiento del TNZ-SAMF era consistente con el de mezclas físicas capaces de

formar CC a través de eutécticos metastables y estables. Por lo tanto, la DSC reveló que el TNZ y el SA son compuestos formadores de CC, tal como lo demostró la SCXRD.

En la Figura 3.20 se presentan las curvas DSC y TG del TNZ, CA, TNZ-CA_{MF} y de TNZ-CA_{LAG}. Como se aprecia en la Figura 3.20d, la curva DSC de TNZ-CA_{LAG} exhibió, entre 25-140 °C, una única endoterma aguda situada a 121,8 °C (Te), la cual no tuvo pérdidas de masa asociadas en la curva TG respectiva. Este comportamiento es típico de un proceso de fusión, el cual, de hecho se confirmó por observaciones en el termomicroscopio (HSM). Es de remarcar, que aunque el pico de fusión de TNZ-CA_{LAG} ocurrió a una temperatura menor que el de TNZ, dicho pico no representa la fusión de una mezcla eutéctica en su composición eutéctica (la cual también presentaría un único pico de fusión a una temperatura menor que el *p.f.* de TNZ) porque los datos PXRD, ¹³C-SSNMR y DRIFT indicaron que TNZ-CA_{LAG} era una nueva fase cristalina, posiblemente un CC. Cabe señalar, que más del 50% de los CC muestran un *p.f.* más bajo que el del IFA y el COF (Saganowska y Wesolowski, 2018) y este sería el caso de TNZ-CA_{LAG}.

En contraste, la curva DSC de TNZ-CA_{MF} (Figura 3.20c) exhibió, entre 80 y 145 °C, tres endotermas anchas, que no tuvieron pérdidas de masa asociadas en la curva TG respectiva, y ocurrieron a temperaturas inferiores a las temperaturas de fusión de TNZ y CA. Este comportamiento DSC, caracterizado por la presencia de múltiples endotermas de fusión, también se ha observado para ciertas MF capaces de formar CC (Yamashita *et al.*, 2013; Yamashita *et al.*, 2014). Como el comportamiento DSC del TNZ-CA_{MF} es consistente con el de las MF capaces de formar CC, los datos DSC indican que el TNZ y el CA son compuestos capaces de formar CC; por tanto, también sustentan la hipótesis que el TNZ-CA_{LAG} representa otro CC de TNZ.

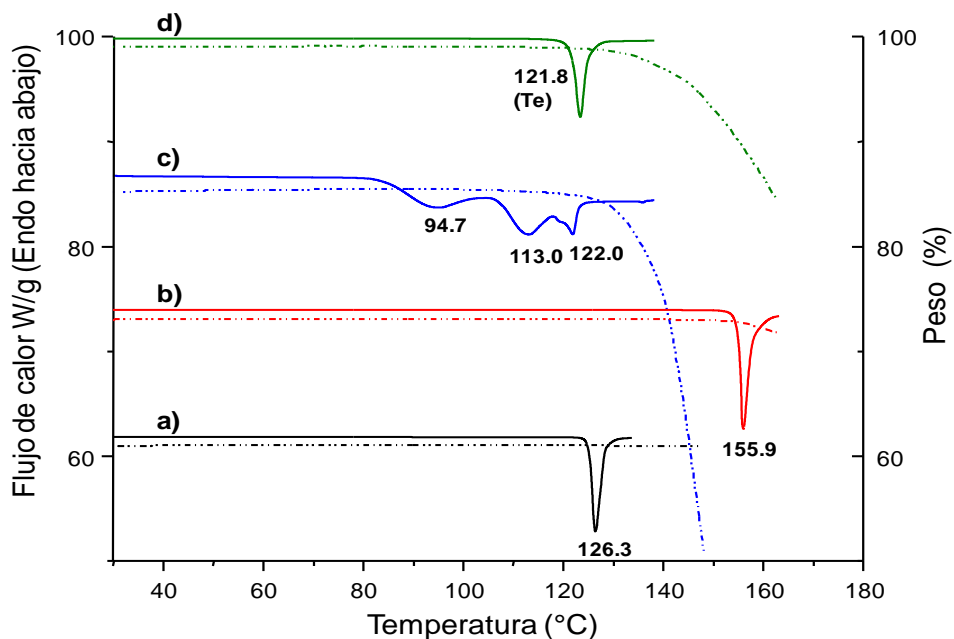


Figura 3.20. Curvas DSC y TG ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, flujo de $\text{N}_2 = 50 \text{ mL}/\text{min}$) de: (a) TNZ; (b) CA; (c) TNZ- CA_{MF} , y (d) TNZ- CA_{LAG} . Los valores acompañados de la sigla (Te) corresponden a las temperaturas de inicio extrapoladas, el resto son temperaturas de pico.

Las curvas DSC y TG de TNZ- SUC_{LAG} (Figura 3.21) mostraron, entre 25 y 160 $^\circ\text{C}$, una única endoterma a 105,5 (Te), que no estuvo acompañada de pérdidas de masa en la curva TG correspondiente, típico de un proceso de fusión, como se comprobó por HSM. Teniendo en cuenta que, la endoterma ocurre a una temperatura menor a las de los *p.f.* DSC de TNZ y SUC (187,5 $^\circ\text{C}$, Te), y que los resultados de PXRD, SS NMR y FTIR indicaron que este IFA no interactuaba con SUC, se concluyó que TNZ- SUC_{LAG} era un eutéctico binario, no una mezcla física. A este respecto vale resaltar que la curva DSC de TNZ- SUC_{MF} (Figura 3.21c) también exhibió una única endoterma, cuya Te fue idéntica, dentro del error experimental, al de la respectiva muestra obtenida por LAG (Figuras 3.21d). Este resultado es también consistente con los de Yamashita *et al.* (2013) quienes observaron que las mezclas físicas binarias, incapaces de formar CC, exhiben una sola endoterma DSC (cuya Te es menor a la del componente de menor *p.f.*) la cual corresponde a la fusión eutéctica de los componentes.

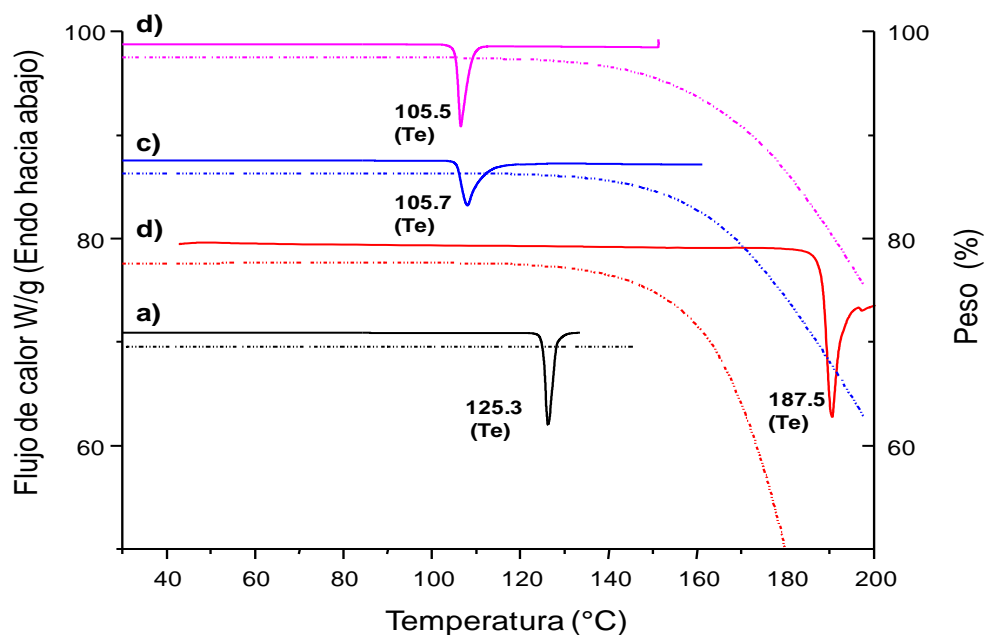


Figura 3.21. Curvas DSC y TG ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, flujo de $\text{N}_2 = 50 \text{ mL}/\text{min}$) de: (a) TNZ; (b) SUC; (c) TNZ-SUC_{MF}, y (d) TNZ-SUC_{LAG}. Los valores incluidos corresponden a temperaturas de inicio extrapoladas (Te).

3.4.8 Solubilidad acuosa

Los valores de las Sa, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, para el TNZ y las cinco nuevas fases sólidas obtenidas, junto con los valores de Sa reportados para los COF utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral [tomados del *Handbook of Aqueous Solubility Data* (Yalkowski *et al.*, 2010)] se presentan en la Tabla 3.3. Los CC obtenidos con PABA fueron isoestructurales y por cocrystalización en solución se obtuvieron CC solvatados con solventes considerados de clase III^ü (FDA, 2017). Por este motivo, se determinaron las Sa de TNZ-PABA_{NG} (que no contenía solvente) y TNZ-PABA_{LAG} (que contenía solo ACE).

Como muestra la Tabla 3.3, la Sa de TNZ-PABA_{NG} fue de $9,18 \text{ mg}/\text{mL}$, y este valor fue estadísticamente similar (prueba *t*-Student con un nivel de confianza del 0,05) al obtenido de manera experimental para TNZ puro ($9,63 \text{ mg}/\text{mL}$). En cambio, los valores de Sa determinados para TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-SA_{LAG} y TNZ-CA_{LAG} fueron de $7,17$; $3,81$ y $12,31 \text{ mg}/\text{mL}$ respectivamente, y cada valor fue estadísticamente diferente (prueba *t*-Student con un nivel de confianza del 0,05) al de TNZ. Estos resultados indicaron que solo TNZ-CA logró incrementar ligeramente la Sa del TNZ

con una ventaja de solubilidad ($S_{\text{cocrystal}}/S_{\text{IFA}}$) (Good y Rodríguez-Hornedo, 2009) igual a 1,3.

Tabla 3.3. Valores de solubilidad acuosa del TNZ, de los coformadores ensayados y de las nuevas fases sólidas obtenidas.

Muestra	Sa reportada ^{a,b} (mg/mL)	Sa experimental ^c (mg/mL)
ARG	181,8 ^{a,d}	ND ^e
CA	615,0 ^{a,f}	ND
CAF	21,70 ^{a,d}	ND
NA	500,0 ^{a,g}	ND
PABA	8,28 ^{a,c}	ND
PRO	618,8 ^{a,d}	ND
SA	2,620 ^{a,c}	ND
SUC	106,0 ^{a,g}	ND
TNZ	7,440 ^{b,c}	9.63 ± 0.21
TNZ-CA _{LAG}	---	12.31 ± 0.28
TNZ-NA _{LAG}	---	10.91 ± 0.22
TNZ-SA _{LAG}	---	3.807 ± 0.046
TNZ-SUC _{LAG}	---	9.79 ± 0.36
TNZ-PABA _{NG}	---	9.18 ± 0.26
TNZ-PABA _{LAG}	---	7.167 ± 0.062
TRIP	13,40 ^d	ND

^a Yalkowski, *et al.*, 2010; ^b Chadha, *et al.*, 2007; ^c 37°C; ^d 25 °C; ^e ND: no determinado; ^f 36,6 °C; ^g 35 °C.

Teniendo en cuenta que Good y Rodríguez-Hornedo (2009) propusieron que la Sa de los CC aumenta con la solubilidad de los COF, y que se necesita una solubilidad del COF de aproximadamente 10 veces la del IFA para que las solubilidades de los CC sobrepasen la del IFA puro, TNZ-PABA y TNZ-SA parecieron seguir esa tendencia general. En efecto, los valores de Sa de PABA y SA son inferiores a la de TNZ (PABA: 8,283 mg/mL y SA: 2,620 mg/mL, Tabla 3.3) y ambos COF no mejoraron la Sa de TNZ (Tabla 3.3). En cambio, TNZ-CA_{LAG} no siguió la tendencia mencionada anteriormente, porque el CA es muy soluble en agua (615,0 mg/mL, Tabla 3.3), lo cual determina que su Sa sea ~ 60 veces mayor que la del TNZ (9,63 mg/mL). Esa diferencia, de acuerdo a lo observado por Good y

Rodríguez-Hornedo (2009), debería haber conducido a una mejora significativa de la Sa de TNZ, a partir de TNZ-CA_{LAG}, mejora que no se verificó ya que su Sa fue solo 1,3 veces mayor a la del TNZ.

El análisis por DRIFT de los sólidos remanentes (secados en desecador al vacío y con agentes desecantes) tras la determinación de la Sa indicó que TNZ-PABA y TNZ-SA eran estables en agua MilliQ® (pH = 5,5), pues sus espectros DRIFT fueron superponibles a los de las muestras previo al estudio de Sa (Figura S9 y S10, Anexo 1). En cambio, el espectro DRIFT del sólido remanente de TNZ-CA (Figura S11, Anexo 1) mostró, además de sus bandas características (Figura 3.17), algunas bandas del TNZ, lo cual indicó que este CC se disociaba parcialmente tras la incubación en agua.

También, se determinó el pH de los sobrenadantes filtrados al final de los experimentos, con el fin de determinar si estos habían cambiado o permanecían inalterados. Dichos valores cayeron dentro de un pequeño intervalo de pH de 3,0 a 3,5 (Tabla S6, Anexo 1) donde TNZ, PABA, SA y CA están parcialmente ionizados, dados sus valores de pKa (Tabla 3.1). Esa caída en el pH de las soluciones (de 5,5 a t=0, a aproximadamente 3,5 al final del experimento) se puede atribuir a la disolución de TNZ y los COF ácidos, lo que conduce a aumentos en sus concentraciones en agua y su posterior ionización. De hecho, cuando los IFA y los COF son compuestos ionizables como el TNZ, el PABA, el SA y el CA, los dos equilibrios relevantes de los que se derivan la concentración de las especies componentes del CC son el equilibrio de disolución o disociación del CC y la ionización del IFA y COF. Estos están determinados por sus respectivas constantes de ionización (Kuminek *et al.*, 2016).

Dado que los valores de Sa hallados podrían estar afectados por la variación del pH (Tabla S6, Anexo 1), son necesarios estudios de solubilidad, y de VD, en medios acuosos de diferentes pH que permitan dilucidar la sensibilidad de los CC del TNZ frente a las variaciones de pH. Dichos estudios constituyen una proyección importante del presente trabajo de Tesis Doctoral.

En el caso de los eutécticos del TNZ (TNZ-SUC y TNZ-NA), los valores de Sa hallados (Tabla 3.3) fueron estadísticamente similares a los del TNZ (TNZ-SUC: 9,79 mg/mL y TNZ-NA: 10,91 mg/mL). Ello sugirió que dichos valores no se correspondían con su Sa de equilibrio, tal como se observó para otros eutécticos binarios (Goud *et al.*, 2012). En efecto, los eutécticos exhiben normalmente una alta

solubilidad y una disolución más rápida que las mezclas físicas debido al exceso en sus funciones termodinámicas (Goud *et al.*, 2012). Pero, si los componentes de las mezclas eutécticas exhiben solubilidades incongruentes (como el TNZ que es ligeramente soluble en agua, y la NA y el SUC que son muy solubles en agua), la determinación de la solubilidad en equilibrio suele estar sesgada porque los componentes eutécticos se disocian después de algún tiempo y el componente más soluble de una composición incongruente se disuelve más rápidamente, dejando un precipitado del componente menos soluble. El análisis por DRIFT de los residuos sólidos secos confirmó dicho comportamiento. Los espectros DRIFT de ambas muestras exhibieron los picos del TNZ y unas pocas bandas de la NA y el SUC pero de muy baja intensidad (Figuras S11 y S12, Anexo 1). Esto indicó que ambos COF se solubilizaban en agua, quedando un precipitado constituido mayoritariamente por TNZ.

3.4.9 Fotoestabilidad en estado sólido

El TNZ, al igual que otros nitroimidazoles, presenta una alta inestabilidad fotoquímica en solución y en estado sólido (Marciniec y Bujac 1994; Marciniec *et al.*, 1997). La causa, entre otros factores, es la presencia del grupo nitro que puede experimentar fotoisomerización, fotorreducción y fotoinducción de radicales libres (Marciniec y Bujac, 1994). Esta característica del TNZ ocasiona la aparición de productos de degradación, que son una consecuencia de su fotoinestabilidad, y determinan que la materia prima y sus productos farmacéuticos deban protegerse de la luz ambiente (Ph. Eur., 2010 y USP 39, 2016).

En el estado sólido, el TNZ, al igual que otros 4- y 5-nitroimidazoles, se fotodegrada siguiendo una cinética de primer orden. El mecanismo de reacción involucra la conversión del grupo nitro en un éster de nitrito, el cual luego puede escindirse en radicales oxilo y en óxido nítrico (Marciniec *et al.*, 1997). En el caso particular de los 5-nitroimidazoles, como el TNZ, el tiempo de vida media (t_{50}) de fotodegradación es inversamente proporcional a la densidad electrónica en el N3 (Figura 3.1) del anillo de imidazol (Marciniec *et al.*, 1997).

Dado que en los CC obtenidos en este trabajo de Tesis, el N3 del anillo imidazol participa en la formación del heterosintón azol-ácido carboxílico (Sección 3.4.1), se decidió realizar estudios sobre la fotoestabilidad de las fases sólidas

obtenidas con el fin de determinar si la cocrystalización del TNZ tiene el potencial de evitar su fotodegradación. Para ello se irradiaron con luz UV-visible los 3 CC obtenidos, los 2 eutécticos, TNZ, los 5 COF que dieron lugar a nuevas fases sólidas (PABA, SA, CA, NA y SUC) y las respectivas mezclas físicas binarias TNZ-COF. Después de la irradiación, se examinó la apariencia física de todas las muestras, se registraron los espectros DRIFT y, además, se determinó por HPLC el contenido del TNZ en las muestras que lo contenían. Como referencias, se utilizaron las muestras sin irradiar.

Luego de 4 h de irradiación, se observó que el TNZ puro, las 5 mezclas físicas y los dos eutécticos (TNZ-NA y TNZ-SUC) habían experimentado un cambio drástico en su apariencia física (Figura 3.22). En efecto, las muestras, que inicialmente eran de color blanco, luego de la irradiación se convirtieron en sólidos de color pardo oscuro. La determinación por HPLC del contenido de TNZ, indicó una fotodegradación del 7,2% para TNZ puro, y del 7-10 % para los dos eutécticos y las 5 MF. Es decir, se observó que la degradación de dichas fases sólidas era similar a la del TNZ puro (Figura 3.22). A su vez, la comparación de los espectros DRIFT de las muestras, no evidenció la aparición de nuevas bandas de absorción, ni su desaparición. Lo que sí se observó fue una disminución en las intensidades de varias bandas, particularmente el de la banda correspondiente al estiramiento del grupo NO_2 (situada a 1521 cm^{-1}). Ello fue consistente con lo observado por Marciniak y Bujan (1994) y Marciniak *et al.* (1997) quienes informaron que la irradiación del TNZ provocaba una disminución de la banda de absorción del grupo NO_2 , la cual atribuyeron a su fotorreducción y a la posterior inducción de radicales libres.

En cambio, el comportamiento frente a la luz de los 3 CC fue marcadamente diferente al del TNZ y las muestras antes indicadas. En efecto, ninguno de los tres CC experimentó cambios en su coloración (Figura 22). Además, la degradación de TNZ-PABA y TNZ-SA, determinada por HPLC, fue menor al 0,5%, y la de TNZ-CA fue del 4,9%. Estos resultados indicaron que TNZ-PABA y TNZ-SA eran estables a la luz UV-Visible, al menos durante 4 horas de irradiación, y que TNZ-CA era menos lábil a la luz que el TNZ puro, los eutécticos y las MF. Por lo tanto, se demostró que mediante la cocrystalización de TNZ con PABA y SA se logra una estabilización significativa del TNZ frente a la fotodegradación. En el CC TNZ-CA esta protección es menor. De esta manera, se estableció que el orden de fotoestabilidad de los 3 CC

es el siguiente: TNZ-PABA = TNF-SA > TNZ-CA. Después de la irradiación, se registraron también los espectros DRIFT del TNZ-PABA, el TNF-SA y el TNZ-CA y se compararon con los de las muestras sin irradiar. Los espectros de los tres CC pre y post-irradiación (Figura S14-16, Anexo 1) fueron superponibles, lo cual era esperable en el caso de TNZ-PABA y TNZ-SA ya que los resultados HPLC indicaron que prácticamente no se degradaban. Para TNZ-CA, en cambio, la concordancia de los espectros DRIFT sugirió que los productos de fotodegradación no eran detectables por esta técnica analítica.

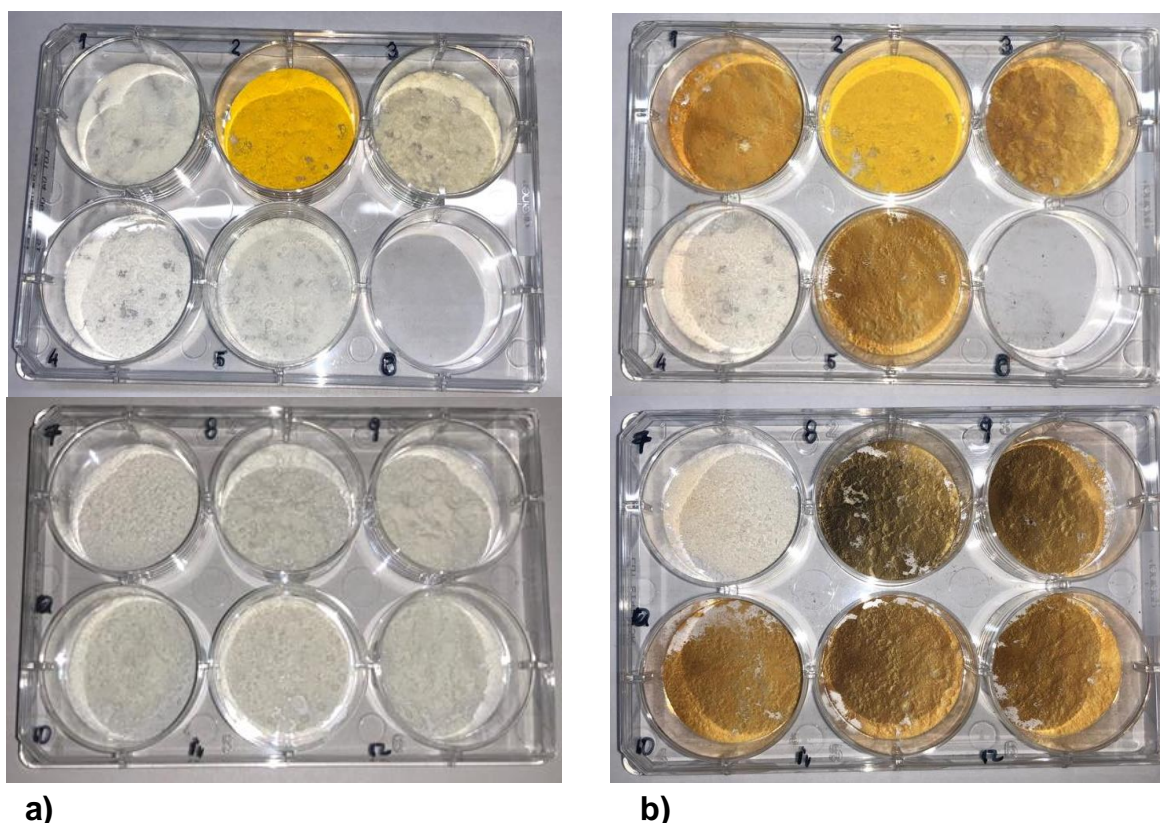


Figura 3.22. Imágenes (tomadas con el celular iPhone X) del TNZ, los 5 COF que dieron lugar a nuevas fases sólidas, las nuevas fases sólidas TNZ-COF y las 5 mezclas físicas TNZ-COF antes (a) y después de 4h de irradiación con luz UV-visible (b). 1) TNZ; 2) TNZ-PABA_{LAG}; 3) TNZ-PABA_{MF}; 4) TNZ-CA_{LAG}; 5) TNZ-CA_{MF}; 7) TNZ-SA_{LAG}; 8) TNZ-SA_{MF}; 9) TNZ-SUC_{LAG}; 10) TNZ-SUC_{MF}; 11) TNZ-NA_{LAG} y 12) TNZ-NA_{MF}.

