



INSTITUTO ANDALUZ DE CIENCIAS DE LA TIERRA
(CSIC-UGR)



UGR | Universidad
de Granada

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA, FACULTAD DE FARMACIA (UGR)

Tesis Doctoral con Mención Internacional

***INTERACCIÓN DE PRAZICUANTEL CON
EXCIPIENTES INORGÁNICOS MICRO- Y
NANOESTRUCTURADOS***

***INTERACTION OF PRAZIQUANTEL WITH
MICRO- AND NANOSTRUCTURED INORGANIC
EXCIPIENTS***

Ana María Borrego Sánchez

Programa de Doctorado en Farmacia

Granada, octubre de 2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Ana María Borrego Sánchez
ISBN: 978-84-1306-097-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/54777>

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los Proyectos Nacionales FIS2013-48444-C2-2-P, FIS2016-77692-C2-2-P y CGL2016-80833-R y de la Junta de Andalucía RNM1897. La doctoranda ha disfrutado de un contrato asociado a Proyectos de Excelencia de la Junta de Andalucía RNM1897. El trabajo ha sido desarrollado en el Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-UGR), en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada y en el Department of Chemistry and Applied Biosciences del Institute of Computational Science de la Università della Svizzera italiana de Lugano (Suiza).

Agradezco profundamente a mis directores de Tesis Doctoral, Ignacio, Carola y César, por toda la enseñanza que me han proporcionado en estos años y su constante dedicación. A Pilar, por su entera disposición y por toda su ayuda en mis inicios en la docencia. A Alfonso, por sus sabios consejos. A Michele Parrinello, por abrirme las puertas de su laboratorio y ampliar mis conocimientos durante la estancia internacional en Suiza. A todas mis compañeras de laboratorio, por tantas horas y momentos compartidos durante esta Tesis, y a todos mis compañeros de mi estancia en Suiza, por su calurosa acogida en Lugano. Sin duda alguna, a toda mi familia, por su apoyo incondicional durante toda mi formación académica. A mis amigas y amigos, por estar siempre a mi lado. Y a todos aquellos que pasaron por estos años de mi vida, formando parte de esta Tesis Doctoral.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen / Summary | 1 |
| CAPÍTULO I | |
| Introducción | 9 |
| I.1. Principio activo: Prazicuantel | 11 |
| I.1.1. Usos clínicos | 12 |
| I.1.1.1. Esquistosomiasis | 12 |
| I.1.1.1.1. Generalidades | 12 |
| I.1.1.1.2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico | 16 |
| I.1.1.1.3. Prevención y tratamiento | 18 |
| I.1.2. Historia | 19 |
| I.1.3. Estructura | 20 |
| I.1.4. Síntesis | 21 |
| I.1.5. Mecanismo de acción | 24 |
| I.1.6. Perfil fisicoquímico | 25 |
| I.1.7. Perfil biofarmacéutico y farmacocinético | 26 |
| I.1.7.1. Absorción | 26 |
| I.1.7.2. Distribución | 27 |
| I.1.7.3. Metabolismo | 27 |
| I.1.7.4. Eliminación | 28 |
| I.1.7.5. Biodisponibilidad | 28 |
| I.1.7.5.1. Estrategias de mejora de la biodisponibilidad oral | 29 |
| I.1.7.5.1.1. Aumento de la velocidad de disolución | 30 |
| I.1.7.5.1.2. Aumento de la absorción y otras estrategias | 34 |
| I.1.7.5.1.3. Vías de administración alternativas | 36 |
| I.2. Excipientes inorgánicos naturales | 36 |
| I.2.1. Arcillas | 37 |
| I.2.1.1. Concepto de arcilla | 37 |
| I.2.1.2. Estructura de los filosilicatos | 39 |
| I.2.1.3. Clasificación de los filosilicatos | 43 |
| I.2.1.3.1. Esmectitas: Montmorillonita | 45 |
| I.2.1.3.2. Sepiolita | 48 |
| I.2.1.4. Propiedades de las arcillas | 49 |
| I.2.1.5. Aplicaciones farmacéuticas de las arcillas | 53 |
| I.2.1.5.1. Usos históricos de las arcillas | 53 |

| | |
|---|----|
| I.2.1.5.2. Arcillas como principio activo | 54 |
| I.2.1.5.3. Arcillas como excipiente convencional | 54 |
| I.2.1.5.4. Arcillas como ingrediente cosmético | 55 |
| I.2.1.5.5. Arcillas como excipiente avanzado | 55 |
| I.2.2. Carbonato cálcico | 56 |
| I.2.2.1. Aspectos generales | 56 |
| I.2.2.2. Tipos de carbonato cálcico de uso farmacéutico | 57 |
| I.2.2.2.1. Carbonato cálcico pulverizado | 57 |
| I.2.2.2.1.1. Origen geológico | 58 |
| I.2.2.2.1.2. Origen biológico | 59 |
| I.2.2.2.2. Carbonato cálcico precipitado | 60 |
| I.2.2.3. Propiedades del carbonato cálcico | 61 |
| I.2.2.3.1. Propiedades de interés farmacéutico | 62 |
| I.2.2.4. Aplicaciones del carbonato cálcico | 63 |
| I.2.2.4.1. Usos históricos del carbonato cálcico | 63 |
| I.2.2.4.2. Aplicaciones farmacéuticas del carbonato cálcico | 64 |
| I.2.2.4.2.1. Carbonato cálcico como principio activo | 65 |
| I.2.2.4.2.2 Carbonato cálcico como excipiente convencional | 66 |
| I.2.2.4.2.3 Carbonato cálcico como como complemento alimenticio | 66 |
| I.2.2.4.2.4 Carbonato cálcico como ingrediente cosmético | 68 |
| I.2.2.4.2.5 Carbonato cálcico como excipiente avanzado | 69 |

CAPÍTULO II

Objetivos

71

CAPÍTULO III

Metodología computacional

77

| | |
|---|----|
| III.1. Teorías y métodos | 81 |
| III.1.1. Mecánica molecular (MM) | 81 |
| III.1.2. Química cuántica (QC) | 85 |
| III.1.2.1. Hartree-Fock (HF) y Post-HF | 87 |
| III.1.2.2. Teoría del Funcional de la Densidad | 89 |
| III.2. Sistemas de estudio y técnicas de modelización computacional | 92 |
| III.3. Paquetes de cálculo de modelización | 95 |

| | |
|--|-----|
| CAPÍTULO IV | |
| <i>Resultados</i> | 99 |
| IV.1. Estructura molecular y cristalina del prazicuantel. Propiedades espectroscópicas y polimorfismo | 101 |
| IV.2. Modelización molecular y espectroscopía infrarroja y Raman de la estructura cristalina del prazicuantel | 141 |
| IV.3. Mejora biofarmacéutica del prazicuantel por interacción con montmorillonita y sepiolita | 169 |
| IV.4. Modelización molecular de la interacción de prazicuantel con nanosuperficies de sepiolita y montmorillonita | 191 |
| IV.5. Cambios polimórficos conformacionales en la estructura cristalina del prazicuantel y su interacción con carbonato cálcico | 217 |
| IV.6. Carbonato cálcico como excipiente natural para mejorar potencialmente la biodisponibilidad del prazicuantel | 261 |
| CAPÍTULO V | |
| <i>Conclusiones / Conclusions</i> | 289 |
| Bibliografía | 297 |
| Anexo 1. Publicaciones adicionales no incluidas en la Tesis Doctoral | 329 |

Resumen / Summary

El prazicuantel es el fármaco de elección en el tratamiento humano de la esquistosomiasis, una enfermedad tropical producida por el parásito *Schistosoma*, con una estimación de más de 700 millones de personas vulnerables y 240 millones de personas enfermas en el mundo, principalmente en las regiones tropical y subtropical. El prazicuantel se administra por vía oral y presenta una baja solubilidad acuosa y elevada permeabilidad, siendo por tanto un fármaco de Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (*Biopharmaceutics Classification System*, BCS). Dado que la disolución de un fármaco es condición necesaria para que este se absorba, la baja solubilidad del prazicuantel requiere la administración oral de dosis elevadas para obtener concentraciones plasmáticas efectivas, lo que da lugar a reacciones adversas y resistencias al fármaco. Es, por tanto, un fármaco diana para la mejora de su perfil biofarmacéutico mediante sistemas farmacéuticos novedosos que aumenten la solubilidad acuosa.

Para superar estas limitaciones, en esta Tesis se han desarrollado sistemas farmacéuticos capaces de aumentar la velocidad de disolución del prazicuantel. Concretamente, las arcillas y el carbonato cálcico han

sido usados como excipientes capaces de interactuar con el fármaco aumentando su solubilidad. Dichos sólidos inorgánicos presentan además la ventaja de no encarecer el precio del medicamento, ya que son excipientes naturales abundantes y de bajo coste, lo cual resulta de relevancia debido a que el uso de este medicamento va destinado a países en vías de desarrollo.

El prazicuantel es un compuesto racémico, en el que sólo uno de sus enantiómeros presenta actividad farmacológica, por tanto, es de gran importancia estudiar su estructura atómica y molecular, que está íntimamente relacionada con sus propiedades cristalinas y espectroscópicas, y en consecuencia con su perfil fisicoquímico y biofarmacéutico. Dada la importancia del estudio teórico en el futuro desarrollo de formulaciones farmacéuticas con biodisponibilidad optimizada y/o estabilidad mejorada del fármaco, el presente trabajo ha consistido en estudiar mediante cálculos atomísticos a nivel mecanocuántico y con campos de fuerza clásicos, las estructuras y propiedades del prazicuantel tanto como molécula como sus formas cristalinas. Los cálculos de la molécula de prazicuantel han indicado la presencia de dos importantes conformeros: el *anti*, con los grupos carbonilos orientados en sentido opuesto y con mayor estabilidad, y el *syn*, con los grupos carbonilos orientados en el mismo sentido y con mayor polaridad. Dicha polaridad implica que, en un medio polar como el medio fisiológico, el conformero *syn* será el más probable e interactuará con el receptor. En las formas cristalinas de prazicuantel se han encontrado que estos conformeros no están mezclados en el cristal, es decir, que cada uno constituye una forma cristalina diferente. Se ha medido también experimentalmente el espectro de infrarrojo y Raman, encontrándose en concordancia con los valores calculados.

Posteriormente, se han estudiado las interacciones existentes entre el fármaco y los distintos excipientes tanto teórica como experimentalmente. Para ello, se han preparado productos de interacción de prazicuantel con montmorillonita y sepiolita, se han caracterizado y se ha evaluado el aumento de la velocidad de disolución del prazicuantel

como resultado de las interacciones con dichos excipientes. Las observaciones indican que es posible la adsorción del prazicuantel por la montmorillonita y sepiolita y que dicha interacción aumenta la velocidad de disolución del fármaco. El estudio a nivel teórico de estos productos de interacción ha reproducido los datos experimentales, encontrando con ello las interacciones intermoleculares que justifican el comportamiento experimental.

Por otra parte, se ha llevado a cabo el estudio de preparados de prazicuantel con carbonato cálcico, tanto como mezcla física como dispersión sólida, encontrando que la preparación del producto de interacción por dispersión sólida cambia la cristalinidad del prazicuantel, debido a la interacción del carbonato con los grupos carbonilos del fármaco en presencia de moléculas de agua. Las mezclas físicas con el carbonato no modifican la cristalinidad del fármaco, pero aumentan la velocidad de disolución con respecto a la del prazicuantel puro.

En general, los resultados de los estudios de esta Tesis han servido como base fundamental para establecer correlaciones entre los valores teóricos obtenidos mediante técnicas computacionales y los resultados experimentales de retención y liberación del fármaco en diferentes soportes o excipientes, en vistas a su optimización tecnológica.



Praziquantel is the drug of choice in the human treatment of schistosomiasis. Schistosomiasis is an unattended tropical disease produced by the *Schistosoma* parasite, with more than 700 million of vulnerable and 240 million infected patients worldwide, mainly in the regions tropical and subtropical. Praziquantel is administered orally and showed low solubility and high permeability, being a Class II drug according to the Biopharmaceutical Classification System (BCS). Therefore, the dissolution of the drug is the limiting factor of the absorption rate. As a result, orally high doses of drug are necessary to

obtain effective plasma concentrations, which caused side effects and resistance to the drug. Therefore, Praziquantel is a target drug for improvement of its biopharmaceutical profile by means of novel pharmaceutical systems that increase the aqueous solubility and the dissolution rate of the drug.

To overcome these limitations, several systems have been developed in this Thesis to increase the dissolution rate of praziquantel, using different excipients to support the drug. Specifically, clays and calcium carbonate have been proposed as excipients to be used in poorly soluble drug delivery systems, in view of improving the aqueous solubility of drugs. Those inorganic solids do not increase the final cost of the medicinal product, because they are natural, abundant, and low-cost excipients, which is relevant since praziquantel is mainly used in developing countries.

Praziquantel is a racemic compound, in which only one enantiomer has the pharmacological activity, so it is very important to study its atomic and molecular structure, which is closely related to its crystalline and spectroscopic properties, and therefore to its physicochemical and biopharmaceutical profiles. The present work has been based on the study, by means of atomistic calculations at the quantum-mechanical level and with force fields, of the structures and properties of the molecule and crystalline forms of praziquantel. The calculations of the praziquantel molecule have shown the presence of two important conformers: the *anti*, with the carbonyl groups oriented in the opposite direction and with higher stability, and the *syn*, with the carbonyls oriented in the same direction and with higher polarity. Such polarity implies that, in a polar medium like the physiological medium, the *syn* conformer will be the most probable and will interact with the receiver. In the crystalline forms of praziquantel, these conformers are not mixed in the crystal, so each conformer constitutes a different crystalline form. The infrared and Raman spectrum have been also measured experimentally, finding a good agreement with the calculated values.

Next, the interactions between the drug and the different excipients have been studied theoretically and experimentally. To do that, the interaction products of praziquantel with montmorillonite and sepiolite have been prepared, they have been characterized and the increase in the dissolution rate of praziquantel as a result of the interactions with these excipients has been evaluated. The observations indicate that the adsorption of praziquantel in the montmorillonite and sepiolite is possible and that such interaction increases the dissolution rate of the drug. The theoretical study has reproduced the experimental data, finding the intermolecular interactions that justify the experimental behavior.

On the other hand, the study of praziquantel preparations with calcium carbonate was carried out, as a physical mixture and as a solid dispersion. It has been found that the preparation of the interaction products by solid dispersion changes the crystallinity of praziquantel due to the interaction of the carbonate with the carbonyl groups of the drug in the presence of water molecules. In addition, physical mixtures with calcium carbonate do not modify the crystallinity of the drug, however they increase its dissolution rate with respect to that of pristine praziquantel.

Overall, the results of this study have allowed to establish correlations between the theoretical values obtained by computational techniques and the experimental results of retention and release of the drug in different natural excipients, in view of its technological optimization.

CAPÍTULO I

Introducción

En este capítulo se describen los principales aspectos relacionados con el principio activo y los excipientes estudiados en esta Tesis Doctoral. En primer lugar, se presenta el prazicuantel como el fármaco antiparasitario indicando sus usos clínicos, historia, estructura, síntesis, mecanismo de acción, perfil fisicoquímico y perfil biofarmacéutico y farmacocinético. En segundo lugar, se describen los aspectos generales, clasificación, propiedades y aplicaciones de las arcillas y del carbonato cálcico usados como excipientes.

I.1. PRINCIPIO ACTIVO: PRAZICUANTEL

El prazicuantel es el fármaco de elección para el tratamiento de la esquistosomiasis, enfermedad producida por el parásito *Schistosoma*. El prazicuantel es altamente eficaz contra todas las especies de *Schistosoma* y también contra cestodos. Se suele administrar en una única dosis oral, lo que facilita el cumplimiento terapéutico y presenta escasos efectos colaterales a corto y largo plazo. Además, el coste de producción es bajo. Por su eficacia, seguridad y características de costo-efectividad, la Organización Mundial de la Salud incluye al prazicuantel en la Lista de

Medicamentos Esenciales y considera al prazicuantel como medicamento antihelmíntico (WHO, 2017).

I.1.1. USOS CLÍNICOS

El prazicuantel se usa como fármaco antiparasitario (antihelmíntico) en humanos administrado exclusivamente en formas de administración oral, siendo el tratamiento de elección para la esquistosomiasis, y una alternativa terapéutica en otras patologías producidas por trematodos y cestodos.

Este fármaco está indicado principalmente para parasitaciones causadas por *Schistosoma* patógenos para el humano como son *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* y *S. mekongi*. El prazicuantel también es altamente efectivo en el tratamiento de infecciones intestinales, hepáticas y pulmonares, incluyendo las causadas por *Fasciolopsis buski*, *Metagonimus yokogawai*, *Heterophyes heterophyes*, *Echinostoma* spp, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felineus* y varias especies de *Paragonimus* (WHO, 2018), así como en infecciones causadas por tenias, tales como *Taenia solium* y *Taenia saginata* y otros cestodos (*Diphyllobothrium latum* y *Hymenolepis nana*) (OMS, 2018).

I.1.1.1. ESQUISTOSOMIASIS

I.1.1.1.1. Generalidades

La esquistosomiasis (antiguamente conocida como bilharziasis o bilharziosis) es una enfermedad parasitaria provocada por trematodos del género *Schistosoma*, que afecta actualmente a 240 millones de personas en el mundo, principalmente en las regiones tropical y subtropical, de las cuales solamente 88 millones reciben tratamiento adecuado (Chitsulo et al., 2000; Steinmann et al., 2006). Es una de las pocas enfermedades parasitarias en fase de expansión con más de 200.000 muertes anuales estimadas, difundida en 78 países del mundo (Figura I.1), aunque se estima que al menos un 92% de las personas infectadas vive en África

(OMS, 2018). Por ello, debido a su importancia en términos numéricos y gravedad clínica, se considera la segunda enfermedad parasitaria con mayor prevalencia, después de la malaria.

La Organización Mundial de la Salud se refiere a esta enfermedad como una enfermedad tropical desatendida, con una estimación de más de 700 millones de personas vulnerables a la infección en todo el mundo (OMS, 2018).

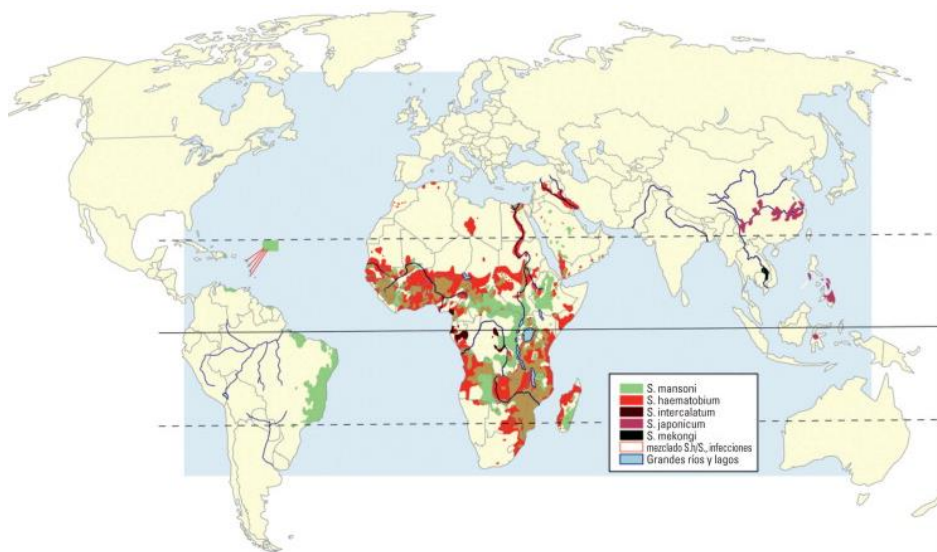


Figura I.1. Mapa con la distribución de la Schistosomiasis (tomado de Ayala Fernández et al., 2014).

Existen dos formas clínicas de esquistosomiasis, la intestinal (provocada por *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum*) y la urogenital (provocada por *Schistosoma haematobium*) (Utzinger y Keiser, 2004; Utzinger et al., 2011; Gryseels, 2012). En particular, el *S. mansoni* se extiende en casi la totalidad de África, Oriente Medio, el Caribe y en el Sur de América (Brasil, Surinam y Venezuela); el *S. haematobium* en África, Oriente Medio y Córcega (Francia) y el *S. japonicum* en China, Filipinas e Indonesia (OMS, 2018).

La esquistosomiasis se adquiere por contacto con agua dulce contaminada con larvas del parásito, denominadas cercarias, liberadas por diferentes especies de moluscos (hospedadores intermediarios). Las cercarias pueden penetrar en un individuo a través de la piel (Figura I.2) (Sirewalt y Hackey, 1956).

Los parásitos adultos de *S. mansoni* y *S. japonicum* residen en las venas mesentéricas y los de *S. haematobium* en las venas del plexo vesical de los hospedadores, lugar en el que se produce la fecundación, tras el acoplamiento de machos y hembras, y posterior deposición de huevos. Estos huevos atraviesan la pared de las vénulas, traspasan los tejidos y pueden alcanzar el intestino o la vejiga urinaria, en función de la especie. Tras un período que oscila entre 35 y 70 días, los huevos se eliminan bien por la orina o por las heces. Los huevos son expulsados embrionados y en un ambiente adecuado (agua dulce, a una temperatura de al menos 10 °C y en presencia de luz), eclosionan, liberando las larvas ciliadas, denominadas miracidios. Estos tienen una vida útil de unas horas, durante las cuales nadan de forma activa, pudiendo alcanzar el huésped intermediario: moluscos gasterópodos (caracoles) pertenecientes al género *Biomphalaria* para *S. mansoni*, al género *Bulinus* para *S. haematobium* y al género *Oncomelania* para *S. japonicum* (Liu et al., 1997). En el interior del molusco tiene lugar un proceso multiplicativo en el que el miracidio se transforma en un esporoquiste primario. A partir del cuarto día, se forman los esporoquistes secundarios, que migran al hepatopáncreas del molusco, y una vez en él emergen las larvas llamadas cercarias. Transcurrido aproximadamente un mes, se liberan (bajo el estímulo de luz y a una temperatura superior a 20 °C) en decenas de miles de cercarias por cada miracidio penetrado. Estas cercarias se caracterizan por tener una cola bifurcada, que les permite nadar libremente en el agua y alcanzar el huésped definitivo, el hombre y otros vertebrados. Contactan con la piel y la atraviesan gracias a la acción de determinadas enzimas proteolíticas, perdiendo la cola en la penetración. Los parásitos, llamándose ahora esquistosómulos, después de permanecer uno o dos días en los tejidos subcutáneos, alcanzan el torrente circulatorio y llegan al corazón, pulmones e hígado, y en este último es donde se alojan

definitivamente. Posteriormente pasan de nuevo, a través de la circulación periférica, a las venas mesentéricas o del plexo vesical, donde alcanzan la madurez sexual e inician la fecundación y oviposición (Figura I.2 y I.3).

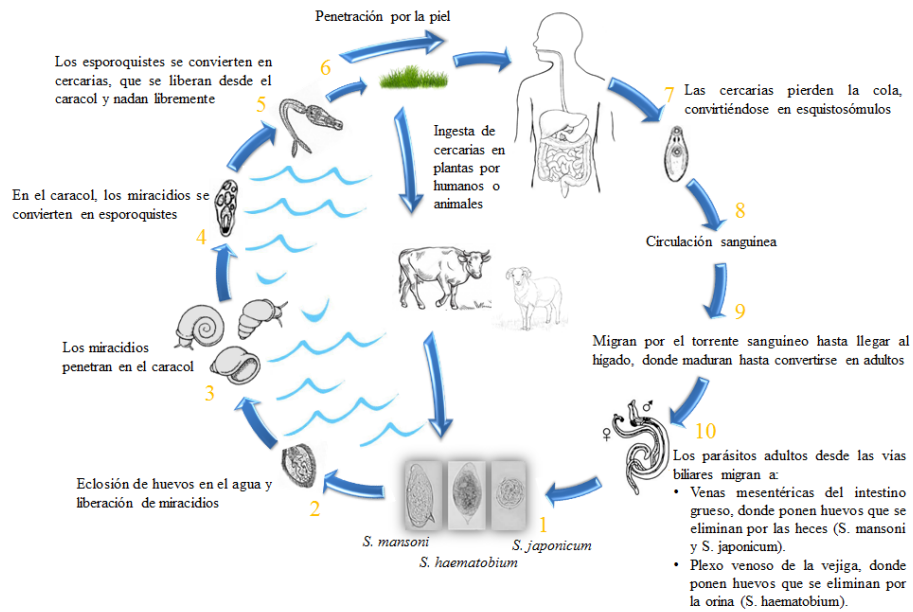


Figura I.2. Ciclo biológico de *Schistosoma* (modificado de CDC, 2018).

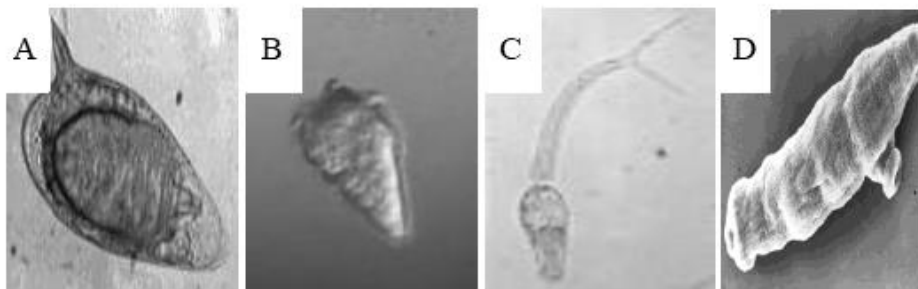


Figura I.3. Formas larvarias del *Schistosoma* spp.: Huevo (A), Miracidio (B), Cercaria (C) y Esquistosómulo (D).

I.1.1.1.2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico

Las manifestaciones clínicas y los daños asociados a la esquistosomiasis, como en casi todas las enfermedades parasitarias, son proporcionales al número de parásitos involucrados y a las reacciones individuales del huésped. No sólo son los huevos en sí los que producen daño al organismo (estos daños se deben a las cercarias en su paso a través la piel y a los parásitos adultos en su tránsito sistémico), sino también la respuesta inmunitaria del propio organismo parasitado. Por ejemplo, la respuesta inmune a los huevos depositados en los tejidos produce granulomas (OMS, 2018).

En la mayoría de los casos (90%), la enfermedad puede afectar durante muchos años de forma asintomática, pudiendo desarrollarse la esquistosomiasis de forma crónica y pudiendo aparecer los síntomas meses o años después de la exposición inicial a los parásitos. Principalmente los síntomas son dolor abdominal, ascitis, sangre en las heces, sangre en orina y dolor al orinar, dificultad al respirar y tos, debilidad, dolor en el pecho y palpitaciones, convulsiones, cambios del estado mental y lesiones en la vulva o en el área perianal.

Desafortunadamente, algunos de los infectados desarrollan la esquistosomiasis aguda, también llamada fiebre de Katayama, cuya sintomatología se manifiesta generalmente con fiebre, dolor abdominal, diarrea, sangre en las heces, tos, malestar, dolor de cabeza, erupción, dolores en el cuerpo, eosinofilia, fatiga y hepatoesplenomegalia. En ocasiones la esquistosomiasis aguda provoca lesiones del sistema nervioso central por el depósito de huevos en el cerebro (*S. japonicum*) o en la médula espinal (*S. mansoni* y *S. haematobium*).

Por otro lado, la infestación continuada puede causar que parte de los huevos se queden atrapados en diferentes tejidos, formando granulomas, que posteriormente dan lugar a reacciones granulomatosas y fibrosis en los órganos afectados. Esto se debe a que la destrucción de los huevos se produce por el recubrimiento de los mismos con unas cubiertas inmunitarias (celular y fibrótica), seguido de un proceso de reparación

con calcificación y formación de cicatriz, que conlleva a una fibrosis progresiva del tejido hepático, alterándose su función. También se ve obstaculizado el flujo de sangre a través del tejido fibroso, produciéndose un aumento progresivo de la presión en el sistema portal, provocando una acumulación de líquido seroso en la cavidad abdominal, conocida como ascitis y embolias debidas a granulomas cerebrales o espinales. Por tanto, la esquistosomiasis es claramente una enfermedad debilitante y como tal tiene efectos más graves en poblaciones con deficiencias nutricionales.

El diagnóstico de esta enfermedad se basa principalmente en el historial médico y en el examen físico del paciente. Es importante saber si la persona ha habitado o ha visitado zonas del mundo donde la enfermedad es endémica. El método de diagnóstico más práctico es la detección directa de huevos de *Schistosoma* en la orina (*S. haematobium*) y en heces (*S. mansoni* y *S. japonicum*) mediante técnicas de microscopía. Los huevos de cada especie de *Schistosoma* se diferencian por su morfología y tamaño como se puede observar en la Figura I.4.

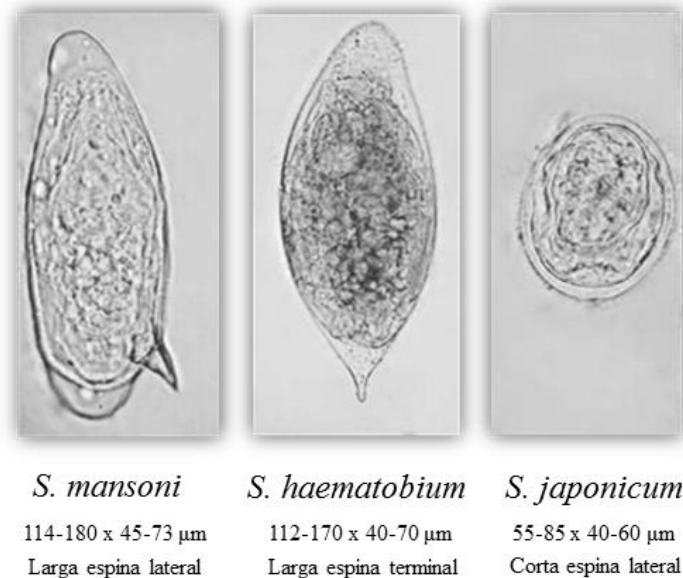


Figura I.4. Huevos de distintas especies de *Schistosoma*.

Otras técnicas de diagnóstico son las serológicas e inmunológicas, que pueden ser útiles para detectar la infección en personas residentes en zonas no endémicas o de baja transmisión. Estas y otras técnicas indirectas que están en desarrollo persiguen un diagnóstico precoz (Feldmeier y Poggensee, 1993; Rabello, 1997; Utzinger et al., 2011; OMS, 2018).

I.1.1.1.3. Prevención y tratamiento

La prevención y tratamiento de esta patología incluye, junto con el empleo de fármacos, técnicas de saneamiento y educación sanitaria (OMS, 2018). Así, las técnicas de prevención incluyen evitar todo contacto de la piel humana con las fuentes de agua dulce que puedan estar infectadas por *Schistosoma*. Además, es importante mejorar el saneamiento de las aguas y la eliminación de los moluscos (hospedadores intermediarios), mediante molusquicidas, en algunas fuentes de agua dulce, aunque requiere repetir el proceso a menudo y tiene un éxito limitado.

El tratamiento farmacológico preventivo se suele abordar con el uso de prazicuantel, tanto para la forma intestinal como la urinaria, mediante una terapia quimiopreventiva periódica y focalizada en aquellas personas pertenecientes a grupos de riesgo en las poblaciones. Aun así, una de las principales limitaciones del control de la esquistosomiasis es la escasa disponibilidad del prazicuantel. Los datos de 2016 revelan que solamente el 34,4% de las personas que requerían tratamiento y el 51,6% de los niños en edad escolar que necesitaban quimioprofilaxis contra la enfermedad fueron tratadas. Por tanto, la prevención de la esquistosomiasis es problemática, puesto que además no existe una vacuna, aunque su investigación está en curso actualmente.

Por otra parte, el tratamiento de los enfermos se aborda con tres fármacos, la oxamniquina, el albendazol y el prazicuantel. Este último es el de elección, mientras que los dos primeros están destinados a situaciones en las que no sea posible emplear prazicuantel.

El prazicuantel es activo contra todas las especies del parásito (Cioli et al., 1995), presenta una alta eficacia, baja toxicidad y es de fácil administración oral. Esto, junto con su versatilidad y su bajo coste de producción y venta, ha hecho que sea elegido como el fármaco de elección (Doenhoff et al., 2000). Asimismo, es efectivo contra otras infecciones parasitarias tales como trematodos y cestodos que infectan a animales domésticos, considerándose un antihelmíntico de amplio espectro. Su principal desventaja es su ineficacia contra las formas juveniles del *Schistosoma* (Cioli y Pica-Mattoccia, 2003).

Cabe indicar que el resultado de tener un solo fármaco para el tratamiento de una enfermedad tan extendida lleva a una situación muy peligrosa que es la resistencia al fármaco.

I.1.2. HISTORIA

A principio del año 1970, la búsqueda de sedantes eficaces con pocos efectos secundarios era el objetivo activamente perseguido por la industria farmacéutica. Investigadores de los laboratorios Merck consideraron el grupo de la pirazinoisoquinolina una gran posibilidad, sin embargo era necesario el uso de dosis relativamente altas para lograr un efecto comparable al de los fármacos ya usados. Por este motivo, los compuestos de este grupo no se siguieron investigando por Merck y se creó un acuerdo con Bayer, que comprobando que eran eficaces antihelmínticos aprobó estos compuestos para uso veterinario (Groll, 1984). De entre un total de unos 400 compuestos, fue el prazicuantel el fármaco de elección por ser eficaz contra un amplio espectro de parásitos de trematodos y cestodos (Andrews et al., 1983). Sucesivos estudios preclínicos mostraron que el prazicuantel era altamente eficaz contra todas las especies de esquistosomas patógenos para el hombre (Davis, 1982). Su toxicidad aguda se ensayó en ratas, ratones, conejos y perros, demostrando ser muy baja en comparación con los fármacos esquistosomicidas que se usaban hasta entonces.

A raíz de los prometedores resultados, obtenidos en experimentos con animales, en 1978 se iniciaron los ensayos clínicos con voluntarios

sanos (Leopold et al., 1978). Paralelamente, la OMS en colaboración con la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer llevó a cabo estudios toxicológicos exhaustivos que descartaron cualquier actividad mutagénica, carcinogénica, embriotóxica o teratogénica del prazicuantel. También, se realizaron ensayos clínicos de tolerancia al prazicuantel y de sus efectos terapéuticos contra las tres especies comunes de esquistosomas que pueden infectar al hombre (*S. haematobium*, *S. mansoni* y *S. japonicum*). Estos ensayos fueron realizados de forma conjunta por el Programa de Enfermedades Parasitarias de la OMS y el Departamento de Medicina del Centro de Investigación Farmacéutica de Bayer, en África, Japón, Filipinas y América del Sur (Wegner, 1981). Concretamente, los estudios focalizados en las infecciones por *S. haematobium* se llevaron a cabo en Zambia, en la unidad de farmacología clínica del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (Hospital Central de Ndola, Ndola) (Davis et al., 1979); los centrados en las infecciones por *S. mansoni*, en el Centro de Pesquisas (Belo Horizonte, Brasil) (Katz et al., 1979) y en el caso de las infecciones por *S. japonicum*, se llevaron a cabo estudios doble ciego de tolerancia en el Hospital de Koma-Kyoritsu (Yamanashi) con el asesoramiento del Instituto Nacional de Salud de Tokio (Japón) (Ishizaki et al., 1979), complementados por los ensayos clínicos de tolerancia y eficacia realizados por el Control de la esquistosomiasis y el Equipo de Investigación de Palo (Leyte, Filipinas) (Davis y Wegner, 1979; Santos et al., 1979). Los resultados de estos estudios confirmaron no sólo una buena tolerancia en los pacientes, sino también una alta eficacia contra las distintas especies de *Schistosoma* (Wegner, 1981). La OMS lo incluye desde entonces en la Lista de Medicamentos Esenciales para el tratamiento de la esquistosomiasis sin que haya sido sustituido por ningún otro fármaco.

I.1.3. ESTRUCTURA

El prazicuantel es un derivado isoquinolínico, que posee en su estructura química un núcleo de pirazina, otro de isoquinolina y un radical cíclico hexil-carbonilo (Figura I.5).

Químicamente se denomina (11bRS)-2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona (RFE, 2015), su fórmula empírica es $C_{19}H_{24}N_2O_2$ y presenta un peso molecular de 312,41 g/mol.

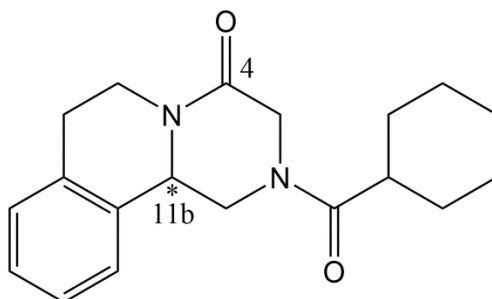


Figura I.5. Estructura del prazicuantel.

En cuanto a la estructura molecular, diversos estudios sobre la molécula han confirmado que el grupo oxo en la posición 4 es esencial para la actividad del fármaco y que cualquier modificación del anillo esqueleto suprime la actividad.

El prazicuantel tiene un centro quiral en la posición 11b (*). En terapéutica, se emplea el compuesto racémico formado a partes iguales por los isómeros “levo” R(-) y “dextro” S(+), no obstante únicamente el levo-enantiómero posee actividad esquistomicida (Pax et al., 1978). Por tanto, la actividad antihelmíntica del prazicuantel está asociada principalmente con el R(-)-enantiómero (Andrews, 1985).

I.1.4. SÍNTESIS

La mayoría de los procedimientos sintéticos para la obtención de los pirazino(2,1-a)isoquinolin-4-ona comienzan con la isoquinolina (**1**) de la que se puede disponer fácilmente (Figura I.6). El paso clave es la reacción de Reissert, que junto con una hidrogenación de alta presión da lugar a un producto intermedio (**3**). La acilación de este producto con cloruro de cloroacetilo origina otro producto intermedio (**4**). La

conversión de ese producto (**4**) al producto final (**5**), puede lograrse por una reacción de ciclación catalizada por una base (Seubert et al., 1977).

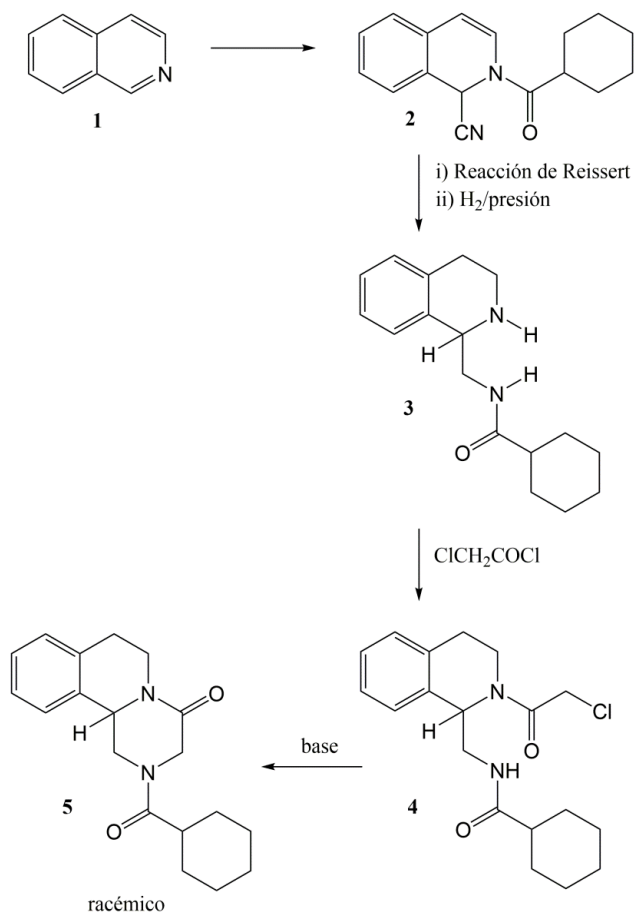


Figura I.6. Síntesis de praziquantel.

La reacción de Reissert emplea un exceso de KCN, lo que origina grandes volúmenes de desechos acuosos con un alto contenido de cianuro, haciendo que esta vía de síntesis sea muy contaminante (Shen et al., 2006). Por este motivo se han planteado numerosas modificaciones de la reacción, tanto en el sustrato como en los agentes dadores de cianuro y el medio de reacción (Hyup Kim et al., 1998; Carvalho et al., 1999; Roszkowski et al., 2006; Cao et al., 2010; Kumar Sharma et al., 2014).

El producto racémico (**5**) puede diferenciarse en sus componentes R-(-) (**5a**) y S-(+) (**5b**). Puesto que el enantiomero R-(-) es el activo, es deseable la conversión del enantiomero inactivo (**5b**) en su imagen especular (**5a**), tal como se muestra en la Figura I.7. Esta transformación puede lograrse mediante la deshidrogenación de **5b**, obteniendo el producto **6**, seguido por una hidrogenación catalítica para obtener nuevamente el producto inicial (**5**) (El-Subbagh y Al-Badr, 1998).

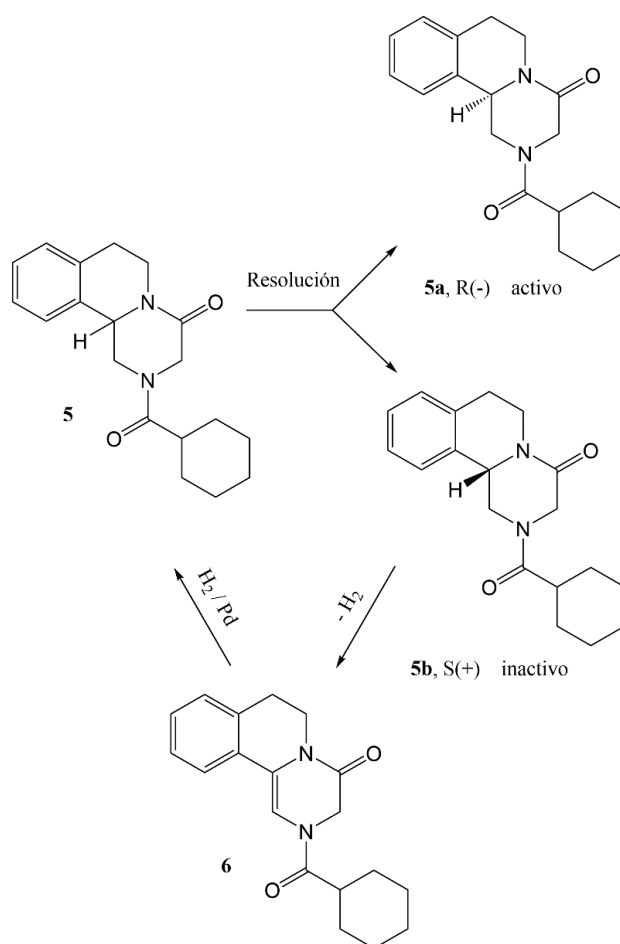


Figura I.7. Selección del componente activo.

I.1.5. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción del prazicuantel no se conoce con exactitud, aunque la mayoría de las evidencias apuntan hacia una alteración de la homeostasis del calcio. El prazicuantel puede actuar sobre las distintas etapas de desarrollo de los *Schistosomas*, pudiendo afectar a parásitos adultos, miracidios y cercarias, pero presenta poco o ningún efecto sobre los huevos, esporoquistes o esquistosómulos.

Tras la administración de prazicuantel, el principal daño que puede observarse en los *Schistosomas* es la alteración del tegumento (Xiao et al., 2000; Xiao et al., 2007), que depende de la dosis y el tiempo del tratamiento (Redman et al., 1996). Las principales alteraciones morfológicas que puede sufrir el tegumento son la vacuolización en la base del sincitio tegumental y la vesiculación de la superficie, afectando las funciones de absorción, excreción y secreción del parásito. Particularmente, provoca una parálisis espástica de la musculatura, probablemente causada por un rápido flujo de iones Ca^{2+} hacia el interior del *Schistosoma*, alterando la homeostasis de calcio e induciendo el desprendimiento de las ventosas del parásito de la pared vascular del huésped (Andrews et al., 1983). Como consecuencia se produce un desplazamiento de los *Schistosomas* desde las venas mesentéricas hacia el hígado, pudiendo el hospedador eliminarlos posteriormente (Day et al., 1992; Wu et al., 2011).

Por tanto, parece ser que la acción del prazicuantel está estrechamente vinculada a los mecanismos de homeostasis de calcio en el parásito. Esta hipótesis se basaría en la estimulación de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} . Distintos estudios sugieren la actuación de prazicuantel en la subunidad β de los canales de calcio de *S. mansoni* y *S. japonicum*, como el posible mecanismo de acción del fármaco (Kohn et al., 2001).

Por otro lado, el prazicuantel presenta resistencias. En la actualidad hay numerosos informes de cepas de *Schistosomas* con disminución de sensibilidad al fármaco (Cioli, 2000). Fue en 1994, en

Senegal, donde se produjo la primera alarma sobre la falta de eficacia del prazicuantel. Sólo el 20-30% de los individuos tratados resultaron curados, cuando este porcentaje es generalmente del 80-90% (Gryseels et al., 1994). Se tuvo en cuenta que las condiciones epidemiológicas (alto número de parásitos, reinfección rápida, etc.) influyen en la eficacia del fármaco, pero los *Schistosomas* de este brote fueron tratados en el laboratorio y demostraron una menor sensibilidad al fármaco (Fallon et al., 1995). Una segunda alarma provino de Egipto, donde los pacientes refractarios al tratamiento fueron tratados dos veces con el prazicuantel y la correspondiente cepa de *Schistosomas* se aisló y se ensayó en laboratorio la sensibilidad al fármaco. Con este procedimiento han sido aisladas cepas de *Schistosomas* que manifiestan una insensibilidad parcial al prazicuantel (Ismail et al., 1996). Una tercera evidencia, se recogió en un laboratorio inglés donde una cepa inicialmente sensible fue sometida en las generaciones sucesivas a presión selectiva con dosis crecientes de prazicuantel y se observó que ya en el séptimo paso (alrededor de un año y medio después) los *Schistosomas* resultantes mostraban una menor susceptibilidad a la acción del prazicuantel (Fallon y Doenhoff, 1994). Por tanto, es evidente la gran importancia del estudio del prazicuantel, así como su fármacorresistencia, para producir análogos del fármaco capaces de superar dicha resistencia. En el caso de prazicuantel, el estudio de resistencia tiene una atracción adicional, porque el mecanismo de acción del fármaco es aún desconocido y el análisis de la resistencia ha resultado esencial para la comprensión del mecanismo de acción del prazicuantel (Cioli et al., 1993; Wang et al., 2012). En este contexto, el estudio de la estructura molecular y cristalina del prazicuantel resulta esencial para conocer su mecanismo de acción y combatir las desventajas que presenta el fármaco.

I.1.6. PERFIL FÍSICOQUÍMICO

El prazicuantel es un polvo cristalino blanco o casi blanco, casi inodoro y con un sabor amargo. Es un compuesto estable en condiciones normales (Seubert et al., 1977; RFE, 2015), muy poco soluble en agua (0,4 mg/mL) (1g/2500 mL) y fácilmente soluble en etanol al 96 % (97

mg/mL), en cloroformo (567 mg/mL) y en cloruro de metileno (RFE, 2015). Se debe conservar protegido de la luz (Budavari et al., 1989; El-Subbagh y Al-Badr, 1998), presenta un punto de fusión entre 136-142 °C y se caracteriza por presentar polimorfismo (RFE, 2015), ya que, el racemato (RS)-PZQ cristaliza en una forma cristalina anhidra que es diferente a la del enantiómero (R) o (S)-PZQ, que son hemihidratos. Por tanto, el racemato es una forma cristalina diferente a la del enantiómero puro de prazicuantel. Además, diferentes estudios han encontrado nuevas formas cristalinas del prazicuantel (De la Torre et al., 1999; Espinosa Lara et al., 2013; Zanolla et al., 2018a).

1.1.7. PERFIL BIOFARMACÉUTICO Y FARMACOCINÉTICO

Dado que no existe una formulación parenteral endovenosa humana, la biodisponibilidad absoluta de prazicuantel no se conoce. Los estudios en animales monogástricos indican un fuerte efecto de primer paso hepático y una biodisponibilidad oral media de aproximadamente el 36% (Olliaro et al., 2014).

1.1.7.1. ABSORCIÓN

El prazicuantel se absorbe rápidamente por vía oral en un porcentaje superior al 80%, incluso en presencia de alimentos. El pico plasmático (la concentración máxima) se alcanza entre 1 y 3 horas tras la administración. Sin embargo, la biodisponibilidad a nivel sistémico es baja y varía considerablemente entre los individuos. Para aumentar la biodisponibilidad se aconseja administrar junto con alimentos, puesto que se ha demostrado que los niveles plasmáticos son más altos con una dieta rica en grasa, y aún más con una dieta rica en carbohidratos (Homeida et al., 1994; Castro et al., 2000; López-Gómez et al., 2001). El efecto de los alimentos sobre la biodisponibilidad del prazicuantel puede deberse a cambios en el flujo sanguíneo hepático y a una alterada expresión del citocromo P450 en respuesta a la dieta o cambios en el metabolismo de primer paso (Wilkinson, 1997; Murray, 2006).

I.1.7.2. DISTRIBUCIÓN

El volumen de distribución de este fármaco no se conoce. A partir de estudios no clínicos en ratones, se ha demostrado que el fármaco se distribuye muy rápidamente por todas las partes del cuerpo (Andrew, 1985). También se han obtenido resultados equivalentes en conejos y en ratas (Shu-Hua et al., 1992), donde la rápida distribución del prazicuantel se observó en todos los órganos de las ratas a las que se les administraron dosis únicas o repetidas por vía oral e intravenosa. Después de ambos modos de administración, las concentraciones más altas siempre se encontraron en el hígado y los riñones (Steiner et al., 1976a; Steiner y Garbe, 1976b). Se recogieron concentraciones mayores que las plasmáticas en pulmón, páncreas, glándulas suprarrenales, glándula pituitaria y glándula salival (Andrews et al., 1983). Debe considerarse el hecho de que puede atravesar la barrera hematoencefálica y distribuirse por el líquido cefalorraquídeo.

El prazicuantel se encuentra altamente unido a proteínas (aproximadamente el 80% a la albúmina) (González-Esquivel et al., 2005), lo que hace que los niveles de fármaco libre estén sujetos a factores tales como la nutrición e inflamación (Bohnert y Gan, 2013). Además, esta fracción libre es mayor en niños menores de un año de edad, puesto que presentan una menor cantidad plasmática de proteínas totales, incluyendo la albúmina (Kearns et al., 2003).

I.1.7.3. METABOLISMO

El prazicuantel en el organismo sufre un extenso metabolismo de primer paso hepático, originando metabolitos mono, di y polihidroxilados, que son producidos en el hígado por el sistema citocromo P450, particularmente por los sistemas CYP1A2, CYP3A4, CYP2B1, CYP3A5 y CYP2C19 (Andrews et al., 1983; Dollery, 1999). El principal metabolito identificado en humanos es el trans-4-hidroxi prazicuantel, que representa las dos terceras partes del total de los metabolitos presentes en la orina.

Debido a ese efecto de primer paso hepático, la farmacocinética de este fármaco es susceptible a diversas variabilidades debidas a las diferencias farmacogenéticas interindividuales o a las interacciones con medicamentos o con sustancias que inducen o inhiben isoenzimas específicas del sistema citocromo. Por ejemplo, la administración conjunta del prazicuantel con cimetidina o zumo de pomelo aumenta la biodisponibilidad del mismo (Castro et al., 2002). Por el contrario, si se administra junto con antiepilépticos inductores del CYP, como son la carbamazepina y la fenitoína (Bittencourt et al., 1992), o con la rifampicina (Riditid et al., 2002), disminuye la biodisponibilidad. Además, influye el estado de la función hepática, de manera que del efecto el fármaco aumenta con la gravedad de la insuficiencia hepática (Mandour et al., 1990). El tiempo de semivida plasmática del prazicuantel es de 1,0-1,5 horas, con una vida media de los metabolitos de aproximadamente 4 horas.

I.1.7.4. ELIMINACIÓN

La eliminación del prazicuantel es esencialmente renal, y en menor medida a través de las heces. Puesto que este fármaco es extensamente metabolizado, únicamente el 0,01% se elimina en la orina como el compuesto original y el resto en forma de metabolitos. Aproximadamente el 80% de la dosis es eliminada en 4 días, mayoritariamente en las 24 primeras horas (Andrews et al., 1983).

Hay que tener en cuenta que el prazicuantel puede ser excretado a través de la leche materna, aunque estudios han demostrado que en el tratamiento de la esquistosomiasis se considera seguro para mujeres embarazadas y lactantes, por lo que se recomienda proseguir la lactancia durante el tratamiento (OMS, 2018).

I.1.7.5. BIODISPONIBILIDAD

Se entiende por biodisponibilidad la cantidad y velocidad con la que un fármaco, una vez administrado desde su forma farmacéutica, aparece en la circulación sistémica (o en el lugar de acción). El

prazicuantel es hidrófobo o lipofílico y posee baja solubilidad acuosa. No obstante, se absorbe bien a través del tracto gastrointestinal (Andrews, 1985). Las dosis orales necesarias son altas para superar el metabolismo de primer paso hepático y para conseguir concentraciones adecuadas en los tejidos diana (Leopold et al., 1978). Se administra a los seres humanos solamente por vía oral. Una mejora de la solubilidad acuosa permitiría vías alternativas de administración, tales como formulaciones parenterales, evitando así el significativo metabolismo hepático de primer paso y la reducción en la dosis suministrada (Patzschke et al., 1979). Paralelamente, un aumento de solubilidad permitiría reducir las altas dosis orales utilizadas actualmente.

El prazicuantel se clasifica en la categoría II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) (Lindenberg et al., 2004; González-Esquivel et al., 2005). Esto significa que tiene muy baja solubilidad en agua y alta permeabilidad, lo cual hace que la disolución sea el factor limitante de la velocidad de absorción (Amidon et al., 1995). Por consiguiente, la mejora de velocidad de disolución del prazicuantel es un aspecto de especial interés tecnológico (Passerini et al., 2002a; Passerini et al., 2002b; Seo et al., 2003; Perissutti et al., 2003; Passerini et al., 2006).

I.2.7.5.1. Estrategias de mejora de la biodisponibilidad oral

Para que tenga lugar la absorción de los principios activos a través de las membranas biológicas, los solutos deben encontrarse casi siempre en forma molecular, es decir, disueltos. En consecuencia, el estudio de la solubilidad de los principios activos y los factores que la afectan es especialmente importante en el campo farmacéutico.

La solubilidad, la disolución y la permeabilidad gastrointestinal son parámetros fundamentales para controlar la velocidad y el grado de absorción de un fármaco y su biodisponibilidad (Amidon et al., 1995; Leuner y Dressman, 2000; Aulton y Taylor, 2013). La solubilidad acuosa de un fármaco es una propiedad fundamental que desempeña un papel importante en su absorción gastrointestinal. Junto con la cantidad de

fármaco disuelto, resulta fundamental conocer la velocidad con la que se disuelve (Williams et al., 2013). La biodisponibilidad oral de un fármaco depende de la solubilidad acuosa, velocidad de disolución, metabolismo de primer paso, etc. (Krishnaiah et al., 2010). Por lo tanto, la disolución *in vitro* ha sido reconocida como un parámetro importante en el desarrollo de medicamentos, de manera que aumentando la velocidad de disolución de fármacos poco solubles se consigue aumentar su biodisponibilidad (Costa y Sousa Lobo, 2001; Hu et al., 2004).

Dado que el prazicuantel es un fármaco hidrófobo y posee baja solubilidad acuosa, se debe buscar la mejora de su solubilidad acuosa y con ella la velocidad de disolución, lo cual permitiría una reducción de las altas dosis orales utilizadas actualmente. Alternativamente pueden plantearse mejoras de la absorción mediante estrategias tecnológicas diversas o vías de administración alternativas. Estos distintos abordajes serán discutidos a continuación.

I.2.7.5.1.1. Aumento de la velocidad de disolución

La velocidad de disolución aumenta al disminuir el tamaño de partícula (y aumentar la superficie del sólido) y/o al aumentar la solubilidad.

a) Cambios preformativos

a.1. Disminución del tamaño de partícula

La micronización es una técnica convencional para reducir el tamaño de partícula, es un método comúnmente utilizado para aumentar solubilidad de los fármacos de clase BCS II (Leleux y Williams et al., 2013). Es una técnica simple que consiste en la transformación de polvo grueso de fármaco a un polvo ultrafino, con el tamaño medio de partícula en el intervalo de 2-5 μm y sólo una muy pequeña fracción de las partículas se encuentran por debajo de 1 μm (Rawat et al., 2011). Esta técnica no incrementa la solubilidad del fármaco en sí, sino que incrementa la velocidad de disolución como consecuencia de un aumento

de la superficie (Khadka et al., 2014). Estudios de micronización usando un molino de inyección de aire “air-jet mil” han reducido el tamaño de partícula del prazicuantel y han obtenido partículas isométricas con mayor velocidad de disolución (Di Pretoro et al., 2015). La atomización con intermedio congelado ha sido también usada para aumentar la superficie y con ello la velocidad de disolución del prazicuantel (Passerini et al., 2006).

a.2. Modificaciones del estado sólido

El prazicuantel es un fármaco que presenta polimorfismo (RFE, 2015). Paralelamente, debido al carbono quiral en posición 11, existen dos enantiómeros con diferentes propiedades. El proceso más usado y sencillo para obtener enantiómeros de un compuesto es la cristalización (Liu et al., 2004). El comportamiento del prazicuantel como sistema enantiomérico a diferentes temperaturas ha sido estudiado (Lim et al., 1995). Igualmente, se han caracterizado las propiedades termodinámicas y de solubilidad de los isómeros ópticos del prazicuantel, las cuales se compararon con las del producto racémico de las presentaciones comerciales en las que está disponible (El-Arini et al., 1998). Los enantiómeros cristalinos mostraron diferentes propiedades térmicas con respecto al fármaco racémico y los resultados de DSC (Differential Scanning Calorimetry) indicaron que el prazicuantel comercial es un compuesto racémico y no una mezcla racémica (Liu et al., 2006). En consecuencia, es difícil separar mecánicamente los dos enantiómeros, a menos que se empleen procedimientos combinados de cristalización y cromatografía quiral (Liu et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que es posible combinar el racémico de prazicuantel ((RS)-prazicuantel) con ácidos di-carboxílicos alifáticos y análogos insaturados de ácido succínico para formar diferentes co-cristales que difieran en sus propiedades, siendo posible superar algunas de las limitaciones del uso de este fármaco tanto en humanos como en animales (Espinosa Lara et al., 2013). Más recientemente, utilizando la molienda para disminuir el tamaño de partícula (Zanolla et al., 2018b) se ha encontrado la transición del prazicuantel racémico en un nuevo polimorfo cristalino (Zanolla et al.,

2018a). La amorfización por co-molienda ha sido también usada para aumentar la solubilidad del fármaco (Perissutti et al., 2017).

a.3. Formación de complejos con ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón. Tienen una parte exterior hidrófila, lo que las hace solubles en agua, y una parte central lipófila, que permite la formación de complejos de moléculas lipófilas en su interior. En el campo farmacéutico, las ciclodextrinas forman complejos cristalinos que tienen capacidad de aumentar la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad de fármacos. Además, enmascaran el color y el sabor de algunos fármacos y también pueden prevenir la irritación gastrointestinal y ocular (Singh et al., 2011). Las ciclodextrinas han sido y siguen siendo usadas para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles en agua (Brewster y Loftsson, 2007; Frömming y Szejtli, 2014). El prazicuantel se ha incluido en α -, β - y γ -ciclodextrinas (Becket, 1999; Maragos et al., 2009; Arrúa et al., 2015; Da Silva Mourão et al., 2016), así como en ciclodextrinas modificadas tales como la metil- β -ciclodextrina (Rodrigues et al., 2011; Arrúa et al., 2015), la hidroxipropil- β -ciclodextrina (De Jesus et al., 2006; Maragos et al., 2009; Chaves et al., 2010; Arrúa et al., 2015), la hidroxipropil- β -ciclodextrina amorfa, la β -ciclodextrina metilada aleatoriamente, la sulfobutil éter- β -ciclodextrina y la maltodextrina, mejorando en todos los casos la solubilidad y permitiendo explorar la administración por vías alternativas a la oral (Cugovčan et al., 2017; Münster et al., 2017; Gonzalez et al., 2018).

a.4. Dispersiones sólidas

La polivinilpirrolidona es un polímero sintético soluble en agua, fabricado a partir del monómero N-vinilpirrolidona, completamente inocuo y se utiliza como excipiente de algunos medicamentos. Su empleo para aumentar la solubilidad de fármacos se basa en la capacidad de formar dispersiones sólidas en las que la molécula de fármaco queda homogéneamente dispersa en estado molecular entre las cadenas de

polímero. Por ello, estudios previos han preparado nuevas formulaciones de prazicuantel y polivinilpirrolidona, para mejorar las propiedades de disolución del fármaco (Costa et al., 2016; De la Torre et al., 1999; El-Arini et al., 1998; El-Lakkany et al., 2012; Gonzalez et al., 2018).

El polietilenglicol, también conocido como óxido de polietileno, polioxietileno o macrogol dependiendo de su peso molecular, es un compuesto de poliéter soluble en agua y ampliamente empleado en la industria. Este polímero se usa como excipiente en muchos productos farmacéuticos y, concretamente, ha sido utilizado como excipiente del prazicuantel consiguiendo mejorar la disolución y biodisponibilidad oral del fármaco (Passerini, et al., 2006; Cheng et al., 2010; Liu et al., 2018).

El glicolato sódico de almidón es la sal sódica del éter carboximetílico del almidón o del éter carboximetílico entrecruzado del almidón. El glicolato sódico de almidón es un ingrediente común en los comprimidos, ya que se utiliza como disgregante, que promueve la desintegración y la liberación rápida de los medicamentos administrados por vía oral. Chaud et al. (2013) prepararon dispersiones sólidas de prazicuantel y glicolato sódico de almidón mejorando la solubilidad del prazicuantel.

El alginato sódico es un polisacárido y la carboximetilcelulosa es un derivado de la celulosa. Ambos han sido utilizados para la preparación de dispersiones sólidas con prazicuantel, las cuales mostraron un aumento de la solubilidad y una mejora en la eficacia del fármaco (Marques et al., 2018).

b) Efectos de la formulación

b.1. Uso de agentes tensioactivos

Los agentes tensoactivos son sustancias que disminuyen la tensión superficial existente en la superficie de contacto entre dos fases, como son, dos líquidos insolubles o inmiscibles entre sí, aumentando así la estabilidad de suspensiones y emulsiones. Se ha estudiado el uso de

distintos agentes tensioactivos consiguiendo aumentar la estabilidad y solubilidad del prazicuantel (Frezza et al., 2013; De Araújo et al., 2018; Trastullo et al., 2015).

b.2. Aglutinantes

La granulación por fusión, usando como aglutinante un polímero hidrofílico de bajo punto de fusión, ha permitido aumentar la velocidad de disolución del prazicuantel, evitando el empleo de solventes orgánicos usados comúnmente en la técnica de granulación húmeda (Passerini et al., 2006).

Formulaciones con lactosa, sorbitol y otros componentes se usan para la preparación de granulados. Los granulados dispersables son preparaciones constituidas por agregados sólidos y secos de partículas de polvo que se dispersan o disuelven rápidamente al combinarse con agua para generar una suspensión de partículas finas. Estos posibilitan la producción de formulaciones altamente concentradas que son mojables y que se desintegran fácilmente al entrar en contacto con el agua, por lo que son una alternativa interesante para la administración de aquellos fármacos poco solubles en agua. Se ha estudiado el desarrollo de formulaciones orales flexibles y dispersables que contienen prazicuantel para el posible tratamiento de la esquistosomiasis en niños en edad preescolar (Trastullo et al., 2015).

I.2.7.5.1.2. Aumento de la absorción y otras estrategias

La limitación fundamental del prazicuantel que afecta a su biodisponibilidad es su baja solubilidad y velocidad de disolución. No presenta una baja absorción y su permeabilidad no limita la biodisponibilidad. No obstante, sistemas destinados a aumentar la absorción, como liposomas o nanopartículas lipídicas han sido empleados con este fin, dado que, junto con el aumento de la permeabilidad, permiten obviar la baja solubilidad. Este se debe a que el mecanismo de absorción desde estos sistemas no implica la previa disolución del fármaco.

a) Liposomas

Los liposomas son vesículas artificiales, esféricas simples o multilaminares con una membrana compuesta de una doble capa de fosfolípidos, que constan de partes hidrosolubles y liposolubles. Por lo tanto, el interior y el exterior de un liposoma es hidrosoluble y el interior de la membrana del liposoma es liposoluble. Al formarse, el liposoma captura en su interior parte del solvente en que se encuentra suspendido. Por ello, actualmente se utilizan como transportadores de diversas moléculas biológicas o complejos moleculares a las células, por ejemplo, en la administración de fármacos y la transferencia de genes. Estas moléculas del interior de un liposoma pueden ser transportadas a células disminuyendo los efectos tóxicos en las células, ya que los liposomas pueden evitar el reconocimiento y destrucción del sistema inmune. La incorporación del prazicuantel en liposomas ha sido estudiada mejorando la actividad antiesquistosomal del fármaco (Mourao et al., 2005).

b) Nanopartículas lipídicas sólidas

Las nanopartículas lipídicas sólidas son sistemas transportadores coloidales de fármacos similares a las nanoemulsiones, pero formulados con lípidos sólidos a temperatura ambiente, tales como glicéridos o ceras con un alto punto de fusión (Müller et al., 2000; Üner y Yener, 2007). Las nanopartículas lipídicas sólidas presentan diferentes ventajas tales como la posibilidad de prolongar y/o dirigir la liberación del fármaco que transportan, aumentar la estabilidad y permitir la incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Sin embargo, también presentan desventajas como la baja capacidad para cargar el fármaco y problemas de estabilidad durante el almacenamiento o la administración (gelificación, aumento de tamaño de partícula y liberación prematura del fármaco) (Khadka et al., 2014). Esta tecnología ha sido usada para aumentar la biodisponibilidad del prazicuantel (Witzleb et al., 2012; Kolenyak-Santos et al., 2014; Ribeiro de Souza et al., 2014). Las nanopartículas lipídicas sólidas también han sido utilizadas para mejorar la eficacia del prazicuantel contra la tenia (Xie et al., 2011).

I.2.7.5.1.3. Vías de administración alternativas

Prácticamente, la administración del prazicuantel se hace solamente por vía oral. No obstante se han planteado formas de administración por vías alternativas, tales como sistemas transdérmicos (Wang et al., 2011) o implantes, combinando el fármaco con poli- ϵ -caprolactona (Cheng et al., 2009; Li et al., 2010) o con mezclas de este polímero y etilenglicol-monofenileter (Zheng et al., 2008) o polietilenglicol (Cheng et al., 2010). Los implantes obtenidos consiguen liberar el fármaco de forma progresiva y continua en el tiempo, se preparan fácilmente a gran escala y permiten conseguir concentraciones de principio activo en plasma lo suficientemente altas durante períodos de 6 semanas como mínimo, demostrando alta compatibilidad con los tejidos, así como una conservación adecuada del fármaco a lo largo del tiempo (Cheng et al., 2010).

Todas las estrategias tecnológicas expuestas en esta sección han tenido un éxito limitado, bien porque no aumentaban la solubilidad del fármaco de manera significativa o porque el coste final del producto era excesivo en vistas a la población a la que iba destinado. Actualmente el fármaco sigue administrándose en comprimidos convencionales sin modificación, complejación o cambio tecnológico alguno.

Por tanto, el diseño y desarrollo de formas farmacéuticas que aseguren una mejora en la biodisponibilidad del prazicuantel, sin un aumento de coste excesivo, continúa siendo un desafío de especial interés.

I.2. EXCIPIENTES INORGÁNICOS NATURALES

El excipiente es todo componente de un medicamento distinto del principio activo y del material de acondicionamiento. El excipiente sirve de vehículo del principio activo y posibilita la preparación de la forma farmacéutica. Los excipientes pueden usarse para disminuir o aumentar la velocidad de disolución, retardar y/o liberar el fármaco en su diana

biológica. Además, pueden prevenir o reducir efectos secundarios del tratamiento, enmascarar sabores u olores desagradables del fármaco, etc.

I.2.1. ARCILLAS

Las arcillas son materias primas farmacéuticas empleadas fundamentalmente como excipientes farmacéuticos. Dada la importancia que tienen los excipientes usados para la administración de fármacos para los objetivos de esta Tesis, se describe a continuación de forma breve el concepto, estructura, clasificación, propiedades y aplicaciones de las arcillas, incluyendo su empleo como excipiente.

I.2.1.1. CONCEPTO DE ARCILLA

El término “arcilla” deriva del griego “argilos”, cuya raíz (“argos”) significa blanco, en referencia a su color. El diccionario de la Real Academia de la Lengua Española (RAE, 2001) define arcilla como “Tierra finamente dividida, constituida por agregados de silicatos de aluminio hidratados, que procede de la descomposición de minerales de aluminio, blanca cuando es pura y con coloraciones diversas según las impurezas que contiene”. El concepto de arcilla ha evolucionado a lo largo de la Historia. Georg Bauer (Agrícola), considerado “padre” de la geología, en el tratado “De Natura Fossilium” (1546), define las arcillas como materiales finos, de comportamiento plástico y que se endurecen en el horno, pero manteniendo su forma. Mackenzie documentó a fondo cómo fue evolucionando la definición de arcilla a lo largo de los siglos (Mackenzie, 1963). Grim define las arcillas como “sustancias terrosas y de grano fino, que presentan comportamiento plástico en presencia de agua, y que están formadas fundamentalmente por sílice, óxido de aluminio, agua y cantidades variables de hierro y metales alcalinos y alcalinotérreos” (Grim, 1968). Bailey (Bailey, 1980) y Weaver (Weaver, 1989) pusieron de manifiesto la dificultad que existe para combinar los requisitos granulométricos y mineralógicos en una misma definición de arcilla, puesto que profundizando en su concepto, son dos los criterios a tener en cuenta; uno granulométrico o textural, que define las arcillas

como “partículas de dimensiones inferiores a 2 μm ” y otro mineralógico, que las define como “minerales estratificados o semi-estratificados hidratados” (Rautureau et al., 2004).

Los Comités de Nomenclatura Conjunta (JNC) de la Asociación Internacional para el estudio de Arcillas (AIPEA) y la Sociedad de Minerales de Arcilla (Clay Mineral Society, CMS) definen arcilla como “un material natural, compuesto principalmente de minerales de pequeño tamaño de partícula (la mayor parte filosilicatos), que es generalmente plástico en presencia de una cantidad apropiada de agua, y que endurece al secarse” (Guggenheim y Martin, 1995; Guggenheim et al., 2006). Dado que las arcillas están compuestas fundamentalmente por un grupo de minerales denominados filosilicatos, muchos autores utilizan para los filosilicatos la denominación de “minerales de las arcillas” (Klein y Hurlbut, 1997), y no resulta de extrañar que se solapen ambos términos. Por esta razón, el Comité de Nomenclatura de la AIPEA utiliza el término “minerales de la arcilla” definidos como “minerales y minerales de filosilicatos que imparten plasticidad a la arcilla y que se endurecen al secarse o desprenderse” (Guggenheim y Martin, 1995). Este término es usado tanto para referirse a los filosilicatos como también a otros minerales presentes en fases minoritarias y copartícipes en las propiedades fisicoquímicas (plasticidad y capacidad de endurecerse al secarse o desprenderse) de la arcilla. Tales minerales se denominan “fases asociadas a los minerales de la arcilla” e incluyen el cuarzo, feldespato, calcita y dolomita. Como es de apreciar, desde un punto de vista mineralógico, el término arcilla engloba a un grupo de minerales (minerales de la arcilla), en su mayor parte filosilicatos, cuyas propiedades físico-químicas dependen de su estructura y de su tamaño de partícula muy fino.

En resumen, desde la definición dada por “Agrícola” hasta el momento actual, la definición de arcilla ha cambiado relativamente poco, y sigue siendo hoy en día definida fundamentalmente por sus propiedades y no por su naturaleza.

I.2.1.2. ESTRUCTURA DE LOS FILOSILICATOS

El término “Filosilicato” deriva del griego “phyllon”, que significa hoja, y del latín “silex”, que significa sílice. Los filosilicatos son una clase de silicatos constituidos por una estructura estratificada característica formada por capas con dos tipos de estructuras diferentes, definidas como capas tetraédricas (T) y capas octaédricas (O). Estas capas están dispuestas regularmente unas sobre otras a lo largo del eje z (Figura I.8). Esta característica estructural fundamental de los filosilicatos de su disposición en capas apiladas es la que les proporciona su baja densidad, así como su dureza, en función del tipo de apilamiento (Baronnet, 1988; Milovski y Kononov, 1988; Battey, 1990; Prothero y Shwab, 1996; Klein y Hurlbut, 1997).

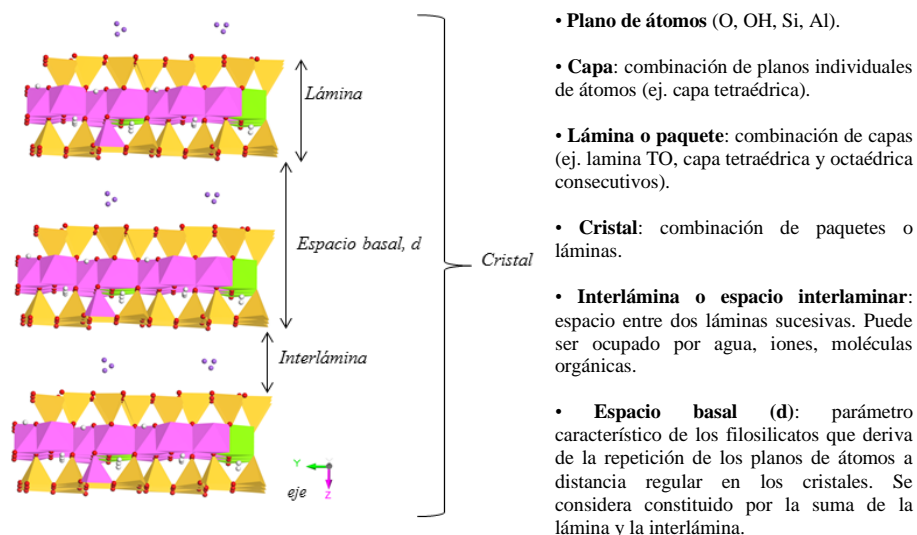


Figura I.8. Estructura general y terminología de los minerales de la arcilla. Los átomos de silicio están representados en color amarillo, los de oxígeno en rojo, los de hidrógeno en blanco, los de aluminio en morado, los de magnesio en verde y los sodios en morado-azulado.

Las capas tetraédricas (T) están constituidas por un conjunto de tetraedros de silicio y oxígeno (SiO₄) en disposición hexagonal y con una deficiencia de carga (-4), en los que un átomo de silicio se encuentra en

posición central uniéndose a cuatro átomos de oxígeno (u OH), que ocupan los vértices del tetraedro. En la estructura de la capa, los tetraedros se disponen formando anillos de seis unidades tetraédricas, en los cuales cada tetraedro comparte tres de sus cuatro vértices de átomos de oxígeno. Estos anillos se repiten indefinidamente dando lugar a la unidad $\text{Si}_2\text{O}_5^{2-}$, que se representa en la Figura I.9.

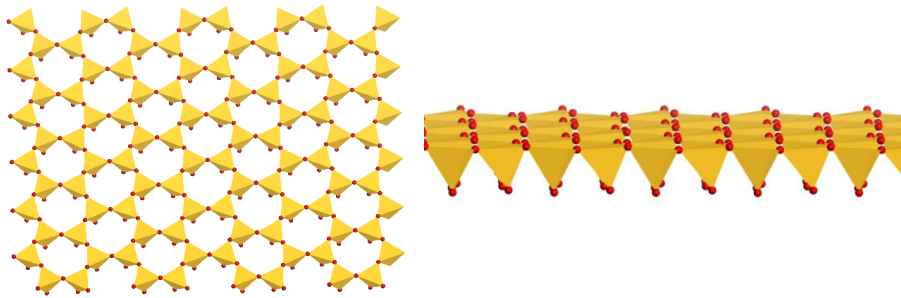


Figura I.9. Capa tetraédrica, donde los átomos de silicio están representados en color amarillo y los de oxígeno en rojo.

