

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDOS DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE RMN NO ESTADO SÓLIDO**

Lyege Magalhães Oliveira*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

O48es

Oliveira, Lyege Magalhães.

Estudos de sólidos farmacêuticos através das técnicas de RMN no estado sólido / Lyege Magalhães Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

113 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Polimorfismo (Cristalografia). 2. Química do estado sólido. 3. Ressonância magnética nuclear. I. Título.

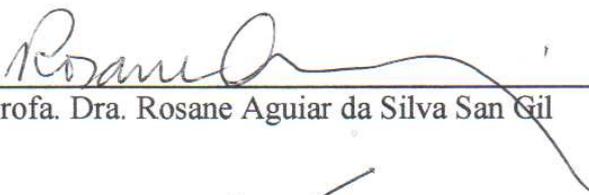
CDD: 548.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado da candidata **Lyege Magalhães Oliveira**, realizada em 11 de julho de 2014:*



Prof. Dr. Tiago Venâncio



Profa. Dra. Rosane Aguiar da Silva San Gil



Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira



Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro



Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira

Dedico este trabalho
aos meus pais, Cleber
e Marli, e ao meu
esposo Eduardo.

*Quem obtém sabedoria ama-se
a si mesmo; quem acalenta o
entendimento prospera.*

Provérbios 19:8

AGRADECIMENTOS

A **Jesus Cristo**, meu Amado Redentor.

Ao prof. Dr. Tiago Venâncio pela orientação, ajuda e ensinamentos transmitidos durante esses anos de doutorado.

Ao Prof. Dr Antonio Gilberto Ferreira pelo apoio.

À Dra Maria da Paz Lima (INPA) por acreditar e incentivar sempre.

Aos técnicos do laboratório de RMN, Paulo e Luciana, por toda ajuda e momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório de RMN, Clayton, Darlene, Elenilson, Lorena, Nazish, Sérgio, Sheraz, Tatiana, Tatielih, Thayana e Valéria, pelo excelente convívio e ajuda oferecida sempre que necessário.

Aos amigos dos laboratórios de Produtos Naturais e de Síntese de Produtos Naturais por todo o auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Javier Ellena e à Dra. Cristiane Cabral de Melo pela obtenção dos dados de cristalografia.

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues Camargo pelos experimentos de DRXP e Raman

Ao Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva pelos experimentos de DSC e valiosas discussões de resultados.

Ao Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira pela disposição em ajudar sempre, tanto com a estrutura do laboratório que coordena, como com seus conhecimentos.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química da UFSCar pelos valiosos ensinamentos.

Aos meus pais Cleber e Marli pelo amor, orientação e apoio dedicados.

Ao meu irmão Luciano, cunhada Jammily e seus lindos filhos Julianna e Leandro, pelo amor.

Ao meu esposo Edu pelo imenso amor, companheirismo, amizade, paciência e carinho, sem os quais seria muito difícil conseguir.

Aos amigos de Manaus e de São Carlos pela torcida.

Aos amigos da Comunidade Cristã Missão Atos, minha família em São Carlos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

LISTA DE ABREVIATURAS

γ	Constante magnetogírica
ω	Frequência de precessão
AMF	Ácido micofenólico
AQ	Tempo de aquisição
B_0	Campo magnético principal
CP	Polarização cruzada (<i>Cross polarization</i>)
CP-MAS	<i>Cross Polarization Magic Angle Spinning</i>
CP-PI	<i>CP - combined with Polarization Inversion</i>
CP-TOSS	<i>CP - Total Suppression of Sidebands</i>
CP-TOSS-NQS	<i>CP-TOSS - Non Quaternary Suppression</i>
CW	<i>Continuos-wave</i>
DRIFTS	<i>Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy</i>
DRXM	Difração de raios X por monocristal
DRXP	Difração de raios X por pó
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
d1	Tempo de espera
D20	Tempo de defasamento dipolar
DEC	Dietilcarbamazina
FSLG HETCOR	<i>Frequency Switched Lee-Goldburg HETeronuclear CORrelation</i>
HPPD	Desacoplamento de alta potência (<i>High-power proton decoupling</i>)
Hz	Hertz
IND	Indústria
IV	Infravermelho
LB	<i>Line-broadening</i>
M	Massa molar
MAS	Giro em torno do ângulo mágico (<i>Magic-Angle Spinning</i>)
MBZ	Mebendazol
MBZA	Mebendazol - forma polimórfica A
MBZC	Mebendazol - forma polimórfica C
MMF	Micofenolato de mofetila
ns	Número de promediações

p15	Duração do pulso de contato
p16	Pulso de inversão
p3	Duração do pulso de 90° no canal do ¹ H
QSINE	Função de apodização seno quadrado
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear bidimensional
SUS	Sistema Único de Saúde
SW	Janela espectral
T ₂ *	Relaxação transversal
TD	Número de pontos do domínio de tempo
T1	Tempo de relaxação longitudinal
T _{1ρ}	Tempo de relaxação longitudinal no referencial rotativo
t _c	Tempo de contato
TGA	Termogravimetria
TPPM	<i>Two-pulse phase-modulated</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1-	Constante magnetogírica dos núcleos de ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P e ^{29}Si	15
TABELA 3.1-	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos qualitativos de ^{13}C -RMN 1D ^{A,B} para o mebendazol nas formas A e C	45
TABELA 3.2 -	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR para o mebendazol nas formas A e C	46
TABELA 3.3 -	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos ^{13}C -RMN 1D ^{A,B} para a DEC livre, DEC citrato e DEC maleato.....	48
TABELA 3.4 -	Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos ^{13}C -RMN 1D ^A para o ácido micofenólico e o micofenolato de mofetila.....	50
TABELA 4.1 -	Valores de distância interbasal (ou interplanar) para os picos analisados dos polimorfos A e C do mebendazol.....	53
TABELA 4.2 -	Deslocamento químico de ^{13}C -CP-TOSS dos polimorfos A e C do mebendazol.	62
TABELA 4.3 -	Polimorfos encontrados nas amostras comerciais do mebendazol.	68
TABELA 4.4 -	Deslocamentos químicos de ^{13}C -CPTOSS da DEC livre e DEC citrato.	78
TABELA 4.5 -	Deslocamentos químicos de ^{13}C -CP-TOSS da DEC livre e DEC maleato.....	88
TABELA 4.6 -	Deslocamentos químicos de ^{13}C do Ácido Micofenólico, atribuídos através dos experimentos unidimensionais (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CP-PI-TOSS).	95
TABELA 4.7 -	Deslocamento químico de ^{13}C -CP-TOSS do Ácido Micofenólico.....	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 -	Curvas genéricas que ilustram a biodisponibilidade de um fármaco em três condições diferentes.....	3
FIGURA 1.2 -	Esquema das possíveis formas cristalinas de um composto químico.....	6
FIGURA 1.3 -	Ilustração de polimorfismo e pseudopolimorfismo.....	6
FIGURA 1.4 -	Micrografias das formas I (a) e II (b) do ritonavir.....	7
FIGURA 1.5 -	Espectros de RMN de ^{13}C -CP-MAS para as duas formas da cloridrato de ranitidina.....	11
FIGURA 1.6 -	Sinais referentes aos deslocamentos anisotrópicos (a), resultando em um intenso alargamento de linha (b).....	14
FIGURA 1.7 -	O amostrador inserido no ângulo mágico. $\theta = 54,7^\circ$ em relação ao campo magnético externo (B_0).....	18
FIGURA 1.8 -	Frequências de precessão para os núcleos de ^1H e ^{13}C quando submetidos ao mesmo campo magnético (a). A transferência de polarização ocorre quando as frequências de precessão são igualadas (b).....	20
FIGURA 1.9 -	Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-MAS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc.....	23
FIGURA 1.10 -	Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-TOSS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc.....	24
FIGURA 1.11 -	Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-TOSS-NQS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc.....	26
FIGURA 1.12 -	(a) Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-PI-TOSS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc. (b) Ordem de relaxação no referencial rotatório dos diferentes tipos de carbono.....	27
FIGURA 1.13 -	Diagrama representativo da sequência de pulso para a determinação de T_1^{H} para amostras no estado sólido.....	28
FIGURA 1.14 -	Ilustração vetorial do comportamento da magnetização durante o experimento de determinação indireta de T_1^{H} , via CP-MAS.....	29

FIGURA 1.15 - Diagrama representativo da sequência de pulsos para o experimento bidimensional $^1\text{H-X}$ FSLG HETCOR, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc.....	31
FIGURA 1.16 - Estrutura do composto mebendazol.....	32
FIGURA 1.17 - Cella unitária da forma A do mebendazol.....	33
FIGURA 1.18 - Cella unitária da forma C do mebendazol.....	34
FIGURA 1.19 - Estruturas da (a) DEC livre (b) DEC citrato e (c) DEC maleato.....	35
FIGURA 1.20 - Unidade assimétrica da (a) DEC livre em $-123\text{ }^\circ\text{C}$ e (b) DEC citrato em $20\text{ }^\circ\text{C}$	36
FIGURA 1.21 - Unidade assimétrica da DEC maleato.....	36
FIGURA 1.22 - Estrutura do Ácido Micofenólico (AMF).....	37
FIGURA 1.23 - Estrutura do Micofenolato de mofetila (MMF).....	37
FIGURA 1.24 - Cella unitária do ácido micofenólico.....	38
FIGURA 1.25 - Unidade assimétrica do micofenolato de mofetila.....	38
FIGURA 4.1 - Difratograma de raios X das formas A e C do mebendazol....	54
FIGURA 4.2 - Espectros de FT-Raman das formas A e C do mebendazol..	54
FIGURA 4.3 - Espectros de (a) ^{13}C -CP-MAS e (b) ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol A.....	56
FIGURA 4.4 - Espectros de (a) ^{13}C -CP-MAS e (b) ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol C.....	56
FIGURA 4.5 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol (a) C e (b) A.....	58
FIGURA 4.6 - Estruturas cristalinas do mebendazol A e C.....	58
FIGURA 4.7 - Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares do mebendazol A.....	59
FIGURA 4.8 - Ligações de hidrogênio não-clássicas presentes no mebendazol C.....	59
FIGURA 4.9 - Ligações de hidrogênio clássicas presentes no mebendazol C.....	59
FIGURA 4.10 - Espectros de RMN de ^{13}C do mebendazol A. (a) CP-TOSS-NQS - d20: $120\text{ }\mu\text{s}$ e (b) CP-TOSS.....	61
FIGURA 4.11 - Espectros de RMN de ^{13}C do mebendazol C. (a) CP-TOSS-NQS - d20: $120\text{ }\mu\text{s}$ e (b) CP-TOSS.....	61
FIGURA 4.12 - Espectros de ^{15}N -CP-MAS do mebendazol (a) A e (b) C.....	63

FIGURA 4.13 - Possíveis tautômeros presentes no MBZA.....	63
FIGURA 4.14 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o mebendazol A, utilizando a técnica HETCOR.....	64
FIGURA 4.15 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o mebendazol C, utilizando a técnica HETCOR.....	65
FIGURA 4.16 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol A em diferentes temperaturas.....	66
FIGURA 4.17 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol C em diferentes temperaturas.....	66
FIGURA 4.18 - Compação entre os espectros de ^{13}C - CP-TOSS das amostras comerciais do mebendazol.....	68
FIGURA 4.19 - Compação entre os espectros de ^{13}C -CP-TOSS dos polimorfos A e C do mebendazol e de três amostras comerciais.....	69
FIGURA 4.20 - Intensidade do sinal em função do intervalo de tempo entre os pulsos de 90° aplicados no canal do ^1H para o grupo CH_3 das formas A e C do mebendazol.....	70
FIGURA 4.21 - Sinais de ^{13}C -CP-MAS do grupo metila em função da porcentagem em massa (m/m) dos polimorfos A e C do mebendazol.....	71
FIGURA 4.22 - Razão entre as áreas dos sinais de ^{13}C -CP-MAS dos grupos metilas (MBZA/MBZC) em função da porcentagem em massa do polimorfo A em relação ao polimorfo C do mebendazol.....	72
FIGURA 4.23 - Razão entre as áreas dos sinais de ^{13}C -CP-MAS dos grupos metilas (MBZA/MBZC) em função da porcentagem em massa do polimorfo A em relação ao polimorfo C do mebendazol.....	73
FIGURA 4.24 - Razão entre as áreas dos sinais de ^{13}C -CP-TOSS dos grupos metilas (MBZA/MBZC) em função da porcentagem em massa do polimorfo A em relação ao polimorfo C do mebendazol.....	74
FIGURA 4.25 - Difratograma de raios X do citrato de dietilcarbamazina.....	76

FIGURA 4.26 - Espectro de FT-Raman do citrato de dietilcarbamazina.....	76
FIGURA 4.27 - Espectro de ^{13}C -CP-TOSS da (a) DEC livre e (b) DEC citrato.....	77
FIGURA 4.28 - Espectros de RMN de ^{13}C da DEC citrato. (a) ^{13}C -CP-TOSS (b) ^{13}C -CP-TOSS-NQS.....	78
FIGURA 4.29 - Desordem de um dos grupos etila da DEC citrato.....	79
FIGURA 4.30 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para a DEC citrato, utilizando a técnica HETCOR.....	80
FIGURA 4.31 - (a) Projeção do espectro de ^1H da DEC citrato obtido indiretamente do experimento HETCOR ^{13}C - ^1H e (b) correlações entre carbonos e hidrogênios envolvidos em ligações de hidrogênio.....	81
FIGURA 4.32 - Espectros de (a) ^{15}N -CP-NQS do citrato de dietilcarbamazina - d20: 50 μs , (b) ^{15}N -CP-MAS do citrato de dietilcarbamazina, (c) ^{15}N -CP-MAS da dietilcarbamazina na forma livre.....	82
FIGURA 4.33 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para a DEC livre, utilizando a técnica HETCOR.....	82
FIGURA 4.34 - Unidade assimétrica da DEC citrato em diferentes temperaturas.....	84
FIGURA 4.35 - Espectros de ^{13}C -CP-MAS do citrato de dietilcarbamazina: (a) -50 $^{\circ}\text{C}$ (b) -38 $^{\circ}\text{C}$ (c) -20 $^{\circ}\text{C}$ (d) 0 $^{\circ}\text{C}$ e (e) 20 $^{\circ}\text{C}$	86
FIGURA 4.36 - Espectro de ^{13}C -CP-TOSS da (a) DEC livre e (b) DEC maleato.....	87
FIGURA 4.37 - Espectros de RMN de ^{13}C da DEC maleato. (a) ^{13}C -CP-TOSS (b) ^{13}C -CP-TOSS-NQS.....	88
FIGURA 4.38 - Cella unitária do maleato de DEC visto em duas diferentes projeções espaciais.....	89
FIGURA 4.39 - Mapa de correlação HETCOR ^{13}C - ^1H para a DEC maleato: (a) Mapa total; (b) expansão do mapa da região dos carbonos vinílicos e carbonílicos e (c) expansão mostrando os sinais de correlação com os hidrogênios em 12 e 17 ppm.....	91

FIGURA 4.40 - (a) Projeção do espectro de ^1H da DEC maleato obtido indiretamente do experimento HETCOR ^{13}C - ^1H e (b) correlações entre carbonos e hidrogênios envolvidos em ligações de hidrogênio.....	92
FIGURA 4.41 - Espectros de (a) ^{15}N -CP-NQS do maleto de dietilcarbamazina - d20: 80 μs , (b) ^{15}N -CP-MAS do maleto de dietilcarbamazina, (c) ^{15}N -CP-MAS da dietilcarbamazina na forma livre.....	93
FIGURA 4.42 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do ácido micofenólico.....	94
FIGURA 4.43 - Espectros de ^{13}C -RMN do ácido micofenólico. (a) CP-TOSS (b) CP-TOSS-NQS (c) CP-PI-TOSS.....	96
FIGURA 4.44 - Ligações inter e intramoleculares do ácido micofenólico (AMF) determinadas por raios X.....	97
FIGURA 4.45 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o ácido micofenólico, utilizando a técnica HETCOR.....	97
FIGURA 4.46 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do ácido micofenólico em diferentes temperaturas.....	98
FIGURA 4.47 - Espectros de ^{13}C -RMN do micofenolato de mofetila. (a) CP-TOSS (b) CP-TOSS-NQS (c) CP-PI-TOSS.....	99
FIGURA 4.48 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do (a) ácido micofenólico e (b) micofenolato de mofetila.....	100
FIGURA 4.49 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o micofenolato de mofetila, utilizando a técnica HETCOR.....	102

RESUMO

ESTUDOS DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS ATRAVÉS DAS TÉCNICAS DE RMN NO ESTADO SÓLIDO. Cerca de 80-90% das drogas presentes no mercado são disponibilizadas no estado sólido, em forma de comprimidos e em cápsulas contendo o produto na forma de pó. Um problema recorrente associado aos fármacos no estado sólido é a baixa taxa de dissolução, principalmente em meio aquoso ou em ambientes mais polares. Outra característica importante, e que está intimamente relacionada com a taxa de dissolução e, conseqüentemente, à biodisponibilidade do fármaco é a existência de várias formas cristalinas que um fármaco pode assumir no momento da sua cristalização. Este fenômeno é conhecido como polimorfismo e trata-se de um sério problema para a indústria farmacêutica. Como o problema não é tão simples de ser caracterizado, é recomendado o uso de um conjunto de técnicas, tais como DRX, Raman, IV, análises térmicas e RMN no estado sólido, porque todas elas têm pelo menos uma limitação. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo estudar sólidos farmacêuticos através das técnicas de RMN no estado sólido, utilizando as matrizes mebendazol (nas formas polimórficas A e C e em amostras comerciais), dietilcarbamazina (nas formas livre, citrato e maleato) e o ácido micofenólico, bem como o seu éster mofetil. Foi utilizado um conjunto de técnicas de RMN no estado sólido baseadas no experimento de CP-MAS e suas variantes (CP-TOSS, CP-NQS e CP-PI), tanto observando o núcleo de carbono-13 quanto o de nitrogênio-15. Com isso, foi possível diferenciar as formas polimórficas A e C do mebendazol, além de utilizá-las na análise dos medicamentos comerciais. Foi possível ainda verificar que a técnica de RMN no estado sólido pode ser usada com sucesso na caracterização e na quantificação absoluta dos polimorfos em amostras comerciais. Os dados obtidos dessas análises demonstraram a importância de se realizar um controle de qualidade eficaz das drogas formuladas no estado sólido disponíveis no mercado, uma vez que alguns lotes comercializados apresentaram o polimorfo indesejado do mebendazol. No caso da dietilcarbamazina nas formas livre, citrato e maleato, os dados de RMN foram coerentes e complementares aos encontrados por cristalografia de raios X. Com o emprego da técnica bidimensional FSLG-HETCOR- ^1H - ^{13}C , foi possível observar a existência de interações de hidrogênio intra e intermoleculares. Já os dados de RMN obtidos para o ácido micofenólico e do seu éster mofetil complementam o estudo estrutural dessa molécula, descrita na literatura somente com dados de raios X de

monocristal. Os resultados obtidos nesse trabalho vêm confirmar a importância da RMN no estado sólido no estudo de sólidos farmacêuticos, principalmente na análise de produtos comerciais no Brasil, onde sua utilização deve ser incentivada, tendo em vista que as vantagens que essa técnica oferece na análise deste tipo de produto são muito consideráveis.

ABSTRACT

STUDIES OF PHARMACEUTICAL SOLIDS THROUGH NMR TECHNIQUES IN SOLID STATE. Approximately 80-90 % of the drugs on the market are available in solid form, sold as tablets and capsules containing product in a powdered form. A frequent problem associated to the drugs in the solid state is the low rate of dissolution, especially in aqueous medium or in polar environments. Another important feature, which is closely related to the dissolution rate, and consequently the bioavailability of the drug, is the existence of several crystalline forms that the drug can assume during the crystallization. This phenomenon is known as polymorphism and it is a serious problem for the pharmaceutical industry. Since the problem is not so simple to be characterized, it is recommended to use a number of different techniques such as XRD, Raman, IR, thermal analysis and solid state NMR, once they all have at least one limitation. In this context, this work aimed to study pharmaceutical solids by solid state NMR techniques, using matrices such as mebendazole (in polymorphic forms A and C and in commercial samples), diethylcarbamazine (in its free, citrate and maleate forms) and mycophenolic acid as well as its ester mofetil form. A set of techniques for solid state NMR based on CP-MAS experiment and its variants (CP-TOSS, CP-NQS e CP-PI) were used, both observing the nucleus of carbon-13, as well as nitrogen-15. Thus, it was possible to differentiate between A and C polymorphs of mebendazole by using these techniques, and still use them in the analysis of commercial drugs. In this context, it was also possible to verify that the technique of solid state NMR can be successfully used to characterize and quantify polymorphs in absolute commercial samples. The data obtained from these analyzes demonstrated the importance of conducting an effective quality control of drugs available in the market when formulated in solid form, since it was verified that some lots sold exhibited the undesired polymorph of mebendazole. Regarding the study involving the free diethylcarbamazine and its citrate and maleate forms, NMR data were consistent and complementary to those reached by X-ray crystallography. With the use of two-dimensional FSLG-HETCOR ^1H - ^{13}C experiment, it was observed the existence of intra- and intermolecular interactions through hydrogen bonds. NMR data obtained for mycophenolic acid and its ester mofetil form corroborate the structural study of this molecule, previously described in the literature only with X-ray crystallography data. The present results confirm the importance of solid state NMR in the study of pharmaceutical solids,

mainly in the analysis of commercial products in Brazil, where their use should be encouraged, since this technique offers considerable advantages in the analysis of this type of product.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xviii
1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 - Sólidos farmacêuticos	2
1.2 - Polimorfismo em fármacos.....	4
1.3 - Técnicas utilizadas para o estudo de sólidos farmacêuticos.....	8
1.4 - A Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido aplicada à caracterização de sólidos farmacêuticos	10
1.5 - A Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido	13
1.5.1 - Desacoplamento heteronuclear de alta potência (<i>High-Power Proton Decoupling</i> - HPPD).....	16
1.5.2 - Rotação da amostra em torno do ângulo mágico (<i>Magic-Angle Spinning</i> - MAS)	17
1.5.3 - Polarização cruzada (<i>Cross Polarization</i> - CP)	18
1.6 - Considerações teóricas sobre alguns experimentos de RMN no estado sólido..	22
1.6.1 - CP-MAS (<i>Cross Polarization Magic Angle Spinning</i>)	23
1.6.2 - CP-TOSS (CP - <i>Total Suppression of Sidebands</i>)	24
1.6.3 - CP-TOSS-NQS (CP-TOSS - <i>Non Quaternary Suppression</i>).....	25
1.6.4 - CP-PI-TOSS (CP <i>combined with Polarization Inversion</i> - TOSS)	26
1.6.5 - Estimativa de T_1^H	27
1.6.6 - X- 1H FSLG HETCOR (<i>Frequency Switched Lee-Goldburg Heteronuclear Correlation</i>).....	30
1.7 - Substâncias alvo	31
1.7.1 - Mebendazol (MBZ).....	31
1.7.2 - Dietilcarbamazina (DEC).....	34
1.7.3 - Ácido micofenólico (AMF)	37
2 – OBJETIVO.....	30
3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	43

3.1 - Infraestrutura e técnicas utilizadas	43
3.1.1 - Difração de raios X por pó (DRX) e Espectroscopia Raman	43
3.1.2 - Espectrômetro de RMN	43
3.1.3 - Preparo das amostras para RMN no estado sólido	44
3.2 - Fármacos estudados	44
3.2.1 - Mebendazol (MBZ)	44
3.2.2 - Dietilcarbamazina (DEC) e suas formas salinas	48
3.2.3 - Ácido Micofenólico (AMF)	49
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 - Mebendazol	53
4.1.1 - Difração de raios X por pó (DRX) e Espectroscopia Raman	53
4.1.2 - Medidas de RMN no estado sólido	55
4.1.3 - Amostras comerciais	67
4.1.4 - Análise quantitativa	70
4.2 - Dietilcarbamazina	75
4.2.1 - Dietilcarbamazina livre e citrato	75
4.2.2 - DEC maleato	86
4.3 - Ácido Micofenólico	93
4.3.1 - Micofenolato de mofetila	99
5 - CONCLUSÃO	104
6 - REFERÊNCIAS	107

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Sólidos farmacêuticos

Os fármacos podem ser administrados de formas diferentes de acordo com o tratamento desejado. Cada uma delas, apresenta vantagens e desvantagens. Os medicamentos de uso tópico são aplicados na pele ou nas mucosas e liberam, de forma lenta e contínua, substâncias com baixo poder de absorção, com a finalidade de atuação local, sem atingir concentrações altas na corrente sanguínea, no entanto têm um número limitado de aplicações. Os injetáveis têm a grande vantagem de possibilitar a biodisponibilidade completa do medicamento, mas a administração exige a atuação de um profissional qualificado, além de provocar dor no local da injeção. Os medicamentos formulados em soluções e/ou suspensões são de fácil administração e rápida absorção, porém apresentam sensações desagradáveis ao paladar (em muitos casos), são mais suscetíveis a alterações de temperatura, incidência de luz, estabilidade e homogeneidade da solução/suspensão. Além desses fatores, muitas vezes o paciente comete equívocos no momento da administração, o que interfere na dosagem correta do medicamento, podendo ser insuficiente ou ainda ser alta o bastante para causar intoxicação. Já o medicamento na forma sólida facilita a administração por fornecer doses corretas do princípio ativo, é menos suscetível a mudanças ambientais, além de ser mais fácil de transportar. Por esses fatores, muitas vezes o médico e o paciente optam pelo tratamento com o medicamento no estado sólido. Por conta disso cerca de 80-90% das drogas disponíveis no mercado são disponibilizadas no estado sólido, apresentadas como comprimidos e em cápsulas contendo o produto na forma de pó (SANCHEZ et al., 2008).

Um problema recorrente associado aos fármacos no estado sólido é a baixa taxa de dissolução, principalmente em meio aquoso ou em ambientes mais polares. De maneira geral, os fármacos devem apresentar uma taxa de dissolução tal que a sua biodisponibilidade seja ótima, resultando numa terapêutica mais eficaz. A taxa de dissolução está diretamente associada à biodisponibilidade do fármaco e varia em função de uma série de parâmetros como o tamanho da partícula, a área de superfície, o grau de hidratação do fármaco, entre outros.

A biodisponibilidade é um processo dinâmico associado à velocidade e à extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (ANVISA, 2013). Esta propriedade é avaliada através de curvas de concentração plasmática em função do período em horas e apresenta um comportamento similar a uma curva de distribuição gaussiana. De maneira geral é dividida em dois estágios: durante o período que antecede o máximo de concentração plasmática ocorre a absorção do medicamento e após esse período ocorre a excreção. A FIGURA 1.1 ilustra três curvas genéricas que descrevem a biodisponibilidade de um fármaco em diferentes condições de solubilidade.

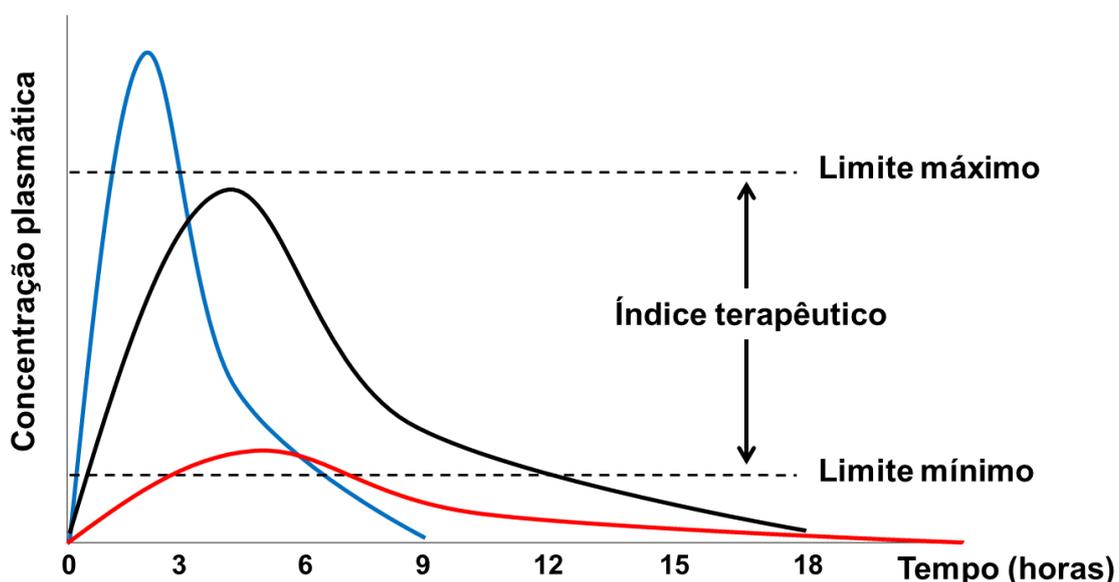


FIGURA 1.1 - Curvas genéricas que ilustram a biodisponibilidade de um fármaco em três condições diferentes.

A curva em azul mostra que nas primeiras duas horas após a ingestão do medicamento, a concentração plasmática superou o limite máximo do índice terapêutico e nesse caso pode tornar-se tóxico ao paciente ou eliminado sem apresentar qualquer efeito ao organismo. Outra observação é que logo após atingir o máximo da curva, ocorre uma queda drástica da concentração, alcançando o limite mínimo após seis horas, ou seja, depois desse ponto não apresenta mais qualquer ação terapêutica; nessa condição, o fármaco não seria indicado para ser utilizado em formulações farmacêuticas. A curva em vermelho exibe um aumento lento da concentração plasmática deste fármaco, de maneira que praticamente não ultrapassa o limite mínimo do índice terapêutico e, sendo assim, essa formulação

também não deve ser usada para a produção do medicamento nesta condição. Já a curva em preto apresenta a condição ideal para a administração do fármaco, pois a concentração plasmática está dentro do índice terapêutico na maior parte do tempo e não alcança o limite máximo. Somente por volta de nove horas é que a concentração se aproxima do limite mínimo e o alcança após 12 horas. Este último caso é o ideal, pois não provoca toxicidade e permite uma boa eficácia terapêutica, além de diminuir a frequência de tomada de doses pelo paciente.

Uma outra característica importante, e que está intimamente relacionada com a taxa de dissolução, e conseqüentemente à biodisponibilidade do fármaco é a existência de várias formas cristalinas que um fármaco pode assumir no momento da sua cristalização. Este fenômeno é conhecido como polimorfismo.

1.2 - Polimorfismo em fármacos

O polimorfismo é caracterizado pela cristalização de uma molécula em duas ou mais formas distintas. Este processo foi descoberto em 1822 pelo químico alemão Eilhard Mitscherlich, mas a atual definição foi dada por HALEBLIAN e McCRONE em 1969. A palavra polimorfismo deriva do grego e significa “muitas formas” (*poli* = muitas, *morphos* = formas). Este fenômeno ocorre com qualquer espécie química que tenha a capacidade de cristalizar, porém, fármacos e polímeros têm maior visibilidade pela importância comercial (CHIENG et al., 2011; RASTOGI e KURELEC, 2000), no entanto, alguns materiais inorgânicos também apresentam estruturas polimórficas (TAULELLE, 2004; DUTOUR et al., 2004). As diferentes formas pelas quais as moléculas podem cristalizar geram estruturas com diferentes propriedades físico-químicas, tais como: estabilidade térmica, grau de higroscopicidade, reatividade no estado sólido, processabilidade, solubilidade e, no caso de fármacos, a biodisponibilidade e conseqüentemente a bioatividade (LLINAS e GOODMAN, 2008; ARAUJO et al., 2012).

O processo de cristalização tem como o seu primeiro estágio a nucleação. Deve-se ter uma solução supersaturada, de maneira a formar cristaltos individuais (núcleos) e a nucleação pode ser primária (homogênea ou heterogênea) ou secundária. A nucleação primária homogênea ocorre quando a cristalização resulta da formação espontânea do núcleo do material a ser cristalizado, sem a

indução de qualquer outra espécie. A primária heterogênea acontece quando é adicionado qualquer corpo estranho ao sistema para induzir a nucleação. Quando a nucleação é induzida pela adição de cristais do soluto, diz-se que a nucleação é secundária (MULLIN, 2004).

Os fatores que governam a formação de vários ou de um determinado polimorfo são a estabilidade termodinâmica do sólido resultante, associada à velocidade do processo de cristalização. Dependendo de fatores como a temperatura, o solvente usado para a cristalização e velocidade de evaporação do solvente, pode ocorrer a formação de um polimorfo em detrimento do outro. Assim, o desenvolvimento e a manipulação dos fármacos, talvez seja o caso mais crítico enfrentado pela indústria farmacêutica, pois para garantir a sua eficiência terapêutica, os fármacos requerem formas muito específicas, que nem sempre são as mais estáveis e mais economicamente favoráveis.

Sólidos farmacêuticos podem apresentar forma cristalina desordenada (amorfa) ou ordenada. Quando um composto químico apresenta forma cristalina ordenada com um único componente, dizemos que é um polimorfo. No entanto, se houver outros componentes, como por exemplo, um solvente, dizemos que é um pseudopolimorfo (YU et al., 1998). No caso de ser um solvente, esse pseudopolimorfo é denominado de solvato, se a molécula é de água chamamos hidrato, quando interage por ligação de hidrogênio ou por interação do tipo π - π com outra molécula sólida em temperatura ambiente trata-se de um co-cristal e quando ocorre reação ácido-base denomina-se sal (FIGURAS 1.2 e 1.3).

Dependendo do processo de cristalização da droga, podem ocorrer alterações na sua solubilidade e com isso a biodisponibilidade e a bioatividade podem ser bastante comprometidas e, em vários casos, causar efeitos colaterais extremamente agressivos ao organismo (LLINAS e GOODMAN, 2008).

Outro problema associado ao polimorfismo está nas condições nas quais o medicamento é armazenado, uma vez que as condições ambientais em que o produto se encontra pode promover alterações estruturais devido à incidência de luz, variações de temperatura, tempo de armazenamento, umidade, além da pressão utilizada na confecção dos comprimidos.

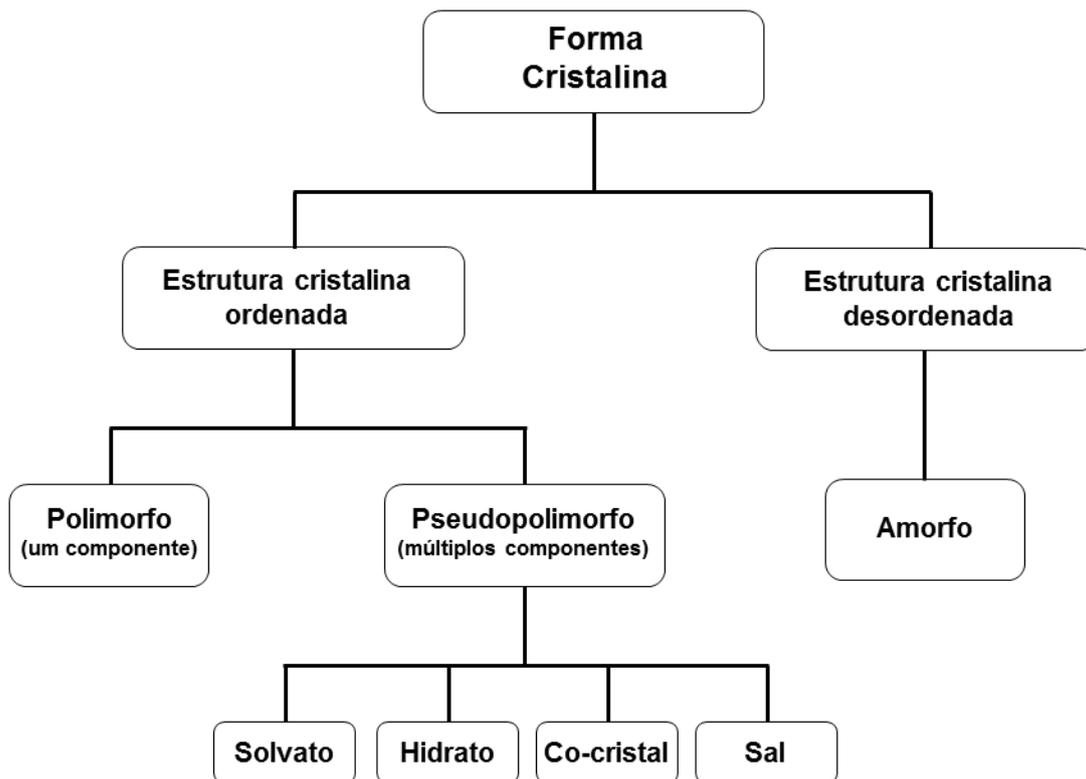
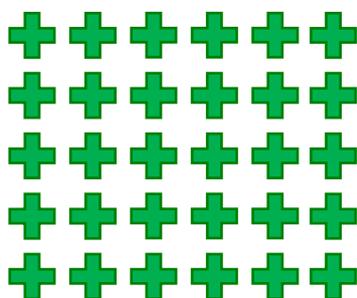
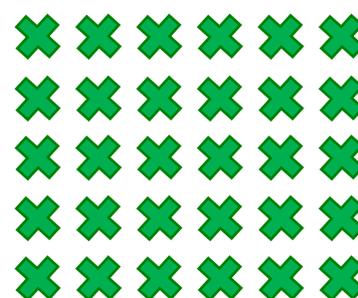


FIGURA 1.2 - Esquema das possíveis formas cristalinas de um composto químico.

Polimorfismo

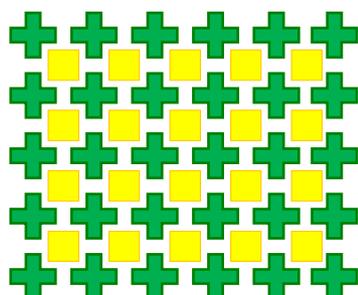


Polimorfo α



Polimorfo β

Pseudopolimorfismo



- Solvente (solvato)
- Água (hidrato)
- Int. de H ou π - π (co-cristais)
- Reação ácido-base (sal)

FIGURA 1.3 - Ilustração de polimorfismo e pseudopolimorfismo.

O caso mais notório de problemas terapêuticos causados pelo polimorfismo de fármacos é o do agente anti-HIV ritonavir (BAUER et al., 2001; MORISSETTE et al., 2003), que chamou a atenção por causar sérios prejuízos ao fabricante e aos pacientes que faziam uso deste medicamento.

Em 1996, esta droga foi disponibilizada em cápsulas contendo uma solução hidroalcoólica (75:25 etanol:água). Nos primeiros lotes apresentou excelentes resultados no tratamento, porém, após um tempo ela começou a perder eficácia terapêutica. Um grande número de pesquisadores se empenhou na tentativa de descobrir o motivo da perda terapêutica e somente em 1998 foi descoberto que um novo polimorfo mais estável estava precipitando dentro das cápsulas. Este novo polimorfo, descrito como forma II, apresentava cristais na forma de agulha e com solubilidade de 30 mg mL^{-1} , sendo que a forma inicial apresentava cristais no formato de placas com uma solubilidade de 170 mg mL^{-1} (FIGURA 1.4).

Dessa forma, uma quantidade muito pequena da droga era de fato disponibilizada na corrente sanguínea e vários lotes do medicamento precisaram ser recolhidos das prateleiras, com prejuízos aos pacientes e ao fabricante do medicamento.

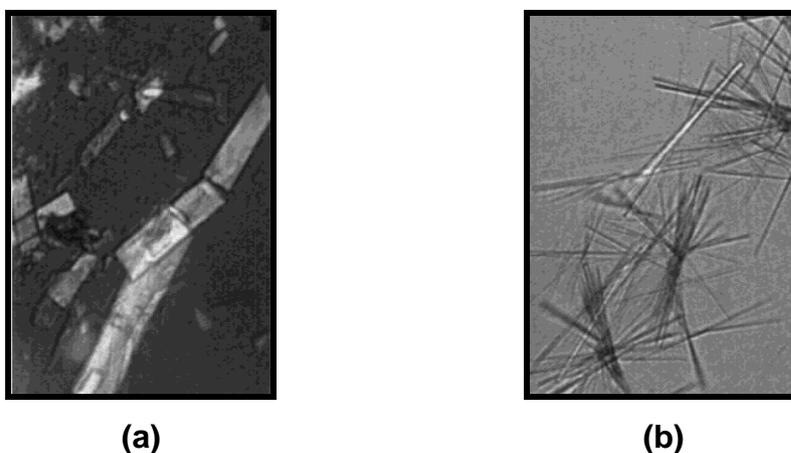


Figura reproduzida da ref. BAUER et al., 2001, com permissão de Springer Science and Business Media.

FIGURA 1.4 - Micrografias das formas I (a) e II (b) do ritonavir.

Vários fármacos apresentam formas polimórficas com baixa solubilidade, como nos casos da nimopidina, uma droga usada na prevenção e tratamento de doenças neurológicas isquêmicas (GRUNENBERG et al., 1995); a glibenclamida, um agente hipoglicemiante oral (PANAGOPOULOU-KAPLANI e MALAMATARIS, 2000); e dos diuréticos furosemida (MATSUDA e TATSUMI, 1990)

e toresamida (ROLLINGER et al., 2002). Algumas estratégias podem ser usadas para melhorar a solubilidade dos fármacos, como por exemplo, a preparação de sais e co-cristais, ou mesmo a obtenção de formas amorfas (SERAJUDDIN, 2007; BLAGDEN et al., 2007).

Problemas como esses incentivam o investimento em estudos relacionados ao polimorfismo, tanto pela comunidade acadêmica, quanto pela indústria farmacêutica. A pesquisa deve envolver todo o processo produtivo para que se obtenham espécies polimórficas que apresentem solubilidade adequada e, conseqüentemente, biodisponibilidade ideal para uma atividade terapêutica eficaz. Estes estudos consistem em estabelecer condições para o controle total do processo que inclui a síntese do fármaco, o processo de cristalização, a interação do fármaco com os excipientes ou aditivos que garantam sua estabilidade, a obtenção final do produto seco e o seu acondicionamento final.

Para garantir que a forma mais ativa do fármaco tenha sido obtida e permaneça estável após todo esse processo, devem ser utilizadas ferramentas bastante confiáveis para caracterizar o produto final, pois o custo total envolvido é bastante elevado (LLINAS e GOODMAN, 2008).

1.3 - Técnicas utilizadas para o estudo de sólidos farmacêuticos

A caracterização de polimorfos ainda é um problema difícil de ser tratado e, portanto, é necessário utilizar um amplo conjunto de técnicas para garantir que o resultado final seja totalmente confiável. Um levantamento realizado por CHIENG e colaboradores (2011) mostrou que a maioria dos estudos de polimorfismo em sólidos farmacêuticos (~90%) utiliza, pelo menos, duas ou mais técnicas analíticas. Existem várias técnicas que vêm sendo empregadas na caracterização do polimorfismo em fármacos, visando principalmente a caracterização estrutural, quantificação e a relação estrutura-propriedade. Dentre as técnicas comumente utilizadas, podem ser citadas: difração de raios X por monocristal (DRXM), difração de raios X por pó (DRXP), infravermelho (IV), Raman, RMN de ^{13}C no estado sólido, calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA), além de técnicas de microscopia (BUGAY, 2001; CHIENG et al., 2011).

