

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

**EMPREGO DA RMN NO ESTADO SÓLIDO EM ESTUDOS DE
COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES DE FÁRMACOS**

Tatielih Pardim de Oliveira Xavier*

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

Orientador: Prof. Dr. Tiago Venâncio

*** bolsista CAPES-EMBRAPA**

**São Carlos - SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

X3e

Xavier, Tatielih Pardim de Oliveira
Emprego da RMN no estado sólido em estudos de
complexos supramoleculares de fármacos / Tatielih
Pardim de Oliveira Xavier. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
122 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Ressonância Magnética Nuclear(RMN) no estado
sólido. 2. Polimorfismo. 3. Química Supramolecular. I.
Título.

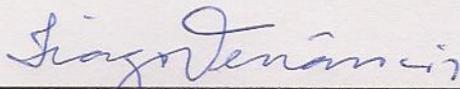


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tatieli Pardim de Oliveira Xavier, realizada em 15/03/2016:



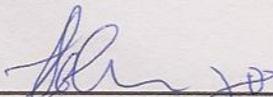
Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar



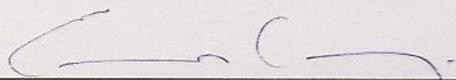
Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
UNESP



Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva
UFSCar



Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago
Embrapa



Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo
UFSCar

Dedico este trabalho

Primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho e por todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais Arlete e Paulo Afonso, que são minha inspiração de vida, por todo amor, ensinamentos, compreensão e apoio.

A minha irmã Kelle pela amizade, carinho, compreensão e por todo apoio.

Ao meu esposo Fernando, pelo amor, companheirismo, paciência, incentivo e parceria.

Vocês foram fundamentais para esta conquista, sempre me apoiando nos momentos de dificuldades e incentivando a cada dia.

AMO MUITO VOCÊS!

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Tiago Venâncio pela orientação, ensinamentos e dedicação no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira pelos conselhos e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório de RMN da UFSCar, pelos ensinamentos e ótimos momentos de convivência: Sérgio, Thayana, Clayton, Lyege, Valéria, Lorena e Elenilson, Sheraz e Nazish, Darlene e Luiz, Tatiana e aos técnicos (Luciana e Paulo).

Ao Prof. Dr. Cauê Ribeiro Oliveira, á Amanda Giroto e a EMBRAPA Instrumentação Agropecuária (São Carlos) pela colaboração e sugestões.

Ao Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo, aos amigos Francisco Nunes e Renata Sala e ao LIEC da UFSCar pelas análises e colaboração.

Ao Prof. Dr. Javier Alcides Ellena, ao amigo Paulo Sousa e ao Instituto de Física de São Carlos (USP) por suas contribuições.

Á Prof. Dra Maria Palmira D. Gremião, á Liliane Pedreiro e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas- UNESP pela colaboração nos testes de solubilidade.

Ao Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva por suas contribuições.

A CAPES-EMBRAPA pela bolsa de doutorado concedida.

LISTA DE ABREVIATURA

ABZ	Albendazol
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AM	Amido
API	Ingredientes Sólidos Ativos
BBI	Broadband Inverse
CP	Polarização cruzada (Cross polarization)
CP-MAS	Cross Polarization Magic Angle Spinning
CP-PI	<i>CP</i> - Combined with Polarization Inversion
CP-TOSS	<i>CP</i> - Total Suppression of Sidebands
CP-TOSS-NQS	<i>CP-TOSS - Non Quaternary Suppression</i>
d20	Tempo de defasamento dipolar
DQ-BABA	Double-Quantum Back-to-Back
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FSLG HETCOR	Frequency Switched Lee-Goldburg Heteronuclear Correlation
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPPD	High-power proton decoupling
Hz	Hertz
IND	Indústria
IV	Infravermelho
LAG	Liquid Assited Grinding
LSS	Lauril Sulfato de Sódio

MAS	Magic-angle spinning (Giro em torno do ângulo mágico)
MBZ	Mebendazol
MeOH-d4	Metanol deuterado
NOESYGPPR1D	1D NOESY with presaturation and spoil gradients
ns	Número de promediações
p15	Duração do pulso de contato
p16	Pulso de inversão
pK _a	Constantes de acidez
q	Quadrupletto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear bidimensional
SCZ	Secnidazol
t	Tripletto
TDF	Tenofovir Disoproxil Fumarato
TGA	Análise Termogravimétrica
TMS	Tetrametilsilano

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -RMN 1D para o secnidazol.....	28
TABELA 2 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H - ^{13}C - FSLG HETCOR para o secnidazol.....	28
TABELA 3 - Deslocamento químico (ppm) de ^{13}C -CP-TOSS das formas anidra e hidratada do secnidazol.....	35
TABELA 4 - Deslocamento químico (ppm) de ^{15}N -CPMAS das formas anidra e hidratada do secnidazol.....	37
TABELA 5 - Deslocamentos químicos (ppm) do mapa de correlação ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR do secnidazol hidratado.....	37
TABELA 6 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -RMN 1D para a amostra de ABZ e suas amostras comerciais.....	46
TABELA 7 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS para os complexos ABZ- Ácidos carboxílicos.....	47
TABELA 8 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR para os complexos ABZ- Ácidos carboxílicos.....	47
TABELA 9 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS para o complexo ABZ-SCZ.....	48
TABELA 10 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR para o para o complexo ABZ-SCZ.....	48
TABELA 11 - Testes de reprodutibilidade dos sistemas ABZ - ácidos carboxílicos.....	66
TABELA 12 - Solubilidade máxima do albendazol em diferentes meios.....	77
TABELA 13 - Solubilidade do ABZ e seus complexos em metanol e água.....	78
TABELA 14 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS dos complexos MBZ-AM.....	87
TABELA 15 - Solubilidade do mebendazol em diferentes meios.....	98
TABELA 16 - Solubilidade do MBZ e seus complexos em etanol.....	99
TABELA 17 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -RMN 1D para o TDF.....	103
TABELA 18 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR para TDF.....	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Ilustração da classificação dos APIs na forma sólida com base na estrutura e composição.....	04
FIGURA 2 - Exemplos de (a) homossíntons e (b) heterossíntons.....	09
FIGURA 3 - Fórmula estrutural do albendazol.....	10
FIGURA 4 - Fórmula estrutural do mebendazol	11
FIGURA 5 - Fórmula estrutural do secnidazol	13
FIGURA 6 - Fórmula estrutural do tenofovir disoproxil fumarato.....	15
FIGURA 7 - (a) Cocrystal de Nicotinamida- ácido Palmítico, (b) espectro de 1H-13C CP-HETCOR ($V_r=14$ kHz) utilizando um tempo de contato de 500 μ s e (c) espectro de 1H DQ-BABA, ($V_r= 35$ kHz).....	18
FIGURA 8 - a) Estrutura e (b) possíveis confôrmeros do secnidazol.....	29
FIGURA 9 - Difratoograma de Raios-X do secnidazol hidratado.....	30
FIGURA 10 - Comparação entre os espectros de CP-TOSS (rotação a 5 KHz) versus CPMAS (rotação a 10 KHz) do SCZ.....	32
FIGURA 11 - Espectros de ^{13}C (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS) da forma hidratada do secnidazol.....	33
FIGURA 12 - Esquema representativo da resposta obtida ao utilizar a sequência de pulso ^{13}C -CPPI-TOSS.....	34
FIGURA 13 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS para as formas anidra e hidratada do secnidazol.....	35
FIGURA 14 - Espectro de ^{15}N -CPMAS das formas anidra e hidratada do secnidazol.....	36
FIGURA 15 - Mapa ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR da forma mais estável do secnidazol (hidratada).....	38
FIGURA 16 - Representação das ligações de hidrogênio do SCZ hidratado baseado em dados cristalográficos.....	39
FIGURA 17 - Mapa ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR da forma anidra do secnidazol.....	40
FIGURA 18 - Ilustração das (a) diferentes conformações das formas anidra do secnidazol e da (b) interação intermolecular tipo cabeça-cauda da forma (II).....	41
FIGURA 19 - Termogramas de DSC das formas hidratada e anidra do secnidazol.....	42
FIGURA 20 - Difratoograma de Raios-X e termograma de DSC do ABZ.....	50

FIGURA 21 - Espectros de ^{13}C (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS) da forma I do ABZ.....	52
FIGURA 22 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do ABZ e suas formulações comerciais...53	53
FIGURA 23 - Espectros de ^{13}C -CP-MAS das formas polimórficas I e II do ABZ.....	54
FIGURA 24 - Fórmula estrutural dos ácidos carboxílicos e suas constantes de acidez (pK_a).....	56
FIGURA 25 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido benzoico.....	58
FIGURA 26 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido aspártico.....	59
FIGURA 27 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido fumárico.....	60
FIGURA 28 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido glutárico.....	61
FIGURA 29 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ- Ácido tartárico.....	62
FIGURA 30 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-Ácido malônico.....	62
FIGURA 31 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-Ácido cítrico.....	63
FIGURA 32 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ- Ácido maléico.....	63
FIGURA 33 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-Ácido oxálico.....	64
FIGURA 34 - Comparação entre os espectros de ^{13}C -CPTOSS do insumo farmacêutico ativo (API) do ABZ versus o ABZ recristalizado em etanol.....	65
FIGURA 35 - (a) Mapa de correlação $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR do complexo ABZ- ácido maléico (1:2); (b) e (c) expansão do mapa mostrando os sinais de correlação com os hidrogênios.....	68
FIGURA 36 - Espectro de ^{15}N -CPMAS do complexo ABZ- ácido maléico (1:2)	69
FIGURA 37 - Proposta do sinton formado entre o ABZ e o ácido maléico(1:2).....	70
FIGURA 38 - (a) Mapa de correlação $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2) e (b) expansão do mapa mostrando os sinais de correlação com os hidrogênios.....	71
FIGURA 39 - Espectro de ^{15}N -CPMAS do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2)	72
FIGURA 40 - Proposta do sinton formado entre o ABZ e o ácido oxálico (1:2).....	72
FIGURA 41 - Análises térmicas do complexo ABZ- ácido maléico (1:2) - (a) Análise Termogravimétrica e (b) Calorimetria Exploratória Diferencial.....	74
FIGURA 42 - Análises térmicas do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2) - (a) Análise Termogravimétrica e (b) Calorimetria Exploratória Diferencial.....	76
FIGURA 43 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-SCZ e APIs isolados.....	80

FIGURA 44 - Espectros de ^{15}N -CPMAS do complexo ABZ-SCZ e APIs isolados.....	81
FIGURA 45 - Difractogramas de Raios-X do complexo ABZ-SCZ e os fármacos isolados.....	82
FIGURA 46 - Termogramas de DSC do complexo ABZ-SCZ e os fármacos isolados.....	83
FIGURA 47 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS da mistura MBZ-Amido obtida por moagem sólido-sólido.....	90
FIGURA 48 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS comparando as amostras dos polimorfos (A e C) e comercial do MBZ.....	91
FIGURA 49 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo MBZ-Amido (62,5%).....	92
FIGURA 50 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo MBZ-Amido (50%).....	93
FIGURA 51 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo MBZ-Amido (5%).....	94
FIGURA 52 - Difractogramas de Raios-X das amostras de MBZ (formas A e C)	95
FIGURA 53 - Difractogramas de Raios-X dos sistemas MBZ-AM.....	96
FIGURA 54 - Termogramas de DSC das amostras de MBZ (formas A e C).....	97
FIGURA 55 - Termogramas de DSC dos sistemas MBZ-AM.....	98
FIGURA 56 - Espectros de ^{13}C (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS) para o TDF.....	106
FIGURA 57 - Mapa de correlação $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR do TDF.....	107
FIGURA 58 - Espectro de ^{15}N -CPMAS do TDF com atribuições dos sinais.....	108
FIGURA 59 - Proposta das interações intermoleculares no TDF.....	109
FIGURA 60 - Espectro RAMAN do TDF.....	110
FIGURA 61 - Difractograma de Raios-X do TDF.	111
FIGURA 62 - Termogramas de DSC do TDF.	111

RESUMO

EMPREGO DA RMN NO ESTADO SÓLIDO EM ESTUDOS DE COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES DE FÁRMACOS. Muitos sólidos farmacêuticos são capazes de adotar mais de uma forma cristalina, sendo esta propriedade denominada polimorfismo. Atualmente 80-90% dos fármacos são comercializados na forma sólida e um problema muito frequente é a baixa solubilidade destas drogas, principalmente em meio aquoso. Dependendo da forma como um fármaco se cristaliza, as suas propriedades físico-químicas podem ser alteradas, o que também poderá implicar em alterações em sua solubilidade. Diante desta problemática a engenharia de cristais surge como uma estratégia para aperfeiçoar as propriedades do estado sólido relacionada à eficácia dos fármacos, por meio do desenvolvimento de novas formas cristalinas. Cristais moleculares multicomponentes podem ser preparados a partir da abordagem de formação de sintões supramoleculares por meio de métodos de cristalização que envolve a otimização de condições favoráveis para a formação dessas novas formas cristalinas. Neste contexto este trabalho teve como objetivo utilizar a RMN no estado sólido para estudar a química supramolecular de três fármacos antiparasitários (secnidazol, albendazol e mebendazol) e um antirretroviral (tenofovir disoproxil fumarato) utilizando um conjunto de técnicas unidimensionais (CP-TOSS, CP-NQS e CP-PI) para os núcleos de carbono-13 e nitrogênio-15, e também bidimensionais ($^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR). A RMN em estado sólido foi utilizada como principal ferramenta analítica na caracterização das formas cristalinas obtidas neste estudo, assim como na caracterização prévia dos Insumos Farmacêuticos Ativos (do inglês, APIs) utilizados como matéria prima, sendo demonstrada a aplicabilidade desta técnica na análise de novas formulações. Os dados obtidos mostraram-se de grande relevância no estudo de sólidos farmacêuticos sendo possível contribuir para o estudo estrutural de formas farmacêuticas, identificar formas polimórficas de fármacos, averiguar transições de fases tanto nos API quanto em amostras comerciais e verificar a presença de interações moleculares (intermolecular e intramolecular) por meio de RMN bidimensional. Neste trabalho foi mostrado que esta técnica se configura como uma importante ferramenta para a caracterização de novos polimorfos, mas que certamente deve ser aplicada em conjunto com outras técnicas de forma a aproveitar a complementaridade oferecida quando diferentes técnicas são utilizadas em

conjunto. Com este trabalho pretende-se consolidar no país o uso da RMN no estado sólido como uma ferramenta para a caracterização de fármacos e também para a análise de medicamentos, que tem sido pouco explorada até o momento.

ABSTRACT

USE OF SOLID STATE NMR. IN STUDY OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES OF PHARMACEUTICAL.

Many pharmaceutical solids are able to adopt more than one crystalline form, and this property is called polymorphism. Currently 80-90% of the drugs are marketed as in solid forms and a very common problem is the low solubility of these drugs, particularly in aqueous media. Depending on how a drug crystallizes, its physical and chemical properties can be changed, which may also result in changes in its solubility. Before this problem the crystals engineering appears as a strategy to improve the properties of the solid state related to the efficacy of the drugs through the development of new crystalline forms. Multicomponent molecular crystals can be prepared from supramolecular synthons forming approach by crystallization methods involving the optimization of conditions for the formation of these novel crystalline forms. In this context, this study aimed to use the solid state NMR for study of supramolecular chemistry the three antiparasitic drugs (secnidazole, albendazole and mebendazole) and one antiretroviral (tenofovir disoproxil fumarate) using a set of one-dimensional techniques (CP-TOSS, CP-NQS and CP-PI) for the carbon-13 and nitrogen-15 nucleus as well as two-dimensional ($^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG HETCOR). Solid state NMR was used as the primary analytical tool for characterizing the crystalline forms obtained in this study, as in the prior characterization of Active Pharmaceutical Ingredient (APIs) used as raw material, being demonstrated the applicability of this technique in the analysis of new formulations. The data obtained were of great importance in the study of these solid dosage forms which can contribute to the structural study of dosage forms, identify polymorphic forms of drugs, detect phase transitions in both API as in commercial samples and check for interactions molecular (intramolecular and intermolecular) by means of two-dimensional NMR. In this work it was shown that this technique is configured as an important tool for the characterization of new polymorphs but they certainly should be applied in conjunction with other techniques in order to take advantage of the complementarity provided when different techniques are used in combination. This work intends to consolidate the use of NMR in the solid state in Brazil as a tool for the characterization of the crystalline forms of drugs and also for the analysis of drugs, which has been few explored so far.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	2
1.1- Polimorfismo em sólidos farmacêuticos	2
1.1.1 - Polimorfos.....	5
1.1.2 - Solvatos e Hidratos.....	5
1.1.3 - Sais e Cocrystalis	6
1.2 - Polimorfismo na indústria farmacêutica	7
1.3 - Estratégias para a obtenção de novas formas cristalinas de fármacos	8
1.4 - Fármacos alvos	10
1.4.1- Fármacos antiparasitários.....	10
1.4.2 - Fármaco antirretroviral.....	13
1.5 - A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no estado sólido aplicada na caracterização de sólidos farmacêuticos	15
CAPÍTULO 2 – OBJETIVO GERAL	21
CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	23
3.1 - Obtenção dos APIs (Insumos Farmacêuticos Ativos).....	23
3.2- Caracterização por RMN no estado sólido.....	23
3.2.1- Infraestrutura	23
3.2.2- Preparo das amostras.....	23
3.2.3- Sequências e padrões externos utilizados.	23
3.3- Difração de Raios-X de pó.....	24
3.4- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).	24
3.5- Análise Termogravimétrica (TGA).....	25
CAPÍTULO 4 – SECNIDAZOL	27
4.1- OBJETIVOS	27
4.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	27
4.2.1- Obtenção da forma anidra do SCZ a partir de sua forma hidratada	27
4.2.2- Medidas de RMN no estado sólido	27
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.4- CONCLUSÕES.....	43
CAPITULO 5 - ALBENDAZOL	45
5.1 - OBJETIVOS	45
5.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	45
5.2.1 - Obtenção da amostra de ABZ e suas amostras comerciais	45
5.2.2- Preparação dos complexos Albendazol- Ácidos carboxílicos.....	45
5.2.3 - Preparação do complexo Albendazol-Secnidazol	46
5.2.4 - Medidas de RMN no estado sólido	46

5.2.5 - Estudo de solubilidade do fármaco albendazol em diferentes meios	49
5.2.6 - Influência dos complexos ABZ- ácido carboxílico na solubilidade do albendazol.	49
5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.3.1 - Caracterização da amostra de albendazol	50
5.3.2 - Caracterização de amostras comerciais do albendazol por RMN no estado sólido...	53
5.2.3 - Caracterização dos complexos ABZ-Ácidos carboxílicos	55
5.3.4 - Complexo binário ABZ-SCZ.....	78
5.4 - CONCLUSÕES.....	84
CAPÍTULO 6 - MEBENDAZOL	86
6.1- OBJETIVOS	86
6.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	86
6.2.1 - Utilização de reação sólido-sólido para a obtenção de complexos MBZ-Amido.	86
6.2.2 - Aplicação da encapsulação na obtenção dos complexos MBZ-Amido.....	86
6.2.2 - Medidas de RMN no estado sólido	87
6.2.3 - Estudo de solubilidade do mebendazol em diferentes meios	87
6.2.4 - Influência dos complexos MBZ- Amido na solubilidade do mebendazol.....	88
6.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
6.4 - CONCLUSÕES.....	101
CAPÍTULO 7- TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATO	103
7.1- OBJETIVOS	103
7.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	103
7.2.1 - Obtenção da amostra de TDF.....	103
7.2.2 - Medidas de RMN no estado sólido	103
7.2.3 - Caracterização por espectroscopia FT-Raman.....	104
7.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
7.4- CONCLUSÕES.....	112
CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES GERAIS	114
CAPÍTULO 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Polimorfismo em sólidos farmacêuticos

Os fármacos, na sua grande maioria, são disponibilizados comercialmente na forma sólida devido à uma série de vantagens que esta forma apresenta, principalmente quanto a administração (dosagem correta), transporte, manipulação, maior estabilidade a alterações de temperatura e incidência de luz. No entanto, algumas características do estado sólido podem causar sérios inconvenientes, tanto para a indústria farmacêutica quanto para as pessoas que se utilizam do tratamento. Um dos principais problemas associado aos insumos farmacêuticos ativos (do inglês APIs - Active Pharmaceutical Ingredients) é o chamado polimorfismo, um fenômeno comumente observado em fármacos (MONOSSETTE et al., 2004).

O polimorfismo é caracterizado pela cristalização de uma molécula em duas ou mais formas distintas. (NANGIA, 2007; McCURONE, 1965). Este é um fenômeno natural e ainda não se pode prever a frequência de sua ocorrência. As diferenças estruturais entre as redes cristalinas de polimorfos são oriundas de dois mecanismos: o polimorfismo conformacional e o polimorfismo orientacional (ou de empacotamento). No primeiro, os grupamentos flexíveis possuem diferentes conformações e então empacotam-se em diferentes estruturas tridimensionais. No segundo, as moléculas relativamente rígidas conformacionalmente, empacotam-se em estruturas cristalinas distintas de acordo com suas orientações espaciais (STAHLY, 2007). Ambos os fenômenos podem ocorrer simultaneamente.

Diferentes mecanismos podem ocasionar o polimorfismo em fármacos, tais como: rota sintética utilizada, processos de recristalização e/ou ativação mecânica, pressão utilizada durante a compressão dos comprimidos, possíveis interações com o excipiente e condições de armazenamento e transporte tais como variações de temperatura, umidade e incidência de luz (LLINAS & GOODMAN, 2008).

O polimorfismo pode comprometer a taxa de dissolução do fármaco, uma vez que os diferentes polimorfos podem apresentar, de maneira geral, diferenças nesta propriedade, e conseqüentemente a sua eficácia terapêutica poderá ser comprometida.

A biodisponibilidade de um fármaco indica a velocidade e a extensão de absorção de um princípio ativo no organismo. Essa propriedade é avaliada por meio uma forma de dosagem em que é obtida uma curva concentração do fármaco versus tempo na circulação sistêmica ou por meio da dosagem da excreção do fármaco na urina (BRASIL, 2015). A solubilidade e a dissolução de um fármaco são as principais características que governam a sua biodisponibilidade. Enquanto a dissolução é um parâmetro cinético, expressando a velocidade com que um fármaco dissolve-se em determinado solvente, a solubilidade é um parâmetro termodinâmico que representa a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o soluto. A solubilidade é um fator que irá influenciar a dissolução do fármaco (MARTÍNEZ & NAVARRO 2001; MANADAS et al., 2002; MOHANACHANDRAN et al., 2010).

Além de comprometer a solubilidade do fármaco, o polimorfismo pode ocasionar também alterações na estabilidade físico-química (TONGLEI & SHAOXIN, 2005). Um exemplo desse fenômeno é o esteroide sintético denominado tibolona, um fármaco utilizado no tratamento de menopausa, que se cristaliza em duas formas, em que a forma II (triclínica) desse fármaco possui uma menor estabilidade térmica e maior suscetibilidade a degradação que a sua forma I (monoclínica) (ARAUJO et al., 2010).

Quando se compara diferentes formas polimórficas de um fármaco, verifica-se que a uma dada temperatura e pressão, irá prevalecer a sua forma termodinamicamente estável, que geralmente exhibe o maior ponto de fusão, uma menor solubilidade e máxima estabilidade química. O polimorfo que apresenta a menor energia livre será denominado de forma termodinamicamente estável, sendo as demais formas intituladas de formas metaestáveis. Em geral, as formas cristalinas metaestáveis tendem a se converter com o tempo na forma mais estável (ZHANG, 2004).

Os insumos farmacêuticos ativos (APIs) podem se apresentar de diferentes formas (FIGURA 1), denominadas polimorfos (HILFIKER et al., 2006). O conhecimento da química do estado sólido dos APIs é um aspecto importante do processo de desenvolvimento de medicamentos, pois estes possuem uma variedade de formas sólidas, podendo ser classificados de acordo com a distribuição espacial dos átomos em amorfos, que são os que possuem forma desordenada, ou em cristalinos que apresentam arranjos ordenados.

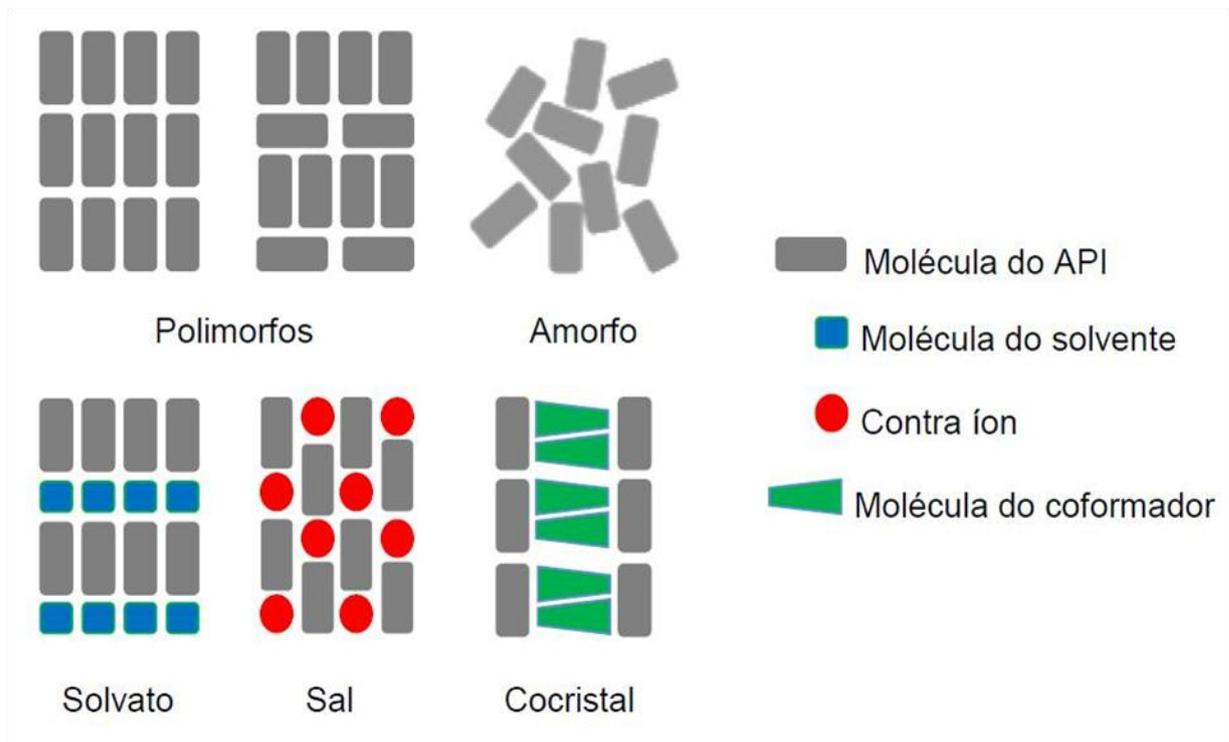


FIGURA 1- Ilustração da classificação dos APIs na forma sólida com base na estrutura e composição.

Os sólidos cristalinos são classificados como (McCRONE, 1965; SEKHON, 2009): polimorfos (APIs com a mesma fórmula química, mas diferente estrutura cristalina), solvatos (APIs que possuem moléculas de solventes agregadas à sua rede cristalina), hidratos (APIs que possuem moléculas de água agregadas à sua rede cristalina), sais (APIs cristalizados com ácidos ou bases), cocristais (APIs cristalizados com outras substâncias sólidas e neutras em condições ambientes, podendo ser cristalizados com outros APIs).

Os sólidos amorfos são termodinamicamente metaestáveis e geralmente apresentam uma biodisponibilidade oral maior do que quando comparado às formas cristalinas, devido a sua maior mobilidade molecular. Entretanto formas metaestáveis podem possuir estabilidade físico-química suficiente para garantir a sua utilização, uma vez que a forma estável de um fármaco nem sempre é a forma preferível, devido a menor solubilidade.

A atorvastina cálcica, por exemplo, é um fármaco comercializado tanto na sua forma cristalina quanto na amorfa, sendo utilizado para reduzir a quantidade de colesterol no sangue. Em seus estudos SHETE et al., 2010 mostraram que a taxa

de dissolução da forma amorfa deste fármaco é aproximadamente o dobro da correspondente à sua forma cristalina.

Estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de promover melhorias na solubilidade de compostos farmacêuticos praticamente insolúveis, por meio do desenvolvimento de sistemas amorfizados, tal como a formação de dispersões sólidas. Um exemplo disto é a vemurafebine (Zelboraf®), um fármaco utilizado para tratamento de câncer de pele. Testes de biodisponibilidade mostraram um aumento de cinco vezes em relação a cristalina (SHAH, et al., 2013).

1.1.1- Polimorfos

Nos polimorfos as moléculas dos APIs rearranjam-se de duas ou mais formas diferentes no cristal, podendo apresentar empacotamento distinto no retículo cristalino e/ou diferenças na sua orientação ou conformação em diferentes localizações do retículo.

Durante o desenvolvimento de um fármaco é muito importante identificar qual forma polimórfica é a mais estável a temperatura ambiente uma vez que podem ocorrer transições polimórficas, devido variações de temperaturas nas etapas de seu processamento (compressão, secagem, etc). O equilíbrio entre essas formas é governado essencialmente pela termodinâmica. Em termos termodinâmicos os polimorfos são classificados em enantiotrópicos e monotrópicos. Esta classificação se baseia na capacidade de conversão de uma forma polimórfica em outra. Os sistemas enantiotrópicos são reversíveis no equilíbrio, podendo ocorrer transição da forma metaestável para a forma polimórfica mais estável, o que é termodinamicamente favorável, e vice-versa. Já em sistemas monotrópicos não são observadas transições reversíveis entre os polimorfos possíveis (HILFIKER et al., 2006).

1.1.2- Solvatos e Hidratos

Um solvato contém moléculas de solvente inseridas na estrutura cristalina, as quais podem estar presentes numa proporção estequiométrica ou não-estequiométrica. Nos solvatos estequiométricos em que a razão estequiométrica entre API e solvente é constante, o processo de dessolvatação resulta em novas

estruturas (cristalinas ou amorfas), uma vez que o solvente faz parte da estrutura cristalina. Já nos solvatos não-estequiométricos, o solvente atua somente de modo a preencher as cavidades e/ou defeitos na estrutura molecular sem formar ligações ou interações efetivas com as moléculas do API (SILVA, 2010).

Quando o solvente incorporado à rede cristalina do API é a água este composto é denominado de hidrato. Alguns produtos farmacêuticos tem o seu API em forma hidratada, tal como a amoxicilina trihidratada (BERNSTEIN, 2002) e o secnidazol (MIRZA et al., 2008). A desidratação de um hidrato em proporção estequiométrica resulta, frequentemente, no colapso da estrutura cristalina originando uma fase amorfa ou cristalina.

Nos hidratos em proporção não estequiométrica, tal como a β -ciclodextrina (KRATOCHVIL, 2011) a água está presente somente preenchendo as cavidades na estrutura molecular sem formar ligações de hidrogênio. A desidratação deste resulta em uma forma cristalina anidra. A estabilidade do sistema de anidro/hidrato depende da umidade relativa do ambiente. Geralmente, formulações constituídas de hidratos não são frequentes devido a sua instabilidade térmica e a possibilidade de desidratação potencial durante o processo de secagem.

1.1.3- Sais e Cocristais

A grande maioria dos APIs utilizados atualmente está na forma de sais, pois estes geralmente resultam em estruturas termicamente mais estáveis e com solubilidade melhorada. Devido à presença da ligação iônica, os sais possuem características desejáveis, tais como maior cristalinidade, estabilidade e solubilidade em solventes polares, principalmente a água (KRATOCHVIL, 2011).

Sais e cocristais são muitas vezes confundidos. Um pré-requisito necessário para a formação de sais é a presença de grupos ionizáveis no API, tal como grupos ácidos e básicos. Quando estes estão ausentes os cocristais tornam-se uma alternativa aos sais. A formação dos cocristais é dependente da complementaridade entre os grupos funcionais do API e do agente coformador (também denominado de agente co-cristalizante) utilizado, de modo que ocorram interações intermoleculares no estado sólido (STEED, 2013)

Quando durante o processo de cristalização ocorre transferência de prótons entre o API e o agente coformador, o resultado é um sal. Se, por outro lado,

houver somente a formação de interações intermoleculares, como ligação de hidrogênio fortes e/ou interações do tipo π - π (MIRZA, et al., 2008) sem que ocorra transferência protônica, então o produto final é um cocrystal

Um cocrystal é um complexo molecular que contém duas ou mais moléculas diferentes no mesmo cristal (MIRZA, et al., 2008). A formação de cocrystalis farmacêuticos ocorre mediante a agregação de um API com outros compostos (farmaceuticamente aceitáveis) numa mesma rede cristalina.

O caráter ácido-base, características estruturais e conformacionais, dentre outras propriedades determinará a compatibilidade entre os diferentes fármacos dentro de uma fase cristalina. Geralmente sistemas com $\Delta pK_a < 0$ (resultam na formação de cocrystalis), se o $\Delta pK_a > 3$ resultará em sais, enquanto que se o ΔpK_a estiver no intervalo entre 0 e 3 poderá ser produzido ambos (CHILDS, et al., 2007).

