



# Solubilidad de equilibrio usando el método de agitación de matraces saturados de JM-20: molécula sintética con acción neuroprotectora

[Equilibrium solubility using shake-flask method of JM-20: a synthetic molecule with neuroprotective action]

Luis O. Martínez Álvarez<sup>1\*</sup>, Pedro L. Alejo Cisneros<sup>1</sup>, Rinaldo Forte Mesa<sup>1</sup>, Livania Quiñones Hinojosa<sup>1</sup>, Abel Mondelo Rodríguez<sup>1</sup>, Lisandra García Borges<sup>1</sup>, Hugo Guerra Menéndez<sup>1</sup>, Ángela Tuero Iglesias<sup>1</sup>, Estael Ochoa Rodríguez<sup>2</sup>, Miguel A. Cabrera Pérez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ave 26, No. 1605, entre Boyeros y Puentes Grandes, C.P. 10600, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad de La Habana. Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, C.P. 10400, La Habana, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní Km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, C.P.54830, Cuba.

\*E-mail: [luis.martinez@cidem.cu](mailto:luis.martinez@cidem.cu)

## Abstract

**Context:** Drug solubility is one of the most important physicochemical properties for the development of new pharmaceutical products, which, in our study, is a new synthetic molecule, which has been shown to have a potential neuroprotective effect in rat.

**Aims:** To evaluate the equilibrium solubility of JM-20 within the physiological pH range and aqueous chemical stability.

**Methods:** It was performed at pH 1.2, 4.5 and 6.8 at  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  for 27 h by the method of the saturated flasks. HPLC and FTIR were used for the study of aqueous stability and to evaluate the molecular structure of the non-ionized fraction by DSC/TGA.

**Results:** Concentrations calculated at pH 1.2 were higher than at pH 4.5 and pH 6.8. A retention time greater than pH 4.5 and 6.8 after 24 h was detected in the aqueous stability study at pH 1.2, in addition to other peaks in these chromatograms. Analyses by FT-IR and DSC/TGA demonstrated the absence of polymorphism in the dissociated fraction of saturated solutions.

**Conclusions:** The JM-20 presented at 6 hours its maximum steady state of solubility, being inferior to pH 4.5 and 6.8. It is corroborated by the qualitative analysis by HPLC, that the compound is chemically unstable from 24 h to pH 4.5 and 6.8. By FT-IR and DSC/TG it was elucidated that the fractions of the molecule not dissociated, did not undergo structural changes in it, and it is inferred that there is no polymorphism.

**Keywords:** polymorphs; saturation shake-flask method; solubility.

## Resumen

**Contexto:** La solubilidad en fármacos es una de las propiedades fisicoquímicas más importantes para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos que, en nuestro estudio, se trata de una nueva molécula sintética que ha demostrado tener un efecto neuroprotector potencial en ratas.

**Objetivos:** Evaluar la solubilidad de equilibrio de JM-20 dentro del rango de pH fisiológico y la estabilidad química acuosa.

**Métodos:** Se realizó a pH 1,2; 4,5 y 6,8 a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  por 27 h por el método de los matraces saturados. Para el estudio de la estabilidad acuosa se empleó HPLC y FTIR y para evaluar la estructura molecular de la fracción no ionizada DSC/TGA.

**Resultados:** Las concentraciones calculadas a pH 1,2 fueron mayores que a pH 4,5 y pH 6,8. En el estudio de estabilidad acuosa a pH 1.2 se detectó un tiempo de retención mayor que a pH 4,5 y 6,8 después de las 24 h, además de detectarse otros picos en dichos cromatogramas. Los análisis por FT-IR y DSC/TGA demostraron la ausencia de polimorfismo en las fracciones no disociadas de las soluciones saturadas.

**Conclusiones:** El JM-20 presentó a las 6 horas su máximo estado estacionario de solubilidad, siendo inferiores a pH 4,5 y 6,8. Se corroboró por el análisis cualitativo por HPLC, que la molécula es inestable químicamente a partir de las 24 h a pH 4,5 y 6,8. Por FT-IR y DSC/TG se elucidó que las fracciones de la molécula no disociada no sufrieron cambios estructurales en ella, y se infiere que no hay polimorfismo.

**Palabras Clave:** matraces saturados; polimorfismos; solubilidad.

## ARTICLE INFO

Received: May 22, 2019.

Received in revised form: October 15, 2019.

Accepted: October 28, 2019.

Available Online: November 14, 2019.

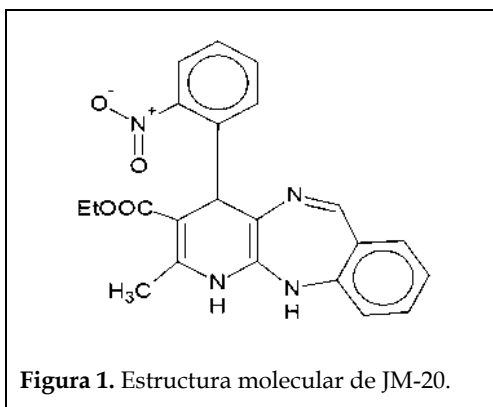
Declaration of interests: The authors declare no conflict of interest.

Funding: This research was not funded and did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.



