



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“Evaluación del impacto de nuevas fases sólidas
cocrystalinas sobre las propiedades físicas y
biofarmacéuticas de praziquantel”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

P R E S E N T A:

YENNIFER ITZAYANNA GARCÍA GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. DEA HERRERA RUIZ

ASESOR TÉCNICO:

M.F. REYNALDO SALAS ZÚÑIGA

CUERNAVACA, MORELOS

2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE FARMACIA
SECRETARIA DE DOCENCIA
JEFATURA DE LA LICENCIATURA**

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365

Fecha: 02 de junio de 2020
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0107/2020

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

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis titulado “**Evaluación del impacto de nuevas fases sólidas cocrystalinas sobre las propiedades físicas y biofarmacéuticas de praziquantel**” presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. Yennifer Itzayanna García González, Matrícula (20151004515)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Dr. Jaime Escalante García

Dra. Adriana Valladares Méndez

Dr. Jesús Rivera Islas

Dr. Ángel Daniel Herrera España

ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”

M.P.D. Reyna América Serrano López
SECRETARIA DE DOCENCIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2020-06-02 18:16:13 | Firmante

SdfykJl47z67qqXhDHeov5EE1BMUIdVkhC3CkIRvEVcFKkPyVR5R2lVWbDzDgPqO8oO1CcG3a4PpMlpWiOEMDWTR4ELICgR+M3A9brsoUYew7bp+Aq/gsmMLmJCzoTuUx/FRBcQMnyPzRLvJYAYCfHm/LyCZq1eJBie2E/olJCqWiXMSPX4xvo24Sh7s2o9kw9lDJNSGxunOff+EBfj5xu74MI6lO41urk3+0CkutGhsyRmbq0xk99B6lxbiVXfkDMpLx5FXcW5+IolT7oQdBRGhImv39S1r7WAiz8vcd3VMeuETvD01E+Eq8LWA17RCT04aHhxo/p5vD9kYa4psg==

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



rxS20l

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/v7XEdJc01fh390HgSW8kXjiOpRqED1Da>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

ANGEL DANIEL HERRERA ESPAÑA | Fecha:2020-06-08 23:36:20 | Firmante

OHp4hvdDjYTS2q5XSQuKJigMgPzbqBWu6T3eCVx15qaNI3QEITdHAIL8N8MR3gvOSbmRQT0t6uYdlup02OMuEpdGvYjV7WTv3jG5nJdGyBL3nXnmFzADcjTS76TkXbASaNYl8bu1q5pGeMZwWfQyeoOsKD3fbPJ20b7R+DRt31RNW398s/9emN0wiAQiyRlq/FPFzoGFKjb1b6SdLcFzzGTH1DyuC4wo0RJIT4W+LthVQBBWfYBvl/tMki+Pxjzp9GYcft1k7bS7zVIB5XbU19DpwrZmAn/QNQw5UG2VTEFwMolIXpQcOwTuB98EGHhTYT3Ew6MIR6TFmNmuHoByw==

JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha:2020-06-09 10:15:46 | Firmante

dQgz0iKiZsZGLILyAeoap33KCCivt0U09pAoUQiBptvJOfy3uJ1FmhmVNxua2a7+Kx/NJIXistkh1qJpXsfNOuT5R0eeZwL+PztRTHnEwoor6hrmWlKPbHV1sNiLqBwEb42WY6KGvHqWRqNpHsMfawxokLOnn0Q5e88laOHC9JIA9dt0c6U8qL9wnX4yOWKhoa5FvYTVd8TbqskSIVbuhRBWA45hDIQFLc9DKqMWjLx9RnsduqQSfzTZpRO/8dXwq4caqtVhJv1BAS/GPUkxJNCfN7IK3xSlMO+gmTXsZlvZkcU0rXIHeaFkwStJfD9ud4spwb3zw8PX1ha+Q==

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2020-06-09 12:56:26 | Firmante

deuift1qrIKaK0drmOXvo1tgnGVicT0W8XNIxvuWcnqu9SJDLp6x+d6w/gevYVLVCNBRZt1DEGXhY5DOyJIVy12G8b43juks+Zp+j2YyR4UAdIrumWCtupnLUXZoRalt2+H8r60KQ+oL7iq0TvqiEQKOCouE0NVXCqL+nN76u+KOM20bP4xNuQV1izkG7UFuchKcVpH1cryTGkZKHRb5DrkGyzen6uPcXArMzGkHENE1BQMfFPKtqS5nF/jJ5cOdbui3m8YEQh6LyXhdGpwtFLOWmjaXwBOnvSCYh4EDqkIE5heVwiLCLbI54Gnb7NSnJMbeQ1GVYHEubHxs3FUQ==

ADRIANA VALLADARES MENDEZ | Fecha:2020-06-09 13:14:10 | Firmante

kPj10E70Txf/cxCdNP+dZ4b81wEjvr3I4BnKRuQS/nHJzdRmYwAOc/aQ/gPZGWZoretb1rixorCTxey27F1s8qYb1Aw5MfbZ4N8btbBpqYrXbk2xCi+QLdQEY4NCpcQB8oaAkszurjCgqDZ8SAti+lvUbw4WMRKAyqn+PMBjwqgYVJYnJl+bpTT7gajngEx+wx8LmEGn4hL5nvwHi23BdDIK20igdgN62BTDBJULO1WwKBq3i6GhLeKJlrqdgQRcC/lj5E GF3oqzL+XuYmGOKMZvq0K7/AOYI7624H07p44tt0Tc6qalF+WB+Y7sGvOCxgnYjH04yDKV581XHrlcA==

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2020-06-09 13:35:30 | Firmante

Ykrms3D+e+9FtPIPBZX29MT8Y4QFMpyP9lbNYTKfiNoBIGFG/13cRtWQANALQEfyNtFcpagLXIU1hhnarfBjTfm9ldQ6vHjbcldGYB5FnOBhbHp4joGohMWGw/CHFvSyEMK66UbYZEhY5+Ot3zifhNyhprJaSYotFGiOLi4rHjUNJ0Xb9vpkg+luoEazM1S9hikdxFzWLOPe6SPLxmhLOXo1h/outBS/RXi5q+vJfjnRaMAQ3qTYdT/huTOf28YdMiaqJwHyS1uT+4zV42PxYQBY8fUV1vZuPR+vfyE3qHJi1r57nzyX7oczCTrrjWrqJ1OIBxRvOCokcJxRT7v==

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



xFEuPW

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RBrN2BdeRYnMHFjVjx6KoNpVAc5GTXh>



Si no lo puedes explicar de forma simple, no lo entiendes suficientemente bien.

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primera instancia a mi directora de tesis, la doctora Dea Herrera Ruiz, por haberme aceptado para formar parte de este gran grupo de investigación, agradecer también por la guía brindada en la realización de este trabajo, por el apoyo que me otorgó siempre que lo necesité, por el buen trato que siempre me brindó como persona y por todas las nuevas experiencias que pude tener gracias a ella.

Agradezco también a los doctores Hugo Morales Rojas y Herbert Höpfl por su constante interés en el mejoramiento de este proyecto. Así como a todos los que forman parte del grupo de investigación y que de alguna manera también contribuyeron en este trabajo. Doc Juan, Magui, Irma, Andrés, Leo, Jenni, Jocce, Christian, Aláin, Andy y recientemente Alondra, Brenda y Alejandro.

Agradezco de forma especial también a mi asesor Reynaldo, por la gran contribución que hizo al apoyarme durante la realización de este trabajo, la guía, el conocimiento compartido y todo el tiempo que invirtió para que este trabajo fuese posible.

Un agradecimiento especial a mis preciosas amigas, roommates, hermanas de otra mamá, Bethia y Guadalupe, por estar a lo largo de este proyecto, de la carrera y de esta amistad, amenizando mi vida. Las amo.

Al jurado revisor de tesis: Dr. Sergio Alcalá, Dr. Jaime Escalante, Dra. Adriana Valladares, Dr. Jesús Rivera, Dr. Angel Herrera, por haberme apoyado con su tiempo, sus conocimientos, haciendo posible la culminación de este trabajo.

A mis amigos de la carrera, Dianita, Juan, Dham, Pablo, Mara, por estar presentes.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, así como a la Facultad de Farmacia y al Centro de Investigaciones Químicas, por haberme facilitado el uso de materiales y equipos que contribuyeron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

Inicialmente le dedico este gran logro a Dios.

A mis padres, mamá y papá, gracias por el apoyo a lo largo de toda esta etapa, sin ustedes no habría sido posible, los amo mucho y con mucho orgullo les dedico esto.

A mis hermanitos Jaime, Julio y Yordi, ya saben por despertar conmigo cada lunes por la madrugada, distraerme cuando era necesario y voltear mi vida de cabeza en ciertas ocasiones.

A mi familia que siempre estuvo dándome ánimos y apoyo, en todos los aspectos. Gracias a todos ustedes por brindarme esa confianza, todo ese apoyo y que gracias a ello hoy les puedo dedicar este trabajo.

A ti Hugo Marquina, por estar siempre a mi lado en buenas y malas, brindándome tu apoyo. Te lo dedico con mucho cariño.

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
RESUMEN.....	VII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	2
1. Esquistosomiasis	2
2. Praziquantel	3
2.1. Mecanismo de acción	4
2.2. Dosificación	5
2.3. Propiedades fisicoquímicas	5
3. Sistemas de liberación para praziquantel	6
4. Estado sólido	6
4.1. Cocristales.....	7
5. Nuevas fases sólidas de praziquantel.....	8
6. Ácidos hidroxibenzoicos	10
6.1. Ácido 2-hidroxibenzoico.....	10
6.2. Ácido 2,4-dihidroxibenzoico	11
7. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS FASES SÓLIDAS	
12	
7.1. Difracción de rayos-X de polvos	12
7.2. Difracción de rayos-X de monocristal	13
7.3. Espectroscopía Infrarroja.....	14
7.4. Calorimetría diferencial de barrido	14
7.5. Análisis termogravimétrico.....	14
8. EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA	15
8.1. Estabilidad de fase e indicativa.....	15
8.2. Prueba de disolución de polvos	16
8.3. Velocidad de disolución intrínseca.....	16
JUSTIFICACIÓN	18

HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
SECCIÓN EXPERIMENTAL	21
1. Materiales.....	21
2. Selección de cocristales a evaluar	21
3. MÉTODOS	22
3.1. Síntesis y escalamiento de cocristales de PZQ	22
3.2. Caracterización física	22
3.3. Evaluación biofarmacéutica	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
1. Obtención y caracterización de nuevas fases sólidas del praziquantel 27	
1.1. Cocrystal PZQ-2HBA-H ₂ O	31
1.2. Cocrystal PZQ-24DHBA	36
2. EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA	39
2.1. Estabilidad indicativa	39
2.2. Transformación de fase mediada por la solución (HCl pH 1.2)	40
2.3. Método de cuantificación	42
2.5. Disolución intrínseca.....	46
2.6. Disolución de polvos bajo condiciones supersaturadas	52
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones de cocrystal.	7
Tabla 2. Resumen del análisis del proceso de disolución de PZQ y algunos cocrisales con ácidos alifáticos.	9
Tabla 3. Concentraciones de la curva de cuantificación empleada.	25
Tabla 4. Cálculo de los límites de detección y cuantificación de PZQ.	45
Tabla 5. Constantes de velocidad de disolución intrínseca para PZQ, PZQ-2HBA-H ₂ O y PZQ-24DHBA en HCl a pH 1.2.	47
Tabla 6. Constantes de velocidad de disolución intrínseca de PZQ, PZQ-2HBA-H ₂ O y PZQ-24DHBA en PBS pH 6.0.	49
Tabla 7. Resumen del análisis de disolución intrínseca de los cocrisales de PZQ.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmisión de <i>Schistosoma spp.</i>	2
Figura 2. Estructura química de <i>RS-PZQ</i>	3
Figura 3. Mecanismo de acción de <i>PZQ</i> sobre el gusano de <i>Schistosoma spp.</i>	4
Figura 4. Estructuras químicas de los enantiómeros de praziquantel: a) (<i>S</i>)- <i>PZQ</i> y b) (<i>R</i>)- <i>PZQ</i>	5
Figura 5. Fases sólidas de un ingrediente farmacéutico activo.....	7
Figura 6. Compuestos químicos que forman fases cocrystalinas con el IFA <i>PZQ</i> . .	9
Figura 7. Estructura química del ácido 2-hidroxibenzoico.....	11
Figura 8. Estructura química del ácido 2,4-dihidroxibenzoico.	12
Figura 9. Representación de la Ley de Bragg.....	13
Figura 10. Equipo Personal Reaction Station J-KEM Scientific	26
Figura 11. Patrón de DRXP de las materias primas <i>PZQ</i> , <i>2HBA</i> y <i>24DHBA</i>	28
Figura 12. Espectros IR de <i>PZQ</i> , <i>2HBA</i> y <i>24DHBA</i>	28
Figura 13. Diagrama DSC-TGA de <i>PZQ</i>	29
Figura 14. Diagrama DSC-TGA de <i>2HBA</i>	30
Figura 15. Diagrama DSC-TGA de <i>24DHBA</i>	30
Figura 16. Patrón de DRXP de las relaciones estequiométricas de la fase <i>PZQ-2HBA</i>	31
Figura 17. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del cocrystal <i>PZQ-2HBA-H₂O</i> 1:1:1 (elipsoides al 50% de probabilidad).....	32
Figura 18. Comparación del patrón DRXP del cocrystal <i>PZQ-2HBA-H₂O</i> simulado con el experimental.	33
Figura 19. Espectros IR del cocrystal <i>PZQ-2HBA-H₂O</i> 1:1:1 comparado con las materias primas.	34
Figura 20. Interacciones por puente de hidrógeno entre las moléculas de <i>PZQ</i> , <i>2HBA</i> y <i>H₂O</i> presentes en el cocrystal <i>PZQ-2HBA-H₂O</i>	34
Figura 21. Diagrama DSC-TGA del cocrystal <i>PZQ-2HBA-H₂O</i> (1:1:1).....	35
Figura 22. Patrón de DRXP de la fase sólida <i>PZQ-24DHBA</i> en diferentes relaciones estequiométricas y las respectivas materias primas.....	36
Figura 23. Espectros IR de <i>PZQ</i> , <i>24DHBA</i> y <i>PZQ-24DHBA</i> (1:1).....	37

Figura 24. Diagrama DSC-TGA del cocrystal PZQ-24DHBA (1:1).....	38
Figura 25. Patrón de DRXP del cocrystal PZQ-2HBA-H ₂ O bajo distintas condiciones de temperatura y humedad relativa.....	39
Figura 26. Patrón de DRXP del cocrystal PZQ-24DHBA bajo distintas condiciones de temperatura y humedad relativa.....	40
Figura 27. Patrón de DRXP de la prueba de transformación de fase mediada por la solución.....	41
Figura 28. Cromatogramas de PZQ y los coformadores con la mezcla de fase móvil CH ₃ CN:HCl pH 1.2 (50:50) en sus respectivos métodos de cuantificación.....	44
Figura 29. Cromatograma de PZQ obtenido con el método de cuantificación PZQ-2HBA.....	45
Figura 30. Perfil de disolución intrínseca del PZQ y los cocristales PZQ-2HBA-H ₂ O y PZQ-24DHBA, en medio acuoso HCl pH 1.2 (n=3 ± DE).	47
Figura 31. Perfil de disolución intrínseca de PZQ y los cocristales PZQ-2HBA-H ₂ O y PZQ-24DHBA, en buffer de fosfatos pH 6.0 (n=3 ± DE).	49
Figura 32. Perfil de disolución intrínseca de PZQ, del cocrystal PZQ-2HBA-H ₂ O 1:1:1 y la mezcla física de PZQ-2HBA 1:1 en medio HCl pH 1.2 (n=3 ± DE).	50
Figura 33. Perfil de disolución de polvos de PZQ y el cocrystal PZQ-2HBA-H ₂ O en buffer de fosfatos pH 6.0 (n=3 ± DE).	52
Figura 34. ABC obtenida de la prueba de disolución de polvos del PZQ y el cocrystal PZQ-2HBA-H ₂ O.....	53

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

24DHBA: Ácido 2,4-dihidroxibenzoico

2HBA: Ácido 2-hidroxibenzoico

ABC: Área bajo la curva

DE: Desviación estándar

DRXM/DRXMC: Difracción de rayos-X de monocristal

DRXP: Difracción de rayos-X de polvos

DSC: Differential Scanning Calorimetry/Calorimetría diferencial de barrido

FDA: Food and Drug Administration/ Administración de Alimentos y Medicamentos.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

HPLC: High performance liquid chromatography/Cromatografía líquida de alta resolución

IFA: Ingrediente farmacéutico activo

k_d: Constante de disolución

LC: Limite de cuantificación

LD: Limite de detección

MF: Mezcla física

NOM: Norma Oficial Mexicana

OMS: Organización Mundial de la Salud

P_{app}: Permeabilidad aparente

PBS: Phosphate buffer solution/Solución buffer de fosfatos

PZQ: Praziquantel

SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

TGA: Thermogravimetric Analysis/Análisis termogravimétrico

T_{onset}: Temperature onset/ Temperatura de comienzo

T_{peak}: Temperature peak/ Temperatura del pico

VDI: Velocidad de disolución intrínseca

RESUMEN

El praziquantel (PZQ) es un fármaco con propiedades antihelmínticas ampliamente utilizado en la terapia de enfermedades parasitarias como la esquistosomiasis y la neurocisticercosis. Sin embargo, pertenece al grupo II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) debido a que posee alta permeabilidad y baja solubilidad en medios acuosos, estas propiedades propician una baja biodisponibilidad, y esto conlleva a la administración de altas cantidades de fármaco (600 mg) para cumplir con el objetivo terapéutico.¹

Actualmente, se ha demostrado que las fases sólidas cocrystalinas modifican las propiedades físicas y biofarmacéuticas de principios activos poco solubles en agua. Debido a lo anterior se ha recurrido al uso de estas técnicas buscando generar cambios que mejoren las propiedades de los fármacos. Un cocrystal farmacéutico pertenece a la subclase de cristales multicomponentes formados por un ingrediente farmacéutico activo (IFA) y un coformador que debe ser seleccionado de la lista de sustancias generalmente reconocidas como seguras (*GRAS* por sus siglas en inglés).²

En este trabajo se estudiaron las propiedades físicas y biofarmacéuticas, así como el comportamiento en disolución de dos fases sólidas cocrystalinas de praziquantel usando como formador de cocrystal el ácido 2-hidroxibenzoico y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico en cada caso. Ambas fases sólidas presentaron propiedades físicas diferentes a las materias primas de partida, como el punto de fusión. Además, los sólidos cocrystalinos modificaron las propiedades biofarmacéuticas de PZQ, al aumentar la constante de velocidad de disolución intrínseca en medio acuoso (solución acuosa de HCl pH 1.2). El cocrystal de PZQ con ácido 2-hidroxibenzoico generó un sistema supersaturado de praziquantel en solución amortiguadora pH 6, estos resultados sugieren que el mejoramiento de la solubilización de PZQ a partir de los cocrystalinos estudiados podrían aumentar la biodisponibilidad de PZQ al administrarse de forma oral.

INTRODUCCIÓN

La ingeniería de cocristales ha evolucionado en una nueva forma de síntesis supramolecular como consecuencia de décadas de investigación teniendo como motivación poder crear nuevas fases sólidas de ingredientes farmacéuticos activos que posean mejores propiedades biofarmacéuticas en pro de una terapia más adecuada para los pacientes.³

Dentro de la industria farmacéutica menos del 1% de los compuestos farmacéuticos activos logran aparecer en el mercado, debido principalmente a sus propiedades biofarmacéuticas pobres más que por su toxicidad o su falta de eficacia. Debido a esto se ha recurrido a la ingeniería de cocristales para la modificación de las propiedades fisicoquímicas de un cristal tal como el punto de fusión, cristalinidad, velocidad de disolución y estabilidad siendo estos últimos, así como la permeabilidad unas de las propiedades de mayor relevancia para la generación de nuevos fármacos. En 1995 Gordon Amidon y colaboradores sientan las bases de lo que hoy se conoce como Sistema de Clasificación Biofarmacéutico el cual es un marco científico utilizado para clasificar un fármaco considerando su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal logrando separarlos en cuatro clases (I, II, III y IV). Los fármacos pertenecientes al grupo o clase II poseen una baja solubilidad acuosa y una alta permeabilidad siendo este el caso de praziquantel.⁴⁻⁷

Praziquantel es un fármaco antihelmíntico ampliamente utilizado para el tratamiento de varias formas de esquistosomiasis, además, es prácticamente insoluble en agua y se ha buscado modificar esta propiedad a través de la ingeniería de cocristales. Anteriormente se han obtenido fases cocrystalinas de praziquantel haciendo uso de ácidos dicarboxílicos alifáticos como formadores de cocrystal comprobando así, que este fármaco es un buen candidato para la formación de nuevas fases cocrystalinas que podrían ayudar a superar algunas de sus limitaciones biofarmacéuticas. Bajo esta premisa se visualizó que los ácidos carboxílicos aromáticos y sus derivados, son candidatos para la formación de cocristales ya que contienen grupos donadores de puentes de hidrógeno que colaborarían para cumplir este objetivo.^{8,9}

ANTECEDENTES

1. Esquistosomiasis

La esquistosomiasis o bilharzia es una enfermedad tropical causada por gusanos del género *Schistosoma*. Las principales especies que causan esta enfermedad son *S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum*. El ciclo de transmisión (figura 1) requiere la contaminación de las aguas superficiales por excretas, caracoles de agua dulce como hospedadores intermedios y el contacto humano con el agua. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), 200 millones de personas están infectadas en todo el mundo.¹⁰

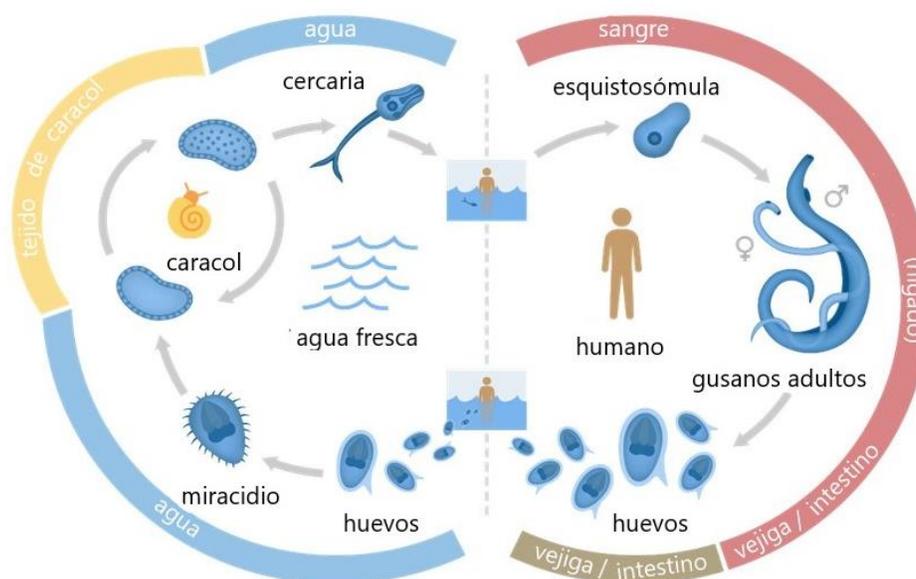


Figura 1. Ciclo de transmisión de *Schistosoma* spp. Recuperada de: <https://www.freepng.es/hd-png/schistosomiasis.html>.