La fotoestabilidad mejorada de los CC del TNZ, en comparación con el TNZ puro, puede explicarse sobre la base de la relación lineal inversamente proporcional encontrada entre la densidad de electrones en el N3 del anillo nitroimidazol y el tiempo de vida media de fotodegradación. Se informó que una menor densidad de electrones en ese N conduce a una mayor fotoestabilidad (Marciniec *et al.*, 1997) y al

hecho de que en la estructura cristalina del TNZ (CSD, *Refcode* CEPSIZ), el N3 del anillo imidazol no participa en la formación de puentes de hidrógeno. Por el contrario, en los CC sintetizados en este trabajo de Tesis, dicho N está involucrado en puentes de H. En efecto, los datos SCXRD brindaron evidencia inequívoca de que el principal sintón responsable de la cocrystalización entre el TNZ y el PABA, y el TNZ y el SA, es el fuerte enlace puente hidrógeno del tipo COF (–COOH)•••N3 (imidazol). La formación espontánea de esta fuerte interacción lineal reduce significativamente la densidad de electrones en el N3 del anillo imidazol, mejorando así la fotoestabilidad de los nuevos CC en comparación con la del TNZ puro.

3.5 Conclusiones

El TNZ es un IFA utilizado para infecciones causadas por bacterias y ciertos protozoos anaeróbicos, pero presenta baja Sa y pobre fotoestabilidad en estado sólido. Se investigó su capacidad de cocrystalizar con varios COF solubles en agua, recurriendo a una aproximación de la ingeniería de cristales que se basa en el análisis de los grupos funcionales de la molécula del IFA y los posibles sintones supramoleculares que dichos grupos pueden formar. De dicho análisis surgió que, los sintones heterodiméricos azol-ácido carboxílico y azol-amida tendrían la mayor probabilidad de ocurrencia. Por ello, se seleccionaron como posibles COF cinco ácidos carboxílicos GRAS, tres aminoácidos y dos amidas GRAS. Como técnicas de síntesis se utilizaron las metodologías LAG, CRIS y NG. El primer método demostró la capacidad que presenta TNZ para interactuar supramolecularmente, originando 5 nuevas formas sólidas: 3 CC con el PABA, el SA y el CA y dos eutécticos con el SUC y la NA. A su vez, por CRIS, se obtuvieron las mismas fases cristalinas que por LAG para TNZ-PABA y TNZ-SA. Además, mediante CRIS se obtuvieron monocristales que se utilizaron para la resolución de sus estructuras cristalinas. El análisis de ellas reveló que ambos eran CC, formados mediante el mismo heterosintón supramolecular, el azol-ácido carboxílico [(COOH)•••N3(imidazol)]. Sin embargo, sus estructuras supramoleculares resultaron ser completamente diferentes. En el TNZ-PABA la presencia de las moléculas de solvente, ubicadas en canales, marcaron la diferencia estructural con la del TNZ-SA. Asimismo, se determinó que las redes de enlaces de hidrógeno son más extensas en el TNZ-PABA que en el TNZ-SA, debido al grupo amino del PABA.

Además, mediante PXRD, ^{13}C -SSNMR, DSC y TG, se pudo establecer que TNZ-PABA forma CC isoestructurales que contienen diferentes solventes, evidentemente porque estos se ubican en canales infinitos, como lo indicó la SCXRD.

Se pudo observar comportamientos térmicos interesantes en las 5 nuevas formas sólidas mediante DSC, TG y HSM. Las MF del TNZ-PABA, TNZ-SA y TNZ-CA exhibieron curvas DSC típicas de compuestos capaces de formar CC, es decir mostraron múltiples picos por debajo de la T de fusión de ambos componentes.

La cocrystalización resultó ser una estrategia adecuada para optimizar la fotoestabilidad en estado sólido del TNZ. Por el contrario, la mejoría en la Sa solo pudo observarse en el CC del TNZ-CA, siendo esta 1,3 veces mayor que la del IFA.

Los resultados obtenidos demostraron que el TNZ es capaz de interactuar con ácidos carboxílicos y amidas, formando CC y eutécticos. La cocrystalización resultó ser una estrategia válida para mejorar las propiedades fisicoquímicas del TNZ, en particular su fotoestabilidad. Por ende, con el fin de optimizar su Sa y fotoestabilidad, por espacios de tiempo más prolongados, los descubrimientos hasta aquí descritos avalan la búsqueda de nuevos CC y eutécticos, con otros ácidos carboxílicos y amidas.

3.6 Referencias

- Alfaro-Fuentes, I.; López-Sandoval, H.; Mijangos, E.; Duarte-Hernández, A.M.; Rodríguez-López, G.; Bernal-Uruchurtu, M.I.; *et al.* Metal coordination compounds derived from tinidazole and transition metals. Halogen and oxygen lone pair... π interactions. *Polyhedron*. 2014, 67, 373-80. DOI: 10.1016/j.poly.2013.09.030
- Bichara, L.C.; Lanus, H.E.; Ferrer, E.G.; Gramajo, M.B.; Brandan, S.A. Vibrational Study and Force Field of the Citric Acid Dimer Based on the SQM Methodology. *Adv. Phys. Chem.* 2011, 1-10. DOI: 10.1155/2011/347072
- Chadha, R.; Jain, D.V.S.; Kumar, A. Quantitative analysis of in vitro compatibility of binary and ternary mixtures of nitroimidazole and macrolides in combination with omeprazole using a calorimetric technique. *Pharmazie*. 2007, 62, 327-36. DOI: 10.1691/ph.2007.5.6111
- Chadha, R.; Saini, A.; Jain, D. S.; Venugopalan, P. Preparation and Solid-State Characterization of Three Novel Multicomponent Solid Forms of Oxcarbazepine: Improvement in Solubility through Saccharin Cocrystal. *Cryst. Growth Des.* 2012, 12, 4211-24. DOI: 10.1021/cg3007102

- Chasseaud, L.F.; Henrick, K.; Matthews, R.W.; Scott, P.W.; Wood, S.G. Migration: X-Ray Structures of Tinidazole and the NH_4^+ Salt of its Ring Hydroxylated Metabolite. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 8, 491-92. DOI: 10.1039/C39840000491
- Cheney, M.L.; Weyna, D.R.; Shan, N.; Hanna, M.; Wojtas, L.; Zaworotko, M.J. Supramolecular Architectures of Meloxicam Carboxylic Acid Co salts, a Crystal Engineering Case Study. *Cryst. Growth Des.* 2010, 10, 4401–13. DOI:10.1021/cg100514g
- Cherukuvada, S.; Guru Row, T. N. Comprehending the Formation of Eutectics and Cocrystals in Terms of Design and Their Structural Interrelationships. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14, 4187-98. DOI: 10.1021/cg500790q
- Cherukuvada, S.; Nangia, A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem. Commun.* 2014, 50, 906–23. DOI: 10.1039/c3cc47521b
- Domingos, S.; André, V.; Quaresma, S.; Martins, I.C.B.; Minas da Piedade, M.F.; Duarte, M.T. New forms of old drugs: improving without changing *J. Pharm. Pharmacol.* 2015, 67, 830–46. DOI: 10.1111/jphp.12384
- Etter, M.C.; MacDonald, J.C.; Bernstein, J. Graph-set analysis of hydrogen-bond patterns in organic crystals. *Acta Crystallogr. B. Struct.* 1990, 46, 256-62. DOI: 10.1107/s0108768189012929
- European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), 7th ed. Tinidazole/Official Monograph. Council of Europe: Strasbourg, France, 2010.
- Food and Drug Administration (FDA). Q3C–Tables and List Guidance for Industry. U.S. *Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*. 2017, Pharmaceutical Quality/CMC Revision 3.
- Fabián, L.; Hamill, N.; Eccles, K.S.; Moynihan, H.A.; Maguire, A.R.; McCausland, L.; *et al.* Cocrystals of Fenamic Acids with Nicotinamide. *Cryst. Growth Des.* 2011, 11 3522–28. DOI:10.1021/cg200429j
- Ferraz Pinto, M.; Afonso de Moura, E.; Santos de Souza, F.; Oliveira Macedo, R. Thermal compatibility studies of nitroimidazoles and excipients. *J Therm Anal Calorim.* 2010, 102, 323–29. DOI 10.1007/s10973-010-0889-3
- Filgueiras, A.L.; Freire Dutra, T.M.; Paschoal, D.; Dos Santos, H.F.; Sant’Ana, A.C. SERS investigation of antimicrobial adsorption on silver nanoparticles as mediated by surface modifiers. *J. Raman Spectrosc.* 2017, 48, 789-94. DOI: 10.1002/jrs.5131
- Frisic’T.; Childs S.L.; Rizvic S.A.A.; Jones W. The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *Cryst Eng Comm.* 2009, 11, 418–426. DOI: 10.1039/b815174a
- Fung, H. B., Doan, T.-L. (2005). *Tinidazole: A nitroimidazole antiprotozoal agent.* *Clin. Ther.* 2005 27, 1859-84. DOI:10.1016/j.clinthera.2005.12.012
- Giron, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. *Thermochim. Acta* 1995, 248, 1-59. DOI: 10.1016/0040-6031(94)01953-E
- Good D.J.; Rodriguez-Hornedo N. Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2009,9, 2252-64. DOI 10.1021/cg801039j
- Goud N.R.; Suresh K.; Sanphui P.; Nangia A. Fast dissolving eutectic compositions of curcumin. *Int. J. Pharm.* 2012, 439, 63-72. DOI:10.1016/j.ijpharm.2012.09.045

- Groom, C.R.; Bruno, I.J.; Lightfoot, M.P.; Ward, S.C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci., Cryst. Eng. Mater.* 2016, 72, 171-79. DOI: 10.1107/S2052520616003954
- ICH Q1B. Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products., Step 5. European Medicines Agency, CPMP/ICH/279/95. [consultado 21 de junio 2021], 1998, pp. 5-9. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-b-photostability-testing-new-active-substances-medicinal-products-step-5_en.pdf
- Jagdale, S.; Kulkarni, A.; Chabukswar, A.; Kuchekar, B. Design and Evaluation of Microwave Induced Solid Dispersion of Tinidazole and Molecular Modelling with β -cyclodextrin. *Lett. Drug Des. Discovery.* 2016, 13, 781–92. DOI: 10.2174/1570180813999160429113650
- Jiang, L.; Huang, Y.; Zhang, Q.; He, H.; Xu, Y.; Mei, X. Preparation and Solid-State Characterization of Dapsone Drug–Drug Co-Crystals. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14, 4562-73. DOI:10.1021/cg500668a
- Karagianni, A.; Malamataris, M.; Kachrimanis, K. Pharmaceutical Cocrystals: New Solid Phase Modification Approaches for the Formulation of APIs. *Pharmaceutics.* 2018, 10, 18. DOI:10.3390/pharmaceutics10010018
- Karimi-Jafari, M.; Padrela, L.; Walker, G.M. Croker, D.M. Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18, 6370-87. DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00933
- Khan, G.; Yadav, S.K.; Patel, R.R.; Kumar, N.; Bansal, M.; Mishra, B. Tinidazole functionalized homogeneous electrospun chitosan/poly(-caprolactone) hybrid nanofiber membrane: Development, optimization and its clinical implications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017,103, 1311–26. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.161
- Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; *et al.* PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. 2021. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, 20894, USA.[internet][consultado 20 de junio 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Kuminek, G.; Rodríguez-Hornedo, N.; Siedler, S.; Rocha, H.V.A.; Cuffini, S.L.; Cardoso, S.G. How cocrystals of weakly basic drugs and acidic cofomers might modulate solubility and stability. *Chem. Commun.* 2016, 52, 5832–35. DOI: 10.1039/C6CC00898D
- Lai, T.F.; Marsh, R.E. The crystal structure of p-aminobenzoic acid. *Acta Cryst.* 1967. 22, 885-93. DOI: 10.1107/S0365110X67001720.
- Lu, E.; Rodríguez-Hornedo, N.; Suryanarayanan, R. A rapid thermal method for cocrystal screening. *CrystEngComm.* 2008, 10, 665-68. DOI: 10.1039/b801713c
- Madan, J. R.; Dagade, R. H.; Awasthi, R.; Dua, K. Formulation and solid-state characterization of carboxylic acid-based co-crystals of tinidazole: An approach to enhance solubility. *Polim. Med.* 2018, 48, 99–104. DOI: 10.17219/pim/105609
- Manin, A.N.; Voronin, A.P.; Drozd, K .V.; Manin, N.G.; Bauer-Brandl, A.; Perlovich, G.L. Cocrystal screening of hydroxybenzamides with benzoic acid derivatives: A comparative study of thermal and solution-based methods. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 65, 56–64, DOI: 10.1016/j.ejps.2014.09.003.

- Marciniac, B.; Bujag, A. Determination of nitroimidazoles in the solid state by infrared spectrometric method. *Chem. Anal.* 1994, 39, 705-11.
- Marciniac, B.; Bujag, A.; Kedziora, W. Kinetic study of the photodegradation of nitroimidazole derivatives in the solid state. *Pharmazie* 1997, 52, 220-23.
- Meshram, D.B.; Bagade, S.B.; Tajne, M.R. Simple, HPLC Method for Simultaneous Estimation of Fluconazole and Tinidazole in Combined Dose Tablet. *J. Chromatogr. Sci.* 2009, 47, 885–88. DOI: 10.1093/chromsci/47.10.885
- Miller, M.W.; Howes, H.L.; English, A.R. Tinidazole, a potent new antiprotozoal agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1969, 9, 257-60.
- Murdande, S.B.; Pikal, M.J.; Shanker, R.M.; Bogner, R.H. Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: Challenges in measurement. *Pharm. Dev. Technol.* 2011, 16, 187–200. DOI:10.3109/10837451003774377
- Mushtaque, M.; Ahamad, S.; Jahan, M.; Hussain, K. Shahid, M. Khan. Azole-based compounds as antiamebic agents: a perspective using theoretical calculations. *RSC Adv.* 2016, 6, 815-24. DOI: 10.1039/c5ra20552b
- Patnala, S.R.C.M.; Khagga, M.; Bhavani, R.; Bhavani, V. Novel Salt of Tinidazole with Improved Solubility and Antibacterial Activity. *Orient. J. Chem.* 2017, 33, 490–499. DOI: 10.13005/ojc/330158
- Paun, J. S.; Chapla, V. K.; Raval, M. K.; Tank, H. M. Improvement of physicochemical properties of tinidazole cocrystals: an influence of additives. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 2013, 3, 3680–88.
- Pickworth Glusker, J.; Minkin, J.A.; Patterson, A.L. X-ray Crystal Analysis of the Substrates of Aconitase. IX. A Refinement of the Structure of Anhydrous Citric acid. *Acta. Crystallogr. B. Struct.* 1969, 25, 1066-72. DOI:10.1107/s0567740869003542
- Robinson, J.M.A.; Philp, D.; Harris, K.D.M.; Kariuki, B.M. Weak interactions in crystal engineering—understanding the recognition properties of the nitro group. *New J. Chem.* 2000, 24, 799-806. DOI 10.1039/B004086J
- Sabitha Reddy, P.; Sujani, S.; Ravindra Reddy, K. Microcrystals: For Improvement of Solubility and Dissolution of Tinidazole. *Asian J. Pharm. Tech.* 2011, 1, 64-69.
- Saganowska, P.; Wesolowski, M. DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2018, 133, 785–795. DOI: 10.1007/s10973-017-6858-3
- Sahoo, A.; Bhilegaonkar, S. Suitability of different grades of gelucire and PEG-6000 for solubility enhancement of tinidazole by process of solid dispersion. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015, 6, 1460–64. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(4).1460-64
- Samsonowicz, M.; Hrynaszkiewicz, T.; Swislocka, R.; Regulska, E.; Lewandowski, W. Experimental and theoretical IR, Raman, NMR spectra of 2-, 3- and 4-aminobenzoic acids. *J. Mol. Struct.* 2005, 744–747, 345-52. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.11.063
- Schultheiss, N.; Newman, A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst. Growth Des.* 2009, 9, 2950– 2967. DOI: 10.1021/cg900129f

- Sullivan, R.A.; Davey, R.J.; Sadiq, G.; Dent, G.; Back, K.R.; ter Horst, J.H.; et al. Revealing the Roles of Desolvation and Molecular Self-Assembly in Crystal Nucleation from Solution: Benzoic and *p*-Aminobenzoic Acids. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14, 2689-96. DOI: 10.1021/cg500441g
- Udupa, N. Effect of crystallinity on drug absorption excretion patterns of ibuprofen, tinidazole and lorazepam. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1987, 13, 2749-69. DOI: 10.3109/03639048709022088
- Udupa, N. Characterization of different crystal forms of ibuprofen, tinidazole and lorazepam. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16, 1591-96. DOI: 10.3109/03639049009074387
- United States Pharmacopeial Convention, Inc. *USP 39. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 34.* Formulario Nacional. Tinidazole/Official Monograph, pag. 34. United States Pharmacopeial Convention. Rockville. US, 2016.
- Vargas Escobar, P.; O Albeiro Florez Acosta, O.; Li Giraldo Aguirre, A.; Tobon Zapata, G. E. Preparation and Characterization of Solid Dispersion of Tinidazole with Benzoic Acid and Tartaric Acid. *Asian J. Applied Sci.* 2016, 4, 387-94.
- Volovšek, V.; Colombo, L.; Furić, K. Vibrational Spectrum and Normal Coordinate Calculations of the Salicylic Acid Molecule. *J. Raman Spectrosc.* 1983, 14, 347-52 DOI: 10.1002/jrs.1250140511
- Yalkowsky S.; He Y.; Parijat J. Handbook of Aqueous Solubility Data; 2^oEd. CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2010. DOI: 10.1201/EBK1439802458
- Yamashita, H.; Hirakura, Y.; Yuda, M.; Teramura, T.; Terada, K. Detection of Cocrystal Formation Based on Binary Phase Diagrams Using Thermal Analysis. *Pharm. Res.* 2013, 30, 70-80. DOI: 10.1007/s11095-012-0850-1
- Yamashita, H.; Hirakura, Y.; Yuda, M.; Terada, K. Cofomer Screening Using Thermal Analysis Based on Binary Phase Diagrams. *Pharm. Res.* 2014, 31, 1946-57. DOI: 10.1007/s11095-014-1296-4
- Zhao, L.; Hanrahan, M.P.; Chakravarty, P.; DiPasquale, A.G.; Sirois, L.E.; Nagapudi, K.; et al. Characterization of Pharmaceutical Cocrystals and Salts by Dynamic Nuclear Polarization-Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Cryst. Growth Des.* 2018, 18, 2588-601. DOI:10.1021/acs.cgd.8b00203
- Zheng, K.; Xie, C.; Li, Wu, W.; Li, A.; Qian, S.; Pang Q. Crystal structures, thermal stabilities, and dissolution behaviours of tinidazole and the tinidazole-vanillic acid cocrystal: insights from energy frameworks. *Acta Cryst.* 2020, 76, 389-97. DOI: 10.1107/S2053229620004180

- 4.1 Introducción
- 4.2 Características físicas, fisicoquímicas y biológicas del *p*-NO₂-BSTHQ
- 4.3 Aspectos fundamentales de algunas tecnologías de solubilización para sustancias hidrofóbicas escasamente solubles en agua
 - 4.3.1 Nanomolienda asistida por microesferas (NAM)
- 4.4 Sección experimental
 - 4.4.1 Materiales
 - 4.4.2 Métodos
 - 4.4.2.1 Preparación de nanocristales de *p*-NO₂-BSTHQ
 - 4.4.2.2 Preparación de cocristales
 - 4.4.2.3 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z
 - 4.4.2.4 Microscopía electrónica de barrido
 - 4.4.2.5 Determinación de la solubilidad en equilibrio
 - 4.4.2.6 Estudios de velocidad de disolución *in vitro*
 - 4.4.2.7 Estudios de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
 - 4.4.2.8 Evaluación del estado cristalino de las muestras secas
 - 4.4.2.8.1 Difracción de Rayos X de polvos (PXRD)
 - 4.4.2.8.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR)
 - 4.4.2.8.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía de platina calentable con luz polarizada (HSM)
- 4.5 Resultados y discusión
 - 4.5.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial Z y microscopía electrónica de barrido
 - 4.5.2 Solubilidad en equilibrio
 - 4.5.3 Comportamiento de disolución de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ
 - 4.5.4 Evaluación del estado cristalino de las muestras secas
 - 4.5.4.1 PXRD
 - 4.5.4.2 ATR
 - 4.5.4.3 DSC y HSM
- 4.6 Búsqueda de cocristales
- 4.7 Conclusiones
- 4.8 Referencias

Capítulo

4

4

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCRISTALES DEL *p*-NITRO- BENCENOSULFONIL-1,2,3,4- TETRAHIDROQUINOLINA

4.1 Introducción

Actualmente, se estima que casi el 70% de las NEQ surgidas de los programas de I+D de nuevos medicamentos presentan baja solubilidad acuosa, lo cual determina que exhiban una lenta VD y baja BD (Yang *et al.*, 2016), por lo que su formulación plantea numerosos e importantes desafíos. El desarrollo de formas parenterales tampoco está exento de dificultades, porque, por ejemplo, se necesitan elevados volúmenes de vehículos para poder ser administrados.

A fin de optimizar la Sa y VD de IFA y NEQ poco solubles se han propuesto diversas estrategias de formulación (Malamatari *et al.*, 2018). Estas incluyen modificaciones de las propiedades del fármaco al nivel molecular o al nivel de las partículas. Ejemplos de estas son, la preparación de sales y complejos con ciclodextrinas; la obtención de CC y coamorfos; el uso de cosolventes; la preparación de dispersiones sólidas, entre otras, o la reducción del tamaño de partículas o la amorfización (Malamatari *et al.*, 2018). Precisamente, la reducción del tamaño de partículas, por ejemplo, por micronización ha permitido incrementar la Sa y BD oral de un buen número de IFA y NEQ poco hidrosolubles (Olusanmi *et al.*, 2014). Sin embargo, para aquellos IFA y NEQ con muy baja Sa, el incremento que produce la micronización sobre la VD, derivado del aumento de su superficie específica, no es suficiente para optimizar sus propiedades biofarmacéuticas desfavorables. Debido a ello, en la década de 1990´ se introdujeron procedimientos para obtener partículas nanométricas, lo cual derivó en el desarrollo de distintos tipos de nanoterapéuticos (Capítulo 1). Entre ellos se destacan los liposomas, las

nanoemulsiones, las nanopartículas poliméricas, virosomas, nanocomplejos y NC (Malamatari *et al.*, 2018). Estos últimos, se consideran un importante enfoque de nanoformulación, con ventajas muy interesantes para su incorporación a diversas formas de dosificación. En efecto, los NC combinan las ventajas de una mayor Sa y una disolución más rápida, lo cual conduce a una BD mejorada. La estabilidad química y la baja toxicidad de los NC, que resultan de su contenido de compuestos, generalmente cercana a 100%, también son aspectos beneficiosos a destacar (Malamatari *et al.*, 2018).

El presente capítulo, detalla los resultados obtenidos en la preparación y caracterización de NC, así como en la búsqueda de CC, del *p*-NO₂-BSTHQ, una NEQ con muy baja Sa. Previo a la presentación y discusión de los resultados, se describirán brevemente sus propiedades físicas, fisicoquímicas y biológicas y algunos aspectos fundamentales de los métodos de preparación de NC.

4.2 Características físicas, fisicoquímicas y biológicas del *p*-NO₂-BSTHQ

El *p*-NO₂-BSTHQ (Figura 4.1) es un derivado de la tetrahydroquinolina que integra una quimioteca de *N*-bencenosulfonil derivados de heterociclos (Hergert *et al.*, 2008; Pagliero *et al.*, 2010; Pagliero *et al.*, 2010; Pagliero *et al.*, 2011; Becerra *et al.*, 2012; Cooke *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2016; Pagliero *et al.*, 2017; Komrovsky *et al.*, 2018; Miana *et al.*, 2019). El diseño y preparación de dicha quimioteca tuvo el propósito de desarrollar fármacos y medicamentos huérfanos para el tratamiento de enfermedades desatendidas tales como la Enfermedad de Chagas, la tuberculosis, la leishmaniasis y la malaria.