Para cada capa tetraédrica, podemos distinguir por tanto tres planos sucesivos de átomos: un plano de oxígenos denominados basales formando las bases de los tetraedros, un plano de átomos de silicio en el que cada silicio se encuentra situado en el centro de cada tetraedro y un plano de átomos de oxígenos denominados apicales en el cual cada uno se encuentra en el vértice superior de los tetraedros (Grim, 1968).

Además, algunos átomos de oxígeno en posición apical de la capa tetraédrica pueden unirse a óxidos metálicos di o trivalentes (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , etc.), formando una coordinación octaédrica con el resto de los oxígenos, denominándose capa octaédrica. Estos átomos de oxígeno pueden unirse a átomos de hidrógeno para completar su coordinación o unirse a otros átomos de otra nueva capa tetraédrica (Figura I.10).

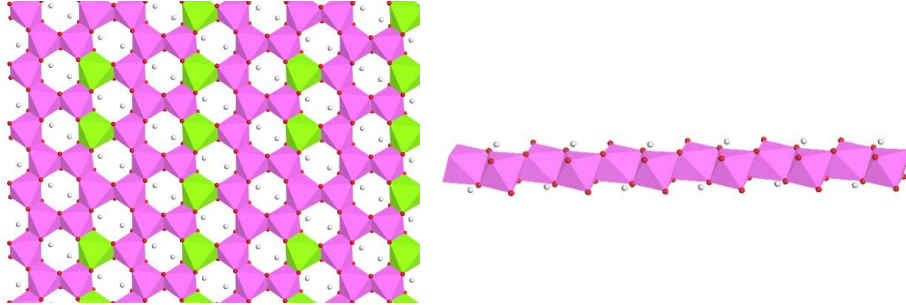


Figura I.10. Capa octaédrica de óxidos de aluminio con sustituciones de magnesio. Los átomos de aluminio están representados en color morado, los de oxígeno en rojo, los de hidrógeno en blanco y los de magnesio en verde.

Por tanto, la unidad básica estará constituida por 4 tetraedros y 3 octaedros y, en función de la ocupación de las capas octaédricas, los filosilicatos se definirán como:

- *Trioctaédricos*: Formados por cationes divalentes en todas las posiciones octaédricas disponibles, por ejemplo, Mg^{2+} o Fe^{2+} .
- *Dioctaédricos*: Formados por cationes trivalentes, como por ejemplo Al^{3+} o Fe^{3+} , que tan sólo ocupan dos de cada tres posiciones octaédricas.

Las capas tetraédricas (T) y octaédricas (O) se apilan para formar láminas (Klein y Hurlbut, 1997).

Según la disposición de estas capas, los filosilicatos se pueden clasificar en:

- *Filosilicatos tipo 1:1*. La estructura básica estará formada por una sola capa tetraédrica (T) unida a la capa octaédrica (O). Se trataría de la capa T/O. En este caso, los oxígenos octaédricos no compartidos con los silicios de la capa tetraédrica se completan con hidrógenos formando grupos OH.
- *Filosilicatos tipo 2:1*. Su estructura básica corresponde a dos capas tetraédricas (T) unidas a ambos lados de la capa octaédrica (O). A esta estructura se le denomina estructura T/O/T, también

conocida como estructura de tipo “sandwich”. En este caso, uno de los oxígenos octaédricos forma un grupo OH al no estar compartido con los silicios de las capas tetraédricas. Esta estructura es eléctricamente neutra debido a que todas las posiciones en la capa T se encuentran ocupadas por átomos de silicio, mientras que todas las posiciones de la capa O contienen aluminio. No obstante, los filosilicatos tienen una composición muy variable debido a que pueden tener multitud de sustituciones isomórficas (cambio de un átomo con otro de similares dimensiones sin modificar la estructura cristalina). En las capas tetraédricas los átomos de Si^{4+} puede estar sustituidos generalmente por iones Al^{3+} , mientras que en las capas octaédricas los Al^{3+} se pueden sustituir por Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ti^{4+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , etc. Estas sustituciones por átomos de valencia inferiores son responsables de una deficiencia de carga en la lámina, debido a que los átomos de oxígeno no son del todo neutralizados con especies catiónicas y, por tanto, como resultado se genera una carga negativa neta de los paquetes T/O/T. El balance de carga se mantiene por la presencia de cationes en el espacio interlamina. Los cationes interlaminares normalmente son alcalinos (Na^+ y K^+) o alcalinotérreos (Mg^{2+} y Ca^{2+}).

En algunos casos, como en el grupo de minerales de las arcillas fibrosas (sepiolita y palygorskita), esta estructura en capas apiladas sufre una modificación sustancial. Estructuralmente, la capa basal de oxígenos es continua, pero los oxígenos apicales presentan una inversión periódica cada 8 posiciones octaédricas en el caso de la sepiolita o cada 5 posiciones en la palygorskita. Esta inversión da lugar a la interrupción de la capa octaédrica que es discontinua, formando así canales o poros. Por tanto, estos minerales están formados por láminas discontinuas de tipo mica y, a diferencia del resto de los filosilicatos cuya disposición laminar es continua, poseen una estructura fibrosa (Guggenheim et al., 2006). Por ello, Weaver (1989) sugirió que el término "physilos" englobase a toda la familia de filosilicatos (incluyendo palygorskita y sepiolita) independientemente del tamaño del grano.

I.2.1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS FILOSILICATOS

Los principales criterios de clasificación para los filosilicatos (recomendados por la AIPEA) se basan en:

- El tipo de apilamiento, es decir, el tipo de combinación de las capas tetraédricas y octaédricas (T/O o 1:1; T/O/T o 2:1; T/O/T/O o 2:1:1).
- El grado de ocupación en la capa octaédrica.
- La carga neta del paquete estructural.
- El tipo de material presente (tipo de catión, moléculas de agua, moléculas orgánicas, etc.) en el espacio interlaminar.

En base a estos criterios se clasifican de acuerdo con los tipos recogidos en la Tabla I.1.

Cabe destacar que la denominación de arcilla puede hacerse empleando el nombre del mineral mayoritario en ella (criterio seguido en el ámbito de la mineralogía), ya que, como sustancias naturales, las arcillas nunca están constituidas por un solo mineral, o con un nombre que informe de su calidad farmacéutica (criterio de Farmacopea), aunque en ambos casos no hay que perder de vista tanto la fase mineral mayoritaria en la sustancia como las fases asociadas (López Galindo et al., 2007). Con esta premisa, se usará por sencillez la denominación arcilla cuando no sea necesario especificar más la composición o calidad de la sustancia en cuestión.

Tabla I.1. Clasificación de los filosilicatos de acuerdo con la AIPEA (Guggenheim et al., 2006).

| Tipo | Material interlaminaar | Grupo | Subgrupo | Mineral (ejemplos) | Fórmula mineralógica |
|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|---|
| 1:1 | Ninguno | Serpentina (trioctaédrica) | Serpentinas | Lizardita | $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ |
| | | Caolinita (dioctaédrica) (x=0) | | Caolinita, Halloysita | $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ |
| 2:1 | Ninguno | Talco (trioctaédrico) | Talco | Talco | $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ |
| | | Pirofilita (dioctaédrica) (x=0) | Pirofilita | Pirofilita | $Al_2Si_4O_{10}(OH)_2$ |
| 2:1 | Cationes hidratados Intercambiables | Esmeclita (x=0.2-0.6) | Saponita (trioctaédrica) | Saponita, Hectorita | $Ca_{0.25}(Mg_{2.5}Li_{0.5})Si_4O_{10}(OH)_2 nH_2O$ |
| | | | Montmorillonita (dioctaédrica) | Montmorillonita, Nontronita | $(Ca,Na)(Al,Mg)_2Si_4O_{10}(OH)_2 nH_2O$ |
| | | | Vermiculita (x=0.6-0.9) | Vermiculitas dioctaédricas Vermiculitas trioctaédricas | Vermiculitas dioctaédricas Vermiculitas trioctaédricas |
| 2:1 | Cationes no hidratados | Mica (x=0.5-1) | Micas dioctaédricas | Moscovita, Paragonita | $K,Al_2(Al,Si_3)O_{10}(OH)_2$ |
| | | | Micas trioctaédricas | Biotita, Lepiolita | $K(Fe,Mg)_3(Al,Si_3)O_{10}(OH)_2$ |
| | | | Micas frágiles dioctaédricas | Margarita | $CaAl_2(Si_2Al_2)O_{10}(OH)_2$ |
| | | | Micas frágiles trioctaédricas | Clintonita | $Ca(Mg,Al)_3(Al_3Si)O_{10}(OH)_2$ |
| 2:1 | Ninguno | Sepiolita - Palygorskita (x variable) | Sepiolitas Palygorskitas | Sepiolita Palygorskita | $Mg_8Si_{12}O_{30}(OH)_4(OH_2)_4 \cdot 8H_2O$ $(Mg,Fe,Al)_5Si_8O_{20}(OH)_2(OH_2)_4 \cdot 4H_2O$ |
| | | 2:1:1 | Hidróxidos | Clorita (x variable) | Cloritas di, trioctaédricas |
| Cloritas trioctaédricas | Clinochloro | | | | $(Fe,Mg,Al)_6(Si,Al)_4O_{10}(OH)_8$ |

x = carga por unidad de fórmula estructural

I.2.1.3.1. Esmectitas: Montmorillonita

Las esmectitas son un grupo de filosilicatos con estructura T/O/T (2:1) (Figura I.11). Según Grim (1962), en las esmectitas el desequilibrio de la carga debido a la sustitución isomorfa de cationes es de alrededor de 0,2-0,66 por unidad de fórmula. Esta carga neta negativa que se genera es neutralizada con cationes en el espacio interlaminar, que son predominantemente Na^+ (esmectita sódica) o Ca^{2+} (esmectita cálcica), los cuales pueden ser fácilmente sustituidos por otros iones y, por tanto, son denominados "intercambiables" (Murray, 2000) (Figura I.11). Como resultado de las distintas posibilidades, aparecen esmectitas con composiciones muy diferentes y propiedades distintas, teniendo diferentes denominaciones, tales como, montmorillonita, beidellita, nontronita, saponita, sauconita y hectorita.

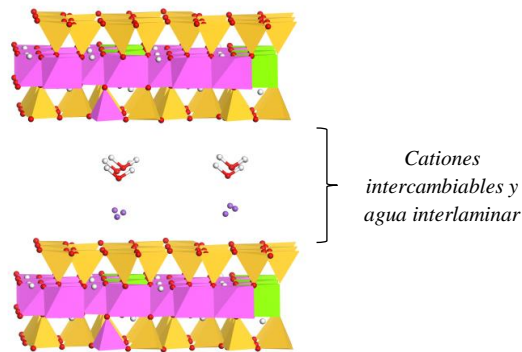


Figura I.11. Estructura de las esmectitas. Los átomos de silicio están representados en color amarillo, los de oxígeno en rojo, los de hidrógeno en blanco, los de aluminio en morado, los de magnesio en verde y los sodios en morado-azulado.

El tipo de catión intercambiable influye en el contenido de agua interlaminar y con ello también en la dimensión del espacio basal ($d(001)$) de la esmectita, ya que las arcillas de tipo esmectita son particularmente valoradas por su capacidad de absorber agua, con la consiguiente expansión del volumen y aumento de la distancia entre las capas. El agua se interpone en los espacios existentes entre las láminas, solvatando los cationes interlaminares y provocando la separación de las capas de la

arcilla. En ausencia de moléculas de agua o de otras moléculas polares en el espacio interlaminar, el espacio basal de la montmorillonita mide alrededor de 9,4-10 Å (Van Olphen, 1963; Fornes y Paul, 2003). Las esmectitas que contienen cationes interlaminares monovalentes (Na^+) presentan un espacio basal en torno a 12 Å cuando se solvatan dichos cationes, debido a la primera capa de hidratación. Las esmectitas con cationes divalentes (predominantemente Mg^{2+} o Ca^{2+}) se hidratan con una primera capa de hidratación presentando un espacio basal de alrededor de 14-15 Å. En presencia de un mayor grado de humedad un mayor número de moléculas de agua son adsorbidas formando dos o más capas de agua y aumentando el espacio basal.

Entre los minerales del grupo de las esmectitas la más interesante en farmacia es la montmorillonita (MMT), cuyo nombre deriva del francés Montmorillon, lugar de Francia en que se encontró en 1847 (Damour y Salvetat, 1847). La fórmula química de la montmorillonita general por celda unidad es $(\text{Ca},\text{Na})_{0.66}(\text{Al}_{3.34}\text{Mg}_{0.66})(\text{Si}_{7.8}\text{Al}_{0.2})\text{O}_{20}(\text{OH})_4 n\text{H}_2\text{O}$ con sustitución de Si^{4+} por Al^{3+} en la capa tetraédrica y de Al^{3+} por Mg^{2+} en la octaédrica. Su composición teórica es 66,7% de SiO_2 , 28,3% de Al_2O_3 y 5% de H_2O . Como resultado de la presencia de cationes interlaminares, la montmorillonita se comporta como un intercambiador de cationes, que pueden ser también moléculas orgánicas, tales como fármacos en disolución. Además de este mecanismo de intercambio, también son posibles otros mecanismos de interacción, recogiendo todos ellos en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Interacciones entre arcillas y componentes orgánicos (Aguzzi et al., 2007).

| Mecanismo | Ejemplos de minerales | Grupos funcionales orgánicos |
|--|--|---|
| Interacciones hidrofóbicas (van der Waals) | Caolinita, esmectitas | Sin carga, no polares (ej. aromáticos) |
| Puentes de hidrógeno | Caolinita | Aminas, carbonilos, carboxilos |
| Protonación | Bordes de aluminosilicato, óxidos de Fe y Al, alofano, imogolita | Aminas, carbonilos, carboxilato, heterociclos con N |
| Intercambio catiónico (sitios cargados permanentes) | Esmectita, vermiculita, ilita | Aminas, heterociclos con N |
| Sitios cargados pH-dependiente (intercambio aniónico frecuentemente) | Bordes de aluminosilicato, óxidos de Fe y Al, alofano, imogolita | Carboxilatos, aminas, anillo NH, heterocíclico de N |
| Enlaces catiónicos | Esmectitas, vermiculita, ilita | Carboxilatos, aminas, carbonilo, OH |

Existen tres excipientes farmacéuticos constituidos por esmectitas: la “Bentonita” (cuando la fase mineral mayoritaria es montmorillonita), el “Silicato aluminico magnésico” o “Silicato magnésico aluminico” (cuando la esmectita es una mezcla de distintos minerales del grupo) y la “Hectorita” (formada fundamentalmente por este mineral) (López-Galindo et al., 2007).

Las suspensiones acuosas de los minerales de este grupo originan sistemas altamente estructurados, con propiedades muy interesantes (Viseras et al., 2007). En virtud de sus interacciones con fármacos de distinta naturaleza, la montmorillonita ha sido usada para el desarrollo de sistemas de liberación controlada y sitio específico de fármacos y para el aumento de la solubilidad del principio activo y de su estabilidad (Aguzzi et al., 2007).

I.2.1.3.2. Sepiolita

Estructuralmente, la sepiolita es un silicato magnésico hidratado próximo en composición a los filosilicatos del tipo 2:1 trioctaédricos, con una sustitución muy escasa de Si^{4+} por Al^{3+} en las posiciones tetraédricas y de Mg^{2+} por Fe^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} en las octaédricas, de tal modo que la mayoría de las sepiolitas no contienen prácticamente aluminio. Además, la capa basal de oxígenos es continua, pero los oxígenos apicales sufren una inversión periódica cada 8 posiciones octaédricas. Esta inversión da lugar a la interrupción de la capa octaédrica, que es discontinua, formando así canales o poros (Figura I.12). Por tanto, la sepiolita está formada por láminas discontinuas y posee un aspecto fibroso (Guggenheim et al., 2006). Esta especie fibrosa contiene cuatro moléculas de agua estructurales por celda unidad, enlazadas a los cationes octaédricos en los bordes de las discontinuidades para completar la coordinación octaédrica, y otras cuatro moléculas de agua de tipo zeolítico alojadas en los canales estructurales, coordinándose con las anteriores. Así, se organizan en cadenas, de diferente anchura en cada especie, orientadas paralelamente a la longitud de las fibras. La longitud de las fibras es muy variable, oscilando desde aproximadamente 100 Å hasta 4-5 μm . Generalmente, las fibras de sepiolita suelen ser mayores que las de palygorskita.

Además, las pequeñas sustituciones catiónicas isomorfas antes citadas pueden originar una carga moderada que hace que esta especie tenga una capacidad de cambio catiónico intermedia entre la de las caolinitas y la de las esmectitas. Dicha capacidad de cambio puede variar entre 4 y 40 miliequivalentes por 100 g de arcilla seca, aunque los valores más altos probablemente estén relacionados con la presencia de impurezas en las arcillas fibrosas analizadas (Galan, 1996).

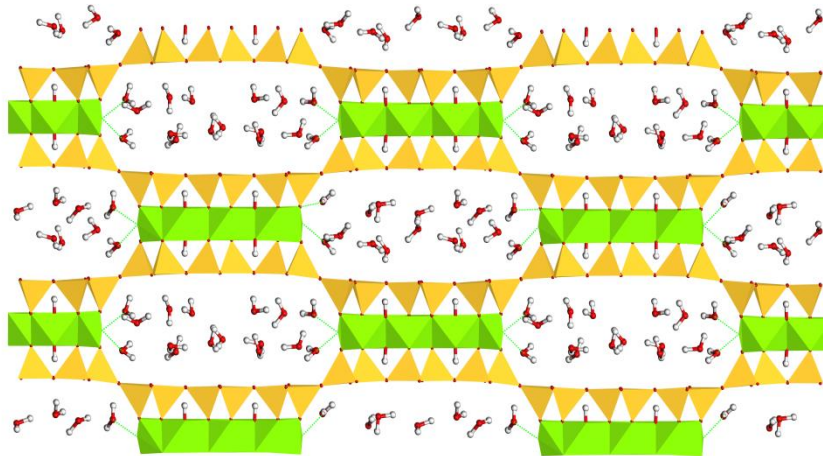


Figura I.12. Estructura de la sepiolita.

I.2.1.4. PROPIEDADES DE LAS ARCILLAS

Dada la composición de las arcillas, tanto mineralógica como química, las arcillas tienen propiedades como la capacidad de intercambio catiónico, la superficie específica, hidratación e hinchamiento, propiedades reológicas (plasticidad y tixotropía) y la capacidad de absorción, que las hacen interesantes para diversas aplicaciones en el ámbito de la farmacia.

a) Capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.)

Como consecuencia de las distintas sustituciones isomórficas de cationes estructurales por otros cationes de diferente valencia se origina una carga residual en la superficie de las arcillas. Esta carga superficial se compensa con la presencia de cationes intercambiables y, por tanto, es responsable directa de la capacidad de intercambio catiónico. Por ejemplo, cuando se sustituye un átomo de silicio (Si^{4+}) por uno de aluminio (Al^{3+}) en la capa tetraédrica, o uno de aluminio (Al^{3+}) por uno de magnesio (Mg^{2+}) en la octaédrica, aparece una carga residual negativa en la superficie, la cual puede ser compensada mediante cationes intercambiables como Na^+ , K^+ , o Mg^{2+} . La sustitución en la capa octaédrica se pone de manifiesto de forma difusa a nivel superficial, dado

que se trata de una capa más interna de la estructura. Por tanto, el intercambio catiónico es la reacción de adsorción reversible en la que los cationes libres en solución o moléculas orgánicas se intercambian con cationes retenidos en el espacio interlaminar o en la superficie de las arcillas. Concretamente, la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.) es la cantidad total de cationes intercambiables que pueden ser adsorbidos por un material particular a un valor dado de pH. Se mide en miliequivalentes (mEq) de cationes por g (o más frecuentemente por 100 g) de material adsorbente. Existen arcillas en las que el grado de sustituciones isomórficas es bajo, por ejemplo la caolinita, el talco y la sepiolita, cuyo valor de C.I.C. está entre 5-20 mEq/100g, donde el intercambio se da fundamentalmente en la superficie exterior y en los bordes de los cristales laminares. Por el contrario, entre las arcillas con mayor C.I.C. se encuentran las esmectitas, teniendo un valor de C.I.C. de 80-200 mEq/100g.

b) Superficie específica

La superficie específica (m^2/g) permite tener una idea relativa del área externa accesible; cuanto mayor sea, mayor cantidad de sustancias podrán ser distribuidas de manera homogénea sobre ella. Pero siendo así resulta esencial que dicha superficie tenga muy baja reactividad química para minimizar y/o evitar las posibles interacciones negativas con sustancias de alto valor nutritivo o farmacológico. En este caso, la caolinita y el talco son los que también presentan una menor superficie específica 10-20 m^2/g , las esmectitas muestran valores intermedios (80 y 100 m^2/g en la esmectita cálcica y la sódica, respectivamente) y la sepiolita tiene un área de superficie específica de 350 m^2/g , mucho mayor que las anteriores arcillas. Esta última presenta, por tanto, la gran ventaja de poseer una amplia superficie específica y una baja capacidad de intercambio catiónico, lo cual resulta de interés como posible soporte inerte en la preparación de medicamentos.

c) Hidratación e hinchamiento

La hidratación de las arcillas implica la adsorción de moléculas de agua a través de la hidratación de los iones interlaminares (cationes y/o aniones) y la interacción de la superficie del mineral con las moléculas de agua y con los iones. Además, también interviene el contenido de agua presente. Esto ocurre debido a que la presencia de cargas les permite atraer sustancias ubicadas en la solución en contacto con las arcillas, como consecuencia del carácter dipolar de la molécula de agua y su capacidad de formar enlaces por puentes de hidrógeno. Así, las moléculas de agua rodean a cationes y aniones hidratándolos.

En cuanto a la capacidad de hinchamiento en agua puede decirse que ésta sirve de base para la clasificación industrial más aceptada de las bentonitas. Según este, criterio Patterson y Murray (1983) establecieron los siguientes tipos: Bentonitas altamente hinchables o sódicas, Bentonitas poco hinchables o cálcicas y Bentonitas moderadamente hinchables o intermedias. Posteriormente, Odom (1984), siguiendo los mismos criterios, las divide en: Bentonitas sódicas, Bentonitas cálcico-magnésicas y Tierras de Fuller o tierras ácidas. En esta última clasificación se incorporan como materiales bentoníticos las Tierras de Fuller (conocidas en España como tierras de batán). A manera de aclaración, se quiere hacer constar aquí que bajo la denominación de Tierras de Fuller se comercializa gran variedad de minerales de la arcilla que van desde esmectitas cálcicas y/o palygorskita, a montmorillonita asociada a ópalo como constituyente mayoritario, e incluso halloysita y caolinita.

d) Plasticidad, viscosidad y tixotropía

Por definición, las arcillas son materiales que al incorporarles agua presentan plasticidad y viscosidad. Las dispersiones de esmectita son sistemas viscoplásticos: tienen un valor de deslizamiento característico (umbral de deslizamiento), más allá del cual la viscosidad del sistema disminuye con el aumento del gradiente aplicado. El umbral de deslizamiento es un índice de la resistencia del sistema a perder su

estructura y es una peculiaridad muy útil para los propósitos de la formulación y estabilidad de sistemas farmacéuticos dispersos, tales como suspensiones y emulsiones.

La tixotropía es la propiedad de algunos fluidos que muestran un cambio de su viscosidad en el tiempo y, por tanto, mide la destrucción y pérdida de resistencia de la arcilla cuando se somete a una deformación y la posterior capacidad del sistema para recuperar la estructura cuando cesa la deformación. Cuanto más se someta el fluido a esfuerzos de cizalla, más disminuye su viscosidad.

Las dispersiones de esmectitas y arcillas fibrosas dan lugar a sistemas tixotrópicos y pseudoplásticos: en reposo, su viscosidad aumenta con el tiempo y como resultado de la aplicación de un gradiente deslizante dado, la viscosidad disminuye gradualmente con el tiempo (Viseras et al., 1999; Viseras et al., 2001; Aguzzi et al., 2013a). Este comportamiento de flujo se explica como resultado de la progresiva destrucción de las estructuras tridimensionales de tipo gel que forman estas arcillas en medios polares. Al aumentar la velocidad de cizalla se destruyen las asociaciones interparticulares y el sistema fluye libremente. Es necesario aplicar un cierto valor inicial de esfuerzo deformante para que empiece a fluir (umbral de deformación o punto de flujo). Por otra parte, cuando cesa el esfuerzo deformante, el sistema es capaz de volver a estructurarse (tixotropía) (Lukham y Rossi, 1999; Mewis y Wagner, 2009). Si consideramos, por ejemplo, las esmectitas, se ha dicho que la hidratación de las partículas significa que en un sistema disperso se atraen los bordes y las caras, comenzando la construcción del típico sistema estructurado tipo “castillo de naipes”. Al principio, la estructuración del sistema es rápida y determina un rápido aumento de la viscosidad. Sin embargo, con el tiempo será cada vez más difícil que las partículas libres restantes encuentren sitios disponibles para la interacción; por tanto, la viscosidad aumentará con una velocidad progresivamente menor. Por otra parte, la aplicación de un determinado gradiente de desplazamiento al sistema estructurado determina su desestructuración, que sucede con una velocidad que es alta al principio y luego más y más gradual en el tiempo.

e) Capacidad de absorción

Las arcillas presentan la propiedad de ser absorbentes, ya que pueden absorber tanto moléculas polares, como el agua, como también moléculas apolares. Estas moléculas se pueden adsorber tanto en la superficie de las arcillas como en el espacio interlaminar, en el caso esmectitas, o en los canales estructurales, en el caso de la sepiolita y palygorskita. La capacidad de absorción de las arcillas está íntimamente relacionada con sus características texturales, como son la superficie específica y la porosidad. Concretamente, la absorción supone procesos físicos, como pueden ser la retención de moléculas por capilaridad, mientras que la adsorción ocurre cuando el adsorbato queda retenido en el adsorbente, en este caso la arcilla, debido a que existen interacciones interatómicas entre ambos.

I.2.1.5. APLICACIONES FARMACÉUTICAS DE LAS ARCILLAS

I.2.1.5.1. Usos históricos de las arcillas

El hombre ha utilizado desde tiempos prehistóricos los recursos naturales con fines terapéuticos, principalmente plantas y partes de plantas, pero también ha usado materiales inorgánicos, y en particular las arcillas, debido a su abundancia, accesibilidad y propiedades especiales (López Galindo et al., 2006; Gomes y Silva, 2007). La primera evidencia histórica del uso de la arcilla con finalidad terapéutica data alrededor del 2500 a. C. y apareció en una tablilla sumerio-mesopotámica (Biggs, 2005). La mayor parte de las civilizaciones antiguas emplearon arcillas para curar heridas, aliviar irritaciones cutáneas o tratar trastornos gastrointestinales. Son muchos los textos antiguos que evidencian estos usos (De Vos, 2010). Así, en el libro “De Materia Médica”, de Dioscórides, se puede encontrar una sección dedicada a minerales y sustancias químicas usadas en farmacia. Hay referencias del uso de las “tierras medicinales” en Mesopotamia, el Antiguo Egipto y la Antigua Grecia, y una de ellas, la “Terra sigilata”, puede considerarse como el primer medicamento registrado de la historia (Finkelman, 2006; Perea,

2014). Otros ejemplos de “tierras medicinales” son la terra Lemnia (procedente de Lemnos), la terra Melitea (de Malta), la terra Armenica (de Armenia), la terra Silesiaca (de Silesia), la terra Florentina (de Italia) o la terra Hispanica (de España).

Por tanto, las arcillas se han utilizado como excipientes y principios activos en formas farmacéuticas y cosméticos (López Galindo y Viseras, 2004; López Galindo et al., 2006) y como nanomateriales para la obtención de sistemas de liberación de fármacos (Aguzzi et al., 2010; Viseras et al., 2010; Salcedo et al., 2012; Aguzzi et al., 2013b; Salcedo et al., 2014; Sandri et al., 2016; Mousa et al., 2018). Tanto como principios activos como excipientes, están presentes en formas de administración sólidas (comprimidos, cápsulas, granulados y polvos), líquidas (suspensiones y emulsiones) y semisólidas (pomadas, pastas, geles, ungüentos, cremas y espumas). Las monografías de estos materiales están incluidas en las principales Farmacopeas (López Galindo et al., 2007; Rowe et al., 2009).

I.2.1.5.2. Arcillas como principio activo

Las arcillas son conocidas por su actividad en el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal y tópicas, aunque también se utilizan en el tratamiento de otros trastornos más específicos. Como principios activos se han utilizado como antidiarreicos, protectores gastrointestinales, antiácidos, antiinflamatorios, antisépticos, antihemorrágicos, laxativos osmóticos y protectores dermatológicos, principalmente por la capacidad que tienen para adsorber y retener agua, bacterias y algunas toxinas (López-Galindo et al., 2011).

I.2.1.5.3. Arcillas como excipiente convencional

Como excipientes, las arcillas se emplean como lubricantes, emulsionantes, espesantes, viscosizantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, estabilizantes, diluyentes, abrasivos, adsorbentes, agentes de recubrimiento, antiagregantes y aglutinantes, con el objetivo de facilitar la administración de los principios activos, mejorar su eficacia y asegurar la

estabilidad hasta la fecha límite de su utilización (Viseras et al., 2007; Rowe et al., 2009).

I.2.1.5.4. Arcillas como ingrediente cosmético

Las esmectitas se utilizan principalmente como bases, agentes viscosizantes (Chen y Zatz, 1992; Ciullo y Braun, 1992), agentes gelificantes y emulgentes en la formación de emulsiones (Le Hir, 1995), agentes estabilizadores de suspensiones (Serrao y Bregni, 1987), agentes que confieren propiedades tixotrópicas a las suspensiones (Ponti y Zanotti-Gerosa, 1980) y humectantes en la preparación de cosméticos para la piel y el cabello (Le Hir, 1995). También se usan como aglutinantes, en la formulación de los dentífricos (Bonadeo, 1963, 1964), y como protectores solares, tanto actuando reflejando totalmente las radiaciones ultravioletas como de soportes de filtros UV (salicilato de fenilo y cinamato de metilo) (del Hoyo et al., 1998). Su empleo se aconseja en filtros “pantalla” de empleo en la protección solar de cicatrices (Aron-Brunetière, 1985). Otros usos son en forma de polvos y en la formulación de cremas desodorantes, en cosméticos para el cuero cabelludo (champú seco antigrasa) o en formulaciones cosméticas para la cara, como base para maquillajes, polvos compactos y mascarillas hidratantes faciales (López-Galindo et al., 2011; Khiari et al., 2014).

I.2.1.5.5. Arcillas como excipientes avanzados

De entre las arcillas empleadas en farmacia, algunas han sido utilizadas para modificar el perfil de disolución de principios activos (Aguzzi et al., 2007). En los últimos años, distintos sistemas constituidos por arcillas o por nanocomposites de arcillas con polímeros o con otros excipientes como ciclodextrinas han sido usados para modificar la liberación de diclofenaco (Ha y Xanthos, 2011), telmisartán (Yang et al., 2014), oxaprozina (Mura et al., 2016; Maestrelli et al., 2017), olanzapina (Gonçalves et al., 2017) o aprepitant (Pappa et al., 2018).

Este breve resumen de las aplicaciones de determinadas arcillas como excipiente de formas farmacéuticas y cosméticas sirve para destacar que no son, en absoluto, sustancias ajenas al campo de la tecnología farmacéutica y, en concreto, al desarrollo de formas farmacéuticas de administración, debido a sus propiedades (Viseras et al., 2007).

Se puede concluir que los recientes estudios sobre la utilización de arcillas como excipientes avanzados para mejorar el perfil biofarmacéutico de distintos fármacos dan lugar a una mayor expansión de su uso en el futuro próximo. En particular, y de especial relevancia para nuestros objetivos, el potencial aumento de la solubilidad de fármacos es uno de los campos de mayor interés en la industria farmacéutica que puede verse beneficiado por el empleo de este grupo de excipientes.

I.2.2. CARBONATO CÁLCICO

I.2.2.1. ASPECTOS GENERALES

El carbonato de calcio es una de las sales de calcio más abundantes presentes en la corteza terrestre. En los seres humanos el calcio es un componente esencial de una dieta equilibrada ya que forma parte de la formación de huesos y dientes y gobierna importantes funciones fisiológicas (Guéguen y Pointillart, 2000).

El calcio es un constituyente básico de las conchas de algunos seres vivos y tiene, además, un amplio uso en la industria como agente desoxidante, para la desulfuración en varias aleaciones ferrosas y no ferrosas, como agente de aleación en la producción de aleaciones de metales y, finalmente, como un constituyente del cemento. Debido a su reactividad química con el agua, el calcio puro no se encuentra en la naturaleza, excepto en algunos organismos vivos donde el Ca^{2+} desempeña un papel clave en la fisiología celular. Este elemento se encuentra en grandes cantidades en las rocas carbonatadas, tales como mármol, calizas y dolomitas. En todas estas rocas es un componente

fundamental y se presenta en forma de sal derivada de ácido carbónico, denominada carbonato de calcio o carbonato cálcico.

I.2.2.2. TIPOS DE CARBONATO CÁLCICO DE USO FARMACÉUTICO

Las propiedades del carbonato de calcio hacen que este mineral sea de gran importancia en muchas industrias. Es ampliamente utilizado en la fabricación de papel, adhesivos, colas, pinturas, así como en la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos. Para estos usos, el carbonato de calcio se obtiene por pulverización de caliza (carbonato pulverizado o GCC) o por precipitación (carbonato precipitado o PCC).

I.2.2.2.1. Carbonato cálcico pulverizado

Las rocas de carbonato son rocas sedimentarias comunes, porosas y, desde el punto de vista químico, compuestas esencialmente de carbonato de calcio (CaCO_3) y carbonato de calcio y magnesio ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) (Tennant, 1956).

Las rocas sedimentarias se forman a una cierta profundidad de la corteza terrestre por la compactación y cementación de sedimentos, por precipitación química o por materiales orgánicos mineralizados. Entre las rocas de carbonato, de interés en este trabajo, son reconocidas las siguientes:

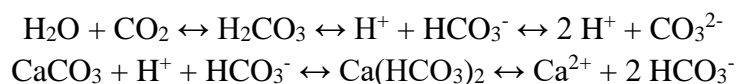
- *Calizas*: Generalmente granos finos, pero con la posible presencia de esférulas de tamaño < 2 mm, llamadas *oolitos*, ó > 2 mm, denominadas *pisolitos*; constituidas principalmente de calcita con concentraciones variables de dolomita y arcilla. En caliza comúnmente la calcita supera el 90%.
- *Travertinos*: Surgen por la precipitación química del agua fuertemente carbonatada. Tiene textura muy irregular con frecuentes concreciones y vacuolas, color amarillo pálido o rojizo.

Compuesto principalmente de calcita y/o cristales de aragonita muy grandes y pueden contener arcilla y limonita.

- *Dolomita*: Textura granular sacaroidal, constituida principalmente de calcita y dolomita con la presencia de cristales de cuarzo y arcillas. Su color blanco grisáceo o amarillo y puede ser rojo por relación con minerales accesorios.

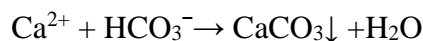
I.2.2.2.1.1. Origen geológico

La formación de las rocas carbonatadas de origen geológico se debe esencialmente a la precipitación de carbonato de calcio de una solución acuosa sobresaturada (Breecker et al., 2010). Las reacciones químicas que determinan la formación se pueden resumir de la siguiente manera:



La presencia de los iones disueltos en el agua depende principalmente de los procesos de disolución de las rocas atravesadas por las aguas de manantial antes de su emersión. El proceso químico que conduce a la disolución de carbonatos toma el nombre de fenómeno Karst. La absorción de dióxido de carbono en el agua de lluvia y la infiltración la hace más agresiva respecto a la roca carbonatada. La absorción se controla por la Ley de Henri. A una temperatura constante, la solubilidad de un gas es directamente proporcional a la presión que el gas ejerce sobre la solución. Por lo tanto, una mayor presión de CO₂ en la atmósfera en contacto con el agua da lugar a una mayor absorción de CO₂ en el agua misma. El proceso también se controla por la temperatura. El paso del CO₂ del aire al agua se produce principalmente durante el cruce de los suelos que revisten las rocas carbonatadas, esto es debido a que dentro de los suelos la presión de CO₂ es 10 veces mayor que en la atmósfera. Una vez en contacto con la roca, la agresividad del agua se neutraliza por la disolución de los carbonatos. Por tanto, podemos

concluir que los procesos de precipitación y disolución de carbonato de calcio en suelos y rocas marinas se rigen por la ecuación clásica:



Sin embargo, esta ecuación no predice el tamaño y la morfología del cristal mineral que se formará. Estos parámetros están estrechamente relacionados con la presencia de otros iones y moléculas en el medio ambiente y también dependen de la precipitación de especies específicas de gas, de la temperatura y de la cinética de reacción. La presencia en solución, o en la roca, de otros iones (típicamente magnesio y sulfatos) influye fuertemente en la disolución, en general, favoreciendo la misma. La precipitación de carbonato de calcio produce una gran variedad de formas, desde los cristales aislados a paisajes de carbonato. Calcita, aragonita y vaterita son los tres polimorfos anhidros de CaCO_3 . La calcita es el mineral más abundante y termodinámicamente más estable en superficie.

I.2.2.2.1.2. Origen biológico

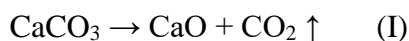
La formación de piedra caliza organogénica aparece asociada a los organismos vivos que presentan una concha o esqueleto calizo (Seibel y Dierssen, 2009). Entre los invertebrados marinos significativamente importantes, que producen enormes esqueletos de carbonato de calcio, están las algas del género *Crisomonas*, foraminíferos, *Calcispongiae* (esponjas calcáreas), corales, anélidos, briozoos, braquiópodos, equinodermos y moluscos (Nienhuis et al., 2010). Tras la muerte de dichos organismos, los restos se deponen en el lecho marino después de un recorrido más o menos largo y una vez descompuestas las partes blandas, las partes mineralizadas forman los sedimentos que llegan a cubrir áreas de notable extensión (Wilson et al., 2009).

Por otra parte, también hay organismos que contribuyen activamente a la construcción de estructuras mineralizadas como los

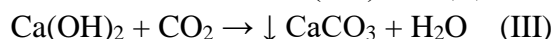
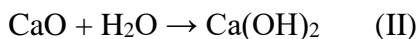
corales, siendo estos capaces de absorber Ca^{2+} y CO_3^{2-} del agua de mar para formar conchas de calcita de gran belleza.

I.2.2.2.2. Carbonato cálcico precipitado

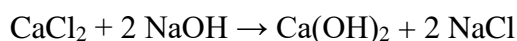
Sintéticamente, el carbonato de calcio (PCC) se puede producir por calcinación de carbonato de calcio pulverizado (GCC) en hornos a una temperatura de 1850 °F (1010 °C). De esta reacción se consigue óxido de calcio (cal viva) y CO_2 (I).



Al óxido de calcio (I) formado, se le añade agua para obtener hidróxido de calcio (II) también llamado cal apagada o lechada de cal, que por reacción con una mezcla de dióxido de carbono en aire determina la precipitación de CaCO_3 (III) (PCC), también conocido como carbonato de calcio sintético o purificado (Dereck y Woode, 1977).



Una alternativa es obtener la lechada de cal por reacción de cloruro cálcico y sosa.



Durante la precipitación del carbonato de calcio, la temperatura y el pH varía afectando de forma significativa a la morfología cristalina del mineral. El pH de la solución es inicialmente alrededor de 12, y ese valor se mantiene hasta que la neutralización se completa. Sin embargo, el pH tiene una reducción momentánea y durante un tiempo se estabiliza alrededor de 8-10. El producto obtenido se seca, a continuación, a una temperatura de 80-90 °C con el fin de aumentar la uniformidad de los cristales formados durante este período y se observa un nuevo aumento del pH a valores de 11-12. A menudo, el producto se somete a una

segunda reacción de carbonatación para llevar la solución a un pH de 7-8 y, durante esta segunda fase, se añaden, normalmente, a los ácidos grasos de cadena larga o sales. Esto asegura la dispersión simple de carbonato de calcio y un mejor rendimiento. El PCC se caracteriza por su alta pureza, partículas muy finas, distribución de tamaños estrecha y alta superficie. No obstante, se trata casi siempre de mezclas de polimorfos del carbonato de calcio. El tamaño medio de las partículas es de aproximadamente 0,7-2µm, pero también se pueden obtener partículas de dimensiones nanométricas. Otra ventaja de esta técnica es que, puesto que no son subproductos que se separan, no requiere pasos adicionales de purificación. Sin embargo, es un proceso más costoso, que requiere más energía que la usada para la producción de GCC.

El carbonato de calcio, obtenido por precipitación (PCC) o pulverización de carbonato de rocas (CCG) es un excipiente farmacéutico ampliamente utilizado como diluyente en formas sólidas de dosificación. También se utiliza como base para formas de administración sobre piel y mucosas, como coadyuvante de la disolución de comprimidos dispersables, como aditivo alimenticio y como suplemento de calcio.

I.2.2.3. PROPIEDADES DEL CARBONATO CÁLCICO

En la naturaleza, el carbonato de calcio es un sólido blanco, translúcido y a veces débilmente teñido por la presencia de impurezas. Es un material prácticamente inerte, no tóxico, de bajo costo con granos de forma cúbica o morfología irregular y variable en función de los procesos de producción. Son conocidas seis morfologías diferentes: romboédrica, prismática, acicular, escalenoédrica, esférica y ortorrómbica, y diferentes minerales, calcita, aragonita y vaterita, que pueden aparecer como resultado de formas cristalinas distintas.

El CaCO_3 de origen natural se obtiene por pulverización de tiza, piedra caliza o mármol. Las rocas sedimentarias, constituidas principalmente de cristales de calcita, son transformadas con las técnicas convencionales de extracción y de molienda. Dependiendo de la técnica de la molienda, que puede ser en seco o en húmedo, se obtiene un

producto que consiste en un polvo más o menos grueso con un diámetro medio de 1 μm aproximadamente y una amplia gama de distribución de tamaños. Los costos de la molienda aumentan con la disminución de tamaño. El carbonato de calcio sintético (PCC) suele tener estructura de escalenoedro o rómbica.

I.2.2.3.1. Propiedades de interés farmacéutico

El carbonato de calcio (Figura I.13) es un polvo inodoro e insípido, prácticamente insoluble en etanol (95%) y agua. La solubilidad en agua se incrementa con la presencia de sales de amonio o dióxido de carbono, mientras que se reduce con los hidróxidos alcalinos.

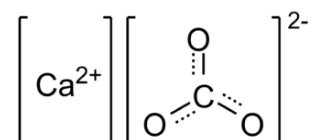


Figura I.13. Estructura molecular del carbonato cálcico.

Se caracteriza por una densidad aparente de 0.8 g/cm^3 , un índice de dureza de 3,0 en la escala de Mohs, un punto de descomposición de 825 $^{\circ}\text{C}$ y un índice de refracción de 1,59. El área superficial específica es de entre 6,21 y 6,47 m^2/g y tiene una gravedad específica de 2,7. Por regla general, el polvo de carbonato de calcio se caracteriza por una fluidez cohesiva (deficiente).

El carbonato de calcio es estable y se debe almacenar en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco. Su administración oral puede causar estreñimiento y flatulencia y el consumo de cantidades excesivas (4-60 $\text{g}/\text{día}$) también puede conducir a hipercalcemia e insuficiencia renal.

I.2.2.4. APLICACIONES DEL CARBONATO CÁLCICO

Debido a las múltiples propiedades del carbonato cálcico, existen muchos sectores en los cuales el carbonato tiene numerosas aplicaciones.

I.2.2.4.1. Usos históricos del carbonato cálcico

La historia del uso del carbonato de calcio va desde las pinturas rupestres hasta el papel y la producción de plásticos en el siglo actual. El carbonato de calcio forma parte de casi todas las pinturas rupestres prehistóricas en el período comprendido entre 40.000 y 10.000 a. C., aunque fue justo al final de esta época cuando los polvos de yeso y caliza fueron utilizados por los "artistas de las cavernas". Durante la revolución industrial en el XVIII y XIX, el fuerte incremento de la construcción con ladrillo y piedra aumentaron el uso del polvo blanco de carbonato de calcio en la cal y en los barnices y pinturas. También aumentó la demanda de CaCO_3 para las tintorerías y tipografías.

La producción de carbonato de calcio precipitado (PCC) se inició en 1841. La primera productora fue la compañía británica, *John E. Sturge Ltd.*, que trató el residuo de cloruro de calcio de su fabricación de clorato de potasio con carbonato de sodio y dióxido de carbono para formar lo que llamaron el precipitado de yeso.

En 1898, una nueva fábrica fue construida en Birmingham y fue la primera que adoptó el método de producción con la lechada de cal, un proceso que todavía está en uso hoy en día. La producción de carbonato de calcio se incrementó con el paso del tiempo y este mineral también se utilizó en la fabricación de vidrio.

A principios de 1900, se inventó la moderna pasta de dientes para facilitar la eliminación de partículas extrañas y sustancias alimenticias en la cavidad oral, así como para limpiar los dientes. En las primeras formulaciones fue utilizado comúnmente el yeso como abrasivo. Posteriormente, en el 1930, fue completamente reemplazado por el carbonato de calcio precipitado (PCC).

El desarrollo de diversas industrias y la creciente demanda de plásticos, pinturas, materiales de relleno y detergentes, llevaron a un aumento en la utilización de carbonato de calcio, el material apreciado por su capacidad de adaptarse a diferentes requisitos en virtud de la finura de su polvo y partículas y la distribución granulométrica de sus partículas.

El carbonato de calcio se introdujo en la producción de papel moderno para imprimir en la mitad del siglo XX. Esto abrió el camino al CCG, así como al PCC, ambos ampliamente utilizados, hoy en día, de rellenos en el papel glaseado y como pigmentos en papeles gráficos y cartón.

Desde finales de 1980, el carbonato de calcio se utiliza para la protección del medio ambiente. La tecnología de la desulfuración del gas de escape ha reducido significativamente el fenómeno de la "lluvia ácida". Se hace uso de una sustancia adsorbente, por lo general compuesta de cal o piedra caliza, para eliminar los compuestos de azufre producidos por la combustión de combustibles fósiles.

Desde 1995, el carbonato cálcico también ha sido utilizado para el desarrollo de "aditivos funcionales", para poliolefinas. Asimismo, se emplea en la producción de películas transpirables en el mercado de la higiene, en particular, para los pañales.

I.2.2.4.2. Aplicaciones farmacéuticas del carbonato cálcico

En farmacia el carbonato de calcio es usado como principio activo y excipiente. Cabe asimismo resaltar su empleo en complementos alimenticios y en la industria cosmética. Muchas de las aplicaciones dependen del alto contenido de calcio (40% de calcio elemental) y del poder absorbente del carbonato de calcio (como resultado de la elevada área superficial que resulta del pequeño tamaño de partícula).

I.2.2.4.2.1. Carbonato cálcico como principio activo

El principal uso del carbonato cálcico como principio activo es como antiácido, en dosis de hasta 1,5 g/día. El carbonato de calcio se ha empleado para tratar la sintomatología de la hiperacidez gástrica, la terapia de úlceras pépticas, el reflujo gastrofaríngeo, la dispepsia y el síndrome de Zollinger-Ellison, una patología rara producida por un tumor denominado gastrinoma, que aumenta la secreción de gastrina (Tang et al., 2014). El carbonato cálcico también se usa para el tratamiento de la hiperfosfatemia en pacientes con insuficiencia renal crónica con una dosis oral de 2,5-17 g. Presenta una dosis letal cincuenta (DL_{50}) por vía oral en ratas de 6,45 g/kg. Está disponible en una amplia gama de formas de administración: comprimidos, comprimidos efervescentes, cápsulas de gelatina, líquidos y goma de mascar.

El empleo de carbonato de calcio como antiácido se fundamenta en su capacidad para actuar como una base débil y, por tanto, ser capaz de contrarrestar la acidez gástrica, pero sin elevar el pH demasiado, evitando el llamado "rebote ácido". La acción del carbonato de calcio debe ser igual o superior a tres horas y no debe ser absorbidos para evitar efectos sistémicos. Asimismo, no debe alterar la motilidad gastrointestinal normal. Sin embargo, el tiempo de acción es relativamente corto y en dosis normales no es capaz de neutralizar los 30-80 mEq de ácido que se producen cada hora. Además, los cationes calcio liberados por el carbonato en el tracto gastrointestinal son fácilmente absorbidos y pueden originar el denominado síndrome de leche y alcalinos, que se caracteriza por una tríada de eventos: hipercalcemia, alcalosis metabólica e insuficiencia renal (Cooke, 1932; Cope, 1936). Este síndrome se asocia a tomar altas dosis de calcio y alcalinos fácilmente absorbibles (McMillan y Freeman, 1965). La cantidad de carbonato de calcio requerida para causar el síndrome de leche y alcalinos varía de un mínimo de 4 g a un máximo de 60 g (Newmark y Nugent, 1993; Orwoll, 1982) y no parece ser dosis dependiente (Beall y Schofield, 1995). El empleo de antagonistas del receptor H₂ e inhibidores de la bomba de protones en sustitución del

carbonato de calcio y otros antiácidos similares ha reducido mucho la prevalencia de este síndrome (Camidge y Peaston, 2000).

A pesar de la aparición y uso generalizado de antagonistas del receptor H₂ y de inhibidores de la bomba de protones, en aquellos casos de síntomas leves de dispepsia, los antiácidos suelen ser los fármacos de primera elección para la automedicación debido a su rápida manifestación de la acción y a que su coste es considerablemente más bajo que el de los antagonistas H₂ a baja dosificación o el de los inhibidores de la bomba de protones. Un ejemplo de medicamento que actualmente contiene carbonato de calcio como antiácido es Rennie[®], que contiene 680 mg de carbonato de calcio y 80 mg de carbonato de magnesio. Tras su administración, el carbonato de calcio y carbonato de magnesio reaccionan con el exceso de ácido presente en el jugo gástrico transformándose en cloruros solubles que reaccionan con las secreciones intestinales, pancreáticas y biliares formando sales insolubles que se eliminan con las heces.

I.2.2.4.2.2. Carbonato cálcico como excipiente convencional

Como excipiente farmacéutico el carbonato cálcico se usa principalmente como diluyente en formas farmacéuticas sólidas de administración oral, como, por ejemplo, comprimidos y cápsulas. También se usa como base para preparaciones dentales medicamentosas, como componente de sistemas tampón y como promotor de la disolución en comprimidos dispersables. Además, se utiliza como excipiente en el proceso de fabricación de grageas y como un opacificante en comprimidos con recubrimiento pelicular (Rowe et al., 2009). El carbonato de calcio puede interferir en la absorción en el tracto gastrointestinal de distintos fármacos administrados concomitantemente.

I.2.2.4.2.3. Carbonato cálcico como complemento alimenticio

El carbonato de calcio, también se usa en la alimentación humana como un suplemento de calcio en caso de hipocalcemia, pero especialmente en el tratamiento de la osteoporosis. Los beneficios de los

suplementos de calcio en la osteoporosis resultan del aumento de la disponibilidad de calcio en suero por la deposición de éste en los huesos y la reducción de la estimulación de la resorción ósea mediante la acción de la hormona circulante Ipth (Sakhaee et al., 1999; Heller et al., 2000; Hanzlik et al., 2005).

El calcio es un elemento importante en el cuerpo humano porque participa en numerosas funciones vitales intracelulares y extracelulares, y en el soporte esquelético y, por tanto, concentraciones de calcio en suero anormales contribuyen al desarrollo de las lesiones y diversos signos clínicos.

Normalmente, la ingesta de calcio en la dieta es proporcional a la cantidad de calcio que se pierde en la orina y las heces. Generalmente, la cantidad diaria de calcio necesaria es repuesta por la ingesta de leche. La ingesta de calcio es crucial no sólo por las razones mencionadas anteriormente, sino también para la prevención de la osteoporosis en los ancianos, en pacientes que son alérgicos a los productos lácteos y en las mujeres tanto premenopáusicas como posmenopáusicas. La osteoporosis es un trastorno del esqueleto caracterizada por una masa ósea disminuida, por un deterioro de la resistencia ósea y por un aumento de la fragilidad ósea que predispone a la fractura (Nordin, 1987). Muchos factores afectan a la osteoporosis, pero pueden ser vistos como un trastorno de la deficiencia de calcio en la que se reabsorbe el hueso para mantener los niveles de calcio en suero cuando la excreción de calcio no está en equilibrio con su absorción (Charles, 1992; Reginster et al., 1993; Martini y Wood, 2002). Debido a que muchas dietas actuales no proporcionan los niveles recomendados de calcio, suplementos de calcio han sido recomendados para la prevención de la osteoporosis, así como para otras condiciones incluyendo la hipertensión, hipercolesterolemia y cáncer (Porter, 2003). Debido a que hay poca información sobre la biodisponibilidad de las diferentes preparaciones, se desconoce si el calcio ingerido se absorbe de manera más eficiente en forma de sales de calcio de sales hidrosolubles que en sales son poco solubles. La solubilidad de una sal de calcio puede variar dependiendo del proceso de

fabricación, y no refleja necesariamente su biodisponibilidad (Heaney et al., 1990). La biodisponibilidad, además de diferencias interindividuales, depende de varios factores, tales como la disgregación, la solubilidad, la formación de quelatos y cualquiera de las interacciones entre alimentos y medicamentos (Whiting y Pluhator, 1992).

Los productos que contienen carbonato de calcio y el citrato de calcio son los más comúnmente utilizados (Levenson y Bockman, 1994; Heller et al., 1999; Porter, 2003). Se demostró que un tratamiento con carbonato cálcico administrado en dos dosis diarias con las comidas y al acostarse produce un aumento significativo en la absorción de calcio. El carbonato de calcio se puede utilizar como una alternativa a la leche en las personas que no toman leche o productos lácteos (Mortensen y Charles, 1996).

I.2.2.4.2.4. Carbonato cálcico como ingrediente cosmético

El carbonato cálcico en cosmética se usa en preparación de pastas de dientes y cremas de belleza. Fue el primer compuesto usado para elaborar pasta de dientes. El carbonato de calcio es un excipiente que actúa como un agente abrasivo. El carbonato de calcio tiene la capacidad de neutralizar ácidos de la placa, y cuando está presente como un abrasivo en pastas de dientes, es retenido en la placa donde actúa como tampón (Davies et al., 2010). El carbonato cálcico es relativamente insoluble a pH neutro y aumenta su solubilidad con la disminución del pH. El uso a largo plazo de una pasta de dientes basada en carbonato de calcio puede conferir un aumento significativo en el pH de la placa, lo cual es beneficioso puesto que al limitar la caída del pH causada por los ácidos tiene un efecto anticaries (Mainwaring y Duke, 1980). Una ventaja adicional de las partículas de carbonato de calcio retenidas en la placa es su capacidad para actuar como un reservorio, liberando el calcio después de su disolución bajo el estímulo de ácidos y, por tanto, causando un aumento en los niveles de calcio en la placa (Shaw et al., 1983), de manera que bajos niveles de calcio en la placa son un factor predictivo de futuras caries (Pearce et al., 2002). El carbonato de calcio permite

remineralizar lesiones en el esmalte (Gaffar et al., 1993). Pastas de dientes basadas en carbonato de calcio son con frecuencia más eficaces que otras que no lo contienen (Cury et al., 2003).

I.2.2.4.2.5. Carbonato cálcico como excipiente avanzado

El carbonato cálcico es un material poroso con una gran área superficial, una excelente seguridad, biocompatible, biodegradable y de bajo costo, por lo que muestra un gran potencial para aplicaciones farmacéuticas. Todas estas propiedades hacen que el carbonato de calcio ofrezca múltiples ventajas para ser un exitoso transportador de fármacos para mejorar la biodisponibilidad oral de fármacos de baja solubilidad en agua (Preisig et al., 2014). Los fármacos hidrofóbicos interactúan con los transportadores porosos hidrofílicos pudiendo así mejorar la humectabilidad y aumentar la porosidad y la superficie específica (Zhang et al., 2015). Además, cuando se adsorbe el fármaco queda en estado molecular en los poros, mejorando la velocidad de disolución *in vitro* (Preisig et al., 2014).

En los últimos años se han planteado sistemas basados en carbonato cálcico en forma de nanopartículas cargadas con eritropoyetina (Ueno et al., 2005). Este tipo de nanopartículas tienden a disponerse en los vasos sanguíneos (Majeti y Kumar, 2000), en tumores (Takenaga, 1996) y en tejidos inflamados (Moulari et al., 2014), lo que las hace útiles en sistemas de tipo “sitio específico”. Micropartículas con carbonato cálcico e hidroxiapatito (Davis, 2002; Mizushima et al., 2006), alginato de calcio (Lanting y Barfett, 2006) o polivinil alcohol (PVA) (Ogomi et al., 2005; Stasko et al., 2009) también han sido estudiadas. Más recientemente se han preparado microcápsulas de carbonato cálcico cargadas con albúmina de suero bovino (BSA) y ADN (Fujiwara et al., 2008). Otras microesferas y nanoesferas de carbonato cálcico han sido usadas para la liberación de camptotecina (Qiu et al., 2012) y otros fármacos anticancerígenos (Chen et al., 2012; Svenskaya et al., 2013; Wu et al., 2014), así como en terapia génica (Zhao et al., 2012; Chen et al., 2012). Sistemas mixtos de carbonato cálcico y ciclodextrinas (Kurapati y

Raichur, 2013), quitosano (Wang et al., 2010; Wang et al., 2018), y carbonato cálcico funcionalizado con hidroxipropil- β -ciclodextrina (Zhang et al., 2015) han sido usados para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos, de proteínas (Roth et al., 2018), ADN (Manzine Costa et al., 2017) y de fármacos anticancerosos (Dizaj et al., 2015; Vergaro et al., 2015; Zhao et al., 2015). Micropartículas de carbonato de calcio híbridas enzimáticas modificadas fueron utilizadas para obtener superficies nanoestructuradas que aumentan la carga de fármaco (Islan et al., 2015).

Se puede concluir que los campos de aplicación de este material inorgánico, el carbonato cálcico, son numerosos y que los recientes estudios prevén una expansión de su uso en el futuro próximo, en particular, en la industria farmacéutica y las nuevas tecnologías. Sus propiedades como excipiente resultan de interés para los objetivos de la Tesis Doctoral y, por tanto, supone junto con las arcillas montmorillonita y sepiolita, los sistemas inorgánicos del presente trabajo.

CAPÍTULO II

Objetivos

El presente trabajo de tesis está dedicado al estudio a nivel teórico y experimental de la interacción del fármaco prazicuantel con excipientes naturales minerales, como son las arcillas y el carbonato cálcico, utilizando herramientas computacionales y experimentales adecuadas, que permitan estudiar la molécula y estructura cristalina del prazicuantel, la interacción química del fármaco con los distintos excipientes y evaluar la velocidad de disolución del fármaco en los diferentes soportes, en vistas a su optimización biofarmacéutica. En particular, el incremento de la solubilidad acuosa del prazicuantel sin aumentar el coste final del medicamento, dado la población a la que está destinado, permitiría disminuir las dosis que son necesarias para conseguir un efecto terapéutico, reduciendo los efectos secundarios, lo que aseguraría poder cumplir los tratamientos y evitaría la frecuente aparición de formas resistentes del parásito. Para cumplir este objetivo general, en la Tesis Doctoral se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Reproducir a nivel teórico la estructura molecular y cristalina del prazicuantel en los distintos enantiómeros que presenta, así como

en el cristal racémico y establecer una metodología computacional que describa adecuadamente la estructura molecular y cristalina del fármaco.

2. Realizar un análisis conformacional exhaustivo de la molécula de prazicuantel para estudiar la estabilidad de los conformeros en distintos medios y sus orientaciones estructurales.
3. Calcular las frecuencias teóricas de vibración de la molécula de prazicuantel con distintos métodos y comparar los resultados con los valores de frecuencias experimentales, asignando aquellas bandas que no puedan ser identificadas experimentalmente.
4. Estudiar las propiedades espectroscópicas de infrarrojo y Raman de las estructuras cristalinas de prazicuantel y compararlas con las experimentales.
5. Obtener productos de interacción prazicuantel-arcilla en ausencia de agua como una estrategia para mejorar la incorporación efectiva de las moléculas de fármaco en el excipiente inorgánico y estudiar el potencial aumento en la velocidad de disolución del fármaco.
6. Reproducir y estudiar con el método computacional más adecuado la estructura molecular del fármaco en interacción con soportes inorgánicos basados en arcillas.
7. Investigar los cambios conformacionales y las características fisicoquímicas de la forma cristalina racémica del prazicuantel una vez en contacto con carbonato de calcio en polvo, y su caracterización con distintas técnicas.

8. Estudiar la interacción de la molécula de prazicuantel con el carbonato cálcico y agua, así como las diferentes formas cristalinas del prazicuantel a escala molecular.
9. Estudiar el carbonato de calcio como un excipiente natural para mejorar la velocidad de disolución del praziquantel.

La consecución de estos objetivos permitirá completar el estudio experimental y establecer correlaciones con los resultados teóricos. La interacción efectiva del fármaco con los excipientes inorgánicos deberá conducir a una mejora útil desde el punto de vista biofarmacéutico que permita optimizar el régimen de dosificación.

CAPÍTULO III

Metodología computacional

En este trabajo de Tesis Doctoral se han empleado dos tipos generales de técnicas o metodologías: experimental y teórica. El uso combinado de ambas permite una comprensión más profunda de los problemas de estudio. Así, mientras que con el experimento se tiene una visión externa, midiendo las propiedades reales del macrosistema, en la teoría, se parte de principios físicos y químicos y se construyen modelos moleculares que permiten dar estimaciones de las propiedades fisicoquímicas, las cuales son comparables con las medidas experimentales. En ciertas ocasiones sólo la teoría es capaz de explicar las observaciones experimentales, puesto que con ella se obtiene una descripción a nivel atómico o molecular. El uso de esta metodología es posible hoy en día en parte gracias a los avances llevados a cabo en las últimas décadas en tecnología informática y los desarrollos de métodos y técnicas computacionales capaces de abordar problemas de mayor complejidad con suficiente precisión. En el campo del estudio de la interacción entre fármacos y minerales se han logrado resultados de relevancia mediante la modelización computacional. A modo de ejemplo, se citan aquí los trabajos sobre la adsorción del ácido salicílico en illita (Kubicki et al., 1997), la tetraciclina y derivados de la

misma en kaolinita y montmorillonita (Figueroa et al., 2004) y oxitetraciclinas en montmorillonita (Kulshrestha et al., 2004; Aristilde et al., 2010), itraconazol en laponita (Jung et al., 2008), heparina e ibuprofeno en arcillas sintéticas (hidrotalcitas) (Zhang et al., 2010; Rojas et al., 2012), isoniazida en halloysita (Carazo et al., 2017), sulfonamidas en la superficie de filosilicatos (Francisco-Márquez et al., 2017) y el ácido 5-aminosalicílico en halloysita (Borrego-Sánchez et al., 2018).

En los artículos de esta Tesis, las diversas técnicas experimentales utilizadas han permitido la preparación de mezclas de prazicuantel con distintos excipientes, su caracterización y la evaluación de su perfil de disolución *in vitro* en medios que simulan a los fisiológicos. A su vez, con la modelización computacional se han determinado la estructura geométrica de la molécula de prazicuantel, las dimensiones estructurales de la celda unidad en las formas cristalinas de prazicuantel y las arcillas (espaciado interlaminar, organización atómica...) y los tipos de interacción entre fármaco y excipientes (carbonato cálcico y arcillas) incluyendo geometría y energía de interacción asociada al proceso de adsorción. Los aspectos tanto generales como específicos de las técnicas experimentales usadas se describen en las distintas secciones del capítulo Resultados. Dado que para la metodología computacional solamente aparecen descritos los detalles más específicos usados en cada artículo, se ha considerado adecuado presentar en este capítulo, al menos de forma resumida, los principales aspectos de las teorías y métodos y de las estrategias computacionales y paquetes de cálculo específicos para la modelización de moléculas y sólidos, así como, la determinación de ciertas propiedades de interés para obtener una descripción atomística de los sistemas de estudio.

III.1. TEORÍAS Y MÉTODOS

Hay que distinguir dos grandes grupos generales de teorías que fundamentan la química computacional: la mecánica molecular clásica y la química cuántica (Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000). La elección de una u otra a la hora de realizar un estudio de modelización computacional depende de una serie de factores, tales como el tamaño del sistema, el coste computacional requerido y la precisión deseada. Los métodos clásicos correspondientes a la mecánica molecular están basados en expresiones analíticas de la energía que se derivan de la mecánica newtoniana. El bajo coste computacional permite su uso en sistemas de gran tamaño molecular o la realización de simulaciones dinámicas de largo tiempo. Sin embargo, su aplicación se ve limitada a situaciones en las cuales no se produzcan alteraciones en enlaces covalentes o cambios drásticos en la distribución electrónica. En estos casos, la alternativa son los métodos de la química cuántica, los cuales poseen una mayor precisión, pero son computacionalmente más costosos.

III.1.1. MECÁNICA MOLECULAR (MM)

En esta teoría clásica, los átomos se representan como cargas puntuales y las interacciones entre los átomos del sistema bajo estudio se determinan mediante funciones de energía potencial cuyos parámetros (empíricos) se ajustan para reproducir algunos datos experimentales y/o datos teóricos provenientes de cálculos cuánticos de mayor precisión como los descritos en la siguiente sección (Jensen, 1999). En la mayoría de las aproximaciones MM no se tienen en cuenta las situaciones de formación o ruptura de enlaces. La energía, E_{MM} , depende inicialmente sólo de las posiciones y de los potenciales de los núcleos atómicos y consta principalmente de los siguientes términos:

$$\begin{aligned}
 E_{MM} &= E_{enlace} + E_{no-enlace} \\
 E_{enlace} &= E_{distancia} + E_{ángulo} + E_{diedro} \\
 E_{no-enlace} &= E_{Coulomb} + E_{Van\ der\ Waals},
 \end{aligned}
 \tag{III.1}$$

donde se distinguen las contribuciones covalentes (E_{enlace}) y las no covalentes ($E_{no-enlace}$) y, a su vez, $E_{distancia}$ corresponde al alargamiento/acortamiento de los enlaces, $E_{ángulo}$ a la flexión de los ángulos de enlace, E_{diedro} a la torsión de los ángulos diedros, $E_{Coulomb}$ a las interacciones electrostáticas y $E_{Van\ der\ Waals}$ a las interacciones de dispersión. Con la finalidad de mejorar la descripción, se pueden añadir otros términos, como términos cruzados que tengan en cuenta el efecto de distorsiones de enlace o de ángulo causadas por átomos vecinos, términos de inversión (o piramidalización) debido a interacciones fuera del plano, etc.

El conjunto de expresiones analíticas clásicas usado para los términos de la Ecuación III.1 y sus parámetros constituyen lo que se denomina campo de fuerzas (*forcefield*, FF). La diferencia entre distintos campos de fuerza radica en la forma funcional de dichas expresiones y la cantidad de parámetros empíricos usados. A continuación, se muestran un conjunto de expresiones comunes en la mayoría de los campos de fuerza. Una de las más simples usadas para describir las distorsiones de tipo alargamiento/acortamiento del enlace ($E_{distancia}$), es la del oscilador armónico, que tiene la siguiente forma:

$$E_{distancia} = \frac{K_0^{dist}}{2} (R - R_0^{dist})^2, \quad (III.2)$$

donde K_0^{dist} es la constante de fuerza del enlace, R la distancia de enlace y R_0^{dist} su distancia en equilibrio. Con excepción de la variable R , el resto son los parámetros empíricos que incluye el campo de fuerzas. Como puede observarse en la Ecuación III.2, esta expresión tiene una dependencia cuadrática con la variable R y no describe bien el comportamiento a valores altos de dicha distancia R cercanos a la rotura de enlace. Este tipo de función puede mejorarse añadiendo términos anarmónicos o usando, por ejemplo, un potencial de Morse, cuya expresión es:

$$E_{distancia} = D_0^{dist} \left(1 - e^{\sqrt{\frac{K_0^{dist}}{2D_0^{dist}}}(R-R_0^{dist})}} \right)^2, \quad (\text{III.3})$$

donde D_0^{dist} corresponde a la profundidad del pozo de energía obtenido en el alargamiento/acortamiento del enlace, también denominada energía de disociación del enlace.

Para los potenciales de enlace correspondientes al cambio de ángulo de enlace y la torsión, las funciones que describen de forma adecuada dichas distorsiones y, por tanto, las que se usan más comúnmente son de tipo cuadrático y periódico, respectivamente:

$$E_{ángulo} = \frac{K_0^{áng}}{2} (\theta - \theta_0)^2, \quad (\text{III.4})$$

$$E_{diedro} = \frac{1}{2} \sum_j \{B_j (1 - d_j \cos[n_j \phi])\}, \quad (\text{III.5})$$

donde $K_0^{áng}$ es la constante de fuerza para la flexión angular, θ la variable ángulo, θ_0 el ángulo en equilibrio, B_j la altura de la barrera energética, d_j el factor de fase, n_j la periodicidad y ϕ la variable de torsión del ángulo diedro.

Para las interacciones no enlazantes, $E_{no-enlace}$, de tipo electrostático o Coulomb, la expresión más común es la siguiente:

$$E_{Coulomb} = \frac{C(q_i q_j)}{\epsilon R}, \quad (\text{III.6})$$

donde C es un factor de conversión, q_i y q_j las cargas de los átomos i y j , respectivamente, ϵ la constante dieléctrica relativa y R la distancia interatómica.

Las interacciones de tipo de van der Waals vienen dadas por el término $E_{Van\ der\ Waals}$, siendo los siguientes los potenciales más comunes:

$$E_{Van\ der\ Waals} = D_0^{VdW} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{R_0^{VdW}}{R} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_0^{VdW}}{R} \right)^6 \right], \quad (III.7)$$

$$E_{Van\ der\ Waals} = \frac{D_0^{VdW}}{1-\frac{6}{\alpha}} \left[\frac{6}{\alpha} e^{\alpha \left(1 - \frac{R}{R_0^{VdW}} \right)} - \left(\frac{R_0^{VdW}}{R} \right)^6 \right], \quad (III.8)$$

donde D_0^{VdW} es la profundidad del pozo energético del potencial de Van der Waals, R_0^{VdW} la distancia de equilibrio, R la variable distancia entre los átomos y α un parámetro que determina la pendiente de la interacción repulsiva. La Ecuación III.7 se denomina comúnmente potencial de Lennard-Jones, mientras que la Ecuación III.8 corresponde a una mejora derivada del potencial de Buckingham en la cual la inclusión del parámetro α permite una mayor flexibilidad en la forma del potencial.

La mayoría de los campos de fuerzas están desarrollados sobre todo para moléculas orgánicas, aunque también existen otros que reproducen mejor los sistemas inorgánicos y minerales. Sin embargo, es difícil encontrar un campo de fuerzas que reproduzca adecuadamente ambos sistemas a la vez, como son algunos de nuestros sistemas de estudio. Además, los filosilicatos son un caso especial de minerales donde las interacciones en los espacios interiores del mineral, como es el espacio interlamilar, son diferentes a otros minerales. Por tanto, es de gran importancia desarrollar y utilizar un campo de fuerzas específico para los filosilicatos que pueda describir la estructura y propiedades de los filosilicatos y al mismo tiempo la de moléculas orgánicas y la interacción entre ambos. En los estudios MM de la Tesis Doctoral se ha hecho uso de distintos campos de fuerzas tales como el campo de fuerzas potenciales moleculares optimizados en fase condensada para estudios de simulaciones atomísticas (*Condensed-phase optimized molecular potentials for atomistic simulation studies*, COMPASS) (Sun, 1998), Universal (Rappé et al., 1992), campo de fuerzas de valencia consistente

para filosilicatos (*consistent-valence forcefield for phyllosilicates*, cvff_phyllosilicates o CVFFH) y campo de fuerzas de polímero consistente para interfase (*polymer-consistent forcefield for interface*, pcff_interface). Estos dos últimos son derivados del CVFF (Dauber-Osguthorpe et al., 1988) y PCFF (Hill y Sauer, 1994), respectivamente. Ambos fueron modificados por Heinz et al. (2006), y adaptados a nuestros sistemas por Martos-Villa et al. (2013). Además, estos sistemas presentan agua, por lo cual se exploraron inicialmente dos modelos de agua, el modelo carga puntual simple (*simple point charge*, SPC) que presenta valores de carga de 0.41 y -0.82 para los átomos de H y O, respectivamente, y el modelo potencial intermolecular transferible con 4 puntos (*transferable intermolecular potential with 4 points*, TIP4P) cuyas cargas son 0.417 y -0.834 para H y O, respectivamente (Berendsen et al., 1987; Rick et al., 1995). El modelo de agua SPC fue el elegido porque describe bien la estructura del agua líquida (función de distribución radial O-O próxima al valor experimental) y su densidad.

III.1.2. QUÍMICA CUÁNTICA (QC)

En la química cuántica se estudian los átomos como sistemas formados por núcleos y electrones, a diferencia de los métodos clásicos anteriores que consideran simplemente los átomos como puntos cargados. Por tanto, se estudian las interacciones entre núcleos, entre electrones y entre núcleos y electrones (Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000; Szabo y Ostlund, 1996). El objetivo principal en la química cuántica es normalmente resolver la denominada ecuación de Schrödinger no relativista independiente del tiempo,

$$\hat{H}\Psi = E\Psi, \quad (\text{III.9})$$

donde Ψ es la función de onda, E la energía y \hat{H} es el operador Hamiltoniano. Este último contiene términos relacionados con los distintos tipos de energías presentes en el sistema:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_n + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{nn} + \hat{V}_{ne}. \quad (\text{III.10})$$

Los términos corresponden, de izquierda a derecha, a la energía cinética de los electrones, la energía cinética de los núcleos, las repulsiones electrón-electrón, las repulsiones núcleo-núcleo y la atracción entre electrones y núcleos.

Para un sistema de N electrones y M núcleos, el Hamiltoniano queda como

$$\hat{H} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{\hbar^2}{2m_A} \sum_{A=1}^M \nabla_A^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}}, \quad (\text{III.11})$$

donde $\hbar = \frac{h}{2\pi}$, siendo h la constante de Planck, m_e y m_A representan la masa del electrón y de los núcleos, respectivamente, Z_A y Z_B las cargas nucleares, r_{ij} la distancia entre los electrones i y j , R_{AB} la distancia entre los núcleos A y B y r_{iA} la distancia entre el electrón i y el núcleo A . La función de onda, Ψ , contiene toda la información sobre el comportamiento de las partículas constituyentes del sistema (núcleos y electrones). El cuadrado de dicha función, $|\Psi|^2$, está relacionado con la probabilidad de encontrar las partículas en el espacio. La resolución de la Ecuación III.9 da como resultado Ψ y E , con lo cual podemos saber cómo se distribuyen los electrones alrededor de los núcleos y los estados energéticos que dispone el sistema molecular.