En el mercado existen fármacos indicados para el tratamiento de la esquistosomiasis como la oxamniquina que posee un récord excelente de eficacia y seguridad para el tratamiento de infecciones causadas por *Schistosoma mansoni* pero no es activa contra otro tipo de esquistosomas; el metrifonato es otro fármaco que solo es activo contra *Schistosoma haematobium*, es raramente utilizado y actualmente ya no se encuentra el medicamento de patente, siendo entonces praziquantel el fármaco de elección para el tratamiento de esta enfermedad.¹¹ PZQ

forma parte del cuadro básico de medicamentos de acuerdo con la OMS y además posee efecto contra algunas infecciones provocadas por céstodos.¹²

2. Praziquantel

PZQ es el nombre común para el compuesto (2-(ciclohexanocarboxilo)-1, 2, 3, 6, 7, 11--hexahidro-4H-pirazino-[2,1-a]isoquinolina-4-ona) (figura 2) de fórmula química (C₁₉H₂₄N₂O₂) y que se presenta como sólido cristalino blanco de sabor amargo.¹¹

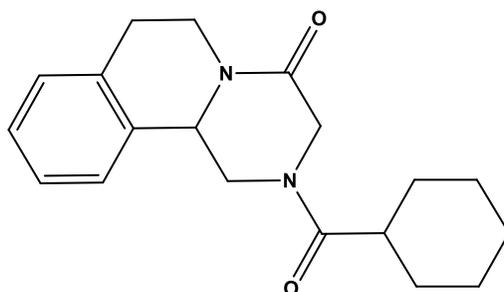


Figura 2. Estructura química de RS-PZQ.

PZQ es una quinolina-pirazina acilada que es activa contra todas las especies de esquistosomas. Su actividad antiparasitaria fue observada en los laboratorios Bayer alrededor de los años 70. Los laboratorios Merck por su parte, buscaban fármacos que fueran potencialmente tranquilizantes, y así sintetizaron una serie de derivados pirazino-isoquinolínicos. Un acuerdo entre las dos empresas alemanas permitió realizar un amplio screening de estos fármacos incluyendo las pruebas antihelmínticas. En 1977, se publicó por primera vez la actividad del compuesto más efectivo de todos los de la serie frente a infecciones generadas por céstodos y tremátodos en animales de experimentación. Este fármaco era el EMBAY 8440, hoy conocido como praziquantel. Un año más tarde se realizaron los primeros estudios en seres humanos. En 1979, se llevaron a cabo los primeros ensayos clínicos a gran escala en zonas endémicas para *S.mansoni*, *S.haematobium* y *S.japonicum* en estrecha colaboración con la Organización Mundial de la Salud. Todos estos ensayos y los que se realizaron a continuación demostraron la elevada eficacia del PZQ, por lo que pasó a ser el tratamiento de elección frente a la esquistosomiasis. Para 1982 PZQ fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos

(FDA, por sus siglas en inglés) como medicamento antiesquistosomiásico con el nombre comercial Biltricide.^{8,13}

2.1. Mecanismo de acción

PZQ se absorbe rápidamente a través del intestino (en humanos más del 80% de la dosis administrada por vía oral se absorbe en el tracto gastrointestinal) y alcanza su concentración plasmática máxima en 1-2 horas. La efectividad que posee PZQ sobre otros antihelmínticos es debido a que actúa sobre la permeabilidad de la membrana celular generando con ello la contracción de los esquistosomas, causa además la vacuolización y desintegración del tegumento del esquistosoma. Esto conlleva a diversas situaciones (figura 3) que activan respuestas de defensa del huésped en contra del gusano; produciendo entonces la formación de granulomas o fagocitosis.^{14,15}

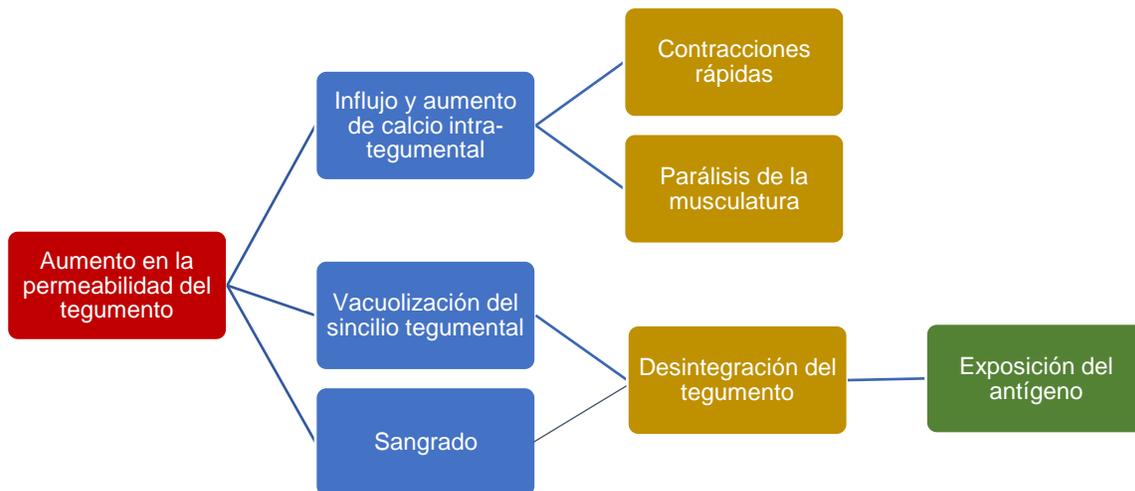


Figura 3. Mecanismo de acción de PZQ sobre el gusano de *Schistosoma spp.*

2.2. Dosificación

En México, de acuerdo con el Cuadro Básico y Catálogo de medicamentos, PZQ se comercializa principalmente como tabletas de 150 y 600 mg. Este fármaco presenta un régimen de dosificación estándar recomendado de 40 mg/kg de peso corporal en una sola dosis. Para el buen resultado de la terapia en esquistosomiasis con PZQ se recomiendan dosis de 20 mg/kg de peso corporal tres veces al día; en intervalos de no menos de 4 horas y no máximos de 6 horas. En el caso de otras enfermedades parasitarias como clonorquiasis el tratamiento consta de 75 mg/kg por vía oral en tres dosis durante dos días, con una efectividad superior al 90%. Dosis inferiores (40 mg/kg en una sola dosis) pueden ser eficaces para el tratamiento de la opistorquiasis.^{16,17}

2.3. Propiedades fisicoquímicas

PZQ es un compuesto quiral comercializado como una mezcla racémica (figura 4), atribuyéndose la principal actividad farmacológica al enantiómero (*R*)-PZQ dado que el enantiómero (*S*)-PZQ no contribuye en la terapéutica.¹⁸

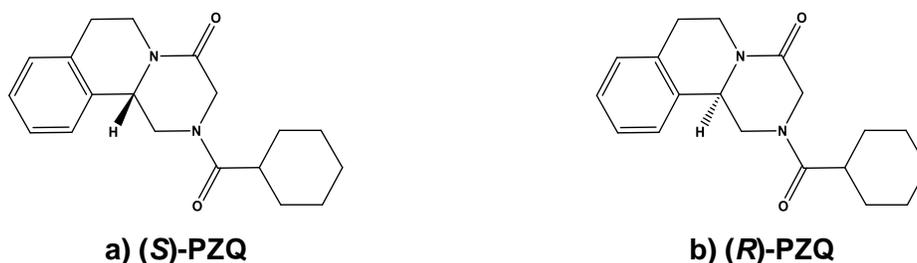


Figura 4. Estructuras químicas de los enantiómeros de praziquantel: a) (*S*)-PZQ y b) (*R*)-PZQ

PZQ es un compuesto estable en condiciones normales de temperatura y humedad, con un peso molecular de 312.413 g/mol, su punto de fusión se encuentra entre los 136 y 140°C. Este fármaco es fácilmente soluble en cloroformo y dimetilsulfóxido, soluble en etanol y muy poco soluble en agua siendo su solubilidad en este último disolvente de 0.40 mg/mL, presenta además alta permeabilidad ($P_{app} = 4.4 \times 10^{-5}$ cm/s) por lo que pertenece a la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.^{19,20}

3. Sistemas de liberación para praziquantel

Con anterioridad se han desarrollado diferentes y novedosas presentaciones de PZQ con las cuales se busca modificar sus propiedades biofarmacéuticas, con el fin de optimizar su biodisponibilidad, tales como los sistemas liposomales de liberación controlada, las dispersiones sólidas o el uso de nanopartículas lipídicas sólidas. Con el uso de estas tecnologías se logró generar modificaciones en los perfiles de disolución, así como un aumento en la biodisponibilidad oral en comparación con las tabletas comerciales.²¹⁻²³

Un objetivo importante dentro del desarrollo farmacéutico es aumentar la solubilidad y la velocidad de disolución de un fármaco mientras mantiene una estructura química estable. Los cocristales ofrecen la oportunidad de modificar las propiedades físicas y/o químicas, sin alterar los enlaces covalentes existentes. Estas estructuras se presentan como un nuevo campo de la química sustentable en donde se obtienen fases sólidas de un IFA, a través de reacciones en estado sólido.²⁴

4. Estado sólido

Aproximadamente el 80% de los ingredientes farmacéuticos activos son administrados en formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos o tabletas, cápsulas, suspensiones, granulados, etc, por lo tanto, características del estado sólido como el polimorfismo resultan relevantes debido al impacto que tienen al modificar propiedades biofarmacéuticas como la estabilidad, la solubilidad y la velocidad de disolución. Estas propiedades están directamente relacionadas con la biodisponibilidad de los fármacos en el organismo humano y consecuentemente con su actividad terapéutica.²⁵

Dentro de las diferentes fases sólidas de un ingrediente farmacéutico activo podemos encontrar las fases amorfas, sales, solvatos/hidratos, polimorfos y cocristales (figura 5); produciendo así materiales con propiedades que difieran o incluso que mejoren las de los IFAs puros. La cocrystalización es reconocida como una estrategia alternativa para aumentar la cantidad de formas sólidas disponibles de un IFA, obteniendo con ello nuevas fases sólidas con propiedades físicas y biofarmacéuticas distintas.^{26,27}

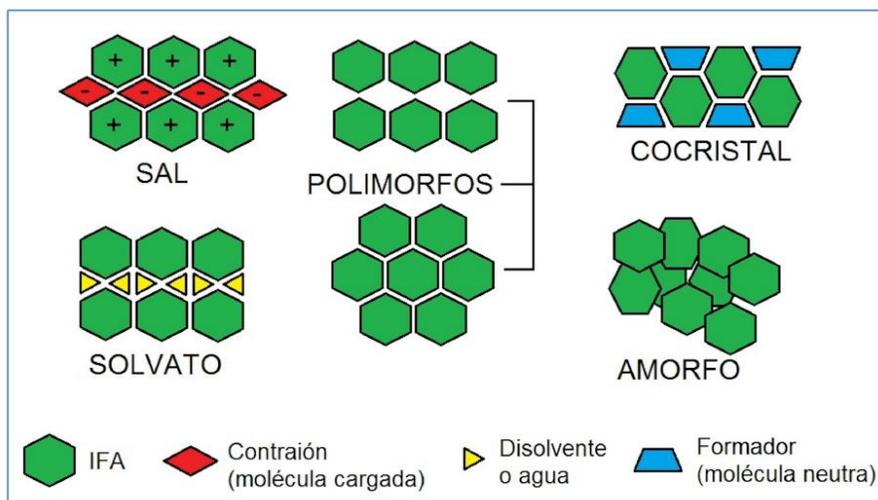


Figura 5. Fases sólidas de un ingrediente farmacéutico activo. Recuperado de Balderas, M. M. S., Lemus, O. Z., Reyna, D. O., & González, J. S. G. (2014). Los cocrystal farmacéuticos: Conceptos generales. In Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. Vol. 80, No. 2, pp. 265-273.

4.1. Cocrystal

Dentro de la literatura, varios parámetros han sido considerados para definir lo que es y lo que no es un cocrystal (tabla 1), sin embargo, una coincidencia general acordada es que todos los cocrystal son materiales cristalinos compuestos de al menos dos componentes diferentes (comúnmente llamados cristales multicomponentes). La problemática reside en la opinión sobre lo que constituye un “componente” ya que suele ser dramáticamente diferente, por otro lado, el uso de “cocrystal farmacéutico” es común y generalmente se aplica cuando un IFA es una de las moléculas en el cristal multicomponente.²⁸

Tabla 1. Definiciones de cocrystal.

Autor	Definición de cocrystal	Referencia
Stahly, G. P.	“un complejo molecular que contiene dos o más moléculas diferentes en la misma red cristalina”	[29]
Aakerøy, C. B.	“Los compuestos contruidos a partir de especies moleculares neutras discretas, todos los sólidos que contienen iones, incluidos los iones complejos de metales de transición, están excluidos” “hechos de reactivos que son sólidos en condiciones ambientales” “material cristalino”	[30]

	estructuralmente homogéneo que contiene dos o más bloques de construcción neutros que están presentes en cantidades estequiométricas definidas”	
Zaworotko, M. J.	“se forman entre un API molecular o iónico y un formador de cocristales que es sólido en condiciones ambientales”	[31]

Los cocristales representan una forma útil de cambiar las propiedades de un cristal dado, eligiendo un coformador adecuado que formará enlaces no covalentes específicos para producir una arquitectura supramolecular diseñada. Por lo tanto, este método permite modificar la biodisponibilidad de un fármaco generando cambios en sus propiedades fisicoquímicas, tales como modificaciones en su velocidad de disolución o estabilidad térmica. Las posibles aplicaciones de los cocristales los hacen de gran interés para la comunidad científica y particularmente entre aquellos involucrados en la ingeniería de cristales.²⁸

5. Nuevas fases sólidas de praziquantel

En nuestro grupo de investigación se han obtenido fases sólidas cocrystalinas de PZQ usando ácidos dicarboxílicos alifáticos y análogos insaturados de ácido succínico como formadores de cocrystal, por medio de molienda asistida con disolvente.⁹

Se han estudiado cocristales de PZQ, como por ejemplo el cocrystal formando por el enantiómero (*R*)-PZQ con ácido *L*-Málico ((*R*)-PZQ:LMA) que presentó una ventaja considerable en el perfil de disolución intrínseca en comparación con *RS*-PZQ. Previamente, Delgado A. documentó las propiedades físicas y biofarmacéuticas de otros cocristales de PZQ obtenidos con ácidos alifáticos, sus hallazgos se resumen en la tabla 2.^{32,33}

Tabla 2. Resumen del análisis del proceso de disolución de PZQ y algunos cocrystalos con ácidos alifáticos.

k_d = constante de disolución intrínseca, r = coeficiente de correlación.

	k_d (mg/hr*cm ²)	r
PZQ	1.2	0.98
PZQ-SUC	9.08	0.99
PZQ-GLU	8.4	0.99
PZQ-MALO	12.1	0.99
PZQ-0.5H₂O	1.85	0.99

PZQ-SUC= Praziquantel-Ácido succínico
PZQ-GLU= Praziquantel-Ácido glutárico
PZQ-MALO= Praziquantel-Ácido malónico
PZQ-0.5H₂O= Praziquantel hemihidrato

Recientemente en nuestro grupo de investigación se han obtenido nuevas fases sólidas de PZQ usando como coformadores derivados de ácido benzoico y compuestos nutraceuticos (figura 6), sin embargo, no se cuenta con la caracterización física y biofarmacéutica completa de estas fases.³⁴

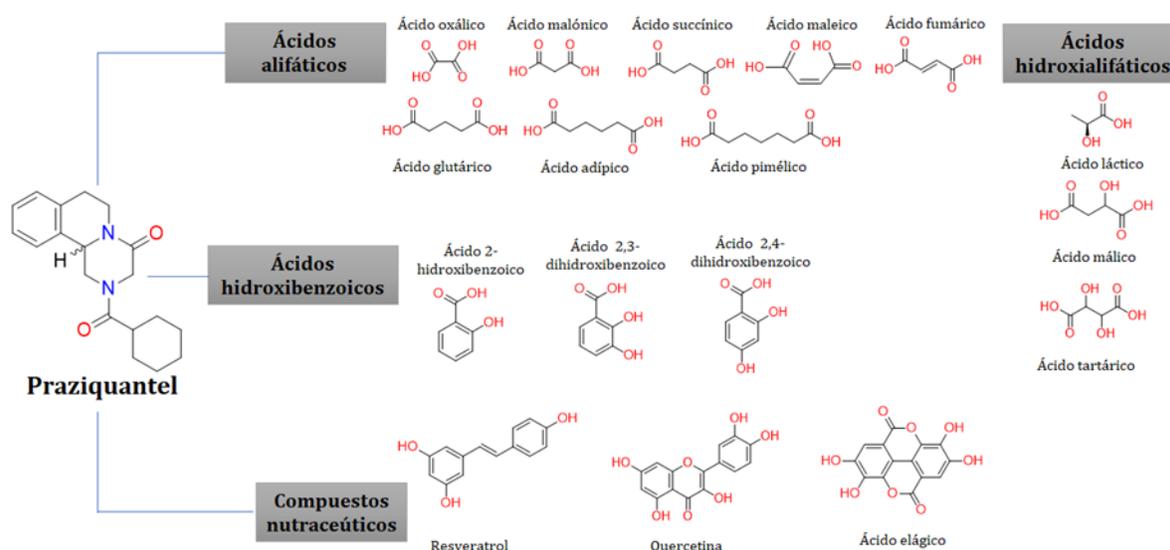


Figura 6. Compuestos químicos que forman fases cocrystalinas con el IFA PZQ. Recuperado de Salas, Z. R. (2019).³⁴

En este proyecto se seleccionaron las fases sólidas obtenidas con ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico) y 2,4-dihidroxibenzoico para evaluar las diferencias en sus propiedades físicas y biofarmacéuticas en comparación con PZQ y contrastando además estas propiedades con las obtenidas para las fases de cocrystal de PZQ con compuestos alifáticos. Se descartó el uso del ácido 2,3-dihidroxibenzoico debido al polimorfismo que presentó el cocrystal obtenido en estudios previos.³⁴

6. Ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxilo (grupo ácido) y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático. Muchos estudios han informado de la actividad biológica de los ácidos hidroxibenzoicos. Dentro de la amplia gama de este tipo de compuestos se encuentran el ácido 2-hidroxibenzoico o salicílico (2HBA) y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4DHBA) los cuales fueron usados como coformadores o formadores de cocrystal en este trabajo.³⁵

Los ácidos hidroxibenzoicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica y de perfumería. En su caso los ácidos dihidroxibenzoicos son materiales importantes en la producción de desinfectantes, fármacos antipiréticos y en la síntesis de compuestos orgánicos tales como resinas, poliésteres, plastificantes, colorantes y productos químicos de caucho.³⁶

6.1. Ácido 2-hidroxibenzoico

El ácido 2-hidroxibenzoico (figura 7) es también conocido como ácido ortohidroxibenzoico o por su nombre genérico, ácido salicílico. Es una de las moléculas más conocidas en el mundo por sus propiedades antipiréticas, antiinflamatorias y de analgesia además de poseer propiedades queratolíticas y antimicrobianas, ampliamente empleado en dermatología. Ayuda a tratar muchas enfermedades inflamatorias, de igual forma se utiliza en la prevención de enfermedades coronarias, ataques cardíacos y en la supresión de tumores.³⁷⁻⁴⁰

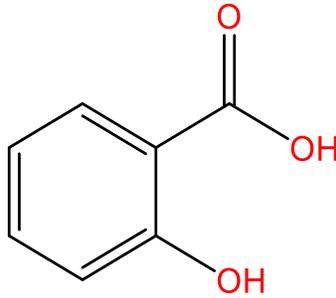


Figura 7. Estructura química del ácido 2-hidroxibenzoico.

La forma sólida de 2HBA consiste en un polvo cristalino blanco o casi blanco, el cual posee un peso molecular de 138.1 g/mol y un punto de fusión de 159°C. Presenta una solubilidad en agua de 2.24 mg/mL siendo soluble también en etanol y acetona, y resulta ser insoluble en éter, benceno y aceites.⁴¹

Debido a la severa irritación gástrica que causa, el ácido salicílico ya no se administra por vía oral, en su caso suele administrarse en su forma acetilada como ácido acetilsalicílico. Puede encontrarse además para su aplicación tópica con una concentración que va desde el 1 hasta el 6% de fármaco, se absorbe bien tras su aplicación y se elimina lentamente en la orina. En general se absorbe y se distribuye rápidamente por todo el cuerpo. Se metaboliza por conjugación con ácido glucurónico y glicina para formar ácido salicilúrico, salicil O-glucoronido y salicil éster glucuronido. Se excreta en la orina como fármaco y metabolitos.⁴²

6.2. Ácido 2,4-dihidroxibenzoico

Denominado también como ácido β -resorcílico (figura 8), es un compuesto fitoquímico que se encuentra en algunos alimentos como el aguacate y en algunas bebidas como el café y el vino, se puede formar a partir de polifenoles tales como flavonoides por la acción de bacterias intestinales. Debido a que es un compuesto fenólico hidroxilado, puede eliminar oxidantes como los radicales libres a través de sus grupos hidroxilo. Su importancia se ve reducida debido a que es un compuesto que esencialmente puede eliminar solo uno o dos oxidantes fuertes.⁴³

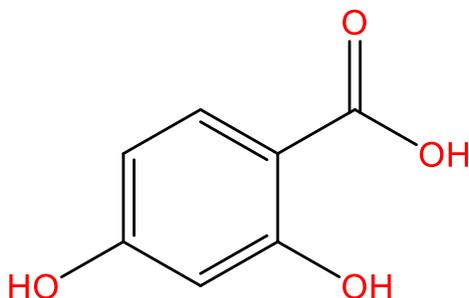


Figura 8. Estructura química del ácido 2,4-dihidroxibenzoico.