A técnica de difração de raios X por monocristal é, sem dúvida alguma, a mais importante para a determinação das várias formas polimórficas encontradas

para uma determinada substância. Esta técnica permite a determinação precisa de distâncias interatômicas e ângulos de ligações que levam a obtenção de estruturas cristalinas e moleculares, fornecendo informações que incluem: parâmetros de cela unitária, densidade, ordem e desordem cristalina, conformação e empacotamento molecular e modelo de ligação de hidrogênio. No entanto, esta técnica requer a obtenção de monocristais de alta qualidade, que em muitos casos é difícil, e nem sempre possível. Além disso, a presença de outros materiais de natureza amorfa pode atrapalhar a análise, e certamente não é possível fazer uso dessa técnica para analisar as formas polimórficas em um material comercial, visto que, existirá uma mistura complexa de outros compostos que estão presentes nas formulações dos medicamentos comerciais (excipientes).

A difração de raios X por pó foi inserida para resolver o problema de amostras policristalinas, principalmente quando associada ao refinamento de Retvield, obtendo sucesso na determinação de estruturas relativamente simples, como é o caso da maioria dos fármacos.

Já as espectroscopias na região do infravermelho e Raman fornecem uma espécie de impressão digital de forma bastante rápida e sensível. No caso do infravermelho, porém, muitas vezes o inconveniente consiste na compressão usada para obter as pastilhas do fármaco em KBr. Essa compressão pode causar alterações na estrutura dos polimorfos existentes, com propriedades diferentes do meio real em que o fármaco será disponibilizado. As técnicas de imagem ou microscopia fornecem informações sobre propriedades óticas, como índice de refração e propriedades morfológicas das partículas, no entanto, o número de informações obtidas é limitado.

As técnicas termoanalíticas, principalmente DSC e TGA, possibilitam identificar os polimorfos com base na estabilidade térmica e possíveis alterações baseadas em seus pontos de fusão, dessolvatação (no caso de pseudopolimorfos), transições sólido-sólido, transições vítreas e cristalização, mas oferecem poucas informações do ponto de vista estrutural. A Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido também vem sendo utilizada para a caracterização do polimorfismo e tem apresentado informações muito interessantes, além de algumas vantagens experimentais. Assim, a RMN no estado sólido, tem se mostrado uma importante aliada na caracterização de fármacos e será o foco deste trabalho.

1.4 - A Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido aplicada à caracterização de sólidos farmacêuticos

A RMN no estado sólido tem sido bastante utilizada no estudo do polimorfismo, pois fornece uma diversidade de informações comparáveis às obtidas por difração de raios X mono e policristalina (BUGAY, 1993), com a vantagem de não exigir a obtenção de monocristais de alta qualidade e, mesmo, podendo ser utilizada no estudo de materiais amorfos. Além disso, a preparação da amostra é bastante simples com manipulação mínima, requerendo no máximo a pulverização da amostra com almofariz e pistilo. Outro fator relevante para o emprego da técnica de RMN é a possibilidade de analisar, além da matéria prima, o produto final já formulado, ainda que a presença de excipientes seja considerada. Dessa forma, é possível utilizá-la na análise de formulações comerciais tendo preocupação no controle da qualidade do produto oferecido, permitindo avaliar qualquer problema ocorrido não só na formulação, mas em outras etapas como o transporte ou armazenamento do produto (TISHMACK et al., 2003).

As principais desvantagens da técnica de RMN no estado sólido são a baixa sensibilidade, o alto custo e o tempo de aquisição dos experimentos que pode ser relativamente longo, dependendo da qualidade e da quantidade de amostra, bem como do tipo de informação que se deseja obter.

O uso da RMN no estado sólido para a caracterização de polimorfos se baseia no fato de que quando uma estrutura se cristaliza em diferentes formas ocorrem mudanças conformacionais e a técnica é sensível a esse comportamento. Essa alteração pode ser monitorada por diferenças no deslocamento químico dos núcleos, resultante de alterações no ambiente eletrônico. Como no estado sólido as moléculas são muito rígidas, alterações mínimas no ambiente eletrônico podem provocar variações significativas no espectro (HARRIS, 2004). Outros detalhes sobre essa técnica estão descritos no item 1.5.

Muitos fármacos de alto volume de consumo e de amplo uso, que exibem dois ou mais polimorfos, têm sido caracterizados por RMN no estado sólido. Um exemplo é o da ranitidina, uma droga usada contra desordens estomacais, que pode se cristalizar em duas formas distintas. Os espectros de RMN ^{13}C são bastante diferentes para cada forma (MIRMEHRABI et al., 2004), como se pode observar na FIGURA 1.5. A forma 1 consiste de cristais menores que se aglomeram formando

partículas grandes e a forma 2 é composta de cristais grandes, e esta característica tem reflexo na largura de linha dos sinais de ambos os espectros, já que mostram a existência de diferenças na ordem cristalina. Essas duas formas resultam em diferentes propriedades físicas, e entre elas está a solubilidade. O que se tem feito com essa droga é avaliar a coexistência de ambas as formas e suas quantidades relativas em um comprimido e a partir do conhecimento dessa composição propõem-se correlações com a solubilidade do medicamento.

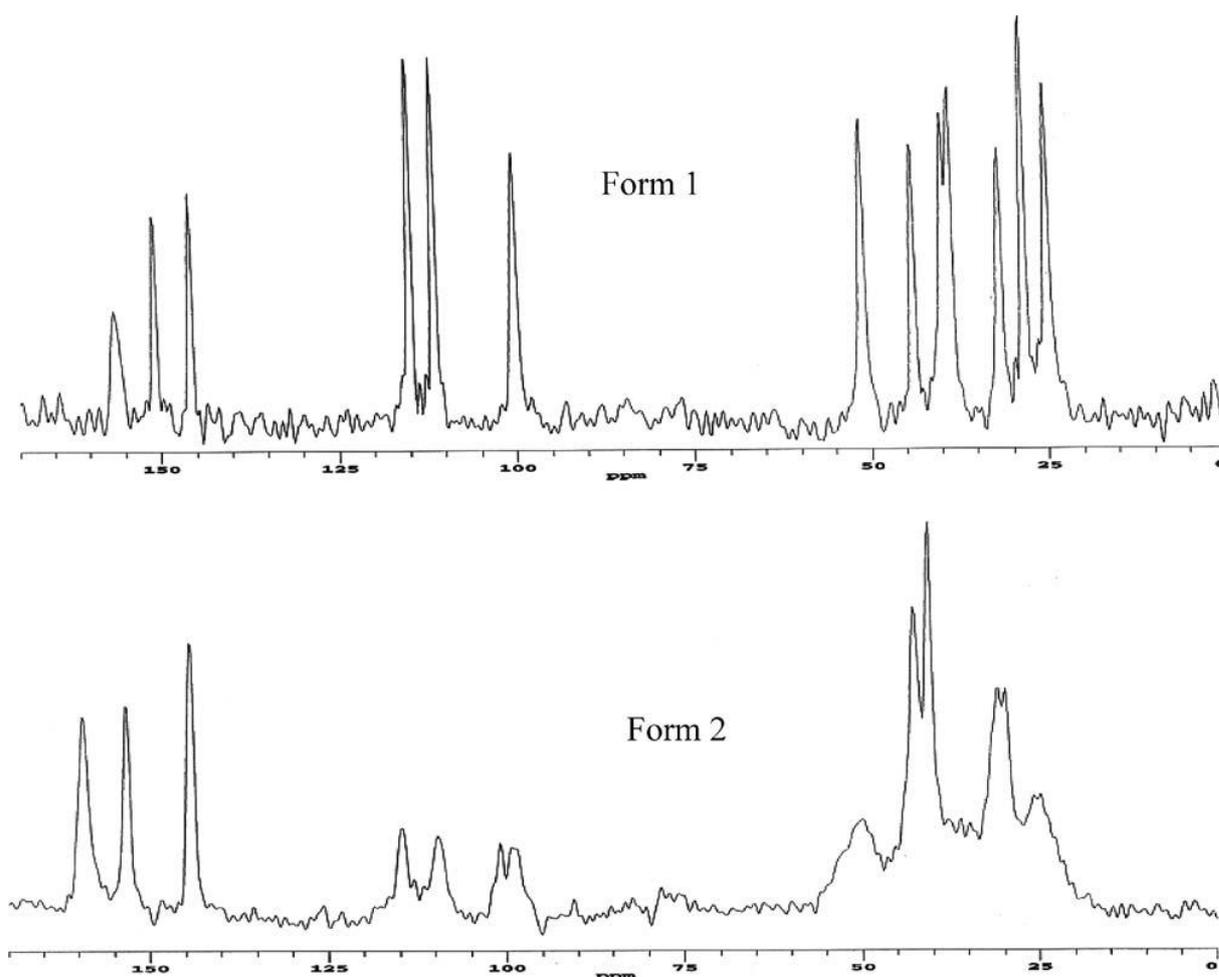


Figura reproduzida da ref. MIRMEHRABI et al., 2004, com permissão de Elsevier.

FIGURA 1.5 - Espectros de RMN de ^{13}C -CP-MAS para as duas formas da cloridrato de ranitidina (MIRMEHRABI et al., 2004).

No Brasil, o primeiro grupo de RMN no estado sólido que se dedicou ao emprego desta técnica no estudo de polimorfismo de fármacos foi o grupo da Profa. Dra. Rosane San Gil, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (AGUIAR et al., 1999). Mais recentemente seu grupo analisou amostras de

cefalexina, um antibiótico β -lactâmico, tanto do fármaco isolado, como em formulações comerciais (AGUIAR et al., 2011). Neste estudo observaram a presença de polimorfismo, pois alguns sinais de RMN de ^{13}C no estado sólido apresentavam-se duplicados quando comparados aos sinais no estado líquido, sugerindo conformações cristalográficas diferentes. Os resultados indicaram a presença majoritária de pelo menos três conformações diferentes da cefalexina em diferentes arranjos cristalinos, e foram verificadas ainda a existência de duas amostras de natureza amorfa, as quais apresentaram sinais alargados, como esperado, devido ao número maior de conformações moleculares e/ou interações intermoleculares.

Outro bom exemplo é o do antibiótico norfloxacino, que pode cristalizar basicamente em duas formas anidras e outras duas hidratadas, cujos espectros são bastante modificados (BARBAS et al., 2006). É visível a variação no deslocamento químico de acordo com o ambiente eletrônico que o rodeia, principalmente em um carbono aromático ligado a um grupo carboxila. A diferença entre as duas formas anidras está na posição assumida pelo grupo carboxila, que pode fazer com que a conjugação esteja no plano do anel (forma B) ou fora do plano (forma A). Em temperatura ambiente, a forma B mostrou ser mais estável que a forma A e até então se acreditava que as alterações polimórficas poderiam ser irreversíveis, mas através da RMN no estado sólido foi possível verificar que a interconversão entre as duas formas são reversíveis, devido ao comportamento enantiotrópico da molécula.

Muitas outras aplicações têm sido reportadas na literatura, sempre relatando o uso da RMN no estado sólido na caracterização do polimorfismo em fármacos: nos casos dos fármacos anti-HIV estavudina (GANDHI et al., 2000), antiviral lamivudina (HARRIS et al., 1997), do hormônio estradiol (PARK et al., 2005), do antiinflamatório ibuprofeno (GEPPI et al., 2005), do analgésico paracetamol (SCHANTZ et al., 2009) e do anti-histamínico cimetidina (MIDDLETON et al., 2000), e muitos outros.

Estudos de dinâmica molecular também têm sido feitos a partir do monitoramento de tempos de relaxação do núcleo de carbono-13, com o intuito de avaliar a mobilidade molecular dos polimorfos (MASUDA et al., 2005). Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que com a variação de temperatura é possível identificar e, juntamente com outras técnicas, caracterizar novos polimorfos (VAN HOOFF et al., 2002; RUBIN-PREMIINGER et al., 2004). Outras técnicas mais avançadas em RMN no estado sólido também têm sido aplicadas, em geral

utilizando espectros de correlação em duas dimensões, pois podem apresentar importantes informações conformacionais, indicando diferenças no ambiente químico e mostrando a conectividade entre os átomos (SMITH et al., 1998; ZELL et al., 1999; TISHMACK et al., 2003; VOGT et al., 2008).

Outro aspecto da RMN no estado sólido, que vem sendo explorado, está relacionado com a quantificação dos princípios ativos nas formulações farmacêuticas (STEPHENSON et al., 2001; TISHMACK et al., 2003; HARRIS et al., 2005; ZIARELLI e CALDARELLI, 2006; ZIARELLI et al., 2007; SANCHEZ et al., 2008; ZIELINSKA-PISKLAK et al., 2012). A quantificação por RMN ainda requer um controle muito refinado dos parâmetros de aquisição para que bons resultados sejam alcançados, uma vez que, as técnicas utilizadas podem apresentar erros consideráveis, levando a resultados que, no caso de medicamentos, podem ser bastante críticos. WAWER e colaboradores (2005), quantificaram o citrato de sildenafil (Viagra), um fármaco utilizado no tratamento de disfunção erétil, em medicamentos comerciais. Nesse trabalho, eles propõem a RMN de ^{13}C no estado sólido como um método rápido para a autenticação de produtos comerciais, bem como a quantificação das dosagens em comprimidos. Quanto à presença de polimorfos, é possível encontrar alguns trabalhos de quantificação em misturas preparadas pelo próprio analista apenas com os polimorfos e um número menor de estudos que quantificam essas misturas em produto comercial, onde há a presença de excipientes (VIRTANEN e MAUNU, 2010).

1.5 - A Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido

Na RMN no estado líquido, o efeito de deslocamento anisotrópico é raramente observado por causa do rápido e constante movimento caótico das moléculas. Já no estado sólido, as moléculas apresentam orientações espaciais muito bem definidas por conta da alta rigidez do ambiente. Quando introduzidas em um campo magnético intenso e de orientação definida, as moléculas irão experimentar este campo magnético de maneiras diferentes. Como resultado, os núcleos de uma molécula com uma determinada orientação em relação ao campo magnético externo irão precessar com frequências diferentes dos núcleos de uma outra molécula com orientação diferente. A partir desse comportamento um mesmo

núcleo passa a precessar com diferentes frequências, resultando nos deslocamentos anisotrópicos e num intenso alargamento de linha, como ilustrado na FIGURA 1.6.

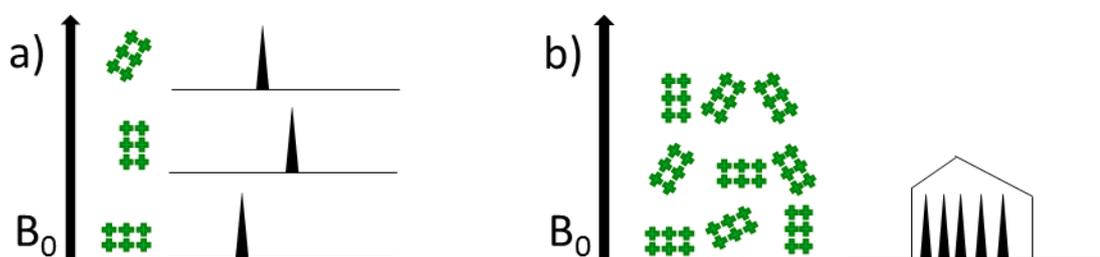


FIGURA 1.6 - Sinais referentes aos deslocamentos anisotrópicos (a), resultando em um intenso alargamento de linha (b).

Outra interação importante recorrente na RMN no estado sólido é a interação dipolar, uma vez que a distância internuclear é bastante reduzida. Esse tipo de interação está relacionado à interferência que o campo magnético produzido por um núcleo pode causar em outro que esteja espacialmente próximo. A interação dipolar entre dois spins acoplados (I e S) tem uma constante de acoplamento associada, a qual será dada como função da distância internuclear e as razões magnetogíricas dos núcleos envolvidos na interação, segundo a equação:

$$D_{IS} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r_{IS}^3}$$

Equação 1.1

Onde:

D_{IS} = acoplamento dipolar entre os spins I e S

μ_0 = momento magnético

γ_I = constante magnetogírica do spin I

γ_S = constante magnetogírica do spin S

\hbar = constante de Planck dividida por 2π

r = distância internuclear I-S

Portanto, o acoplamento dipolar depende de forma inversamente proporcional à distância entre esses dois núcleos. Outro fator que influencia na intensidade do acoplamento dipolar é a constante magnetogírica (γ) de cada um desses núcleos envolvidos na interação. Por exemplo, a interação dipolar entre dois

núcleos de hidrogênio será muito maior do que entre um núcleo de hidrogênio e outro de carbono, pois a constante magnetogírica (γ) do carbono é muito menor do que a de hidrogênio ($\gamma^1\text{H}=26,75$ e $\gamma^{13}\text{C}= 6,73$ ($10^7 \text{ rad s}^{-1}\text{T}^{-1}$)). O intenso acoplamento dipolar H-H faz com que o espectro de RMN de ^1H no estado sólido apresente linhas extremamente largas (da ordem de 120 kHz quando a distância internuclear é de 1,0 Å) e, infelizmente, esse núcleo tem sido menos estudado por RMN no estado sólido, mesmo sendo o mais abundante e mais sensível. Porém, muitos esforços têm sido feitos nos últimos anos no sentido de ampliar seu uso, principalmente em técnicas como o CRAMPS (*Combined Rotation and Multiple Pulse NMR Spectroscopy*) e uso de sondas que permitem que a amostra gire em rotações ultrarrápidas (acima de 70 kHz).

Por conta disso, outros núcleos menos suscetíveis a intensos acoplamentos dipolares têm sido mais utilizados, sendo mais comuns os núcleos de carbono-13, nitrogênio-15, fósforo-31, silício-29, etc, que apresentam menores constantes magnetogíricas, como mostra a TABELA 1.1.

TABELA 1. 1 - Constante magnetogírica dos núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P e ^{29}Si

Núcleo	γ ($10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{T}^{-1}$)	Abundância natural (%)
Hidrogênio-1	26,75	99,9
Carbono-13	6,73	1,1
Nitrogênio-15	-2,72	0,37
Fósforo-31	10,84	100
Silício-29	-5,32	4,7

As limitações em se trabalhar com esses núcleos são várias, mas perfeitamente minimizáveis e, em alguns casos, totalmente sanáveis. Essas desvantagens são: menor sensibilidade, acoplamentos dipolares relativamente intensos com núcleos de hidrogênio (muito comum em compostos orgânicos). Somada a essas limitações ainda pode-se citar a baixa abundância natural de núcleos como o carbono-13 (1,1%) e nitrogênio-15 (0,37%), muito analisados em substâncias orgânicas.

Pelo exposto fica evidente que muitas interações, praticamente inexistentes em RMN de soluções, são importantes e podem comprometer a qualidade dos espectros em RMN no estado sólido. Certamente que existem metodologias muito eficientes para minimizar ou mesmo anular problemas como esses. Para tanto, três principais técnicas são utilizadas na RMN no estado sólido: rotação da amostra em torno do ângulo mágico (*Magic-Angle Spinning* - MAS) para eliminar a anisotropia de deslocamento químico, o desacoplamento de alta potência (*High-Power Proton Decoupling* - HPPD) para eliminar os acoplamentos dipolares, e polarização cruzada (*Cross Polarization* - CP), para aumentar a sensibilidade de núcleos pouco sensíveis (APPERLEY et al., 2012; AGUIAR et al., 1999). Na sequência essas metodologias serão descritas com um pouco mais de detalhes.

1.5.1 - Desacoplamento heteronuclear de alta potência (*High-Power Proton Decoupling* - HPPD)

No estado sólido, as interações dipolares (através do espaço) heteronuclear, $^1\text{H} \leftrightarrow ^{13}\text{C}$ ou $^1\text{H} \leftrightarrow ^{15}\text{N}$ por exemplo, são bastante fortes, com constantes de acoplamento podendo ultrapassar 50 kHz, o que ocasiona um alargamento dos sinais, e diminuindo, assim, a resolução espectral. Nesse sentido, existe a necessidade de se fazer uso de um desacoplador e, em virtude desses acoplamentos serem intensos, é necessário que o campo aplicado seja também intenso, portanto potências elevadas devem ser empregadas para eliminar os efeitos desses acoplamentos. Para se ter uma ideia façamos um paralelo com a RMN em solução, pois os acoplamentos escalares (que se propagam através das ligações químicas, e não do espaço) são de uma grandeza muito menor (os mais intensos da ordem de poucas centenas de Hertz). Assim, os desacopladores utilizados em experimentos na RMN de solução utilizam uma potência em torno de 10 W para eliminar as interações escalares, uma vez que são essas as interações dominantes em amostras líquidas. Os desacopladores usados no estado sólido, porém, podem utilizar potências da ordem de dezenas e/ou centenas de Watts para eliminar ou apenas minimizar as interações dipolares heteronuclear. É importante salientar que o ajuste da potência a ser utilizada pelo desacoplador deve ser feito com muito cuidado, pois se o limite permitido pela sonda for ultrapassado, certamente a mesma

sofrerá sérios danos. O campo aplicado para eliminar estes acoplamentos deve estar relacionado a frequências três vezes superior a maior constante de acoplamento dipolar; por exemplo, se a máxima constante de acoplamento dipolar $^1\text{H}\leftrightarrow^{13}\text{C}$ for de 25 kHz, o campo aplicado para desacoplamento será da ordem de 75 kHz.

O desacoplamento pode ser promovido pela irradiação de uma série de pulsos de alta frequência (*Continuos-Wave* - CW) durante o tempo de aquisição. Esse método apresenta bons resultados, no entanto, pode trazer prejuízos à sonda a longo prazo. Além disso, o tempo de aquisição para um experimento de carbono-13 no estado sólido, por exemplo, deve ser muito menor (em torno de 50 ms) do que o utilizado no estado líquido, que é da ordem de 1 s. Outro tipo de desacoplador que apresenta excelentes resultados é o TPPM (*Two-Pulse Phase-Modulated*), pois permite corrigir imperfeições de fase, sendo muito utilizado em altos campos magnéticos, quando a amostra é submetida a altas frequências de rotação ou mesmo quando há limitações na potência do desacoplador, porque aplica potências mais brandas. Além dessas duas formas de desacoplamento, ainda existem outras que podem ser utilizadas conforme a necessidade em questão (APPERLEY et al., 2012).

1.5.2 - Rotação da amostra em torno do ângulo mágico (*Magic-Angle Spinning* - MAS)

Outro procedimento imprescindível quando se fala em RMN no estado sólido é a rotação em torno do ângulo mágico. Na década de 50, LOWE (1959) descobriu que as interações anisotrópicas que provocam o alargamento de linhas de RMN no estado sólido têm uma dependência da orientação molecular com o campo magnético externo de $(3\cos^2\theta - 1)$, onde θ é o ângulo formado entre o vetor do amostrador e o campo magnético externo (B_0), como ilustrado na FIGURA 1.7. Para que essa dependência geométrica seja eliminada, é necessário que esse termo seja anulado, ou seja, que $(3\cos^2\theta - 1) = 0$. Assim, em experimentos de RMN no estado sólido, a amostra é inserida em um ângulo de $54,74^\circ$ em relação ao campo magnético externo, pois nesse ângulo o termo de $(3\cos^2\theta - 1)$ é igualado a zero e, por isso é chamado de ângulo mágico.

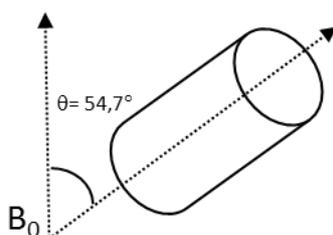


FIGURA 1.7 - O amostrador inserido no ângulo mágico. $\theta = 54,7^\circ$ em relação ao campo magnético externo (B_0).

Mesmo que o vetor do amostrador esteja no ângulo mágico, é conhecido que no estado sólido existem várias orientações diferentes no nível molecular, ou seja, nem todos os vetores moleculares estarão orientados de acordo com o ângulo mágico, o que irá resultar na anisotropia de deslocamento químico. Para minimizar esse problema, a amostra é então submetida a altas frequências de rotação (da ordem de kHz) em torno do ângulo mágico, para que seja alcançada uma “média” das orientações moleculares e, conseqüentemente, a eliminação dos efeitos de anisotropia de deslocamento químico e, simultaneamente, do acoplamento dipolar. Veremos em seções posteriores que mesmo girando em altas frequências de rotação, muitas vezes ainda restam no espectro linhas referentes aos sinais anisotrópicos harmônicos a rotação utilizada, e com isso outros procedimentos podem ser utilizados para corrigir esse problema (seção 1.6.2 TOSS).

1.5.3 - Polarização cruzada (*Cross Polarization - CP*)

A técnica de polarização cruzada é utilizada para intensificar o sinal dos núcleos menos abundantes (p.e. ^{13}C ou ^{15}N) à custa da transferência de magnetização de núcleos mais abundantes (p.e. ^1H) para estes. No estado líquido essa transferência pode ocorrer por efeito nuclear Overhauser (NOE), ou ainda por polarização cruzada, como é feita em experimentos como o DEPT ou INEPT.

Na condição inicial, quando a amostra é inserida no campo magnético externo (B_0), os spins nucleares se distribuem em níveis diferentes de energia: por exemplo, núcleos de spin $\frac{1}{2}$ se distribuem em dois níveis, $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. E a separação entre esses níveis será diretamente proporcional à intensidade de B_0 . Uma vez que

$\Delta E = h\omega/2\pi$ e que $\omega = -\gamma B_0$, as frequências de precessão (ω) serão diferentes para cada tipo de núcleo, pois dependerão da constante magnetogírica (γ) e do campo magnético sentido pelo núcleo. Para um mesmo B_0 , a diferença de energia entre os níveis energéticos irá depender do γ do núcleo. Portanto, a diferença de energia entre os níveis para o carbono-13 (por exemplo) será em torno de quatro vezes menor que para o hidrogênio-1. Esse processo pode ser melhor visualizado na FIGURA 1.8a, em que estão ilustrados os diagramas de energia para os núcleos de ^1H e ^{13}C e as frequências de precessão relacionadas a eles. Nesta condição, em que os núcleos precessam com frequências completamente diferentes, é como se houvesse uma “barreira” entre os núcleos impedindo que ocorra uma transferência de magnetização do tipo $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$.

A transferência de polarização de um núcleo para outro só pode ser alcançada se a frequência de precessão (ω) de ambos for igual, ou seja, esses núcleos devem estar em fase, processo que é descrito como condição Hartmann-Hahn (HARTMANN e HAHN, 1962). Além disso, ambos os núcleos devem estar com suas magnetizações orientadas no plano $x'y'$ do sistema de coordenadas girantes, e para isso é necessário que ocorra um processo de trava de spins neste plano. Uma vez que a constante magnetogírica (γ) é intrínseca de cada núcleo, a única maneira de igualar as frequências de precessão é ajustando o campo magnético sentido por cada núcleo, que pode ser feito através da aplicação de sequências de pulsos apropriadas. Quando a condição Hartmann-Hahn é satisfeita e os núcleos passam a precessar na mesma frequência, então a “barreira” é quebrada e ocorre a transferência de polarização - a polarização cruzada. No caso exemplificado na FIGURA 1.8, o sinal de ^{13}C será intensificado à custa da magnetização do ^1H .

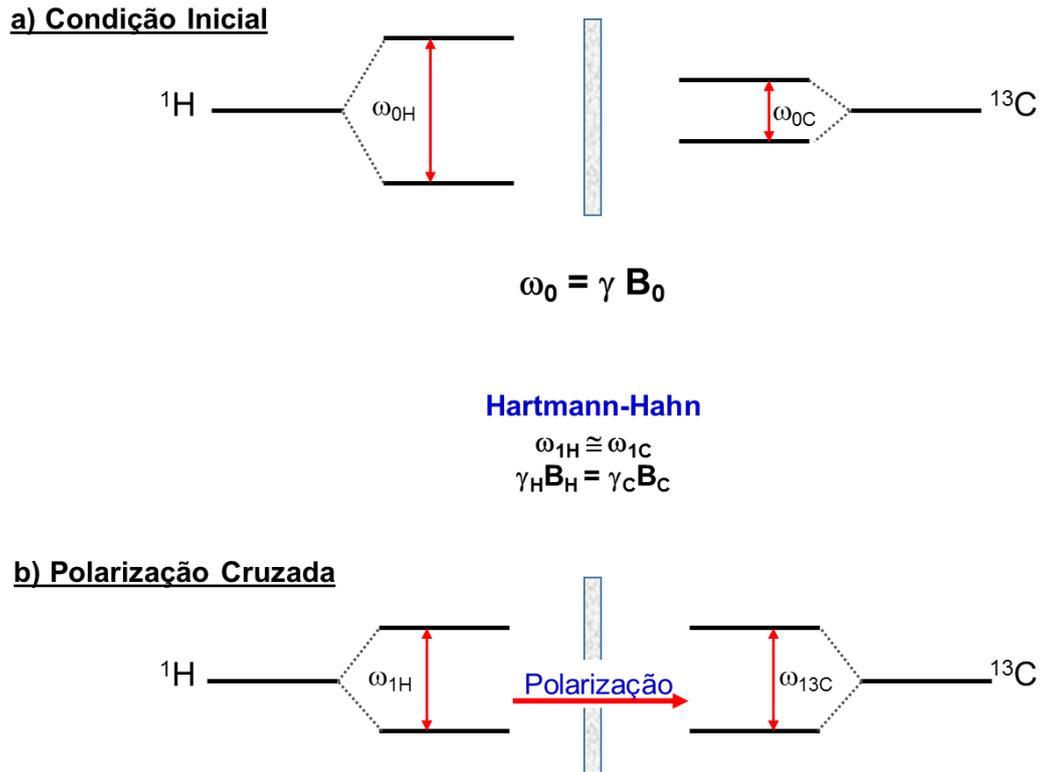


FIGURA 1.8 - Frequências de precessão para os núcleos de ^1H e ^{13}C quando submetidos ao mesmo campo magnético (a). A transferência de polarização ocorre quando as frequências de precessão são igualadas (b).

A descrição segundo formalismo de operadores de spins é bastante complexa, mas pode ser entendida pela aproximação da temperatura de spins, pois conforme a distribuição de Boltzmann (Equação 1.2), a temperatura de um sistema de spins varia com a diferença da população entre o estado de maior e menor energia (N_β e N_α , respectivamente). No caso do ^1H a diferença de população de spins é maior e por isso esse núcleo é chamado de frio, enquanto que para o ^{13}C a diferença de população de spins é pequena, e então este é chamado de núcleo quente. Quando ambos, ^1H e ^{13}C , estão em contato térmico ocorre o resfriamento dos spins de ^{13}C pela transferência de temperatura e este é o processo de polarização cruzada.

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/kT}$$

(Equação 1.2)

É importante ainda, compreender o processo de relaxação longitudinal no referencial rotativo ($T_{1\rho}$). Inicialmente os spins do núcleo mais sensível (^1H) são levados ao plano $x'y'$ e aplica-se um pulso de trava de spins (*spin lock*) em ambos os canais (^1H e ^{13}C) para fazer a transferência de magnetização $^1\text{H}\rightarrow\text{X}$ neste plano. Durante o período de trava dos spins os núcleos de ^1H permanecem apenas sob a influência de B_1 e relaxam com relação a este referencial, segundo uma constante de tempo dada por $T_{1\rho}$. Como simultaneamente se faz a trava dos spins de ^{13}C no plano $x'y'$, o tempo que estes núcleos permanecem em contato térmico (T_{CH}) é suficiente para que ocorra a transferência de polarização, a qual é dependente da interação dipolar entre ambos os núcleos. Após o período de trava de spins/tempo de contato faz-se a aquisição do sinal no canal do carbono-13. Quando possível, o experimento deve ser otimizado pela variação do período de contato, de tal maneira que a transferência da magnetização (polarização cruzada) seja a mais eficiente possível. Dessa maneira, é possível monitorar indiretamente essa transferência de magnetização $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$, que vai ser tão mais eficiente quanto mais rígido for o sistema, uma vez que a interação dipolar é mais forte e portanto $T_{1\rho}$ é longo e T_{CH} é curto. Nos casos em que o $T_{1\rho}$ é curto a transferência de magnetização $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$ é minimizada e, o sistema tende a restabelecer a condição inicial rapidamente, durante a qual passa a ocorrer a transferência de magnetização no sentido inverso, $^{13}\text{C}\rightarrow^1\text{H}$. Assim, quanto mais rápido for $T_{1\rho}$, mais rápida será a transferência inversa de magnetização, e o decaimento do sinal ocorrerá de maneira mais rápida (JURGA et al., 1994; KOLODZIEJSKI e KLINOWSKI, 2002). A condição ótima para esse processo seria de T_{CH} curto e $T_{1\rho}$ longo.

A eficiência da transferência de magnetização $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$ pode ser medida pelo tempo de polarização cruzada ou tempo de contato (T_{CH}), pois refere-se ao período de tempo necessário para que ambos os núcleos (^1H e ^{13}C) permanecem em contato térmico de maneira que a transferência de polarização seja a máxima possível. Este é um processo mediado essencialmente pela interação dipolar, portanto quanto mais rígido for o sistema mais rápida será a transferência de magnetização. Em geral, quanto maior o número de átomos de ^1H diretamente ligados ao átomo de ^{13}C , mais eficiente será a transferência de polarização. No entanto, vale lembrar que nos casos em que os grupos têm uma maior mobilidade, como por exemplo os grupos metila, a transferência de polarização não é muito

eficiente, sendo bastante comum observar sinais relativos a grupos metila menos intensos que grupos metilenos, e com intensidade similar a carbonos metínicos.

1.6 - Considerações teóricas sobre alguns experimentos de RMN no estado sólido

Atualmente, existem várias sequências de pulsos disponíveis para experimentos com amostras no estado sólido e a maioria delas utiliza a técnica de polarização cruzada. A polarização cruzada é uma metodologia utilizada para aumentar a sensibilidade de núcleos com baixa abundância natural e razão magnetogírica, como é o caso de núcleos muito analisados em moléculas orgânicas, incluindo carbono-13 e nitrogênio-15. A seguir, serão abordadas as técnicas aplicadas nesse estudo, ressaltando que cada uma delas fornecem informações diferentes, como será explorado. As principais técnicas utilizadas neste estudo foram: CP-MAS, CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CP-PI-TOSS. Para cada amostra o tempo de contato (t_c) foi otimizado para que a transferência de polarização fosse efetiva.

Para a calibração de deslocamento químico dos núcleos de hidrogênio-1 e carbono-13, foi utilizado o adamantano como referência externa, sendo que para os espectros de carbono-13 o sinal referente aos grupos CH_2 foi calibrado para 38,5 ppm e para o hidrogênio-1 o sinal foi calibrado para 1,9 ppm, ambos em relação ao tetrametilsilano (TMS). O núcleo de nitrogênio-15 foi calibrado a partir de uma amostra de glicina, com deslocamento químico de 11,6 ppm, em relação ao nitrato de amônio (NH_4NO_3).

1.6.1 - CP-MAS (*Cross Polarization Magic Angle Spinning*)

A técnica de CP-MAS é uma das mais simples e utilizadas na RMN no estado sólido. A FIGURA 1.9 ilustra essa sequência de pulsos sendo utilizada para aumentar a intensidade do núcleo X por meio da transferência de polarização do ^1H para X (por exemplo, ^{13}C e ^{15}N). Primeiramente, um pulso de 90° é aplicado no canal do ^1H para levar a magnetização ao plano $x'y'$, considerando os eixos de coordenadas girantes. Em seguida, um pulso para a trava de spins (*spin lock*) é aplicado e mantém os spins do ^1H no plano $x'y'$. Simultaneamente um pulso é aplicado no canal do núcleo X e, durante um período de tempo suficiente, ambos os núcleos (^1H e X) permanecem em contato térmico para que a transferência de polarização seja a máxima possível. Este período de tempo é chamado de tempo de contato. Mas, para que a transferência de polarização seja eficiente é necessário que a condição Hartmann-Hahn seja satisfeita, como descrito anteriormente (ver item 1.5.3). Em seguida, o desacoplador, de alta potência, é ligado no canal do ^1H enquanto o sinal de X é adquirido. Um inconveniente desta técnica é que, dependendo da rotação utilizada na execução do experimento, podem ser observadas muitas bandas laterais de rotação. Especificamente no caso da CP-MAS, essas bandas de rotação podem ser suprimidas utilizando rotações mais elevadas. Mas existem outras maneiras mais elegantes de eliminar essas bandas de rotação, baseadas na aplicação de diferentes sequências de pulsos, como a CP-TOSS.

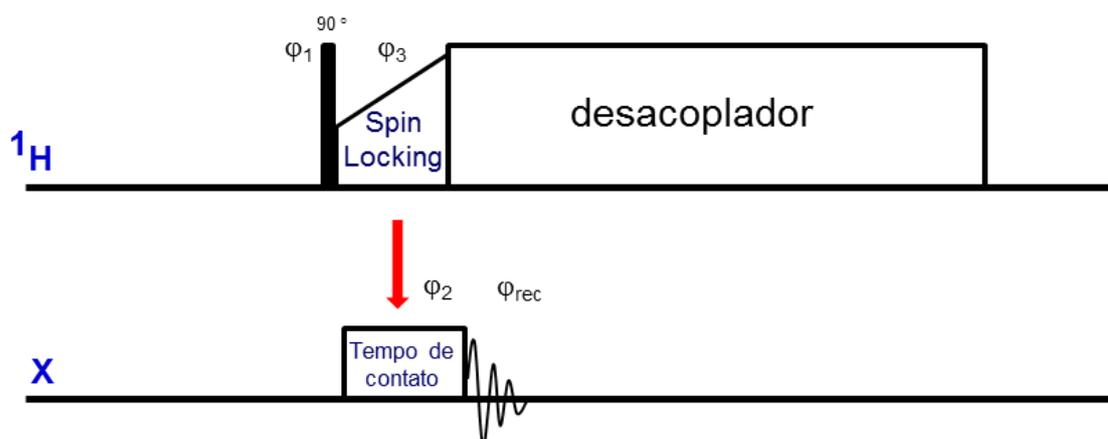


FIGURA 1. 9 - Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-MAS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc. As fases para cada pulso são dadas por $\varphi_1= 1\ 3$, $\varphi_2= 0\ 0\ 2\ 2\ 1\ 1\ 3\ 3$, $\varphi_3= 0$, $\varphi_{\text{rec}}= 0\ 2\ 2\ 0\ 1\ 3\ 3\ 1$.

1.6.2 - CP-TOSS (CP - Total Suppression of Sidebands)

A técnica de CP-TOSS foi um grande avanço na RMN no estado sólido experimental. Baseia-se na sequência de CP-MAS, acrescida de quatro pulsos de 180° aplicados com diferentes fases no canal X (FIGURA 1.10), e têm como função suprimir as bandas laterais, deixando apenas os sinais dos deslocamentos químicos isotrópicos. Esses pulsos são aplicados com um intervalo de tempo variável entre eles, durante os quais as frequências relativas às bandas laterais perdem coerência de fase e são completamente suprimidas, uma vez que são mais rápidas ou mais lentas que a frequência principal, relativa ao sinal isotrópico. A soma desses tempos coincide com o inverso da frequência de rotação, $1/\nu_R$, e as fases dos pulsos são aplicadas para corrigir imperfeições dos pulsos. Essa sequência é muito útil para amostras complexas, principalmente quando a medida é realizada em frequências de rotação mais baixas, muitas vezes por limitação da sonda. Algumas vantagens do uso de rotações mais baixas é que se promove uma economia do gás utilizado no sistema pneumático, e também é conhecido que a transferência de polarização é mais eficiente em baixas frequências de rotação, uma vez que o acoplamento dipolar é mais favorecido nestas condições. Nesse trabalho, utilizou-se uma rotação de 5 kHz para os experimentos de CP-TOSS, enquanto que para os experimentos de CP-MAS a frequência de rotação foi de 10 kHz.

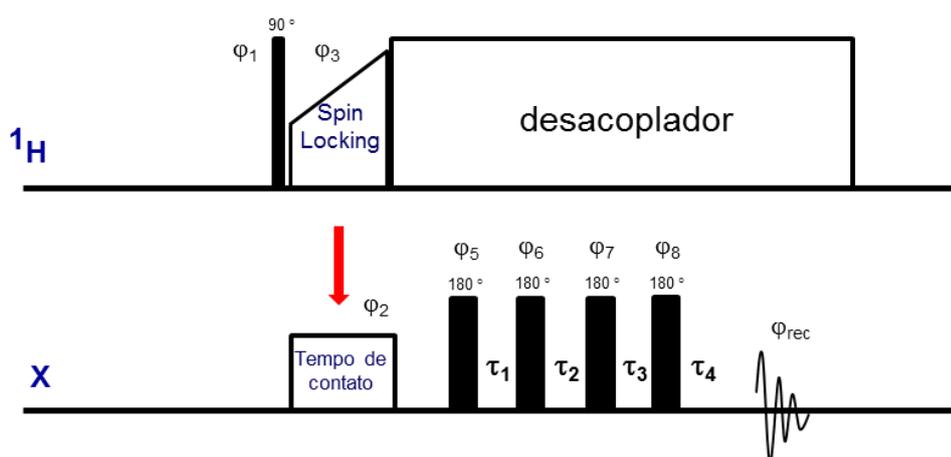


FIGURA 1. 10 - Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-TOSS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc. As fases para cada pulso são dadas por $\varphi_1= 2 0$, $\varphi_2= 1 1 2 2 3 3 0 0$, $\varphi_3= 3$, $\varphi_5= 1 1 2 2 3 3 0 0$, $\varphi_6= 3 3 0 0 1 1 2 2$, $\varphi_7= 3 3 0 0 1 1 2 2$, $\varphi_8= 0 0 3 3 2 2 1 1$, $\varphi_{\text{rec}}= 0 2 1 3 2 0 3 1$ e $\tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 \neq \tau_4$.

1.6.3 - CP-TOSS-NQS (CP-TOSS - *Non Quaternary Suppression*)

Outra sequência de pulsos muito utilizada, principalmente em sólidos orgânicos, é a CP-TOSS-NQS (FIGURA 1.11), também conhecida como defasagem dipolar (DD), pois baseia-se na rápida defasagem dos *spins* acoplados a ^1H através de interação dipolar heteronuclear. Através dessa sequência de pulsos é possível suprimir sinais de núcleos de átomos que estejam ligados diretamente a átomos de hidrogênios, permanecendo apenas núcleos não hidrogenados, como por exemplo carbonos quaternários (APPERLEY et al., 2012).

Essa sequência é semelhante à CP-TOSS, mas inclui uma pequena janela de tempo em que o desacoplador é desligado no canal do ^1H . Nesse período de tempo a magnetização dos núcleos X diretamente ligados ao núcleo de hidrogênio, e que se encontram fortemente acoplados, evoluem muito mais rapidamente que aqueles núcleos fracamente acoplados (por ex., carbonos quaternários). Nesta evolução há uma grande perda de coerência de fases e dessa forma os sinais destes núcleos desaparecem, permanecendo no espectro apenas os sinais relativos aos núcleos não hidrogenados. Portanto, o tempo τ_4 , chamado de tempo de defasamento dipolar, deve ser muito bem ajustado para que os resultados esperados sejam obtidos com o máximo de intensidade, uma vez que durante esse período o processo de relaxação longitudinal também está ocorrendo; e em geral esse tempo varia entre 30 e 100 μs , que corresponde ao inverso das constantes de acoplamento dipolar entre ^1H e X, $1/D_{\text{H-X}}$, as quais são da ordem de 10 a 30 kHz. O pulso de 180° é utilizado para refocalizar os núcleos fracamente acoplados que evoluem lentamente.