La resolución analítica de la ecuación de Schrödinger definida en la Ecuación III.9 no es posible en la gran mayoría de sistemas de interés en química, lo cual se debe a la presencia de términos que dependen de dos partículas, r_{ij} , R_{AB} y r_{iA} . Dicha ecuación diferencial sería resoluble analíticamente si sólo hubiera dependencias de una partícula. Afortunadamente, sí es posible encontrar soluciones aproximadas, que siguen siendo de gran utilidad. Para ello se recurre a aproximaciones, la primera de las cuales corresponde a la aproximación adiabática o de Born-Oppenheimer (Born y Oppenheimer, 1927). Esta aproximación se basa en el hecho de que las escalas temporales de movimiento de los

núcleos y de los electrones son en general muy distintas, por lo que se puede separar el problema molecular en un problema nuclear y uno electrónico ($\hat{H} = \hat{H}_{nuc} + \hat{H}_{elec}$, $\Psi = \Psi_{nuc}\Psi_{elec}$ y $E = E_{nuc} + E_{elec}$), y centrarse primero en la resolución de la ecuación electrónica manteniendo la posición de los núcleos fija. Recurriendo a dicha aproximación, el Hamiltoniano electrónico queda definido ahora a través de la expresión

$$\hat{H}_{elec} = -\frac{\hbar^2}{2m_e} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}}. \quad (\text{III.12})$$

Aquí, r_{ij} sigue siendo una variable que depende de dos partículas, pero r_{iA} sólo depende ahora de una partícula, la posición del electrón i , ya que el núcleo A está fijo. La resolución de la ecuación electrónica ($\hat{H}_{elec}\Psi_{elec} = E_{elec}\Psi_{elec}$) es ahora posible mediante el método Hartree-Fock (HF) (Hartree, 1928; Fock, 1930), descrito en la siguiente sección, el cual elimina el problema de la dependencia bi-partícula del segundo término en la Ecuación (III.12).

Tras la obtención de Ψ_{elec} y E_{elec} es posible continuar con la resolución de la parte nuclear. Sin embargo, esto supone cierta complejidad y coste computacional. Una forma más simple de obtener información sobre el comportamiento nuclear (de forma semi-clásica) es resolviendo el problema electrónico a distintos valores de las coordenadas nucleares, obteniéndose E_{elec} , sumarle luego la constante de repulsión nuclear ($\sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$), dando lugar entonces a las denominadas superficies de energía potencial (*potential energy surfaces*, PES). Estas superficies son de gran utilidad para la resolución de problemas químicos, ya que con ellas se pueden determinar, por ejemplo, qué posiciones u orientaciones de los átomos de un sistema molecular tienen mínimos energéticos y, por lo tanto, son más estables.

III.1.2.1. HARTREE-FOCK (HF) Y POST-HF

La ecuación electrónica con el Hamiltoniano de la Ecuación III.12 aún presenta gran complejidad a la hora de resolverla, con lo cual son

necesarias más aproximaciones para hacer el problema aplicable a sistemas de interés. Tal y como se ha mencionado arriba, el principal problema se deriva del término bi-electrónico r_{ij} el cual hace que la ecuación diferencial no sea resoluble analíticamente. La solución, derivada de las contribuciones realizadas por Hartree y Fock (Hartree, 1928; Fock, 1930) consiste en sustituir el término de interacción directa electrón-electrón por un término de interacción promedio de cada electrón con el campo generado por el resto de electrones. Este término depende ahora de una partícula (el electrón) y permite la resolución de la ecuación diferencial multielectrónica (Ecuación III.12) como un conjunto de ecuaciones diferenciales monoeléctricas ahora para cada electrón.

Para obtener las soluciones de estas ecuaciones (energía ε_i para cada electrón i y su correspondiente función de onda, ψ_i , también denominada orbital molecular) hay que tener en cuenta, sin embargo, que es necesario conocer el campo generado por el resto de los electrones y, por tanto, la posición de estos ($\psi_j, j \neq i$). Se debe recurrir entonces a un proceso iterativo o de campo auto-consistente (*self-consistent field*, SCF) en el cual se parte de valores iniciales de ψ_j , los cuales se van optimizando en cada iteración hasta encontrar los convergidos (aquellos que producen un mínimo de energía electrónica) (Szabo y Ostlund, 1996).

Como funciones de partida para empezar el cálculo iterativo se suele recurrir normalmente a la aproximación de Roothan, conocida también como combinación lineal de orbitales atómicos (*linear combination of atomic orbitals*, LCAO) (Roothan, 1951). Se parte de funciones ϕ_i centradas en los distintos átomos que simulan los orbitales de tipo atómico (por ejemplo, funciones de tipo 1s, 2s, 2p, 3d...). A lo largo del proceso iterativo, se combinan entre ellas para dar lugar al final a orbitales moleculares (ψ_i) óptimos. Estos orbitales atómicos de partida (ϕ_i) constituyen lo que comúnmente se denomina conjunto de base.

Existen distintos tipos de conjuntos de base, cuya diferencia está en el número de orbitales de partida usados y su complejidad, lo cual repercute en una mayor o menor precisión y coste computacional. En esta

Tesis se ha hecho uso del conjunto de base doble numérica más funciones de polarización (*double numerical plus polarization*, DNP) (Delley, 1990). Se usa aquí una función por cada orbital atómico ocupado en los átomos constituyentes del sistema molecular, más otra función adicional por cada orbital de valencia ocupado (por ejemplo, 1s y 1s' para H y 1s, 2s, 2s', 2p y 2p' para C) y una función extra con un número cuántico azimutal superior (por ejemplo, 2p para H y 3d para C). Esta base supone un buen compromiso entre precisión y coste computacional.

Las soluciones de energía que proporciona el método HF son siempre superiores a la solución exacta (teorema variacional) (Andrés y Beltrán, 2000; Szabo and Ostlund, 1996), lo cual se debe al hecho de que el término $1/r_{ij}$ se ha considerado de forma promediada y no explícita. A la diferencia que existe entre la solución exacta y la solución obtenida con el método HF se la conoce como correlación electrónica. Dicha correlación es un término de gran importancia ya que supuso la base para el desarrollo de toda una serie de métodos denominados post-HF cuyo objetivo es recuperar lo máximo posible de la correlación electrónica y con ello obtener la máxima precisión posible. Dentro de estos métodos post-HF destacan tres categorías principales, que se distinguen en el tipo de técnicas que usan para obtener la correlación electrónica: interacción de configuraciones, teoría de perturbaciones y métodos de clústeres acoplados. También se distinguen los métodos que permiten describir una sola configuración electrónica a la vez o varias (mono y multiconfiguracionales, respectivamente).

III.1.2.2. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD

Los métodos cuánticos descritos arriba se centran en la función de onda, la cual depende de las coordenadas espaciales de los N electrones más sus espines ($4N$ en total), de ahí su gran complejidad y gran coste computacional que requieren sobre todo los métodos post-HF. Como alternativa, es posible abordar los problemas electrónicos de forma cuántica centrándose en la densidad electrónica, la cual depende únicamente de tres coordenadas espaciales. Este tipo de métodos

corresponden a la teoría del funcional de la densidad (*density functional theory*, DFT) (Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000, Parr y Weitao, 1995) y parten de los teoremas de Hohenberg-Kohn (Hohenberg y Kohn, 1964), en los cuales se afirma que la energía del estado electrónico fundamental de un sistema puede determinarse si se conoce su densidad electrónica $\rho(\vec{r})$. La expresión de la energía electrónica queda descrita como:

$$E(\rho) = T(\rho) + E_{en}(\rho) + E_{ee}(\rho), \quad (\text{III.13})$$

donde, $T(\rho)$ representa la energía cinética, $E_{en}(\rho)$ la energía de interacción electrón-núcleo y $E_{ee}(\rho)$ la interacción electrón-electrón.

Con la finalidad de poder calcular los términos energéticos de la Ecuación III.13, Kohn y Sham (Kohn y Sham, 1965) consideraron un sistema de $2N$ electrones sin interacciones, descrito por orbitales ψ_i de tal manera que la densidad electrónica del sistema, $\rho_s(\vec{r})$, coincidiese con la del sistema real, $\rho_r(\vec{r})$, en el que sí hay interacciones:

$$\rho_s(\vec{r}) = 2 \sum_{i=1}^N |\psi_i|^2 = \rho_r(\vec{r}). \quad (\text{III.14})$$

De esta forma la Ecuación III.13 pasa a escribirse como:

$$E(\rho) = T_s(\rho) + E_{en}(\rho) + E_{xc}(\rho) + J(\rho), \quad (\text{III.15})$$

en la que $J(\rho)$ equivale a la interacción de Coulomb electrón-electrón clásica y se puede calcular usando los orbitales ψ_i , $T_s(\rho)$ es una aproximación de la energía cinética real $T(\rho)$ y también se puede calcular con ψ_i y $E_{xc}(\rho)$ es el término de correlación de intercambio cuya forma funcional es desconocida (Parr y Weitao, 1995).

La dificultad principal de este método reside en encontrar expresiones adecuadas para $E_{xc}(\rho)$ para poder calcularla. Cuando ya se tiene una expresión para dicho factor, el problema es muy parecido a HF, de tal manera que se debe determinar el conjunto de orbitales ψ_i que

minimicen la energía. Sin embargo, el DFT incluye correlación electrónica, permitiendo mejorar los resultados HF a un coste más reducido en comparación a los métodos post-HF.

El término $E_{xc}(\rho)$ se separa en dos factores:

$$E_{xc}(\rho) = E_x(\rho) + E_c(\rho). \quad (\text{III.16})$$

En este caso, $E_x(\rho)$ es el término de la energía de intercambio y $E_c(\rho)$ el de la energía de correlación. Se han desarrollado diversos funcionales para estos términos, para lo que se ha hecho uso de distintas aproximaciones con el fin de obtener la expresión final de $E_{xc}(\rho)$ (Cohen et al., 2012):

- *Aproximación de la densidad local (local density approximation, LDA)*: En este caso, la densidad electrónica (ρ) se trata como si fuera un gas uniforme de electrones en el entorno molecular. Supone una aproximación local en la cual, en cada punto, E_{xc} depende sólo de la densidad en ese punto.
- *Aproximación del gradiente generalizado (general gradient approximation, GGA)*: Se corrigen las deficiencias de la aproximación LDA haciendo que las expresiones para las energías de correlación e intercambio, E_{xc} , dependan no solo de la densidad (ρ) sino también del módulo del gradiente de la densidad $|\nabla\rho|$. Esto supone una aproximación semilocal.
- *Funcionales híbridos*: Son aquellos funcionales que incorporan parte de la energía de intercambio exacta de HF en la parte de intercambio. Corresponden a los funcionales más sofisticados y precisos, aunque su coste computacional es también mayor. Suelen usarse comúnmente para determinar la termoquímica y cinética de procesos reactivos.

En los estudios de esta Tesis se han usado funcionales de tipo GGA, los cuales son especialmente adecuados para los estudios de

determinación geométrica, estructura vibracional y adsorción en sistemas sólidos periódicos. Este tipo de funcionales mejora significativamente la descripción con respecto a los de tipo LDA y su coste computacional es muy inferior al de los híbridos. Dos de los funcionales más populares dentro de la categoría GGA son el Perdew-Wang 91 (PW91) (Perdew et al., 1996a) y el Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) (Perdew et al., 1996b), los cuales han sido diseñados para dar esencialmente los mismos resultados, sin embargo, el segundo es más robusto en sistemas con cambios rápidos en la densidad electrónica. Por tanto, PBE suele ser una mejor opción. Para energías de adsorción de moléculas en superficies, el PBE cuenta con una revisión, denominada PBE revisado (*revised* PBE, RPBE) (Hammer et al., 1999). Estos funcionales (PBE y RPBE) han sido los utilizados en los estudios de esta Tesis.

III.2. SISTEMAS DE ESTUDIO Y TÉCNICAS DE MODELIZACIÓN COMPUTACIONAL

En esta Tesis Doctoral, han sido de interés dos tipos de sistemas de estudio, moléculas aisladas (prazicuantel) y sólidos periódicos (cristales de prazicuantel y los filosilicatos de montmorillonita y sepiolita). En el primer caso, el número de átomos y la complejidad de su estudio son mucho más reducidos. Es por ello por lo que se puede llevar a cabo una caracterización más precisa de dichos sistemas. Además, existe una gran gama de métodos implementados en paquetes de cálculo que se pueden usar para el estudio de moléculas (tanto DFT como post-HF). En cuanto a los sólidos periódicos, estos se caracterizan por una celda unidad que se repite en las tres dimensiones espaciales. Centrándose en la celda unidad y usando las condiciones periódicas de contorno se consigue simular la interacción entre imágenes periódicas de la celda, obteniendo así el rigor y la precisión necesaria en la descripción de los sólidos (Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000). Los métodos más populares para el estudio de sólidos periódicos son los basados en mecánica molecular (con campos de fuerza) y DFT.

Para abordar los estudios con el prazicuantel, la montmorillonita y la sepiolita, y determinar las geometrías de equilibrio en la molécula y el cristal de prazicuantel y también en los sólidos inorgánicos, obtener los espectros IR y Raman y caracterizar los modos geométricos más probables de interacción entre fármaco y arcillas y su movilidad (estudios dinámicos), se ha recurrido a estrategias de cálculo que han permitido llevar a cabo de forma eficiente dichas determinaciones. Sus detalles se describen de forma breve a continuación:

- *Cálculos en sólidos periódicos* (Andrés y Beltrán, 2000): Para este tipo de modelización con métodos MM se suele usar aproximaciones que hagan uso de las propiedades periódicas de contorno. La celda unidad o real se replica periódicamente en las tres dimensiones generando imágenes. Las energías y fuerzas de los átomos reales se calculan teniendo en cuenta el resto de átomos de dicha celda y átomos de celdas vecinas que queden dentro de un radio definido (*cutoff*) y que son creados como imagen de aquellos presentes en la celda unidad. Las energías y las fuerzas entre los átomos imagen no se calculan ya que sus movimientos se obtienen como operaciones de simetría sobre los átomos reales, por ejemplo, traslaciones a lo largo de los ejes cúbicos. En algunos métodos mecano-cuánticos de sistemas cristalinos, se pueden introducir un conjunto de las denominadas ondas planas, que son funciones acopladas con la simetría traslacional del cristal con la finalidad de mejorar la descripción del sistema. En principio, el número de ondas planas requerido es infinito, aunque en la práctica, se usa un parámetro energético de corte o *cutoff* suficientemente grande o convergido de tal forma que las propiedades calculadas no dependan del número de funciones.

- *Determinación de geometrías de equilibrio y espectros IR y Raman*: Haciendo uso de la aproximación de Born-Oppenheimer (Born y Oppenheimer, 1927) y mediante el uso de las superficies de energía potencial es posible obtener de forma fácil información sobre las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedro

que caracterizan el equilibrio y determinar también sus propiedades vibracionales. Así, las geometrías de equilibrio se corresponden con mínimos de energía en las PES que pueden obtenerse calculando el gradiente y el Hessiano (primeras y segundas derivadas, respectivamente, de la energía con respecto a las coordenadas nucleares). En un mínimo, se cumple las condiciones de que el gradiente es nulo y el Hessiano es positivo. Estas dos condiciones se usan en los algoritmos de búsqueda de las estructuras de equilibrio. El Hessiano también sirve para obtener los espectros vibracionales IR y Raman ya que las frecuencias de vibración se corresponden con las segundas derivadas de la energía (Jensen, 1999; Andrés y Beltrán, 2000).

- *Determinación de propiedades de adsorción:* En el caso de complejos relativamente simples o como punto de partida, la energía y geometrías de adsorción entre un sustrato (fármaco) y el adsorbato (sólido inorgánico) se pueden abordar de forma manual, primero, optimizando por separado sustrato y adsorbato y luego optimizando el complejo tras situar el sustrato en distintas orientaciones relativas al adsorbato. La energía de interacción o de adsorción, E_{ad} , corresponde a la obtenida con la Ecuación III.17:

$$E_{ad} = E_{AS} - (E_A + E_S), \quad (\text{III.17})$$

donde E_{AS} , E_A y E_S son las energías del complejo, adsorbato y sustrato, respectivamente. En ciertas ocasiones, con la finalidad de obtener un resultado más representativo teniendo en cuenta el gran número de conformaciones posibles en el sistema sustrato-adsorbato, se puede hacer uso de métodos de Monte Carlo (Metropolis, 1953). Estos métodos exploran de forma aleatoria distintas conformaciones del sustrato y distintas orientaciones entre el sustrato y el adsorbato y seleccionan las más estables.

III.3. PAQUETES DE CÁLCULO DE MODELIZACIÓN

Teniendo en cuenta la naturaleza y la diversidad de estudios teóricos de interés en esta Tesis, el paquete de cálculo teórico Materials Studio (Accelrys, 2012) ha sido sin duda alguna una de las mejores opciones para realizar los cálculos. Este software cuenta con una interfaz gráfica relativamente simple y potente para la preparación de los sistemas a estudiar, una gran gama de métodos disponibles y diversos tipos de cálculos populares en estudios combinados teórico-experimentales en los cuales la herramienta de la química teórica permite un nivel interpretativo a nivel atómico de los resultados experimentales.

Dentro del Materials Studio, existen un conjunto de módulos con funciones específicas para distintos problemas teóricos. En el caso concreto de la presente Tesis, se ha hecho uso de los módulos listados a continuación junto con su descripción:

-*DMOL3* (Delley, 2000): Permite la modelización químico-cuántica de la estructura electrónica y la energética de moléculas orgánicas e inorgánicas, cristales moleculares, sólidos covalentes y metálicos y superficies, haciendo uso del DFT y conjuntos de base atómicos. Con *DMOL3*, se puede predecir las estructuras, las energías de reacción, las barreras de reacción, las propiedades termodinámicas y los espectros ópticos y vibratorios. Con este módulo se obtienen resultados precisos mediante el uso de un funcional correcto, manteniendo el coste computacional bastante bajo para un método cuántico.

-*CASTEP* (Clark et al., 2005): Es un conjunto de algoritmos para llevar a cabo cálculos químico-cuánticos, diseñado específicamente para ciencia de materiales en estado sólido, mejorando la descripción con respecto al programa anterior. Hace uso de la metodología DFT adaptada con ondas planas, lo cual permite explorar las propiedades geométricas y electrónicas de

cristales y superficies en materiales como semiconductores, cerámicas, metales, minerales y zeolitas.

-*FORCITE* (Accelrys, 2012): Es una colección de herramientas de mecánica molecular que permite el estudio de un amplio tipo de sistemas, desde moleculares a sólidos periódicos. Al ser un programa de MM, la energía se obtiene mediante un campo de fuerzas que ha sido desarrollado parametrizando sus constantes con datos experimentales y cálculos químico-cuánticos de alto nivel. Dispone de los campos de fuerzas COMPASS, Dreiding, Universal, cvff, y pcff. Además, se pueden incluir otros campos de fuerzas como el pcff_interface.

-*DISCOVER* (Accelrys, 2012): Al igual que el módulo previo, éste permite llevar a cabo cálculos de MM en moléculas y sólidos, haciendo uso de campos de fuerza similares e incluyendo el campo de fuerzas cvff_phyllosilicates (CVFFH) de gran relevancia para los estudios de esta Tesis.

-*CRYSTAL BUILDER* (Accelrys, 2012): Este módulo permite crear y construir cristales con las dimensiones que se elijan introduciendo condiciones periódicas de contorno, también reconstruir cristales creando superceldas, es decir, creando una caja de un material repetido periódicamente en dos o tres dimensiones espaciales, formando así un “super cristal artificial”. También permite redefinir la simetría de un cristal, por ejemplo, cambiarlo a un grupo espacial P1, así como eliminar la periodicidad de un cristal y cambiar los parámetros de red cristalina de un cristal.

-*REFLEX* (Accelrys, 2012): Es un módulo que permite simular y analizar datos de difracción de rayos X, de electrones y de neutrones, proporcionando todas las herramientas necesarias para extraer la máxima cantidad de información de patrones de

difracción de cristales orgánicos, inorgánicos, organometálicos y biológicos. Además, permite procesar datos de difracción de polvo experimentales, realizar simulaciones de difracción de polvo de sistemas cristalinos, buscar manual y automáticamente picos de un patrón experimental y realizar modificaciones en las estructuras cristalinas frente a los datos experimentales para minimizar la energía potencial inicial con la restricción de que se acerque a los datos experimentales.

-*ADSORPTION LOCATOR* (Accelrys, 2012): Este módulo identifica configuraciones de adsorción llevando a cabo búsquedas en el espacio configuracional del sistema sustrato-adsorbato con el método Monte Carlo (Metropolis et al., 1953) usando un esquema cíclico de aumento rápido y disminución lenta de la temperatura denominado templado simulado (*simulated annealing*) (Kirkpatrick et al., 1983; Cerný, 1985). A través de un proceso iterativo se generan nuevas conformaciones del sustrato y distintas orientaciones entre sustrato y adsorbato. Se calcula la energía de cada configuración aplicando un campo de fuerzas. Se selecciona la nueva geometría si su energía es menor a la anterior o en el caso contrario, sólo se descarta si su probabilidad es menor a un número aleatorio generado. Esta probabilidad depende de la diferencia entre la energía de una geometría y la de la geometría previa (ΔE) y también de la temperatura (T). A menor ΔE y mayor T , mayor probabilidad. Es por ello que a mayor T se permiten seleccionar geometrías menos estables y, por tanto, explorar distintas zonas, obteniendo distintos mínimos locales. De no ser así, se llegaría solo a uno de ellos.

A parte del Materials Studio, existen hoy en día un gran número de programas no tan generales, en los cuales se sacrifica la generalidad o la simplicidad de uso por una mejor eficiencia a la hora de modelizar un tipo de sistemas en concreto o a la hora de usar un tipo de metodología. En esta Tesis, se ha hecho uso también del programa iniciativa española

para las simulaciones electrónicas con miles de átomos (*Spanish Initiative for Electronic Simulations with Thousands of Atoms*, SIESTA) (Soler et al., 2002) basado en DFT con orbitales atómicos numéricos aplicando condiciones periódicas de contorno, para calcular la energía y optimizar la geometría, aprovechando su mayor velocidad de cálculo. Con este programa también se pueden calcular frecuencias de los modos normales de vibración de forma numérica. Para ello, el programa realiza una serie de desplazamientos finitos de cada átomo del sistema en ambos sentidos de cada una de las direcciones cartesianas, se recopilan las energías y con ellas se obtiene la matriz de las fuerzas o primeras derivadas de la energía y el Hessiano o segundas derivadas de la energía. Con estas últimas y utilizando el programa VIBRA, incluido en el paquete de SIESTA, se determinan las frecuencias y con ello el espectro IR de un cristal.

CAPÍTULO IV

Resultados

Los estudios realizados en esta Tesis se recogen en las siguientes secciones a modo de compilación de artículos. En cada sección se presenta en primer lugar un resumen del estudio llevado a cabo y a continuación se presenta el artículo.

IV.1. ESTRUCTURA MOLECULAR Y CRISTALINA DEL PRAZICUANTEL. PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS Y POLIMORFISMO

En este trabajo se han cumplido los objetivos 1, 2 y 3 de la Tesis y los resultados obtenidos han dado lugar a la siguiente publicación:

Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism

A. Borrego-Sánchez, C. Viseras, C. Aguzzi, C.I. Sainz-Díaz

Eur. J. Pharm. Sci. **2016**, 92, 266-275.

Dada la importancia del conocimiento de las propiedades espectroscópicas y otras propiedades físico-químicas del prazicuantel para mejorar sus aplicaciones, en este trabajo, el objetivo fue poner a punto la metodología teórica y los parámetros computacionales que permitieran estudiar dicho fármaco en un grado de profundidad que no se había estudiado hasta el momento. Se determinaron la estructura molecular y las distintas estructuras cristalinas del prazicuantel, así como sus propiedades espectroscópicas mediante cálculos basados en métodos de mecánica clásica y en métodos de mecánica cuántica usando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Los resultados reprodujeron las propiedades cristalográficas y espectroscópicas experimentales.

En primer lugar, se optimizó una molécula aislada de prazicuantel extraída de una estructura cristalina del enantiómero R con mecánica clásica usando distintos campos de fuerza (COMPASS, Universal, CVFFH) y con el método cuántico DFT (empleando el programa DMOL3 y el funcional RPBE). La opción que mejor reprodujo la estructura molecular del prazicuantel es con COMPASS aplicando cargas atómicas calculadas previamente por DFT, aunque los cálculos CVFFH y DFT dieron resultados similares. El análisis conformacional de tres ángulos de rotación de la molécula de prazicuantel también fue estudiado. Uno de los análisis de rotación está relacionado con la orientación relativa de los grupos carbonilo entre sí, siendo las conformaciones de mínima energía, los conformeros *syn* (donde ambos grupos carbonilo están en el mismo lado de la molécula) y *anti* (donde dichos grupos están en lados opuestos de la molécula).

De estudios cristalográficos previos de la base de datos Cambridge Structural Database (CSD), se extrajeron las estructuras cristalinas del prazicuantel racémico (RS) y del enantiómero S y las dos estructuras del enantiómero R obtenidas a dos temperaturas, 298 K y 130 K. Todas estas estructuras fueron optimizadas comparando sus parámetros de red cristalina y sus distancias de enlaces con diferentes metodologías (con los programas Discover y Forcite y los campos de fuerzas COMPASS, CVFFH, y Universal con el modelo SPC del agua, y con el programa

mecano-cuántico DMOL3 y el método DFT con el funcional RPBE). En primer lugar, se optimizó el enantiómero R del prazicuantel y los resultados mostraron que los campos de fuerzas COMPASS y CVFFH con el programa Discover son los que mejor reproducen esta estructura cristalina. Por esta razón, usando el campo de fuerza COMPASS y el programa Discover se optimizó el cristal del enantiómero S del prazicuantel, comparando los resultados de los parámetros de red y las distancias de enlace con los del enantiómero R. Los resultados indican que los parámetros de red cristalina de ambos enantiómeros son los mismos. En segundo lugar, se optimizó el cristal racémico de prazicuantel y se observó que la celda unidad de este cristal está constituida por ocho moléculas del conformero *syn* del prazicuantel. Por otra parte, los cristales de los enantiómeros puros son hemihidratos y su celda unidad está constituida por 4 moléculas del conformero *anti* con dos moléculas de agua de cristalización. El conformero *syn* se extrajo del cristal racémico y se optimizó en vacío con el campo de fuerzas COMPASS, manteniéndose su estructura en la misma conformación. El conformero *syn* es algo menos estable que el *anti*. El momento dipolar de cada conformero también fue calculado y se encontró que el conformero *syn* es mucho más polar que el *anti*, lo que significa que el conformero *syn* puede ser más estable en medios polares y llegar incluso a ser el conformero predominante. Por tanto, se planteó como hipótesis el hecho de que en un medio fisiológico acuoso, el conformero *syn* pudiese ser el que interactuase con el receptor. Probablemente, la orientación de ambos grupos carbonilo al mismo lado facilitaría la coordinación con cationes Ca^{2+} o la aparición de interacciones por puentes de hidrógeno con cualquier aminoácido del centro activo del receptor que está relacionado con los canales de calcio de las membranas.

Por otra parte, los parámetros de red cristalina y las distancias de enlace del cristal RS de prazicuantel fueron optimizadas con COMPASS. Se observó que las interacciones intermoleculares de los cristales de hemihidrato son diferentes a las del cristal racémico. Los grupos carbonilo y el anillo aromático son responsables del empaquetamiento molecular en las formas cristalinas. Además, la energía de cohesión del cristal RS y R del prazicuantel fueron optimizadas con COMPASS y los resultados

mostraron que ambas energías de cohesión son negativas, por lo que la formación de los cristales es favorable. El espectro de infrarrojo de los conformeros *anti* y *syn* de la molécula de praziquantel fue calculado con COMPASS y con DFT y el funcional RPBE y fueron comparados con datos experimentales. Ambos métodos produjeron buenas frecuencias para los principales modos de vibración de infrarrojo. Las frecuencias de vibración de la molécula de praziquantel de algunas bandas, tales como las de los grupos carbonilo, pudieron ser asignadas por primera vez, lo cual es de gran importancia puesto que experimentalmente no se habían podido asignar hasta la fecha.

**MOLECULAR AND CRYSTAL STRUCTURE OF
PRAZIQUANTEL. SPECTROSCOPIC PROPERTIES AND
CRYSTAL POLYMORPHISM.**

Ana Borrego-Sánchez^{1,2}, César Viseras², Carola Aguzzi², C. Ignacio Sainz-Díaz^{1*}

¹ Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

² Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

ABSTRACT

Schistosomiasis is a parasitic disease widely extended worldwide, mainly in the tropics and subtropics. Its pharmacological treatment is approached with praziquantel (PZQ), chemically named (RS)-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazin-[2,1a]-isoquinolin-4-one. The PZQ commercial preparation is actually a racemic mixture, in which only the levo-enantiomer possesses antihelmintic activity. The knowledge of its spectroscopic and other chemical-physical properties is important to improve its applications. Therefore, the molecular and crystal structure of praziquantel have been investigated by means of calculations with classical mechanics and quantum mechanics methods based on Density Functional Theory (DFT), reproducing the experimental crystallographic and spectroscopic properties. Several crystal lattices of PZQ have been studied. Most of the intramolecular and intermolecular interactions of PZQ molecules in the crystal structure have been discussed. The vibration frequencies of the PZQ molecule were calculated with different molecular simulations and the assignments of some bands have been confirmed, such as, those of carbonyl groups.

Keywords: Praziquantel, DFT calculations, IR spectroscopy, Schistosomiasis, Molecular Modeling

INTRODUCTION

Praziquantel is the drug of choice for schistosomiasis. It is highly effective against all species of *Schistosomas* and against cestodes. It is usually administered in a single oral dose, which not only facilitates compliance but also has few side effects at short and long term. For its effectiveness, safety and cost-effectiveness features, the World Health Organization considers the praziquantel to be an essential drug (Passerini et al., 2006; WHO, 2015).

Schistosomiasis remains one of the most prevalent parasitic infections in the world caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, which currently affects 250 million people worldwide out of a total of 783 million at risk (in 74 developing countries) (Trastullo et al., 2015) with about a half million deaths per year, mainly in the tropic and subtropical zones (Chitsulo et al., 2000; Rodrigues et al. 2010; Steinmann et al., 2006). There are two clinical forms of schistosomiasis, intestinal (caused by *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*) and urogenital (caused by *Schistosoma haematobium*). The adult worms of *S. mansoni* and *S. japonicum* reside in the mesenteric veins and *S. haematobium* in the host veins bladder plexus, place where fertilization occurs after male and female coupling, and subsequent eggs deposition. In particular, the *S. mansoni* extends almost all of Africa and South America; *S. haematobium* in Africa and the Middle East and *S. japonicum* in China, the Philippines and some islands of Southeast Asia. Schistosomiasis is acquired by contact with fresh water contaminated with larvae of the parasite, called cercariae, released by different species of molluscs (intermediate hosts), which can penetrate into the individual skin (Sirewalt and Hackney, 1956). Pharmacology treatment mainly deals with the use of praziquantel for both intestinal and urinary way. Schistosomiasis prevention is problematic, since there is no vaccine, although its research is currently underway. The only possibility is chemotherapy treatment, for which there are three drugs, oxamniquine,

albendazole and praziquantel. PZQ is active against all species of the parasite (Cioli et al., 1995), it has a high efficiency, low toxicity and is easy oral administration. This coupled with its versatility and low cost production makes it the chosen, as the drug of choice (Doenhoff et al., 2000). It is also effective against other parasitic infections, such as, flukes and tapeworms that infect pets. Hence it is considered an anthelmintic of broad spectrum. Its main disadvantage is its ineffectiveness against juvenile forms of the parasite (Cioli and Pica-Mattocchia, 2003). It is considered that the result of using a single drug for treating a widespread disease, might lead to such a dangerous situation as drug resistance.

Praziquantel was discovered at the beginning of the 1970s, when Bayer A.G. and E. Merck found that the group pyrazinoisoquinoline were effective anthelmintics (Groll, 1984; Andrews et al., 1983; Davis, 1982). In the PZQ molecule, chemically named (RS)-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazin[2,1a]-isoquinolin-4-one (EP, 2011; USP, 2013), the oxo group in position 4 is essential for drug activity and that any modification of the skeleton ring suppresses activity. Furthermore, PZQ has a chiral center at the position 11b. The commercial preparation is actually a racemic mixture composed of equal parts "levo" isomer R (-), and "dextro" S (+), in which only the levo-enantiomer possesses molluscicide activity (Pax et al., 1978). Therefore, the PZQ antihelmintic activity is associated mainly with R-(-)-enantiomer (Andrews, 1985).

The PZQ action mechanism is not exactly known, although most of the evidence points to an alteration of calcium homeostasis (Greenberg, 2005; Doenhoff et al., 2008). PZQ can act on various stages of development Schistosomes and can affect adult parasites, miracidia and cercariae, but has little or no effect on the eggs, sporocysts or schistosomula.

PZQ is hydrophobic and has low aqueous solubility. However, it is well absorbed through the gastrointestinal tract (Andrews, 1985). Oral doses are required to overcome high first pass liver metabolism and get appropriate target tissues concentrations (Leopold et al., 1978). With regard to their biopharmaceutical properties, PZQ is classified in Class II in

Biopharmaceutics Classification System (BCS) (Lindenberg et al., 2004; González-Esquivel et al., 2005). This means that it has very low water solubility and high permeability. Furthermore, PZQ shows drug resistance. At present there are numerous reports of *Schistosoma* strains with decreased drug sensibility. Due to its problematic, the PZQ continues being an object of study. However, surprisingly only a few works (Ahamed et al. 2012; Rodrigues et al. 2010) have been found related with the study of the molecular structure and intermolecular interactions in the crystal lattice, and spectroscopic properties of this drug. On the other hand, the racemate (RS)-PZQ crystallizes in an anhydrous crystal form that is different to that of the enantiomer (R) or (S)-PZQ, which are hemihydrates. Then, the racemate is a different crystal polymorph to the pure enantiomer PZQ. Previous works have tried to find new polymorphs of PZQ but always they obtained the same crystal forms (Toro et al. 2014). Therefore, one of the aims of this work is to find a computational methodology, which describes properly the molecular structure, and crystal lattices of PZQ and to identify normal vibration modes of the IR spectrum of PZQ.

COMPUTATIONAL METHODOLOGY

Calculations based on the Density Functional Theory (DFT) were performed by means of the DMOL3 program (Delley, 2000) using the generalized gradient approximation (GGA), and the revised Perdew–Burke–Ernzerhof functional (RPBE) for the exchange–correlation potential (Hammer et al., 1999). Tridimensional periodical boundary conditions can be applied in this code, which uses molecular orbitals as a linear combination of atomic orbitals (LCAO), employing double zeta extended base functions including polarization functions (DNP) (Delley, 1990). Pseudopotentials with semi-core correction (DSPP) were used (Delley, 2002) in order to describe the interactions between electrons of the inner shells of atoms and valence electrons. The convergence threshold in the self-consistent cycle (SCF) of the energy calculation was 10^{-6} . The calculation of frequency was based on the harmonic approximation using finite displacements of every atom. The harmonic vibrational frequencies were calculated by diagonalization of the Hessian matrix of the second

derivative of the energy with respect to geometric changes generated by finite atomic displacements. This approach was previously used in other crystalline systems with good results (Escamilla-Roa and Sainz-Díaz, 2014).

On the other hand, since quantum mechanical methods described above may be difficult to explain the weak dispersion interactions in some cases, modeling using empirical interatomic potentials was also used for comparison. This approach is based on classical mechanics considering atoms as spheres with charges and interatomic potentials dependent of the distance between atoms. These potentials are characterized by a number of parameters that have been preset with empirical observables constituting force fields. Several force fields (FF) were used, such as COMPASS (Sun, 1998), Universal (Rappe and Goddard, 1991) and the recently optimized CVFFH, based on the consistent valence force field (CVFF) (Heinz et al., 2006), that has provided good results in previous studies (Martos-Villa et al., 2013). To carry out these FF calculations, the Discover and Forcite programs were used within Materials Studio package (Accelrys, 2012). Different conditions were tested for calculating Van der Waals and Coulomb interactions. Atom based interactions with a cut-off of 18.5 Å was used for Universal and COMPASS FFs. With the CVFFH FF, the Ewald method with a cut-off of 15.5 Å yielded better convergence in the calculations according to previous works (Sainz-Díaz et al. 2011). Therefore, these conditions have been defined to undertake this work. On the other hand, the vibration frequencies were calculated following the same harmonic approximation used in the DFT calculations by means of finite displacements of every atom, where the energies are calculated with the FF.

In preliminary calculations various methods of atomic charges assignments were explored within the COMPASS FF: the COMPASS charges included in its own FF, and those calculated by the QEQ Method (charge equilibration) (Rappe and Goddard, 1991; Rick et al., 1995). The use of atomic charges of the own COMPASS FF yielded the closest values of lattice parameters to the experimental data. On the other hand, for

CVFFH two water models were explored: SPC one (charges values of 0.41 and -0.82 for H and O atoms, respectively), and TIP4P model (charges of 0.417 and -0.834 for H and O atoms, respectively) (Rick et al., 1995; Berendsen et al., 1987). Net atomic charges associated to the electrostatic potential (ESP charges) (Besler et al. 1990) were calculated at quantum mechanical level using DMOL3 and they were applied to the COMPASS and CVFFH calculations.

The work was carried out using a modeling and simulation of materials software, Materials Studio 6.0 (Accelrys Inc., 2012) as well as graphical interface to calculate, analyze and study the crystal and molecular structures.

RESULTS AND DISCUSSION

Praziquantel molecular structure

The crystal structure of (RS)-PZQ showed a certain disorder in the atomic positions, then the PZQ molecule was extracted from the experimental crystallographic data of the hemihydrate of (R)-PZQ crystal (Meyer et al., 2009) where no disorder was found in atomic positions. This molecule was fully optimized alone, in gas phase, with different theoretical methods (Fig. 1) comparing the calculated geometry with the only available experimental data that is in solid state (Table 1). Assuming that this calculated molecular structure is for an isolated molecule as in gas phase, the comparison with experimental values from a solid state can be considered valid for comparing the different calculation methods used in this work.

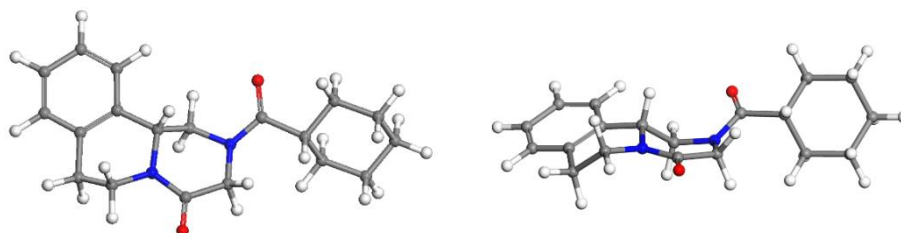


Figure 1. PZQ molecular structure optimized with COMPASS FF in two possible orientations. The atoms of carbon, hydrogen, nitrogen and oxygen are described in gray, white, blue and red, respectively.

Table 1. Main geometrical features (bond lengths in Å and angles in °) of experimental and calculated molecular structure of PZQ. Cy = cyclohexyl.

| Features | Exp. ^d | DC ^a | CVFFH ^b | FU ^c | DMOL3 |
|---|------------------------------------|----------------------|--------------------|-----------------|---------|
| $d(\text{C}=\text{O})$ | 1.229-1.226, 1.288 ^e | 1.218 (1.221) | 1.235 | 1.220 | 1.239 |
| $d(\text{C}-\text{O})$ | 1.219-1.223 | 1.223 (1.221) | 1.233 | 1.219 | 1.239 |
| $d(\text{OC}-\text{N})$ | 1.342-1.350 | 1.355 (1.349) | 1.365 | 1.383 | 1.378 |
| $d[\text{OC}(\text{Cy})-\text{N}]$ | 1.342-1.360 | 1.357 (1.361) | 1.377 | 1.387 | 1.396 |
| $d[\text{H}_2\text{C}(\text{CO})-\text{N}]$ | 1.450-1.455 | 1.474 (1.458) | 1.505 | 1.479 | 1.462 |
| $d(\text{HC}-\text{N})$ | 1.462-1.469 | 1.466 (1.459) | 1.512 | 1.481 | 1.482 |
| $\theta_1 [\text{H}_2\text{C}-\text{C}(\text{H})-\text{C}=\text{O}]$ | 28, 261-270 | 14, 255 (19, 260) | 41, 275 | 14, 252 | 29, 266 |
| $\theta_2 [\text{H}_2\text{C}(\text{CO})-\text{N}-\text{C}=\text{O}]$ | 181-189 | 205 (198) | 176 | 184 | 177 |

^a Calculated with COMPASS FF in Discover, the same values using the Forcite code with the same FF; values in brackets were calculated with quantum-mechanical ESP charges. ^b Calculated with CVFFH FF in Discover. ^c Calculated with Universal FF in Forcite. ^d Obtained from the experimental crystal structure of (RS)-PZQ (Espinosa-Lara et al., 2012). ^e From the experimental crystal structure of (R)-PZQ hemihydrate (Meyer et al., 2009).

In general, the calculated C=O bond distances are close to those from experimental data. In the hemihydrate crystal structure, the C=O bond attached to the cyclohexyl group is much longer than those calculated. In this crystal structure, this carbonyl group interacts with a water molecule

by hydrogen bonds enlarging the C=O bond. In the OC-N bond, in both cases, $d(\text{OC}(\text{Cy})\text{-N})$ and $d(\text{OC-N})$, the calculated distances are larger than the experimental, being the closest those calculated with COMPASS. The same occurs with the bond H₂C-N of the CH₂ joined to the carbonyl and with the HC-N bond, the experimental values are close to those calculated with COMPASS. The OC-N and OC(Cy)-N bonds are shorter than the HC-N and H₂C(CO)-N bonds, due to the resonant delocalization of π electrons between N atom and carbonyl group.

Net atomic charges based on the Mulliken approximation and also atomic charges fitted to the electrostatic potential (ESP charges) were calculated (Besler et al. 1990) (see Tables S1 y S2 in Supplementary Information). The O atoms of the carbonyl groups have the most negative charges of the molecule and most of the intermolecular interactions will be produced through these atoms, especially in crystal structures and its biological activity. However, some differences between Mulliken and ESP charges are observed. In general the ESP charges are higher than the ESP ones in H atoms according to previous works (Gross et al. 2002). The O atoms show similar Mulliken charges, whereas in the ESP charges the O atom of the heterocyclic part has a more negative charge than the other one. The N atoms show similar Mulliken charges, whereas the N atom joined to the carbonyl close to cyclohexyl ring shows a positive ESP charge and the other N atom shows a negative ESP charge. This difference is related with that in C8 that has a negative ESP charge whereas it has a low Mulliken charge. The positive ESP charge of N1 and the negative ESP charge in C8 indicate a participation of the electron lone pair of N1 into the N1-C8 bond assisted by the carbonyl O2 group.

Using atomic ESP charges from DMOL3 calculations within the COMPASS FF, the geometric features were slightly closer to experiment than those with the intrinsic charges of COMPASS FF. Therefore, these results conclude that the COMPASS FF combined with ESP atomic charges yields the closest values of the main geometric features, bond lengths and angles, of the PZQ molecule to the experimental one in solid

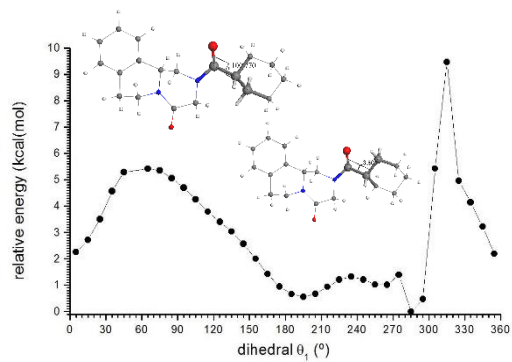
state. Similar behavior with the ESP charges was found previously (Martos-Villa et al. 2013).

Conformational analysis

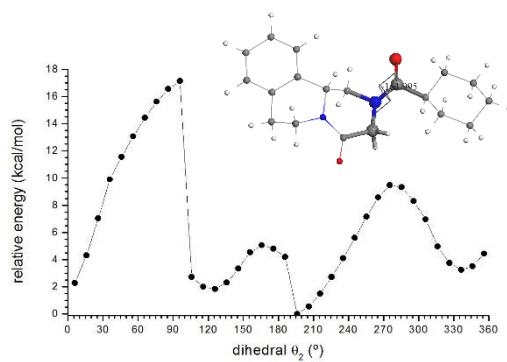
In above results, some differences between calculated and experimental values in torsional angles are observed. These torsion angles can be also affected by the intermolecular interactions within the crystal structure. Molecular Dynamics simulations were performed for this isolated molecule at the NVT (298K, steps of 1 fs for 5 ps) and NVE ensembles and no significant changes of the main dihedral angles by the rotation of bonds related with the exo-heterocyclic carbonyl group and cyclohexyl moiety was observed. Hence, a conformational analysis of these main dihedral angles should be explored. Then, the rotation of three dihedral angles has been studied independently with steps of 10° with the COMPASS FF. These angles control the spatial disposition of the cyclohexyl moiety with respect to the amido group and the relative disposition of the carbonyl group with respect to the heterocyclic part.

The rotation of the $\theta_1[\text{H}_2\text{C}-\text{C}(\text{H})-\text{C}=\text{O}]$ dihedral angle, which control de rotation of the cyclohexyl moiety with respect to the exo-heterocyclic carbonyl group, uses the C(H)-C(O) bond as a rotor and shows a conformer of minimal energy for $\theta_1 = 285^\circ$ within a zone of conformations between $\theta_1 = 170-295^\circ$ where the energy differences are less than 1.5 kcal/mol (Fig. 2a). This range is consistent with values found in experimental crystal structures $261-270^\circ$ depending on the intermolecular structures described later. The global minimum conformer of Table 1 has a θ_1 value close to this range. A second conformer with an energy 2 kcal/mol higher than the minimum was localized at $\theta_1 = \pm 5^\circ$ that corresponds to the angle formed by the equivalent CH_2 group of the cyclohexyl moiety, where $\theta_1 = 14.3^\circ$ in the global minimum calculated above. In these conformers, the cyclohexyl ring is twisted with respect to the aromatic ring forming an angle of $45 - 80^\circ$ the planes of both rings, avoiding repulsion interactions of the H atoms with the H atoms of the heterocycle. The rotation of the $\theta_2[\text{H}_2\text{C}(\text{CO})-\text{N}-\text{C}=\text{O}]$ dihedral angle uses the C(O)-N bond as a rotor that

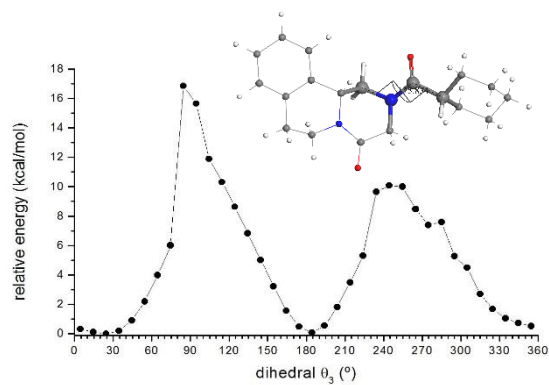
describes the rotation of the exo-heterocyclic carbonyl group with respect to the heterocyclic ring with reference to the relative disposition with the heterocyclic carbonyl group. The analysis of this rotation shows a conformer of minimum energy for $\theta_2 = 195\text{-}205^\circ$ being close to the value of this dihedral angle in the global minimum of Table 1. This conformer maintains the minimal repulsion between the electron orbital of carbonyl O atom and the electron lone pair of the N atom and both carbonyl groups are oriented to opposite parts of the molecule naming as the conformer *anti*. Other conformers were obtained for $\theta_2 = 115\text{-}130^\circ$ and $325\text{-}355^\circ$. This last conformer, named *syn*, has both carbonyl groups oriented to the same part of the molecule. This conformer is present in the racemic (RS) crystal structure. The rotation of the $\theta_3[\text{H}_2\text{C}(\text{CH})\text{-N-C(O)-CH}(\text{Cy})]$ dihedral angle is correlated with the previous one using the same C(O)-N bond as a rotor that describes the rotation of the C(O)-cyclohexyl moiety with respect to the CH₂ group joined to the chiral carbon. The analysis of this rotation shows two clear conformers with minimum energy are observed at $\theta_3 = 0\text{-}35^\circ$ and $175\text{-}195^\circ$, which correspond to the above *syn* and *anti* relative dispositions of the carbonyl groups and observed experimentally in the (RS)-PZQ and (R)-PZQ crystal structures, respectively. In both conformers, these C atoms, CH of cyclohexyl moiety and CH₂ joined to the chiral center, are coplanars maintaining the minimal repulsion between the H atoms of CH₂ groups.



a



b



c

Figure 2.- Energy profile (in kcal/mol) of the rotation of the θ_1 [H₂C-C(H)-C=O] (a), θ_2 [H₂C(CO)-N-C=O] (b), and θ_3 [H₂C(CH)-N-C(O)-CH(Cy)] (c) dihedral angles calculated with COMPASS FF.

*Praziquantel crystalline structure**Enantiomer*

PZQ is used mainly as a crystalline solid, hence a more realistic study is to calculate the PZQ in one of its crystal forms. Besides, the above former results of the calculated geometry of the isolated PZQ molecule only could be compared with experimental values of molecules within PZQ crystal structures. However, these molecules do not maintain the same geometry in all crystal lattices and change depending on the intermolecular interactions in each crystal structure. The experimental information obtained after a search in Cambridge Structural Database (CSD) (Allen, 2002) shows several crystal forms. One of them corresponds to the anhydrous racemic mixture (TELCEU) (Espinosa-Lara et al., 2013), another one to the isomer S hemihydrate (SIGBUG) (Liu et al., 2006), other to the isomer R hemihydrate (SIGBUG01) (Meyer et al., 2009) and the last one to the isomer R hemihydrate measured at low temperature (LIVFED) (Cedillo-Cruz et al., 2014). Additional income contains PZQ structural information of co-crystals and chemically replaced derivatives (Espinosa-Lara et al., 2013).

The structure of the racemic crystal showed a certain disorder in atomic positions, see later. On the contrary, the atomic positions of the crystal structure of the hemihydrate of the enantiomer R of PZQ (SIGBUG01) are well defined. Then, this last structure was used for testing several computational methods. This crystal structure was measured at 298K and other crystal structure of the same hemihydrate measured at 130K was reported recently (Cedillo-Cruz et al. 2014). Both crystal structures are similar with slight differences in the cell parameters and different orientation and atomic positions. Both crystal lattices are in C2 space group and models with the unit cell in the P1 symmetry were generated for both. This unit cell has 194 atoms, 4 praziquantel molecules and 2 water molecules (Fig. 3).

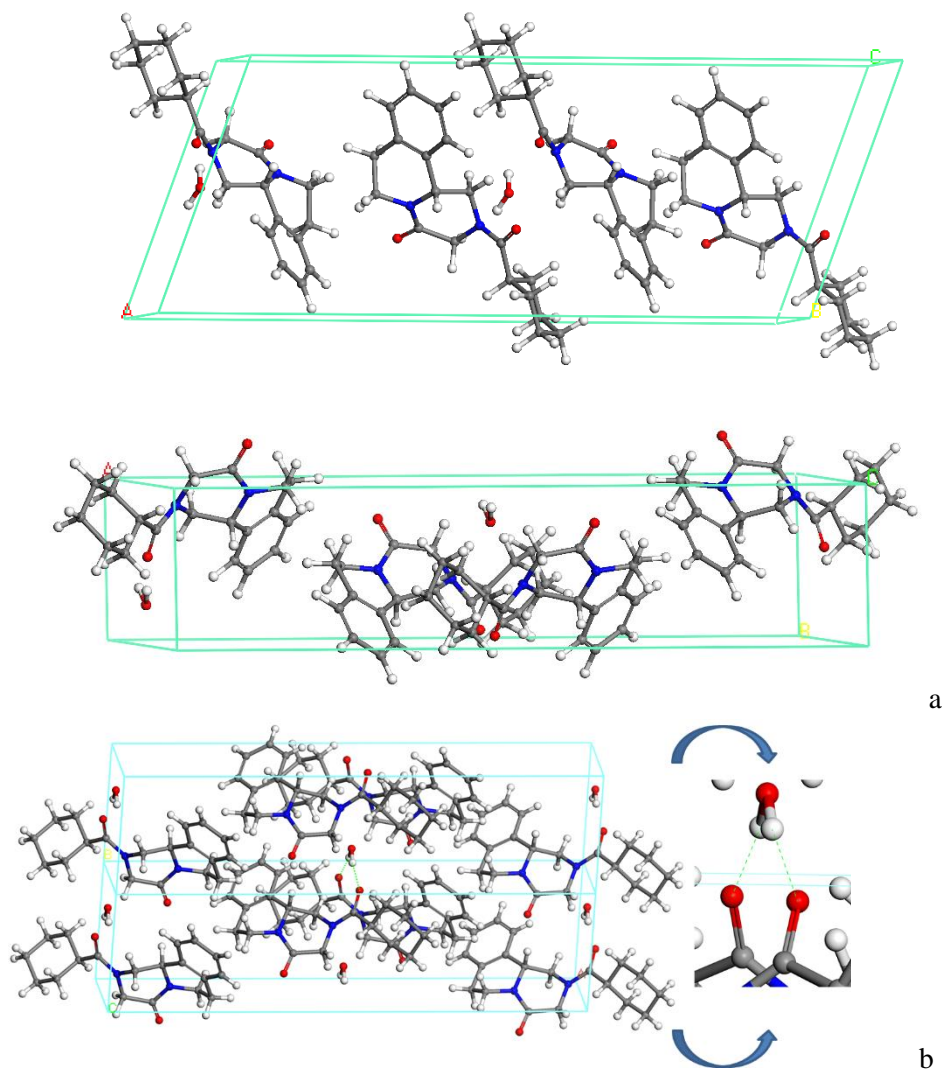


Figure 3a. A crystal structure of the hemihydrate of (R)-PZQ (SIGBUG01), views from the (010) and (001) planes. The atoms of carbon, hydrogen, nitrogen and oxygen are described by gray, white, blue and red color, respectively. **b.** Supercell 1x2x1 of the hemihydrate of (R)-PZQ crystal sight in perspective from the plane (001) highlighting the intermolecular interactions with water molecule (right side).

All atomic positions were optimized with different methods considering a constant volume and later the crystal lattice was also optimized along with all atom positions at variable volume. The crystal lattice parameters of the optimized structures were compared with experimental data (Table 2). The COMPASS and CVFFH FFs with Discover yielded crystal lattice parameters close to experimental data. Both are closer to the data obtained at 130K that were slightly smaller than that obtained at 298K, as it was expected since the calculations were made at 0K. The Universal FF did not yield good results. The optimization at variable cell in Forcite with COMPASS FF yielded worse results than in Discover. Hence the best computational method was Discover with both FFs, COMPASS and CVFFH.

The optimization of the crystal structure obtained at 298K (SIGBUG01) (Meyer et al., 2009) yielded the same lattice cell as that obtained at 130K (LIVFED) (Cedillo-Cruz et al., 2014).

Table 2. Values of crystal lattice parameters of the hemihydrate of (R)-PZQ, fully optimized with variable volume with different theoretical methods and compared with the experimental lattice (distances in Å and angles in °).

| Lattice parameters | Exp | DCCV ^a | VHCV ^b | VHsCV ^c | FCCV ^d | FUCV ^e |
|--------------------|--|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| <i>a</i> | 27.05 ^f , 26.30 ^g | 26.63 | 26.30 | 26.24 | 27.52 | 28.09 |
| <i>b</i> | 6.02 ^f , 6.01 ^g | 6.17 | 6.21 | 6.19 | 6.04 | 6.04 |
| <i>c</i> | 11.36 ^f , 11.14 ^g | 10.98 | 10.98 | 11.02 | 10.86 | 10.77 |
| β | 112.5 ^f , 111.1 ^g | 110.3 | 109.2 | 109.2 | 114.4 | 114.0 |

^a Calculated with the COMPASS FF in Discover. ^b Calculated with CVFFH with their own charges for water atoms in Discover. ^c Calculated with CVFFH with the SPC water model Discover. The same result was obtained with the TIP4P water model in same conditions. ^d Calculated with COMPASS FF in the Forcite code. ^e With the Universal FF in the Forcite code. ^f Experimental crystal structure at 298K (Meyer et al., 2009). ^g Experimental data at 130K (Cedillo-Cruz et al., 2014).

The same relative disposition of PZQ molecules was observed in experimental and calculated crystal lattice structures. The PZQ molecules are packing in a tail-head facing orientation, where the cyclohexyl ring is facing to the aromatic ring of the vicinal molecule with electrostatic interactions between some H atoms of cyclohexyl and the π electron cloud of the aromatic ring. On the other side of the molecule, one water molecule joins two PZQ molecules by means of the carbonyl groups with bridging H bonds (Fig. 3). The main geometrical features of the molecules in the calculated crystal show (Table 3) the same differences observed above in the isolated PZQ molecule (Table 1). No significant differences were observed between the different models of water, due to the low proportion of water in these crystals. The use of COMPASS FF within Discover yielded the closest geometry to the experimental data, though the values calculated with the DMOL3 method showed also a good agreement with experiment. The bonds $\text{H}_2\text{C}(\text{CO})\text{-N}$, OC-N and HC-N are lightly longer than the experimental. The experimental $d(\text{OH})$ bond length did not fit with the calculated ones, because the experimental values come from an estimated placement of H atoms during the refinement of the crystal structure from the electron density obtained by X-ray diffraction and this bond can be overestimated in one from Meyer et al. (2009) and underestimated in the other from Cedillo-Cruz et al. (2014). No significant differences in the bond lengths and angles of PZQ molecules in the crystal structure were observed between the structures optimized at fixed or at variable volume, except in the intermolecular interactions (Tables 3 and 4). The cyclohexyl ring is twisted 45° with respect to the aromatic ring according with experimental structure where the twisting angle is 70° . In the heterocycle joined to the aromatic ring, the CH_2 group joined to N atom is shifted upwards from the aromatic plane. This makes that the other heterocycle is shifted downwards with respect to the aromatic plane. In all PZQ molecules of these hemihydrate crystal structures, the carbonyl groups are oriented in opposite directions.

It is remarkable the large difference in the bond length of the carbonyl group joined to the cyclohexyl moiety. This could be explained by the H bond interaction with water molecule. However this interaction

exists also in the crystal studied at 130K and the bond length is significantly shorter and closer to our calculations. Hence, the crystal structure analyzed at 298K overestimated the C=O bond length.

Table 3. Main geometrical features (Å) of the crystal structure of hemihydrate of (R)-PZQ optimized at fixed volume with different computational methods and experimental data.

| Features | Exp | DCCF ^a | VHCF ^b | VHsCF ^c | FCCF ^d | FUCF ^e | DMOL3 |
|---|--|-------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| d(CyC=O) | 1.288 ^f , 1.233 ^g | 1.220 | 1.235 | 1.236 | 1.227 | 1.224 | 1.251 |
| d(C=O) | 1.220 ^f , 1.227 ^g | 1.226 | 1.230 | 1.231 | 1.205 | 1.207 | 1.245 |
| d(OC-N) | 1.351 ^f , 1.346 ^g | 1.355 | 1.362 | 1.364 | 1.366 | 1.367 | 1.364 |
| d(OC(Cy)-N) | 1.350 ^f , 1.357 ^g | 1.350 | 1.371 | 1.369 | 1.365 | 1.379 | 1.370 |
| d(H ₂ C(CO)-N) | 1.455 ^f , 1.453 ^g | 1.470 | 1.497 | 1.499 | 1.456 | 1.481 | 1.465 |
| d(HC-N) | 1.462 ^f , 1.469 ^g | 1.472 | 1.513 | 1.516 | 1.476 | 1.476 | 1.480 |
| d(OH...OC) | 1.715 ^f , 1.836 ^g | 1.704 | 2.605 | 1.688 (1.737) | 1.917 | 2.185 | 1.817 |
| d(HO...OC) | 2.749 ^f , 2.653 ^g | 2.662 | 3.312 | 2.698 (2.703) | 2.872 | 3.011 | 2.796 |
| d(O-H) | 1.065 ^f , 0.850 ^g | 0.968 | 0.958 | 1.012 (0.968) | 0.979 | 0.984 | 0.980 |
| θ ₁ (H ₂ C-C(H)- C=O) | 28, 261- 266 | 18.8, 259.2 | 32, 265.6 | 30, 263.7 (30, 263.6) | 13.9, 253.9 | 14.7, 252 | 27.7, 265 |
| θ ₂ (H ₂ C(CO)- N-C=O) | 181-187 | 195 | 169.8 | 174.8 (174.8) | 213 | 200.7 | 182.3 |

^a Calculated with Discover and COMPASS FF with fixed volume. ^b Calculated with Discover and CVFFH at fixed volume. ^c Calculated with Discover and CVFFH with SPC water model at fixed volume. The same result was obtained with the TIP4P water model in the same conditions, except in the values described in brackets. ^d Calculated with Forcite and COMPASS FF at fixed volume. ^e Calculated with Forcite and Universal FF at fixed volume. ^f Experimental crystal structure at 298K (Meyer et al., 2009). ^g Experimental data at 130 K (Cedillo-Cruz et al., 2014).

Table 4. Main geometrical features (Å) of the crystal structure of the hemihydrate of (R)-PZQ optimized at variable volume with different computational methods.

| Features | DCCV ^a | VHCV ^b | VHsCV ^c | FCCV ^d | FUCV ^e |
|---|-------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| d(CyC=O) | 1.220 | 1.235 | 1.236 | 1.224 | 1.212 |
| d(C=O) | 1.226 | 1.231 | 1.231 | 1.218 | 1.205 |
| d(OC-N) | 1.356 | 1.364 | 1.365 | 1.350 | 1.372 |
| d(OC(Cy)-N) | 1.350 | 1.373 | 1.370 | 1.358 | 1.370 |
| d(H ₂ C(CO)-N) | 1.471 | 1.499 | 1.499 | 1.441 | 1.446 |
| d(HC-N) | 1.472 | 1.514 | 1.515 | 1.463 | 1.464 |
| d(OH...OC) | 1.708 | 2.597 | 1.679 (1.728) | 1.816 | 2.232 |
| d(HO...OC) | 2.657 | 3.077 | 2.687 (2.693) | 2.782 | 2.811 |
| d(O-H) | 0.967 | 0.957 | 1.012 (0.968) | 0.989 | 1.001 |
| θ ₁ (H ₂ C-C(H)- C=O) | 16.6, 258.1 | 30.9, 264.1 | 29, 262.1 (29, 262.1) | 20.1, 262.8 | 15.3, 253.8 |
| θ ₂ (H ₂ C(CO)-N- C=O) | 196 | 172.9 | 175.6 (175.6) | 192.5 | 188.2 |

^a Calculated with COMPASS in Discover. ^b Calculated with CVFFH in Discover. ^c Calculated with Discover and CVFFH with SPC water model. The same result was obtained with the TIP4P water model in the same conditions, except in the values described in brackets. ^d Calculated with Forcite and COMPASS. ^e Calculated with Forcite and Universal FF.

The crystal structure of the hemihydrate of the enantiomer S of PZQ obtained experimentally at 293K (Liu et al., 2006) is similar to that of the isomer R studied at 298 K, with the same cell parameters and space group. However, the atomic positions were different owing to the different orientation with respect to the origin of the coordinates system used for the refinement. Nevertheless, a model of one unit cell of this crystal of (S)-PZQ was generated and optimized with Discover and COMPASS FF obtaining the same cell parameters that those of the (R)-PZQ crystal. However, small differences are observed in some bond lengths and angles (Table 5). In this crystal, the experimental bond length of the carbonyl group joined to the cyclohexyl moiety is closer to that of the R isomer measured at 130K and to our calculated values. This corroborates that the bond length of the crystal determined by Meyer et al. (2009) overestimated the C=O bond length.

Table 5.- Main bond lengths (Å) and angles (°) values of the crystal structure of the hemihydrate of (S)-PZQ (SIGBUG), experimental data and optimized with Discover/COMPASS at fixed (CF) and variable (CV) volume.

| Features | Experimental ^a | DCCF ^b | DCCV ^c |
|---|---------------------------|-------------------|-------------------|
| d(CyC=O) | 1.232 | 1.220 | 1.220 |
| d(C=O) | 1.223 | 1.226 | 1.226 |
| d(OC-N) | 1.351 | 1.355 | 1.356 |
| d(OC(Cy)-N) | 1.346 | 1.350 | 1.350 |
| d(H ₂ C(CO)-N) | 1.451 | 1.470 | 1.471 |
| d(HC-N) | 1.463 | 1.472 | 1.472 |
| d(OH...OC) | 2.033 | 1.702 | 1.706 |
| d(HO...OC) | 2.751 | 2.661 | 2.657 |
| d(O-H) | 0.724 | 0.968 | 0.967 |
| θ ₁ (H ₂ C-C(H)-C=O) | 27.5, 265.4 | 18.8, 259.2 | 16.6, 257.3 |
| θ ₂ (H ₂ C(CO)-N-C=O) | 178 | 165 | 164.3 |

^a Obtained from experimental crystal structure (Liu et al., 2006). ^b Calculated at fixed volume. ^c Calculated at variable volume.

Racemate (RS)-PZQ

A different crystal structure was reported for the racemate (RS)-PZQ. This is an anhydrous crystal with no water molecule in the crystal lattice and a P-1 space group (293 K) in a triclinic system (Espinosa-Lara et al., 2013). This crystal is a racemate crystal where the enantiomers are mixed forming the crystal lattice. This is not an aggregate or solid solution of crystals of separated enantiomers with crystals of R and crystals of S forms. However, the refinement quality is lower (8% of residual indetermination) than in the enantiomer crystals (4%). This is owing to disordering in atomic positions. The unit cell is formed by 8 PZQ molecules, where the atomic positions of four of them are well determined, whereas the other four molecules have well localized the cyclohexyl atoms but the heterocyclic and aromatic atoms are disordered. This crystal structure file includes all possible atomic positions as an average view. These atoms can adopt slightly different positions in vicinal cells and supercells will be necessary to represent all atomic positions. Then in the

description of the electron density of a unit cell some duplicate positions are obtained, indicating that there is some likelihood that these atoms occupy those positions of considering various neighboring cell-statistical unit (Fig. 4a). From this experimental lattice a model of a unit cell of this racemate was created deleting all atom duplications maintaining similar bond lengths and angles to the other ordered molecules and a more ordered system was obtained (Fig. 4b).

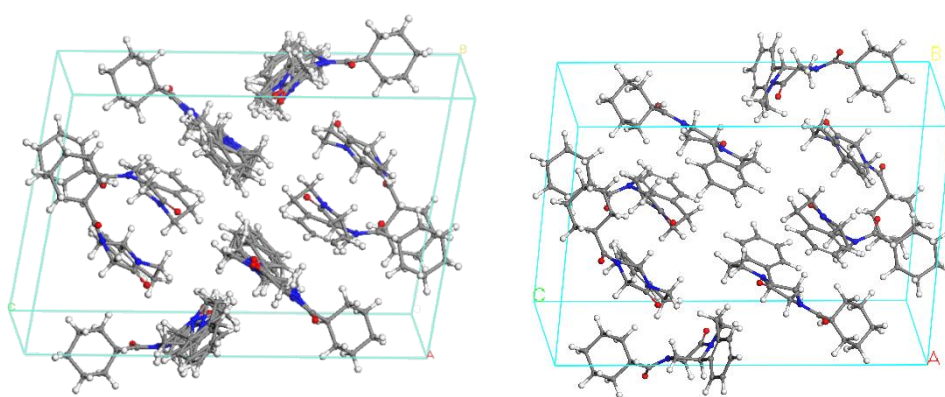


Figure 4. Crystal structure of (RS)-PZQ, (a) from experimental (Espinosa-Lara et al., 2013) data, and an ordered model (b).

Our calculations reproduce the experimental crystal structure of (RS)-PZQ with a deviation less than 1 % in lengths and less than 4 % in angles of cell parameters (Table 6). There is not strong intermolecular H bond like in the hemihydrate, this facilitates the partial disorder observed. The carbonyl groups are oriented towards the heterocyclic H atoms owing to electrostatic interactions, and the aromatic rings are parallel to the heterocyclic rings of vicinal molecules establishing a possible $\pi - \pi$ interaction between these rings. The enantiomer molecules are associated each other in racemic pairs of PZQ. The cyclohexyl ring is twisted with respect to the vicinal carbonyl group. This consistent with the above conformational analysis, where the conformation of minimum energy had the dihedral angle $\theta_1 = 280^\circ$. The cyclohexyl plane forms a twist angle of 80° with respect to the aromatic plane. On the contrary of the above hemihydrate crystals, in RS crystals the carbonyl groups are oriented in the

same direction, adopting the above named conformer *syn*, that corresponds to the second conformer observed in the above conformational analysis with the rotation of the θ_2 and θ_3 dihedral angles. This new conformer was extracted from the crystal structure as an isolated molecule and was optimized with COMPASS and the same conformation was maintained being only 0.525 kcal/mol less stable than the global minimum obtained above for PZQ molecule. On the other hand the global dipolar moment was calculated for both conformers. The conformer *syn* is much more polar ($\mu = 6.3$ D) than the conformer *anti* ($\mu = 1.5$ D). This can indicate that the conformer *syn* will be more stable in polar media and this high μ can justify the stability of the crystal packing of the (RS)-crystal where no water and no H bonding were necessary. The intermolecular interactions in this racemic crystal are mainly electrostatic ones between dipoles. The vicinal molecules are oriented in opposite sense where the dipole moments are opposite establishing attractive dipole-dipole electrostatic interactions.

Table 6. Lattice parameters (distances in Å and angles in degrees) of the (RS)-PZQ crystal structure, experimental (Espinosa-Lara et al., 2013) values and fully optimized structure at variable volume with Discover COMPASS FF.

| Lattice parameters | Experimental | DCCV |
|--------------------|--------------|-------|
| <i>a</i> | 10.45 | 10.35 |
| <i>b</i> | 15.11 | 15.02 |
| <i>c</i> | 22.96 | 23.23 |
| α | 99.5 | 95.6 |
| β | 98.4 | 96.7 |
| γ | 108.3 | 111.3 |

The CyC=O, H₂C(CO)-N and C=O bond lengths of the calculated structure are shorter than the experimental and the OC(Cy)-N, OC-N and HC-N bond lengths are longer than the experimental ones (Table 7).

Table 7. Main bond lengths and angles (distances in Å and angles in degrees) of the crystal structure of (RS)-PZQ, experimental values and calculated values of the structures optimized at fixed and variable volume with Discover COMPASS FF.

| Features | Experimental ^a | DCCF ^b | DCCV ^c |
|---|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| d(CyC=O) | 1.226-1.229 | 1.219 | 1.216-1.219 |
| d(C=O) | 1.219-1.223 | 1.224 | 1.223-1.226 |
| d(OC-N) | 1.342-1.350 | 1.355 | 1.358-1.361 |
| d(OC(Cy)-N) | 1.342-1.360 | 1.351-1.364 | 1.356-1.369 |
| d(H ₂ C(CO)-N) | 1.453 | 1.457-1.467 | 1.459-1.467 |
| d(HC-N) | 1.461 | 1.465-1.480 | 1.470 |
| θ ₁ (H ₂ C-C(H)-C=O) | 31.5, 270 | 15.7-31.6, 256.9- 271.9 | 23.2-32.2, 252.6- 273.1 |
| θ ₂ (H ₂ C(CO)-N-C=O) | 2.3 | 2.7-14.5 | 1.6-7.7 |

^a Obtained from experimental crystal structure (Espinosa-Lara et al., 2013). ^b Calculated with Discover COMPASS at fixed volume. ^c Calculated with Discover COMPASS at variable volume.

Cohesive energy

Cohesive energy has been calculated with COMPASS FF in Discover for the hemihydrate of one enantiomer and the racemate crystals. The cohesive energy can be defined as the difference between the energy of each molecule isolated and the energy of the crystal:

$$\Delta E_{RS} = E_{RS} - 8E_{PZQ \text{ MOL}}$$

$$\Delta E_R = E_R - 4E_{PZQ \text{ MOL}} - 2E_{\text{water}}$$

In all cases the cohesive energy is negative, showing that the formation of the crystal is exothermic and thermodynamically favourable. This energy is stronger with the crystals optimized at variable volume than in the crystals optimized at constant volume. The racemic RS crystal is 105.6 kcal/mol per unit cell more stable than the hemihydrate enantiomeric crystal owing to the higher number of PZQ molecules per unit cell in the RS crystal. However, the (R)-PZQ crystal has a stronger cohesive energy per PZQ molecule (-48.1 kcal/mol per PZQ molecule) than the RS crystal

(-37.2 kcal/mol per PZQ molecule) due to the presence of water molecules in the hemihydrate.

Infrared spectroscopy

In previous reports on PZQ, the IR spectra were used only as identification tool rather than as a way for a further structural knowledge (Schepers et al., 1987; Liu et al. 2004; Passerini et al., 2006; Mainardes et al., 2006; Rodrigues et al., 2010; Chaud et al., 2013). Infrared spectroscopy shows bands corresponding to vibration absorption between atoms and therefore is also closely related to atomistic studies. In the above calculations, molecular structures were optimized. In the minimum energy structure, the atom positions can be altered slightly along the directions of the Cartesian axes of the three-dimensional structure in both senses, making $6N$ finite atomic displacements, where N is the number of atoms. These changes produce an alteration of energy and thus the derivative of energy with respect to such geometrical change, that is what is called the atomic forces, can be calculated and the process, named Forces Analysis, enable us to calculate the frequencies of the normal modes of atomic vibrations. This allows us to compare these frequencies with those observed experimentally as infrared spectrum bands. Besides these theoretical calculations it facilitates the allocation of certain bands observed in the spectrum and not defined previously in previous experimental studies or to clarify discrepancies in its allocation among previous authors.

Therefore, in this study the frequencies of the vibration normal modes of the PZQ molecule were calculated with the procedure described above using COMPASS FF and DMOL3 for energy calculations of each step and compared with literature data (Table 8). PZQ shows experimentally two main characteristic bands in the range 3028 - 2840 cm^{-1} assigned to stretching vibration $\nu(\text{CH})$ of CH and CH_2 groups, however, no specific assignments were reported for the different CH groups of the PZQ molecule (Schepers et al., 1987; Passerini et al., 2006; Mainardes et al., 2006; Rodrigues et al., 2010; Chaud et al., 2013). In this range the

calculated frequencies are consistent with experimental values and the relative frequency differences are similar in both calculations methods, being slightly higher those of DMOL3 for frequencies higher than 3000 cm^{-1} . No significant differences are observed between frequencies calculated by COMPASS FF with and without ESP atomic charges calculated at quantum mechanical level, except in the modes of the polar groups, $\nu(\text{C}=\text{O})$, or modes of bonds close to the polar groups, COCH_2N . In our calculations several types of CH bonds can be distinguished. Aromatic CH bonds show $\nu(\text{CH})$ at higher frequencies than the aliphatic ones, being in the middle those CH_2 group of the heterocyclic moiety. In these last groups, COCH_2N , CH_2N in β position with respect to the aromatic ring and CH_2N group in the heterocyclic ring, the frequency of the $\nu(\text{CH})$ mode depends on the relative orientation of the C-H bond with respect to the neighbor C=O bond. The C-H bond that vibrates in a parallel disposition with respect to the vicinal C=O bond, has a higher frequency than the other C-H bond with different orientation. This is due to the electrostatic effect of the C=O dipole on the C-H stretching vibration that is stronger with the C-H bond that is in a parallel disposition with C=O, requiring this stretching more energy and then higher frequency.

The experimental $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands are observed in the 1736-1627 cm^{-1} range (Schepers et al., 1987; Passerini et al., 2006; Mainardes et al., 2006; Chaud et al. 2013). In some spectra, a splitting or complex structure was observed but neither discussion about it was reported. Some differences in experimental studies are observed: Schepers et al. (1987) reported a broad band (1680-1625 cm^{-1}) centered at 1650 cm^{-1} ; similar band was reported at 1630 cm^{-1} by Mainardes et al. (2006) and at 1736 cm^{-1} by Rodrigues et al. (2010); Chaud et al. (2013) showed a complex band centered at 1651 cm^{-1} ; and Passerini et al. (2006) reported two bands at 1649 and 1627 cm^{-1} . The calculated $\nu(\text{C}=\text{O})$ frequencies are slightly higher than experimental ones; nevertheless, this splitting is also detected in our calculations. The frequency difference is small 16 and 12-34 cm^{-1} in COMPASS and DMOL3, respectively. However, the assignments of the bands are different in each calculation method. In COMPASS, the higher frequency band is

assigned to the carbonyl group joined to the cyclohexyl moiety, whereas in DMOL3 this band is assigned to the other carbonyl group. This discrepancy is due to the similar local environment for both C=O bonds and it can justify the lack of relative assignment reported experimentally, where this splitting could change in solid state or in dissolution. However, the COMPASS calculations applying atomic ESP charges yielded the same assignment that in DMOL3 (Table 8). Further studies related with this item should be performed.