## INTRODUCCIÓN

La molécula JM-20, 4-aryl-(2'-nitro)-3-carboniletoxi-2-metil-1,4-dihidropirido (2,3-b-5,6-e)-1,4-benzodiazepina (Fig. 1), es una nueva entidad híbrida formada por un anillo de dihidropiridina asociado covalentemente a una benzodiazepina [ACD/ChemSketch (2009) Version 12.01]. En estudios preclínicos, para distintos modelos de isquemia cortical focal activa inducidos en ratas, este compuesto demostró poseer efecto neuroprotector. Esta propiedad/actividad no se encontró en moléculas similares anteriormente obtenidas. El efecto neuroprotector frente a distintos modelos de isquemia cortical focal inducidos en ratas, estuvo asociado con propiedades antioxidantes, anticitotóxicas, ansiolíticas, antiinflamatorias y mitoprotectoras, y conducen a la realización de los ensayos clínicos (Reyes Verdecia et al., 2011; Núñez Figueredo et al., 2013; 2014a-c; 2015; 2016; Ramírez-Sánchez et al., 2015).



Teniendo en cuenta las potencialidades de JM-20, y como parte del desarrollo de la preformulación, se hace necesario la determinación de su solubilidad acuosa, por ser esta una de las propiedades fisicoquímicas fundamentales (Baka et al., 2008; Milani Zakeri et al., 2009; Clarysse et al., 2011), que influye en la velocidad de adsorción y en la biodisponibilidad oral de los fármacos, (Abolghasem et al., 2010; Savjani et al., 2012). Esta propiedad puede verse afectada por su estado físico (cristalino o amorfo) o por poseer formas polimórficas. Además de otros factores como, pH, temperatura, tamaño de partículas y polaridad

(Baka et al., 2008; Savjani et al., 2012; Prakash et al., 2014; Persky y Hughes, 2014; Raza et al., 2014; Kalepua y Nekkanti, 2015), sin obviar la velocidad de agitación empleada para lograr una mayor disociación, el tiempo de sedimentación y las variadas técnicas de separación (Baka et al., 2008; Takács-Novák et al., 2010; Censi y Di Martino, 2015; González Álvarez et al., 2015; Chaurasia, 2016).

Ante la posible formación de formas polimórficas en el método de agitación de los matraces saturados, es necesario estudiar las fracciones no disociadas en las soluciones acuosas, con el propósito de comprobar que la molécula objeto de estudio no ha sufrido transformación durante el estudio de la solubilidad (Brittain, 1997; Pudipeddi y Serajuddin, 2005; Avdeef, 2007), utilizando técnicas complementarias como FT-IR y DSC/TG, no empleadas en otros estudios anteriores de solubilidad.

Realizar previamente los estudios de solubilidad acuosa de un nuevo candidato farmacéutico, bajo condiciones de pH fisiológicos es de suma importancia, según lo avala desde el año 1995, el BCS (Amidon et al., 1995), para clasificar los API, ya que pueden modular la velocidad y cantidad absorbida de un candidato farmacéutico, a partir de formas farmacéuticas sólidas de administración oral (FDA, 2000; WHO, 2006).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la solubilidad acuosa de la molécula JM-20 a distintos valores de pH, que simularan el fluido gastrointestinal del cuerpo humano, empleando el tradicional método de agitación de los matraces saturados (Avdeef y Berger, 2000; Baka et al., 2008; González Álvarez et al., 2015) y determinar la estabilidad química de las soluciones saturadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras y reactivos químicos

JM-20 como Sustancia de Referencia Química (SRQ), obtenido por vía sintética en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana y tres lotes, como

muestras de ensayo obtenidas igualmente por vía sintética en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Todas con una pureza de acuerdo a las recomendaciones de las ICH (ICH Q6A, 1999).

Para la preparación de las soluciones saturadas que se emplearon en el presente estudio de solubilidad fue necesaria la preparación de tres soluciones amortiguadoras (USP, 2016):

Solución amortiguadora ácida (pH 1,2): Mezcla de 250,0 mL de cloruro de potasio 0,2 M con 425,0 mL ácido clorhídrico 0,2 M en 1000 mL de agua destilada, exenta de dióxido de carbono.

Solución amortiguadora de acetato (pH 4,5): Mezcla de 2,99 g de acetato de sodio trihidrato con 14,0 mL de ácido acético 2 N en 1000 mL de agua destilada, exenta de dióxido de carbono.

Solución amortiguadora de fosfato (pH 6,8): Mezcla de 112,0 mL de hidróxido de sodio 0,2 M con 250,0 mL de fosfato de potasio monobásico 0,2 M en 1000 mL de agua destilada, exenta de dióxido de carbono.

Todos los reactivos usados en la preparación de las soluciones amortiguadoras fueron de calidad analítica, marca Merck. El agua destilada que se empleó fue de alta pureza.

### Estudio de solubilidad

Para este estudio, por el método de agitación de los matraces saturados (Higuchi y Connors, 1965; González Álvarez et al., 2015), se adicionó un exceso de JM-20 en recipientes de 50 mL hasta lograr la saturación de las soluciones a pH 1,2; 4,5 y 6,8, respectivamente. Dichas soluciones saturadas se colocaron en un baño de agua Grant OLS200 37°C ± 1°C a 120 rpm por 27 h y de cada una se tomaron alícuotas de 5,0 mL a distintos intervalos tiempos (1, 2, 3, 4, 6, 24 y 27 h) y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. Las partes sobrenadantes se extrajeron cuidadosamente y se diluyeron en matraces aforados de 10 mL y se les determinó las absorbancias usando un espectrofotómetro GENESYS 10S Series UV-VIS a 262 nm en celdas de 1 cm de paso óptico.