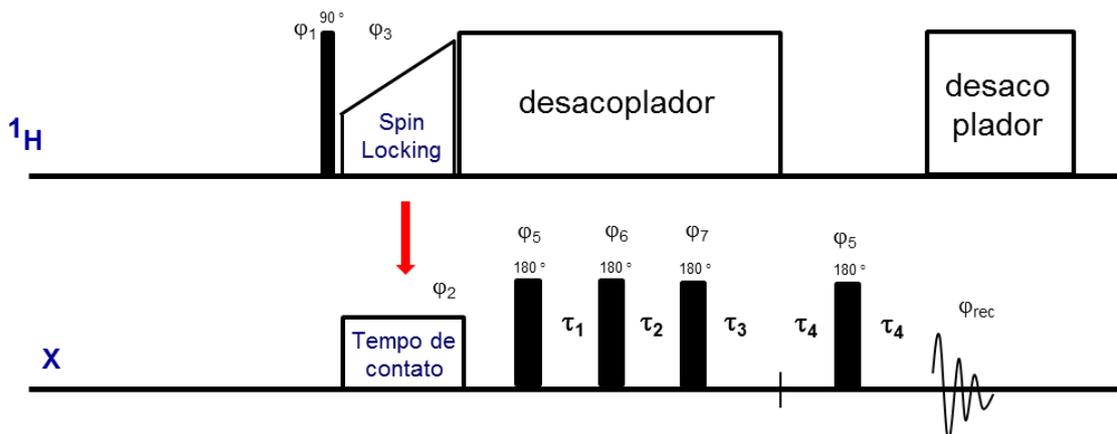


FIGURA 1. 11 - Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-TOSS-NQS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc. As fases para cada pulso são dadas por $\varphi_1 = 20$, $\varphi_2 = 11223300$, $\varphi_3 = 3$, $\varphi_5 = 11223300$, $\varphi_6 = 33001122$, $\varphi_7 = 33001122$, $\varphi_{\text{rec}} = 02132031$ e $\tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 \neq \tau_4$.

1.6.4 - CP-PI-TOSS (CP combined with Polarization Inversion - TOSS)

O experimento *Cross Polarization combined with Polarization Inversion* é muito útil na atribuição de sinais de carbono, quando se tem um espectro com muitos sinais ou mesmo quando há intensa sobreposição de sinais, sendo possível distinguir os tipos de ^{13}C (ou ^{15}N) presentes na estrutura (CH_3 , CH_2 , CH ou quaternário). Cada um desses grupos apresenta uma defasamento dipolar heteronuclear diferente, já que o acoplamento dipolar entre eles não é o mesmo. Essa sequência de pulsos (FIGURA 1.12a) é semelhante à de CP-MAS, mas o período de *spin lock* é acrescido pela aplicação de um pulso de inversão (parâmetro *p16* em equipamentos Bruker) de diferente fase. Durante o período do pulso as magnetizações evoluem de acordo com suas constantes de acoplamento dipolar. Se bem ajustado, o uso deste pulso permitirá obter um espectro em que os sinais de carbonos quaternários e CH_3 são positivos, CH_2 são negativos e CH são nulos. A largura deste pulso pode variar entre 40 e 100 μs , e deve ser ajustada pelo monitoramento da anulação do sinal de CH . Na FIGURA 1.12b, está ilustrada a ordem em que os núcleos de carbono relaxam no referencial rotatório, segundo seus valores de $T_{1\rho}$, e isso ocorre de acordo com a sua natureza (SANGILL et al., 1994). A princípio, poderíamos esperar que o CH_3 relaxasse mais rapidamente, porém o

acoplamento dipolar mais fraco em função da maior mobilidade dificulta o processo de relaxação. Ainda é possível, neste mesmo experimento, realizar a supressão de bandas laterais através do incremento TOSS.

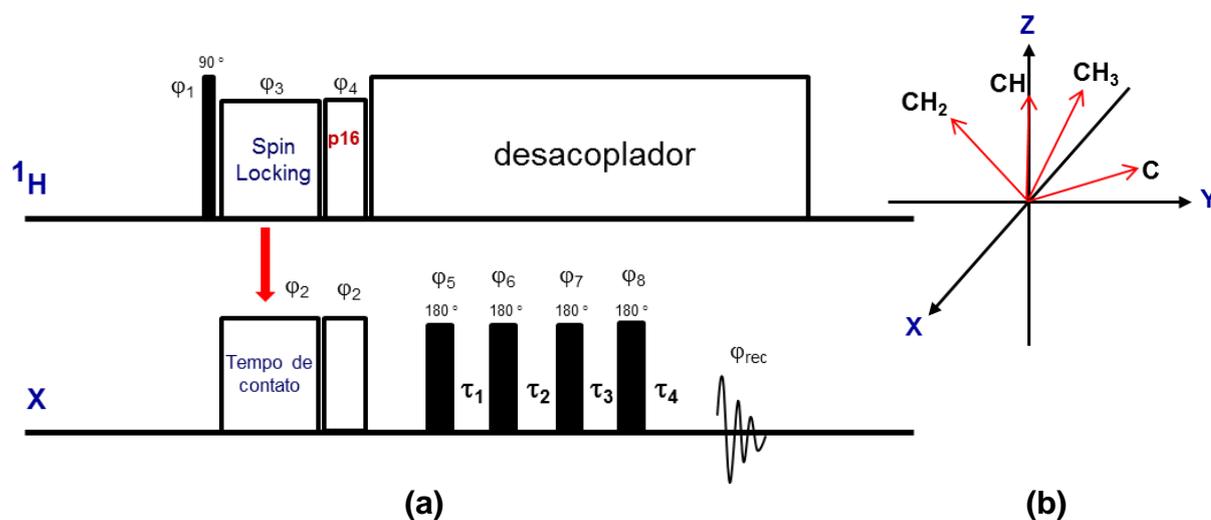


FIGURA 1. 12 - (a) Diagrama representativo da sequência de pulsos CP-PI-TOSS, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc. As fases para cada pulso são dadas por $\varphi_1= 1\ 3$, $\varphi_2= 0\ 0\ 2\ 2\ 1\ 1\ 3\ 3$, $\varphi_3= 0$, $\varphi_4= 2$, $\varphi_5= 1\ 1\ 2\ 2\ 3\ 3\ 0\ 0$, $\varphi_6= 3\ 3\ 0\ 0\ 1\ 1\ 2\ 2$, $\varphi_7= 3\ 3\ 0\ 0\ 1\ 1\ 2\ 2$, $\varphi_8= 0\ 0\ 3\ 3\ 2\ 2\ 1\ 1$, $\varphi_{\text{rec}}= \varphi_1 + \varphi_2$ e $\tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 \neq \tau_4$; (b) Ordem de relaxação no referencial rotatório dos diferentes tipos de carbono.

1.6.5 - Estimativa de T_1^{H}

A estimativa e/ou a determinação precisa do tempo de relaxação longitudinal do núcleo de hidrogênio (T_1^{H}) é um experimento importantíssimo em RMN, seja no estado sólido ou líquido, uma vez que os aspectos quantitativos da técnica de RMN dependem desse parâmetro. Existem algumas sequências de pulsos que possibilitam essa medida e a sequência de Inversão-Recuperação é uma das mais utilizadas. No entanto, no estado sólido é muito difícil determinar os valores de T_1 através dessa técnica, tanto considerando o núcleo de carbono-13 quanto o de hidrogênio. No caso do carbono-13, tanto o tempo de relaxação, excessivamente longo, quanto a baixa abundância natural desse núcleo são os principais empecilhos. Já no caso do hidrogênio, o intenso acoplamento dipolar ^1H - ^1H causa um alargamento muito grande dos sinais e não é possível adquirir espectros com alta resolução, se for utilizada a detecção direta deste núcleo.

A maneira mais apropriada de determinar T_1^H em estado sólido é através da técnica de CP-MAS, uma vez que a polarização cruzada depende, na prática, somente da relaxação dos núcleos de hidrogênio. Neste caso a relaxação dos núcleos de hidrogênio é monitorada através da aquisição do sinal de carbono-13, a qual é descrita na sequência. A FIGURA 1.13 ilustra a sequência de pulsos utilizada neste trabalho para a determinação de T_1 dos núcleos de hidrogênio. Primeiramente, um pulso de radiofrequência de 90° é aplicado no canal do 1H para gerar magnetização no plano $x'y'$ e espera-se um determinado tempo (τ) para que os núcleos de hidrogênio relaxem longitudinalmente. Deve-se enfatizar que o pulso no canal do 1H deve estar muito bem calibrado para a execução deste experimento. Em seguida, é aplicada a sequência de pulso CP-MAS convencional.

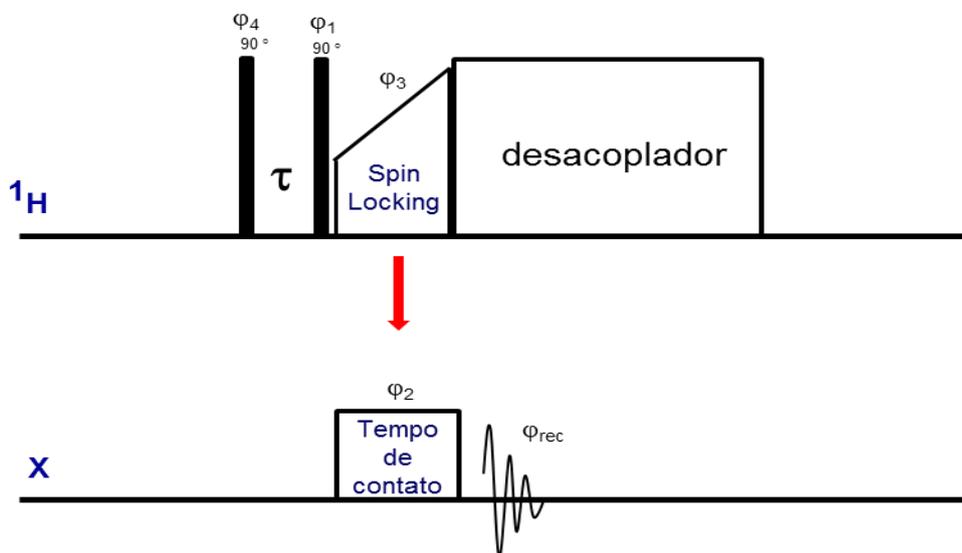


FIGURA 1. 13 - Diagrama representativo da sequência de pulso para a determinação de T_1^H para amostras no estado sólido. As fases para cada pulso são dadas por $\phi_1= 1\ 3$, $\phi_2= 0\ 0\ 2\ 2\ 1\ 1\ 3\ 3$, $\phi_3= 0$, $\phi_4= 0\ 2$, $\phi_{rec} = 0\ 2\ 2\ 0\ 1\ 3\ 3\ 1$.

Se $\tau \approx 0$, praticamente nenhum núcleo terá iniciado o processo de relaxação, e então, se for aplicado outro pulso de 90° nos canais de 1H e ^{13}C , o vetor magnetização referente ao núcleo de 1H irá para o eixo negativo de z . Dessa forma, não ocorre a polarização cruzada, uma vez que a magnetização relativa aos hidrogênios não se encontra mais no plano $x'y'$; mas ortogonal a magnetização do núcleo de carbono, e assim nenhum sinal de ^{13}C será observado (FIGURA 1.14a). À medida que τ vai aumentando, a relaxação vai progredindo e parte do vetor magnetização 1H já terá retornado a sua condição inicial, no eixo z positivo (FIGURA

1.14b). Assim, quando o segundo pulso de 90° for aplicado, a parte do vetor magnetização relativo aos hidrogênios que já relaxou completamente será novamente levada ao plano $x'y'$ e, portanto, a polarização cruzada agora irá ocorrer de acordo com o número de *spins* de ^1H existentes no plano $x'y'$. Dessa maneira, a intensidade do sinal de carbono-13 passa a aumentar gradativamente, conforme o intervalo de tempo entre o primeiro e o segundo pulso de 90° no canal do ^1H vai aumentando. Quando todos os núcleos relaxarem completamente, o segundo pulso de 90° no canal do hidrogênio levará toda a magnetização para o plano $x'y'$ e a transferência de polarização será máxima (FIGURA 1.14c). O aumento da intensidade do sinal de carbono segue um comportamento exponencial, de acordo com a equação $M_z(t) = M_0(1 - \exp(-t/T_1))$, em que a constante de decaimento é igual a T_1^{H} . Portanto, um ajuste exponencial permite a determinação da constante do decaimento. Nesse estudo, as medidas de tempo de relaxação T_1^{H} foram realizadas com a variação do tempo τ de 10 ms a 60 s, e também com o uso de um intervalo de tempo entre experimentos (d1) de 20 s.

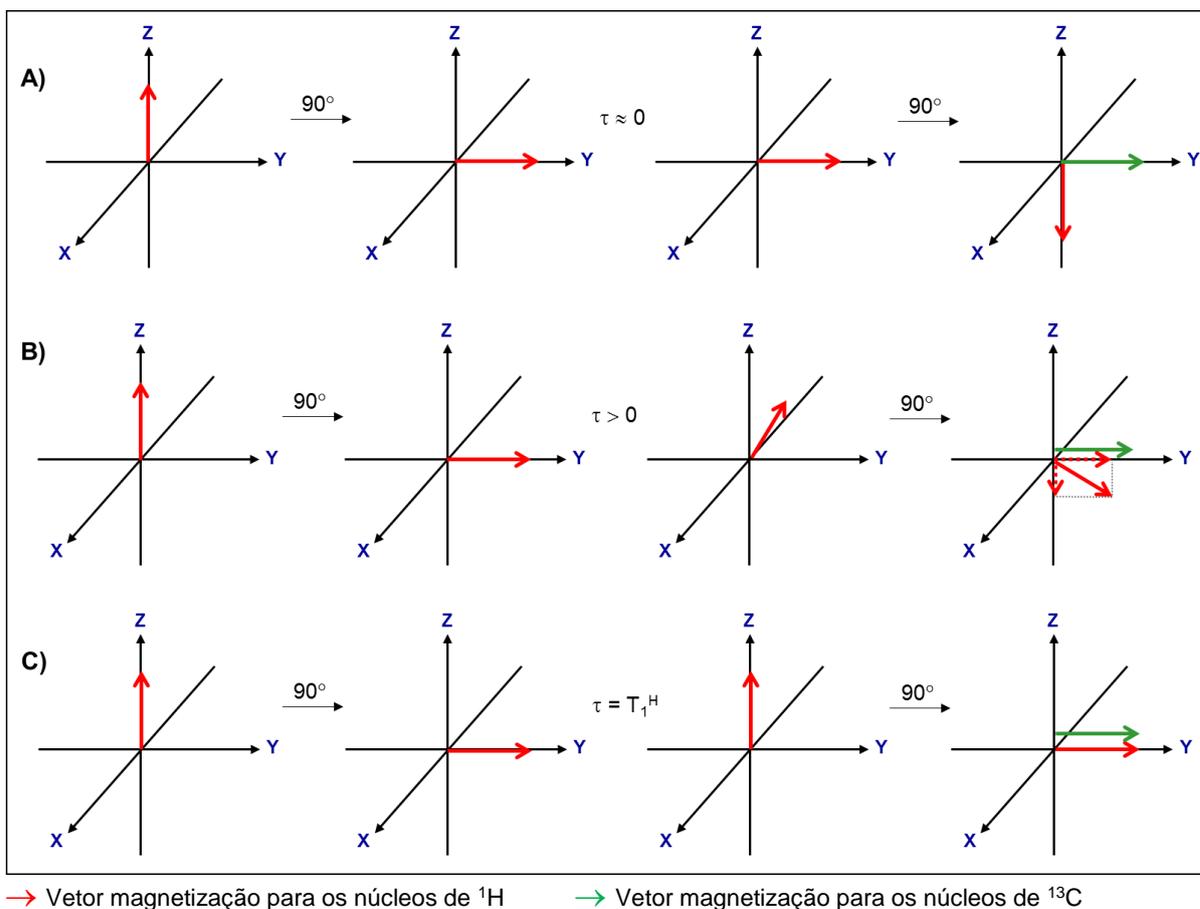


FIGURA 1. 14 - Ilustração vetorial do comportamento da magnetização durante o experimento de determinação indireta de T_1^{H} , via CP-MAS.

1.6.6 - X-¹H FSLG HETCOR (*Frequency Switched Lee-Goldburg Heteronuclear Correlation*)

Esse experimento permite obter informações sobre ligações diretas entre hidrogênio e outros núcleos através da obtenção de um mapa de correlações heteronucleares como ¹H-¹³C, ¹H-¹⁵N, entre outros. A sequência de pulsos que é utilizada para executar esse experimento é apresentada na FIGURA 1.15. A sequência é igual a de um experimento CP-MAS, porém com a introdução de um incremento responsável por eliminar e/ou minimizar o acoplamento dipolar ¹H-¹H, mas preservando o acoplamento ¹H-X. Este incremento é o bloco de evolução (*Frequency Switched Lee-Goldburg*, FSLG) contido em qualquer esquema de experimento bidimensional, e aqui se refere ao período de tempo t_1 . O período de tempo t_1 , que é variável, consiste na aplicação de um trem de pulsos de 360° com fases opostas com uma frequência fora da ressonância (em torno de 2 kHz). As diferentes fases também minimizam problemas com a imperfeição dos pulsos. Um requisito importante é trabalhar com uma irradiação simultânea de uma ampla faixa de frequências, e para isso o campo associado deve ser de 80 a 100 kHz para que uma boa eficiência seja alcançada no desacoplamento. Para tanto é necessário usar altas frequências de rotação da amostra, 10 kHz ou maiores. Durante t_1 os *spins* dos prótons evoluem de acordo com suas diferentes constantes de acoplamento dipolar, de maneira que ao final ocorre uma interferência destrutiva e o acoplamento é cancelado, ou ao menos minimizado. Dessa maneira, o objetivo é minimizar o acoplamento dipolar homonuclear ¹H-¹H, observando apenas o acoplamento dipolar heteronuclear ¹H-X e, assim, os sinais obtidos indiretamente, referentes ao ¹H, passam a apresentar suas linhas menos alargadas na dimensão relativa a projeção do espectro de ¹H (dimensão F1). Como consequência é possível obter indiretamente um espectro de ¹H um pouco melhor resolvido. Se o objetivo da análise é a visualização de acoplamentos entre núcleos diretamente ligados, o tempo de contato deve ser o mais curto possível, em geral variam entre 50 e 500 μ s. Porém quando se deseja avaliar acoplamentos entre núcleos um pouco mais distantes, por exemplo aqueles possivelmente envolvidos em ligações de hidrogênio intra ou intermoleculares, o tempo de contato pode ser aumentado para 500-1000 μ s, por exemplo. O aumento do tempo de contato deve ser feito com cuidado, uma vez que aparecem muitos sinais devido ao processo de difusão de *spins*, e então há

o aparecimento de correlações inespecíficas entre todos os núcleos observados. Nesta seqüência de pulsos o tempo de contato é o tempo de mistura.

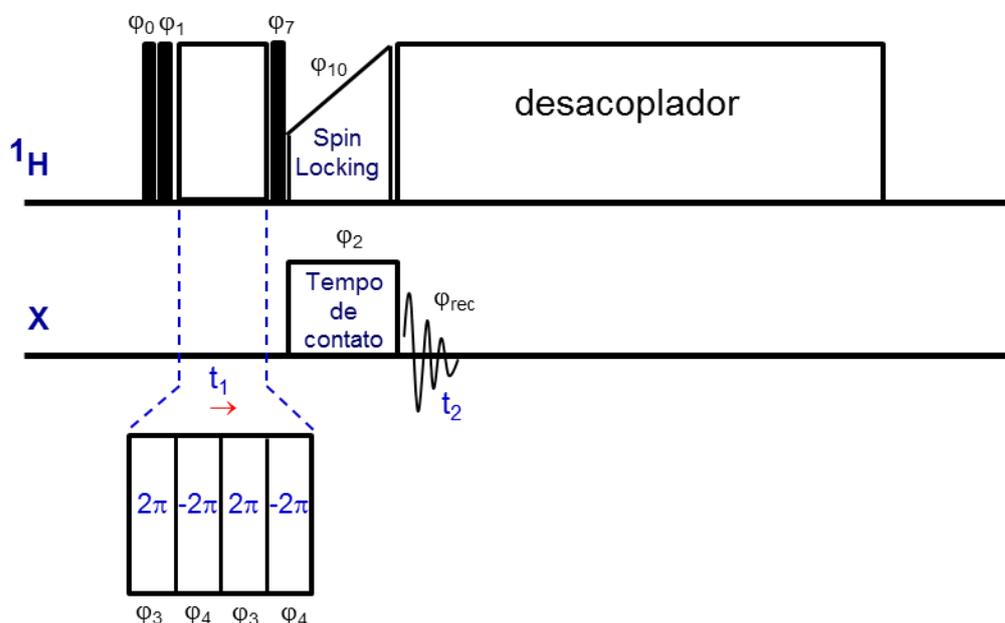


FIGURA 1. 15 - Diagrama representativo da seqüência de pulsos para o experimento bidimensional $^1\text{H-X}$ FSLG HETCOR, em que X pode ser ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , ^{29}Si , etc. As fases para cada pulso são dadas por $\varphi_0=1$, $\varphi_1=3$, $\varphi_1=1$, $\varphi_2=0$, $\varphi_2=0$, $\varphi_2=2$, $\varphi_2=2$, $\varphi_7=1$, $\varphi_7=1$, $\varphi_7=3$, $\varphi_7=3$, $\varphi_3=0$, $\varphi_4=2$, $\varphi_7=3$, $\varphi_{10}=0$, $\varphi_{\text{rec}}=0$, $\varphi_{\text{rec}}=2$, $\varphi_{\text{rec}}=2$, $\varphi_{\text{rec}}=0$, $\varphi_{\text{rec}}=1$, $\varphi_{\text{rec}}=3$, $\varphi_{\text{rec}}=3$, $\varphi_{\text{rec}}=1$.

1.7 - Substâncias alvo

Nesse trabalho, será apresentado o estudo de três fármacos, dando ênfase para a técnica de RMN no estado sólido: o mebendazol, nas suas formas polimórficas A e C; a dietilcarbamazina nas formas livre, citrato e maleato; e o ácido micofenólico, bem como a sua forma éster mofetil.

1.7.1 - Mebendazol (MBZ)

O mebendazol [(5-benzoíla-1H-benzimidazo-2-il) carbamato de metila; $M=295,29$ g.mol $^{-1}$; $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$; FIGURA 1.16], um potente vermífugo, é muito utilizado pela população que vive na zona rural e em áreas urbanas de baixa renda. Sua ação principal é contra vermes helmínticos, como por exemplo, *Ascaris*

lumbricoides (ascaridíase), *Enterobius vermicularis* (oxiuríase), entre outros. A literatura também relata sua ação contra vários tipos de câncer, como o carcinoma adrenocortical e o melanoma (MARTARELLI et al., 2008; DOUDICAN et al., 2008).

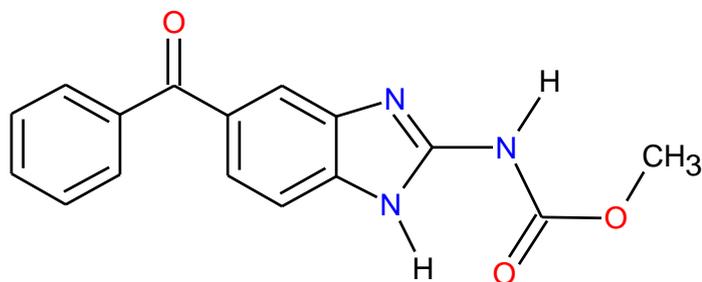


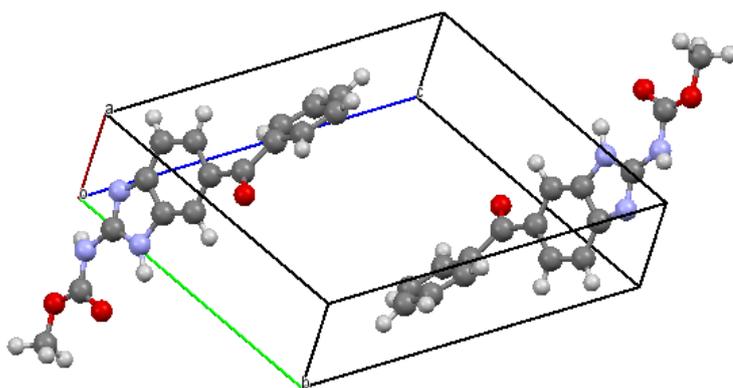
FIGURA 1. 16 - Estrutura do composto mebendazol.

São conhecidas três diferentes formas cristalinas para o mebendazol, as formas **A**, **B** e **C**, sendo que a estrutura cristalina das formas **A** e **C** já foram identificadas por difração de raios X por pó e por monocristal, respectivamente (FERREIRA et al., 2010; MARTINS et al., 2009). Essas duas formas também são as mais ocorrentes, sendo a forma **A** mais estável, de solubilidade extremamente baixa e não apresenta atividade anti-helmíntica quando está sozinha ou quando presente acima de 30% em uma mistura polimórfica. A forma **B** é o polimorfo mais instável, mais solúvel e apresenta um certo grau de toxicidade. Já a forma **C** é a de maior interesse farmacológico porque a sua solubilidade garante uma boa biodisponibilidade (SWANEPOEL et al., 2003). As formas **A** e **C** são as mais encontradas no mercado e, no Brasil, esse medicamento pode ser adquirido sem prescrição médica. Dessa forma, é necessário identificar a forma polimórfica presente no produto comercial e, caso haja mistura de diferentes formas, determinar a quantidade de cada uma, já que a atividade farmacológica é fortemente dependente do polimorfismo.

Alguns estudos foram realizados com espectroscopia de infravermelho para verificar as diferenças entre os polimorfos em amostras padrão e comerciais do mebendazol (ABOUL-ENEIN et al., 2002; FROEHLICH e GASPAROTTO, 2005; AYALA et al., 2008). Dois desses estudos também utilizaram os resultados obtidos por *Diffuse Reflectance Infrared Spectroscopy* (DRIFTS) e ferramentas quimiométricas para qualificar e quantificar as amostras (ABOUL-ENEIN et al., 2002; KACHRIMANIS et al., 2010). AYALA e colaboradores (2008), por sua vez, empregou a espectroscopia Raman e observou que as diferenças entre as amostras estão na

intensidade dos sinais e não na posição dos mesmos, exceto no caso do grupos NH e carboxila, os quais fornecem a impressão digital dessas formas polimórficas. A combinação de análise térmica (DSC) e difração raios X pelo método do pó (XRPD) foi empregada para verificar a estabilidade térmica da forma **C**, e os resultados mostraram que entre a temperatura ambiente e aproximadamente 179 °C esse polimorfo é estável (VILLIERS et al., 2005).

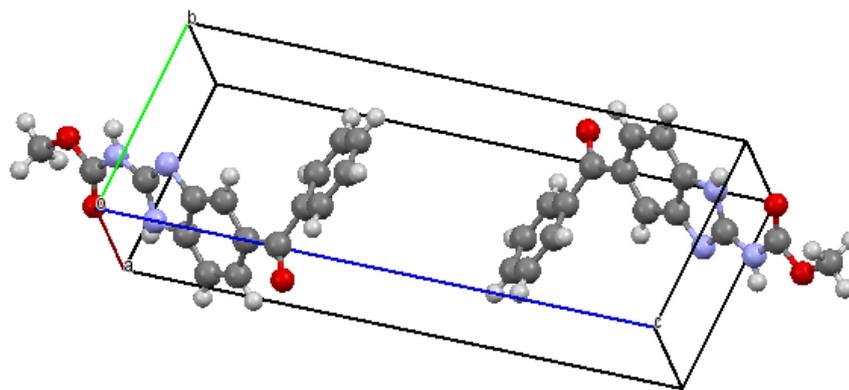
Recentemente, a caracterização das estruturas cristalinas das formas **A** e **C** do mebendazol (MBZA e MBZC, respectivamente) foi reportada na literatura. A estrutura cristalina do mebendazol A foi determinada através de dados obtidos por *High-Resolution Synchrotron X-Ray Powder Diffraction* (difração de raios X de alta resolução por radiação sincrotron) (FERREIRA et al., 2010) apresentando duas moléculas por cela unitária (FIGURA 1.17).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 1. 17 - Cela unitária da forma **A** do mebendazol (FERREIRA et al., 2010).

A estrutura cristalina da forma **C** do mebendazol foi resolvida utilizando-se a técnica de difração de raios X por monocristal (MARTINS et al., 2009), e apresentou duas moléculas na cela unitária (FIGURA 1.18).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 1. 18 - Cella unitária da forma **C** do mebendazol (MARTINS et al., 2009).

Os estudos por raios X para as formas **A** e **C** do mebendazol foram imprescindíveis para a determinação da estrutura cristalina, no entanto, é importante lembrar que para amostras comerciais, onde há a presença de excipientes, é necessária a utilização de outras técnicas, inclusive na rotina de controle de qualidade. Considerando que cada uma das técnicas possui limitações, a RMN no estado sólido pode ser inserida para complementar o conjunto de informações sobre cada um dos polimorfos do mebendazol, até mesmo apresentando dados quantitativos, no caso de mistura de polimorfos.

1.7.2 - Dietilcarbamazina (DEC)

A dietilcarbamazina (*N,N*-dietil-4-metil-1-carboxpiperazinamida; $M=199,29 \text{ g mol}^{-1}$; $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$; FIGURA 1.19a) é um vermífugo altamente potente na eliminação de vermes adultos de *Wuchereria bancrofti*, agente causador da filariose, doença conhecida popularmente como elefantíase (NORÕES et al., 1997). A DEC é usada na forma de sal de citrato (FIGURA 1.19b), pois é muito estável em temperatura ambiente e solúvel em água. Todavia, sua meia vida no sangue é bastante curta, ou seja, em pouco tempo a concentração do medicamento diminui, e é eliminado pela urina com muita facilidade. No Brasil, este medicamento não é comercializado, a distribuição é feita pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que disponibiliza apenas aos pacientes em tratamento.

A DEC citrato também é estável em temperaturas normais de cozimento dos alimentos, o que viabiliza a sua administração junto ao sal de cozinha, podendo assim, contribuir de maneira significativa com a redução da microfilaremia. A adição deste fármaco ao sal de cozinha já tem sido realizada em estudos piloto no Brasil e em outros países, como na China e no Haiti (HAWKING e MARQUES, 1967; LIU et al., 1992; FREEMAN et al., 2001).

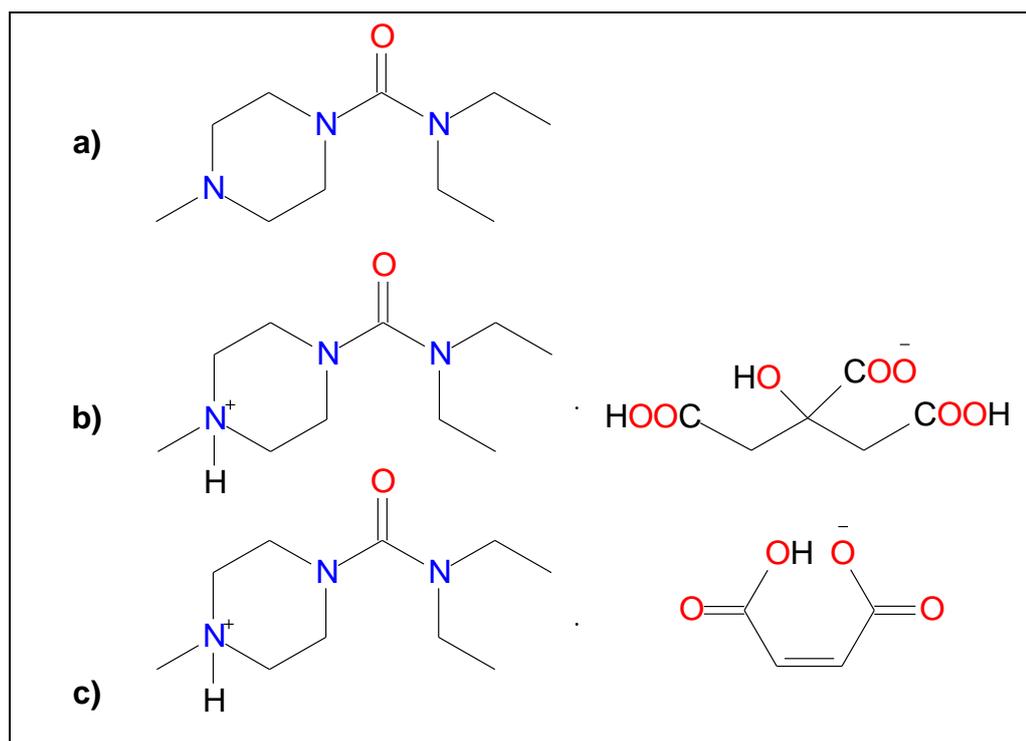
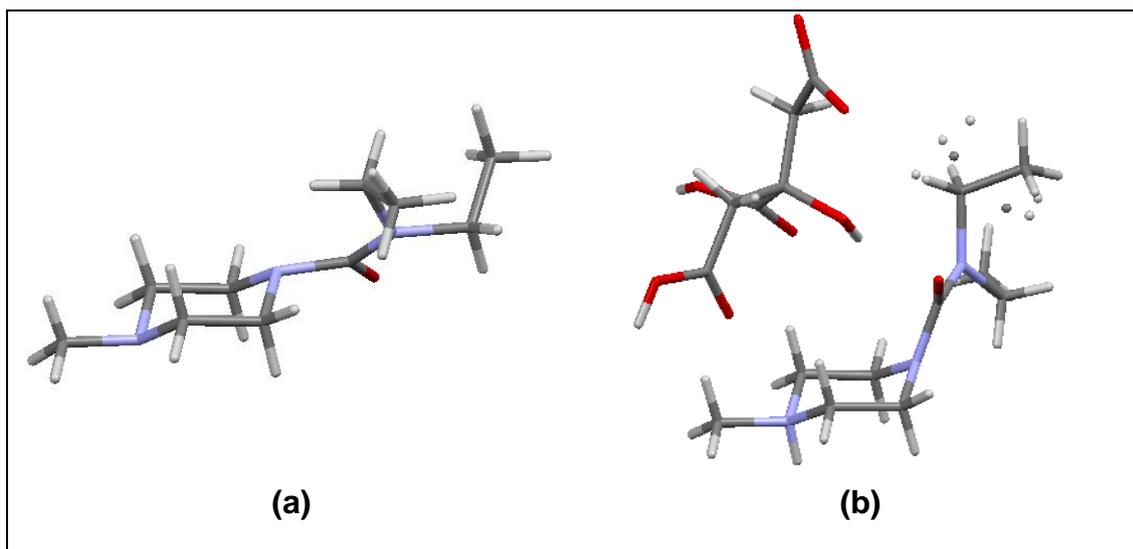


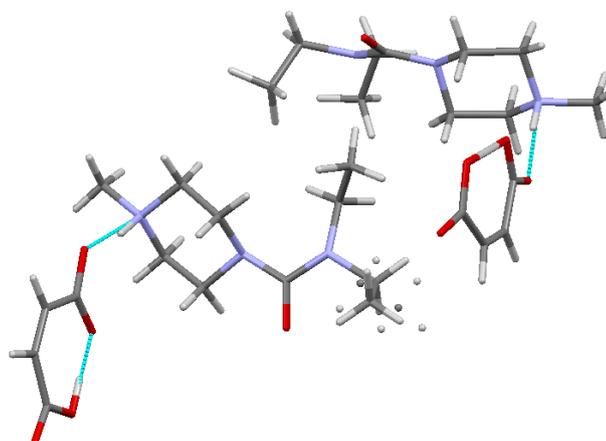
FIGURA 1.19 - Estruturas da (a) DEC livre (b) DEC citrato e (c) DEC maleato.

Em 2010, as formas cristalinas da DEC livre e da DEC citrato foram investigadas e nesse trabalho está descrita a determinação de quatro fases cristalinas da DEC citrato por cristalografia de raios X em diferentes temperaturas (SILVA, 2010; SILVA et al., 2010). As fases denominadas I, II, III e IV foram determinadas a 20, -38, -123 e -173 °C, respectivamente, e a principal diferença entre as fases está na conformação das duas caudas etílicas ligadas ao grupo carbamóil. No entanto, o estudo com variação de temperatura para a DEC livre (-23, -73 e -123 °C) não mostrou diferenças muito significativas na estrutura cristalina nessa faixa de temperatura, e portanto, não houve transição de fase (FIGURA 1.20).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).
 FIGURA 1.20 - Unidade assimétrica da (a) DEC livre em -123 °C e (b) DEC citrato em 20 °C (SILVA, 2010).

Outro estudo (SILVA, et al.), ainda não publicado, vem sendo realizado com a DEC maleato (FIGURA 1.19c) e mostra que esta apresenta dois pares iônicos, DEC⁺ e maleato⁻, por unidade assimétrica em temperatura ambiente e quando submetida à baixa temperatura (-73 °C) (FIGURA 1.21).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).
 FIGURA 1. 21 - Unidade assimétrica da DEC maleato (SILVA et al.).

As duas unidades de DEC⁺ presentes na célula unitária são confôrmeros bastante similares, denominados A e B, e em temperatura ambiente, o confôrmero A apresenta um dos grupos etila desordenado (70% *syn* e 30% *anti* em relação ao grupo piperazina). No confôrmero B não há desordem dos grupos etilas.

O estudo por RMN no estado sólido pode corroborar com os dados obtidos por cristalografia de raios X, fornecendo informações que confirmam transições de fase em função da variação de temperatura e padrões de ligações de hidrogênio, principalmente nos sistemas [DEC⁺ citrato] e [DEC⁺ maleato].

1.7.3 - Ácido micofenólico (AMF)

O ácido micofenólico [ácido (4E)-6-(4-hidróxi-6-metóxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidro-2-benzofurano-5-il)-4-metil-hex-4-enoico; M= 320,34 g mol⁻¹; C₁₇H₂₀O₆; FIGURA 1.22], isolado de espécies de fungos do gênero *Penicilium*, apresenta várias atividades biológicas, destacando-se, entre essas, seu efeito imunossupressor, o que permite ser amplamente utilizado por pacientes que foram submetidos a transplantes de órgãos (BULLINGHAM et al., 1998). O uso clínico é feito, principalmente, através do micofenolato de mofetila (MMF, FIGURA 1.23), um pró-fármaco, que ao ser metabolizado através de esterases intestinais, plasmáticas e hepáticas, libera e aumenta a biodisponibilidade do AMF, que quando sozinho é muito instável (ALLISON e EUGUI, 1996).

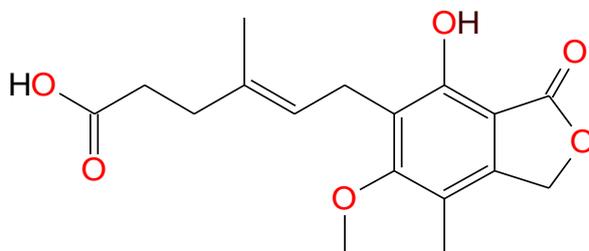


FIGURA 1. 22 - Estrutura do Ácido Micofenólico (AMF).

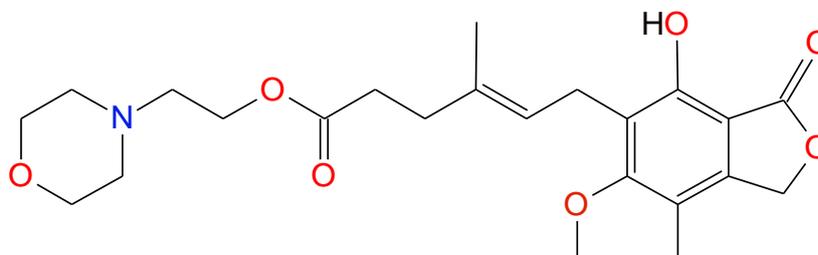
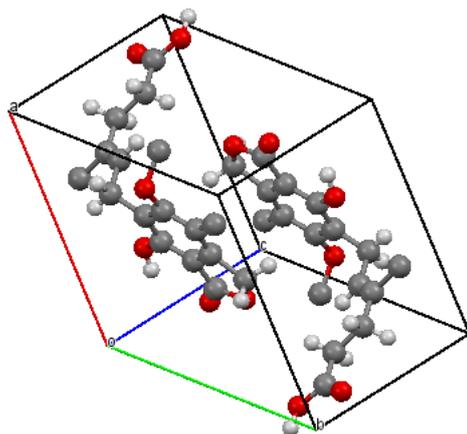


FIGURA 1. 23 - Estrutura do Micofenolato de mofetila (MMF).

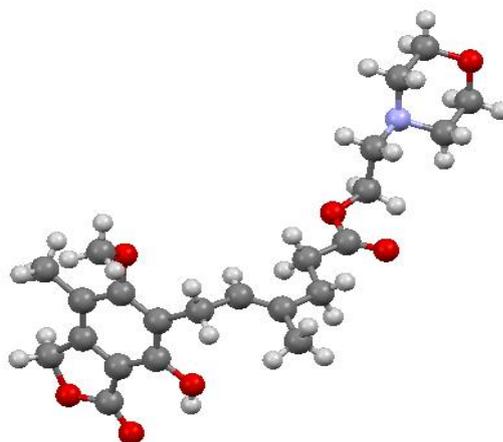
A estrutura cristalina do AMF já é conhecida desde 1972, quando HARRISON e colaboradores publicaram um estudo apresentando a estrutura cristalina do ácido micofenólico, na qual se observava duas moléculas na cela unitária. Toda a estrutura do AMF pode ser retratada em apenas dois planos - um constituído pelos dois anéis e o outro pela cadeia lateral (FIGURA 1.24).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 1. 24 - Cela unitária do ácido micofenólico (HARRISON et al., 1972).

A estrutura cristalina do micofenolato de mofetila [(4E)-6-(4-hidróxi-6-metóxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidro-2-benzofurano-5-il)-4-metil-hex-4-enoato de etanol-morfolina; M= 433,44 g.mol⁻¹; C₂₃H₃₁NO₇; FIGURA 1.25] foi determinada através dos dados obtidos por difração de raios X por monocristal e apresentou quatro moléculas na cela unitária (YATHIRAJAN et al., 2004).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 1. 25 - Unidade assimétrica do micofenolato de mofetila (YATHIRAJAN et al., 2004).

A obtenção e caracterização do ácido micofenólico foi objeto de uma patente pelo laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar, sendo obtido através da fermentação de fungos presentes em grãos de café (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2007), no entanto, poucos estudos quanto às suas possíveis formas polimórficas são encontrados na literatura. Assim, a RMN no estado sólido pode contribuir oferecendo dados adicionais ao estudo desse sólido farmacêutico.

A escolha desses fármacos deve-se principalmente ao acesso às formas polimórficas isoladas e já determinadas por raios X para as duas primeiras substâncias, mebendazol (nas formas **A** e **C**) e dietilcarbamazina (livre, citrato e maleato) e, principalmente, porque são fármacos amplamente utilizados para o tratamento de doenças típicas do nosso país e de países menos favorecidos economicamente. Por serem fármacos utilizados no tratamento de doenças negligenciadas, pouca atenção é dada a eles e, como relatado anteriormente, existem problemas associados às suas diferentes formas cristalinas que podem acarretar em prejuízos aos usuários destes medicamentos, que muitas vezes os consomem mesmo sem prescrição médica. Portanto, é necessário que haja um controle maior para que se comercialize de fato o produto de melhor qualidade. No caso específico do ácido micofenólico (e seu éster mofetil), a obtenção foi através de compra e o interesse no estudo se deu por observar sua baixa solubilidade quando recristalizado em metanol e por não haver trabalhos que descrevam a possível existência de polimorfos. Além dessas considerações, vale a pena ressaltar que pouquíssimos grupos de pesquisa em RMN e no Brasil tem utilizado essa técnica para a análise de polimorfismo aplicados a fármacos, e uma contribuição significativa pode ser dada nesse sentido.