A principal abordagem para a obtenção de cocrystalis é baseada nos métodos de cristalização em solução (ZHANG, et al., 2007) seguida de evaporação lenta (a temperatura ambiente ou baixas temperaturas) e/ou forçada (em evaporador rotativo).

Segundo CHILDS, et al. (2007), os sais e cocrystalis são classificados como policristais (“cristais multicomponentes”), onde os valores do produto de solubilidade são importantes no ajuste de condições favoráveis em um processo de co-cristalização em solução. Este processo consiste na dissolução e recristalização dos APIs em estudo. Os cocrystalis são obtidos a partir de soluções líquidas envolvendo um ou mais solventes, variando-se parâmetros tais como a natureza do solvente, temperatura e pH.

1.2 - Polimorfismo na indústria farmacêutica

O polimorfismo tem grande relevância para a indústria farmacêutica, uma vez que ainda não é possível prever todos os polimorfos estáveis de um de insumo farmacêutico ativo (LLINAS & GOODMAN, 2008). Se por um lado a descoberta de um novo polimorfo pode resultar em melhorias nas propriedades físico-químicas do fármaco devido o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica, por outro lado também podem ocorrer vários problemas, tanto os de ordem técnica quanto aqueles relacionados com a propriedade intelectual

(contestação de patente). Frequentemente essa quebra de patente nem é proposital, uma vez que durante a produção de um fármaco pode ocorrer a formação de um novo polimorfo, mas também a de um polimorfo já registrado por uma empresa concorrente (KRATOCHVIL, 2011).

Além desses problemas, a formação de uma forma polimórfica inadequada durante a cristalização devido à ocorrência de transições de fase ou mesmo durante o processamento e/ou armazenamento podem resultar em uma forma sólida farmacêutica com eficácia terapêutica baixa, inexistente ou tão elevada a ponto de ser tóxica ao organismo (BRITAIN, 2002; MONOSSETTE et al., 2004).

No Brasil a questão do polimorfismo ganhou destaque em função da necessidade de regulamentar os medicamentos novos, genéricos e similares pelo governo brasileiro, em que uma das exigências é a comprovação da possível existência de polimorfos no API (BRASIL, 2007)

Apesar da existência das denominações (YU et al., 1998): polimorfos quando se refere a uma forma cristalina ordenada com um único componente, e pseudopolimorfos quando houver múltiplos componentes na estrutura, a indústria considera os sólidos farmacêuticos intitulados pseudopolimorfos, como “polimorfos verdadeiros” para fins legais (registro de patentes) e comerciais (ISLÁN e MONTES, 2006).

1.3- Estratégias para a obtenção de novas formas cristalinas de fármacos

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas, visando solucionar e/ou minimizar o problema da baixa solubilidade que estas várias formas polimórficas podem apresentar, e a co-cristalização dos princípios ativos com outras moléculas farmacologicamente aceitáveis é uma delas. Este processo para obtenção de novas formulações em estado sólido tem ganhado grande atenção por parte da indústria farmacêutica, sendo relatadas melhorias nas propriedades físico-químicas como estabilidade térmica e química, solubilidade, taxa de dissolução, dentre outras (VOGT et al., 2009).

Outra abordagem interessante para à indústria farmacêutica é obter formulações que modifiquem a liberação desses fármacos, como por exemplo, dissolver o fármaco em matrizes poliméricas como amidos ou celulosas

micronizadas com diferentes tamanhos de partículas, e por meio de processos de co-moagem, obtendo-se assim uma forma amorfa do fármaco (KIPP, 2004; FERREIRA, et al., 2015).

A engenharia de cristais definida como a “compreensão das interações supramoleculares no contexto do empacotamento cristalino e a utilização destas interações na síntese de novas formas sólidas com as propriedades físicas e químicas desejadas” (DESIRAJU, 2010; NANGIA, 2010), vem sendo aplicada no desenvolvimento de uma grande variedade de novas formas sólidas farmacêuticas, como um meio de otimização de propriedades desejáveis nos fármacos, por meio da formação de sítions supramoleculares.

Os sítions são definidos como “unidades estruturais constituintes da estrutura cristalina”, baseadas em interações intermoleculares (BLAGDEN et al., 2007). Essas interações supramoleculares podem ser compreendidas como a formação de estruturas cristalinas por meio de interações intermoleculares (geralmente, ligação de hidrogênio), levando-se em consideração a repetição de determinados padrões e a possibilidade de formação de sítions (de acordo com pontos de coordenação presentes nos materiais de partida).

Os sítions (FIGURA 2) podem ser classificados em homossítions onde as interações ocorrem entre o mesmo tipo de grupos funcionais, e heterossítions cuja interação ocorre entre grupos funcionais diferentes, porém complementares (VISHWESHWAR et al., 2006).

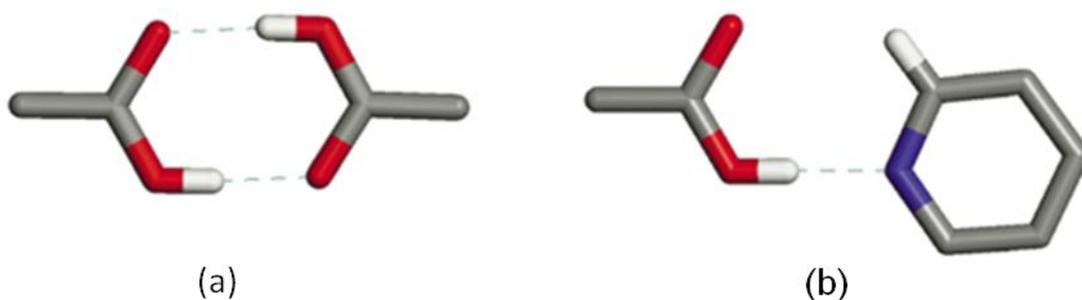


FIGURA 2 - Exemplos de (a) homossítions e (b) heterossítions.

Os ácidos carboxílicos representam um dos grupos funcionais mais comumente estudados na engenharia de cristal, devido à presença de pontos de coordenação que favorecem a formação de ligação de hidrogênio, possibilitando a

formação síntons. Estudos apontam que seu uso é um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de novos APIs, tais como os cocristsais e sais, uma vez que são excelentes doadores de prótons (VISHWESHWAR et al., 2006).

1.4- Fármacos alvos

1.4.1 - Fármacos antiparasitários

Uma das classes de fármacos mais empregadas, não só no Brasil, mas também em outros países em desenvolvimento, são os antiparasitários, uma vez que o aparecimento dessas moléstias é muito comum quando não existem boas condições sanitárias. Os mais utilizados são o albendazol, mebendazol, e secnidazol. Estes fármacos são facilmente adquiridos sem prescrição médica.

O albendazol (FIGURA 3), ABZ, também denominado carbamato de metil N-(5-propilsulfanil-3H-benzoimidazol-2-il) possui a fórmula molecular $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ e peso molecular de $265,34 \text{ g.mol}^{-1}$. Esta molécula foi patenteada em 1975, sendo descrita como cristais incolores com pontos de fusão entre 108 e 210°C (FERREIRA et al., 2015; PRANZO et al., 2010).

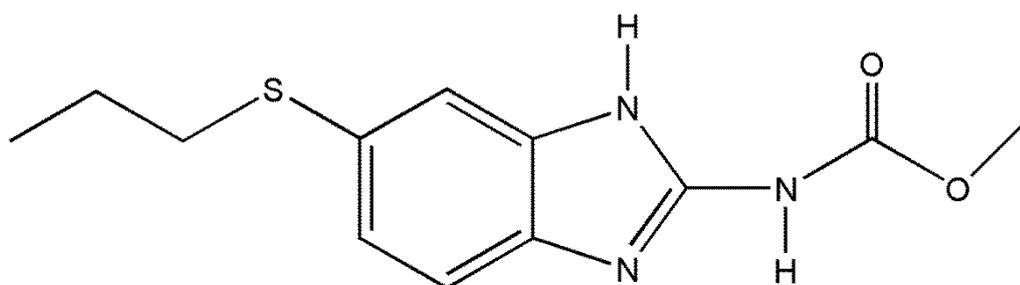


FIGURA 3 - Fórmula estrutural do albendazol.

Este fármaco possui baixa solubilidade em água e apresenta ação anti-helmíntica, sendo utilizado no tratamento de infecções causadas por parasitas intestinais, como a giárdia (TORRADO et al., 1996, CAVALCANTI et al., 2012). É amplamente utilizado para controlar parasitas intestinais, pois é bem tolerado pelo organismo, possui baixo custo e apresenta atividade anti-helmíntica de amplo

espectro (MORIWAKI et al., 2008). Recentemente, FERREIRA et al., 2015 complexou o ABZ em ciclodextrinas com o intuito de melhorar a solubilidade deste fármaco e aplicou a técnica de RMN no estado sólido para caracterizar os complexos obtidos.

A recristalização do ABZ tanto a partir de metanol e N, N-dimetilformamida gerou uma nova forma polimórfica estável (Forma II) enantiotropicamente relacionado com o ABZ comercialmente disponível (Forma I), sendo esta última considerada à forma metastável, à temperatura ambiente (PRANZO et al., 2010).

O mebendazol (FIGURA 4), MBZ, também denominado metil-5-benzoil benzimidazole-2-carbamato é um anti-helmíntico, com fórmula molecular $C_{16}H_{13}N_3O_3$ e peso molecular $295,29 \text{ g.mol}^{-1}$ (CAIRA et al., 1998, PAULA et al., 2013). Este medicamento apresenta uma solubilidade muito baixa em água, sendo praticamente insolúvel (SWANEPOEL et al., 2003a e 2003b). O uso do mebendazol não tem sido explorado apenas como antiparasitário, mas também como um fármaco antitumoral (MARTARELLI et al., 2008), o que o torna ainda mais interessante pela ampliação do espectro de atividades.

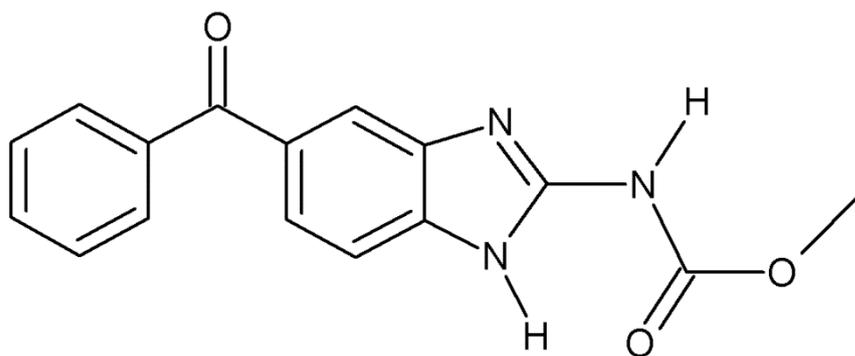


FIGURA 4 - Fórmula estrutural do mebendazol.

Em seus estudos FROEHLICH e GASPAROTTO (2005) identificaram e avaliaram a dissolução das formas polimórficas do mebendazol em diferentes matérias-primas e medicamentos disponíveis no mercado nacional. GARBUIO et al., 2014, também realizaram um estudo sobre as formas polimórficas de mebendazol

presente nas matérias-primas e também em comprimidos disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro.

KACHRIMANIS et al. (2010) recristalizaram as formas A, B e C do mebendazol utilizando diferentes métodos. A forma A foi cristalizada por meio do método de moagem com gotejamento de solvente utilizando gotas de ácido acético, a forma B foi cristalizada pelo método de evaporação forçada do solvente a partir de soluções de clorofórmio e a forma C foi cristalizada utilizando ácido fórmico como o solvente e a água como o anti-solvente.

Foi verificado que a adição de lauril sulfato de sódio (LSS) ao MBZ aumenta a sua solubilidade, porém impede a diferenciação das três diferentes formas polimórficas existentes: A, B e C, em que C é a farmaceuticamente preferida (FROEHLICH & GASPAROTTO 2005; BRUSAU et al., 2008), por apresentar solubilidade e biodisponibilidades adequadas.

Diversos estudos foram desenvolvidos com o intuito de melhorar a solubilidade do mebendazol, tais como o desenvolvimento de um cristal deste fármaco com o ácido propiônico que foi caracterizado como sendo um solvato, (CAIRA et al., 1998), o seu encapsulamento em ciclodextrina (SKIBA et al., 2007), a síntese do cloridrato de mebendazol, um sal estável (BRUSAU et al. 2008) e o desenvolvimento de um sal de mesilato de mebendazol monohidratado (PAULA et al., 2013).

Devido à importância do seu uso, a questão de sua solubilidade limitada, e a existência de três diferentes formas cristalinas, o estudo do mebendazol mostra-se de grande interesse em termos tecnológicos, econômicos e sociais.

O secnidazol (FIGURA 5), SCZ, também denominado 1-(hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol é utilizado no tratamento de amebíase, giardíase, tricomoníase e vaginose bacteriana. Este fármaco apresenta fórmula molecular $C_7H_{11}N_3O_3$ e peso molecular de $185,18 \text{ g.mol}^{-1}$ sendo utilizado majoritariamente na sua forma hidratada (MIRZA et al., 2008).

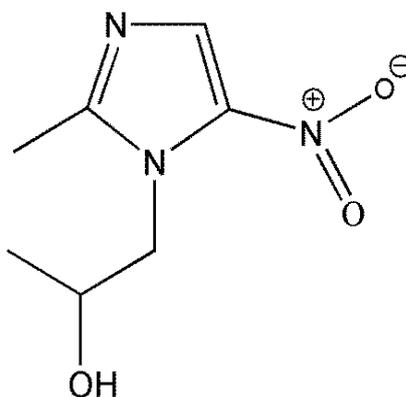


FIGURA 5 - Fórmula estrutural do secnidazol.

O secnidazol apresenta um estereocentro, sendo comercializado na forma racêmica de seus enantiômeros R e S (NASCIMENTO & SANTANA, 2011). Em estudos de caracterização do secnidazol, RIVERA et al., (2000) verificou que este apresenta elevada solubilidade em água devido à presença dos grupos polares (OH e NO₂) em sua estrutura química. O secnidazol também tem um alto poder de hidratação, e sua forma mais estável é a forma hidratada, sendo que em ambientes mais exposto, é praticamente a forma mais abundante.

1.4.2 - Fármaco antirretroviral

Os antirretrovirais são fármacos utilizados no tratamento de infecções por retrovírus, principalmente HIV (Human Immunodeficiency Virus). Eles são utilizados para impedir a multiplicação desse retrovírus no organismo, ajudando a evitar o enfraquecimento do sistema imunológico de portadores da AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). O uso adequado destes medicamentos é de fundamental importância para aumentar o tempo e a qualidade de vida do portador desse vírus.

O conhecimento da existência de polimorfos nos sólidos farmacêuticos utilizados para o tratamento de doenças graves ou crônicas é de extrema importância principalmente em antirretrovirais, uma vez que uma baixa biodisponibilidade do fármaco pode não controlar a replicação do vírus e com isso levar a vírus mais resistentes. Talvez o caso mais sério sobre os problemas

causados pela existência do polimorfismo em fármacos antirretrovirais é o do ritonavir, que em 1996 passou a ser comercializado na forma de cápsulas contendo uma solução hidroalcoólica. O medicamento Norvir® foi usado inicialmente com muito sucesso, porém após um tempo ele começou a perder a sua eficácia terapêutica e vários lotes começaram a falhar nas especificações de dissolução, cuja solubilidade passou de 170 mg.mL^{-1} para 30 mg.mL^{-1} em uma solução 75:25 água:etanol. Essa nova forma polimórfica do ritonavir ficou sendo conhecida como forma II e se cristaliza em cristais na forma de agulha. Já o fármaco utilizado inicialmente na fabricação do medicamento denominado de forma I, apresentava cristais no formato de placas. Após diversos estudos foi verificado que o grande problema era que um mínimo cristal semente da forma II pode ser suficiente para desencadear a cristalização do fármaco somente nesta forma. Com a identificação do problema, todos os lotes foram retirados do mercado, causando grandes prejuízos para o laboratório Abbott (BAUER et al., 2001; MORISSETTE et al., 2003).

O Tenofovir Disoproxil Fumarato (FIGURA 6), TDF, é um antirretroviral da classe dos inibidores de transcriptase reversa nucleosídeo, comercializado como Viread®, sendo utilizado no tratamento de pacientes portadores de HIV/AIDS e também para o tratamento de hepatite B (GALLANT, 2003) Este fármaco atua na enzima transcriptase reversa, incorporando-se à cadeia de DNA do vírus, impedindo que o vírus se reproduza. A literatura tem relatado a existência de três polimorfos (I, A, e B) para este fármaco (LEE et. al., 2010). Também foi relatada a descoberta de quatro novos solvatos e um novo polimorfo, que foram obtidos a partir do TDF I (LEE et. al., 2013). Recentemente GOMES, et. al., 2015 utilizou várias técnicas para caracterizar a forma polimórfica I do TDF, inclusive a RMN no estado sólido.

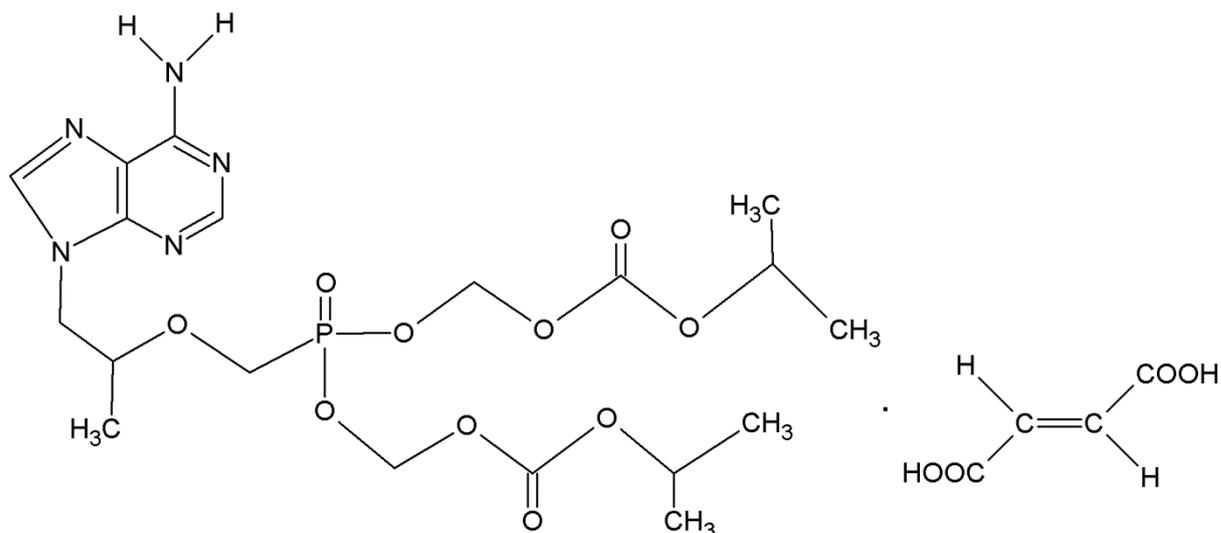


FIGURA 6 - Fórmula estrutural do tenofovir disoproxil fumarato.

1.5- A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no estado sólido aplicada na caracterização de sólidos farmacêuticos

A caracterização das estruturas cristalinas bem como das propriedades físico-químicas de sólidos farmacêuticos é essencial para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas. É extremamente importante o conhecimento aprofundado sobre o comportamento de diferentes formas cristalinas do API, uma vez que o fenômeno do polimorfismo pode ocasionar alterações nas propriedades físico-químicas (solubilidade, estabilidade térmica, taxa de dissolução) e conseqüentemente na biodisponibilidade da droga (BERNSTEIN, 2002).

A existência de diferentes empacotamentos moleculares em materiais polimórficos não só altera suas propriedades físico-químicas, mas também as espectroscópicas (transições eletrônicas, vibracionais e de spin nuclear), dentre outras. Neste sentido mudanças significativas nos espectros permitem num primeiro momento caracterizar estruturalmente os polimorfos e em um segundo momento identificá-los em uma formulação, ou sozinhos ou em misturas. Para tanto são utilizadas diversas técnicas de caracterização (GRANT, 1999; BUGAY, 2001): raios-X, infravermelho e Raman, e a ressonância magnética nuclear.

As informações sobre as possíveis formas polimórficas que um insumo farmacêutico ativo pode assumir são de fundamental importância. Isso porque se podem estabelecer as melhores condições de preparação da forma

farmacologicamente adequada, tanto no processo sintético do API quanto na própria formulação, e também do seu correto acondicionamento, tanto durante o transporte quanto no armazenamento.

O polimorfismo farmacêutico pode ser avaliado aproveitando-se da complementaridade de diferentes técnicas, uma vez que o critério que define a existência do polimorfismo é a demonstração de estruturas não equivalentes nas redes cristalinas.

A técnica de DR-X de amostras policristalinas fornece informação sobre as fases cristalinas presentes na amostra e por meio da comparação de difratogramas, e possibilita também distinguir entre diferentes arranjos cristalinos. Já a técnica de DRX de monocristal permite obter informações tridimensionais sobre a disposição de átomos da molécula na cela unitária, bem como grupo espacial, ligações de hidrogênio e interações não-clássicas (YU et al., 2003).

As análises térmicas são um conjunto de técnicas nas quais se acompanha a variação de propriedades físicas e químicas de uma amostra enquanto esta é submetida a uma variação controlada de temperatura (CANEVAROLO, 2007). A Análise Termogravimétrica (TGA) é uma técnica na qual ocorre variação da massa da amostra (perda ou ganho) em função da temperatura. A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica que mede o fluxo de energia associados a transições na amostra em estudo em função da temperatura.

Enquanto a técnica de DR-X de pó fornece informações estruturais por meio da análise de picos de difração únicos para cada forma cristalina, a técnica de DSC possibilita a identificação de diferentes formas cristalinas, devido ao aparecimento de múltiplos picos de fusão no termograma obtido (ZHANG et al., 2004).

A difração de raios X de monocristal configura-se como a melhor escolha para determinação estrutural de compostos no estado sólido, pois fornece informações tridimensionais sobre a conectividade e orientação dos átomos na molécula, ligações de hidrogênio, dentre outras. Porém esta técnica requer amostra monocristalina de alta qualidade, um “cristal perfeito” e torna-se uma técnica falha quando a ordem cristalina de longo alcance é perdida, o que configura uma limitação para o sua aplicação (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012).

A RMN em estado sólido aplicada na caracterização de cocristsais farmacêuticos é um campo bastante recente no Brasil. No que concerne a estudos

refinados da estrutura por esta técnica é um ramo em expansão (VOGT et al., 2009; KHAN et al., 2011; CHIEROTTI e GOBETTO, 2012; PINDELSKA et al., 2015; SHEWALE et al., 2015; VOGT et al., 2015), configurando-se como uma técnica com grande potencial de desenvolvimento na investigação de sistemas polimórficos.

Em seus estudos VOGT et al. (2009) apresentaram, utilizando apenas dados de RMN no estado sólido, uma série de exemplos em que é possível obter importantes informações estruturais, através de várias metodologias em RMN no estado sólido. Informações como existência de ligações de hidrogênio, que são a principal informação acerca das interações intra e intermoleculares podem ser alcançadas. Para tanto, foi realizada uma detalhada avaliação de parâmetros como variação de deslocamento químico, desdobramento de sinais, sinais de correlação em mapas bidimensionais homo e heteronuclear (^1H - ^1H , ^1H -X), modulação de sinais por defasagem dipolar. Foram utilizados principalmente técnicas de polarização cruzada, experimentos de correlação binuclear (^1H - ^{13}C , ^1H - ^{19}F , ^1H - ^{31}P , ^{13}C - ^{31}P) e homonuclear (^1H - ^1H , ou ainda ^{13}C - ^{13}C), explorando processos como a difusão de spins e acoplamentos escalares e dipolares (transferência de polarização). Este trabalho mostra que, embora não seja plenamente possível caracterizar, de maneira absoluta, a estrutura cristalina por RMN no estado sólido, esta técnica permite obter informações importantes sobre a química supramolecular. Neste sentido é possível, por exemplo, propor a formação de sítions, que é bastante importante naqueles sistemas cristalinos compostos por mais de um componente, como os cocristais e sais.

Um exemplo deste estudo é o cocrystal de nicotinamida- ácido palmítico em que foram utilizadas técnicas uni e bidimensional para propor o sítion supramolecular mostrado na FIGURA 7a. O espectro de ^1H - ^{13}C CP-HETCOR (FIGURA 7b) fornece correlações heteronucleares, através de acoplamento dipolar e processos de difusão de spin, entre o carbono (C1) com os hidrogênios aromáticos (H33 e H36), que indicam uma interação intermolecular entre estas moléculas. A análise do espectro de ^1H DQ-BABA (FIGURA 7c) comprova a associação entre as duas moléculas com a formação do cocrystal, por meio de informações de acoplamentos dipolares homonucleares entre o hidrogênio (H1) do ácido palmítico com os hidrogênios H33 e H36 da nicotinamida (VOGT et al., 2009).

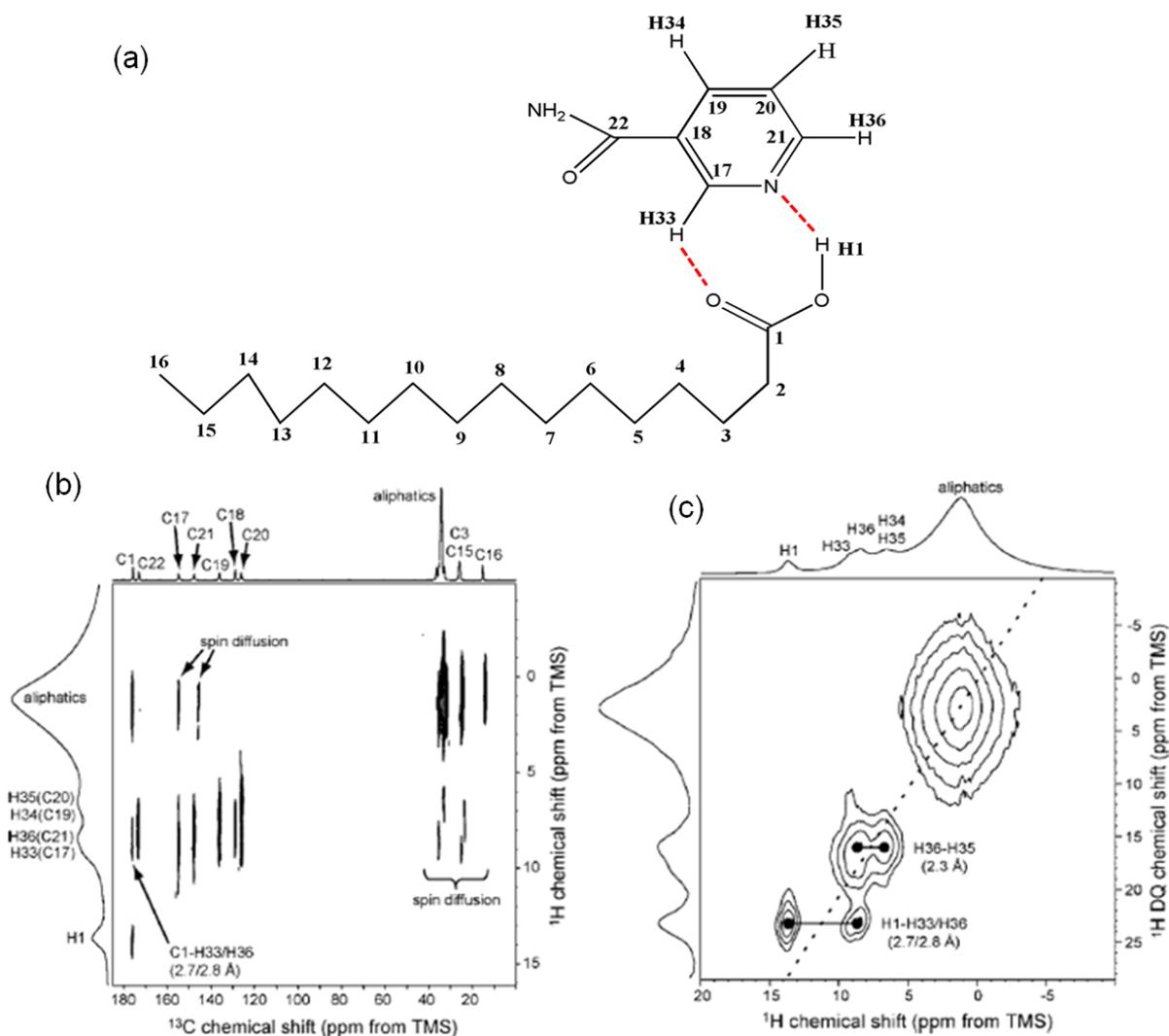


FIGURA 7 - (a) Cocrystal de Nicotinamida- ácido Palmítico, (b) espectro de ^1H - ^{13}C CP-HETCOR ($V_r=14$ kHz) utilizando um tempo de contato de $500\mu\text{s}$ e (c) espectro de ^1H DQ-BABA, ($V_r= 35$ kHz). (Adaptado de VOGT et al., 2009).

A RMN no estado sólido possibilita o estudo e diferenciação de formas cristalinas, além de fornecer importantes informações quanto aos aspectos estruturais. Esta técnica possui as seguintes vantagens:

- É uma técnica não destrutiva;
- O preparo de amostra é bem simples, pois consiste em inserir a amostra em um porta amostra que é denominado “rotor”. Como o sinal não é influenciado pelo tamanho da partícula da amostra, elimina-se as complicações de possíveis transformações polimórficas devido a processos de

moagem/compactação que são necessárias em outras técnicas tais como infravermelho (IR) e difração de raios X de pó;

- Possibilidade de análise de sólidos amorfos e possíveis misturas de compostos, além de apresentar grande aplicabilidade no estudo de amostras que são difíceis de cristalizar em monocristais;
- Necessidade de uma quantidade relativamente pequena de amostra: num rotor de 4 mm são utilizados aproximadamente 60 mg de amostra, enquanto que em rotores de 3.2 ou 2.5 mm uma quantidade muito menor de amostra pode ser utilizada;
- Possibilidade de análise de amostras comerciais, uma vez que os sinais de fármacos geralmente aparecem no espectro entre 0 e 50 ppm e acima de 100 ppm. Dentre os excipientes, os comumente usados são os polissacarídeos (que aparecem entre 50 e 100 ppm) e as sílicas (que não aparecem no espectro de carbono-13), o que viabiliza o uso desta técnica.

Como qualquer técnica analítica a RMN no estado sólido também apresenta suas desvantagens tais como: a baixa sensibilidade, tempo de análise que geralmente é longo e o alto custo de manutenção do equipamento.

OBJETIVO GERAL

2 – OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo principal utilizar a RMN no estado sólido para estudar a química supramolecular de fármacos antiparasitários e um antirretroviral. Tivemos como objetivos específicos:

1. Avaliar as interações intermoleculares do secnidazol anidro e hidratado;
2. Preparar possíveis sais/cocristais de albendazol formados a partir da adição de ácidos di e tricarboxílicos, estudando a formação de síntons supramoleculares, com o objetivo de melhorar a solubilidade;
3. Preparar possíveis dispersões sólidas do mebendazol com amido de milho, com o objetivo de melhorar a solubilidade;
4. Avaliar as interações intermoleculares do sal fumarato de disproxil tenofovir na busca pela caracterização de síntons.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 - Obtenção dos APIs (Insumos Farmacêuticos Ativos)

Os APIs foram cedidos pelas seguintes indústrias farmacêuticas para fins de estudo.

- Teuto - amostras de ABZ e SCZ;
- GeoLab - amostras das formas A e C do MBZ;
- Sigma- amostra comercial do princípio ativo MBZ (pureza: $\geq 98\%$);
- CYG Biotech - amostra de TDF.

3.2- Caracterização por RMN no estado sólido

3.2.1- Infraestrutura

As análises foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar, em um equipamento Bruker, modelo Avance-III-400, que opera com um campo magnético de 9,4 T (399,94 MHz para frequência do hidrogênio-1, 100,57 MHz para carbono-13 e 40,5 MHz para nitrogênio-15) e é equipado com uma sonda MAS para rotores de 4mm.

3.2.2- Preparo das amostras

As amostras na forma de pó foram empacotadas em rotores de zircônia de 4 mm de diâmetro externo (~ 60 mg de amostra) e em alguns casos em rotores do tipo CRAMPS (~20mg de amostra). Os rotores foram fechados com tampas de Kel-F

3.2.3- Sequências e padrões externos utilizados.

As sequências de pulsos utilizadas neste trabalho foram: CP-MAS (Cross Polarization on Magic Angle Spinning), CP-TOSS (CP - Cross Polarization with Total Suppression of Sidebands), CP-TOSS-NQS (CP-TOSS - Non Quaternary

Suppression), CPPI-TOSS (CP combined with Polarization Inversion - TOSS) e FSLG-HETCOR (Frequency Switched Lee Goldberg Heteronuclear Correlation) - ^1H - ^{13}C . Todos os experimentos foram feitos em uma temperatura ambiente aproximada de 23°C. Os experimentos unidimensionais foram feitos com uma rotação de 5 kHz, enquanto que os bidimensionais foram feitos com uma rotação de 10 kHz.