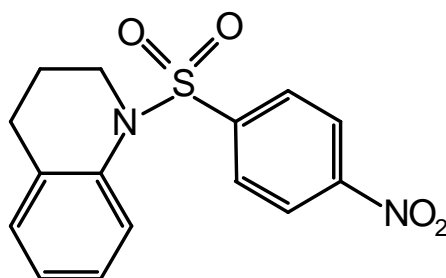


Figura 4.1. Estructura química del *p*-NO₂-BSTHQ.

El PM del *p*-NO₂-BSTHQ es de 318,35 g/mol y su *p.f.* es de 118 °C. Se obtiene como un sólido cristalino de color blanco-amarillento. Es soluble en solventes orgánicos pero presenta muy baja solubilidad acuosa ($1,7 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$, $\text{LogS} = -5,3$, a 25 °C) pero buena lipofilicidad ($\text{CLogP } 3,2$) (Komrovsky, 2014); por lo cual, se lo podría clasificar como una NEQ clase II del SCB de NEQ (Rutwijn y Morris, 2016).

La síntesis y purificación del *p*-NO₂-BSTHQ fue informada previamente por Pagliero *et al.*, (2011). Hasta el presente se ha reportado una única fase cristalina, cuya estructura se resolvió por SCXRD (Komrovsky, 2014). Dicha estructura cristalina pertenece al sistema monoclinico, grupo espacial P21/c (N° 14) y su celda unitaria contiene 4 moléculas ($Z = 4$). La Figura 4.2 muestra la conformación molecular del *p*-NO₂-BSTHQ, y las interacciones prominentes en su cristal. Como se aprecia en la Figura 4.2a, la molécula se encuentra plegada en forma de V (también llamada conformación tipo mariposa) teniendo como eje el grupo sulfonilo, como es típico en los compuestos del tipo sulfonamida. En el cristal (Figura 4.2b), las moléculas se mantienen unidas por un enlace puente hidrogeno intermolecular débil, de tipo C-H...O ($\text{C}_{15}\text{-H}_{15}\cdots\text{O}_{13}$) e interacciones de van der Waals. Se observan también interacciones del tipo $\pi\cdots\pi$ *stacking* entre el fenilo del benzenosulfonilo y la porción aromática de la tetrahydroquinolina, estando los centroides de los anillos separados por menos de 4,9 Å, en una disposición paralela desplazada (Komrovsky, 2014).

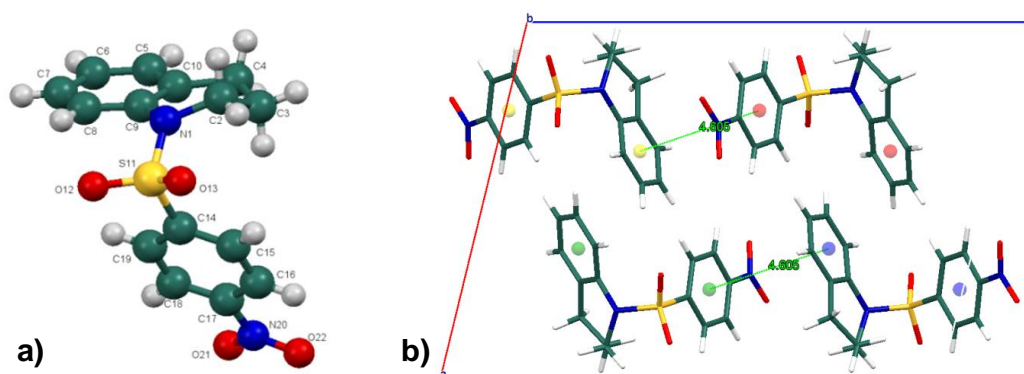


Figura 4.2. (a) Estructura molecular del *p*-NO₂-BSTHQ. Los átomos distintos a hidrógenos se dibujaron como elipsoides (50% de probabilidad) y los átomos de H se representaron como esferas de radio arbitrario. (b) Interacciones prominentes $\pi\cdots\pi$ con distancia entre los centroides de los anillos menores a 5 Å (Tomada de Komrovsky, 2014).

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD), tales como la tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la tuberculosis, entre otras, siguen siendo una de las principales preocupaciones para la salud pública de la mayoría de los países en desarrollo (Rojas-Aguirre *et al.*; 2012; WHO (*Leishmaniasis*), 2021; WHO (*Chagas disease*), 2021). Esto es debido a que su farmacoterapia no resulta del todo adecuada, a pesar de la alta prevalencia de dichas enfermedades. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de desarrollar nuevos IFA para el tratamiento de las ETD o bien, de optimizar molecular o farmacéuticamente compuestos que han exhibido actividad frente a sus agentes etiológicos. Dentro de esos compuestos, merece destacarse el *p*-NO₂-BSTHQ porque ha mostrado buena actividad *in vitro* frente al *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum* (Miana, 2015). Lamentablemente, este compuesto presenta muy baja Sa (<0,02 mg/mL) (Komrovsky, 2014), y ello predice que tendría serios problemas biofarmacéuticos, como una baja VD y una BD oral pobre.

En el pasado, las NEQ con muy baja Sa eran consideradas riesgosas para el desarrollo de medicamentos (Malamatari *et al.*, 2018). Sin embargo, principalmente debido a su prevalencia, la industria farmacéutica ha cambiado su actitud de evitación a una de aceptación de este tipo de NEQ, y se da un mayor énfasis a la investigación con el objetivo de resolver los desafíos de solubilidad (Malamatari *et al.*, 2018).

Por ello, en este trabajo de Tesis Doctoral se hipotetizó, también, que la obtención de NC podría ser una estrategia adecuada para optimizar la baja Sa del *p*-NO₂-BSTHQ. Como parte del mismo estudio, se investigó la posibilidad de obtener y caracterizar CC de este compuesto con coformadores GRAS solubles en agua.

4.3 Aspectos fundamentales de algunas tecnologías de solubilización para sustancias hidrofóbicas escasamente solubles en agua

Como se señaló en el Capítulo 1, la baja Sa es un problema serio, que obstaculiza el desarrollo de la mayoría de las NEQ por su impacto en la BD. Es especialmente crítico cuando el compuesto hidrofóbico presenta una Sa menor a 0,01 mg/mL. Para tales compuestos, las estrategias convencionales de solubilización

suelen no ser eficaces y se debe recurrir a sistemas de liberación de IFA más avanzados, como los nanoterapéuticos.

De las varias opciones estudiadas en este sentido, los NC constituyen una de las plataformas tecnológicas más importantes. Fueron establecidas para la formulación de IFA y NEQ escasamente solubles en agua, existiendo varias metodologías para su obtención. A continuación, se describen algunos aspectos fundamentales de la nanomolienda asistida por microesferas (NAM, por sus siglas en inglés), la técnica utilizada en este trabajo de Tesis Doctoral para la preparación de NC.

4.3.1 Nanomolienda asistida por microesferas (NAM)

Los NC se componen típicamente de fármacos y estabilizadores (polímeros o tensioactivos) con diámetros medios inferiores a 1 μm . Tienen un proceso de preparación simple y un estado estable de nanodispersión (denominada nanosuspensión) que se puede lograr para las NEQ o IFA, con una pequeña cantidad de surfactante o material polimérico. Por ende, la carga del compuesto puede llegar a casi el 100% en la formulación (Cheng *et al.*, 2018).

Existen varios procedimientos para la preparación de NC de NEQ e IFA (Capítulo 1, sección 1.5.1). De ellos, la NAM es uno de los métodos más actuales y convenientes para la obtención de NC (Afolabi *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2016). En efecto, posee numerosas ventajas, entre ellas, es simple y se puede aplicar a NEQ o IFA termolábiles, porque la temperatura del proceso es fácilmente controlable y usualmente menor a la temperatura ambiente, y el agua disipa eficazmente el calor generado (Merisko-Liversidge *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2018).

La NAM es un método de fragmentación (es decir, un método *top down*) basado en la división mecánica de las partículas del sólido. Para la obtención de NC se debe preparar una suspensión acuosa de la sustancia a nanometrizar, a la que se le agrega un agente estabilizante y un material de molienda (generalmente perlas de zirconio, vidrio o cerámica) que constituyen el elemento activo de la nanomolienda. Luego se aplica agitación al sistema. Cabe señalar que, el agente estabilizante es un elemento clave en el proceso, ya que debe favorecer la reducción del tamaño de partícula del sólido y proveerle una adecuada estabilidad física. Para que éste resulte eficaz, debe provocar la humectación de la superficie de los cristales del

sólido y proporcionarles una barrera de tipo iónico o estérico. En ausencia de un agente estabilizante, o si este es inadecuado, la elevada energía superficial de las partículas nanométricas formadas provocará su agregación (Choi *et al.*, 2005).

La colisión entre las partículas del IFA o de la NEQ, con el material de molienda y las paredes del equipo de NAM, producen la disminución del tamaño de partícula (Afolabi *et al.*, 2014; Romero *et al.*, 2016). Esto conduce a la formación de una nanosuspensión de partículas nanocristalinas (cuyo tamaño habitualmente está comprendido entre 100 y 500 nm), recubiertas de una fina película de agente estabilizante. De esta manera se estabiliza al sistema creando una barrera electrostática o estérica entre los cristales (Merisko-Liversidge *et al.*, 2003; Chogale *et al.*, 2016).

Los equipos para NAM están compuestos, generalmente, por una cámara donde se alojan el material de molienda y la suspensión. Dentro de ella también hay un agitador acoplado a un motor que lo hace girar a altas rpm (Figura 4.3) (Loh *et al.*, 2015).

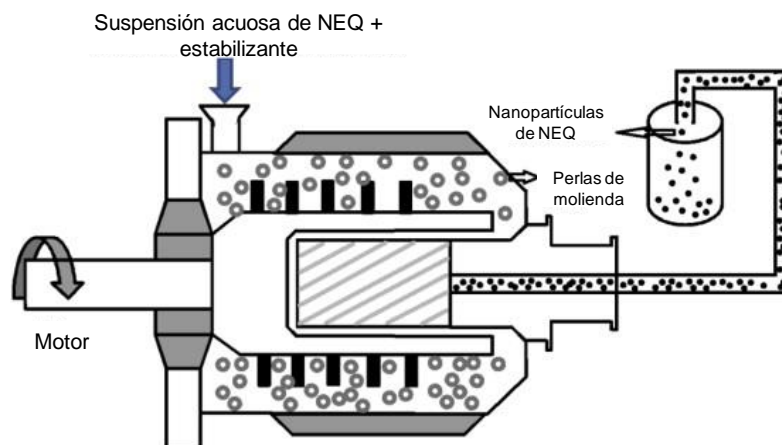


Figura 4.3. Representación esquemática del proceso de NAM (Adaptado y traducido de Loh *et al.*, 2015).

Cabe señalar que, los equipos disponibles comercialmente para la NAM necesitan volúmenes elevados de suspensión (~500 mL). Lo cual es una gran desventaja cuando se desea procesar NEQ, de las cuales se posee normalmente muy poca cantidad. Por ello, se han desarrollado algunos equipos que permiten utilizar cantidades pequeñas de muestra. Uno de ellos es el NanoDISP[®] Mill (Figura 4.4), el cual fue desarrollado en el marco de la Tesis Doctoral del Dr. Paredes

(2016). Como se ilustra en la Figura 4.4, el equipo consiste en un molino construido en acero y resina y posee una tapa hermética que impide la fuga de la suspensión y la entrada de aire al sistema, lo cual evita la formación de espuma durante el proceso. Además, posee un sistema de rodamientos y retenes en la tapa, que permiten el giro del agitador sin intercambio de materia con el medio externo. El molino cuenta, además, con una cámara de refrigeración externa a la de molienda, por la que circula un líquido refrigerante para controlar la temperatura del proceso (Paredes, 2016).

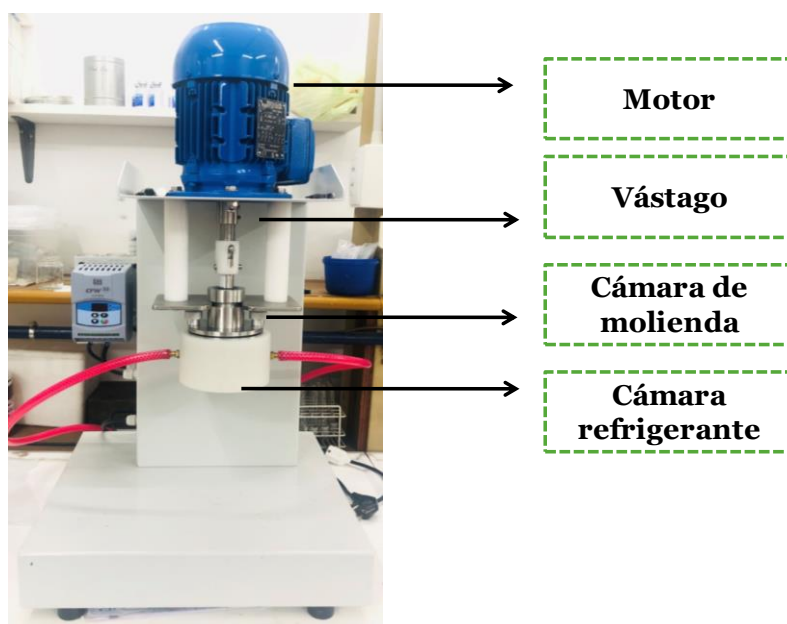


Figura 4.4. Fotografía del equipo NanoDISP® Mill empleado para la obtención de los NC del p -NO₂-BSTHQ.

4.4 Sección experimental

4.4.1 Materiales

La muestra de partida del p -NO₂-BSTHQ se obtuvo por síntesis, siguiendo un procedimiento descrito por Pagliero *et al.* (2011). Involucra una reacción de condensación entre la tetrahydroquinolina y el cloruro de p -nitrobenzeno sulfonilo (Figura 4.5). La purificación del p -NO₂-BSTHQ se efectuó por filtración a través de una mezcla de sílica gel y carbón activado (para eliminar impurezas coloreadas) y posterior recristalización de etanol.

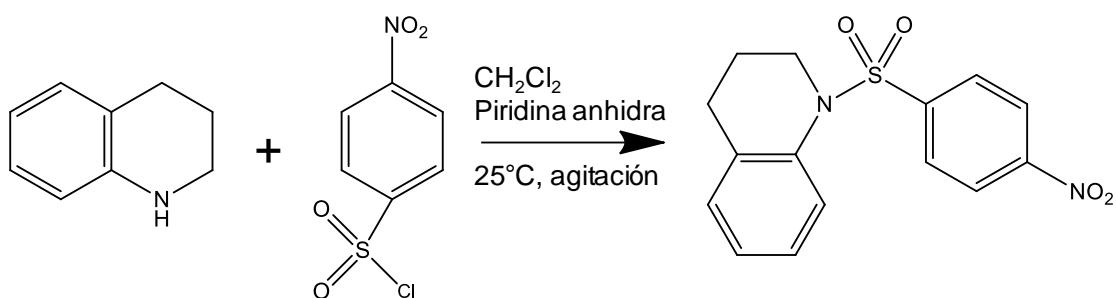


Figura 4.5. Esquema de síntesis del *p*-NO₂-BSTHQ.

El manitol (MAN) y poloxamer 188 (POL188) se adquirieron comercialmente (pureza >99%) y se utilizaron sin purificación previa. El papel de filtro (2,7 μm, Whatman 542, Reino Unido), las membranas de Nylon® (0,45 μm, *Pall Corporation*, EUA) y las placas para cromatografía en placa delgada (CCD, sílica gel 60 F254, Merck KGaA, Alemania) se adquirieron comercialmente. El agua se purificó por medio de un sistema de purificación Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA). Todos los solventes y demás reactivos fueron de calidad analítica o HPLC, y se utilizaron sin purificación previa. Para la designación de los solventes se utilizan las mismas siglas que se describieron en el Capítulo 3.

4.4.2 Métodos

4.4.2.1 Preparación de nanocristales del *p*-NO₂-BSTHQ

Como el *p*-NO₂-BSTHQ es una NEQ que se obtiene por síntesis a escala laboratorio y el NanoDISP® Mill permite trabajar con cantidades pequeñas de muestras (1-5 g), se recurrió a este equipo para obtener NC. Para ello, se pesaron exactamente cantidades equiponderales (1 g) del *p*-NO₂-BSTHQ y del POL188 (agente estabilizante). Los polvos se homogeneizaron en un mortero con pilón de cerámica y luego se adicionaron a una probeta, que contenía 60 mL de agua MilliQ®. Esta se tapó y se agitó en forma manual, suavemente, para evitar la formación de grandes cantidades de espuma. La suspensión acuosa resultante se vertió dentro de la cámara de molienda del NanoDISP® Mill y se agregaron 50 g de perlas de zirconio de 0,1 mm, y se procedió a nanomoler el *p*-NO₂-BSTHQ en ciclos de 30 min., a 1600 rpm y a 15 °C (a fin de prevenir el aumento de temperatura en la muestra). Luego de cada ciclo, se tomaron muestras y se midió el tamaño de

partícula medio (TPM) y el índice de polidispersidad (PDI, por su sigla en inglés) (Zetasizer Nano-S, Malvern Instruments®, Reino Unido) para determinar el tiempo adecuado de molienda. A las 2 h, el TPM y la homogeneidad de la suspensión resultaron adecuados y dentro del rango típico de NC, con lo cual se dio por finalizada la molienda. La suspensión se retiró de la cámara del molino y se tamizó para la extracción de las perlas de zirconio. Luego, y a fin de eliminar la fase acuosa de la nanosuspensión por liofilización, se agregó 1 g de MAN, como agente crioprotector, y la mezcla se transfirió a un tubo de vidrio para liofilización. Este se sumergió en aire líquido para congelar la muestra, se colocó en el liofilizador Freezone 6 (Labonco, Kansas, Missouri, EUA) y liofilizó por 24 h, a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, con alto vacío. Transcurrido ese tiempo, el tubo se retiró del liofilizador y colocó en un desecador con sílica gel, CaCl_2 y vacío para su secado final. Las nanopartículas en estado de polvo seco, se almacenaron en un desecador con CaCl_2 hasta su posterior caracterización. Además, se preparó una MF, mortereando suavemente en un mortero de ágata con pilón el *p*- NO_2 -BSTHQ, el POL188 y el MAN en proporción 1:1:1 p/p.

4.4.2.2 Preparación de cocristales

Para la búsqueda de CC del *p*- NO_2 -BSTHQ se eligieron 5 COF GRAS, el ácido benzoico (AB), el SA, el PABA, el TRIP y la urea (U). Como método de síntesis se seleccionó la técnica LAG (Capítulo 3, Sección 3.3.2.2 A). Para ello, se molieron, en un mortero de ágata con pilón, cantidades exactamente pesadas del *p*- NO_2 -BSTHQ y el COF en relación estequiométrica 1:1. El mortereado inicial se efectuó durante 30 min., adicionando unas pocas gotas de ACN, tras lo cual se determinaron los puntos *p.f.* de las mezclas molidas. El mortereado se continuó hasta 150 min., en intervalos de 30 min., con el agregado de gotitas de ACN. Las muestras obtenidas se almacenaron en un desecador (utilizando vacío, CaCl_2 y sílica gel como desecantes) para su posterior caracterización.

4.4.2.3 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z

La determinación del tamaño de partículas (diámetro hidrodinámico), PDI y potencial Z de las nanosuspensiones (tras los diferentes ciclos de homogenización)

y las redispersiones de los NC en agua, se efectuó mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz. Para ello se utilizó un analizador de tamaño de partículas Zetasizer Nano-S (Malvern Instruments®, Reino Unido). En este trabajo de Tesis, el TPM se expresó como el diámetro volumétrico medio, $d [v, 0,5]$, el cual se corresponde al tamaño por debajo del cual se encuentra el 50% de la población de partículas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, a 25 °C, colocando las muestras en una cubeta de cuarzo para introducirla en el equipo de medición. Las nanosuspensiones obtenidas en los ciclos de nanomolienda se diluyeron colocando alícuotas de 0,1 mL en matraces de 10 mL, los cuales se completaron a volumen con agua Milli Q®. Para la redispersión de los NC, se pesaron 10 mg del polvo liofilizado en un matraz de 10 mL, y éste se completó a volumen con agua Milli Q®. Los valores de tamaño de partícula, PDI y el potencial Z se calcularon con el programa incluido en el analizador Zetasizer Nano-S.

4.4.2.4 Microscopía electrónica de barrido

La morfología de las muestras se examinó con un microscopio electrónico de barrido Carl Zeiss (Sigma, EUA), del Laboratorio de Microscopía y Análisis por Rayos X (LAMARX) de la UNC. Las muestras se fijaron sobre un portamuestra de aluminio en una cinta de carbono de doble cara, y se recubrieron con un baño de oro para impartirles conductividad.

4.4.2.5 Determinación de la solubilidad en equilibrio

La solubilidad acuosa se evaluó a 25 °C, por el método del tubo (Murdande *et al.*, 2011). Para ello, se colocó un exceso de muestra en un tubo de vidrio con tapa a rosca y se adicionaron 10 mL de diferentes *buffer* acuosos (KCl/HCl de pH 1,0, 2,0, 3,5 y 5,5, y de KCl/NaOH pH 7,0). Luego, el tubo se colocó en un baño de agua termostatzado a 25 °C y se mantuvo con agitación constante por 7 días, tiempo que tarda en alcanzar el equilibrio el *p*-NO₂-BSTHQ, conforme a lo informado por Komrovky (2014). Luego de este periodo, se tomaron alícuotas de 1 mL, se las filtró (membranas de Nylon de 0,45 µm) y analizó por HPLC, utilizando un método validado que utiliza detección UV (Komrovsky, 2014). Las determinaciones se

realizaron por triplicado y los valores de Sa informados corresponden a la media de tres mediciones, con su respectiva desviación estándar.

4.4.2.6 Estudios de velocidad de disolución *in vitro*

Los estudios de VD del *p*-NO₂-BSTHQ y sus NC, se efectuaron en un disolutor Sotax AT7 Smart *Semi-automated dissolution tester* (Sotax Corp. Horsham, Pennsylvania, EUA). Las condiciones experimentales fueron las siguientes: Aparato USP 1 (cestillo), 900 mL de fluido gástrico simulado sin enzimas (pH 1,2), desaireado a $37,0 \pm 0,5$ °C y 100 rpm. El desaireado del medio de disolución se efectuó mediante filtrado al vacío (membrana de Nylon® de 0,45 µm) y agitación vigorosa, en vacío, por 5 min. Las muestras sólidas exactamente pesadas (aproximadamente 5 mg de *p*-NO₂-BSTHQ y la cantidad equivalente a 5 mg de *p*-NO₂-BSTHQ en el caso de los NC) se colocaron en cápsulas de gelatina dura, las cuales se introdujeron en los cestillos metálicos del disolutor. A tiempos prefijados (5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min.) se extrajeron alícuotas de 3 mL (con una jeringa de 5 mL) y se filtraron a través de membranas de Nylon® (0,45 µm). A fin de mantener constante el volumen, se repuso el volumen extraído con una cantidad equivalente de medio de disolución fresco, precalentado a $37,0 \pm 0,5$ °C. En todos los casos, se descartó el primer mililitro filtrado. La cantidad del *p*-NO₂-BSTHQ disuelta (expresada en porcentaje acumulado) se determinó por HPLC (Sección 4.3.2.8). Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los perfiles de disolución se representaron como los porcentajes acumulativos medios ($n = 3$) de la cantidad de NEQ liberada en cada intervalo de muestreo. Para parametrizar los perfiles de disolución se utilizaron métodos de modelos dependientes (Costa y Sousa Lobo, 2001). Los modelos matemáticos utilizados incluyeron la cinética de orden cero y de primer orden, así como los modelos de Hixson-Crowell, Higuchi, Weibull, Probit y Gompertz. Todos ellos están incluidos en *DDSolver*, un programa gratuito para modelar y comparar perfiles de disolución de fármacos (Zhang *et al.*, 2010).