OBJETIVO

2 – OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo estudar sólidos farmacêuticos através das técnicas de RMN no estado sólido, utilizando as seguintes matrizes:

- Mebendazol
 - amostras padrão das formas **A** e **C**;
 - amostras comerciais obtidas no mercado nacional, visando o controle de qualidade;

- Dietilcarbamazina
 - amostras padrão das formas livre, citrato e maleato;

- Ácido micofenólico
 - amostras comerciais do ácido e do seu éster mofetil.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 - Infraestrutura e técnicas utilizadas

3.1.1 - Difração de raios X por pó (DRX) e Espectroscopia Raman

Inicialmente, as amostras padrão de mebendazol nas formas polimórficas A e C (fornecidas pela GeoLab Indústria Farmacêutica) e citrato de dietilcarbamazina (fornecida pelo grupo da Dra. Nubia Boechat, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FioCruz, Rio de Janeiro), foram analisadas por difração de raios X por pó e espectroscopia Raman. Os experimentos de difração de raios X por pó foram realizados em temperatura ambiente usando radiação Cu K α (Rigaku D/MAX 200 com um ânodo rotatório operando em 150 kV e 40 mA) com a faixa de 2 θ com variação de 3° a 55° e os espectros de Raman foram coletados entre 0 e 4000 cm⁻¹ por um espectrômetro Raman (FT-Raman, Bruker RFS 100/S). Esses experimentos foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da UFSCar (LIEC-UFSCar), em colaboração com o Prof. Dr. Emerson Rodrigues Camargo.

3.1.2 - Espectrômetro de RMN

Os experimentos de RMN no estado sólido foram realizados em um espectrômetro da marca Bruker, modelo Avance-III-400, o qual opera com um campo magnético de 9,4T (399,94 MHz para frequência do hidrogênio-1, 100,57 MHz para carbono-13 e 40,5 MHz para nitrogênio-15) produzido pela Oxford Instruments. Esse equipamento está instalado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar e é equipado com uma sonda (narrow bore) para rotores de 4mm de diâmetro externo e giro no ângulo mágico. Os rotores utilizados podem ser girados em rotações máximas de 15 kHz e, permite a realização de experimentos com variação controlada de temperatura.

3.1.3 - Preparo das amostras para RMN no estado sólido

Para as medidas de RMN no estado sólido, as amostras foram empacotadas em um rotor de zircônia de 4mm de diâmetro externo, com o auxílio de um suporte em formato de funil e um pistão.

Para experimentos realizados entre as temperaturas de -20 e 50 °C, a tampa do rotor utilizada foi de Kel-F (um material polimérico que não exibe sinal de RMN). Para as temperaturas fora dessa faixa (acima ou abaixo) utilizaram-se tampas de nitreto de boro, BN₃, um tipo de material semelhante a cerâmica, uma vez que esse material suporta uma faixa de temperatura que vai de -150 até 150 °C.

3.2 - Fármacos estudados

3.2.1 - Mebendazol (MBZ)

3.2.1.1 - Amostras padrão puras das formas A e C do mebendazol

Todos os experimentos de RMN no estado sólido supracitados, além do experimento de ¹⁵N-CP-MAS, foram realizados para as formas isoladas, A e C, do mebendazol (MBZA e MBZC respectivamente). Na tentativa de detectar possíveis variações estruturais com a mudança de temperatura, foram realizados experimentos com as formas **A** e **C**, variando a temperatura entre 20 e 50 °C. Na TABELA 3.1 são apresentados os valores de alguns dos parâmetros utilizados nas sequências de pulsos.

TABELA 3.1- Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos qualitativos de ^{13}C -RMN 1D^{A,B} para o mebendazol nas formas **A** e **C**

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	5 s
Duração do pulso de 90° no canal do ^1H (p3)	3 μs
Potência do pulso de 90° no canal do ^1H (p12)	58,7 W
Duração do pulso de contato (p15)	2 ms
Potência do pulso de contato (p11)	50,1 W
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ)	34 ms
Número de promediações (ns)	1024
Número de pontos do domínio de tempo (TD)	2048
Janela espectral do domínio (SW)	295 ppm
Tempo de defasamento dipolar (d20) ^C	120 μs
Pulso de inversão (p16) ^D	50 μs
Programa para desacoplamento	TPPM 15 (83,3 kHz)
Frequência de rotação	5 kHz ^B , 10 kHz ^A

^ACP-MAS

^BCP-TOSS, CP-TOSS-NQS, CP-PI-TOSS

^CAplicado em CP-TOSS-NQS

^DAplicado em CP-PI-TOSS

Quanto aos experimentos de ^{15}N -CP-MAS, o tempo de contato foi de 3 ms e para a estimativa do tempo de relaxação (T_1^{H}) variou-se o tempo de espera entre os pulsos de 90° (τ) de 10 ms a 60 s. Em seguida, contruiu-se uma curva com a variação de τ em função da área do sinal; essa curva apresenta um comportamento exponencial e foi ajustada com a equação $M_z(t) = M_0(1 - \exp(-t/T_1))$, cuja a constante de decaimento representa o valor de T_1^{H} . A TABELA 3.2 mostra os parâmetros de aquisição para o experimento ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR.

Após a realização dos experimentos, iniciou-se o processamento dos dados, aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos e uma função de apodização *line-broadening* (LB) = 20 Hz nos experimentos 1D. Ressalta-se que, tanto a fase quanto a linha de base foram corrigidas automaticamente. Para o mapa de correlação HETCOR, aplicou-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 e 1024 pontos em F1, empregando-se a função de apodização seno quadrado (QSINE).

TABELA 3.2 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR para o mebendazol nas formas **A e C**

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	2 s
Duração do pulso de 90° no canal do ^1H (p3)	3 μs
Potência do pulso de 90° no canal do ^1H (p12)	58,7 W
Duração do pulso de contato (p15)	500 μs
Potência do pulso de contato (p1)	62,2 W
Tempo de aquisição no domínio indireto (AQ-F1)	32 ms
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ-F2)	16 ms
Número de promediações (ns)	80
Número de pontos do domínio de tempo indireto (TD-F1)	256
Número de pontos do domínio de tempo direto (TD-F2)	948
Janela espectral do domínio indireto (SW-F1)	55 ppm
Janela espectral do domínio direto (SW-F2)	295 ppm
Programa para desacoplamento	SPINAL 64 (83,3 kHz)
Frequência de rotação	10 kHz

3.2.1.2 - Amostras comerciais

Além das amostras padrão, também foram analisadas 13 amostras comerciais adquiridas em São Carlos/SP e também em Manaus/AM. Essas amostras são provenientes de quatro diferentes indústrias: IND A (lotes 1, 2, 3, 4 e 5), IND B (lotes 1, 2, 3 e 4), IND C (lotes 1, 2 e 3) e IND D (lote 1) e, por serem disponibilizadas na forma de comprimidos, foram pulverizadas antes da análise, utilizando para tanto um gral e pistilo, ambos confeccionados de pedra ônix.

3.2.1.3 - Análise quantitativa

Foi construída uma curva analítica utilizando-se misturas dos polimorfos isolados do mebendazol A e C em porcentagens de 0:100 a 100:0 (A:C; m/m). Adicionou-se celulose (principal excipiente encontrado nas amostras comerciais) a essas misturas, de maneira que a amostra final apresentasse uma proporção fixa de 40:60% (mebendazol:celulose), pois essa condição se assemelha à composição descrita nas amostras comerciais. Essas misturas foram homogeneizadas durante dois minutos em um misturador elétrico e para a medida das massas (aproximadamente 66 mg no total) foi utilizada uma balança analítica digital Bioprecisa, modelo FA-2104N, com precisão de $\pm 0,1$ mg.

Antes que as medidas fossem realizadas, vários parâmetros experimentais foram calibrados, como o ângulo mágico, o deslocamento químico do ^{13}C e o pulso de ^1H da sequência de pulso CP-MAS. Em seguida, ajustou-se a condição Hartmann-Hahn, o tempo de contato e fez-se a determinação dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) de acordo com o experimento descrito anteriormente. A calibração do ângulo mágico foi feita com uma amostra de KBr, monitorando através do sinal de ^{79}Br . Inicialmente, pretendíamos usar o tempo de espera (d_1) igual a $7 \times T_1$, por ser o tempo recomendado para análises quantitativas. No entanto, o T_1 medido para o grupo metila do mebendazol C, por exemplo, foi de aproximadamente seis segundos, ou seja, o d_1 seria de 42 segundos. Para um experimento de CP-MAS, por exemplo, com o número de promediações igual a 1024, seriam necessárias 11h57min. Decidimos então, realizar um experimento com $d_1 = 5T_1$ e compará-lo com um experimento de $d_1 = 10\text{s}$. Como não houve diferença muito significativa entre eles, decidiu-se por realizar todos os experimentos com $d_1 = 10\text{s}$, reduzindo a duração da análise para 2h51m. Essa redução de tempo foi muito significativa, principalmente porque os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a construção da curva analítica, utilizou-se a área do sinal do grupo metila (MBZA-51,4 e MBZC-54,5 ppm), fornecida por uma ferramenta de deconvolução disponível no *software TopSpin*[®]. Em seguida, analisou-se uma amostra comercial que apresentava uma mistura das formas **A** e **C** no mesmo comprimido, na tentativa de se fazer uma análise quantitativa relativa entre os polimorfos presentes.

3.2.2 - Dietilcarbamazina (DEC) e suas formas salinas

As medidas de RMN no estado sólido foram realizadas para a dietilcarbamazina nas formas livre, citrato (fornecidas pelo grupo da Dra. Nubia Boechat, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FioCruz, Rio de Janeiro) e maleato (cristalizado em colaboração com Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo - IFSC, nas pessoas do Prof. Dr. Javier Ellena e da Dra. Cristiane Cabral de Melo; ver item 3.2.2.1). Os parâmetros utilizados em cada sequência de pulsos estão listados na TABELA 3.3.

No intuito de verificar, através da técnica de RMN, mudanças conformacionais na estrutura da DEC citrato descritas por estudo anterior por raios X (SILVA et al., 2010), realizou-se experimentos de ^{13}C -CP-MAS variando a temperatura de 20° a -50 °C, que é a temperatura mínima permitida pelo equipamento de RMN utilizado nesse estudo.

TABELA 3.3 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos ^{13}C -RMN 1D^{A,B} para a DEC livre, DEC citrato e DEC maleato

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	5 s
Duração do pulso de 90° no canal do ^1H (p3)	5 μs
Potência do pulso de 90° no canal do ^1H (p12)	58,7 W
Duração do pulso de contato (p15)	3 ms
Potência do pulso de contato (p11)	50,1 W
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ)	34 ms
Número de promediações (ns)	256
Número de pontos do domínio de tempo (TD)	2048
Janela espectral do domínio (SW)	295 ppm
Tempo de defasamento dipolar (D20) ^C	110 μs
Pulso de inversão (p16) ^D	50 μs
Programa para desacoplamento	TPPM 15 (83,3 kHz)
Frequência de rotação	5 kHz ^B , 10 kHz ^A

^ACP-MAS

^BCP-TOSS, CP-TOSS-NQS, CP-PI-TOSS

^CAplicado em CP-TOSS-NQS

^DAplicado em CP-PI-TOSS

No experimento de ^{15}N -CP-MAS, o tempo de contato foi de 4,5 ms e para os experimentos ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR, utilizou-se o tempo de contato de 200 μs e o número de promediações igual a 64. Os demais parâmetros para os experimentos de HETCOR são idênticos aos usados para as amostras de mebendazol (ver TABELA 3.2)

Em seguida, processou-se os dados dos experimentos 1D aplicando-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos, uma função de apodização $\text{LB} = 20$ Hz, onde a fase e linha de base foram corrigidas automaticamente. Para o mapa de correlação HETCOR, o processamento foi o mesmo utilizado para as amostras de mebendazol (item 3.2.1.1).

3.2.2.1 - Obtenção dos cristais de maleato de dietilcarbamazina

Para a obtenção dos cristais de maleato de dietilcarbamazina, misturou-se 10 mg de DEC livre com 5,8 mg de ácido maleico (1:1), adicionou-se 1,5 mL de álcool isopropílico e a solução foi submetida à agitação magnética até a dissolução completa dos solutos. Em seguida, essa solução foi mantida em repouso sob refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 30 dias. Esse procedimento foi realizado em quadruplicata para alcançar massa suficiente para as análises por RMN no estado sólido. Este sal tem sido preparado pelo grupo do Prof. Dr. Javier Ellena com o objetivo de se obter uma forma mais estável para a DEC, e também para melhorar sua solubilidade em meio aquoso.

3.2.3 - Ácido Micofenólico (AMF)

As amostras de ácido micofenólico e micofenolato de mofetila foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (pureza: $\geq 98\%$; lotes: 011M4007V e 032M4705V respectivamente). Todos os experimentos citados no item 3.1.4 (exceto o CP-MAS) também foram realizados para essa amostra e os parâmetros utilizados em cada sequência de pulsos estão apresentados na TABELA 3.4. Experimentos em diferentes temperaturas também foram executados para o ácido micofenólico com a

finalidade de verificar a estabilidade, no entanto, a faixa de temperatura empregada variou de -6 a 50°C.

Para a estimativa do tempo de relaxação (T_1) variou-se o tempo de espera (τ) de 10 ms a 60 s e para os experimentos de ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR, utilizou-se o tempo de contato de 200 μs e o número de promediações igual a 64. Os demais parâmetros de aquisição para os experimentos de HETCOR são os mesmos usados para as amostras de mebendazol (ver TABELA 3.2)

TABELA 3.4 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos ^{13}C -RMN 1D^A para o ácido micofenólico e o micofenolato de mofetila

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	10 s
Duração do pulso de 90° no canal do ^1H (p3)	3 μs
Potência do pulso de 90° no canal do ^1H (p12)	58,7 W
Duração do pulso de contato (p15)	1500 μs
Potência do pulso de contato (p1)	50,1 W
Tempo de aquisição no domínio direto (AQ)	34 ms
Número de promediações (ns)	256
Número de pontos do domínio de tempo (TD)	2048
Janela espectral do domínio (SW)	295 ppm
Tempo de defasamento dipolar (D20) ^B	120 μs
Pulso de inversão (p16) ^C	90 μs
Programa para desacoplamento	TPPM 15 (83,3 kHz)
Frequência de rotação	5 kHz

^ACP-TOSS, CP-TOSS-NQS, CP-PI-TOSS

^BAplicado em CP-TOSS-NQS

^CAplicado em CP-PI-TOSS

Posteriormente, os dados dos experimentos 1D foram processados pela aplicação da transformada de Fourier com 2048 pontos, uma função de apodização $LB = 20$ Hz, onde a fase e linha de base foram corrigidas automaticamente. Para o mapa de correlação HETCOR aplicou-se uma transformada de Fourier com 2048 pontos em F2 e 1024 pontos em F1, utilizando a função de apodização seno quadrado (QSINE).

Após a realização dos experimentos de ^{13}C -RMN, o ácido micofenólico foi recristalizado em diferentes solventes, como metanol, acetonitrila e diclorometano, e com todos esses solventes houve a formação de cristais, os quais foram enviados para análise por difração de raios X no Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo - IFSC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Mebendazol

4.1.1 - Difração de raios X por pó (DRX) e Espectroscopia Raman

Como vários estudos anteriores sobre o mebendazol já haviam consolidado o uso das técnicas de raios X e espectroscopia vibracional, utilizou-se essas técnicas para certificação das amostras. Os resultados obtidos por difração de raios X por pó e espectroscopia Raman foram comparados com dados já descritos na literatura (VILLIERS et al., 2005; AYALA et al., 2008; BRUSAU et al., 2008; BRITS et al, 2010) e confirmaram que os polimorfos individuais analisados nesse trabalho se tratam especificamente das formas **A** e **C** do mebendazol (TABELA 4.1, FIGURAS 4.1 e 4.2). Vale ressaltar que, assim como observaram AYALA e colaboradores (2008), o espectro de Raman desses dois polimorfos apresenta, principalmente, diferenças na intensidade dos sinais e não na posição dos mesmos, o que torna difícil uma análise de misturas.

TABELA 4.1 - Valores de distância interbasal (ou interplanar) para os picos analisados dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol

Forma A				Forma C			
Experimental		VILLIERS et al., 2005		Experimental		VILLIERS et al., 2005	
<i>d</i> (Å)	<i>I</i> / <i>I</i> ₀ (%)	<i>d</i> (Å)	<i>I</i> / <i>I</i> ₀ (%)	<i>d</i> (Å)	<i>I</i> / <i>I</i> ₀ (%)	<i>d</i> (Å)	<i>I</i> / <i>I</i> ₀ (%)
11,37	97	11,52	100,0	16,86	100	17,91	72
6,13	21	6,13	25	7,05	21	7,19	28
5,15	100	5,13	70	5,47	40	5,45	51
4,89	21	4,87	19	4,87	42	4,89	30
4,52	18	4,49	13	4,50	81	4,48	100
4,39	17	4,35	11	4,15	25	4,16	28
3,84	64	3,84	38	3,64	61	3,60	56
3,67	34	3,78	47	3,38	74	3,34	73
3,59	34	3,61	34	3,13	28	3,09	36
3,38	23	3,53	23				
3,24	52	---	---				

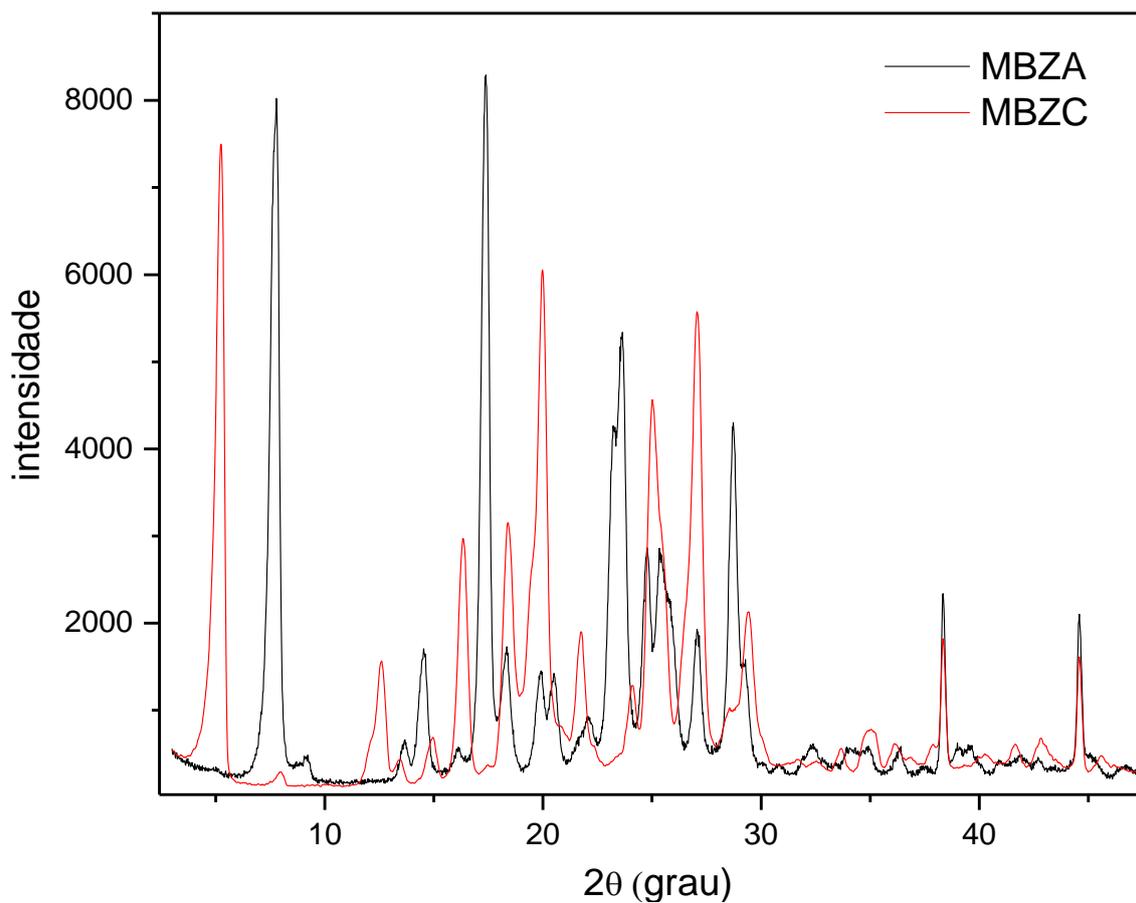


FIGURA 4.1 - Difratoograma de raios X das formas **A** e **C** do mebendazol.

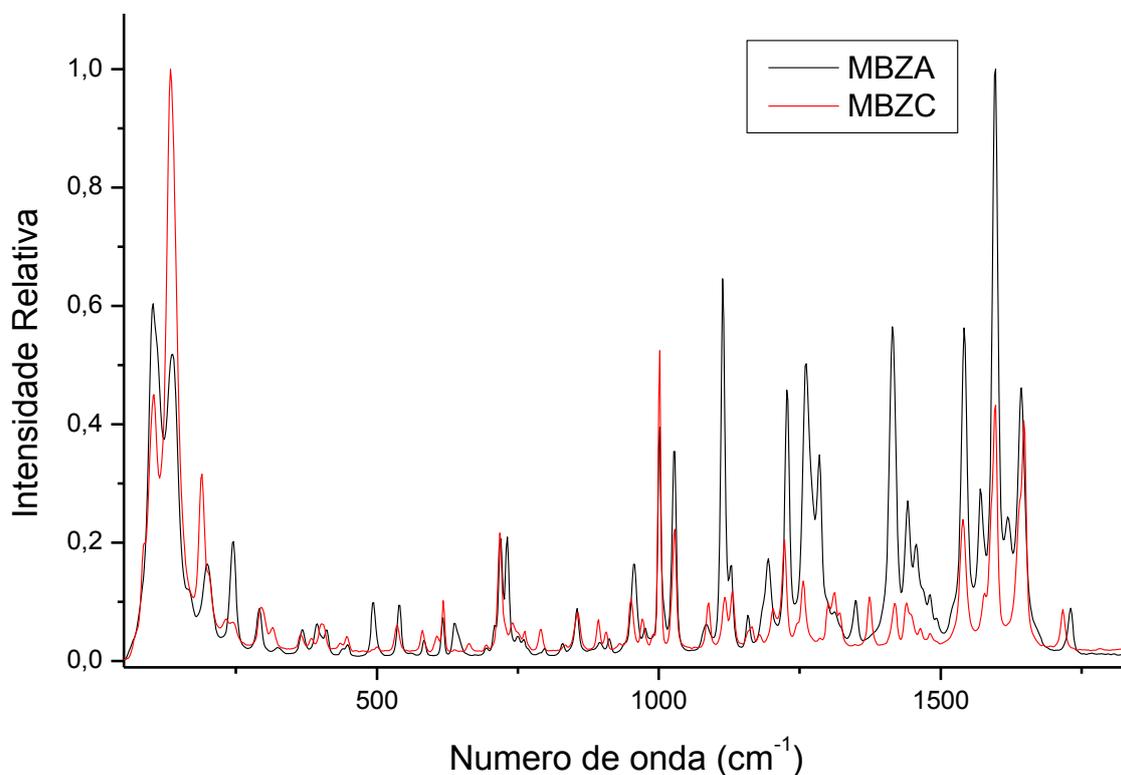


FIGURA 4.2 - Espectros de FT-Raman das formas **A** e **C** do mebendazol.

Esses resultados, associados a toda a caracterização estrutural realizada por estudos anteriores, servirão de base para a interpretação dos resultados obtidos pelas técnicas de RMN no estado sólido, que serão apresentados a seguir.

4.1.2 - Medidas de RMN no estado sólido

Após os experimentos de difração de raios X por pó e espectroscopia Raman foram obtidos os espectros de ^{13}C -CP-MAS, e estes mostraram diferenças significativas entre as formas **A** e **C** do mebendazol, como esperado. Como foram observadas algumas bandas laterais de rotação, mesmo com uma rotação de 10 kHz, optou-se por realizar o experimento de ^{13}C -CP-TOSS, mas agora utilizando uma rotação de 5 kHz (FIGURAS 4.3 e 4.4). Além de eliminar totalmente as bandas laterais, são verificados outros benefícios, sendo que o principal é relativo à intensidade do sinal do grupo metila, em torno de 50 ppm. Quando se compara a intensidade relativa entre o sinal do grupo metila e os sinais da região aromática, é possível observar que há um ganho na intensidade da metila no experimento CP-TOSS. Isso pode ser explicado pelo fato de que, em baixas rotações o acoplamento dipolar é mais favorecido e portanto, a transferência de polarização é mais eficiente. Outra vantagem de se utilizar o experimento CP-TOSS é a economia de gás usado para girar a amostra, já que utiliza rotações mais baixas.

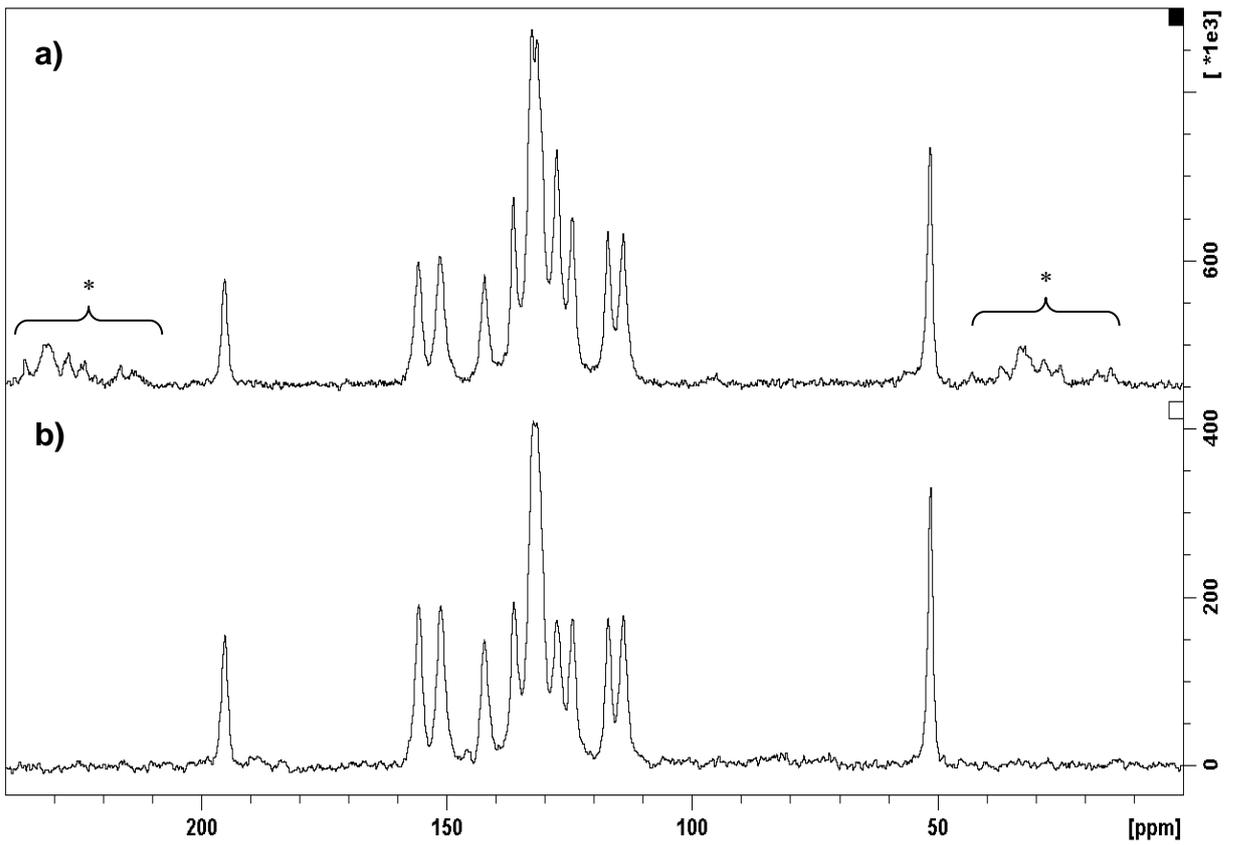


FIGURA 4.3 - Espectros de (a) ^{13}C -CP-MAS e (b) ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol A. Número de promediações de 1024, tempo de contato de 2 ms. (*) bandas laterais.

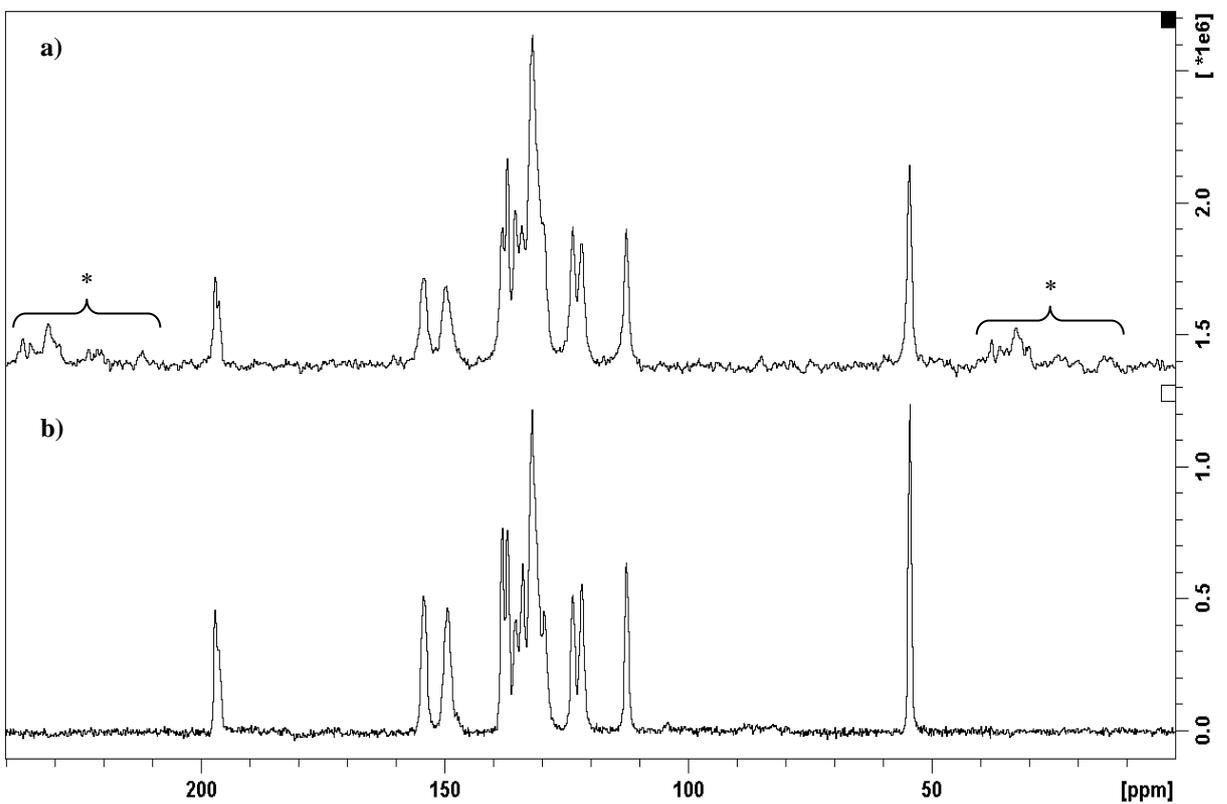


FIGURA 4.4 - Espectros de (a) ^{13}C -CP-MAS e (b) ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol C. Número de promediações de 1024, tempo de contato de 2 ms. (*) bandas laterais.

Na FIGURA 4.5 estão apresentados os espectros de ^{13}C -CP-TOSS das formas **A** e **C** do mebendazol e, uma comparação qualitativa entre esses espectros fornece claras informações sobre as diferenças entre as duas formas polimórficas, especialmente nos sinais da região aromática (110-145 ppm). Observando as estruturas cristalinas desses polimorfos determinadas por raios X (FIGURA 4.6), podemos verificar que o grupo benzoíla exibe conformações distintas para cada polimorfo e essa mudança reflete nos deslocamentos químicos diferentes na região aromática. Outro fator importante é que cada polimorfo apresenta ligações de hidrogênio intra e intermoleculares diferentes, o que certamente causa mudanças no deslocamento químico, como é o caso da interação intermolecular não-clássica C(12)–H---O(2), descrita para o MBZA, como mostra FIGURA 4.7 (FERREIRA et al., 2010). A forma **C** também apresenta interação de hidrogênio intermolecular não-clássica na região aromática entre os átomos C(9)–H---O(2) (MARTINS et al., 2009; FIGURA 4.8). Os espectros de ^{13}C -CP-TOSS mostram claramente a mudança no deslocamento dos referidos carbonos, C(12) e C(9).

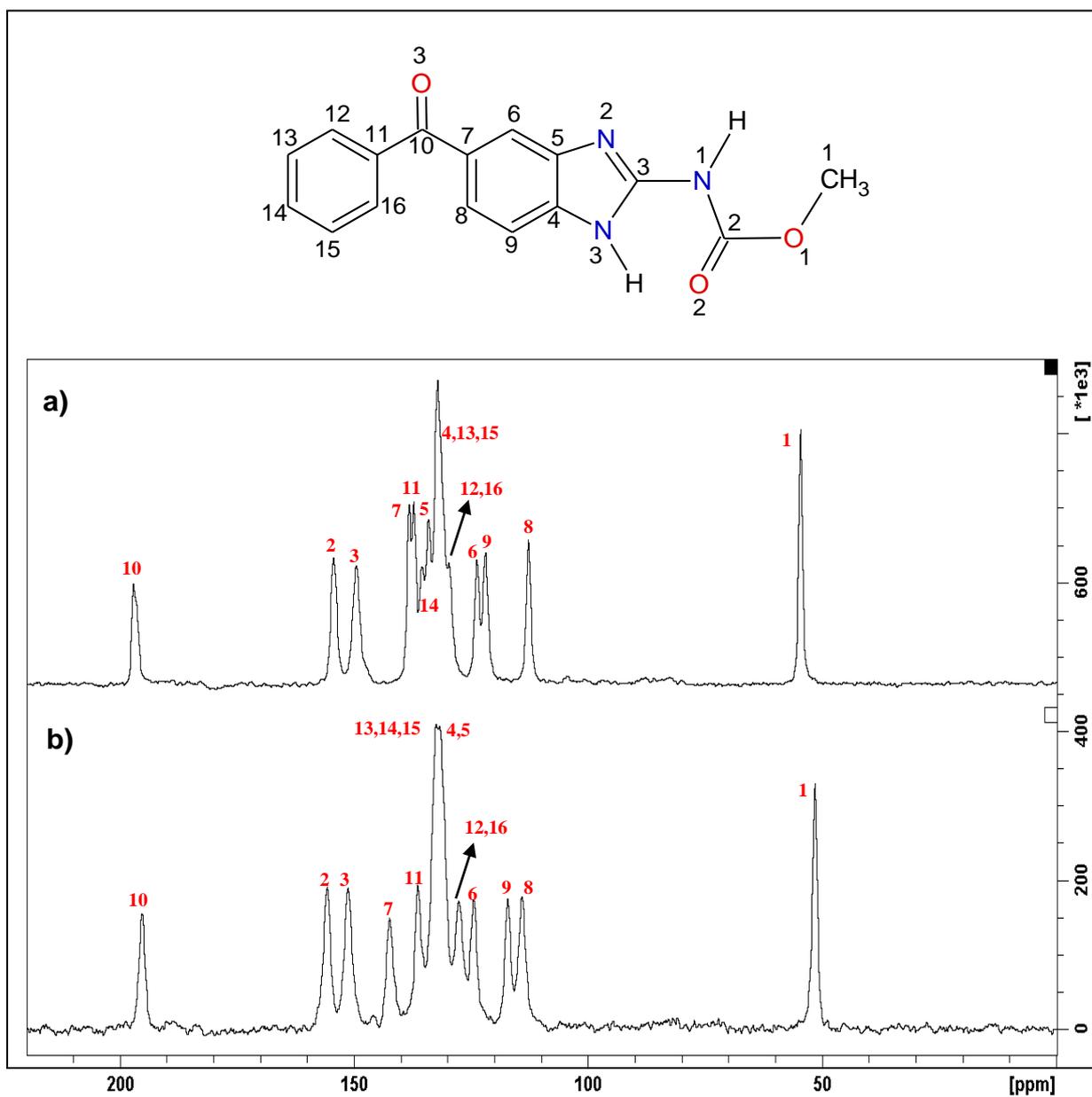
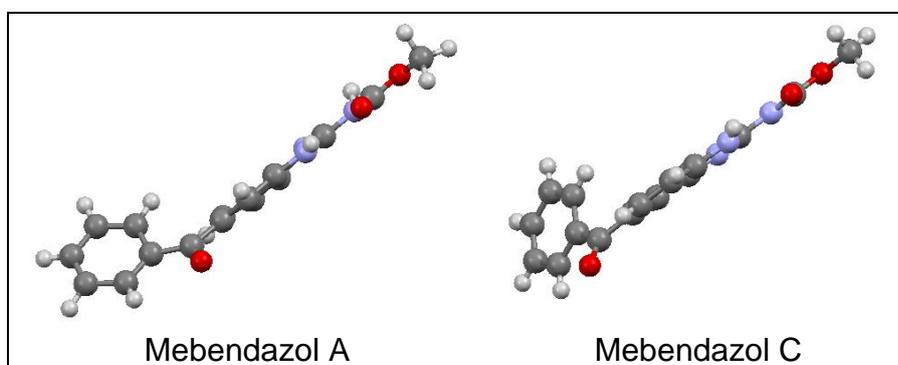
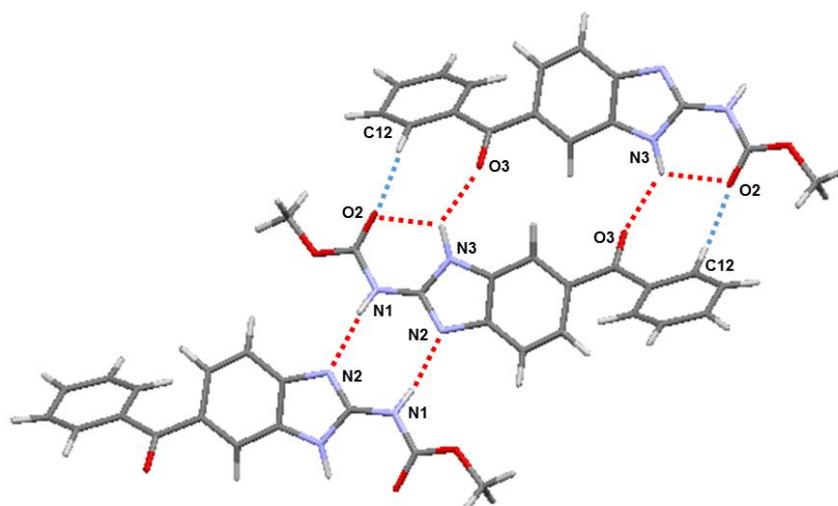


FIGURA 4.5 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol (a) C e (b) A. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 1024, tempo de contato de 2 ms.



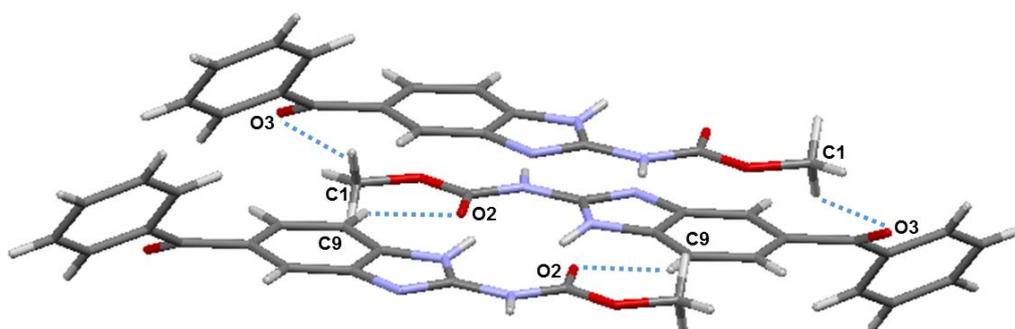
Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 4.6 - Estruturas cristalinas do mebendazol A e C.



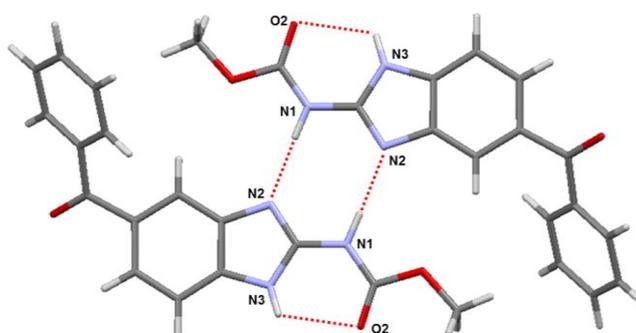
Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 4.7 - Ligações de hidrogênio intra e intermoleculares do mebendazol A (FERREIRA et al., 2010).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 4.8 - Ligações de hidrogênio não-clássicas presentes no mebendazol C (MARTINS et al., 2009).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 4.9 - Ligações de hidrogênio clássicas presentes no mebendazol C.

Diferenças mais sutis também podem ser observadas nos sinais referentes à carbonila dos grupos carbamato (MBZA= 151,3 e MBZC=149,6 ppm) e benzoíla (MBZA= 195,1 e MBZC=197,0/196,1 ppm). Com relação ao grupo carbamato, a diferença está relacionada com as mesmas interações intermoleculares descritas no parágrafo anterior, C(12)–H---O(2) no MBZA e C(9)–H--O(2) no MBZC. Já para o grupo benzoíla, a distinção no deslocamento químico é devido às interações intermoleculares C(10)=O(3)---H–N(3) no MBZA e C(10)=O(3)--H–C(1) no MBZC.

Os estudos por raios X mostraram que somente o polimorfo **C** exibe ligação de hidrogênio envolvendo o grupo metila e esta ocorre de forma intermolecular com a carbonila do grupo benzoíla, como descrito acima [C(10)=O(3)--H–C(1)]. Essa ligação de hidrogênio na forma **C** do mebendazol pode justificar a diferença entre os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos grupos metila (51,4 e 54,5 ppm - MBZA e MBZC, respectivamente), pois uma interação com o oxigênio da carbonila desblindará o carbono metílico.

A atribuição dos sinais foi realizada através da análise dos experimentos ¹³C-CP-TOSS e ¹³C-CP-TOSS-NQS (FIGURAS 4.10 e 4.11; TABELA 4.2). O experimento ¹³C-CP-TOSS-NQS foi muito útil na distinção dos sinais de carbonos quaternários, especialmente na região entre 130 e 145 ppm, onde há grande sobreposição de sinais. No caso do MBZC, por exemplo, foi possível diferenciar os sinais dos carbonos aromáticos hidrogenados C12-C16 dos carbonos aromáticos quaternários C7, C11, C4 e C5 (FIGURA 4.11a), pois somente esses últimos podem ser visualizados no espectro de ¹³C-CP-TOSS-NQS. Vale lembrar que esse experimento nem sempre consegue suprimir completamente o sinal dos grupos metilas, pois os sinais de grupos com alta mobilidade raramente são removidos do espectro, uma vez que estão mais fracamente acoplados. (APPERLEY et al., 2012).