No caso do carbono-13 foi utilizado um padrão externo de adamantano, calibrando o deslocamento químico pelo sinal mais intenso em 38.5 ppm, referente ao grupo metileno (com relação ao TMS-tetrametilsilano). Para o hidrogênio-1 o sinal foi calibrado para 1,9 ppm, também com relação ao TMS. Para a calibração do núcleo de nitrogênio-15, foi utilizado a glicina, com deslocamento químico de 11,6 ppm, com relação ao nitrato de amônio (NH_4NO_3).

3.3- Difração de Raios-X de pó.

A difração de raios X de pó (DRX) foi utilizada para a caracterização da estrutura cristalina. Os difratogramas foram obtidos de amostras na forma de pó utilizando um equipamento Shimadzu modelo XRD 6000, com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. As medidas foram feitas em varredura contínua no intervalo de $5^\circ \leq 2\theta \leq 50^\circ$, a uma velocidade de varredura de $2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Esses experimentos foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da UFSCar (LIEC-UFSCar).

3.4- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Para as medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram pesadas 5 mg das amostras diretamente em cápsulas herméticas de alumínio e analisadas em um calorímetro diferencial de varredura DSC Q200 (TA Instruments, New Castle, EUA). As amostras foram resfriadas e estabilizadas a -10°C e, posteriormente, aquecida a uma taxa de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 300°C , sob um fluxo de 50 mL de $\text{N}_2\cdot\text{min}^{-1}$. Esses experimentos também foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da UFSCar (LIEC-UFSCar).

3.5- Análise Termogravimétrica (TGA).

Para avaliar o comportamento térmico das amostras foi utilizando um equipamento da marca NETZSCH modelo TG 209 F1 com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de O_2 com vazão de $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura empregada variou de 20 a 300°C em suporte de alumina onde foi utilizado aproximadamente 5 mg de amostras.

SECNIDAZOL

4 – SECNIDAZOL

4.1- OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivos específicos:

- Caracterizar e avaliar as interações intermoleculares do secnidazol anidro e hidratado por RMN no estado sólido;

4.2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1- Obtenção da forma anidra do SCZ a partir de sua forma hidratada

A amostra de SCZ foi fornecida pela indústria Teuto. Como o SCZ é altamente higroscópico, sua exposição ao ambiente durante poucos segundos é suficiente para que este se converta para a sua forma hidratada que é a mais estável.

Com o intuito de se obter a forma anidra do SCZ a partir de sua forma hidratada, parte da amostra de SCZ foi seca em estufa por 12h a 60°C e parte ficou exposta ao ambiente, de onde se obteve facilmente a forma hidratada.

4.2.2- Medidas de RMN no estado sólido

Os parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de RMN no estado sólido para o secnidazol estão descritos na TABELA 1:

TABELA 1 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -RMN 1D para o secnidazol.

Parâmetros utilizados (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Duração do pulso de contato (p15)	5 ms
Potência do pulso de contato (p1)	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 (SW)	295 ppm
Frequência de rotação	5 kHz

TABELA 2 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR para o secnidazol.

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Duração do pulso de contato (p15)	200 μs
Potência do pulso de contato (p1)	50 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
Frequência de rotação	10 kHz
Campo LG	83 kHz
Campo para desacoplador	83 kHz

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O secnidazol (SCZ) cristaliza como hemi-hidrato, apresentando quatro moléculas secnidazol por célula unitária e duas moléculas de água (MISHRA et al., 2009).

Três confôrmeros (I, II, III) do SCZ foram descritos (FIGURA 8) por meio de estudos utilizando a espectroscopia de Infravermelho e Raman (MISHRA et al., 2009), sendo o confôrmero I o mais estável.

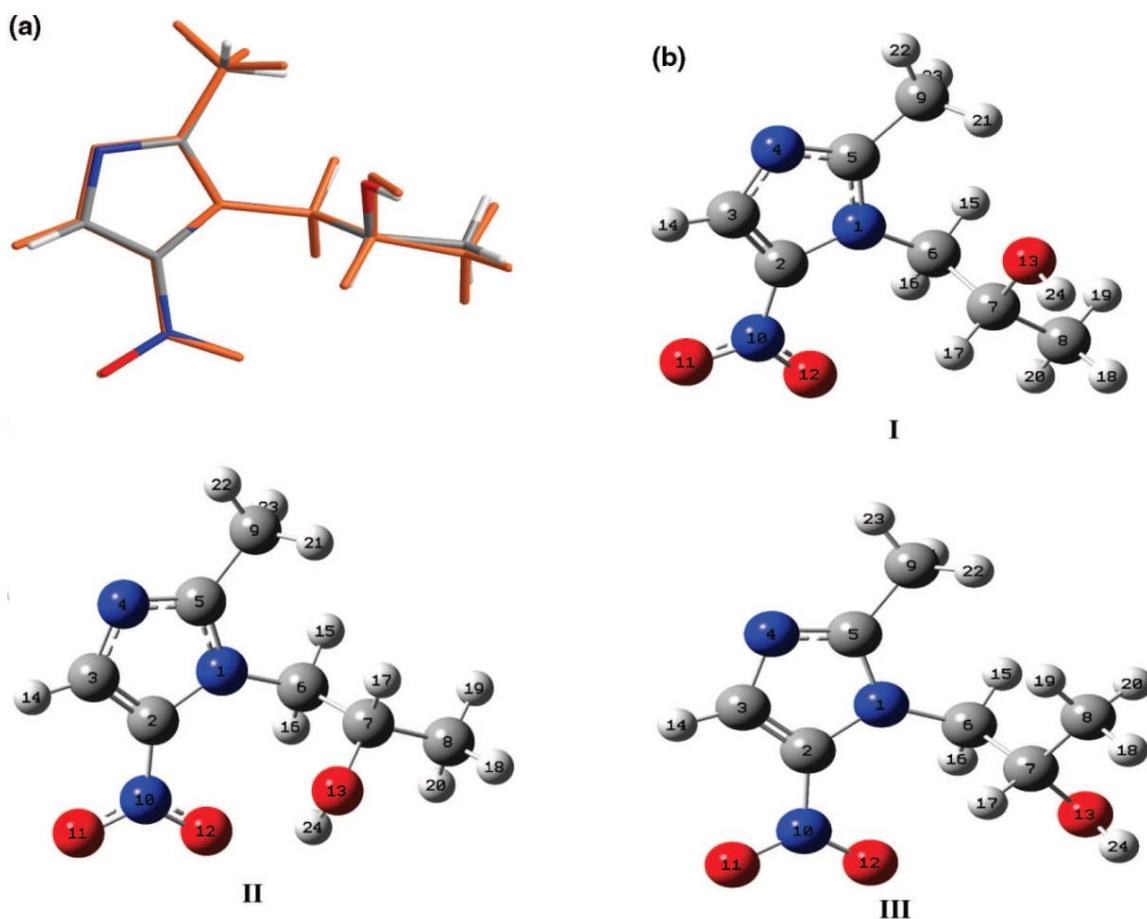


FIGURA 8 - a) Estrutura e (b) possíveis confôrmeros do secnidazol (Fonte: MISHRA, et al., 2009).

Como não há relatos na literatura sobre a caracterização do secnidazol por RMN no estado sólido ou mesmo uma estrutura cristalina bem caracterizada, este trabalho utiliza esta técnica para caracterizar a forma comercialmente disponível deste fármaco (hidratada) e também sua forma anidra que foi obtida por

meio de sua desidratação em estufa de circulação de ar a uma temperatura de 60°C por 12h.

Como ponto de partida no estudo do SCZ, foi obtido um difratograma de raios X de pó que foi comparado com outros difratogramas já descritos na literatura (MISHRA et al., 2009; RIVERA et al., 2000) e confirmou que os dados de raios-X correspondem a forma hidratada do secnidazol. O difratograma (FIGURA 9) exibe picos bem definidos, estreitos, intensos e finos. Devido à alta higroscopicidade do secnidazol não foi possível obter o difratograma de raios-X para o SCZ anidro, uma vez que este se converte facilmente a sua forma mais estável (hidratada) quando exposta ao ambiente.

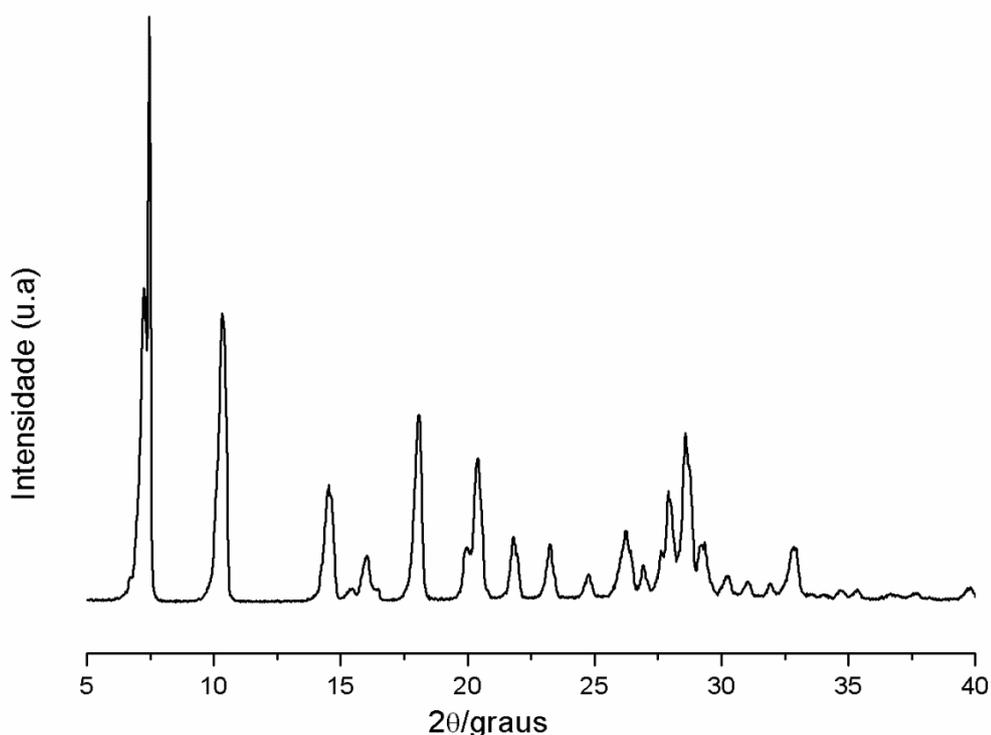


FIGURA 9- Difratograma de Raios-X do secnidazol hidratado.

Após os experimentos de difração de raios X por pó do SCZ foram obtidos os espectros de RMN no estado sólido. Algumas técnicas foram aplicadas com o intuito de intensificar o sinal e aumentar a resolução dos espectros. Para solucionar alguns problemas recorrentes na RMN no estado sólido e praticamente inexistentes em RMN de soluções, tal como a baixa sensibilidade e longos tempos de relaxação longitudinal para núcleos de pequeno fator magnetogírico e baixa

abundância natural, alargamento de sinais devido à anisotropia de deslocamento químico e interações dipolares, foram utilizadas técnicas muito eficientes que minimizam ou até anulam esses problemas. A polarização cruzada (CP- *Cross polarization*) foi utilizada para aumentar a sensibilidade de núcleos pouco sensíveis, a rotação da amostra em torno do ângulo mágico (MAS- *Magic-angle spinning*) para eliminar a anisotropia de deslocamento químico e o desacoplamento de alta potência (HPPD- *High-power proton decoupling*) foi utilizado para eliminar os acoplamentos dipolares (APPERLEY et al., 2012).

A técnica de CP-MAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning) se baseia na transferência de polarização de um núcleo de spin abundante (^1H) para um núcleo de spin pouco abundante X (tal como ^{13}C e ^{15}N). Uma desvantagem desta técnica é que o espectro poderá apresentar várias bandas laterais de rotação, dependendo da rotação utilizada na execução do experimento. Na CP-MAS o aumento das rotações promove a supressão dessas bandas, porém ocorre um alto consumo de gás nitrogênio que é utilizado no sistema pneumático.

Quando a técnica de CP-TOSS (CP - Total Suppression of Sidebands) é utilizada, o espectro apresenta apenas sinais dos deslocamentos químicos isotrópicos, já que ocorre supressão de possíveis bandas laterais. A CP-TOSS baseia-se na sequência de CP-MAS com a inclusão de quatro pulsos de 180° aplicados com diferentes fases no canal X (pode ser o ^{13}C , ^{15}N , etc). Essa sequência apresenta como vantagens o uso de rotações mais baixas, seja por limitação da sonda e/ou para economia de $\text{N}_{2(g)}$, se este for o gás utilizado no sistema pneumático responsável por fazer a rotação da amostra em torno do ângulo mágico e a possibilidade de análise de amostras complexas. A FIGURA 10 mostra uma comparação entre os espectros obtidos utilizando as técnicas descritas anteriormente.

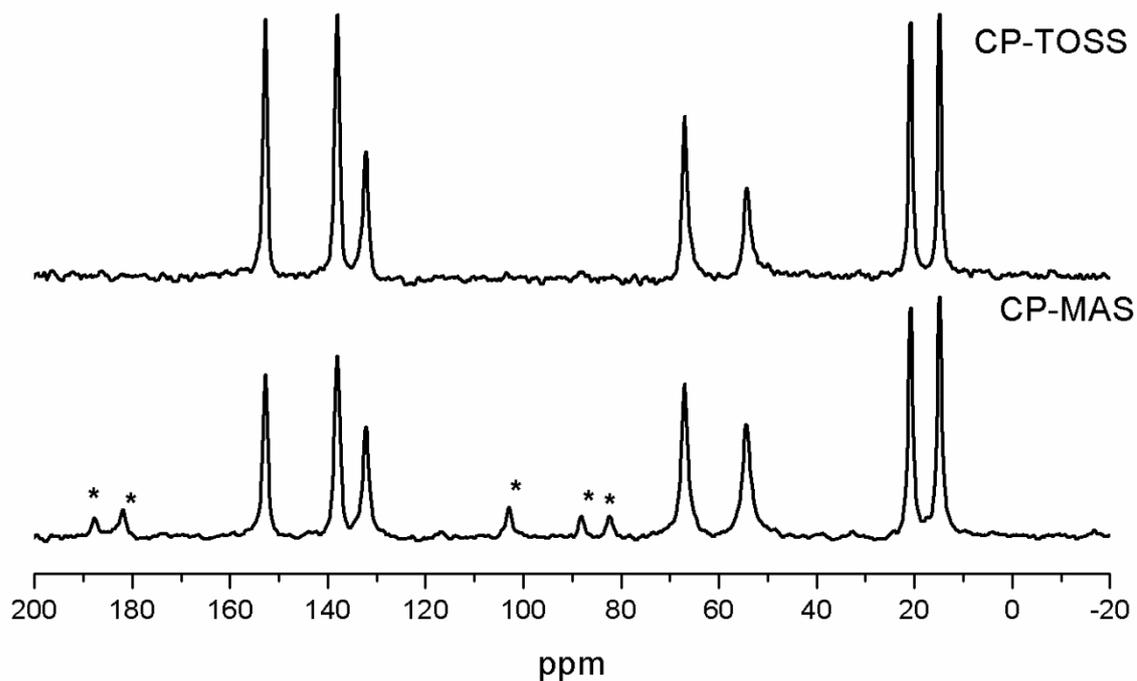


FIGURA 10 - Comparação entre os espectros de CP-TOSS (rotação a 5 KHz) versus CP-MAS (rotação a 10 KHz) do SCZ. (*) Bandas de rotação.

A atribuição dos sinais do SCZ foi feita por meio da RMN no estado sólido por meio da análise dos experimentos ¹³C-CP-TOSS e ¹³C-CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS (FIGURAS 11).

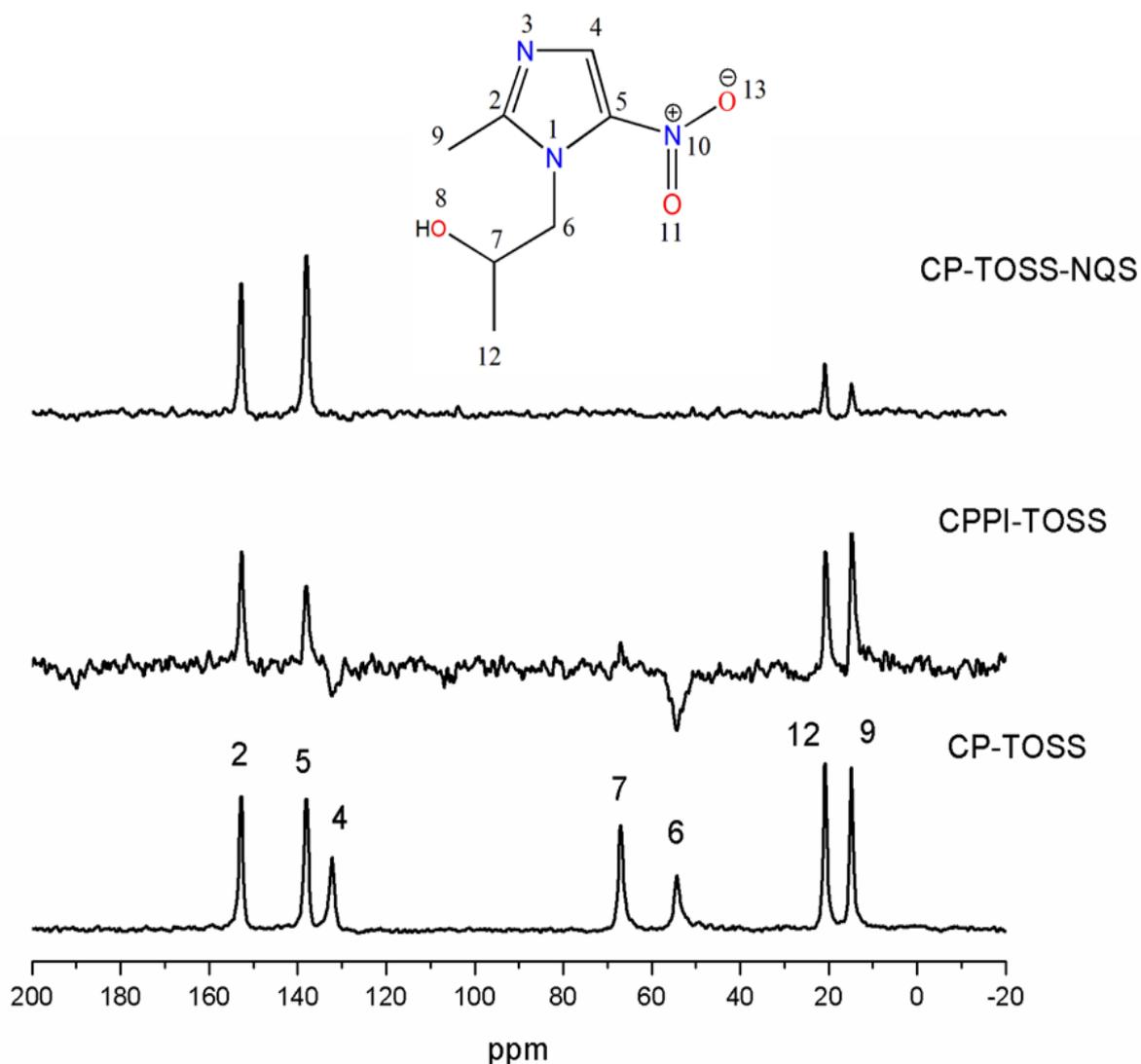


FIGURA 11 - Espectros de ^{13}C (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS) da forma hidratada do secnidazol.

No experimento de CP-TOSS-NQS ocorre a supressão de sinais de carbonos hidrogenados, portanto o espectro apresenta apenas sinais de carbonos quaternários, permitindo a sua identificação. Para tanto, é necessário otimizar o parâmetro $d20$, um período de tempo inserido logo após o período de polarização cruzada, durante o qual os núcleos de carbono com forte acoplamento dipolar, ou seja, aqueles átomos ligados diretamente a átomos de hidrogênio, evoluem de acordo com suas constantes de acoplamento dipolar, sendo essas grandezas inversamente proporcionais. Devido à maior mobilidade dos grupos metilas, o

acoplamento dipolar é menos eficiente e geralmente permanecem no espectro sinais residuais relativos a estes grupamentos (APPERLEY et al., 2012).

A sequência de pulso CPPI-TOSS permite diferenciar grupos metilenos (CH_2) cujos sinais aparecem em fase negativa de carbonos quaternários (C^0) e metilas (CH_3) que apresentam sinais em fase positiva e também dos sinais de grupamentos metínicos (CH), que são anulados dos espectros (FIGURA 12). Para tal, é preciso otimizar um parâmetro denominado pulso de inversão (p16) que varia entre 40 e 100 μs , o qual é ajustado por meio do monitoramento da anulação do sinal referente ao CH . Durante esse período, que corresponde a uma extensão do pulso de polarização cruzada, mas com fase diferente, os núcleos de carbono evoluem em função dos tempos de relaxação no referencial rotatório.

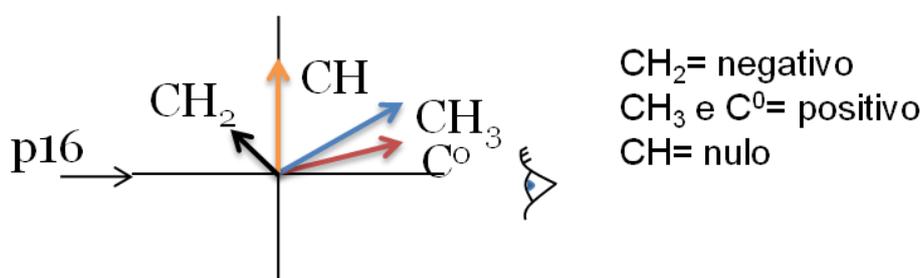


FIGURA 12 - Esquema representativo da resposta obtida ao utilizar a sequência de pulso ^{13}C -CPPI-TOSS.

Após esta etapa de atribuição dos sinais da forma hidratada do SCZ, foram obtidos espectros de RMN ^{13}C -CPTOSS da amostra anidra (que foi obtida por meio da desidratação da forma hidratada deste fármaco) e então ambos os espectros foram comparados. Nos espectros são observadas algumas diferenças, tanto na forma dos sinais (FIGURA 13) quanto nos deslocamentos químicos (TABELA 3).

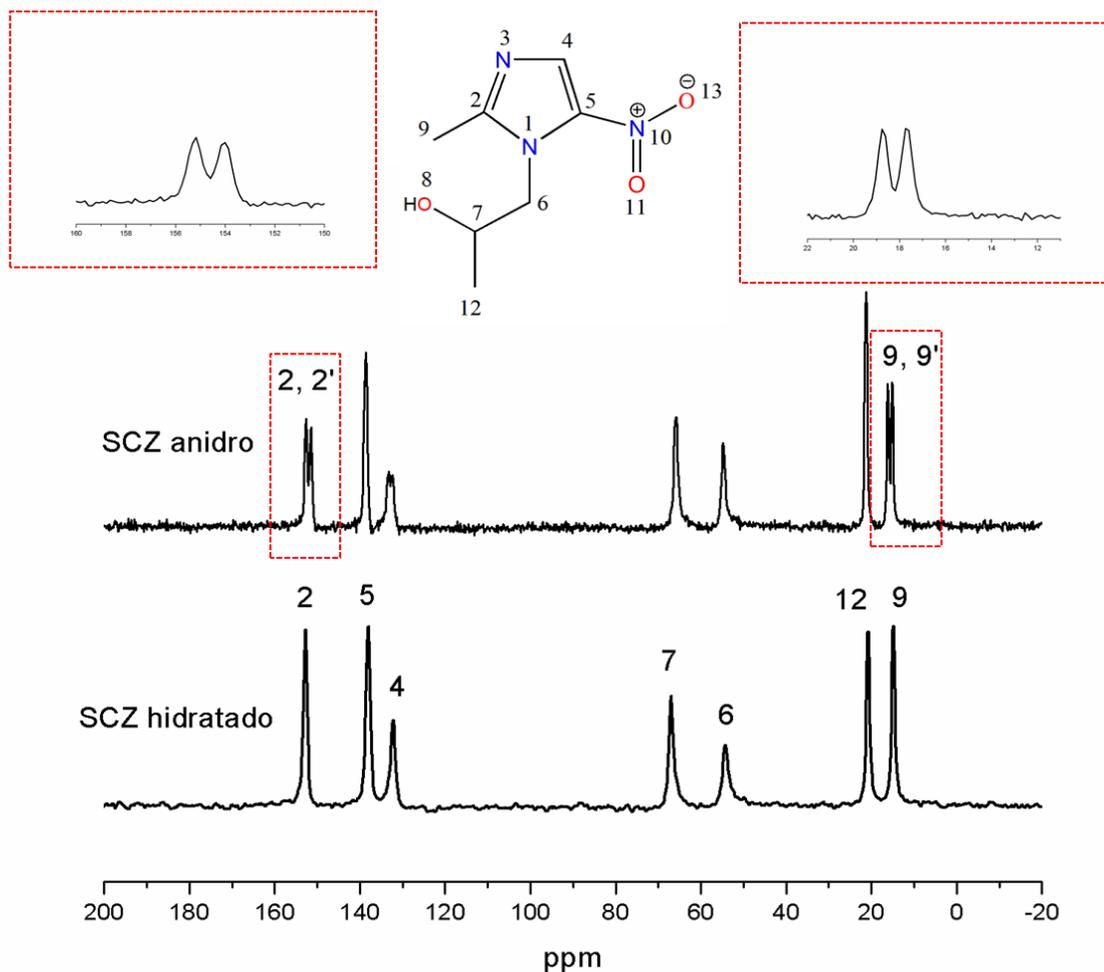


FIGURA 13 – Espectros de ¹³C-CPTOSS para as formas anidra e hidratada do secnidazol.

TABELA 3 - Deslocamento químico (ppm) de ¹³C-CP-TOSS das formas anidra e hidratada do secnidazol.

Carbono	SCZ (hidratado)	SCZ (anidro)
2	152,8	152,6 / 151,5
5	138,1	138,1
4	132,3	132,3
7	67,1	67,1
6	54,4	54,4
12	20,9	20,9
9	14,9	16,2 / 15,3

Quanto às formas dos sinais a principal diferença observada entre as formas anidra e hidratada está nos sinais relativos aos carbonos C2 e C9, em que na forma anidra há um desdobramento desses sinais, indicando a possibilidade de haver mais de uma estrutura não equivalente por célula unitária para esta forma. O carbono C4 também parece apresentar um pequeno desdobramento.

Já no espectro de ^{15}N (FIGURA 14), a única e pequena diferença está na variação de deslocamento químico (TABELA 4) do N3, de 242,7 ppm (hidrato) para 245,1 ppm (anidro), indicando que na forma anidra este átomo pode estar envolvido em uma ligação de hidrogênio intermolecular, plausível devido ao seu caráter básico. CHIEROTTI e GOBETTO, 2012, mostraram em seus estudos que o deslocamento químico do ^{15}N é máximo quando o hidrogênio está localizado no centro da ligação de hidrogênio numa interação do tipo $\text{N}\cdots\text{H}\cdots\text{O}$, quando a protonação se completa este deslocamento tende a diminuir ($\text{N}^+\text{---}\text{H}\cdots\text{O}^-$). Uma interação intermolecular é verificada para a forma anidra do SCZ que tem o deslocamento químico de seu N3 aumentado possivelmente por estar envolvido em ligação de hidrogênio intermolecular. Isso mostra que a região aromática está sendo bastante sensível às mudanças no empacotamento cristalino.

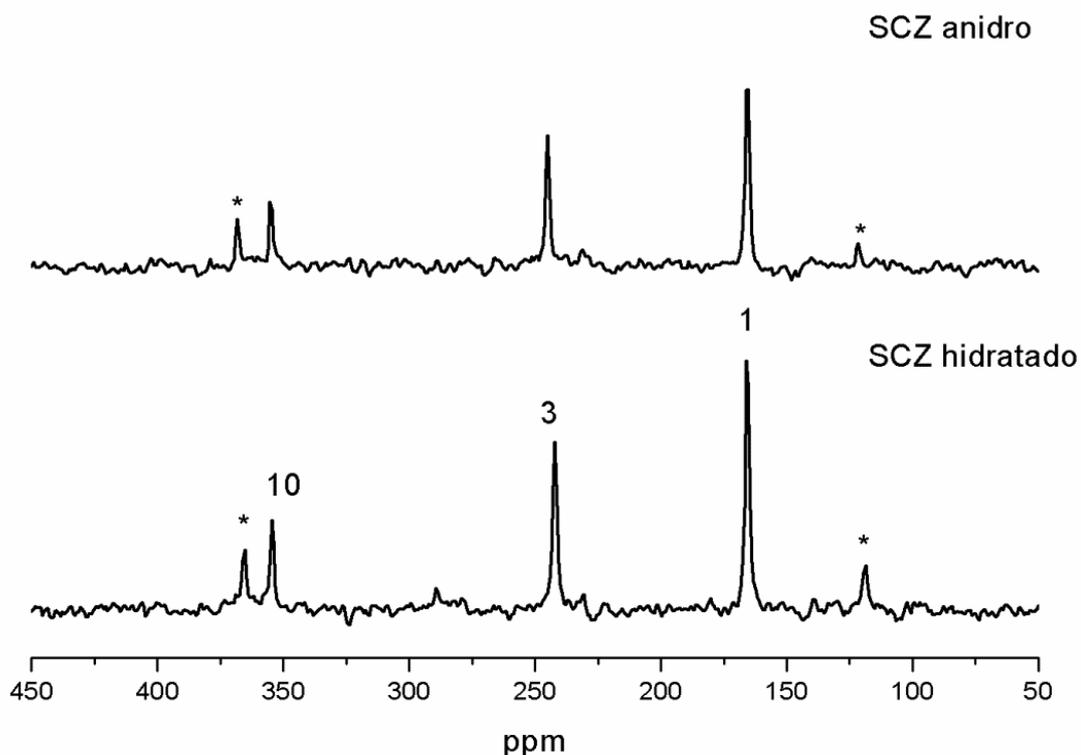


FIGURA 14 – Espectro de ^{15}N -CPMAS das formas anidra e hidratada do secnidazol.
* Bandas de rotação.

TABELA 4 - Deslocamento químico (ppm) de ^{15}N -CPMAS das formas anidra e hidratada do secnidazol.

Nitrogênio	SCZ (hidratado)	SCZ (anidro)
10	355,2	355,2
3	242,7	245,1
1	165,8	165,8

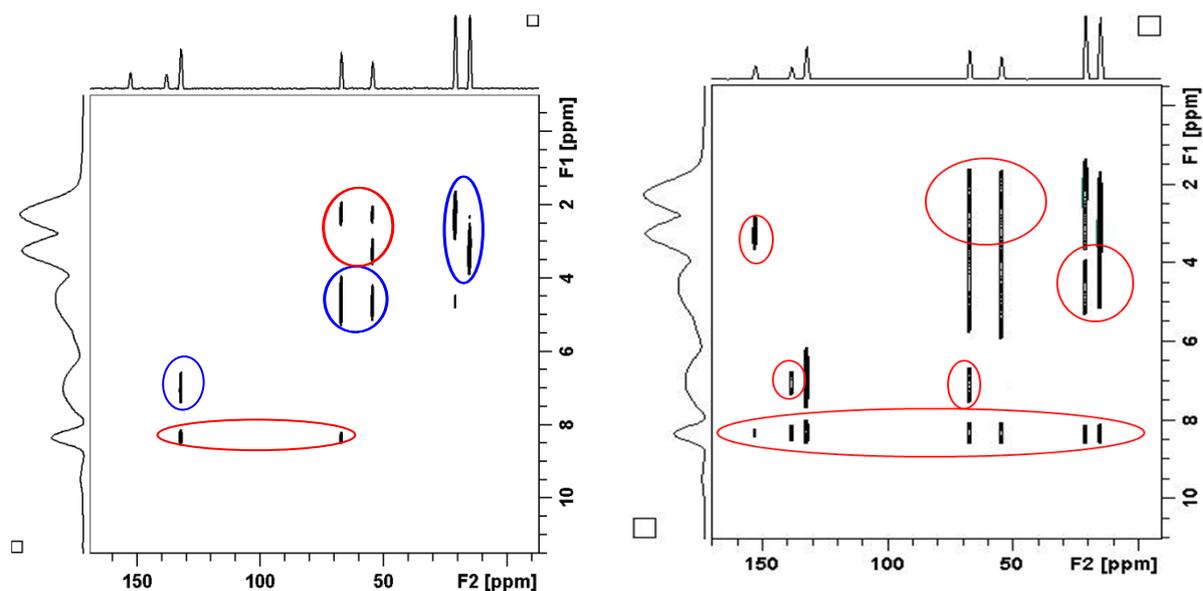
Para avaliar como esses núcleos interferem entre si através de acoplamentos dipolares foram obtidos mapas de correlação FSLG-HETCOR, utilizando tempos de contato mais longos para privilegiar processos como acoplamento dipolar em distâncias um pouco mais longas e/ou difusão de spins e assim detectar possíveis ligações de hidrogênio. O mapa FSLG-HETCOR para o hidrato (FIGURA 15) apresenta sinais de correlação permitiu observar as correlações da TABELA 5.