El 24DHBA se encuentra en forma sólida, posee un peso molecular de 154.121 g/mol y un punto de fusión de 226°C. Tiene una solubilidad en agua de 5.78 mg/mL.⁴⁴

7. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS FASES SÓLIDAS

La cristalografía, incluyendo la difracción de rayos-X de polvo y monocristal, DRXP y DRXMC, respectivamente; así como las técnicas de espectroscopía (vibracional y magnética), microscopía, análisis térmico (análisis térmico diferencial (DTA)), calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA) entre otras técnicas físicas son las principalmente utilizadas, solas o en combinación, para caracterizar formas sólidas novedosas y para examinar las interacciones moleculares de sales y cocristales en estado sólido.⁴⁵

7.1. Difracción de rayos-X de polvos

Muchos fármacos pueden ser preparados sólo como polvos microcristalinos. Además, durante una evaluación de rutina de un IFA, generalmente es suficiente establecer la forma polimórfica o verificar la formación de una sal o cocrystal. Por esta razón, y debido a que se trata de una técnica no destructiva, la DRXP es la herramienta predominante para el estudio y la caracterización de formas policristalinas de una fase sólida.⁴⁶

El análisis sucede cuando un haz estrecho de rayos-X pasa a través de la muestra. La longitud de onda de los rayos-X es del orden de la distancia entre las moléculas en la red cristalina y, por lo tanto, la muestra actúa como una rejilla de difracción. La difracción ocurre en los ángulos correspondientes a la ecuación de Bragg. En 1913

W. H. y W. L. Bragg mostraron que la difracción de un cristal se describe mediante la ecuación ahora conocida como la ley de Bragg: $n\lambda = 2d\sin\theta$ donde; λ es la longitud de onda de los rayos-X en Å, d es la separación entre los planos de reflexión en Å y θ es el ángulo entre el haz de rayos-X monocromático y el plano de reflexión correspondiente (Figura 9). Los datos obtenidos corresponden a un patrón de picos que se relaciona con los planos de la red cristalina y algunas características del arreglo en tres dimensiones de los átomos en la red cristalina.^{47,48}

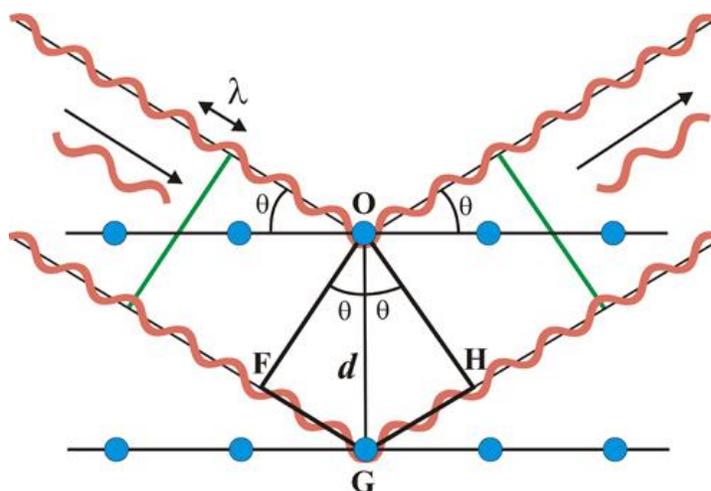


Figura 9. Representación de la Ley de Bragg.

7.2. Difracción de rayos-X de monocristal

DRXMC es la principal fuente de información sobre la estructura geométrica de las moléculas y los sólidos moleculares, incluidas las distancias de enlace -y, por lo tanto, los órdenes de enlace-, los ángulos de enlace, las formas de los poliedros de coordinación, las conformaciones de moléculas flexibles y los contactos intermoleculares. El principio general entre esta técnica y la DRXP es la misma, en este caso se hace incidir un haz de rayos-X sobre un monocristal, los datos obtenidos corresponden a un patrón bidimensional de puntos que está relacionado con los planos de la red cristalina. La disposición tridimensional de los átomos en la celda unitaria se puede resolver a partir de estos datos.^{48,49}

7.3. Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja es una técnica basada en las vibraciones de los átomos de una molécula y funciona de acuerdo con el principio de que una muestra se irradia con un espectro de luz infrarroja, de la cual una fracción de esa luz será absorbida por la muestra. Los espectros infrarrojos se adquieren utilizando el modo de transmisión o absorción. Los rangos de absorción para la espectroscopía infrarroja se pueden dividir en dos secciones, la región de 400–1000 cm^{-1} se describe como la región de huellas digitales del espectro, y generalmente es exclusiva de un compuesto molecular específico. La región de 4000–1000 cm^{-1} se define para grupos funcionales específicos como cetonas, aldehídos, ésteres y ácidos carboxílicos.^{48,50}

7.4. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido es una de las técnicas analíticas más comunes utilizadas para caracterizar sólidos farmacéuticos. En esta técnica, una muestra y una referencia se calientan simultáneamente mientras se mantienen ambas a la misma temperatura. Se monitorea la cantidad de energía requerida para calentar tanto la muestra como la referencia. La capacidad calorífica de la muestra permanecerá constante durante el análisis a menos que sufra un cambio de fase. Los resultados de esta prueba son relativamente fáciles de interpretar para materiales puros, y el instrumento es relativamente económico y fácil de usar.⁴⁸

7.5. Análisis termogravimétrico

En el análisis termogravimétrico, una muestra en un recipiente abierto se calienta a una velocidad específica, y se controla el peso ganado o perdido por la muestra. La técnica se utiliza principalmente para controlar la pérdida de disolvente o las reacciones de descomposición. A menudo se usa junto con *DSC* para comparar la entalpía de las transiciones con la ganancia o pérdida de peso resultante. La velocidad de calentamiento es típicamente comparable a la utilizada para *DSC*.⁴⁸

8. EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA

La disponibilidad biológica de un medicamento es el resultado de muchos procesos. Factores como la baja solubilidad, la velocidad de disolución o liberación lenta, la baja permeabilidad, la degradación gastrointestinal y la biotransformación rápida pueden contribuir a la baja disponibilidad. La experiencia ha demostrado que estos factores pueden estudiarse individualmente y que se pueden anticipar muchos posibles problemas antes de que el medicamento llegue a la clínica.⁵¹

La relación entre las propiedades fisicoquímicas de un medicamento en una forma de dosificación y la respuesta biológica (como consecuencia de su biodisponibilidad) después de su administración es el tema de un área de investigación de medicamentos conocida como biofarmacéutica. Para evaluar esta respuesta biológica es necesario realizar distintos tipos de pruebas o análisis, como pruebas de estabilidad de fase, estabilidad indicativa o pruebas de disolución, las cuales evidenciarán el comportamiento que podría llegar a tener el fármaco dentro del organismo antes de ser comercializado. Otras herramientas de gran utilidad en el estudio de un IFA es la aplicación de conceptos farmacocinéticos como el área bajo la curva (ABC) la cual es una forma de representar el cambio de concentración mediante el uso de una gráfica representando la concentración del fármaco contra el tiempo, proveyendo datos de relevancia en el estudio de distintos IFAs.^{51,52}

8.1. Estabilidad de fase e indicativa

El análisis de estabilidad de fase permite determinar si una fase cristalina es estable o se transforma a otra al entrar en contacto con medios acuosos durante un periodo determinado de tiempo. Este estudio se realiza con una muestra usando agitación a temperatura constante en un medio acuoso durante diferentes tiempos.⁵³

Por otro lado, el análisis de estabilidad indicativa ayuda a determinar si una fase cristalina se mantiene estable bajo distintas condiciones de temperatura y humedad. Esto puede ayudar a establecer posteriormente las condiciones de almacenamiento, transporte e incluso el mejor sistema contenedor-cierre de un medicamento.⁵⁴

De acuerdo con la NOM-073-SSA1-2015 para la República Mexicana la Zona Climática II (subtropical, con posible humedad elevada) es la correspondiente para realizar estos estudios conforme a la clasificación que marca la Organización Mundial de la Salud.⁵⁴

8.2. Prueba de disolución de polvos

Hay una serie de consideraciones al discutir los datos de solubilización de polvos. Si las fases en estudio no se transforman en una solución supersaturada, por ejemplo, un cocrystal a sus materias primas, es posible cuantificar la solubilidad al equilibrio de la fase cocrystalina. Para la solubilidad al equilibrio, se toman una serie de puntos de tiempo y mediciones para asegurar que la solución haya alcanzado el equilibrio como lo demuestra una meseta en los datos de concentración. El primero es el equilibrio versus las mediciones de solubilidad cinética (o aparente). Los valores de solubilidad cinética son valores aproximados generalmente basados en una medición en un punto de tiempo.

El tiempo requerido para alcanzar la solubilidad de una fase también puede ser un factor de desarrollo basado en el tiempo de residencia en el estómago y los intestinos. Es deseable que el fármaco se disuelva mientras está en el tracto gastrointestinal, y tiempos de disolución muy largos pueden dar como resultado una menor absorción del fármaco. Las velocidades de disolución del polvo también pueden depender del tamaño de partícula; por lo tanto, para controlar este parámetro se recomienda realizar la estimación de la velocidad de disolución intrínseca.⁵

8.3. Velocidad de disolución intrínseca

La disolución intrínseca es la disolución de una sustancia activa pura, y la determinación de la velocidad de disolución es un factor importante durante el desarrollo de nuevas moléculas o fases sólidas, a pesar de esto se deben considerar varios factores y se pueden necesitar experimentos adicionales para obtener e interpretar correctamente los datos de la prueba en los cocrystalos.⁵

La velocidad de disolución intrínseca (VDI) se define como la velocidad de disolución de una sustancia activa pura, donde las condiciones de superficie,

temperatura, agitación, pH del medio y fuerza iónica son constantes. Por lo tanto, es posible obtener datos sobre la influencia de la naturaleza química de la fase, en la velocidad del proceso de disolución del fármaco. Esta información está relacionada con la variabilidad de la materia prima disponible en el mercado, que resulta de procesos de síntesis distintivos, especialmente en las etapas finales de cristalización, y puede conducir, por ejemplo, grados de hidratación, hábitos y formas cristalinas para un solo medicamento.⁵⁵

JUSTIFICACIÓN

La baja solubilidad acuosa de PZQ es uno de los factores que limita su biodisponibilidad oral y conlleva al uso de sistemas de alta dosificación en el tratamiento de parasitosis con este fármaco. Se ha demostrado que el uso de cocristales farmacéuticos puede mejorar las propiedades físicas y biofarmacéuticas de fármacos que presentan una baja solubilidad acuosa. En investigaciones previas se observó que cocristales con ácidos alifáticos como formador de cocrystal mostraban una ventaja en el perfil de disolución intrínseca de PZQ en comparación con el IFA puro.

En nuestro grupo de investigación se amplió la búsqueda de nuevas fases sólidas usando derivados de ácido benzoico, tales como el ácido 2-hidroxibenzoico, ácido 2,3-dihidroxibenzoico y ácido 2,4-dihidroxibenzoico, este trabajo pretende reproducir las nuevas fases sólidas de praziquantel usando como formadores de cocrystal los ácidos 2-hidroxibenzoico y 2,4-dihidroxibenzoico y evaluar el cambio de las propiedades físicas y biofarmacéuticas en comparación con las fases cristalinas con compuestos alifáticos reportadas previamente y con el fármaco en su estado puro.

HIPÓTESIS

Si las nuevas fases sólidas de PZQ usando como formadores de cocrystal los ácidos 2-hidroxibenzóico y 2,4-dihidroxibenzoico presentan propiedades físicas distintas a las ya reportadas, entonces se observará un cambio en las propiedades biofarmacéuticas de éstas en comparación con otros cocristales con compuestos alifáticos y con el praziquantel en su estado puro.

OBJETIVOS

Objetivo general

Reproducir y caracterizar nuevas fases sólidas cocrystalinas de praziquantel usando ácidos hidroxibenzoicos como formadores de cocrystal y evaluar la modificación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de estas.

Objetivos específicos

- Reproducir la obtención de los cocrystalos de PZQ con ácidos hidroxibenzoicos por molienda asistida con disolvente.
- Caracterizar las fases sólidas obtenidas mediante técnicas de difracción de rayos X de polvos (DRXP) y monocristal (DRXMC), espectroscopía infrarroja (IR) y calorimetría diferencial de barrido acoplada a termogravimetría (DSC-TGA).
- Escalar en factor de 1:10 las fases sólidas por molienda asistida con disolvente.
- Reproducir y validar el método de cuantificación de PZQ y los formadores de cocrystal por cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*, por sus siglas en inglés).
- Evaluar las propiedades biofarmacéuticas de las fases generadas: estabilidad de fase e indicativa, velocidad de disolución intrínseca y disolución de polvos.
- Determinar si existe una ventaja biofarmacéutica de los cocrystalos obtenidos sobre fases obtenidas previamente en el grupo de investigación con ácidos alifáticos.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

1. Materiales

Los reactivos utilizados se enlistan a continuación:

- (*R,S*) Praziquantel, Sigma-Aldrich P4668, lote: 066M4779V.
- Ácido 2-hidroxibenzoico (salicílico) $\geq 99\%$, Sigma S5922, lote: MKBB3917.
- Acido 2.4-dihidroxibenzoico 97%, Aldrich D109401, lote: 30398PJ.
- Fosfato monobásico de potasio anhidro $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich 795488, lote: SLB8129.
- Fosfato dibásico de potasio anhidro $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich 795496, lote: SLBR8555V.

Los disolventes acetona y acetonitrilo se adquirieron en J. T. Baker, así como el ácido clorhídrico. El etanol provenía de Merck KGaA.

Soluciones utilizadas:

- El medio de HCl pH 1.2 utilizado en las pruebas de disolución se preparó con agua desionizada a una concentración 0.1 N.
- La solución CH₃CN:HCl pH 1.2 utilizada en el análisis por *HPLC* se preparó en una proporción 50:50 v/v con el medio HCl pH 1.2 previamente descrito.
- El medio *PBS* pH 6 utilizado en las pruebas de disolución se preparó con agua desionizada y una mezcla de K₂HPO₄ y KH₂PO₄ en proporciones adecuadas para obtener el pH requerido.

2. Selección de cocristales a evaluar

Recientemente en nuestro grupo de investigación se obtuvieron fases sólidas de PZQ usando derivados de ácido benzoico como formadores de cocrystal, sin embargo, no se evaluaron las propiedades biofarmacéuticas. Las fases se obtuvieron con ácido 2-hidroxibenzoico, 2,3-dihidroxibenzoico y 2,4-dihidroxibenzoico. Se descartó el análisis de la fase con ácido 2,3-dihidroxibenzoico

debido a que se encontró transformación polimórfica de la fase obtenida, lo cual dificultaba su reproducibilidad y desarrollo.³⁴

3. MÉTODOS

3.1. Síntesis y escalamiento de cocristales de PZQ

La síntesis de los cocristales se llevó a cabo por medio de la técnica de molienda asistida con gota de disolvente. Inicialmente se prepararon 50 mg de cocrystal de PZQ con cada uno de los coformadores, ambos en estequiometría 1:1, se adicionó en cada caso 20 μ L de acetona y se molieron a 25 Hz durante 10 minutos en contenedores de 2 mL de acero inoxidable de molino Retsch® MM400. Posteriormente las muestras obtenidas se caracterizaron por DRXP, DSC y TGA.⁹

Para el escalado de las muestras, se prepararon por duplicado 500 mg de cocrystal (1 gramo en total) de PZQ con cada uno de los coformadores utilizando los contenedores de 5 mL del molino Retsch® MM400 y adicionando en cada caso 100 μ L de acetona, se molieron a 25 Hz durante 10 minutos. Las muestras obtenidas se caracterizaron mediante DRXP.

3.2. Caracterización física

3.2.1. Difracción de rayos x de polvos

El análisis por difracción de rayos x de polvos se realizó en un difractómetro BRUKER D8-ADVANCE con detector LynxEye ($\lambda_{\text{CuK}\alpha 1} = 1.5406 \text{ \AA}$, monocromador de germanio). El equipo se utilizó a 40 kV y 40 mA, los datos fueron obtenidos a temperatura ambiente en un rango $2\theta = 5\text{-}45^\circ$.

3.2.2. Difracción de rayos x de monocristal

Este proceso se llevó a cabo en un difractómetro Agilent Technologies SuperNova equipado con un detector con un área CCD (EosS2) usando radiación de Mo-K α ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$) a partir de una fuente de rayos-X con microfoco y un enfriador Oxford Instruments Cryojet.

3.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las mediciones fueron realizadas usando el equipo TGA Q50 TA Instrument. Las muestras de aproximadamente 3 mg fueron colocadas en crisoles de aluminio y analizadas en un rango de temperatura de 25-450°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se utilizó nitrógeno como gas de purga inerte con un flujo de 50 mL/min.

3.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis se llevó a cabo con el equipo SDT Q2000 TA Instrument. Se colocaron muestras de alrededor de 3 mg en crisoles de aluminio y analizadas en un rango de temperatura de 25-450°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se utilizó nitrógeno como gas de purga inerte con un flujo de 50mL/min.

3.2.5. Espectroscopía de infrarrojo

El análisis se realizó en un espectrofotómetro ThermoScientific FT-IR-NICOLET 6700 en un rango de número de onda de 4000-400 cm^{-1} , utilizando el accesorio de muestreo ATR ThermoScientific Smart iTR de diamante.

3.3. Evaluación biofarmacéutica

3.3.1. Estabilidad indicativa

Para esta prueba se usaron 30 mg de las materias primas (PZQ, 2HBA y 24DHBA) y los cocristales (PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA), incubando las muestras a condiciones de temperatura y humedad controlada por triplicado durante un mes. La prueba se realizó en cámaras de atmósfera controlada en las instalaciones de Laboratorios Senosiain S.A. de C.V. Las condiciones utilizadas fueron:

- 40°C calor seco/ 0% humedad relativa
- 50°C calor seco/ 0% humedad relativa
- 40°C calor seco/75% humedad relativa

Una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron analizadas por DRXP.

3.3.2. Transformación de fase en medio acuoso

La evaluación de la transformación de fase de cada cocrystal se estudió colocando 100 mg de sólido en una solución acuosa (HCl pH 1.2) con agitación constante a una temperatura de 37°C durante 24 h. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se filtraron (utilizando swinex con papel Whatman número 3), el sólido remanente se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se analizó por DRXP.

3.3.3. Método de cuantificación de PZQ

Con la finalidad de conocer las concentraciones de PZQ en las pruebas de disolución, se estableció un método de cuantificación específico para el IFA y los coformadores. Debido a que los formadores de cocrystal absorben en el espectro UV-Vis presentando máximos de absorción que traslapan con el espectro del fármaco, se decidió utilizar el método de cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación del PZQ. Se utilizó un equipo HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity II. El método considera el uso de una fase móvil compuesta de CH₃CN:HCl pH 1.2 en una proporción 50:50 con una velocidad de flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL. Se utilizó una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18

(4.6x150 mm, 5 μ m) y un detector G7117A 1290 DAD FS establecido a 210, 257 y 300 nm para cuantificar PZQ, 24DHBA y 2HBA, respectivamente.

Los parámetros de validación evaluados fueron linealidad, precisión, selectividad, límite de detección y límite de cuantificación, de acuerdo con lo establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos.⁵⁶ Se evaluó la adecuabilidad del sistema cromatográfico y posteriormente se prepararon curvas de cuantificación a partir de una solución stock de concentración 1 mg/mL. En la tabla 3 se puede observar el volumen requerido para la obtención de cada uno de los puntos de la curva de PZQ, en el anexo 1 presentado al final de este documento, se muestran las cantidades empleadas para la preparación de las curvas de PZQ-2HBA y PZQ-24DHBA.

Tabla 3. Concentraciones de la curva de cuantificación empleada.

Concentración de PZQ (μ g/mL)	Volumen de stock (μ L)	Volumen final (mL)
10	100	10
20	200	10
30	300	10
40	400	10
50	500	10

3.3.4. Prueba de disolución intrínseca

Para la determinación del perfil de disolución intrínseca se pesaron 130 mg de muestra (fármaco o cocrystal) posteriormente se colocaron dentro de una matriz del aparato de Wood y se comprimieron en una prensa hidráulica Zhermack, C305800 PO3 a 30 psi durante 30 segundos. Para esta prueba se utilizó el aparato de disolución VARIAN, VK7010, se usaron 300 mL de medio de disolución (HCl pH 1.2 ó PBS pH 6.0) a 37°C y una velocidad de 100 rpm. Se tomaron muestras de 3 mL a los tiempos 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 h haciendo la respectiva reposición de medio en cada caso. Posteriormente las muestras fueron filtradas con filtros de membrana HVLP de 0.45 μ m para su posterior análisis por HPLC. La prueba se realizó por triplicado.

3.3.5. Prueba de disolución de polvos

Se evaluó a través de experimentos en condiciones supersaturadas (*no-sink*) en un equipo personal Reaction Station J-KEM Scientific (figura 10). Se colocó un tubo de vidrio de 50 mL que contenía 200 mg de PZQ o cocrystal y en seguida se adicionaron 10 mL del medio de disolución (PBS pH 6) y se mantuvo en agitación constante a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. En intervalos de tiempo predeterminados (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 45, 60, 75, 90 min) se tomó una muestra de aproximadamente 2 mL que fue filtrada y diluida para su cuantificación por el método de HPLC, el volumen equivalente de cada muestra tomada fue repuesto. La prueba se realizó por triplicado para cada experimento.

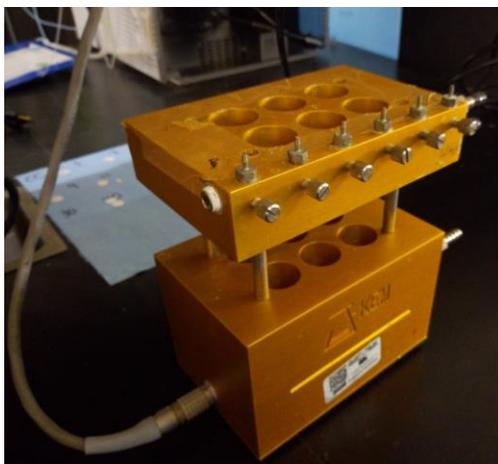


Figura 10. Equipo Personal Reaction Station J-KEM Scientific

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención y caracterización de nuevas fases sólidas del praziquantel

Inicialmente se llevó a cabo la caracterización de praziquantel y de los formadores de cocrystal, así como de las fases cocrystalinas, mediante las técnicas de DRXP, IR y DSC-TGA.

En la figura 11 se presenta el patrón de DRXP, se observan los picos característicos de PZQ en el ángulo de difracción 2θ con valores de 12.85, 15.41, 17.03 y 20.10. Para 2HBA se observan los picos a 2θ de 10.97, 17.29, 25.39 y 28.80 y para 24DHBA se observan picos característicos en valores 2θ de 13.88, 16.49, 25.53, 27.17, 28.29 y 28.44. Se compararon los patrones de difracción de ambos coformadores con el patrón simulado a partir de los datos cristalográficos de la base de datos de Cambridge, confirmando que 2HBA (anexo 2) se encuentra en su forma anhidra. De igual forma se compararon los patrones del coformador 24DHBA y se observó que también se encuentra en su forma anhidra (anexo 3).