4.4.2.7 Estudios de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

El equipo de HPLC consistió en un cromatógrafo líquido Agilent® S1100, con un inyector automático de *loop* variable (Agilent 1100 serie G-1313 A) prefijado en 20 µL y un detector UV-Visible variable Agilent serie G1365B. Se utilizó una

columna de fase reversa de C18 Phenomenex® de 250 mm x 4,6 mm con partículas de relleno con un diámetro de 4,0 μm . La fase móvil consistió en una mezcla de MeOH y agua Milli Q® (80:20, v/v), la cual se filtró a través de membranas de Nylon® (0,45 μm) y se desgasificó mediante vacío. El análisis se llevó a cabo en modo isocrático a 25 °C, utilizando un caudal de 1,0 mL/min. La detección se realizó a 254 nm. En todos los casos, se realizaron tres inyecciones de 20 μL cada una. La determinación de los tiempos de retención (t_r) y el cálculo de las áreas de los picos se efectuó con el programa Chemstation Rev. A.10.02®.

Para la construcción de la curva de calibrado de *p*-NO₂-BSTHQ, se prepararon 3 soluciones estándar (*stock*), pesando exactamente (en matraces de 50 mL) 3 alícuotas (10 mg) del *p*-NO₂-BSTHQ finamente pulverizado. Luego, se agregó a cada matraz 1 mL de MeOH (solvente en el que el *p*-NO₂-BSTHQ es soluble) y a las suspensiones resultantes se las sonicó con ultrasonido por 3 min. y se completó a volumen con fase móvil. Después, se transfirieron 5 alícuotas de cada solución *stock* del *p*-NO₂-BSTHQ, cubriendo el intervalo de concentraciones de 0,2–50,0 $\mu\text{g/mL}$, a matraces de 10 mL, los cuales se completaron a volumen con fase móvil. Las soluciones se filtraron a través de membranas de 0,45 μm y se analizaron por HPLC, utilizando las condiciones arriba descritas. La linealidad se evaluó por el método de los cuadrados mínimos y ANOVA, utilizando las herramientas estadísticas de Microsoft EXCEL®.

4.4.2.8 Evaluación del estado cristalino de las muestras secas

4.4.2.8.1 Difracción de Rayos X de polvos (PXRD)

Los patrones de PXRD del *p*-NO₂-BSTHQ, POL188, MAN y de los NC de *p*-NO₂-BSTHQ, se obtuvieron a temperatura ambiente en un difractómetro de polvo Philips X'PERT PRO PANALytical (Philips, Holanda), con filtro de Ni y ánodo de CuK α , $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$, corriente de 30 mA y voltaje de 40 kV. La medición se llevó a cabo en modo continuo, con un tamaño de paso de 0,05° y un tiempo de 3 s/paso. El intervalo de medición fue entre 5° y 40° 2 θ . Las muestras se depositaron en un portamuestras de Si (monocristal). El *p*-NO₂-BSTHQ y los componentes de la formulación se morterearon suavemente en un mortero de ágata con pilón, para uniformar el tamaño de partícula y reducir el fenómeno de orientación preferencial.

Los NC en estado de polvo seco no se molieron. El procesamiento de los patrones de PXRD se efectuó con el programa OriginLab®.

4.4.2.8.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR)

Los espectros de IR ATR en el MIR ($4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$) se registraron en un espectrofotómetro Agilent Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., EUA), equipado con un sistema de ATR de rebote único. Para la obtención de los espectros, se colocaron las muestras sólidas a analizar sobre el módulo ATR, sin el agregado de diluyentes. Se adquirieron acumulando 40 barridos, a una resolución de 4 cm^{-1} , y se procesaron con el programa OMNIC E.S.P.5.1p (Nicolet Corp.).

4.4.2.8.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía de platina calentable con luz polarizada (HSM)

Las mediciones de DSC se efectuaron en el analizador DSC DISCOVERY (TA Instrument, Inc., EUA). Las observaciones microscópicas se efectuaron a través de un microscopio polarizador (Olympus BX51), equipado con una platina de calentamiento (Linkam LTS420) y se utilizaron las condiciones experimentales descritas en el Capítulo 3. Las curvas DSC se procesaron con el programa TRIOS Full_v4.1.1.33073 (TA Instruments Inc.).

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Tamaño de partícula, índice de polidispersidad, potencial Z y microscopia electrónica de barrido

El término NC se refiere a partículas cristalinas y con un tamaño en el rango submicrométrico (Zhongyao *et al.*, 2018). Uno de los primeros aspectos a considerar en la caracterización de muestras sometidas a procesos de nanonización es el tamaño y distribución de tamaños de partículas. Estos condicionan otras propiedades tales la estabilidad física, la S en equilibrio, la VD y aún la eficacia clínica (Chogale *et al.*, 2016). Además, se debe evaluar la Sa y la VD de las

nanopartículas, resuspendidas en agua, para confirmar las predicciones teóricas de las mejoras en dichas propiedades.

A fin de optimizar el tiempo de nanomolienda y determinar si las condiciones experimentales ensayadas conducían a la formación de una suspensión con TPM en el rango submicrométrico y, además, si este tamaño era homogéneo, se midió el TP y el PDI, luego de cada ciclo de molienda (Tabla 4.1). Cabe mencionar que este último es un parámetro obtenido de manera simultánea con el TP, que provee información sobre la homogeneidad de tamaños. Valores de PDI cercanos a cero indican que la muestra es monodispersa, mientras que valores cercanos a la unidad indican que presenta gran variedad de tamaños.

El potencial Z es una propiedad de los materiales que mide el potencial electrocinético en sistemas coloidales. Su magnitud indica el grado de repulsión o atracción entre partículas adyacentes cargadas en una dispersión, y puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales (Hunter, 1988). En general, es menos probable que ocurra la agregación de partículas cuando poseen un potencial Z que proporcione suficiente repulsión eléctrica, o suficiente barrera estérica, entre ellas. Para sistemas electrostáticos es deseable que este sea de al menos -30 mV, y de -20 mV para sistemas estabilizados estéricamente, para obtener suspensiones estables de nanocristales, en tanto que, el límite superior es de +30 mV (Chogale *et al.*, 2016).

Como se visualiza en la Tabla 4.1, al inicio del proceso la muestra era una suspensión micrónica polidispersa, ya que el valor de TPM medido fue mayor a 3000 nm y el PDI fue cercano a la unidad (0,71). Esto indicó que existían partículas de tamaños diversos y de gran tamaño. Sin embargo, tras el primer ciclo de nanomolienda, tanto el TPM como el PDI se redujeron considerablemente. Los valores obtenidos [$529,9 \pm 6,2$ nm (TPM) y $0,189 \pm 0,034$ (PDI)] indicaron que el proceso NAM inducía la nanonización del *p*-NO₂-BSTHQ. Dado que el TP típico para los NC es del orden de 400 nm o menor (Merisko-Liversidge *et al.*, 2003), se continuó la nanomolienda en ciclos de 30 min. Se observó que el TPM disminuía a medida que aumentaba el tiempo de molienda. En cambio la homogeneidad de la muestra no variaba, ya que los valores de PDI mostraron escasas diferencias (Tabla 4.1). Luego de 2 h de nanomolienda, la suspensión exhibió un buen valor de diámetro medio de partícula ($307,3 \pm 3,0$ nm), el menor observado para el proceso, con el valor de PDI que se mantuvo cercano a cero. Esto señaló que la

homogeneidad de la nanosuspensión obtenida fue adecuada. Estos resultados permitieron inferir que las condiciones experimentales empleadas fueron apropiadas para la obtención de NC del *p*-NO₂-BSTHQ. Estas se seleccionaron sobre la base de la información de un protocolo de nanonización desarrollado por Paredes (2016). Este establece el uso de cantidades equiponderales (en el rango del gramo) de NEQ, o IFA, y POL 188 (como agente estabilizante), 60 mL de agua, 1600 rpm y 50 g de perlas de zirconio.

Tabla 4.1. Tamaño medio de partícula y valores de PDI para los distintos ciclos de nanomolienda asistida por microesferas del *p*-NO₂-BSTHQ.

Ciclo de nanomolienda (min.)	Tamaño medio de partícula (nm), SD ^a	PDI ± SD ^a
0	> 3000	0,71 ± 0,16
30	529,9 ± 6,2	0,189 ± 0,034
60	393,8 ± 3,7	0,176 ± 0,020
90	348,7 ± 2,3	0,170 ± 0,017
120	307,3 ± 3,0	0,1860 ± 0,0040

^a SD: desviación estándar.

La eliminación de la fase acuosa de las nanosuspensiones es una etapa importante en la obtención de NC, ya que permite obtenerlos en estado de polvo seco. Este es un estado en el cual la estabilidad física y química de los NC, se ve incrementada al evitar el peligro de la aglomeración o del crecimiento cristalino (Merisko-Liversidge *et al.*, 2003). Además, facilita la incorporación de ellos con facilidad a formas de dosificación sólidas. Por consiguiente, se liofilizó la nanosuspensión, utilizando MAN como crioprotector. Se sabe que este recrystaliza alrededor de los NC durante la remoción del agua, y así previene la interacción entre partículas y su aglomeración (Chogale *et al.*, 2016). Luego de ello, se efectuó un análisis de tamaños para el polvo seco redispersado en agua Milli Q®.

La Figura 4.6 exhibe las curvas de distribución de tamaños de partículas (DTP) de los NC en estado de polvo seco, tras ser resuspendidos en agua Milli Q®, y en estado de nanosuspensión antes de la liofilización. Como se aprecia, tanto los NC resuspendidos como los NC antes de ser liofilizados presentaron una DTP bimodal, con un pico muy pequeño y otro mayoritario. En el caso de los primeros, la población

minoritaria se ubicó en el rango de TP <100 nm, con una incidencia del 0,5% del total de la medición. En tanto que, para los NC antes de ser liofilizados la población pequeña se ubicó en el rango de TP >1000 nm y su incidencia fue del 1,6% del total de la medición. Como se describirá más adelante, el *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar era un sólido cristalino constituido por fibras (hábito cristalino columnar) con un tamaño > 30 μm. Por este motivo, las curvas de DTP de los NC obtenidos, ya sea como nanosuspensión o como polvo seco redispersado, no se pudieron comparar con la del *p*-NO₂-BSTHQ materia prima. Esto es debido a que el límite máximo de medición del analizador Zetasizer es de 10 μm.

Además, el TPM del producto seco resuspendido en agua fue de $482,3 \pm 1,2$ nm. Si bien este tamaño fue mayor al de la nanosuspensión sin liofilizar ($307,3 \pm 3,0$ nm, Tabla 4.1), este se mantuvo dentro del rango aceptable para NC resuspendidos en agua (Zhongyao *et al.*, 2018). Además, el polvo resuspendido exhibió un PDI de $0,31 \pm 0,05$, y ello reveló que la nanosuspensión obtenida era homogénea. A su vez, el potencial Z fue de -23 mV. Este debe ser superior o cercano a -30 mV para que los NC no formen aglomerados y floculen (Kakran, 2012). El valor obtenido predice que la estabilidad de la nanosuspensión frente al almacenamiento será adecuada. Es decir, no presentará tendencia la agregación (Chongale *et al.*, 2016).

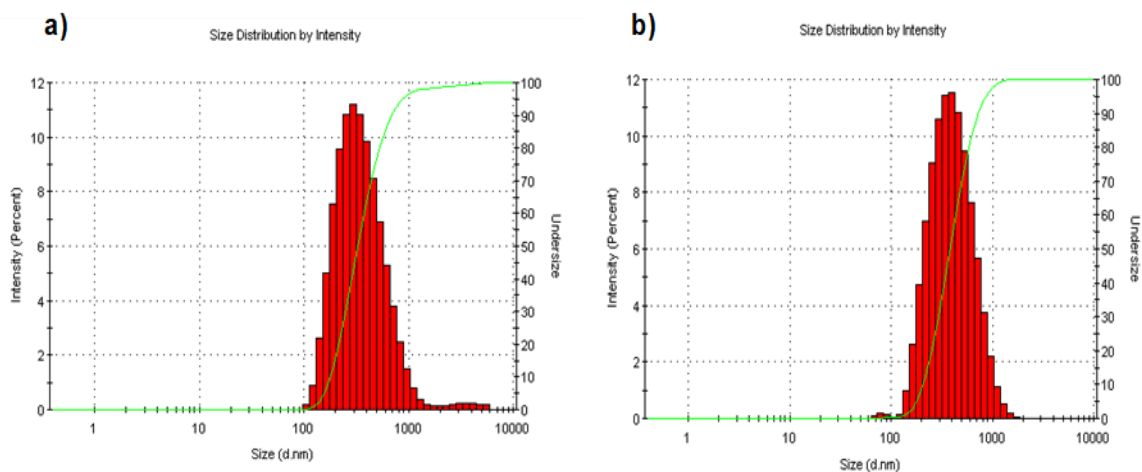


Figura 4.6. Curvas de distribución de tamaño de partículas de la nanosuspensión del *p*-NO₂-BSTHQ obtenida por NAM, previa a la liofilización (a) y después de la redispersión en agua Milli Q (b).

Además, se evaluaron las características morfológicas de los NC en estado de polvo seco por SEM, en comparación con el *p*-NO₂-BSTHQ materia prima (Figura 4.7). Como se aprecia, la morfología y el TP de ambas muestras (Figura 4.7a, b),

antes y después de nanometrizar, fueron marcadamente diferentes. En efecto, el p -NO₂-BSTHQ utilizado en este estudio era un sólido euhedro, constituido por fibras alargadas de gran tamaño (> 30 μ m) y de diferentes grosores y longitudes (Figura 4.7a). En cambio, los NC en estado de polvo seco (Figura 4.7b) eran partículas prismáticas pequeñas, con un tamaño del orden de \sim 400 nm. Estas se vieron recubiertas de una película de estabilizante y crioprotector, los cuales se depositaron durante el proceso de secado por liofilización de la nanosuspensión.

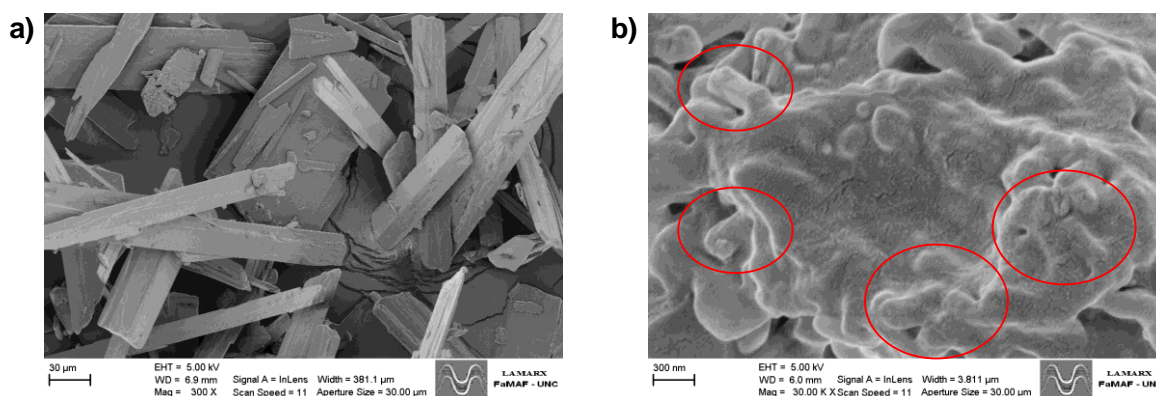


Figura 4.7. Fotografías obtenidas por SEM (con las magnificaciones utilizadas indicadas entre paréntesis) de (a) p -NO₂-BSTHQ sin moler (300X, escala = 30 μ m) y (b) NC del p -NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco (30 KX, escala = 300 nm). Los óvalos rojos señalan las partículas prismáticas del p -NO₂-BSTHQ.

4.5.2 Solubilidad en equilibrio

Los NC se comportan de manera diferente en varios entornos (especialmente *in vivo*). Esto determina que se deba evaluar su Sa en equilibrio en medios que repliquen el tracto gastrointestinal, si se van a formular como formas de dosificación orales (Farjadian *et al.*, 2019). Esta se evaluó en soluciones acuosas de diferentes pH (rango 1,2 -7,0). La evaluación se realizó comparativamente entre el p -NO₂-BSTHQ (materia prima), la MF ternaria (p -NO₂-BSTHQ-POL 188-MAN) y los NC en estado de polvo seco.

La Figura 4.8 exhibe los perfiles de pH-Sa de las muestras anteriormente descritas. Como se aprecia, la Sa en equilibrio del p -NO₂-BSTHQ fue pH independiente, dentro del error experimental, con valores menores a 1,00 μ g/mL. La MF también exhibió una Sa en equilibrio pH independiente, y los valores fueron similares a los del p -NO₂-BSTHQ materia prima, como era esperable para una MF.

En contraste, la Sa en equilibrio de los NC si resultó pH dependiente, con valores superiores a los del *p*-NO₂-BSTHQ materia prima, a partir de pH 3,5. En efecto, los NC mostraron una mejora de 11,7 veces a pH 7,0; de 6,6 veces a pH 5,5, y de 5,0 veces a pH 3,5, en comparación con la NEQ sin procesar. Si bien estos incrementos en la Sa en equilibrio no fueron dramáticos, si fueron significativos. En especial, si se considera la escasa Sa y alta hidrofobicidad del *p*-NO₂-BSTHQ (Komrosvky, 2014). También, fueron consistentes con los aumentos de Sa en equilibrio observados para algunos NC (Hecq *et al.*, 2015; Rahim *et al.*, 2017). Por debajo de un tamaño crítico de 1 a 2 μm, la Sa en equilibrio depende, también, de la estructura cristalina y el tamaño de las partículas, y aumenta con una reducción del tamaño de partícula por debajo de 1000 nm (Chogale *et al.*, 2016). Considerando esto, se puede explicar el aumento alcanzado con los NC del *p*-NO₂-BSTHQ.

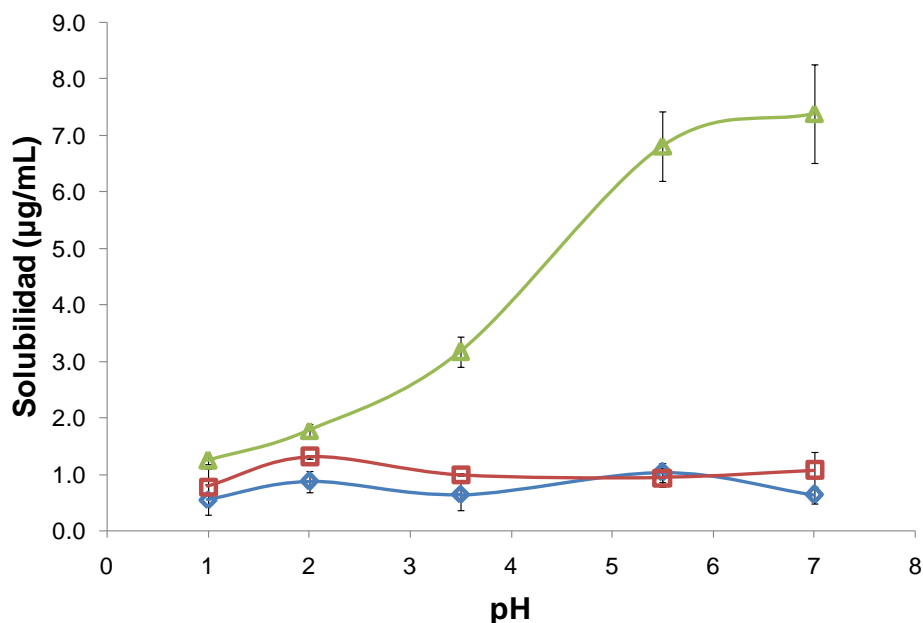


Figura 4.8. Perfil pH-Sa en equilibrio ($n = 3$) de (\diamond) *p*-NO₂-BSTHQ materia prima; (\square) *p*-NO₂-BSTHQ-POL188-MAN_{MF}, y (\triangle) NC del *p*-NO₂-BSTHQ.

4.5.3 Velocidad de disolución de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ

En la Figura 4.9 se presentan los perfiles de disolución, obtenidos en fluido gástrico simulado sin enzimas a 37 °C, del *p*-NO₂-BSTHQ materia prima y de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco. Como se visualiza, el comportamiento

de disolución *in vitro* de ambas muestras fue marcadamente diferente. En efecto, la VD de la materia prima sin procesar fue nula, ya que *p*-NO₂-BSTHQ no se disolvió en ninguno de los intervalos de tiempos ensayados. En cambio, los resultados mostraron un incremento significativo en la VD de sus NC, cuando se compara con la materia prima sin procesar. Pudo cuantificarse cierta cantidad del *p*-NO₂-BSTHQ disuelto a los 15 min., y se alcanzó un porcentaje de disolución medio del 16,8 % a los 120 min. Vale mencionar que, de acuerdo con lo esperado, el perfil de disolución de los NC mostró un retardo en la disolución, debido a que se incluyeron en cápsulas de gelatina dura, las cuales necesitan de un cierto tiempo para disolverse, en este caso fue de 10 min. (Figura 4.9). Asimismo, cabe destacar que, si bien la VD de disolución de los NC no fue elevada ($Q_{120} = 16,8 \%$), la mejora en la VD lograda fue de ~ 17 veces. Dicha mejora fue incluso mayor a la observada para otros NC reportados (Hecq *et al.*, 2015; Rahim *et al.*, 2017).

El incremento observado en la VD de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ, puede explicarse tomando en cuenta la ecuación de Noyes-Whitney (Capítulo 2) la que indica que la VD es directamente proporcional al área superficial y a la Ss en equilibrio. Por tanto, la ecuación predice incrementos en la VD como consecuencia de la ampliación de la superficie del sólido a disolver, debida a la disminución del tamaño de sus partículas a tamaños submicrónicos. Además, la reducción del TP

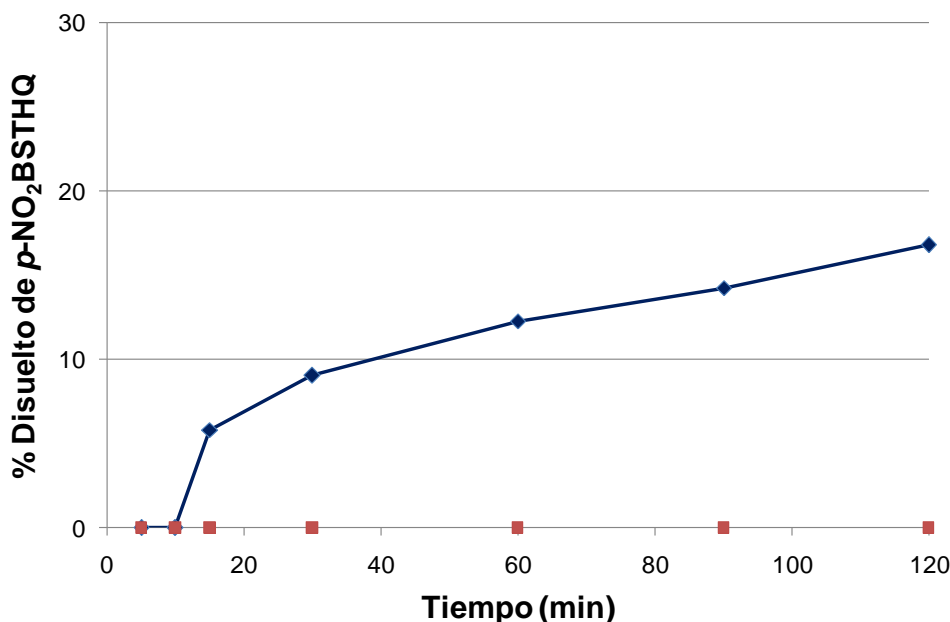


Figura 4.9. Perfiles de disolución medios ($n = 3$) en fluido gástrico simulado sin enzimas a 37 °C de (■) *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar y (♦) NC en estado de polvo seco del *p*-NO₂-BSTHQ.

conduce a un aumento de la Sa en equilibrio, como de hecho se observó para los NC del p -NO₂-BSTHQ (Figura.4.8).