Paralelamente se prepararon tres soluciones madres con la SRQ en cada uno de los medios, a concentraciones de 0,03956 mg/mL (pH 1,2); 0,02415 mg/mL (pH 4,5) y 0,03124 mg/mL (pH 6,8). Todas las pesadas se realizaron en una microbalanza MX5 Mettler Toledo. A estas soluciones madres se le proporcionó igual tratamiento que a las soluciones saturadas. A partir de ellas, se prepararon las soluciones patrones para lo que se tomaron alícuotas de 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 y 9,0 mL, se diluyeron en matraces de 10 mL, y se les midió las absorbancias a la misma longitud de onda, que se leyeron las soluciones saturadas y por último se graficaron las curvas de calibración. Las concentraciones de JM-20 de cada solución saturada se determinaron por interpolación en las curvas de calibración. Las mediciones se realizaron por triplicado.

El por ciento de ionización del nuevo candidato farmacéutico se calculó basado en la ecuación de Henderson-Hasselbalch [ec. 1] (Henry y Senozan, 2001; Hamed et al., 2016):

$$I = 100 / (1 + \text{antilog}(\text{pH} - \text{pKa})) \quad [1]$$

Donde:

I- porcentaje ionización en las soluciones saturadas; pH- valor del medio de disolución; pKa- logaritmo negativo de la constante de disociación (Ka).

El pKa (Manallack, 2007) se determinó previamente por medio de valoraciones potenciométricas, y se empleó como sustancia valorante hidróxido de sodio 0,1 N, previa disolución de la molécula de JM-20 en dimetilsulfóxido.

### Estudio de estabilidad química por HPLC

Para este estudio cualitativo, se mantuvieron las soluciones saturadas en el baño de agua con agitación durante 48 h a 37 ± 1°C. A tiempo cero, 24 y 48 h, se extrajeron las partes acuosas, se centrifugaron, se filtraron y se inyectaron 20 µL de cada parte del sobrenadante. Para llevar a cabo las corridas, se empleó un HPLC AZURA, constituido por una bomba analítica cuaternaria AZURA P 6.1L con degasificador, un muestreador automático 3950, Horno CT 2.1, un detector diode-array 6.1L, una columna analítica VertexPlus 5 x µm 250

x 4,6 mm Eurospher 100-5 C18 y una fase móvil desgasificada compuesta por acetonitrilo-ácido fórmico al 1%, (60:40, v/v) a un flujo 1 mL/min. La temperatura del horno fue de 35°C y las corridas se realizaron a 262 nm.

### Análisis por FT-IR de la fracción no disociada

Una vez filtradas las soluciones saturadas, las fracciones sólidas remanentes no disueltas, se secaron en una estufa al vacío por 2 h, para su análisis por FT-IR e identificación de los grupos funcionales característicos de la molécula y su posterior comparación con un espectro de referencia. El espectrofotómetro empleado para el análisis fue el Mattson Instruments Genesys II FT-IR, para lo cual se prepararon pastillas con las fracciones secas y bromuro de potasio (calidad espectroscópica-Merck). El espectro infrarrojo se realizó en un rango de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

### Análisis por DSC/TGA de la fracción no disociada. Solubilidad.

Una característica que muestra el JM-20 es que no presenta una transición física de fusión, sino que a una temperatura de aproximadamente 245°C presenta una transición química exotérmica con significativa pérdida de masa, que demuestra la descomposición de la sustancia.

Por tanto, las fracciones sólidas remanentes no disueltas se analizaron por DSC para la corroboración de la temperatura de descomposición de la molécula de JM-20. Para ello se empleó el calorímetro NETZSCH STA 449 F3 Jupiter, previamente, calibrado con una muestra patrón de Indium de una pureza de 99,999%. El barrido se realizó en un rango de calentamiento desde 50°C hasta 300°C a una velocidad de calentamiento de 4°/min. Las muestras de ensayos se colocaron en crisoles de aluminio de alta pureza y se sellaron con su tapa correspondiente para la realización del barrido.

### Análisis estadístico

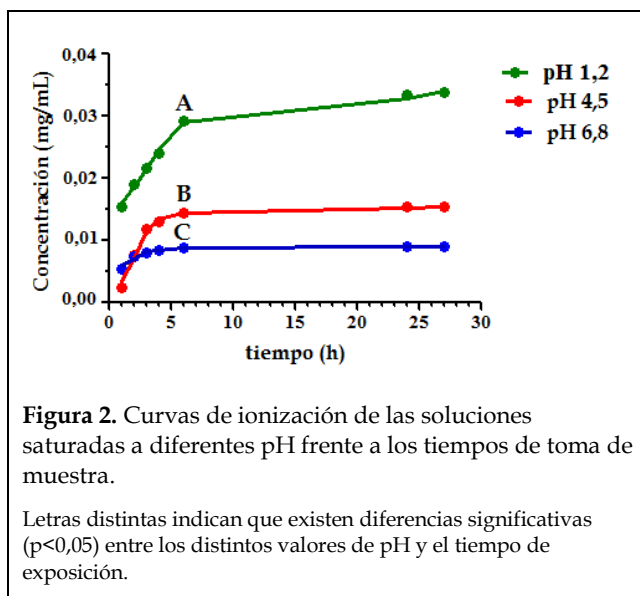
El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism version 5.01 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California, USA). Los datos se expresaron como media  $\pm$  error

estándar de la media (ESM) y se analizaron por ANOVA (análisis de varianza de una vía). Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las curvas de calibración construidas para determinar la concentración de la ionización de JM-20 en las soluciones saturadas, presentaron valores de coeficientes de regresión de 0,9988 (pH 1,2); 0,9903 (pH 4,5); 0,9941 (pH 6,8).