Around 1450-1000 cm^{-1} shows the bands of C-H bonds deformation vibration or bending $\delta(\text{CH})$ and bands of stretching vibration of the C-N bonds $\nu(\text{CN})$ were reported experimentally (Mainardes et al., 2006; Rodrigues et al., 2010) (Table 8). The calculated frequencies of $\delta(\text{CH})$ mode are higher than the experimental values for all calculation levels. The aromatic H atoms show higher $\delta(\text{CH})$ frequencies than the aliphatic ones. The $\gamma(\text{CH})$ modes and other that appear at lower frequencies is difficult to assign due to the coupling with other atomic vibrations of the whole molecule.

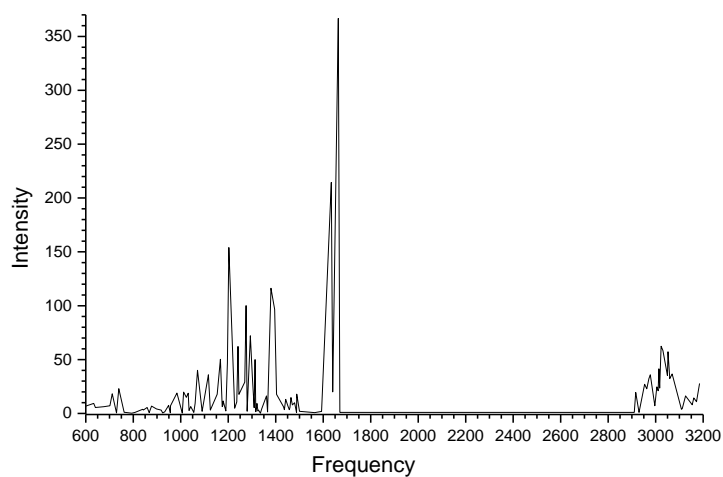
Table 8. Calculated frequencies (cm^{-1}) of the main modes of vibration of the PZQ molecule.

| Mode | COMPASS | DMOL3 <i>anti (syn)</i> | Exp. ^a |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH})_{\text{ar}}^{\text{c}}$ | 3074-3046 (3072-3043) ^b | 3183-3126 (3156-3138, 3128) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH}_2)\text{COCH}_2\text{N}$ | 3016 (3036, 2966) | 3102, 2950 (3108, 3003) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\text{pa}}\text{CO}^{\text{d}}$ | 2981, 2971 (2983) ^b | 3152, 3004 (3133) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\text{pa}}\text{CO}^{\text{d}'}$ | 2971 (2955) ^b | 3107, 3013 (3108) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\alpha\text{ar}}^{\text{e}}$ | 2967, 2919 (2964, 2916) ^b | 3046, 3001 (3051, 3001) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\text{pe}}\text{CO}^{\text{f}}$ | 2909 (2918) ^b | 3004 (2968) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\text{pe}}\text{CO}^{\text{f}'}$ | 2898 (2891) ^b | 3013 (2993) | 3028-2840 |

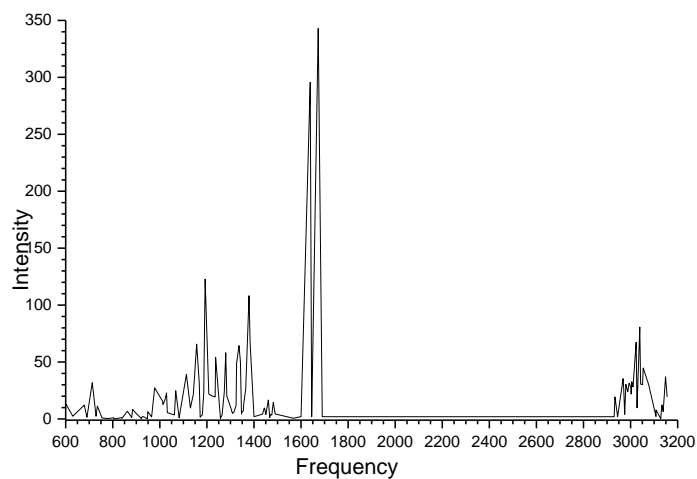
| | | | |
|---------------------------------------|--|--|-----------|
| $\nu(\text{CH}_2)\text{cy}^g$ | 2955-2949 _{as} , 2911-2902 _s (2957-2945 _{as} , 2909- 2900 _s) ^b | 3050, 3033-3026, 2982-2966 (3077- 3053, 3039-3011, 2988-2971) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH})\text{cy}$ | 2940 (2942) | 3002, 2987 (3005) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CH})\text{ch}^h$ | 2906 (2903) ^b | 2920 (2934) | 3028-2840 |
| $\nu(\text{CO})$ | 1703 (1718) ^b | 1662 (1673) | 1650-1627 |
| $\nu(\text{CO})\text{cy}^i$ | 1719 (1702) ^b | 1650 (1639) | 1650-1627 |
| $\delta(\text{CH})\text{ar}^c$ | 1662-1615, 1513 (1660- 1615) ^b | 1593, 1565, 1487 (1589-1568, 1482) | 1450-1000 |
| $\delta(\text{CH})\text{cy}^g$ | 1481-1467 (1483-1475, 1470-1468, 1427, 1414) ^b | 1489, 1477, 1467 (1490, 1479-1469, 1437) | 1450-1000 |
| $\delta(\text{CH})$ | 1599, 1456 (1594, 1462) | 1466, 1360 (1467) | 1450-1000 |
| $\delta(\text{CH}) \beta$ | 1548, 1433 (1541, 1444, 1417) | 1462, 1404, 1376 (1461) | 1450-1000 |
| $\delta(\text{CH})^j$ | 1502 (1514-1508,) ^b | 1435 (1450) | 1450-1000 |
| $\delta(\text{CH}) \alpha\text{ar}^e$ | 1464 | 1437 (1443) | 1450-1000 |
| $\gamma(\text{CH})^j$ | 1343, 1314, 1278 (1313) ^b | 1309 (1218) | - |

^a Schepers et al., 1987; Passerini et al., 2006; Mainardes et al., 2006; Chaud et al. 2013. ^b COMPASS with ESP charges. ^c CH bonds of the aromatic ring. ^d Stretching of the C-H bond of the CH₂ group in the heterocyclic ring (CH-CH₂-N) with the vibration mode parallel to the carbonyl bond. ^{d'} Stretching of the C-H bond of the CH₂ group in β position with respect to the aromatic ring with the vibration mode parallel to the carbonyl bond. ^e Stretching of the CH in α position with respect to the aromatic ring. ^f Stretching of the C-H bond (CH₂ group in the heterocyclic ring, CH-CH₂-N) oriented perpendicularly to the carbonyl bond. ^{f'} Stretching of the C-H bond (CH₂ group in β position with respect to the aromatic ring) oriented perpendicularly to the carbonyl bond. ^g CH₂ bonds of the cyclohexyl group. ^h Stretching of the CH of the chiral carbon. ⁱ Symmetric stretching of the CO joined to the cyclohexyl group. ^j CH group joined to the COCH₂N group.

Spectra of the calculated (DFT) *anti* and *syn* conformers of the PZQ molecule were simulated, observing that the most intense bands are those of $\nu(\text{CO})$ according with experiment (Figure 5).



a



b

Figure 5. Simulated IR spectra (frequency in cm^{-1}) of the *anti* (a) and *syn* (b) conformers of the calculated PZQ molecule.

The $\nu(\text{CH})$ frequencies are similar for both conformers, except in the COCH_2N group, where they are higher in *syn* than in *anti*, due to the effect of the carbonyl groups. In the *syn* conformers both carbonyl groups are oriented to these COCH_2N group and the effect of these local dipoles is higher than in *anti*. On the contrary the $\nu(\text{CH})$ frequencies of the NCH_2 group of heterocyclic ring of *syn* (3133 and 2968 cm^{-1}) are lower than in *anti* (3152 and 3004 cm^{-1}), due to the lack of the effect of carbonyl group. On the other hand, the frequency difference in $\nu(\text{CO})$ between both carbonyl groups is higher in *syn* than in *anti* (Table 8, Figure 5).

CONCLUSIONS

Our atomistic computational methods have reproduced the molecular and all crystal structures of PZQ in both enantiomers and racemic form. The COMPASS FF and DMOL3 methods yielded the closest results to experimental values. COMPASS described well the geometry and DMOL3 calculated well the infrared frequencies. In gas phase, as isolated molecules the conformer *anti* is more stable than the *syn* one. However, this last one is much more polar than the *anti* one. This means that in polar media the most stable conformer will be probably the conformer *syn*. Hence, in an aqueous physiological medium the conformer *syn* will interact with the receptor. Probably the orientation of both carbonyl groups to the same side can facilitate the coordination with Ca^{2+} cations or H bonding interactions with aminoacids of the receptor active site.

The intermolecular interactions of the hemihydrate crystals are different that those of the racemic crystal. The carbonyl groups and the aromatic ring are responsible of the molecular packing in the crystal forms. The local environments of these carbonyl groups are different in each crystal structures adopting different conformations that can affect to the vibration frequencies. Further studies of the solid state of this drug are necessary to understand more deeply its properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to the regional Andalusian projects (RNM363 and RNM1897) and the Spanish MINECO projects (FIS2013-48444-C2-2-P) for financial support and to the Supercomputational Center of Universidad de Granada for computing facilities.

REFERENCES

- Accelrys Materials Studio, version v 6.0, 2012. Accelrys Inc., San Diego, USA.
- Ahamed, M., Chan, B., Jensen, P., Todd, M.H., 2012. The outcome of the oxidations of unusual enediamide motifs is governed by the stabilities of the intermediate iminium ions. *PLoS One* 7, 47224.
- Allen, F.H., 2002. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Cryst. B* 58, 380-388.
- Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R., Seubert, J., 1983. Praziquantel. *Med. Res. Rev.* 3, 147-200.
- Andrews, P., 1985. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacol. Ther.* 29, 129-156.
- Berendsen, H.J.C., Grigera, J.R., Straatsma, T.P., 1987. The missing term in effective pair potentials. *J. Phys. Chem.* 91, 6269-6271.
- Besler, B.H., Merz Jr., K.M., Kollman, P.A., 1990. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 11, 431-439.
- Cedillo-Cruz, A., Aguilar, M.I., Flores-Alamo, M., Palomares-Alonso, F., Jung-Cook, H., 2014. A straightforward and efficient synthesis of praziquantel enantiomers and their 4'-hydroxy derivatives. *Tetrahedron* 25, 133-140.
- Chaud, M.V., Lima, A.C., Vila, M.M.D.C., Paganelli, M.O., Paula, F.C., Pedreiro, L.N., Gremião, M.P.D., 2013. Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate, *Trop. J. Pharm. Res.* 12, 163-168.

Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 7, 41-51.

Cioli, D., Pica-Mattocchia, L., Archer, S., 1995. Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmacol. Ther.* 68, 35-85.

Cioli, D., Pica-Mattocchia, L., 2003. Praziquantel. *Parasitol. Res.* 90, 3-9.

Cooke, C.L., 1932. Alkalosis occurring in the alkaline treatment of peptic ulcers. *Quart. J. Med.* 25, 527-41.

Davis, A., 1982. Available chemotherapeutic tools for the control of Schistosomiasis. *Behring Inst Mitt.* 71, 90-103.

Delley, B., 1990. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. *J. Chem. Phys.* 92, 508-517.

Delley, B., 2000. From molecules to solids with the DMol3 approach. *J. Chem. Phys.* 113, 7756-7764.

Delley, B., 2002. Hardness conserving semilocal pseudopotentials. *Phys. Rev. B* 66, 1551251-1551259.

Doenhoff, M.J., Kimani, G., Cioli, D., 2000. Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitol. Today* 16, 364-366.

Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659-667.

EP 7.0., 2011. European Pharmacopoeia Seventh Edition. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, Strasbourg, France.

Escamilla-Roa, E., Sainz-Díaz, C.I., 2014. Amorphous ammonia-water ice deposited onto silicate grain: Effect on growth of mantles ice on interstellar and interplanetary dust. *J. Phys. Chem. C* 118, 3554-3563.

Espinosa-Lara, J.C., Guzmán-Villanueva, D., Arenas-García, J.I., Herrera-Ruiz, D., Rivera-Islas, J., Román-Bravo, P., Morales-Rojas, H., Höpfl, H., 2013. Cocrystals of active pharmaceuticals ingredients-praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic and pimelic acids. *Cryst. Growth Des.* 13, 169-185.

González-Esquivel, D., Rivera, J., Castro, N., Yopez-Mulia, L., Helgi, J.C., 2005. In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel. *Int. J. Pharm.* 295, 93-99.

Greenberg, R.M., 2005. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *Int. J. Parasit.* 35, 1-9.

Groll, E., 1984. Praziquantel. *Adv. Pharmacol. Chemother.* 20, 219-238.

Gross, K., Seybold, P.G., Hadad, C.M., 2002. Comparison of Different Atomic Charge Schemes for Predicting pK_a Variations in Substituted Anilines and Phenols. *Inter. J. Quantum Chem.* 90, 445-458.

Hammer, B., Hansen, L.B., Norskov, J.K., 1999. Improved adsorption energetics within density-functional theory using revised Perdew-Burke-Ernzerhof functionals. *Phys. Rev. B* 59, 7413.

Heinz, H., Vaia, R.A., Farmer, L., 2006. Interaction energy and surface reconstruction between sheets of layered silicates. *J. Chem. Phys.* 124, 224713.

Leopold, G., Ungethum, W., Groll, E., Diekmann, H.W., Nowak, H., Wegner, D.H.G., 1978. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 14, 281-291.

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. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 265-278.

Liu, Y., Wang, X., Wang J.K., Ching, C.B., 2004. Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel. *J. Pharm. Sci.* 93, 3039-3046.

- Liu, Y., Wang, X., Wang J.K., Ching, C.B., 2006. Investigation of the phase diagrams of chiral praziquantel. *Chirality* 18, 259-264.
- Mainardes, R.M., Gremião, M.P.D., Evangelista, R.C., 2006. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Braz. J. Pharm. Sci.* 42, 523-530.
- Martos-Villa, R., Francisco-Márquez, M., Mata, M.P., Sainz-Díaz, C.I., 2013. Crystal structure, stability and spectroscopic properties of methane and CO₂ hydrates. *J. Mol. Graphics Model.* 44, 253-265.
- Meyer, T., Sekljic, H., Fuchs, S., Bothe, H., Schollmeyer, D., Miculka, C., 2009. Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLoS One* 3, 357.
- Olliaro, P., Delgado-Romero, P., Keiser, J., 2014. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 863-870.
- Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., Rodriguez, L., 2006. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *Int. J. Pharm.* 318, 92-102.
- Pax, R., Bennett, J.L., Fetterer, R., 1978. A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naanyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 304, 309-315.
- Payne, M.C., Teter, M.P., Allan, D.C., Arias, T.A., Joannopoulos, J.D., 1992. Iterative minimization techniques for abinitio total-energy calculations – molecular dynamics and conjugate gradients. *Rev. Mod. Phys.* 64, 1045-1097.
- Rappe, A.K., Goddard, W.A., 1991. Charge equilibration for molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem.* 95, 3358-3363.
- Redman, C.A., Robertson, A., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J., Martin, R.J., 1996. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* 12, 14-20.

Rick, S.W., Stuart, S.J., Bader, J.S., Berne, B.J., 1995. Fluctuating charge force fields for aqueous solutions. *J. Mol. Liq.* 65-66, 31-40.

Rodrigues, S.G., Chaves, I.S., Melo, N.F.S., de Jesus, M.B., Fraceto, L.F., Fernandes, S.A., de Paula, E., de Freitas, M.P., Pinto, L.M.A., 2010. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 70, 19-28.

Sainz-Díaz, C.I., Francisco-Márquez, M., Vivier-Bunge, A., 2011. Adsorption of Polyaromatic Heterocycles on pyrophyllite surface by different theoretical approaches. *Environ. Chem.* 8, 429-440.

Schepers, H., Brasseur, R., Goormaghtigh, E., Duquenoy, P., Ruyschaert, J.M., 1987. Mode of insertion of praziquantel and derivatives into lipid membranes. *Biochem. Pharmacol.* 37, 1615-1623.

Segall, M.D., Lindan, P.J.D., Probert, M.J., Pickard, C.J., Hasnip, P.J., Clark, S.J., Payne, M.C., 2002. First-principles simulation: ideas, illustrations and the CASTEP code. *J. Phys. Condens. Matter* 14, 2717-2744.

Sirewalt, M.A., Hackey, J.R., 1956. Penetration of host skin by cercariae of *S. mansoni*. I. Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. *J. Parasitol.* 42, 565-579.

Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411-425.

Sun, H., 1998. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications-Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J. Phys. Chem. B* 102, 7338-7364.

Teleman, O., Jonsson, B., Engström, S., 1987. A molecular dynamics simulation of a water model with intramolecular degrees of freedom. *Mol. Phys.* 60, 193-203.

Toro, R., Kaduk, J., Delgado, M., Díaz de Delgado, G. 2014. Structural characterization of praziquantel: a broad spectrum anthelmintic, in *Powder Diffraction. Proceedings of the International Centre for Diffraction Data (ICDD) Annual Spring Meetings*, 29, 3.

Trastullo, R., Dolci, L.S., Passerini, N., Albertini, B., 2015. Development of flexible and dispersible oral formulations containing praziquantel for potential schistosomiasis treatment of pre-school age children. *Int. J. Pharm.* 495, 536-550.

USP 36-NF31, 2013. United States Pharmacopoeia 36 and National Formulary 31. US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD (USA).

WHO, 2015. WHO Schistosomiasis. World Health Organization. <http://www.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.

Xiao, S.H., Shen, B., Chollet, J., Utzinger, J., Tanner, M., 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *J. Parasitol.* 86, 1125-1132.

Xiao, S.H., Keiser, J., Chollet, J., Utzinger, J., Dong, Y., Endriss, Y., Vennerstrom, J.L., Tanner, M., 2007. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1140-1145.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table S1.- Net atomic charges of the PZQ molecule calculated with DMOL3.
Conformer *anti*

| Nombre en Figura | ESP-fitted charges | Mulliken atomic charges |
|------------------|--------------------|-------------------------|
| O1 | -0.464 | -0.478 |
| O2 | -0.517 | -0.479 |
| N1 | 0.068 | -0.418 |
| N2 | -0.233 | -0.405 |
| C1 | -0.224 | -0.107 |
| H1 | 0.077 | 0.074 |
| H2 | 0.107 | 0.096 |
| C2 | -0.114 | -0.134 |
| H3 | 0.063 | 0.072 |
| H4 | 0.060 | 0.064 |
| C3 | -0.124 | -0.128 |
| H5 | 0.054 | 0.069 |
| H6 | 0.075 | 0.069 |
| C4 | -0.134 | -0.133 |
| H7 | 0.069 | 0.067 |
| H8 | 0.063 | 0.073 |
| C5 | -0.155 | -0.126 |
| H9 | 0.041 | 0.078 |
| H10 | 0.100 | 0.085 |
| C6 | 0.122 | -0.226 |
| H11 | 0.058 | 0.096 |
| C7 | 0.230 | 0.508 |
| C8 | -0.601 | -0.059 |
| H12 | 0.200 | 0.128 |
| H13 | 0.218 | 0.108 |
| C9 | 0.596 | 0.479 |
| C10 | -0.197 | 0.006 |
| H14 | 0.116 | 0.081 |
| H15 | 0.124 | 0.144 |
| C11 | 0.128 | 0.027 |
| H16 | 0.068 | 0.104 |
| C12 | -0.094 | -0.004 |
| H17 | 0.089 | 0.082 |
| H18 | 0.115 | 0.127 |
| C13 | -0.188 | -0.168 |
| H19 | 0.101 | 0.102 |
| H20 | 0.099 | 0.085 |
| C14 | 0.101 | 0.026 |
| C15 | 0.043 | 0.017 |

| | | |
|-----|--------|--------|
| C16 | -0.257 | -0.074 |
| H21 | 0.169 | 0.078 |
| C17 | -0.129 | -0.065 |
| H22 | 0.141 | 0.066 |
| C18 | -0.116 | -0.063 |
| H23 | 0.137 | 0.064 |
| C19 | -0.228 | -0.067 |
| H24 | 0.142 | 0.061 |

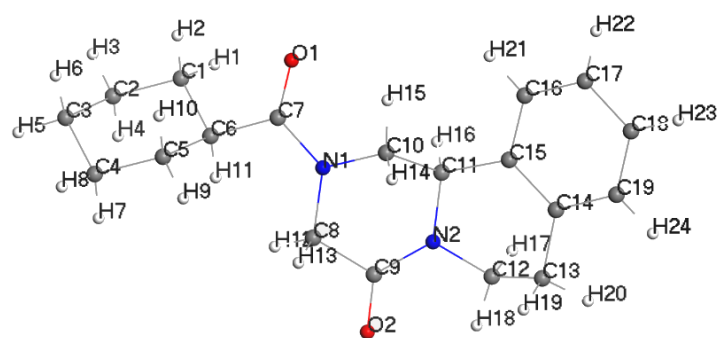
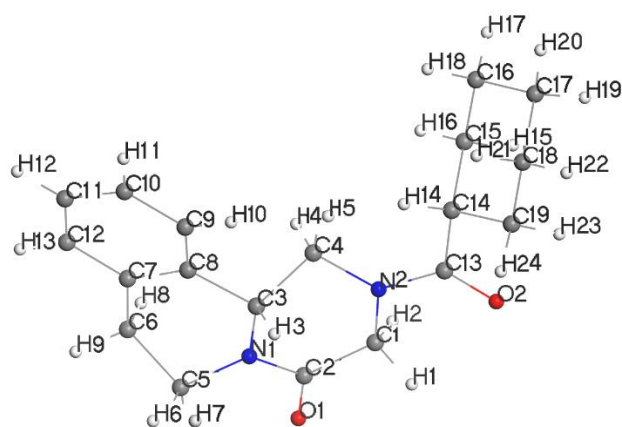


Table S2.- Net atomic charges of the PZQ molecule calculated with DMOL3.
Conformer *syn*

| Nombre en Figura | ESP-fitted charges | Mulliken charges |
|------------------|--------------------|------------------|
| N1 | 0.132 | -0.422 |
| O1 | -0.507 | -0.474 |
| O2 | -0.453 | -0.470 |
| C1 | -0.417 | -0.034 |
| H1 | 0.193 | 0.142 |
| H2 | 0.176 | 0.108 |
| C2 | 0.499 | 0.479 |
| C3 | -0.034 | 0.030 |
| H3 | 0.085 | 0.099 |
| C4 | -0.386 | 0.004 |
| H4 | 0.172 | 0.085 |
| H5 | 0.139 | 0.116 |
| N2 | -0.098 | -0.410 |
| C5 | -0.137 | -0.003 |
| H6 | 0.094 | 0.081 |
| H7 | 0.123 | 0.129 |
| C6 | -0.156 | -0.168 |
| H8 | 0.094 | 0.102 |

| | | |
|-----|--------|--------|
| H9 | 0.098 | 0.085 |
| C7 | 0.050 | 0.024 |
| C8 | 0.150 | 0.018 |
| C9 | -0.245 | -0.072 |
| H10 | 0.159 | 0.065 |
| C10 | -0.160 | -0.068 |
| H11 | 0.148 | 0.066 |
| C11 | -0.103 | -0.064 |
| H12 | 0.137 | 0.067 |
| C12 | -0.225 | -0.064 |
| H13 | 0.146 | 0.063 |
| C13 | 0.201 | 0.505 |
| C14 | 0.083 | -0.228 |
| H14 | 0.048 | 0.087 |
| C15 | -0.106 | -0.123 |
| H15 | 0.032 | 0.073 |
| H16 | 0.095 | 0.091 |
| C16 | -0.166 | -0.132 |
| H17 | 0.066 | 0.073 |
| H18 | 0.070 | 0.062 |
| C17 | -0.092 | -0.130 |
| H19 | 0.069 | 0.071 |
| H20 | 0.049 | 0.069 |
| C18 | -0.141 | -0.133 |
| H21 | 0.063 | 0.060 |
| H22 | 0.066 | 0.072 |
| C19 | -0.186 | -0.107 |
| H23 | 0.105 | 0.101 |
| H24 | 0.069 | 0.071 |



IV.2. MODELIZACIÓN MOLECULAR Y ESPECTROSCOPIA INFRARROJA Y RAMAN DE LA ESTRUCTURA CRISTALINA DEL PRAZICUANTEL

Los resultados de esta sección correspondientes al objetivo 4 de la Tesis se presentan y discuten en la siguiente publicación:

Molecular modeling and infrared and Raman spectroscopy of the crystal structure of the chiral antiparasitic drug praziquantel.

A. Borrego-Sánchez, A. Hernández-Laguna, C.I. Sainz-Díaz

J. Mol. Model. **2017**, *23*, 106.

Con la finalidad de alcanzar una mejor comprensión de las propiedades del praziquantel, son necesarios más estudios en estado sólido con respecto a los realizados en el trabajo previo y el análisis de la molécula en disolución. En la modelización computacional de la sección IV.1 se puso a punto la metodología teórica y los parámetros computacionales adecuados para estudiar la estructura molecular y cristalina del praziquantel y se realizaron análisis conformacionales de la molécula con el campo de fuerzas COMPASS, que mostraron la existencia de dos conformeros, *syn* y *anti*. En el trabajo de la presente sección, se llevó a cabo la optimización de los dos conformeros aislados en fase gas con diferentes métodos computacionales basados en el Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) con los funcionales Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) y el PBE revisado (RPBE) pertenecientes a la Aproximación del Gradiente Generalizado (GGA), así como con estos mismos funcionales añadiendo una corrección de dispersión. Los resultados obtenidos fueron comparados con los cálculos basados en mecánica clásica con el campo de fuerzas COMPASS realizados en la

publicación anterior y ambos mostraron que los dos conformeros tienen energía similar, siendo el conformero *anti* ligeramente más estable que el *syn*. Esta diferencia de energía es mayor con DFT y, concretamente, con RPBE, aunque todos los métodos dieron lugar a los mismos resultados cualitativamente. También se realizaron optimizaciones de geometría del prazicuantel en disoluciones de etanol y agua. En este caso, a diferencia de los cálculos en vacío, el DFT con la corrección de dispersión dio lugar a resultados en los que el conformero *syn* es más estable que el *anti*. Estos hallazgos confirman la hipótesis sobre la estabilidad relativa realizadas en el trabajo previo y basadas en el momento dipolar. La diferencia de energía entre ambos conformeros decrece en el orden vacío > etanol > agua siendo mayor la probabilidad de las geometrías *syn* con respecto a las *anti* en medios más polares. También se compararon las geometrías y distancias de enlace de los dos conformeros con estos métodos DFT con los funcionales PBE y RPBE y DFT con corrección de dispersión, comparándolos con los experimentales.

Por otra parte, tras estudiar las diferentes estructuras cristalinas del prazicuantel se observó que los enantiómeros R y S poseen cuatro moléculas de prazicuantel en conformación *anti*, mientras que el cristal RS de prazicuantel contiene ocho moléculas en conformación *syn*. Cada uno de estos ocho conformeros *syn* del cristal racémico presenta una conformación distinta al resto, diferenciándose en el ángulo formado entre los planos de los grupos carbonilos y el grupo ciclohexilo. Además, se optimizó el cristal RS con el programa SIESTA con el funcional de Van der Waals (VWD) y el funcional de densidad de Van der Waals (DRSLL) y con PBE y se calculó la energía de cohesión con los dos métodos, obteniendo una energía negativa. Con los funcionales de VWD y DRSLL, la energía de cohesión fue mayor que con PBE. El cristal racémico del prazicuantel también fue optimizado con COMPASS en Discover, con GGA y PBE en SIESTA y con VDW y DRSLL también en SIESTA, obteniendo unos parámetros de celda próximos a los experimentales.

En cuanto a los estudios espectroscópicos, se calculó el espectro Raman de los conformeros *syn* y *anti* con el programa DMOL3, así como también, el espectro de infrarrojos del cristal RS con mecánica clásica con el campo de fuerza COMPASS en Discover y con DFT en SIESTA y el cristal R con COMPASS para comparar. Todos estos resultados obtenidos fueron comparados también con los datos experimentales y muchas de las bandas pudieron ser asignadas por primera vez, particularmente las bandas $\nu(\text{C-H})$ y $\nu(\text{C=O})$ que experimentalmente no se habían podido asignar hasta el momento.

Por tanto, en esta publicación fueron estudiadas las conformaciones que adopta la molécula de prazicuantel en las distintas estructuras cristalinas del fármaco, la energía de estos conformeros en diferentes medios en fase líquida (etanol y agua) y las propiedades espectroscópicas de infrarrojo y Raman de las distintas estructuras cristalinas del prazicuantel mediante cálculos teóricos basados en mecánica cuántica y mecánica clásica.

MOLECULAR MODELING AND INFRARED SPECTROSCOPY OF THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE CHIRAL ANTIPARASITIC DRUG PRAZIQUANTEL

Ana Borrego-Sánchez^{1,2}, Alfonso Hernández-Laguna¹, C. Ignacio Sainz-Díaz^{1*}

¹Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

ABSTRACT

Anthelmintic praziquantel (PZQ) and its molecular and crystal lattice structures were studied by means of atomistic calculations based on empirical interatomic potentials and quantum mechanical methods (DFT). This chiral drug presents several crystal polymorphs due to the enantiomers (either R or S) or the racemic crystal, and different molecular conformations. The relative configurations of the carbonyl groups in PZQ define these conformations that produce different polymorphs. The polarity of these conformers is quite different and their relative population can vary in media with different polarity. Crystal structures of PZQ were studied by infrared and Raman spectroscopy and their spectroscopical properties were calculated by quantum mechanical methods, assigning many of their bands, and finding a good agreement with experimental data.

Keywords: Conformers, DFT calculations, IR spectroscopy, Polymorphism, Praziquantel, Raman spectroscopy

INTRODUCTION

Nowadays, drugs with asymmetric centers are significant between the whole set of drugs in the world market. Numerous active ingredients used in drugs formulations possess chiral centers which can considerably affect their pharmacological properties [1], causing considerable concern in pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, industrial processes, and marketing [2,3]. Chiral compounds are widely applied on academic research areas and have many industrial applications. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, such as absorption, distribution, metabolism, and excretion, can vary depending on the enantiomer [4], so the study of these properties related with enantiomerism has a great importance from pharmaceutical industry. Hence, the pharmacological efficacy and pharmacodynamic and pharmacokinetic properties for each enantiomer must be studied for the drug clinical studies and commercialization [5]. Therefore, chirality is essential in the efficacy of racemate drugs and the enantiomer distinction is necessary for pharmaceutical laboratories [6], and enantiomer separation is important for the pharmacological activity, mechanism of action, pharmacophore knowledge, and in the whole processes of the pharmaceutical industry [3], even chirality has to do with the toxicity of the drug.

Praziquantel (PZQ) [(RS)-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazin-[2,1a]-isoquinolin-4-one] is the drug of choice in the schistosomiasis treatment. PZQ is a chiral molecule, which can display biological and pharmacokinetics activities different when either the enantiomer or the racemate is delivered in the biological system (*in vivo* or *in vitro*). PZQ is used in therapy as its racemic mixture but the R enantiomer is the only pharmacologically active, and the S-(+)-enantiomer is almost ineffective [7-9]. Nevertheless, the metabolism of both enantiomers still remains unclear. Several properties and behavior of the PZQ enantiomers were studied, such as, in the production method [10], the thermodynamic and solubility properties [11], the differences between enantiomers crystals and racemic drug in the Differential

Scanning Calorimetry (DSC) [3] and the formation of PZQ co-crystals combining the racemic (RS)-PZQ with aliphatic dicarboxylic acids [12]. Recently, a theoretical study of the molecular structure of PZQ has been reported and extended to their crystal structures [13]. The behavior of PZQ is not completely understood yet and additional research at molecular level should be necessary. Hence, in this work a conformational analysis is studied exhaustively and related with the crystal structures of its polymorphs. The spectroscopical properties of IR and Raman are determined and discussed.

COMPUTATIONAL METHODOLOGY

Quantum mechanical calculations of the periodic crystal structure of enantiomers and racemic PZQ was studied by using Density Functional Theory (DFT) with DMOL3 [14] and SIESTA [15] codes, both based on numerical atomic orbitals, within the generalized gradient approximation (GGA) and the Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) correlation exchange functional (some DMOL3 calculations of PZQ conformers were also performed with the revised PBE, RPBE) [16]. Double- ζ polarized (DZP) basis sets were used. In Siesta calculations, norm-conserving pseudopotentials [17], a mesh cut-off energy of 800 Ry, and two k points for the Brillouin zone sampling were used, according to previous calculations [18]. In DMOL3 calculations, pseudopotentials with semi-core correction (DSPP) [14] were used and the calculations were restricted to the Γ point in the irreducible wedge of the Brillouin zone. The threshold for the convergency self-consistent field (SCF) cycles of the energy calculations was 10^{-6} Ha.

The normal vibration modes were studied within the harmonic approximation applying steps of finite displacements on every atom. The frequencies of these vibrational modes were obtained by diagonalizing the dynamical matrix related with the geometrical changes generated. This procedure was applied recently in crystalline systems satisfactorily [19]. The solvation effect was included in some DMOL3 calculations applying the continuum solvation model, COSMO, where a dielectric medium is

applied with a certain permittivity ϵ , as a solvent embedding the solute molecule, and this medium is polarized by the solute charge distribution [20].

On the other hand, previous comparative benchmark calculations have found that the vdW-DF functional better describes the weak van der Waals (vdW) dispersion interactions in organic molecules [21]. The development of this nonlocal correlation functional from first principles was successfully implemented in SIESTA [22]. This vdW-DF functional was used in our SIESTA calculations. For considering the weak vdW and dispersion interactions in the DMOL3 calculations, the DFT-D approach of Tkatchenko and Scheffler was applied by full optimizations in some cases. This is a semiempirical correction, $E_{ij} = f(R_{ij}) \times C_{6ij} \times R_{ij}^{-6}$, to be added to the DFT total energy for each pair (ij) located at a R_{ij} distance, depending on a C_{6ij} dispersion coefficient. A damping function $f(R_{ij})$ is included for avoiding divergence for small values of R . This method has the advantage of including variations in the vdW contributions of atoms to their local chemical environment [23].

In addition, calculations based on empirical interatomic potentials within classical mechanics COMPASS [24] force field (FF) were also performed by using the Discover program of the Materials Studio package [25]. As well as, atomic charges associated to the electrostatic potential (ESP charges) [26] were calculated using quantum mechanical calculations with DMOL3 program and these ESP charges were included in some COMPASS force field calculations.

EXPERIMENTAL SECTION

Praziquantel (PZQ) was purchased from Sigma Aldrich. Raman spectra were recorded as solids using a Micro-Raman dispersive JASCO NRS-5100 spectrophotometer with a resolution of 1 cm^{-1} , and a red diode laser at 785 nm with maximum power of 500 mW (TorsanaStarbright). The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra were recorded as solids with a JASCO 6200 spectrophotometer with Spectra Manager II software with a 0.5 cm^{-1} resolution and a well-plate sampler.

RESULTS AND DISCUSSION

Praziquantel Conformers

Previous conformational analysis [13] related with the main dihedral angles showed that PZQ has two main conformers mainly related to the relative configuration of carbonyl groups: *anti*, where both carbonyl groups are in the opposite side with respect to the central heterocyclic ring (Figure 1a); and *syn*, where the carbonyl groups are in the same side with respect to the heterocyclic ring (Figure 1b). For achieving both conformers, mainly an internal rotation around $\text{cyclohexylCO-N}_{\text{heterocyclic}}$ bond is produced.

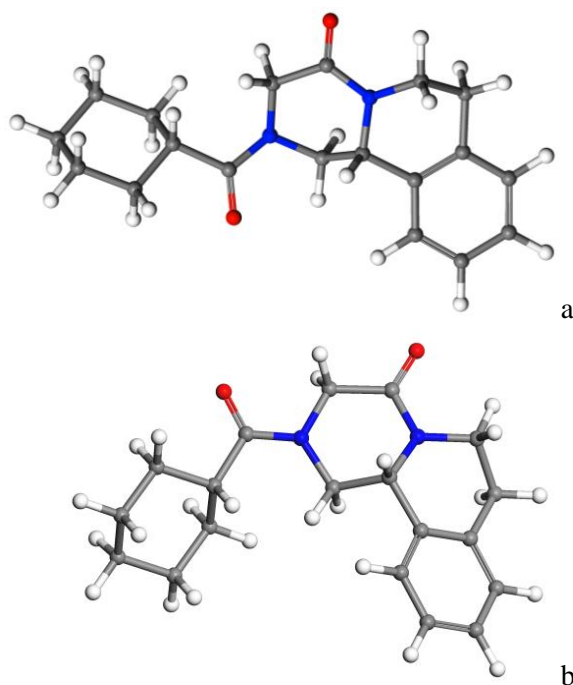


Figure 1. Conformers *anti* (a) and *syn* (b) of the PZQ molecule.

Both conformers have similar energy, being slightly more stable the *anti* conformer in the gas phase, as isolated molecule, by all methods applied (Table 1). This energy difference is bigger with DFT than with COMPASS FF. In a preliminary conformational analysis of the potential

energy surface of the OC(Cy)-NCH₂CO angle rotation, which defines these conformers, the internal rotation energy barrier between both conformers was estimated to be close to 10 kcal/mol in COMPASS FF [13]. However, in an exhaustive search of the transition state (TS) for the transformation path from the conformer *anti* to the *syn*, by using DFT/RPBE and the Linear Synchronous Transit/Quadratic Synchronous Transit (LST/QST) method, a TS was found with an angle between the carbonyl groups, (O=C...C=O) close to 90°. However, the conformation change does not depend only on this dihedral angle, because during this rotation some repulsions appear between the H atoms of heterocycle and cyclohexyl group forcing a slight rotation of the cyclohexyl group with respect to the heterocycle.

The energy difference between the *syn* and *anti* conformers calculated with other correlation-exchange functional, PBE, is smaller than that from RPBE calculations (Table 1). Applying dispersion correction for weak interactions in the DFT calculations, the energy difference decreased. On the other hand, the conformer *syn* is more polar ($\mu=6.3$ D in RPBE DFT calculations) than the *anti* one ($\mu=1.5$ D). This means that the conformer population can change with the polarity of the media. Then, we simulated the solvent effect in the DFT calculations by geometrical optimizations considering water and ethanol as solvents. The energy difference between both conformers decreases with increasing the polarity of media following the sequence (vacuum>ethanol>water). Using dispersion correction with DFT calculations, the conformer *syn* is more stable than the *anti* one. This result is very interesting because PZQ is very soluble in EtOH and in this medium the *syn* conformer can mainly be present in the dissolutions of PZQ and polymorphic changes can be produced in the dissolution-recrystallization process.

Table 1.- Relative energy (in kcal mol⁻¹) of the main conformers of PZQ optimized at different conditions with DMOL3.

| Method | Medium ^a | $\Delta E (E_{anti} - E_{syn})$ |
|--------------------|---------------------|---------------------------------|
| RPBE | Vacuum | -1.609 (-0.525) ^b |
| RPBE | Ethanol | -0.524 |
| RPBE | Water | -0.427 |
| PBE | Vacuum | -1.140 |
| PBE | Ethanol | -0.605 |
| PBE | Water | -0.508 |
| DFT-D ^c | Vacuum | -0.798 |
| DFT-D ^c | Ethanol | +0.084 |
| DFT-D ^c | Water | +0.141 |

^a Vacuum means without solvent effect and in the rest of media the COSMO method was applied. ^b Calculated with the COMPASS FF. ^c DFT with dispersion correction.

The main geometric measurements of PZQ conformers optimized with different functionals are compared with experimental data (Table 2). The geometrical differences can be due to the intermolecular interactions in the crystal forms. Generally, these calculated values are slightly larger than the experimental ones. This difference is more remarkable in the $d(\text{OC-N})$ bond length. Probably the intermolecular interactions through the carbonyl groups increase the π electron delocalization along the amide group decreasing the OC-N bond length. Indeed, in the crystal structure of (RS)-PZQ optimized at variable volume with SIESTA, the molecules of PZQ with the shortest $d(\text{C=O})$ bonds also show the longest $d(\text{OC-N})$ bonds. In both experimental and calculated geometries for both conformers the $d(\text{OCcy -N})$ distance is longer than the other $d(\text{OC-N})$ bonds. The values calculated with PBE are slightly closer to experimental data than the RPBE ones. The dispersion correction did not significantly improve the geometric values. In the crystal (RS)-PZQ, after optimization at variable volume with DFT-vdW functional in SIESTA, the bond

lengths of the molecules are longer than those measured in the experimental crystal and those calculated in the isolated molecule conformers.

Table 2. Main geometrical features (bond lengths in Å and bond angles in degrees) of calculated molecular structure of PZQ conformers optimized as isolated molecules. cy = cyclohexyl.

| Parameters ^a | <i>ANTI</i> | | | | <i>SYN</i> | | | |
|--|------------------|--------|--------|-------------------|------------------|--------|--------|-------------------|
| | EXP ^b | RPBE | PBE | DFTD ^c | EXP ^d | RPBE | PBE | DFTD ^c |
| d(C=O) | 1.227 | 1.239 | 1.235 | 1.235 | 1.223 | 1.237 | 1.234 | 1.233 |
| d(C=O) _{cy} | 1.233 | 1.239 | 1.236 | 1.236 | 1.229 | 1.238 | 1.235 | 1.234 |
| d(OC-N ₁) | 1.346 | 1.378 | 1.371 | 1.371 | 1.350 | 1.383 | 1.378 | 1.378 |
| d(OC _{cy} -N ₂) | 1.357 | 1.396 | 1.387 | 1.385 | 1.360 | 1.394 | 1.384 | 1.384 |
| d(H ₂ C-N ₁) | 1.460 | 1.471 | 1.462 | 1.461 | 1.453 | 1.471 | 1.462 | 1.461 |
| d(HC-N ₁) | 1.469 | 1.482 | 1.473 | 1.472 | 1.461 | 1.478 | 1.469 | 1.469 |
| d(H ₂ C-N ₂) | 1.460 | 1.462 | 1.453 | 1.451 | 1.450 | 1.461 | 1.450 | 1.449 |
| d(H ₂ CCOCH ₂ N-N) | 1.453 | 1.462 | 1.453 | 1.452 | 1.453 | 1.472 | 1.457 | 1.455 |
| θ ₁ [O=C...C=O] | -171.3 | -172.5 | -170.9 | -168.0 | ^e | -14.9 | -7.4 | -10.4 |
| θ ₂ [H-C(Cy)-C=O] | 142.3 | 148.9 | 146.6 | 144.2 | ^e | -154.6 | -148.9 | -145.9 |
| θ ₃ [O=C/cyclohexyl plane] | -37.0 | -32.7 | -35.3 | -37.9 | ^e | 26.8 | 30.4 | 33.7 |

^a N₁ is the N atom close to the aromatic ring and N₂ is the N atom close to cyclohexyl group. ^b Extracted from the (R)-PZQ crystal structure of Cedillo-Cruz et al. [27]. ^c With DMOL3 calculations with Tkatchenko dispersion correction. ^d Taken from the (RS)-PZQ crystal structure of Espinosa-Lara et al. [12]. ^e See Table 3.

PZQ conformers in crystal structures

In the experimental and calculated crystal lattice of (R)-PZQ or (S)-PZQ (hemihydrates), all molecules have the conformer *anti* (Figure 2), whereas in the (RS)-PZQ crystal all PZQ molecules are in the

conformer *syn* (Figure 3). In the hemihydrate crystal the dihedral angle of the *anti* conformer is similar for all molecules and the water molecule maintains H bonds with the carbonyl groups from different molecules acting as bridging H bonds. However, in the racemic crystal lattice, the dihedral angle of the *syn* conformer changes having several values depending on the intermolecular interactions. The unit cell of this crystal has 8 PZQ molecules and each has a different dihedral angle. Hence, eight conformations of the *syn* configuration can be found in one unit cell (Figure 4).

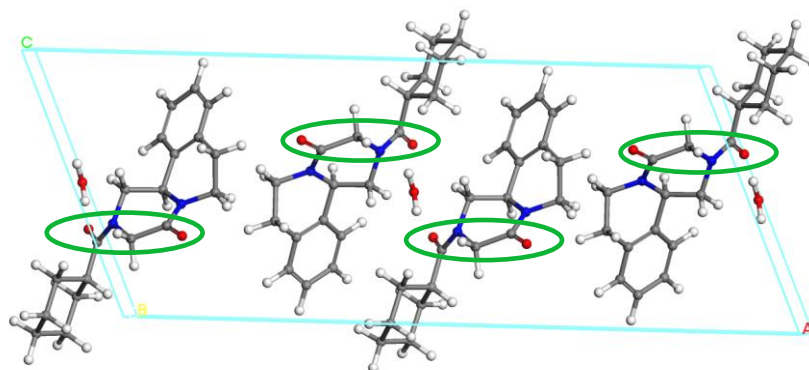


Figure 2. Crystal structure of hemihydrate of (R)-PZQ [28].

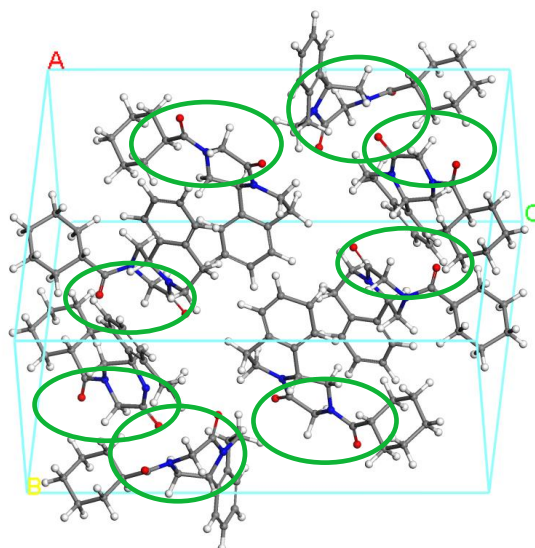


Figure 3. Crystal structure of (RS)-PZQ [12].

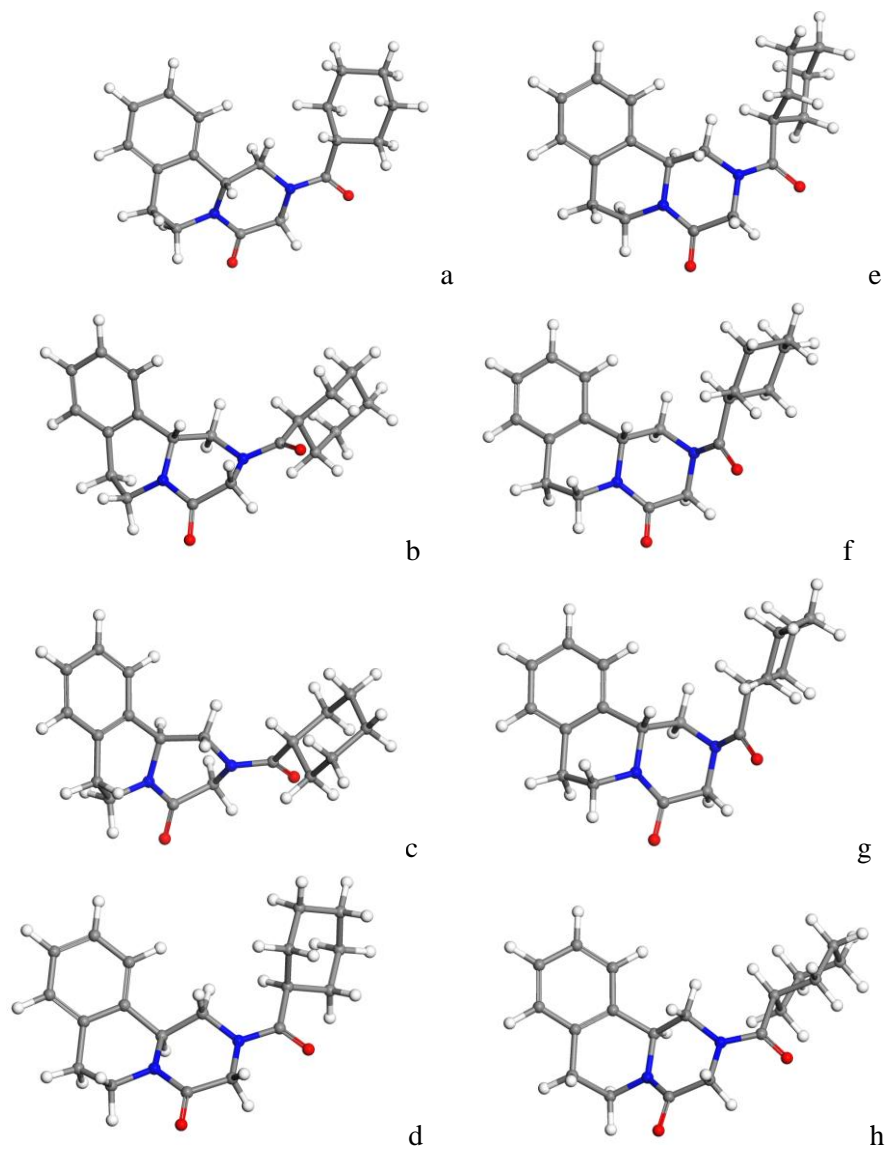


Figure 4.- Conformations of the PZQ molecules in the crystal structure of (RS)-PZQ.

In these *syn* conformations, the changes in the relative angle between the planes of both carbonyl groups affect the rotation of the cyclohexyl group (Table 3). This cyclohexyl ring is in a twisted configuration with respect to the aromatic ring. The conformations *a* and

d are the most coplanar where both carbonyl groups are quasi coplanar. Both conformations are similar and they are enantiomers of each other and, hence, angle values are similar but with opposite sign. The conformations *f* and *h* are similar and they are enantiomers of each other. The carbonyl groups are also quasi coplanar but the cyclohexyl ring is more twisted than the former *a/d* conformations. The conformations *b* and *c* have similar molecular structure and dihedral angles and they are enantiomers of each other. The carbonyl groups are twisted of each other and the heterocyclic moiety is more shrunken. The last conformations, *e* and *g*, are similar and enantiomers of each other, where the carbonyl groups are slightly twisted, the heterocyclic moiety are shrunken, and the cyclohexyl ring is closer to the aromatic one. Hence, the longest backbone distances decrease (Table 3).

Table 3. Values of the longest backbone distance (in Å) and main dihedral angles (in degrees) of the PZQ molecule in the existing conformations in the (RS)-PZQ crystal.

| Conformer (enantiomer) | Distance (Å) | θ_1 [O=C...C=O] | θ_2 [H-C(Cy)- C=O] | θ_3 [O=C/cyclohexyl plane] |
|---------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| <i>a</i> (R) | 11.8 | -1.61 | -138.88 | -48.88 |
| <i>b</i> (R) | 12.0 | -58.71 | -147.92 | -57.92 |
| <i>c</i> (S) | 11.8 | 37.4 | 167.83 | 77.83 |
| <i>d</i> (S) | 11.6 | 1.67 | 146.59 | 56.59 |
| <i>e</i> (S) | 11.4 | -10.64 | 140.71 | 50.71 |
| <i>f</i> (R) | 11.8 | 4.47 | -162.28 | -72.28 |
| <i>g</i> (R) | 11.6 | -16.51 | -138.94 | -48.94 |
| <i>h</i> (S) | 11.9 | 4.90 | -154.97 | -64.97 |

With the optimization of the (RS)-PZQ crystal lattice, the cohesion energy of the formation of these crystals was calculated with SIESTA and PBE.

The cohesion energy (E_{COH}) is the difference among the energy of the (RS)-PZQ crystal (E_{RS}) optimized at variable volume and the energy of each PZQ molecule isolated ($E_{\text{PZQ MOL}}$):

$$E_{\text{COH}} = E_{\text{RS}} - 8E_{\text{PZQ MOL}}$$

With both methodologies the crystal formation is exothermic and the process is thermodynamically stable with negative cohesion energy. This energy is higher with the crystals lattice relaxed at variable volume than in those optimized at fixed volume. By using the Van der Waals (VWD) exchange-correlation functional and Van der Waals density functional (DRSLL), the cohesive energy is higher (-41.5183 eV) than with PBE functional (-25.5108 eV). This indicates the strong significance of the Van der Waals intermolecular interaction inside the PZQ crystal structure.

Spectroscopical properties

In a previous work, the infrared spectra of both conformers of the PZQ molecule were simulated [13]. In this work, the Raman spectra of both *syn* and *anti* conformers of PZQ molecule were simulated with DMOL3 and the IR frequencies of the crystal structure of (RS)-PZQ were calculated and compared with experimental data.

Raman spectra

The Raman spectra of the optimized molecular structures of the *syn* and *anti* conformers of PZQ were calculated (Figure 5). The relative intensity of the $\nu(\text{C-H})$ bands are higher than in the IR spectra and, on the contrary, the intensity of the $\nu(\text{C=O})$ bands are smaller than in IR. Both spectra are similar and the only differences are related with the relative intensities (Figure 5). The splitting of the $\nu(\text{C=O})$ bands was observed for both conformers corresponding to the two carbonyl groups in the molecule. The $\nu(\text{C=O})$ of the carbonyl joined to the cyclohexyl appears at lower frequency than the carbonyl group of the heterocycle. A slight

difference in frequencies can be detected between both conformers. These $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands appear at 1638 and 1671 cm^{-1} in *syn*, whereas these bands appear at 1636 and 1663 cm^{-1} in *anti*. The splitting was also observed in the experimental $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands and they appear at slightly lower frequency (1625 and 1647 cm^{-1}) than those of the calculated conformers, possibly due to the intermolecular interactions in the crystal structure. A good agreement was observed in the $\delta(\text{CH})$ frequency of the aromatic groups appearing at 1582-1605 cm^{-1} in experiment, at 1569-1586 cm^{-1} in the *syn* conformer and at 1563-1591 cm^{-1} in *anti*. The slightly higher frequencies of the experimental bands are probably due to the intermolecular interactions in the crystal structure.

Some differences in relative intensities are observed in the zone of 1100-1400 cm^{-1} , where the modes $\delta(\text{CH})$, $\gamma(\text{CH})$, and $\nu(\text{CN})$ can appear overlapped. The intramolecular interactions during these vibrations are different in each conformer. In both conformers the most intense band is the $\gamma(\text{CH})$ that appears at 1029-1041 cm^{-1} for *syn*, 1037 cm^{-1} for *anti*, observing the same in the experimental Raman spectrum of the crystalline powder of (RS)-PZQ at 1044 cm^{-1} (Figure 5). In the same way, the characteristic $\delta(\text{CH})$ mode of the CH_2CO groups show two bands at 1443 and 1464 cm^{-1} for the conformer *syn*, and 1436 and 1460 cm^{-1} for *anti*, being consistent with the experimental bands observed at 1422 and 1444 cm^{-1} . The band that appears at lower frequency is assigned to the NCH_2CO group and the band of higher frequency corresponds to the CCH_2CO group that is in β position to the aromatic ring.

The experimental Raman spectrum cannot show clearly that the main conformer of PZQ in this crystal is the *syn* one, due to the presence of different conformations in the crystal structure of (RS)-PZQ (Table 3) and the medium- and long-range disorder observed in the distribution of these conformations along the crystal lattice [13].

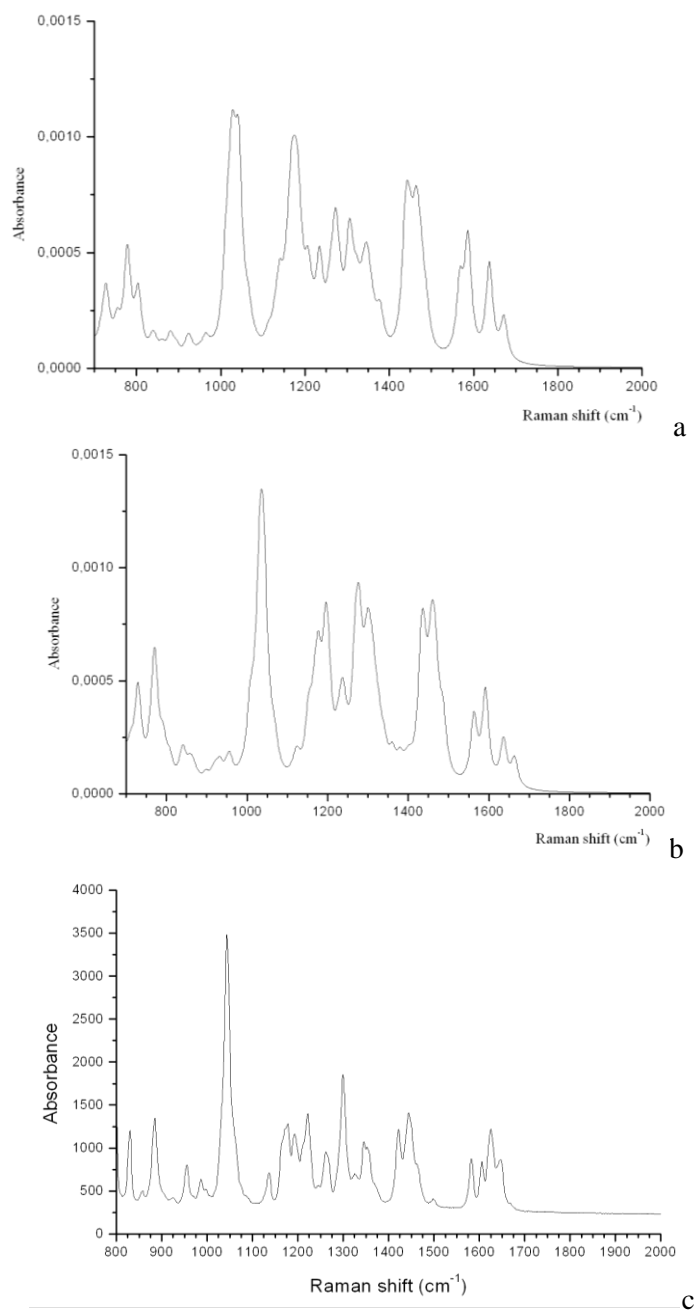


Figure 5.- Raman spectra of the conformers *syn* (a), and *anti* (b) of PZQ calculated with DMOL3, and the experimental one of the (RS)-PZQ solid (c).

Calculated infrared spectra of the PZQ crystal structure.

The crystal structure of (RS)-PZQ was optimized with different methods obtaining cell parameters of the crystal lattice close to the experimental values (Table 4). The different methods used to calculate them do not present meaningful differences. The axis lengths calculated by COMPASS FF are as close to experimental ones as those calculated by DFT, whereas the crystallographic angles calculated by DFT are closer to experiment than those from COMPASS (Table 4). In all cases the conformer of the PZQ molecules remained the *syn* one.

Table 4. Cell lattice parameters of the (RS)-PZQ crystal structure fully optimized structure at variable volume (distances in Å and angles in degrees).

| Cell parameters | Experimental ^a | COMPASS | SIESTA_G,P ^b | SIESTA_V,D ^c |
|-----------------|---------------------------|---------|-------------------------|-------------------------|
| <i>a</i> | 10.45 | 10.35 | 10.30 | 10.30 |
| <i>b</i> | 15.11 | 15.02 | 14.60 | 14.39 |
| <i>c</i> | 22.96 | 23.23 | 22.59 | 22.42 |
| α | 99.5 | 95.6 | 96.8 | 96.8 |
| β | 98.4 | 96.7 | 99.5 | 99.5 |
| γ | 108.3 | 111.3 | 109.6 | 109.4 |

^a Experimental (RS)-PZQ crystal structure [12]. ^b Calculated with SIESTA, GGA and PBE. ^c Values calculated with SIESTA GGA plus van der Waals functional (VDW and DRSSL).

Most of the experimental IR spectra were performed as crystal solids mixed with KBr and these spectra were compared with calculated spectra of the isolated PZQ molecule [13]. In this work, the frequencies of the main vibration normal modes of the (RS)-PZQ crystal structure were calculated using the COMPASS-FF and SIESTA methods (Table 5). The IR frequencies of the (R)-PZQ crystal were also studied using COMPASS-FF for comparison. Previous experimental spectra of PZQ showed characteristic bands in the 3028-2852 cm⁻¹ range, they were assigned to stretching ν (CH) vibrations of CH and CH₂ groups [29-33]. Also, ν (C=O) bands were reported with some discrepancies in the 1736-

1627 cm^{-1} range [29-31, 33] and bands assigned to $\delta(\text{CH})$ and $\nu(\text{CN})$ were observed around 1450-1200 cm^{-1} [31-32] (Table 5).

Table 5. Calculated vibrational frequencies (cm^{-1}) of the PZQ crystal structures and experimental data.

| Mode | COMPASS ^{a,b} | SIESTA ^a | COMPASS ^{b,c} | Exp. ^d | Exp. ^e |
|--|---|--|---|-------------------|---|
| $\nu_{\text{as}}(\text{CH})_{\text{ar}}^f$ | 3114-3063, 3057-3044 | 3165-3099, 3087-3086 | 3091-3087, 3080-3051 | 3028-2852 | 3080-3000 |
| $\nu(\text{CH})_{\text{paCO}}^g$ | 3016-2981 ^h , 2974-2954 ⁱ | 3109-3108 ⁱ , 3104-3093 ^h , 3078-3068 ⁱ , 3049-3036 ^h | 3027-3025 ⁱ , 3005-2995 ^h | 3028-2852 | 2950 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\alpha\text{ar}}^j$ | 3005-2973 _{as} , 2935-2928 _s | 3076-3036 _{as} , 3011-2953 _s | 2975-2969 _{as} , 2927-2923 _s | 3028-2852 | 2900 |
| $\nu(\text{CH})_{\text{peCO}}^k$ | 2946-2917 ^h , 2906- 2881 ⁱ | 3012-3011 ⁱ , 2994-2978 ^h , 2976-2958 ⁱ | 2954-2944 ^h , 2927-2924 ⁱ | 3028-2852 | 2900 |
| $\nu(\text{CH}_2)_{\text{cy}}^l$ | 2994-2901 | 3062-2952 | 2982-2901 | 3028-2852 | 2850 |
| $\nu(\text{CH})_{\text{ch}}^m$ | 2927-2888 | 2942-2918 | 2929-2923 | 3028-2852 | 2850 |
| $\nu(\text{CO})$ | 1723-1722 ⁿ , 1685-1679 ^p | 1693-1661 | 1714-1709 | 1736-1627 | (1680- 1650) _{sh} , 1646, 1620 |
| $\nu(\text{CO})_{\text{cy}}^q$ | 1704-1703 ⁿ , 1697-1694 ^p | 1664-1657, 1653-1641 | 1700-1698 | 1736-1627 | (1680-1650) _{sh} 1646, 1620 |
| $\delta(\text{CH})_{\text{ar}}^f$ | 1672-1512 | 1512-1504, 1468 | 1660-1513 | 1450-1200 | 1590-1450 |
| $\delta(\text{CH})_{\text{cy}}^l$ | 1505-1200 | 1447-1210 | 1487-1202 | 1450-1200 | 1450-1300 |
| $\delta(\text{CH})$ | 1662-1495 ^r | 1437 ^s | 1542-1539 ^r | 1450-1200 | 1350-1021 |
| $\gamma(\text{CH})$ | 1388-1216 ^r | 1374-1371 ^s | 1363-1224 ^r | - | 1200-1000 |

^a Racemic (RS)-PZQ crystal structure. ^b Calculated with COMPASS FF with ESP charges. ^c Crystal structure of (R)-PZQ. ^d [29-33]. ^e Our experimental data (Figure 6), sh = shoulder. ^f CH bonds of the aromatic ring. ^g Stretching of the C-H bond parallel to the carbonyl bond. ^h Close to aromatic ring. ⁱ Close to cyclohexane. ^j Stretching of the CH in α position with respect to the aromatic ring, *as* = asymmetric, *s* = symmetric. ^k Stretching of the C-H bond perpendicular to the carbonyl bond. ^l CH₂ bonds of the cyclohexyl group. ^m Stretching of the CH of the chiral carbon. ⁿ Conformer *syn* with carbonyl groups in twisted planes. ^p Conformer *syn* with coplanar carbonyl groups. ^q Symmetric stretching of the CO joined to the cyclohexyl group. ^r CH group joined to the COCH₂N group. ^s C-H bond parallel or perpendicular to the carbonyl bond.

In the (RS)-PZQ crystal structure calculated with COMPASS force field, the stretching $\nu(\text{CH})$ of the aromatic ring appears in the ranges of 3114-3063 cm^{-1} and 3057-3044 cm^{-1} . The bands of $\nu(\text{CH})$ for the alicyclic CH bonds oriented in a parallel disposition with respect to the carbonyl bond appear at lower frequencies. Two of these CH bonds can be differentiated, those whose $\nu(\text{CH})$ appears at higher frequency are closer to the aromatic ring and the others are closer to the cyclohexyl moiety. The $\nu(\text{CH})$ bands of the alicyclic CH_2 group, which is in α position to the aromatic ring, appear at slightly lower frequencies and the symmetric and asymmetric modes can be distinguished. In the other alicyclic CH_2 group, the C-H bonds, which are oriented in a perpendicular disposition with respect to the carbonyl bond, show a $\nu(\text{CH})$ band at lower frequencies than those that are parallel to CO group. In these alicyclic C-H bonds, also those close to aromatic ring can be distinguished from those close to cyclohexyl ring. The $\nu(\text{CH})$ mode of the cyclohexyl CH_2 groups appears in the same range of other CH_2 groups. The $\nu(\text{CH})$ band of the CH bond on the asymmetric C atom appears at the lowest frequency zone (2927-2888 cm^{-1}) of the rest of CH bonds. The $\nu(\text{CH})$ frequencies calculated with DFT are slightly higher than those from COMPASS force field, nevertheless the sequence are similar except in the alicyclic CH_2 groups with both, parallel and perpendicular orientations with respect to C=O bond, where the group close to the cyclohexane shows higher frequency. In this frequency zone the (R)-PZQ crystal shows similar frequencies to the (RS) one. The experimental frequency range is within the calculated range in this work, however, no specific assignments were reported in previous studies. So, our calculations let us to propose tentatively more detailed assignments (Table 5).

A complex multiband group is observed in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ zone of our FTIR spectrum (Figure 6). Different frequency values were reported previously within a wide range (1736-1627 cm^{-1}) and no detailed assignment was reported. Our calculation distinguishes the $\nu(\text{C}=\text{O})$ mode of the heterocyclic carbonyl and that of the carbonyl group joined to

cyclohexyl. All PZQ molecules in this (RS)-PZQ crystal are as a *syn* conformer, however, each molecule has a different angle between the carbonyl planes showing different $\nu(\text{C}=\text{O})$ frequency. We can consider two groups: one with the C-C=O planes twisted ($\theta > 30^\circ$) that appears at high frequency and the other where both groups are co-planar with lower $\nu(\text{C}=\text{O})$ frequency. This last conformation is more common in the (RS)-PZQ crystal (Table 3). The high frequency bands of twisted carbonyl groups for heterocyclic and cyclohexyl C=O groups can be assigned to the shoulders observed at the high frequency slope of the experimental bands.

The aromatic $\delta(\text{CH})$ bands appear at higher frequency than those of the cyclohexyl ring. However, these modes are coupled and they do not allow a clear assignment to the experimental bands observed in the 1550-1000 cm^{-1} range.

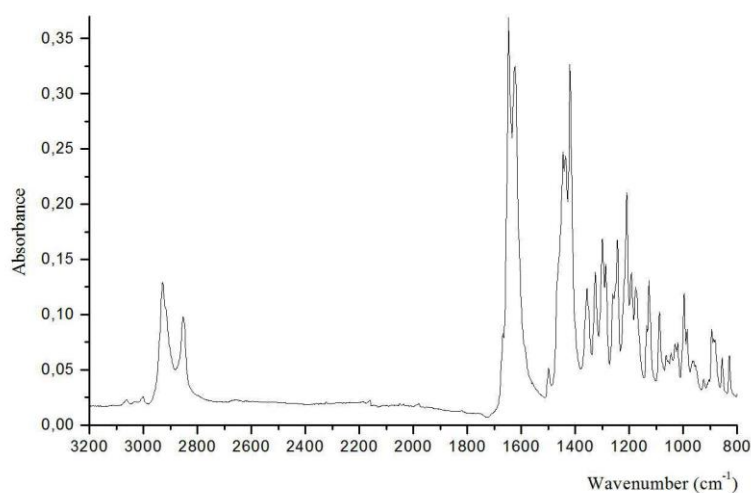


Figure 6.- Experimental FT-IR spectrum of the (RS)-PZQ crystal.

CONCLUSIONS

Two main conformers related with the carbonyl groups relative positions can be distinguished in PZQ conformers *syn* and *anti*, and they are critical to define the crystal structure, the spectroscopic properties and the biological activity of PZQ. However, the transformation from one conformer to the other is more complex than a simple bond rotation and several geometric changes are produced during this transformation. This can explain the several variants of conformer *syn*, which are observed in the crystal structure of the racemic (RS)-PZQ.

The higher polarity of the conformer *syn* indicates that this conformer will be more favorable at polar solvents like ethanol or water, and it could be produced in the dissolution-recrystallization process. Probably the relative population of this *syn* conformer will be also higher in its interaction with the receptor in the parasite membrane.

The Raman and IR spectra calculated with the COMPASS FF and DFT agrees with the experimental spectra and let many bands to be assigned. Particularly, the $\nu(\text{C-H})$ and $\nu(\text{C=O})$ bands in the IR spectra can be assigned at definite bonds and groups in the structure, however, $\delta(\text{CH})$ and $\gamma(\text{CH})$ bands appear at low frequency, many modes of them are coupled and cannot be easily assigned.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to the regional Andalusian projects (RNM363 and RNM1897) and MINECO project (FIS2013-48444-C2-2-P) for financial support and to the Supercomputational Center of the University of Granada for computing facilities.

REFERENCES

-
1. Fanali S (1996) Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 735:77-121

2. Liu Y, Wang X, Wang JK, Ching CB (2004) Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel. *J Pharm Sci* 93:3039-3046
3. Liu Y, Wang X, Wang JK, Ching CB (2006) Investigation of the phase diagrams of chiral praziquantel. *Chirality* 18:259-264
4. Guo-Qiang L, Qi-Dong Y, Jie-Fei C (2011) *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, Nueva Jersey, USA
5. Jabor VAP, Bonato PS (2001) Enantiomeric determination of praziquantel and its main metabolite trans-4-hydroxypraziquantel in human plasma by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 22:1399-1405
6. Patel RN (2001) Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Drug Development. *Adv Synth Catal* 343:527-546
7. Andrews P (1985) Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacol Ther* 29:129-156
8. Pax R, Bennett JL, Fetterer R (1978) A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naanyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 304:309-315
9. Staudt U, Schmahl G, Blaschke G, Mehlhorn H (1992) Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni* in vitro. *Parasitol Res* 78:392-397
10. Lim BG, Tan RBH, Ng SC, Ching CB (1995) Solubility phase-diagram of praziquantel enantiomeric system. *Chirality* 7:74-81
11. El-Arini SK, Giron D, Leuenberg H (1998) Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers. *Pharm Dev Techn* 3:557-564

12. Espinosa-Lara JC, Guzmán-Villanueva D, Arenas-García JI, Herrera-Ruiz D, Rivera-Islas J, Román-Bravo P, Morales-Rojas H, Höpfl H (2013) Cocrystals of active pharmaceutical ingredients-praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic and pimelic acids. *Cryst Growth Des* 13:169-185
13. Borrego-Sánchez A, Viseras C, Aguzzi C, Sainz-Díaz CI (2016) Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism. *Eur J Pharm Sci* 92:266-275
14. Delley B (2002) Hardness conserving semilocal pseudopotentials. *Phys Rev B*. 66:155125
15. Soler JM, Artacho E, Gale JD, García A, Junquera J, Ordejón P, Sánchez-Portal D (2002) The Siesta method for ab initio order-N materials simulation. *J Phys Condens Matter* 14:2745-2779
16. Hammer B, Hansen LB, Norskov JK (1999) Improved adsorption energetics within density-functional theory using revised Perdew-Burke-Ernzerhof functionals. *Phys Rev B* 59:7413
17. Troullier N, Martins JL (1991) Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. *Phys Rev B* 43:1993-2006
18. Sainz-Díaz CI, Escamilla-Roa E, Hernández-Laguna A (2005) Quantum mechanical calculations of trans-vacant and cis-vacant polymorphism in dioctahedral 2:1 phyllosilicates. *Am Miner* 90:1827-1834
19. Escamilla-Roa E, Sainz-Díaz CI (2014) Amorphous ammonia-water ice deposited onto silicate grain: Effect on growth of mantles ice on interstellar and interplanetary dust. *J Phys Chem C* 118: 3554-3563
20. Klamt A, Schuurmann G (1993) COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J Chem. Soc Perkin Trans* 2:799-805

21. Carter DJ, Rohl AL (2012) Noncovalent interactions in SIESTA using the vdW-DF functional: S22 benchmark and macrocyclic structures. *J Chem Theory Comput* 8:281–289
22. Roman-Perez G, Soler JM (2009) Efficient Implementation of a van der Waals Density Functional: Application to Double-Wall Carbon Nanotubes. *Phys Rev Lett* 103:096102
23. Tkatchenko A, Scheffler M (2009) Accurate Molecular Van Der Waals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data. *Phys Rev Lett* 102:073005
24. Sun H (1998) COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications-Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J Phys Chem B* 102:7338-7364
25. Accelrys Materials Studio, version v 6.0, 2012. Accelrys Inc., San Diego, USA
26. Besler BH, Merz Jr KM, Kollman PA (1990) Atomic charges derived from semiempirical methods. *J Comput Chem* 11:431-439
27. Cedillo-Cruz A, Aguilar MI, Flores-Alamo M, Palomares-Alonso F, Jung-Cook H (2014) A straightforward and efficient synthesis of praziquantel enantiomers and their 4'-hydroxy derivatives. *Tetrahedron* 25:133-140
28. Meyer T, Sekljic H, Fuchs S, Bothe H, Schollmeyer D, Miculka C (2009) Taste, a new incentive to switch to (R)-praziquantel in schistosomiasis treatment. *PLoS One* 3:357
29. Schepers H, Brasseur R, Goormaghtigh E, Duquenoy P, Ruysschaert JM (1987) Mode of insertion of praziquantel and derivatives into lipid membranes. *Biochem. Pharmacol.* 37:1615-1623
30. Passerini N, Albertini B, Perissutti B, Rodriguez L (2006) Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *Int J Pharm* 318:92-102

31. Mainardes RM, Gremião MPD, Evangelista RC (2006) Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Braz J Pharm Sci* 42:523-530
32. Rodrigues SG, Chaves IS, Melo NFS, de Jesus MB, Fraceto LF, Fernandes SA, de Paula E, de Freitas MP, Pinto LMA (2010) Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 70:19-28
33. Chaud MV, Lima AC, Vila MMDC, Paganelli MO, Paula FC, Pedreiro LN, Gremião MPD (2013) Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate, *Trop J Pharm Res* 12:163-168

IV.3. MEJORA BIOFARMACÉUTICA DEL PRAZICUANTEL POR INTERACCIÓN CON MONTMORILLONITA Y SEPIOLITA

El objetivo 5 se ha abordado en esta sección, dando como resultado datos y análisis recopilados en la siguiente publicación:

Biopharmaceutical improvement of praziquantel by interaction with montmorillonite and sepiolite

A. Borrego-Sánchez, E. Carazo, C. Aguzzi, C. Viseras, C.I. Sainz-Díaz

Appl. Clay Sci. **2018**, 160, 173-179.