TABELA 5 - Deslocamentos químicos (ppm) do mapa de correlação ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR do secnidazol hidratado.

Carbono	Correlação direta	Correlação por difusão de spins
2	-	H9 (3,26 ppm) e HA (8,33 ppm)
4	H4 (7,02 ppm)	HA (8,33 ppm)
5	-	H4 (7,02 ppm) e HA (8,33 ppm)
6	H6 (4,48 ppm)	HA (8,33 ppm), H9 (3,26 ppm) e H12 (2,25 ppm)
7	H7 (4,66 ppm)	HA (8,33 ppm), H9 (3,26 ppm), H4 (7,02 ppm) e H12 (2,25 ppm)
9	H9 (3,26 ppm)	H7 (4,66 ppm) e HA (8,33 ppm)
12	H12 (2,25 ppm)	H7 (4,66 ppm) e HA (8,33 ppm)

Por difusão de spins é verificado um sinal de correlação entre C2 (em 152,8 ppm) e dois hidrogênios, um em aproximadamente 3,26 e outro em 8,33 ppm, sendo que o último pode ser atribuído ao hidrogênio da água (HA), que de acordo

com a cela unitária descrita para o SCZ hidratado na FIGURA 16 (HONORATO,S.B., 2009), pode estar muito próxima espacialmente. Aliás, ainda de acordo com a cela proposta na FIGURA 16, às moléculas de água estão distribuídas de uma forma que se encontram próximas de praticamente todos os núcleos de carbono-13 e, como pode ser observado no mapa HETCOR da FIGURA 15, existem sinais de correlação deste próton com todos os carbonos do secnidazol, com maior ou menor intensidade.



(a) Tempo de contato= 500us – círculos azuis – correlação direta, círculos vermelhos – correlação por difusão de spins

(b) Círculos vermelhos – correlação por difusão de spins – nível de corte mais baixo

FIGURA 15 – Mapa ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR da forma mais estável do secnidazol (hidratada)

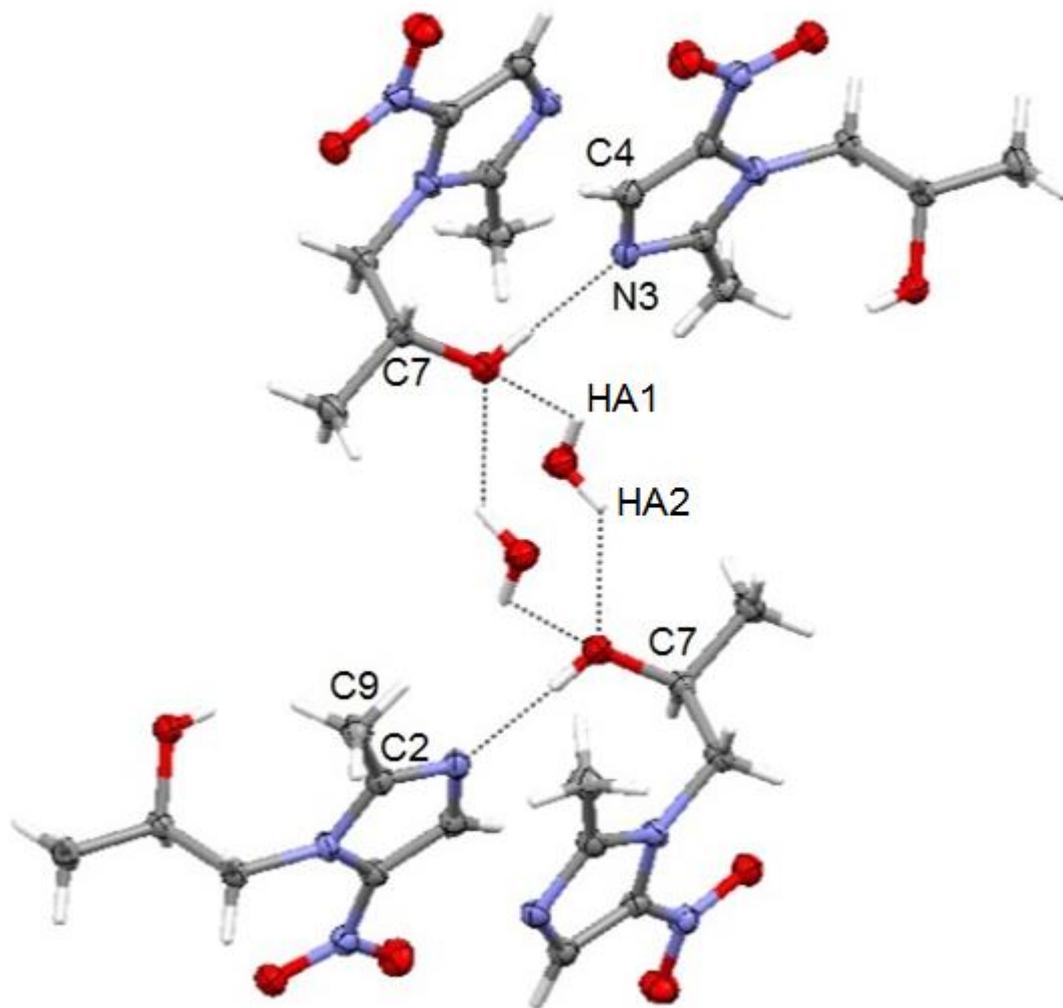


FIGURA 16 - Representação das ligações de hidrogênio do SCZ hidratado baseado em dados cristalográficos (Adaptado de HONORATO S.B., 2009).

Já no secnidazol anidro (FIGURA 17) é verificada a possibilidade de haver duas estruturas diferentes na mesma célula unitária, uma vez que os sinais dos carbonos 2 e 9 aparecem desdobrados. A proximidade dos carbonos 2 e 9 das moléculas de água faz com que esses átomos “sintam” mais fortemente a remoção da água. Quanto ao radical 2 hidroxi-propil não é observada nenhuma alteração nos deslocamentos químicos dos átomos de carbono (C6, C7 e C12), mostrando que não há mudança conformacional com a desidratação. Com a remoção das moléculas de água a interação por ligação de hidrogênio intermolecular entre um grupo hidroxila de uma molécula com um átomo de nitrogênio N3 de uma segunda molécula, sendo que o nitrogênio N3 da primeira molécula permanece livre. O

nitrogênio N3 envolvido em uma fraca ligação de hidrogênio acaba tendo sua nuvem eletrônica ligeiramente diminuída atraindo densidade eletrônica do carbono C2. O carbono C9, por sua vez, doa densidade eletrônica ao anel e tem a sua densidade eletrônica também diminuída, sendo ligeiramente desprotegido e exibindo um deslocamento químico um pouco mais elevado. Os átomos de carbono C2 e C9 pertencentes à molécula em que o nitrogênio N3 não está envolvido em uma ligação de hidrogênio exibem deslocamentos químicos ligeiramente mais baixos, por estarem mais protegidos. Também é observado um ligeiro desdobramento do sinal relativo ao carbono C4, seguindo a mesma tendência dos carbonos C2 e C9.

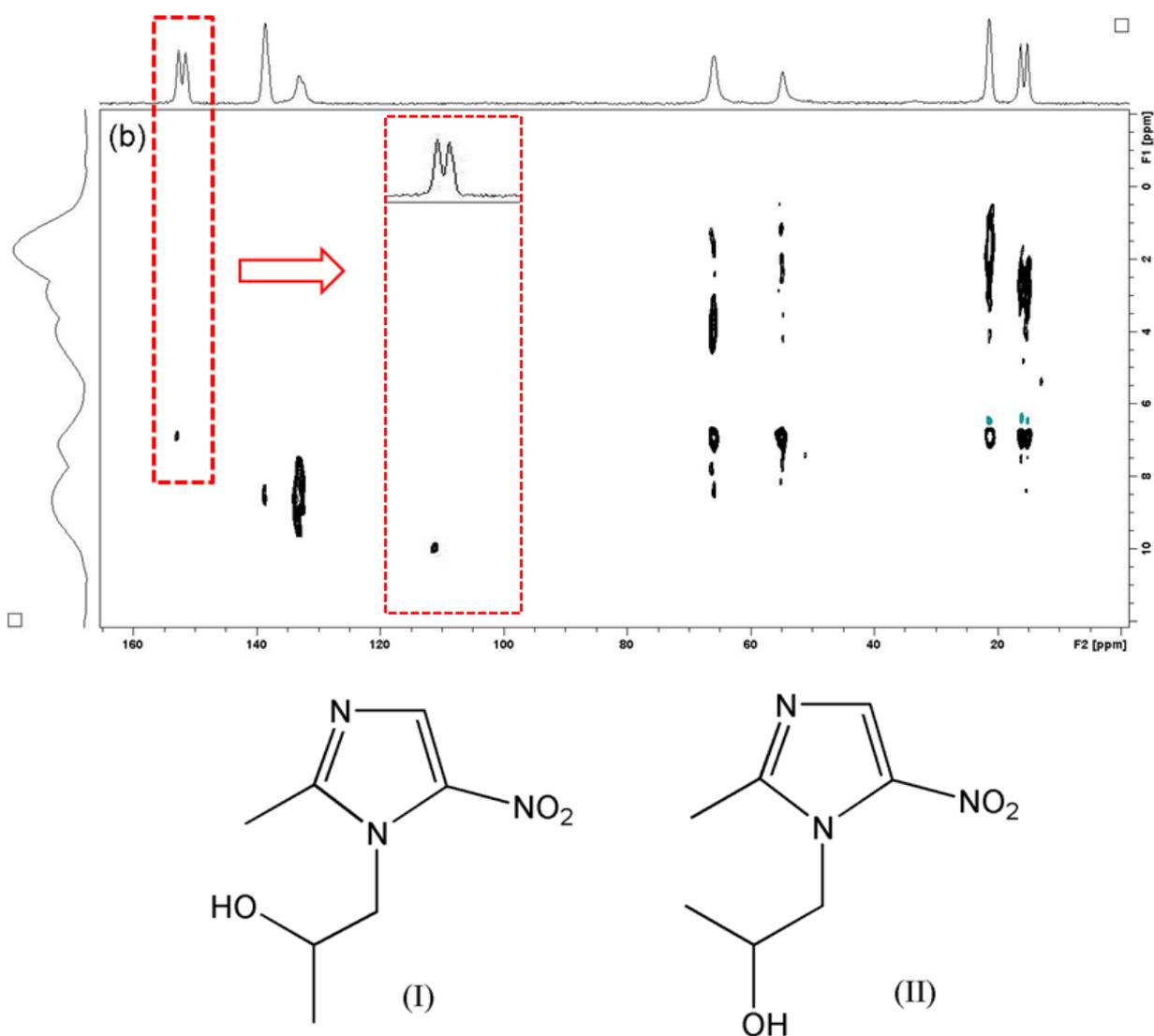


FIGURA 17 - Mapa ^1H - ^{13}C FSLG-HETCOR da forma anidra do secnidazol.

Na forma I pode ser observado um sinal de correlação, por difusão de spins, entre o C2 (152.6 ppm) e possivelmente um H do grupo OH (~7 ppm), que não aparece para o C2 da forma II (151.5 ppm), como mostrado na expansão da FIGURA 17. Além disso, os H do grupo metila (C9) da forma I aparecem mais menos blindados (~3 ppm) com relação aos mesmos da forma II (~2,5 ppm). No caso da forma II ainda pode estar ocorrendo uma interação intermolecular via ligação de hidrogênio entre o grupo OH e o N3, formando ligações na forma “cabeça-cauda”, como sinalizado no espectro de 15N (FIGURA 4.7). A FIGURA 18 ilustra as diferentes conformações das formas anidra do SCZ e a possível interação intermolecular da forma anidra II.

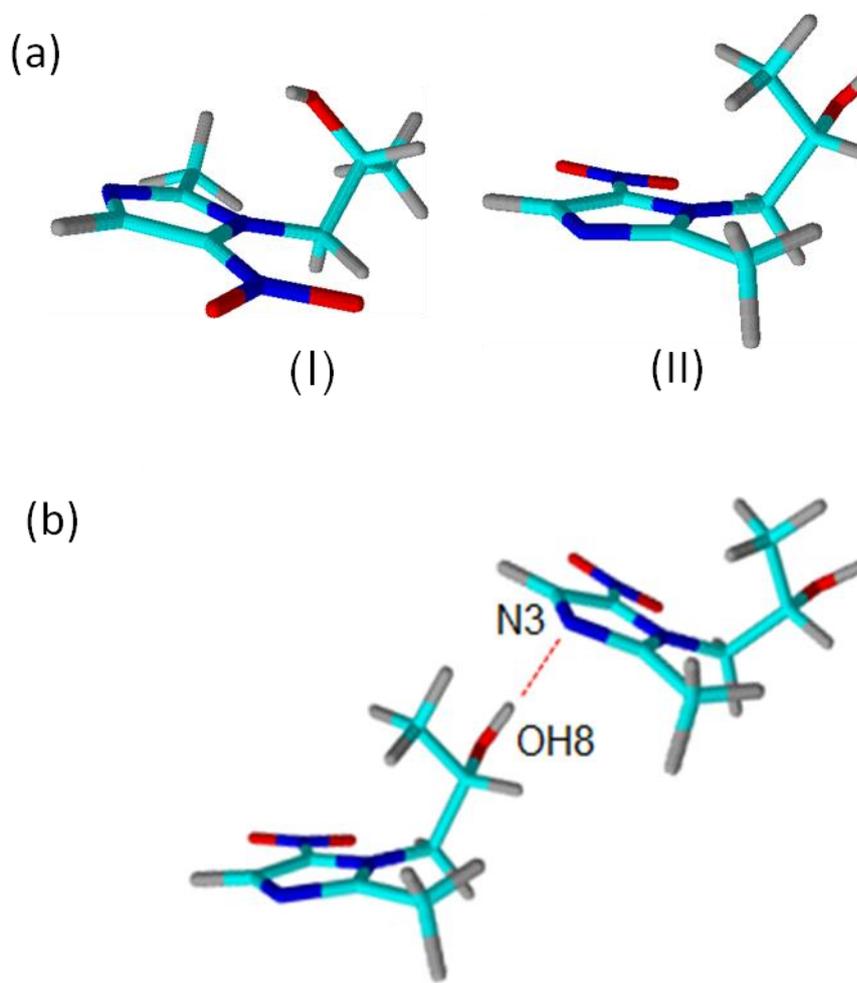


FIGURA 18 - Ilustração das (a) diferentes conformações das formas anidra do secnidazol e da (b) interação intermolecular tipo cabeça-cauda da forma (II).

Nos termogramas de DSC (FIGURA 19) foi possível verificar que o SCZ hidratado apresenta duas endotermas de fusão. No intervalo entre 69- 73 C° provavelmente ocorreu à desidratação da forma hidratada do SCZ, seguida pela fusão de sua forma anidra em 79,2°C. Já para a forma anidra do SCZ temos somente uma transição relativa à fusão desta fase. Esse mesmo comportamento foi verificado por HONORATO S.B., 2009, que observou que o SNZ hidratado sofre um processo de desidratação a 68°C, passando para uma fase anidra a qual funde a 74°C. Essas variações de temperaturas podem ter sido causadas pela influência de alguns parâmetros experimentais tal como razão de aquecimento, dentre outros (BERNAL et al., 2002).

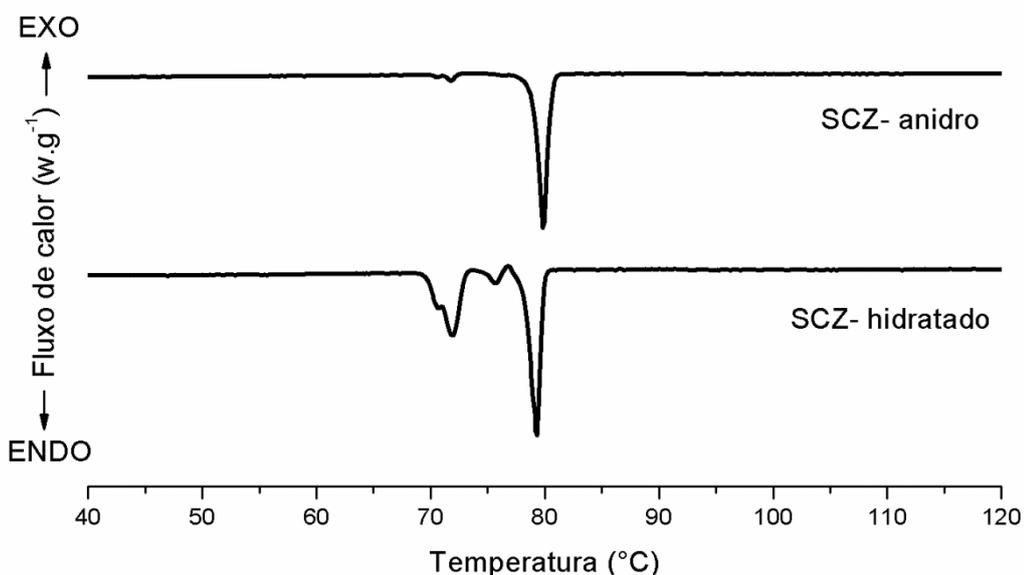


FIGURA 19 - Termogramas de DSC das formas hidratada e anidra do secnidazol.

4.4- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos identificaram a forma polimórfica hidratada e anidra do SCZ, que foram caracterizadas pela técnica de RMN no estado sólido. Por meio de experimentos de RMN-2D foi possível propor as conformações moleculares para as formas anidras (I e II) e também uma interação intermolecular do tipo cabeça-cauda para forma anidra II.

ALBENDAZOL

5 - ALBENDAZOL

5.1- OBJETIVOS

Esta parte do trabalho tem por objetivo específico:

- Caracterização da amostra de ABZ e avaliação de suas amostras comerciais por RMN no estado sólido;
- Obtenção de novas formas polimórficas por meio da cristalização do ABZ utilizando diferentes ácidos carboxílicos como agentes coformadores;
- Obtenção de sistemas de cristalização ABZ-SCZ visando o desenvolvimento de uma possível co-formulação.
- Estudo da solubilidade do albendazol e seus complexos obtidos.

5.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 – Obtenção da amostra de ABZ e suas amostras comerciais

A amostra de ABZ foi fornecida pela indústria Teuto e foram adquiridas no comércio local amostras de quatro marcas comerciais diferentes.

5.2.2- Preparação dos complexos Albendazol- Ácidos carboxílicos

Foram testados diferentes solventes (acetonitrila, etanol (PA), metanol, etc) para solubilizar o albendazol, associados ainda com diferentes temperaturas (25 á 70°C) e tempos de agitação (0 - 60 min), e com evaporação a baixas temperaturas (~10°C) e a temperatura ambiente.

Estabelecidas as condições favoráveis para o processo de cristalização dos sistemas em estudo: solvente (etanol), temperatura (50°C), tempo de agitação (40-50 min) e evaporação lenta (~10°C), foram desenvolvidas repetições do método utilizado a fim de avaliar a sua reprodutibilidade.

Os complexos em estudo foram preparados com 5 mL de etanol nas razões de (1:1) e (1:2) de (ABZ: Ácidos carboxílicos). Os sistemas foram deixados

sob sonicação por 30-50 min, sendo a cristalização realizada sob evaporação a baixa temperatura (~10°C). Os tempos de secagem variaram entre 20-30 dias.

Os ácidos carboxílicos foram escolhidos de acordo com seu pK_{a1} que variou entre 1,25-4,35, para os seguintes ácidos: oxálico, aspártico, maléico, malônico, tartárico, fumárico, cítrico, benzoico e glutárico.

5.2.3 - Preparação do complexo Albendazol-Secnidazol

Amostras de ABZ e SCZ, na proporção estequiométrica de (1:1), foram dissolvidas em 15 mL de acetonitrila e sonicadas por 30 min. A cristalização foi realizada por evaporação simples a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 dias.

5.2.4 - Medidas de RMN no estado sólido

Os parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de RMN no estado sólido para o secnidazol estão descritos abaixo:

TABELA 6 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -RMN 1D para a amostra de ABZ e suas amostras comerciais.

Parâmetros utilizados (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Duração do pulso de contato (p15)	3 ms
Potência do pulso de contato (p1)	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 (SW)	295 ppm
Frequência de rotação	5 kHz

TABELA 7 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS para os complexos ABZ- Ácidos carboxílicos.

Parâmetros utilizados (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	5 s
Duração do pulso de contato (p15)	3 ms
Potência do pulso de contato (p1)	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 (SW)	295 ppm
Frequência de rotação	5 kHz

TABELA 8 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR para os complexos ABZ- Ácidos carboxílicos.

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Duração do pulso de contato (p15)	1ms
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
Frequência de rotação	10 kHz
Campo LG	83 kHz
Campo para desacoplador	83 kHz

TABELA 9 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS para o complexo ABZ-SCZ.

Parâmetros utilizados (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	2 s
Duração do pulso de contato (p15)	3 ms
Potência do pulso de contato (p1)	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 (SW)	295 ppm
Frequência de rotação	5 kHz

TABELA 10 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C - ^1H FSLG HETCOR para o para o complexo ABZ-SCZ.

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	2 s
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
Frequência de rotação	10 kHz
Campo LG	83 kHz
Campo para desacoplador	83 kHz

5.2.5 – Estudo de solubilidade do fármaco albendazol em diferentes meios

A solubilidade do ABZ foi determinada em cinco diferentes meios solventes comumente utilizados: água, ácido clorídrico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), acetonitrila, etanol e metanol. Uma concentração de 5 mg.mL^{-1} do fármaco, suficiente para saturação dos meios, foram mantidas sob agitação mecânica por 48 horas, em velocidade constante. Após este período, utilizando uma centrífuga (Heraeus Fresco 17®) as soluções foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 min e o sobrenadante filtrado em membrana de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Em seguida, as soluções foram diluídas e analisadas em espectrofotômetro de UV-VIS, com HP UV-Visible ChemStation Software (Hewlett Packard® 8453). As solubilidades foram determinadas após a obtenção de curvas analíticas dos diferentes meios solventes, pela leitura das absorbâncias na região do UV, no comprimento de onda de 304 nm para o albendazol (adaptado de PEDREIRO, 2012). Essas análises foram feitas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

5.2.6 - Influência dos complexos ABZ-ácido carboxílico na solubilidade do albendazol.

Para os complexos ABZ- ácido maléico e ABZ- ácido oxálico, os meios solventes utilizados para determinar a solubilidade foram metanol e água. A solubilidade foi determinada partindo-se de suspensões dos complexos com concentração conhecida dos fármacos de 3 mg.mL^{-1} (adaptado de PEDREIRO, 2012).

5.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 - Caracterização da amostra de albendazol

Como ponto de partida no estudo do ABZ foi obtido um difratograma de raios X e um termograma de DSC (FIGURA 20) que foram comparados com dados já descritos na literatura (PRANZO, et al., 2010).

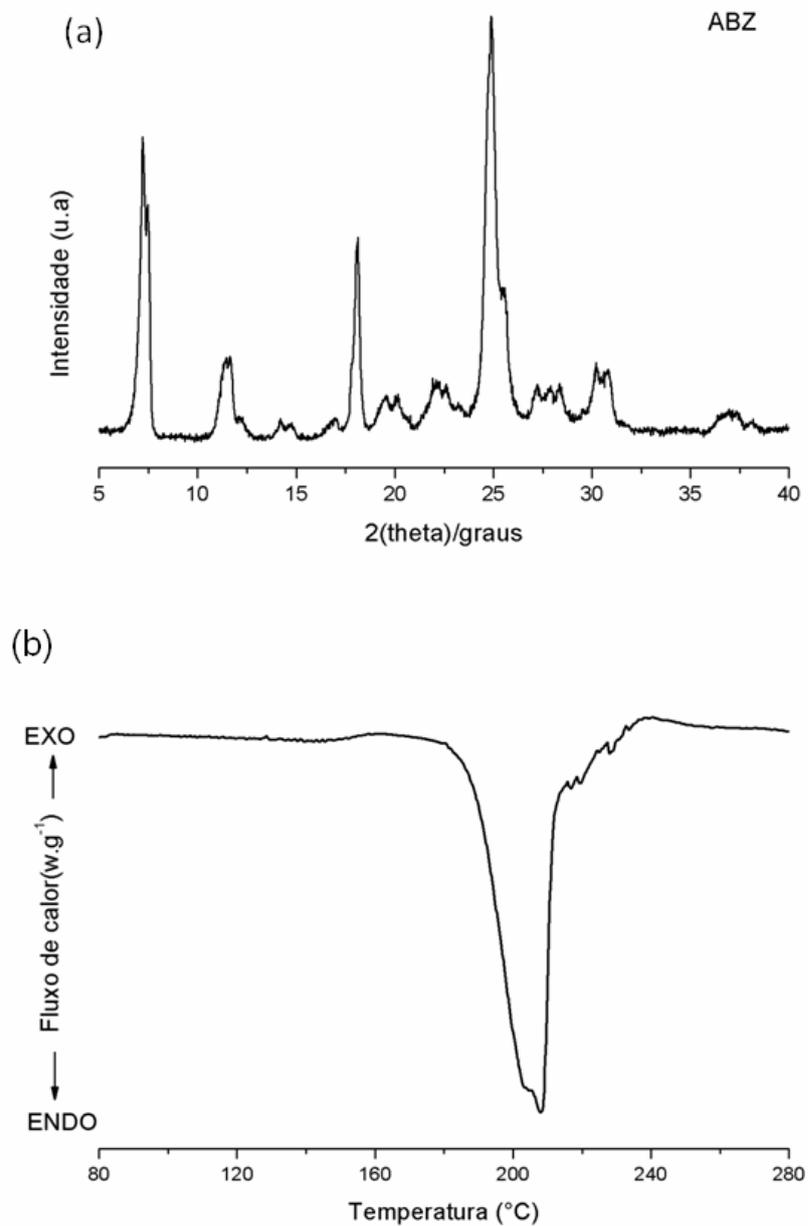


FIGURA 20 - Difratograma de Raios-X e termograma de DSC do ABZ.

Com base nestes resultados é possível afirmar que o ABZ se encontra na sua forma I, uma vez que o difratograma apresenta um pico característico em $2\theta = 11,5^\circ$ que está presente somente para a forma I do ABZ. A forma dos picos em $2\theta = 7^\circ$ e próximo a 25° colaboram com esta afirmativa. A ausência de picos no difratograma que são referentes à forma II em $2\theta = 10,5^\circ$; 15° e 30° reforçam esta constatação (PRANZO et al., 2010).

O termograma obtido está em acordo com os dados de raios-X, pois mostra que o ABZ apresenta uma única endoterma em 208°C , que corresponde a fusão do polimorfo I do ABZ. De acordo com PRANZO et al. (2010) o termograma da forma II do ABZ apresenta duas endotermas sendo a primeira com um ponto de fusão em aproximadamente 160°C , o que não é visualizado no termograma obtido para a amostra em estudo, confirmando que a amostra de ABZ utilizada neste trabalho se encontra na sua forma polimórfica I.

Por meio da técnica de RMN no estado sólido e o uso de algumas sequências específicas, já explicadas detalhadamente no capítulo anterior, foram obtidos espectros do ABZ que possibilitaram fazer a atribuição dos sinais satisfatoriamente. No espectro de ^{13}C -CPTOSS (FIGURA 21) é verificada a presença de três sinais referentes aos grupos metílenos (C15 e C16), que aparecem em fase negativa no espectro de CPPI-TOSS, sendo um indicativo de que possivelmente este sinal é o que diferencia os polimorfos I e II do ABZ, já que esta molécula apresenta somente dois grupos CH_2 em sua estrutura.

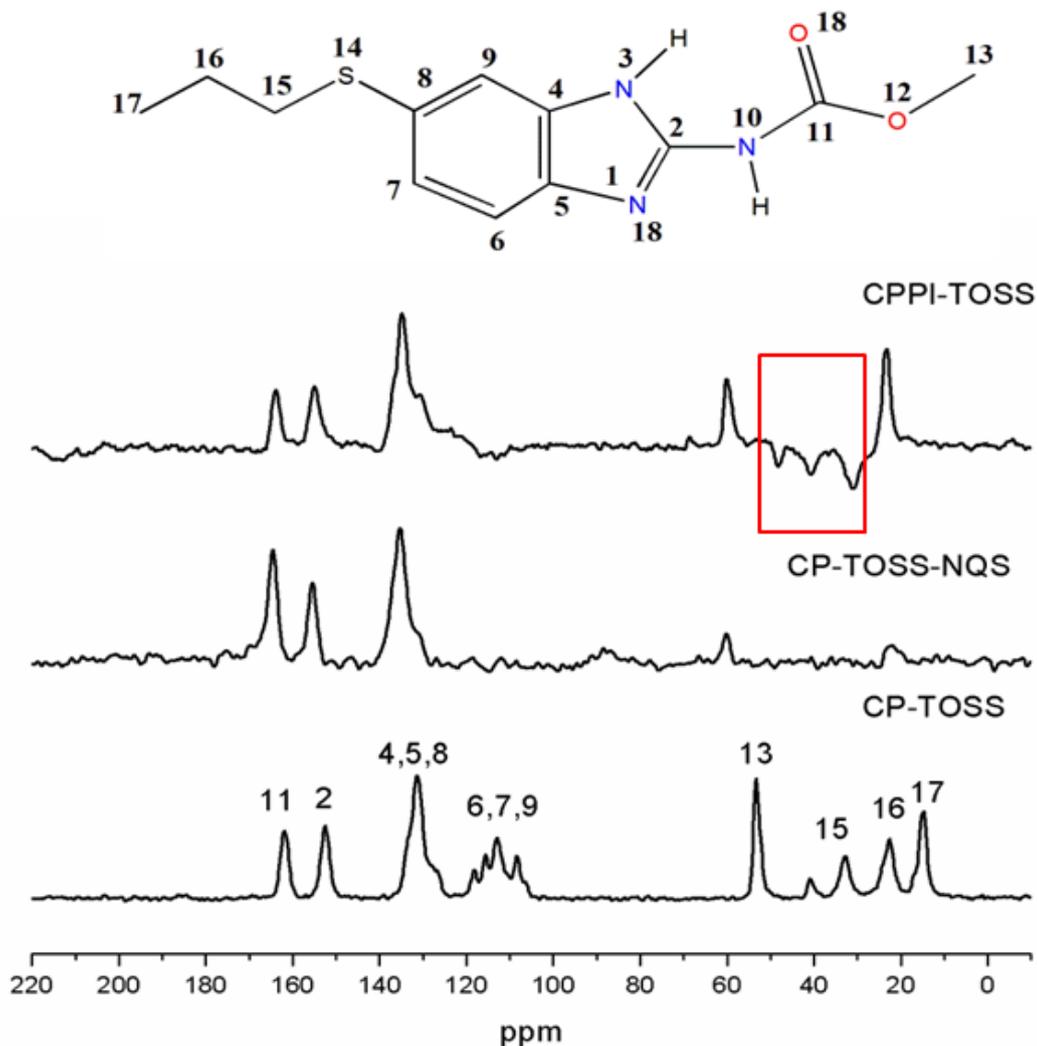


FIGURA 21 – Espectros de ^{13}C (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS) da forma I do ABZ.

A fim de comparar os espectros de RMN no estado sólido das formas I e II do ABZ diversas tentativas de recristalização do ABZ em metanol e N, N-dimetilformamida seguindo a metodologia descrita por PRANZO et al. (2010) foram desenvolvidos a fim de se obter a forma polimórfica II deste fármaco, porém sem sucesso. Diante disso, adquirimos formas comerciais do ABZ com o propósito de encontrar formas polimórficas diferentes da comercial (forma I) e assim distinguir os espectros de RMN destes polimorfos, além de avaliar a aplicação da RMN no estado sólido como ferramenta analítica para a análise de medicamentos comerciais.

5.3.2 - Caracterização de amostras comerciais do albendazol por RMN no estado sólido

Na tentativa de encontrar formas polimórficas diferentes da forma I (comercial), amostras comerciais de quatro diferentes indústrias foram adquiridas. É importante ressaltar que todas essas amostras comerciais avaliadas são medicamentos genéricos. O interesse em analisar essas amostras comerciais surgiu devido à facilidade de aquisição desses medicamentos (não é necessário uma prescrição médica), seu baixo custo e a inexistência na literatura de qualquer análise de formas comerciais de ABZ utilizando a técnica de RMN no estado sólido.

Experimentos de RMN no estado sólido foram realizados em amostras comerciais a fim de verificar possíveis formas polimórficas do ABZ. No espectro de ^{13}C -CPTOSS (FIGURA 22) é observado que os sinais referentes aos carbonos aromáticos, carbonílico e grupos metílicos apresentaram deslocamentos químicos similares quando comparados.