En la Fig. 2 se observan las curvas correspondientes a la determinación de las concentraciones de ionización a distintos tiempos de experimentación y valores de pH (pH 1,2; A = 0,02932 mg/mL; pH 4,5; B = 0,01448 mg/mL; pH 6,8; C = 0,00890 mg/mL) observándose que, a las 6 h, comienza a mantenerse casi constante las concentraciones de ionización de la molécula.



En la Fig. 3 se muestra el promedio alcanzado de las distintas concentraciones de ionización de JM-20 a los distintos valores de pH estudiados (pH 1,2; A = 0,02520  $\pm$  0,002700 mg/mL; pH 4,5; B = 0,01146  $\pm$  0,001817 mg/mL; pH 6,8; C = 0,008082  $\pm$  0,0004864 mg/mL), teniendo su mayor concentración a pH 1,2.

Según la clasificación de solubilidad que se reporta en la farmacopea USP, JM-20 es práctica-

mente insoluble en agua. No obstante, se determinó *in silico* (ChemAxon, 2017), la solubilidad de dicha molécula, la cual arrojó un resultado inferior a 0,01 mg/mL, corroborando este resultado con el obtenido según las recomendaciones de la farmacopea consultada para el ensayo de solubilidad.

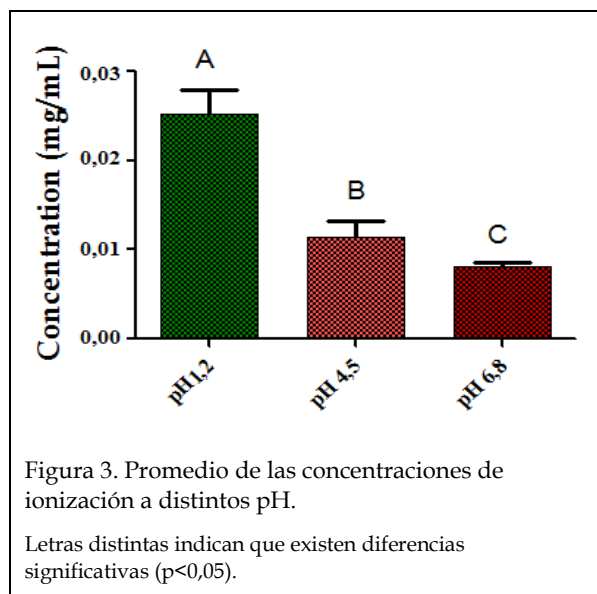


Figura 3. Promedio de las concentraciones de ionización a distintos pH.

Letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La constante de disociación ( $pK_a$ ) de esta molécula se determinó previamente *in silico* (ChemAxon, 2017) dando como resultado un valor de 5,03 y experimentalmente mediante valoración potenciométrica de 5,25. Por medio de este valor experimental y los valores de pH de los medios empleados, fue posible determinar los por ciento de ionización y no ionización de la molécula (Tabla 1).

Tabla 1. Por ciento de la fracción ionizada y no ionizada de JM-20 a varios valores de pH.

pH	Fracción ionizada (%)	Fracción no ionizada (%)
1,2	99,99	0,10
4,5	84,90	15,10
6,8	2,74	97,26