La espectroscopía infrarroja se emplea ampliamente para el reconocimiento y el análisis cuantitativo de unidades estructurales en compuestos desconocidos, también se puede utilizar para obtener datos fundamentales sobre la mecánica de las moléculas simples. Se obtuvieron los espectros IR de PZQ, 2HBA y 24DHBA, los cuales se presentan en la figura 12. Observamos que el espectro IR correspondiente a PZQ presenta bandas a los números de onda de 1623 y 1647 cm^{-1} , que corresponden a vibraciones de los grupos carbonilos (C=O). Por otro lado, en el caso del 2HBA se muestra una banda a un número de onda de 1652 cm^{-1} atribuido al enlace C=O y una banda a 3231 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo hidroxilo (OH) del anillo bencénico. En el espectro correspondiente al espectro de 24DHBA se presenta una banda a 1628 cm^{-1} la cual corresponde a vibraciones y estiramientos del enlace C=O y una señal a 3360 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de los grupos OH. Estas señales son de importancia debido a que, al ser grupos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, se espera una modificación en el número de onda debido a la generación de un cocrystal por la potencial interacción de dichos grupos funcionales.^{57,58}

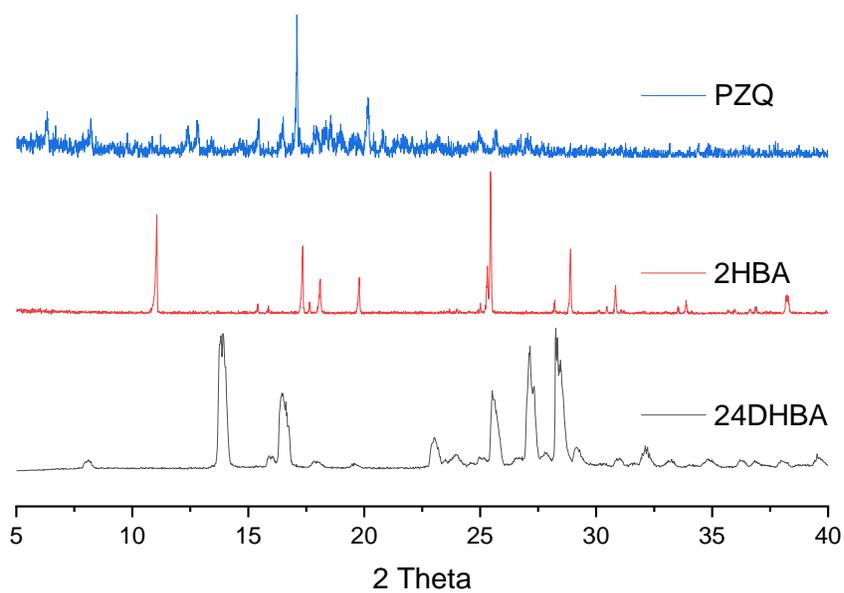


Figura 11. Patrón de DRXP de las materias primas PZQ, 2HBA y 24DHBA.

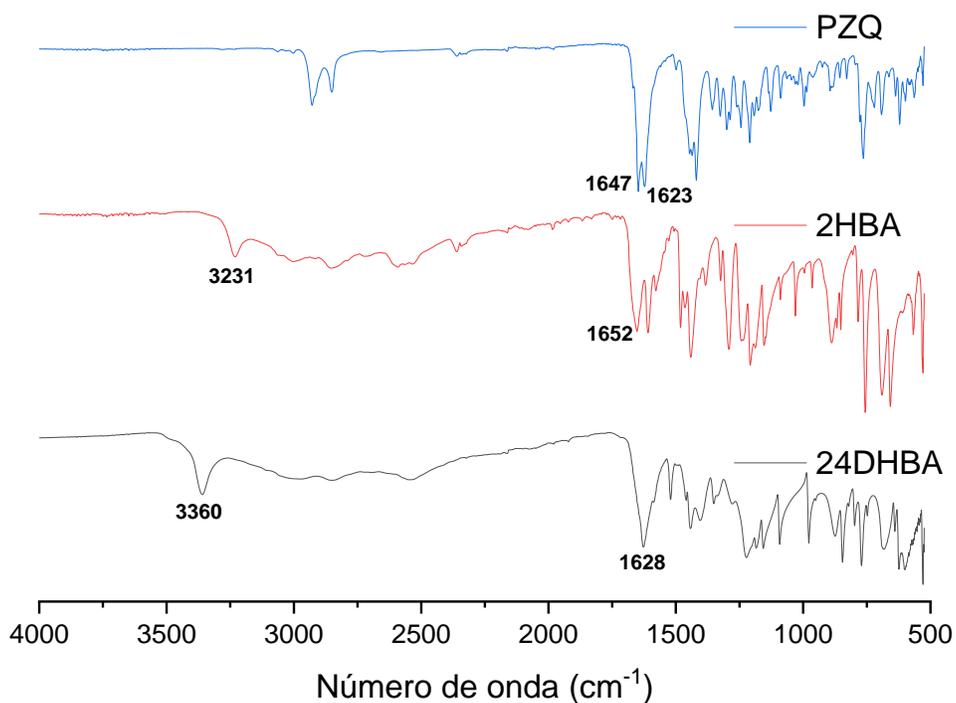


Figura 12. Espectros IR de PZQ, 2HBA y 24DHBA.

La calorimetría diferencial de barrido se ha utilizado para caracterizar las propiedades físicas de los materiales farmacéuticos, incluyendo punto de fusión o la capacidad de calor específica, en este proceso se ilustra el flujo de calor (W/g) en

función de la temperatura en °C. Por otro lado, el análisis termogravimétrico es un método experimental que provee información para caracterizar un sistema (elemento, compuesto o mezcla) midiendo los cambios en el peso que se dan en función del aumento de la temperatura originando así datos de fenómenos físicos como la fusión o fenómenos químicos como la descomposición.^{59,60}

En las figuras 13, 14 y 15 se muestran los diagramas DSC y TGA de PZQ, 2HBA y 24DHBA, respectivamente. El PZQ (figura 13) presenta un evento endotérmico a $T_{peak}=140.92^{\circ}\text{C}$ el cual indica la fusión del sólido que coincide con el punto de fusión del fármaco reportado en la literatura con valores de $136\text{-}140^{\circ}\text{C}$.¹⁹

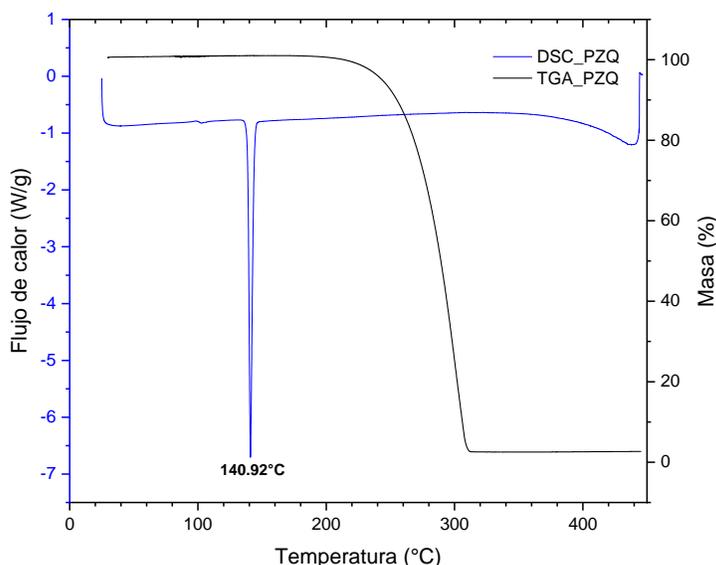


Figura 13. Diagrama DSC-TGA de PZQ.

En el caso de los coformadores, el ácido 2HBA (figura 14) presenta un proceso endotérmico de descomposición a $T_{peak}=159.21^{\circ}\text{C}$ el cual es fácilmente visible tanto en DSC como en TGA, este resultado concuerda con el punto de fusión/descomposición reportado en la literatura para esta molécula. El coformador 24DHBA (figura 15) muestra un pico endotérmico a una $T_{peak}=230.44^{\circ}\text{C}$, el cual corresponde con el punto de fusión/descomposición reportado como se observa en el TGA y está en concordancia con los reportado previamente.^{44,61}

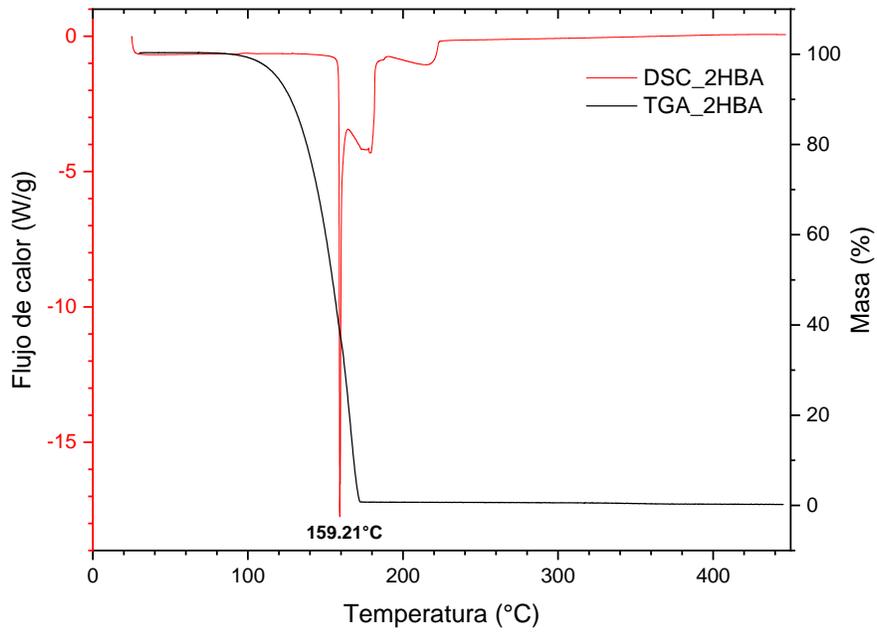


Figura 14. Diagrama DSC-TGA de 2HBA.

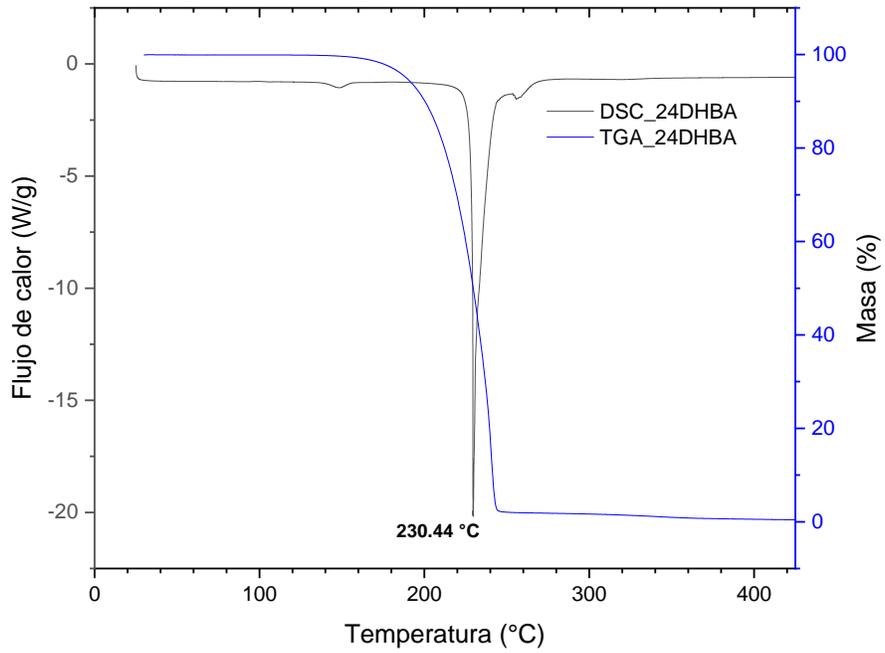


Figura 15. Diagrama DSC-TGA de 24DHBA.

1.1. Cocrystal PZQ-2HBA-H₂O

La fase sólida cocristalina de PZQ usando 2HBA como coformador se reprodujo mediante la técnica de molienda asistida con gota de disolvente, como se obtuvo previamente en el grupo de investigación. Inicialmente se establecieron distintas combinaciones molares de fármaco y coformador para corroborar la relación estequiométrica inicial identificada (1:1) (anexo 4) utilizando acetona como disolvente. En la figura 16 se observa que en la relación molar 1:1 no hay picos de difracción de las materias primas, caso contrario a lo observado cuando se probaron en las relaciones molares 1:2 y 2:1, donde se observó un exceso de coformador y fármaco, respectivamente.³⁴

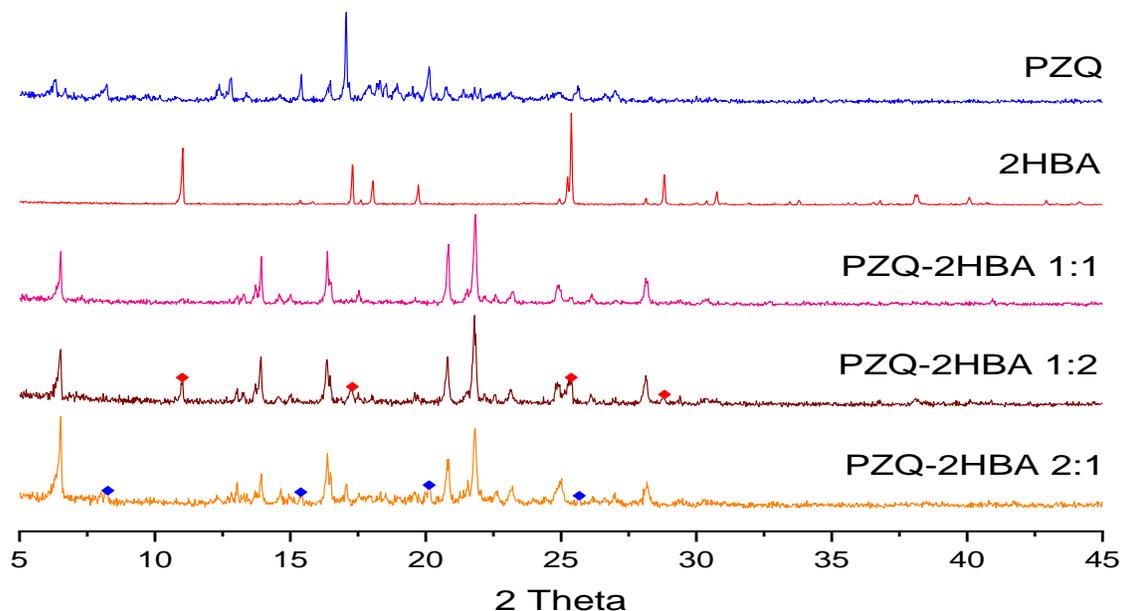


Figura 16. Patrón de DRXP de las relaciones estequiométricas de la fase PZQ-2HBA obtenidas por el método de molienda asistida con gota de disolvente utilizando acetona como disolvente. Los rombos indican los picos de difracción de las materias primas en exceso.

En paralelo al desarrollo de este trabajo de investigación, el cDr. Reynaldo Salas-Zúñiga, logró la elucidación estructural por DRXMC de esta nueva fase sólida. A continuación, se presenta la unidad asimétrica del cocrystal (figura 17), la cual está formada por una molécula de praziquantel y una molécula de ácido 2-hidroxibenzóico, ambas en estado neutro; lo cual confirma la obtención de una fase

cocrystalina en una relación molar 1:1 como se describió anteriormente. Adicionalmente, se observó la presencia de una molécula de agua como parte de la celda unitaria, por lo cual, se establece que se obtuvo una fase cocrystalina monohidratada (PZQ-2HBA-H₂O 1:1:1).³⁴

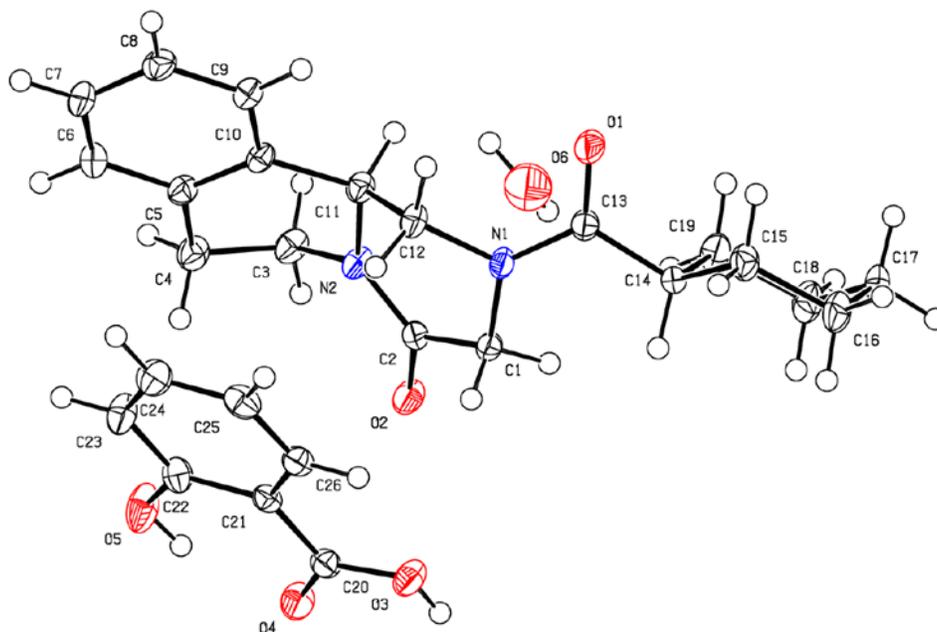


Figura 17. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O 1:1:1 (elipsoides al 50% de probabilidad).

Se comparó el patrón DRXP simulado a partir de los datos cristalográficos del cocrystal monohidrato PZQ-2HBA con el difractograma obtenido experimentalmente en este trabajo (Figura 18), observando que el sólido obtenido experimentalmente tiene picos de difracción idénticos al patrón de DRXP simulado. Este análisis corroboró que la fase sólida obtenida, que se empleó en estudios posteriores, corresponde con la fase monohidratada descrita previamente.

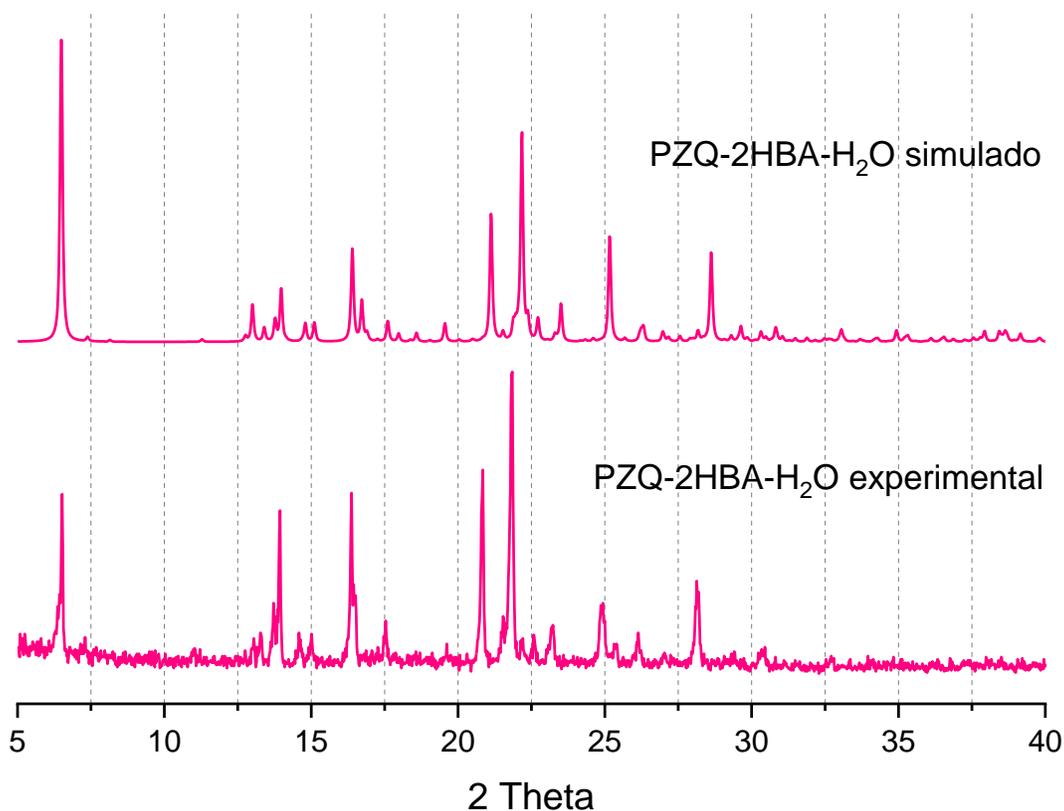


Figura 18. Comparación del patrón DRXP del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O simulado con el experimental.

Adicionalmente se realizó la caracterización por espectroscopía IR del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O, mostrando que existe una modificación en el espectro con respecto a las materias primas. En la figura 19 se observa que las bandas presentes a 1647 y 1623 cm⁻¹ pertenecientes a los grupos carbonilos de PZQ presentan un desplazamiento en una sola banda a 1591 cm⁻¹, y la banda correspondiente al C=O del coformador se desplazó a 1670 cm⁻¹ en el cocrystal. Este comportamiento es similar al observado en cocrystal de PZQ con ácidos dicarboxílicos alifáticos como coformadores, donde se requiere una mayor energía para el estiramiento del enlace C=O del coformador cuando está en fase cocrystalina.⁹

Por otro lado, se observa la aparición de nuevas bandas a números de onda de 3463 y 3536 cm⁻¹ y se atribuye a vibraciones generadas por los grupos OH del ácido 2-hidroxibenzoico y de la molécula de agua presentes en la celda unitaria de este cocrista. Este resultado está en concordancia con el análisis de las interacciones

por puente de hidrógeno presentes entre los grupos funcionales que intervienen en el reconocimiento molecular en la fase cocrystalina, tal como se aprecia en la figura 20.