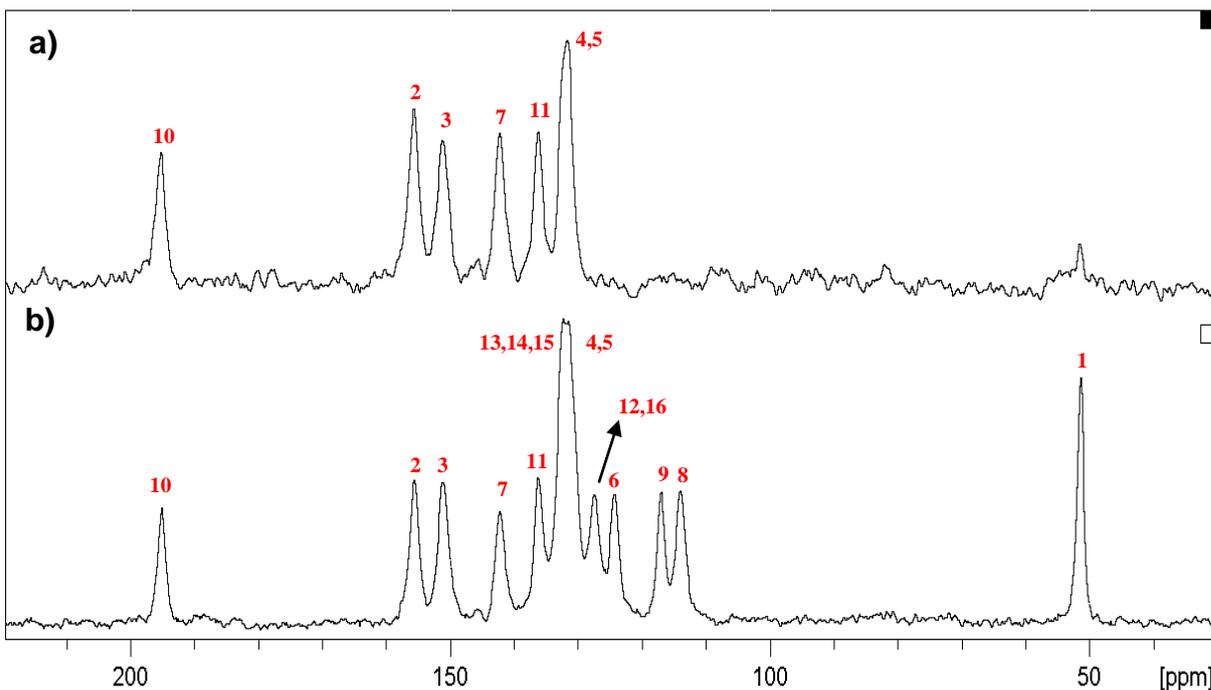


FIGURA 4.10 - Espectros de RMN de ^{13}C do mebendazol A. (a) CP-TOSS-NQS - d_2O : $120\ \mu\text{s}$ e (b) CP-TOSS. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 1024, tempo de contato de 2 ms.

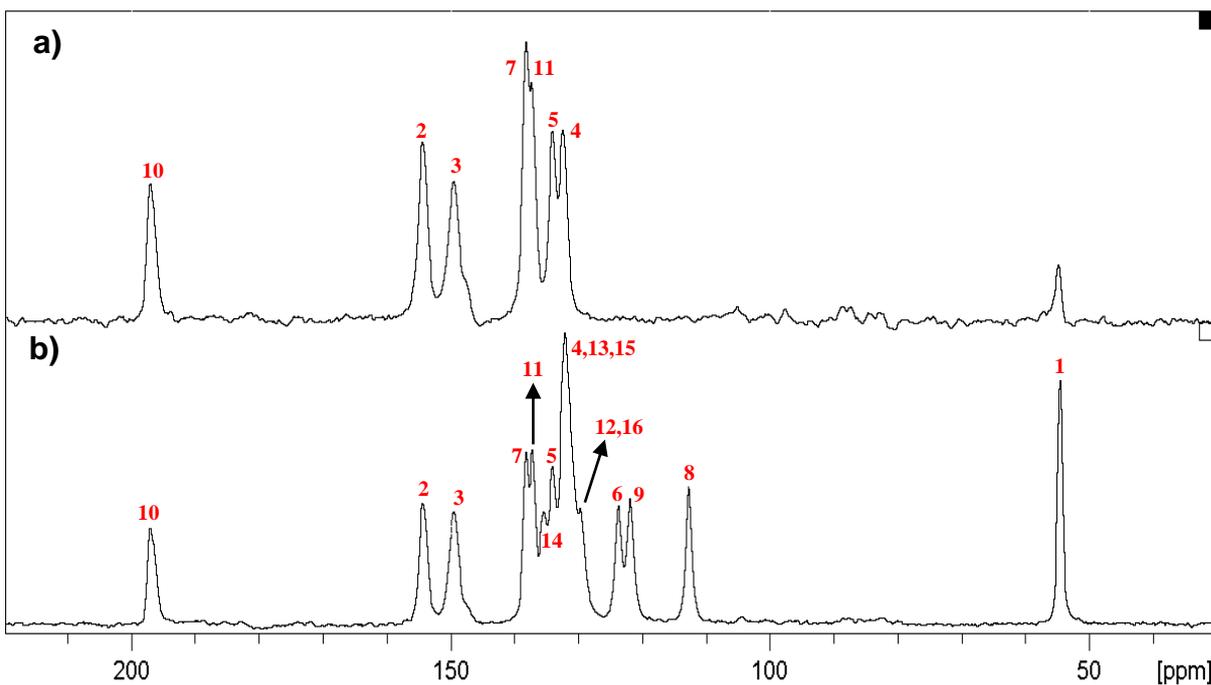
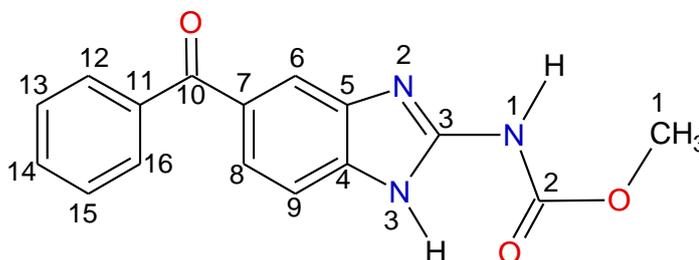


FIGURA 4.11 - Espectros de RMN de ^{13}C do mebendazol C. (a) CP-TOSS-NQS - d_2O : $120\ \mu\text{s}$ e (b) CP-TOSS. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 1024, tempo de contato de 2 ms.

TABELA 4.2 - Deslocamento químico de ^{13}C -CP-TOSS dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol



Carbono	^{13}C MBZA	^{13}C MBZC
	$\delta(\text{ppm})$	$\delta(\text{ppm})$
1	51,4	54,5
2	155,6	154,3
3	151,3	149,6
4	130,7	132,4
5	131,5	134,0
6	124,3	123,6
7	142,3	138,0
8	114,0	112,6
9	117,1	121,8
10	195,1	197,0/196,1
11	136,3	137,0
12	127,5	131,8
13	132,5	129,5
14	133,4	135,4
15	132,5	129,5
16	127,5	131,8

Os experimentos de ^{15}N -CP-MAS para as duas formas polimórficas do mebendazol também mostraram diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais, como mostra a FIGURA 4.12. MARTINS e colaboradores (2009) apresentaram cinco possíveis formas tautoméricas para o mebendazol e verificaram, pelo uso de difração de raios X, que MBZ1 (FIGURA 4.13) é o tautômero predominante no mebendazol C. No entanto, é possível observar que, no caso do MBZA, os sinais

atribuídos aos nitrogênios N2 e N3 apresentam largura de linha maior, com uma tendência a um desdobramento do sinal relativo ao N2, o que pode indicar a presença de pelo menos dois tautômeros na amostra analisada (FIGURA 4.13).

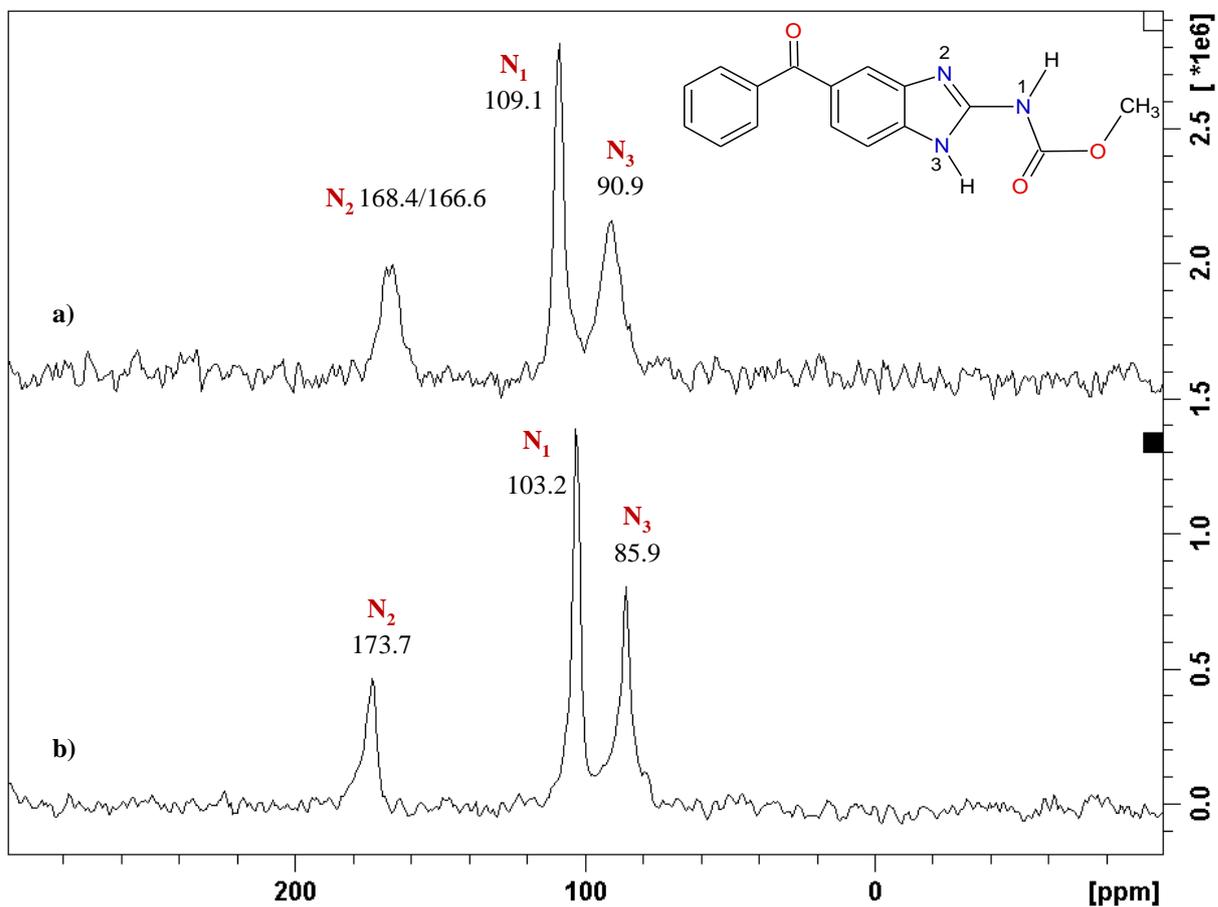


FIGURA 4.12 - Espectros de ^{15}N -CP-MAS do mebendazol (a) A e (b) C. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 16384, tempo de contato de 3 ms.

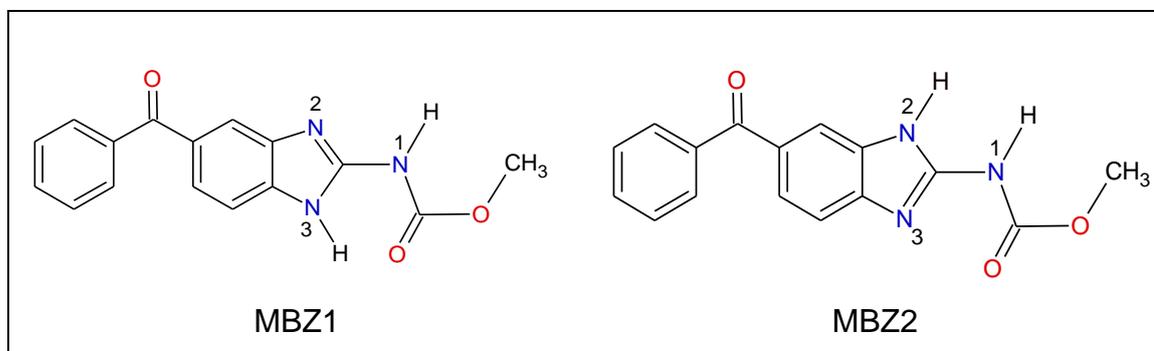


FIGURA 4.13 - Possíveis tautômeros presentes no MBZA.

Também foram feitos experimentos de correlação heteronuclear bidimensional ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR para ambos os polimorfos do mebendazol (FIGURAS 4.14 e 4.15); no entanto, nenhum resultado interessante foi obtido. Como mencionado anteriormente, uma informação importante, a qual é possível de ser obtida neste experimento é a existência de ligações de hidrogênio. No caso do mebendazol as ligações de hidrogênio que envolvem grupos em que o carbono está presente (por exemplo o grupo carbonila) são fracas e, talvez por esse motivo, sejam difíceis de serem observadas neste tipo de experimento (FIGURAS 4.7, 4.8 e 4.9). Possivelmente um experimento ^{15}N - ^1H FSLG HETCOR mostraria a existência de ligações de hidrogênio para os polimorfos do mebendazol.

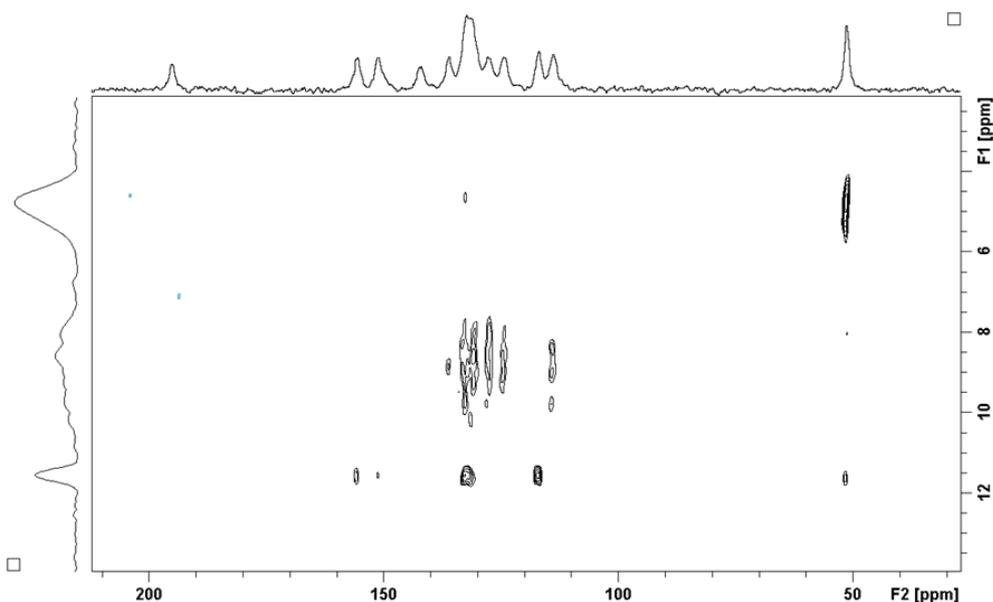


FIGURA 4.14 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o mebendazol A, utilizando a técnica HETCOR, com rotação de 10 kHz e tempo de contato de 2 ms. Dimensão F1 é relativa a projeção do espectro de ^1H e dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

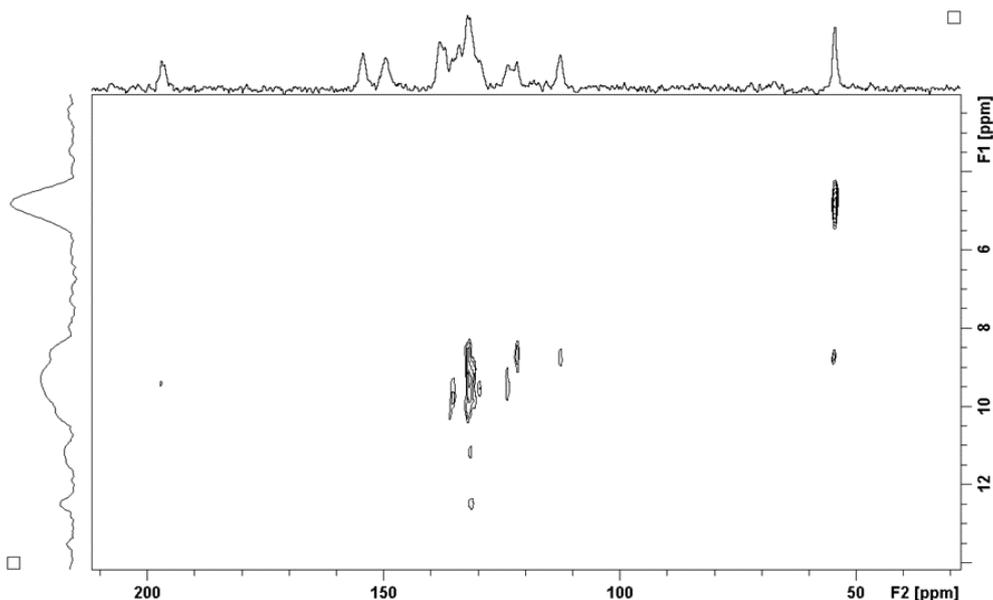


FIGURA 4.15 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o mebendazol C, utilizando a técnica HETCOR, com rotação de 10 kHz e tempo de contato de 2 ms. Dimensão F1 é relativa à projeção do espectro de ^1H e dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

Experimentos com variação de temperatura

Na tentativa de detectar possíveis variações estruturais com a mudança de temperatura, foram realizados experimentos com as formas **A** e **C**, variando a temperatura entre 20 e 50 °C (FIGURAS 4.16 e 4.17). De maneira geral, não foram observadas grandes mudanças no espectro de ^{13}C de ambos os polimorfos, indicando que a temperatura não está relacionada com a existência de uma possível conversão entre as formas polimórficas nessa faixa de temperatura, como já descrito por VILLIERS e colaboradores (2005). No entanto, pode-se observar a diminuição da intensidade do sinal atribuído aos carbonos C12 e C16 (127.5 ppm) do MBZA. Conforme descrito por FERREIRA e colaboradores (2010), o MBZA forma uma ligação fraca intermolecular não-clássica entre os átomos C(12)-H---O(2) e, portanto, à medida que a temperatura aumenta, provavelmente a mobilidade também aumenta nessa região, podendo inclusive romper essa interação, ocasionando a mudança no deslocamento químico para valores mais altos, tornando-se semelhante ao deslocamento observado para o MBZC (na região de 132 ppm), com o alargamento sutil desse último sinal.

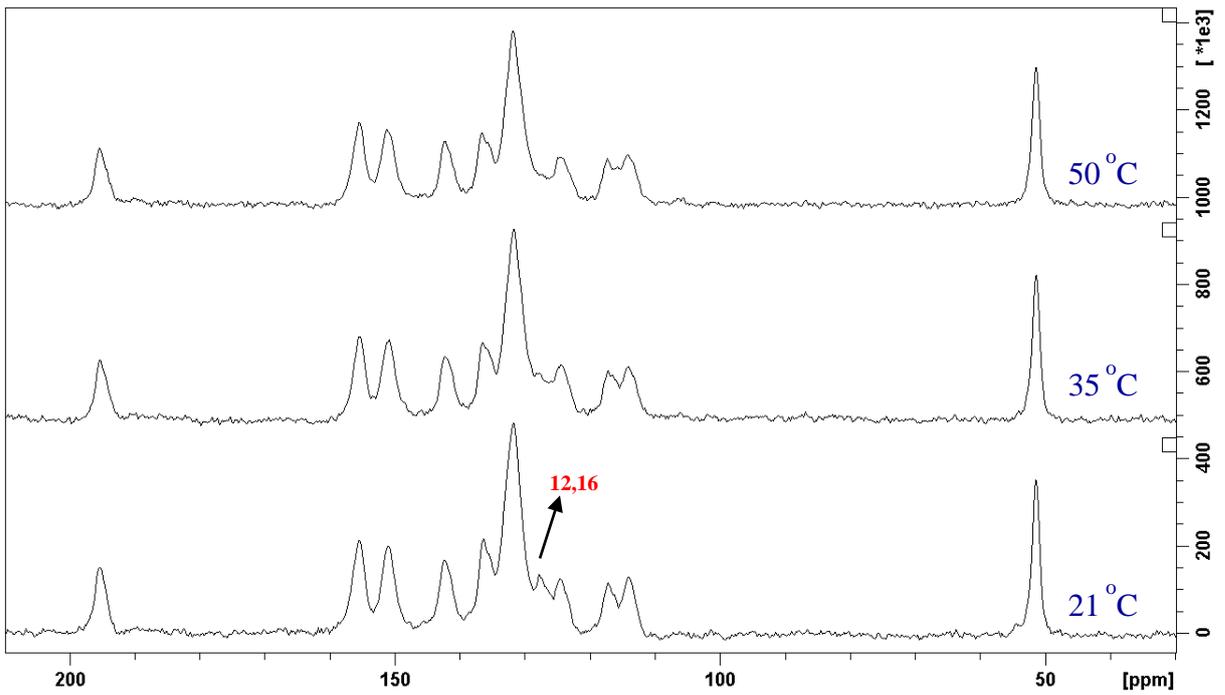


FIGURA 4.16 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol A em diferentes temperaturas. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 1024 e tempo de contato de 2 ms.

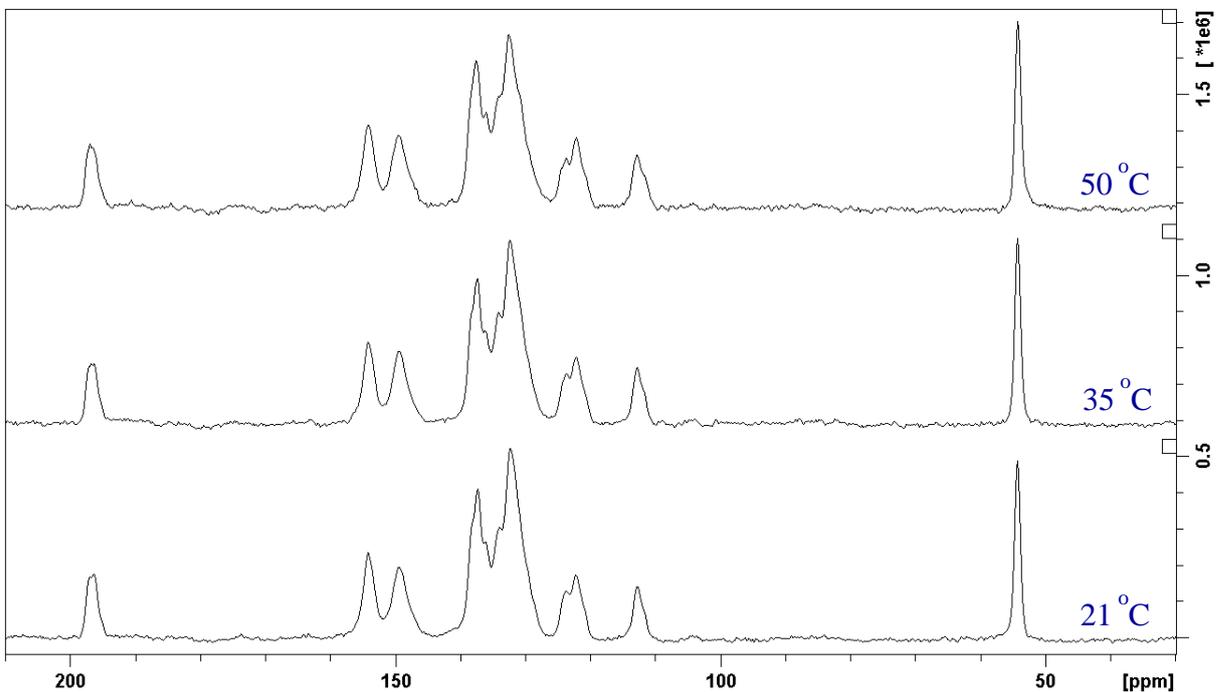


FIGURA 4. 17 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do mebendazol C em diferentes temperaturas. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 1024 e tempo de contato de 2 ms.

4.1.3 - Amostras comerciais

O interesse em analisar amostras comerciais surgiu principalmente devido ao fácil acesso às mesmas, pois é um medicamento de baixo custo e, no Brasil, pode ser adquirido sem prescrição médica; além de avaliar a aplicação da RMN no estado sólido como ferramenta analítica dos medicamentos comerciais.

A FIGURA 4.18 mostra os espectros ^{13}C -CP-TOSS de 13 amostras comerciais do mebendazol analisadas nesse trabalho. A maior diferença observada nos espectros aparece na região aromática entre 110 e 145 ppm. Outros sinais que mostram diferenças entre os polimorfos são os do grupo metila em 51,4 e 54,5 ppm para os polimorfos **A** e **C** respectivamente e o sinal da carbonila do grupo benzoil em 195,1 para a forma **A** e 197,0/196,1 para a forma **C**, assim como descrito anteriormente para as amostras padrão. Os sinais em aproximadamente 35 ppm e entre 60-110 ppm referem-se aos aditivos dos comprimidos (como polissacarídeos), e como pode ser observado não comprometem a análise dos sinais do princípio ativo.

Das 13 amostras analisadas, seis contêm a forma **A** do mebendazol, seis apresentam a forma **C** e uma delas mostrou a mistura desses dois polimorfos (FIGURA 4.18 e TABELA 4.3).

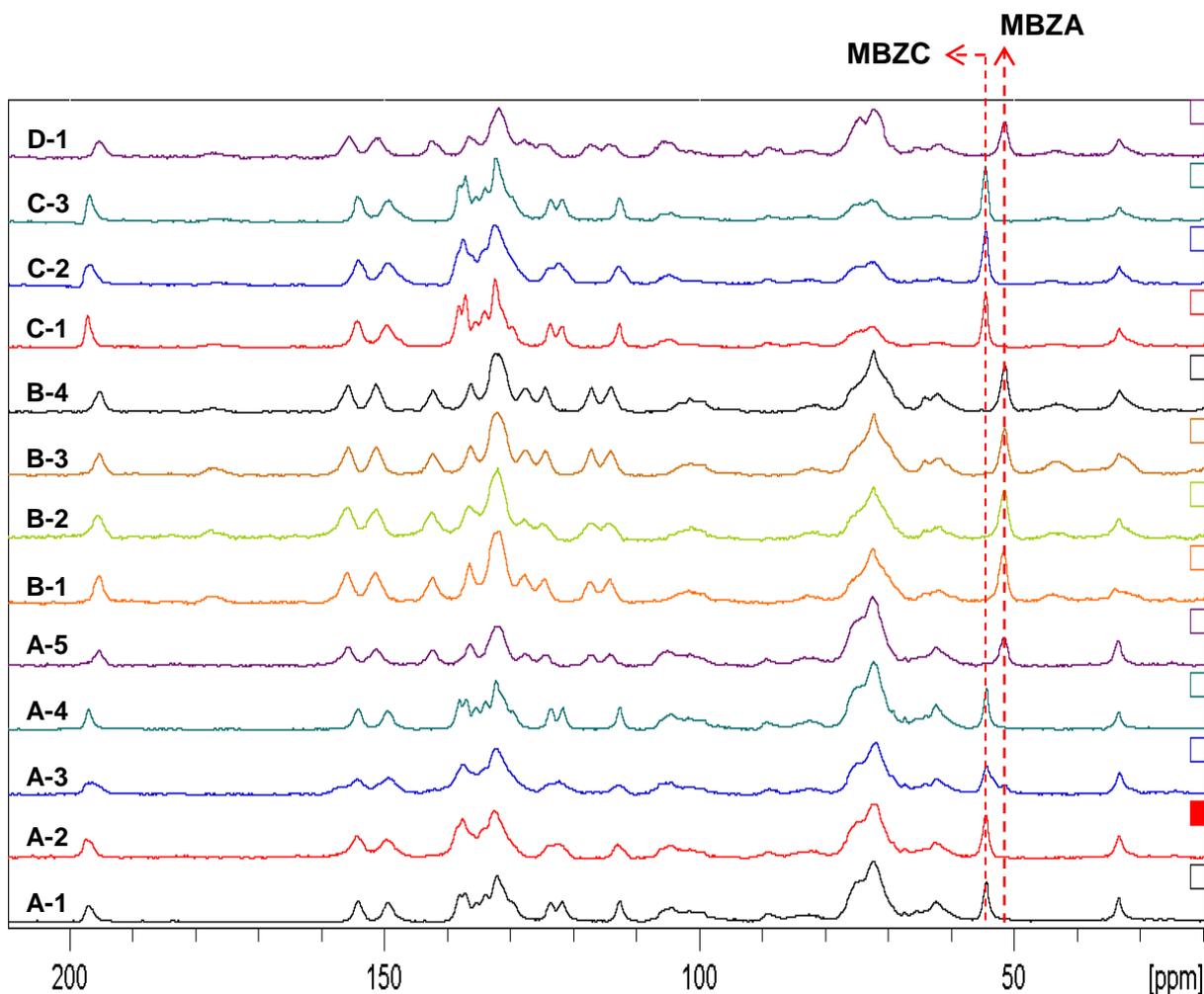


FIGURA 4.18 - Compação entre os espectros de ^{13}C - CP-TOSS das amostras comerciais do mebendazol.

TABELA 4.3 - Polimorfos encontrados nas amostras comerciais do mebendazol

Amostra	Polimorfo	Amostra	Polimorfo	Amostra	Polimorfo
IND A - 1	C	IND B - 1	A	IND C - 1	C
IND A - 2	C	IND B - 2	A	IND C - 2	C
IND A - 3	A+C	IND B - 3	A	IND C - 3	C
IND A - 4	C	IND B - 4	A	IND D - 1	A
IND A - 5	A				

IND – Indústria

É importante notar que as amostras da indústria A apresentaram polimorfos diferentes para lotes distintos (lotes 1, 2 e 4 - polimorfo **C**; lote 3 - mistura dos polimorfos **A** e **C**; lote 5 - polimorfo **A**). A FIGURA 4.19 mostra a compação entre

os espectros de ^{13}C -CP-TOSS dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol com os espectros de três amostras comerciais da indústria A, ilustrando três situações diferentes. A indústria B apresentou a forma inativa do mebendazol (forma polimórfica A) em todos os lotes analisados nesse trabalho. Esses resultados demonstram a importância de se conduzir um controle efetivo de qualidade nas drogas formuladas disponíveis no mercado.

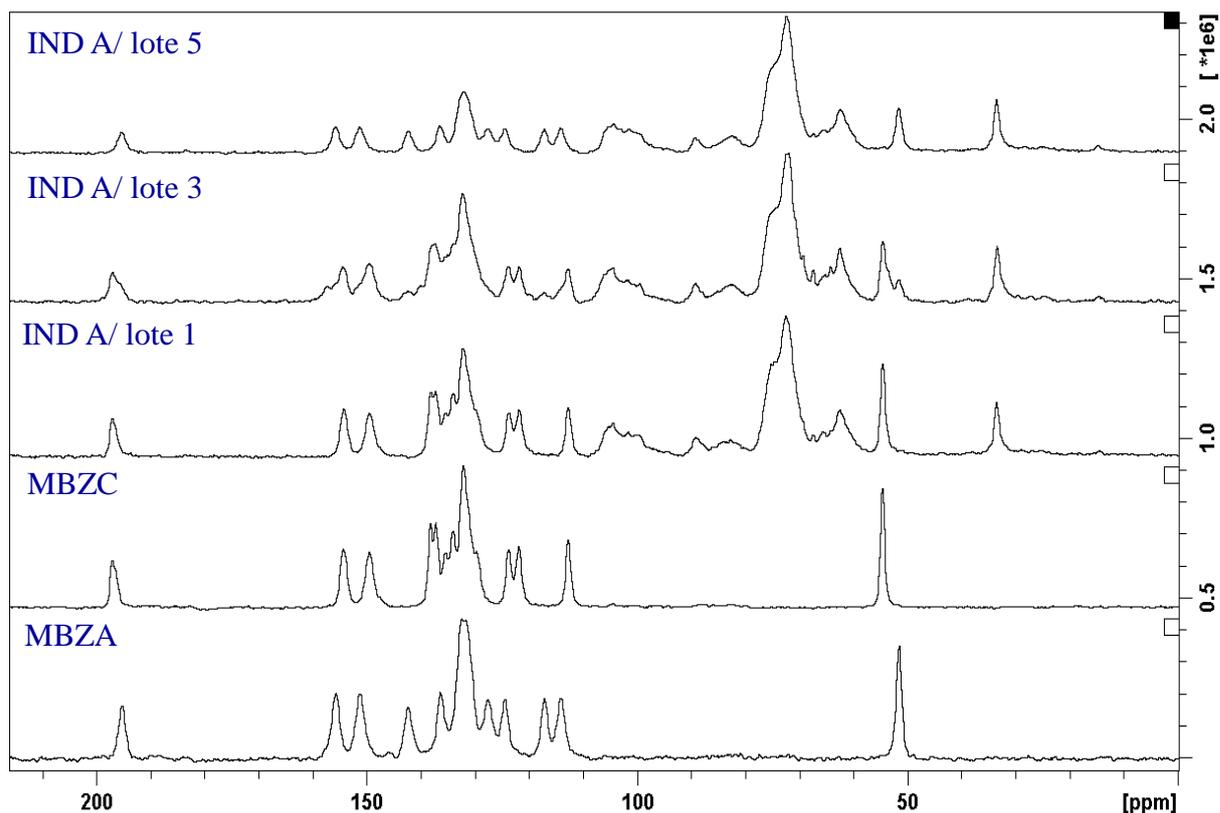


FIGURA 4.19 - Compação entre os espectros de ^{13}C -CP-TOSS dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol e de três amostras comerciais.

Alguns trabalhos relatam que após determinado tempo, crianças que haviam sido tratadas com mebendazol, voltaram a apresentar infestação (OLSEN et al., 2009). No entanto, de acordo com os resultados obtidos por RMN no estado sólido, pode-se questionar se realmente ocorreu reinfestação ou se o medicamento administrado foi formulado com o polimorfo inativo, o mebendazol A, uma vez que este é facilmente encontrado nas formulações desses medicamentos.

4.1.4 - Análise quantitativa

Uma vez obtidos os resultados das amostras comerciais, que se apresentaram de certa forma surpreendentes, decidiu-se também fazer um estudo que possa ser aplicado na quantificação de polimorfos presentes em misturas. Neste contexto explorou-se os aspectos quantitativos da técnica de RMN no estado sólido para este tipo de aplicação. Para conduzir as análises quantitativas, o sinal do grupo metila foi escolhido por não apresentar sobreposição com os outros sinais da amostra, incluindo o sinal da metila do outro polimorfo (MBZA - 51,4 e MBZC - 54,5 ppm), facilitando, assim, a deconvolução dos mesmos, uma vez que esse procedimento será necessário como será apresentado a seguir.

Antes de fazer os experimentos de maneira quantitativa, foram feitas as calibrações dos pulsos de carbono-13 e hidrogênio, do ângulo mágico, da condição de Hartman-Hahn e do tempo de contato. Uma vez realizadas essas calibrações, foi feita a determinação dos tempos de relaxação longitudinal (T_1) para o grupo metila conforme descrito no item 3.2.1.3. Esse procedimento foi feito para ambas as formas do mebendazol utilizadas neste trabalho (A e C). A FIGURA 4.20 mostra que o valor de T_1^H é mais longo no polimorfo **A** (MBZA - 16,5 e MBZC - 6,1 s).

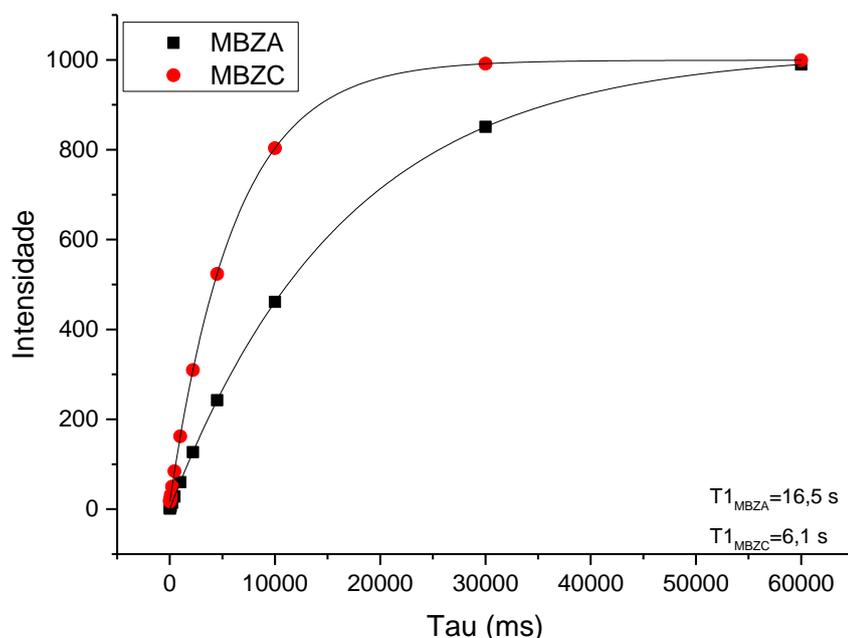


FIGURA 4.20 - Intensidade do sinal em função do intervalo de tempo entre os pulsos de 90° aplicados no canal do ^1H para o grupo CH_3 das formas **A** e **C** do mebendazol.

Alguns trabalhos anteriores (VIRTANEN e MAUNU, 2010; TOZUKA et al., 2002) propuseram a quantificação absoluta através da curva analítica, construída apenas com o uso dos fármacos de maneira isolada (API's). Decidiu-se, num primeiro momento utilizar a mesma metodologia. Para a construção das curvas analíticas foi utilizada a área do sinal do grupo metila fornecida por uma ferramenta de deconvolução disponível no *software TopSpin*[®]. A FIGURA 4.21 apresenta as curvas analíticas construídas utilizando-se apenas a mistura dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol. As curvas mostram que a área dos sinais cresce com o aumento da concentração de cada forma polimórfica correspondente nas misturas, conforme esperado. É possível observar também que a área do sinal do grupo metila é sempre maior no polimorfo **C** do que no polimorfo **A**, o que pode ser explicado pelo fato de que na forma **C**, o grupo metila está envolvido em uma ligação de hidrogênio intermolecular não-clássica (FERREIRA et al., 2010) [C(1)–H---O(3); FIGURA 4.8]. Essa ligação de hidrogênio torna o grupo metila menos móvel e portanto, a transferência de polarização se torna mais eficiente.

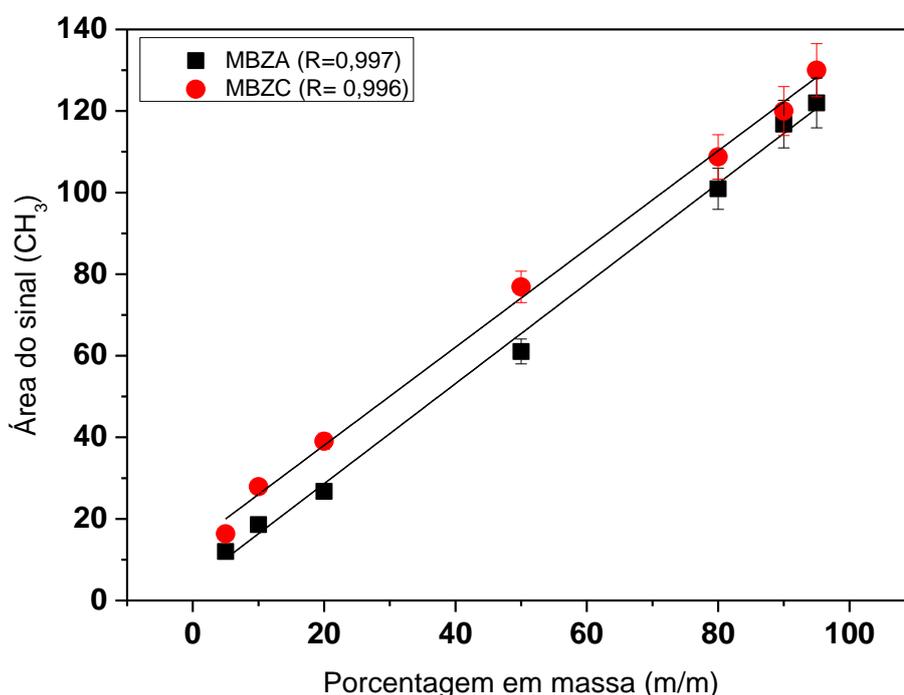


FIGURA 4.21 - Sinais de ¹³C-CP-MAS do grupo metila em função da porcentagem em massa (m/m) dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol. Barras de erro de 5%.

Portanto, para a quantificação, optou-se por utilizar a razão entre as áreas dos sinais do grupo metila de cada polimorfo, pois como visto anteriormente, a polarização cruzada não ocorre da mesma forma em ambos os casos, e também para que essas curvas analíticas possam ser utilizadas independentemente da massa total inserida no amostrador. Foi obtido um coeficiente de correlação de $R^2=0,999$ e a curva mostra que a razão entre as áreas dos sinais do grupo metila cresce exponencialmente com o aumento da concentração de cada forma polimórfica nas misturas (FIGURA 4.22, apresentada na forma linearizada).

Assim, utilizou-se essa curva analíticas para medir, de forma absoluta, as formas **A** e **C** em uma mistura, por meio de um teste cego, avaliando a confiabilidade da sequência de pulsos ^{13}C -CP-MAS na medição quantitativa. A amostra utilizada no teste cego foi preparada por um outro aluno do laboratório e entregue ao operador sem revelar o conteúdo percentual dos polimorfos na amostra. Os resultados se mostraram muito bons (81 e 19% para as formas **A** e **C**, respectivamente), uma vez que a mistura do teste cego era composta de 80% do polimorfo **A** e 20% do polimorfo **C**.

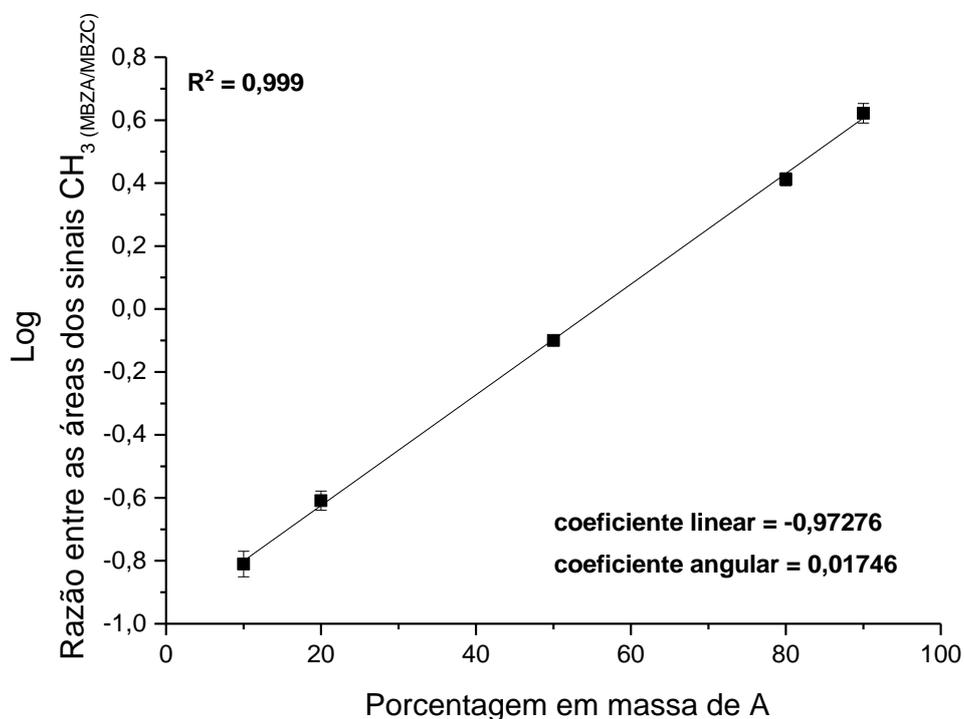


FIGURA 4.22 - Razão entre as áreas dos sinais de ^{13}C -CP-MAS dos grupos metilas (MBZA/MBZC) em função da porcentagem em massa do polimorfo **A** em relação ao polimorfo **C** do mebendazol. Barras de erro de 5%.