En este trabajo se estudió experimentalmente la interacción entre el prazicuantel y las arcillas montmorillonita y sepiolita. Se observó la carga efectiva del fármaco en los minerales arcillosos, así como el aumento significativo de la velocidad de disolución *in vitro* y la cantidad disuelta de prazicuantel, lo que potencialmente mejora la biodisponibilidad y el perfil biofarmacéutico del fármaco.

En primer lugar, se obtuvieron productos de interacción prazicuantel-montmorillonita y prazicuantel-sepiolita mediante la dispersión de las arcillas en una solución de fármaco en etanol puro y la posterior evaporación del disolvente. Esta metodología de preparación de los productos de interacción en ausencia de agua fue una estrategia para mejorar la cantidad de fármaco retenido. Los productos de interacción fueron caracterizados mediante diferentes técnicas y comparados con las materias primas puras. Por difracción de rayos X se observó la desaparición de los picos de fármaco en los productos de interacción. En el caso del producto de interacción prazicuantel-montmorillonita, el espacio interlaminaar aumentó de $d(001) = 12.32 \text{ \AA}$ (montmorillonita pura) a $d(001) = 16.05 \text{ \AA}$, lo que se asoció a la efectiva inclusión de las moléculas de

fármaco en el espacio interlamilar de la montmorillonita. En la calorimetría diferencial de barrido (DSC), el producto de interacción prazicuantel-sepiolita mostró la desaparición del pico de fusión del fármaco, mientras que en el producto de interacción prazicuantel-montmorillonita se observó un pequeño pico de fusión del fármaco a 144 °C. Los resultados del análisis termogravimétrico mostraron la pérdida de masa correspondiente a la descomposición térmica del prazicuantel entre 200-400 °C, corroborando la presencia del prazicuantel en los productos de interacción. En los resultados de microscopía electrónica de barrido, el producto de interacción prazicuantel-montmorillonita mostró cambios relevantes en la textura y morfología del fármaco, encontrándose pequeñas partículas filamentosas de prazicuantel entre las partículas de montmorillonita y observándose una pérdida de cristalinidad del prazicuantel. Las microfotografías del producto de interacción con sepiolita no mostraron rastros de cristales del fármaco puro. En los espectros de infrarrojo, se detectaron bandas típicas del prazicuantel, en ambos productos de interacción, demostrando la presencia del fármaco en estos. Se realizaron ensayos de disolución *in vitro* para estudiar la velocidad de disolución y la cantidad disuelta de fármaco en medio ácido y en fluido intestinal simulado sin enzimas. En ambos medios, los productos de interacción, prazicuantel-montmorillonita y prazicuantel-sepiolita, incrementaron en gran medida la velocidad de disolución con respecto al fármaco puro. Este aumento en la velocidad de disolución fue aún mayor en el fluido intestinal simulado (pH= 6.8), en el cual se aumentó también un 20% aproximadamente la cantidad de fármaco disuelto con respecto al fármaco puro. Este aumento en el fluido intestinal simulado es particularmente importante, debido a que el intestino es el lugar de absorción preferente cuando se administran los fármacos por vía oral.

Por tanto, la preparación de los productos de interacción utilizando un medio polar no acuoso (etanol), mostró una intercalación del prazicuantel en el espacio interlamilar de la montmorillonita y en los canales de la sepiolita, pudiendo ser esta técnica utilizada para otros fármacos poco solubles en agua y muy solubles en disolventes orgánicos. Además, los productos de interacción presentaron un gran aumento en la

velocidad de disolución y en la cantidad disuelta de fármaco, considerándose como alternativa prometedora para mejorar la biodisponibilidad del prazicuantel. Este trabajo ha dado lugar a una solicitud de patente española e internacional.

BIOPHARMACEUTICAL IMPROVEMENT OF PRAZIQUANTEL BY INTERACTION WITH MONTMORILLONITE AND SEPIOLITE

Ana Borrego-Sánchez^{1,2}, Esperanza Carazo², Carola Aguzzi², César Viseras^{1,2}, C. Ignacio Sainz-Díaz¹

¹Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

ABSTRACT

Praziquantel is the drug of first choice for the treatment of the human schistosomiasis. It is administered orally, requiring high doses to overcome adverse biopharmaceutical properties, including high lipophilia and intense hepatic first pass metabolism. According to its biopharmaceutical profile, praziquantel has very low water solubility and high permeability. Therefore, dissolution is the limiting factor for absorption in the gastrointestinal tract. Improvement of the aqueous solubility of the drug would reduce the currently high oral doses. Meanwhile, montmorillonite and sepiolite are clay minerals, with a high adsorption and swelling properties, potentially useful as a low-cost nanocarrier to design praziquantel delivery systems. In this work, the interactions between the drug and clay minerals are studied experimentally, with the aim of improving the biopharmaceutical profile of the drug. The results showed the effective loading of the drug in the clay minerals as well as the significant increase of the dissolution rate and the dissolved amount of praziquantel, potentially improving the bioavailability of the drug.

Keywords: Praziquantel, clay minerals, montmorillonite, sepiolite, schistosomiasis, bioavailability

INTRODUCTION

Clay minerals, in particular montmorillonite and sepiolite, are widely used pharmaceutical excipients in different pharmaceutical dosage forms, designed for oral and topical administration (López-Galindo and Viseras, 2004; Viseras et al., 2007). Besides their classic pharmaceutical uses, clay minerals may be effectively used in the development of modified drug delivery systems (Aguzzi et al., 2007; Viseras et al., 2010).

Montmorillonite is a dioctahedral 2:1 phyllosilicate with one octahedral sheet and two tetrahedral sheets (T:O:T). An interlayer nanospace exists between each triple-sheet-layer. These layers have isomorphic substitutions of Si^{4+} by Al^{3+} in the tetrahedral sheet and Al^{3+} by Mg^{2+} in the octahedral layer. An important part of the physicochemical properties of montmorillonite depends on the isomorphic substitutions that confer a negative residual charge compensated by cations in the interlayer space. These interlayer spaces represent about 90% of the mineral total surface and are accessible to water molecules and other compounds, yielding a high adsorption capacity for polar molecules (Bergaya and Lagaly, 2006; Aguzzi et al., 2007).

On the other hand, sepiolite is a non-planar phyllosilicate with fibrous morphology. The basal oxygen layer is continuous but the apical oxygens undergo a periodic inversion every 8 octahedral positions. This inversion causes a discontinuous octahedral layer forming long channels, where the water and organic molecules can be adsorbed (Guggenheim et al., 2006).

Because of their high adsorption and cation exchange capacities, both montmorillonite and sepiolite are peculiar nanostructured material. These solids can retain organic molecules in their structures and after administration release the retained active compounds under controlled conditions, being good candidates for the design of modified delivery

systems of several drugs (Viseras et al., 2010). Besides the above mentioned clay minerals, halloysite nanotubes have been also exploited as nanocarriers for several applications (Massaro et al., 2016; Makaremi et al., 2017).

Praziquantel is the drug of choice for an extended parasitic disease, schistosomiasis that it is a parasitic disease caused by *Schistosoma*. The infection is caused by the parasite penetration through the skin of individuals, in contact with contaminated water. It is widely extended, mainly in at least 74 developing countries, in the tropics and subtropics (Chitsulo et al., 2000) and it affects 250 million people approximately, causing over half a million of deaths every year (Steinmann et al., 2006). Behind of malaria, the Schistosomiasis is the second of the most prevalent diseases that affects African children (WHO, 2017).

The prevention of the Schistosomiasis is difficult and there is no effective vaccine against the disease. Praziquantel is the most used drug for the treatment of Schistosomiasis (WHO, 2017). However, its extensive use and the lack of compliance during the treatment is causing drug resistance (Wang et al., 2012).

Praziquantel has a chiral center and only the R-(-)-enantiomer possesses anthelmintic activity (Andrews, 1985) even if the actual treatments use a racemic mixture. It is classified in Class II in Biopharmaceutics Classification System (BCS) (FDA, 2017; González-Esquível et al., 2005), due to its low aqueous solubility and high permeability, and has low absorption in the gastrointestinal tract (GIT) (Amidon et al., 1995). For these reasons, high oral doses are required to treat schistosomiasis. The interaction of praziquantel with montmorillonite in aqueous medium was studied by El-Feky et al. (2015). However, the resultant interaction products did not improve *in vitro* dissolution rates neither *in vivo* absorption rates. Probably, as a result of the presence of water molecules in the interlayer space of the montmorillonite, the entry of praziquantel was hindered and the drug was only absorbed on the external surface, resulting in the absence of relevant biopharmaceutical improvements.

With these premises, aim of this work was to obtain praziquantel/clay mineral interaction products in absence of water as a strategy to improve the effective entrapment of the drug molecules. The potential increase in praziquantel solubility was a rational approach to the improvement of drug bioavailability.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Praziquantel (PZQ) was purchased from Sigma Aldrich (S). Ethanol of 99% of purity was used as solvent. Purified pharmaceutical degree Montmorillonite (Veegum HS[®], VHS) was purchased from Vanderbilt Company (USA). The Sepiolite samples from Vicálvaro (Madrid) (SEP) were kindly gifted by TOLSA (S). These solids were used without any pretreatment and were characterized elsewhere (Torres-Ruíz et al., 1994; Viseras and López-Galindo, 1999; Aguzzi et al., 2005).

Methods

Preparation of praziquantel/clay minerals interaction products

Clay powders were dispersed in 100 mL of ethanolic solution of PZQ under magnetic stirring at room temperature for 24 hours, in such way that the clay/drug ratio was 5:1 w/w. After 24 hours, the solvent was evaporated at 40 °C by means a rotary evaporator (Buchi[®] R II, CH) and the solid residue (PZQ-VHS or PZQ-SEP prepared with VHS or SEP, respectively) was stored in a desiccator at room temperature with freshly activated silica-gel grafted with a moisture indicator of Co salt.

X-ray diffraction

Powder X-ray diffraction was performed with a Philips[®]X-Pert diffractometer with the CuK α wavelength. The information of diffraction was analyzed using XPOWDER[®] software (Martín-Ramos, 2005).

Thermal analysis

Differential Scanning Calorimetric analysis (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) were performed with a Mettler Toledo mod. TGA/DSC1 calorimeter, equipped with sensor and FRS5 microbalance (precision 0.1 μg) and FP89 software package, using a heating rate of 5°C/min in the 30-400°C temperature range for TGA and DSC runs and a rate of 2°C/min for additional specific DSC runs. Nitrogen was used as purge gas in DSC under flows of 100 and 15 mL/min.

Scanning electron microscopy (SEM)

Microphotographs of the samples were performed using a Hitachi S-510 scanning electron microscope (voltage 25 kV, secondary electron images) (Hitachi Scientific Instruments Ltd, Tokyo, Japan). The samples were mounted on adhesive paper, fixed with colloidal gold and metallized with gold in two orientations (20-30°). The images were captured digitally using the program ScanVision, Version 1.2.

Fourier Transform Infrared (FTIR) and Raman Spectroscopies

FTIR spectra were recorded in the range 4000-600 cm^{-1} with a 0.5 cm^{-1} resolution and a well-plate sampler (JASCO 6200 spectrophotometer with Spectra Manager II software). Raman spectra were recorded in the range 3500-800 cm^{-1} with a 6.48 cm^{-1} resolution using a Micro-Raman dispersive JASCO NRS-5100 spectrophotometer, with laser light source VIS-NIR with red diode at 785 nm with 500 mW of power (TorsanaStarbright) and refrigeration by air and a KnowItAll JASCO Edition for Raman software.

In vitro release studies

Hard gelatine capsules containing 600 mg of each PZQ-VHS and PZQ-SEP, in which 100 mg correspond to PZQ, were prepared. Similarly, hard gelatine capsules containing 100 mg of PZQ were elaborated as reference. The capsules were subjected to *in vitro* release studies following

the European Pharmacopoeia procedure for dissolution test of solid oral dosage forms. Experiments were carried out using European Pharmacopoeia apparatus 2 with sinkers (Sotax AT7, CH) at 150 rpm, 37 °C, 1 L of dissolution medium (no sink conditions). Two dissolution media were used: i) HCl 0.001 M simulating the stomach physiological fluid; and ii) a simulated intestinal fluid (pH = 6.8) (SIF) without enzymes. At established time intervals, samples of dissolution medium (5 ml) were withdrawn, filtered through 0.45 µm Millipore® (S) membranes and the amount of drug dissolved measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a 1260 Infinity II Agilent equipment (G) with quaternary pump, autosampler, column oven and UV-VIS diode-array spectrophotometer. The stationary phase was a column Kromasyl® C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm (Teknokroma, S) and the mobile phase was a mixture of H₂O and CH₃CN (35:65 v/v). The flow rate was set at 0.8 mL/min with an injection volume of 10 µL. A detector with a wavelength of 225 nm was used and the run time for each analysis was 5 min. Data were recorded and analyzed by using LC Open LAB HPLC 1260 software (Agilent, G). The analytical method was linear in the concentration range 10-50 mg/L of PZQ in both media, resulting in correlation coefficients of 0.9994 (HCl 0.001 M) and 0.9992 (SIF).

RESULTS AND DISCUSSION

X-ray diffraction

The powder XRD patterns of raw components and interaction products are shown in Figure 1. PZQ showed the most intense reflection at around 16.5° (2θ units) and other intense reflections at approximately 8.0°, 19.1° and 23.3° (2θ units) according with that previously reported (El-Subbagh, 1998). After interaction with the clay minerals, complete absence of drug reflections was probably due to a loss of crystallinity of PZQ. In previous works a similar behavior of PZQ was observed in the formation of a solid dispersion with PVP (polyvinylpyrrolidone) (De la Torre et al., 1999) and with sodium starch glycolate (Chaud et al., 2013).

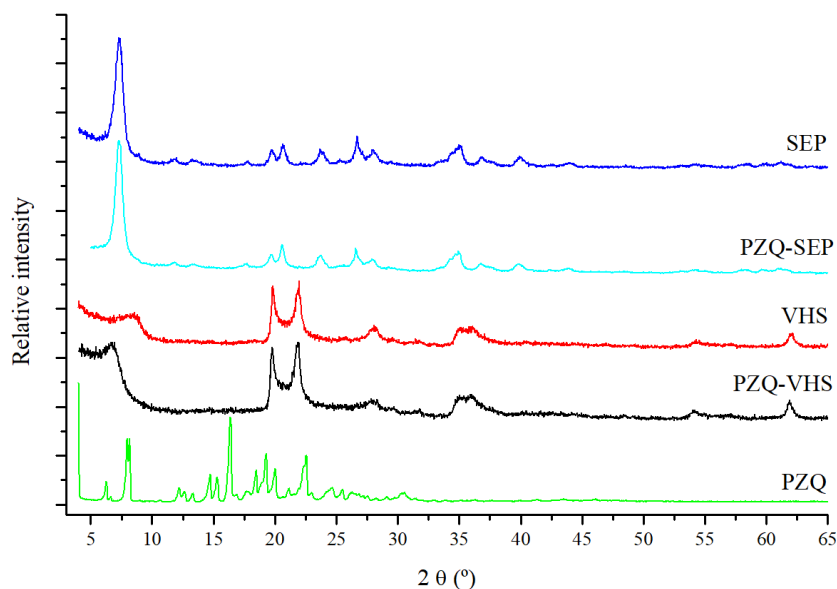


Figure 1. XRPD patterns of the studied samples.

As a result of the interaction with the drug, diffraction patterns of SEP did not show changes, whereas VHS patterns evidenced significant changes in some reflections. In particular, reflection corresponding to $d(001)$ of VHS shifted to lower angles after interaction with the drug. The resultant interlayer spaces changed from 12.32 Å in the pristine VHS to 16.05 Å in PZQ-VHS, clearly suggesting the effective inclusion of drug molecules in the clay mineral interlayer.

Thermal analysis

The DSC profiles of PZQ showed a strong endothermic peak at 144 °C with enthalpy $\Delta H = -90.41 \text{ Jg}^{-1}$, corresponding to the melting of the (RS)-PZQ crystals (Fig. 2) and with no loss of weight in TGA curve (Fig. 3). Calorimetric profiles of VHS and SEP showed broad endothermic peaks in the range 50-90 °C, corresponding to the evaporation of water. As a result of interaction, DSC profile of PZQ-SEP showed only a very low intensity peak corresponding to water evaporation and complete disappearance of melting peak of the drug. In PZQ-VHS profile water evaporation was also evident as well as a small peak corresponding to the melting of the drug,

with $\Delta H = 1.86 \text{ Jg}^{-1}$. The crystallinity degree of the drug in the interaction product, calculated as $\Delta H_{\text{melting}}(\text{PZQ/VHS})/\Delta H_{\text{melting}}(\text{pure PZQ})$, was approximately 2%. Similar approach was proposed by Cavallaro et al. (2013), studying the amorphization of polyethylene glycol in polymer/clay composites. The obtained results showed that amorphization of the PZQ occurs in the prepared interaction products, explaining the lack of the PZQ reflections in the PZQ-VHS and PZQ-SEP powder XRD patterns. This amorphization is slightly higher in PZQ-SEP product.

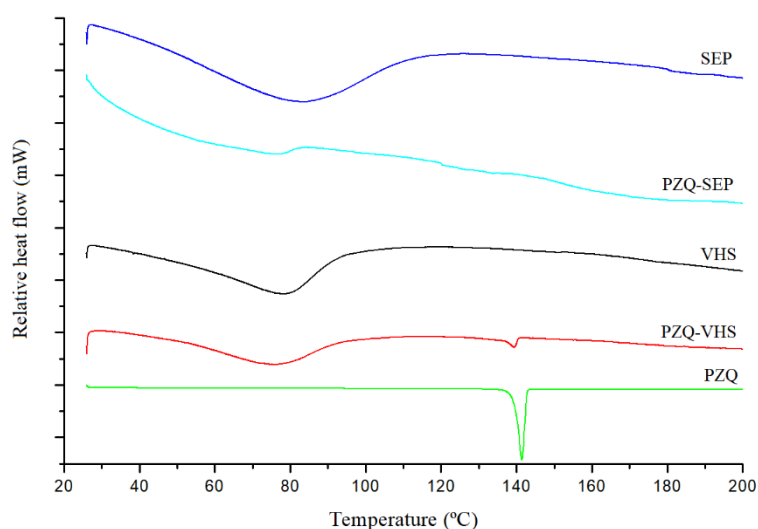


Figure 2. DSC profiles of the studied samples.

Thermogravimetric profiles of the clay minerals showed a weight loss (2 % w/w and 10 % w/w), corresponding to evaporation of adsorbed water molecules from VHS and SEP surfaces, respectively (Figure 3). Second weight loss of the sepiolite sample in the interval 250-350 °C corresponded to loss of zeolitic water (Viseras and López-Galindo, 1999). In the interaction products, thermal decomposition of the drug resulted in weight losses in the range between 200 and 400 °C, corroborating the adsorption of the PZQ in these mineral solids.

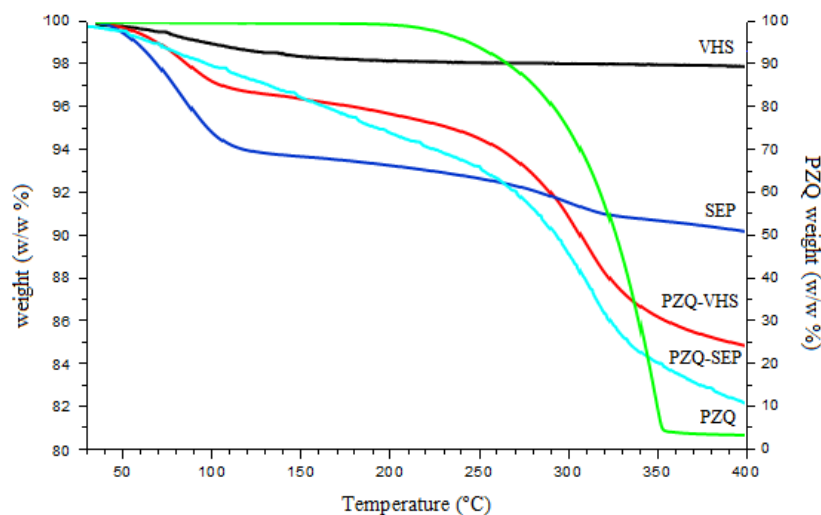


Figure 3. TGA profiles of the studied samples.

Electron Microscopy

The microphotographs of the praziquantel (Figure 4A-B) presented elongated prismatic morphology and crystal sizes $> 100 \mu\text{m}$, similar to those of PZQ racemic mixtures previously observed (Liu et al., 2004; Espinosa-Lara et al., 2013).

SEM microphotographs of montmorillonite (Figure 4C-D) showed grains with different particle sizes. Particles associated with any impurities were not detected, corroborating the XRD results. In the SEM microphotographs of the PZQ-VHS interaction product, significant changes of texture and morphology were observed (Figure 4E-F). Filamentous particles of praziquantel were observed between the montmorillonite particles, as well as, the amorphization and the loss of the crystalline structure of praziquantel. The initial PZQ particles disappeared and PZQ formed aggregates in the montmorillonite particles during the dispersion and solvent evaporation process. The amorphization of a portion of the praziquantel and the formation of these small size crystalline fibers may also justify the low crystallinity and the previous lack of XRD

reflections in this IP mixture (PZQ-VHS), corroborating XRD diffraction and the DSC results.

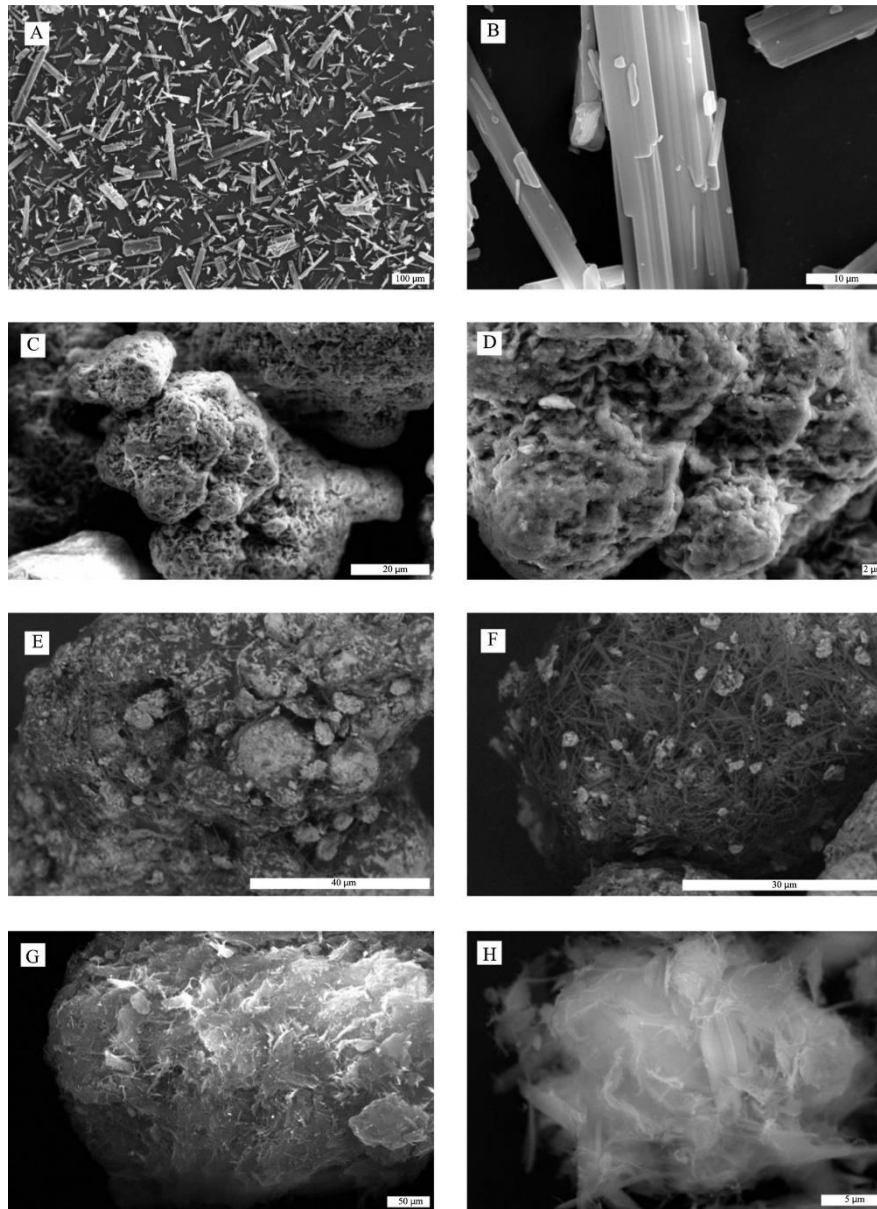


Figure 4. SEM microphotographs of PZQ (A-B), VHS (C-D), PZQ-VHS (E-F) and PZQ-SEP (G-H).

Sepiolite morphologies were described previously as being constituted by grains with different particle sizes formed by fibrous particles (Viseras and López-Galindo, 1999; Suárez and García-Romero, 2012). In PZQ-SEP microphotographs, these well-known characteristics were observable, as well as the absence of crystalline praziquantel, due to the total amorphization of the drug, corroborating the DSC and the XRD results (Figure 4G-H).

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FTIR spectra of the racemic PZQ, sepiolite, montmorillonite and the interaction products (PZQ-VHS and PZQ-SEP) are compared in Figure 5. PZQ showed two main characteristic bands in the range $2960\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ assigned to stretching vibration modes $\nu(\text{CH})$ of CH and CH_2 groups (Rodrigues et al., 2010). Two bands corresponding to the $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibration mode were observed at $1665\text{-}1621\text{ cm}^{-1}$ (Rodrigues et al., 2010), which were assigned to each carbonyl group with different local environment in the crystal packing (Borrego-Sánchez et al., 2017). The $\delta(\text{C-H})$ and $\nu(\text{C-N})$ modes were observed around $1350\text{-}1021\text{ cm}^{-1}$ (Passerini et al., 2006). These experimental values coincide with previous theoretical data that completed the infrared spectra of praziquantel, assigning new bands not identified experimentally, both in the molecule (Borrego-Sánchez et al., 2016) and in the crystalline structure of praziquantel (Borrego-Sánchez et al., 2017).

The spectra of montmorillonite and sepiolite showed characteristic bands of the clay minerals at $3700\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ of the octahedral OH groups, $\nu(\text{AlOHAl})$ $\nu(\text{AlOHMg})$, $\nu(\text{MgOHMg})$, $1680\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ($\delta(\text{OH water})$) and $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{Si-O})$) (Frost et al., 2001; Ortega-Castro et al., 2009). In PZQ-VHS and PZQ-SEP, the bands of PZQ were detected which means that the drug was present in the interaction product, although no clear differences could be observed due to the high proportion of clays, whose bands overlap those of PZQ.

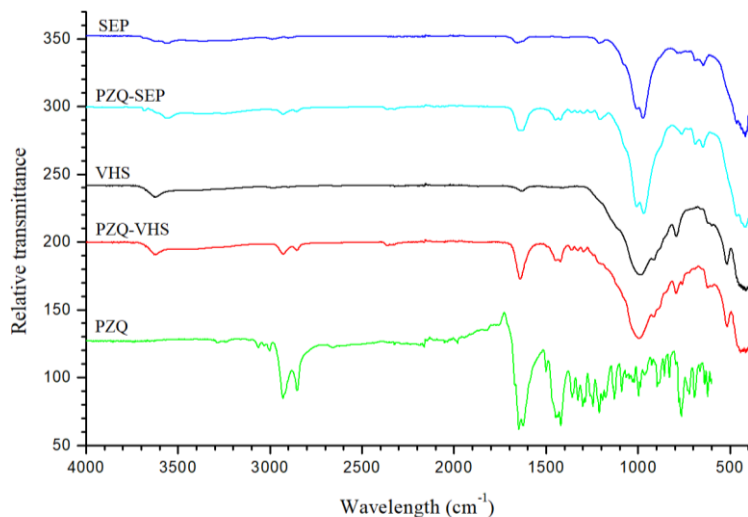


Figure 5. FTIR spectra of the studied samples.

In vitro release studies

Drug release profiles of PZQ and the two interaction products are shown in Figure 6. PZQ dissolution rate was higher in acidic medium (Figure 6 up) than in intestinal fluid (Figure 6 down), in concordance with its pH dependent solubility. As it was reported by Chaud et al. (2010), solubility of PZQ was 0.735 mg/mL and 0.454 mg/mL in HCl and phosphate buffer, respectively. Interaction of the drug with the clay minerals induced an increase in dissolution rates with independence of pH. This improvement is particularly important in phosphate buffer (Figure 6 down), being the intestinal environment the preferential site of absorption of orally administered drugs. The final amount of drug dissolved from the interaction products increased approximately a 20% in simulated intestinal fluid with respect to the pure PZQ. Therefore, PZQ-VHS and PZQ-SEP interaction products might improve oral bioavailability of the drug by increasing both dissolution rate and amount of drug dissolved in FIS.

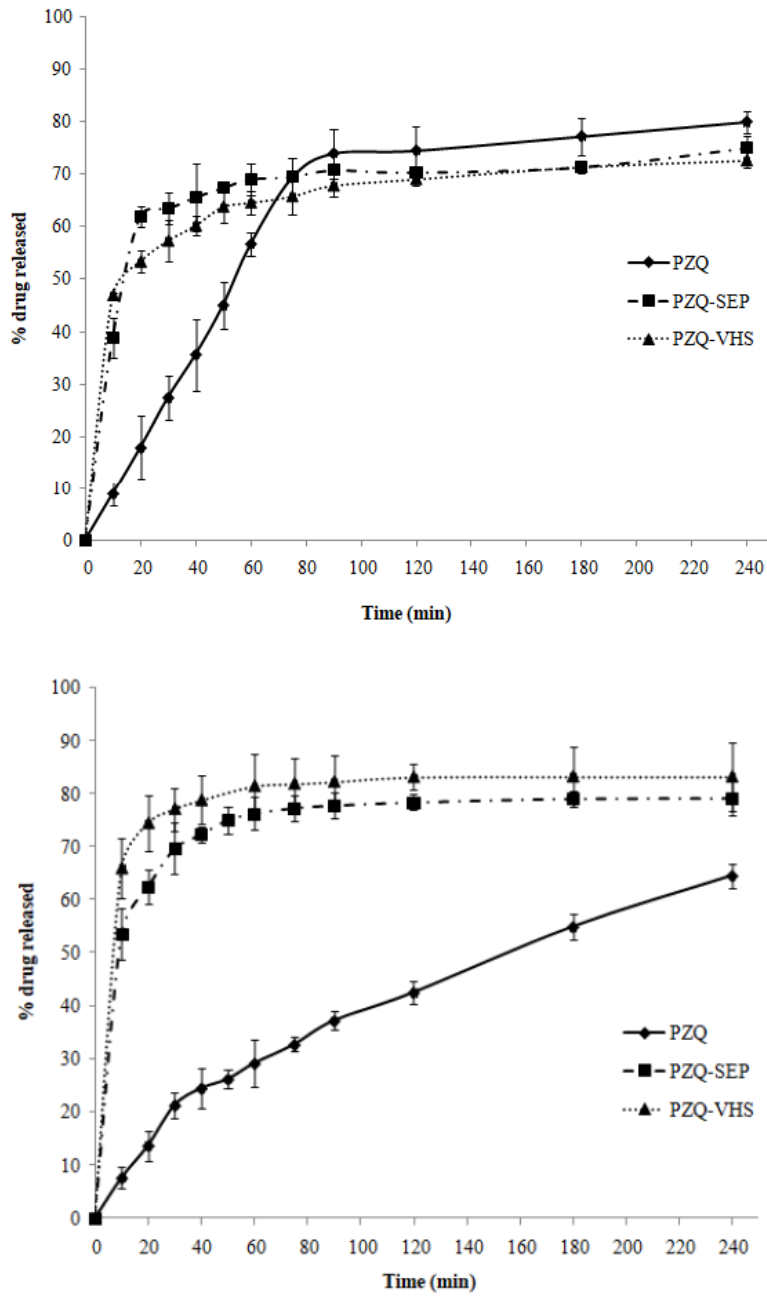


Figure 6. *In vitro* drug release profiles in HCl 0.001 M. (up) and simulated intestinal fluid (down); (mean values \pm s.d.; n = 6).

CONCLUSIONS

The antihelmintic drug PZQ was easily intercalated in montmorillonite interlayer space and sepiolite channels by using a non-aqueous polar medium (ethanol), which allowed overcoming the water barriers for low-water soluble organic compounds. This method can be extended to any short-chain alcohols where PZQ is soluble. These solvents can be easily eliminated after the preparation process.

PZQ-VHS and PZQ-SEP increased dissolution rates and global amount of drug dissolved. These kinds of interaction products can be considered as promising alternatives to improve bioavailability of water low-soluble drugs like praziquantel.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to MINECO projects (FIS2013-48444-C2-2-P and CGL2016-80833-R) and Andalusian projects (RNM363 and RNM1897) for financial support.

REFERENCES

Aguzzi, C., Viseras, C., Cerezo, P., Rossi, S., Ferrari, F., López-Galindo, A., Caramella, C., 2005. Influence of dispersion conditions of two pharmaceutical grade clays on their interaction with some tetracyclines. *Appl. Clay Sci.* 30, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2005.03.007>.

Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Appl. Clay Sci.* 36, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.015>.

Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413-420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>.

Andrews, P., 1985. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacol. Ther.* 29, 129-156. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(85\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0163-7258(85)90020-8).

Bergaya, F., Lagaly, G., 2006. Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. *Developments in Clay Science.* 1, 1-18. [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01001-9](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01001-9).

Borrego-Sánchez, A., Viseras, C., Aguzzi, C., Sainz-Díaz, C.I., 2016. Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism. *Eur. J. Pharm. Sci.* 92, 266-275 <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.023>.

Borrego-Sánchez, A., Hernández-Laguna, A., Sainz-Díaz, C.I., 2017. Molecular modeling and infrared and Raman spectroscopy of the crystal structure of the chiral antiparasitic drug Praziquantel. *J. Mol. Model.* 23, 106. <https://doi.org/10.1007/s00894-017-3266-3>.

Cavallaro, G., De Lisi, R., Lazzara, G., Milioto, S., 2013. Polyethylene glycol/clay nanotubes composites. Thermal properties and structure. *J. Therm. Anal. Calorim.* 112, 383–389.

Chaud, M.V., Tamascia, P., de Lima, A.C., Paganelli, M.O., Gremião, M.P.D., de Freitas, O., 2010. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. *Braz. J. Pharm. Sci.* 46, 473–481. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502010000300010>.

Chaud, M.V., Lima, A.C., Vila, M.M.D.C., Paganelli, M.O., Paula, F.C., Pedreiro, L.N., Gremião, M.P.D., 2013. Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate. *Trop. J. Pharm. Res.* 12,163-168. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.5>.

Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 77, 41-51. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00122-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00122-4).

De la Torre, P., Torrado, S., Torrado, S., 1999. Preparation, dissolution and characterization of Praziquantel solid dispersions. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 1629-1633. <http://doi.org/10.1248/cpb.47.1629>.

El-Feky, G.S., Mohamed, W.S., Nasr, H.E., El-Lakkany, N.M., Seif el-Din, S.H., Botros, S.S., 2015. Praziquantel in a Clay Nanoformulation Shows More Bioavailability and Higher Efficacy against Murine *Schistosoma mansoni* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3501-3508. <http://doi.org/10.1128/AAC.04875-14>.

El-Subbagh, H.I., Al-Badr, A.A., 1998. Praziquantel, in: Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, vol. 25. Academic Press Inc., New York, 463-500.

Espinosa-Lara, J.C., Guzmán-Villanueva, D., Arenas-García, J.I., Herrera-Ruiz, D., Rivera-Islas, J., Román-Bravo, P., Morales-Rojas, H., Höpfl, H., 2013. Cocrystals of active pharmaceutical ingredients-praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic and pimelic acids. *Cryst. Growth Des.* 13,169-185. <https://doi.org/10.1021/cg301314w>.

FDA, U.S. Food and Drug Administration. Recovered February 2017, <https://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm>

Frost, R.L., Locos, O.B., Ruan, H., Klopogge, J.T., 2001. Near-infrared and mid-infrared spectroscopic study of sepiolites and palygorskites. *Vib. Spectrosc.* 27, 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00110-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00110-2).

González-Esquivel, D., Rivera, J., Castro, N., Yopez-Mulia, L., Helgi, J.C., 2005. In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel. *Int. J. Pharm.* 295,93-99. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.01.033>.

Guggenheim, S., Adams, J.M., Bain, D.C., Bergaya, F., Brigatti, M.F., Drits, V.A., Formoso, M.L.L., Galán, E., Kogure, T., Stanjek, H., 2006. Summary of recommendations of nomenclature committees relevant to clay mineralogy: report of the association internationale pour l'étude des argiles (aipea) nomenclature committee for 2006. *Clays and Clay minerals.* 54, 761-772. <http://dx.doi.org/10.1346/CCMN.2006.0540610>.

Liu, Y., Wang, X., Wang, J.K., Ching, C.B., 2004. Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel. *J Pharm Sci.* 93, 3039-3046. <https://doi.org/10.1002/jps.20211>.

López-Galindo, A., Viseras, C., 2004. Pharmaceutical and Cosmetic Applications of Clays. *Interface Science and Technology*. 1, 267-289. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(04\)80044-9](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(04)80044-9).

Makaremi, M., Pasbakhsh, P., Cavallaro, G., Lazzara, G., Aw, Y.K., Lee, S.M., Milioto, S., 2017. Effect of morphology and size of halloysite nanotubes on functional pectin bionanocomposites for food packaging applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 17476-17488. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04297>.

Martín-Ramos, J.D., 2005. X Powder software. <http://www.xpowder.com.X-Power>.

Massaro, M., Amorati, R., Cavallaro, G., Guermelli, S., Lazzara, S., Milioto, S., Noto, R., Poma, P., Riela, S., 2016. Direct chemical grafted curcumin on halloysite nanotubes as dual-responsive prodrug for pharmacological applications. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 140, 505-513. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.025>.

Ortega-Castro, J., Hernández-Haro, N., Muñoz-Santiburcio, D., Hernández-Laguna, A., Sainz-Díaz, C.I., 2009. Crystal structure and hydroxyl group vibrational frequencies of phyllosilicates by DFT methods. *Theochem-J. Mol. Struct.* 912, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2009.02.013>.

Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., Rodriguez, L., 2006. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *Int J Pharm.* 318, 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.028>.

Patzschke, K., Pütter, J., Wegner, L.A., Horster, F.A., Diekmann, H.W., 1978. Serum concentrations and renal excretion in humans after oral administration of praziquantel - results of three determination methods. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 4, 149-156. <https://doi.org/10.1007/BF03189418>.

Rodrigues, S.G., Chaves, I.S., Melo, N.F.S., de Jesus, M.B., Fraceto, L.F., Fernandes, S.A., de Paula, E., de Freitas, M.P., Pinto, L.M.A., 2010. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 70, 19-28. <https://doi.org/10.1007/s10847-010-9852-y>.

Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411-425. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70521-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70521-7).

Suárez, M., García-Romero, E., 2012. Variability of the surface properties of sepiolite. *Appl. Clay Sci.* 67-68, 72-82. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.06.003>.

Torres-Ruíz, J., López-Galindo, A., González-López, J.M., Delgado, A., 1994. Geochemistry of Spanish sepiolite-palygorskite deposits: Genetic considerations based on trace elements and isotopes. *Chem. Geol.* 112, 221-245. [https://doi.org/10.1016/0009-2541\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0009-2541(94)90026-4).

Viseras, C., López-Galindo, A., 1999. Pharmaceutical applications of some spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies. *Appl. Clay Sci.* 14, 69-82. [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(98\)00050-7](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(98)00050-7).

Viseras, C., Cerezo, P., Sánchez, R., Salcedo, I., Aguzzi, C., 2010. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Appl. Clay Sci.* 48, 291-295. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.01.007>.

Wang, W., Wang, Li., Liang, Y-S., 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol Res.* 111, 1871-1877. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3151-z>.

WHO, World Health Organization. Recovered February 2017, <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>

IV.4. MODELIZACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DE PRAZICUANTEL CON NANOSUPERFICIES DE SEPIOLITA Y MONTMORILLONITA

En esta sección se ha abordado el objetivo 6 de la Tesis, dando lugar al siguiente manuscrito:

Molecular modeling of the interaction of praziquantel with nanosurfaces of sepiolite and montmorillonite

A. Borrego-Sánchez, C. Viseras, C. Aguzzi, C.I. Sainz-Díaz

En preparación.

Con la finalidad de interpretar los resultados experimentales que se obtuvieron en la sección anterior sobre la interacción entre el prazicuantel y las superficies de la sepiolita y la montmorillonita, y después de ver que los métodos teóricos describen bien la estructura molecular y cristalina del prazicuantel, se abordó en el presente estudio la optimización de la adsorción del prazicuantel en los nanocanales de sepiolita y en el espacio interlaminar de la montmorillonita. Para ello se usaron potenciales interatómicos empíricos basados en campos de fuerzas y también métodos mecano-cuánticos. Este estudio nos permitió establecer correlaciones teoría-experimento y determinar mejor las posibilidades de las arcillas como nanomateriales para la liberación de prazicuantel.

En primer lugar, se realizó un análisis más exhaustivo y profundo de los espectros de infrarrojo de los productos de interacción prazicuantel-sepiolita y prazicuantel-montmorillonita del estudio experimental descrito anteriormente para observar con más detenimiento los cambios en las

bandas presentes y para correlacionar dichas bandas con los procesos de adsorción.

En el producto de interacción prazicuantel-sepiolita, las bandas $\nu(\text{O-H})$ se mantuvieron similares a las de la sepiolita pura. Sin embargo, las bandas a 3630 cm^{-1} desaparecieron durante el proceso de adsorción, lo que puede deberse al reemplazo de moléculas de agua por prazicuantel. Las bandas $\nu(\text{C=O})$ permanecieron similares a las del prazicuantel puro, lo que indica que el conformero *syn* se mantiene tras la adsorción. Sin embargo, en el prazicuantel puro inicial estas bandas aparecieron como una microestructura múltiple debido a la existencia de varios conformeros *syn* en el cristal RS-prazicuantel. En este cristal, las interacciones intermoleculares hacen que los grupos carbonilo se desvíen de la conformación *syn* perfecta, dando lugar a esa estructura fina de la banda $\nu(\text{C=O})$. Esto no se observa en el complejo de adsorción prazicuantel-sepiolita, indicando que solo el conformero *syn* se encuentra en el nanocanal de la sepiolita. En el producto de interacción prazicuantel-montmorillonita, las bandas correspondientes a la montmorillonita no se vieron perturbadas durante el proceso de adsorción, sin embargo, sí aquellas correspondientes al prazicuantel. Las bandas $\nu(\text{C=O})$ del cristal RS-PZQ inicial aparecieron en el producto de interacción a 1642 and 1637 cm^{-1} . Este cambio se debe a la interacción del prazicuantel con la montmorillonita en el espacio interlamina de ésta última. Además, puede indicar la coexistencia de otras especies de prazicuantel en la superficie externa. Por otra parte, múltiples bandas en el rango de $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ cambiaron tras la adsorción en montmorillonita.

Tras estudiar los datos experimentales, computacionalmente se extrajo la estructura molecular del conformero *syn* del prazicuantel de trabajos previos y se generaron dos modelos de arcillas: la supercelda $1 \times 1 \times 3$ de sepiolita con la fórmula química: $(\text{Mg}_{48})\text{Si}_{72}\text{O}_{180}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{96}$ y la supercelda $3 \times 2 \times 1$ de la montmorillonita con la fórmula: $\text{Na}_6(\text{Al}_{19}\text{Mg}_5)(\text{Si}_{47}\text{Al}_1)\text{O}_{120}(\text{OH})_{24}$. Estos tamaños de supercelda se crearon teniendo en cuenta el tamaño de la molécula de prazicuantel para eliminar interacciones interatómicas con las celdas vecinas laterales. El modelo de

la montmorillonita fue creado teniendo en cuenta la composición química de la montmorillonita usada experimentalmente. Asimismo, la cantidad de agua presente en los complejos de adsorción de prazicuantel en ambas arcillas fue consistente con el valor encontrado experimentalmente.

Las estructuras de prazicuantel, sepiolita y montmorillonita fueron optimizadas, en el caso de la sepiolita con DFT, mientras que el prazicuantel y la montmorillonita fueron optimizados con el campo de fuerzas *pcff_interface* y DFT. Posteriormente, en el caso de la sepiolita, se crearon dos complejos de adsorción diferentes. Uno de ellos con una molécula de prazicuantel en un canal de sepiolita y 18 moléculas de agua por cada canal de la supercelda 1x1x3 de sepiolita. El contenido de moléculas de agua fue acorde con los datos experimentales previos. El otro complejo fue con una molécula de prazicuantel y 30 moléculas de agua en un canal de sepiolita y 48 moléculas de agua en el otro canal de la supercelda 1x1x3 de sepiolita. Ambos modelos se optimizaron con DFT usando el programa CASTEP, se analizaron las geometrías de las moléculas de prazicuantel en los canales de la sepiolita y se calculó la energía de adsorción. Dicha adsorción resultó favorable en ambos complejos.

En el caso de los complejos de adsorción de prazicuantel-montmorillonita, se usó métodos Monte Carlo con el campo de fuerzas *pcff_interface* para explorar distintas conformaciones y orientaciones del prazicuantel y 12 moléculas de agua, creadas según los datos experimentales del estudio previo, en la montmorillonita. El complejo prazicuantel-montmorillonita más estable fue optimizado de nuevo usando el campo de fuerza *pcff_interface_v1_5* y CASTEP. Además, un complejo con dos moléculas de prazicuantel y 12 moléculas de agua fue creado y optimizado con ambos métodos. Las distintas geometrías de los complejos de adsorción optimizadas con ambos métodos fueron estudiadas, así como las interacciones interatómicas entre el fármaco, las aguas y el espacio interlaminar. Se compararon los espaciados interlaminares con los datos experimentales y también fueron calculadas las energías de adsorción.

En conclusión, los cálculos teóricos llevados a cabo en este estudio fueron fundamentales para analizar los fenómenos de interacción a nivel atómico no accesibles experimentalmente. Se complementó, con ello, el trabajo experimental previo, permitiendo una comprensión más completa y satisfactoria. La correlación de los datos experimentales de difracción de rayos X y espectroscopía de infrarrojo con los correspondientes resultados teóricos permitieron determinar la disposición geométrica del prazicuantel adsorbido en el canal de la sepiolita y en el espacio interlaminar de la montmorillonita. Los resultados mostraron que el tamaño del prazicuantel es compatible con los canales de la sepiolita, siendo la energía de adsorción negativa (proceso de adsorción favorable), y que, en los complejos prazicuantel-montmorillonita, dos moléculas de prazicuantel pueden ser adsorbidas en el espacio interlaminar de la supercelda $3 \times 2 \times 1$ de montmorillonita. Las energías de adsorción con una y dos moléculas de prazicuantel por supercelda fueron siempre negativas. Por tanto, con los estudios realizados, se obtuvieron las principales interacciones entre el fármaco y ambas arcillas y energías de adsorción favorables de los complejos estudiados.

MOLECULAR MODELING OF THE INTERACTION OF PRAZIQUANTEL WITH NANOSURFACES OF SEPIOLITE AND MONTMORILLONITE

Ana Borrego-Sánchez^{1,2}, Carola Aguzzi², César Viseras^{1,2}, C. Ignacio Sainz-Díaz¹

¹Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

ABSTRACT

Praziquantel drug is nowadays in continuo study to overcome adverse biopharmaceutical properties as drug of first choice for the treatment of the human schistosomiasis. Meanwhile, sepiolite and montmorillonite have been studied as low-cost nanocarrier to design new praziquantel delivery systems. In this work, the interactions between the drug and clay minerals surfaces are studied by computational methods. The optimization of the adsorption of praziquantel in sepiolite nanochannels and in the montmorillonite interlayer space has been studied by using force fields based on empirical interatomic potentials and at quantum mechanical level. The results showed the main interactions between the drug and both clay minerals surfaces and the favorable adsorption energies of the praziquantel-clays complexes were obtained. Therefore, theoretical calculations allow to know how the drug is adsorbed in the clays and in the case of the montmorillonite how many molecules of the drug are adsorbed in the interlayer space or on the surface of the mineral according to the experimental data of previous experimental works.

Keywords: Praziquantel, modeling, clay minerals, montmorillonite, sepiolite

INTRODUCTION

Sepiolite (SEP) and montmorillonite (MMT) are phyllosilicates with a peculiar nanostructure. They have nanometric internal spaces, which are accessible to water molecules and other compounds, occurring here most of the adsorption-desorption phenomena (Bergaya and Lagaly, 2006; Aguzzi et al., 2007). Sepiolite is a non-planar phyllosilicate with fibrous morphology and has long channels, while montmorillonite is laminar phyllosilicate and has an interlayer nanospace between each triple-sheet-layer (Guggenheim et al., 2006). Therefore, clay minerals are common excipients in pharmaceutical products and can modify drug bioavailability, solubility and release (Viseras et al., 2010). This type of structure provides phyllosilicates the ability to be good candidates for the design of new release systems of drugs, such as praziquantel (PZQ) (López-Galindo and Viseras, 2004). Praziquantel is the drug of first choice for an extended parasitic disease, Schistosomiasis, that worldwide affects 250 million people (WHO, 2018).

Previous experimental studies between praziquantel and clays have been performed in aqueous medium (El-Feky et al., 2015). Therefore, to improve the adsorption of praziquantel, which is a hydrophobic drug, praziquantel/montmorillonite and praziquantel/sepiolite interaction products were obtained in absence of water and the potential increase of the dissolution rate of praziquantel solubility was demonstrated (Borrego-Sánchez et al., 2018). A raw, purified and alkali activated Wyoming bentonite were characterized and used as carrier for praziquantel. This study compared the release percentage of praziquantel in the different bentonites (Dardir et al., 2018).

Complementary theoretical and experimental studies are very important to study the interaction between these minerals and praziquantel and to determine the possibilities for praziquantel delivery purposes, correlating theoretical and experimental results. In this work, theoretical

studies of the interaction of montmorillonite and sepiolite with praziquantel have been carried out to determine the effective possibilities of both clay minerals as nanomaterials for drug delivery purposes.

METHODS

Models

The praziquantel molecular structure was taken from previous studies (Borrego-Sánchez et al., 2016). Two nanoparticle models were generated: sepiolite from a 1x1x3 supercell with formula $(\text{Mg}_{48}\text{Si}_{72}\text{O}_{180}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{96})$, and montmorillonite from a 3x2x1 supercell with formula $\text{Na}_6(\text{Al}_{19}\text{Mg}_5)(\text{Si}_{47}\text{Al}_1)\text{O}_{120}(\text{OH})_{24}$. These supercell sizes were created taking into account the size of the praziquantel molecule for avoiding intermolecular interactions (Figure 1). The model of montmorillonite was taking considering the chemical composition of the montmorillonite used in experiments (Borrego-Sánchez et al., 2018). Different adsorption complexes of praziquantel in both clays in the presence of water were studied taking information of chemical composition from experimental data (Borrego-Sánchez et al., 2018).

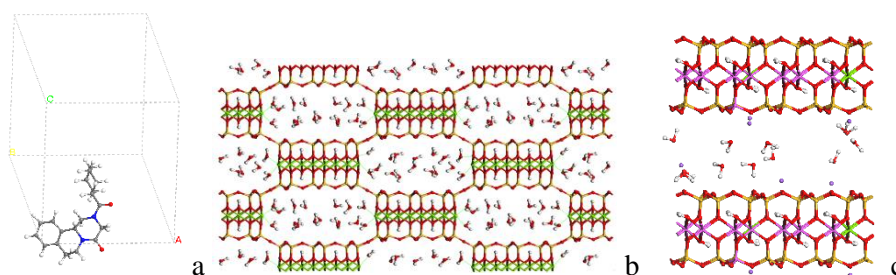


Figure 1. Structure of praziquantel (a), sepiolite (b) and montmorillonite (c) with adsorbed water.

Computational methods

Quantum mechanical calculations based on Density Functional Theory (DFT) were performed using the CASTEP program with the generalized gradient approximation (GGA), and the Perdew-Burke-

Ernzerhof functional (PBE) for the exchange-correlation potential (Perdew et al., 1996). On-the-fly generated (OTFG) ultrasoft pseudopotentials were used with Koelling-Harmon relativistic treatment (Vanderbilt, 1990). The effect of the dispersion corrections of Tkatchenko-Scheffler was included (Tkatchenko and Scheffler, 2009).

In addition, theoretical calculations using empirical interatomic potentials were also used for comparison in the models with montmorillonite. This approach is based on classical mechanics using the *pcff_interface* force field (Heinz et al., 2006) that works well for phyllosilicates with organic compounds, with Forcite program within Materials Studio package (Accelrys, 2012). Ewald method and atom based interactions for electrostatic and Van der Waals, respectively with a cut-off of 18.5 Å was used for FF. The atomic charges of the montmorillonite model were included manually following previous work that described the atomic charges for classical simulations of polar systems (Heinz and Suter, 2004). The SPC water molecules charges were used applying charges values of 0.41 and -0.82 for H and O atoms, respectively (Rick et al., 1995; Berendsen et al., 1987). The charges of PZQ molecule was the ESP charges taking from previous calculations with DMOL3 program (Borrego-Sánchez et al., 2016; Borrego-Sánchez et al., 2017).

Experimental methods

Materials

Praziquantel (PZQ) was purchased from Sigma Aldrich (S). Purified pharmaceutical degree Montmorillonite (MMT), with the commercial name of Veegum HS®, was purchased from Vanderbilt Company (USA). The Sepiolite samples from Vicálvaro (Madrid) (SEP) were gifted by TOLSA (S). Ethanol of 99% of purity was used as solvent.

Sample-Preparation

Adsorption experiments were performed by using praziquantel, montmorillonite and sepiolite, mixing suspension of clay minerals in

praziquantel ethanolic solutions and separating the solvent. These interaction products were characterized, and the results used to create the theoretical models (Borrego-Sánchez et al., 2018).

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR spectra were recorded with a JASCO 6200 spectrophotometer in the range 4000-600 cm^{-1} with a 0.25 cm^{-1} resolution and a well-plate sampler. Spectra Manager version 2 software was used for analyzing the results.

X-ray diffraction

Oriented aggregate was prepared by the dispersion of the powder clay in bi-distilled water with a vigorous manual stirring. This dispersion was allowed to stand until the separation of two phases took place. In the top phase the smaller size particles were found, which were collected and placed in a sample holder. The sample was allowed to dry and subsequently the oriented aggregate X-ray diffraction was performed with a Philips[®]X-Pert diffractometer with the $\text{CuK}\alpha$ wavelength. The results were analyzed using XPOWDER[®] software (Martín-Ramos, 2005).

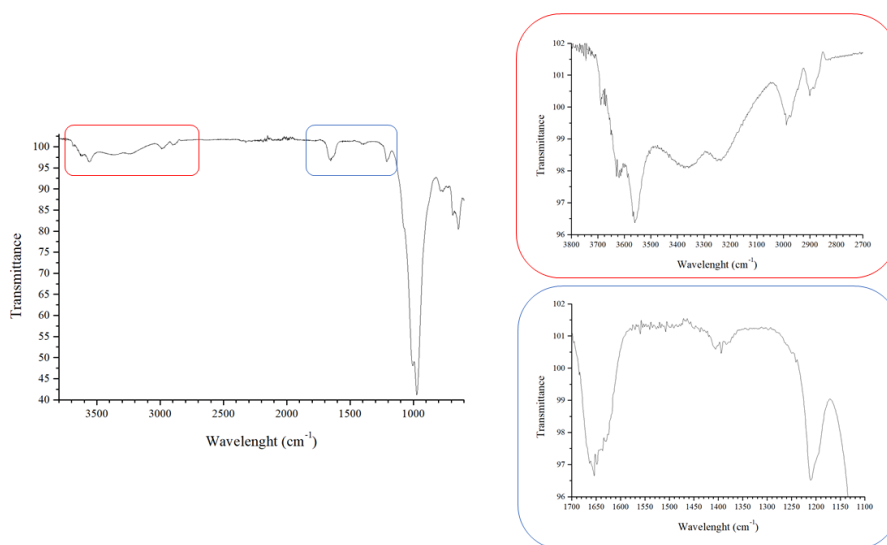
RESULTS AND DISCUSSION

Sample characterization

A detailed description of the adsorption of praziquantel with sepiolite and montmorillonite, and the characterization of products was reported elsewhere (Borrego-Sánchez et al., 2018). However, an exhaustive analysis of the FTIR spectrum is described in this work.

In the sepiolite mineral sample used the highest intensity band correspond to the $\nu(\text{Si-O})$ and the bands that appear at 1650 cm^{-1} and 3700-2850 cm^{-1} are assigned to the $\delta(\text{O-H})$ and $\nu(\text{O-H})$ vibration modes of the water molecules in the channel, respectively (Figure 2). In this last frequency range, the $\nu(\text{O-H})$ vibration modes of the octahedral OH groups

of sepiolite are included. In the adsorption complex, the profile of the $\nu(\text{O-H})$ bands remains similar to the pristine sepiolite. Nevertheless, the band that appears at 3630 cm^{-1} disappeared during the adsorption process. This band is one of the highest frequencies of the water molecules and hence, it can correspond to the water molecules that have weaker interactions with the system and they can be replaced by the PZQ molecule during adsorption. Notice that the $\nu(\text{C=O})$ bands of PZQ changed during the adsorption observing only two bands at 1647 and 1623 cm^{-1} . These frequencies are similar than in the pristine PZQ indicating that the syn conformer is maintained after the adsorption. However, more bands can be detected as shoulders in the pristine PZQ, corresponding to the existence of several conformers in the RS-PZQ crystal structure. These side-bands are not detected in the adsorption complex indicating that only one syn conformation of PZQ is adopted in the nanochannel space of sepiolite, as it will be seen later.



a

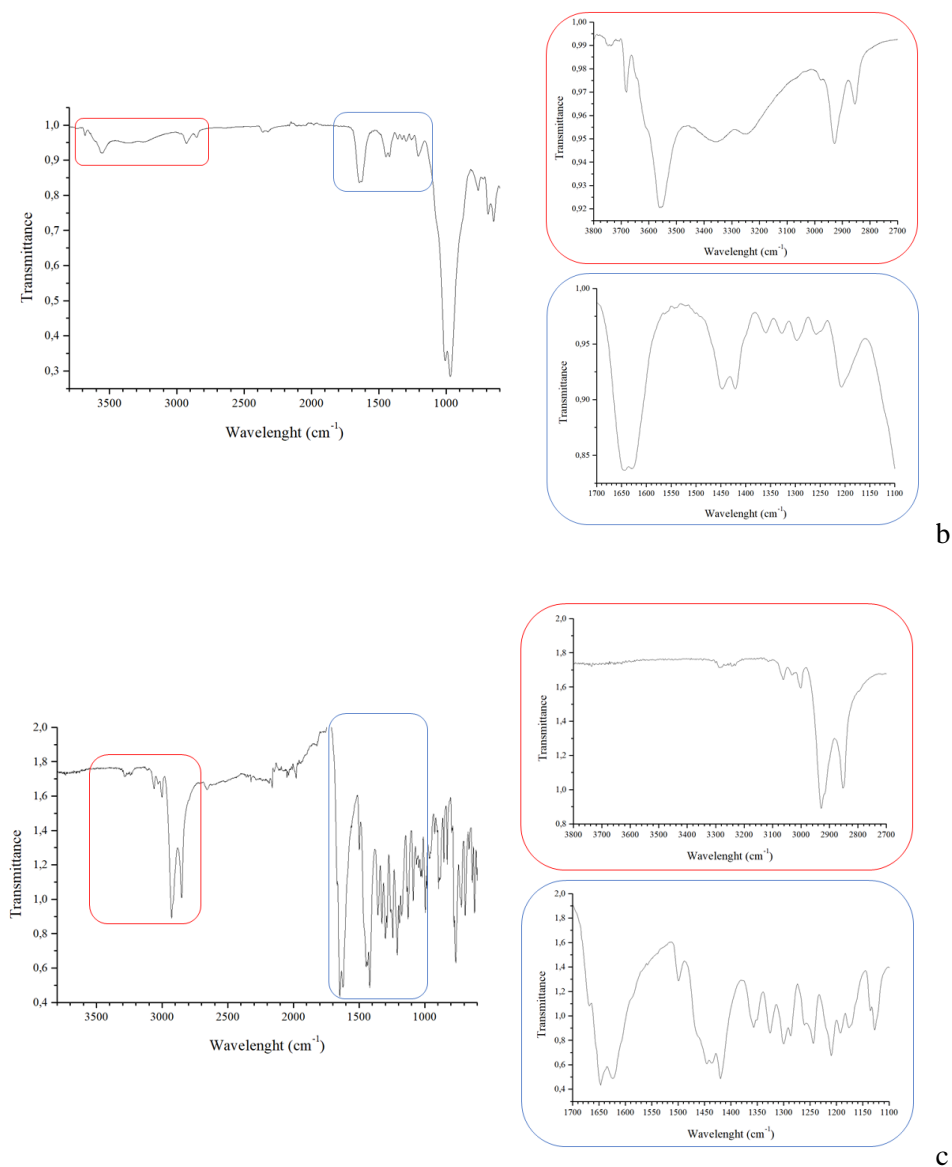


Figure 2. FTIR spectra of sepiolite (a), adsorption complex (b) and praziquantel (c).

In the montmorillonite sample, the oriented aggregate powder X-ray diffraction pattern changed during the adsorption process. A shift of the (001) reflection was observed after the adsorption of PZQ, from $d(001) = 12.32 \text{ \AA}$ to $d(001) = 16.05 \text{ \AA}$. This change indicates that at least part of the

PZQ has been intercalated in the interlayer space of montmorillonite (Figure 3).

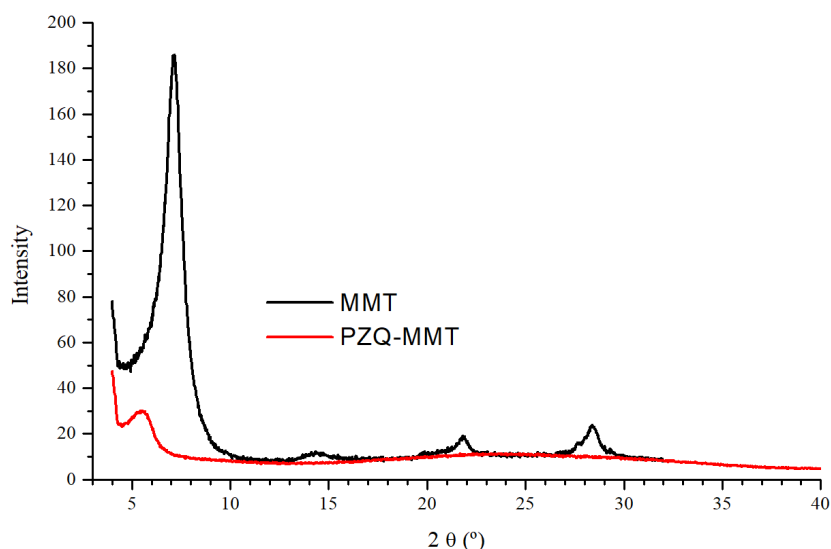


Figure 3. Powder X-ray diffraction pattern of the oriented aggregate of MMT before (black) and after (red) the adsorption of PZQ.

In the FTIR spectra of MMT the $\nu(\text{O-H})$ bands of the octahedral OH groups can be observed. The width of this band is due to the overlapping of the bands of the possible M-OH-M species (Al-OH-Al and Al-OH-Mg), and due to the different local environment of each OH (Ortega-Castro et al., 2008). The small band that appears at 1620 cm^{-1} is due to the water molecules adsorbed in the mineral. The intense band at 1000 cm^{-1} corresponds to the typical $\nu(\text{Si-O})$ mode of silicate. The bands that appear at 915 and 800 cm^{-1} are assigned to the $\delta(\text{O-H})$ of the octahedral OH groups (Escamilla-Roa et al., 2014). These bands are not perturbed during the adsorption process (Figure 4). However, the IR bands of PZQ change during the adsorption. Thus, the multiple $\nu(\text{C=O})$ band of the initial RS-PZQ appears as a double band at 1642 and 1637 cm^{-1} . This change is due to the interactions of PZQ in the interlayer space of MMT. Nevertheless, this double band shows a low resolution, indicating the

coexistence of other species of PZQ, possibly in the external surface. Besides, the multiple bands that appears in the 1500-1400 cm^{-1} range in the initial RS-PZQ crystal change after the adsorption in MMT.

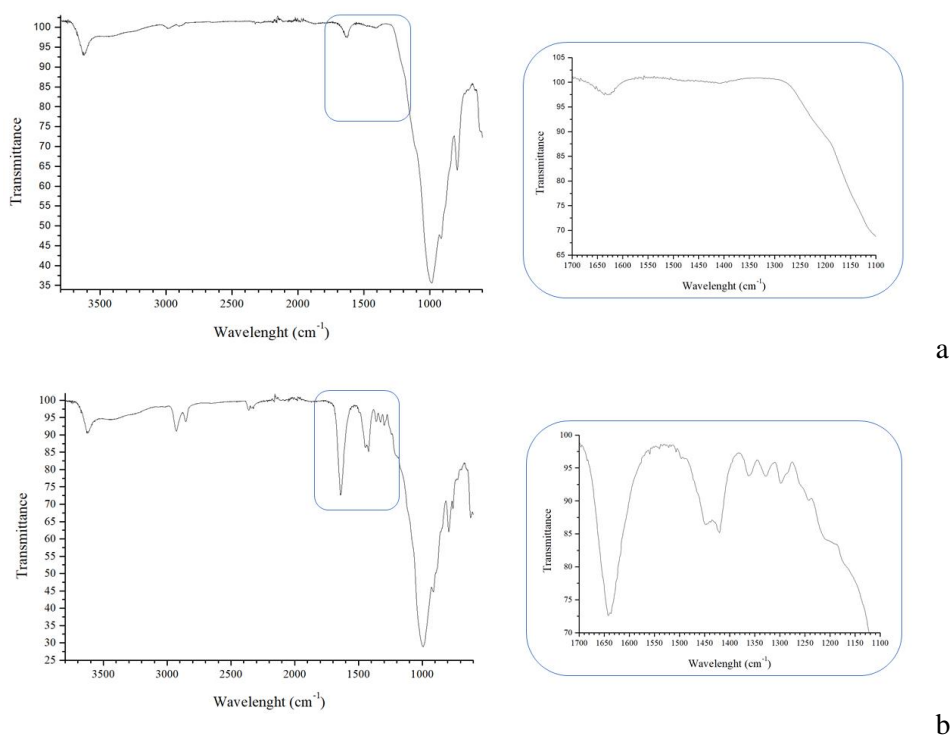


Figure 4. FTIR spectra of MMT before (a) and after (b) the adsorption with PZQ.

Adsorption modeling in sepiolite

Molecular structure of praziquantel was included in a box with the dimensions of the clay and the crystal structures of the sepiolite and montmorillonite were optimized (Figure 1). The crystal structure of sepiolite was optimized with DFT method, whereas the praziquantel and the montmorillonite structure were optimized with pcff_interface and DFT methods.

A unit cell of sepiolite was created from a cif file of previous crystallographic work (Giustetto et al., 2011). In this cif file, the superposition of some atoms was observed due to a standard statistical

treatment of a certain disorder of some water molecules. Then, we selected those atoms that correspond to a configuration of 32 water molecules per unit cell. Optimization of the unit cell of sepiolite structure was performed with CASTEP. A sepiolite 1x1x3 supercell structure, with the formula $(\text{Mg}_{48})\text{Si}_{72}\text{O}_{180}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{96}$, was created from the unit cell above optimized. Some water molecules were removed leaving only 36 molecules per supercell (SEPw), according to the experimental data (Borrego-Sánchez et al., 2018), that is 18 molecules of water per each channel. In this group of water molecules are included the structural ones to complete coordination of the edge Mg cations (12 water molecules per channel of supercell) and the zeolitic water molecules coordinated with the former ones (6 water molecules per channel of supercell). These water molecules are very stable in the sepiolite and normally require high temperatures to be released.

The experiments showed that at least one molecule of PZQ was absorbed per supercell (Borrego-Sánchez et al., 2018). Therefore, a model with one molecule of praziquantel placed in one channel of sepiolite was generated and this adsorption complex was optimized (PZQ-SEPw) (Figure 5). In the case that the other channel was occupied by another praziquantel molecule, the interaction would be the same.

After the optimization with CASTEP, the PZQ molecule maintained the *syn* conformation. However, the tridimensional geometry of the molecule changed drastically when it is adsorbed into the channel, adopting a coplanar configuration. The main interactions between praziquantel and sepiolite structure were interactions between the oxygens of the carbonyl group of the praziquantel molecule and the hydrogens of water with $d(\text{CO}\dots\text{Hw}) = 1.85 \text{ \AA}$ and 3.13 \AA . Other electrostatic interactions were found, between the H atoms of the PZQ molecule and the O atoms of the sepiolite channel $d(\text{Hp}\dots\text{Osep}) = 2.40\text{-}3.06 \text{ \AA}$. Besides, hydrogens bonds between the water H atoms and the O atoms of the sepiolite channel were found, with $d(\text{Hw}\dots\text{Osep}) = 1.68\text{-}2.45 \text{ \AA}$. Also, hydrogens bonds between the oxygens and hydrogens of water molecules were formed with $d(\text{Hw}\dots\text{Ow}) = 1.57\text{-}2.06 \text{ \AA}$.

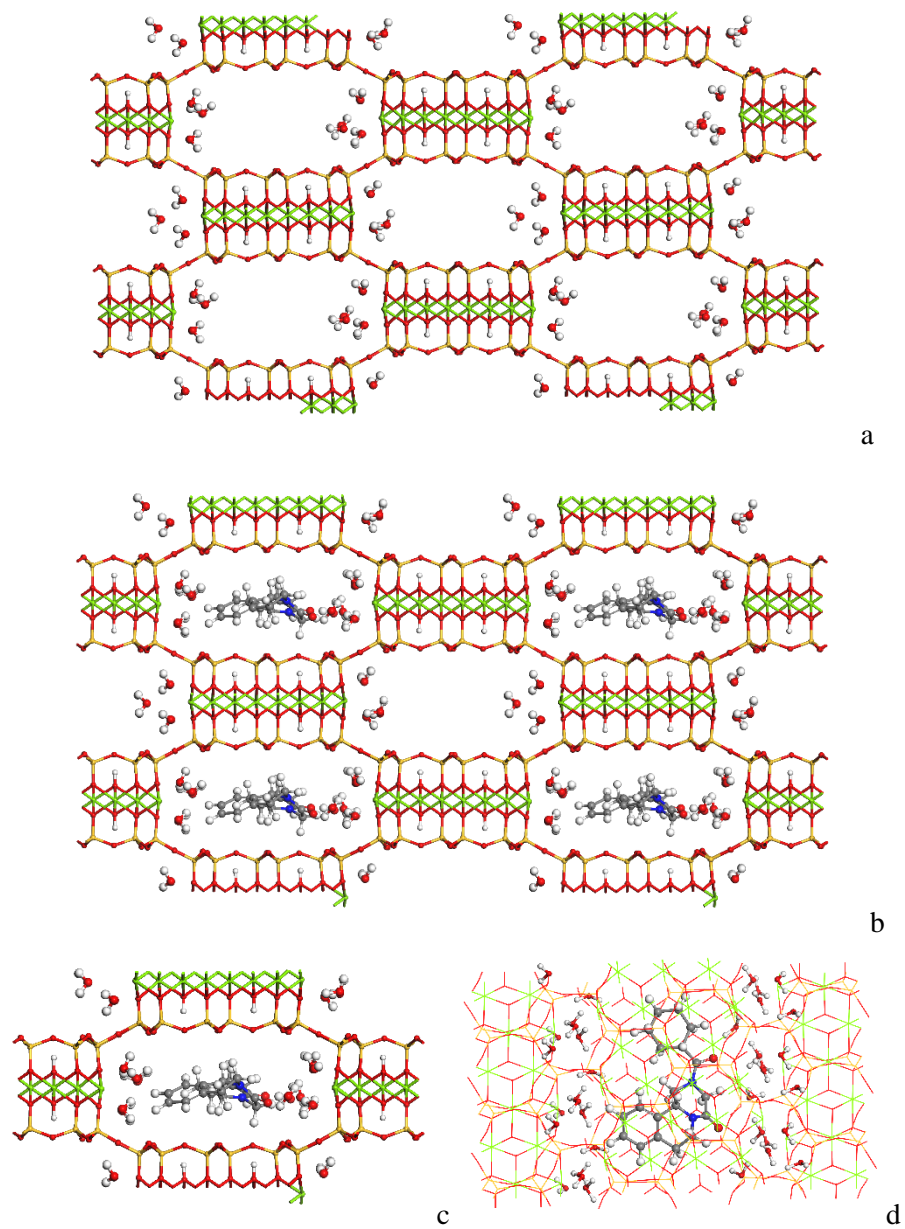


Figure 5. Optimized sepiolite structure with 36 water molecules per supercell (SEPw) (a) and the adsorption of praziquantel in the sepiolite channel (PZQ-SEPw), view as supercell (b) and as unit cell from (100) plane (c) and (001) plane (d).

The adsorption energy of the complex calculated can be defined as the difference between the energy of the PZQ-SEPw adsorption complex and the energy of PZQ molecule isolated in a box and the energy of the supercell of sepiolite with 36 water molecules per supercell (SEPw):

$$\Delta E_{\text{ads}} = E_{\text{PZQ-SEPw}} - (E_{\text{PZQ}} + E_{\text{SEPw}})$$

Thus, the adsorption energy was -69.9 kcal/mol (-23.3 kcal/mol per unit cell). Therefore, the adsorption process is likely to be favorable. This adsorption energy can be considered very high because of the high reactivity of the sepiolite with low water content. Hence, another adsorption complex with more water molecules was created. In this case, a sepiolite 1x1x3 supercell structure with 48 molecules of water in one channel and 30 molecules of water in the other channel was optimized (SEPww). In the channel with 30 water molecules, these molecules were shifted close to the edges of the channel leaving space for the adsorption of a PZQ molecule. In this channel one molecule of praziquantel was placed and this adsorption complex was optimized (PZQ-SEPww) (Figure 6).

The main interactions between PZQ and sepiolite in the adsorption complex (PZQ-SEPww) were, after the optimization, hydrogens bonds between the carbonyl O atoms of PZQ and the water H atoms with $d(\text{CO}\dots\text{Hw}) = 1.52 \text{ \AA}$ and 1.60 \AA . Other electrostatic interactions were found between the PZQ H atoms and the surface O atoms of the sepiolite channel $d(\text{Hp}\dots\text{Osep}) = 2.58\text{-}2.97 \text{ \AA}$. Besides, hydrogens bonds between the water H atoms and the surface O atoms of the sepiolite channel were found, with $d(\text{Hw}\dots\text{Osep}) = 1.67\text{-}2.47 \text{ \AA}$. Also, hydrogens bonds between the O and H atoms of water molecules are formed with $d(\text{Hw}\dots\text{Ow}) = 1.55\text{-}2.37 \text{ \AA}$.