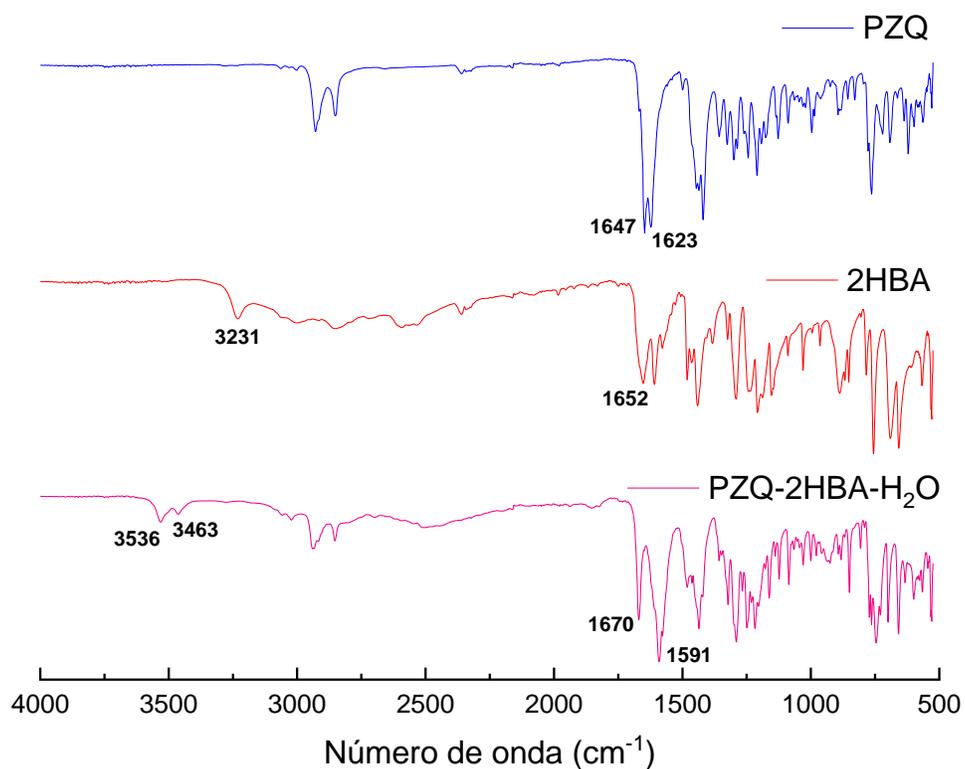


Figura 19. Espectros IR del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O 1:1:1 comparado con las materias primas.

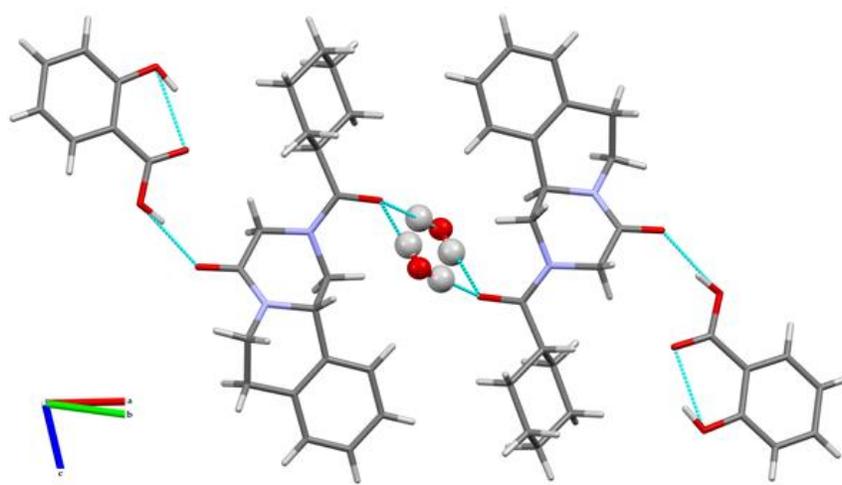


Figura 20. Interacciones por puente de hidrógeno entre las moléculas de PZQ, 2HBA y H₂O presentes en el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O

El análisis termogravimétrico (figura 21) muestra que la pérdida de masa del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O (1:1:1) se lleva a cabo en tres etapas. La primera pérdida consta de aproximadamente el 3.14% de la muestra total en un intervalo de 50-90°C que se atribuye a la pérdida de agua (deshidratación del sólido) lo cual concuerda con el análisis por DRXMC donde se observó la presencia de una molécula de agua en la unidad asimétrica, también concuerda con el porcentaje en peso calculado del agua presente en el sólido (3.84%). Posteriormente se observa una segunda pérdida de masa la cual inicia a 83.46°C hasta 86.88°C (evento endotérmico en la curva DSC) correspondiente a la descomposición del cocrystal.

De acuerdo con el diagrama TGA la descomposición del cocrystal se presenta a una temperatura menor en comparación con el punto de fusión/descomposición de las materias primas que lo conforman, posterior a la pérdida de agua presente en el sólido se observa una segunda pérdida de masa de aproximadamente 29.11% la cual corresponde al peso total de coformador con un porcentaje calculado de 29.48%, finalmente se observa una tercera pérdida la cual consta del 66.25% valor que concuerda con el total del fármaco presente siendo el valor calculado de 66.68% de PZQ.

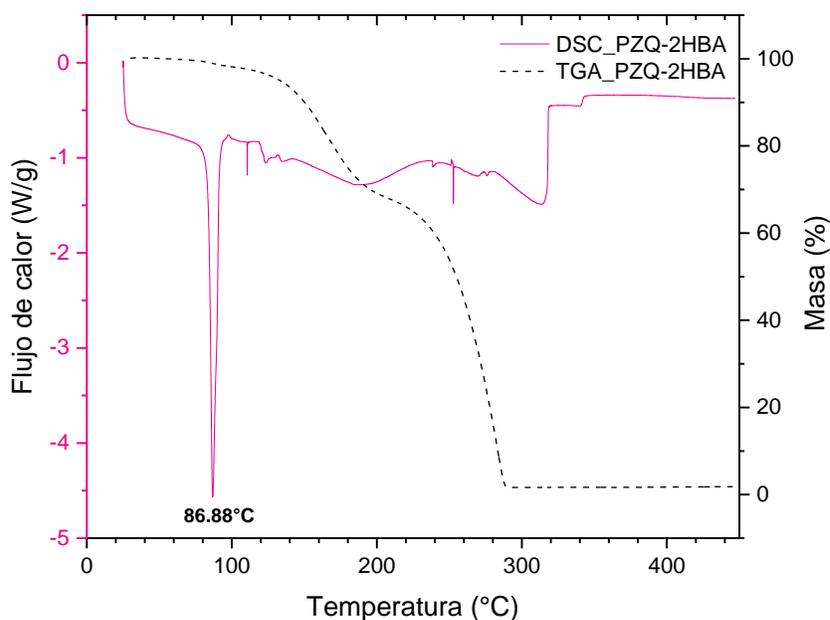


Figura 21. Diagrama DSC-TGA del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O (1:1:1).

1.2. Cocrystal PZQ-24DHBA

En el caso del cocrystal de PZQ con ácido 2,4-dihydroxibenzoico se estableció la relación estequiométrica 1:1. Como se observa en la figura 22 en las estequiometrías 1:2 y 2:1 existe un exceso de coformador y fármaco respectivamente. En la estequiometría 1:1 se observa un patrón nuevo en el que no aparecen picos característicos de las materias de partida y que coincide con el patrón de DRXP del sólido reportado previamente (anexo 5).

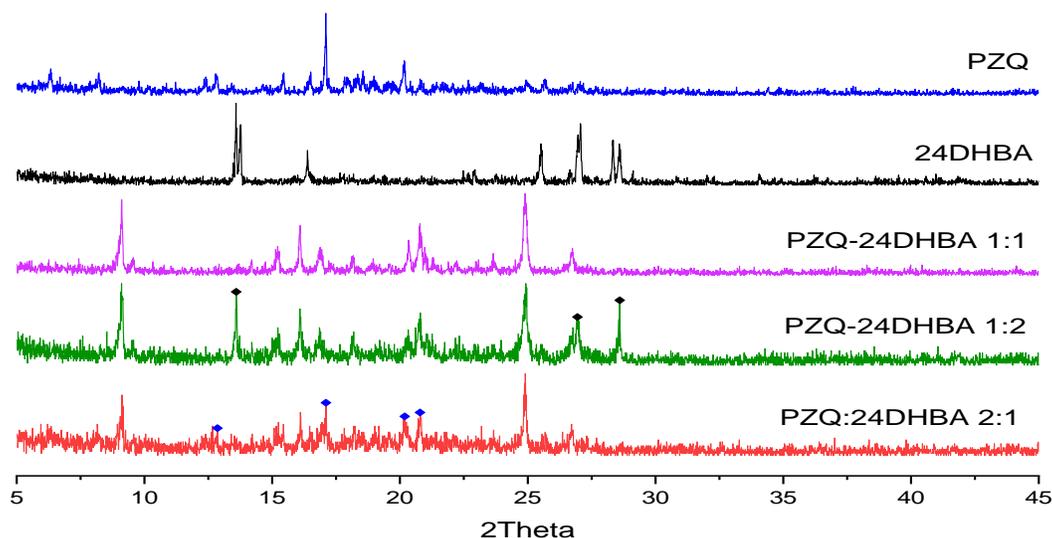


Figura 22. Patrón de DRXP de la fase sólida PZQ-24DHBA en diferentes relaciones estequiométricas y las respectivas materias primas.

La nueva fase sólida PZQ-24DHBA se caracterizó por espectroscopía IR (figura 23). Comparando los espectros IR del fármaco y el coformador se observó que el espectro IR del cocrystal no corresponde a la superposición de los espectros de las materias primas. El espectro IR de la nueva fase sólida PZQ-24DHBA muestra modificaciones en el número de onda correspondientes a las vibraciones de los enlaces C=O hacia un número de onda menor (1602 cm^{-1}) y el desplazamiento de la banda debido al estiramiento del enlace C=O del coformador se desplazó a un mayor número de onda (1651 cm^{-1}), similar al cocrystal hidrato PZQ-2HBA-H₂O. Por otro lado, en el espectro IR del cocrystal se observa un desplazamiento de la banda en número de onda de 3360 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de los grupos OH

pertencientes al coformador a una banda ancha desde 3050 hasta 3400 aproximadamente. Demostrando la participación de los grupos funcionales en las interacciones en la fase cocrystalina, lo cual podría corroborarse con el análisis por DRXMC.

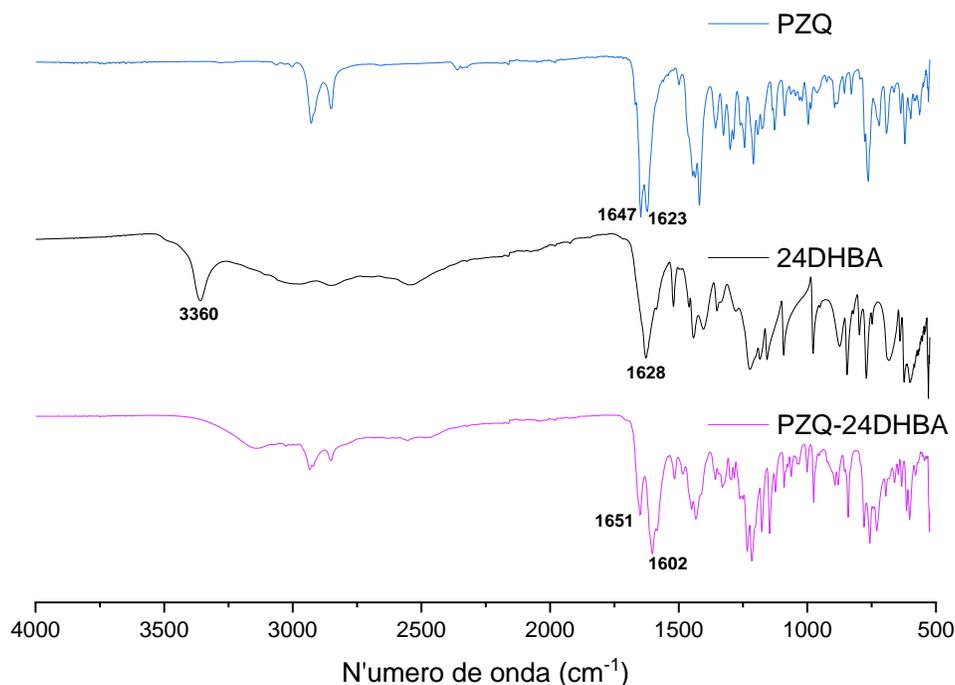


Figura 23. Espectros IR de PZQ, 24DHBA y PZQ-24DHBA (1:1).

El análisis termogravimétrico (figura 24) de la nueva fase sólida PZQ-24DHBA, mostró en el diagrama DSC un proceso endotérmico a una temperatura de 168.93 °C (T_{peak}) que corresponde al punto de fusión del cocrystal. Mientras que en el diagrama TGA se observa una primera pérdida de masa de aproximadamente el 32.19% que concuerda con la cantidad de coformador presente en el sólido (calculado= 33.04%) y una segunda pérdida del 66.10% cantidad que se atribuye a la cantidad de fármaco presente (calculado= 66.96%).

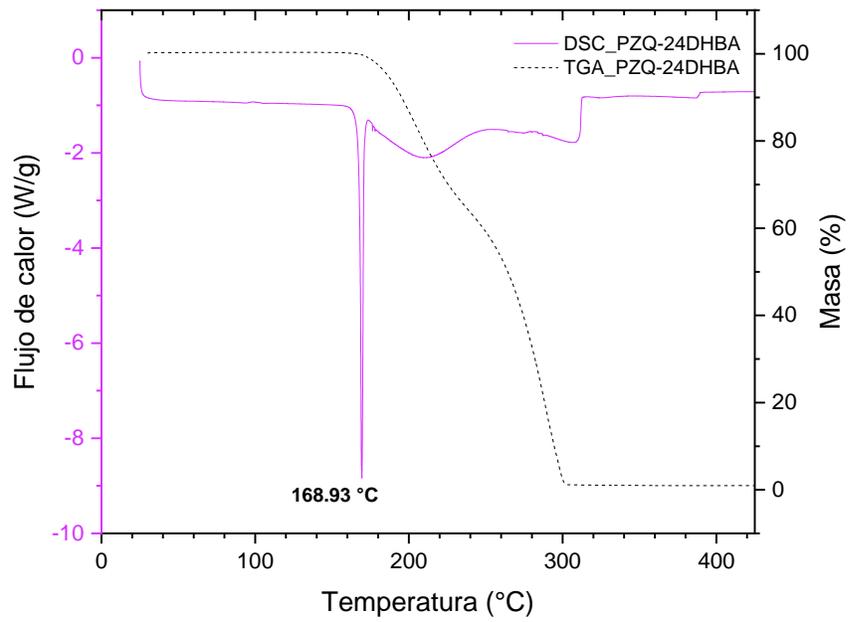


Figura 24. Diagrama DSC-TGA del cocrystal PZQ-24DHBA (1:1).

2. EVALUACIÓN BIOFARMACÉUTICA

2.1. Estabilidad indicativa

Con el propósito de estudiar el comportamiento de los cocrystalos PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA bajo distintas condiciones de temperatura y humedad, los sólidos se sometieron durante 30 días a tres condiciones de temperatura y humedad relativa (HR): a) 40°C, calor seco. b) 50°C, calor seco y c) 40°C, 75% HR. Una vez transcurrido el tiempo las muestras se analizaron por DRXP. En la figura 25 se observa que el patrón de DRXP del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O no muestra cambios y no se observan picos de difracción de las materias primas. Por lo tanto, al no existir transformación en la fase o una degradación en las materias primas de partida se concluye que el cocrystal de PZQ-2HBA-H₂O es estable físicamente bajo estas condiciones.

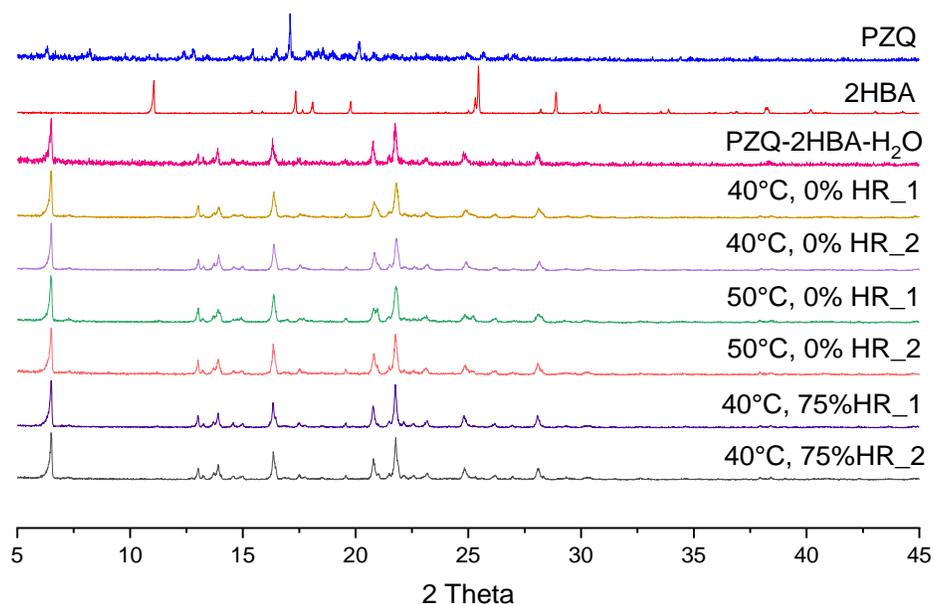


Figura 25. Patrón de DRXP del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O bajo distintas condiciones de temperatura y humedad relativa.

Un comportamiento similar al cocrystal PZQ-2HBA-H₂O se observó en los estudios de estabilidad indicativa del cocrystal PZQ-24DHBA. En la figura 26, se presenta la comparación del patrón de DRXP de las muestras obtenidas después de la prueba

de estabilidad con el sólido cocrystalino y las materias primas, se observa que no existen cambios o transformaciones en el sólido, indicando que es estable físicamente bajo estas condiciones de temperatura y humedad relativa.

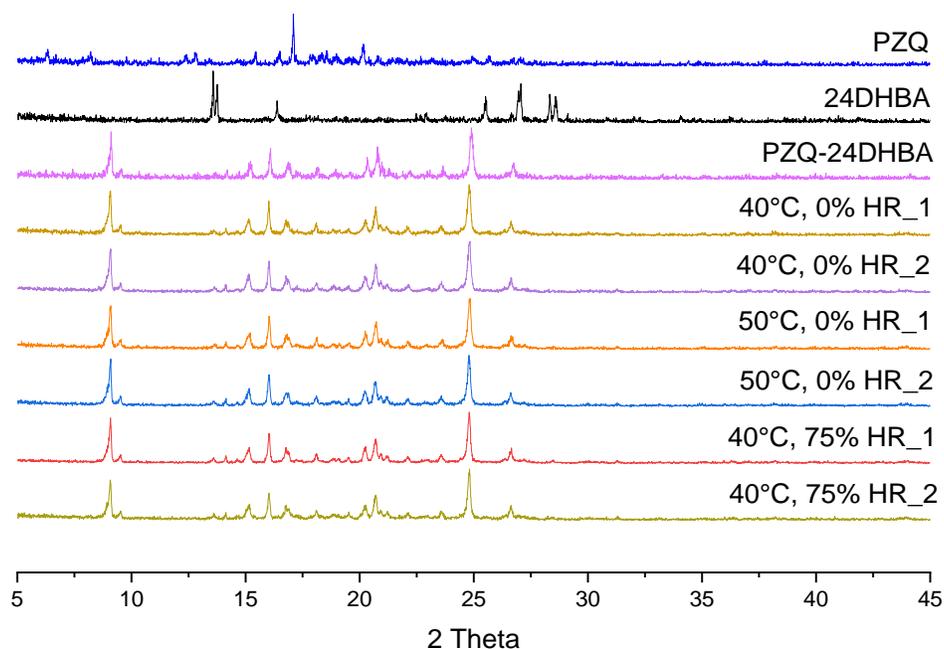


Figura 26. Patrón de DRXP del cocrystal PZQ-24DHBA bajo distintas condiciones de temperatura y humedad relativa.

2.2. Transformación de fase mediada por la solución (HCl pH 1.2)

En este proceso realizaron pruebas para establecer la posible transformación de fase en medio acuoso (HCl pH 1.2) con el fin de simular el medio gástrico y determinar el comportamiento que tendrán los cocrystalos PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA al entrar en contacto con la solución acuosa.

Como se observa en el análisis por DRXP de las muestras obtenidas usando el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O (Figura 27a), el patrón de DRXP de los sólidos residuales a distintos tiempos muestran que el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O es físicamente estable hasta las 24 h de encontrarse en contacto con el medio, dado que, en todas las muestras se observan picos de difracción similares al sólido cocrystalino inicial. En el caso de la fase sólida de PZQ-24DHBA (Figura 27b), por medio del análisis por DRXP de los sólidos residuales se observó que su estado físico se mantiene al no

observar transformación física a sus componentes de partida al estar en contacto con la solución acuosa (HCl pH 1.2). Ambas fases sólidas son muy estables a pH 1.2, no mostrando transformación a materias primas durante las 24 h del experimento.