A fin de obtener información sobre el mecanismo de disolución de los NC, se ajustaron los valores de disolución medidos a modelos cinéticos ampliamente utilizados en el ajuste (Costa y Souza Lobo, 2001). Como rasgo distintivo puede señalarse que, los datos de disolución de los NC no ajustaron al modelo de raíz cúbica (Anexo 2, Tabla S1), uno de los clásicamente utilizados para polvos mono y polidispersos. Esto indicó que no explica satisfactoriamente el perfil de disolución experimental de los NC por este modelo. Ello podría explicarse considerando que la forma de los NC no era esférica, sino prismas pequeños (Figura 4.7) tal como lo asume el modelo (Pereira de Almeida *et al.*, 1997). El modelo cinético que mejor ajustó fue la función de Weibull, ya que arrojó el menor valor para el Criterio de Información de Akaike (AIC, por su sigla en inglés) y el mayor valor del Criterio de Selección del Modelo (MSC, por su sigla en inglés). El valor más pequeño de AIC y el mayor valor de MSC indica cuál es el modelo que mejor explica estadísticamente el proceso de disolución de un dado compuesto (Zhang *et al.*, 2010). La bondad del ajuste se visualiza claramente en la Figura 4.10, la cual muestra una excelente concordancia entre los valores experimentales y los predichos por la función de Weibul [curva generada por el programa *DDSolver* (Zhang *et al.*, 2010)].

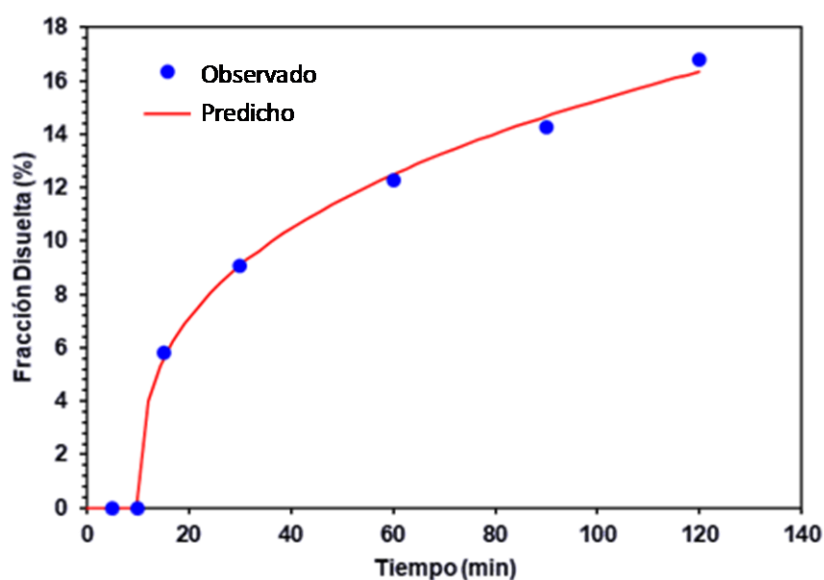


Figura 4.10. Perfil de disolución ajustado (Programa *DDSolver*, Zhang *et al.*, 2010) al modelo cinético de Weibull para los datos de disolución medios de los NC del p -NO₂-BSTHQ.

El ajuste al modelo de Weibull sugeriría que el mecanismo de disolución de los NC involucra disolución, difusión y procesos combinados limitados por una velocidad de disolución-difusión. Esto ya fue postulado para otros sistemas particulados que también han seguido la mencionada función (Barzegar-Halali *et al.*, 2008).

4.5.4 Evaluación del estado cristalino de los NC en estado de polvo seco

La evaluación de las características cristalinas de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ como polvo seco se realizó mediante PXRD y ATR, tal como se describe a continuación.

4.5.4.1 PXRD

La fricción y las fuerzas de colisión generadas entre las perlas de zirconio y las paredes del nanomolino, además de quebrar y reducir el tamaño de los cristales, pueden inducir transformaciones polimórficas en la sustancia a nanometrizarse, y también conducir a partículas con una fracción amorfa (Chogale *et al.*, 2016).

Se evaluó el estado cristalino de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco mediante PXRD y ATR, en comparación con la materia prima inicial. Esto fue con el fin de verificar que el aumento de la Sa en equilibrio y VD observado para los NC del *p*-NO₂-BSTHQ no se debía a un cambio en su estado polimórfico o a una disminución parcial o total de su cristalinidad. Cabe destacar que otra ventaja de los NC con respecto a otros sistemas potenciadores de la VD, como las dispersiones sólidas, es que en los NC se mantiene el estado cristalino inicial del fármaco. Por lo tanto, la mejora en la Sa y VD no se basa en la presencia de la forma amorfa de la sustancia, ya que los compuestos amorfizados suelen presentar una inestabilidad termodinámica a largo plazo (Hecq *et al.*, 2005).

La Figura 4.11 muestra los patrones de PXRD del *p*-NO₂-BSTHQ, del POL188, del MAN y el de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco. Como se aprecia en la Figura 4.11d, el patrón de polvos de los NC fue la suma de los patrones de PXRD de los componentes, lo cual indicó que no se producían interacciones no covalentes entre ninguno de los componentes. Asimismo, la presencia de las reflexiones características del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar (Figura 4.11a) en el patrón de polvo de los NC (Figura 4.11d), evidenció que la

nanomolienda y la liofilización no inducían a transformaciones polimórficas, ni provocaban la amorfización del compuesto.

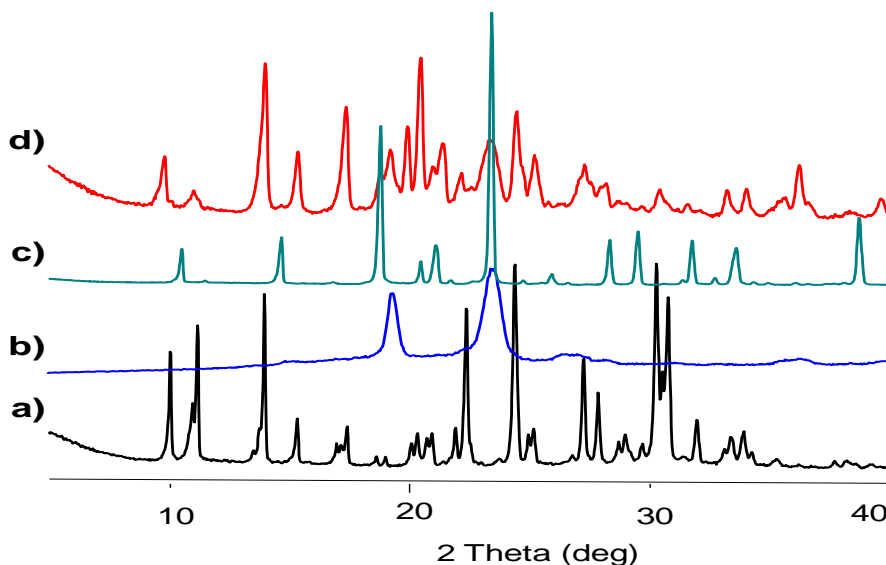


Figura 4.11. Patrones de PXRD de (a) *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar; (b) POL188; (c) MAN y (d) NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco.

4.5.4.2 ATR

A fin de complementar la información obtenida por PXRD, se compararon los espectros ATR del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar, del POL188 y del MAN con el de su NC del *p*-NO₂-BSTHQ (Figura 4.12). La ATR resulta una técnica analítica útil para la caracterización de fases cristalinas y amorfas, CC y NC. Debido a que permite obtener información sobre las interacciones intra e intermoleculares de una sustancia sin alterar su red cristalina o su desorden molecular. Esto sucede ya que las muestras no son compactadas como en la FTIR.

Como se aprecia en la Figura 4.12d, el espectro ATR de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco fue la suma de los espectros ATR del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar, POL188 y MAN (Figuras 4.12a-c), lo cual indicó que no se produjeron interacciones no covalentes entre ninguno de los componentes.

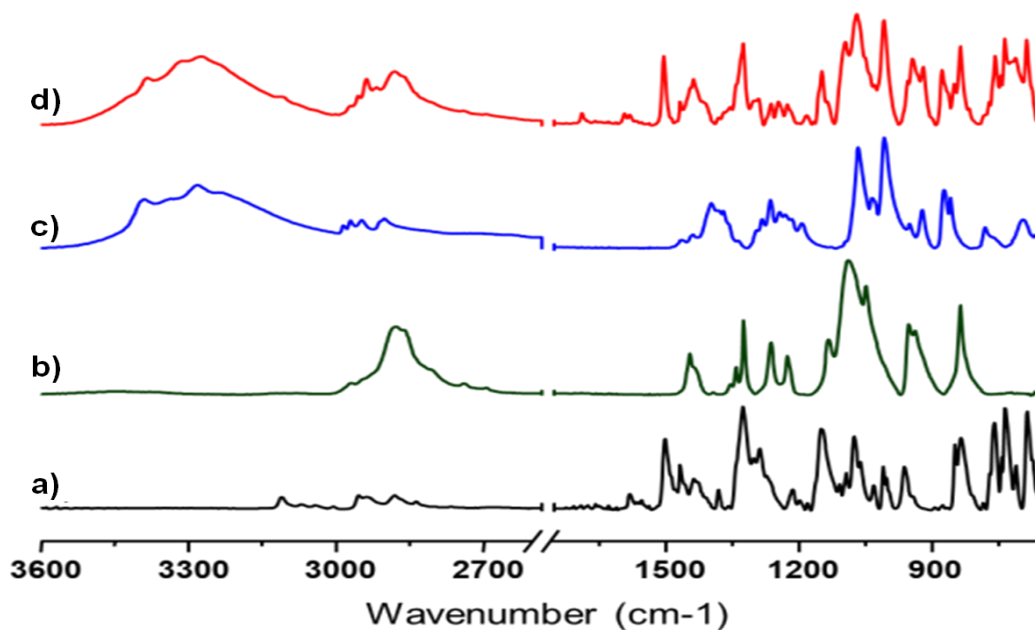


Figura 4.12. Espectros ATR de (a) *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar; (b) POL188; (c) MAN y (d) NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco.

Es de destacar que, el espectro ATR de los NC no mostró un ensanchamiento generalizado de las bandas de absorción. Esto se observa en los sólidos parcialmente cristalinos y amorfos, pues las moléculas están bajo la influencia de entornos locales aleatorios. Además, determina que las bandas de absorción de las vibraciones que interactúan fuertemente con el entorno se ensanchen. Ello indicó que la nanomolienda y liofilización no provocaron la amorfización de la muestra, en concordancia con lo mostrado por PXRD. Además, no se observaron desplazamientos para las bandas de absorción características del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar (Figuras 4.12a), lo cual evidenció que su estado polimórfico no había sufrido cambios durante la formación de los NC, y esta observación también fue consistente con lo indicado por la PXRD.

4.5.4.3 DSC y HSM

La DSC es una técnica muy útil durante los estudios de preformulación de IFA y NEQ porque permite conocer el comportamiento frente al calentamiento de muestras puras y mezclas, e inferir la ocurrencia de interacciones entre los excipientes y el compuesto en estudio. Pero, se debe tener siempre en cuenta que

dichas interacciones podrían ser inducidas durante el proceso de calentamiento DSC. Por lo cual una interacción al nivel molecular indicada por la DSC no es lo suficientemente fiable sin información difractométrica y espectroscópica.

En la Figura 4.13 se muestran las curvas DSC del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar, del POL188, del MAN, la MF equiponderal de los tres componentes (*p*-NO₂-BSTHQ-POL188-MAN_{MF}) y los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco. Las curvas DSC de cada uno de los componentes individuales (Figuras 4.13a-c) mostraron una única endoterma aguda de fusión situada a 118,1 (*p*-NO₂-BSTHQ, Te), 50,5 (POL188, Te) y 165,7 °C (MAN, Te). En cambio, las curvas DSC del *p*-NO₂-BSTHQ-POL188-MAN_{MF} (Figura 4.13d) y los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco (Figura 4.13e) mostraron dos endotermas. Estas se observaron a 50,1 (Te) y 165,0 °C (Te) en el caso de la MF, y a 45,0 (Te) y 164,1 °C (Te) para los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco. Vale mencionar, que las Te de las endotermas de la MF fueron coincidentes con las temperaturas de fusión del POL188 y el MAN, sugiriendo que estas se debían a la fusión del estabilizante y el MAN, respectivamente.

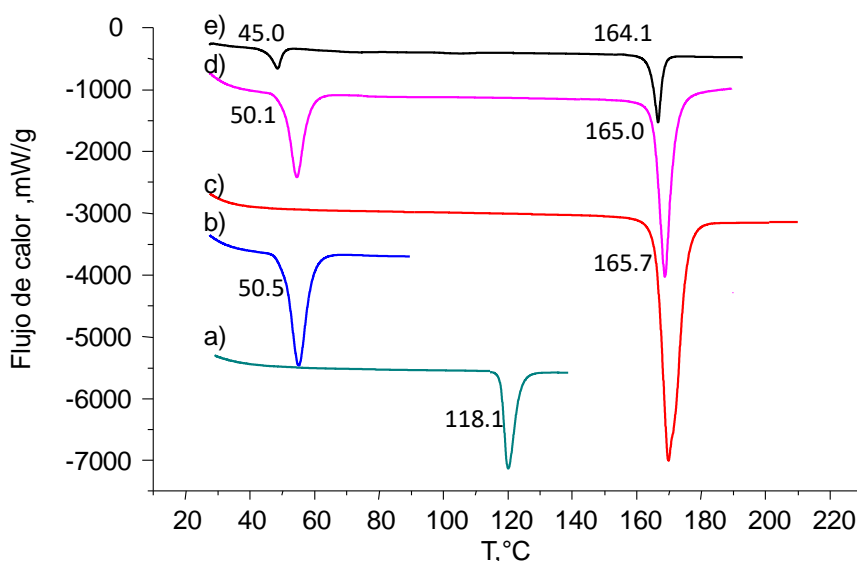


Figura 4.13. Curvas DSC ($\beta = 10$ °C/min., flujo de N₂= 50 mL/min.) de (a) *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar; (b) POL188; (c) MAN; (d) *p*-NO₂-BSTHQ-POL188-MAN_{MF} y (e) NC de *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco. Los valores consignados corresponden a las temperaturas de inicio extrapoladas (Te).

En el caso de los NC, las Te fueron un poco más bajas (Figura 4.13e) que en la MF (Figura 4.13d), en el POL188 (Figura 4.13b) y el MAN (Figura 4.13c) sin procesar. Esto puede explicarse considerando que el *p.f.* de las muestras con tamaños submicrónicos se desplazan a temperaturas inferiores, como consecuencia de la reducción del tamaño de los cristales (Medarević *et al.*, 2020).

La MF ternaria exhibió solo dos endotermas, en lugar de las tres esperadas. Un comportamiento similar se observó en los NC. A fin de interpretar el comportamiento térmico de ambas muestras se prepararon MF binarias del *p*-NO₂-BSTHQ con POL188 y con MAN, en proporciones 1:1 p/p. Estas se analizaron por HSM, comparando su comportamiento, frente al calentamiento, con la MF ternaria. Para ello, se colocó una pequeña porción de cada una de las muestras a ensayar de *p*-NO₂-BSTHQ-POL188_{MF} en diferentes portaobjetos y estos se cubrieron con un cubreobjetos. Para el *p*-NO₂-BSTHQ-POL188_{MF} se calentó desde 25 hasta 140 °C y, para la *p*-NO₂-BSTHQ-MAN_{MF} y la *p*-NO₂-BSTHQ-POL188-MAN_{MF}, desde 25 hasta 180 °C. El examen microscópico de la MF ternaria reveló que estaba constituida por una mezcla de partículas globulares, fibras transparentes y traslúcidas. La morfología de estas partículas fueron coincidentes con las del POL188, MAN y *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar, respectivamente. A los 51 °C, temperatura de fusión del POL188, se observó que las partículas globulares comenzaban a fundir y las prismáticas traslúcidas se comenzaban a solubilizar en la fase fundida. A los 55 °C solo quedó una mezcla de fase fundida con fibras transparentes, las cuales fundieron a 166°C, temperatura de fusión del MAN. Al continuar el calentamiento hasta los 180 °C, no se observaron cambios de color ni achicamiento de la fase fundida. Ello indicó que esta era estable hasta la temperatura alcanzada.

En el caso de la MF binaria *p*-NO₂-BSTHQ-POL188, el examen microscópico indicó que estaba constituida por una mezcla de fibras traslúcidas y partículas globulares, como era esperable para esta MF. A los 51 °C, se observó que las partículas globulares comenzaban a fundir y las prismáticas a solubilizarse en la fase fundida, terminando de desaparecer a los 55 °C. Al seguir calentando hasta 140 °C, no se observaron cambios de color, ni achicamiento de la fase fundida, lo cual evidenció que esta era estable hasta la temperatura alcanzada. Este resultado reveló que el *p*-NO₂-BSTHQ se solubilizaba en el POL188 fundido.

A su vez, el examen microscópico de la MF del *p*-NO₂-BSTHQ y del MAN, indicó que estaba constituida por fibras, algunas eran bien transparentes y otras más

traslúcidas. Cabe destacar que el MAN, era un sólido euhedro constituido por partículas con hábito columnar (fibras alargadas). Estas eran transparentes en contraparte con las de *p*-NO₂-BSTHQ que eran blancas-amarillentas translúcidas. A los 119 °C, se observó que algunas partículas comenzaban a fundir mientras que otras permanecían intactas. Al seguir calentando hasta aproximadamente 166 °C, el resto de las partículas comenzaron a fundir, terminando de hacerlo a ~167 °C. Al continuar el calentamiento hasta 180 °C, no se observaron cambios en la coloración de la fase fundida, lo cual indicó que esta no descomponía al calentarse hasta la temperatura alcanzada. Estos resultados evidenciaron la existencia de procesos de fusión. Estos ocurrían a las respectivas temperaturas de fusión de ambos componentes de la MF, es decir, el comportamiento típico de las MF binarias.

Los eventos térmicos antes descritos permitieron explicar la presencia de solo dos endotermas DSC en la MF ternaria, ya que la HSM reveló que el *p*-NO₂-BSTHQ se disuelve en el POL188 fundido; por ello, la curva DSC de la MF ternaria solo exhibe las endotermas de fusión del POL188 y el MAN, ya que estos no interactúan por efecto del calor. Por otra parte, la similitud en el comportamiento DSC de los NC en estado de polvo seco y de la *p*-NO₂-BSTHQ-POL188-MAN_{MF} indicó claramente que los NC se comportaban como una mezcla física. Estos resultados fueron consistentes con los datos PXRD y ATR, que habían indicado que el proceso de nanometrización no alteraba el estado polimórfico del *p*-NO₂-BSTHQ. Además, no se producían interacciones no covalentes entre los tres componentes.

4.6 Búsqueda de cocristales

Para la selección de los potenciales COF del *p*-NO₂-BSTHQ se tomaron en cuenta los grupos funcionales presentes en su molécula y su potencialidad para actuar como donores o aceptores de hidrógenos. El *p*-NO₂-BSTHQ (Figura 4.1) posee un grupo nitro y un grupo sulfona. El primero, es capaz de aceptar protones de grupos donores de hidrógeno [Y-H donde Y= O, N, C (Robinson *et al.*, 2000)] formando homo y heterosintones. El segundo, puede interactuar de manera no covalente con COF que contengan grupos donores de hidrógenos. Con esta información, se seleccionaron como COF GRAS, 4 ácidos carboxílicos (AB, PABA, SA y TRIP) y U. Como metodología de síntesis, se utilizó LAG. Al igual que con TNZ (Capítulo 3, Sección 3.4.2), como criterio inicial de formación de CC se utilizaron los

p.f. de las mezclas *p*-NO₂-BSTHQ-COF obtenidas. Además las muestras obtenidas se analizaron por DRIFT y PXR. D.

El análisis de las 5 muestras obtenidas (*p*-NO₂-BSTHQ-AB, *p*-NO₂-BSTHQ SA, *p*-NO₂-BSTHQ-PABA, *p*-NO₂-BSTHQ-TRIP y *p*-NO₂-BSTHQ-U) por las tres técnicas de caracterización, en comparación con las respectivas MF equimolares, indicó que estas no exhibían diferencias en sus *p.f.*, patrones de polvo PXR. D. y espectros DRIFT. Ello indicó que las muestras obtenidas representaban MF, no nuevas fases sólidas. Por tanto, se concluyó que el *p*-NO₂-BSTHQ, en las condiciones experimentales empleadas, no formaba CC ni eutéticos con los COF ensayados.

4.7 Conclusiones

El *p*-NO₂-BSTHQ es una NEQ que ha mostrado buena actividad *in vitro* frente al *T. cruzi*, *L. donovani* y *P. falciparum*, pero presenta muy baja Sa. Por ello, se buscó optimizarla mediante la aplicación de una técnica de nanometrización del tipo *top-down*, como la NAM. Esto, resultó efectivo para la preparación de NC del *p*-NO₂-BSTHQ. El TPM y el PDI confirmaron que la muestra está conformada por partículas homogéneas, dentro de la escala manométrica. Además, el potencial Z indicó que su estabilidad frente al almacenamiento es buena, prediciendo que podrá resistir la agregación.

El *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar mostró una Sa en equilibrio, a 37 °C, constante en el rango de pH 1,2 y 7,0. En cambio, sus NC mostraron una Sa mejorada, la cual resultó pH dependiente, con un valor máximo a pH 7,0; representando una mejora de 11,7 veces en la Sa del compuesto sin procesar. También, se comprobó que la nanometrización del *p*-NO₂-BSTHQ resultó útil para aumentar su VD. En efecto, los resultados de los estudios de disolución indicaron que los NC, en estado de polvo seco, incrementaron de manera significativa la VD, en comparación con la del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar. Por PXR. D. y ATR se determinó que el estado cristalino del compuesto se mantuvo durante el proceso de nanometrización. Por lo tanto, los incrementos en la Sa y VD no serían atribuibles a una amorfización de la muestra, sino a la obtención de NC. Además, la NEQ no interaccionó de manera no covalente con el estabilizante y el crioprotector. Los incrementos anteriormente mencionados fueron significativos considerando la escasa Sa, alta hidrofobicidad y nula VD en fluido gástrico simulado del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar

Los ensayos de cocrystalización indicaron que el *p*-NO₂-BSTHQ no tiene la capacidad de cocrystalizar con los COF ensayados, al menos bajo las condiciones experimentales probadas.

4.8 Referencias

- Afolabi, A.; Akinlabi, O.; Bilgili, E. Impact of process parameters on the breakage kinetics of poorly water-soluble drugs during wet stirred media milling: A microhydrodynamic view. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 51, 75–86. DOI:10.1016/j.ejps.2013.09.002
- Barzegar-Halali, M.; Adibikia, K.; Valizadeh, H.; Reza Sighi Shadbad, M. et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *J. Pharm Pharm Sci.* 2008,11,166-77. DOI:10.18433/j3d59t
- Becerra, C.M.; Guiñazú, N.; Hergert, L. Y.; Pellegrini, A.; Mazzieri, M.R.; Gea, S.; Albesa, I..In vitro activity of N-Benzenesulfonylbenzotriazole on Trypanosoma cruzi epimastigote and trypomastigote forms. *Exp. Parasitol.* 2012, 131, 57-62. DOI: 10.1016/j.exppara.2012.02.028
- Cheng, Z.; Lian, Y.; Kamal, Z.; Ma, X.; Chen, J.; Zhou, X.; et al. Nanocrystals Technology for Pharmaceutical Science. *Curr. Pharm. Des.* 2018, 24, 1-11. DOI: 10.2174/13816128246661805180824205
- Chogale, M.M.; Ghodake, V.N.; Patravale, V.B. Performance Parameters and Characterizations of Nanocrystals: A Brief Review. *Pharmaceutics.* 2016, 8, 1-18. DOI:10.3390/pharmaceutics803002
- Choi, J. V.; Yoo, J.Y.; Kwak, H. S.; Nam, B.U.; Lee, J. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. *Curr. Appl. Phys.* 2005, 5, 472-74. DOI: 10.1016/j.cap.2005.01.012
- Cooke, M.V.; Malvacio, I.; Peláez, W.J.; Pepino, A.J.; Mazzieri, M.R.; Argüello, G.A.TD-DFT calculations of UV absorption bands and their intensities in the spectra of some tetrahydroquinolines.. *RSC Adv.*, 2015, 5, 26255–62. DOI: 10.1039/c5ra00249d.
- Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 13, 123–33. DOI 10.1016/S0928-0987(01)00095-1
- Farjadian. F.; Ghasemi, A.; Gohari, O.; Roointan, A.; Karimi, M.; Hamblin, M.R. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine.* 2019, 14, 93-126. DOI: 10.2217/nnm-2018-0120.
- Hecq, J.; Deleers, M.; Fanara, D.; Vranckx, H.; Amighi, K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int. J. Pharm.* 2005, 299, 167- 77. DOI:10.1016/j.ijpharm.2005.05.014
- Hergert, L.Y.; Nieto, M.J.; Becerra, M. C.; Albesa, I.; Mazzieri, M.R. Synthesis of N-Benzenesulfonylbenzotriazole Derivatives and Evaluation of their Antimicrobial Activity. *Lett. Drug. Des. Discov.* 2008, 5, 313-18. DOI: 10.2174/157018008784912108
- Hunter, R. J. Zeta potential, In: Colloid Science: Principles and Applications. Academic Press, UK. 1988.