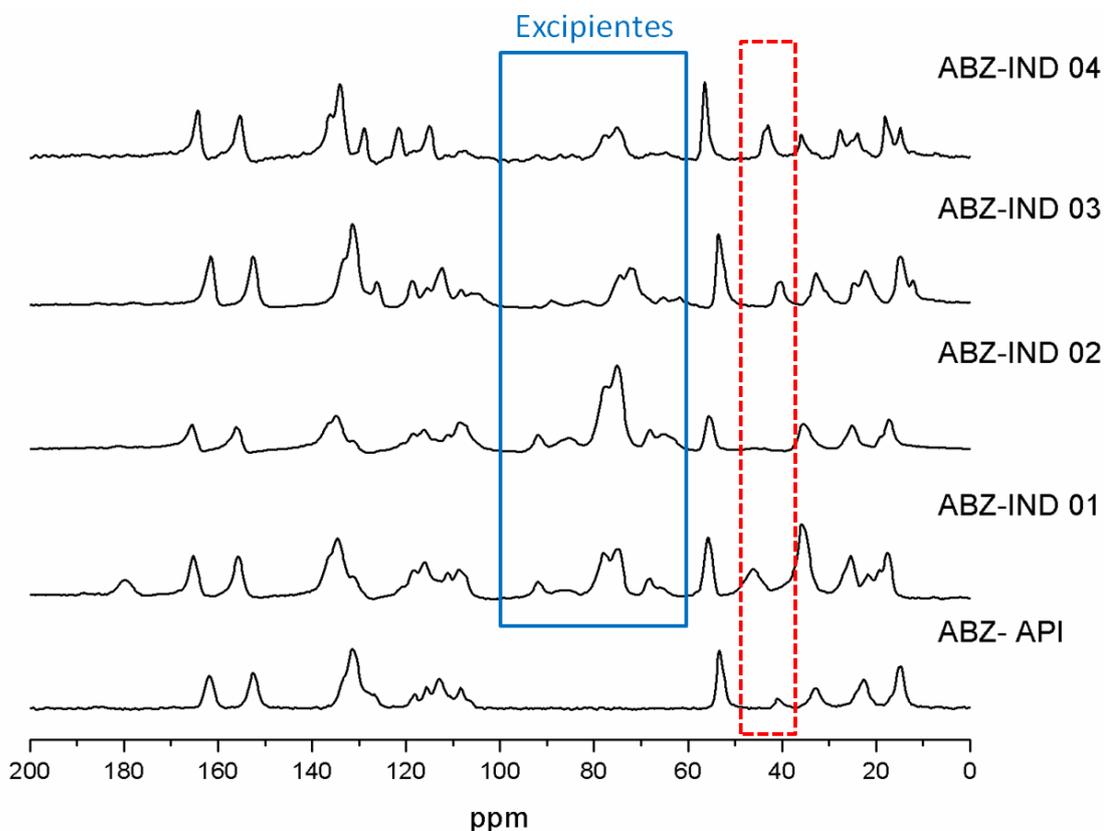


FIGURA 22- Espectros de ^{13}C -CPTOSS do ABZ e suas formulações comerciais

A principal diferença entre as amostras comerciais verificadas nos espectros é devido a presença do sinal referente ao grupo metileno entre 40- 42 ppm para as amostras (ABZ- ind 01, ABZ-ind 03 e ABZ-ind 04), sendo que este sinal está ausente na forma ABZ-ind.2, um indicativo de polimorfismo neste fármaco.

PRANZO et al. (2010), obtiveram uma nova forma polimórfica mais estável (Forma II) enantiotropicamente relacionado com a Forma I do ABZ (comercialmente disponível), por meio da recristalização do ABZ a partir de metanol e N, N-dimetilformamida.

O espectro de RMN no estado sólido do ABZ-API (FIGURA 22) é referente à forma comercial do ABZ (Forma I), que está de acordo com um recente estudo feito por CHATTAH et al. (2015) utilizando a RMN no estado sólido (FIGURA 23). Os espectros de carbono-13 obtidos por este autor para a forma II do ABZ são semelhantes ao espectro obtido na FIGURA 4.15 para o ABZ-IND 02, onde o sinal em aproximadamente 41 ppm está ausente. Esta forma, por ser a mais estável, apresenta uma solubilidade ainda menor do que a forma comercial do ABZ. (PRANZO et al., 2010).

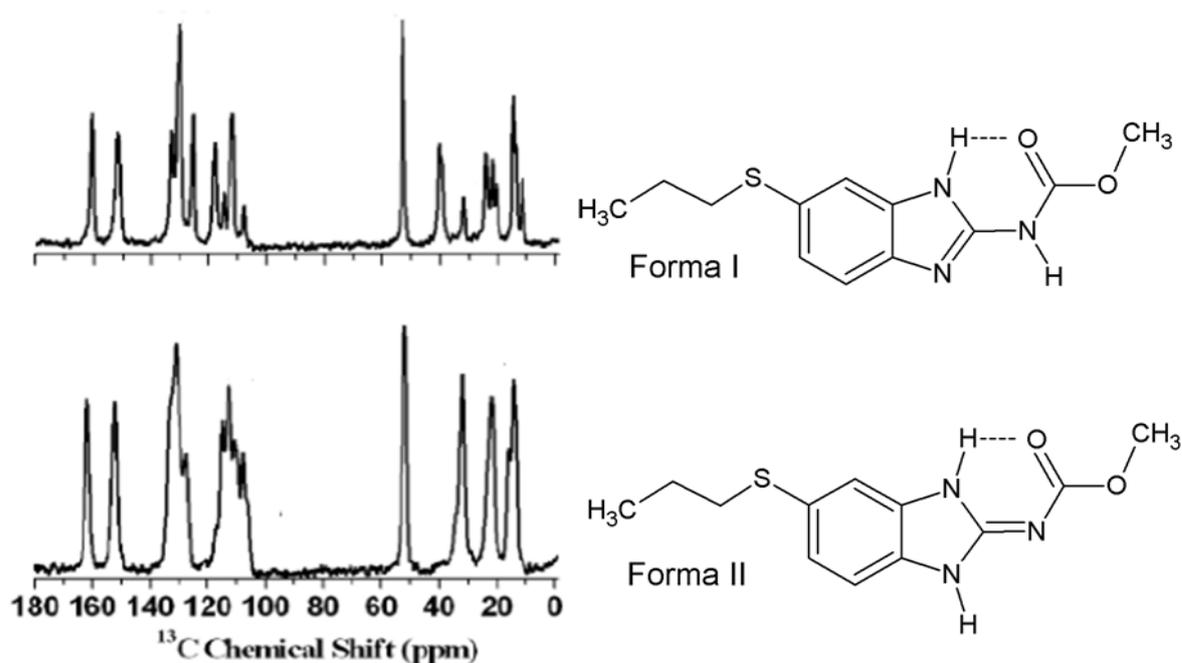


FIGURA 23 – Espectros de ¹³C-CP-MAS das formas polimórficas I e II do ABZ (Adaptado de CHATTAH, et al, 2015).

Um dos maiores problemas da indústria farmacêutica com o uso de polimorfos metaestáveis para aumentar a dissolução do fármaco é justamente a possibilidade da conversão da forma mais solúvel (maior energia) para a forma cristalina de menor solubilidade (maior estabilidade). É provável que durante o processo de produção e/ou armazenamento da forma comercial (metaestável) do ABZ-ind 02 tenha ocorrido uma conversão para a sua forma menos solúvel.

5.2.3 - Caracterização dos complexos ABZ-Ácidos carboxílicos

A elaboração de novas formas cristalinas com base na formação de possíveis complexos de ABZ com ácidos carboxílicos propostos neste trabalho se baseia nos procedimentos de cristalização em que o API (no caso o ABZ), poderá ser agregado a moléculas diferentes (ácidos carboxílicos) numa mesma rede cristalina. Neste sentido aplicamos a RMN no estado sólido com o intuito de verificar a formação de possíveis síntons, uma vez que o ABZ possui grupos receptores de prótons e os ácidos carboxílicos são doadores de prótons.

Os ácidos carboxílicos representam um dos grupos funcionais mais utilizados na engenharia de cristal, e principalmente na indústria farmacêutica, já que grande parte deles é aceitável do ponto de vista farmacêutico. Estudos apontam que o uso destes ácidos é um excelente ponto de partida para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, tais como os cocristais (VISHWESHWAR, 2006). Neste trabalho os ácidos carboxílicos foram escolhidos como agentes coformadores em função de ser farmacologicamente aceitáveis, possuir custo relativamente baixo e apresentarem pontos de coordenação que favorecem a formação de síntons supramoleculares com o ABZ. A FIGURA 24 mostra as estruturas dos ácidos carboxílicos e os valores de suas constantes de acidez (pka).

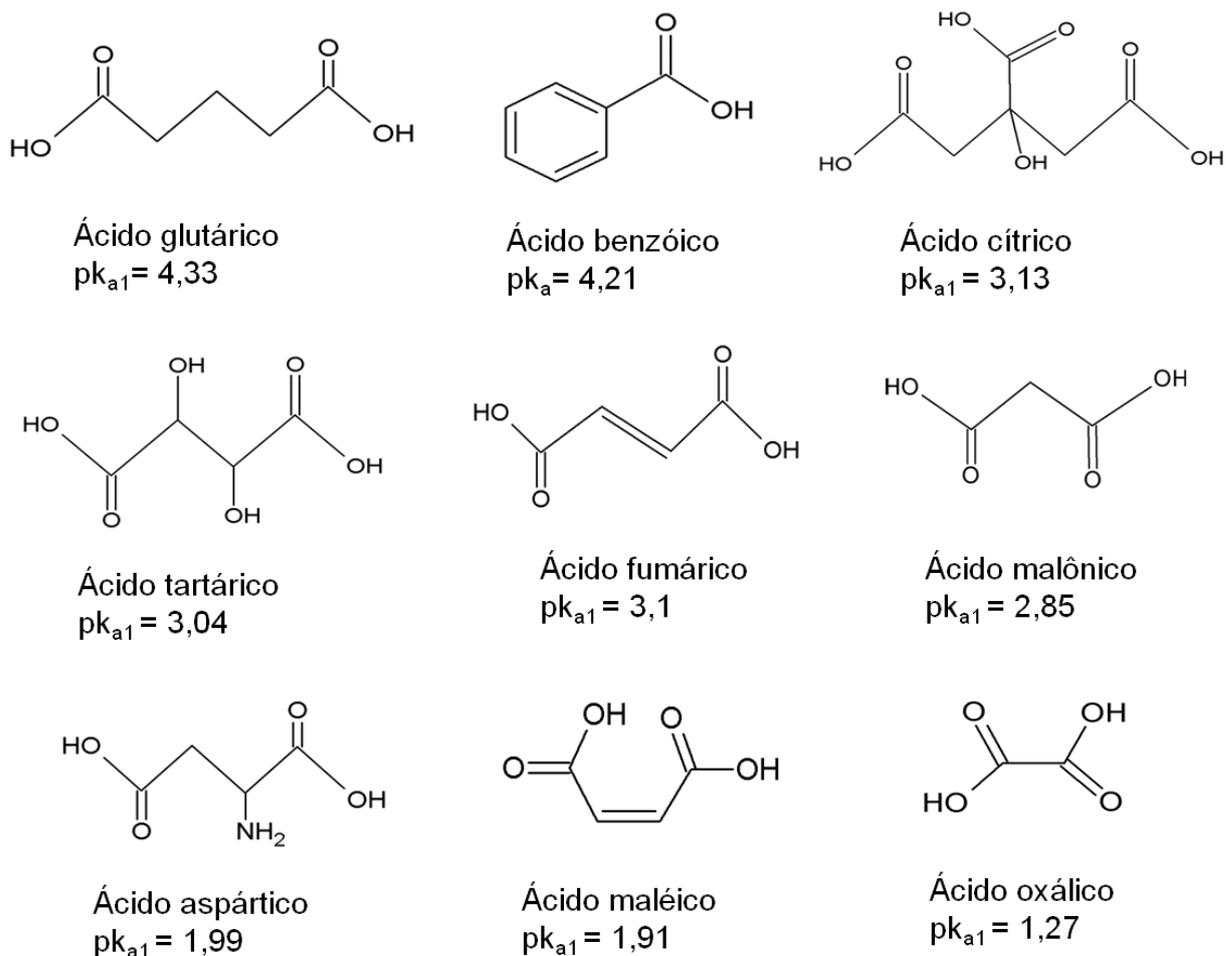


FIGURA 24 – Fórmula estrutural dos ácidos carboxílicos e suas constantes de acidez (pK_a).

Como mencionado, o albendazol possui grupos aceptores e doadores de hidrogênio aptos a estabelecer interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio e anéis aromáticos capazes de realizar interações do tipo π - π . Já os ácidos carboxílicos além de características estruturais que permitem a formação de síntons, possuem diferentes valores de pK_a que influenciam no seu caráter ácido, aumentando e/ou diminuindo a capacidade doadora de prótons. Para favorecer a formação de síntons, foram utilizadas neste trabalho as razões molares de (1:1) e (1:2) de (albendazol: ácido carboxílico).

Com o intuito de otimizar as condições favoráveis para a obtenção de novas formas cristalinas, um conjunto de fatores foram avaliados previamente. Foram testadas as misturas do ABZ: ácidos carboxílicos em vários solventes (acetonitrila, etanol (PA), metanol, etc), onde foi verificado que o etanol apresentou melhor solubilidade para ambos os componentes. Testamos também diferentes

temperaturas e tempo de agitação, além de avaliar qual o processo de evaporação lenta era o mais adequado. A cristalização utilizando evaporação lenta à baixa temperatura (~10°C) foi o que melhor se adequou para a maioria dos sistemas desenvolvidos.

As melhores condições de cristalização para os sistemas ABZ- ácidos carboxílicos foram: solvente (etanol), temperatura (50°C), tempo de agitação (40-50 min) e evaporação lenta (~10°C). Estabelecidos estes parâmetros em testes preliminares os sistemas de cristalização foram desenvolvidos.

Posteriormente, foram obtidos espectros de ¹³C-CPTOSS dessas amostras onde se observou que quando obtemos somente uma mistura física entre o ABZ e o ácido carboxílico, temos praticamente uma soma de espectros de RMN no estado sólido referentes aos espectros dos materiais de partida. Nos espectros dos sistemas ABZ- ácidos carboxílicos preparados com os ácidos: benzoico, aspártico, fumárico e glutárico (FIGURAS 25, 26, 27 e 28 respectivamente) não foram verificadas mudanças significativas, provavelmente devido ao fato destes ácidos serem mais fracos (alto valor de pK_a e/ou as suas características estruturais não favorecerem a formação de síntons uma vez que são estruturas com cadeias de maior mobilidade. As únicas e pequenas modificações observadas nestes espectros são referentes a uma possível transição do ABZ da sua forma I para a II que é evidenciada pelo desaparecimento do sinal em aproximadamente 40 ppm e uma possível diminuição da cristalinidade, uma vez que alguns sinais aparecem alargados. No espectro da FIGURA 25 verifica-se que o sinal referente ao ácido benzóico praticamente desaparece. Apesar de não ter sido utilizado processos de filtração no desenvolvimento dos sistemas de cristalização, possivelmente parte do ácido benzóico ficou aderido as paredes do frasco durante a evaporação lenta e conseqüentemente ocorreu perda de massa no manuseio desta amostra, o que influenciou na intensidade do sinal.

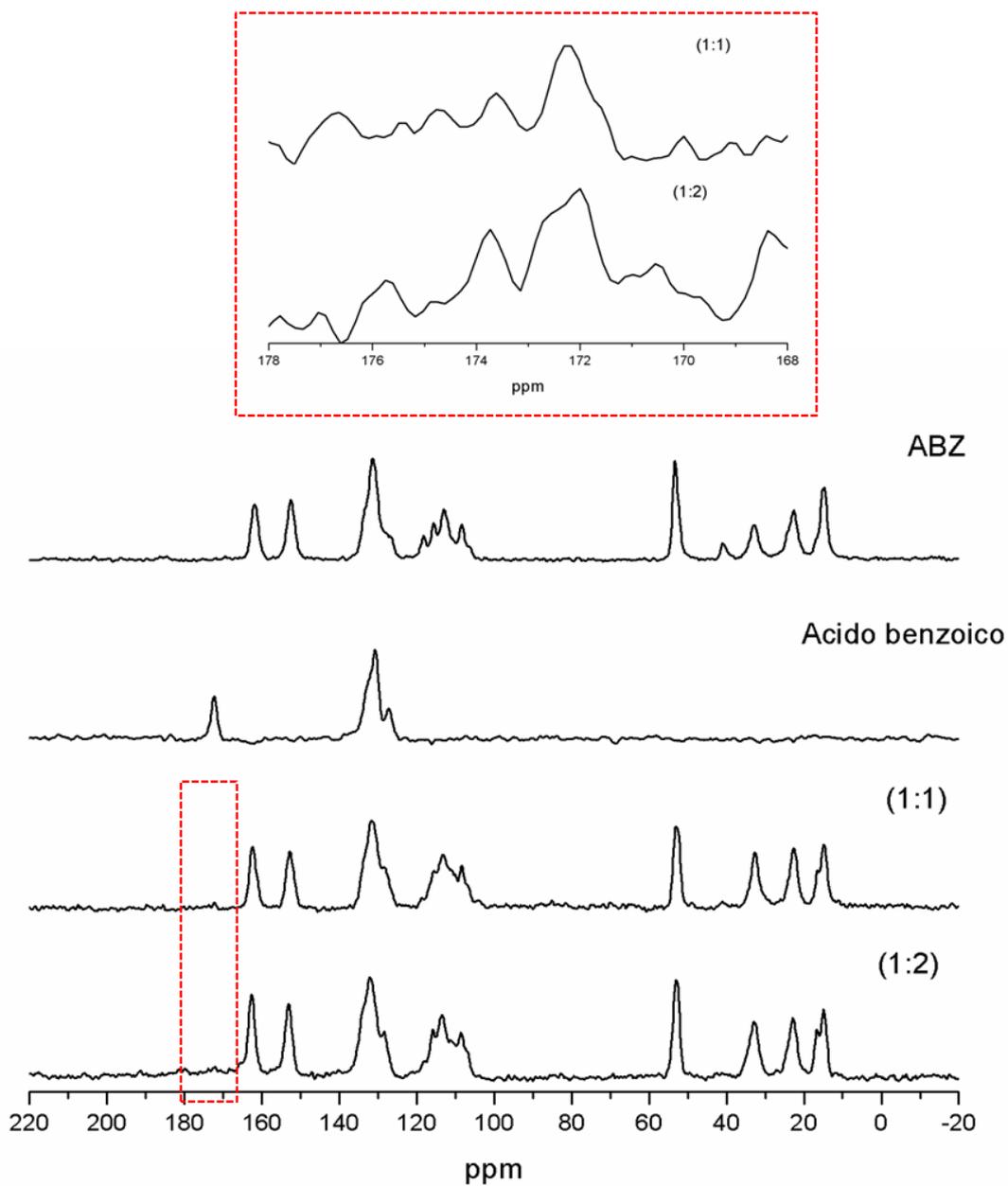


FIGURA 25 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido benzóico.

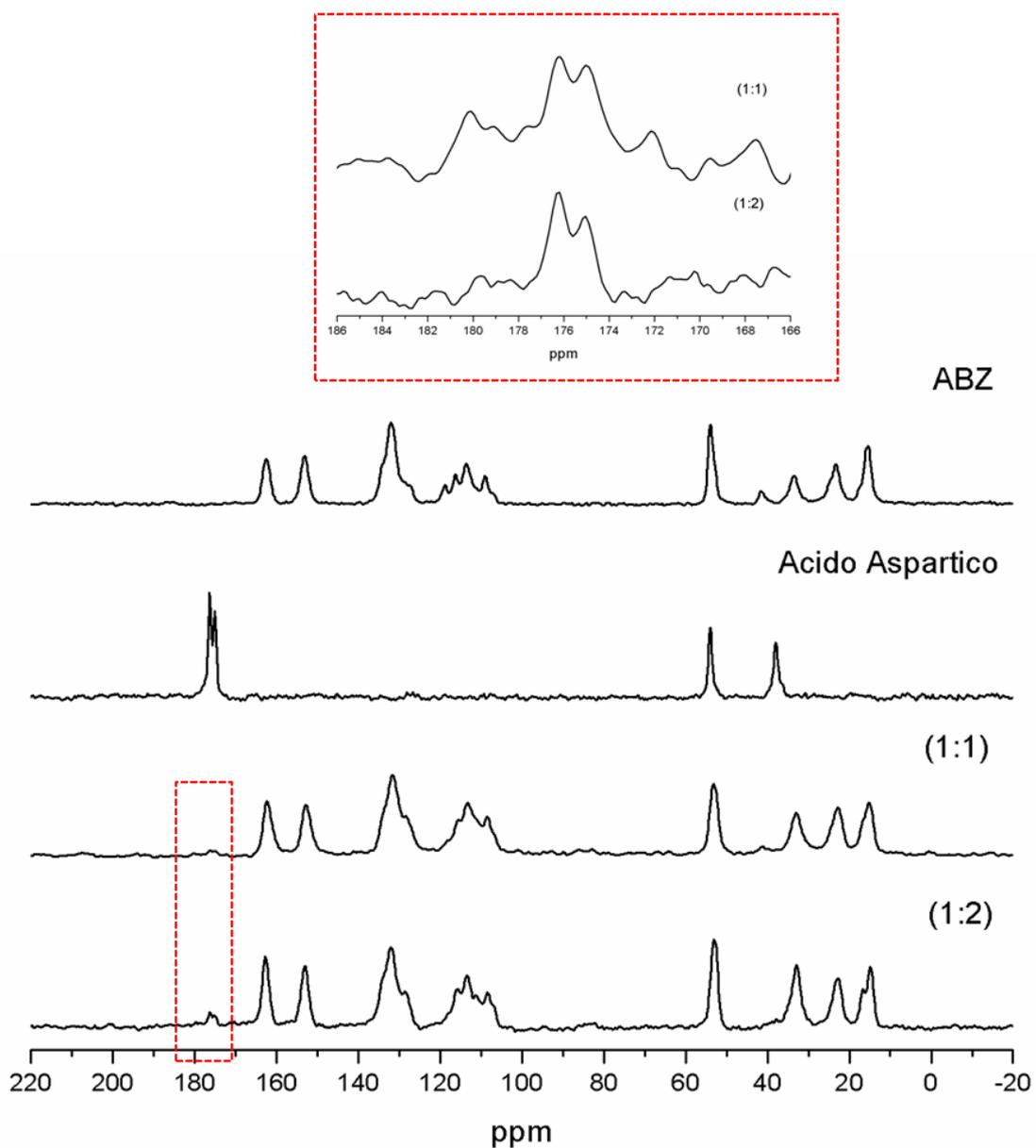


FIGURA 26 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido aspártico.

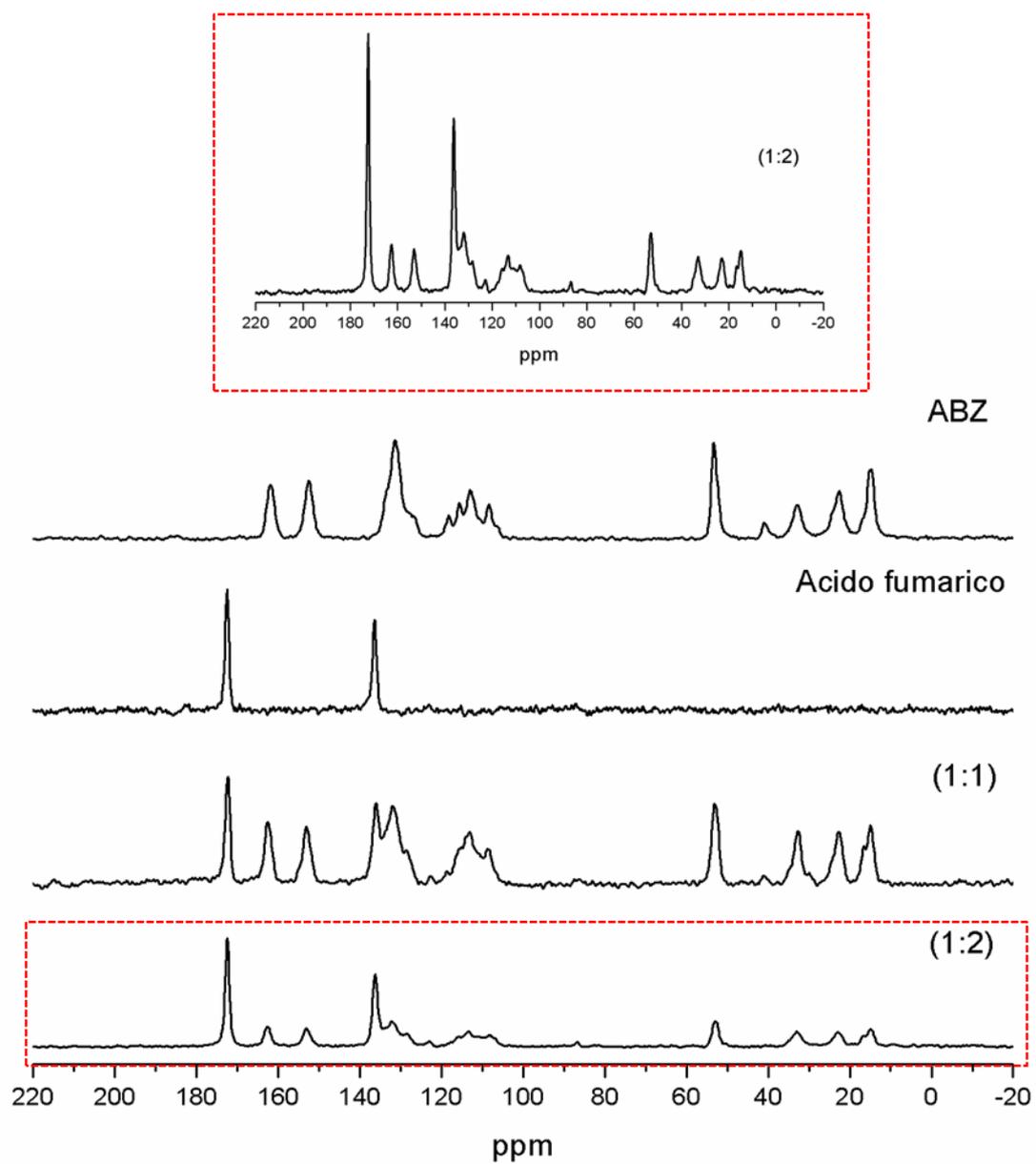


FIGURA 27 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido fumárico.

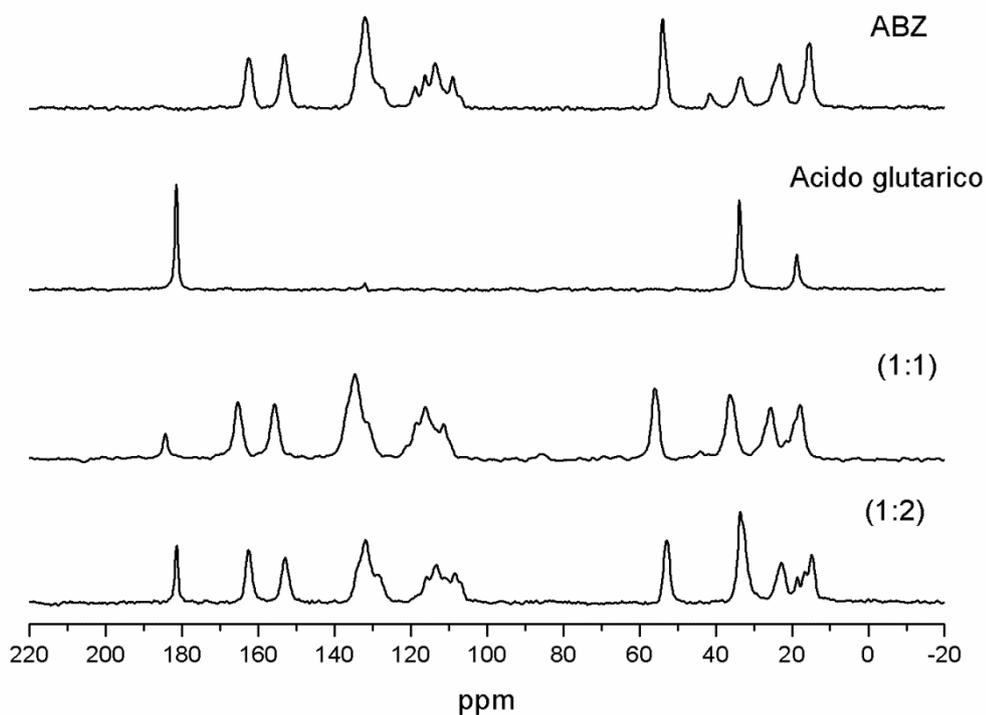


FIGURA 28 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do sistema ABZ- Ácido glutárico.

Alterações significativas no espectro dos complexos obtidos por cristalização sugerem a formação de novas formas cristalinas devido a interações intermoleculares entre o ABZ e o ácido carboxílico utilizado, tal como foi observado no espectro dos sistemas preparados com ácidos tartárico, malônico, cítrico, maléico e oxálico, e também de acordo com a proporção molar entre ABZ: ácido carboxílico utilizado. Os espectros destes sistemas são mostrados nas FIGURAS 29, 30, 31, 32 e 33, respectivamente. Neste caso, as diferenças mais evidentes foram nos sinais de carbonos aromáticos e aqueles atribuídos aos grupos carboxila dos ácidos carboxílicos utilizados.

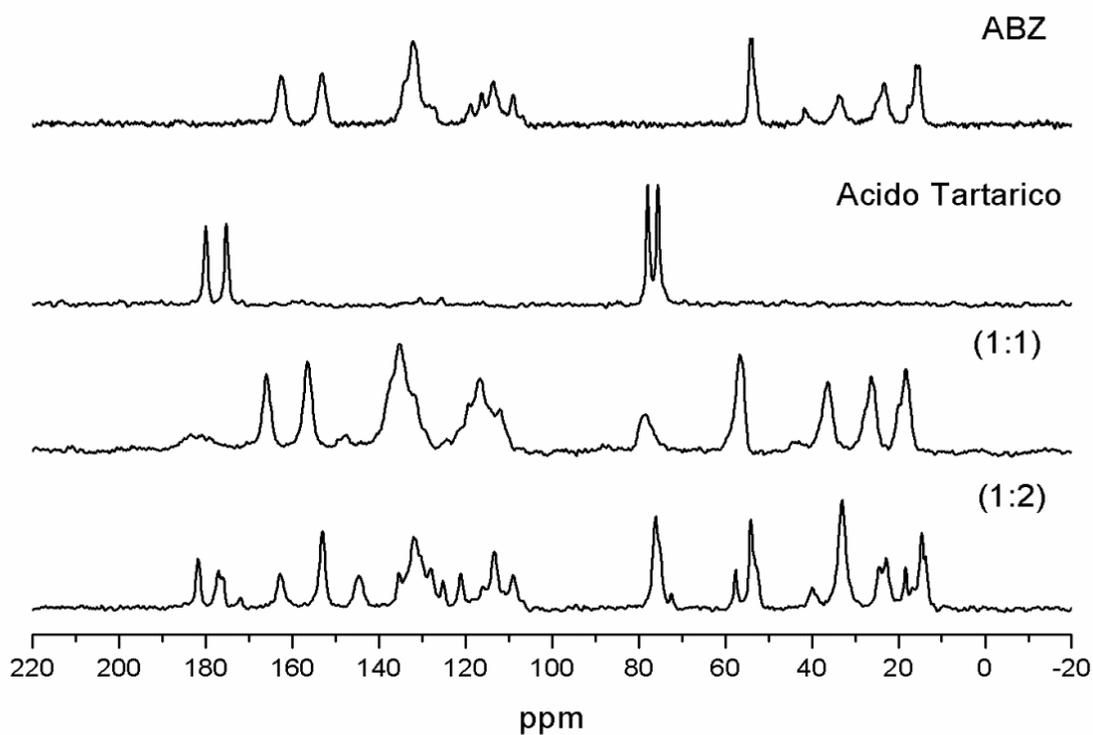


FIGURA 29 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ- Ácido tartárico.