Como as amostras comerciais apresentam também excipientes na sua formulação, foram construídas novas curvas analíticas adicionando-se celulose (excipiente majoritário na composição dos comprimidos comerciais), na proporção de 40:60% (mebendazol:celulose), para alcançar uma condição semelhante à descrita para as amostras comerciais. Esse procedimento foi realizado no intuito de verificar uma possível interferência no sinal proveniente de interações entre o fármaco e os excipientes.

Foram utilizadas as sequências de pulsos ^{13}C -CP-MAS e ^{13}C -CP-TOSS com a finalidade de comparar a potencialidade de cada uma delas. Assim como para a curva analítica construída sem excipientes, coeficientes de correlação da ordem de 0,999 foram obtidos e a razão entre as áreas dos sinais cresce exponencialmente com o aumento da concentração de cada polimorfo nas misturas (FIGURAS 4.23 e 4.24, apresentadas na forma linearizada). As curvas analíticas se mostraram bastante reprodutíveis, pois foram realizadas replicatas consecutivas e em dias alternados.

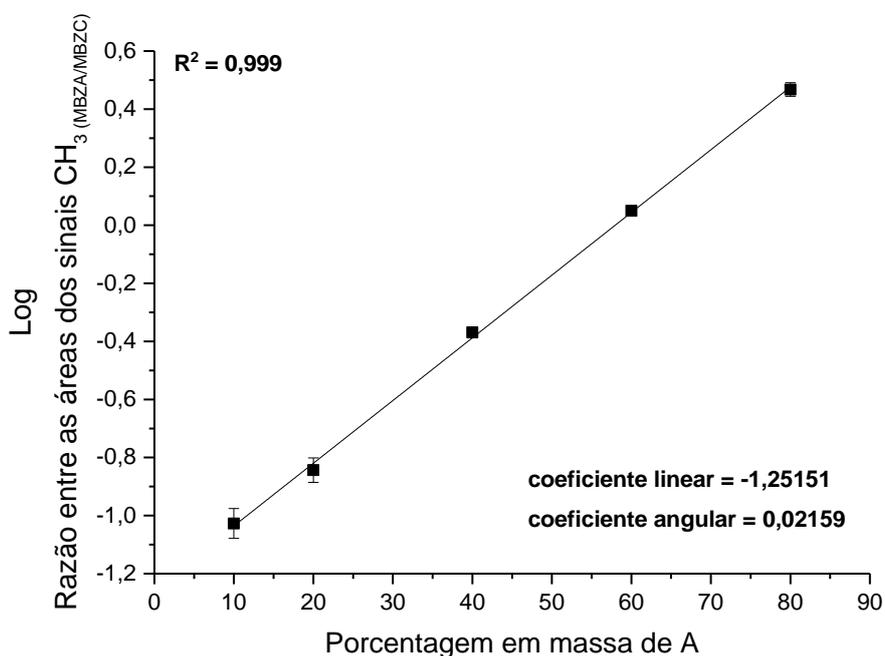


FIGURA 4.23 - Razão entre as áreas dos sinais de ^{13}C -CP-MAS dos grupos metilas (MBZA/MBZC) em função da porcentagem em massa do polimorfo **A** em relação ao polimorfo **C** do mebendazol. Barras de erro de 5%.

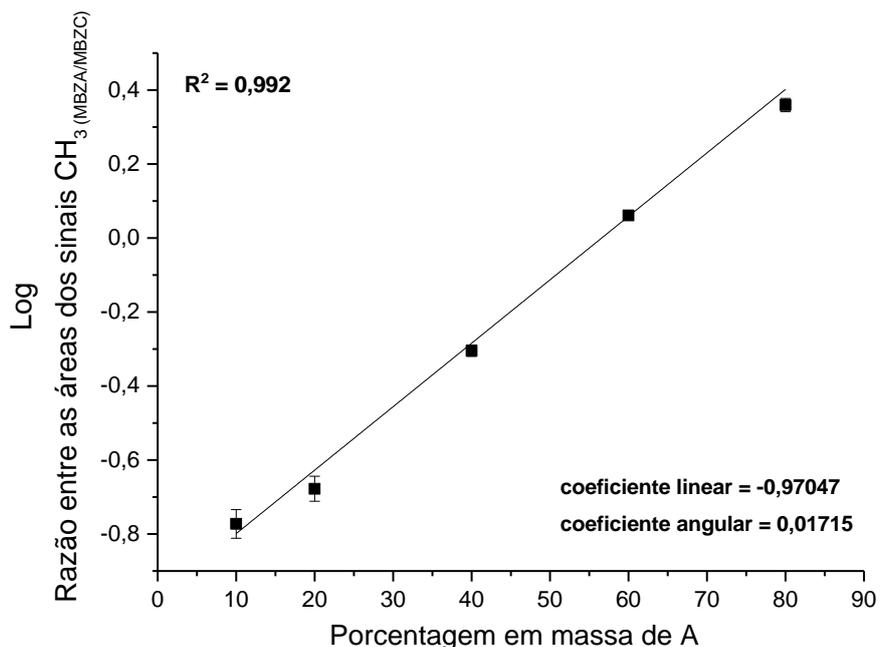


FIGURA 4.24 - Razão entre as áreas dos sinais de ^{13}C -CP-TOSS dos grupos metilas (MBZA/MBZC) em função da porcentagem em massa do polimorfo **A** em relação ao polimorfo **C** do mebendazol. Barras de erros de 5%.

Utilizaram-se os dados obtidos pela regressão linear para mensurar a concentração percentual das formas **A** e **C** no mesmo teste cego usado anteriormente. Os resultados revelaram que através da sequência de pulsos ^{13}C -CP-MAS foi possível chegar a resultados mais próximos do correto; 79 e 21% (^{13}C -CP-MAS) e 77 e 23% (^{13}C -CP-TOSS) para as formas **A** e **C**, respectivamente. Esses resultados mostraram que a presença de excipientes não interferiu na medida quantitativa dos polimorfos **A** e **C** do mebendazol. Assim, em seguida, utilizaram-se as curvas analíticas para medir, também de forma absoluta, as formas **A** e **C** no comprimido comercial que continha a mistura desses polimorfos (FIGURA 4.19) e o resultado encontrado foi de 32% do polimorfo **A** e 67% do polimorfo **C**, neste caso utilizando a técnica ^{13}C -CP-MAS. Com o uso da técnica ^{13}C -CP-TOSS o resultado foi de 26% para a forma **A** e 74% para a **C**. De acordo com REN e colaboradores (1987), a forma **A** não apresenta atividade anti-helmíntica quando está sozinha ou quando presente acima de 30% em misturas polimórficas. Dessa forma, o resultado obtido nesse trabalho sugere que em alguns momentos, a indústria opta por trabalhar no limite do recomendado.

É importante ressaltar que é possível realizar uma análise quantitativa de maneira relativa realizando uma série de experimentos de CP-MAS, variando o tempo de contato e monitorando o sinal de carbono-13. Em seguida, é necessário traçar as curvas de intensidade *versus* tempo de contato e utilizar o ponto de intersecção entre as duas curvas dos dois polimorfos. Neste ponto a transferência de polarização deve ocorrer da mesma maneira para ambas as formas que estão sendo analisadas. Porém optamos fazer uso de uma curva analítica, por acreditarmos que os erros nas medidas seriam menores.

Nesse trabalho, a menor quantidade detectada em uma mistura de polimorfos do mebendazol foi de 5% em massa (aproximadamente 3 mg). Com relação ao tempo mínimo de análise, houve variação de acordo com a proporção entre os polimorfos, com duração de até 30 minutos.

4.2 - Dietilcarbamazina

4.2.1 - Dietilcarbamazina livre e citrato

Os estudos envolvendo a dietilcarbamazina foram feitos com o intuito de utilizar a RMN no estado sólido como ferramenta para fornecer suporte a estudos prévios sobre: transições de fase que ocorrem em função da variação de temperatura, fornecer dados que confirmem informações estruturais acerca da formação de cristais formados em sistemas multicomponentes (formas co-cristalinas ou salinas).

Neste caso utilizou-se amostras de dietilcarbamazina nas suas formas livre, citrato e maleato. Os estudos foram iniciados com o citrato de dietilcarbamazina, uma vez que esta é a forma que tem sido administrada aos pacientes. Os dados obtidos no difratograma de raios X e no espectro de Raman para o citrato de dietilcarbamazina (FIGURAS 4.25 e 4.26) são compatíveis com os dados encontrados na literatura (SILVA et al., 2010).

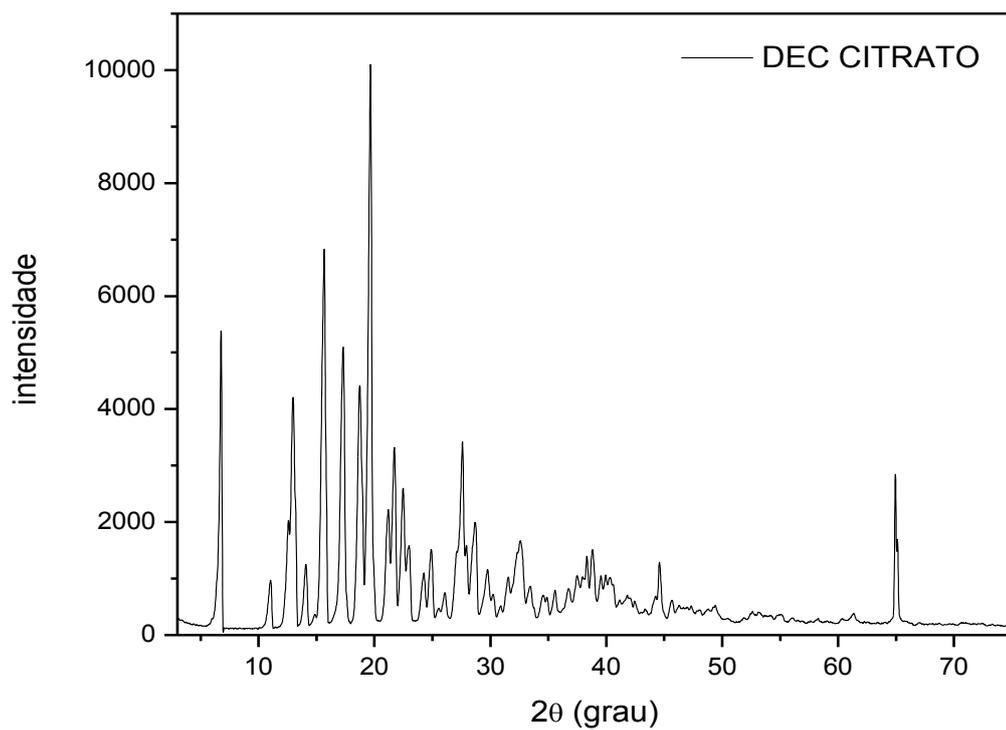


FIGURA 4.25 - Difratoograma de raios X do citrato de dietilcarbamazina.

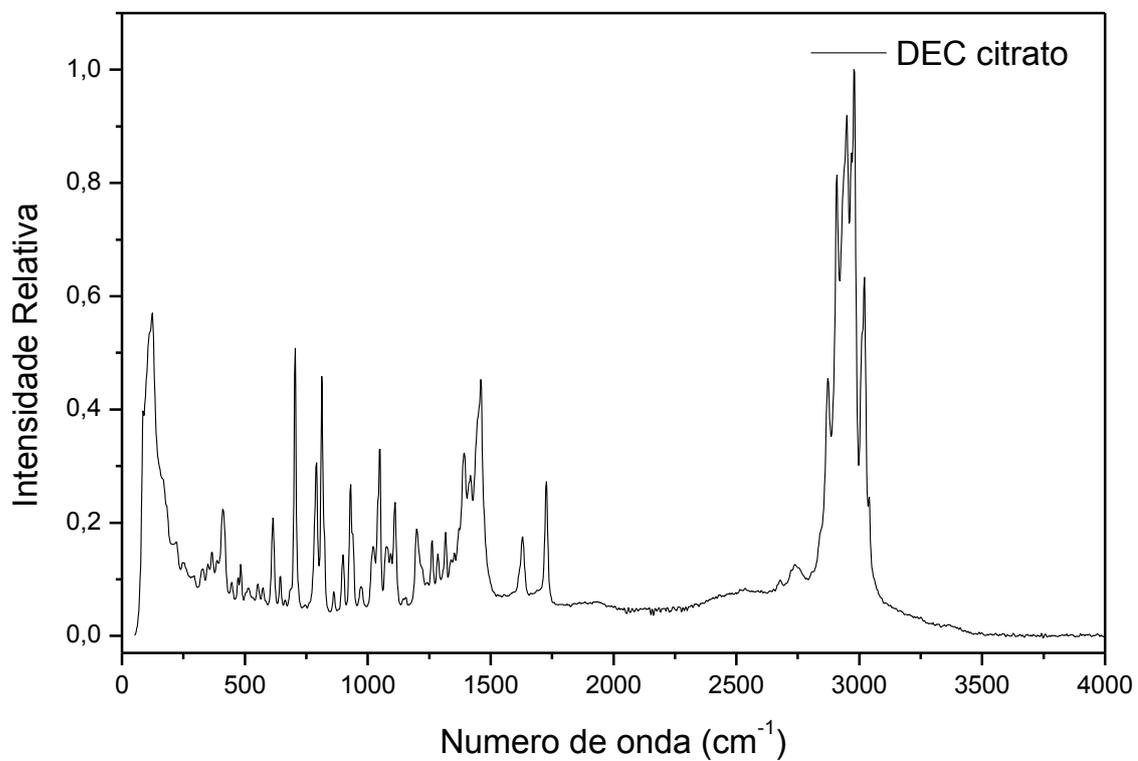


FIGURA 4.26 - Espectro de FT-Raman do citrato de dietilcarbamazina.

Com relação aos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS (FIGURA 4.27) realizados com a dietilcarbamazina nas formas livre e citrato, foi possível obter espectros com sinais bem resolvidos, o que facilitou a análise dos dados. Na TABELA 4.5 estão listados os valores dos sinais atribuídos após a análise dos espectros de ^{13}C -CP-TOSS e ^{13}C -CP-TOSS-NQS (FIGURA 4.28).

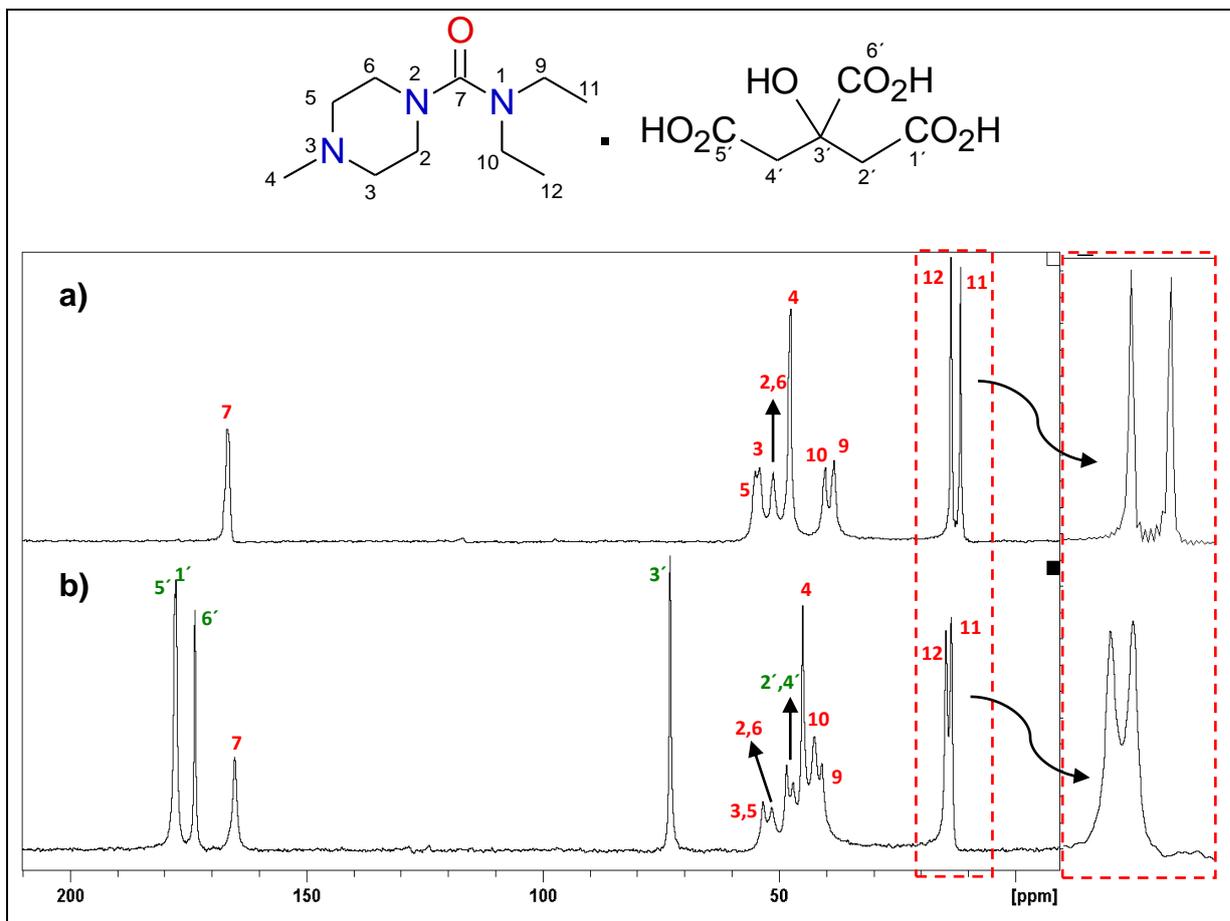


FIGURA 4.27 - Espectro de ^{13}C -CP-TOSS da (a) DEC livre e (b) DEC citrato. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 256 e tempo de contato de 3ms.

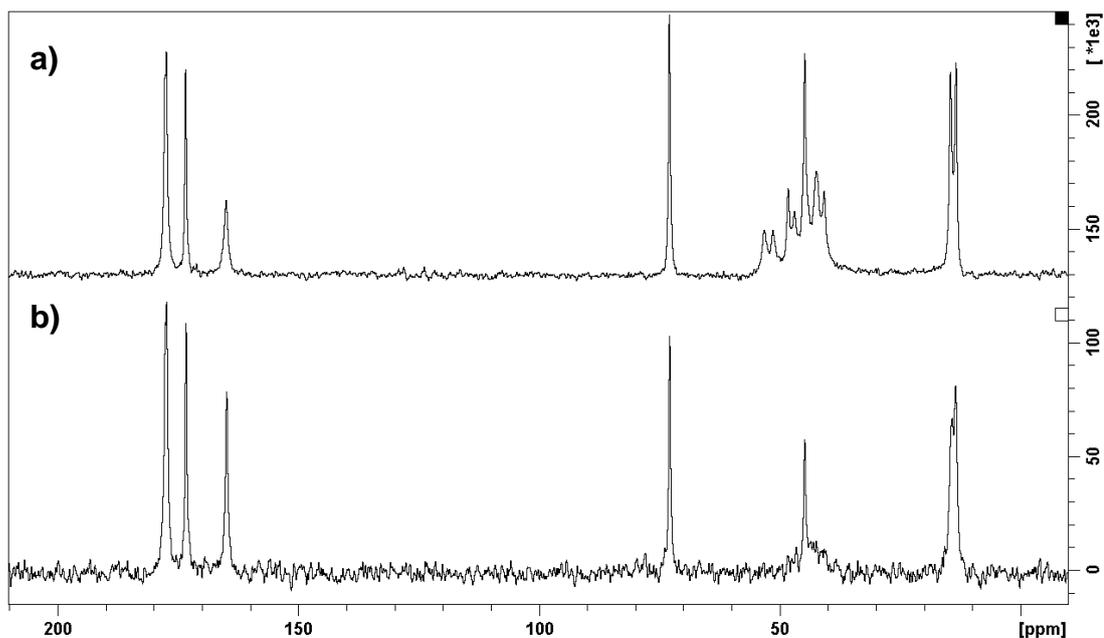
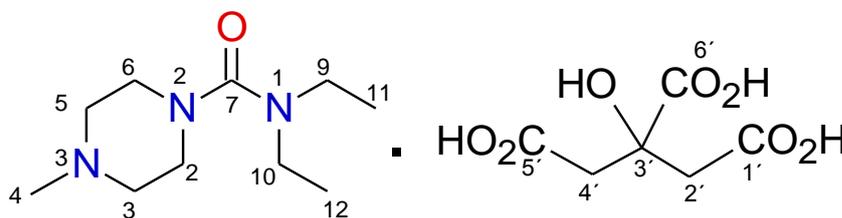


FIGURA 4.28 - Espectros de RMN de ^{13}C da DEC citrato. (a) ^{13}C -CP-TOSS (b) ^{13}C -CP-TOSS-NQS - d_{20} : 80 μs . Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 256, tempo de contato de 3 ms.

TABELA 4.4 - Deslocamentos químicos de ^{13}C -CPTOSS da DEC livre e DEC citrato



Carbono	^{13}C DEC livre	^{13}C DEC Citrato	Carbono	^{13}C Citrato
	δ (ppm)	δ (ppm)		δ (ppm)
11	11,5	13,4	2'	46,9
12	13,5	14,5	4'	48,3
9	38,2	40,7	3'	72,9
10	40,1	42,4	6'	173,4
4	47,5	44,8	1'	177,4
2,6	51,1	51,2	5'	177,6
3	54,0	53,3		
5	54,9	53,3		
7	166,6	164,9		

SILVA e colaboradores (2010) observaram, através da DRXM, que em temperatura ambiente, o grupo etila da DEC citrato com orientação *syn* em relação ao grupo carbonila, pode ser encontrado em duas posições diferentes, ou seja, está desordenado (FIGURA 4.29). As diferentes posições espaciais desses grupos etila resultam nas diferenças verificadas nos espectros de ^{13}C -CP-TOSS de ambas as formas (livre e citrato), principalmente com relação aos sinais dos grupos metilas. Na forma citrato estes sinais aparecem em 13,4 e 14,5 ppm e apresentam deslocamentos químicos mais próximos quando comparados aos das metilas da DEC livre, que aparecem em 11,5 e 13,5 ppm. Na forma citrato, o outro grupo etila com orientação *anti* em relação ao grupo carbonila, está ordenado em apenas uma posição e, de acordo com os dados de DRXM (SILVA et al., 2010), interage com uma carbonila do (citrato)⁻ através de uma ligação de hidrogênio não-clássica do tipo C–H---O, o que justifica os deslocamentos químicos maiores em comparação com os da forma livre.

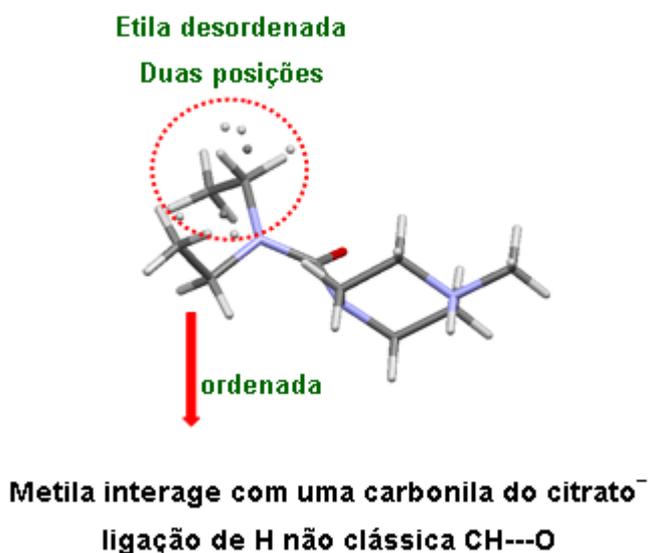


FIGURA 4.29 - Desordem de um dos grupos etila da DEC citrato.

Outra diferença que pode ser observada é que o grupo metila (C4) e os metilenos (C3, C5) do anel piperazina estão mais blindados para a DEC citrato, e tal fato pode ser decorrente da blindagem exercida pelo cone de proteção de uma carbonila do citrato, que segundo dados de cristalografia (SILVA et al., 2010), está próxima a essa região.

Embora os experimentos anteriores tenham reunido informações importantes, os experimentos de CP-MAS e CP-NQS observando o núcleo de ^{15}N e o HETCOR- ^1H - ^{13}C forneceram os resultados mais interessantes. O HETCOR da DEC citrato (FIGURA 4.30) indica que o citrato interage com a DEC através de uma ligação de hidrogênio entre a carboxila (C_6') e um dos nitrogênios da DEC, uma vez que o deslocamento químico do H é compatível com ligação de H do tipo $\text{N}\cdots\text{H}\cdots\text{O}$ (~ 13 ppm) (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012).

Outra informação importante que pode ser visualizada no HETCOR da DEC citrato é o sinal de correlação entre os carbonos C_1' e C_5' , ambos com um hidrogênio em aproximadamente 16 ppm. Um hidrogênio com este deslocamento químico é típico de um átomo envolvido em uma ligação de hidrogênio forte (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012), o que pode indicar uma interação entre carboxilas de unidades diferentes de citrato, como descrito por SILVA e colaboradores (2010) (FIGURA 4.31).

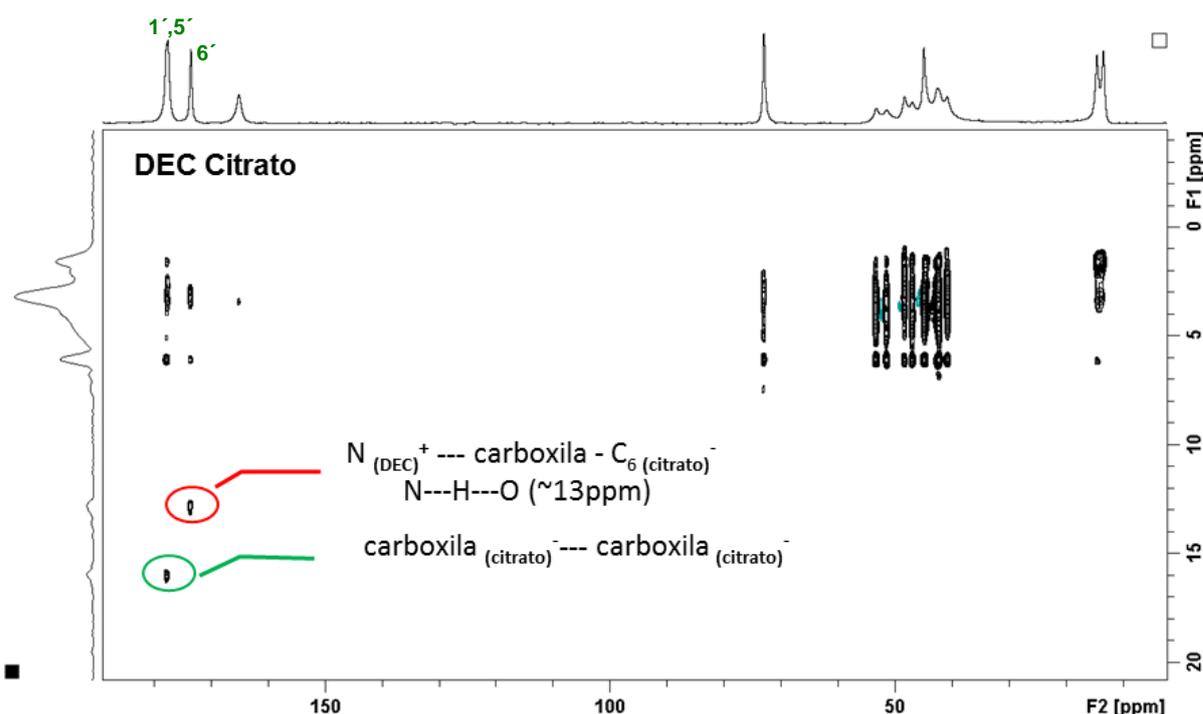


FIGURA 4.30 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para a DEC citrato, utilizando a técnica HETCOR, com rotação de 10 kHz e tempo de contato de 500 μs . Dimensão F1 é relativa a projeção do espectro de ^1H e dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

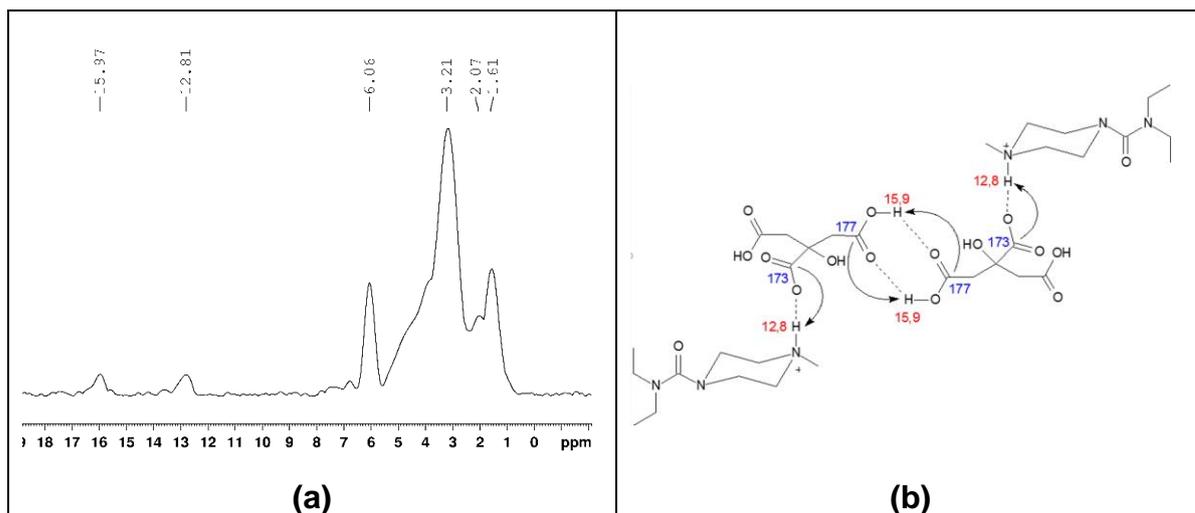


FIGURA 4.31 - (a) Projeção do espectro de ^1H da DEC citrato obtido indiretamente do experimento HETCOR ^{13}C - ^1H e (b) correlações entre carbonos e hidrogênios envolvidos em ligações de hidrogênio.

Já os espectros de ^{15}N -CP-TOSS mostram que o nitrogênio metilado (N3) da DEC citrato está mais desblindado em comparação ao da DEC livre, o que pode ser um indício de que este é o nitrogênio que encontra-se protonado (FIGURAS 4.31 e 4.32). O nitrogênio metilado do anel piperazina é protonado possivelmente devido aos efeitos doadores de elétrons provenientes dos carbonos sp^3 ligados diretamente a ele, o que confere um maior caráter básico a este nitrogênio. Os outros átomos de nitrogênios não estão protonados por causa da retirada de elétrons pelo grupo carbonila, por efeito de ressonância. Através do experimento ^{15}N -CP-NQS também foi possível confirmar onde ocorre a protonação da dietilcarbamazina, uma vez que o sinal referente ao nitrogênio protonado (N3) foi suprimido, permanecendo apenas os sinais dos nitrogênios não protonados (FIGURA 4.32a). O mapa de correlação ^{13}C - ^1H HETCOR para a DEC livre está apresentado na FIGURA 4.33, mas não foi possível obter nenhuma informação interessante deste experimento.

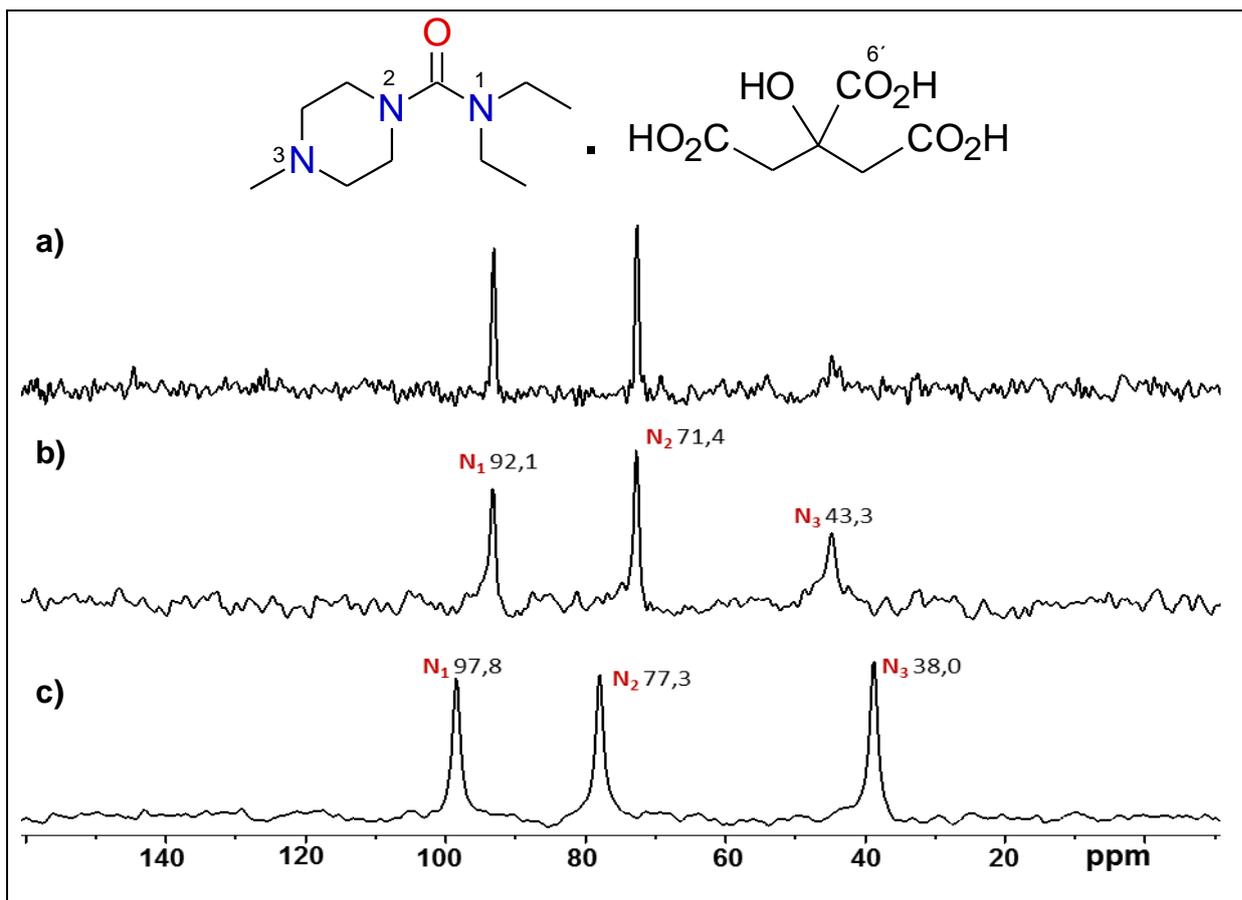


FIGURA 4.32 - Espectros de (a) ^{15}N -CP-NQS do citrato de dietilcarbamazina - d₂₀: 50 μs , (b) ^{15}N -CP-MAS do citrato de dietilcarbamazina, (c) ^{15}N -CP-MAS da dietilcarbamazina na forma livre. Giro no ângulo mágico de 5 KHz, número de promediações de 256, tempo de contato de 3,0 ms.

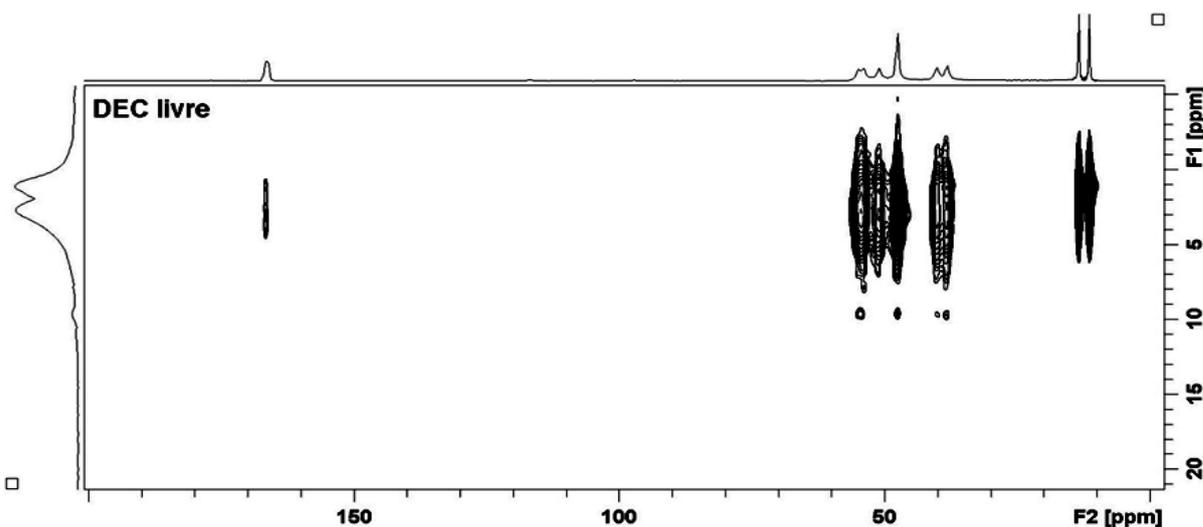


FIGURA 4. 33- Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para a DEC livre, utilizando a técnica HETCOR, com rotação de 10 kHz e tempo de contato de 500 μs . Dimensão F1 é relativa a projeção do espectro de ^1H e dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

Experimentos com variação de temperatura

No trabalho de SILVA et al., (2010), foi verificado que a parte alifática se torna mais ordenada em baixas temperaturas e que ocorrem três transições de fase sólido-sólido, numa faixa de temperatura entre -173 e 20°C, gerando quatro fases cristalinas, as quais foram denominadas fases I, II, III e IV.

Após as análises por difração de raios X em temperatura ambiente, o cristal de DEC citrato foi congelado até a temperatura de -123 °C, sendo possível observar uma ligação de hidrogênio intermolecular não-clássica envolvendo o metileno (CH₂) do grupo etila, que em temperatura ambiente era desordenado, e o nitrogênio neutro do anel piperazina, permanecendo assim fixo em uma única posição e conectando unidades de (DEC)⁺. Nessa temperatura, a ligação de hidrogênio não-clássica do tipo C–H---O, que existia a 20 °C, envolvendo o grupo etila com orientação *anti* e uma carbonila do (citrato)⁻, passa a não existir. Outra interação encontrada é a ligação intermolecular do tipo N⁺–H---C=O entre o grupo piperazina e a carbonila do carbamoil de (DEC)⁺. Observou-se, ainda, que o empacotamento cristalino a -123 °C é mais compacto do que em temperatura ambiente. Essa fase foi denominada fase III.

Na fase IV, determinada congelando-se o cristal a partir da temperatura ambiente até a temperatura de -173 °C, verificou-se um sistema de cristalização triclinico, com dois pares iônicos de (DEC)⁺ (citrato)⁻ na unidade assimétrica. Nessa temperatura, ambos os grupos etila apresentam conformação *anti* em relação ao anel piperazina e essa conformação facilita a ligação de hidrogênio não-clássica do tipo C–H---O, entre o CH₂ do grupo etila e a carbonila de um dos grupos carboxila do (citrato)⁻.

Para a determinação da estrutura cristalina da fase II, um cristal de DEC citrato foi congelado até a temperatura de -123 °C (fase III), e depois aquecido até -38 °C a 2 °C min⁻¹, para então ser analisado novamente por difração de raios X. Após essa análise, observou-se a presença de dois pares iônicos de (DEC)⁺ (citrato)⁻ na unidade assimétrica, os quais também foram encontradas nas unidades assimétricas determinadas na fase I e na fase III. Assim como na fase I, a fase II contém moléculas que apresentam uma ligação de hidrogênio não-clássica do tipo C–H---O entre um dos grupos metilas da (DEC)⁺ com uma carbonila do (citrato)⁻. Uma das interações presentes na fase II, também ocorrente na fase III, é a ligação

intermolecular do tipo $N^+-H---C=O$ entre o grupo piperazina e a carbonila do carbamoil de (DEC)⁺. A ligação de hidrogênio não-clássica do tipo $C-H---O$ entre o CH_2 da etila e a carbonila de um dos grupos carboxila do (citrato)⁻ que ocorre na fase I, não ocorre mais em algumas moléculas da fase II, assim como acontece na fase III, ou seja, mais uma vez é possível concluir que na fase II encontram-se moléculas com a conformação da fase I e outras moléculas com a conformação da fase III. Todo esse estudo por difração de raios X recebeu suporte dos dados obtidos da análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC). A FIGURA 4.34 apresenta a unidade assimétrica da DEC citrato em diferentes temperaturas.

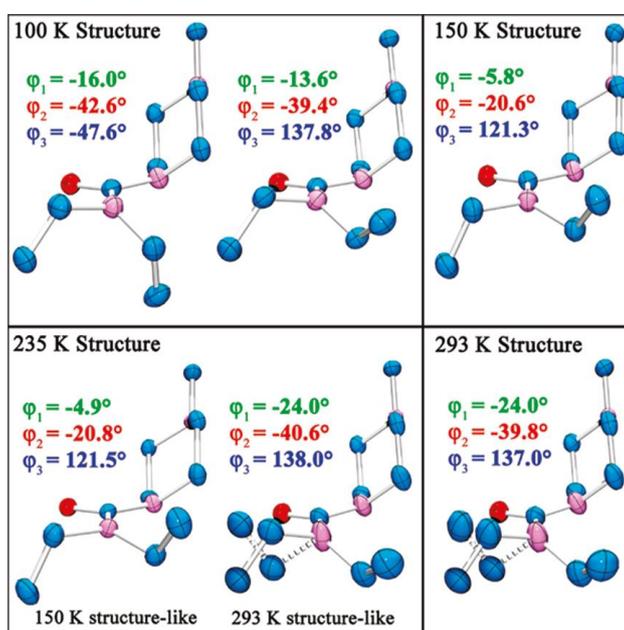


Figura reproduzida com permissão de SILVA et al., 2010. Direitos autorais 2014, American Chemical Society.

FIGURA 4.34 - Unidade assimétrica da DEC citrato em diferentes temperaturas.

O estudo por raios X descreve quatro diferentes fases que foram determinadas nas temperaturas 20, -38, -123 e -173°C (SILVA et al., 2010). A temperatura mínima permitida para realizar experimentos no equipamento de RMN utilizado neste trabalho é de -50 °C, portanto, visualizou-se somente o início da primeira transição de fase da DEC citrato.