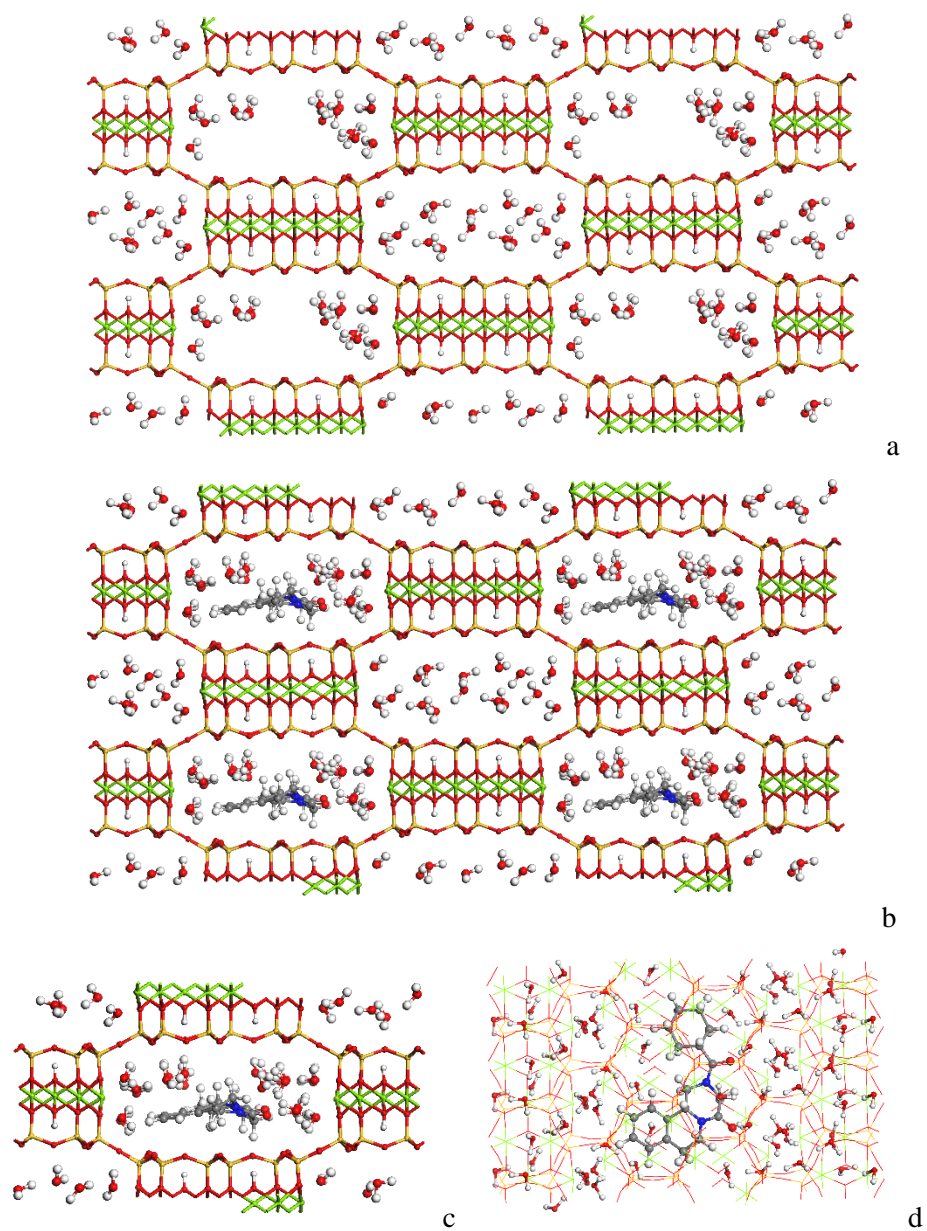


Figure 6. Optimized sepiolite structure with 78 water molecules (SEPww) per supercell (a) and the adsorption complex (PZQ-SEPww) of PZQ in the SEP channel with 30 water molecules, view as supercell (b) and as unit cell from (100) plane (c) and (001) plane (d).

Applying the same equation that previously, $\Delta E_{\text{ads}} = E_{\text{PZQ-SEP}_{\text{Pww}}} - (E_{\text{PZQ}} + E_{\text{SEP}_{\text{Pww}}})$. In this model with more water content the adsorption energy was -26.9 kcal/mol per supercell. Again, the adsorption process is likely to be favorable. Nevertheless, this value is much lower than the above one, confirming the high reactivity of the sepiolite with low water content.

Adsorption modeling in montmorillonite

The crystal structure of MMT in a 3x2x1 supercell, $\text{Na}_6(\text{Al}_9\text{Mg}_5)(\text{Si}_{47}\text{Al}_1)\text{O}_{120}(\text{OH})_{24}$, was optimized. This supercell allows describing the relative chemical composition of the experimental sample. The initial interlayer spacing $d(001)$ of montmorillonite was 16.05 Å. This value creates enough space to arrange all adsorbate molecules before the optimization. Also, according to previous experimental data (Borrego-Sánchez et al., 2018), 12 water molecules were placed in the interlayer space.

Experimentally it was not possible to know if the molecules of praziquantel are adsorbed in the interlayer space of the clay or on the external surface of the mineral (Borrego-Sánchez et al., 2018). With the theoretical calculations it is possible to know if that spacing corresponds to the XRD space of an adsorption complex with one or two molecules of praziquantel per supercell in the interlayer space.

Therefore, the adsorption of one and two PZQ molecules in the MMT interlayer with 12 molecules of water per supercell was studied by using the `pcff_interface_v1_5` forcefield with FORCITE code, and the DFT CASTEP method.

First, by means of Monte Carlo methods and using the FF `pcff_interface`, many possible conformations were studied in the PZQ-MMT complex. This method randomly explores different conformations of the PZQ and different relative orientations between the PZQ, the MMT and the water molecules, selecting the most stable ones. The most stable PZQ-MMT complex was optimized again by using the FF `pcff_interface_v1_5`

and CASTEP ways. The PZQ molecule of this complex was removed and the resulting structure of montmorillonite supercell with water molecules was optimized again using both methodologies (pcff_interface_v1_5 FF and CASTEP program).

Using pcff_interface_v1_5, the MMT with water (MMTw) was optimized at variable volume and showed an interlayer space of $d(001) = 11.7 \text{ \AA}$. The adsorption complex with PZQ was optimized at variable volume, yielding a $d(001)$ spacing of 14.04 \AA (Figure 7). This value is lower than the experimental one. This can induce to consider that two molecules of praziquantel per unit cell can be in the interlayer space.

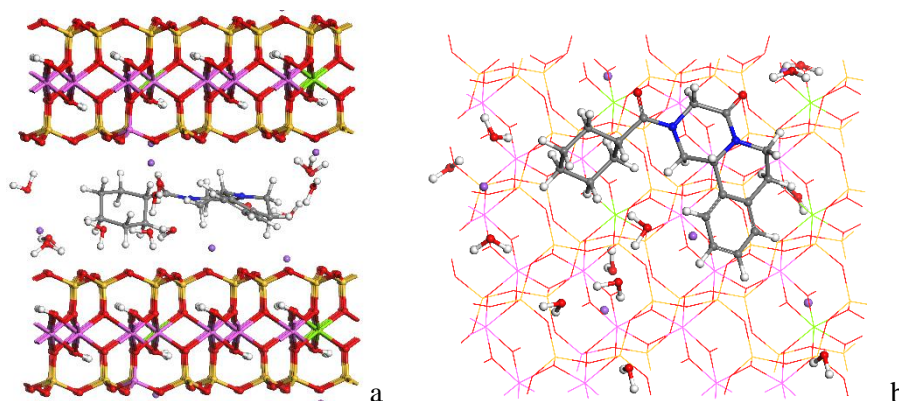


Figure 7. Structure of the adsorption complex of PZQ in the MMT with 12 water molecules optimized with pcff_interface, view as unit cell from (100) plane (a) and (001) plane (b).

After the optimization, of the adsorption complex, the PZQ molecule showed that both carbonyl groups are quasi coplanar and the cyclohexyl group is slightly twisted. The main interactions between the PZQ and MMT were hydrogens bonds between the carbonyl O atoms of PZQ and the water H atoms with $d(\text{CO}_P \dots \text{H}_w) = 1.71 \text{ \AA}$ and 1.98 \AA . Also electrostatic interactions were found between the PZQ H atoms and the surface O atoms of MMT $d(\text{H}_P \dots \text{O}_{\text{MMTw}}) = 2.55\text{-}3.0 \text{ \AA}$. In addition, hydrogens bonds between the water H atoms and the MMT surface O atoms

with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 1.68\text{-}2.11 \text{ \AA}$, and between the O and H atoms of water with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_w) = 1.81\text{-}2.23 \text{ \AA}$ were found.

With this equation $\Delta E_{\text{ads}} = (E_{\text{PZQ-MMT}_w}) - (E_{\text{PZQ}} + E_{\text{MMT}_w})$, the adsorption energy was -5.11 kcal/mol , being a favorable adsorption.

On the other hand, another PZQ molecule was added to this complex and this new adsorption complex with two PZQ molecules per supercell was optimized, resulting a spacing of $d(001) = 15.2 \text{ \AA}$ (Figure 8). The adsorption energy of the complex was -35.2 kcal/mol (-17.6 kcal/mol per PZQ molecule).

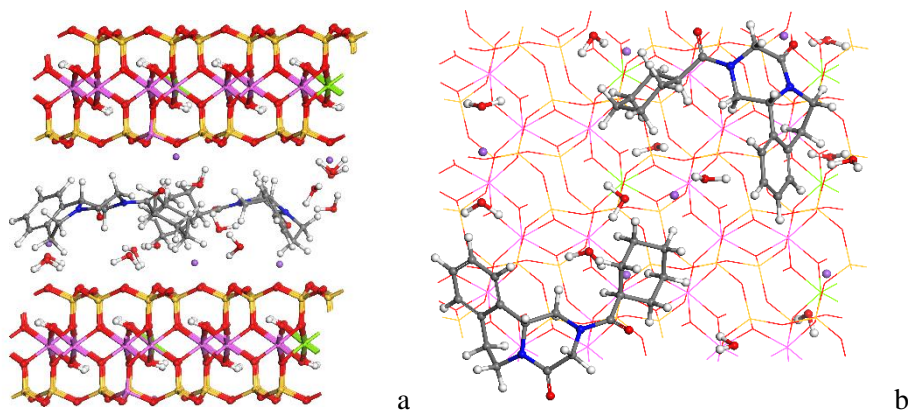


Figure 8. Optimized structure of the adsorption-complex of two PZQ molecules on the montmorillonite interlayer surface with 12 water molecules calculated with `pcff_interface`, view as unit cell from (100) plane (a) and (001) plane (b).

Both PZQ molecules changed their conformations similarly after the optimization in the adsorption complex where both carbonyl group are in slightly twisted planes each other and the cyclohexyl group is more shrunken. The main interactions between PZQ and MMT were hydrogens bonds and electrostatic interactions. Only one PZQ molecule presented hydrogen bonds between the carbonyl O atoms of PZQ and the water H atoms with $d(\text{CO}_P \dots \text{H}_w) = 1.86 \text{ \AA}$ and 2.13 \AA . Other electrostatic interactions between the PZQ H atoms and the MMT surface O atoms $d(\text{H}_P \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 2.25\text{-}3.3 \text{ \AA}$. In addition, hydrogens bonds between the water hydrogens and the oxygen of the montmorillonite surface were found

with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 1.7\text{-}2.34 \text{ \AA}$, and between the oxygens and hydrogens of water with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_w) = 1.83\text{-}1.95 \text{ \AA}$.

The complexes created with one and two molecules of praziquantel and montmorillonite were optimized with CASTEP, for comparison purpose. Then, the adsorption complex with one praziquantel molecule per supercell was optimized at variable volume obtaining an interlayer spacing of $d(001) = 16.5 \text{ \AA}$ (Figure 9).

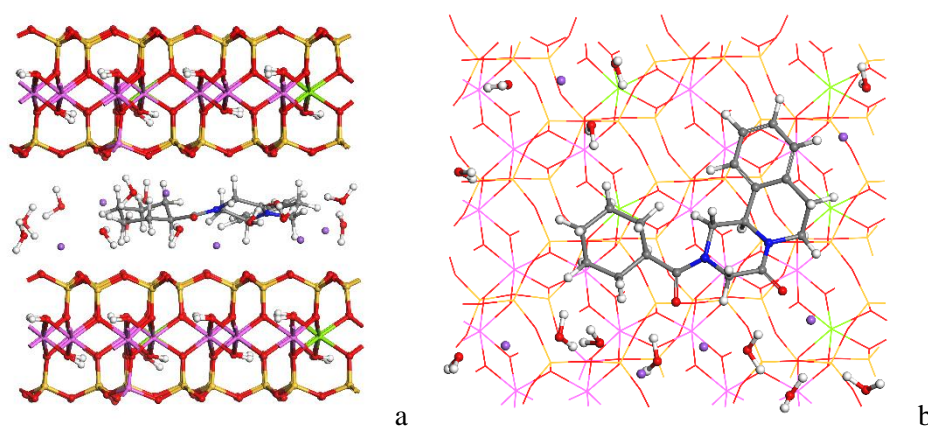


Figure 9. Optimized structure of the adsorption complex of one PZQ molecule in the montmorillonite with 12 water molecules with CASTEP, viewed as unit cell from (100) plane (a) and (001) plane (b).

Using CASTEP calculations, the PZQ molecule in the adsorption complex presented a different conformation to that calculated using empirical interatomic potentials, showing that both carbonyl groups are also quasi coplanar, but the cyclohexyl group is more twisted and the aromatic part ring are more shrunken and distorted. Hydrogen bonds were the main interactions found between PZQ and MMT, where only the oxygen of one carbonyl group presented interactions with the hydrogens of two water molecules at $d(\text{CO}_P \dots \text{H}_w) = 1.97 \text{ \AA}$ and 2.06 \AA . Also, electrostatic interactions were found between the PZQ H atoms and the MMT surface O atoms $d(\text{H}_P \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 2.73\text{-}3.29 \text{ \AA}$. In addition, hydrogen bonds between the water H atoms and the oxygens of the montmorillonite surface were found with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 2.01\text{-}2.48 \text{ \AA}$

and between the oxygens and hydrogens of water with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_w) = 1.73\text{-}2.06 \text{ \AA}$.

On the other hand, the adsorption complex with two PZQ molecules was also optimized resulting an interlayer spacing of $d(001) = 16.4 \text{ \AA}$ (Figure 10). These results indicated that in both cases only a monolayer of the PZQ was formed in the interlayer space of the MMT. However, with one PZQ molecule per supercell, the PZQ acquires a coplanar configuration with respect the interlayer spaces, whereas with two PZQ molecules the cyclohexyl moiety of PZQ adopted a disposition more perpendicular with respect the interlayer space. The most stable relative position of both PZQ molecules in the interlayer space was that where the cyclohexyl ring of both molecules was parallel each other.

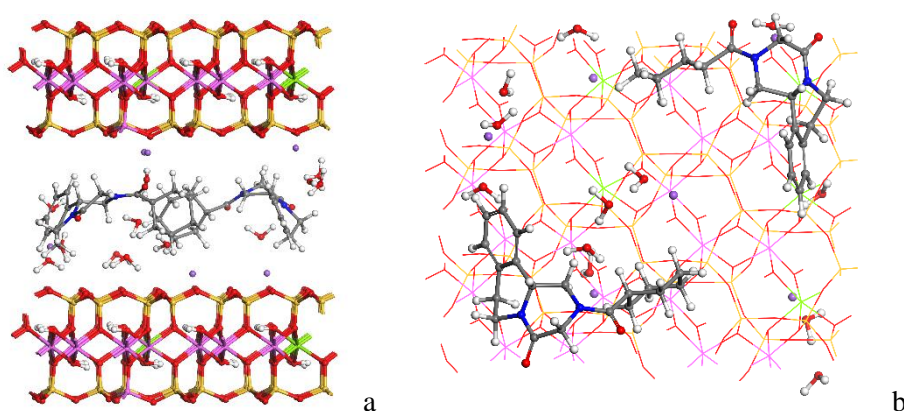


Figure 10. Optimized structure of the adsorption complex of two PZQ molecules in MMT with 12 water molecules calculated with CASTEP, view as unit cell from (100) plane (a) and (001) plane (b).

In addition, in the adsorption complex with two PZQ molecules in the interlayer space of MMT, both drug molecules had the same conformation after the optimization, showing that both carbonyl groups are coplanar, while the cyclohexyl groups are totally twisted and the general structures of the praziquantel molecules are very shrunken. The main interactions occurred in the interlayer space were hydrogen bonds between the carbonyl O atoms of the PZQ molecules and the water H atoms were

found with $d(\text{CO}_P \dots \text{H}_w) = 1.79 \text{ \AA}$ and 1.91 \AA and electrostatic interactions between the PZQ H atoms and the surface oxygens of the montmorillonite $d(\text{H}_P \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 2.61\text{-}3.3 \text{ \AA}$. In addition, hydrogens bonds between the hydrogens of the water and the oxygen of the montmorillonite surface were formed, with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_{\text{MMT}_w}) = 2.02\text{-}2.49 \text{ \AA}$ and between the oxygens and hydrogens of water with $d(\text{H}_w \dots \text{O}_w) = 1.66\text{-}1.94 \text{ \AA}$.

CONCLUSIONS

The theoretical calculations are fundamental to be able to study those phenomena that cannot be observed experimentally. So, experimental and theoretical complementary studies allow obtaining much more complete and satisfactory works. In this work, correlation between experimental PXRD and FTIR data and theoretical studies allowed to understand the geometrical disposition of praziquantel adsorbed in the channel of sepiolite and in the interlayer space of montmorillonite.

The PZQ molecular size is compatible with the size of sepiolite channels being likely the PZQ to be adsorbed in sepiolite with negative adsorption energy.

The theoretical studies showed that in the interaction product of praziquantel and montmorillonite, two molecules of praziquantel per supercell of montmorillonite can be adsorbed in the interlayer space. In both models with one and two molecules of PZQ per supercell, the praziquantel is also likely to be adsorbed in the interlayer space of the montmorillonite as a monolayer.

The main intermolecular interactions in the adsorption of PZQ in the sepiolite channel and in the interlayer space of MMT were evaluated, in presence of water molecules, forming H bonds and interaction of carbonyl group with Na^+ cations.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to MINECO projects (FIS2016-77692-C2-2-P and CGL2016-80833-R) and Andalusian projects (RNM1897) for financial support.

REFERENCES

- Accelrys Materials Studio, version v 6.0, 2012. Accelrys Inc., San Diego, USA.
- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.015>.
- Berendsen, H.J.C., Grigera, J.R., Straatsma, T.P., 1987. The missing term in effective pair potentials. *The Journal of Physical Chemistry*, 91, 6269-6271.
- Bergaya, F., Lagaly, G., 2006. Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. *Developments in Clay Science*. 1, 1-18. [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01001-9](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01001-9).
- Borrego-Sánchez, A., Viseras, C., Aguzzi, C., Sainz-Díaz, C.I., 2016. Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92, 266-275. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.04.023>.
- Borrego-Sánchez, A., Hernández-Laguna, A., Sainz-Díaz, C.I., 2017. Molecular modeling and infrared and Raman spectroscopy of the crystal structure of the chiral antiparasitic drug Praziquantel. *Journal of Molecular Modeling*, 23, 106. <https://doi.org/10.1007/s00894-017-3266-3>.
- Borrego-Sánchez, A., Carazo, E., Aguzzi, C., Viseras, C., Sainz-Díaz, C.I., 2018a. Biopharmaceutical improvement of praziquantel by interaction with montmorillonite and sepiolite. *Applied Clay Science*, 160, 173-179. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.12.024>.

Borrego-Sánchez, A., Carazo, E., Albertini, B., Passerini, N., Perissutti, B., Cerezo, P., Viseras, C., Hernández-Laguna, A., Aguzzi, C., Sainz-Díaz, C.I., 2018b. Conformational polymorphic changes in the crystal structure of the chiral antiparasitic drug praziquantel and interactions with calcium carbonate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 132, 180-191.

El-Feky, G.S., Mohamed, W.S., Nasr, H.E., El-Lakkany, N.M., Seif el-Din, S.H., Botros, S.S., 2015. Praziquantel in a Clay Nanoformulation Shows More Bioavailability and Higher Efficacy against Murine *Schistosoma mansoni* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 3501-3508. <http://doi.org/10.1128/AAC.04875-14>.

Escamilla-Roa, E., Hernández-Laguna, A., Sainz-Díaz, C.I. Theoretical study of the hydrogen bonding and infrared spectroscopy in the cis-vacant polymorph of dioctahedral 2:1 phyllosilicates. *Journal of Molecular Modeling*, 20, 2404.

Guggenheim, S., Adams, J.M., Bain, D.C., Bergaya, F., Brigatti, M.F., Drits, V.A., Formoso, M.L.L., Galán, E., Kogure, T., Stanjek, H., 2006. Summary of recommendations of nomenclature committees relevant to clay mineralogy: report of the association internationale pour l'étude des argiles (aiepa) nomenclature committee for 2006. *Clays and Clay minerals*. 54, 761-772. <http://dx.doi.org/10.1346/CCMN.2006.0540610>.

Heinz, H., Suter, U.W., 2004. Atomic Charges for Classical Simulations of Polar Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108, 18341-18352.

Heinz, H., Vaia, R.A., Farmer, L., 2006. Interaction energy and surface reconstruction between sheets of layered silicates. *The Journal of chemical physics*, 124, 224713.

López-Galindo, A., Viseras, C., 2004. Pharmaceutical and Cosmetic Applications of Clays. *Interface Science and Technology*, 1, 267-289. [https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(04\)80044-9](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(04)80044-9).

Martín-Ramos, J.D., 2005. XPowder software. <http://www.xpowder.com.X-Power>.

Ortega-Castro, J., Hernández-Haro, N., Hernández-Laguna, A., Sainz-Díaz, C.I. 2008. DFT calculation of crystallographic properties of dioctahedral 2:1 phyllosilicates. *Clay Minerals*, 43, 351-361.

Perdew, J.P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. 1996. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Physical Review Letters*, 77, 3865-3868.

Rick, S.W., Stuart, S.J., Bader, J.S., Berne, B.J., 1995. Fluctuating charge force fields for aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids*, 65-66, 31-40. [https://doi.org/10.1016/0167-7322\(95\)00842-7](https://doi.org/10.1016/0167-7322(95)00842-7).

Tkatchenko, A.; Scheffler, M. 2009. Accurate Molecular Van Der Waals Interactions from Ground-State Electron Density and Free-Atom Reference Data. *Physical Review Letters*, 102, 073005.

Vanderbilt, D. 1990. "Soft self-consistent pseudopotentials in a generalized eigenvalue formalism", *Physical Review B*, 41, 7892-7895.

Viseras, C., Cerezo, P., Sánchez, R., Salcedo, I., Aguzzi, C., 2010. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science*, 48, 291-295. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2010.01.007>.

WHO, World Health Organization. Recovered September 2018, <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>

IV.5. CAMBIOS POLIMÓRFICOS CONFORMACIONALES EN LA ESTRUCTURA CRISTALINA DEL PRAZICUANTEL Y SU INTERACCIÓN CON CARBONATO CÁLCICO

Los objetivos 7 y 8 de esta Tesis han sido completados, dando lugar a la siguiente publicación:

Conformational polymorphic changes in the crystal structure of the chiral antiparasitic drug praziquantel and interactions with calcium carbonate

A. Borrego-Sánchez, E. Carazo, B. Albertini, N. Passerini, B. Perissuti, P. Cerezo, C. Viseras, A. Hernández-Laguna, C. Aguzzi, C.I. Sainz-Díaz

Eur. J. Pharm. Biopharm. **2018**, 132, 180-191.

En esta publicación se investigaron las características fisicoquímicas de cristal racémico de praziquantel una vez puesto en contacto con el carbonato cálcico mediante la interacción de ambos en una dispersión en etanol 96% durante 24 horas y la posterior evaporación del disolvente. El correspondiente producto de interacción fue caracterizado y comparado con los compuestos puros mediante diferentes técnicas: calorimetría diferencial de barrido, análisis termogravimétrico, difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier y Raman y cromatografía quiral.

En la difracción de rayos X se observó que el producto de interacción presenta grandes cambios en la cristalinidad del praziquantel. El perfil de calorimetría diferencial de barrido del producto de interacción praziquantel-carbonato cálcico cambió completamente con respecto al del fármaco puro, mostrando picos endotérmicos sobre 112, 134 y 138 °C. El análisis termogravimétrico no mostró pérdida de masa en ese intervalo de

temperatura, por lo que el pico de 112 °C puede atribuirse a la fusión de un cristal monoenantiomérico o de un nuevo polimorfo del racémico del prazicuantel, ambos descritos previamente a 111 °C. Los otros dos picos (134 y 138 °C) pueden ser cristales conglomerados o pseudoracematos, en concordancia con otros estudios previos. En la microscopía electrónica de barrido del producto de interacción se observaron cambios en el tamaño, la textura y la morfología con respecto al fármaco puro. Se encontraron partículas filamentosas de pequeño tamaño de prazicuantel interconectadas rodeando el carbonato cálcico. En el espectro de infrarrojo, se detectaron ligeras diferencias en las frecuencias y formas de las bandas $\nu(\text{C}=\text{O})$ atribuibles a cambios conformacionales sobre los grupos carbonilo. En espectroscopía Raman, las principales bandas de prazicuantel en el producto de interacción en el intervalo entre 1150-1360 cm^{-1} mostraron un perfil diferente al del conformero *syn* del fármaco inicial y cercano al calculado previamente para el conformero *anti*. El producto de interacción fue medido por cromatografía líquida de alta resolución quiral mostrando la misma proporción de ambos enantiómeros, al igual que el prazicuantel puro. Para explorar otras condiciones, el producto de interacción se preparó utilizando etanol sin agua y la calorimetría diferencial de barrido de este producto mostró sólo los picos endotérmicos a 134 y 138 °C. Por lo tanto, el pico a 112 °C únicamente apareció con la presencia del pequeño porcentaje de agua del etanol 96%. La microscopía electrónica de barrido de este producto mostró cristales de prazicuantel más pequeños, pero no en forma de fibras filamentosas. Por otro lado, se exploró un aumento del tiempo de contacto de 72 horas y etanol 99%, obteniéndose los mismos resultados. Este experimento se repitió utilizando sílice coloidal, en lugar de carbonato cálcico, y etanol 96% y etanol puro con 24 horas de contacto, apareciendo en la calorimetría diferencial de barrido un pico de fusión a 140 °C, típico del prazicuantel puro racémico inicial. Por tanto, la presencia de carbonato cálcico es la responsable de los cambios producidos en la cristalinidad del prazicuantel, así como también lo es la presencia de agua.

Para poder entender el comportamiento experimental descrito arriba, se estudió la relación entre las diferentes formas cristalinas del

prazicuantel a escala molecular y se determinaron las interacciones intermoleculares presentes mediante la realización de cálculos teóricos. Las estructuras cristalinas del enantiómero R, del nuevo polimorfo y del cristal racémico del prazicuantel también fueron estudiadas, mostrando una energía de cohesión similar. Además, se estudió la interacción del conformero *anti* del prazicuantel, con el carbonato cálcico y el agua también a nivel molecular. Esta interacción puede alterar la nucleación y el crecimiento cristalino del PZQ y, por tanto, alterar la cristalinidad del prazicuantel en el producto de interacción con el carbonato.

Se concluyó con este trabajo que el carbonato cálcico utilizado como excipiente del prazicuantel a través de la formación de una dispersión sólida afecta y modifica la estructura cristalina y el estado sólido del prazicuantel puro. Este efecto también se debe a la presencia de moléculas de agua residuales del disolvente. Estas modificaciones de las formas cristalinas podrían corresponder a formas monoenantioméricas o al nuevo polimorfo racémico del prazicuantel (punto de fusión a 112 °C) y otras fases (punto de fusión a 134-138 °C) que podrían asignarse provisionalmente a un sólido pseudoracemato. Estos cambios cristalográficos no se observaron utilizando sílice coloidal como excipiente sólido. La modelización computacional fue una herramienta útil para comprender las interacciones moleculares en las estructuras cristalinas, el efecto del carbonato cálcico sobre el prazicuantel y los cambios conformacionales de prazicuantel observadas experimentalmente en las estructuras cristalinas.

CONFORMATIONAL POLYMORPHIC CHANGES IN THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE CHIRAL ANTIPARASITIC DRUG PRAZIQUANTEL AND INTERACTIONS WITH CALCIUM CARBONATE

Ana Borrego-Sánchez^{a,b}, Esperanza Carazo^b, Beatrice Albertini^c, Nadia Passerini^c, Beatrice Perissutti^d, Pilar Cerezo^b, César Viseras^{a,b}, A. Hernández-Laguna^a, Carola Aguzzi^{b,*}, C. Ignacio Sainz-Díaz^a

^a Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

^c Department of Pharmacy and BioTechnology, University of Bologna, Via S. Donato 19/2, 40127 Bologna (Italy).

^d Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, P.le Europa 1, 34127 Trieste (Italy).

* Corresponding author: carola@ugr.es

ABSTRACT

Praziquantel is an antiparasitic drug used for decades. Currently, the praziquantel commercial preparation is a racemic mixture, in which only the levo-enantiomer possesses anthelmintic activity. The knowledge of its properties in the solid state and other chemical-physical properties is necessary for improving its efficacy and applications. Drug solid dispersions were prepared with calcium carbonate at 1:5 drug to excipient weight ratio by solvent evaporation method. Then, the modification of the crystal structure of the racemic polymorph of praziquantel in presence of calcium carbonate has been studied by means of several analytical

techniques (DSC, TGA, XRD, SEM, FTIR, Raman spectroscopy and chiral liquid chromatography). This study has been completed with atomistic calculations based on empirical interatomic force fields and quantum mechanics methods applied to the crystal structure of praziquantel and of intermolecular interactions. The results evidenced that calcium carbonate provoked a conformational change in the praziquantel molecule yielding the formation of different polymorphs of praziquantel crystal. These alterations were not observed replacing calcium carbonate with colloidal silica as excipient in the solid dispersion.

Keywords: Praziquantel, calcium carbonate, solid state characterization, DFT calculations, IR spectroscopy, molecular modeling

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by *Schistosoma*. It is widely extended, mainly in 78 developing countries in the tropics and subtropics [1,2,3], and it affects 210 million people approximately, causing two hundred thousand deaths every year. Moreover, at least 92% of people who need treatment for schistosomiasis live in Africa and, behind of malaria, is the second of the most prevalent diseases that affects African children [4].

The infection is caused by the parasite penetration through the skin of healthy individuals, who are in contact with contaminated water. The Schistosomiasis treatment consists in three drugs (oxamniquine, albendazole and praziquantel), due to the fact that prevention is difficult and there is no vaccine. Praziquantel (PZQ) is the most used drug, considering that it has several advantages: i) being active against every *Schistosomas* species [5] ii) its administration is orally, iii) it produces few side effects, iv) it has a high efficiency, and v) it has low toxicity. For all of these reasons, World Health Organization considers PZQ to be an essential drug [4]. However, its extensive use might produce drug resistance. Another factor, which contributes to drug resistance, is that the drug is only effective against parasite adult forms [6].

PZQ, (RS)-2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazin[2,1a]-isoquinolin-4-one [7,8], is a molecule that contains an oxo group in position 4, which is very important for drug activity (Fig. 1). Moreover, if this group is modified, the activity gets suppressed. Furthermore, PZQ has a chiral center in position 11b, therefore, it has two enantiomers with different properties, where only the R-(-)-enantiomer possesses anthelmintic activity [9,10]. However, commercial preparation is a racemic mixture. The process which is the most widely used to obtain enantiomers is the crystallization [11]. The PZQ enantiomeric system behavior was studied at different temperatures and several enantiomer mixtures of PZQ were obtained [12]. Likewise, thermodynamic and solubility properties of PZQ enantiomers were characterized and compared with those of the commercial racemic product [13]. Enantiomers crystals showed different thermal properties relative to the racemic drug and the results of Differential Scanning Calorimetry (DSC) indicated that the PZQ used is a racemic compound rather than a racemic mixture. Consequently, it is difficult to separate mechanically both enantiomers, unless crystallization and chromatography processes would be used [14]. Moreover, it was possible to combine the racemic PZQ, (RS)-PZQ, with aliphatic dicarboxylic acids to form different co-crystals which differ in their properties, making possible to overcome some of the restrictions on the use of this drug in humans and animals [15]. In addition, PZQ is classified in Class II in Biopharmaceutics Classification System (BCS) [16]. Therefore, the improvement of PZQ dissolution rate and/or solubility has an important technological interest [17]. Solid dispersions prepared by melt granulation and spray congealing showed their efficacy in enhancing the PZQ dissolution rate [18]. Recently, clay minerals as montmorillonite and sepiolite were studied as nanocarrier with the aim of improving the biopharmaceutical profile of the drug [19]. More recently, a new PZQ polymorphic phase, called Form B, has been discovered and fully characterized demonstrating better bioavailability in term of intrinsic dissolution and solubility [20].

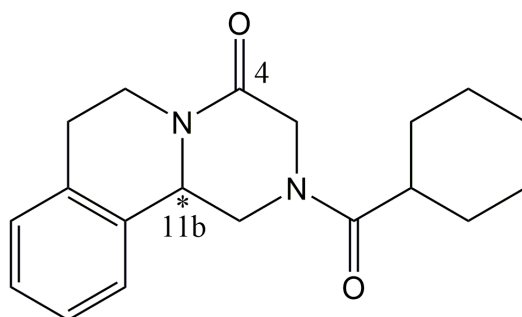


Fig. 1. Molecular structure of PZQ.

Ground calcium carbonate (GCC) is a pharmaceutical excipient widely used as a diluent in solid dosage forms, as an adjuvant in dissolution for dispersible tablets, as a food additive and calcium supplement [21]. GCC is a natural and economic component for pharmaceutical and veterinary drugs with an interesting potential use in developing countries. Therefore, calcium carbonate has been proposed as excipient for a new delivery system of low soluble drugs, e.g. praziquantel. In particular PZQ-GCC solid dispersions were prepared by solvent evaporation method and then characterized to detect possible drug solid state modifications or interactions with the excipient. This is important because the characterization and stability of chiral drugs properties in solid state are critical for their development, manufacturing and applications. Previous solubility studies of PZQ reported ambiguous behavior due particularly to the existence of crystal polymorphism [11,12,14]. Thus, the main aims of this work were to investigate the physico-chemical characteristics of the racemic crystal form of PZQ once in contact with powdered calcium carbonate, by means of DSC, TGA, XRD, SEM, FTIR, Raman spectroscopy and chiral chromatography. Finally, the relationships between the different crystal forms of PZQ at molecular scale were discussed.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Praziquantel (PZQ) was kindly donated by Fatro S.p.A. (Bologna, Italy). Calcium carbonate, as Ground Calcium Carbonate Calcitec Pure PH V/40S (GCC), was purchased from Italy (Company “Mineraria Sacilese”). The Calcium Carbonate Calcitec Pure PH is used in the food industry and in industries where a low content of heavy metals is requested as well as in the pharmaceutical industry, since it was accepted in the latest edition of the European Pharmacopoeia and the USP. Colloidal silica (Aerosil® 200) was purchased to Degussa AG (Frankfurt). Ethanol of 96% and 99% of purity were used as PZQ solvents.

Preparation of the PZQ and GCC interaction product (IP)

An amount of GCC was dispersed in an ethanolic solution of PZQ under magnetic stirring at room temperature and protected from light to obtain a drug/calcium carbonate ratio of 1:5 w/w. After 24 hours, the solvent was evaporated at 40 °C with a rotary evaporator (Buchi® R II) at reduced pressure. The solid residue was dried in a desiccator and then it was pulverized. The obtained solid dispersions were stored in a desiccator at room temperature. As a control experiment, commercial PZQ was treated without GCC following the same procedure (PZQ_c). Colloidal silica was also used instead of GCC in the same way for comparison purposes.

Powder X-ray diffraction

Powder X-ray diffraction was performed with a Philips® X-Pert diffractometer with CuK α radiation. The information of diffraction was analyzed using XPOWDER® software [22].

Thermal analysis

Differential Scanning Calorimetric analysis (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) were performed with a Mettler Toledo mod. TGA/DSC1 calorimeter, equipped with sensor, a FRS5 microbalance (precision 0.1 μg) and the FP89 software package. A heating rate of 5°C/min was used in the 30-400°C temperature range for TGA and DSC runs. Additionally, a rate of 2°C/min was used for some specific DSC runs. Nitrogen was used as purge gas in DSC under flows of 15 mL/min⁻¹.

Scanning electron microscope (SEM)

Microphotographs of the samples were performed using a Hitachi S-510 scanning electron microscope (voltage 25 kV, secondary electron images) (Hitachi Scientific Instruments Ltd, Tokyo, Japan). The samples were mounted on adhesive paper, fixed with colloidal gold and metallized with gold in two orientations (20-30°). The images were captured digitally using the program ScanVision 1.2 attached to the microscope.

Fourier Transform Infrared (FTIR) and Raman Spectroscopies

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra were recorded in the range 4000-600 cm⁻¹ with a 0.5 cm⁻¹ resolution and a well-plate sampler (JASCO 6200 spectrophotometer with Spectra Manager II software). Raman spectra were recorded in the range 3500-800 cm⁻¹ with a 6.48 cm⁻¹ resolution using a Micro-Raman dispersive JASCO NRS-5100 spectrophotometer, with laser light source VIS-NIR, red diode at 785 nm with 500 mW of power (*TorsanaStarbright*), refrigeration by air and a KnowItAll JASCO Edition for Raman software.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

The chirality of drug in the interaction product was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a 1260 Infinity II Agilent equipment (G) with quaternary pump, autosampler, column

oven and UV-VIS diode-array spectrophotometer. The stationary phase was a column Chiralpak® IC, 5 μm , 150 \times 4.6 mm (Daicel Corporation), and the mobile phase was a mixture of H₂O and CH₃CN (35:65 v/v). The flow rate was set at 0.8 mL/min with an injection volume of 10 μL . A detector with a wavelength of 225 nm was used and the run time for each analysis was 5 min. Data were recorded and analyzed by using LC Open LAB HPLC 1260 software (Agilent, G).

COMPUTATIONAL SECTION

The COMPASS FF [23] based on empirical interatomic potentials was used within the Discover program of the Materials Studio package on the periodical crystal models [24]. This FF was used previously to describe PZQ molecules and crystal structure with satisfactory results [25]. An atomic interactions cut-off of 18.5 Å was used for calculating Van der Waals and Coulomb interactions.

Additional DFT calculations of the periodic racemic crystal of PZQ were also performed with the SIESTA program [26] using the generalized gradient approximation (GGA) with the Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) [27] correlation exchange functional, and norm-conserving pseudopotentials [28]. Preliminary calculations were set up to explore different values of mesh cut-off energy and different numbers of *k*-points in the irreducible wedge of the Brillouin zone to optimize the calculations level. A wide range of mesh cut-off energy values in steps of 50 Ry was explored according to previous work [29,30], finding a suitable cut-off energy of 800 Ry and two *k*-points in the Brillouin zone in this work.

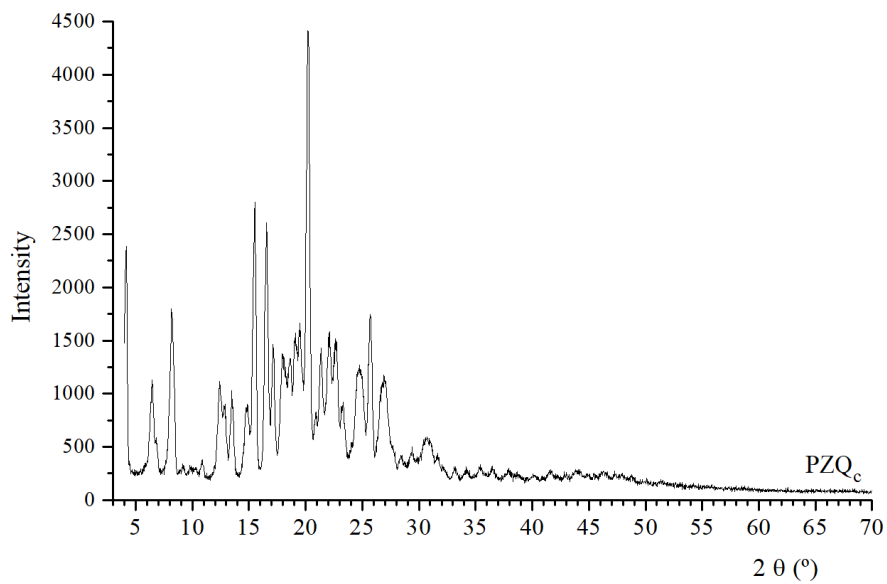
Powder XRD patterns were simulated from crystal structures by using the Reflex code implemented in Materials Studio package [24].

RESULTS

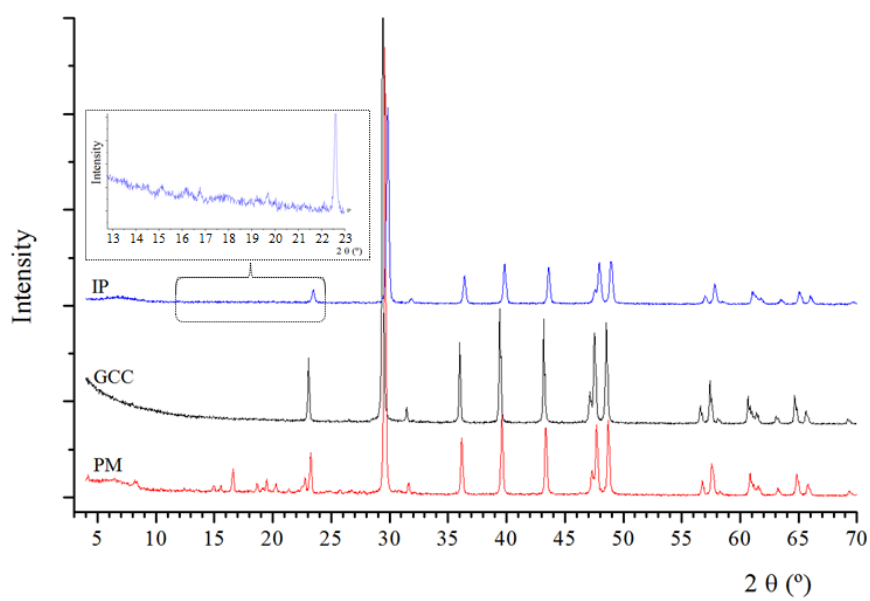
Physico-chemical evaluation of PZQ-GCC interaction product

Possible interactions between PZQ and GCC were first explored by powder XRD on pristine PZQ, GCC and the IP obtained by solvent evaporation using ethanol 96% (Fig. 2). The pristine PZQ was solved and recrystallized through the same procedure evaporation of ethanol 96%, as a control experiment without GCC, and its XRD pattern showed a crystalline PZQ according with that previously reported [31] (Fig. 2a). GCC shows a typical pattern of calcite with reflections at 23.0°, 29.4° (the most intense), 39.5° and 43.1° (2Θ units).

The IP mixture showed reflections of mainly calcium carbonate crystals. Reflection peaks of PZQ crystals in IP had very low intensity and resolution probably due to the amorphization of PZQ or several changes in the crystallinity of the PZQ crystals with GCC as explained later. In previous works a similar behavior of PZQ was observed in the formation of a solid dispersion with polyvinylpyrrolidone (PVP) [32], sodium starch glycolate [33] and clay minerals [19]. The powder XRD pattern of a physical mixture (PM) of PZQ with GCC showed that the crystallinity of PZQ was maintained corroborating that the treatment of GCC and ethanol 96% affects the crystallinity of PZQ (Fig. 2b).



a



b

Fig. 2. Powder XRD patterns of the studied samples, PZQ obtained crystallized through ethanol 96% evaporation (a), IP, GCC, and PM samples (b).

Thermogravimetric profiles of the samples studied are shown in the Fig. 3. GCC shows a slight weight loss (0.34 % w/w) at 40 °C approximately, corresponding to the surface humidity evaporation. PZQ weight loss occurs in the range between 200 and 422 °C (97.64 % w/w) due to the decomposition of PZQ. The IP showed similar profiles with the decomposition of the PZQ fraction at 250-300 °C, indicating the PZQ is remained in the IP, although the thermal range is narrower than the pure PZQ. This range can be due to a different crystallinity of PZQ in the IP.

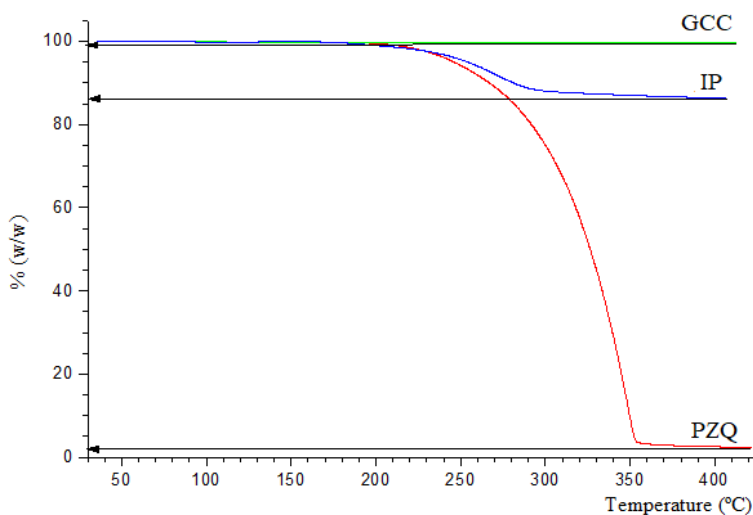


Fig. 3. TGA profiles of the studied samples.

The DSC profiles of these samples are reported in Fig. 4. PZQ showed a strong endothermic peak at 142-144 °C corresponding to the melting of the (RS)-PZQ crystal. GCC showed no significant peak in the DSC profile at $T < 200$ °C. The IP profile was completely different than pure PZQ and GCC, displaying two small peaks at 110-112 °C and around 133-144 °C. Since no weight loss was observed by TGA at this temperature range, the peak at about 110-112 °C could be attributable to the melting of either the monoenantiomeric crystals or of the new polymorph (Form B) described recently by Zanolla et al. [20], both reported at around 111 °C. The second endothermic peak at higher

temperature could be ascribed to possible agglomerate or pseudoracemate crystals (134-138 °C) according to a previous work [11]. Finally, the broad and weak shoulder around 142-143 °C corresponded to the initial racemic (RS)-PZQ crystals. Therefore, the formation of a disordered mixture of several crystal forms in IP could justify the low resolution of the PZQ reflections in the XRD pattern.

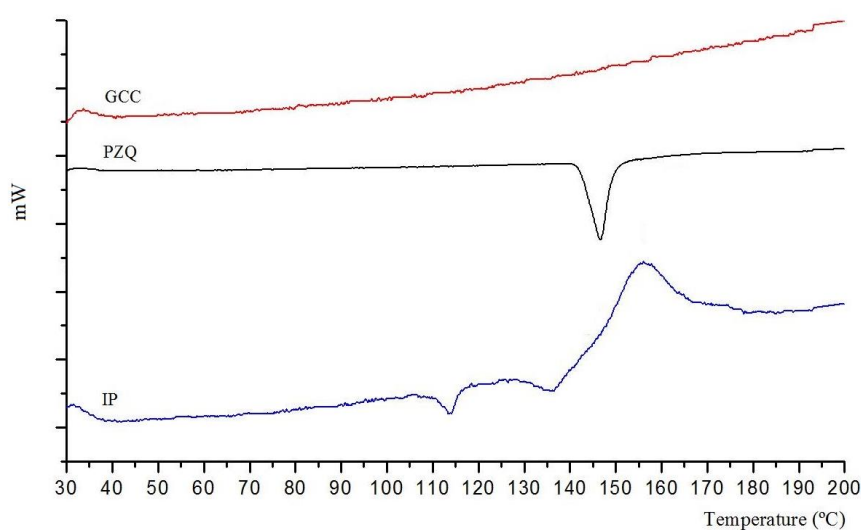


Fig. 4. DSC profiles of GCC, PZQ, and the IP.

In order to obtain better DSC profiles with more accurate melting points and for comparisons with previous studies [14], a lower temperature rate (2 °C/min) and gas flow (15 mL/min) was used confirming the above profiles. An experimental control of pristine PZQ treated was performed with ethanol 96% following the same procedure as the IP. The treated PZQ showed its endothermic peak at 142 °C (Fig. 5a) with a melting enthalpy of $\Delta H = 90.4$ J/g according to previous work [32]. On the contrary, the IP mixture showed endothermic peaks at 112 °C, 134 °C and 138 °C (Fig. 5b). Similar DSC profile was found by De la Torre et al. [32] in IP of PZQ with PVP. The peak at 134 °C disappeared after 3 months from preparation, increasing the area of the peak at 138 °C. This can indicate that the crystal form with the melting point at 134 °C was

metastable and transformed slowly to the form which melted at 138 °C. Therefore, we can conclude that the alteration of PZQ solid state within the IP mixture was not due to the dissolution-evaporation process, but it is due the direct interaction of PZQ with GCC.

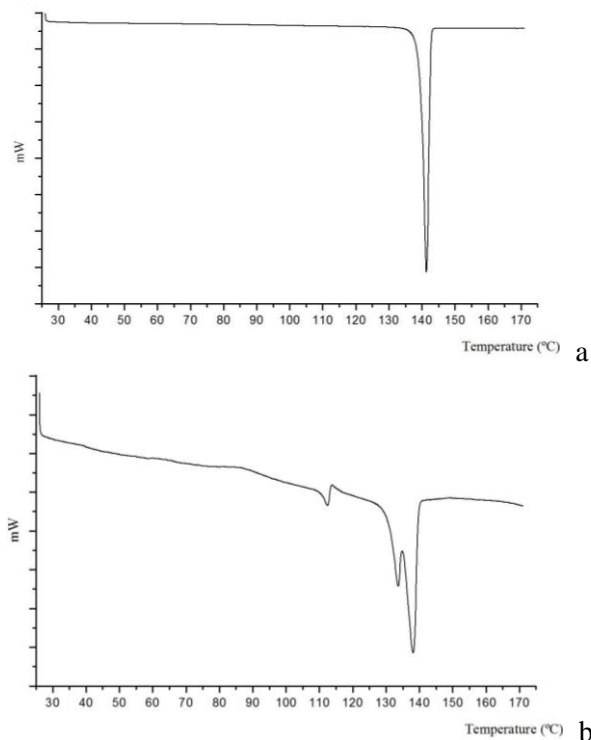


Fig. 5. DSC profiles of PZQ treated with ethanol 96 % (PZQ_c) (a), and the IP (b).

SEM microphotographs of GCC (Fig. 6A) showed a grain size lower than 10 μm , with typical morphologies of GCC of high purity for pharmaceutical use previously reported [21]. Particles associated with any impurities were not detected, corroborating the XRD results. The micropictures of the racemic (RS)-PZQ (Fig. 6B) presented elongated prismatic morphology and sizes superior to 100 μm , similar to those observed for drug racemic mixture previously [11,15].

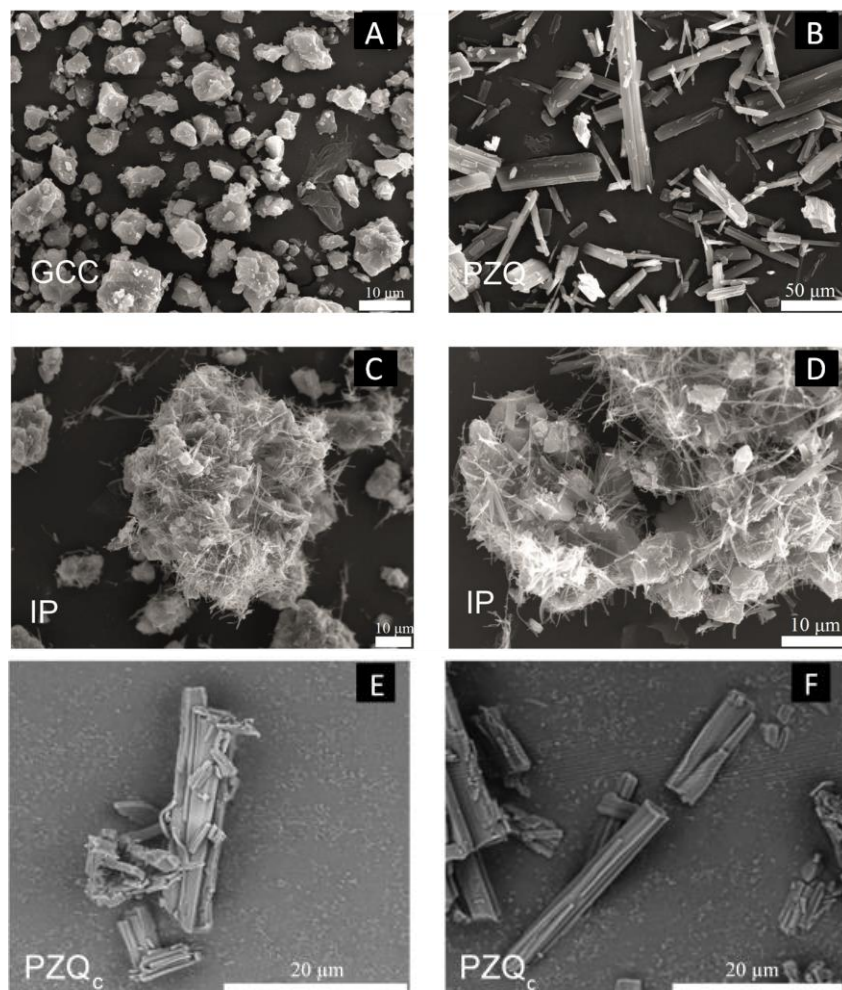


Fig. 6. SEM microphotographs of studied samples at different magnifications.

In the SEM micropictures of the IP, significant changes of size, texture and morphology were observed (Fig. 6C and 6D). Filamentous particles interconnecting the GCC particles were observed along with some wider needles. The initial particles of PZQ disappeared and PZQ formed aggregates on the GCC particles during the dispersion and solvent evaporation process and the filaments grew inside these aggregates. This small crystal size of these disordered fibers can justify the low crystallinity and the above lack of XRD reflections in this IP mixture. A similar behavior was observed in previous works when PZQ is mixed

with PVP in a solid dispersion [32], with sodium starch glycolate [33], and with clay minerals [19], where the formation of similar fibers was observed after preparation of IP. Recently this formation of fibers of PZQ was also observed after neat grinding without additives, and it was attributed to the new PZQ polymorphic form (Form B) [20], which can be in agreement with the 112 °C peak of our DSC analysis. However, in our experimental control the PZQ recrystallized in EtOH 96% in the same conditions as IP showed a similar crystal shape and morphology that the pristine PZQ in the SEM micropictures (Fig. 6E and 6F). This corroborates the effect of water and GCC on the crystallinity of PZQ.

FTIR spectra of the racemic PZQ, calcium carbonate (GCC) and the IP are compared in Fig. 7. PZQ shows two main characteristic bands in the range 2960-2840 cm^{-1} assigned to stretching vibration modes $\nu(\text{CH})$ of CH and CH_2 groups [18]. Two bands corresponding to the $\nu(\text{C}=\text{O})$ vibration mode are observed at 1665-1621 cm^{-1} [18], which can be assigned to each carbonyl group with different local environment in the crystal packing. The $\delta(\text{C}-\text{H})$ and $\nu(\text{C}-\text{N})$ modes are observed around 1350-1021 cm^{-1} [34]. The spectrum of GCC shows characteristic bands of the carbonate group (CO_3^{2-}) at 1453, 875 and 712 cm^{-1} [35, 36]. In the IP, the bands of PZQ were detected with lower intensity than in the pure product, but most of them overlap with the bands of Ca carbonate due to the high proportion of GCC. However, slight differences can be distinguished in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands. In PZQ, two $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands appear with maxima at 1647 and 1624 cm^{-1} , corresponding to the syn relative conformation of the carbonyl groups in the (RS)-PZQ crystal. The shoulders observed at higher frequency are assigned to the syn conformation in twisted planes of each C=O group, according to previous work [37]. On the contrary, in IP these bands are broader with maxima at 1644 and 1634 cm^{-1} . These frequency shifts could also be assigned to the conformation change of the C=O groups in an anti conformer whose frequencies are closer according our previous calculations [37]. This frequency shifts were also previously observed for the Form B phase [20].

These bands are broader due to the co-existence of several conformations, syn and anti, confirming the mixture of crystal forms detected above.

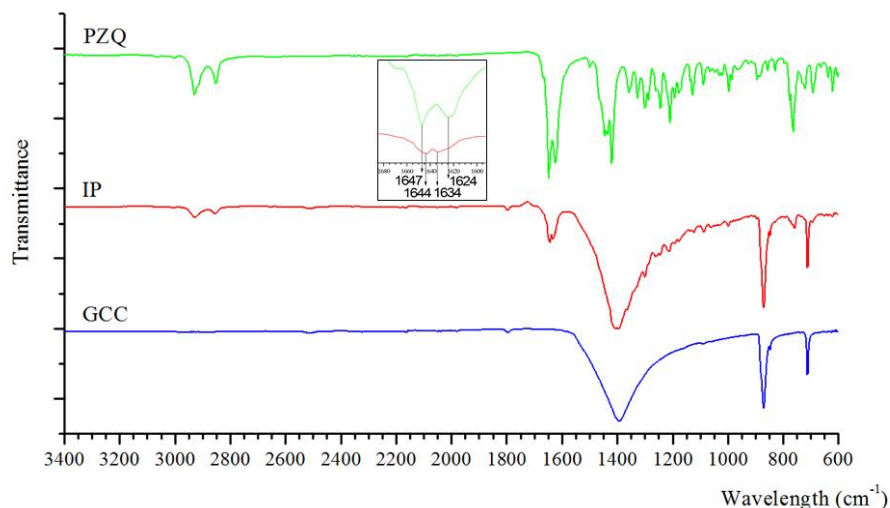


Fig. 7. FTIR spectra of PZQ, the IP, and GCC.

In addition, the Raman spectra of PZQ (Fig. 8) shows a high intensity band at 1044 cm^{-1} that can be assigned to a symmetric deformation vibration mode of C-N, $\delta(\text{CN})_s$. Whereas the most intense band of the calcium carbonate (GCC) spectra appears at 1085 cm^{-1} , that corresponds to the symmetric $\nu(\text{C-O})$ stretching [38,39,40]. The intensities of the PZQ fraction of the IP mixture are very low indicating the possible formation of different PZQ crystal forms. Nevertheless, the main bands of PZQ can be weakly observed in the IP spectrum. However, slight differences can be detected in the ranges of $1150\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$, and $1280\text{-}1360\text{ cm}^{-1}$ where the profiles are different and closer to the calculated anti conformer of PZQ [37]. Hence this enforces the existence of other crystal forms with different conformer mixture.

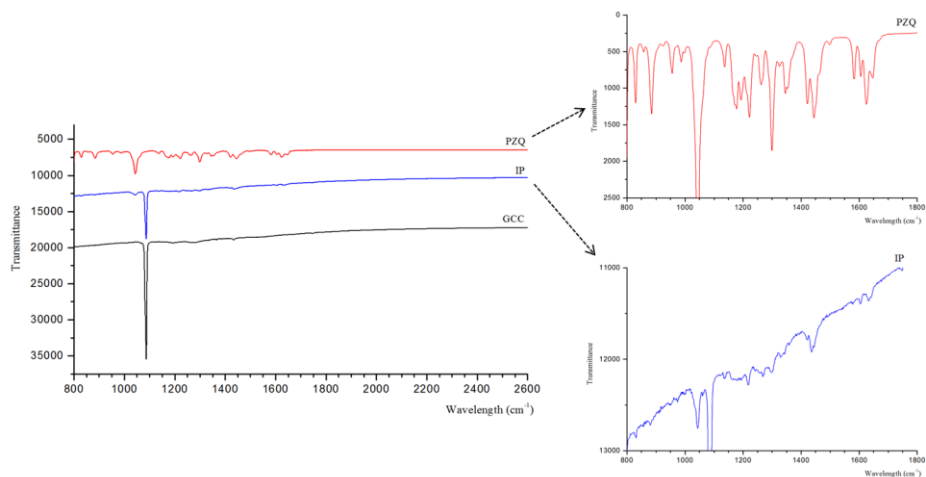


Fig. 8. Raman spectra of PZQ, the IP, and GCC.

In addition, the chirality of the drug in the IP was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC), obtaining the same proportion of each enantiomer in pure PZQ and IP, which means that the IP obtained was still a racemic product (Fig. 9). Taking into account the melting point observed at 111 °C in DSC, we tried to separate this melted phase from the rest of crystal form and observe possible changes in the enantiomer proportion by HPLC. Then, we placed an IP solid sample on a mesh and heated it for 3 hours at 125 °C. No melted material was observed with shorter heating time. The melted part was absorbed by an absorbent paper placed below the mesh. Subsequently, this paper was treated with ethanol 96% to extract the melted compound and this dissolution was analyzed by HPLC. The chromatogram showed (Fig. 9c) a greater proportion of the area of peak that appeared at a time of retention of 6 minutes, approximately. However, this peak appeared as a double peak, suggesting the overlapping of two compounds formed during the heating of the IP at 125 °C. Other peaks with low retention time are observed, indicating other different compounds formed during the heating process.

To confirm this hypothesis, this experiment was repeated by using DSC, treating the IP at 125 °C for 3 hours. After that process, the DSC profile was gone on by heating up to 400 °C, then a subsequent cooling process up to room temperature was followed (Fig. S1). An exothermic peak was observed at 110-125 °C corresponding to the decomposition of the compound instead of the melting endothermic peak of Form B crystal phase (Fig. S1a and S1b). The shoulder at 111 °C could indicate a balance between the melting and decomposition of the Form B. This degradation was small maintaining the main molecular structure, because the main degradation occurred at 210-310 °C. In N₂ atmosphere, the degradation decreased, the melting peak of (RS)-PZQ crystal was observed at 134-140 °C and the main thermal degradation occurred at a higher temperature range, 270-350 °C. As a result, the degradation of the drug was observed (Fig. S1). Therefore, the alteration of the HPLC chromatogram of the IP treated at 125 °C was due to the PZQ degradation. By performing the DSC scan of the pristine PZQ sample no degradation of the drug was observed (Fig. S1c). No peak was observed during the cooling process indicating no recrystallization of the initial compound confirming the total degradation of PZQ. Therefore, this means that when the IP was maintained at 125 °C for 3 hours, the crystal form, which has a melting peak of 112 °C, degrades under these conditions, while the rest of the sample does not degrade until T>210 °C.

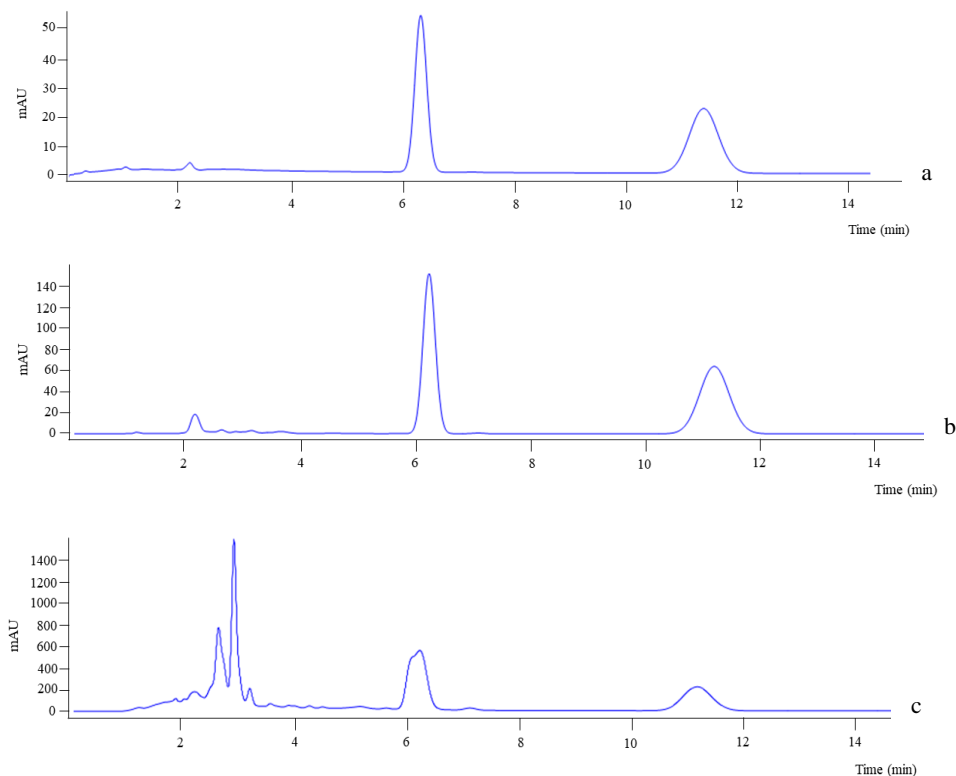


Fig. 9. HPLC chromatograms of the pure PZQ (a), IP (b), and the melted part of the IP after 3 hours at 125 °C (c).

Interaction products of PZQ in other conditions

Other experimental conditions have been explored, such as the influence of a more pure ethanol to minimize the presence of water and contact time in the formation of IP in the same conditions as in the above experiments. The DSC profile of the PZQ treated with ethanol 99% and GCC showed endothermic peaks only at 134 °C and 138 °C (Fig. 10a). Therefore, the peak at 112 °C only appears with ethanol 96% (with 4% of water). On the other hand, the contact time was also explored considering 24 and 72 hours with ethanol 99%. The same behavior was observed. The DSC profile showed endothermic peaks only at 134 °C and 138 °C (Fig. 10b). The peak at 134 °C was more intensive than the other peak, and no peak at 112 °C was found.

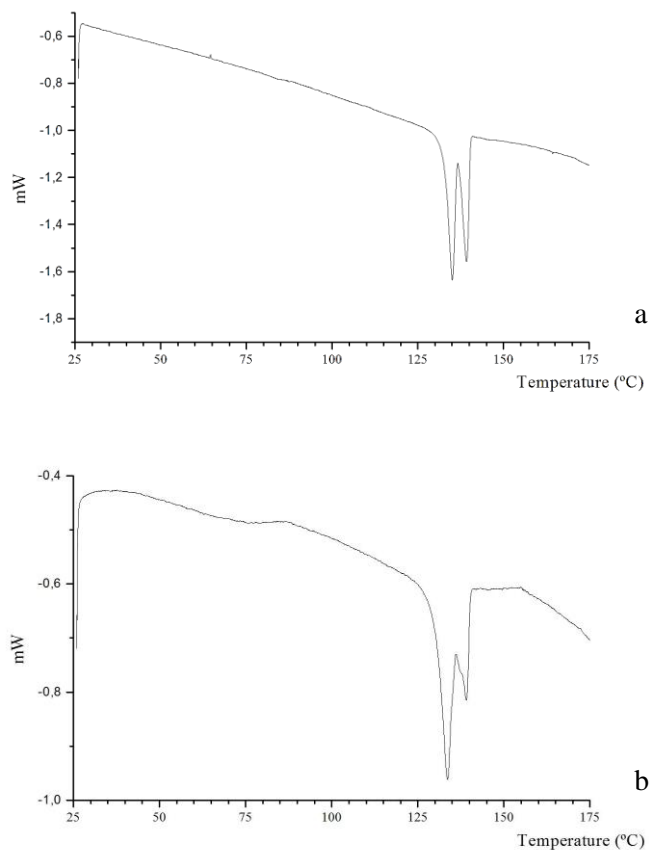


Fig. 10. DSC profiles of PZQ treated with ethanol 99% in GCC during 24 hours of agitation (a), in GCC during 72 hours of agitation (b).

In the micropictures (SEM) of PZQ treated with ethanol 99% in GCC for 24 hours and afterwards solvent evaporation, the crystal particles were different and smaller than those of pristine PZQ (Fig. 11 and Fig. 6B, respectively). No filamentous fibers, similar to those found in the IP obtained with ethanol 96% (Fig. 6C and 6D), were observed. Therefore, the presence of water resulted fundamental for the formation of the crystal forms with melting point at 112 °C.

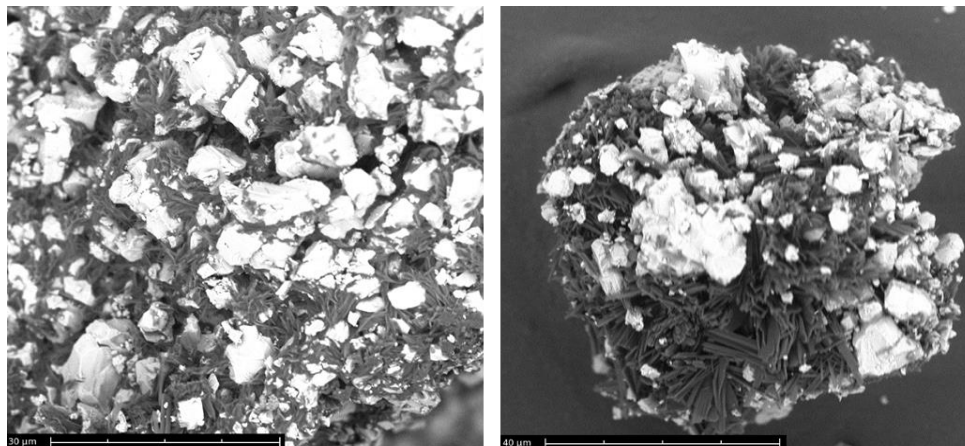


Fig. 11. SEM microphotographs of the PZQ treated with ethanol 99% in GCC during 24 hours of agitation and afterwards solvent evaporation.

The behavior of PZQ interacting with a less reactive compound like colloidal silica was tested in the same conditions that with GCC. PZQ was treated with colloidal silica in ethanol 99% and ethanol 96% during 24 hours of agitation and afterward ethanol evaporation. DSC profiles showed a single melting peak at 140 °C, without splitting of peaks (Fig. 12). The peak is typical of pure PZQ. No formation of the crystal form with melting point at 112 °C was observed. Therefore, the presence of GCC is critical for the change in the crystallinity of PZQ.

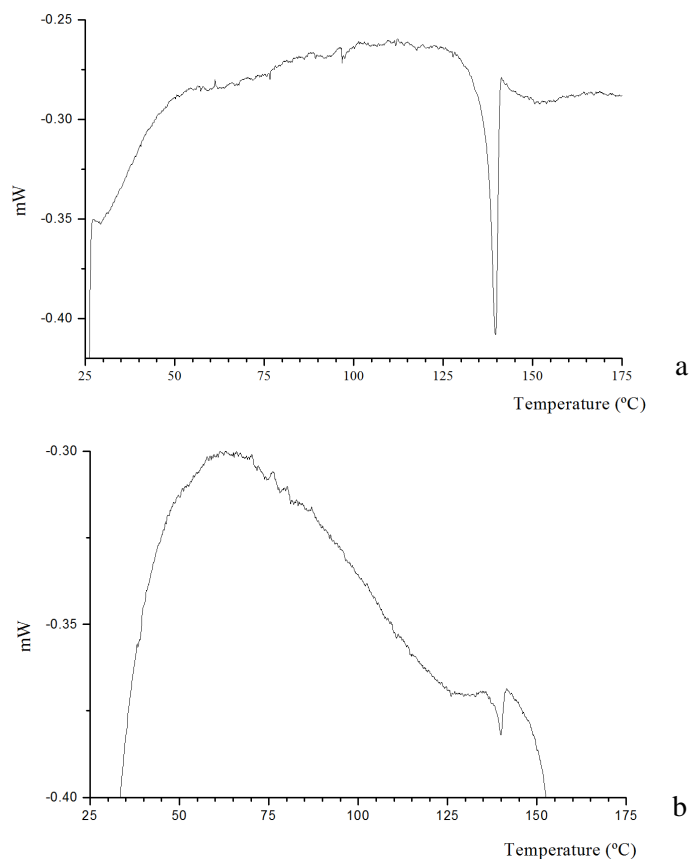


Fig. 12. DSC profiles of PZQ treated in colloidal silica with ethanol 99% (a) and in colloidal silica with ethanol 96% (b).

DISCUSSION

Interactions between PZQ and calcium carbonate at molecular level

Our experiments described above indicated that the interaction of the (RS)-PZQ solid with calcium carbonate affects the crystallization process and crystallinity of PZQ, forming other different crystal forms. No chemical decomposition of PZQ was observed, but only alterations of the ordering in the packing of PZQ molecules and a conformational change in the PZQ molecule. In the (RS)-PZQ crystal the carbonyl groups are oriented to the same direction, *syn* conformation (Fig. 13a). During

the nucleation step, the calcium carbonate can interact with these carbonyl groups of PZQ. This interaction can be enhanced with the presence of a small amount of residual water coming from the ethanol (96%) solvent during the treatment. Previous calculations showed that the *syn* conformation of PZQ is the more polar than the *anti* one [37] (Fig. 13b) and it is likely to be present in an ethanol/water solution during the formation of the solid dispersion. Then, both conformers can be present in the solution and form different crystal nuclei. Our FTIR analysis indicates the presence of several conformers in the broadening of the stretching C=O bands in IP sample (Fig. 7).

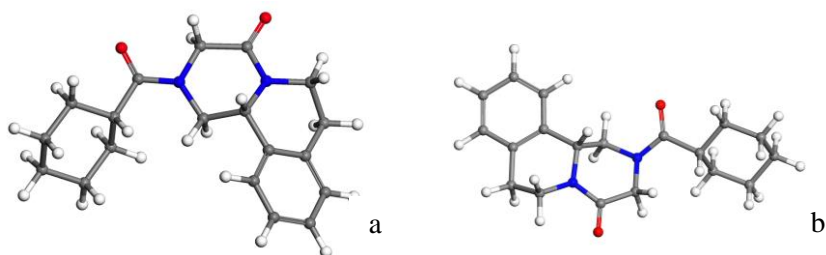


Fig. 13. Conformations *syn* (a) and *anti* (b) of PZQ. The C, H, N, and O atoms are in grey, white, blue, and red color.

Our above experiments indicate that the interaction of PZQ with water and GCC is critical for the crystallinity alteration in the IP samples. The presence of water/carbonate alters definitely the recrystallization of PZQ. Possibly, a local zone of high pH aqueous conditions could affect in this recrystallization during the nucleation and ordering of the PZQ units. However, we cannot measure the pH at nanoscale level. Nevertheless, we include here this idea as a hypothesis and as a starting point for future investigations. Definitely the actual effect will be the interactions at molecular level in a PZQ/water/CaCO₃ complex. In order to explore these interactions, we can create small models to describe this complex system with only one PZQ molecule, one water molecule and one GCC salt complex. We understand that these models can be considered too small. But these models do not pretend to reproduce exactly the experimental scenario, that would be too complex and difficult to calculate. Our models

represent the minimal expression to describe the formation of interatomic interactions between PZQ/water/CaCO₃. Of course this complex will be surrounded by more water molecules and CaCO₃ species but they will be in outer coordination spheres.

Then, two possible complexes can be considered: PZQCCw1, where the Ca²⁺ cation is coordinated with both carbonyl groups in a equidistant distance of 2.9 Å; and PZQCCw2, where the water molecule interacts directly with both carbonyl groups by means of hydrogen bonds at 2.3 Å. Both models were generated and the geometry was optimized with COMPASS FF calculations, using the SPC water model. In both models the coordination changed to only one carbonyl group during the optimization process. In PZQCCw1, the Ca²⁺ cation is coordinated at 2.30 Å to only one carbonyl O atom, which is joined to the cyclohexyl ring, leaving free the other carbonyl group; and the water H atoms form hydrogen bonds with the carbonate O atoms at 1.48-1.52 Å (Fig. 14a). Similarly in PZQCCw2, one water H atom is coordinated at 1.73 Å to only one carbonyl O atom, which is joined to the cyclohexyl ring, leaving also free the other carbonyl group (belonged to the heterocyclic ring), and the water O atom is coordinating the Ca²⁺ cation $d(\text{O}\dots\text{Ca}) = 2.25$ Å (Fig. 14b).

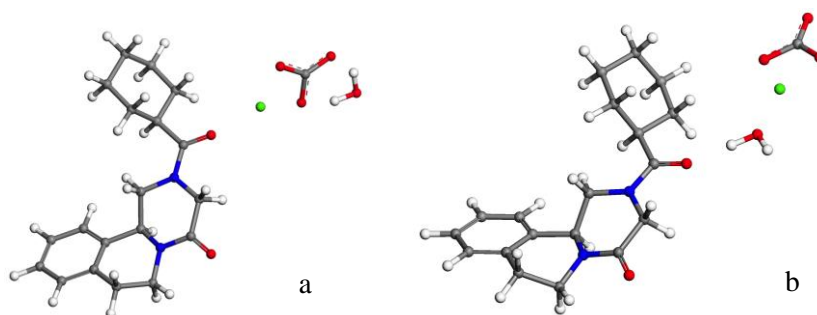


Fig. 14. Models of PZQCCw1 (a), and PZQCCw2 (b) complexes optimized with COMPASS. The C, Ca, H, N, and O atoms are in grey, green, white, blue, and red color.