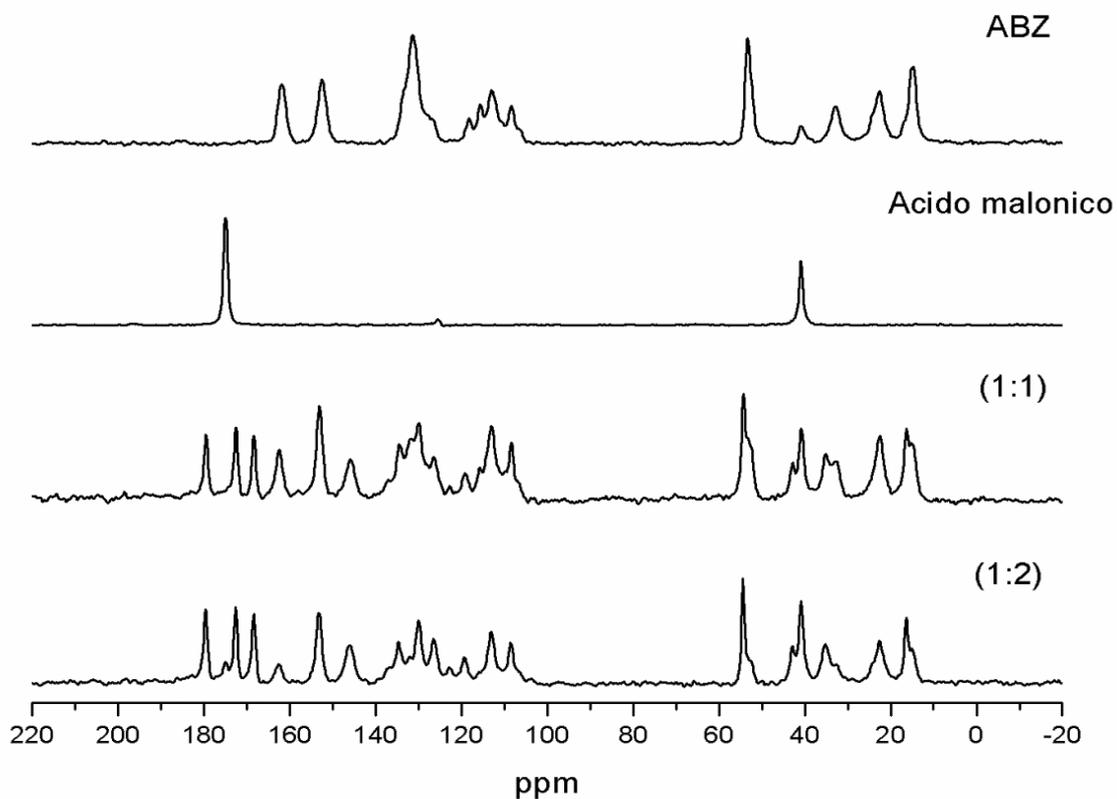


FIGURA 30 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-Ácido malônico

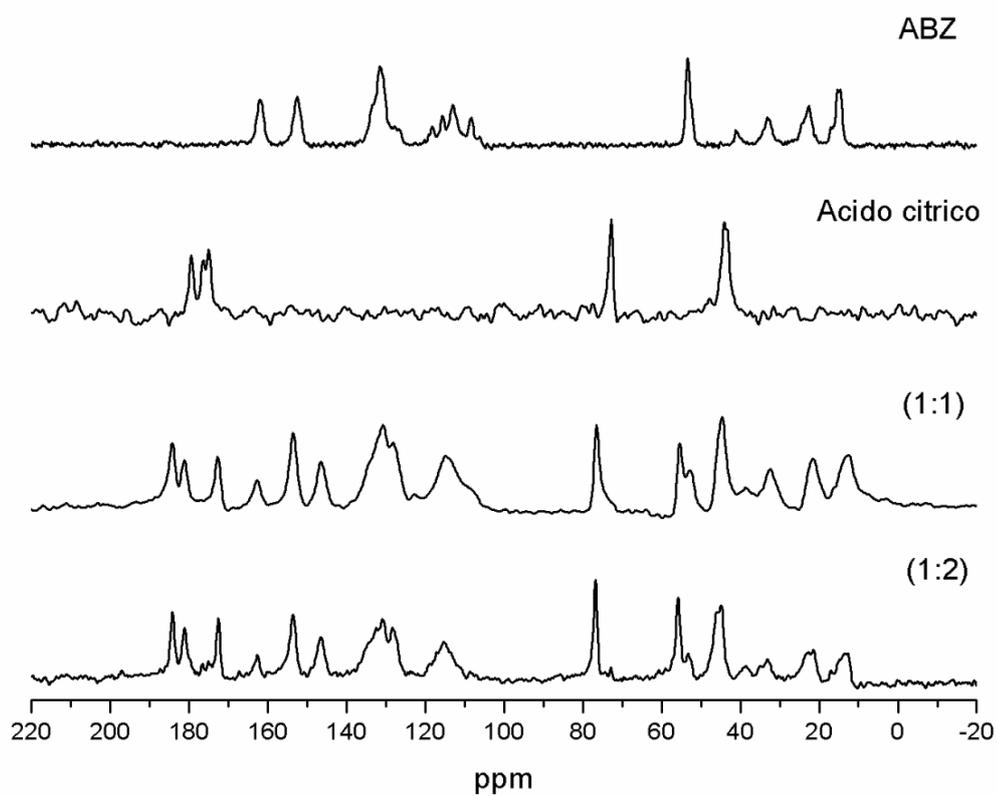


FIGURA 31 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-Ácido cítrico.

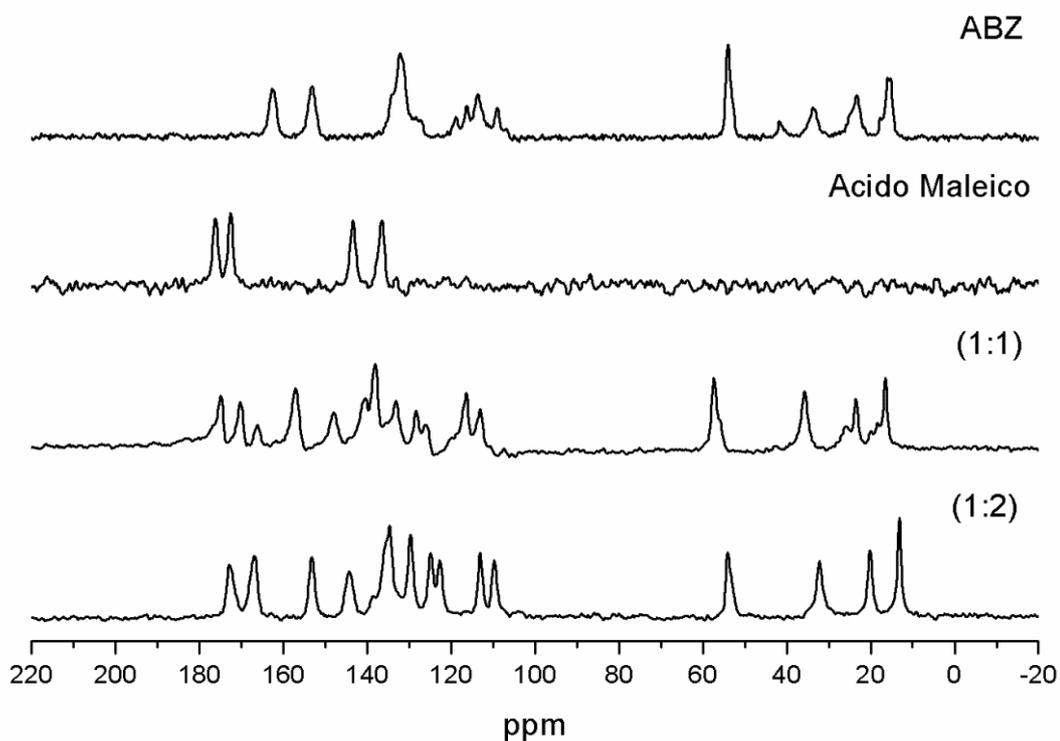


FIGURA 32 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ- Ácido maléico.

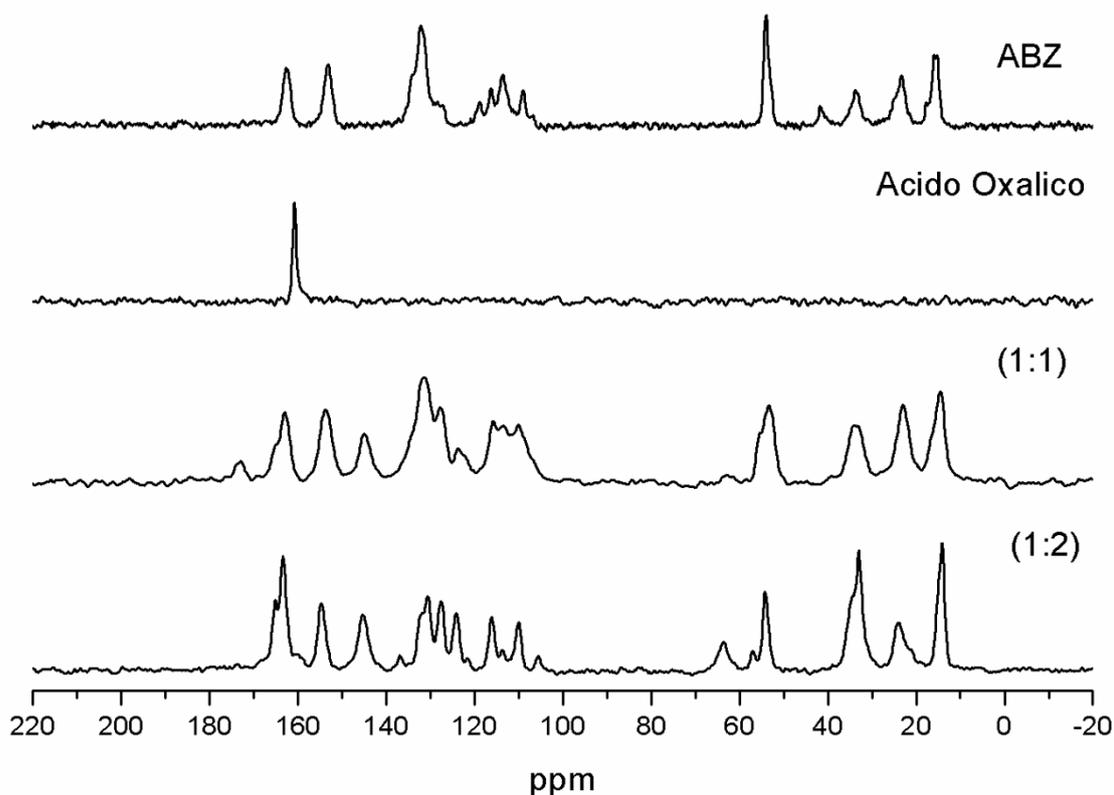


FIGURA 33 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-Ácido oxálico.

Fazendo uma avaliação dos espectros desses complexos observamos que os espectros dos complexos de ABZ com os ácidos (tartárico, malônico e cítrico) possuem desdobramentos nos sinais do ABZ indicando a existência de mais de uma molécula de ABZ na unidade assimétrica e/ou que o ABZ está sofrendo uma transição polimórfica, o que torna estes sistemas de difícil análise com relação ao tipo de estrutura majoritária que está sendo formada.

Portanto, a princípio os complexos ABZ- ácido maléico e ABZ-ácido oxálico, formados pelos ácidos mais fortes (menor valor de pK_a) e com maior rigidez estrutural, dentre os ácidos carboxílicos utilizados, se mostraram os sistemas mais interessantes para a análise por RMN no estado sólido. Nestes dois casos, onde possivelmente se formaram síntons as amostras foram avaliadas pela técnica de RMN-2D- ^1H - ^{13}C -HETCOR no estado sólido.

Antes de selecionar os sistemas para estudo por RMN bidimensional, avaliamos a possibilidade de estar ocorrendo alguma mudança na estrutura cristalina do ABZ a partir da sua recristalização apenas na presença do solvente.

Para tanto submetemos o ABZ sob as mesmas condições de temperatura e agitação em etanol e posteriormente coletamos os espectros de RMN (FIGURA 34). Neste espectro não foi observada nenhuma alteração no perfil espectral do albendazol, confirmando que ele preserva sua estrutura cristalina quando recristalizado apenas na presença de etanol. Este resultado também comprova que as alterações verificadas nos espectros dos complexos do albendazol com os ácidos carboxílicos são consequência de possíveis interações intermoleculares entre o albendazol e as moléculas dos ácidos carboxílicos presentes no meio.

Outro fator determinante, e que antecede a seleção dos sistemas é a reprodutibilidade da cristalização. Neste sentido foram feitos os testes de reprodutibilidade em quadruplicata e os resultados obtidos estão resumidos na TABELA 11.

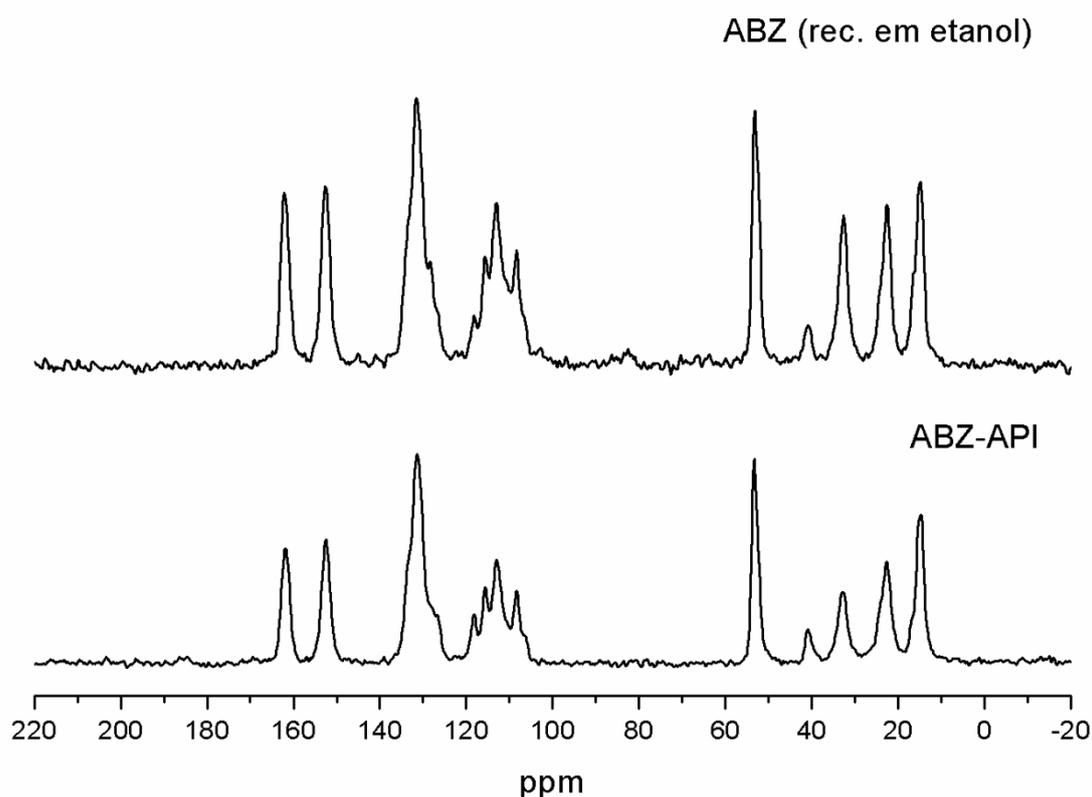


FIGURA 34 – Comparação entre os espectros de ^{13}C -CPTOSS do insumo farmacêutico ativo (API) do ABZ versus o ABZ recristalizado em etanol.

TABELA 11 - Testes de reprodutibilidade dos sistemas ABZ- ácidos carboxílicos.

SISTEMA	PROPORÇÃO	REPRODUTIBILIDADE
ABZ- Ácido tartárico	(1:1)	X
	(1:2)	X*
ABZ- Ácido maléico	(1:1)	V*
	(1:2)	V
ABZ-Ácido malônico	(1:1)	V*
	(1:2)	V*
ABZ- Ácido oxálico	(1:1)	X
	(1:2)	V
ABZ- Ácido cítrico	(1:1)	X*
	(1:2)	X*

X= formação de mistura física.

V= sistema reprodutível.

* = espectro apresentou desdobramentos nos sinais do ABZ (indicativo de mais de uma molécula por unidade assimétrica e/ou transição polimórfica).

Feito esse monitoramento da reprodutibilidade da formação dos complexos ABZ- Ácidos carboxílicos através dos experimentos de ^{13}C -CPTOSS selecionamos os sistemas ABZ- ácido maléico (1:2) e ABZ- ácido oxálico (1:2) para estudo por RMN-2D e análise do espectro de RMN- ^{15}N , com o intuito de propor a formação de possíveis sítios supramoleculares. Estes complexos apresentaram alterações significativas no espectro de RMN no estado sólido, são sistemas reprodutíveis e é provável que esteja ocorrendo alguma interação intermolecular entre o ABZ e o ácido carboxílico.

A FIGURA 35a mostra o mapa de correlação $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR do complexo ABZ- ácido maléico (1:2), que indica que o ABZ interage com o ácido maléico por meio de uma ligação de hidrogênio entre a carboxila (C2') do ácido e um dos nitrogênios (N10) do ABZ, uma vez que o deslocamento químico do H é compatível com ligação de H do tipo NH---O (~14,6 ppm) (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012). A evidência dessa interação intermolecular são os dois sinais de correlação

por difusão de spins observados na expansão do mapa de correlação heteronuclear (FIGURA 35b), entre o C2' do ácido maléico e C11 do ABZ com um mesmo hidrogênio em 14,6 ppm.

Além dessa interação intermolecular, verifica-se a presença de outra interação que é evidenciada pelos sinais de correlação (FIGURA 4.28b) existentes entre duas carboxilas do ácido maléico (C2' e C6') com um hidrogênio em aproximadamente 15 ppm, que é compatível com uma ligação intermolecular do tipo OH---O (CHIEROTTI & GOBETTO, 2012).

Os sinais de correlação entre os carbonos C11, C2 e C4 com um hidrogênio em 9,3 ppm (FIGURA 35a e FIGURA 35c) evidenciam uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio (N3H) com o oxigênio da carbonila (C11O) na molécula de ABZ, formando uma ligação do tipo NH---O.

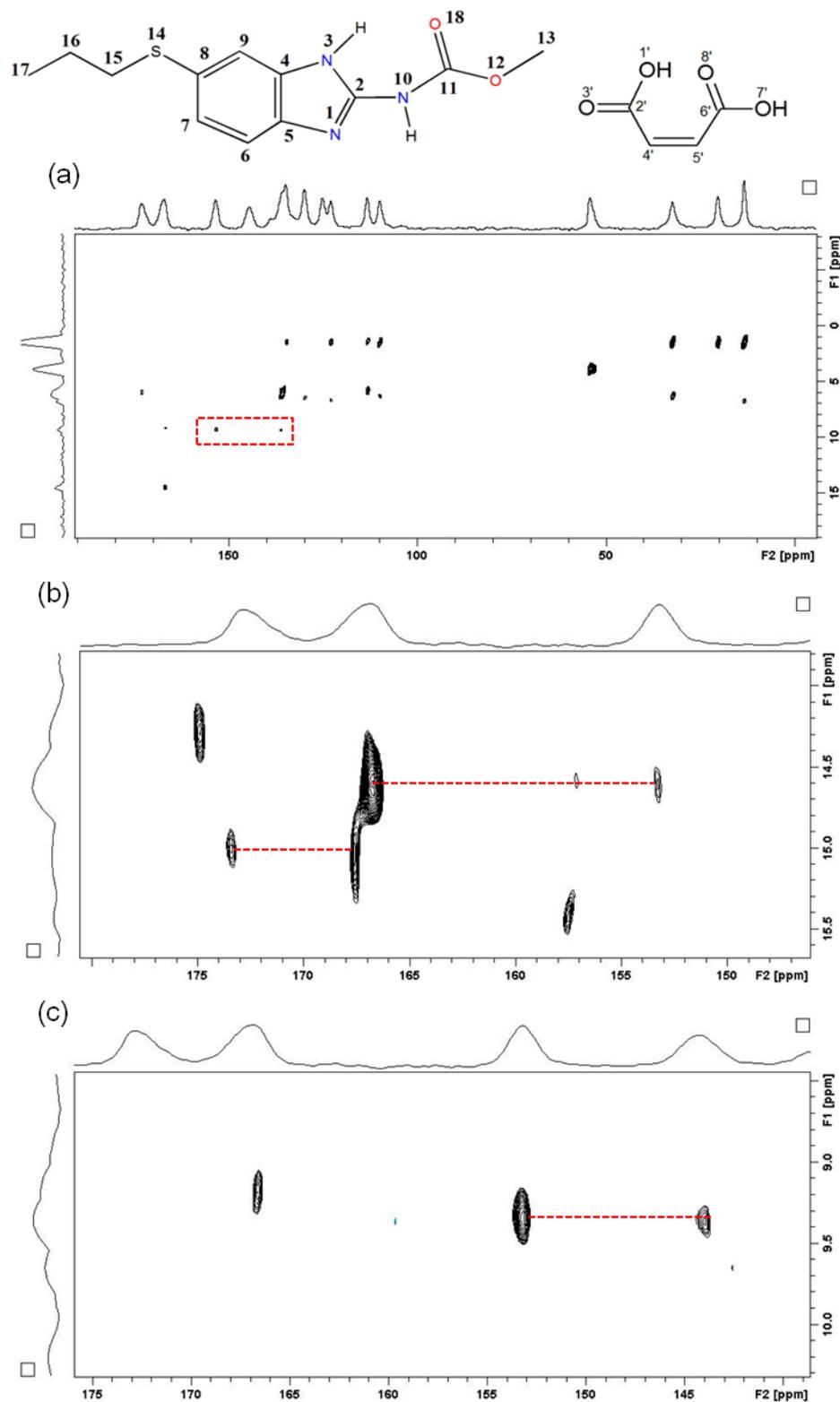


FIGURA 35 - (a) Mapa de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR do complexo ABZ-ácido maléico (1:2); (b) e (c) expansão do mapa mostrando os sinais de correlação com os hidrogênios. A dimensão F1 é relativa à projeção do espectro de ^1H e a dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

No espectro de ^{15}N -CP-MAS do complexo ABZ- ácido maléico (1:2) mostrado na FIGURA 36 é verificado variações significativas nos deslocamentos químicos, indicativo de que estes nitrogênios se encontram em ambientes magnéticos diferentes do que se encontravam inicialmente. Os deslocamentos químicos de ^{15}N para molécula de ABZ que eram de 102,5 (N3 e N1) e 127,5 (N10) ppm, se desdobraram para 108,2; 81,6 e 54 ppm no complexo.

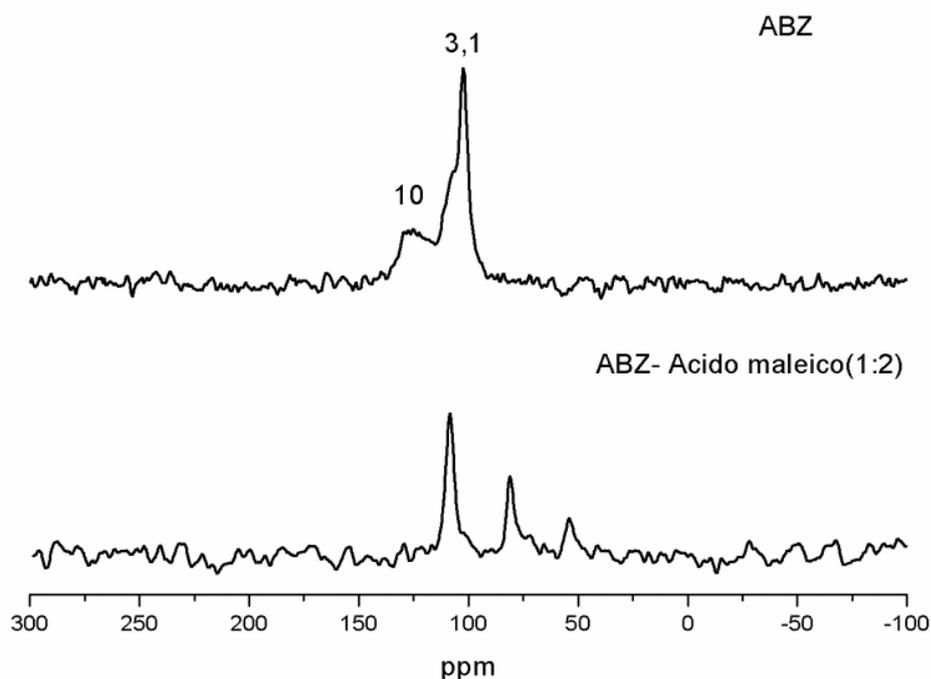


FIGURA 36 – Espectro de ^{15}N -CPMAS do complexo ABZ- ácido maléico (1:2).

Com os dados obtidos por meio dos experimentos de RMN no estado sólido uni e bidimensional foi possível propor o sinton formado entre o ABZ e o ácido maléico (FIGURA 37).

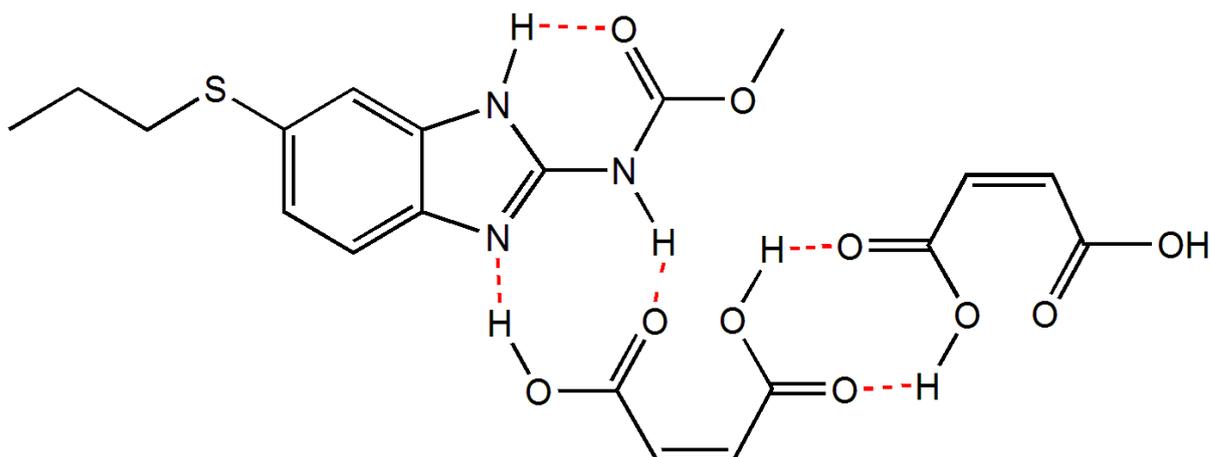


FIGURA 37 - Proposta do sínton formado entre o ABZ e o ácido maléico (1:2).

Para o complexo ABZ- ácido oxálico (1:2) foi obtido o mapa de correlação $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR (FIGURA 38a) que mostra que o ABZ interage com o ácido oxálico por meio de duas ligações de hidrogênio intermoleculares. A primeira entre a carboxila (C2') do ácido oxálico com o nitrogênio (N10) do ABZ. Esta ligação é evidenciada pelos três sinais de correlação existentes entre os carbonos C2', C11 e C2 com um hidrogênio em aproximadamente 13,8 ppm que é compatível com uma ligação de H do tipo NH---O (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012).

A segunda ligação intermolecular ocorre por meio da ligação entre a hidroxila do ácido oxálico (C2') e o nitrogênio (N3) do ABZ, que é demonstrada pelos três sinais de correlação existentes entre os carbonos C2', C2 e C4, que está de acordo com uma ligação de hidrogênio do tipo N---OH (~15,4 ppm) (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012).

Além dessas interações intermoleculares entre o ABZ e o ácido oxálico, verifica-se a presença de outra interação entre duas moléculas de ácido oxálico, que é evidenciada pelos dois sinais de correlação (FIGURA 38b) existentes entre duas carboxilas do ácido oxálico (C2' e C6') com um hidrogênio em aproximadamente 15,6 ppm, que é compatível com uma ligação do tipo OH---O (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012).

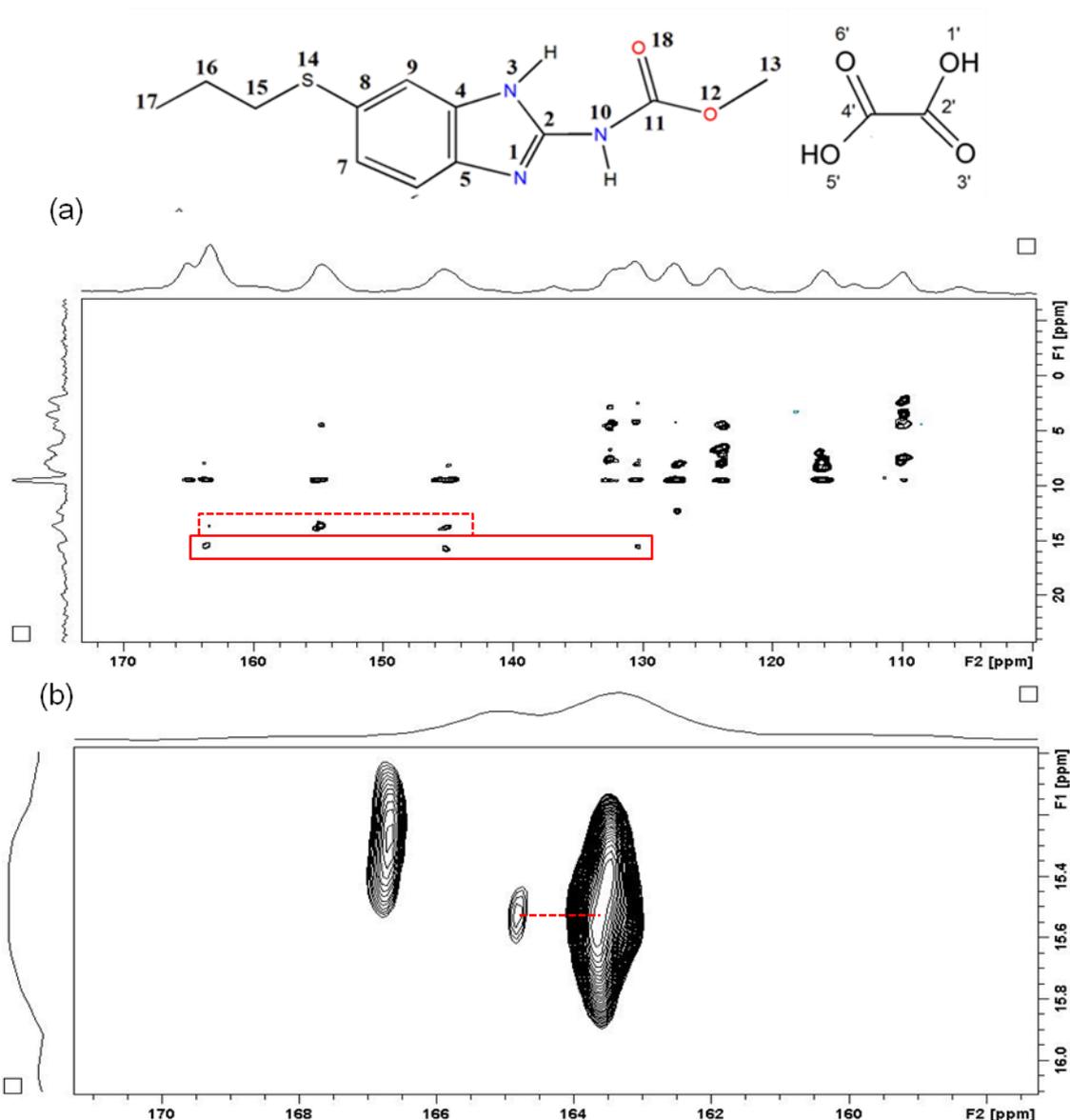


FIGURA 38 - (a) Mapa de correlação $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2) e (b) expansão do mapa mostrando os sinais de correlação com os hidrogênios. A dimensão F1 é relativa à projeção do espectro de ^1H e a dimensão F2 é relativa ao espectro ^{13}C -CP-TOSS.

O espectro de ^{15}N -CP-MAS (FIGURA 39) do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2) também apresentou diferenças significativas nos deslocamentos químicos. Os núcleos de nitrogênio sofreram uma mudança nos seus deslocamentos químicos que inicialmente eram de 102,5 (N3 e N1) e 127,5 (N10) ppm, e após a formação do complexo se desdobraram para 108,2; 84 e 58,9/ 54,4 ppm.

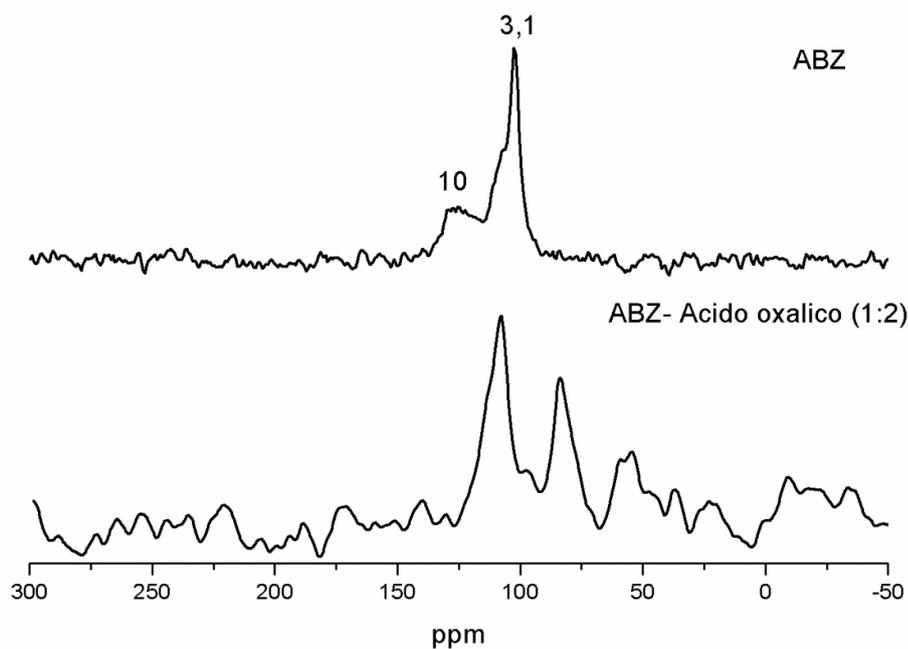


FIGURA 39 – Espectro de ^{15}N -CPMAS do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2).