No intuito de verificar tais mudanças conformacionais na estrutura da DEC citrato através da técnica de RMN, realizaram-se experimentos de ¹³C-CP-MAS variando a temperatura de 20 a -50 °C (FIGURA 4.35).

Foi possível observar diferenças nos sinais dos grupos metilas (~14 ppm), principalmente entre as temperaturas de 20 e 0 °C, onde os sinais se tornam mais estreitos e intensos conforme a temperatura diminui. Uma análise mais minuciosa mostra também que há uma tendência na diminuição do deslocamento químico dos sinais relativos a estes grupos, o que mostra pequenas mudanças no ambiente eletrônico nos quais estes se encontram. Esse comportamento pode estar relacionado apenas a um enrijecimento do sistema. Outro sinal que apresenta mudança, esta já mais evidente, é o atribuído ao carbono C10, cuja intensidade aumenta significativamente quando a temperatura é diminuída até -38 °C, temperatura que corresponde à transição de fases I→II.

Como descrito pelo estudo por DRXM, na fase II o grupo etila que ocupava duas posições em temperatura ambiente, passa a interagir por meio de ligação de hidrogênio com um dos nitrogênios da piperazina em temperaturas mais baixas, conectando assim, duas unidades de DEC⁺ [CH₂ (grupo etila)---N_{piperazina}]. A existência de uma ligação de hidrogênio entre o grupo metileno (C10) e um nitrogênio torna este grupo menos móvel, o que justifica o aumento na intensidade do sinal desse CH₂, uma vez que em um sistema mais rígido a transferência de polarização é mais eficiente. Este comportamento é mantido até uma temperatura de -50°C.

Outra observação que pode ser feita nos espectros de ¹³C-CP-MAS é referente aos sinais dos carbonos C1' e C5' do citrato (~177 ppm), pois a partir de 0 °C já se começa a observar o desdobramento destes sinais, possivelmente porque, nessas temperaturas, algumas moléculas deixam de apresentar grupos carbonila envolvidos na ligação de hidrogênio não-clássica CH₃ (DEC)⁺ --- C=O_(citrato)⁻, passando a apresentar deslocamentos químicos significativamente diferentes.

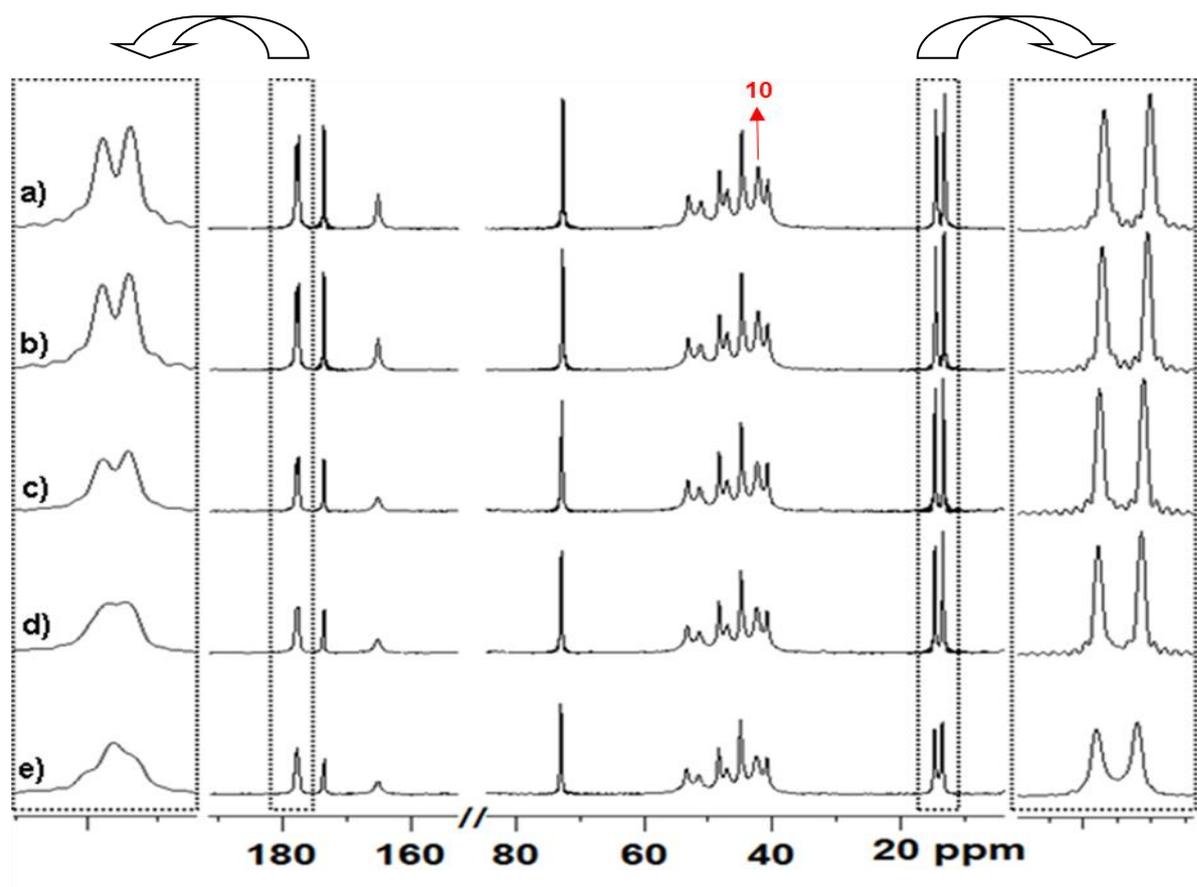


FIGURA 4.35 - Espectros de ^{13}C -CP-MAS do citrato de dietilcarbamazina: (a) $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (c) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (d) $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e (e) $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 - DEC maleato

Os grupos dos Profs. Javier Ellena (do IFSC-USP) e Pedro Ayala (DF-UFCE) têm se dedicado à obtenção de novas formas salinas da dietilcarbamazina, e uma das formas que tem sido estudada é a da DEC maleato. A preparação desse sal visa obter uma forma mais estável e com maior biodisponibilidade. Com os bons resultados obtidos para o sistema DEC-citrato também decidimos fazer um estudo semelhante por RMN no estado sólido, visando fornecer informações adicionais que corroborem com os resultados obtidos por outras técnicas, e também aplicar a RMN neste tipo de estudo.

O espectro de ^{13}C -CP-TOSS da DEC maleato também apresentou sinais bem resolvidos e a FIGURA 4.36 mostra a comparação entre os espectros da

DEC maleato e da DEC livre, nos quais os sinais foram atribuídos de acordo com a análise dos dados de todos os experimentos 1D (FIGURA 4.37, TABELA 4.5).

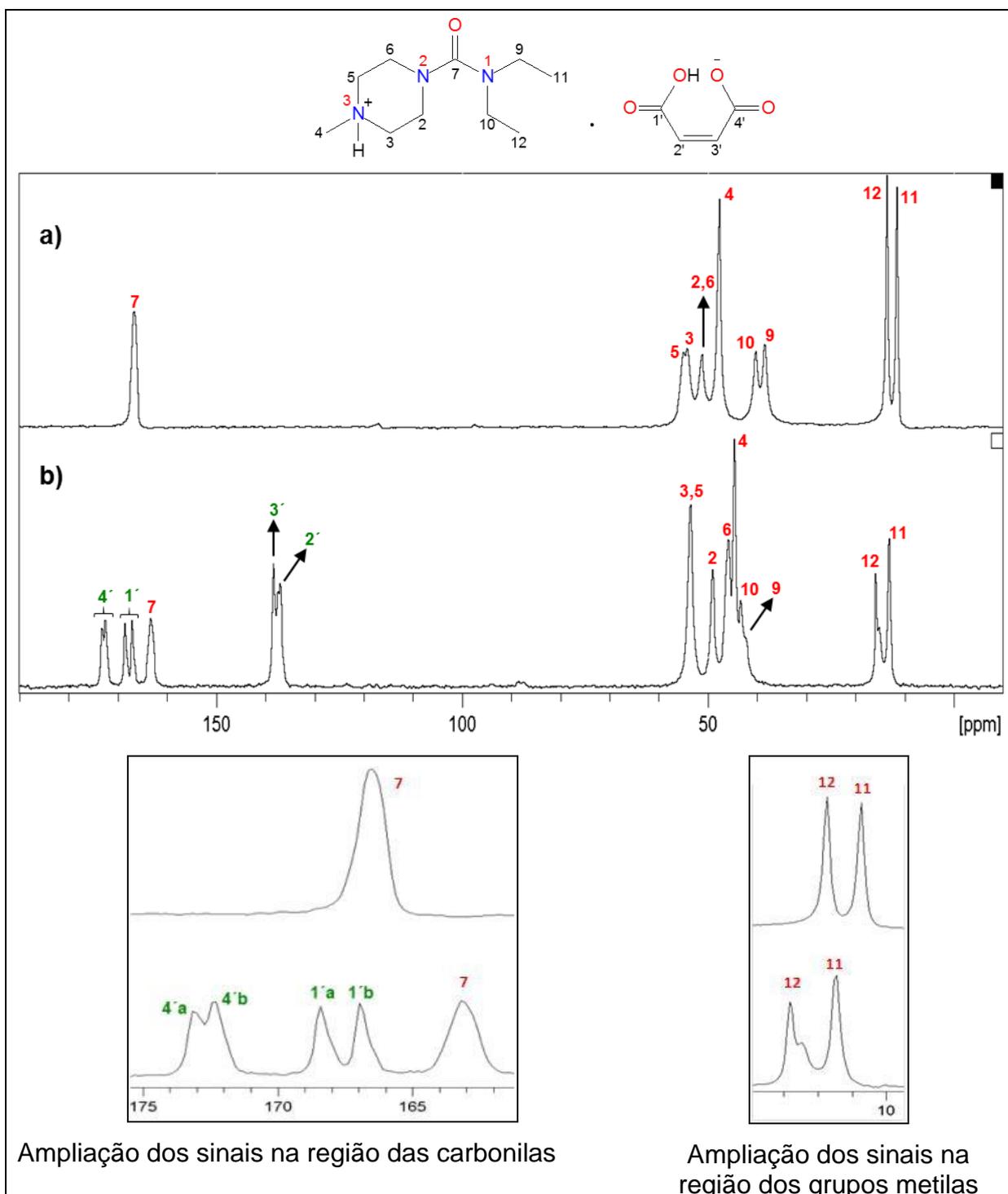


FIGURA 4.36 - Espectro de ^{13}C -CP-TOSS da (a) DEC livre e (b) DEC maleato. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de transientes de 256 e tempo de contato de 3 ms.

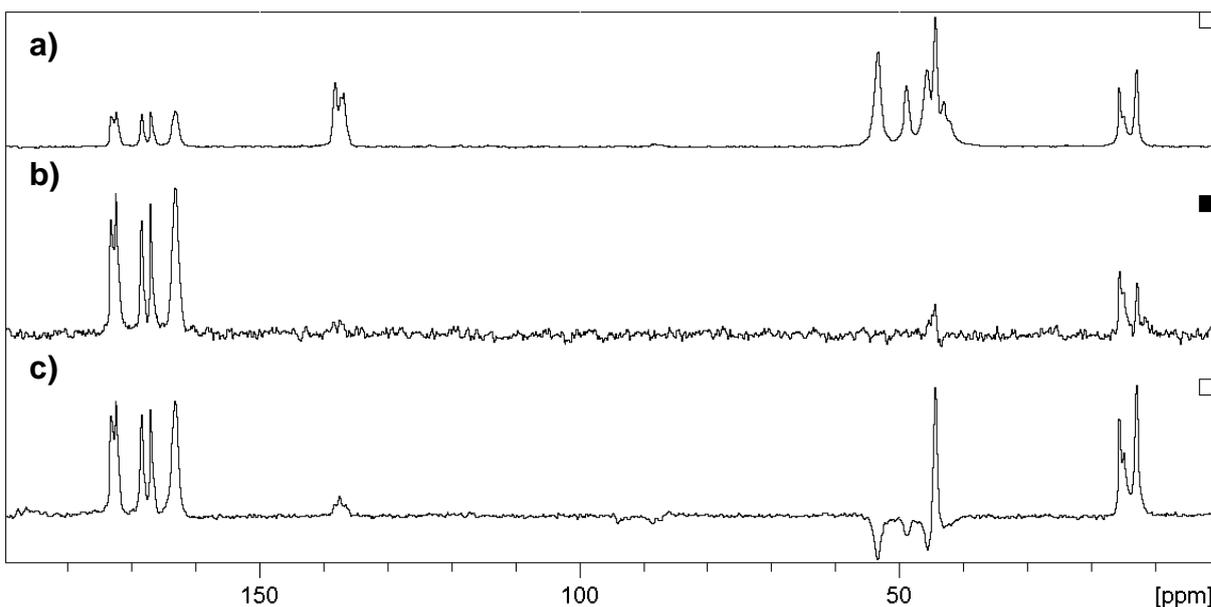
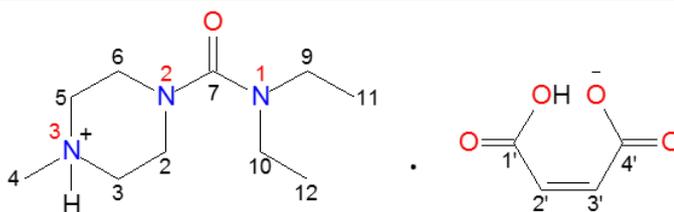


FIGURA 4.37 - Espectros de RMN de ^{13}C da DEC maleato. (a) ^{13}C -CP-TOSS (b) ^{13}C -CP-TOSS-NQS - d20: 110 μs e (c) CP-PI-TOSS - p16: 50us. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de transientes de 256 e tempo de contato de 3 ms.

TABELA 4.5 - Deslocamentos químicos de ^{13}C -CP-TOSS da DEC livre e DEC maleato

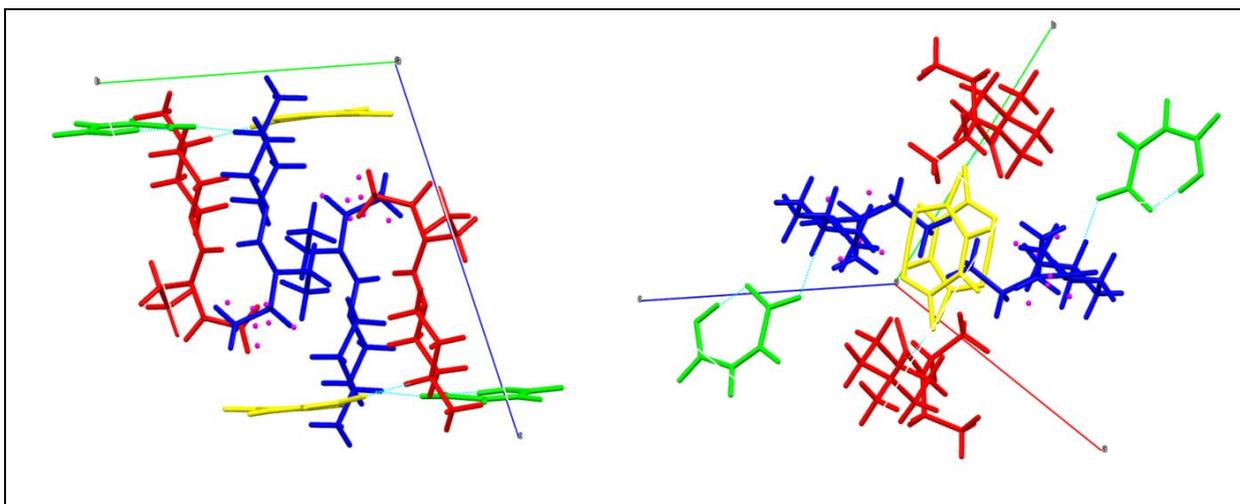


Carbono	^{13}C DEC livre δ (ppm)	^{13}C DEC Maleato δ (ppm)	Carbono	^{13}C Maleato δ (ppm)
11	11,5	13,0	2'	136,9/137,3
12	13,5	15,0/15,6	3'	138,2
9	38,2	42,1	1'	166,9/168,4
10	40,1	43,1	4'	172,4/173,1
4	47,5	44,4		
2,6	51,1	45,7/48,9		
3	54,0	53,3		
5	54,9	53,3		
7	166,6	163,2		

É possível observar diferenças entre os sinais da DEC livre e da DEC maleato na região dos grupos metilas (11,5-15,6 ppm), onde verifica-se inclusive, que a região atribuída ao C12 da DEC maleato apresenta sinais de duas frequências distintas, o que sugere duas orientações diferentes para esse grupo metila. Conforme o estudo realizado através da técnica de DRXM (SILVA et al.), a unidade assimétrica da DEC maleato apresenta dois pares iônicos, DEC⁺ e maleato⁻, como mostra a FIGURA 4.38. Nesta unidade as duas moléculas de DEC⁺ são confôrmeros bastante similares (confôrmeros A e B, representados nas cores vermelho e azul).

No entanto, o confôrmero A apresenta um dos grupos etila em duas posições diferentes (70% *syn* e 30% *anti* em relação ao grupo piperazina), o que pode justificar o desdobramento do sinal de um dos grupos metilas da DEC maleato. Outra evidência das diferenças na região etílica está nos deslocamentos dos sinais atribuídos aos carbonos CH₂ (entre 38-43 ppm), que segundo dados de DRXM (SILVA et al.) mostram uma pequena diferença entre os ângulos de torção nessa região da DEC livre e DEC maleato.

Os dados de DRXM (SILVA et al.) também mostram que o anel piperazina da DEC livre apresenta conformação bastante semelhante ao anel da DEC maleato; no entanto, a ligação de hidrogênio intermolecular entre o nitrogênio metilado da DEC⁺ e uma das carboxilas do maleato⁻ [N⁺-H---O], justifica as diferenças de deslocamentos químicos na região dos carbonos CH₂ e do grupo metila do anel piperazina (44-55 ppm).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 4.38 - Cella unitária do maleato de DEC visto em duas diferentes projeções espaciais.

Além das duas unidades de DEC⁺, co-existindo como dois confômeros de DEC⁺ (representados pelas cores azul e vermelho) existem também duas unidades de maleato⁻ (representadas nas cores verde e amarelo), que experimentam tensores de blindagem diferentes e, portanto, apresentam frequências de ressonância diferentes, resultando no desdobramento dos sinais referentes a estas unidades.

A observação mais evidente é o desdobramento dos sinais atribuídos aos carbonos carboxílicos C1' e C4' do maleato (~ 168 e 173 ppm, respectivamente). Esses carbonos estão envolvidos em uma ligação de hidrogênio intramolecular entre as carboxilas do maleato [C(1')-O-H --- O- C(4')]. A evidência destas ligações são os quatro sinais de correlação existentes no mapa de correlação heteronuclear (FIGURA 4.39). Os carbonos C1' e C4' de uma das unidades maleato correlacionam com um mesmo hidrogênio em 17,1 ppm, estes mesmos carbonos da outra unidade correlacionam com um hidrogênio em 17,6 ppm. Já o carbono C4' também correlaciona com um próton em 12 ppm que é relativo a um hidrogênio envolvido numa ligação de hidrogênio do tipo [N⁺-H---O]. Este hidrogênio encontra-se mais fortemente ligado ao nitrogênio devido à transferência de um próton do ácido málico para a DEC. Este mesmo hidrogênio em 12 ppm correlaciona fortemente com os hidrogênios do anel piperazínico (C3, C5) e com o grupo metila C4 via difusão de spins, uma vez que estão espacialmente próximos.

Outra observação, menos evidente, mas que confirma a existência de duas unidades maleato por unidade assimétrica, é que os sinais dos carbonos vinílicos (C2' e C3', respectivamente em 137 e 138 ppm) também se encontram levemente desdobrados. Além do hidrogênio diretamente ligado ao carbono C2' (em ~6 ppm), este átomo correlaciona também com um hidrogênio em 17,6 ppm. Já o carbono C3' correlaciona com um hidrogênio em ~6 ppm, com um hidrogênio em 12,0 ppm e com outros dois em 17,1 e 17,6 ppm, que devem aparecer por conta da existência de duas moléculas por unidade assimétrica. Este carbono está mais próximo do grupo carboxilato envolvido diretamente na interação com a DEC através de uma ligação de hidrogênio. É importante lembrar que os sinais de correlação com o hidrogênio em 12 ppm só foram possíveis de serem observados quando o tempo de contato do experimento HETCOR foi aumentado para 2 ms, e esses sinais podem ser visualizados na FIGURA 4.39c. Todas as correlações e a projeção do espectro de hidrogênio são apresentados na FIGURA 4.40.

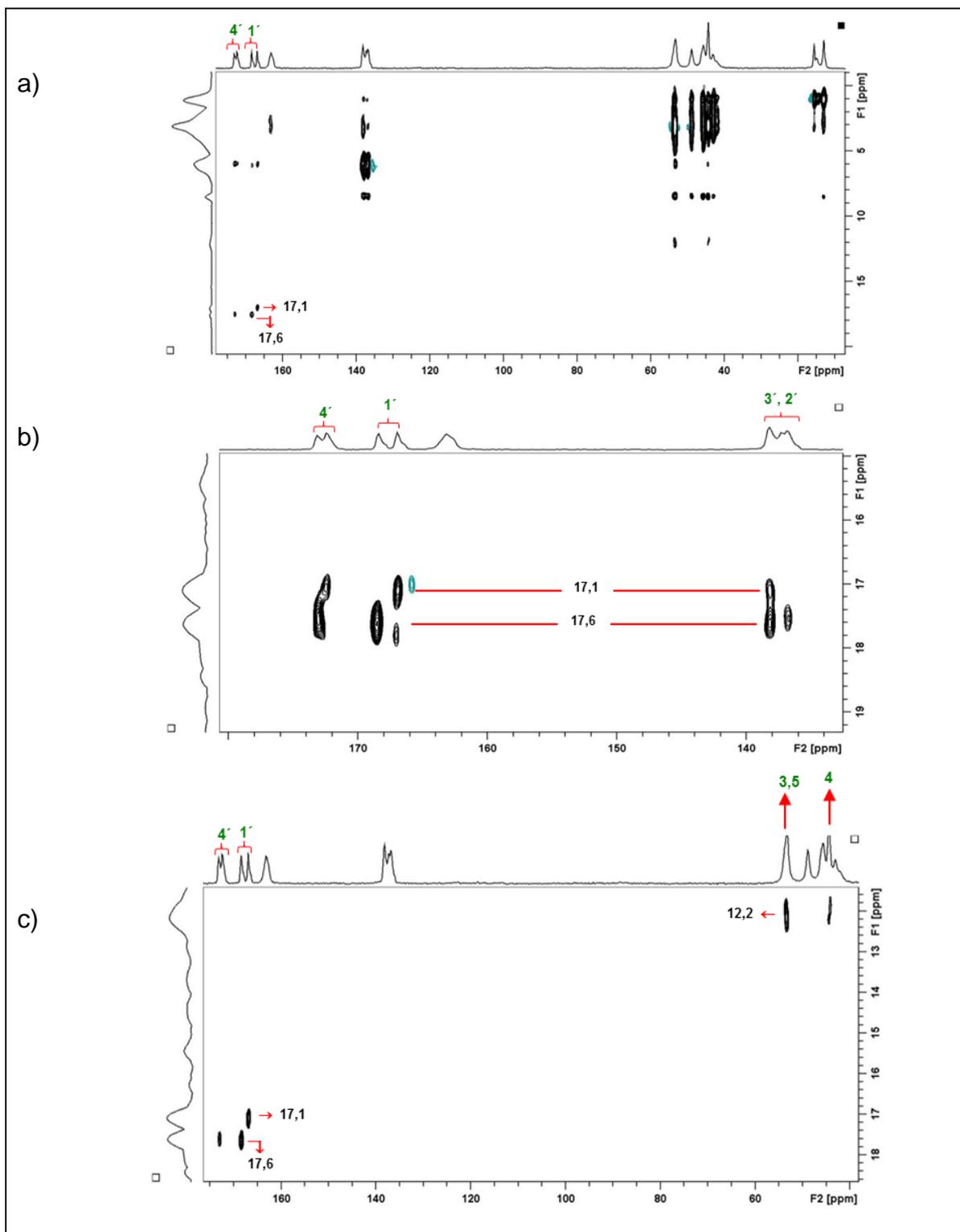


FIGURA 4.39 - Mapa de correlação HETCOR ^{13}C - ^1H para a DEC maleato: (a) Mapa total obtido com tempo de contato de 200 μs ; (b) expansão do mapa da região dos carbonos vinílicos e carbonílicos, obtidos com um tempo de contato de 2 ms e (c) expansão mostrando os sinais de correlação com os hidrogênios em 12 e 17 ppm, obtido com tempo de contato de 2 ms. Dimensão F1 é relativa a projeção do espectro de ^1H e dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

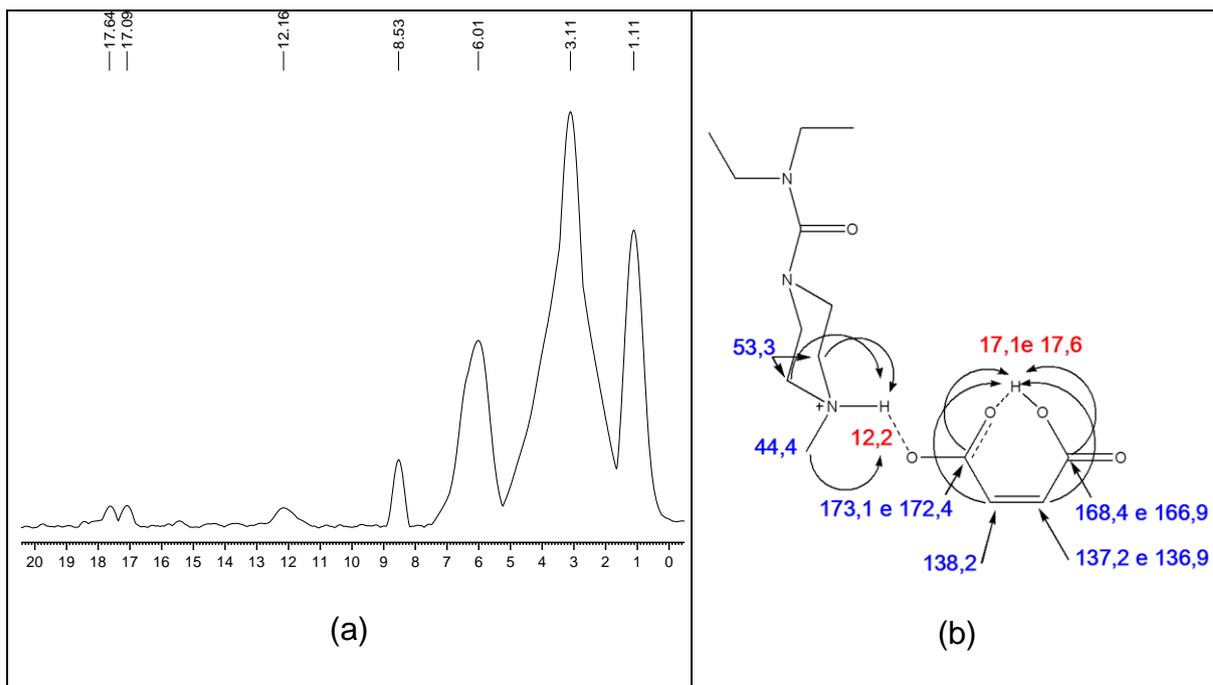


FIGURA 4. 40 - (a) Projeção do espectro de ^1H da DEC maleato obtido indiretamente do experimento HETCOR ^{13}C - ^1H e (b) correlações entre carbonos e hidrogênios envolvidos em ligações de hidrogênio.

Como mencionado e explorado no experimento de correlação heteronuclear, ficou evidente que a DEC maleato apresenta uma ligação de hidrogênio intermolecular entre o nitrogênio protonado da DEC⁺ e o grupo carboxilato do maleato⁻ [$\text{N}(3)\text{H} \cdots \text{O}(4')$]. Este resultado foi confirmado pelo experimento de ^{15}N -CP-MAS, cujo espectro (FIGURA 4.41) mostra que o deslocamento químico do N(3) da DEC maleato aparece em maiores valores de frequência quando comparado ao N(3) da DEC livre.

Além disso, o valor é muito próximo ao deslocamento químico observado para o mesmo nitrogênio da DEC citrato (43,3 ppm; FIGURA 4.32), pois esta última também apresenta ligação de hidrogênio intermolecular com um carboxilato do citrato. O espectro de ^{15}N -CP-NQS da DEC maleato confirmou a protonação no nitrogênio N3 (42,6 ppm), assim como para a DEC citrato, pois este foi completamente suprimido nesse experimento (FIGURA 4.41a).

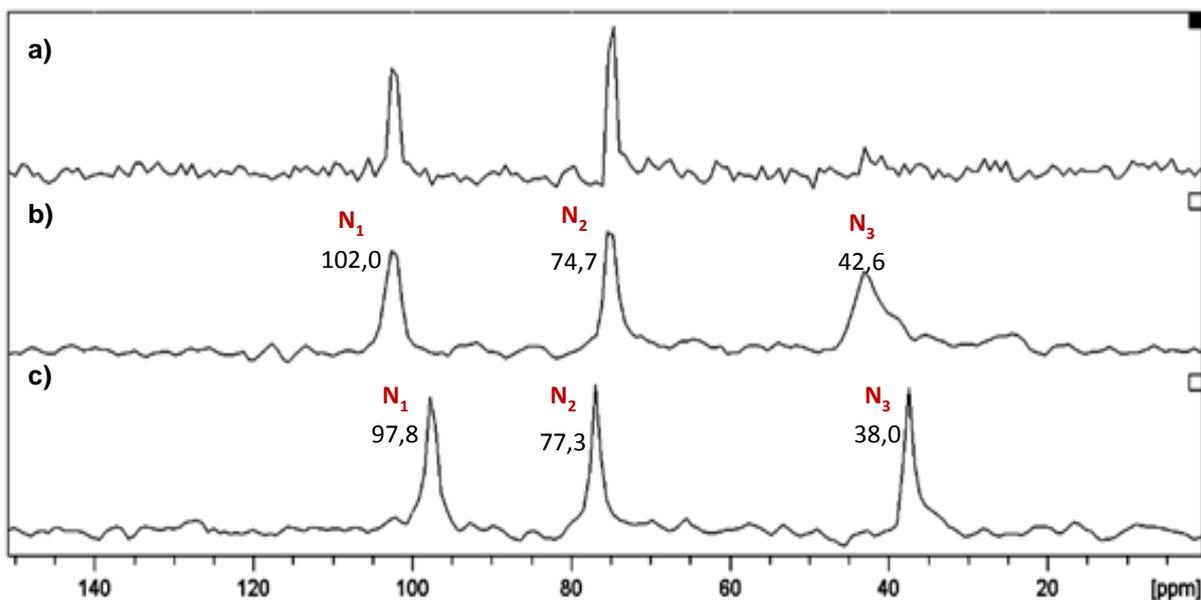


FIGURA 4.41 - Espectros de (a) ^{15}N -CP-NQS do maleato de dietilcarbamazina - d20: 80 μs , (b) ^{15}N -CP-MAS do maleato de dietilcarbamazina, (c) ^{15}N -CP-MAS da dietilcarbamazina na forma livre. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 1024, tempo de contato de 3 ms.

4.3 - Ácido Micofenólico

No processo de obtenção do ácido micofenólico desenvolvido em nosso laboratório (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2007), foi observado que, dependendo do solvente utilizado na recristalização eram obtidos cristais visualmente diferentes, que não mais solubilizavam em metanol. Essa foi a principal motivação em estudá-lo, além de que são encontrados poucos estudos sobre a possível existência de polimorfos.

Iniciaram-se os experimentos com o ácido micofenólico com a medida do tempo de relaxação longitudinal (T_1) e o maior valor encontrado foi de 17,3 s referente aos hidrogênios ligados ao carbono C13, no entanto, os experimentos foram realizados com $d1=10\text{s}$. Em seguida, o tempo de contato ($p15$) também foi otimizado e o melhor resultado foi obtido com o uso de um tempo de contato de 1500 μs .

Para a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos do ácido micofenólico, foram utilizados os dados obtidos através dos espectros de ^{13}C -CP-

TOSS, ^{13}C -CP-TOSS-NQS e ^{13}C -CP-PI-TOSS, os quais apresentaram sinais bem resolvidos, o que facilitou a análise dos dados (FIGURAS 4.42 e 4.43, TABELA 4.6).

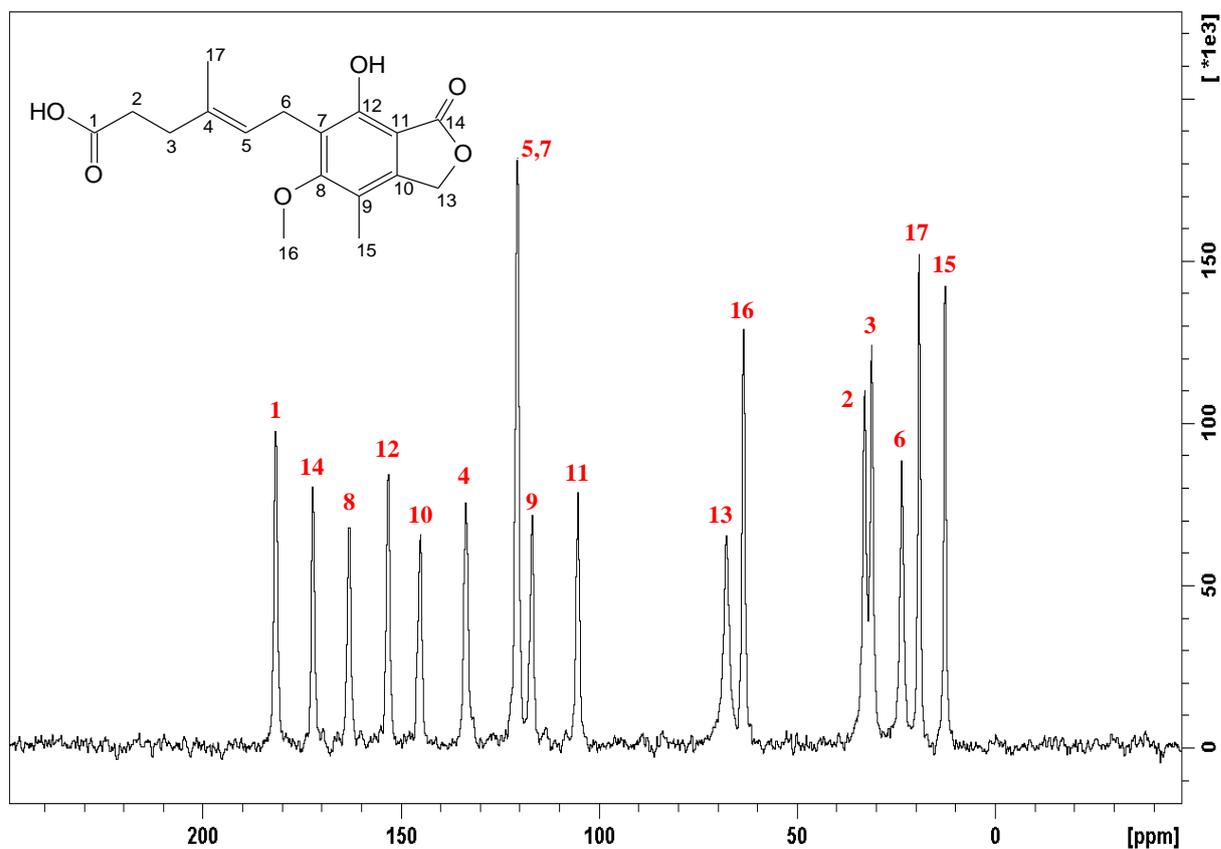
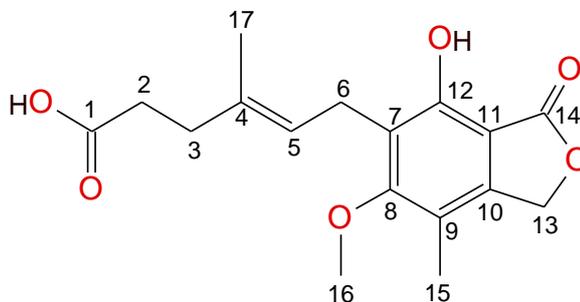


FIGURA 4.42 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do ácido micofenólico. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 256, tempo de contato de 1,5 ms.

TABELA 4. 6 - Deslocamentos químicos de ^{13}C do Ácido Micofenólico, atribuídos através dos experimentos unidimensionais (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CP-PI-TOSS)



Carbono	^{13}C AMF $\delta(\text{ppm})$	Carbono	^{13}C AMF $\delta(\text{ppm})$
1	181,6	9	116,8
2	32,9	10	145,0
3	31,1	11	105,3
4	133,5	12	153,2
5	120,6	13	67,8
6	23,6	14	172,2
7	120,6	15	12,7
8	163,0	16	63,5
		17	19,2

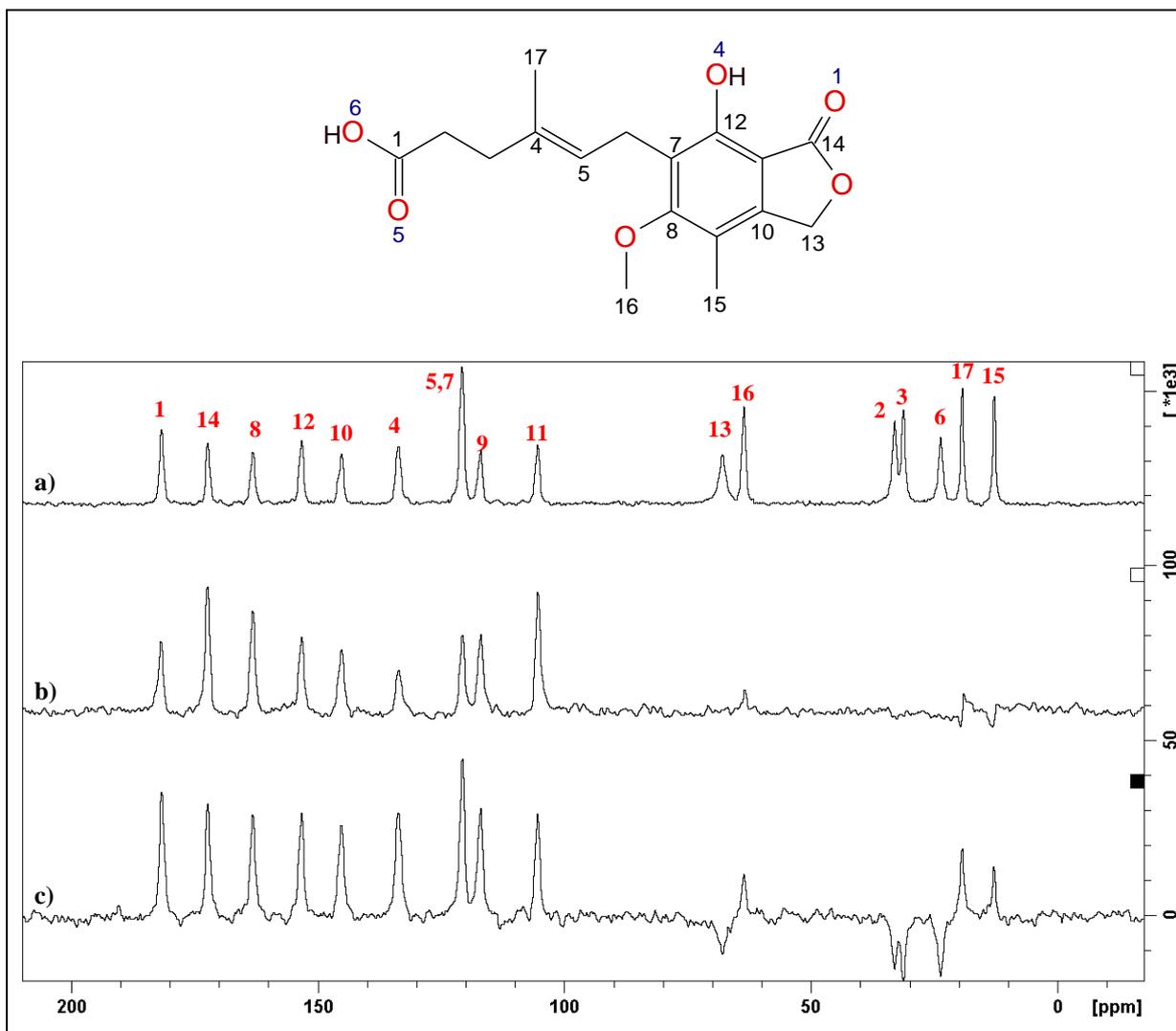
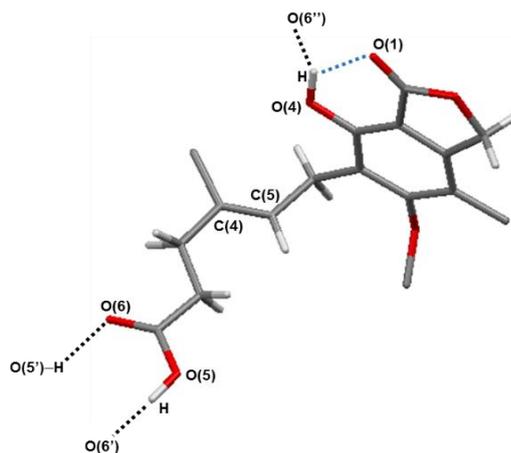


FIGURA 4.43 - Espectros de ¹³C-RMN do ácido micofenólico. (a) CP-TOSS (b) CP-TOSS-NQS - d20: 120us e (c) CP-PI-TOSS - p16: 90us. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 256, tempo de contato de 1,5 ms.

Segundo o estudo realizado por difração de raios X (HARRIS et al., 1972; FIGURA 4.44), a ligação dupla C(4)=C(5) apresenta configuração *trans*, e as moléculas de AMF interagem através de ligações de hidrogênio intermoleculares entre dois grupos carboxila, O(5)–H---O(6') e O(5')–H---O(6), e entre um grupo hidroxila e um grupo carboxila, O(4)–H---O(6''). A hidroxila O(4)–H também interage de forma intramolecular com a carbonila O(1)=C(14), fechando um sistema de 6 membros.

No ano 2000, foi realizado um outro estudo para determinar a estrutura cristalina do AMF e os parâmetros de cela e sistema de cristalização obtidos estão de acordo com os dados encontrados por HARRIS e colaboradores, em 1972 (COVARRUBIAS-ZUNIGA, 2000).



Representação gráfica produzida pelo programa Mercury (BRUNO et al., 2002).

FIGURA 4.44 - Ligações inter e intramoleculares do ácido micofenólico (AMF) determinadas por raios X (HARRIS et al., 1972).

No entanto, não foi possível detectar tais ligações de hidrogênio através do mapa de correlação HETCOR (FIGURA 4.45), mas o sinal de correlação do carbono C12 com um sinal de hidrogênio em ~8ppm, indica que o fenol possivelmente encontra-se livre de ligação de hidrogênio. Caso contrário o deslocamento químico deveria ser maior.