In both models the Ca^{2+} cation is coordinated to two carbonate O atoms at 1.87-1.91 Å. It is remarkable that in both complexes the heterocyclic carbonyl moiety is not coordinated being more free for rotating to the *anti* conformation facilitating the formation of other crystal forms as observed experimentally.

Molecular interactions in the conformational changes of PZQ in the crystal forms

In the above experiments the racemic crystal of (RS)-PZQ was partially decomposed on other crystal forms owing to the interaction with GCC during the nucleation and recrystallization of PZQ. The molecular interactions in the different crystal forms can be explored at molecular level by means of molecular modeling simulations to explain this experimental behavior. In this work, the intermolecular interactions within the different crystal forms are analyzed more exhaustively. The crystal structures of the R enantiomer of PZQ, the commercial racemic (RS)-PZQ and the new polymorph of (RS)-PZQ, form B proposed by Zanolla et al. [20], were calculated at molecular level and compared. All details of these calculations are described in the Supplementary Material.

The crystal lattice of (RS)-PZQ is formed by enantiomer pairs and the molecular packing is due to the electrostatic interactions of the carbonyl groups with the H atoms of the heterocycles and π - π interactions between aromatic and heterocyclic rings (Fig. 15a). The difference between the (R)-PZQ and (RS)-PZQ crystals is not only the proportion of enantiomers, but they are different crystal forms, with different molecular conformations, different intermolecular interactions and the presence of water molecules. In the (RS)-PZQ crystal both carbonyl groups are oriented to the same direction, conformation *syn*, whereas in the R-enantiomer hemihydrate crystal these carbonyl groups are oriented to opposite directions, conformation *anti*. In the crystal of the hemihydrate of the enantiomer (R)-PZQ (Fig. 15b), the crystallization water provides hydrogen bonds to connect the carbonyl groups.

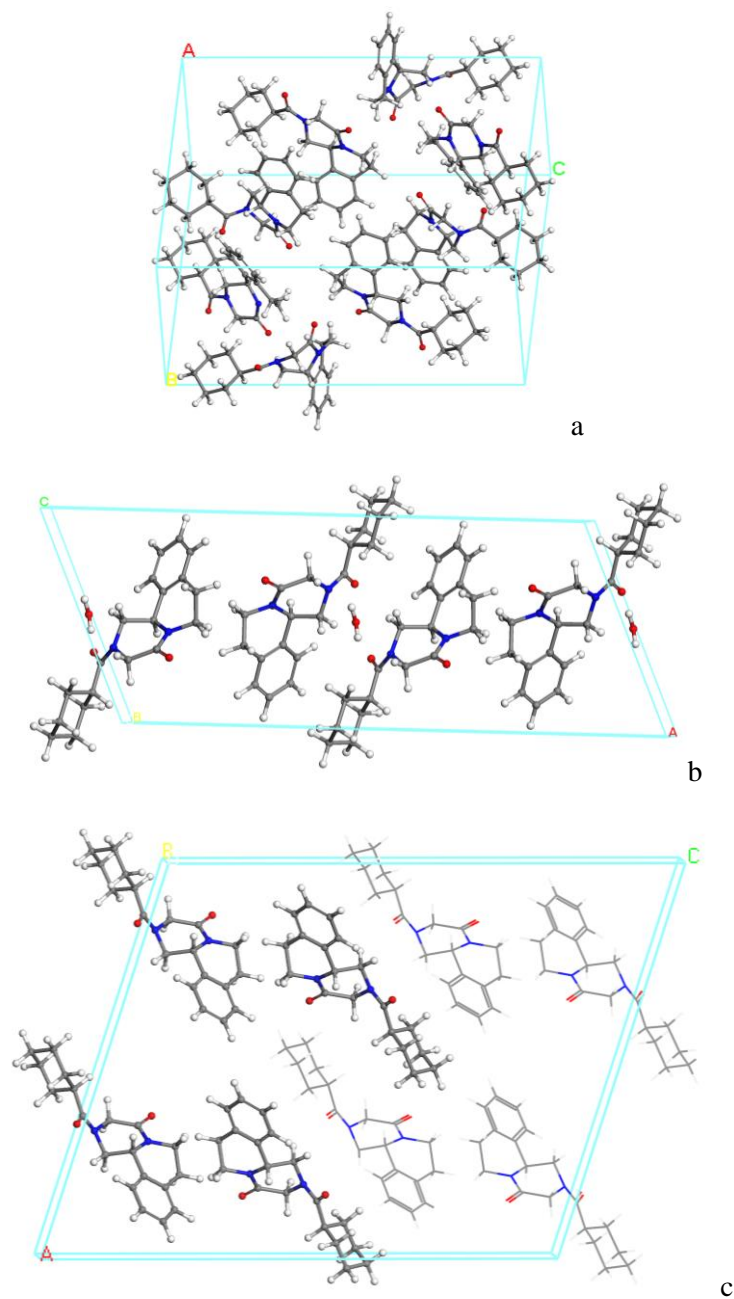


Fig. 15. Intermolecular interactions in the optimized crystal lattice of (RS)-PZQ (a), (R)-PZQ (b), the new RS polymorph (Form B) (The enantiomer S is highlighted with the atoms represented as balls) (c).

In the crystal structure of the new RS polymorph (Form B), all PZQ molecules are in the anti conformation and the main intermolecular interactions are electrostatic between the carbonyl O atoms and the surrounding alkyl H atoms at $d(\text{CO}\dots\text{HC}) = 2.6\text{-}2.9 \text{ \AA}$. The unit cell is a racemic mixture with 4 molecules of each enantiomer per unit cell (Fig. 15c). However, the relative distribution of enantiomers is different from that of the pristine (RS)-PZQ. The enantiomers R are separate from the S ones forming clusters that form alternate slabs of each enantiomer in a tridimensional supercell structure, whereas in the initial pristine (RS)-PZQ the molecules are forming pairs of R and S enantiomers. The cohesion energy (-41.42 kcal/mol per PZQ molecule) of this new RS polymorph (Form B) is similar to the initial pristine (RS)-PZQ crystal form, -39.78 kcal/mol per PZQ molecule. This small energy difference can indicate a similar probability for nucleating both polymorphs.

The IUPAC definition of the term "racemic mixture" in the solid state refers to a heterogeneous mixture of two separate solid phases, while the term "racemate" refers to a homogeneous single phase [41]. Pseudoracemate is other possible solid structure that can be defined in chiral compounds. When one enantiomer has a greater affinity for molecules of its own kind than for those of the other enantiomer, both enantiomers crystallize in separate phases forming a racemic mixture. On the contrary, one enantiomer can have greater affinity for molecules of the opposite enantiomer than for its own kind and form a racemic compound. In both cases, the unit cell of the crystal lattice contains an equal number of molecules of each enantiomer and the product is a true addition compound. When there is little difference in the affinity between enantiomers of like or opposite configuration, both enantiomers exist in a disordered manner in the crystal forming a racemic solid solution or pseudoracemate [41]. In this work, one additional difference exists, that is, pure enantiomers form a different crystal polymorph with respect to the racemate. Liu et al. [11] studied several mixtures of PZQ enantiomers finding different melting points and concluded that the direct transformation between racemic mixture and racemic compound was not possible. However, in this work we conclude the opposite way. In the

experimental crystallographic CIF file of (RS)-PZQ crystal (TELCEU, CCDC-896767), four PZQ molecules (two enantiomers pairs) per unit cell are disordered in the atomic positions of the aromatic-heterocyclic moiety of the molecule [15]. This mobility of the molecules could favor the easy polymorphic change in this system. Zanolla et al. [20] obtained the new polymorph just by milling physically without dissolution-recrystallization process. The conformer *anti* is less polar than the *syn* one, and the *anti* one is more stable than *syn* without polar interactions [37]. The mechanical energy during the grinding process can provoke a disorder in the molecules and a conformational change obtaining the most stable conformer. However, the ordering of this system did not produce a racemate, like in the initial (RS)-PZQ, but a pseudoracemate or racemic mixture where each enantiomer of the same sign is clustered.

After the dissolution of PZQ and treatment with GCC, both enantiomers precipitate forming a mixture of a solid solution of PZQ enantiomers (pseudoracemate) showing a melting point at 134-137 °C and some crystals of PZQ with a melting point at 111-113 °C. Previous authors [11] found a melting point at 111 °C of the crystal form of the enantiomer (-)-(R)-PZQ and a melting point at 134-138 °C for a 50:50 mixture of enantiomers of PZQ, indicating that this mixture was a racemate and not a conglomerate of enantiomers. In our work, the hemihydrate crystals of the separate enantiomers have the same melting point that the Form B. This can confuse in the interpretation of the polymorphic changes. In our experiments, the interaction of the calcium carbonate provokes the alteration of the pristine (RS)-PZQ that is not observed with a more inert excipient like colloidal silica. However, the presence of water is also critical for this alteration to form crystals that melt at 111-112 °C. This water content cannot be detected in our thermal analysis because it is embedded in the hemihydrate crystals. Therefore, we can conclude that these formed crystals, with melting point at 111-112 °C, could be assigned to the polymorph of hemihydrate of (R) and (S)-PZQ in separate crystals, instead of the anhydrous RS polymorph, Form B, reported by Zanolla et al. [20]. Nevertheless, DSC analysis did not

distinguish the presence between the enantiomers and Form B crystals, or the formation of both polymorphs.

Besides, the DSC experiments of this work can identify clearly the melting points of the monoenantiomeric crystal or the Form B [20] (110-112 °C) and the pure racemic crystals (142-144 °C). However, new solid forms have been detected with intermediate melting points (134-138 °C), which cannot be clearly assigned. This happened only with the presence of calcium carbonate and can be produced also with and without the presence of water, indicating that could correspond to anhydrous forms. The solid phase with a melting point at 134 °C could be assigned to another pseudoracemate or (RS)-racemate with defects and we cannot know its crystal structure. On the other hand, the solid phase with melting point at 138 °C could be another solid solution of enantiomers. Any of these phases could correspond tentatively to the initial racemate where the presence of defects or disordered PZQ could decrease its melting point. However, the phase with melting point at 134 °C is metastable and is transformed slowly to the phase whose melting point is 138 °C.

CONCLUSIONS

Our experiments conclude that the GCC used as excipient of the PZQ through the formation of a solid dispersion affected the crystal structure of the PZQ and modified the pristine PZQ solid state. This effect was enhanced with the presence of residual water molecules from the solvent. A crystal form change occurred along with conformational changes in the molecules. These modifications of the crystal forms could correspond either to monoenantiomeric forms or to the (RS)-Form B (melting point at 112 °C) and other phases (melting point at 134-138 °C) that could be tentatively assigned to a disordered pseudoracemate solid phases. These crystallographic changes were not observed using colloidal silica as solid excipient.

This phenomenon is due to the interaction of calcium carbonate with the carbonyl groups of PZQ, which are in the *syn* conformation. The presence of water is critical in the formation of the crystals with melting

point at 111-112 °C. Probably the solvation water of Ca²⁺ cation forms hydrogen bonds with the carbonyl group joined to the cyclohexyl group. The PZQ molecule can adopt an *anti* conformation, which is energetically more stable than the *syn* one, like in the enantiomeric crystal. Then, the hydrated cyclohexyl-carbonyl group can interact with another PZQ molecule forming the hemihydrate enantiomer crystal (either the same enantiomer or a pseudoracemate crystal, if it is the other enantiomer) in a solid solution of mixed enantiomers.

Computational modeling, with classical FF and at quantum mechanical level, has been a useful tool for understanding the molecular interactions in the crystal structures and the effect of GCC on PZQ and the PZQ conformational changes in the crystal structures experimentally observed.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are thankful to the regional Andalusian projects (RNM363 and RNM1897) and national MINECO project (FIS2016-77692-C2-2-P and CGL2016-80833-R) for financial support and to the Supercomputational Center of Universidad de Granada and CSIC for computing facilities.

REFERENCES

[1] L. Chitsulo, D. Engels, A. Montresor, L. Savioli, The global status of schistosomiasis and its control, *Acta Trop.* 7 (2000) 41-51.

[2] P. Steinmann, J. Keiser, R. Bos, M. Tanner, J. Utzinger, Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk, *Lancet Infect. Dis.* 6 (2006) 411-425.

- [3] R. Trastullo, L.S. Dolci, N. Passerini, B. Albertini, Development of flexible and dispersible oral formulations containing praziquantel for potential schistosomiasis treatment of pre-school age children, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 536-550.
- [4] WHO, WHO Schistosomiasis, World Health Organization, <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>, 2018 (accessed 29 June 2018).
- [5] D. Cioli, L. Pica-Mattocchia, S. Archer, Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmacol. Ther.* 68 (1995) 35-85.
- [6] D. Cioli, L. Pica-Mattocchia, Praziquantel, *Parasitol. Res.* 90 (2003) 3-9.
- [7] EP 7.0. European Pharmacopoeia Seventh Edition. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe, Strasbourg, France, 2011.
- [8] USP 36-NF31. United States Pharmacopoeia 36 and National Formulary 31. US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD USA, 2013.
- [9] P. Andrews, Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity, *Pharmacol. Ther.* 29 (1985) 129-156.
- [10] R. Pax, J.L. Bennett, R. Fetterer, A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*, *Naanyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 304 (1978) 309-315.
- [11] Y. Liu, X. Wang, J.K. Wang, C.B. Ching, Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 3039-3046.
- [12] B.G. Lim, R.B.H. Tan, S.C. Ng, C.B. Ching, Solubility phase-diagram of praziquantel enantiomeric system, *Chirality* 7 (1995) 74-81.
- [13] S.K. El-Arini, D. Giron, H. Leuenberg, Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers, *Pharm. Dev. Techn.* 3 (1998) 557-564.

- [14] Y. Liu, X. Wang, J.K. Wang, C.B. Ching, Investigation of the phase diagrams of chiral praziquantel, *Chirality* 18 (2006) 259-264.
- [15] J.C. Espinosa-Lara, D. Guzmán-Villanueva, J.I. Arenas-García, D. Herrera-Ruiz, J. Rivera-Islas, P. Román-Bravo, H. Morales-Rojas, H. Höpfl, Cocrystals of active pharmaceutical ingredients-praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic and pimelic acids, *Cryst. Growth. Des.* 13 (2013) 169-185.
- [16] M. Lindenberg, S. Kopp, J.B. Dressman, Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 265-278.
- [17] D. González-Esquivel, J. Rivera, N. Castro, L. Yopez-Mulia, J.C. Helgi, In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel, *Int. J. Pharm.* 295 (2005) 93-99.
- [18] N. Passerini, B. Albertini, B. Perissutti, L. Rodriguez, Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel, *Int. J. Pharm.* 318 (2006) 92-102.
- [19] A. Borrego-Sánchez, E. Carazo, C. Aguzzi, C. Viseras, C.I. Sainz-Díaz, Biopharmaceutical improvement of praziquantel by interaction with montmorillonite and sepiolite, *Appl. Clay. Sci.* 160 (2018) 173-179.
- [20] D. Zanolla, B. Perissutti, N. Passerini, M.R. Chierotti, D. Hasa, D. Voinovich, L. Gigli, N. Demitri, S. Geremia, J. Keiser, P.C. Vioglio, B. Albertini, A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 127 (2018) 19-28.
- [21] R.C. Rowe, P.J. Sheskey, P.J. Weller, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, sixth ed., Pharmaceutical Press, London, 2009.
- [22] J.D. Martín-Ramos, X Powder software, <http://www.xpowder.com>, 2005 (accessed 29 June 2018).

- [23] H. Sun, COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications-Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 7338-7364.
- [24] Accelrys Materials Studio, version v 6.0. Accelrys Inc., San Diego, USA, 2012.
- [25] A. Borrego-Sánchez, C. Viseras, C. Aguzzi, C.I. Sainz-Díaz, Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism, *Eur. J. Pharm. Sci.* 92 (2016) 266–275.
- [26] J.M. Soler, E. Artacho, J.D. Gale, A. García, J. Junquera, P. Ordejón, D. Sánchez-Portal, The Siesta method for ab initio order-N materials simulation, *J. Phys. Condens. Matter.* 14 (2002) 2745-2779.
- [27] J.P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, Generalized gradient approximation made simple, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 3865-3868.
- [28] N. Troullier, J.L. Martins, Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations, *Phys. Rev. B* 43 (1991) 1993-2006.
- [29] C.I. Sainz-Díaz, E. Escamilla-Roa, A. Hernández-Laguna, Quantum mechanical calculations of trans-vacant and cis-vacant polymorphism in dioctahedral 2:1 phyllosilicates, *Am. Mineral.* 90 (2005) 1827-1834.
- [30] R. Martos-Villa, M. Francisco-Márquez, M.P. Mata, C.I. Sainz-Díaz, Crystal structure, stability and spectroscopic properties of methane and CO₂ hydrates, *J. Mol. Graph. Model.* 44 (2013) 253-265.
- [31] H.I. El-Subbagh, A.A. Al-Badr, Praziquantel, in: Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, vol. 25, Academic Press Inc., New York, 1998, pp. 463-500.
- [32] P. De la Torre, S. Torrado, S. Torrado, Preparation, Dissolution and Characterization of Praziquantel Solid Dispersions, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 1629-1633.

- [33] M.V. Chaud, A.C. Lima, M.M.D.C. Vila, M.O. Paganelli, F.C. Paula, L.N. Pedreiro, M.P.D. Gremião, Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate, *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 163-168.
- [34] S.G. Rodrigues, I.S. Chaves, N.F.S. Melo, M.B. De Jesus, L.F. Fraceto, S.A. Fernandes, E. De Paula, M.P. De Freitas, L.M.A. Pinto, Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 70 (2010) 19-28.
- [35] F.B. Reig, J.V. Gimeno-Adelantado, M.C.M. Moya-Moreno, FTIR quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. Application to geological samples, *Talanta* 58 (2002) 811-821.
- [36] N.V. Vagenas, A. Gatsouli, C.G. Kontoyannis, Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy, *Talanta* 59 (2003) 831-836.
- [37] A. Borrego-Sánchez, A. Hernández-Laguna, C.I. Sainz-Díaz, Molecular modeling and infrared and Raman spectroscopy of the crystal structure of the chiral anti-parasitic drug praziquantel, *J. Mol. Model.* 23 (2017) 106.
- [38] H.G.M. Edwards, S.E.J. Villar, J. Jehlicka, T. Munshi, FT-Raman spectroscopic study of calcium-rich and magnesium-rich carbonate minerals, *Spectrochim. Acta A* 61 (2005) 2273-2280.
- [39] S.M. De Paula, M.F.G. Huila, K. Araki, H.E. Toma, Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion of calcium carbonate from *Pomacea lineata* shells into hydroxyapatite bioceramic materials in phosphate media, *Micron* 41 (2010) 983-989.
- [40] G.P.S. Smith, K.C. Gordon, S.E. Holroyd, Raman spectroscopic quantification of calcium carbonate in spiked milk powder samples, *Vib. Spectrosc.* 67 (2013) 87-91.

[41] A. Mitchell, Racemic Drugs: Racemic Mixture, Racemic Compound, or Pseudoracemate? *J. Pharm. Pharm. Sci.* 1 (1998) 8-12.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

CONFORMATIONAL POLYMORPHIC CHANGES IN THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE CHIRAL ANTIPARASITIC DRUG PRAZIQUANTEL AND INTERACTIONS WITH CALCIUM CARBONATE

Ana Borrego-Sánchez^{a,b}, Esperanza Carazo^b, Beatrice Albertini^c, Nadia Passerini^c, Beatrice Perissutti^d, Pilar Cerezo^b, César Viseras^{a,b}, A. Hernández-Laguna^a, Carola Aguzzi^{b,*}, C. Ignacio Sainz-Díaz^a

^a Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

^c Department of Pharmacy and BioTechnology, University of Bologna, Via S. Donato 19/2, 40127 Bologna (Italy).

^d Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, P.le Europa 1, 34127 Trieste (Italy).

* Corresponding author: carola@ugr.es

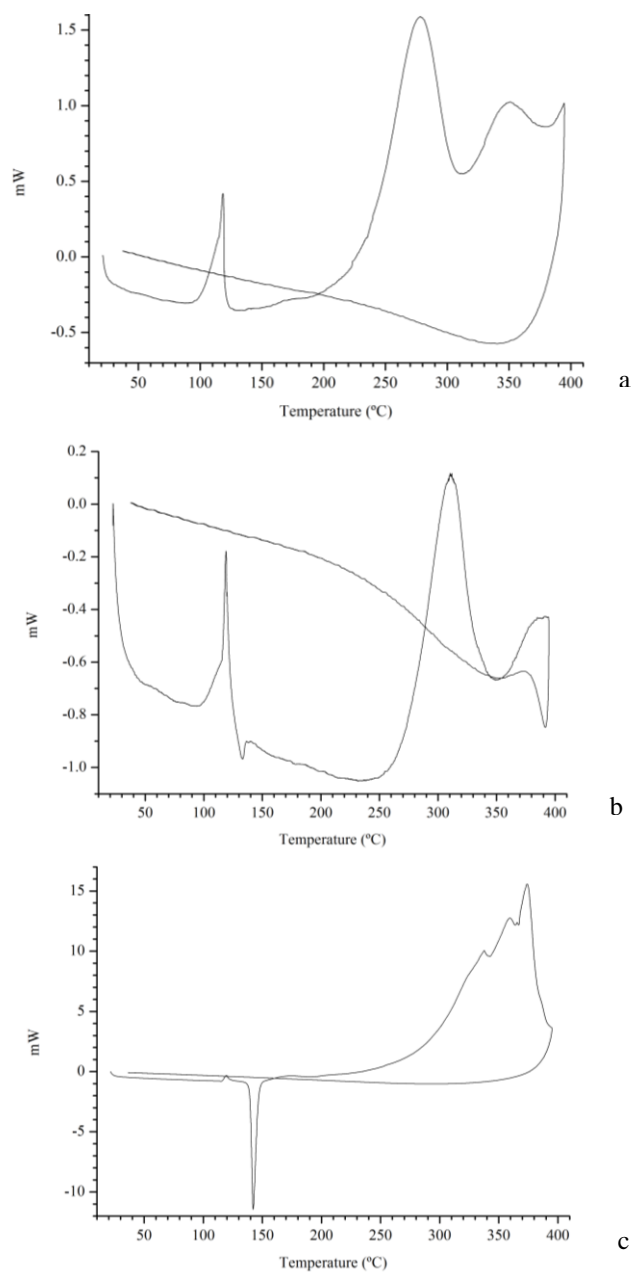


Fig. S1. DSC profiles of IP maintaining the temperature at 125 °C for 3 hours and performing the DSC in air (a) and in nitrogen (b), and pristine PZQ in air (c).

The atomic coordinates of the PZQ crystal models were taken from experimental crystallographic studies of the R-enantiomer [37], the racemic RS [15] crystals of PZQ, and the new polymorph Form B [20] and were optimized with COMPASS FF [26] and at quantum-mechanics level with SIESTA. The calculated crystal structure forms of PZQ were consistent with the experimental data yielding similar cell parameters [37] and powder X-ray diffraction patterns (Figs. S2-S4). The cell parameters of the structure optimized with DFT are slightly shorter than those calculated with COMPASS FF and less close to experimental values [37].

The simulated powder XRD pattern of the hemihydrate crystal of (R)-PZQ (Fig. S3) is identical to that of the hemihydrate S enantiomer [25], then it is not necessary to display. The powder XRD pattern of (R)-PZQ is different to the (RS)-PZQ pattern (Fig. S2). The (R)-PZQ crystal shows two reflections at slightly lower 2θ values (15.1° and 19.6°) (Fig. S3) than the (RS)-PZQ (15.4° and 20.1°) (Fig. S2).

We calculated also the crystal structure of the new RS polymorph (Form B) proposed by Zanolla et al. [20] with the COMPASS FF. Like in the above crystal forms, the optimized structure was similar to the experimental one (Fig. S4). The cohesion energy of the Form B was calculated being -41.42 kcal/mol per PZQ molecule. This value is similar to that calculated for the initial pristine (RS)-PZQ crystal form (-39.78 kcal/mol per PZQ molecule).

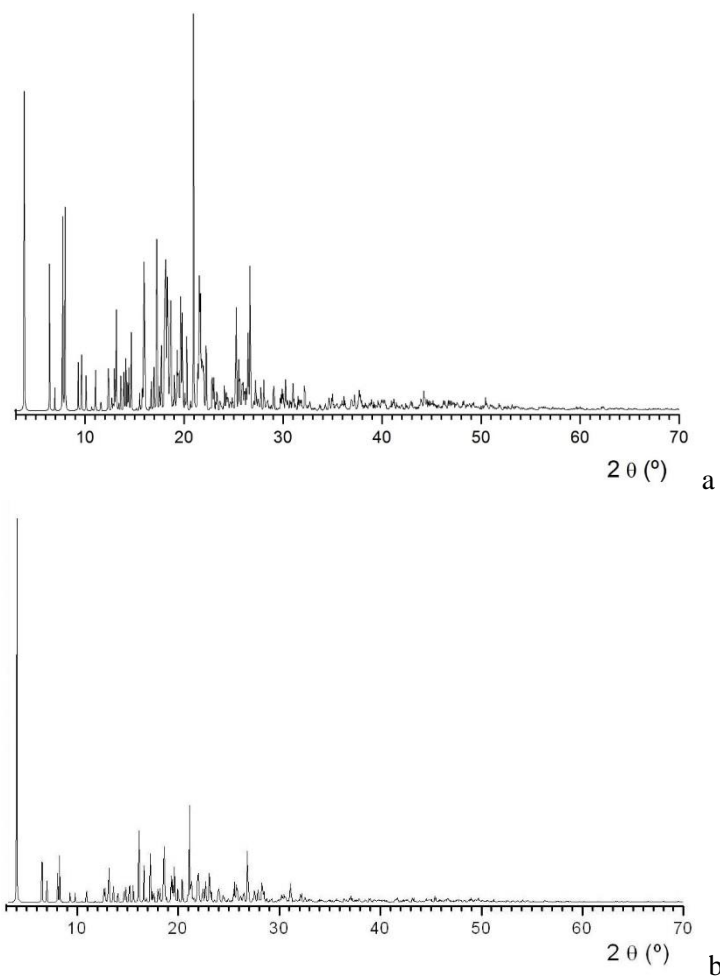


Fig. S2. Powder X-ray diffraction pattern of the crystal structure of (RS)-PZQ calculated and optimized with COMPASS (a) and with SIESTA (b).

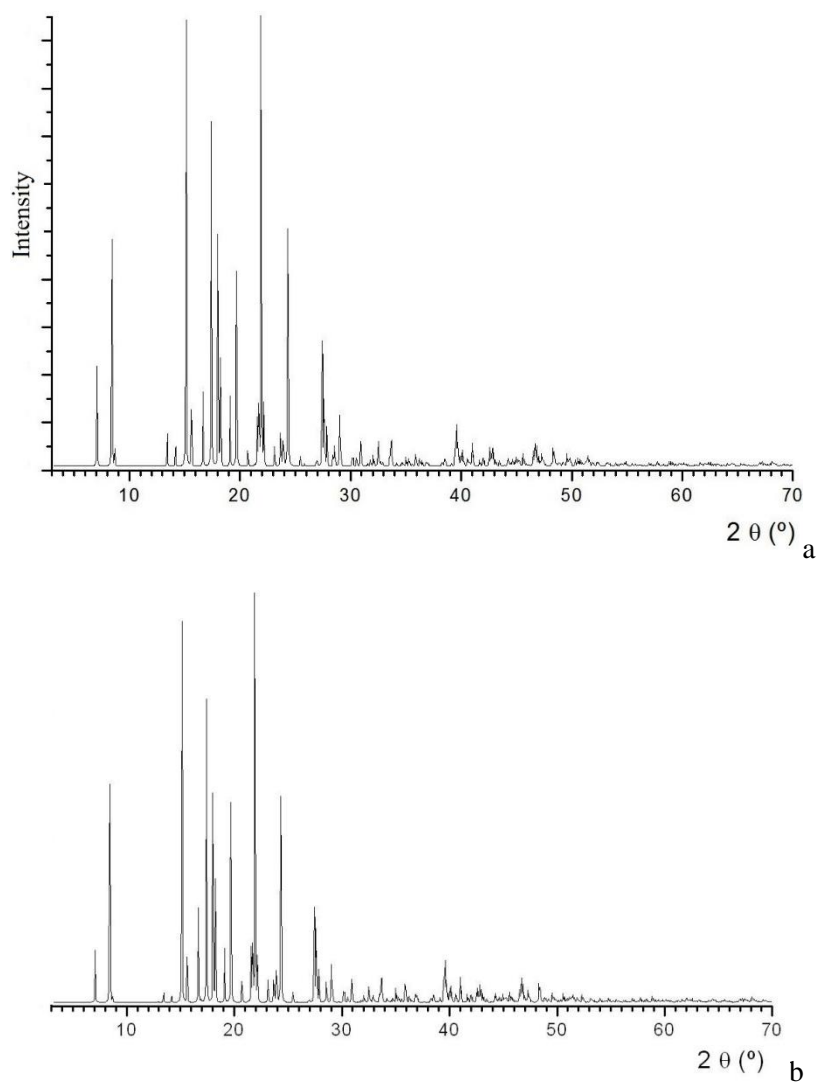


Fig. S3. Powder X-ray diffraction pattern simulated from the experimental crystal structure of (R)-PZQ (a) and the (R)-PZQ crystal calculated and optimized with COMPASS.

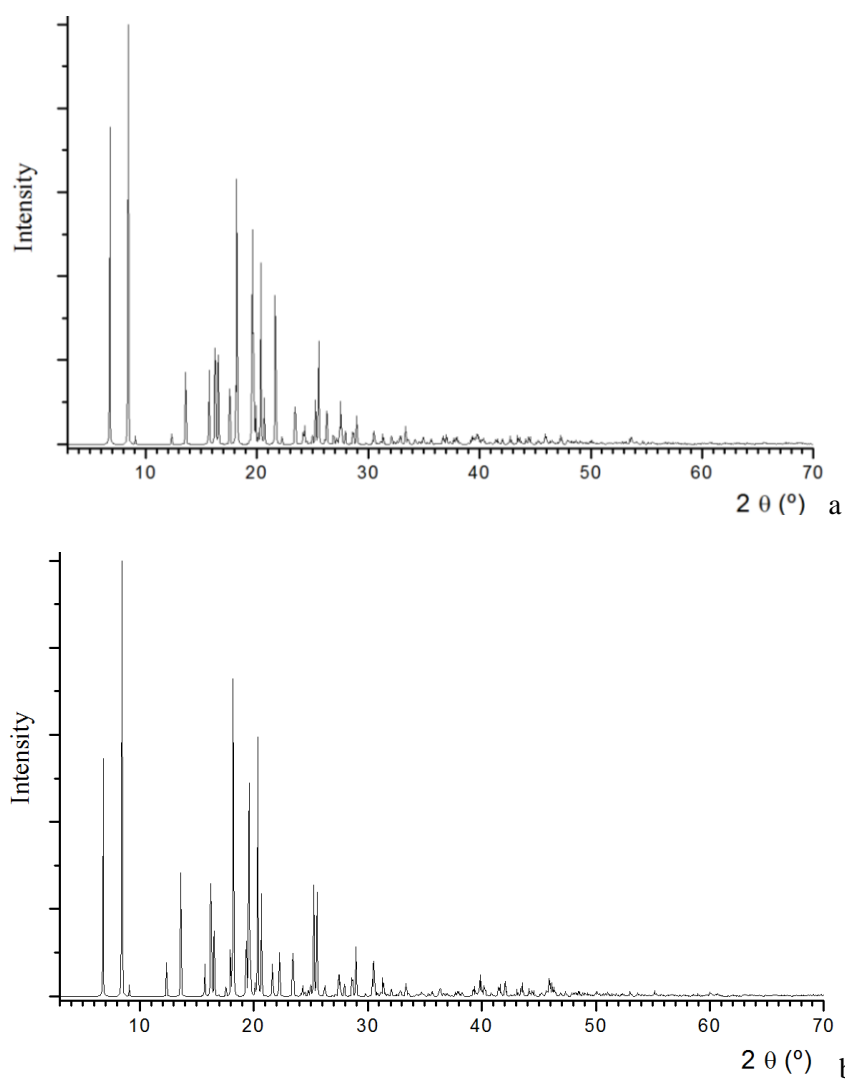


Fig. S4. Powder X-ray diffraction pattern simulated from the experimental crystal structure of the new RS polymorph of PZQ (Form B) reported by Zanolla et al. [20] (a) and the optimized crystal structure of Form B (b).

REFERENCES

The references numbers are the same of those of the main manuscript.

IV.6. CARBONATO CÁLCICO COMO EXCIPIENTE NATURAL PARA MEJORAR POTENCIALMENTE LA BIODISPONIBILIDAD DEL PRAZICUANTEL

En esta sección se ha abordado el objetivo 9, dando lugar al siguiente manuscrito en preparación para una publicación:

Calcium carbonate as a natural excipient to potentially improve the bioavailability of a poorly water-soluble drug praziquantel

A. Borrego-Sánchez, B. Albertini, N. Passerini, P. Cerezo, C. Viseras, C. Aguzzi, C.I. Sainz-Díaz

En preparación.

Como se ha discutido en el apartado previo de la Tesis, los productos de interacción de praziquantel y carbonato cálcico generan cambios en el fármaco que pueden ser potencialmente útiles desde el punto de vista de su optimización biofarmacéutica. Con esta premisa, en este apartado se presentan, en forma de artículo para su posterior publicación, los resultados obtenidos al comparar mezclas físicas praziquantel-carbonato cálcico con dispersiones sólidas equivalentes preparadas en etanol 96%. Las observaciones muestran que mientras en las mezclas físicas el praziquantel se presenta puro y sin cambios en la cristalinidad, indicando una inexistente interacción entre los componentes, en el producto de interacción el praziquantel sufre grandes cambios en su cristalinidad. Por otra parte, cuando las mezclas físicas y productos de interacción se someten a ensayos de disolución *in vitro* en medio ácido y fluido intestinal simulado sin enzimas, se obtienen resultados de gran interés. La mezcla física de praziquantel-carbonato cálcico induce un aumento en la velocidad inicial y la cantidad de

fármaco disuelto con respecto a los valores medidos en ausencia del excipiente inorgánico. Por el contrario, el producto de interacción de prazicuantel-carbonato cálcico da lugar a perfiles de disolución donde se observa un aumento en la velocidad inicial de disolución, pero no en la cantidad de fármaco disuelto con respecto a los valores del fármaco puro. Durante la realización de estos ensayos el pH de los medios fue medido, observándose que en medio ácido el pH se mantiene en el caso del prazicuantel puro, mientras que el pH del medio aumenta mucho y muy rápidamente en el caso de la mezcla física y el producto de interacción debido a la disolución del carbonato de calcio en el medio. Concretamente, este aumento de pH fue mucho más rápido en la mezcla física que en el producto de interacción. Por tanto, dicho cambio de pH podría estar directamente relacionado con la alta tasa de disolución de la mezcla física. Por otro lado, en el fluido intestinal simulado, no se observó ninguna alteración del pH en ninguna de las muestras, debido, como es de esperar, al efecto tampón del carbonato.

Se concluye con ello que la disolución de las partículas de carbonato de calcio en el medio ácido y su correspondiente aumento de pH causaron una mejor disolución del prazicuantel y la cantidad disuelta aumentó.

El análisis de caracterización anterior del estado sólido de la mezcla física no mostró diferencias significativas con respecto al prazicuantel puro y al carbonato cálcico, por lo que los rápidos cambios de pH en el medio, debido a la disolución parcial local del carbonato de calcio en los nanoespacios de los poros de la mezcla física, podrían haber mejorado la disolución del prazicuantel en la mezcla física. El producto de interacción también es una mezcla de prazicuantel y carbonato de calcio, sin embargo, el aumento del pH local se produce más lentamente, y el efecto sobre la disolución del fármaco es menor que en la mezcla física. Probablemente, la presencia de moléculas del fármaco y/o nanocristales de prazicuantel en la superficie del excipiente bloquea los nanoporos de este disminuyendo su velocidad de disolución y con ello no

originando el cambio de pH local que promueve la disolución del fármaco.

En el fluido intestinal simulado a pH = 6,8, el aumento de la disolución del prazicuantel fue menor que en medio ácido debido a la mala disolución del carbonato de calcio, sin menoscabo de que la mejora en la disolución de prazicuantel fue mayor en la mezcla física que en el producto de interacción.

Para explicar estos resultados experimentales se planteó la hipótesis de que las causas estén asociadas a interacciones a nivel molecular entre el fármaco y el carbonato cálcico, junto con los efectos derivados del cambio de pH local. Para verificar dicha hipótesis, se crearon dos modelos teóricos con los conformeros *syn* y *anti* de la molécula de prazicuantel con carbonato cálcico y agua, dado que, como es sabido, en la mezcla física las ocho moléculas de un cristal de prazicuantel están como conformeros *syn*, mientras que en el producto de interacción están como *anti*. La aproximación teórica se fundamenta en el hecho de que el conformero *syn* puede formar complejos con cationes de Ca^{2+} hidratados más fácilmente que el *anti*, donde los grupos carbonilo están en el lado opuesto de la molécula. Las geometrías de estos modelos teóricos fueron analizadas tras su optimización y mostraron que el complejo con el conformero *syn* es más estable que el formado con el conformero *anti*, siendo plausible que, durante la disolución del fármaco, sea el conformero *syn* el que está presente en los espacios de interacción entre los dos componentes (fármaco y carbonato).

Como conclusión general, la incorporación de carbonato cálcico de forma sencilla (mezcla física) al prazicuantel resulta una estrategia tecnológica muy interesante para la mejora de las propiedades biofarmacéuticas, y consecuentemente clínicas, del fármaco al aumentar de forma significativa su velocidad de disolución.

CALCIUM CARBONATE A NATURAL EXCIPIENT TO POTENTIALLY IMPROVE THE BIOAVAILABILITY OF A POORLY WATER SOLUBLE DRUG PRAZIQUANTEL

Ana Borrego-Sánchez,^{1,2} Beatrice Albertini,³ Nadia Passerini,³ Pilar Cerezo,² César Viseras,^{1,2} Carola Aguzzi,^{2,*} C. Ignacio Sainz-Díaz,¹

¹Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra (CSIC-University of Granada), Av. de las Palmeras 4, 18100 Armilla, Granada (Spain).

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada (Spain).

³Department of Pharmacy and BioTechnology, University of Bologna, Via S. Donato 19/2, 40127 Bologna (Italy).

* Corresponding author: carola@ugr.es

ABSTRACT

Calcium carbonate is an abundant mineral in nature with several advantages to be a successful carrier to improve oral bioavailability of poorly water-soluble drugs, such as praziquantel. Praziquantel (PZQ) is an antiparasitic drug classified in group II of the Biopharmaceutical Classification System hence characterized by high permeability and low solubility. Therefore, the dissolution rate is the limiting factor for the gastrointestinal absorption that contributes to the low bioavailability. Consequently, the therapeutic dose of the praziquantel has to be high and big tablets and capsules are required, which are difficult to swallow especially for pediatric and elderly patients. We have prepared mixtures of PZQ and calcium carbonate using solid-solid physical mixtures and as solid dispersions, characterizing the solid preparations with several techniques. Dissolution tests of these materials were performed in different conditions. We found that the solubility of PZQ mixed with

calcium carbonate as physical mixture increases in physiological media. Several theoretical models have been studied to understand this experimental behavior.

Keywords: Praziquantel, Calcium Carbonate, Schistosomiasis, Bioavailability, Solubility

INTRODUCTION

Calcium carbonate (CaCO_3) is a well documented excipient in pharmaceutical solid dosage forms, mainly used as diluent, being a low cost material, with high surface area, excellent safety, biocompatibility and biodegradability¹. Recently, it has also been demonstrated that calcium carbonate can successfully act as hydrophilic porous carrier to improve oral bioavailability of low water soluble drugs^{2,3,4,5}. Functionalization with hydroxypropyl- β -cyclodextrin⁶, enzymatic macromolecules⁷, or incorporation in polymeric hydrogels^{8,9,10,11} can further enhance the ability of calcium carbonate to improve oral delivery of several biomolecules, including proteins¹² and anti-cancer drugs¹³.

Praziquantel (PZQ) is the drug of choice in the treatment of Schistosomiasis¹⁴, being included in the WHO Model List of Essential Drug for the treatment of adults and children¹⁵. Schistosomiasis affects 210 million people approximately, causing two hundred thousand deaths every year. Moreover, it is widely extended, mainly in 78 developing countries in the tropics and subtropics, although at least 92% of people who need treatment for schistosomiasis live in Africa and, is the second of the most prevalent diseases (after malaria) that affects African children. PZQ is classified in group II of the Biopharmaceutical Classification System (BCS) hence characterized by high permeability and low solubility¹⁶. Therefore, the dissolution rate is the limiting factor for the gastrointestinal absorption that contributes to the low oral bioavailability. Moreover, absorbed amounts of PZQ suffer an extensive first-pass metabolism¹⁷, leading to administration of high-dosed dosage forms, which are difficult to swallow especially for pediatric patients¹⁸.

Enhancing the water solubility and the dissolution rate is critical to increase oral bioavailability of PZQ. Several studies and strategies have been carried out to improve PZQ water solubility, such as incorporation into liposome vectors¹⁹, preparation of solid dispersions of the drug with different excipients such as clay minerals²⁰, β cyclodextrins^{21,22,23}, polyvinylpyrrolidone^{24,25,26}, polyethylene glycols^{27,28,29}, sodium starch glycolate³⁰ and preparation of dispersible granules¹⁴. In addition, other techniques have been used to increase the solubility of PZQ such as co-grinding with several excipients³¹, melt granulation and ultrasonic spray congealing²⁷, and the transition in a new crystalline polymorph by milling¹⁸.

Given these premises, aim of this work was to assess suitability of calcium carbonate to enhance dissolution features of PZQ. In a previous paper, conformational changes of PZQ after solvent evaporation process were elucidated³². In this paper we further explore the possibilities of calcium carbonate/praziquantel systems in the improvement of biopharmaceutical properties of the drug. In particular, dissolution rates of PZQ from interaction product was studied and compared to the corresponding physical mixture, and the results explained by using theoretical modeling.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Praziquantel (PZQ) was kindly donated by Fatro S.p.A. (Bologna, Italy). Ground Calcium Carbonate Calcitec Pure PH V/40S (GCC) was purchased from Mineraria Sacilese (Italy). This kind of calcium carbonate is used in the pharmaceutical industry and was accepted in the latest edition of the European Pharmacopoeia and USP. The GCC finds also employment in the food industry and in industries where is requested a low content of heavy metals. Ethanol of 96% of purity was used as solvent.

Methods

Preparation of the PZQ and GCC physical mixture

Physical mixtures (PM) of PZQ and GCC (1:5 w/w) were prepared grinding and blending both solids in an agate mortar of 100 mm of diameter at room temperature during 5 min.

Preparation of the PZQ and GCC interaction product (IP)

Calcium carbonate excipient (GCC) was dispersed in 1 L of ethanolic solution of PZQ under magnetic stirring at room temperature for 24 hours, so drug/calcium carbonate ratio was 1:5 w/w in order to ensure the complete interaction between PZQ and GCC. After 24 hours, the solvent was evaporated with rotary evaporator (Rotary evaporator Buchi® R II) at 40°C and reduced pressure. The solid residue was dried in a desiccator and then it was pulverized.

X-ray diffraction (XRD)

Philips®X-Pert diffractometer with the CuK α radiation was used for performing powder X-ray diffraction. The diffraction results were analyzed with the XPOWDER® software³³.

Thermal analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetric analysis (DSC) were performed with a Mettler Toledo mod. TGA/DSC1 calorimeter, equipped with sensor and FRS5 microbalance (precision 0.1 μ g) and FP89 software package. Samples were heated in air atmosphere at 5 °C/min in the 30-400°C temperature range for TGA and in the 30-200°C temperature range for DSC.

Scanning electron microscope (SEM)

Microphotographs of the samples were performed using a Hitachi S-510 scanning electron microscope (voltage 25 kV, secondary electron images) (Hitachi Scientific Instruments Ltd, Tokyo, Japan). The samples were mounted on adhesive carbon paper, fixed with colloidal gold and metallized with gold in two orientations (20-30°). The images were captured digitally using the program attached to the microscope (ScanVision, Version 1.2).

Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopies

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra were recorded with a JASCO 6200 spectrophotometer in the range 4000-600 cm^{-1} with a 0.5 cm^{-1} resolution and a well-plate sampler along with the Spectra Manager II software. Raman spectra were recorded using a Micro-Raman dispersive JASCO NRS-5100 spectrophotometer in the range 3500-800 cm^{-1} with a 6.48 cm^{-1} resolution, with laser light source VIS-NIR with red diode at 785 nm with 500 mW of power (*TorsanaStarbright*) refrigerated by air and the KnowItAll JASCO for Raman software.

Dissolution studies

Samples of 720 mg were encapsulated in double zero (00) gelatin capsules. These samples can be PZQ-GCC physical mixture or PZQ-GCC interaction product, in which 120 mg correspond to PZQ and 600 mg correspond to GCC. Similarly, 120 mg of PZQ was encapsulated as reference. The obtained capsules were subjected to dissolution tests using the official Pharmacopoeia USP apparatus 2 for the dissolution test of oral solid dosage forms (Sotax AT7, S). This apparatus is equipped with a rotation system type palette and sinkers, piston pump for the automatic sampling at scheduled times and collector of fractions. The measurements were performed at 37 °C and 100 rpm in 1 L of medium: an acidic medium of HCl 0.001 M and a simulated intestinal fluid (SIF) without enzymes with a buffer at pH = 6.8. Taking into account previous studies

of solubility of PZQ in the media used in the present work³⁴, our experiments were performed in no sink conditions to allow direct comparison with previously studied systems at similar concentrations²⁰. During the tests, the pH of the media was measured at each sampling time, with the pH-Meter Basic 20 + Crison®. The samples collected in the dissolution test (5 ml each sample) were filtered through 0.45 µm Millipore® (S) membranes and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) for drug content. Volumes of 5 ml of fresh dissolution medium were replaced after each sampling to maintain the volume constant. All dissolution tests were replicated 7 times.

Drug determination analysis

Drug analysis was performed using an HPLC Hitachi system (serie L-2200U, S) equipped with quaternary pump, autosampler, column oven and UV-VIS diode-array spectrophotometer. The stationary phase was a column Kromasyl® C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm (Teknokroma, S) and the mobile phase was a mixture of H₂O and CH₃CN (35:65 v/v). The flow rate was set at 0.8 mL/min with an injection volume of 10 µL. A spectrophotometer detector at a 225 nm wavelength was used and the run time for each analysis was 5 min. Data were recorded and analyzed by using software EZChrom Elite (Hitachi). The response of the analytical method was linear in the concentration range 10-50 mg/L of PZQ in both media, resulting in correlation coefficients of 0.9998 (HCl 0.001 M) and 0.9994 (SIF).

Computational methods

The molecular model of PZQ was extracted from previous calculations³⁵ and the rest of components were placed by hand. The COMPASS FF³⁶ based on empirical interatomic potentials was used within the Discover program of the Materials Studio package³⁷. This FF was used previously to describe PZQ molecules and crystal structure with satisfactory results^{35,38}. An atomic interactions cut-off of 18.5 Å was used for calculating Van der Waals and Coulomb interactions.

RESULTS AND DISCUSSION

X-ray diffraction

Powder XRD diffractograms of PZQ, GCC, and the physical mixture (PM) and the interaction product (IP) of both solids (PZQ and GCC) are shown in Figure 1. PZQ shows the most intense reflection around 16.5° (2θ units) and other intense reflections at approximately 8° , 19.1° and 23.3° (2θ units) according with that previously reported¹⁷. GCC shows a typical pattern of calcite with reflections at 23.0° , 29.4° (the most intense), 39.5° and 43.1° (2θ units).

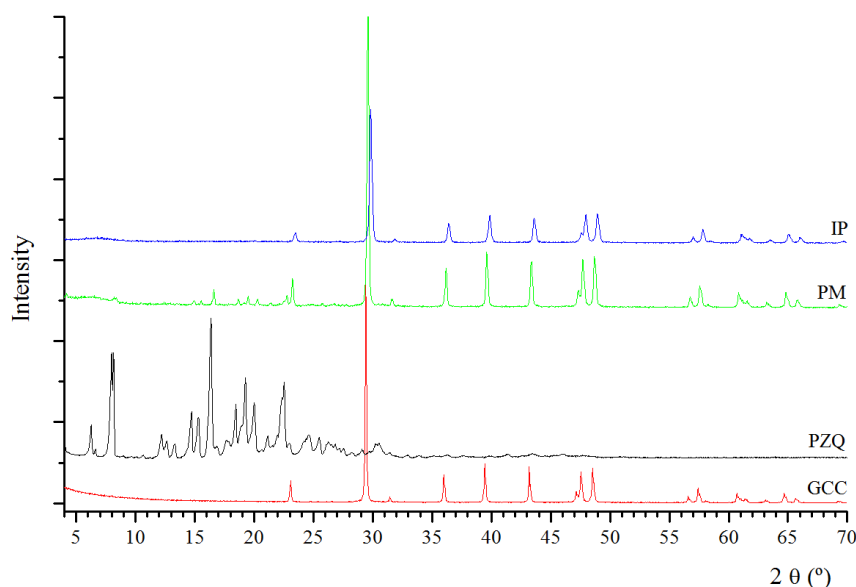


Figure 1. Powder XRD patterns of the samples studied.

The PZQ and GCC physical mixture (PM) showed reflections of both components though those of PZQ have low intensity due to its low proportion in the mixture. The XRD pattern of IP was reported previously³², nevertheless it has been included in this work for comparison purposes. The IP solid showed only reflections of calcium carbonate crystals, apparently due to the amorphization of PZQ or a

partial reduction of crystallinity of PZQ. In previous works a similar the loss of the crystallinity of PZQ was also observed in the formation of a solid dispersion with different excipients^{20,24,30}.

Thermal analysis

Thermogravimetric profiles of the samples studied are shown in Figure 2. GCC shows a slight weight loss (0.34 % w/w) at 40 °C approximately, corresponding to the surface humidity evaporation. PZQ weight loss occurs in the range between 200 and 422 °C (97.64 % w/w) due to the decomposition of PZQ. The PM showed a similar profile as that of the IP solid³² with the decomposition of the PZQ fraction at 250-300 °C.

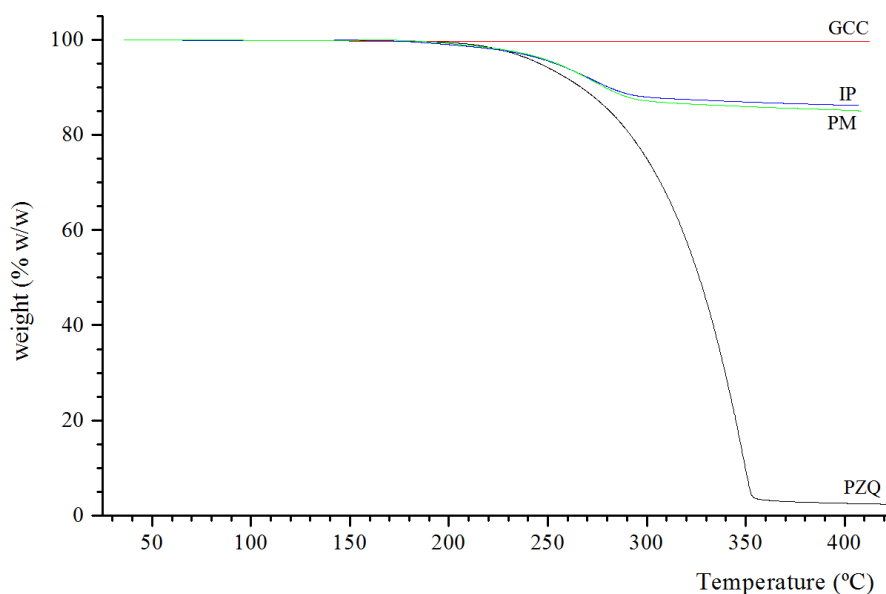


Figure 2. TGA profiles of the GCC, IP, PM, and PZQ solids.

The DSC profiles of these samples are showed in Figure 3. PZQ showed a strong endothermic peak at 142-144 °C corresponding to the melting point of the (RS)-PZQ crystal. GCC showed no significant peak in the DSC profile at $T < 200$ °C. PM showed the endothermic peak of the

melting of the pristine (RS)-PZQ crystals. The DSC profile of the IP showed broad peaks at 110-112 °C and 133-136 °C and a shoulder around 142-144 °C. This behavior indicates the alteration of the crystal structure of the pristine PZQ solid explained in previous works^{18,24,32}. This phenomenon cannot be observed in XRD profile of IP due to the low crystallinity of the sample.

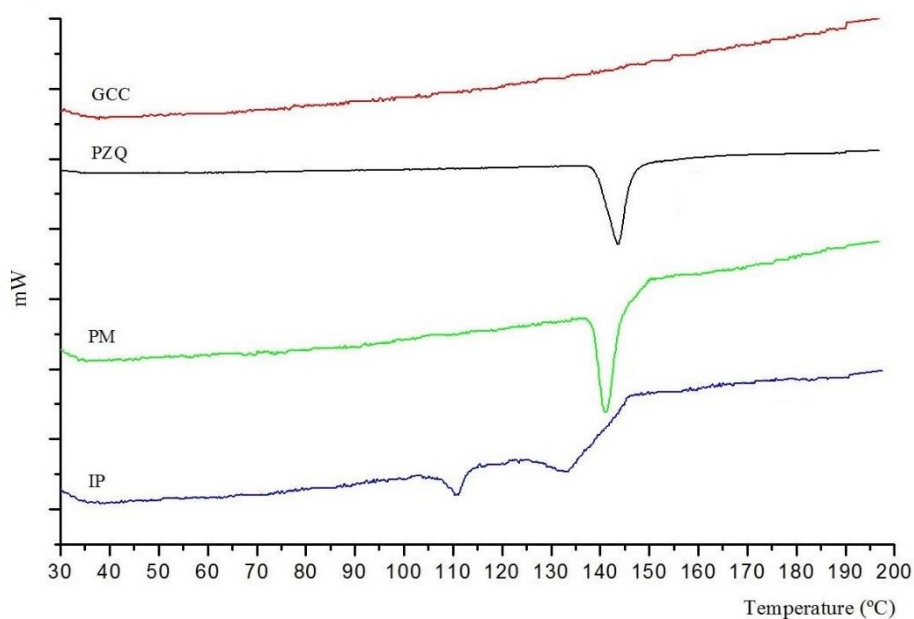


Figure 3. DSC profiles of GCC, PZQ, PM, and IP solids.

Scanning electron microscope

GCC showed a particle size lower than 10 μm in the SEM micro pictures (Figure 4A) with typical morphologies of calcium carbonate of high purity for pharmaceutical use reported previously¹. Microphotographs of the pristine racemic (RS)-PZQ presented elongated prismatic morphology with sizes $> 100 \mu\text{m}$ (Figure 4B), similar to that observed in previous racemic PZQ mixtures^{20,32,39,40}.

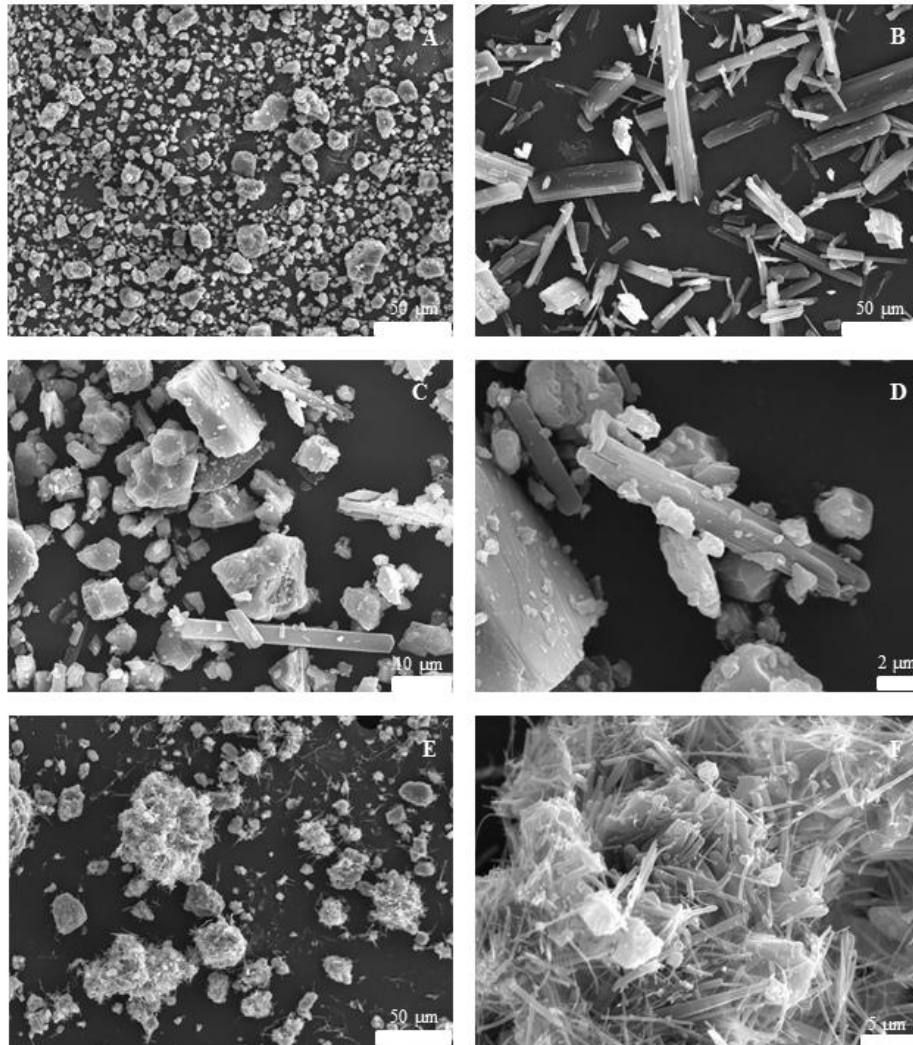


Figure 4. SEM micropictures of GCC, pristine PZQ, PM and IP samples studied.

In the PM mixture the SEM microphotographs showed particles of both components, (RS)-PZQ and GCC were detected and no appreciable changes were observed in morphology, texture or particle size (Figure 4C and 4D). While in the SEM micropictures of the IP, significant changes of texture and morphology were observed in the IP (Figure 4E and 4F). The initial structure of PZQ disappeared and fibrous and filamentous particles of PZQ was observed surrounding the GCC particles. The decrease in the

size and the crystallinity of praziquantel may be the reason why no reflection peaks are observed in XRD in this IP, which has also been observed in previous works^{20,24,30,32}.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Raman

Spectroscopical properties of GCC, the pristine PZQ, the PM and the IP were compared with FTIR (Figure 5a) and Raman (Figure 5b) spectra. GCC shows characteristic IR bands of the carbonate group (CO_3^{2-}) at 1453, 875 and 712 cm^{-1} ^{41,42}. The IR spectrum of the pristine PZQ shows two bands in the range 2960-2840 cm^{-1} that were assigned to stretching $\nu(\text{CH})$ modes of the alkyl CH and CH_2 groups^{35,38,20}. Two $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands were observed at 1665-1621 cm^{-1} ^{35,38,20}, which we assigned to each carbonyl group of PZQ with different local environments in the racemic crystal packing. The $\delta(\text{C}-\text{H})$ and $\nu(\text{C}-\text{N})$ modes are observed around 1350-1021 cm^{-1} ²¹. In the PM and IP the bands of PZQ were detected but no big differences could be observed due to the high proportion of GCC, whose bands overlap those of PZQ that is in low relative proportion in the PM mixture. Nevertheless, slight differences are detected in the $\nu(\text{C}=\text{O})$ bands. They are closer in IP than in PM and pristine PZQ. This behavior was reported previously³².

The Raman spectrum of PZQ (Fig. 5b) shows a band at 1044 cm^{-1} that we assigned to a symmetric $\delta(\text{CN})_s$ vibration mode of the C-N bonds. On the other hand, a high intensity band appears at 1085 cm^{-1} in the GCC spectrum that we assigned to a symmetric $\nu(\text{C}-\text{O})$ stretching mode of the carbonate C-O bond.^{43,44,45} The PM and IP mixtures showed bands of PZQ and GCC. In PM, the PZQ component showed the same bands in the same frequencies and relative intensity that as isolated PZQ solid in the pristine racemic (RS)-PZQ crystals. However, the IP mixture showed slight differences in relative intensities of the bands with respect to pristine PZQ according to previous results³².

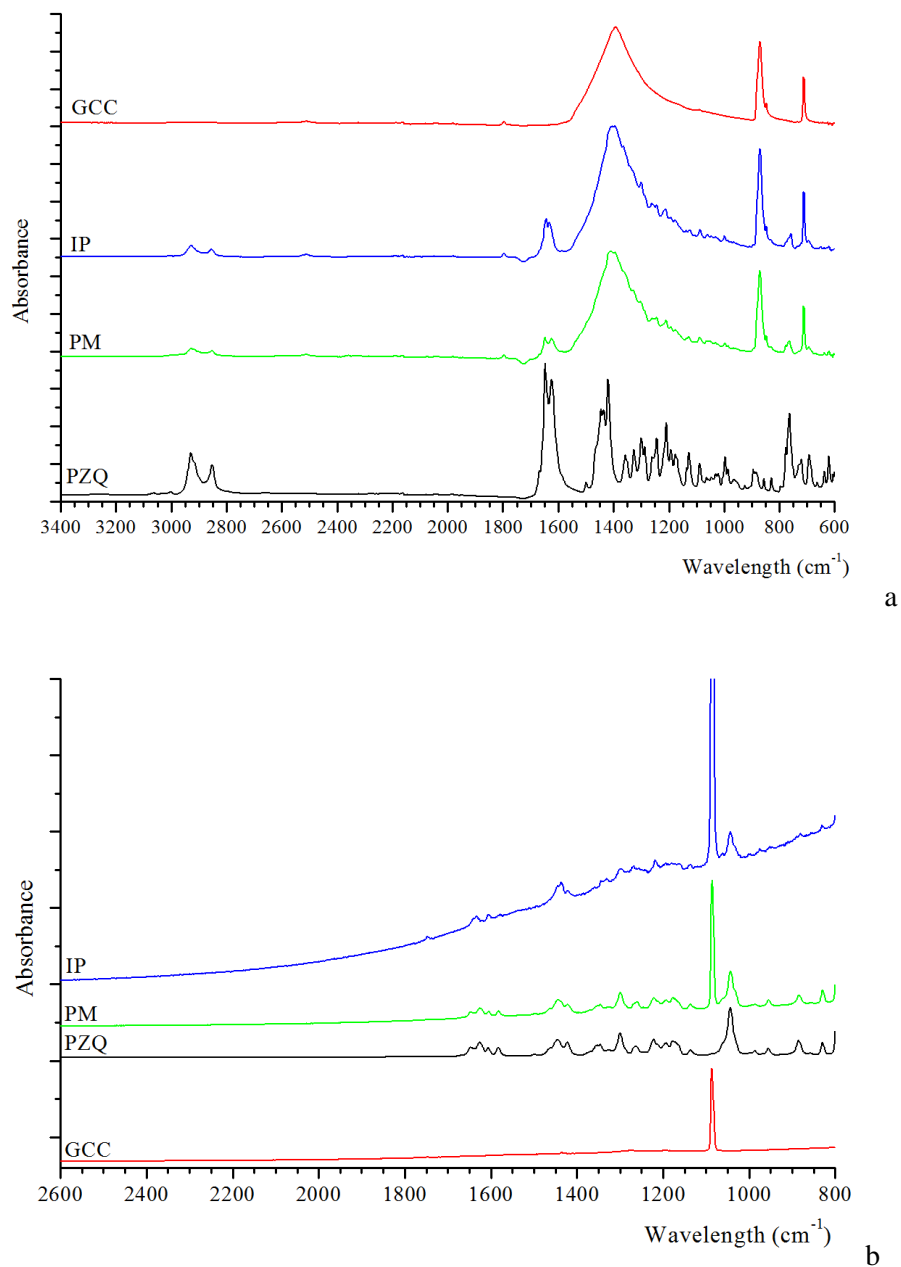


Figure 5.- FTIR (a), and Raman (b) spectra of GCC, IP, PM, and PZQ samples.

Dissolution studies

In order to explore the *in vitro* bioavailability of PZQ, dissolution tests were performed for the pure pristine drug (PZQ) and the combinations of PZQ with calcium carbonate (IP and PM) (Figure 8). Two media were considered simulating environments close to physiological scenarios: an acid aqueous medium with 0.001 M HCl at pH = 3 simulating gastric fluids; and a simulated intestinal fluid (SIF) without enzymes with a buffer at pH = 6.8.

In all samples, the dissolution of PZQ was faster and of higher extent in acid medium than in at pH = 6.8. In general, the dissolution profiles increased with the time decreasing the slope asymptotically to a maximum after 240 min for all samples and both media. The PZQ/GCC physical mixture (PM) induced an increase in the initial rate and amount of PZQ dissolution reaching a 90% after four hours at pH = 3 and a 40% at pH = 6.8. This dissolution profile is much higher than that of the alone pristine PZQ. On the contrary, the IP PZQ-GCC mixture did not show an improvement in terms of the amount of drug released compared to the PZQ in these media. Nevertheless, the IP showed an increase in the dissolution rate at early stages of the dissolution tests compared to the PZQ, to a greater extent in simulated intestinal fluid medium. The similarity factor (f_2) between the IP and PZQ dissolution profiles were calculated at early times, obtaining that both profiles are similar in acid medium ($f_2 = 56.2$) and different in simulated intestinal fluid medium ($f_2 = 21.6$). In the later, the lower of f_2 is due to the fact that the IP improves the dissolution rate of the PZQ in this medium. At pH = 3.0, the amount of PZQ dissolved was lower in IP than in the pristine PZQ. Whereas at pH = 6.8 the amount of PZQ dissolved was higher than the alone PZQ initially at short contact times being the same amount as pure PZQ at long reaction times. Therefore, the dissolution rate of PZQ is different depending on the pH of the media and increases when it is mixed with the carbonate as physical mixture, remaining practically unchanged in the IP.

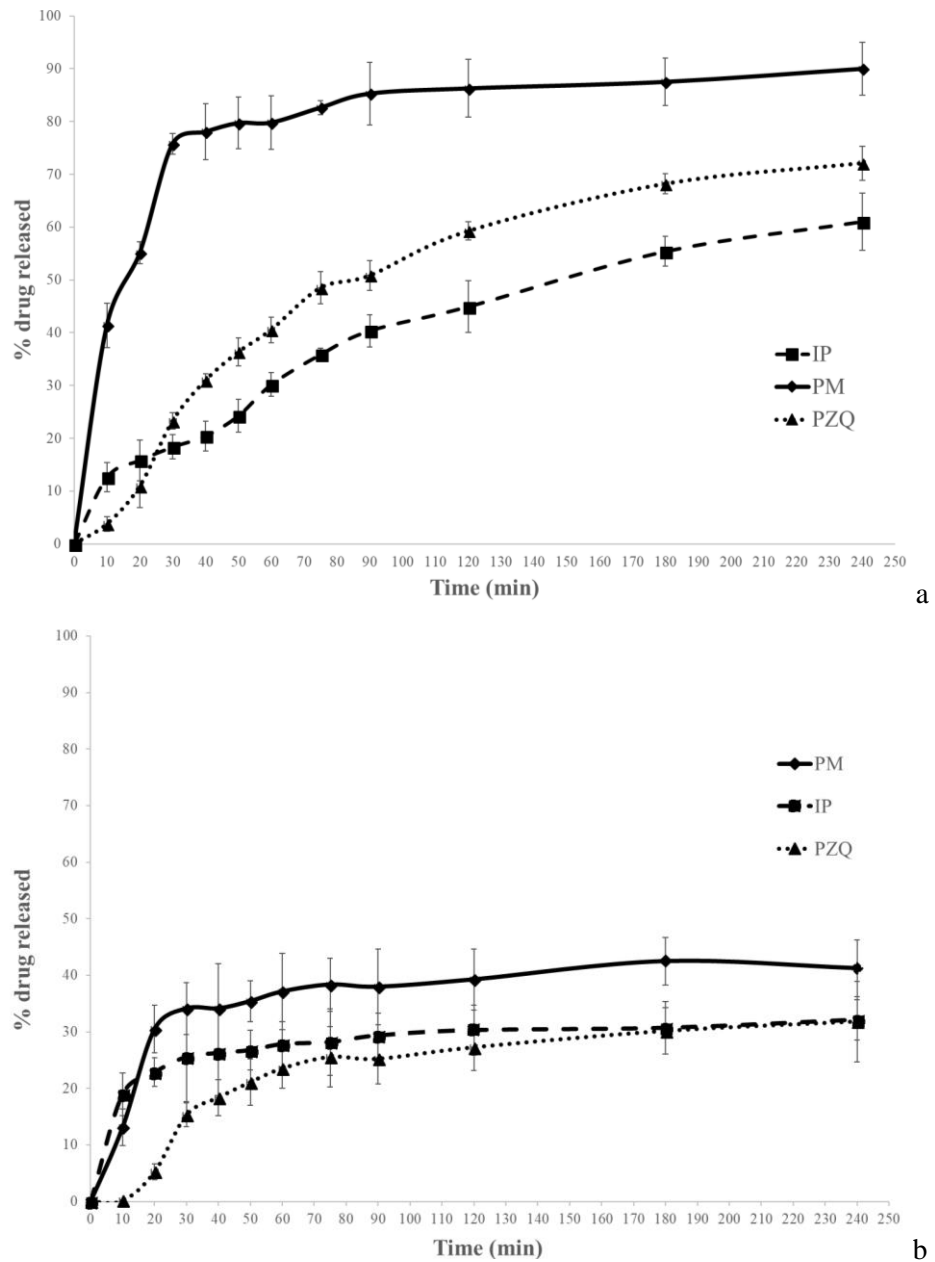


Figure 8. Drug release (% w/w) profiles from the PZQ and the PM in 0.001 M HCl (a) and in a simulated intestinal fluid at pH = 6.8 (b); (mean values \pm s.d.; n = 6).

Taking into account the pH measurements of the media at different times during the dissolution studies (Table 1), different behaviors were observed. In an acid medium at the initial pH = 3.0, the pH was maintained in the case of the PZQ, whereas the pH of the medium increased greatly and very rapidly in the case of PM and IP mixtures due to the dissolution of the calcium carbonate in the medium. Nevertheless, this pH increase was much faster in PM than in IP mixture. Hence, this increase of pH could be directly related with the high dissolution rate of PM. On the other hand, in the simulated intestinal fluid, no alteration of pH was observed in all samples due to the buffer effect, as expected.

Table 1. Values of pH in the dissolution media at different times during the intrinsic dissolution studies.

| Time (min) | PZQ ^a | PM ^a | IP ^a | PZQ ^b | PM ^b | IP ^b |
|------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 3.10 | 3.09 | 3.11 | 6.80 | 6.79 | 6.81 |
| 10 | 3.15 | 6.43 | 3.26 | 6.80 | 6.78 | 6.81 |
| 20 | 3.21 | 7.35 | 4.22 | 6.80 | 6.78 | 6.79 |
| 30 | 3.16 | 7.86 | 5.77 | 6.78 | 6.78 | 6.79 |
| 40 | 3.22 | 7.86 | 6.18 | 6.80 | 6.78 | 6.81 |
| 50 | 3.23 | 7.80 | 6.24 | 6.80 | 6.78 | 6.82 |
| 60 | 3.28 | 7.89 | 6.63 | 6.80 | 6.78 | 6.83 |
| 75 | 3.18 | 7.90 | 6.87 | 6.78 | 6.79 | 6.82 |
| 90 | 3.16 | 7.93 | 7.13 | 6.81 | 6.78 | 6.82 |
| 120 | 3.20 | 7.97 | 8.05 | 6.80 | 6.79 | 6.82 |
| 180 | 3.17 | 8.04 | 8.28 | 6.78 | 6.78 | 6.81 |
| 240 | 3.22 | 8.07 | 8.26 | 6.80 | 6.79 | 6.82 |

^a In acid medium. ^b In simulated intestinal fluid.

Therefore, the dissolution of the calcium carbonate particles in the acid medium and its corresponding pH increase caused a better dissolution of PZQ and the dissolution rate increased. The above characterization analysis of the solid state of the physical mixture showed no significant differences with respect to the pure PZQ and GCC, hence the fast pH changes in the medium, observed in the dissolution of PM, could improve the dissolution of the PZQ in PM.

Since in the IP, even the size of PZQ crystals were much smaller, dissolution rate did not change, the improvement in the dissolution rate observed in the physical mixtures, in which there is obviously no change in the size of the components, must be explained by reasons not related to the surface exposed to the solution. The improvement in the solubility of the drug by simple mixing with calcium carbonate could be due to the local partial dissolution of calcium carbonate in the nanospaces of the PM pores, where water molecules can form confined high pH scenarios and the water-Ca²⁺ can form complexes with the carbonyl groups of PZQ, C=O^δ...Ca²⁺OH₂, increasing the polarity of the organic molecule and then its dissolution in aqueous solution. This carbonate effect has been demonstrated in other drugs in similar systems⁴⁶. The IP solid is also a mixture of PZQ and calcium carbonate, however, the increase of the local pH occurs more slowly in the IP mixture, and the effect on the PZQ dissolution is lower than in PM. Probably the intimate precipitation of PZQ blocked the nanopores of GCC in IP³² decreasing the dissolution rate of Ca carbonate. There are some examples of inhibition of carbonate dissolution by adsorption of organic compounds on the surface⁴⁷.

In the simulated intestinal fluid at pH = 6.8 medium, the increase of PZQ dissolution was lower than in acid media due to the poor dissolution of calcium carbonate. Nevertheless, the dissolution grade of PZQ was also greater in PM than in IP at pH = 6.8. Then, some interactions at molecular level should be happening to explain this behavior. Therefore, small models of PZQ molecule with the calcium carbonate and water molecules were created. In the molecular structure of PZQ in the PM, the carbonyl groups are at the same side of the molecule as a syn conformer, whereas in IP the proportion of the conformer anti is higher³². This conformer syn can form complexes with hydrated Ca²⁺ cations more easily (Figure 9) than the conformer anti, where the carbonyl groups are in the opposite side in the molecule and cannot form these complexes. This explanation could explain the different behavior in the dissolution process of PZQ with GCC.