- Kakran, M.; Shegokar, R.; Gopal Sahoo, N.; Al Shaal, L.; Li, L.; Müller, R.H. Fabrication of quercetin nanocrystals: Comparison of different methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012, 80, 0–121. DOI:10.1016/j.ejpb.2011.08.006
- Komrovsky, F. Tesis Doctoral: Contribuciones de las propiedades del estado sólido al diseño y desarrollo de bencenosulfonil derivados de heterociclos [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas]. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 2014.
- Komrovsky, F.; Sperandeo, N.R.; Vera, D.M.A.; Caira, M.R.; Mazzieri, M.R. X-ray, DFT, FTIR and thermal study of the antimicrobial N-benzenesulfonyl-1H-1,2,3-benzotriazole. *J.Mol. Struct.* 2018, 1164, 200–08. DOI: 10.1016/j.molstruc.2018.03.012
- Loh, Z.H.; Samanta, A.K.; Sia Heng, P.W. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian J. of Pharm. Sci.* 2014, 10, 255–274. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.12.006
- Medarević, D.; Ibrić, S.; Vardaka, E.; Mitrić, M.; Nikolakakis, I.; Kachrimanis, K. Insight into the Formation of Glimepiride Nanocrystals by Wet Media Milling. *Pharmaceutics.* 2020, 12, 1-17. DOI: 10.3390/pharmaceutics12010053
- Malamatari, M.; Taylor, K.M.G.; Malamataris, S.; Douroumis, D. Kachrimanis, K. Pharmaceutical nanocrystals: Production by wet milling and applications. *Drug Discov. Today.* 2018, 23, 534-547. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.01.016
- Martínez, S.M.; Miana, G.E.; Albesa, I.; Mazzieri, M.R.; Becerra, M.C. Evaluation of Antibacterial Activity and Reactive Species Generation of N-benzenesulfonyl Derivatives of Heterocycles. *Chem. Pharm. Bull.* 2016, 64, 135-141. DOI: 10.1248/cpb.c15-00682
- Merisko-Liversidge, E.; Liversidge, G.G.; Cooper, E.R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003, 18, 113-20. DOI: 10.1016/s0928-0987(02)00251-8
- Miana, G.E. Tesis Doctoral: Búsqueda de compuestos anti-Trypanosoma cruzi a partir de una quimioteca de bencenosulfonilos de heterociclos. [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas]. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 2015.
- Miana, G.E.; Ribone, S.R.; Vera, D.M.A.; Mazzieri, M.R.; Quevedo, M.A. Design, synthesis and molecular docking studies of novel N-arylsulfonyl-benzimidazoles with anti Trypanosoma cruzi activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 165, 1–10. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.013
- Murdande, Sharad B.; Pikal, Michael J.; Shanker, Ravi M.; Bogner, Robin H. Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: Challenges in measurement. *Pharm. Dev. Technol.* 2011, 16, 187–200. DOI:10.3109/10837451003774377
- Olusanmi, D.; Jayawickrama, D.; Bu, D.; McGeorge, G.; Sailes, H.; Kelleher, J.; *et al.* A control strategy for bioavailability enhancement by size reduction: Effect of micronisation conditions on the bulk, surface and blending characteristics of an active pharmaceutical ingredient. *Powder Technol.* 2014, 258, 222-33. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.03.032

- Pagliero, R.J.; Lusvarghi, S.; Pierini, A.; Brum, R.; Mazzieri, M.R. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 142-50. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.11.010
- Pagliero, R.J.; Pierini, A.; Brun, R.; Mazzieri, M. R. Design, synthesis and 3-D characterization of 1-benzenesulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines as lead scaffold for antiparasitic drug. *Lett. Drug. Des. Discov.* 2010, 7 (6), 461-470. DOI: 10.2174/157018010791306614
- Pagliero, R.J.; Kaiser, M.; Brun, R.; Nieto, M.J.; Mazzieri, M.R. Lead selection of antiparasitic compounds from a focused library of benzenesulfonyl derivatives of heterocycles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, 27, 3945–49. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.07.081
- Pagliero, J.R.; Mercado, R.; McCracken, V.; Mazzieri, M.R., Nieto, J.M. Rapid and Facile Synthesis of N-Benzenesulfonyl Derivatives of Heterocycles and their Antimicrobial Properties. *Lett. Drug. Des. Discov.* 2011, 8, 778-91. DOI: 10.2174/157018011797200803
- Paredes, A.J. Nanocristales de albendazol obtenidos por homogeneización de alta presión y secado por aspersión: diseño, optimización y caracterización *in vitro /in vivo*. [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas]. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina. 2016.
- Pereira de Almeida, L.; Simões, S.; Brito, P.; Portugal, A.; Figueiredo, M. Modeling Dissolution of Sparingly Soluble Multisized Powders. *J.Pharm. Sci.* 1997, 86, 726-32. DOI 10.1021/js960417w
- Rahim, H.; Sadiq, A.; Khan, S.; Khan, M.A.; Shah, S.M.H.; Hussain, Z.; *et al.* Aceclofenac nanocrystals with enhanced *in vitro*, *in vivo* performance: formulation optimization, characterization, analgesic and acute toxicity studies. *Drug Des Devel Ther.* 2017,11, 2443-52. DOI: 10.2147/DDDT.S140626.
- Rojas-Aguirre, Y.; Castillo, I.; Hernández D.J.; Noguera-Torres B.; Márquez-Navarro A.; Villalobos J.C.; *et al.* Diversity in the supramolecular interactions of 5,6-dichloro-2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole with modified cyclodextrins: Implications for physicochemical properties and antiparasitic activity. *Carbohyd Polym.* 2012, 87, 471-79. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.009
- Romero, G.B.; Keck, C.M., Müller, R.H. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production. *Int. J. Pharm.* 2016, 501, 236–44. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.11.047
- Robinson, J.M.A.; Philp, D.; Harris, K.D.M.; Kariuki, B.M. Weak interactions in crystal engineering—understanding the recognition properties of the nitro group. *New J. Chem.* 2000, 24, 799-806. DOI: 10.1039/B004086J
- Rutwij, A.D.; Morris, M.E. Novel high/low solubility classification methods for new molecular entities. *Int. J. Pharm.* 2016, 511, 111–26. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.06.060 0378-5173/ã 2016
- World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Geneva, Switzerland. 2021. [Consultado: 21 de junio 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- World Health Organization (WHO). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Geneva, Switzerland. 2021. [Consultado: 21 de junio 2021]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Yang, M.; Gong, W.; Wang, Y.; Shan, L.; Li Y.; Gao, C. Bioavailability Improvement Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs Based on the Supersaturation Mechanism: An Update. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2016, 19, 208-25. DOI: 10.18433/J3W904.

Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: an Add-In program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS J.* 2010, 12, 263–71. DOI:10.1208/s12248-010-9185-1

Capítulo 5

5.1 Conclusiones generales

5.2 Proyecciones

5

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

5.1 Conclusiones generales

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue obtener nuevas formas sólidas multicomponentes y nanoformulaciones para la optimización de propiedades biofarmacéuticas y fisicoquímicas de un IFA y una NEQ, ambos con actividad antiparasitaria. Para estos fines, se investigó la capacidad de cocrystalizar del TNZ y se prepararon y caracterizaron NC del *p*-NO₂-BSTHQ.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, permitieron llegar a las conclusiones que se describen a continuación.

El TNZ es capaz de interaccionar de manera no covalente con ácidos carboxílicos y amidas GRAS, mediante LAG. Utilizando esta metodología se obtuvieron con éxito cinco nuevas formas sólidas multicomponentes de este IFA. En efecto, los datos de difracción de rayos X, espectroscópicos y térmicos obtenidos revelaron que el TNZ cocrystalizó con tres ácidos carboxílicos (PABA, SA y CA). Además, formó eutécticos binarios con otro ácido carboxílico (SUC) y una amida (NA). Asimismo, se comprobó que mediante la CRIS, el TNZ cocrystalizó con PABA y SA, y las fases obtenidas son isoestructurales a las sintetizadas por LAG. También, la CRIS resultó útil para la preparación de monocristales de TNZ-PABA y TNZ-SA, cuyas estructuras cristalinas pudieron ser resueltas a través de SCXRD. Cabe destacar, que dichas estructuras cocrystalinas fueron depositadas en la CSD y constituyeron las primeras para este IFA. La resolución de las estructuras cristalinas mediante SCXRD es fundamental en el desarrollo de CC farmacéuticos. Ello se debe a que permite probar su existencia, mejorar la comprensión fundamental de las arquitecturas supramoleculares y allanar el camino hacia la obtención de nuevas

formas sólidas con las propiedades deseadas. El análisis de las estructuras cristalinas de TNZ-PABA y TNZ-SA reveló que eran CC y que sus unidades cocrystalinas estaban mantenidas por un enlace de hidrógeno lineal fuerte del tipo COO–H...N3 (imidazol) que da lugar al mismo sintón azol-ácido carboxílico. Sin embargo, sus estructuras supramoleculares resultaron completamente diferentes. El TNZ-SA es un CC no solvatado, mientras que el TNZ-PABA presenta solventes ubicados en canales y además redes de enlaces de hidrógeno más extensas, debido al grupo amino del PABA.

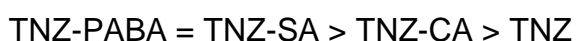
La comparación de sus espectros de ^{13}C CP/MAS y DRIFT de TNZ-PABA y de TNZ-SA con los de TNZ-CA, junto con los datos de SCXRD de los dos primeros, permitió postular que, este último, también sería un CC. Además, ante la ausencia de monocristales las la SSNMR y la FTIR, como técnicas analíticas complementarias, resultaron útiles para evidenciar la existencia de una interacción no covalente.

La cocrystalización de TNZ con PABA, SA y CA brindó una evidencia adicional sobre las altas probabilidades estadísticas de formación del heterosintón supramolecular azol-ácido carboxílico. Sin embargo, dado que TNZ no cocrystalizó con SUC, ARG, PRO y TRIP, resulta evidente que otros factores condicionan la formación de un CC entre un IFA y un COF.

El análisis por DSC y TG de las 5 nuevas formas sólidas obtenidas, en particular el comportamiento del CC de TNZ-SA y de las 5 MF binarias, arrojó datos muy interesantes. En el caso de TNZ-SA, ambas técnicas revelaron la posible existencia de al menos dos polimorfos para dicho CC. Por otra parte, las 5 MF mostraron comportamientos típicos de compuestos formadores de CC y eutécticos. Esto podría utilizarse para predecir mediante DSC la formación de nuevos CC y eutécticos de este IFA.

El estudio de solubilidad reveló que el TNZ-CA incrementó su Sa 1,3 veces respecto a la de TNZ puro. Sin embargo, este comportamiento no se vio reflejado en el resto de las nuevas formas sólidas de este IFA.

La cocrystalización fue una estrategia adecuada para superar la inestabilidad frente a la luz en estado sólido de TNZ. Los estudios realizados arrojaron el siguiente orden de fotoestabilidad:



En los estudios llevados a cabo sobre la NEQ, el *p*-NO₂-BSTHQ, la NAM demostró ser una estrategia adecuada para la obtención de NC estabilizados en estado de polvo seco. Tras su redispersión en agua Milli Q®, dichos NC, lograron mejorar de manera significativa la Sa en equilibrio y VD del *p*-NO₂-BSTHQ. En efecto, los estudios de Sa en equilibrio en el rango de pH ensayado indicaron que los NC presentaron una Sa 11,7 veces superior a la del *p*-NO₂-BSTHQ sin procesar. Un comportamiento similar, se registró en las mediciones de la VD de los NC de la NEQ. Asimismo, por estudios de PXR, ATR y DSC, se pudo determinar que las mejoras en la Sa en equilibrio y VD de los NC no fueron ocasionadas por un cambio en la cristalinidad y el estado polimórfico del *p*-NO₂-BSTHQ, o la ocurrencia de interacciones no covalentes de este con el estabilizante y el crioprotector. Los incrementos en la Sa en equilibrio y VD alcanzados con los NC fueron significativos, teniendo en cuenta la escasa Sa, alta hidrofobicidad y nula VD en fluido gástrico simulado del *p*-NO₂-BSTHQ.

Los ensayos de cocrystalización llevados a cabo, como estrategia alternativa para la mejora de la Sa del *p*-NO₂-BSTHQ, indicaron que este compuesto no tiene la capacidad de cocrystalizar con los COF ensayados, al menos bajo las condiciones experimentales empleadas.

Los resultados presentados aportan información original y relevante en relación a la optimización de las propiedades biofarmacéuticas y fisicoquímicas tanto de IFA conocidos como de NEQ. La obtención de nuevas formas sólidas de compuestos con actividad antiparasitaria aporta estrategias prometedoras para mejorar el tratamiento de las ETD.

5.2 Proyecciones

Si bien los resultados antes descritos resultan muy prometedores, y permitieron alcanzar los objetivos planteados, restan todavía realizar evaluaciones que no se han abordado en este trabajo de Tesis Doctoral. En este sentido, se proponen las siguientes actividades futuras:

- ✓ Realizar ensayos microbiológicos a fin de evaluar la eficacia de los CC del TNZ.

- ✓ Evaluar la velocidad de disolución de los CC del TNZ en medios de disolución que simulen fluidos gastrointestinales.
- ✓ Estudiar el polimorfismo farmacéutico del CC del TNZ con SA, la cual representa un área de investigación novedosa y de creciente interés científico.
- ✓ Preparar formas de dosificación orales (comprimidos) que contengan TNZ-PABA o TNZ-SA y evaluar el efecto de la luz UV-Visible, comparativamente con comprimidos comerciales de TNZ, sobre su fotoestabilidad.
- ✓ Ensayar nuevos COF GRAS que puedan conducir a nuevos cocristales y eutécticos de TNZ que logren mejorar su solubilidad acuosa y aumenten su fotoestabilidad en estado sólido por intervalos de tiempo prolongados.
- ✓ Estudiar la estabilidad física de los de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ.
- ✓ Realizar ensayos microbiológicos a fin de evaluar la actividad antiparasitaria y antibacteriana de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ.
- ✓ Probar nuevas técnicas de nanometrización y nuevos agentes estabilizantes con miras a obtener NC que logren un mayor incremento en la S en equilibrio y VD del *p*-NO₂-BSTHQ.

Producción Científica

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Trabajos de investigación publicados, cuyos resultados están incluidos en el presente manuscrito

- **Fandiño, O. E.;** Reviglio, L.; Linck, Y. G.; Monti, G. A.; Marcos Valdez, M. M.; Faudone, S. N.; Caira, M.R. and Sperandeo, N. R. Novel Cocrystals and Eutectics of the Antiprotozoal Tinidazole: Mechanochemical Synthesis, Cocrystallization, and Characterization. *Cryst. Growth Des.* 2020, 20, 2930-2942. DOI:10.1021/acs.cgd.9b01435

Trabajos de investigación presentados en reuniones científicas, cuyos resultados están incluidos en el presente manuscrito

- **Fandiño, O.E.;** Reviglio, L.; Garro Link, Y.; Monti, G.; Faudone, S.N. y Sperandeo, N.R. “PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMAS SÓLIDAS ALTERNATIVAS DE ANTIPARASITARIOS: TINIDAZOL”. 1° Reunión Conjunta, 5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) y 50° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), del 14 al 16 de noviembre 2018, Ciudad de La Punta, San Luis, Argentina.
- **Fandiño, O.E.;** Faudone S.N.; Mazzieri M.R. y Sperandeo N.R. “SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COCRISTALES DE P-NITRO-N-BENCENOSULFONIL-1,2,3,4-TETRAHIDROQUINOLINA”. XIV Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía, 31 de octubre al 2 de Noviembre de 2018, Centro Atómico Constituyentes, Provincia de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- **Fandiño, O.E.;** Marcos Valdez, M.M.; Paredes, A.J.; Camacho, N.; Palma, S.D.; González Rodríguez, M.L.; Gines J.M.; Rabasco Alvarez, M.A. y Sperandeo, N.R. “SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCRISTALES DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA: P-NITRO-BENCENOSULFONIL-1,2,3,4-TETRAHIDROQUINOLINA.” XVI Congreso y V Congreso Internacional de Farmacia y Bioquímica Industrial y XIV Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial (JORFYBI), 10 al 13 de septiembre de 2019, Centro Costa Salguero, Buenos Aires, Argentina.
- **Fandiño, O.E.;** Marcos Valdez, M.M.; Paredes, A.J.; Camacho, N.; González Rodríguez, M.L.; Gines, J.M.; Rabasco Alvarez, A.M. y Palma, S.D. “EVALUACIÓN DE SOLUBILIDAD ACUOSA Y VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN DE NANOCRISTALES DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA: P-NITRO-BENCENOSULFONIL-1,2,3,4-

TETRAHIDROQUINOLINA”. PRISMA, Asociación para la Diversidad Afectivo-Sexual y de Género en Ciencia, Tecnología e Innovación. Conference. Science for Diversity. Diversity for Science. Facultad de Ciencias Matemáticas de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España (formato virtual). 16 de Noviembre 2020.

- Reviglio, A.L.; Garro Linck, Y.; **Fandiño, O.E.**; Costa, R.; Sperandeo, N.R.; Cuffini, S.; Monti, G. ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE RMN EN ESTADO SÓLIDO Y DFT. IV Taller de Resonancia Magnética. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 2018.

Trabajos de investigación presentados en reuniones científicas, cuyos resultados no están incluidos en el presente manuscrito

- **Fandiño, O.E.**; Bruno, F.P.; Mazzieri M.R. y Sperandeo N.R. “PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS BINARIAS Y TERNARIAS DE TIXOZANIDA”. Congreso iberoamericano de ciencias farmacéuticas (COIFA), 2 al 6 de noviembre de 2015, Pabellón Argentina, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.
- **Fandiño, O.E.**; Bruno, F.P.; Mazzieri M.R. y Sperandeo N.R. “PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NEW ALTERNATIVE SOLID FORMS OF TIZOXANIDE”. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 27 y 28 de octubre 2016, Rosario, Argentina
- Marcos Valdez, M.M.; Bruno, F.P.; **Fandiño, O.E.**; Narda, G. y Sperandeo, N.R. “INVESTIGATION OF THE COCRYSTALLIZATION AND COAMORPHIZATION OF ALBENDAZOLE WITH TRYPTOPHAN”. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 27 y 28 de octubre 2016, Rosario, Argentina.
- Bruno, F.P.; Trillini, M., **Fandiño, O.E.**; Sperandeo, N.R. “COMPARING THE POLYMORPHIC STATE AND DISSOLUTION PROFILES OF CLOPIDOGREL BISULPHATE SIMILAR PRODUCTS OF THE ARGENTINIAN MARKET. PART 1”. Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 27 y 28 de octubre 2016, Rosario, Argentina.
- **Fandiño, O.E.**; Mazzieri, M.R. y Sperandeo N.R. “PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DISPERSIONES SÓLIDAS DE 2° Y 3° GENERACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTIMICROBIANOS: P-NITRO- N-BENCENOSULFONIL-1, 2, 3,4-TETRAHIDROQUINOLINA”. EXPOFYBI, exposición y congreso internacional de farmacia y bioquímica industrial, 9 de Agosto de 2017, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Marcos Valdez, M.M.; **Fandiño O.E.**; Bruno, F.P.; Narda, G. y Sperandeo N.R. “INVESTIGACIÓN DE LA COAMORFIZACIÓN DE ALBENDAZOL Y ARGININA MEDIANTE SONOQUÍMICA Y LIOFILIZACIÓN”. XIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía, 1 al 3 de Noviembre de 2017, Rectorado de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

- Marcos Valdez, M.M.; **Fandiño, O.E.**; Faudone, S.N. y Sperandeo N.R. “INVESTIGACIÓN DE LA COCRISTALIZACIÓN DE CLOBAZAM CON UREA”. 1° Reunión Conjunta, 5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa) y 50° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), del 14 al 16 de noviembre 2018, Ciudad de La Punta, San Luis, Argentina.
- Marcos Valdez, M.M.; **Fandiño O.E.**; Faudone, S.N. y Sperandeo, N.R. “ESTUDIO DEL ESTADO SÓLIDO DE NUEVOS AGENTES ANTIPARASITARIOS: ACETAMIDOBENCENOSULFONILO DE BENZIMIDAZOL.” XVI Congreso y V Congreso Internacional de Farmacia y Bioquímica Industrial y XIV Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial (JORFYBI), 10 al 13 de septiembre de 2019, Centro Costa Salguero, Buenos Aires, Argentina.
- Marcos Valdez, M.M.; Sanchez, J.; Faudone, S.N.; **Fandiño, O.E.** y Sperandeo, N.R. “APLICACIÓN DE LA CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) Y EL ANÁLISIS DINÁMICO MECÁNICO (DMA) PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO AMORFO DE ANTIEPILÉPTICOS.” XVI Congreso y V Congreso Internacional de Farmacia y Bioquímica Industrial y XIV Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial (JORFYBI), 10 al 13 de septiembre de 2019, Centro Costa Salguero, Buenos Aires, Argentina.
- Avila, C.D.; **Fandiño, O.E.**; Sperandeo, N.R.; Mazzieri, M.R.; Pinto Vitorino, G. “ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE NORFLOXACINO Y ÁCIDO CÍTRICO EN EL ESTADO SÓLIDO”. I Encuentro Iberoamericano de Investigación en Ciencias Farmacéuticas XIV Jornadas Día del Farmacéutico 2019, 1 y 2 de noviembre de 2019, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Anexo

1

Tabla S1. Datos del cristal, parámetros relacionados a la colecta de datos y detalles del refinamiento de TNZ-PABA_{CRIS-fBuOH}.

Formula molecular	$C_8H_{13}N_3O_4S \cdot C_7H_7NO_2 \cdot 0.4(C_4H_{10}O)$
Masa de la formula (g mol ⁻¹)	414.06
Dimensiones cristalinas (mm)	0.27, 0.15, 0.14
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/n$ (No. 14)
a (Å), b (Å), c (Å), β (°), V (Å ³)	5.8529(4), 14.2198(11), 24.304(2), 90.179(2), 2022.8(3)
Z	4
D_c (g cm ⁻³)	1.360
$F000$	875
(mm ⁻¹)	0.203
(Å)	0.71073
T (K)	173(2)
$2\theta_{max}$ (°)	55.2
Reflexiones medidas/unicas/ R_{int}	28762/4688/ 0.0486
Reflexiones con $I > 2\sigma(I)$	3764
Parámetros/restricciones	263/9
$R1$, $wR2$, [$I > 2\sigma(I)$]	0.0580, 0.1783
Bondad de ajuste (S)	1.046
CCDC N°	1960455

Tabla S2. Datos del cristal, parámetros relacionados a la colecta de datos y detalles del refinamiento del cocrystal TNZ-SA.