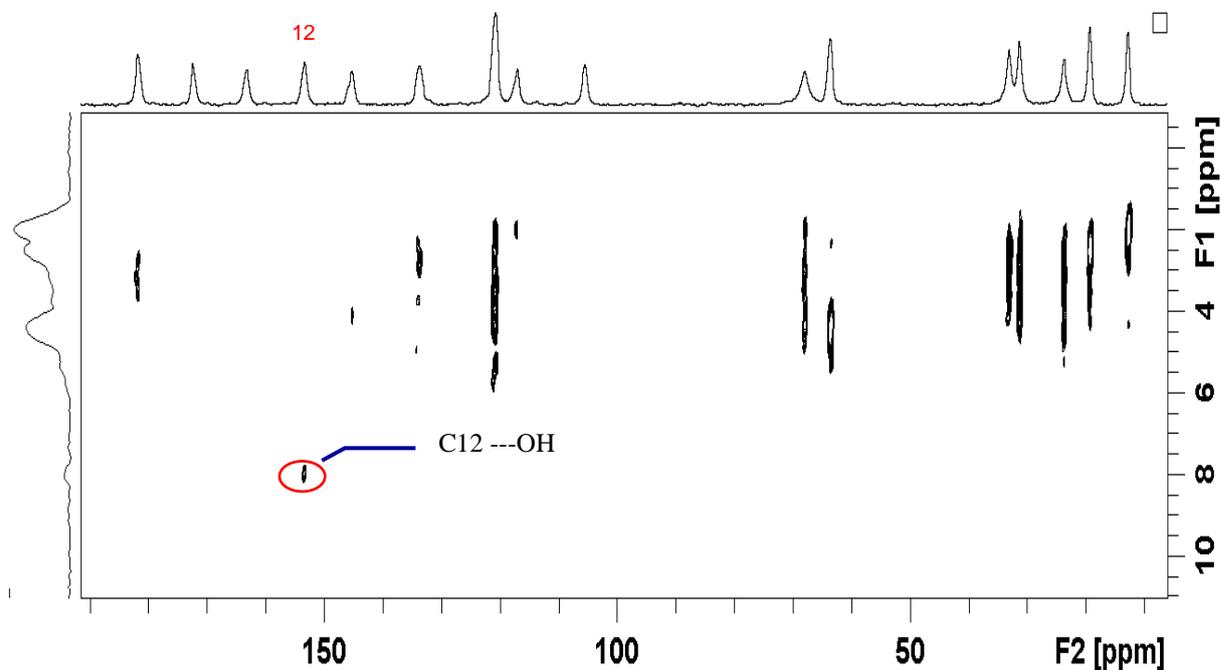


FIGURA 4.45 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o ácido micofenólico, utilizando a técnica HETCOR, com rotação de 10 kHz, tempo de contato de 500 μs e número de promediações de 100. A dimensão F1 é relativa à projeção do espectro de ^1H e a dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

Experimentos em diferentes temperaturas também foram realizados para o ácido micofenólico com a finalidade de verificar a estabilidade. Na FIGURA 4.46 observa-se que não há diferenças significativas entre -6 e 50°C, o que sugere que nesta faixa de temperatura a estrutura molecular do ácido micofenólico não sofre alterações importantes com variações de temperatura nesta faixa.

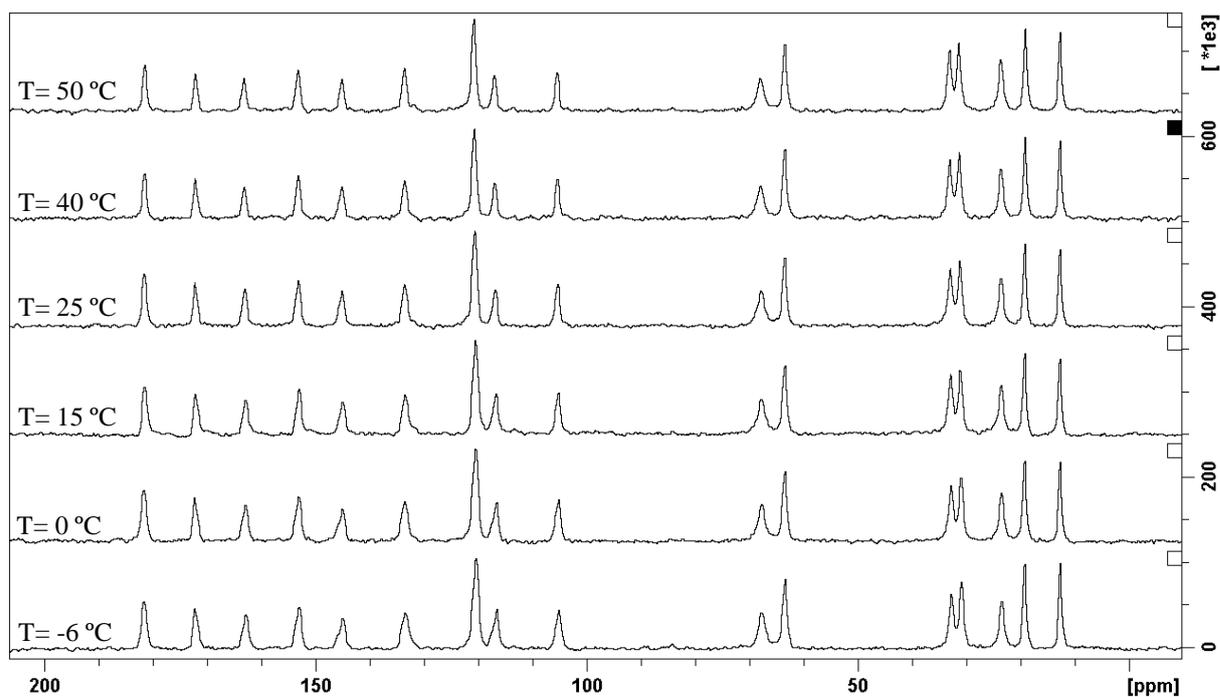


FIGURA 4.46 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do ácido micofenólico em diferentes temperaturas. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 128, tempo de contato de 1,5 ms.

Após a realização dos experimentos de ^{13}C -RMN, o ácido micofenólico foi recristalizado em diferentes solventes, como metanol, acetonitrila e diclorometano, resultando em todos os casos, na formação de cristais. Todos os cristais obtidos foram enviados para análise por cristalografia de raios X e os parâmetros de cela foram compatíveis com os dados da literatura (HARRISON et al., 1972; COVARRUBIAS-ZUNIGA et al., 2000). Portanto, não foram encontrados polimorfos do ácido micofenólico nesse trabalho.

4.3.1 - Micofenolato de mofetila

O micofenolato de mofetila também apresentou um espectro de ^{13}C -CP-TOSS muito bem resolvido e possibilitou, juntamente com os espectros de ^{13}C -CP-TOSS-NQS e ^{13}C -CP-PI-TOSS, a atribuição dos sinais (FIGURA 4.47).

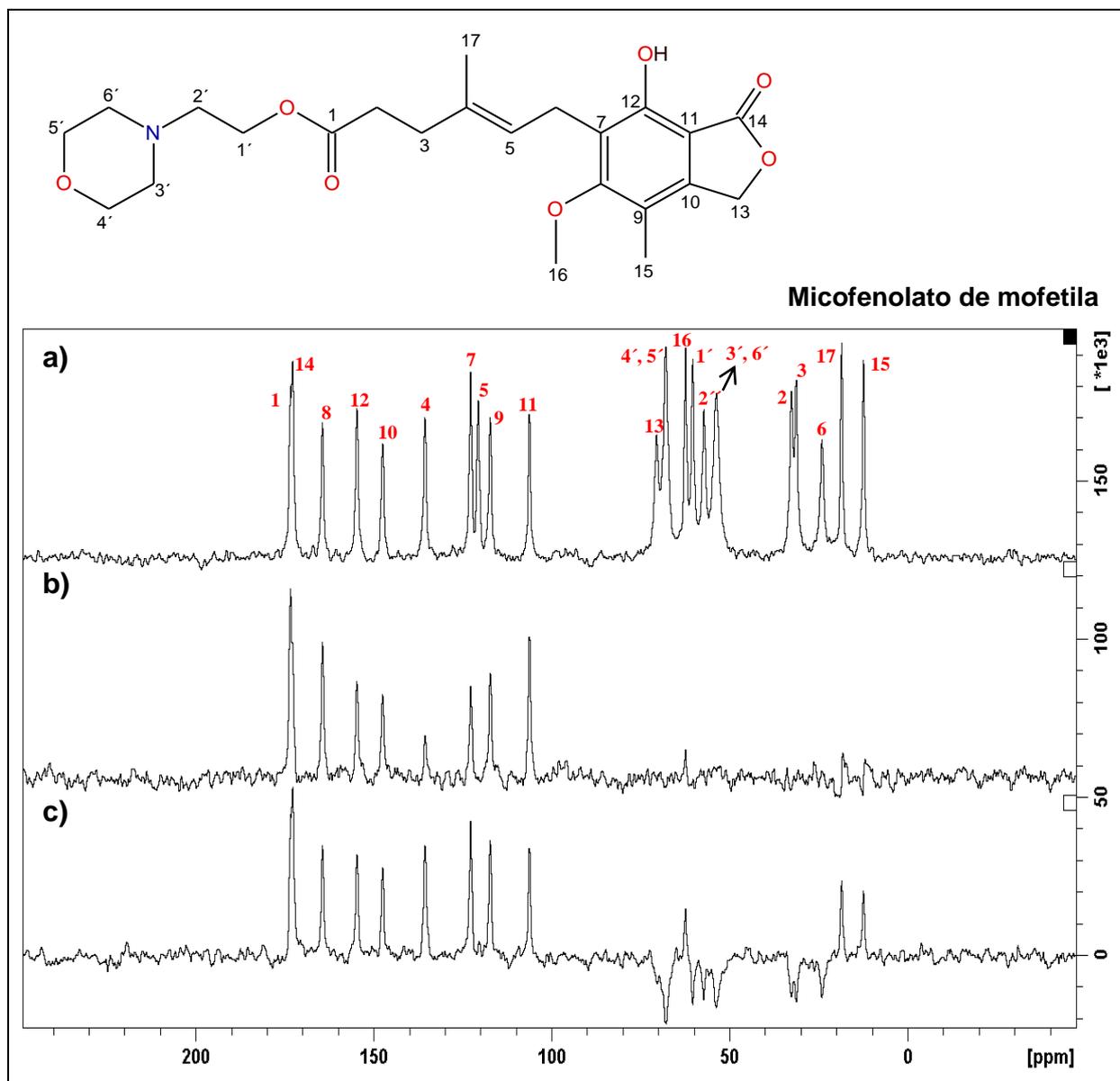


FIGURA 4.47 - Espectros de ^{13}C -RMN do micofenolato de mofetila. (a) CP-TOSS (b) CP-TOSS-NQS - $d_{20}= 120\mu\text{s}$ e (c) CP-PI-TOSS - $p_{16}= 90\mu\text{s}$. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 256, tempo de contato de 1,5 ms.

A comparação dos espectros do micofenolato de mofetila e do ácido micofenólico mostra diferença no deslocamento químico de vários sinais, principalmente nos que aparecem acima de 50 ppm. O sinal atribuído à carbonila C1

apresentou deslocamento químico menor no caso do micofenolato de mofetila, como esperado, pois carbonila de éster é mais protegida devido ao efeito de hiperconjugação (FIGURA 4.48; TABELA 4.7).

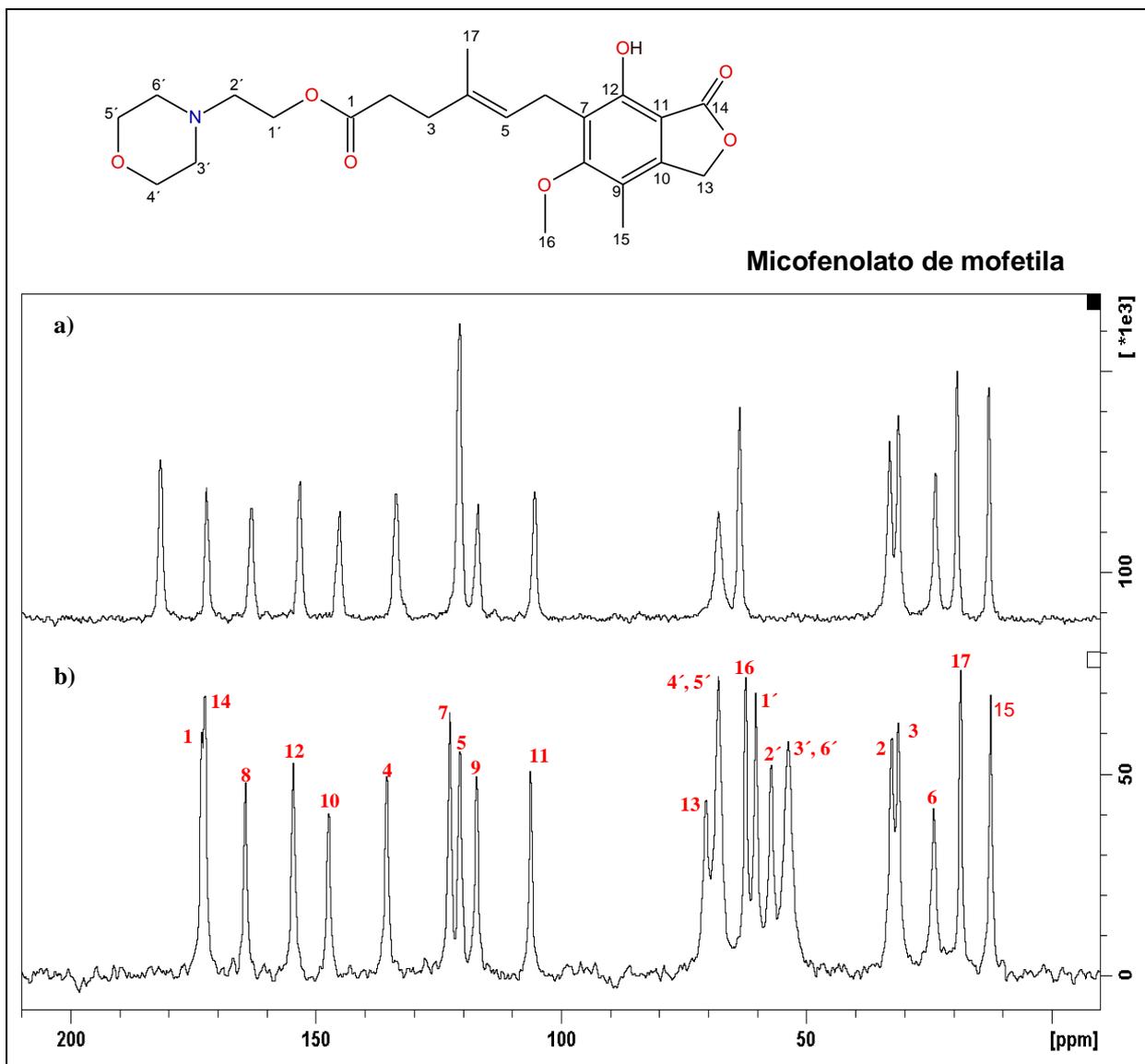
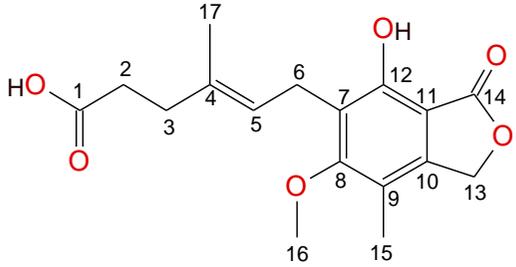
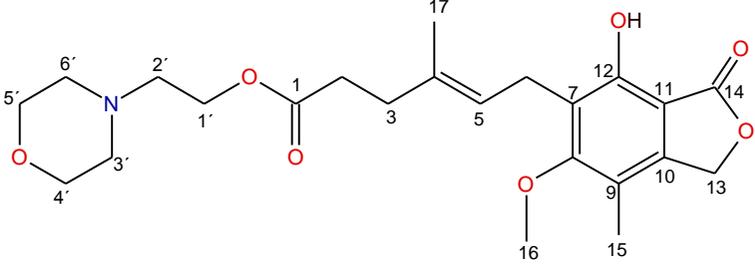


FIGURA 4.48 - Espectros de ^{13}C -CP-TOSS do (a) ácido micofenólico e (b) micofenolato de mofetila. Giro no ângulo mágico de 5 kHz, número de promediações de 256, tempo de contato de 1,5 ms.

TABELA 4. 7 - Deslocamento químico de ^{13}C -CP-TOSS do Ácido Micofenólico.

Ácido Micofenólico				Micofenolato de mofetila					
									
C	^{13}C AMF $\delta(\text{ppm})$	C	^{13}C AMF $\delta(\text{ppm})$	C	^{13}C MMF $\delta(\text{ppm})$	C	^{13}C MMF $\delta(\text{ppm})$	C	^{13}C MMF $\delta(\text{ppm})$
1	181,6	10	145,0	1	173,2	10	147,2	1'	60,2
2	32,9	11	105,3	2	32,5	11	106,1	2'	57,1
3	31,1	12	153,2	3	31,1	12	154,5	3'	53,6
4	133,5	13	67,8	4	135,4	13	70,3	4'	67,8
5	120,6	14	172,2	5	120,5	14	172,5	5'	67,8
6	23,6	15	12,7	6	23,9	15	12,3	6'	53,6
7	120,6	16	63,5	7	122,5	16	62,2		
8	163,0	17	19,2	8	164,2	17	18,4		
9	116,8			9	117,1				

O experimento bidimensional HETCOR não apresentou indícios de ligação de hidrogênio para o micofenolato de mofetila (FIGURA 4.49).

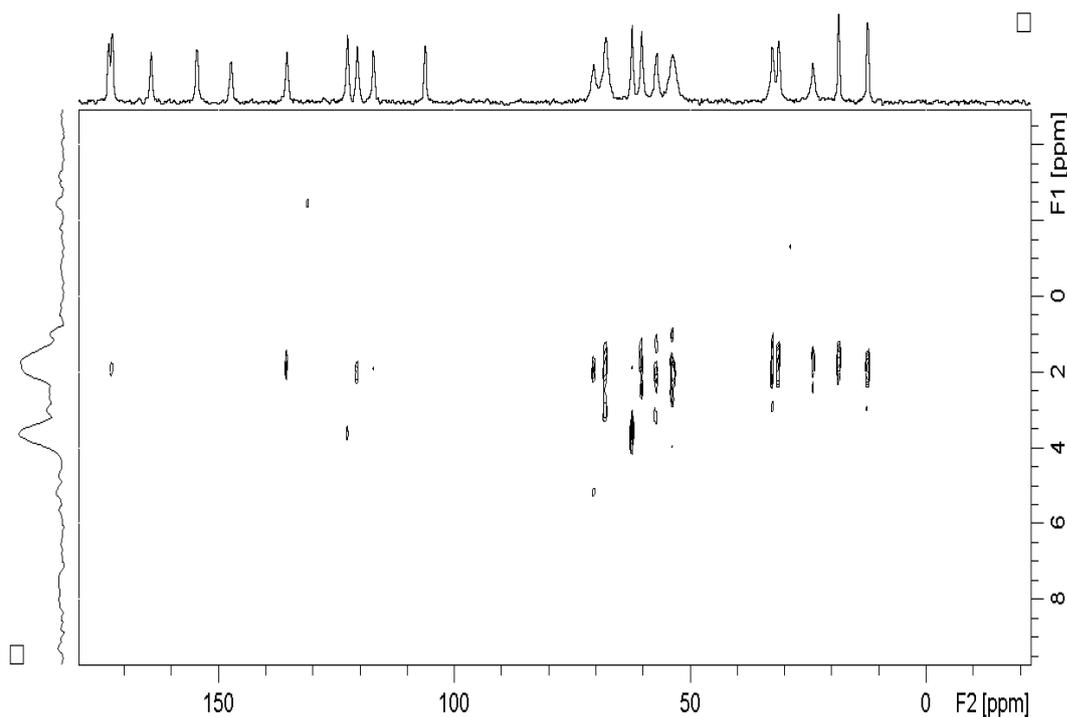


FIGURA 4.49 - Mapa de correlação ^{13}C - ^1H para o micofenolato de mofetila, utilizando a técnica HETCOR, com rotação de 10 kHz, tempo de contato de 500 μs e número de promediações de 100. A dimensão F1 é relativa a projeção do espectro de ^1H e a dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

Nesse trabalho não foram encontrados polimorfos para o ácido micofenólico, bem como para o seu éster mofetil, no entanto, este é o primeiro relato da caracterização desses sólidos farmacêuticos via ressonância magnética nuclear.

CONCLUSÃO

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho reforçam a possibilidade do uso da RMN no estado sólido como uma ferramenta importante no estudo de sólidos farmacêuticos, mas sua utilização deve ser associada a difração de raios X mono e policristalina. As técnicas unidimensionais utilizadas, ^{13}C -CP-TOSS, ^{13}C -CP-TOSS-NQS, ^{13}C -CP-PI-TOSS e ^{15}N -CP-MAS se mostraram complementares, não só na atribuição dos sinais mas também na detecção de pontos de protonação e observação de dinâmica molecular, como no caso de modificações estruturais em função de temperatura. O experimento bidimensional ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR mostrou correlações importantes intra e intermoleculares em algumas das matrizes estudadas, dando informações bastante precisas sobre a existência de ligações de hidrogênio.

A utilização da RMN no estado sólido demonstrou que esta técnica pode ser utilizada para a distinguir as formas polimórficas A e C do mebendazol, pois apresenta espectros com claras diferenças entre os dois polimorfos, especialmente nos sinais da região aromática e nos sinais referentes aos grupos metila. A diferença nos deslocamentos químicos para cada forma polimórfica pôde ser explicada em alguns casos, pois cada polimorfo apresenta ligações de hidrogênio intra e intermoleculares diferentes já descritas por estudos de raios X. Com a análise dos espectros de ^{15}N -CP-MAS sugeriu-se nesse trabalho a presença de pelo menos dois tautômeros na amostra do mebendazol A. Os experimentos bidimensionais ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR não mostraram resultados interessantes para os polimorfos do mebendazol.

A RMN no estado sólido também se mostrou muito útil na análise de amostras comerciais onde há a presença de excipientes. Na formulação comercial no estado sólido (comprimidos), os sinais de RMN de ^{13}C do mebendazol aparecem em uma região longe dos sinais dos excipientes e essa é uma vantagem, porque não há sobreposição de sinais.

Foram analisadas 13 amostras comerciais do mebendazol provenientes de quatro indústrias diferentes e foi constatado que seis contêm a forma **A** do mebendazol, seis apresentam a forma **C** e uma delas mostrou a mistura desses dois polimorfos. Foi possível quantificar de forma absoluta, as formas **A** e **C** no comprimido comercial que continha a mistura desses polimorfos, e os resultados indicam que em alguns momentos, a indústria parece optar por trabalhar no limite do

recomendado. Diante disso, fica clara a importância de se conduzir um controle de qualidade nas drogas formuladas disponíveis no mercado.

Os espectros obtidos para a dietilcarbamazina nas formas livre, citrato e maleato, mostraram sinais bem resolvidos e os deslocamentos químicos de vários sinais puderam ser explicados tomando-se como base as informações obtidas por difração de raios X por monocristal. Através de experimentos realizados com variação de temperatura foi possível observar uma transição de fase no citrato de dietilcarbamazina, principalmente pela mudança nos sinais referentes aos grupos etila e carbonila.

O experimento ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR mostrou correlações referentes a ligações de hidrogênio intermoleculares entre carboxilas de unidades diferentes de citrato⁻ e correlações que indicam a interação entre unidades de DEC⁺ e citrato⁻. O espectro de ^{13}C -CP-TOSS da DEC maleato apresentou sinais que confirmam a presença de dois pares iônicos na unidade assimétrica, principalmente na região dos grupos metilas, pois há desdobramento do sinal; e o mapa FSLG HETCOR mostrou sinais de correlação que foram atribuídos à ligação de hidrogênio intramolecular entre as carboxilas do maleato e intermolecular entre unidades de DEC⁺ e maleato⁻.

Não foram encontrados polimorfos do ácido micofenólico e do seu éster mofetil nesse trabalho, no entanto, os dados de RMN obtidos contribuem para o estudo estrutural dessas moléculas, pois são encontrados poucos trabalhos que descrevem estudos no estado sólido para as mesmas. Experimentos realizados em diferentes temperaturas, com a finalidade de verificar a estabilidade, mostraram que não houve diferenças significativas entre -6 e 50°C, indicando que nesta faixa de temperatura a estrutura molecular do ácido micofenólico não sofre alterações polimórficas.

Todos esses resultados mostram que a RMN no estado sólido é uma importante técnica, que pode ser inserida com sucesso no conjunto de métodos utilizados para o estudo de sólidos farmacêuticos no Brasil.

REFERÊNCIAS

6 - REFERÊNCIAS

- ABOUL-ENEIN, H. Y.; BUNACIU, A. A. & FLESCHEIN, S. "Analysis of mebendazole polymorphs by Fourier Transform IR spectrometry using chemometric methods". *Biopolymers*, 67 (1): 56, 2002.
- AGUIAR, D. L. M.; SAN GIL, R. A. S.; BORRE, L. B.; MARQUES, M. R. C. & GEMAL, A. L. "Evaluation of polymorphs in cephalexin medicines by ¹³C solid state NMR". *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3 (3): 293, 2011.
- AGUIAR, M. R. M. P.; GEMAL, A. L. & SAN GIL, R. A. S. "Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido". *Quim. Nova*, 22 (4): 553, 1999.
- ALLISON, A. C. & EUGUI, E. M. "Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF)". *Clin. Transplant.*, 10 (1,2): 77, 1996.
- ANVISA. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/Nu>. Acessado em 18/12/2013.
- APPERLEY, D. C.; HARRIS, R. K. & HODGKINSON, P. "Solid State NMR: Basic Principles & Practice Solid State NMR". 1a ed. New York, Momentum Press, 2012. p 276.
- ARAÚJO, G. L. B.; PITALUGA, A.; ANTONIO, S. G.; SANTOS, C. O. P & MATOS, J. R. "Polimorfismo na produção de medicamentos". *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 33 (1): 27, 2012.
- AYALA, A. P.; SIESLER, H. W. & CUFFINI, S. L. "Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole: a vibrational spectroscopy investigation". *J. Raman Spectrosc.*, 39 (9): 1150, 2008.
- BARBAS, R.; MARTI, F.; PROHENS, R. & PUIGJANER, C. "Polymorphism of norfloxacin: evidence of the enantiotropic relationship between polymorphs A and B". *Cryst. Growth Des.*, 6 (6): 1463, 2006.
- BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W. & MORRIS, J. "Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism". *Pharm. Res.*, 18 (6): 859, 2001.
- BLAGDEN, N.; MATAS, M.; GAVAN, P.T. & YORK, P. "Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates". *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 59 (7): 617, 2007.
- BRITS, M.; LIEBENBERG, W. & VILLIERS M. M. "Characterization of polymorph transformations that decrease the stability of tablets containing the WHO essential drug mebendazole". *J. Pharm. Sci.*, 99(3): 1138, 2010.
- BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; EDGINGTON, P. R.; KESSLER, M. K.; MACRAE, C. F.; MCCABE, P.; PEARSON, J. & TAYLOR, R. "New software for searching the Cambridge structural database and visualizing crystal structures". *Acta Crystallogr. Sect. B*, 58 (1-3): 389, 2002.

BRUSAU, E. V.; CAMI, G. E.; NARDA, G. E.; CUFFINI, S.; AYALA, A. P. & ELLENA, J. "Synthesis and Characterization of a New Mebendazole Salt: Mebendazole Hydrochloride". *J. Pharm. Sci.*, 97(1): 542, 2008.

BUGAY, D. E. "Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques". *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 48 (1): 43, 2001.

BUGAY, D. E. "Solid state nuclear magnetic resonance spectroscopy: theory and pharmaceutical applications". *Pharm. Res.*, 10 (3): 317, 1993.

BULLINGHAM, R. E. S.; NICHOLLS, A. J. & KAMM, B. R. "Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil". *Clin. Pharmacokinet.*, 34 (6): 429, 1998.

CHIENG, N.; RADES, T. & AALTONEN, J. "An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs". *J. Pharmaceut. Biomed.*, 55 (4): 618, 2011.

CHIEROTTI, M. R. & GOBETTO, R. 2012. "Solid-state NMR studies on supramolecular chemistry". IN: *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. STEED, J. W. & GALE, P. A. 1a ed. Nova Jersey, Wiley, 2012. p. 331-346.

COVARRUBIAS-ZUNIGA, A.; ZUNIGA-VILLARREAL, N.; GONZALEZ-LUCAS, A.; DIAZ-DOMINGUEZ, J. & ESPINOSA-PEREZ, G. "Crystal structure of mycophenolic acid: 6- (4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1,3-dihydrobenzofuran-5-yl)-4-methyl-hex-4-enoic acid". *Anal.Sci.*, 16 (7): 783, 2000.

DOUDICAN, N.; RODRIGUEZ, A.; OSMAN, I. & ORLOW, S. J. "Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells". *Mol. Cancer Res.*, 6 (8): 1308, 2008.

DUTOUR, J.; GUILLOU, N.; HUGUENARD, C.; TAULELLE, F.; MELLOTT-DRAZNIKES, C. & FÉREY G., "Chiolite, a case study for combining NMR crystallography, diffraction and structural simulation". *Solid State Sci.*, 6 (10): 1059, 2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA/ FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. Angela Maria Montes Peral Valente, Antonio Gilberto Ferreira, Edson Rodrigues Filho, Elisangela Fabiana Boffo, Elke Simoni Dias Vilela, Itamar Soares de Melo, João Luiz da Silva & Rosely dos Santos Nascimento. "Processo para produção e isolamento de ácido micofenólico e seus sais". INPI. Pat. No PI0704700-2. 12 dez. 2007, 11 ago. 2009.

FERREIRA, F. F.; ANTONIO, S. G.; ROSA, P. C. P. & PAIVA-SANTOS, C. O. "Crystal structure determination of mebendazole form A using high-resolution synchrotron x-ray powder diffraction data". *J. Pharm. Sci.*, 99 (4): 1734, 2010.

FREEMAN, A. R.; LAMMIE, P. J.; HOUSTON, R.; LAPOINTE, M. D.; STREIT, T. G.; JOOSTE, P. L.; BRISSAU, J. M.; LAFONTANT, J. G. & ADDISS, D. G. "A community-based trial for the control of lymphatic filariasis and iodine deficiency using salt fortified with diethylcarbamazine and iodine". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65 (6): 865, 2001.

FROEHLICH, P. E. & GASPAROTTO, F. S. "Mebendazol: identificação das formas polimórficas em diferentes matérias-primas e medicamentos (referência e genéricos) disponíveis no mercado nacional. Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., 26 (3): 205, 2005.

GANDHI, R. B.; BOGARDUS, J. B.; BUGAY, D. E.; PERRONE, R. K. & KAPLAN, M. A. "Pharmaceutical relationships of three solid state forms of stavudine". Int. J. Pharm., 201 (2): 221, 2000.

GEPPI, M.; GUCCIONE, S.; MOLLICA, G.; PIGNATELLO, R. & VERACINI, C. A. "Molecular properties of ibuprofen and its solid dispersions with eudragit RL100 studied by solid-state nuclear magnetic resonance". Pharmaceut. Res., 22 (9): 1544, 2005.

GRUNENBERG, A.; KEIL, B. & HENCK, J.-O. "Polymorphism in binary mixtures, as exemplified by nimodipine". Int. J. Pharm., 118 (1): 11-21, 1995.

HALEBLIAN, J. & MCCRONE W. "Pharmaceutical applications of polymorphism". J. Pharm. Sci., 58 (8): 911-29, 1969.

HARRIS, R. K.; YEUNG, R. R.; LAMONT, R. B.; LANCASTER, R. W.; LYNN, S. M. & STANIFORTH, S. E. 'Polymorphism' in a novel anti-viral agent: Lamivudine. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 7: 2653, 1997.

HARRIS, R. K. "NMR crystallography: the use of chemical shifts". Solid State Sci., 6 (10): 1025, 2004.

HARRIS, R. K.; HODGKINSON, P.; LARSSON, T & MURUGANANTHAM, A. "Quantification of bambuterol hydrochloride in a formulated product using solid-state NMR". J. Pharmaceut. Biomed., 38 (5): 858, 2005.

HARRISON, W.; SHEARER, H. M. M. & TROTTER, J. "Crystal Structure of Mycophenolic Acid". J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 11: 1542, 1972.

HARTMANN, S. R. & HAHN, E. L. "Nuclear double resonance in the rotating frame". Phys. Rev., 128 (5): 2042, 1962.

HAWKING, F. & MARQUES, R. J. "Control of bancroftian filariasis by cooking salt medicated with diethylcarbamazine". Bull. World Health Organ., 37 (3): 405, 1967.

KACHRIMANIS, K.; RONTOGIANNI, M. & MALAMATARIS, S. "Simultaneous quantitative analysis of mebendazole polymorphs A-C in powder mixtures by DRIFTS spectroscopy and ANN modeling". J. Pharm. Biomed. Anal., 51 (3): 512, 2010.

KOŁODZIEJSKI, W.; KLINOWSKI, J. "Kinetics of cross-polarization in solid-state NMR: a guide for chemists". Chem. Rev., 102 (3): 613, 2002.

JURGA, K.; REYNHARDT, E. C. & JURGA, S. Measurement and interpretation of far off-resonance $T_{1\rho}$ in solids. Meas. Sci. Technol., 5 (1): 27, 1994.

LIU, J.; CHEN, Z.; HUANG, X. & TU, Z. "Mass treatment of filariasis using DEC-medicated salt". J. Trop. Med. Hyg., 95 (2): 132, 1992.

- LLINAS, A. & GOODMAN, J. M. "Polymorph control: past, present and future". *Drug Discov. Today*, 13 (5,6): 198, 2008.
- LOWE, I. J. "Free induction decays of rotating solids". *Phys. Rev. Lett.*, 2 (7): 285, 1959.
- MARTARELLI, D.; POMPEI, P.; BALDI, C. & MAZZONI G. "Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 61 (5): 809, 2008.
- MARTINS, F. T.; NEVES, P. P.; ELLENA, J.; CAMI, G. E.; BRUSAU, E. V. & NARDA, G. E. "Intermolecular contacts influencing the conformational and geometric features of the pharmaceutically preferred mebendazole polymorph C". *J. Pharm. Sci.* 98 (7): 2336, 2009.
- MASUDA, K.; TABATA, S.; SAKATA, Y.; HAYASE, T.; YONEMOCHI, E. & TERADA, K. "Comparison of molecular mobility in the glassy state between amorphous indomethacin and salicin based on spin-lattice relaxation times". *Pharmaceut. Res.*, 22 (5): 797, 2005.
- MATSUDA, Y. & TATSUMI, E. "Physicochemical characterization of furosemide modifications". *Int. J. Pharm.*, 60 (1): 11, 1990.
- MIDDLETON, D. A.; LE DUFF, C. S.; PENG, X.; REID, D. G. & SAUNDERS, S. "Molecular conformations of the polymorphic forms of cimetidine from ¹³C solid-state NMR distance and angle measurements". *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (6): 1161, 2000.
- MIRMEHRABI, M.; ROHANI, S.; MURTHY, K. S. K. & RADATUS, B. "Characterization of tautomeric forms of ranitidine hydrochloride: thermal analysis, solid state NMR, X-Ray". *J. Cryst. Growth*, 260 (1,2): 517, 2004.
- MORISSETTE, S. L.; SOUKASENE, S.; LEVINSON, D.; CIMA, M. J.; ALMARSSON, O. "Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization". *PNAS*, 100 (5): 2180, 2003.
- MULLIN, J. W. "Crystallization". 4 ed. Burlington-MA, Elsevier Butterworth-Heinemann, 2004. 594 p.
- NORÕES, J.; DREYER, G.; SANTOS, A.; MENDES, V. G.; MEDEIROS, M. & ADDISS, D. "Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* in vivo". *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.*, 91 (1): 78, 1997.
- OLSEN, A.; NAMWANJE, H.; NEJSUM, P.; ROEPSTORFF, A. & THAMSBORG, S. M. "Albendazole and mebendazole have low efficacy against *Trichuris trichiura* in school-age children in Kabale District, Uganda". *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.*, 103 (5): 443, 2009.
- PANAGOPOULOU-KAPLANI, A. & MALAMATARIS, S. "Preparation and characterisation of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide". *Int. J. Pharm.*, 195 (1,2): 239, 2000.

PARK, J-S.; KANG, H. W.; PARK, S. J. & KIM, C-K. "Use of CP/MAS solid-state NMR for the characterization of solvate molecules within estradiol crystal forms". Eur. J. Pharm. Biopharm., 60 (3): 407, 2005.

RASTOGI, S. & KURELEC, L. "Polymorphism in polymers; its implications for polymer crystallization". J. Mater. Sci., 35 (20): 512, 2000.

REN, H.; CHENG, B.; MA, J. & HUA, D. "Comparative effectiveness of mebendazole with different polymorphic forms against *Nippostrongylus braziliensis*". Yiyao Gongye 18: 356, 1987.

RIHS, G.; PAPAGEORGIOU, C. & PFEFFER, S. "Sodium mycophenolate". Acta Crystallogr., Sect.C: Cryst.Struct.Comm., 56 (4): 432, 2000.

ROLLINGER, J. M.; GSTREIN, E. M. & BURGER, A. Crystal forms of toresamide: New insights. Eur. J. Pharm. Biopharm., 53 (1): 75, 2002.

RUBIN-PREMIER, J. M.; BERNSTEIN, J.; HARRIS, R. K.; EVANS, I. R. & GHI, P. Y. "Variable temperature studies of a polymorphic system comprising two pairs of enantiotropically related forms: [S,S]-ethambutol dihydrochloride". Cryst. Growth Des., 4 (3): 431, 2004.

SANCHEZ, S.; ZIARELLI, F.; VIEL, S.; DELAURENT, C. & CALDARELLI, S. "Improved solid-state NMR quantifications of active principles in pharmaceutical formulations". J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 47 (4,5): 683, 2008.

SANGILL, R.; RASTRUPANDERSEN, N.; BILDSE, H.; JAKOBSEN, H. J. & NIELSEN, N. C. "Optimized spectral editing of ¹³C MAS NMR Spectra of rigid solids using cross-polarization methods". J. Magn. Reson., Ser A, 107 (1): 67, 1994.

SCHANTZ, S.; HOPPU, P. & JUPPO A. M. "A solid-state NMR study of phase structure, molecular interactions, and mobility in blends of citric acid and paracetamol". J. Pharm. Sci., 98 (5): 1862, 2009.

SERAJUDDIN, A. T. M. "Salt formation to improve drug solubility". Adv. Drug Deliver. Rev., 59 (7): 603, 2007.

SILVA, C. C. P. Caracterização de Estado Sólido de Insumos Farmacêuticos Ativos: Clorpropamida, Nevirapina e Dietilcarbamazina. São Carlos. Programa de Pós-Graduação em Física - USP, 2010. Dissertação de mestrado, 187p.

SILVA, C. C. P.; MARTINS, F. T.; HONORATO, S.B.; BOECHAT, N.; AYALA, A. P. & ELLENA, J. "Triple structural transition below room temperature in the antifilarial drug diethylcarbamazine citrate". Cryst. Growth Des., 10 (7): 3094, 2010.

SILVA, C. C. P.; BOCELLI, M. D.; BOECHAT, N.; HONORATO, S. B.; OLIVEIRA, L. M.; VENÂNCIO, T.; AYALA, A. P. & ELLENA, J. "Conformational isomorphism in a new maleate salt of diethylcarbamazine". Em redação.

- SMITH, J.; MACNAMARA, E.; RAFTERY, D.; BORCHARDT, T. & BYRN, S. "Application of two-dimensional ^{13}C solid-state NMR to the study of conformational polymorphism". *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (45): 11710, 1998.
- STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A. & REUTZEL-EDENS, S. M. "Characterization of the solid state: quantitative issues". *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 48 (1): 67, 2001.
- SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; DEVARAKONDA, B. & VILLIERS, M. M. "Developing a discriminating dissolution test for three mebendazole polymorphs based on solubility differences". *Pharmazie*, 58 (2): 117, 2003.
- TAULELLE, F. "NMR Crystallography: crystallochemical formula and space group selection". *Solid State Sci.*, 6 (10): 1053, 2004.
- TISHMACK, P. A.; BUGAY, D. E. & BYRN, S. R. "Solid State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy - Pharmaceutical Applications". *J. Pharm. Sci.*, 92 (3): 441, 2003.
- TOZUKA, Y.; ITO, A.; SEKI, H.; OGUCHI, T. & YAMAMOTO, K. "Characterization and quantitation of clarithromycin polymorphs by powder X-ray diffractometry and solid-state NMR spectroscopy". *Chem. Pharm. Bull.*, 50 (8): 1128, 2002.
- VAN HOOF, P.; LAMMERS, R.; VAN PUIJENBROEK, R.; VAN DER SCHANS, M.; CARLIER, P. & KELLENBACH, E. "Polymorphism of the CNS active drug Org 13011: the application of high temperature analysis to detect new polymorphs". *Int. J. Pharm.*, 238 (1-2): 215, 2002.
- VILLIERS, M. M.; TERBLANCHE, R. J.; LIEBENBERG, W.; SWANEPOEL, E.; DEKKER, T. G. & SONGA, M. "Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (3): 435, 2005.
- VIRTANEN, T. & MAUNU, S. L. "Quantitation of a polymorphic mixture of an active pharmaceutical ingredient with solid state ^{13}C CPDAS NMR spectroscopy". *Int. J. Pharm.*, 394 (1-2): 18, 2010.
- VOGT, F. G.; KATRINCIC, L. M.; LONG, S. T.; MUELLER, R. L.; CARLTON, R. A.; SUN, Y. T.; JOHNSON, M. N.; COPLEY, R. C. B. & LIGHT, M. E. "Enantiotropically-related polymorphs of {4-(4-chloro-3-fluorophenyl)-2-[4-(methoxy)phenyl]-1, 3-thiazol-5-yl} acetic acid: crystal structures and multinuclear solid-state NMR". *J. Pharm. Sci.*, 97 (11): 4756, 2008.
- WAWER, I.; PISKLAK, M. & CHILMONCZYK, Z. " ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR analysis of sildenafil base and citrate (viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 38 (5): 865, 2005.
- YATHIRAJAN, H. S.; NAGARAJ, B.; GAONKAR, S. L.; NARASEGOWDA, R. S.; NAGARAJA, P. & BOLTE, M. "Mycophenolate mofetil". *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online.*, 60 (12): 2223, 2004.

YU, L.; REUTZEL, S. M. & STEPHENSON, G. A. "Physical characterization of polymorphic drugs: an integrate characterization strategy". PSTT, 1 (3): 118, 1998.

ZELL, M. T.; PADDEN, B. E.; GRANT, D. J. W.; CHAPEAU, M. C.; PRAKASH, I. & MUNSON, E. J. "Two-dimensional high-speed CP/MAS NMR spectroscopy of polymorphs. 1. Uniformly ^{13}C -labeled aspartame". J. Am. Chem. Soc., 121 (6): 1372, 1999.

ZIARELLI, F. & CALDARELLI, S. "Solid-state NMR as an analytical tool: Quantitative aspects". Solid State Nucl. Mag., 29 (1-3): 214, 2006.

ZIARELLI, F.; VIEL, S.; SANCHEZ, S.; CROSS, D. & CALDARELLI, S. "Precision and sensitivity optimization of quantitative measurements in solid state NMR". J. Magn. Reson., 188 (2): 260, 2007.

ZIELINSKA-PISKLAK, M.; PISKLAK, D. M. & WAWER, IWONA. "Application of ^{13}C CPMAS NMR for qualitative and quantitative characterization of carvedilol and its commercial formulations". J. Pharm. Sci., 101 (5): 1763, 2012.