Por meio dos resultados obtidos por RMN no estado sólido uni e bidimensional foi possível propor o sinton formado entre o ABZ e o ácido maléico (FIGURA 40).

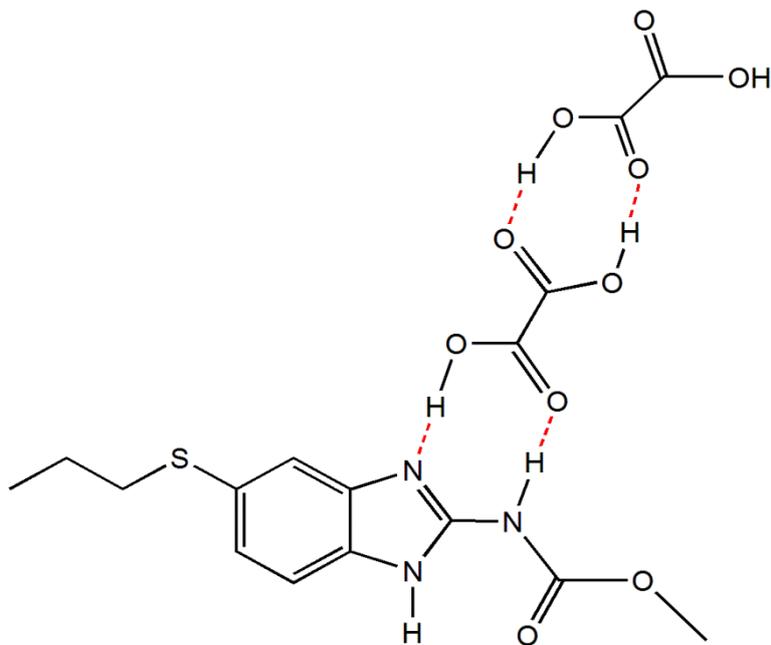


FIGURA 40 - Proposta do sinton formado entre o ABZ e o ácido oxálico (1:2).

Devido os vários pontos de coordenação presentes no ABZ (dependendo de sua forma tautomérica), que podem estar envolvidos em ligações de hidrogênio, não só o pK_a do ácido carboxílico utilizado é importante no desenvolvimento de novas formas cristalinas, mas também as suas características estruturais. Foi verificado que os ácidos dicarboxílicos (maléico e oxálico) que apresentam os menores valores de pK_a dentre os ácidos utilizados e também os que possuem maior rigidez estrutural formaram complexos com ABZ, o que possivelmente facilitou com que os grupos carboxila estivessem orientados numa posição que favorecem a interação com os grupos de ABZ levando à formação dos sítios propostos neste trabalho.

Técnicas de análises térmicas distinguem modificações cristalinas com base nas transições de fases que sofrem durante a variação de temperatura. As amostras dos complexos ABZ- ácido maléico (1:2) e ABZ- ácido oxálico (1:2), foram submetidas à análise térmica diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), com o intuito de se avaliar a estabilidade destes sistemas. Enquanto a DSC permite a quantificação da energia (absorvida ou liberada) pela amostra quando esta é aquecida, resfriada ou mantida a temperatura constante, a TGA permite mensurar a perda de massa em função da temperatura.

O resultado da TGA mostra que o complexo ABZ- ácido maléico (1:2) permanece estável até 135°C passando a sofrer perda de massa acima dessa temperatura (FIGURA 41a). Já a DSC revela uma transição endotérmica entre 109 - 118° C (FIGURA 41b), onde é observado um pico largo, pode ser atribuído ao complexo ABZ- ácido maléico, possivelmente devido às interações intermoleculares presentes neste complexo. Isso indica que este complexo apresenta uma menor estabilidade quando comparada ao ABZ e ao ácido maléico que possuem pontos de fusão em 208,3° e entre 137-140°C, respectivamente. Essa menor estabilidade pode estar relacionada às fracas interações intermoleculares entre o ABZ e o ácido maléico.

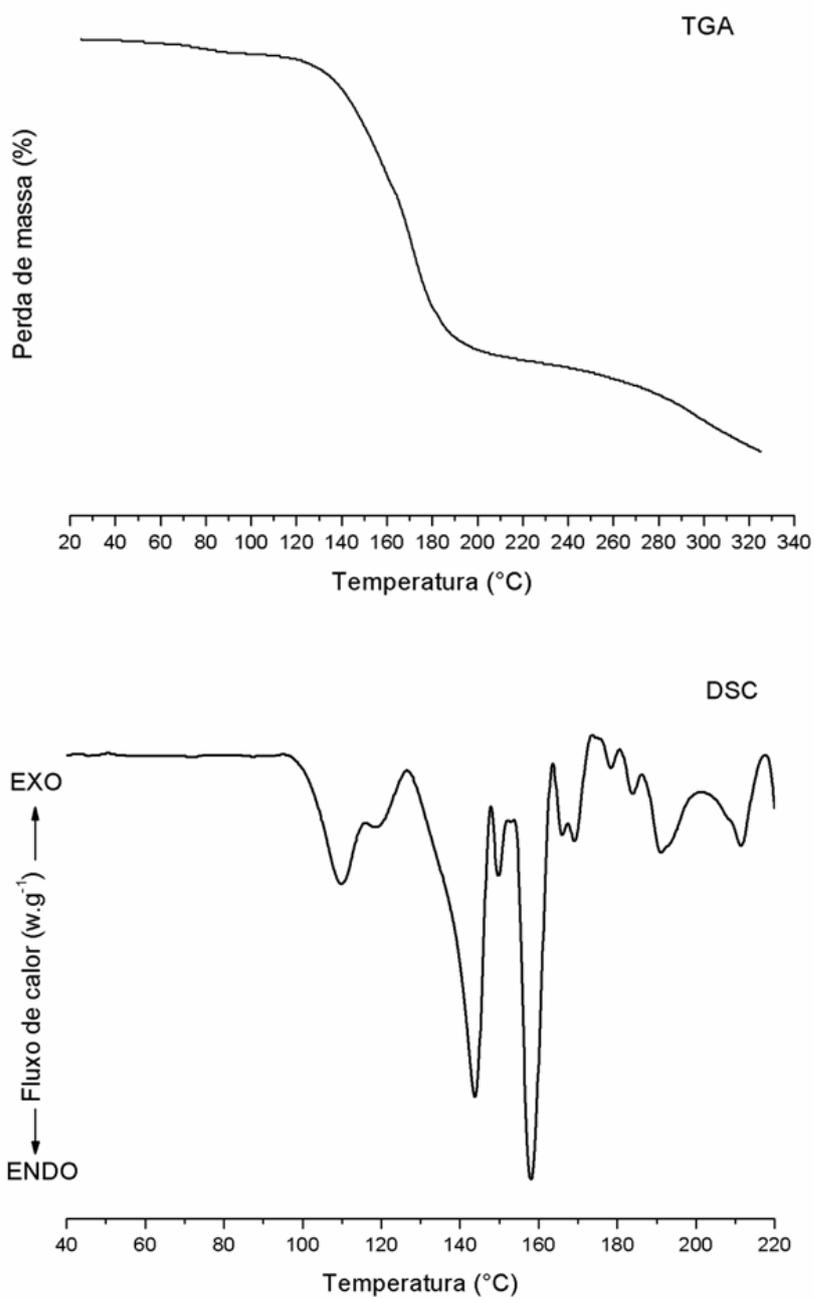


FIGURA 41: Análises térmicas do complexo ABZ- ácido maléico (1:2) - (a) Análise Termogravimétrica e (b) e Calorimetria Exploratória Diferencial.

Para o complexo ABZ- ácido oxálico (1:2), o resultado da TGA mostra que este complexo possivelmente sofre uma dessolvatação devido a uma pequena perda de massa a partir de 57°C. Posteriormente ocorre uma perda de massa acima da temperatura de 160°C, o que sugere que este complexo sofre decomposição a partir desta temperatura (FIGURA 42a).

Já a DSC mostra uma endoterma entre 63-72°C (FIGURA 42b), que pode ser atribuído ao etanol que foi utilizado como solvente no processo de cristalização e que provavelmente não foi totalmente removido durante a evaporação. A presença do etanol no retículo cristalino deste complexo foi confirmada por RMN de ¹H. A amostra foi solubilizada em MeOH-d₄ (600 µL) e analisada em espectrômetro de RMN 400MHz (para frequência de ¹H) equipado com sonda BBI 5mm com sequência de pulso NOESYGPPR1D (denominação Bruker). Foi possível verificar os sinais característicos do etanol em 1,17 (t, 7,08 Hz) e em 3,6 (q, 7,0; 14,0 Hz) já amplamente discutidos na literatura.

A endoterma presente entre 123-129°C possivelmente corresponde ao complexo ABZ- ácido oxálico, devido às interações intermoleculares existentes, indicativo de que este complexo possui estabilidade inferior quando comparada aos materiais de partida que possuem pontos de fusão de 208,3°C e 189,5° para o ABZ e ácido oxálico anidro, respectivamente. Neste trabalho foi utilizado o ácido oxálico anidro, porém este ácido pode se hidratar e então surgir picos entre 100-105°C (HIGGINS et al., 1997; OMAR & ULRICH, 2006), o que não foi verificado.

Foi observado um pico em 151°C, sendo que pode ser atribuído à fusão do ácido oxálico. Essa variação na temperatura de fusão do ácido oxálico deve-se a possíveis interações intermoleculares fracas em que este ácido possa estar envolvido e que conseqüentemente interferiu na sua estabilidade, diminuindo assim sua temperatura de fusão.

Os resultados obtidos por meio destas análises térmicas evidenciam que os complexos ABZ- ácido maléico e ABZ- ácido carboxílico são menos estáveis que seus respectivos materiais de partida, possivelmente devido ao pequeno grau de associação entre o ABZ e os ácidos carboxílicos, através de fracas interações intermoleculares.

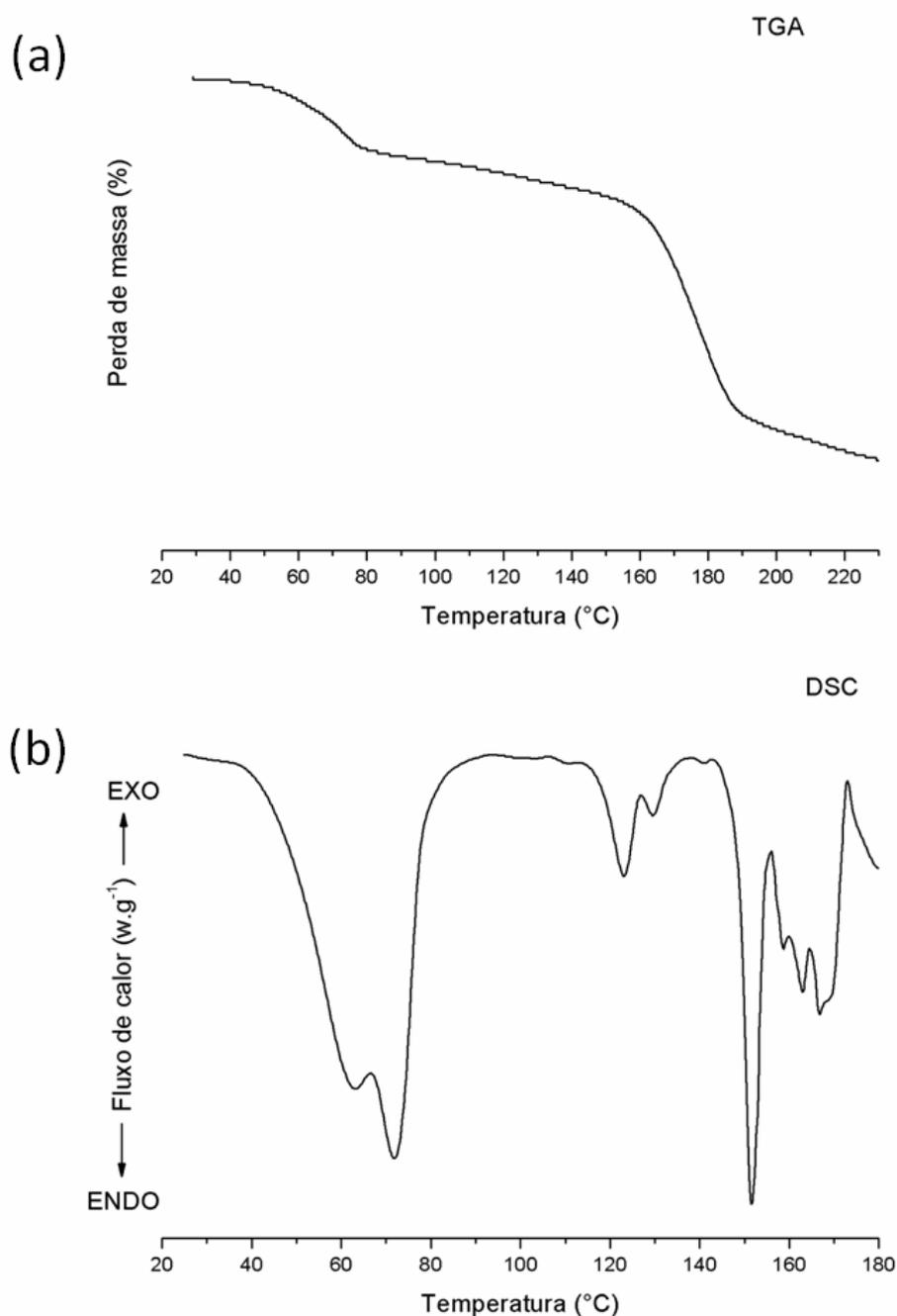


FIGURA 42: Análise térmica do complexo ABZ- ácido oxálico (1:2) - (a) Análise Termogravimétrica e (b) e Calorimetria Exploratória Diferencial.

Os APIs contidos nas formulações farmacêuticas devem apresentar solubilidade aquosa adequada de modo a garantir a eficácia terapêutica esperada. A solubilidade de um fármaco representa a concentração da solução em equilíbrio com

o soluto, e a determinação deste parâmetro é essencial na caracterização de novas formas farmacêuticas.

Para melhorar algumas características dos fármacos, tal como a baixa solubilidade, diversas metodologias tem sido desenvolvidas no ramo farmacêutico. Neste trabalho aplicamos métodos de cristalização para obter sistemas ABZ- ácidos carboxílicos, com o intuito de se obter novas formas polimórficas e melhorar características desejáveis tal como a solubilidade desse fármaco.

Para o estudo do perfil de solubilidade do fármaco ABZ foi feita a construção das curvas analíticas em cinco diferentes meios: ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹), etanol, metanol, acetonitrila e água. Os valores de solubilidade obtidos para o albendazol estão resumidos na TABELA 12.

TABELA 12 - Solubilidade máxima do albendazol em diferentes meios.

Solvente	Solubilidade (mg.mL⁻¹)	Desvio Padrão
Ácido clorídrico (0,1M)	0,4828	0,004
Etanol	0,3849	0,120
Metanol	0,5366	0,139
Acetonitrila	0,1427	0,122
Água	0,0032	0,014

Foi possível verificar que o melhor solvente para o ABZ foi o metanol e este fármaco apresentou solubilidade muito baixa em meio aquoso. Uma vez que o objetivo dos ensaios de solubilidade é a comparação entre os valores obtidos para API puro com os dos novos sistemas desenvolvidos, então o metanol e a água foram os solventes escolhidos para o estudo de solubilidade dos complexos ABZ- ácido maléico e ABZ- ácido oxálico com o intuito de se fazer um comparativo da solubilidade do complexo obtido com a o fármaco puro.

Verificou-se que houve um aumento de solubilidade para os complexos ABZ- ácido maléico e ABZ- ácido oxálico, conforme verificado na TABELA 13. É provável que a estabilidade da rede cristalina formada nestes complexos seja baixa, possivelmente devido a fracas interações intermoleculares, o que facilita a quebra do retículo cristalino proporcionando uma maior solubilidade.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos pelas análises térmicas, em que foi verificado uma menor estabilidade destes sistemas, o que contribui para um aumento de solubilidade, visto que este parâmetro é dependente das forças (intra e/ou intermolecular) que mantêm as moléculas unidas.

TABELA 13 - Solubilidade do ABZ e seus complexos em metanol e água.

Amostra	Solubilidade (mg.mL ⁻¹)	
	Metanol	Água
ABZ	0,5366 ± 0,06	0,0032 ± 0,39
ABZ- Ácido maléico	1,4547 ± 0,35	0,0601 ± 0,11
ABZ- Ácido oxálico	1,4168 ± 0,76	0,0799 ± 0,17

5.3.4 - Complexo binário ABZ-SCZ

É comum o interesse pela administração simultânea de dois medicamentos com funções distintas, mas que se complementam em um tratamento médico. Esse tipo de abordagem é realizada no tratamento da AIDS, nos chamados coquetéis (BRECHTL et al., 2001) e também no tratamento da bactéria *Helicobacter pylori*, que causa danos ao estômago (RUSSO et al., 2016) onde são coformulados os fármacos omeprazol e amoxicilina. A indústria farmacêutica tem interesse em co-formulações de APIs (composições que contenham dois APIs). Essas formulações visam promover um efeito sinérgico, com o intuito de potencializar a ação esperada em um único comprimido e ao mesmo tempo minimizar as doses destes (VISHWESHWAR, et al 2006). Estas co-formulações são vantajosas para os pacientes que poderão ingerir um único comprimido formado pela combinação de princípios ativos e os excipientes, e também para a indústria em termos de custos.

Pensando nisso fizemos uma tentativa de avaliar uma combinação de anti-helmínticos (ABZ-SCZ), uma vez que uma possível co-formulação destes fármacos pode ampliar o espectro da ação anti-helmíntica, já que estes fármacos atuam contra diferentes classes de parasitas. Outro propósito foi avaliar a

possibilidade de aproveitar a alta solubilidade do SCZ para possivelmente melhorar a solubilidade do ABZ.

Partindo dos APIs isolados (ABZ e SCZ), os quais possuem coloração branca em suas formas livres, estes foram dissolvidas utilizando a proporção estequiométrica de (1:1), em 15 mL de acetonitrila e sonicadas por 30 min. A cristalização foi realizada por evaporação simples a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 dias. Após o processo de cristalização foi observada a obtenção de um material na forma de pó com uma intensa coloração amarela, apontando para uma possível formação de um complexo ABZ-SCZ. Este material foi então empacotado e foram obtidos espectros de espectro de RMN de carbono-13 (FIGURA 43). Neste espectro podem ser observadas diferenças significativas no perfil espectral do complexo binário quando comparado com os perfis espectrais de ambos os fármacos isolados. Observou-se uma mudança considerável nos carbonos com deslocamento químico de 152,6 (C2) para 145,4 ppm do ABZ após a formação do complexo. Na região dos carbonos aromáticos do complexo, no espectro ABZ - SCZ observou-se a sobreposição de vários sinais, não sendo possível obter informações interessantes. As análises dos sinais do SCZ no espectro do complexo, revelou a presença de desdobramento de sinais em 67,1 (C7') para 67,4 / 66,45 ppm, fornecendo evidências de um possível ponto de coordenação nos arredores do grupo hidroxila.

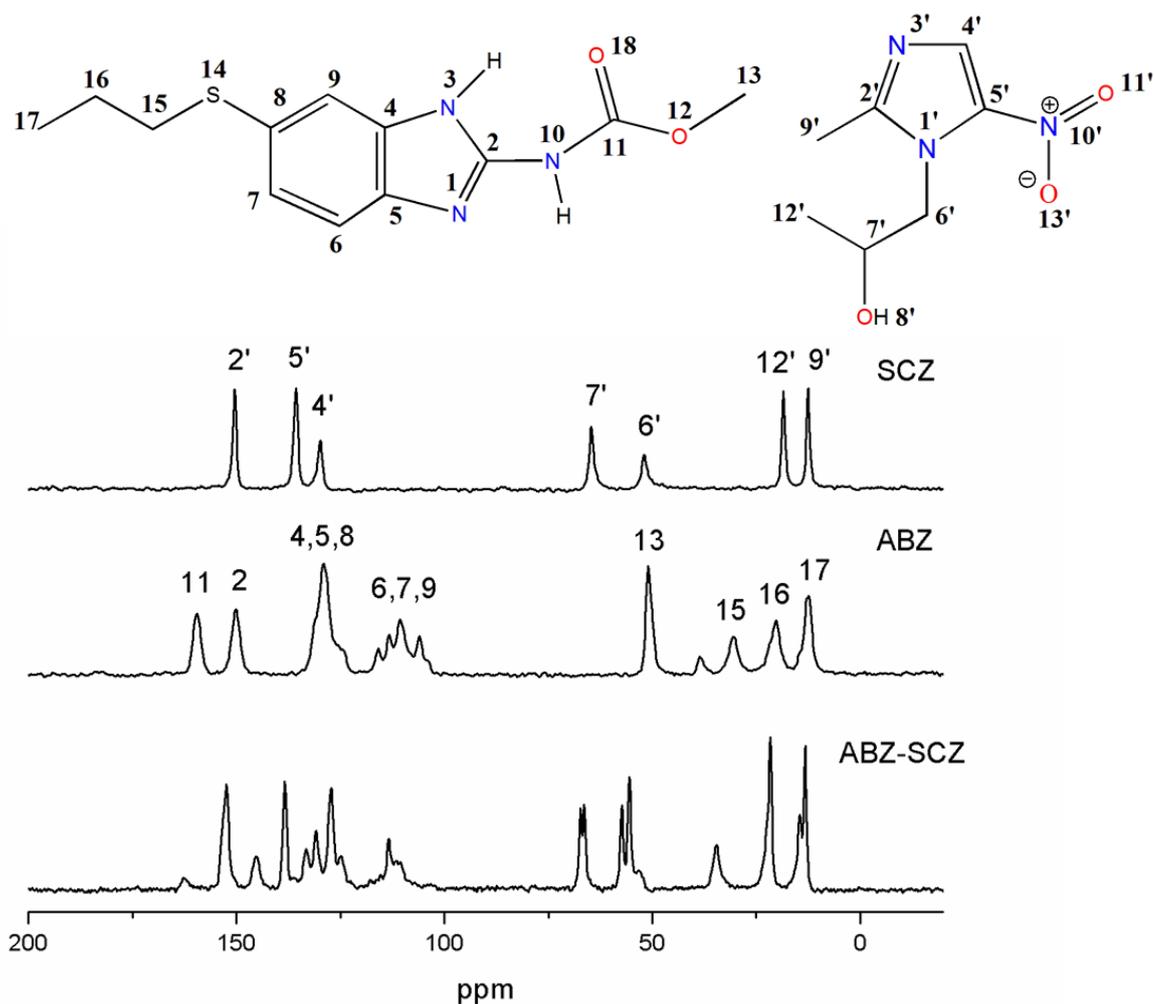


FIGURA 43 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo ABZ-SCZ e APIs isolados.

O espectro de ^{15}N do complexo ABZ-SCZ (FIGURA 44) também apresentou variações significativas nos deslocamentos químicos. A principal diferença reside na variação do deslocamento químico relacionado com os átomos de nitrogênio em 242,7 (N3') no SCZ e 127,5 (N10) ppm no ABZ, para 187,2 e 80,5 ppm, respectivamente, no complexo ABZ - SCZ. O mapa de correlação $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ FSLG-HETCOR não foi informativo para o complexo ABZ-SCZ, portanto não foi possível propor o sinton formado para este sistema.

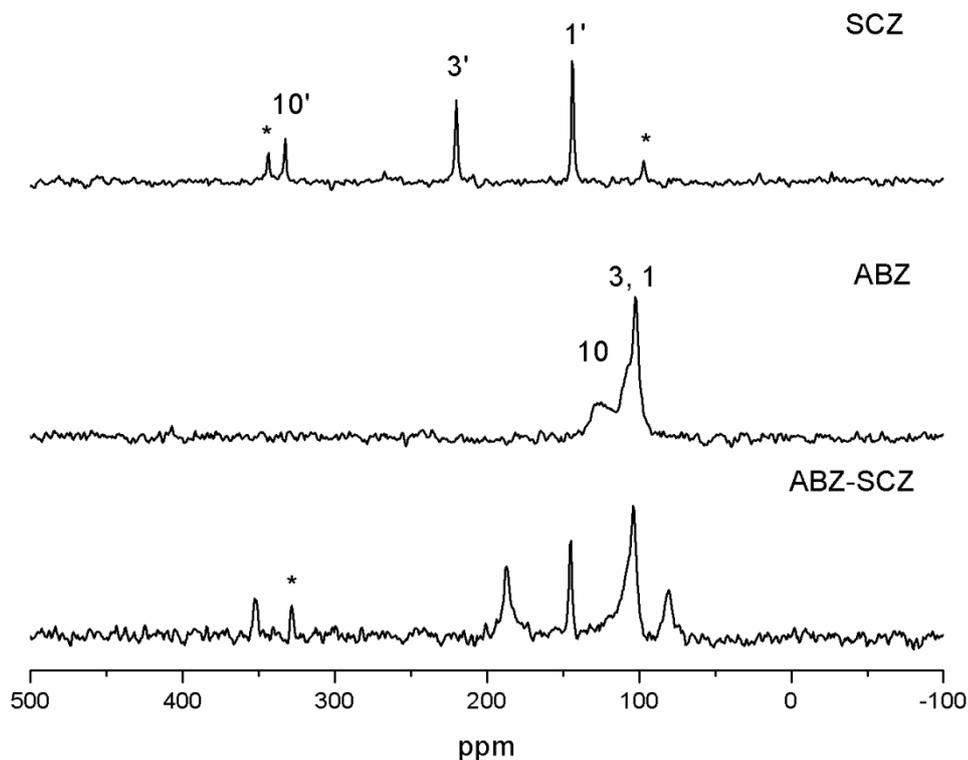


FIGURA 44 - Espectros de ^{15}N -CPMAS do complexo ABZ-SCZ e APIs isolados.

A fim de investigar a possível co-cristalização dos fármacos ABZ-SCZ, foram feitas análises por difratometria de raios-X. Os difratogramas (FIGURA 45) mostram que está ocorrendo um empacotamento distinto no retículo cristalino do complexo binário, quando comparado aos APIs puros. Caso ocorresse somente uma mistura física entre os APIs teríamos uma soma de difratogramas, porém para o complexo em estudo são observadas alterações significativas.

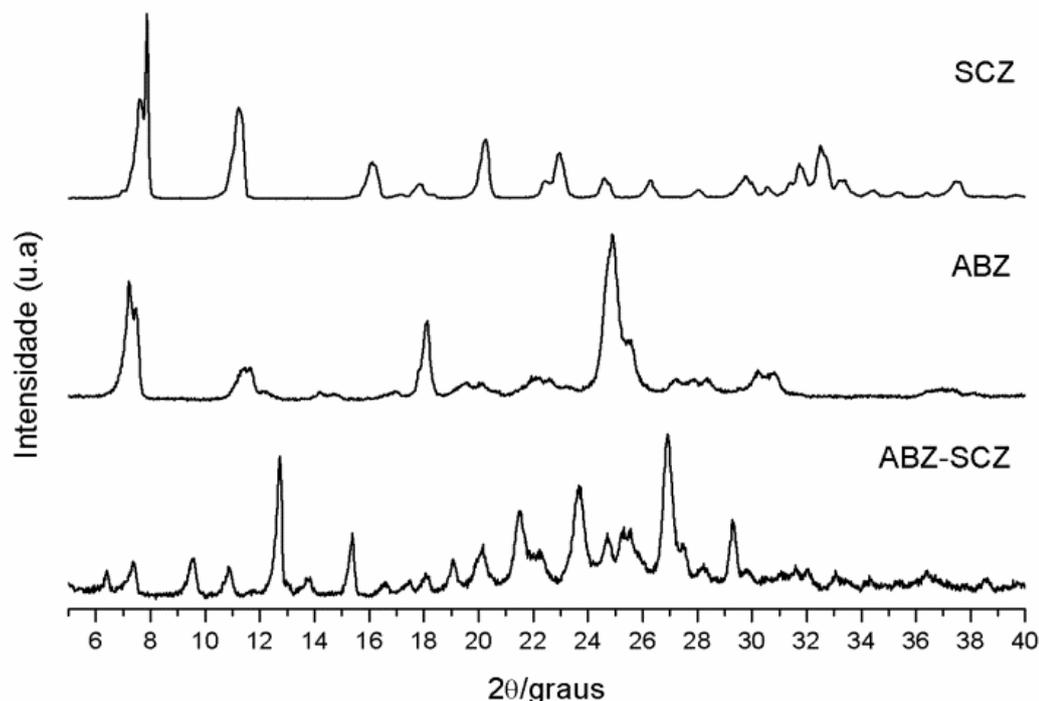


FIGURA 45 - Difratoformas de Raios-X do complexo ABZ-SCZ e os fármacos isolados.

Como observado no difratograma verifica-se que o complexo binário ABZ-SCZ apresenta um padrão diferente dos materiais de partidas isolados, indicativo de uma nova forma cristalina, tal como visualizado no espectro de RMN no estado sólido.

Técnicas de análises térmicas distinguem modificações cristalinas com base nas transições de fases que sofrem durante a variação de temperatura. A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) permite a quantificação da energia absorvida ou liberada pela amostra quando esta é aquecida, resfriada ou mantida a temperatura constante.

Basicamente, as propriedades térmicas de uma mistura física são a soma dos componentes individuais, o que não é observado na FIGURA 46, sendo este um indicativo de que houve uma interação entre os fármacos isolados com formação de um complexo binário.

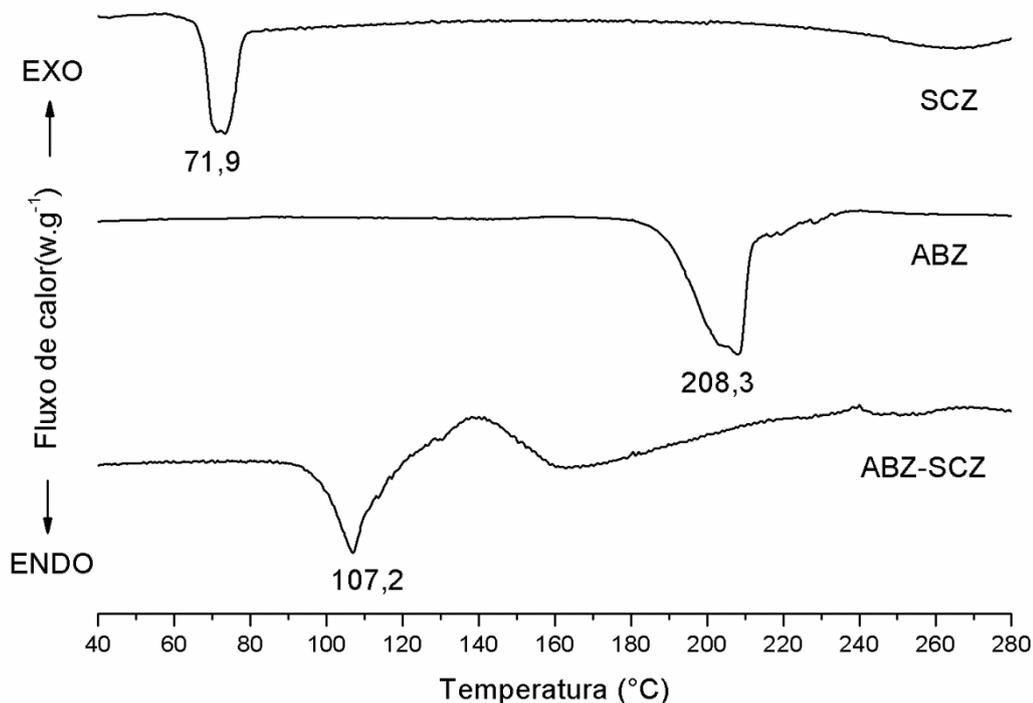


FIGURA 46 - Termogramas de DSC do complexo ABZ-SCZ e os fármacos isolados.

Em geral, altas temperaturas de transição são o resultado de um alto grau de cristalização, que indica elevada estabilidade estrutural. Isto explica o alto valor de PF (208,3°) para a molécula de ABZ e sua baixa solubilidade aquosa devido à sua alta estabilidade molecular.

Com a finalidade de se obter quantidade suficiente de amostra para realizar o teste de solubilidade, várias tentativas de reprodutibilidade deste complexo foram desenvolvidas, porém sem sucesso. Pelos resultados obtidos verifica-se que foi obtida uma nova forma policristalina e os resultados de DSC indicam que esta forma possui uma estabilidade intermediária a dos fármacos de partida.

5.4- CONCLUSÕES

Pela técnica de RMN no estado sólido foi possível fazer a atribuição estrutural da amostra de ABZ, verificar que uma das amostras comerciais avaliadas se encontrava na forma polimórfica II (de solubilidade ainda menor) que a forma comercial (forma I).

Nos sistemas obtidos por meio de cristalização (ABZ- ácidos carboxílicos e ABZ-SCZ) foi possível avaliar por meio dos espectros de RMN no estado sólido em quais sistemas policristalinos houve formação de “novas” formas polimórficas e em quais sistemas ocorreu somente uma mistura física. A RMN 2D possibilitou propor o possível o sinton formado para os complexos ABZ- ácido maléico e ABZ- ácido oxálico.