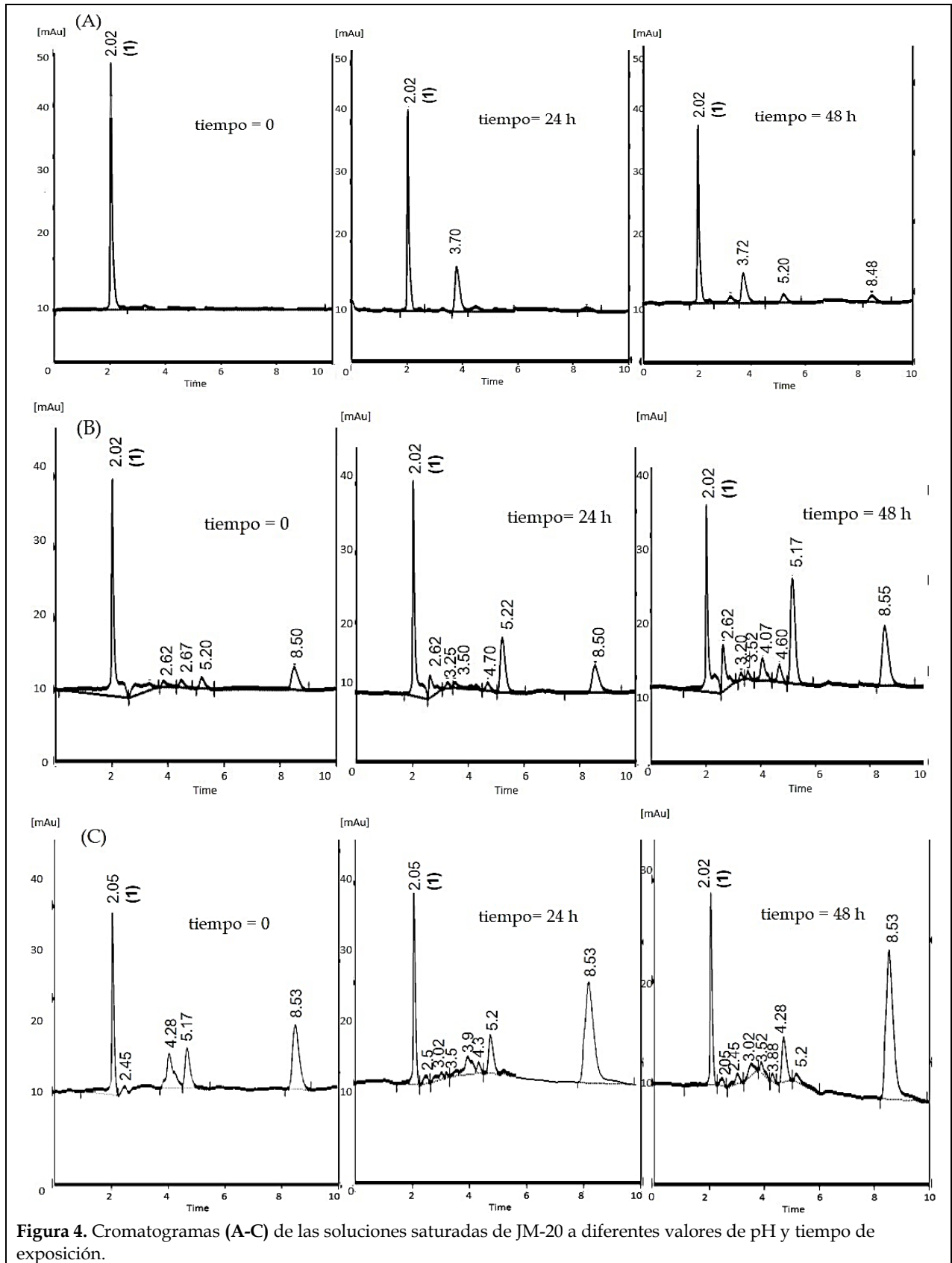
Por tanto, a un pH 6,8 con un 97,26 % de no-ionización, hace que se favorezca más el paso de esta fracción por difusión pasiva por las membra-

nas lipídicas. La fracción ionizada, a pH 4,5 y 6,8, poseen una escasa solubilidad en lípidos, por lo que no puede atravesar las membranas lipídicas celulares o lo haría escasamente.

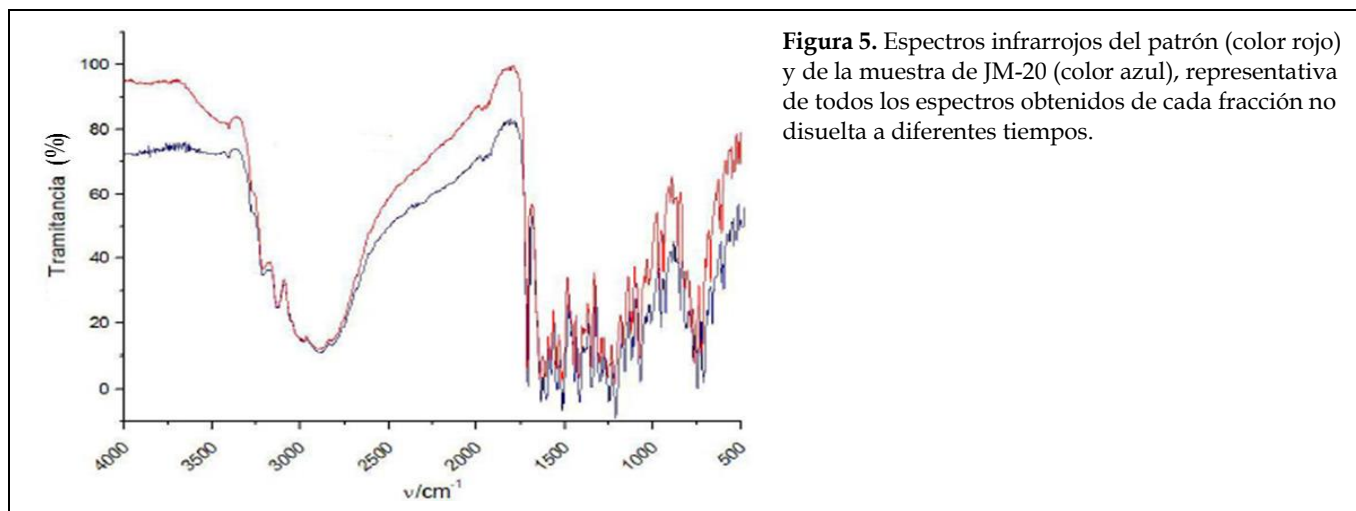
Las Figs. 4A-C representan los cromatogramas obtenidos por HPLC de las soluciones saturadas a distintos valores de pH a una temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . En dichos cromatogramas se puede observar que a pH 4,5 y 6,8 comienzan las detecciones de nuevos picos, por lo que se infiere que las soluciones comienzan a degradarse, siendo más significativas a este último pH. Sin embargo, el tiempo de retención de JM-20 es el mismo, y solo se observa una disminución de las áreas correspondientes, por lo que se deduce que aún no ha sufrido cambios en su estructura química.