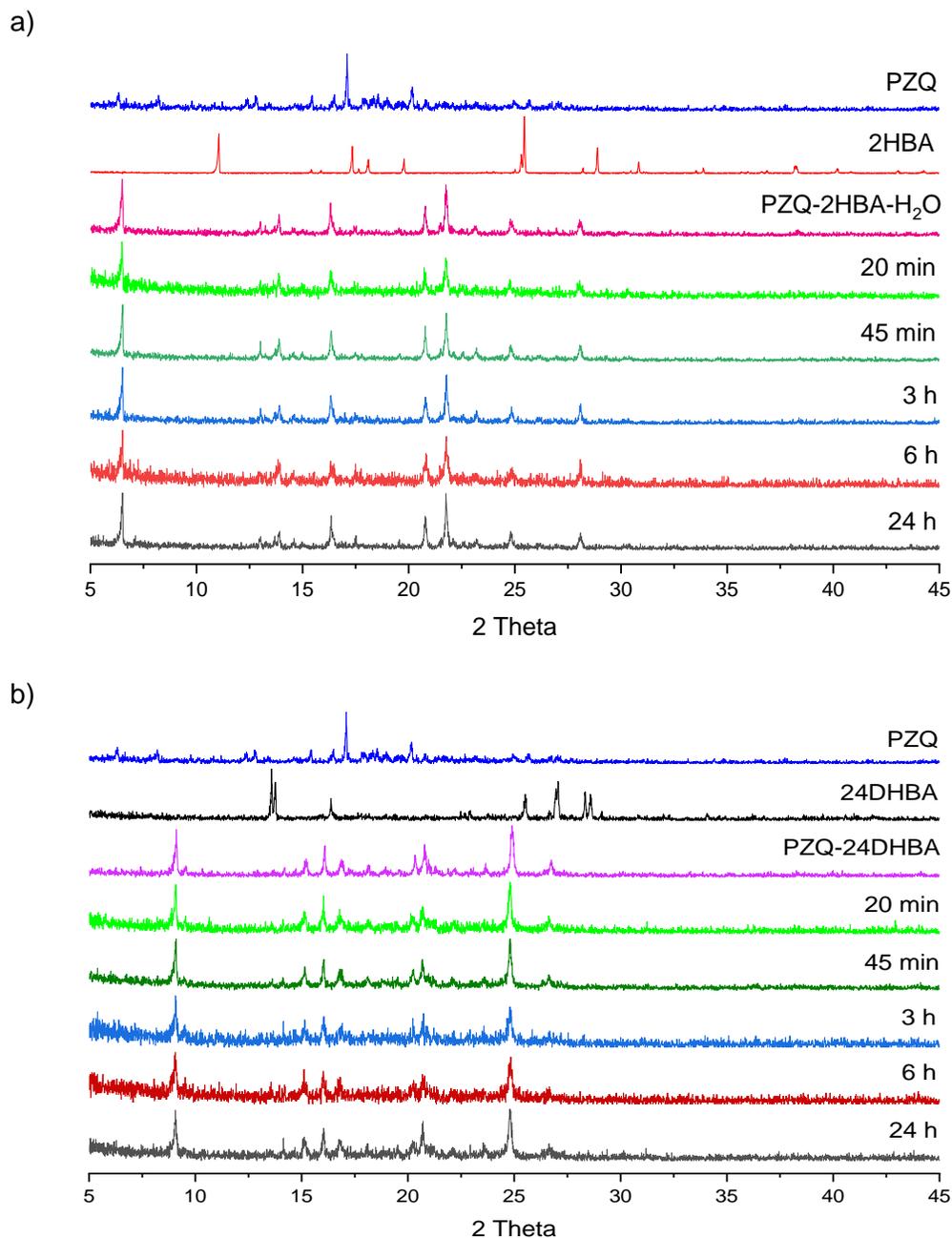


Figura 27. Patrón de DRXP de la prueba de transformación de fase mediada por la solución (HCl pH 1.2) para: a) el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O y b) el cocrystal PZQ-24DHBA.

2.3. Método de cuantificación

Inicialmente, se obtuvieron los espectros UV-Vis del PZQ y los formadores de cocrystal (anexo 6 y 7), donde se observó que ambos analitos presentan máximos de absorción que se traslapan y por lo tanto su cuantificación por este método no fue posible. Así, se decidió utilizar un método de cromatografía líquida de alta resolución para la separación y cuantificación del PZQ proveniente de los experimentos de disolución del fármaco puro y de los cocristales estudiados en este trabajo.

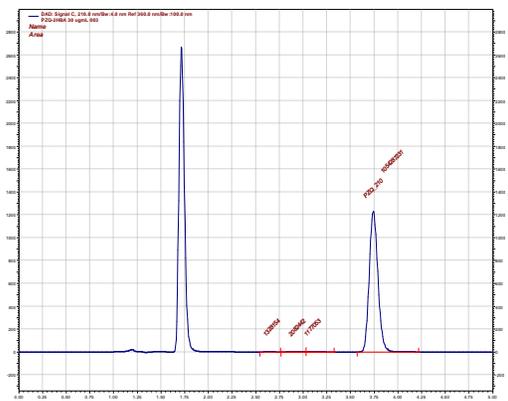
Para establecer el método cromatográfico se consideraron los parámetros de desempeño: adecuabilidad, linealidad, precisión, especificidad, límite de cuantificación y límite de detección de acuerdo con las especificaciones descritas en la “Guía de Validación de Métodos Analíticos”. Se evaluaron dos métodos de cuantificación a partir de las mezclas físicas de los componentes de cada cocrystal PZQ-2HBA y PZQ-24DHBA (fármaco-coformador).⁵⁶

Para el método de cuantificación de PZQ considerando la mezcla PZQ-2HBA se seleccionó la longitud de onda de 210 y 300 nm para la cuantificación del PZQ y el ácido 2-hidroxibenzoico, respectivamente. Se evaluó la adecuabilidad del método mediante la inyección por quintuplicado de la concentración intermedia de la curva de cuantificación, en todos los casos se obtuvo una desviación estándar relativa (%RSD, por sus siglas en inglés) menor al 2%, indicando que el método era adecuado para la cuantificación de los analitos (anexo 8). El mismo proceso se llevó a cabo utilizando la mezcla PZQ-24DBHA para la cuantificación de PZQ y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico utilizando la longitud de onda de 210 y 292 nm, respectivamente, la determinación de la adecuabilidad se evaluó mediante la inyección por quintuplicado de la concentración intermedia de la curva de cuantificación, de lo anterior se obtuvo un %RSD menor al 2% en todos los casos corroborando que el método es adecuado para la cuantificación de los analitos (anexo 9).

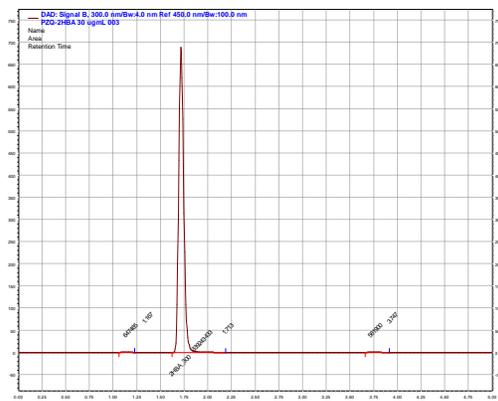
La linealidad del método se demostró a partir de la preparación de curvas de cuantificación por triplicado con un mínimo de 5 puntos (sin incluir el cero) por 3 días. La guía de validación indica que el criterio de aceptación para cumplir con la linealidad es que el valor del coeficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.98 . El método para cuantificar PZQ a partir de la mezcla física PZQ-2HBA fue lineal en el intervalo de estudio de 10 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$ (anexo 12), de igual forma el valor de r^2 obtenido para el método de cuantificación de PZQ usando la mezcla física PZQ-24DHBA (anexo 13) corrobora la linealidad del método.

Para la precisión del método se determinó el coeficiente de variación (C.V) a partir del análisis del factor respuesta (R) para cada concentración de la curva de cuantificación, cuyo criterio de aceptación es que el CV debe ser $\leq 2\%$. En el caso del método PZQ-2HBA solo la concentración más baja del día 3 se encuentra ligeramente por arriba del 2% (aprox. 3.5, anexo 12). Para el método PZQ-24DHBA se obtuvieron C.V. iguales y menores al 2% (anexo 13).

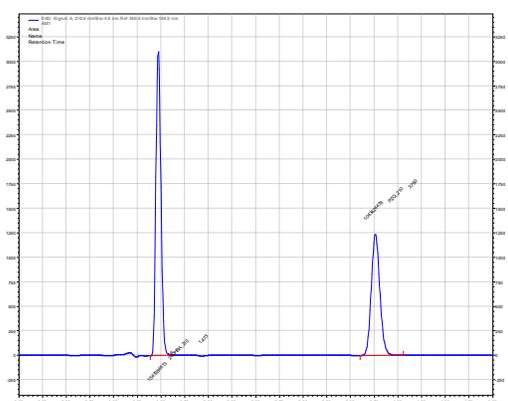
Los cromatogramas obtenidos con el método para PZQ-2HBA y con el método para PZQ-24DHBA (figura 28), muestran que PZQ presenta un tiempo de retención de 3.7 min independiente del tipo de coformador, es decir, la presencia del formador de cocrystal no modifica el tiempo de retención del fármaco.



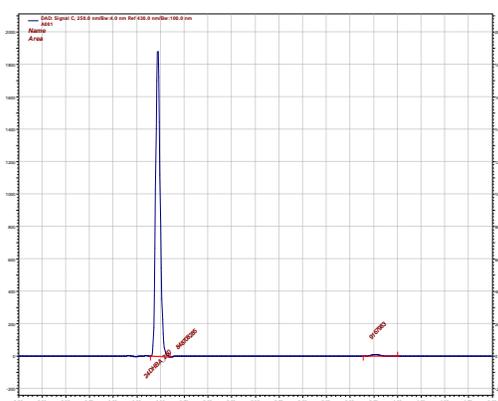
a)



b)



c)



d)

Figura 28. Cromatogramas de PZQ y los cofomadores con la mezcla de fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}:\text{HCl pH } 1.2 (50:50)$ en sus respectivos métodos de cuantificación. a) cocrystal PZQ-2HBA- H_2O , b) cofomador 2HBA, c) cocrystal PZQ-24DHBA y d) cofomador 24DHBA.

En la figura 29 podemos observar el cromatograma de PZQ obtenido mediante el método PZQ-2HBA a partir de una disolución de polvos realizada en medio acuoso PBS pH 6.0, podemos observar que el tiempo de retención del fármaco de 3.7 min se mantiene constante independientemente del medio acuoso en el que se realice el experimento, esto además indica lo versátil que es el método para la cuantificación de PZQ. De acuerdo con la Guía de validación de Métodos Analíticos el método posee alta especificidad al obtener una respuesta constante en el tiempo de retención de PZQ ya sea que se encuentre puro o en mezcla. Esto sucede en el método PZQ-2HBA así como en el método PZQ-24DHBA.

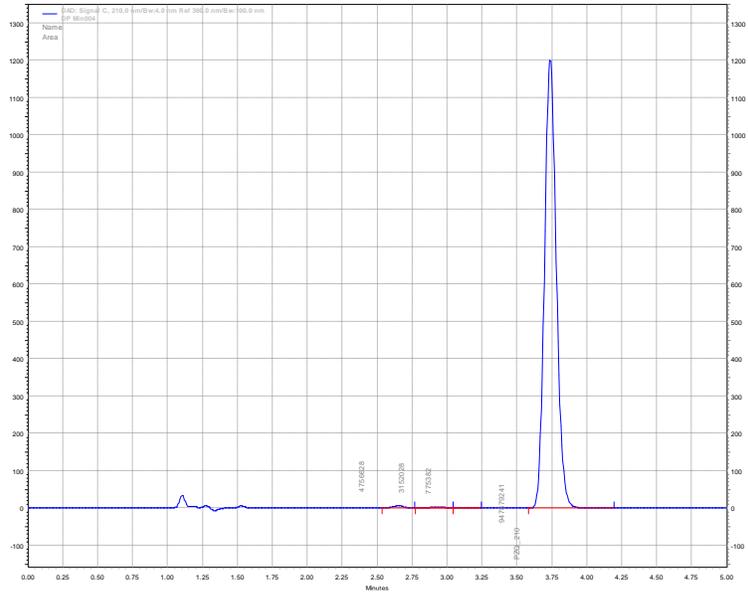


Figura 29. Cromatograma de PZQ obtenido con el método de cuantificación PZQ-2HBA.

2.4. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron a partir de los datos obtenidos del análisis de regresión lineal, considerando el valor de la pendiente y el intercepto de cada curva de cuantificación. A partir de estos valores se obtuvo el promedio de las pendientes (\bar{m}) y del intercepto (\bar{b}), posteriormente se obtuvieron las respectivas desviaciones estándar (DE_m y DE_b). En la tabla 4 podemos observar los resultados obtenidos.

$$LD = 3.3 \frac{DE_b}{\bar{m}} \quad LC = 10 \frac{DE_b}{\bar{m}}$$

Tabla 4. Cálculo de los límites de detección y cuantificación de PZQ.

	PZQ-2HBA	PZQ-24DHBA
	PZQ ($\lambda=210$ nm)	PZQ ($\lambda=210$ nm)
\bar{m}	34076318	34248192
DE m	726534	149549
\bar{b}	-2419403	6193364
DE b	11804615	2984880
LD ($\mu\text{g/mL}$)	1.14	0.29
LC ($\mu\text{g/mL}$)	3.46	0.87

Con el LC se estableció la concentración mínima de PZQ que es posible cuantificar de manera confiable en cada método.

2.5. Disolución intrínseca

La velocidad de disolución intrínseca se define como la disolución del fármaco puro cuando las condiciones como el área superficial, la temperatura, la agitación o la velocidad de agitación, el pH y la fuerza iónica del medio de disolución se mantienen constantes.⁵⁵

La figura 30 muestra el perfil de disolución intrínseca del PZQ y los cocristales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA en un medio acuoso (HCl pH 1.2). Todos los perfiles se ajustaron a un modelo matemático lineal obteniendo coeficientes de determinación mayores a $r^2 = 0.98$, lo cual indica que no existe transformación física de las fases sólidas bajo estas condiciones de estudio. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en los experimentos de estabilidad de fase en solución acuosa pH 1.2 (figura 27), donde se encontró que ambas fases sólidas no sufren transformación en solución a una fase sólida distinta. En los perfiles de disolución se observa un aumento en el porcentaje disuelto de PZQ a partir de ambos cocristales en comparación con el fármaco puro, donde el cocrystal hidrato PZQ-2HBA-H₂O mostró un mayor porcentaje de fármaco disuelto en comparación con el cocrystal de PZQ-24DHBA.

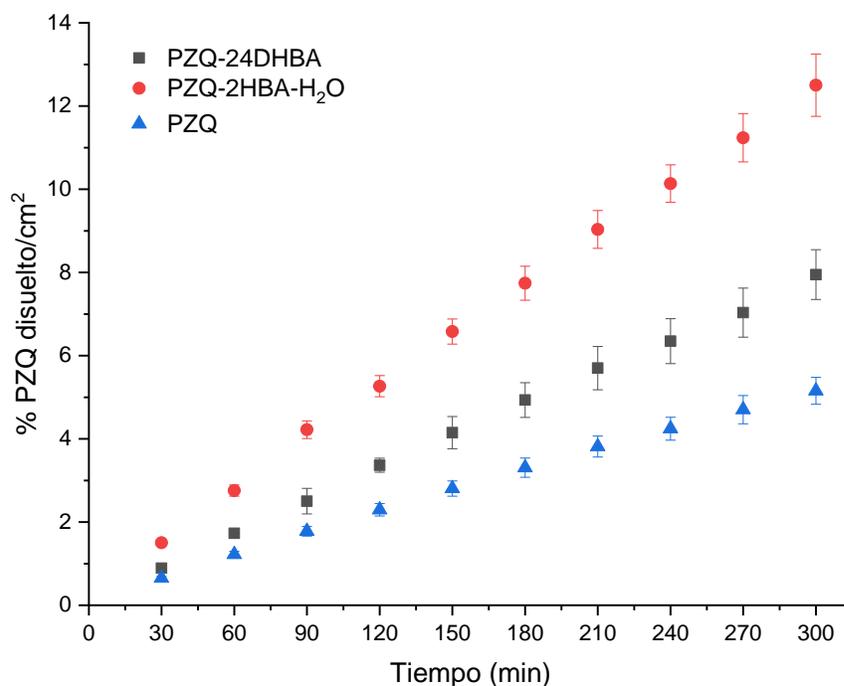


Figura 30. Perfil de disolución intrínseca del PZQ y los cocrisales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA, en medio acuoso HCl pH 1.2 (n=3 ± DE).

En la tabla 5 se muestran las constantes de velocidad de disolución intrínseca del PZQ y los cocrisales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA obtenidas a partir del ajuste lineal de los perfiles de disolución intrínseca (Anexo 14). Derivado de este análisis se observó que ambos cocrisales aumentan la constante de velocidad de disolución en comparación con el PZQ puro, aumentando por 2.4 y 1.5 veces más con el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA, respectivamente.

Tabla 5. Constantes de velocidad de disolución intrínseca para PZQ, PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA en HCl a pH 1.2.

	k_d (% disuelto/min*cm ²)	k_d (cocrystal)/ k_d (PZQ)	r^2
PZQ	0.017	--	0.99
PZQ-2HBA-H₂O	0.041	2.4	0.99
PZQ-24DHBA	0.026	1.5	0.99

Dado que el ácido 2-hidroxibenzoico y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico poseen valores de pKa de 2.9 y 3.1 respectivamente, estas moléculas tienen solubilidad pH dependiente. Debido a que son ácidos débiles, a pH 1.2 la especie química que predomina es la forma neutra, sin embargo, a valores de pH mayores al valor de pKa tienen la capacidad de ionizarse, de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach:^{44,61,62}

$$\text{Log} ((\text{forma protonada}) / (\text{forma no protonada})) = \text{pK}_a - \text{pH}$$

Como se mencionó anteriormente, los cocristales de PZQ estudiados aquí pueden tener una solubilización pH dependiente dado que los coformadores tienen un valor de pKa asociado, es así como se decidió estudiar el efecto del cambio de pH en el medio de disolución (pH 6.0) sobre el perfil de disolución intrínseca de ambos cocristales.

En la figura 31 se observa que el PZQ puro no muestra un cambio en el perfil de disolución en un medio acuoso pH 6.0 comparado con el medio HCl pH 1.2 (figura 30), debido a que es un fármaco neutro y su solubilización no se modifica por el cambio de pH. Sin embargo, ambos cocristales mostraron un cambio en la cinética de disolución en el medio de disolución pH 6.0. Hasta los 30 min se observa una velocidad de disolución rápida, observándose un cambio de cinética a partir de 30 y hasta los 90 min aproximadamente y otro cambio posterior a este tiempo en los perfiles de disolución de PZQ a partir de los sólidos cocrystalinos. Un comportamiento similar se observó en el perfil de disolución intrínseca del cocrystal enantiopuro de PZQ en combinación con ácido *L*-málico, lo cual se atribuye a una transformación de fase mediada por la solución.³²

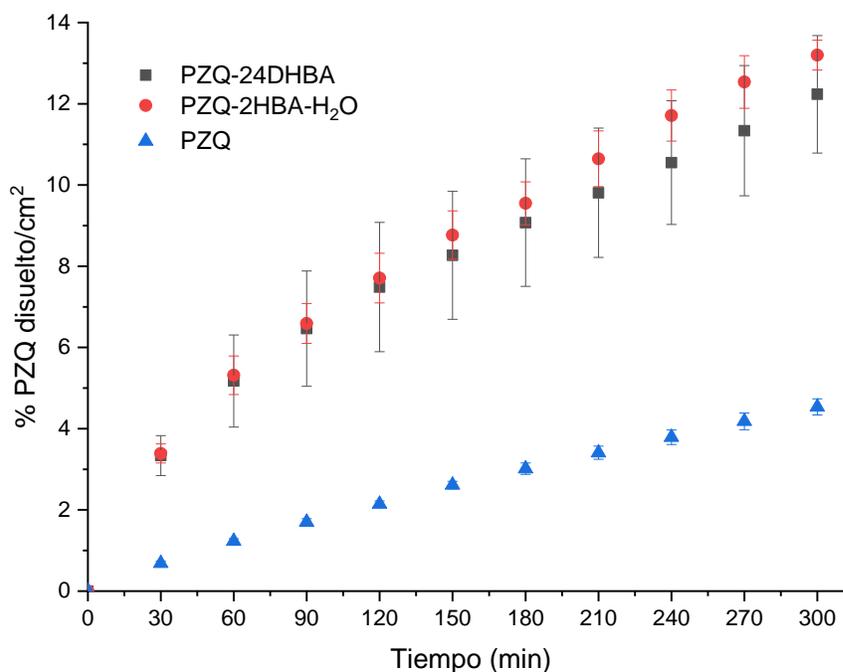


Figura 31. Perfil de disolución intrínseca de PZQ y los cocristales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA, en buffer de fosfatos pH 6.0 (n=3 ± DE).

En la tabla 6 se observa la constante de disolución intrínseca del fármaco puro y de PZQ a partir de las formas sólidas cocristalinas de este, obtenidas a partir del ajuste polinomial de los perfiles de la prueba de disolución intrínseca en medio acuoso pH 6.0 (anexo 15). Ambos cocristales presentaron un aumento en la constante de velocidad de disolución del PZQ, siendo 3.85 y 3.71 veces mayor a partir del cocristal PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA, respectivamente.

Tabla 6. Constantes de velocidad de disolución intrínseca de PZQ, PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA en PBS pH 6.0.

	k_d (% disuelto/hr*cm ²)	k_d (cocristal)/ k_d (PZQ)	r
PZQ	0.014	--	0.995
PZQ-2HBA-H₂O	0.054	3.85	0.997
PZQ-24DHBA	0.052	3.71	0.995

Para los demás estudios que aquí se presentan, se decidió enfocarse solo al cocrystal PZQ-2HBA-H₂O, dado que los resultados obtenidos con este generaban menor variabilidad y no se esperaba difirieran en tendencia a los que pudiesen obtenerse con el cocrystal PZQ-24DHBA.

Es así, que el análisis de la cinética de disolución bajo condiciones *sink* se complementó con la evaluación de la velocidad de disolución intrínseca de la mezcla física de los componentes PZQ-2HBA, esto para estudiar si el incremento en la constante de velocidad de disolución intrínseca se podía atribuir a la sola presencia del coformador en la solución. En la figura 32 se presenta la comparación del perfil de disolución intrínseca de PZQ a partir del sólido cocrystalino PZQ-2HBA-H₂O y su respectiva mezcla física, donde se observó que la mezcla física tiene una k_1-k_d mayor que el fármaco, pero menor que el cocrystal. Por lo tanto, se muestra que la mayor mejora en la solubilización de PZQ se puede alcanzar empleando la fase cocrystalina PZQ-2HBA-H₂O.

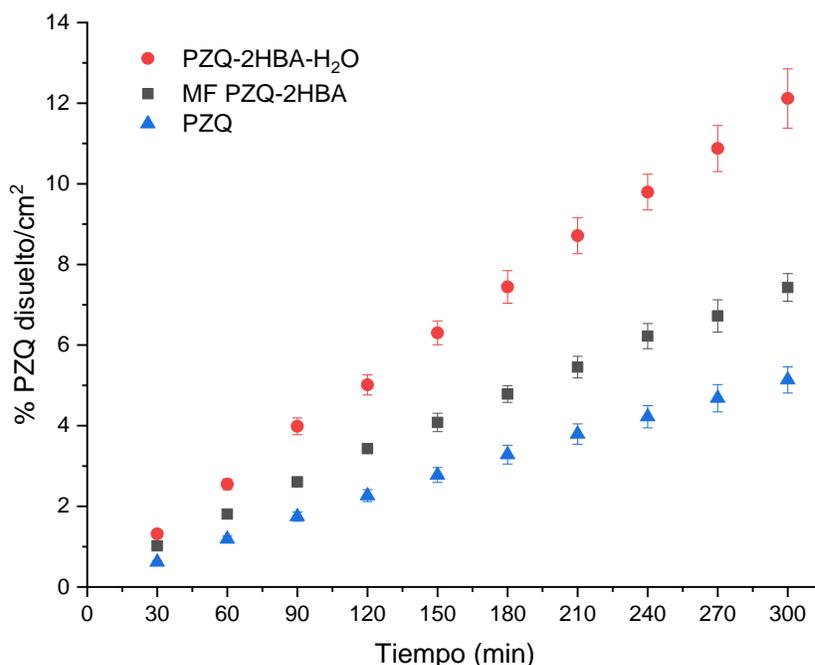


Figura 32. Perfil de disolución intrínseca de PZQ, del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O 1:1:1 y la mezcla física de PZQ-2HBA 1:1 en medio HCl pH 1.2 (n=3 ± DE).