Formula molecular	$C_8H_{13}N_3O_4S \cdot C_7H_6O_3$
Masa de la formula (g mol ⁻¹)	385.39
Dimensiones cristalinas (mm)	0.42, 0.29, 0.18
Sistema cristalino	Monoclinico
Grupo espacial	$P2_1/c$ (No. 14)
a (Å), b (Å), c (Å), β (°), V (Å ³)	5.7785(2), 14.5717(6), 20.6134(8), 92.3510(10), 1734.24(12)
Z	4
D_c (g cm ⁻³)	1.476
$F000$	808
(mm ⁻¹)	0.231
(Å)	0.71073
T (K)	173(2)
$2\theta_{max}$ (°)	56.8
Reflexiones medidas/unicas/ R_{int}	28676/4347/0.0335
Reflexiones con $I > 2\sigma(I)$	3738
Parámetros/restricciones	239/0
$R1$, $wR2$, [$I > 2\sigma(I)$]	0.0332, 0.0880
Bondad de ajuste (S)	1.045
CCDC N°	1960462

Figura S1. Espectros de ^1H NMR (CDCl_3) de: (a) $\text{TNZ-PABA}_{\text{CRIS-t-BuOH}}$, (b) CDCl_3 adicionado de unas gotas de acetona y (c) $\text{TNZ-PABA}_{\text{CRIS-tBU}}$ luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente en el tubo de NMR destapado.

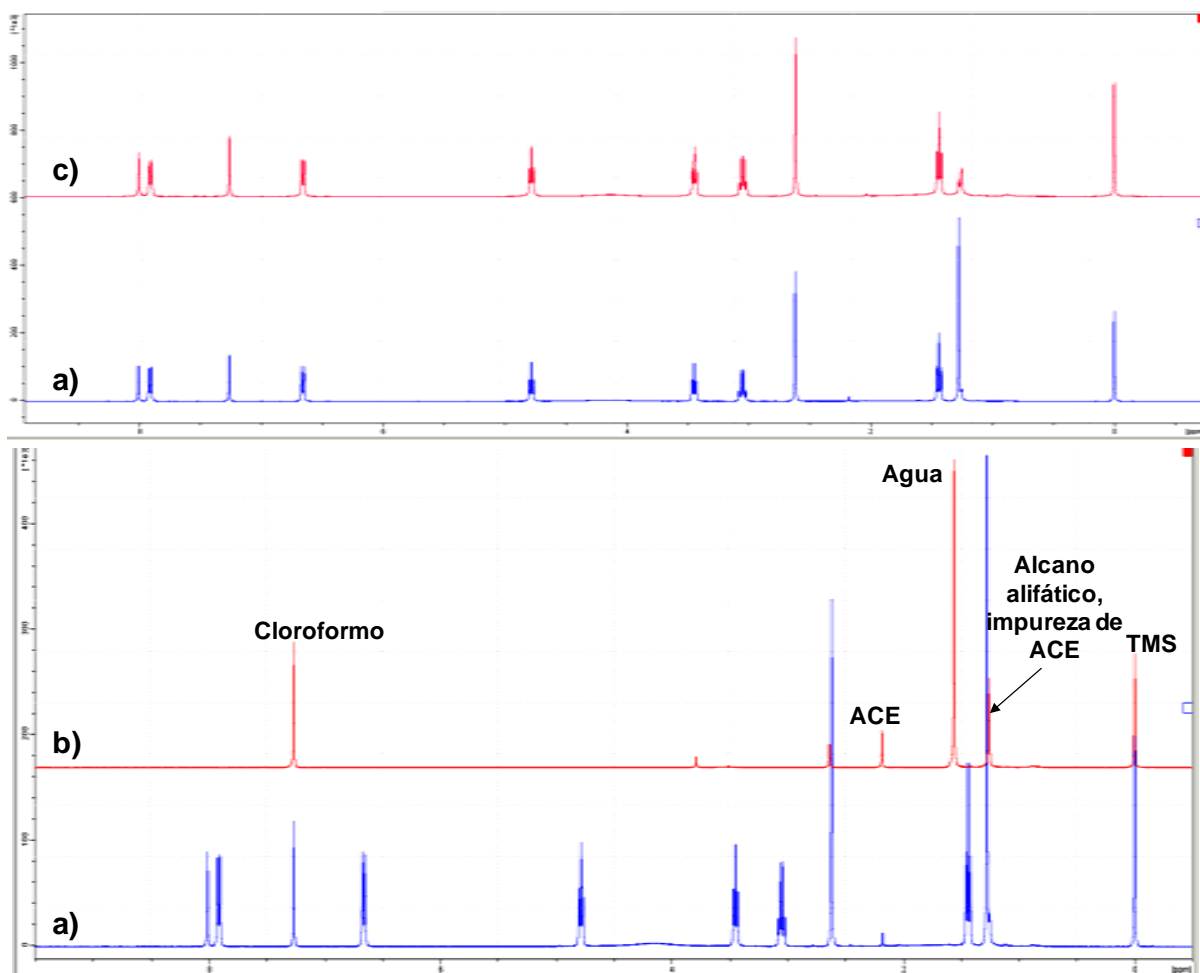


Tabla S3. Desplazamientos químicos (ppm) de ^{13}C CP/MAS de: TNZ, PABA, TNZ-PABA_{MF}, TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-PABA_{CRIS-ACE}.

N° de átomo de carbono	TNZ	PABA	TNZ-PABA _{MF}	TNZ-PABA _{LAG}	TNZ-PABA _{CRIS-ACE}
1	155.3	-	155.4	152.3	152.2
2	135.0	-	135.1	134.2	134.2
3	138.3	-	138.3	136.9	136.8
4	39.5	-	39.6	40.3	40.2
5	47.0	-	47.0	48.6	48.8
6	47.0	-	47.0	46.5	46.7
7	8.8	-	8.9	8.0	7.0
8	15.9	-	16.0/13.9 ^a	13.9	13.6
9	-	116.7	116.6/119.5 ^a	119.6	119.4
10	-	131.2	131.1/133.0 ^a	133.0	132.9
11	-	115.7	115.7	114.2	114.0
12	-	152.9	152.7	154.1	154.2
13	-	112.1	112.3/113.2 ^a	113.1	113.1
14	-	131.2	131.1/133.0 ^a	133.0	133.0
15	-	174.2	174.2/170.2 ^a	170.3	170.2

^aSeñal de baja intensidad, que indica la presencia de una cantidad menor de CC TNZ-PABA en la MF, que se formó durante el experimento de SSRMN. + Átomos de carbono del EtOH. # Átomos de carbono de ACE.

Tabla S4. Desplazamientos químicos (ppm) ^{13}C CP/MAS de: TNZ, SA, TNZ-SA_{MF}, TNZ-SA_{LAG} y TNZ-SA_{CRIS-ETOH}.

N° de Átomo de carbono	TNZ	SA	MF	TNZ-SA _{LAG}	TNZ-SA _{CRIS-ETOH}
1	155.3	-	155.3	152.7	152.7
2	135.0	-	135.0	135.0	135.0
3	138.3	-	138.3	138.3	138.3
4	39.5	-	39.5	38.6	38.6
5	47.0	-	47.0	52.0	52.1
6	47.0	-	47.0	48.5	48.5
7	8.8	-	8.8	5.0	5.0
8	15.9	-	15.9	13.6	13.6
16	-	112.2	112.2	113.9	114.0
17	-	162.3	162.3	163.3	163.3
18	-	118.5	118.5	117.0	117.0
19	-	138.7	138.7	135.6	135.6
20	-	121.3	121.3	119.0	119.0
21	-	133.4	133.4	129.5	129.6
22	-	176.3	176.3	170.6	170.6

Tabla S5. Desplazamientos químicos (ppm) ^{13}C CP/MAS de: TNZ, CA, TNZ-CA_{MF} y TNZ-CA_{LAG}

N° Átomo de carbono	TNZ	CIT	TNZ-CA _{MF}	TNZ-CA _{LAG}
1	155.3	-	155.3	152.7
2	135.0	-	135.0	133.3
3	138.3	-	138.3	137.1
4	39.5	-	39.5	40.5
5	47.0	-	47.0	48.9
6	47.0	-	47.0	47.7
7	8.8	-	8.8	8.8
8	15.9	-	15.9	14.0
23	-	174.9	174.9	173.9
23'	-	176.4	176.4	173.9
24	-	43.1	43.1	44.6
24'	-	44.1	44.1	43.1
25	-	72.1	72.1	74.0
26	-	179.4	179.4	178.9

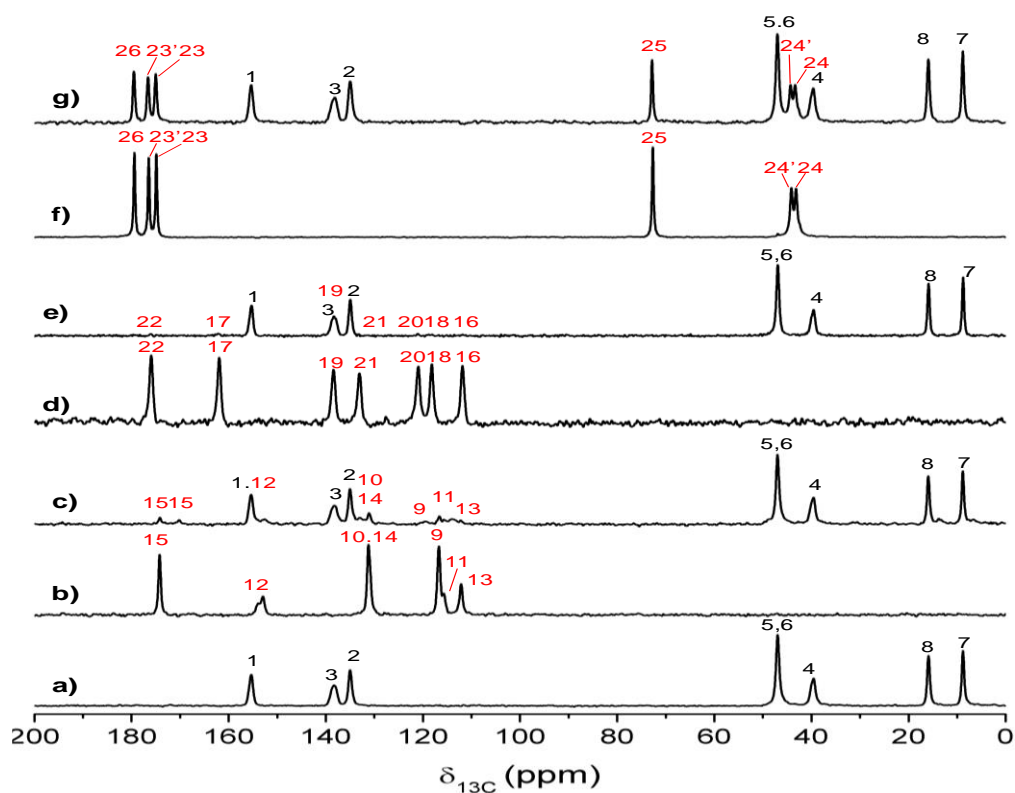
Figura S2. Espectros ^{13}C CP/MAS de: (a) TNZ, (b) PABA, (c) TNZ-PABA_{MF}, (d) SA, (e) TNZ-SA_{MF}, (f) CA y (g) TNZ-CA_{MF}.

Figura S3. Espectros ^{13}C CP/MAS de: (a) TNZ, (b) SUC, (c) TNZ-SUC_{MF} y (d) TNZ-SUC_{LAG}.

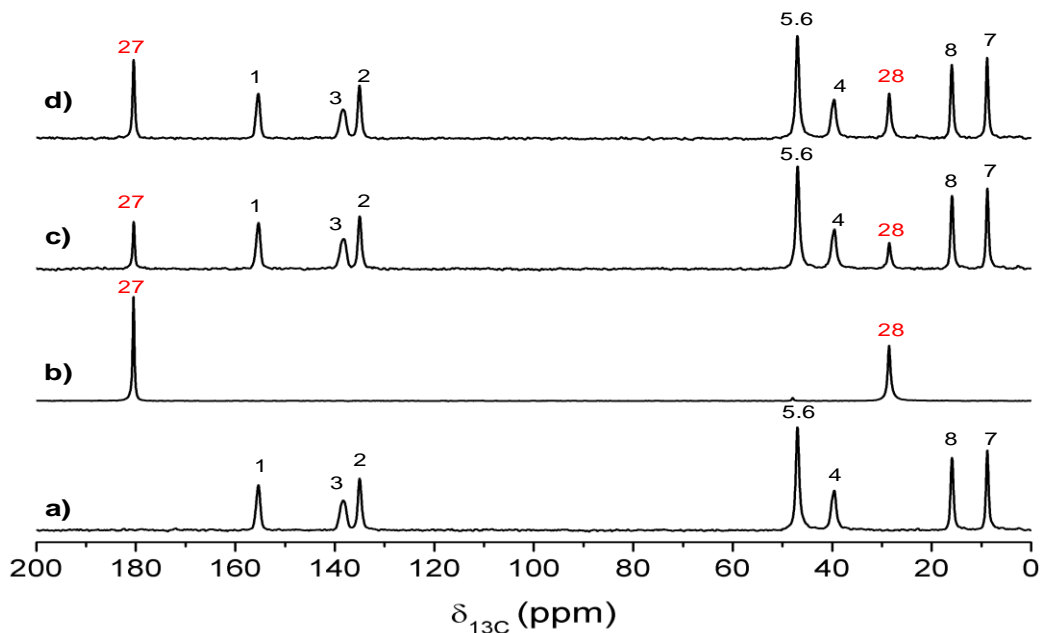


Figura S4. Espectros ^{13}C CP/MAS de: (a) TNZ, (b) NA, (c) TNZ-NA_{MF} y (d) TNZ-NA_{LAG}.

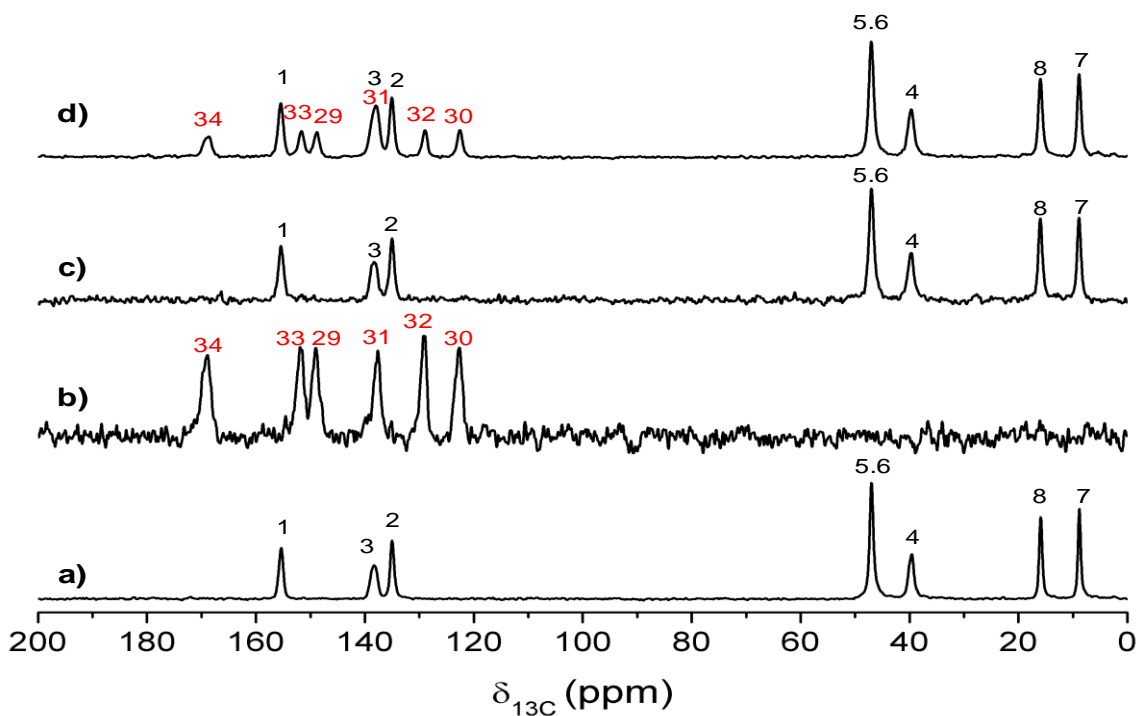


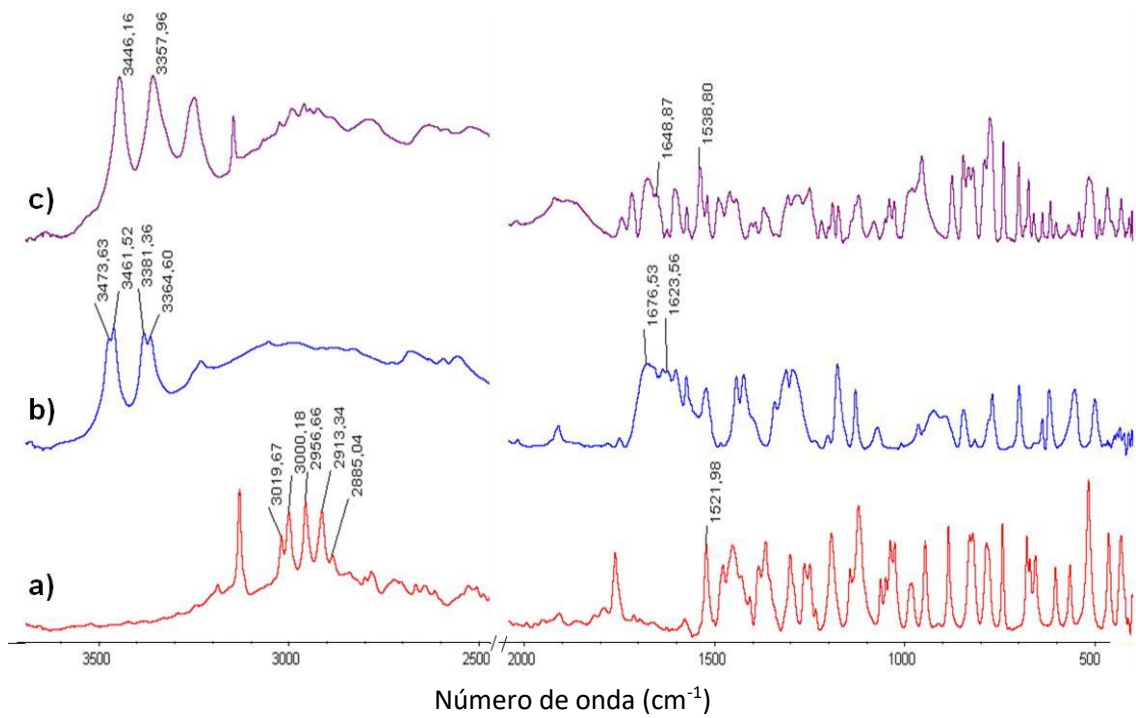
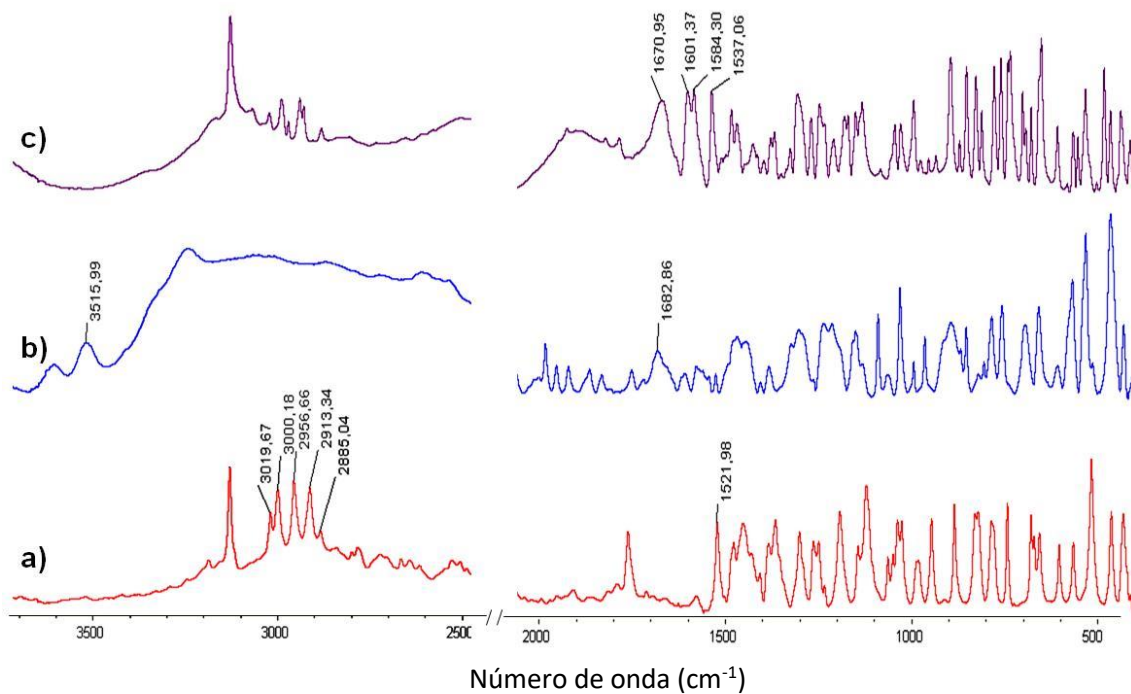
Figura S5. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ; (b) PABA; y (c) TNZ-PABA_{LAG}.**Figura S6.** Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ; (b) SA; y (c) TNZ-SA_{LAG}.

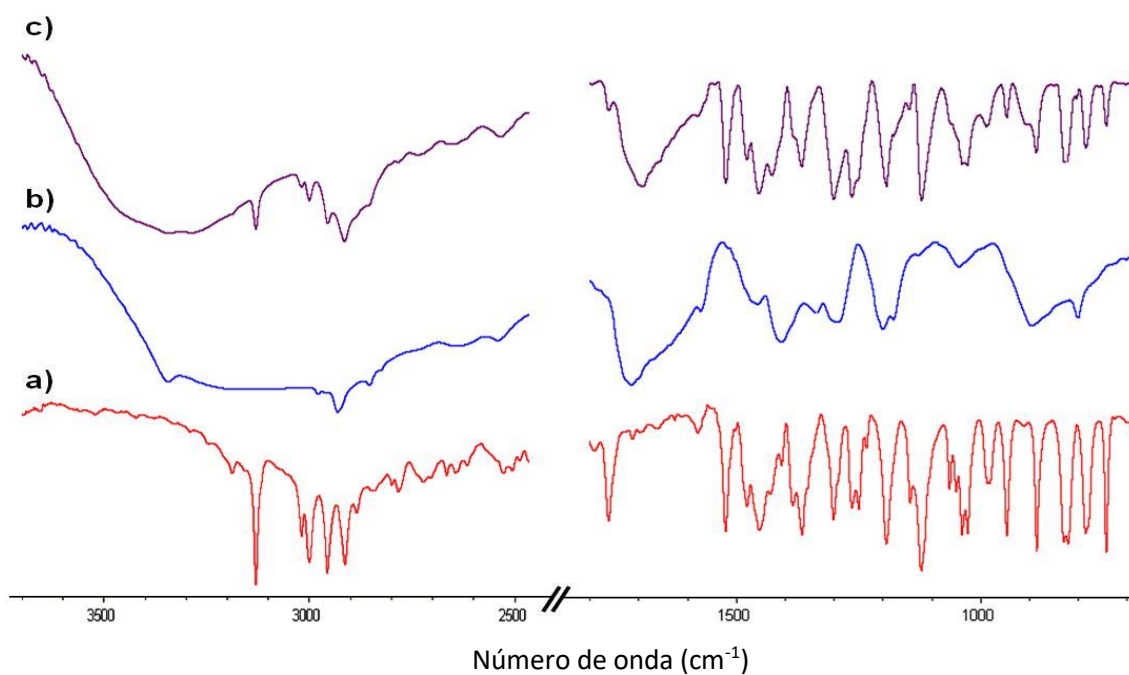
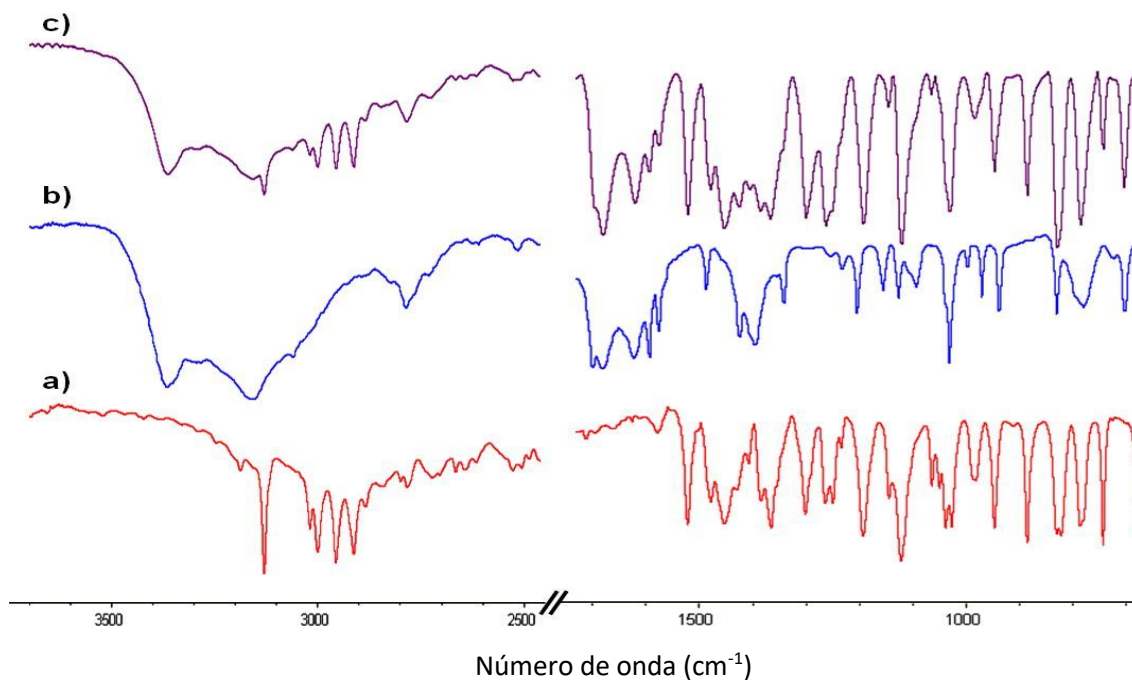
Figura S7. Espectros FTIR (KBr) de: (a) TNZ; (b) SUC; y (c) TNZ-SUC_{LAG}.**Figura S8.** Espectros FTIR (KBr) de: (a) TNZ; (b) NA; y (c) TNZ-NA_{LAG}.