Por FT-IR se analizó cada parte no disociada de la molécula de las soluciones saturadas y se comparó con su espectro de referencia, observándose en todos los espectros de absorción infrarroja, que las bandas principales se corresponden con el de la referencia. En dichos espectros, se observaron las vibraciones correspondientes a cada uno de los grupos funcionales característicos de la molécula. Se detectó una banda ancha cerca de  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de valencia de los grupos NH; la banda característica del grupo carbonilo presente en la molécula a  $1690\text{ cm}^{-1}$ , así como la presencia del grupo nitró ( $\text{NO}_2$ ) a partir de la presencia de las bandas simétricas (vs) y antisimétricas (vas) características de este (bandas características  $3410\text{ cm}^{-1}$ , v NH;  $1690\text{ cm}^{-1}$ , v C=O;  $1600$ ,  $1570\text{ cm}^{-1}$  (patrón aromático);  $1548\text{ cm}^{-1}$  vs  $\text{NO}_2$ ;  $1353\text{ cm}^{-1}$  vs  $\text{NO}_2$ ) (Fig. 5). La detección de nuevas bandas, ni corrimientos significativos de picos y su analogía con el espectro de referencia, expresa que no ocurrieron cambios estructurales y demuestra la no transformación polimórfica.

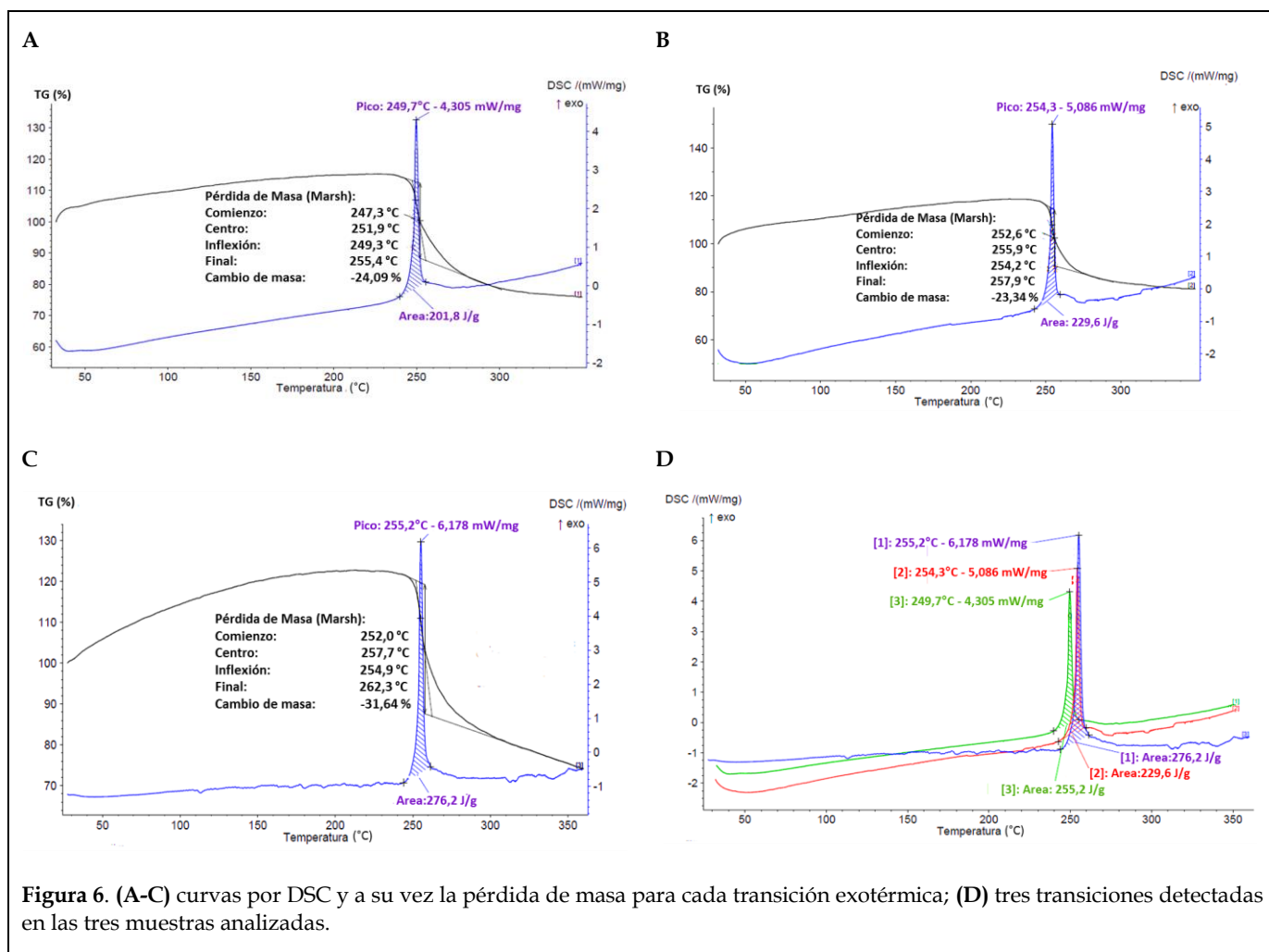
Por DSC (Fig. 6) se corroboró la descomposición que sufre la fracción no disociada obtenida durante el estudio de solubilidad de JM-20 en un intervalo de temperatura entre  $247 - 252^\circ\text{C}$ , con pérdidas de masas de 24,09; 23,34 y 31,64%, respectivamente.