Como ya se había mencionado, anteriormente se obtuvieron cocristales de PZQ con ácidos alifáticos. Con el fin de comparar los valores de k_d previamente reportados con los valores obtenidos de las nuevas fases de PZQ con ácidos hidroxibenzoicos en la tabla 7 se resumen estos resultados.⁹

Podemos observar que en ambos casos los cocristales presentan una ventaja en la constante de disolución en comparación con la de PZQ anhidro, sin embargo, los valores de k_d de los cocristales con ácidos alifáticos presentan una ventaja mayor sobre los cocristales con ácidos hidroxibenzoicos, esto puede atribuirse a que el valor de solubilidad acuosa de los ácidos alifáticos es mayor que el valor de solubilidad de los ácidos hidroxibenzoicos lo cual impacta en las propiedades de los cocristales. En el caso de los cocristales generados con ácidos hidroxibenzoicos, el cocrystal PZQ-24DHBA presenta un valor de k_d muy similar al PZQ en su forma pura, por otro lado, el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O presenta un valor de k_d mayor como se observa en la figura 30 en los perfiles de disolución de ambas fases sólidas.⁶³

Tabla 7. Resumen del análisis de disolución intrínseca de los cocristales de PZQ. k_d : constante de disolución, r: coeficiente de correlación y valores de solubilidad en agua de los coformadores a 25°C. Los experimentos en ambos casos se llevaron a cabo en medio acuoso HCl pH 1.2 a 37°C.

Cocristales de PZQ con ácidos alifáticos				Cocristales de PZQ con ácidos hidroxibenzoicos			
	k_d (mg/hr*cm ²)	R	Solubilidad de coformador (mg/mL)		k_d (mg/hr*cm ²)	R	Solubilidad de coformador (mg/mL)
PZQ	1.2	0.98	--	PZQ	1.3	0.99	--
PZQ-SUC	9.0	0.99	71	PZQ-2HBA-H ₂ O	2.2	0.99	2.24
PZQ-GLU	8.4	0.99	540	PZQ-24DHBA	1.4	0.99	5.78
PZQ-MALO	12.1	0.99	623				
PZQ-0.5H ₂ O	1.8	0.99	--				

La solubilidad de los coformadores de tipo alifático fueron tomadas de: Schultheis, N. (2009).

PZQ-SUC= Praziquantel-Ácido succínico

PZQ-GLU= Praziquantel-Ácido glutámico

PZQ-MALO= Praziquantel-Ácido malónico

PZQ-0.5H₂O= Praziquantel hemihidrato

2.6. Disolución de polvos bajo condiciones supersaturadas

Reportes previos han descrito que los cocrystalos que sufren transformación de fase mediada por la solución, son capaces de generar sistemas supersaturados. Es así como se evaluó el comportamiento del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O en disolución bajo condiciones de supersaturación (condiciones *no sink*) en el medio de disolución pH 6.0.⁶⁴

En la figura 33 se muestra el perfil de disolución de polvos del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O comparado con el del PZQ puro. El perfil donde se empleó el cocrystal alcanzó una concentración máxima de PZQ de hasta 1.17 mg/mL en los primeros minutos de análisis, decayendo rápidamente hasta alcanzar una concentración de PZQ de aproximadamente 0.37 mg/mL a los 10 min y hasta el final de la prueba (90 min). En contraste, el perfil de disolución de polvos del fármaco alcanzó su máxima concentración de 0.24 mg/mL a los 5 min, permaneciendo así hasta el final de la prueba.

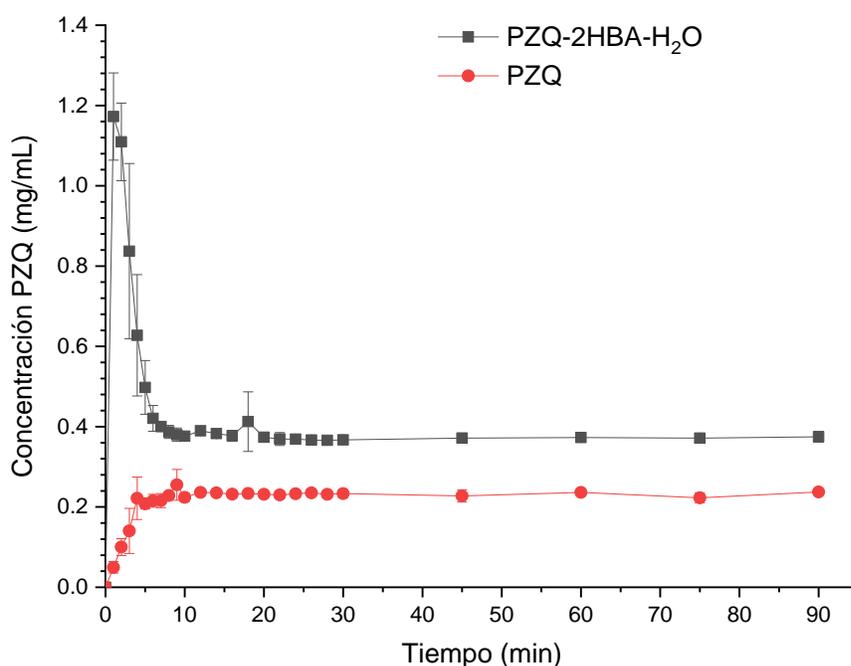


Figura 33. Perfil de disolución de polvos de PZQ y el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O en buffer de fosfatos pH 6.0 (n=3 ± DE).

La figura 34 muestra el área bajo la curva (ABC) de los perfiles de disolución de polvos del PZQ a partir del fármaco puro y del cocrystal PZQ-2HBA-H₂O, esto como un parámetro para cuantificar la ventaja de solubilización inducida por el cocrystal bajo condiciones de supersaturación. El ABC inducida por el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O mostró ser 1.77 veces mayor en comparación con el fármaco.



Figura 34. ABC obtenida de la prueba de disolución de polvos del PZQ y el cocrystal PZQ-2HBA-H₂O.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron los cocristales PZQ-2HBA-H₂O (1:1:1) y PZQ-24DHBA (1:1) por el método de molienda asistida con disolvente y fueron caracterizadas por DRXP, DRXCM [PZQ-2HBA-H₂O (1:1:1)], IR, DSC y TGA. Estos presentaron propiedades físicas y biofarmacéuticas diferentes a las materias primas.

Algunas conclusiones adicionales relevantes son:

- Los cocristales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA presentaron una constante de disolución intrínseca de hasta 1.7 veces mayor que la generada por PZQ puro, en medio acuoso pH 1.2. Esta ventaja observada se atribuye a la cocrystalización del PZQ y no a la mezcla física de los componentes de partida.
- Ambos cocristales tienen una estabilidad física en solución pH dependiente, debido a la capacidad de ionización y solubilización de los coformadores. A pH 1.2 las fases no presentan transformación de fase mediada por la solución, mientras que a pH 6.0 se esperaría que se transformaran a materias primas, lo cual sería atribuido a la transformación del sólido mediada por la solución.
- El cocrystal PZQ-2HBA-H₂O generó condiciones de supersaturación en un medio acuoso pH 6.0, el cual se mantiene por un periodo de 10 minutos, debido a la precipitación posterior de la forma menos soluble del PZQ.

PERSPECTIVAS

- Caracterizar el cocrystal PZQ-24DHBA por DRXMC.
- Determinar la constante eutéctica de ambos cocrystalos, para enriquecer la discusión de los resultados de los experimentos de disolución
- Evaluar el efecto de polímeros inhibidores de la precipitación de fármacos sobre el perfil de disolución de los sólidos cocrystalinos bajo condiciones supersaturadas.
- Obtener una forma farmacéutica sólida usando los cocrystalos estudiados aquí y comparar el rendimiento *in vitro/in vivo* comparado con el fármaco puro y la formulación comercialmente disponible del PZQ.

BIBLIOGRAFÍA

1. Geremia, S., Keiser, J., Cerreia V, P., Albertini, B., (2018). A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127, 19-28.
2. Bolla, G., & Nangia, A. (2016). Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. *Chemical Communications*, 52(54), 8342-8360.
3. Vishweshwar, P., McMahon, J. A., Peterson, M. L., Hickey, M. B., Shattock, T. R., & Zaworotko, M. J. (2005). Crystal engineering of pharmaceutical cocrystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients. *Chemical communications*, (36), 4601-4603.
4. Qiao, N., Li, M., Schlindwein, W., Malek, N., Davies, A., & Trappitt, G. (2011). Pharmaceutical cocrystals: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 419(1-2), 1-11.
5. Schultheiss, N., & Newman, A. (2009). Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Crystal growth and design*, 9(6), 2950-2967.
6. Baena, Y., & Ponce, L. F. (2008). Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 37(1).
7. Lindenberg, M., Kopp, S., & Dressman, J. B. (2004). Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2), 265-278.
8. Cioli, D., & Pica-Mattoccia, L. (2003). Praziquantel. *Parasitology Research*, 90(1), S3-S9.
9. Espinosa, L. J. C., Guzman, V. D., Arenas, G. J. I., Herrera, R. D., Rivera, I. J., Román, B. P., Morales, R. H. & Höpfl, H. (2012). Cocrystals of Active Pharmaceutical Ingredients Praziquantel in Combination with Oxalic, Malonic, Succinic, Maleic, Fumaric, Glutaric, Adipic, And Pimelic Acids. *Crystal Growth & Design*, 13(1), 169-185

10. Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., & Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368(9541), 1106-1118.
11. Doenhoff, M. J., Cioli, D., & Utzinger, J. (2008). Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6), 659-667.
12. WHO Model List of Essential Medicines, (2019), 21st List Recuperado de < <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>> vía internet.
13. Organización Panamericana de la Salud. (1983) Información Farmacológica. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 95(4).
14. Chai, J. Y. (2013). Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Infection & Chemotherapy*, 45(1), 32-43.
15. Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P., Thomas, H., & Eckert, J. (1980). Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63(2), 113-128.
16. Consejo de Salubridad General. (1984) Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, México, D.F. Secretaría de Salubridad y Asistencia.
17. Ayala Fernández, J. A., Cebrián, E. G., Lazcano, I. H., & González, F. M. (2014). Infecciones por trematodos: esquistosomiasis, fascioliasis, opistorquiasis, clonorquiasis y paragonimiasis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(53), 3115-3128.
18. Meyer, T., Sekljic, H., Fuchs, S., Bothe, H., Schollmeyer, D., & Miculka, C. (2009). *PLOS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 3, p. e357).
19. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Praziquantel, CID=4891, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Praziquantel> (accessed on Oct. 17, 2019).
20. Maragos, S., Archontaki, H., Macheras, P., & Valsami, G. (2009). Effect of cyclodextrin complexation on the aqueous solubility and solubility/dose ratio

- of praziquantel. American Association of Pharmaceutical Scientists, PharmSciTech, 10(4), 1444.
21. Akbarieh, M., Besner, J. G., Galal, A., & Tawashi, R. (1992). Liposomal delivery system for the targeting and controlled release of praziquantel. Drug Development and Industrial Pharmacy, 18(3), 303-317.
 22. Chaud, M. V., Tamascia, P., Lima, A. C. D., Paganelli, M. O., Gremião, M. P. D., & Freitas, O. D. (2010). Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 46(3), 473-481.
 23. Yang, L., Geng, Y., Li, H., Zhang, Y., You, J., & Chang, Y. (2009). Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 64(2), 86-89.
 24. López, K. A. (2015). Uso de cocrisales para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. Pensamiento Actual, 15(25), 207-215.
 25. Vicente, P. H. (2018). Utilización de cocrisales para el desarrollo de nuevos fármacos (Doctoral Dissertation Universidad Complutense).
 26. Farfan, S. N., Dabbene, V. G., Badini, R. G., & Faudone, S. N. (2016) Las farmacopeas y el polimorfismo de fármacos: algunos ejemplos. Asociación Argentina de Farmacia y Bioquímica Industrial, (56): 34-42.
 27. López, K. A. (2015). Uso de cocrisales para mejorar la solubilidad y velocidad de disolución de los fármacos. Pensamiento Actual, 15(25), 207-215.
 28. Karki, S., Frišćić, T., Fabian, L., Laity, P. R., Day, G. M., & Jones, W. (2009). Improving mechanical properties of crystalline solids by cocrystal formation: new compressible forms of paracetamol. Advanced Materials, 21(38-39), 3905-3909.
 29. Stahly, G. P. (2007). Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. Crystal Growth and Design, 2007, 7, 1007–1026.
 30. Aakeroy, C. B.; Salmon, D. J. (2005). Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. CrystEngComm, 7, 439–448.

31. Vishweshwar, P.; McMahon, J. A.; Bis, J. A.; Zaworotko, M. J. (2006) Pharmaceutical co-crystals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95, 499–516.
32. Sánchez, G. O., Mendoza, N. F., Cedillo, C. A., Jung, C. H., Arenas, G J. I., Delgado, D. A., Herrera, R. D., Morales, R. H. & Höpfl, H. (2015). Chiral Resolution of *RS*-Praziquantel via diastereomeric co-crystal pair formation with *L*-malic acid. *Crystal Growth and Design*, 16(1), 307-314.
33. Delgado A. (2016) Estudio del impacto del uso de polímeros en las propiedades biofarmacéuticas de sistemas cocrystalinos de praziquantel. Tesis para obtener el grado de Maestro en Farmacia, UAEMor. Cuernavaca, Morelos.
34. Salas, Z. R. Desarrollo de Sistemas de Liberación Innovadores para IFAs Cocrystalinos Confinados en Materiales Mesoporosos. Tesis para obtener el grado de Doctor en Farmacia, UAEMor. Cuernavaca, Morelos, 2017-en proceso.
35. Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
36. Tao Y, Han L, Han Y, Liu Z. (2015). A combined experimental and theoretical analysis on molecular structure and vibrational spectra of 2,4-dihydroxybenzoic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 1078-85.
37. Arif, T. (2015). Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 8, 455.
38. Bhalla, T. C., Kumar, V., & Bhatia, S. K. (2013). Hydroxy acids: production and applications. *Advances in Industrial Biotechnology*. IK International Publishing House Pvt Ltd, India, 56-76.
39. Cuéllar, L., Sehtman, A., Donatti, L., & Allevato, M. (2008). Ácido salicílico. *Revista Antiguos y Vigentes*, 31(108), 108-112.
40. Ramírez Labrada, F. A., Plana Ramírez, A., Ferrandiz Ramírez, D., Ramírez, A., & Ramírez Milán, O. (1999). La aspirina. El medicamento del siglo. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(3), 0-0.

41. Abounassif, M. A., Mian, M. S., & Mian, N. A. A. (1994). Salicylic acid. In *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Vol. 23, pp. 421-470. Academic Press.
42. Needs, C. J., & Brooks, P. M. (1985). Clinical pharmacokinetics of the salicylates. *Clinical Pharmacokinetics*, 10(2), 164-177.
43. Juurlink, B. H., Azouz, H. J., Aldalati, A. M., AlTinawi, B. M., & Ganguly, P. (2014). Hydroxybenzoic acid isomers and the cardiovascular system. *Nutrition Journal*, 13(1), 63.
44. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2,4-Dihydroxybenzoic acid, CID=1491, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dihydroxybenzoic-acid (accessed on May. 17, 2019)
45. Pindelska, E., Sokal, A., & Kolodziejcki, W. (2017). Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 111-146.
46. Misture, S. T., & Snyder, R. L. (2001). X-ray Diffraction. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 9799–9808. doi:10.1016/b0-08-043152-6/01778-2.
47. Moreno E. R. (2007) La difracción de rayos X y la densidad electrónica. Facultad de Química, UNAM. <http://depa.fquim.unam.mx/jesusht/01-rayosX-intro-SA.pdf>
48. Munson, E. J., (2009) Chapter 3 - Analytical Techniques in Solid-state Characterization A2 - Qiu, Yihong. In *Developing Solid Oral Dosage Forms*, Chen, Y.; Zhang, G. G. Z.; Liu, L.; Porter, W. R., Eds. Academic Press: San Diego, 61-74.
49. Batsanov, A. S. (1999). Small Molecule Applications of X-Ray Diffraction. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2106–2115. doi:10.1006/rwsp.2000.0279.
50. Stuart, B. (2000). Infrared spectroscopy. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-18.

51. Kaplan, S. A. (1972). Biopharmaceutical considerations in drug formulation design and evaluation. *Drug Metabolism Reviews*, 1(1), 15-33.
52. Carrillo E, R., Zavaleta B, M., Álvarez A, H., (2013) La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. *Revista Facultad de Medicina, UNAM.*; 56(3):5-11.
53. Villanueva, E. N. C. (2018). Obtención y caracterización de una sal de R-baclofeno con ácido málico. Tesis para obtener el grado de Maestría en Farmacia. UAEMor, Cuernavaca, Morelos.
54. NOM-073-SSA1-2015. (2015). Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5440183.
55. Issa, M. G.; Ferraz, H. G., (2011) Intrinsic Dissolution as a Tool for Evaluating Drug Solubility in Accordance with the Biopharmaceutics Classification System. *Dissolution Technologies*, 18 (3), 6-13.
56. García, M. A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A., & Garzón, A. (2002). Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Biólogos México, AC México.
57. Bellamy, L. J. F. C. (1975). The infra-red spectra of complex molecules. Springer Science & Business Media. 3rd, edition. Pp. 433.
58. Pettinari, C., & Santini, C. (2010). Capítulo: IR and Raman Spectroscopies of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds. In book: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Chapter: Vol. 2, Publisher: Academic Press, United Kingdom. Editors: Lindon, J. C., Tranter, G. E., Holmes, J. L., pp.1021-1034.
59. Pyramides, G., Robinson, J. W., & Zito, S. W. (1995). The combined use of DSC and TGA for the thermal analysis of atenolol tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(2), 103-110.
60. Coats, A. W., & Redfern, J. P. (1963). Thermogravimetric analysis. A review. *Analyst*, 88(1053), 906-924.

61. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Salicylic acid, CID=338, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-acid> (accessed on May.17, 2019).
62. Katzung, B. G., Trevor, A. J., & Pacheco, M. D. R. C. (1991). *Farmacología. El Manual Moderno*, (1), 1-3.
63. Schultheis, N., & Newman, A. (2009). Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Crystal Growth and Design*, 9(6), 2950-2967.
64. Rodríguez, H. N., Nehm, S. J., Seefeldt, K. F., Pagan, T., Y., & Falkiewicz, C. J. (2006). Reaction crystallization of pharmaceutical molecular complexes. *Molecular Pharmaceutics*, 3(3), 362-367.

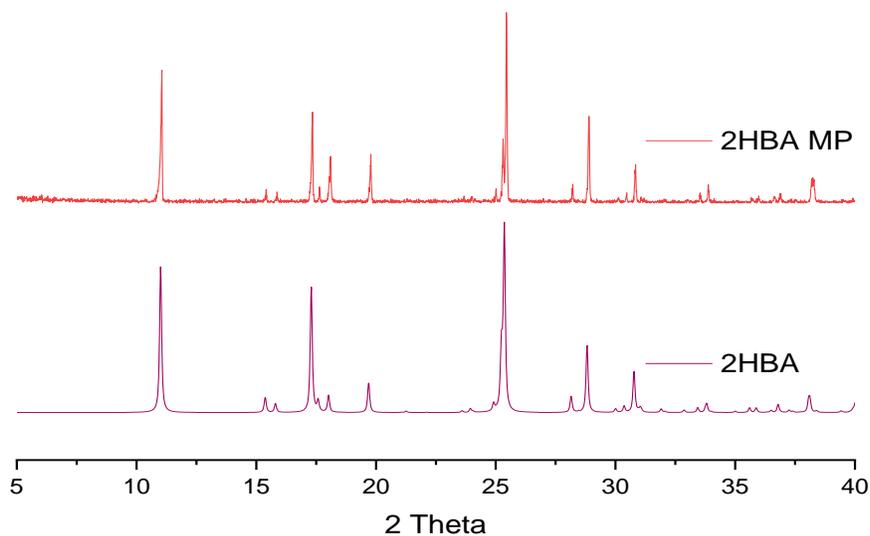
ANEXOS

Anexo 1. Concentración de las curvas de cuantificación PZQ-2HBA y PZQ-24DHBA para la validación.

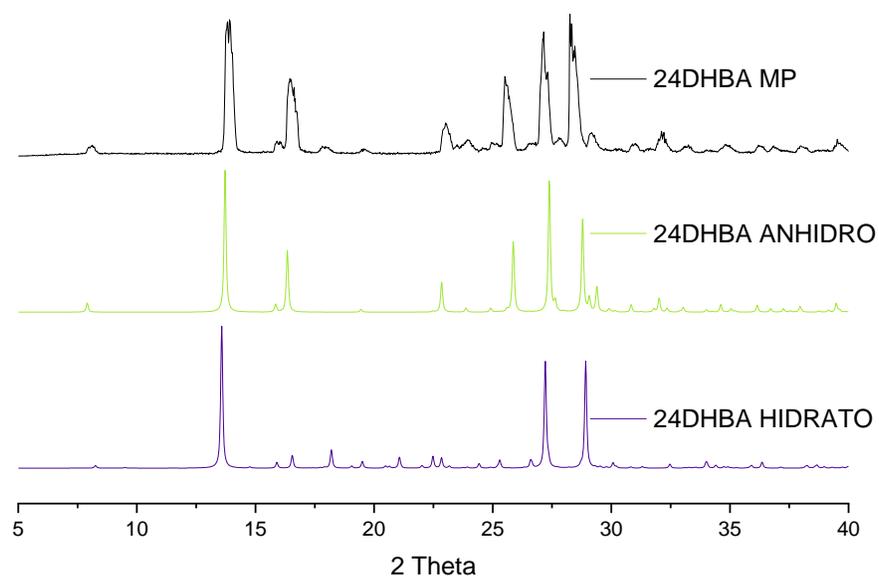
Concentración de PZQ-2HBA ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de stock (μL)	Volumen final (mL)
10	100	10
20	200	10
30	300	10
40	400	10
50	500	10

Concentración de PZQ-24DHBA ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen de stock (μL)	Volumen final (mL)
10	100	10
20	200	10
30	300	10
40	400	10
50	500	10

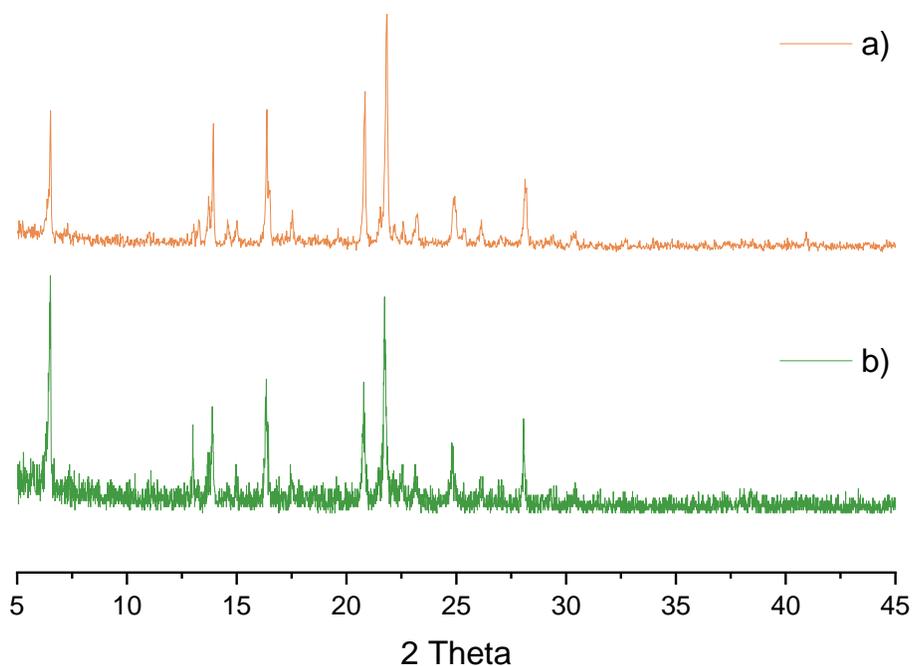
Anexo 2. Comparación de los patrones de difracción de rayos x de polvos de 2HBA materia prima y patron de 2HBA anhidro simulado.