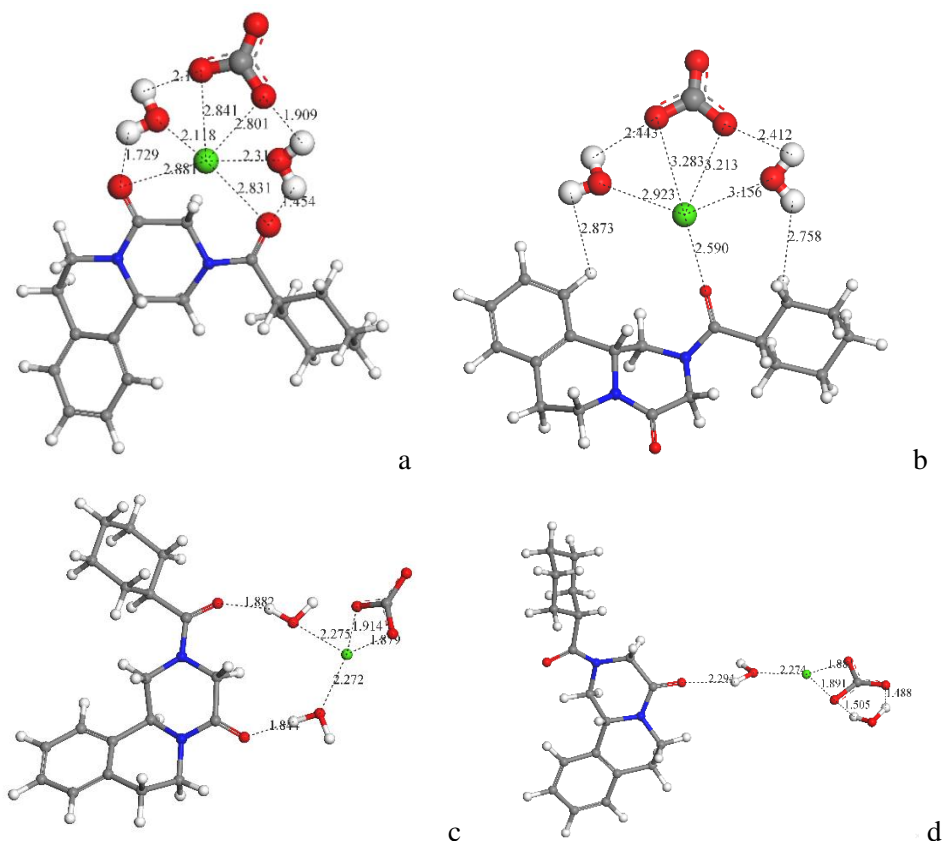


Figure 9.- Possible complexes of PZQ molecule conformer syn (a) and anti (b) with hydrated Ca^{2+} carbonates clusters, and optimized complexes of syn (c) and anti (d) PZQ (non-bonding distances are included in Å). The C, Ca, H, N, and O atoms are in grey, green, white, blue, and red color.

The geometry of these models was optimized with COMPASS FF calculations, using the SPC water model (Figure 9c and 9d). In both models the carbonate anion is coordinated with de Ca^{2+} cation $d(\text{Ca}\dots\text{OCO}) = 1.88\text{-}1.91$ Å and at least one water molecule is between the Ca^{2+} cation and a carbonyl group forming a hydrogen bond with the corresponding carbonyl group $d(\text{HOH}\dots\text{O}=\text{C}) = 1.84\text{-}1.88$ Å. In the syn conformer, both water molecules are coordinating the Ca^{2+} cation and the water H atoms $d(\text{HOH}\dots\text{Ca}) = 2.27$ Å (Figure 9c). In the anti conformer, one water molecule is coordinating the Ca^{2+} cation, $d(\text{O}\dots\text{Ca}) = 2.27$ Å,

and one carbonyl O atom $d(\text{CO}\dots\text{H}) = 2.22 \text{ \AA}$. Our calculations indicate that the complex of the syn conformer is -3.78 kcal/mol more stable with respect to that formed with the anti conformer, being more likely to exist in the nanospace of the interactions between these components during the dissolution process.

CONCLUSIONS

The in vitro bioavailability of PZQ was different depending on the pH of the medium and increases when it was mixed with the carbonate as a solid physical mixture (PM of PZQ-GCC). The presence of calcium carbonate in physical mixtures with praziquantel increased its dissolution rate. Surprisingly this nanomaterial showed a dissolution rate higher than that of the pure pristine PZQ and of the interaction product (IP) with GCC formed using solvent. The preparation of the PM can be considered a good procedure for a better bioavailability of a water low-soluble drug like praziquantel. This allows to explore the use of this mixture for a drug administration in a more effective way.

As a general conclusion, the use of calcium carbonate, especially in solid-solid physical mixtures, appears as an interesting technological strategy in the improvement of the biopharmaceutical and clinical properties of praziquantel by increasing the dissolution of the drug.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are thankful to Fatro S.p.A. for donating Praziquantel samples, and to MINECO projects (FIS2016-77692-C2-2-P and CGL2016-80833-R) and Andalusian projects (RNM1897) for financial support.

REFERENCES

- ¹ Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Weller, P.J., in: Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition, Pharmaceutical Press, London, 2009.
- ² Ueno, Y., Futagawa, H., Takagi, Y., Ueno, A., Mizushima, Y. 2005. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. *Journal of Controlled Release* 103, 93-98.
- ³ Preisig, D., Haid, D., Varum, F.J., Bravo, R., Alles, R., Huwyler, J., Puchkov, M. 2014. Drug loading into porous calcium carbonate microparticles by solvent evaporation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87, 548-558.
- ⁴ Manzine Costa, L.M., Molina de Olyveira, G., Salomão, R. 2017. Precipitated Calcium Carbonate Nano-Microparticles: Applications in Drug Delivery. *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 3, 2.
- ⁵ Dizaj, S.M., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.H., Adibkia, K., Lotfipour, F. 2015. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. *Expert Opinion on Drug Delivery* 12, 1649-1660.
- ⁶ Zhang, L., Zhu, W., Lin, Q., Han, J., Jiang, L., Zhang, Y. 2015. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin functionalized calcium carbonate microparticles as a potential carrier for enhancing oral delivery of water-insoluble drugs. *International Journal of Nanomedicine* 10, 3291-3302.
- ⁷ Islan, G.A., Cacicedo, M.L., Bosio, V.E., Castro, G.R. 2015. Development and characterization of new enzymatic modified hybrid calcium carbonate microparticles to obtain nano-architected surfaces for enhanced drug loading. *Journal of Colloid and Interface Science* 439, 76-87.
- ⁸ Wang, J., Chen, J-S., Zong, J-Y., Zhao, D., Li, F., Zhuo, R-X., Cheng, S-X. 2010. Calcium Carbonate/Carboxymethyl Chitosan Hybrid Microspheres and Nanospheres for Drug Delivery. *Journal of Physical Chemistry C* 114, 18940-18945.

⁹ Wang, C., Liu, H., Gao, Q., Liu, X., Tong, Z. 2008. Alginate-calcium carbonate porous microparticle hybrid hydrogels with versatile drug loading capabilities and variable mechanical strengths. *Carbohydrate Polymers* 71, 476-480.

¹⁰ Wang, J., Kong, Y., Liu, F., Shou, D., Tao, Y., Qin, Y. 2018. Construction of pH-responsive drug delivery platform with calcium carbonate microspheres induced by chitosan gels. *Ceramics International* 44, 7902-7907.

¹¹ Vergaro, V., Papadia, P., Leporatti, S., De Pascali, S.A., Fanizzi, F.P., Ciccarella, G. 2015. Synthesis of biocompatible polymeric nano-capsules based on calcium carbonate: A potential cisplatin delivery system. *Journal of Inorganic Biochemistry* 153, 284-292.

¹² Roth, R., Schoelkopf, J., Huwyler, J., Puchkov, M. 2018. Functionalized calcium carbonate microparticles for the delivery of proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 122, 96-103.

¹³ Svenskaya, Y., Parakhonskiy, B., Haase, A., Atkin, V., Lukyanets, E., Gorin, D., Antolini, R. 2013. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophysical Chemistry* 182, 11-15.

¹⁴ Trastullo, R., Dolci, L.S., Passerini, N., Albertini, B. 2015. Development of flexible and dispersible oral formulations containing praziquantel for potential schistosomiasis treatment of pre-school age children. *International Journal of Pharmaceutics* 495, 536-550.

¹⁵ WHO, WHO Schistosomiasis. World Health Organization, 2018 <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>

¹⁶ 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, 265-278.

- ¹⁷ El-Subbagh HI, Al-Badr AA. 1998. Praziquantel, in: Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, vol. 25. Academic Press Inc., New York, pp. 463-500.
- ¹⁸ Zanolla, D., Perissutti, B., Passerini, N., Chierotti, M.R., Hasa, D., Voinovich, D., Gigli, L., Demitri, N., Geremia, S., Keiser, J., Vioglio, P.C., Albertini, B. 2018. A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel. *Eur J Pharm Biopharm* 127, 19-28.
- ¹⁹ Mourao, S.C., Costa, P.I., Salgado, H.R.N., Gremiao, M.P.D. 2005. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 295, 157-162.
- ²⁰ Borrego-Sánchez, A., Carazo, E., Aguzzi, C., Viseras, C., Sainz-Díaz, C.I. 2018. Biopharmaceutical improvement of praziquantel by interaction with montmorillonite and sepiolite. *Applied Clay Science*, 160, 173-179.
- ²¹ Rodrigues, S.G., Chaves, I.S., Melo, N.F.S., de Jesus, M.B., Fraceto, L.F., Fernandes, S.A., de Paula, E., de Freitas, M.P., Pinto, L.M.A. 2010. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 70, 19-28.
- ²² Maragos, S., Archontaki, H., Macheras, P., Valsami, G. 2009. Effect of Cyclodextrin Complexation on the Aqueous Solubility and Solubility/Dose Ratio of Praziquantel. *AAPS PharmSciTech*, 10, 1444.
- ²³ Becket, G., Schep, L.J., Tan, M.Y. 1999. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β -, and γ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, 179, 65-71.
- ²⁴ De la Torre, P., Torrado, S., Torrado, S. 1999. Preparation, Dissolution and Characterization of Praziquantel Solid Dispersions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 47, 1629-1633.

²⁵ El-Arini, S.K., Leuenberger, H. 1998. Dissolution properties of praziquantel–PVP systems. *Pharmaceutica Acta Helveticae* 73, 89-94.

²⁶ Costa, E.D., Priotti, J., Orlandi, S., Leonardi, D., Lamas, M.C., Nunes, T.G., Diogo, H.P., Salomon, C.J., Ferreira, M.J. 2016. Unexpected solvent impact in the crystallinity of praziquantel/poly(vinylpyrrolidone) formulations. A solubility, DSC and solid-state NMR study. *International Journal of Pharmaceutics* 511, 983-993.

²⁷ Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., Rodriguez, L. 2006. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics* 318, 92-102.

²⁸ Liu, Y., Wang, T., Ding, W., Dong, C., Wang, X., Chen, J., Li, Y. 2018. Dissolution and oral bioavailability enhancement of praziquantel by solid dispersions. *Drug Delivery and Translational Research* 8, 580-590.

²⁹ Cheng, L., Lei, L., Guo, S. 2010. In vitro and in vivo evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. *International Journal of Pharmaceutics* 387, 129-138.

³⁰ Chaud, M.V., Lima, A.C., Vila, M.M.D.C., Paganelli, M.O., Paula, F.C., Pedreiro, L.N., Gremião, M.P.D. 2013. Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12, 163-168.

³¹ Perissutti, B., Passerini, N., Trastullo, R., Keiser, J., Zanolla, D., Zingone, G., Voinovich, D., Albertini, B. 2017. An explorative analysis of process and formulation variables affecting comilling in a vibrational mill: The case of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics* 533, 402-412.

³² Borrego-Sánchez, A., Carazo, E., Albertini, B., Passerini, N., Perissutti, B., Cerezo, P., Viseras, C., Aguzzi, C., Sainz-Díaz, C.I. 2018. Conformational polymorphic changes in the crystal structure of the chiral antiparasitic drug praziquantel and interactions with calcium carbonate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 132, 180-191.

- ³³ Martín-Ramos JD. 2005. X Powder software. <http://www.xpowder.com.X-Power>.
- ³⁴ Chaud, M.V., Tamascia, P., de Lima, A.C., Paganelli, M.O., Gremião, M.P.D., de Freitas, O., 2010. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46, 473-481.
- ³⁵ Borrego-Sánchez, A., Viseras, C., Aguzzi, C., Sainz-Díaz, C.I. 2016. Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism, *European Journal of Pharmaceutical Science* 92, 266-275.
- ³⁶ Sun, H. 1998. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications-Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds, *Journal of Physical Chemistry B* 102, 7338-7364.
- ³⁷ Accelrys Materials Studio, version v 6.0. Accelrys Inc., San Diego, USA, 2012.
- ³⁸ Borrego-Sánchez, A., Hernández-Laguna, A., Sainz-Díaz, C.I. 2017. Molecular modeling and infrared and Raman spectroscopy of the crystal structure of the chiral anti-parasitic drug praziquantel. *Journal of Molecular Modeling* 23, 106.
- ³⁹ Liu, Y., Wang, X., Wang, J.K., Ching, C.B. 2004. Structural Characterization and Enantioseparation of the Chiral Compound Praziquantel. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 3039-3046.
- ⁴⁰ Espinosa-Lara, J.C., Guzmán-Villanueva, D., Arenas-García, J.I., Herrera-Ruiz, D., Rivera-Islas, J., Román-Bravo, P., Morales-Rojas, H., Höpfl, H. 2013. Cocrystals of active pharmaceuticals ingredients-praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic and pimelic acids. *Crystal Growth & Design* 13, 169-185.
- ⁴¹ Reig, F.B., Adelantado, J.V.G., Moreno, M.C.M.M. 2002. FTIR quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. Application to geological samples. *Talanta* 58, 811-821.

⁴² Vagenas, N.V., Gatsouli, A., Kontoyannis, C.G. 2003. Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy. *Talanta* 59, 831-836.

⁴³ Edwards, H.G.M., Villar, S.E.J., Jehlicka, J., Munshi, T. 2005. FT-Raman spectroscopic study of calcium-rich and magnesium-rich carbonate minerals. *Spectrochimica Acta Part A* 61, 2273-2280.

⁴⁴ De Paula, S.M., Huila, M.F.G., Araki, K., Toma, H.E. 2010. Confocal Raman and electronic microscopy studies on the topotactic conversion of calcium carbonate from *Pomacea lineata* shells into hydroxyapatite bioceramic materials in phosphate media. *Micron* 41, 983-989.

⁴⁵ Smith, G.P.S., Gordon, K.C., Holroyd, S.E. 2013. Raman spectroscopic quantification of calcium carbonate in spiked milk powder samples. *Vibrational Spectroscopy* 67, 87-91.

⁴⁶ Ogomi, D., Serizawa, T., Akashi, M. 2005. Controlled release based on the dissolution of a calcium carbonate layer deposited on hydrogels. *Journal of Controlled Release* 103, 315-323.

⁴⁷ Morse, J.W., Arvidson, R.S., Lüttge, A. 2007. Calcium Carbonate Formation and Dissolution. *Chemical Reviews* 107, 342-381.

CAPÍTULO V

Conclusiones / Conclusions

En esta Tesis Doctoral se han realizado estudios teóricos y experimentales sobre la interacción del prazicuantel con excipientes inorgánicos naturales con la finalidad de mejorar el perfil biofarmacéutico del fármaco. Como resultado de este trabajo, se han publicado cuatro artículos en revistas científicas internacionales indexadas en el *Science Citation Index* (SCI) situados en buenas posiciones dentro sus categorías. Además, se han elaborado dos manuscritos para su posterior publicación que están incluidos en esta memoria de Tesis. En estos seis artículos se ha dado respuesta a los objetivos de la Tesis Doctoral. En cada uno de los capítulos han quedado plasmadas las conclusiones específicas de cada trabajo. En este capítulo se señalan aquellas conclusiones y aspectos que son más generales, los cuales se listan a continuación:

1. La exploración de diversas metodologías computacionales y la comparación de los resultados ha permitido seleccionar aquellas que describen adecuadamente las estructuras moleculares y cristalinas del prazicuantel, destacando los métodos químico-cuánticos basados en DFT/GGA y los campos de fuerza basados en potenciales empíricos COMPASS y CVFFH.

2. La molécula de prazicuantel presenta dos confórmeros principales estables definidos por la posición relativa de los dos grupos carbonilo del prazicuantel, *syn* y *anti*. Estos confórmeros no coexisten en ninguna de las formas cristalinas del fármaco y son los que definen sus diferentes polimorfos conocidos.
3. Se ha conseguido reproducir las formas cristalinas del prazicuantel por métodos teóricos, por primera vez, y sus patrones de difracción de rayos X, identificando las principales interacciones intermoleculares responsables de los empaquetamientos moleculares de dichas formas cristalinas.
4. Se han reproducido los espectros de infrarrojo y Raman de la molécula de prazicuantel y sus formas cristalinas con métodos teóricos, por primera vez, identificando los principales modos de vibración y asignando algunas bandas que no habían sido posible identificar experimentalmente.
5. Se han obtenido, por primera vez, materiales nanoestructurados basados en prazicuantel y arcilla, concretamente montmorillonita y sepiolita, en ausencia de agua, lo que ha dado lugar a una solicitud de patente de invención.
6. Se ha conseguido mejorar la velocidad de disolución y la cantidad del fármaco prazicuantel liberada *in vitro*, gracias a su interacción con materiales nanoestructurados basados en montmorillonita y sepiolita como excipientes inorgánicos naturales.
7. Los estudios de modelado molecular han permitido conocer las interacciones de la molécula de prazicuantel con la superficie interlamilar de la montmorillonita y espacios zeolíticos de la sepiolita, conociendo en profundidad la forma en que se adsorbe el prazicuantel en dichas arcillas y reproduciendo los cambios de dichos espacios observados experimentalmente.

8. La adsorción de prazicuantel sobre las superficies de sepiolita y montmorillonita se ha obtenido como energéticamente favorable.
9. La preparación de productos de interacción de prazicuantel con el carbonato cálcico en presencia de agua ha dado lugar a significativos cambios en la morfología, textura y estructura cristalina del prazicuantel, incluyendo cambios conformacionales de las moléculas de fármaco.
10. La mezcla física de prazicuantel y carbonato cálcico ha producido una mejora en la velocidad de disolución *in vitro* del fármaco.
11. El modelado molecular ha permitido conocer las principales interacciones interatómicas entre prazicuantel y carbonato cálcico en presencia de agua y, con ello, entender el comportamiento experimental de dichos sistemas.

Corolario e hipótesis futura

Estas conclusiones se han logrado gracias a la realización de un estudio conjunto teórico-experimental, en el que se han correlacionado los resultados obtenidos con ambas metodologías. El estudio a nivel teórico de la interacción del fármaco prazicuantel con las arcillas y el carbonato cálcico ha permitido determinar la estructura de la molécula y de las formas cristalinas del prazicuantel y la de los excipientes inorgánicos, así como analizar la interacción química entre el fármaco y los excipientes. Experimentalmente, se han caracterizado los productos de interacción de fármaco-mineral y se han evaluado los cambios en el perfil de disolución *in vitro* del fármaco como resultado de la interacción con los excipientes. Gracias al empleo de los excipientes estudiados en esta Tesis es posible aumentar la velocidad de disolución del prazicuantel de forma significativa, lo que permitirá diseñar formas farmacéuticas con dosis menores que consientan el tratamiento de la enfermedad con una reducción de los efectos secundarios. Este desarrollo conducirá a la mejora del tratamiento de la enfermedad, disminuyendo la prevalencia del

incumplimiento terapéutico y el desarrollo de formas resistentes del parásito sin aumentar el coste final del medicamento.

In this Doctoral Thesis, theoretical and experimental studies have been performed on the interaction of praziquantel with natural inorganic excipients aimed to improve the biopharmaceutic profile of the drug. This work has given rise to four articles that have been published in international scientific journals indexed in the Science Citation Index (SCI) placed in good positions within their categories. In addition, two manuscripts have been prepared for later publication, which are also included in this Thesis report. In these six articles, the objectives of the Doctoral Thesis have been achieved. In each of the chapters, the specific conclusions of each work have been presented. Meanwhile, in this chapter, those conclusions and aspects which are more general are given and listed in the following lines:

1. The exploration of various computational methodologies and the comparison of the results has allowed selecting those that adequately describe the molecular and crystalline structures of praziquantel, highlighting the quantum-chemical methods based on DFT/GGA and the force fields based on empirical potentials COMPASS and CVFFH.
2. The praziquantel molecule has two main stable conformers defined by the relative position of the two carbonyl groups of praziquantel, *syn* and *anti*. These conformers do not coexist in any of the crystalline forms of the drug and are those that define their different known polymorphs.
3. The crystalline forms of praziquantel have been reproduced by theoretical methods for the first time and their X-ray diffraction

patterns, identifying the main intermolecular interactions responsible for the molecular packaging of such crystalline forms.

4. The infrared and Raman spectra of the praziquantel molecule and its crystalline forms have been reproduced by theoretical methods for the first time, identifying the main modes of vibration and assigning some bands that had not been identified experimentally.
5. For the first time, nanostructured materials based on praziquantel and clay, specifically montmorillonite and sepiolite, have been obtained in the absence of water, which has led to a patent application.
6. It has been possible to improve the rate of dissolution and the amount of the praziquantel drug released *in vitro*, thanks to its interaction with nanostructured materials based on montmorillonite and sepiolite as natural inorganic excipients.
7. Molecular modeling studies have allowed to know the interactions of the praziquantel molecule with the interlaminar surface of montmorillonite and the zeolitic spaces of sepiolite, and to understand the way in which praziquantel is adsorbed in these clays. The changes of such spaces observed experimentally have been reproduced.
8. The adsorption of praziquantel on the surfaces of sepiolite and montmorillonite has been obtained as energetically favorable.
9. The preparation of interaction products of praziquantel with calcium carbonate in the presence of water has given rise to significant changes in the morphology, texture and crystal structure of praziquantel, including conformational changes of the drug molecules.

10. The physical mixture of praziquantel and calcium carbonate has produced an improvement in the *in vitro* dissolution rate of the drug.
11. The molecular modeling has allowed to know the main interatomic interactions between praziquantel and calcium carbonate in the presence of water and consequently to understand the experimental behaviour of these systems.

Corollary and future hypothesis

These conclusions have been achieved thanks to the realization of a joint theoretical and experimental study, in which the results obtained with both methodologies have been correlated. The theoretical study of the interaction of the praziquantel drug with clays and calcium carbonate have allowed to determine the structure of the molecule and the crystalline forms of praziquantel and that of the inorganic excipients, as well as to analyze the chemical interaction between the drug and the excipients. Experimentally, the drug-mineral interaction products have been characterized and the changes in the *in vitro* dissolution profile of the drug as a result of the interaction with the excipients have been evaluated. Thanks to the use of the excipients studied in this Thesis, it is possible to significantly increase the dissolution rate of praziquantel, which shall allow to design pharmaceutical forms with smaller doses that consent the treatment of the disease with fewer side effects. This development will lead to the improvement of the treatment of the disease, decreasing the prevalence of noncompliance and the development of resistant forms of the parasite without increasing the final cost of the drug.

Bibliografía

- Accelrys Materials Studio, versions v 6.0.0.0., 2012. Accelrys Inc., San Diego, USA.
- Aguzzi, C., Capra, P., Bonferoni, C., Cerezo, P., Salcedo, I., Sánchez, R., Caramella, C., Viseras, C., 2010. Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). *Applied Clay Science* 50, 106-111.
- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., Caramella, C., 2007. Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science* 36, 22-36.
- Aguzzi, C., Sánchez-Espejo, R., Cerezo, P., Machado, J., Bonferoni, C., Rossi, S., Salcedo, I., Viseras, C., 2013a. Networking and rheology of concentrated clay suspensions “matured” in mineral medicinal water. *International Journal of Pharmaceutics* 453, 473-479.
- Aguzzi, C., Viseras, C., Cerezo, P., Salcedo, I., Sánchez-Espejo, R., Valenzuela, C., 2013b. Release kinetics of 5-aminosalicylic acid from halloysite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105, 75-80.
- Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research* 12, 413-420.
- Andrés, J. y Beltrán, J., 2000. Química teórica y computacional, Universitat Jaume I, Castellón.
- Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R., Seubert, J., 1983. Praziquantel. *Medicinal Research Reviews* 3, 147-200.
- Andrews, P., 1985. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacology & Therapeutics* 29, 129-156.
- Aristilde, L., Marichal, C., Miéché-Brendlé, J., Lanson, B., Charlet, L., 2010. Interactions of Oxytetracycline with a Smectite Clay: A Spectroscopic Study with Molecular Simulations. *Environmental Science and Technology* 44, 7839-7845.

- Aron-Brunetière, R., 1985. Guía de la terapéutica dermatológica, Masson, Barcelona.
- Arrúa, E.C., Ferreira, M.J.G., Salomon, C.J., Nunes, T.G., 2015. Elucidating the guest-host interactions and complex formation of praziquantel and cyclodextrin derivatives by ^{13}C and ^{15}N solid-state NMR spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* 496, 812-821.
- Aulton, M.E. y Taylor, K.M.G., 2013. *Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*, Fourth Ed. Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia.
- Ayala Fernández, J.A., Gualda Cebrián, E.M., Hermida Lazcano, I., Medrano González, F., 2014. Infecciones por trematodos: esquistosomiasis, fascioliasis, opistorquiasis, clonorquiasis y paragonimiasis. Infections due to trematodes, schistosomiasis, fascioliasis, opistorchiasis, clonorchiasis and paragonimiasis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 11, 3115-3128.
- Bailey, S.W., 1980. Summary of recommendation of AIPEA. Nomenclature Committee. *Clays and Clay Minerals* 28, 73-78.
- Baronnet, A., 1988. *Minéralogie*. Ed. Dunod, Paris.
- Batthey, M.H., 1990. *Mineralogy for students*. Longman, Harlow.
- Beall, D.P. y Schofield, R.H., 1995. Milk-alkali syndrome associated with calcium carbonate consumption. Report of 7 patients with parathyroid hormone levels and an estimate of prevalence among patients hospitalized with hypercalcemia. *Medicine* 74, 89-96.
- Becket, G., Schep, L.J., Tan, M.Y., 1999. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β - and γ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* 179, 65-71.
- Berendsen, H.J.C., Grigera, J.R., Straatsma, T.P., 1987. The missing term in effective pair potentials. *The Journal of Physical Chemistry* 91, 6269-6271.
- Biggs, R.D., 2005. 'Medicine, surgery, and public health in ancient mesopotamia'. *Journal of Assyrian Academic Studies* 19, 1-19.

- Bittencourt, P.R., Gracia, C.M., Martins, R., Fernandes, A.G., Diekmann, H.W., Jung, W., 1992. Phenytoin and carbamazepine decreased oral bioavailability of praziquantel. *Neurology* 42, 492-496.
- Bohnert, T. y Gan, L.S., 2013. Plasma protein binding: from discovery to development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102, 2953-2994.
- Bonadeo, I., 1963. Tratado de cosmética moderna. Ed. Científico-Médica, Barcelona.
- Bonadeo, I., 1964. Cosméticos extracutáneos. Cosmetología estética e higiénica. Ed. Científico-Médica, Barcelona.
- Born, M. y Oppenheimer, R., 1927. On the quantum chemistry of molecules. *Annals of Physics* 84, 475-484.
- Borrego-Sánchez, A., Awad, M.E., Sainz-Díaz, C.I., 2018. Molecular Modeling of Adsorption of 5-Aminosalicylic Acid in the Halloysite Nanotube. *Minerals* 8, 61.
- Breecker, D.O., Sharp, Z.D., McFadden, L.D., 2010. Atmospheric CO₂ concentration during ancient greenhouse climates were similar to those predicted for A.D. 2100. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 576-580.
- Brewster, M.E. y Loftsson, T., 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 645-666.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., 1989. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, 11th ed. Merck & Co., Inc, USA.
- Camidge, R. y Peaston, R., 2000. Recommended dose antacids and severe hypercalcemia. *British Journal of Clinical Pharmacology* 52, 341-342.
- Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., García-Villén, F., Sánchez-Espejo, R., Aguzzi, C., Viseras, C., Sainz-Díaz, C.I., Cerezo, P., 2017. Assessment of halloysite nanotubes as vehicles of isoniazid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 160, 337-344.

- Cao, H., Liu, H., Dömling, A., 2010. Efficient multicomponent reaction synthesis of the schistosomiasis drug praziquantel. *Chemistry: A European Journal* 16, 12296-12298.
- Carvalho, M.R., Pedro de Souza, J., Clemente de Araújo, H., 1999. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. *Química Nova* 22, 5-10.
- Castro, N., Medina, R., Sotelo, J., Jung, H., 2000. Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 2903-2904.
- Castro, N., Jung, H., Medina, R., González-Esquivel, D., López, M., Sotelo, J., 2002. Interaction between grapefruit juice and praziquantel in humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1614-1616.
- Cerný, V., 1985. A thermodynamical approach to the travelling salesman problem: an efficient simulation algorithm. *Journal of Optimization Theory and Applications* 45, 41-51.
- Charles, P., 1992. Calcium absorption and calcium bioavailability. *Journal of Internal Medicine* 231, 161-168.
- Chaud, M.V., Lima, A.C., Vila, M.M.D.C., Paganelli, M.O., Paula, F.C., Pedreiro, L.N., Gremião, M.P.D., 2013. Development and evaluation of praziquantel solid dispersions in sodium starch glycolate. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12, 163-168.
- Chaves, I.S., Rodrigues, S.G., Melo, N.F.S., De Jesus, M.B., Fraceto, L.F., De Paula, E., Pinto, L.M.A., 2010. Alternatives for the treatment of schistosomiasis: Physico-chemical characterization of an inclusion complex between praziquantel and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Latin American Journal of Pharmacy* 29, 1067-1074.
- Chen, C.R., Zatz, J.L., 1992. Dynamic rheologic measurement of the interaction between xanthan gum and colloidal magnesium aluminum silicate. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 43, 1-12.
- Chen, S., Zhao, D., Li, F., Zhuo, R-X., Cheng, S-X., 2012. Co-delivery of genes and drugs with nanostructured calcium carbonate for cancer therapy. *RSC Advances* 2, 1820-1826.

- Cheng, L., Guo, S., Wu, W., 2009. Characterization and in vitro release of praziquantel from poly(-caprolactone) implants. *International Journal of Pharmaceutics* 377, 112-119.
- Cheng, L., Lei, L., Guo, S., 2010. *In vitro* and *in vivo* evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. *International Journal of Pharmaceutics* 387 129-138.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 7, 41-51.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S., 1993. Drug Resistance in Schistosomes. *Parasitology Today* 9, 162-166.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S., 1995. Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmacology & Therapeutics* 68, 35-85.
- Cioli, D., 2000. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Current Opinion in Infectious Diseases* 13, 659-663.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., 2003. Praziquantel. *Journal of Parasitology Research* 90, 3-9.
- Ciullo, P. y Braun, D., 1992. Stabilising topical products. *Manufacturing Chemist* 63, 20-21.
- Clark, S.J., Segall, M.D., Pickard, C.J., Hasnip, P.J., Probert, M.J., Refson, K., Payne, M.C., 2005. First principles methods using CASTEP. *Zeitschrift fuer Kristallographie* 220, 567-570.
- Cohen, A.J., Mori-Sánchez, P., Yang, W., 2012. Challenges for density functional theory. *Chemical Reviews* 112, 289-320.
- Cooke, C.L., 1932. Alkalosis occurring in the alkaline treatment of peptic ulcers. *An International Journal of Medicine* 25, 527-41.
- Cope, C.L., 1936. Base changes in the alkalosis produced by the treatment of gastric ulcer with alkalies. *Clinical Science* 2, 287-399.
- Costa, P., Sousa Lobo, J.M., 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 123-133.

- Costa, E.D., Priotti, J., Orlandi, S., Leonardi, D., Lamas, M.C., Nunes, T.G., Diogo, H.P., Salomon, C.J., Ferreira, M.J., 2016. Unexpected solvent impact in the crystallinity of praziquantel/poly(vinylpyrrolidone) formulations. A solubility, DSC and solid-state NMR study. *International Journal of Pharmaceutics* 511, 983-993.
- Cugovčan, M., Jablan, J., Lovrić, J., Cinčić, D., Galić, N., Jug, M., 2017. Biopharmaceutical characterization of praziquantel cocrystals and cyclodextrin complexes prepared by grinding. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 137, 42-53.
- Cury, J.A., Francisco, S.B., Simões, G.S., Del Bel Cury, A.A., Tabchoury, C.P.M., 2003. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. *Caries Research* 37, 194-199.
- Da Silva Mourão, L.C., Batista, D.R.M.R., Honorato, S.B., Ayala, A.P., Morais, W.D.A., Barbosa, E.G., Raffin, F.N., Moura, T.F.A.D.L., 2016. Effect of hydroxypropyl methylcellulose on beta cyclodextrin complexation of praziquantel in solution and in solid state. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 85, 151-160.
- Damour, A. y Salvetat, D., 1847. Analyses sur un hydrosilicate d'alumine trouvé à Montmorillon. *Annales de Chimie et de Physique* 3, 376-383.
- Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V.A., Osguthorpe, D.J., Wolff, J., Genest, M., Hagler, A.T., 1988. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *E. coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 4, 31-47.
- Davies, R., Scully, C., Preston, A.J., 2010. Dentifrices-an update. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 15, 976-982.
- Davis, A., Biles, J.E., Ulrich, A.M., 1979. Initial experiences with praziquantel in the treatment of human infections due to *Schistosoma Haematobium*. *Bulletin of the World Health Organization* 57, 773-779.
- Davis, A. y Wegner, D.H., 1979. Multicenter trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. *Bulletin of the World Health Organization* 57, 767-771.

- Davis, A., 1982. Available chemotherapeutic tools for the control of Schistosomiasis. *Behring Institute Mitteilungen* 71, 90-103.
- Davis, M.E., 2002. Ordered porous materials for emerging applications. *Nature* 417, 813-821.
- Day, T.A., Bennett, J.L., Pax, R.A., 1992. Praziquantel: The enigmatic antiparasitic. *Parasitology Today* 8, 342-344.
- De Araújo, M.M., Streck, L., De Souza, I., Caroni, A.L.P., Fernandes-Pedrosa, M.F., Sarmiento, V.H.V., Da Silva-Júnior, A.A., 2018. Surfactant-oil interactions overcoming physicochemical instability and insoluble praziquantel loading in soybean oil dispersions. *Journal of Molecular Liquids* 255, 288-296.
- De Jesus, M.B., Pinto, L.M.A., Fraceto, L.F., Takahata, Y., Lino, A.C.S., Jaime, C., De Paula, E., 2006. Theoretical and experimental study of a praziquantel and-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and-nuclear magnetic resonance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1428.
- De la Torre, P., Torrado, S., Torrado, S., 1999. Preparation, Dissolution and Characterization of Praziquantel Solid Dispersions. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 47, 1629-1633.
- De Vos, P., 2010. European materia medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. *Journal of Ethnopharmacology* 132, 28-47.
- Del Hoyo, C., Vicente, M.A., Rives, V., 1998. Application of phenyl salicylate-sepiolite systems as ultraviolet radiation filters. *Clay Minerals* 33, 467-474.
- Delley, B., 1990. An all-electron numerical method for solving the local density function for polyatomic molecules. *Journal of Chemical Physics* 92, 508-517.
- Delley, B., 2000. From molecules to solids with the DMol3 approach. *Journal of Chemical Physics* 113, 7756-7764.
- Dereck, R. y Woode, A., 1977. Production of calcium Carbonate. United States Patent, US4018877A.

- Di Pretoro, G., Zema, L., Gazzaniga, A., Kleinebudde, P., 2015. Impact of needle-like crystals on wet and solid-lipid extrusion processes. *Powder Technology* 270, 476-483.
- Dizaj, S.M., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M.H., Adibkia, K., Lotfipour, F., 2015. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system. *Expert Opinion on Drug Delivery* 12, 1649-1660.
- Doenhoff, M.J., Kimani, G., Cioli, D., 2000. Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitology Today* 16, 364-366.
- Dollery, C.T., 1999. Praziquantel. *Therapeutic Drugs*, Third Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. P184-P188.
- El-Arini, S.K., Giron, D., Leuenberg, H., 1998. Solubility properties of racemic praziquantel and its enantiomers. *Pharmaceutical development and technology* 3, 557-564.
- El-Lakkany, N., el-Din, S.H.S., Heikal, L., 2012. Bioavailability and in vivo efficacy of a praziquantel–polyvinylpyrrolidone solid dispersion in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 37, 289-299.
- El-Subbagh, H.I. y Al-Badr, A.A., 1998. Praziquantel. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients* 25, 463-500.
- Espinosa Lara, J.C., Guzman Villanueva, D., Arenas García, J.I., Herrera Ruiz, D., Rivera Islas, J., Román Bravo, P., Morales Rojas, H., Höpfl, H., 2013. Cocrystals of active pharmaceutical ingredients-praziquantel in combination with oxalic, malonic, succinic, maleic, fumaric, glutaric, adipic and pimelic acids. *Crystal Growth & Design* 13, 169-185.
- Fallon, P.G., Sturrock, R.F., Capron, A., Niang, M., Doenhoff, M.J., 1995. Short Report: Diminished Susceptibility to Praziquantel in a Senegal Isolate of *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53, 61-62.

- Fallon, P.G., Doenhoff, M.J., 1994. Drug-Resistant Schistosomiasis: Resistance to Praziquantel and Oxamniquine Induced in *Schistosoma Mansoni* in Mice is Drug Specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 83-88.
- Feldmeier, H. y Poggensee, G., 1993. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. A review. *Acta Tropica* 52, 205-220.
- Figueroa, R.A., Leonard, A., MacKay, A.A., 2004. Modeling Tetracycline Antibiotic Sorption to Clays. *Environmental Science and Technology* 38, 476-483.
- Finkelman, R.B., 2006. Health benefits of geologic materials and geologic processes. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 3, 338-342.
- Fock, V.A.Z., 1930. Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems. *Physik* 15, 126-148.
- Fornes, T.D. y Paul, D.R., 2003. Modeling properties of nylon 6/clay nanocomposites using composite theories. *Polymer* 44, 4993-5013.
- Francisco-Márquez, M., Soriano-Correa, C., Sainz-Díaz, C.I., 2017. Adsorption of Sulfonamides on Phyllosilicate Surfaces by Molecular Modeling Calculations. *The Journal of Physical Chemistry C* 121, 2905-2914.
- Frezza, T.F., Gremião, P.M.D., Zanotti-Magalhães, E.M., Magalhães, L.A., Ribeiro de Souza, A.L., Allegretti, S.M., 2013. Liposomal-praziquantel: Efficacy against *Schistosoma mansoni* in a preclinical assay. *Acta Tropica* 128, 70-75.
- Frömming, K.H. y Szejtli, J., 2014. Cyclodextrins in Pharmacy, Fifth Ed. Topics in Inclusion Science, Springer, Netherlands.
- Fujiwara, M., Shiokawa, K., Morigaki, K., Zhu, Y., Nakahara, Y., 2008. Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules. *Chemical Engineering Journal* 137, 14-22.
- Gaffar, A., Balke-Haskins, J.C., Mellberg, J.R., 1993. In vivo studies with a dicalcium dihydrate/MFP system for caries prevention. *International Dental Journal* 43, 81-88.

- Galan, E., 1996. Properties and applications of palygorskite-sepiolite clays. *Clay Minerals* 31, 443-453.
- Gonçalves, M.L.C.M., Lyra, M.A.M., Oliveira, F.J.V.E., Rolim, L.A., Nadvorny, D., Vilarinho, A.C.S.G., Nunes, L.C.C., Soares, M.F.L.R., Silva-Filho, E.C., Soares-Sobrinho, J.L., 2017. Use of phyllosilicate clay mineral to increase solubility olanzapine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 127, 1743-1750.
- Gomes, C. y Silva, J.B., 2007. Minerals and clay minerals in medical geology. *Applied Clay Science* 36, 4-21.
- Gonzalez, M.A., Ramírez Rigo, M.V., Gonzalez Vidal, N.L., 2018. Praziquantel systems with improved dissolution rate obtained by high pressure homogenization. *Materials Science and Engineering: C* 93, 28-35.
- González-Esquivel, D., Rivera, J., Castro, N., Yepez Mulia, L., Helgi, J.C., 2005. In vitro characterization of some biopharmaceutical properties of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics* 295, 93-99.
- Grim, R.E., 1962. *Applied Clay Mineralogy*, McGraw Hill Book Company, New York.
- Grim, R.E., 1968. Structure of the clays minerals. En: Emery, K.O., Engel, A.E., Krauskopf, K., Murray, B., Siever, R. (Eds.), *Clay Mineralogy*, Second Ed. McGraw-Hill International Series in the Earth and Planetary Sciences, New York, pp.70-77.
- Groll, E., 1984. Praziquantel. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy* 20, 219-238.
- Gryseels, B., Stelma, F.F., Talla, I., van Dam, G.J., Polman, K., Sow, S., Diaw, M., Sturrock, R.F., Doehring-Schwerdtfeger, E., Kardorff, R., 1994. Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Tropical and Geographical Medicine* 46, 209-219.
- Gryseels, B., 2012. Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26, 97-383.

- Guéguen, L. y Pointillart, A., 2000. The bioavailability of dietary calcium. *Journal of American College of Nutrition* 19, 119-136.
- Guggenheim, S. y Martin, R.T., 1995. Definition of clay mineral: Joint Report of the AIPEA Nomenclature and CMS Nomenclature Committees. *Clays and Clay minerals* 43, 255-256.
- Guggenheim, S., Adams, J.M., Bain, D.C., Bergaya, F., Brigatti, M.F., Drits, V.A., Formoso, M.L.L., Galán, E., Kogure, T., Stanjek, H., 2006. Summary of recommendations of nomenclature committees relevant to clay mineralogy: report of the Association Internationale pour l'Etude des Argiles (AIPEA) Nomenclature Committee for 2006. *Clay Minerals* 54, 761-772.
- Ha, J. y Xanthos, M., 2011. Drug release characteristics from nanoclay hybrids and their dispersions in organic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 414, 321-331.
- Hammer, B., Hansen, L.B., Norskov, J.K., 1999. Improved adsorption energetics within density-functional theory using revised Perdew-Burke-Ernzerhof functionals. *Physical Review B* 59, 7413.
- Hanzlik, R.P., Fowler, S.C., Fisher, D.H., 2005. Relative bioavailability of calcium from calcium formate, calcium citrate, and calcium carbonate. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 313, 1217-1222.
- Hartree, D.R., 1928. The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory and Methods. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 24, 89-110.
- Heaney, R.P., Recker, R.R., Weaver, C.M., 1990. Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcified Tissue International* 46, 300-304.
- Heinz, H., Vaia, R.A., Farmer, L., 2006. Interaction energy and surface reconstruction between sheets of layered silicates. *The Journal of Chemical Physics* 124, 224713.

- Heller, H.J., Greer, L.G., Haynes, S.D., Poindexter, J.R., Pak, C.Y.C., 2000. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of two calcium supplements in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Pharmacology* 40, 1237-1244.
- Hill, J.R. y Sauer, J., 1994. Molecular mechanics potential for silica and zeolite catalysts based on ab initio calculations. 1. Dense and microporous silica. *Journal of Physical Chemistry* 98, 1238-1244.
- Hohenberg, P. y Kohn, W., 1964. Inhomogeneous electron gas. *Physical Reviews* 136, B864-B871.
- Homeida, M., Leahy, W., Copeland, S., Ali, M.M., Harron, D.W., 1994. Pharmacokinetic interaction between praziquantel and albendazole in Sudanese men. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 88, 551-559.
- CDC, 2018. Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado julio 2018, <https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>.
- Hu, J., Johnston, K.P., Williams, R.O., 2004. Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 30, 233-245.
- Hyup Kim, J., Sup Lee, Y., Park, H., Sup Kim, C., 1998. Formation of pyrazinoisoquinoline ring system by the tandem amidoalkylation and N-acyliminium ion cyclization: An efficient synthesis of praziquantel. *Tetrahedron* 54, 7395-7400.
- Ishizaki, T., Kamo, E., Boehme, K., 1979. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma Japonicum* infections. *Bulletin of the World Health Organization* 57, 787-791.
- Islan, G.A., Cacicedo, M.L., Bosio, V.E., Castro, G.R., 2015. Development and characterization of new enzymatic modified hybrid calcium carbonate microparticles to obtain nano-architected surfaces for enhanced drug loading. *Journal of Colloid and Interface Science* 439, 76-87.

- Ismail, M., Metwally, A., Farghaly, A., Bruce, J., Tao, L-F., Bennett, J.L., 1996. Characterization of Isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian Villagers that Tolerate High Doses of Praziquantel. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55, 214-218.
- Jensen, F., 1999. Introduction to computational chemistry, John Wiley & Sons, Chichester.
- Jung, H., Kim, H-M., Choy, Y.B., Hwang, S-J., Choy, J-H., 2008. Itraconazole–Laponite: Kinetics and mechanism of drug release. *Applied Clay Science* 40, 99-107.
- Katz, N., Rocha, R.S., Chaves, A., 1979. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma Mansoni*. *Bulletin of the World Health Organization* 57, 781-785.
- Kearns, G.L., Abdel-Rahman, S.M., Alander, S.W., Blowey, D.L., Leeder, J.S., Kauffman, R.E., 2003. Developmental pharmacology-drug disposition, action, and therapy in infants and children. *The New England Journal of Medicine* 349, 1157-1167.
- Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J.T., Kim, H., Cho, J.M., Yun, G., Lee, J., 2014. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 9, 304-316.
- Khiari, I., Mefteh, S. Sánchez-Espejo, R., Cerezo, P., Aguzzi, C., López-Galindo, A., Jamoussi, F., Viseras Iborra, C., 2014. Study of traditional Tunisian medina clays used in therapeutic and cosmetic mud-packs. *Applied Clay Science* 101, 141-148.
- Kirkpatrick, S., Gelatt, C.D., Vecchi, M.P., 1983. Optimization by simulated annealing. *Science* 220, 671-680.
- Klein, C. y Hurlbut, C.S., 1997. Manual de Mineralogía, Fourth Ed. Reverté, Barcelona.

- Kohn, A., Anderson, P.A.V., Roberts-Misterly, J.M., Greenberg, R., 2001. Schistosome calcium channel β subunits unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 36873-36876.
- Kohn, W. y Sham, L.J., 1965. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Reviews* 140, A1133-A1138.
- Kolenyak-Santos, F., Garnero, C., Nunes de Oliveira, R., De Souza, A.L., Chorilli, C., Marques Allegretti, S., Longhi, M.R., Vinícius Chaud, M., Gremião, M.P., 2014. Nanostructured Lipid Carriers as a Strategy to Improve the In Vitro Schistosomiasis Activity of Praziquantel. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 14, 1-12.
- Krishnaiah, Y.S.R., 2010. Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* 2, 28-36.
- Kubicki, J.D., Itoh, M.J., Schroeter, L.M., Apitz, S.E., 1997. Bonding Mechanisms of Salicylic Acid Adsorbed onto Illite Clay: An ATR-FTIR and Molecular Orbital Study. *Environmental Science and Technology* 31, 1151-1156.
- Kulshrestha, P., Giese, R.F., Aga, D.S., 2004. Investigating the Molecular Interactions of Oxytetracycline in Clay and Organic Matter: Insights on Factors Affecting Its Mobility in Soil. *Environmental Science and Technology* 38, 4097-4105.
- Kumar Sharma, L., Cupit, P.M., Goronga, T., Webba, T.R., Cunningham, C., 2014. Design and synthesis of molecular probes for the determination of the target of the anthelmintic drug praziquantel. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 2469-2472.
- Kurapati, R. y Raichur, A.M., 2013. Composite cyclodextrin-calcium carbonate porous microparticles and modified multilayer capsules: novel carriers for encapsulation of hydrophobic drugs. *Journal of Materials Chemistry B* 1, 3175-3184.

- Lanting, B., Barfett, J., 2006. Encapsulated calcium carbonate suspensions: A drug delivery vehicle sensitive to ultrasound disruption. *McGill Journal of Medicine* 9, 108-110.
- Le Hir, A., 1995. Farmacia Galénica. Manuales de Farmacia, Masson, Barcelona.
- Leleux, J. y Williams, R.O., 2013. Recent advancements in mechanical reduction methods: Particulate systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 3109, 1-12.
- Leopold, G., Ungethum, W., Groll, E., Diekmann, H.W., Nowak, H., Wegner, D.H.G., 1978. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. *European Journal of Clinical Pharmacology* 14, 281-291.
- Leuner, C. y Dressman, J., 2000. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 47-60.
- Levenson, D.I. y Bockman, R.S., 1994. A review of calcium preparations. *Nutrition Reviews* 52, 221-232.
- Li, C., Cheng, L., Zhang, Y., Guo, S., Wu, W., 2010. Effects of implant diameter, drug loading and end-capping on praziquantel release from PCL implants. *International Journal of Pharmaceutics* 386, 23-29.
- Lim, B.G., Tan, R.B.H., Ng, S.C., Ching, C.B., 1995. Solubility phase-diagram of praziquantel enantiomeric system. *Chirality* 7, 74-81.
- 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, 265-278.

- Liu, S.Y., Sporer, F., Jourdane, J., Henning, R., Li, Y.L., Ruppel, A., 1997. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria*, and *Bulinus*. *Tropical Medicine and International Health* 2, 179-188.
- Liu, Y., Wang, X., Wang, J.K., Ching, C.B., 2004. Structural characterization and enantioseparation of the chiral compound praziquantel. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 93, 3039-3046.
- Liu, Y., Wang, X., Wang J.K., Ching, C.B., 2006. Investigation of the phase diagrams of chiral praziquantel. *Chirality* 18, 259-264.
- Liu, Y., Wang, T., Ding, W., Dong, C., Wang, X., Chen, J., Li, Y., 2018. Dissolution and oral bioavailability enhancement of praziquantel by solid dispersions. *Drug Delivery and Translational Research* 8, 580-590.
- López Galindo, A. y Viseras, C. 2004. Pharmaceutical and cosmetic applications of clays. En: Wypych, F. y Satyanarayana, K.G. (Eds.), *Clay Surfaces, Fundamentals and Applications*. Elsevier, Amsterdam, pp. 267-289.
- López Galindo, A., Viseras, C., Cerezo, P., 2006. Las arcillas en Farmacia, Cosmética y Balnearios. En: Suárez, M., Vicente, M.A., Rives, V., Sánchez, M.J. (Eds.), *Materiales arcillosos: De la Geología a las Nuevas Aplicaciones*. Sociedad Española de Arcillas, Salamanca, pp. 291-307.
- López-Galindo, A., Viseras, C., Cerezo, P., 2007. Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. *Applied Clay Science* 36, 51-63.
- López-Galindo, A., Viseras, C., Aguzzi, C., Cerezo, P., 2011. Pharmaceutical and Cosmetic Uses of Fibrous Clays. En: Galán, E. y Singer, A. (Eds.), *Handbook of Clay Science, Developments in Clay Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 299-324.
- López-Gómez, M., Castro, N., Jung, H., Sotelo, J., Corona, T., 2001. Optimization of the single-day praziquantel therapy for neurocysticercosis. *Neurology* 57, 1929-1930.

- Lukham, P.F. y Rossi, S., 1999. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. *Advances in Colloid and Interface Science* 82, 43-92.
- Mackenzie, R.C., 1963. De Natura Lutorum. En: Bradley, W.F. (Ed.), Proceedings of the Eleventh National Conference on Clays and Clay Minerals, 1962. Pergamon Press, Oxford, pp. 11-28.
- Maestrelli, F., Mura, P., Cirri, M., Mennini, N., Ghelardini, C., Di Cesare Mannelli, L., 2017. Development and characterization of fast dissolving tablets of oxaprozin based on hybrid systems of the drug with cyclodextrins and nanoclays. *International Journal of Pharmaceutics* 531, 640-649.
- Mainwaring, P. y Duke, S.A., 1980. Effect of home use of calcium carbonate (CaCO₃) toothpastes on plaque acidity following sucrose rinsing. *Caries Research* 14, 170.
- Majeti, N. y Kumar, V.R., 2000. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 3, 234-258.
- Mandour, M., Turabi, H., Homeida, M., Sadig, T., Ali, H., Bennett, J., Leahey, W., Harron, D., 1990. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 84, 389-393.
- Manzine Costa, L.M., Molina de Olyveira, G., Salomão, R., 2017. Precipitated Calcium Carbonate Nano-Microparticles: Applications in Drug Delivery. *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 3, 2.
- Maragos, S., Archontaki, H., Macheras, P., Valsami, G., 2009. Effect of cyclodextrin complexation on the aqueous solubility and solubility/dose ratio of praziquantel. *The American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech* 10, 1444-1451.
- Marques, C.S.F., Rezende, P., Andrade, L.N., Mendes, T.M.F., Allegretti, S.M., Bani, C., Chaud, M.V., de Almeida, M.B., Souto, E.B., da Costa, L.P., Severino, P., 2018. Solid dispersion of praziquantel enhanced solubility and improve the efficacy of the schistosomiasis treatment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 45, 124-134.

- Martini, L. y Wood, R.J., 2002. Relative bioavailability of calcium-rich dietary sources in the elderly. *American Society for Clinical Nutrition* 76, 1345-1350.
- Martos-Villa, R., Francisco Márquez, M., Mata, M.P., Sainz Díaz, C.I., 2013. Crystal structure, stability and spectroscopic properties of methane and CO₂ hydrates. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 44, 253-265.
- McMillan, D.E. y Freeman, R.B., 1965. The milk alkali syndrome: A study of the acute disorder with comments on the development of the chronic condition. *Medicine* 44, 485.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller, A.H., Teller, E., 1953. Equation of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics* 21, 1087-1092.
- Mewis, J. y Wagner, N.J., 2009. Thixotropy. *Advances in Colloid and Interface Science* 147, 214-227.
- Milovski, A.V. y Kónonov, O.V., 1988. Mineralogía. Mir, Moscú, pp. 163-197.
- Mizushima, Y., Ikoma, T., Tanaka, J., Hoshi, K., Ishihara, T., Ogawa, Y., Ueno, A., 2006. Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs. *Journal of Controlled Release* 110, 260-265.
- Mortensen, L. y Charles, P., 1996. Bioavailability of calcium supplements and the effect of vitamin D: comparisons between milk, calcium carbonate and calcium carbonate plus vitamin. *The American Journal of Clinical Nutrition* 63, 354-357.
- Moulari, B., Béduneau, A., Pellequer, Y., Lamprecht, A., 2014. Lectin-decorated nanoparticles enhance binding to the inflamed tissue in experimental colitis. *Journal of Controlled Release* 188, 9-17.
- Mourao, S.C., Costa, P.I., Salgado, H.R.N., Gremiao, M.P.D., 2005. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 295, 157-162.

- Mousa, M., Evans, N.D., Oreffo, R.O.C., Dawson, J.I., 2018. Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: A review of clay bioactivity. *Biomaterials* 159, 204-214.
- Müller, R.H., Mader, K., Gohla, S., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 161-177.
- Münster, M., Mohamed-Ahmed, A.H.A., Immohr, L.I., Schoch, C., Schmidt, C., Tuleu, C., Breitzkreutz, J., 2017. Comparative *in vitro* and *in vivo* taste assessment of liquid praziquantel formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 529, 310-318.
- Mura, P., Maestrelli, F., Aguzzi, C., Viseras, C., 2016. Hybrid systems based on “drug - in cyclodextrin - in nanoclays” for improving oxaprozin dissolution properties. *International Journal of Pharmaceutics* 509, 8-15.
- Murray, H.H., 2000. Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview. *Applied Clay Science* 17, 207-221.
- Murray, M., 2006. Altered CYP expression and function in response to dietary factors: potential roles in disease pathogenesis. *Current drug metabolism* 7, 67-81.
- Newmark, K. y Nugent, D., 1993. Milk-alkali syndrome. A consequence of chronic antacid abuse. *Postgraduate medicine* 93, 50-149.
- Nienhuis, S., Palmer, A.R., Harley, C.D.G., 2010. Elevated CO₂ affects shell dissolution rate but not calcification rate in a marine snail. *Proceedings of the Royal Society of London B* 227, 2553-2558.
- Nordin, B.E.C., 1987. The definition and diagnosis of osteoporosis. *Calcified Tissue International* 40, 57-58.
- Odom, I.E., 1984. Smectite Clay Minerals: Properties and Uses. Philosophical Transactions of the Royal Society A, London.
- Ogomi, D., Serizawa, T., Akashi, M., 2005. Controlled release based on the dissolution of a calcium carbonate layer deposited on hydrogels. *Journal of Controlled Release* 103, 315-323.

- Olliaro, P., Delgado-Romero, P., Keiser, J., 2014. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69, 863-870.
- OMS, 2018. Organización Mundial de la Salud. Recuperado julio 2018, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>.
- Orwoll, E.S., 1982. The milk alkali syndrome: current concepts. *Annals of Internal Medicine* 97, 242-248.
- Pappa, C., Nanaki, S., Giliopoulos, D., Triantafyllidis, K., Kostoglou, M., Avgeropoulos, A., Bikiaris, D., 2018. Nanostructured Composites of Sodium Montmorillonite Clay and PEO Used in Dissolution Improvement of Aprepitant Drug by Melt Mixing. *Applied Sciences* 8, 786.
- Parr, R., Weitao, R., 1995. Density-Functional theory of atoms and molecules. Oxford University Press, New York.
- Passerini, N., Albertini, B., González Rodríguez, M.L., Cavallari, C., Rodríguez, L., 2002a. Preparation and characterisation of ibuprofenpoloxamer 188 granules obtained by melt granulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 71-78.
- Passerini, N., Perissutti, B., Moneghini, M., Voinovich, D., Albertini, B., Cavallari, C., Rodríguez, L., 2002b. Characterisation of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91, 699-707.
- Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., Rodríguez, L., 2006. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics* 318, 92-102.
- Patterson, S.H. y Murray, H.H., 1983. Clays. En: Leford, S.J. (Ed.), *Industrial Minerals and Rocks* (5th ed.). AIME, New York, pp. 589-651.
- Patzschke, K., Putter, J., Wegner, A.F., Diekmann, W.H., 1979. Serum concentrations and renal excretion in humans after oral administration of praziquantel-results of three determination methods. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 3, 149-156.

- Pax, R., Bennett, J.L., Fetterer, R., 1978. A benzodiazepine derivative and praziquantel: Effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 304, 309-315.
- Pearce, E.I., Dong, Y.M., Yue, L., Gao, X.J., Purdie, G.L., Wang, J.D., 2002. Plaque minerals in the prediction of caries activity. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 30, 61-69.
- Perdew, J.P., Burke, K., Wang, Y., 1996a. Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system. *Physical Review B* 54, 16533-16539.
- Perdew, J.P., Burke, K., Ernzerhof, M., 1996b. Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters* 77, 3865-3868.
- Perea, M.A., 2014. Historia de la peloterapia. En: Hernández Torres, A. (Ed.), Peloterapia: Aplicaciones médicas y cosméticas de fangos termales. Fundación para la Investigación e Innovación en Hidrología Médica y Balneoterapia "Bílbilis", Madrid, pp. 47-53.
- Perissutti, B., Rubessa, F., Moneghini, M., Voinovich, D., 2003. Formulation design of carbamazepine fast-release tablets prepared by melt granulation technique. *International Journal of Pharmaceutics* 256, 53-63.
- Perissutti, B., Passerini, N., Trastullo, R., Keiser, J., Zanolla, D., Zingone, G., Voinovich, D., Albertini, B., 2017. An explorative analysis of process and formulation variables affecting comilling in a vibrational mill: The case of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics* 533, 402-412.
- Ponti, G. y Zanotti-Gerosa, A., 1980. Influence of colloidal stabilizing agents on the rheological properties of suspension. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 120, 606-617.
- Porter, C., 2003. Vitamin and mineral supplements: part 1. *The Rx Consultant* 12, 1-8.

- Preisig, D., Haid, D., Varum, F.J., Bravo, R., Alles, R., Huwyler, J., Puchkov, M., 2014. Drug loading into porous calcium carbonate microparticles by solvent evaporation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87, 548-558.
- Prothero, D.R. y Schwab, F., 1996. An Introduction to Sedimentary Rocks and Stratigraphy. Sedimentary Geology. W.H. Freedman and Company, Nueva York.
- Qiu, N., Yin, H., Ji, B., Klauke, N., Glidle, A., Zhang, Y., Song, H., Cai, L., Ma, L., Wang, G., Chen, L., Wang, W., 2012. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin. *Materials Science and Engineering: C* 32, 2634-2640.
- Rabello, A., 1997. Diagnosing schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92, 76-669.
- RAE, 2001. Diccionario de la Real Academia Española. Vigésima segunda Ed.
- Rappé, A.K., Casewit, C.J., Colwell, K.S., Goddard, W.A., Skiff, W.M., 1992. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society* 114, 10024-10035.
- Rautureau, M., Caillère, S., Hénin, S., 2004. Utilisation de l'argile au cours des âges, Second Ed. Les Argiles, France.
- Rawat, N., Kumar, M.S., Mahadevan, N., 2011. Solubility: Particle size reduction is a promising approach to improve the bioavailability of lipophilic drugs. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Research* 1, 8-18.
- RFE, 2015. Real Farmacopea Española. Quinta Ed.
- Redman, C.A., Robertson, A., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J., Martin, R.J., 1996. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitology Today* 12, 14-20.
- Reginster, J.Y., Denis, D., Bartsch, V., Deroisy, R., Zegels, B., Franchimont, P., 1993. Acute biochemical variations induced by four different calcium salts in healthy male volunteers. *Osteoporosis International* 3, 271-275.

- Ribeiro de Souza, A.L., Andreani, T., Nunes de Oliveira, R., Kiill, C.P., Kolenyak dos Santos, F., Marques Allegretti, S., Vinícius Chaud, M., Souto, E.B., Silva, A.M., Daflon Gremião, M.P., 2014. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of the schistosomiasis treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 463, 31-37.
- Rick, S.W., Stuart, S.J., Bader, J.S., Berne, B.J., 1995. Fluctuating charge force fields for aqueous solutions. *Journal of Molecular Liquids* 65-66, 31-40.
- Riditid, W., Wongnawa, M., Mahatthanatrakul, W., Punyo, J., Sunbhanich, M., 2002. Rifampin markedly Decreases plasma concentrations of praziquantel in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 72, 505-513.
- Rodrigues, S.G., Chaves, I.S., Melo, N.F.S., de Jesus, M.B., Fraceto, L.F., Fernandes, S.A., de Paula, E., de Freitas, M.P., Pinto, L.M.A., 2011. Computational analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl- β -cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 70, 19-28.
- Rojas, R., Palena, M.C., Jimenez-Kairuz, A.F., Manzo, R.H., Giacomelli, C.E., 2012. Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex. *Applied Clay Science* 62-63, 15-20.
- Roothan, C.C.J., 1951. New developments in molecular orbital theory. *Reviews of Modern Physics* 23, 69-89.
- Roszkowski, P., Maurin, J.K., Czarnocki, Z., 2006. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ). *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 1415-1419.
- Roth, R., Schoelkopf, J., Huwyler, J., Puchkov, M., 2018. Functionalized calcium carbonate microparticles for the delivery of proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 122, 96-103.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E., 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Ed. Pharmaceutical Press, London.

- Sakhaee, K., Bhuket, T., Adams-Huet, B., Rao, D.S., 1999. Meta-analysis of calcium bioavailability: a comparison of calcium citrate with calcium carbonate. *American Journal of Therapeutics* 6, 313-321.
- Salcedo, I., Aguzzi, C., Sandri, G., Bonferoni, M.C., Mori, M., Cerezo, P., Sánchez, R., Viseras, C., Caramella, C., 2012. In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery. *Applied. Clay Science* 55, 131-137.
- Salcedo, I., Sandri, G., Aguzzi, C., Bonferoni, C., Cerezo, P., Sánchez-Espejo, R., Viseras, C., 2014. Intestinal permeability of oxytetracycline from chitosan-montmorillonite nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117, 441-448.
- Sandri, G., Bonferoni, M.C., Rossi, S., Ferrari, F., Aguzzi, C., Viseras, C., Caramella, C., 2016. Clay minerals for tissue regeneration, repair, and engineering. *Wound Healing Biomaterials* 2, 385-402.
- Santos, A.T., Blas, B.L., Noseños, J.S., Portillo, G.P., Ortega, O.M., Hayashi, M., Boehme, K., 1979. Preliminary clinical trials with praziquantel in *Schistosoma Japonicum* infections in the Philippines. *Bulletin of the World Health Organization* 57, 793-799.
- Seibel, B.A. y Dierssen, H.M., 2009. Animal Function at the Heart (and Gut) of Oceanography. *Science* 323, 343-344.
- Seo, A., Holm, P., Kristensen, H.G., Schaefer, T., 2003. The preparation of agglomerates containing solid dispersion of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer. *International Journal of Pharmaceutics* 259, 161-171.
- Serrao, R. y Bregni, C., 1987. Estabilización de emulsiones por formación de complejos insolubles. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 6, 175-181.
- Seubert, J., Pohlke, R., Loebich, F., 1977. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. *Experientia* 33, 1036-1037.

- Shaw, L., Murray, J.J., Burchell, C.K., Best, J.S., 1983. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Research* 17, 543-548.
- Shen, Z., Han, B., Wickramasinghe, S.R., 2006. Cyanide removal from industrial praziquantel wastewater using integrated coagulation–gas-filled membrane absorption. *Desalination* 195, 40-50.
- Shu-Hua, X., Ji-Qing, Y., Hui-Fang, G., Catto, B.A., 1992. Plasma Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy of Praziquantel and 4-Hydroxypraziquantel in *Schistosoma japonicum*-Infected Rabbits after Oral, Rectal, and Intramuscular Administration. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 582-588.
- Singh, A., Worku, Z.A., Van den Mooter, G., 2011. Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* 8, 1361-1378.
- Sirewalt, M.A. y Hackey, J.R., 1956. Penetration of host skin by cercariae of *S. mansoni*. I. Observed entry into skin of mouse, hamster, rat, monkey and man. *Journal of Parasitology* 42, 565-579.
- Soler, J.M., Artacho, E., Gale, J.D., García, A., Junquera, J., Ordejón, P., Sánchez-Portal, D., 2002. The SIESTA method for ab initio order-N materials simulation. *Journal of Physics: Condensed Matter* 14, 2745.
- Stasko, J., Kalniņš, M., Dzene, A., Tupureina, V., 2009. Poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 58, 63-66.
- Steiner, K., Garbe, A., Diekmann, H.W., Nowak H., 1976a. The fate of praziquantel in the organism I. Pharmacokinetics in animals. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1, 85-95.
- Steiner, K., Garbe, A., 1976b. The fate of praziquantel in the organism II. Distribution in rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1, 97-106.

- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6, 25-411.
- Sun, H., 1998. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications-Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *The Journal of Physical Chemistry B* 102, 7338-7364.
- Svenskaya, Y., Parakhonskiy, B., Haase, A., Atkin, V., Lukyanets, E., Gorin, D., Antolini, R., 2013. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophysical Chemistry* 182, 11-15.
- Szabo, A., Ostlund, N.S., 1996. Modern quantum chemistry. Introduction to advanced electronic structure theory, Dover Publications Inc., Mineola, New York.
- Takenaga, M., 1996. Application of lipid microspheres for the treatment of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 20, 209-219.
- Tang, B., Cheng, G., Gu, J.C., Xu, C.H., 2008. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today* 13, 606-612.
- Tang, S-J., Wu, R., Bhajjee, F., 2014. Zollinger–Ellison Syndrome. *Video Journal and Encyclopedia of GI Endoscopy* 1, 666-668.
- Tennant, C.B. y Berger, R.W., 1956. X-ray determination of dolomite-calcite ratio of carbonate rock. *American Mineralogist* 42, 23-29.
- Trastullo, R., Dolci, L.S., Passerini, N., Albertini, B., 2015. Development of flexible and dispersible oral formulations containing praziquantel for potential schistosomiasis treatment of pre-school age children. *International Journal of Pharmaceutics* 495, 536-550.
- Ueno, Y., Futagawa, H., Takagi, Y., Ueno, A., Mizushima, Y., 2005. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. *Journal of Controlled Release* 103, 93-98.

- Üner, M. y Yener, G., 2007. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. *International Journal of Nanomedicine* 2, 289-300.
- Utzinger, J. y Keiser, J., 2004. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 5, 85-263.
- Utzinger, J., N’Goran, E.K., Caffrey, C.R., Keiser, J., 2011. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. *Acta Tropica* 120, 37-121.
- Van Olphen, H., 1963. An introduction to clay colloid chemistry. Interscience, New York.
- Vergaro, V., Papadia, P., Leporatti, S., De Pascali, S.A., Fanizzi, F.P., Ciccarella, G., 2015. Synthesis of biocompatible polymeric nano-capsules based on calcium carbonate: A potential cisplatin delivery system. *Journal of Inorganic Biochemistry* 153, 284-292.
- Viseras, C., Meeten, G.H., López-Galindo, A., 1999. Pharmaceutical grade phyllosilicate dispersions: the influence of shear history on floc structure. *International Journal of Pharmaceutics* 182, 7-20.
- Viseras, C., Cerezo, P., Meeten, G.H., López-Galindo, A., 2001. One-dimensional filtration of pharmaceutical grade phyllosilicate dispersions. *International Journal of Pharmaceutics* 217, 201-213.
- Viseras, C., Aguzzi, C., Cerezo, P., López-Galindo, A., 2007. Uses of clay minerals in semisolid health care and therapeutic products. *Applied Clay Science* 36, 37-50.
- Viseras, C., Cerezo P., Sánchez, R., Salcedo, I., Aguzzi, C., 2010. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science* 48, 291-295.
- Wang, J., Chen, J-S., Zong, J-Y., Zhao, D., Li, F., Zhuo, R-X., Cheng, S-X., 2010. Calcium Carbonate/Carboxymethyl Chitosan Hybrid Microspheres and Nanospheres for Drug Delivery. *The Journal of Physical Chemistry C* 114, 18940-18945.

- Wang, L., Zheng, X., Fang, Y., Wang, Y., Duan, C., Yao, B., 2011. Transdermal evaporation delivery system of praziquantel for schistosomiasis japonicum chemotherapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100, 2769-2777.
- Wang, W., Wang, L., Liang, Y-S., 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology Research* 111, 1871-1877.
- Wang, J., Kong, Y., Liu, F., Shou, D., Tao, Y., Qin, Y., 2018. Construction of pH-responsive drug delivery platform with calcium carbonate microspheres induced by chitosan gels. *Ceramics International* 44, 7902-7907.
- Weaver, C.E., 1989. Clays, muds and shales. Elsevier, Amsterdam, Holland.
- Wegner, D.H., 1981. Trial designs for multicentre clinical studies of investigational phases I B to III with praziquantel. *Arzneimittel-Forschung* 31, 566-567.
- Whiting, S.J., Pluhator, M.M., 1992. Comparison of in vitro and in vivo tests for determination of availability of calcium from calcium carbonate tablets. *The Journal of the American College of Nutrition* 11, 553-560.
- WHO, 2017. 20th WHO Model List of Essential Medicines. Recuperado octubre 2018, http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/6th_EMLc2017.pdf.
- WHO, 2018. World Health Organization. Recuperado octubre 2018, <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2922e/3.8.1.html>.
- Wilkinson, G.R., 1997. The effects of diet, aging and disease-states on presystemic elimination and oral drug bioavailability in humans. *Advanced drug delivery reviews* 27, 129-159.
- Williams, H.D., Trevaskis, N.L., Charman, S.A., Shanker, R.M., Charman, W.N., Pouton, C.W., Porter, C.J.H., 2013. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological Reviews* 65, 315-499.
- Wilson, R.W., Millero, F.J., Taylor, J.R., Walsh, P.J., Christensen, V., Jennings, S., Grosell, M., 2009. Contribution of fish to the marine inorganic carbon cycle. *Science* 323, 359-362.

- Witzleb, R., Müllertz, A., Kanikanti, V.R., Hamann, H.J., Kleinebudde, P., 2012. Dissolution of solid lipid extrudates in biorelevant media. *International Journal of Pharmaceutics* 422, 116-124.
- Wu, W., Wang, W., Huang, Y.X., 2011. New insight into praziquantel against various developmental stages of schistosomes. *Parasitology Research* 109, 1501-1507.
- Wu, J.L., Wang, C.Q., Zhuo, R.X., Cheng, S.X., 2014. Multi-drug delivery system based on alginate/calcium carbonate hybrid nanoparticles for combination chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 123, 498-505.
- Xiao, S.H., Shen, B., Chollet, J., Utzinger, J., Tanner, M., 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *The Journal of Parasitology* 86, 1125-1132.
- Xiao, S.H., Keiser, J., Chollet, J., Utzinger, J., Dong, Y., Endriss, Y., Vennerstrom, J.L., Tanner, M., 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 1140-1145.
- Xie, S., Pan, B., Shi, B., Zhang, Z., Zhang, X., Wang, M., Zhou, W., 2011. Solid lipid nanoparticle suspension enhanced the therapeutic efficacy of praziquantel against tapeworm. *International journal of nanomedicine* 6, 2367-2374.
- Yang, L., Shao, Y., Han, H.K., 2014. Improved pH-dependent drug release and oral exposure of telmisartan, a poorly soluble drug through the formation of drug-aminoclay complex. *International journal of Pharmaceutics* 471, 258-263.
- Zanolla, D., Perissutti, B., Passerini, N., Chierotti, M.R., Hasa, D., Voinovich, D., Gigli, L., Demitri, N., Geremia, S., Keiser, J., Vioglio, P.C., Albertini, B., 2018a. A new soluble and bioactive polymorph of praziquantel. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 127, 19-28.

- Zanolla, D., Perissutti, B., Passerini, N., Invernizzi, S., Voinovich, D., Bertoni, S., Melegari, C., Millotti, G., Albertini, B., 2018b. Milling and comilling Praziquantel at cryogenic and room temperatures: Assessment of the process-induced effects on drug properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 153, 82-89.
- Zhang, H., Xu, Z.P., Lu, G.Q., Smith, S.C., 2010. Computer Modeling Study for Intercalation of Drug Heparin into Layered Double Hydroxide. *The Journal of Physical Chemistry C* 114, 12618-12629.
- Zhang, L., Zhu, W., Lin, Q., Han, J., Jiang, L., Zhang, Y., 2015. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin functionalized calcium carbonate microparticles as a potential carrier for enhancing oral delivery of water-insoluble drugs. *International Journal of Nanomedicine* 10, 3291-3302.
- Zhao, D., Zhuo, R-X., Cheng, S-X., 2012. Alginate modified nanostructured calcium carbonate with enhanced delivery efficiency for gene and drug delivery. *Molecular BioSystems* 8, 753-759.
- Zhao, Y., Luo, Z., Li, M., Qu, Q., Ma, X., Yu, S-H., Zhao, Y., 2015. A Preloaded Amorphous Calcium Carbonate/Doxorubicin@Silica Nanoreactor for pH-Responsive Delivery of an Anticancer Drug. *Drug Delivery* 54, 919-922.
- Zheng, X.S., Duan, C.Z., Xiao, Z.D., Yao, B.A., 2008. Transdermal delivery of praziquantel: Effects of solvents on permeation across rabbit skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 1045-1048.

Anexo 1. Publicaciones
adicionales no incluidas en la
Tesis Doctoral

- Borrego-Sánchez, A., Gómez-Pantoja, E., Morillo González, E., Undabeytia López, T., Sainz-Díaz, C.I., 2018. Adsorption of the tallow amine ethoxylate surfactant Ethomeen T/15 on montmorillonite. *Applied Clay Science* 161, 533-543.
- Borrego-Sánchez, A., Awad, M.E., Sainz-Díaz, C.I., 2018. Molecular Modeling of Adsorption of 5-Aminosalicylic Acid in the Halloysite Nanotube. *Minerals* 8, 61.
- Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., 2017. Use of Clays as Nanocarriers of First-Line Tuberculostatic Drugs. *Current drug delivery* 14, 902-903.
- Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., García-Villén, F., Sánchez-Espejo, R., Aguzzi, C., Viseras, C., Sainz-Díaz, C.I., Cerezo, P., 2017. Assessment of halloysite nanotubes as vehicles of isoniazid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 160, 337-344.
- Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., García-Villén, F., Sánchez-Espejo, R., Cerezo, P., Aguzzi, C., Viseras, C., 2018. Advanced Inorganic Nanosystems for Skin Drug Delivery. *The Chemical Record* 18, 891-899.
- Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., García-Villén, F., Sánchez-Espejo, R., Viseras, C., Cerezo, P., Aguzzi, C., 2018. Adsorption and characterization of palygorskite-isoniazid nanohybrids. *Applied Clay Science* 160, 180-185.
- Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., Sánchez-Espejo, R., García-Villén, F., Cerezo, P., Aguzzi, C., Viseras, C., 2018. Kinetic and thermodynamic assessment on isoniazid/montmorillonite adsorption. *Applied Clay Science* 165, 82-90.
- García-Villén, F., Sánchez-Espejo, R., Carazo, E., Borrego-Sánchez, A., Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., 2018. Characterisation of Andalusian peats for skin health care formulations. *Applied Clay Science* 160, 201-205.