**Figura 4.** Cromatogramas (A-C) de las soluciones saturadas de JM-20 a diferentes valores de pH y tiempo de exposición.



**Figura 5.** Espectros infrarrojos del patrón (color rojo) y de la muestra de JM-20 (color azul), representativa de todos los espectros obtenidos de cada fracción no disuelta a diferentes tiempos.



**Figura 6.** (A-C) curvas por DSC y a su vez la pérdida de masa para cada transición exotérmica; (D) tres transiciones detectadas en las tres muestras analizadas.

Como una característica de esta molécula de no presentar una transición física de fusión, sino una descomposición, se infiere que la estructura mole-

cular de JM-20 en la fracción no disociada mantiene dicha transición química. Con este resultado

también se descarta la aparición de formas polimórficas.

---

## CONCLUSIONES

---

Este estudio comprobó la poca solubilidad acuosa de JM-20, siendo más propensa a solubilizarse a pH ácido, la cual se hace más significativa en el resto de los pH estudiados y paralelamente a esto, se corroboró una creciente inestabilidad acuosa a esos mismos valores de pH por el análisis cualitativo realizado por HPLC. Sin embargo, el pico correspondiente a JM-20, se mantiene a los mismos tiempos de retención en todos los cromatogramas, lo cual indica que la molécula, a pesar de su inestabilidad acuosa, no sufre cambios estructurales, por lo que se descarta el fenómeno de polimorfismo de la molécula en las soluciones saturadas. Por FT-IR y DSC/TG se corroboró que, en la fracción sólida de la molécula no disociada en los distintos medios empleados, no se detectaron cambios estructurales de la molécula estudiada, incluso, a pesar de haberla sometida a un régimen de calentamiento por estas dos últimas técnicas, por lo que también se infiere que no se presentó el fenómeno de polimorfismo en dicha fracción sólida.

---

## CONFLICTO DE INTERÉS

---

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

---

## AGRADECIMIENTOS

---

A los autores les gustaría agradecer a las doctoras en ciencias Laura García-Pupo y Vivian Montero, del Centro de Investigación y Desarrollo Farmacéutico, de la Habana, por revisar críticamente este manuscrito.

---

## REFERENCIAS

---

- Abolghasem J (2010) Handbook of solubility data for pharmaceuticals. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis Group, LLC.
- ACD/ChemSketch (2009) Version 12.01. <http://www.acdlabs.com> [Consulted December 15, 2010].
- Amidon GL, Lennernas H, Shah V P, Crison JR (1995) A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res* 12(3): 413–420.

- Avdeef A (2007) Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv Drug Deliver Rev* 59: 568–590.
- Avdeef A, Berger CM (2000) pH-metric solubility 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. *Pharm Res* 17: 85–89.
- Baka E, Comerb JEA, Takács-Novák K (2008) Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. *J Pharm Biomed Anal* 46: 335–341.
- Brittain HG (1997) Spectral methods for the characterization of polymorphs and solvates. *J Pharm Sci* 86: 405–411.
- Censi R, Di Martino P (2015) Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs. *Molecules* 20: 18759–18776.
- Chaurasia G (2016) A review on pharmaceutical preformulation studies in formulation and development of new drug molecules. *Int J Pharm Sci Res* 7(6): 2313–2320.
- ChemAxon Aqueous Solubility Predictor (2017) Version 17.2.13.0, <http://www.chemaxon.com> [Consulted February 2017].
- Clarysse S, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Augustijns P (2011) Drug solubility estimation based on simulated intestinal fluids: Comparison with solubility in human intestinal fluids. *Eur J Pharm Sci* 43(4): 260–269.
- FDA - U. S. Department of Health and Human Services (2000) FDA Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, U.S.A. <http://www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.html>. [Consulted January 29, 2018].
- González Álvarez I, Cabrera Pérez MÁ, Bermejo Sanz MV (2015) Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos, España: Editorial de la Universidad Miguel Hernández.
- Hamed R, Awadallah A, Sunoqrot S, Tarawneh O, Nazzal S, AlBaraghthi T, Al Sayyad J, Abbas A (2016) pH-dependent solubility and dissolution behavior of carvedilol – case example of a weakly basic BCS class II drug. *AAPS PharmSciTech* 17(2): 418–426.
- Henry NP, Senozan NM (2001) The Henderson-Hasselbalch equation: Its history and limitations. *J Chem Educ* 78(11): 1499.
- Higuchi T, Connors KA (1965) Phase-solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum* 4: 117–212.
- ICH Q6A Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances, Current Step 4 version dated 6 October 1999. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> [Consulted: September 25, 2018].