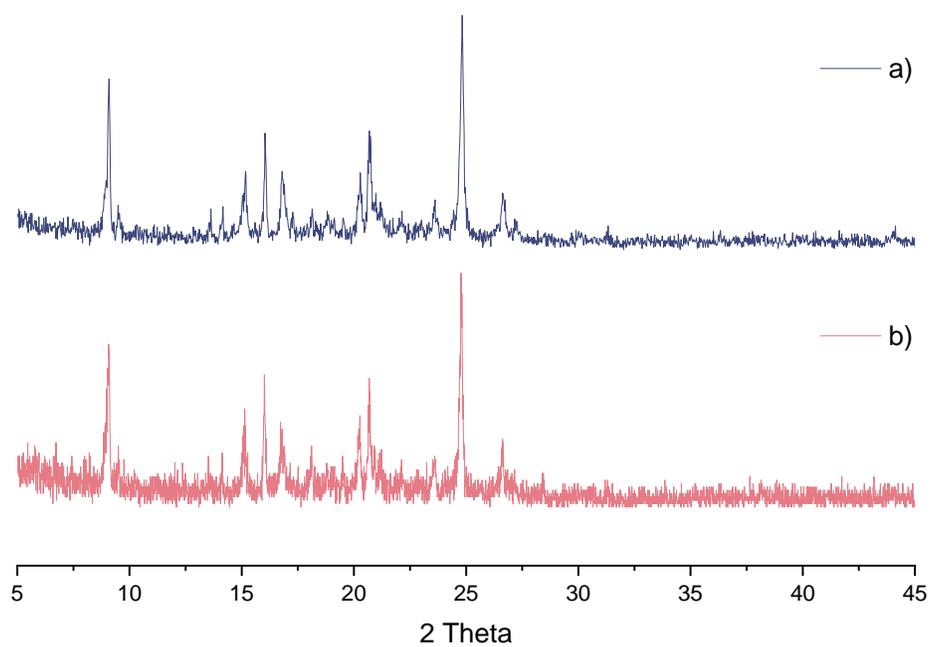
Anexo 3. Comparación de los patrones de difracción de rayos-X de polvos de 24DHBA materia prima con los patrones simulados de 24DHBA hidrato y 24DHBA anhidro.



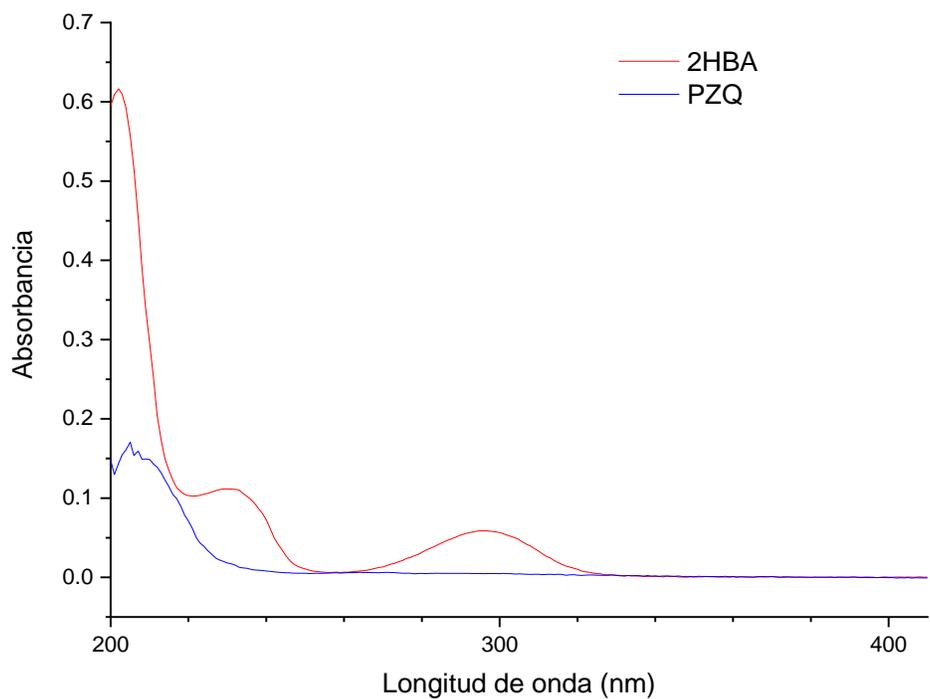
Anexo 4. (a) Patrón de DRXP de la fase sólida PZQ-2HBA-H₂O obtenida previamente y (b) patrón de DRXP de la fase sólida PZQ-2HBA-H₂O reproducida para este trabajo.



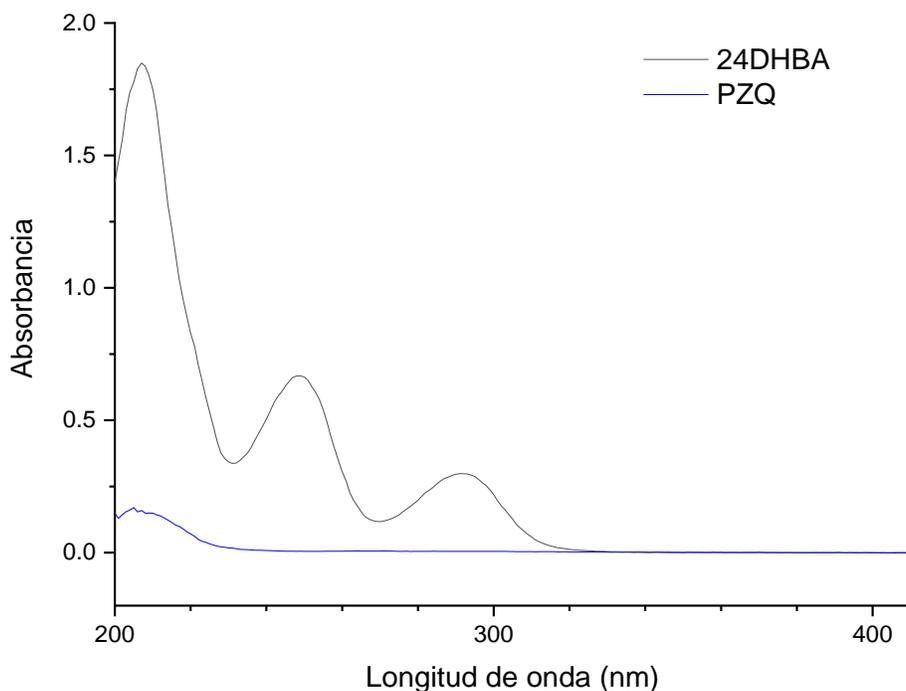
Anexo 5. (a) Patrón de DRXP de la fase sólida PZQ-24DHBA obtenida previamente y (b) patrón de DRXP de la fase sólida PZQ-24DHBA reproducida para este trabajo.



Anexo 6. Espectro UV-Vis de PZQ y 2HBA en medio HCl pH 1.2.



Anexo 7. Espectro UV-Vis de PZQ y 24DHBA en medio HCl pH 1.2.



Anexo 8. Adecuabilidad para el PZQ y el ácido 2-hidroxibenzoico usando el método PZQ-2HBA. (Parámetros: área y tiempo de retención).

System Suitability Report

Page 2 of 2

Sequence : D:\Result\3. Reynaldo\2019\Junio\05\ADECUABILIDAD PZQ-2HBA 2.rs\A\ADECUABILIDAD PZQ-2HBA 2.rst
 User : SYSTEM (SYSTEM)
 Printed : 6/5/2019 4:37:47 PM (GMT -05:00)

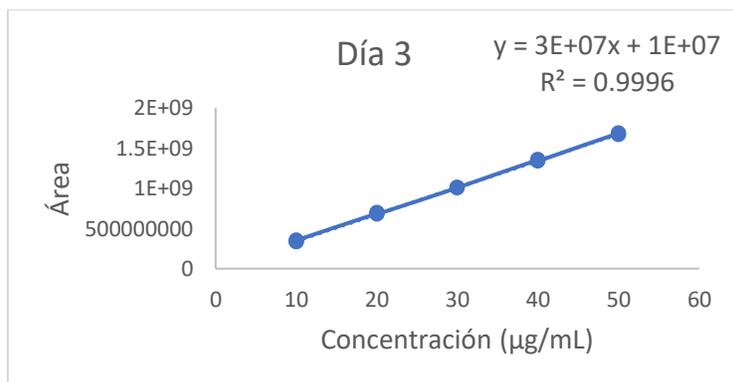
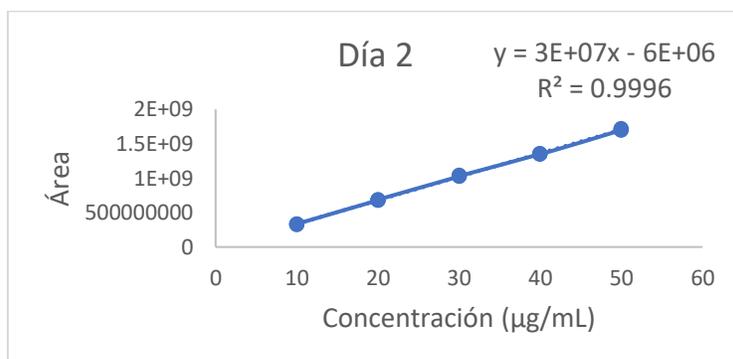
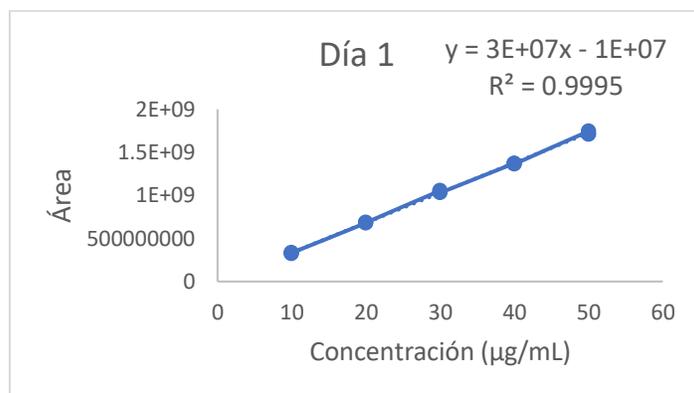
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
DAD: Signal B, 300.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 450.0 nm/Bw:100.0 nm							
	2HBA_300	Retention Time				2	
		Area				2	
A001		Retention Time	1.708	1.707	1.713	0.175	Passed
A002		Retention Time					Passed
A003		Retention Time					Passed
A004		Retention Time					Passed
A005		Retention Time					Passed
A001		Area	533889910	533072743	534601592	0.130	Passed
A002		Area					Passed
A003		Area					Passed
A004		Area					Passed
A005		Area					Passed

Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status
PZQ-2HBA 30 ug/mL 001	PZQ_210	Retention Time	3.740	3.740	3.740	0.000	Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 002		3.740					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 003		3.740					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 004		3.740					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 005		3.740					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 001		Area	1053873294	1052897413	1055150513	0.086	Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 002		1053131557					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 003		1054287231					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 004		1055150513					Passed
PZQ-2HBA 30 ug/mL 005		1053899755					Passed

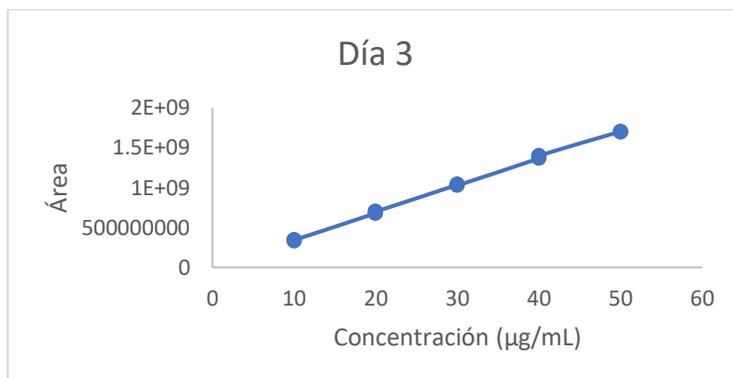
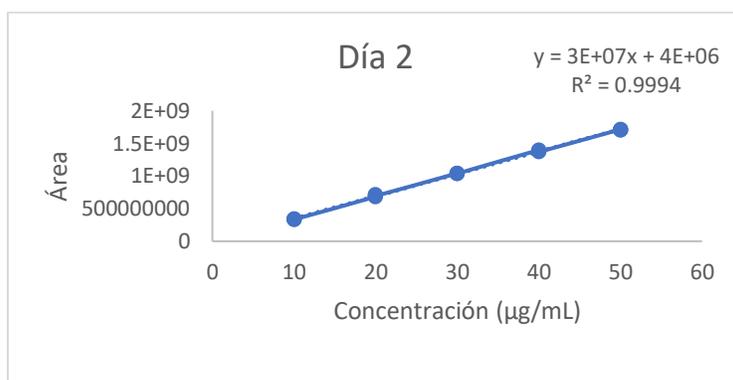
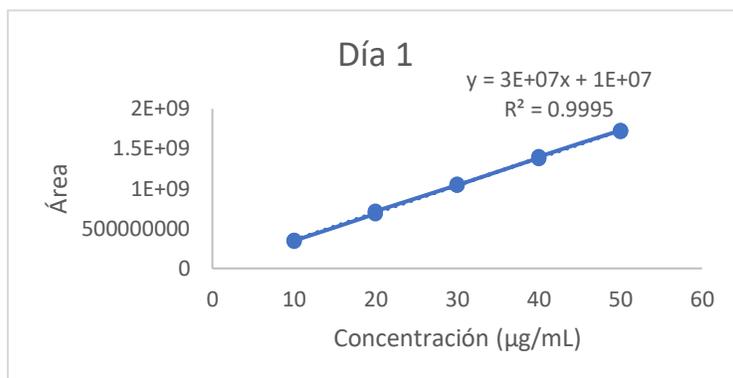
Anexo 9. Adecuabilidad para el PZQ y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico usando el método PZQ-24DHBA. (Parámetros: área y tiempo de retención).

DAD: Signal D. 292.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 430.0 nm/Bw:100.0 nm		Compound	Parameter	Min	Max	%RSD		
		24DHBA_292	Retention Time			2		
			Area			2		
Sample ID	Compound	Parameter	Average	Low	High	%RSD	Status	
A001	24DHBA_292	Retention Time	1.469	1.467	1.473	0.249	Passed	
A002		1.473					Passed	
A003		1.467					Passed	
A004		1.473					Passed	
A005		1.467					Passed	
A001		Area	424223428	423895724	424515295	0.059	Passed	
A002		424515295					Passed	
A003		424292473					Passed	
A004		423895724					Passed	
A005		424366464					Passed	
A001		PZQ_210	Retention Time	3.761	3.760	3.767	0.079	Passed
A002			3.760					Passed
A003			3.767					Passed
A004			3.760					Passed
A005	3.760						Passed	
A001	Area		1044284438	1043424478	1045659727	0.107	Passed	
A002	1043424478						Passed	
A003	1045346283						Passed	
A004	1043500475						Passed	
A005	1043491229						Passed	
A001	Area		1044284438	1043424478	1045659727	0.107	Passed	
A002	1043424478						Passed	
A003	1045346283						Passed	
A004	1043500475						Passed	
A005	1043491229					Passed		

Anexo 10. Datos de linealidad del método de cuantificación por HPLC de PZQ a partir del método PZQ-2HBA.



Anexo 11. Datos de linealidad del método de cuantificación por HPLC de PZQ a partir del método PZQ-24DHBA.



Anexo 12. Determinación de la linealidad para PZQ a partir de los datos del método PZQ-2HBA.

Día 1						
Concentración (µg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	DE	CV
10	323499416	336013428	332660088	330724310.7	6477696.311	1.96
20	679685443	687504610	683214390	683468147.7	3915755.082	0.57
30	1054523739	1035682647	1029755647	1039987344	12932996.93	1.24
40	1372450682	1369609800	1362776239	1368278907	4972642.052	0.36
50	1743886148	1716895439	1711407286	1724062958	17385313.11	1.01
				r ²	0.9995	
				b1	34714880.53	
				b0	-12142082.53	
Día 2						
Concentración (µg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	DE	CV
10	324502670	333560311	335380042	331147674.3	5826226.667	1.76
20	678735955	677561041	688569983	681622326.3	6045457.435	0.89
30	1025284650	1043219336	1031288163	1033264050	9129147.637	0.88
40	1351344641	1356045181	1346649463	1351346428	4697859.255	0.35
50	1699202288	1718409060	1705481529	1707697626	9793280.145	0.57
				r ²	0.9996	
				b1	34228240.05	
				b0	-5831580.533	
Día 3						
Concentración (µg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	DE	CV
10	330758970	331911649	351791929	338154182.7	11824688.62	3.50
20	685357286	693666246	676693287	685238939.7	8487098.367	1.24
30	1006037993	1005070037	1006517425	1005875152	737306.5716	0.07
40	1354102571	1341691721	1336918915	1344237736	8870239.647	0.66
50	1684815524	1662000411	1672023714	1672946550	11435517.68	0.68
				r ²	0.9996	
				b1	33285835.3	
				b0	10715452.87	

Anexo 13. Determinación de la linealidad para PZQ a partir de los datos del método PZQ-24DHBA.

Día 1						
Concentración (µg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	DE	CV
10	338086087	352319072	347296065	345900408	7218404.211	2.09
20	684011243	707489512	716333527	702611427.3	16704169.94	2.38
30	1044280724	1055693591	1042349847	1047441387	7211533.853	0.69
40	1384295158	1370380477	1399179429	1384618355	14402196.05	1.04
50	1728428028	1728601119	1714536633	1723855260	8070631.759	0.47
				r ²	0.9995	
				b1	34379166.3	
				b0	9510378.07	
Día 2						
Concentración (µg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	DE	CV
10	335661959	338427475	333887843	335992425.7	2287787.32	0.68090443
20	683464015	711132168	694251415	696282532.7	13945456.3	2.00284449
30	1041056411	1040434707	1036846611	1039445910	2272420.33	0.21861843
40	1397806727	1378539764	1368346236	1381564242	14961307.9	1.08292524
50	1713662215	1705854535	1702563377	1707360042	5700523.26	0.33387939
				r ²	0.9994	
				b1	34280169.4	
				b0	3723947.63	
Día 3						
Concentración (µg/mL)	R1	R2	R3	Promedio	DE	CV
10	328210110	340785884	341206106	336734033.3	7384923.722	2.19
20	677746468	704629669	697421517	693265884.7	13915048.83	2.01
30	1033542203	1038546069	1024805042	1032297771	6954524.67	0.67
40	1364053061	1375077991	1398398325	1379176459	17535602.92	1.27
50	1701113547	1697026731	1695982037	1698040772	2711882.663	0.16
				r ²	0.9997	
				b1	34085240.51	
				b0	5345768.7	

Anexo 14. Concentración de PZQ (% disuelto/cm² promedio) calculado a partir de los resultados de las pruebas de disolución intrínseca de PZQ y los cocristales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA realizados en medio HCl pH 1.2.

Tiempo	PZQ	DE	PZQ-2HBA-H ₂ O	DE	PZQ-24DHBA	DE
30	0.61847	0.02101	1.31845	0.05388	0.45714	0.23587
60	1.18656	0.01619	2.54895	0.13306	0.85374	0.4752
90	1.74689	0.03061	3.9853	0.2085	1.23152	0.49135
120	2.26582	0.06045	5.01275	0.24875	1.65507	0.61008
150	2.77762	0.07164	6.30319	0.29597	2.04988	0.59596
180	3.28194	0.08173	7.44276	0.40263	2.43249	0.52817
210	3.79239	0.09813	8.7123	0.44578	2.81001	0.68679
240	4.22145	0.10052	9.79504	0.44307	3.11782	0.62965
270	4.68244	0.13518	10.87699	0.57158	3.4661	0.64733
300	5.13665	0.17049	12.11764	0.73494	3.93887	0.36881

Anexo 15. Concentración de PZQ (% disuelto/cm² promedio) calculado a partir de los resultados de las pruebas de disolución intrínseca de PZQ y los cocristales PZQ-2HBA-H₂O y PZQ-24DHBA realizados en medio PBS pH 6.0.

Tiempo	PZQ	DE	PZQ-2HBA-H ₂ O	DE	PZQ-24DHBA	DE
30	0.68392	0.05318	3.38983	0.23587	1.93105	0.05794
60	1.23064	0.06071	5.31607	0.4752	3.12473	0.16219
90	1.69934	0.08513	6.58914	0.49135	4.15262	0.17123
120	2.14465	0.07642	7.70816	0.61008	5.09087	0.20754
150	2.61208	0.09251	8.7659	0.59596	5.85759	0.26886
180	3.0142	0.14057	9.54828	0.52817	6.61738	0.37114
210	3.40773	0.16082	10.64586	0.68679	7.2142	0.55274
240	3.78808	0.17689	11.71125	0.62965	7.86651	0.60644
270	4.18074	0.205	12.53808	0.64733	8.48533	0.73497
300	4.53519	0.19836	13.19901	0.36881	9.19277	0.73049