Figura S9. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-PABA_{NG} antes de 24 h en agua Milli Q® y (b) TNZ-PABA_{NG} después de 24 h en agua Milli Q®.

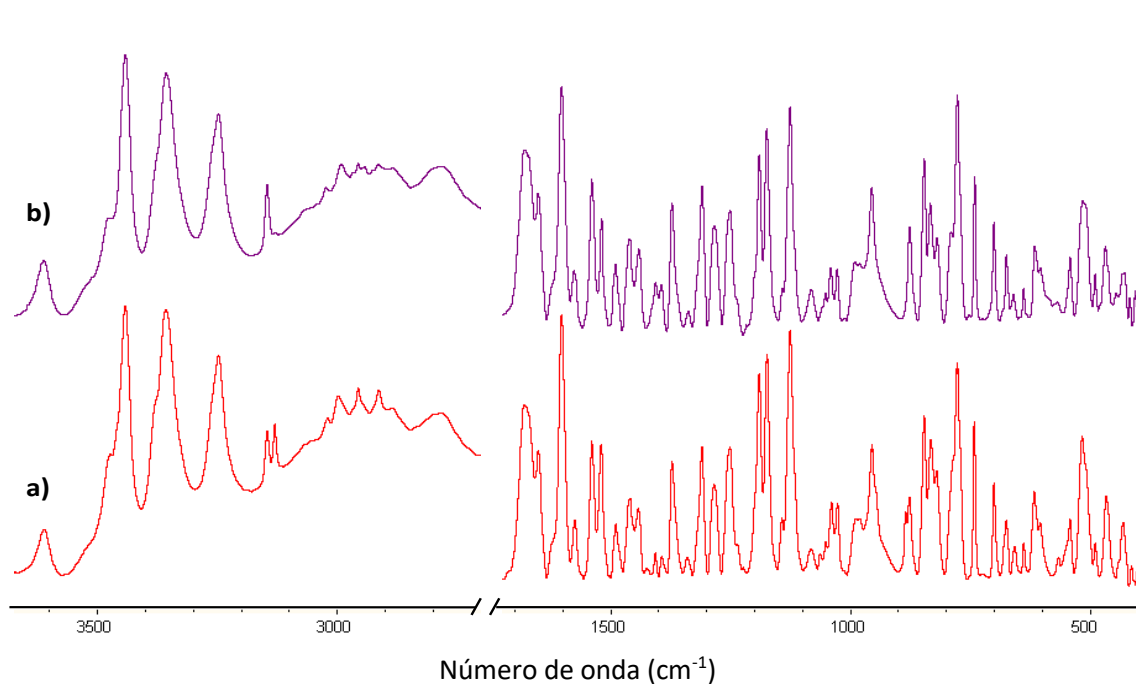


Figura 10. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-SA_{LAG} antes de 24 h en agua Milli Q® y (b) TNZ-SA_{LAG} después de 24 h en agua Milli Q®.

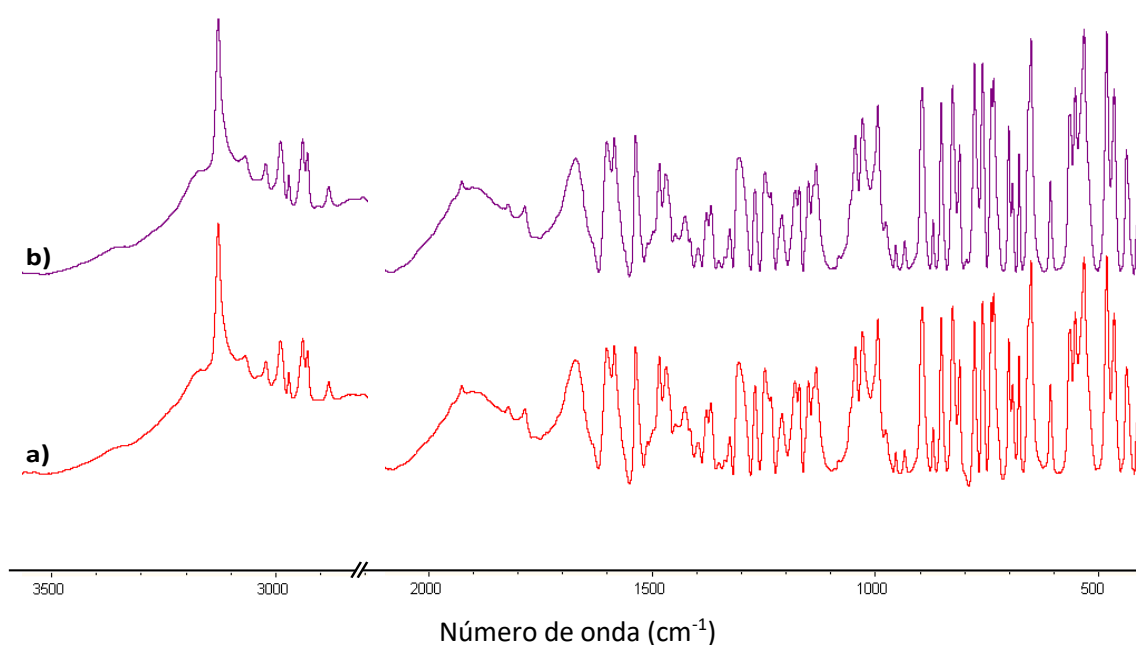


Figura S11. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-CA_{LAG} antes de 24 h en agua Milli Q® y (b) TNZ-CA_{LAG} después de de 24 h en agua Milli Q®

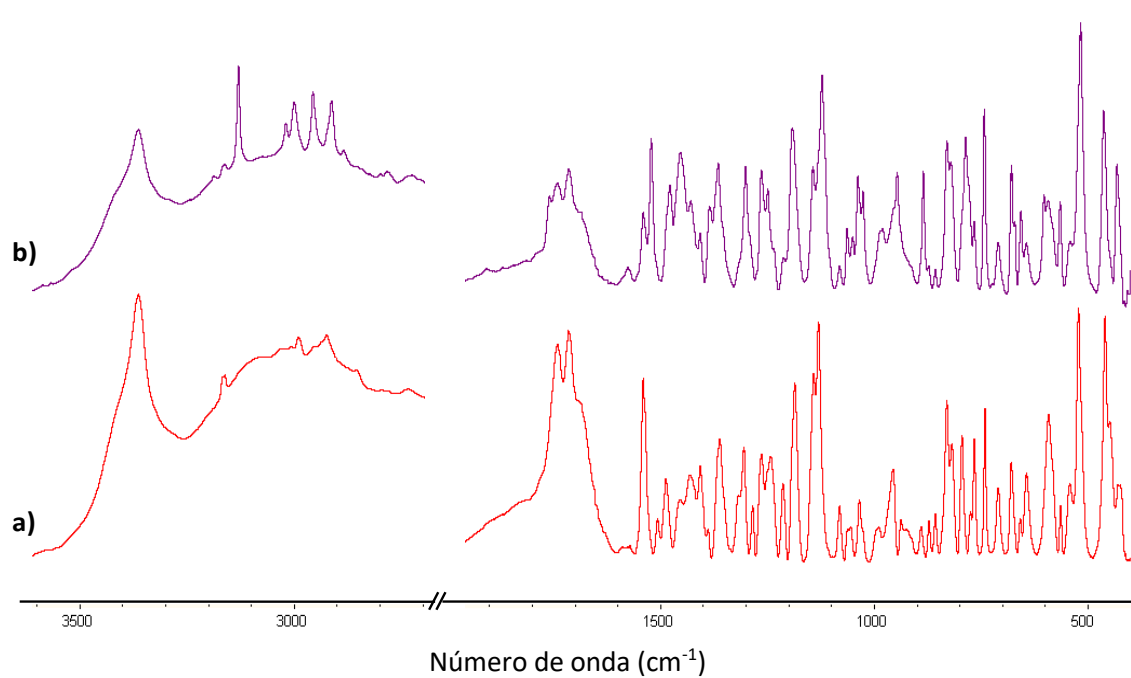


Figura S12. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-NA_{LAG} antes de 24 h en agua Milli Q® y (b) TNZ-NA_{LAG} después de de 24 h en agua Milli Q®

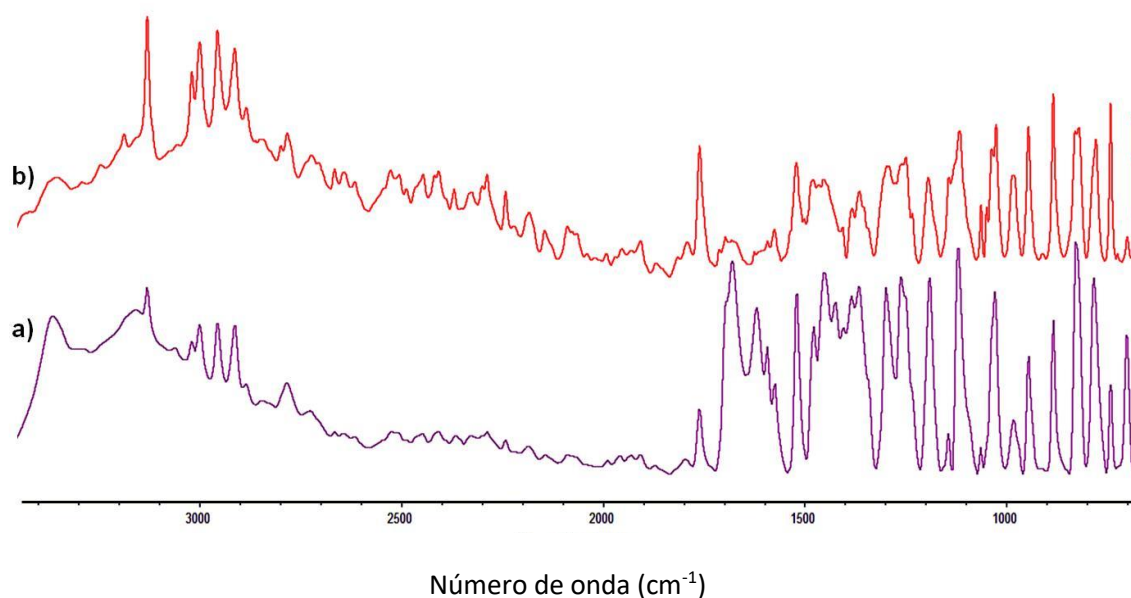


Figura S12. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-SUC_{LAG} antes de 24 h en agua Milli Q® y (b) TNZ-SUC_{LAG} después de de 24 h en agua Milli Q®

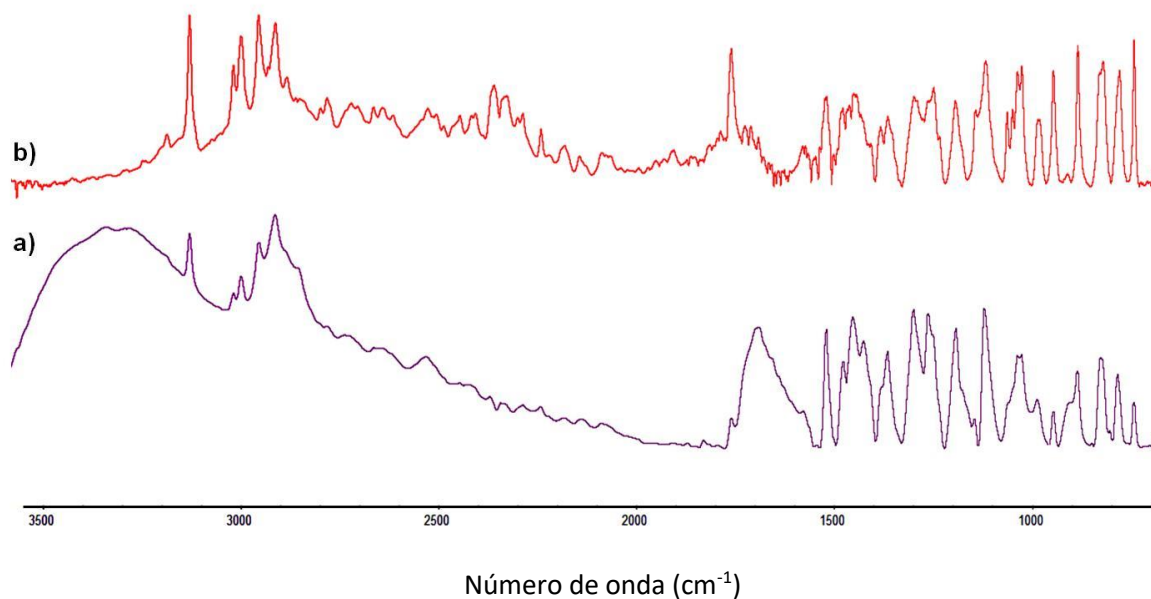


Figura S14. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-PABA_{LAG} antes de irradiación con luz UV-visible y (b) TNZ-PABA_{LAG} después de 4h de irradiación con luz UV-visible

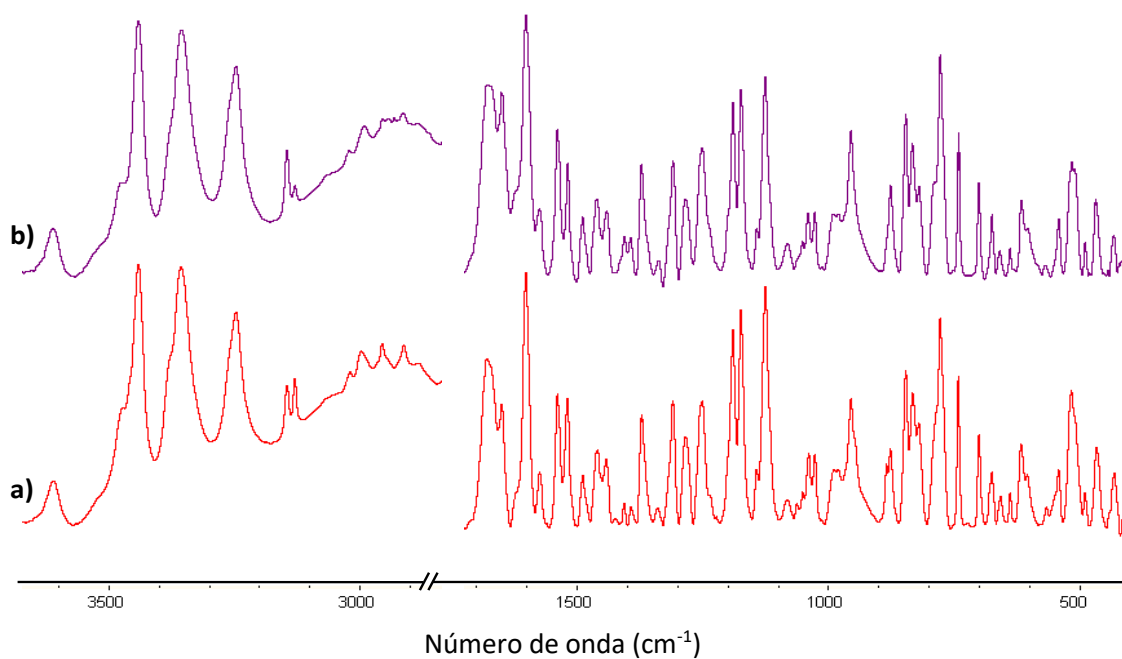


Figura S15. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-SA_{LAG} antes de irradiación con luz UV-visible y (b) TNZ-SA_{LAG} después de 4h de irradiación con luz UV-visible

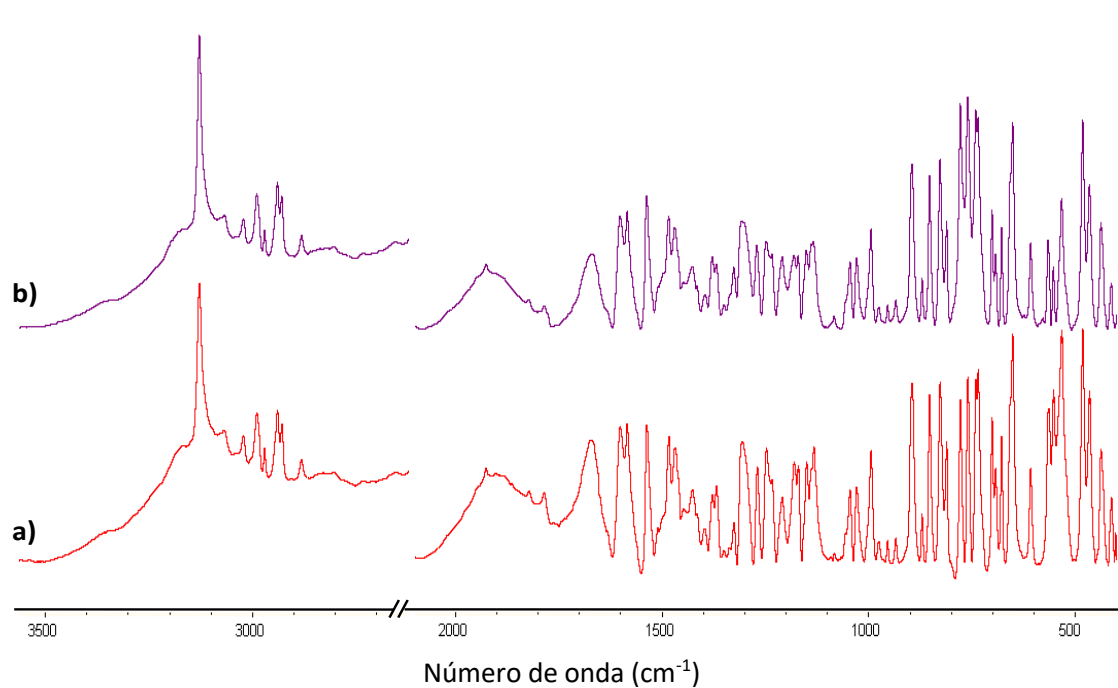


Figura S16. Espectros DRIFT (KBr) de: (a) TNZ-CA_{LAG} antes de irradiación con luz UV-visible y (b) TNZ-CA_{LAG} después de 4h de irradiación con luz UV-visible

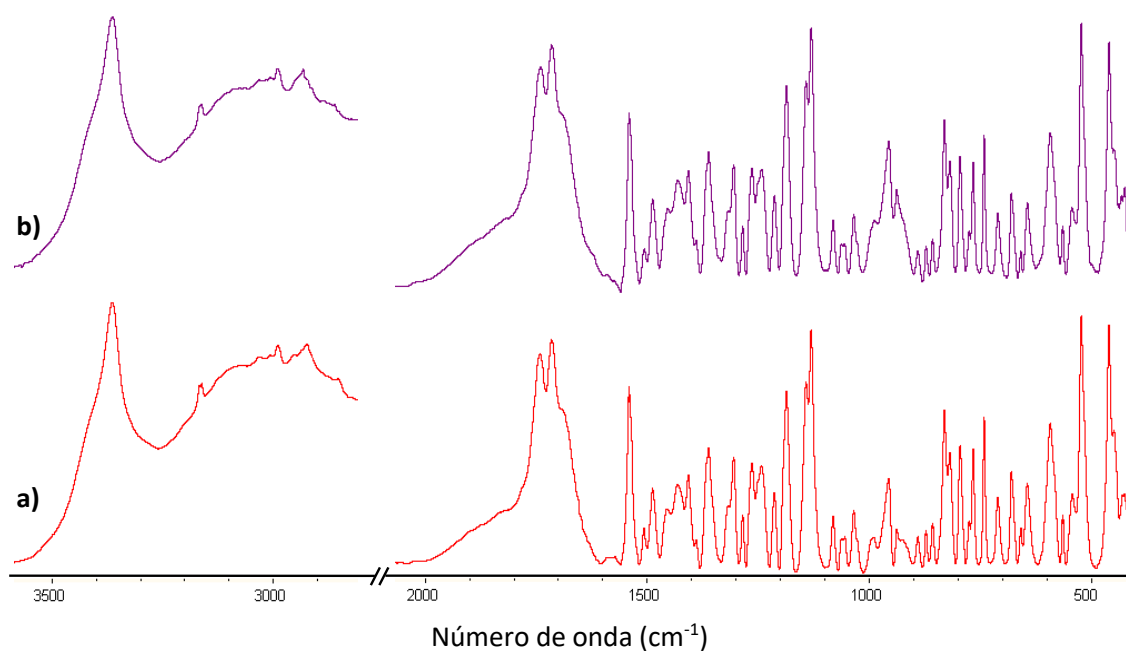


Tabla S6. Valores de pH medidos luego de realizar el estudio de solubilidad de los tres CC, TNZ-PABA_{LAG}, TNZ-SA_{LAG} y TNZ-CA_{LAG}

Muestra	pH
TNZ-PABA _{LAG}	3.5
TNZ-SA _{LAG}	3.4
TNZ-CA _{LAG}	3.0
Agua MilliQ®	5.5

Anexo

2

Tabla S1. Ajustes de los datos de disolución de los NC del *p*-NO₂-BSTHQ en estado de polvo seco a diferentes modelos cinéticos (Programa *DDSolver*).

Modelo	Estadística ^a	
Orden Cero	K_0	0.140
	r^2	0.8623
	MSC	0.6869
	AIC	29.2686
Primer Orden	K_0	0.002
	r^2	0.8738
	MSC	0.7743
	AIC	28.6573
Higuchi	K_d	1.676
	r^2	0.9703
	MSC	2.2205
	AIC	18.5335
Hixson-Crowell	K_d	0.001
	r^2	0.8700
	MSC	0.7446
	AIC	28.8649
Weibull	α	31.631
	β	0.368
	T_d	11879.451
	r^2	0.9981
	MSC	4.6900
	AIC	1.2473
Probit	α	-2.749
	β	0.871
	r^2	0.9294
	MSC	1.3555
	AIC	24.5887
Gompertz	α	6.878
	β	0.657
	r^2	0.9404
	MSC	1.5237
	AIC	23.4116

^a α , parámetro que define la escala de tiempo del proceso; β , parámetro de forma que caracteriza la curva; k_0 es la constante de liberación de orden cero; k_d , constante de liberación en el modelo Hixson-Crowell; r^2 , coeficiente de determinación; **AIC**, Criterio de Información de Akaike; **MSC**, Criterio de Selección de Modelo