- Kalepua S, Nekkanti V (2015) Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B* 5(5): 442–453.
- Manallack DT (2007) The pKa distribution of drugs: Application to drug discovery. *Perspect Medicin Chem* 1: 25–38.
- Milani Zakeri P, Barzegar Jalali M, Azimi M, Valizadeh H (2009) Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. *Eur J Pharm Biopharm* 73(1): 102–106.
- Núñez Figueredo Y, Ochoa Rodríguez E, Verdecia Reyes Y, Carrillo Dominguez, Lagarto Parra A, Ramirez Sánchez, Delgado Hernández, Porto Verdecia, Pardo Andreu GL (2013) Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20 a novel benzodiazepine–dihydropyridine hybrid molecule. *Neurol Res* 35(8): 804–812.
- Núñez Figueredo Y, Pardo Andreu GL, Oliveira Loureiro S, Ganzella M, Ramirez Sánchez J, Ochoa Rodríguez, E, Verdecia Reyes Y, Delgado Hernández, R, Souza DO (2015) The effects of JM-20 on the glutamatergic system in synaptic vesicles, synaptosomes and neural cells cultured from rat brain. *Neurochem Int* 81: 41–47.
- Núñez Figueredo Y, Pardo Andreu GL, Ramirez Sánchez J, Delgado Hernández R, Ochoa Rodríguez E, Verdecia Reyes Y, Naald Z, PastorisMullere A, ValmorPortelae L, Souza DO (2014a) Antioxidant effects of JM-20 on rat brain mitochondria and synaptosomes: Mitoprotection against Ca<sup>2+</sup>-induced mitochondrial impairment *Brain Res Bull* 109: 68–76.
- Núñez Figueredo Y, Ramirez Sánchez J, Gisele Hansel GL, Pardo Andreu NM, Aparicio G, Delgado Hernández, R, García Pupo L, Ochoa Rodríguez E, Verdecia Reyes Y, O.Souza D (2016) Therapeutic potential of the novel hybrid molecule JM-20 against focal cortical ischemia in rats. *J Pharm Pharmacogn Res* 4(4): 153–158.
- Núñez Figueredo Y, Ramirez Sánchez J, Hansel G, Simões Pires EN, Valdés OMN, Delgado Hernández R, Parra AL, Ochoa Rodríguez E, Verdecia Reyes Y, Salbego C, Costa SL, Souza DO, Pardo Andreu GL (2014b) A novel multi-target ligand (JM-20) protects mitochondrial integrity, inhibits brain excitatory amino acid release and reduces cerebral ischemia injury *in vitro* and *in vivo*. *Neuropharmacology* 85: 517–527.
- Núñez Figueredo Y, Ramirez Sánchez, Delgado Hernández R, Porto-Verdecia M, Ochoa Rodríguez E, Verdecia Reyes Y, Marin Prida J, González Durruthy MA, Uyemura S, Rodrigues F, Curti C, Souza D, Pardo Andreu GL (2014c) JM-20, A novel benzodiazepine–dihydropyridinehybridmolecule, protects mitochondria and preventsischemicinsult-mediated neural celldeath *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 726: 57–65.
- Persky AM, Hughes JA (2014) Solutions and solubility. <http://www.cop.ufl.edu/safezone/prokai/pha5100/pha5110.html> [Consulted November 15, 2014].
- Prakash K, Jieun R, Hyeongmin K, Iksoo K, Jeong Tae K, Hyunil K, Jae Min Cho, Gyiae Y, Lee J (2014) Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J Pharm* 9: 304–316.
- Pudipeddi M, Serajuddin ATM (2005) Trends in solubility of polymorphs. *J Pharm Sci* 94: 929–939.
- Ramírez-Sánchez J, Simões-Pires EN, Núñez-Figueredo Y, Pardo-Andreu GL, Fonseca LA, Ruiz-Reyes A, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Delgado-Hernández R, Souza DO, Salbego C (2015) Neuroprotection by JM-20 against oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices: Involvement of the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. *Neurochem Int* 90: 215–223.
- Raza K, Kumar P, Ratan S, Malik R, Arora S (2014) Polymorphism: The phenomenon affecting the performance of Ddrugs. *SOJ Pharm Pharm Sci* 1(2): 10.
- Reyes Verdecia Y, Rodríguez Ochoa E, Reyes Ruiz A, Figueredo Núñez, Carillo Domínguez C, Tacoronte Morales JE, Alba Gutiérrez LL, Pardo Andreu GL (2011) Sistemas tricíclicos y tetracíclicos con actividad sobre el sistema nervioso central y vascular, CU Patent No. WO 2011041989 A2, Abril.
- Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK (2012) Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm* 2012: 195727.
- Takács-Novák K (2010) Solubility -pH profile of drugs. Experiences and surprises in Experiences and surprises in logS measurements. *PhysChem FORUM* 9, September 17, Barcelona.
- USP - United States Pharmacopeia 39, National Formulary 34 (USP-NF) (2016) Buffer Solutions, vol. 1, Rockville, USA.
- WHO - World Health Organization (2006) WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Who Technical Report Series, fortieth report, Geneva, Annex 7, pp. 358–413.

**AUTHOR CONTRIBUTION:**

Contribution	Martínez LO	Alejo P	Forte R	Quiñones L	Mondelo A	García L	Guevara H	Tuero A	Ochoa E	Cabrera MA
Concepts or ideas	x									x
Design	x									x
Definition of intellectual content	x									x
Literature search	x									x
Experimental studies	x	x	x	x	x	x	x		x	
Data acquisition	x									x
Data analysis	x				x	x		x		x
Statistical analysis	x									
Manuscript preparation	x									
Manuscript editing										
Manuscript review	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

**Citation Format:** Martínez LO, Alejo P, Forte R, Quiñones L, Mondelo A, García L, Guevara H, Tuero A, Ochoa E, Cabrera MA (2020) Solubilidad de equilibrio usando el método de agitación de matraces saturados de JM-20: molécula sintética con acción neuroprotectora. [Equilibrium solubility using shake-flask method of JM-20: a synthetic molecule with neuroprotective action]. J Pharm Pharmacogn Res 8(2): 117-126.