MEBENDAZOL

6 - MEBENDAZOL

6.1- OBJETIVOS

Esta parte do trabalho tem por objetivo específico:

- Obtenção e caracterização de novas formas polimórficas por meio de reações sólido-sólido e encapsulação do MBZ com o amido, visando uso humano e animal.
- Estudo da solubilidade do mebendazol e seus complexos obtidos.

6.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.2.1- Utilização de reação sólido-sólido para a obtenção de complexos MBZ-Amido.

O complexo MBZ-AM foi obtido por meio do método Liquid Assited Grinding (LAG), que consiste em uma reação do tipo sólido-sólido. A mistura MBZ-AM, na proporção de 62,5% de MBZ em relação ao amido, foi moída em um moinho de bolas por 10 min com adição de 2 gotas de acetonitrila. Esses experimentos foram realizados Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) da Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos-SP).

6.2.2 – Aplicação da encapsulação na obtenção dos complexos MBZ-Amido.

Os complexos MBZ-AM foram obtidos pela gelatinização do amido (5% em massa), por meio de dispersão em água destilada sob agitação mecânica até a temperatura de 90 °C, onde uma pasta de amido viscosa foi formada. Em seguida, a temperatura foi reduzida para 70 °C e adicionado o MBZ nas proporções em relação

ao amido de (62,5%, 50% e 5%). O gel formado transferido para placas de petri e mantidos à temperatura de 30 °C em estufa com circulação de ar durante 72 h para obtenção do material seco. O material seco foi moído em moinho de bolas/SERVITECH, CT 242 durante 20 min. O material obtido na forma em pó foi utilizado para análises. Esses experimentos também foram realizados na Embrapa Instrumentação Agropecuária.

6.2.2- Medidas de RMN no estado sólido

TABELA 14 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -CP-TOSS dos complexos MBZ-AM.

Parâmetros utilizados (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
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)	1024
Número de pontos do domínio de tempo (TD)	2048
Janela espectral (SW)	295 ppm
Frequência de rotação	5 kHz

6.2.3 – Estudo de solubilidade do mebendazol em diferentes meios

A solubilidade do mebendazol foi determinada em cinco diferentes meios solventes comumente utilizados: água, ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹), acetonitrila, etanol e metanol. Uma concentração de 5 mg.mL⁻¹ do fármaco, suficientes para saturação dos meios, foram mantidas sob agitação mecânica por 48 horas, em velocidade constante. Após este período, utilizando uma centrífuga

(Heraeus Fresco 17®) as soluções foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 min e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45 µm. Em seguida, as soluções foram diluídas e analisadas em espectrofotômetro de UV-VIS, com HP UV-Visible ChemStation Software (Hewlett Packard® 8453). As solubilidades foram determinadas após a obtenção de curvas analíticas dos diferentes meios solventes, pela leitura das absorvâncias na região do UV, no comprimento de onda de 298 nm para o mebendazol (adaptado de PEDREIRO, 2012).

6.2.4 - Influência dos complexos MBZ- Amido na solubilidade do mebendazol.

Para os complexos MBZ-AM nas proporções de 5, 50 e 62,5% os meios solventes utilizados para determinar a solubilidade foram etanol e água. A solubilidade foi determinada partindo-se de suspensões dos complexos com concentração conhecida dos fármacos (3 mg.mL^{-1}) (adaptado de PEDREIRO, 2012).

6.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia mais comum utilizada para melhorar a solubilidade de APIs é o uso da técnica de cristalização. Contudo alguns compostos por possuir uma solubilidade muito baixa, tanto em meio aquoso quanto em solventes orgânicos, não se adequam bem a esta metodologia. Nesses casos têm sido utilizadas outras técnicas tais como reação sólido-sólido, Liquid Assited Grinding (LAG), encapsulação em matrizes como polissacarídeos, dentre outras.

Neste trabalho propomos o encapsulamento e reação do tipo sólido-sólido do MBZ em amido de milho (AM) visando melhorias em sua solubilidade, uma vez que encontramos dificuldades de desenvolver sistemas de cristalização, tal como foi aplicado para o albendazol, devido à solubilidade muito baixa do MBZ em solventes orgânicos. Apesar de várias tentativas, os sistemas obtidos consistiram somente em misturas físicas.

Os sistemas de encapsulação e reação do tipo sólido-sólido de MBZ-AM foram desenvolvidos em parceria com a Embrapa Instrumentação Agropecuária, uma vez que o mebendazol também é utilizado como vermífugo de uso animal. O amido foi escolhido por ser uma matéria-prima de baixo custo, de fácil manipulação e permitido farmacêuticamente. As concentrações utilizadas foram baseadas na concentração de MBZ em relação ao amido (quando utilizado como excipiente) disponível em formulações comerciais para o uso humano (62,5%) e animal (50% e 5%).

O processo de encapsulação consiste na aplicação de revestimentos finos a partículas sólidas pequenas. Neste processo há uma tendência de amorfização dos sistemas obtidos devido o uso do amido como revestimento. A liberação do API será regulada essencialmente por processos de difusão, onde os grânulos de amido de milho quando ingeridos irão absorver água e inchar, e o composto encapsulado irá difundir para fora da matriz de amido.

Diversas tentativas de reações do tipo sólido-sólido com uso de moinho de bolas foram desenvolvidas entre a forma C do MBZ e amido de milho. No espectro de ¹³C-CPTOSS do sistema obtido por meio da mistura MBZ- AM (FIGURA 47) com uso de 2 gotas de acetonitrila como solvente e um tempo de 10 min no moinho misturador foi observada uma transição de fase deste fármaco, que estava

inicialmente na sua forma C (considerada a forma de maior interesse farmacológico devido a sua maior solubilidade), para a sua forma de menor solubilidade (forma A), induzida pelo seu processamento.

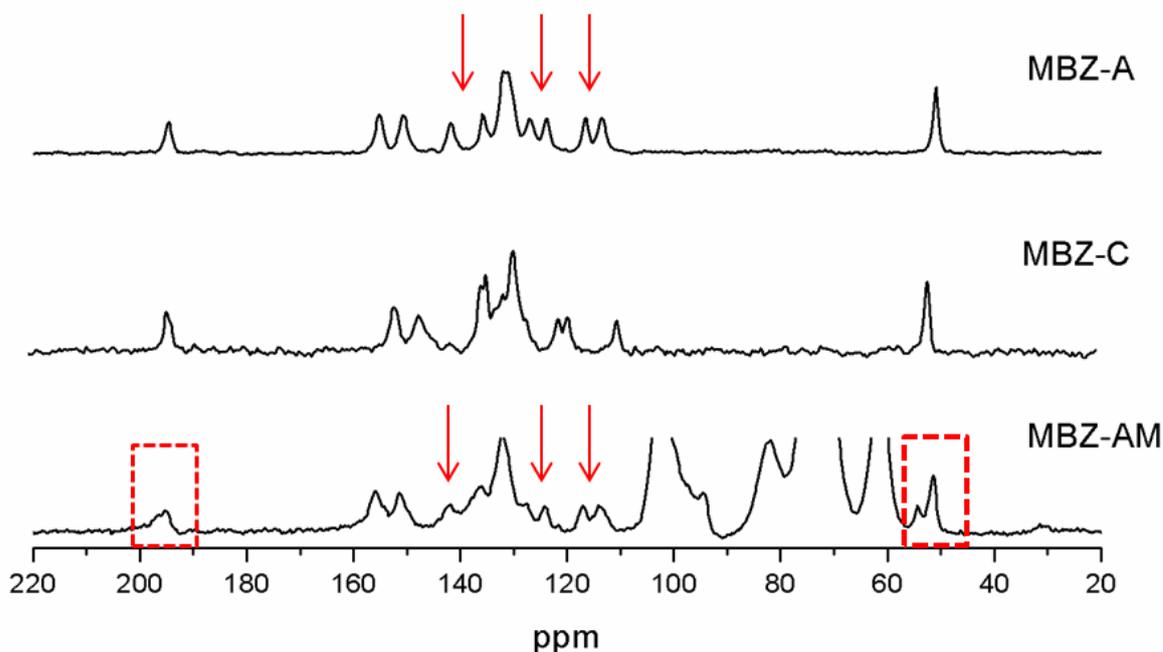


FIGURA 47 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS da mistura MBZ-Amido obtida por moagem sólido-sólido.

O conhecimento de possíveis transições polimórficas é de grande importância no processo industrial de um fármaco, uma vez que identificada a forma estável é necessário controlar as etapas críticas de seu processamento, caso esta não seja a forma cristalina mais adequada. A literatura relata que processos como a moagem podem induzir uma transição polimórfica (LUCZAKA et al., 2013; KHOMANE et al., 2013). Neste trabalho foi identificada uma conversão entre as formas polimórficas do MBZ, ocasionada pelo processo de moagem (ativação mecânica).

Para o processo de encapsulamento do fármaco MBZ era necessário uma maior quantidade em massa deste API, que foi adquirido comercialmente. Inicialmente foi feito uma análise por RMN no estado sólido desta amostra de MBZ

para uma comparação entre este API comercial e as amostras padrões (A e C) a fim de verificar em qual destas formas polimórficas o fármaco se encontrava.

O espectro de RMN no estado sólido (FIGURA 48) mostra que o insumo farmacêutico ativo da amostra comercial do MBZ constituiu uma mistura das formas A e C. Quando comparados os espectros das formas polimórficas A e C do MBZ, a maior diferença observada aparece na região aromática entre 110 e 145 ppm. Outros sinais que indicam diferenças entre os polimorfos são os da metila em 51,4 para o polimorfo A e em 54,6 ppm para a polimorfo C, e também o sinal da carbonila em 195,0 e 197,2 para os polimorfos A e C, respectivamente. A forma polimórfica mais estável e, portanto a mais insolúvel do MBZ é o polimorfo A.

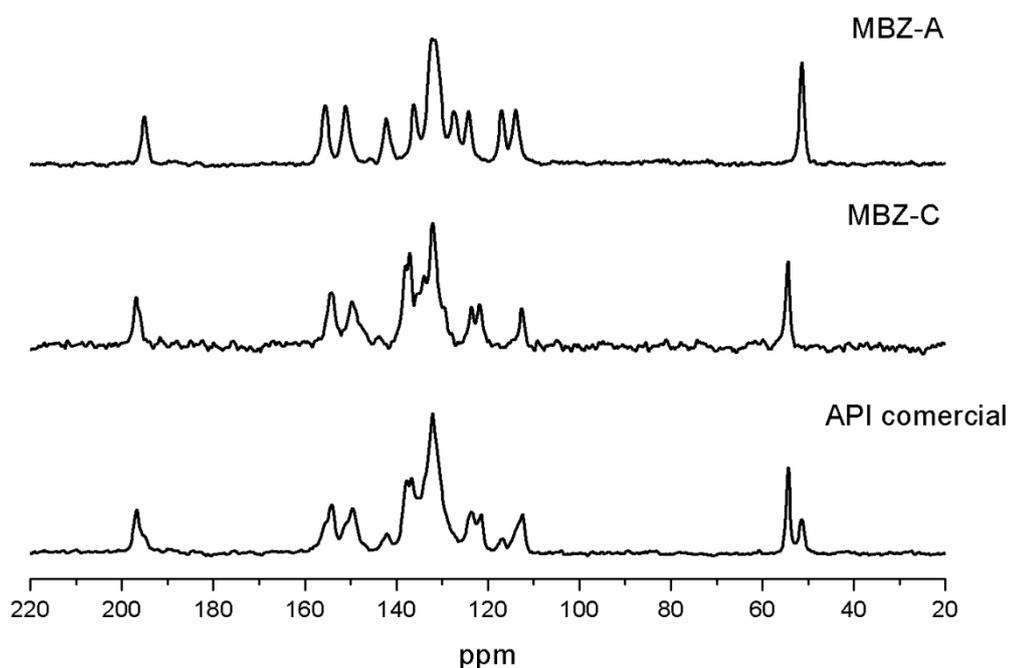


FIGURA 48 - Espectros de ¹³C-CPTOSS comparando as amostras dos polimorfos (A e C) e comercial do MBZ.

Nos espectros de ¹³C-CPTOSS dos complexos MBZ-Amido (FIGURAS 49 e 50) foi observado que ao encapsular o MBZ em amido de milho não se verificaram variações de deslocamento químico significativas de nenhum dos picos relacionados aos carbonos da estrutura, mostrando que houve pouca interação do amido com o MBZ. No entanto, verifica-se um alargamento dos sinais, que pode se

tratar da perda de cristalinidade exercida pela presença do amido, que é interessante do ponto de vista farmacêutico, uma vez que sistemas amorfos tendem a ser mais solúveis.

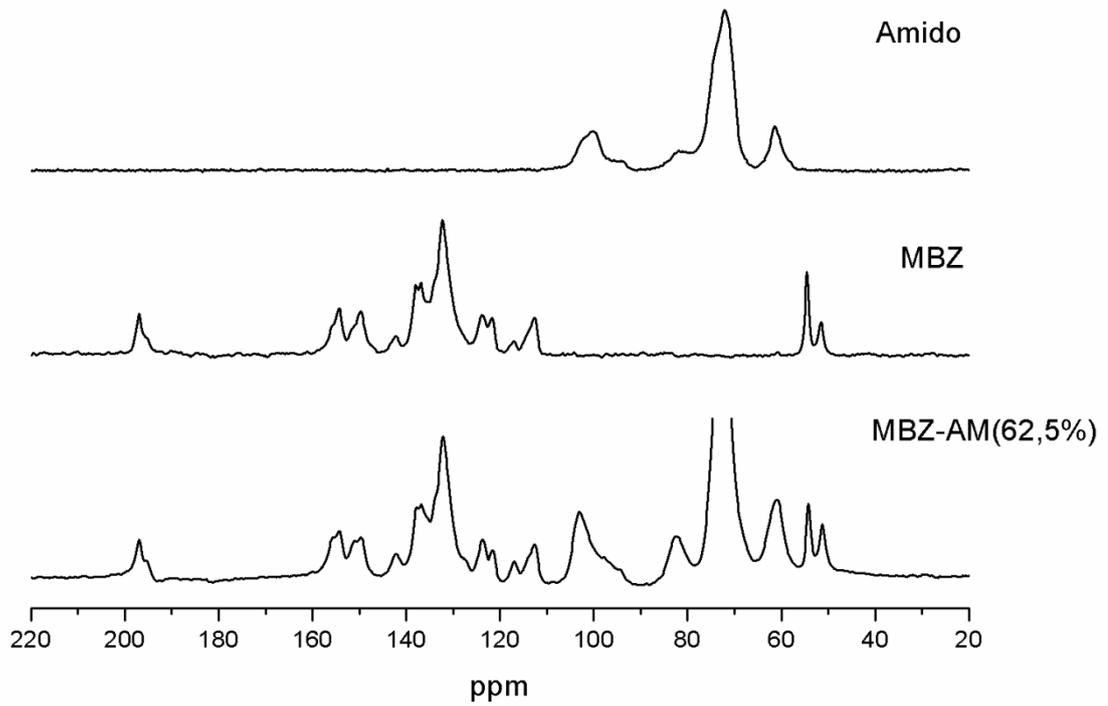


FIGURA 49 - Espectros de ¹³C-CPTOSS do complexo MBZ-Amido (62,5%).

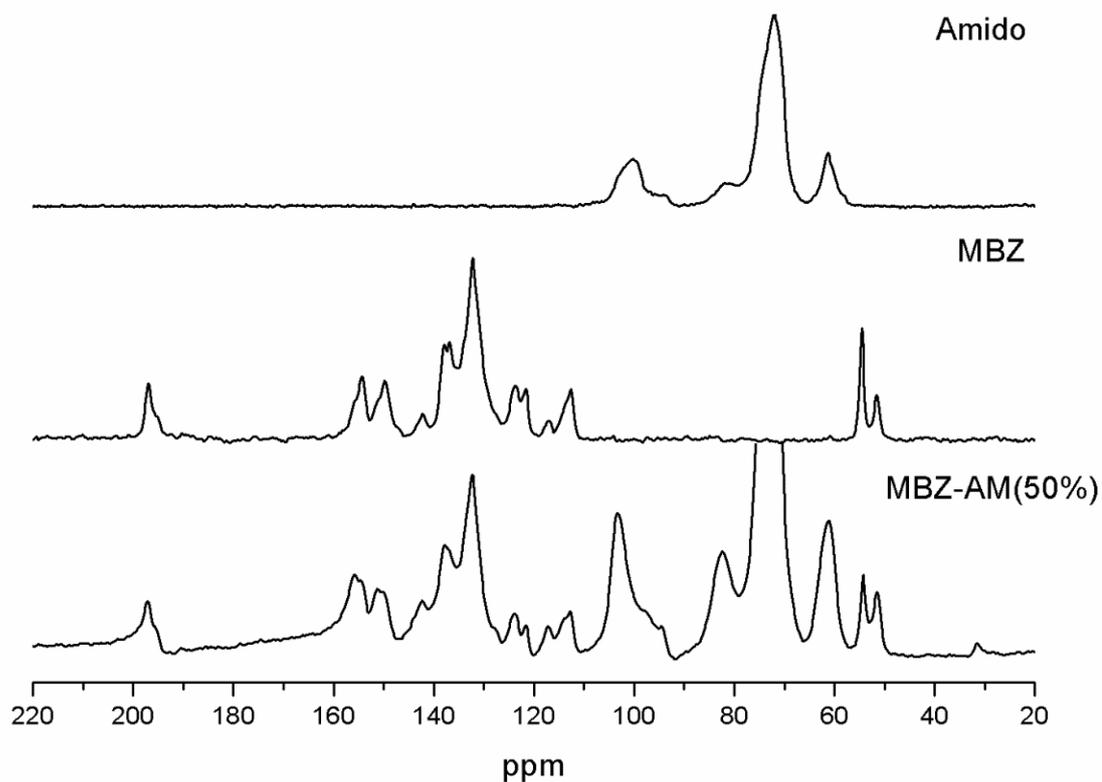


FIGURA 50 - Espectros de ¹³C-CPTOSS do complexo MBZ-Amido (50%).

Sólidos farmacêuticos amorfos possuem uma maior solubilidade em comparação aos sólidos cristalinos, porém apresentam baixa estabilidade, exigindo maior atenção durante seu processo produtivo e de armazenamento.

Na FIGURA 51 verifica-se pelo espectro que o sistema MBZ-AM (5%), nesta proporção, não se mostrou interessante para nosso estudo, uma vez que devido à alta proporção de amido em relação ao MBZ os sinais deste último praticamente desapareceram dificultando as análises por RMN no estado sólido.

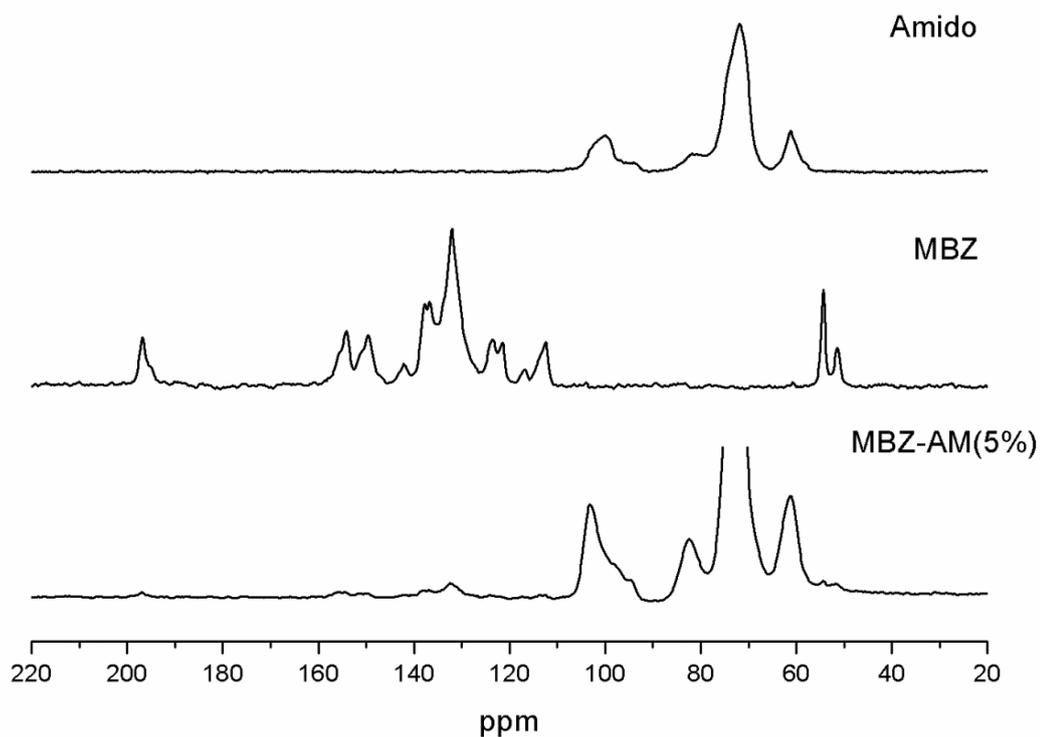


FIGURA 51 - Espectros de ^{13}C -CPTOSS do complexo MBZ-Amido (5%).

Pela FIGURA 52 observa-se grandes diferenças no perfil do difratograma das amostras padrões do MBZ, apresentado picos característicos de maior intensidade, a $2\theta = 7,7; 17,4; 23,3/23,6$ e $28,7^\circ$ para a forma A e $2\theta = 16,2; 18,3; 19,3/19,8; 24,9$ e $26,9^\circ$ para a forma C. O amido possui um perfil de difratograma típico de uma amostra amorfa, como verificado nesta mesma figura.

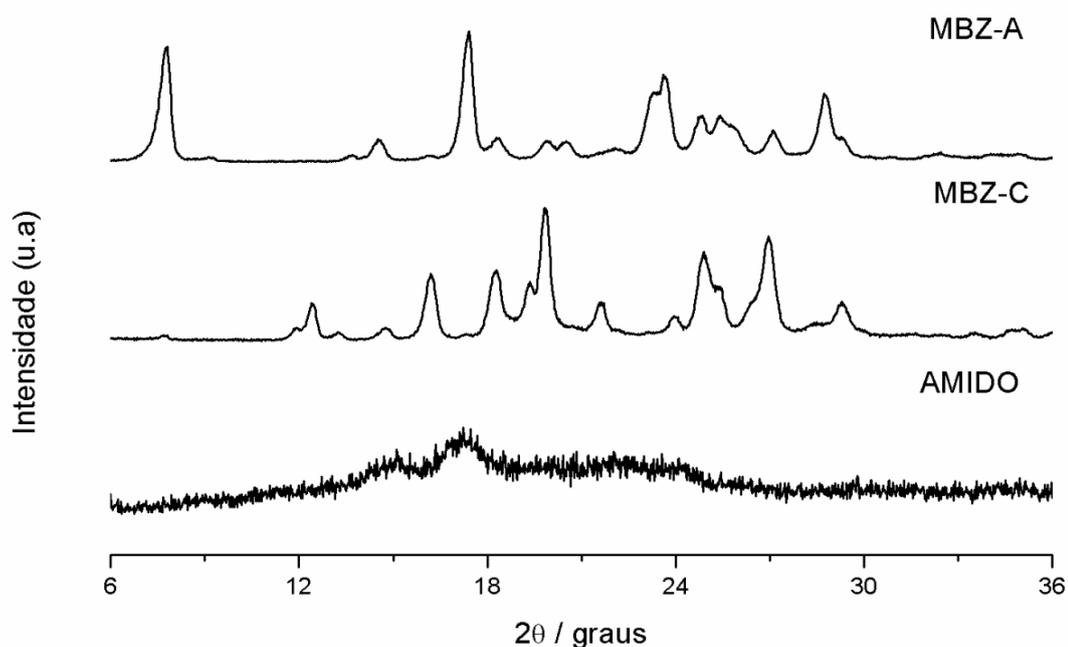


FIGURA 52 - Difratoogramas de Raios-X das amostras de MBZ (formas A e C).

Os difratogramas de pó dos sistemas MBZ-AM (FIGURA 53) nas proporções de 62,5 e 50% são semelhantes, constituindo uma mistura das formas A e C do MBZ, sendo que o primeiro possui picos mais finos e bem definidos o que caracteriza uma maior cristalinidade devido a menor concentração de amido presente neste sistema. Já o sistema MBZ-AM (5%), observa-se uma amorfização do sistema MBZ-AM devido ao alto teor de amido utilizado, fato também observado no espectro de RMN obtido para esta amostra.

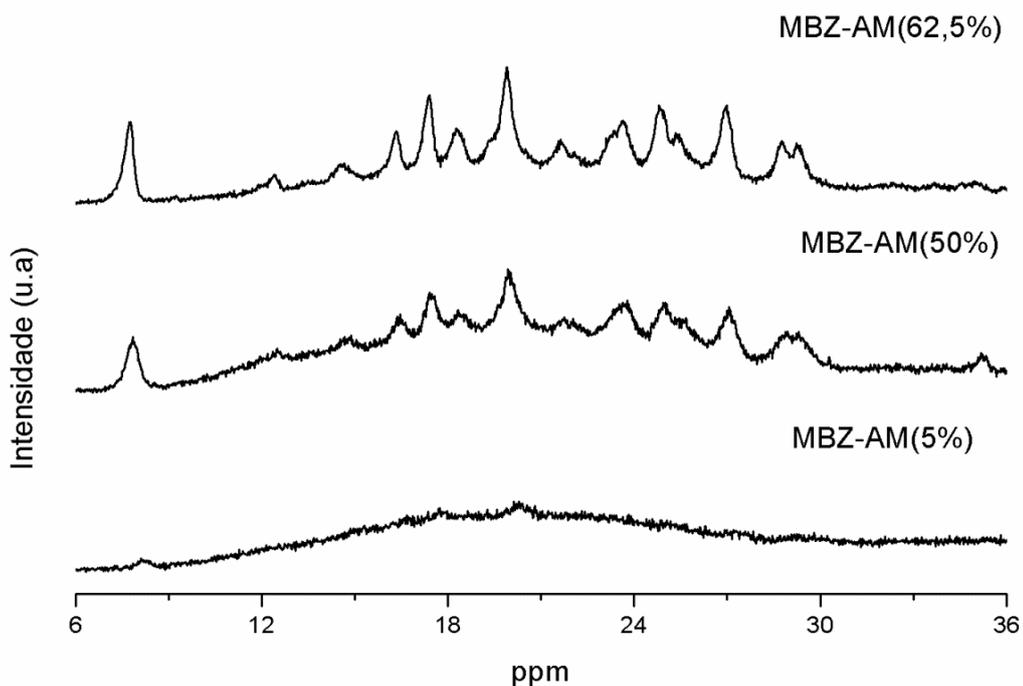


FIGURA 53 - Difratoigramas de Raios-X dos sistemas MBZ-AM.

Os termogramas de DSC das formas polimórficas A e C do MBZ (FIGURA 54) mostram que a forma C apresenta três eventos: um pequeno evento endotérmico a 213°C seguido por dois outros eventos endotérmicos bem definidos a 253°C e em 331°C. Já a forma A do MBZ apresenta uma única transição endotérmica em aproximadamente 250°C e uma endoterma final de fusão a 332°C.

Estes valores obtidos para as formas A e C do MBZ, estão de acordo com os estudos feitos por VILLIERS et al., 2005 que observaram que o polimorfo C é transformado no polimorfo A com aquecimento entre 200 e 225° C (possivelmente pela formação de uma mistura dos polimorfos A e C) e o processo de fusão e degradação do polimorfo A ocorre em temperatura superior a 240°C.

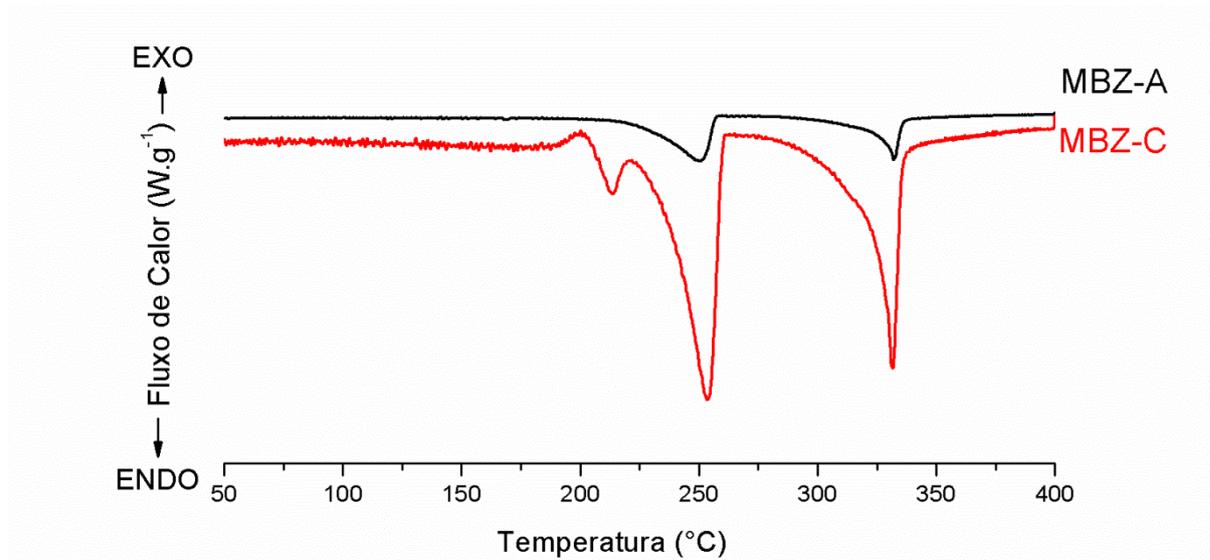


FIGURA 54 - Termogramas de DSC das amostras de MBZ (formas A e C).

Os termogramas de DSC dos sistemas MBZ-AM (FIGURA 55) evidenciam a amorfização do sistema MBZ-AM (5%), onde se observa somente a endoterma relativa ao amido em aproximadamente 323°C. Para os sistemas MBZ-AM (62,5% e 50%) verifica-se endotermas em aproximadamente 232°C, mais intensa para o primeiro sistema, sendo este sinal referente à transição polimórfica (forma C → A) do MBZ. Outros pequenos eventos ocorrem acima de 250°C, que indicam a fusão e degradação do MBZ-A encapsulado em amido.

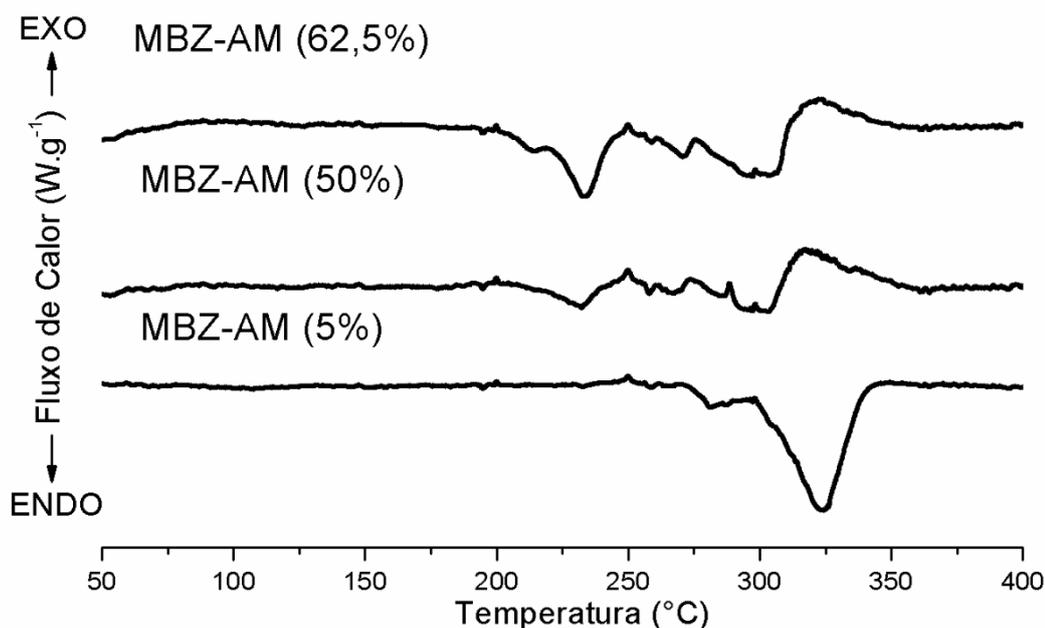


FIGURA 55 - Termogramas de DSC dos sistemas MBZ-AM.

Aplicamos o processo de encapsulação do MBZ em amido com o intuito de melhorar a solubilidade deste fármaco por meio de sua amorfização. Para o estudo do perfil de solubilidade do MBZ foi feita a construção das curvas analíticas em cinco diferentes meios: ácido clorídrico (0,1 mol.L⁻¹), etanol, metanol, acetonitrila e água. Os valores de solubilidade obtidos para este fármaco estão resumidos na TABELA 15:

TABELA 15 - Solubilidade do mebendazol em diferentes meios.

Solvente	Solubilidade (mg.mL ⁻¹)	Desvio Padrão
Ácido clorídrico (0,1M)	0,0444	0,02
Etanol	0,1498	0,07
Metanol	0,0936	0,06
Acetonitrila	0,0980	0,16
Água	0,0028	0,02

Baseado nos resultados de solubilidade o etanol e a água foram os solventes selecionados para o estudo dos complexos MBZ-AM, com o intuito de se fazer um comparativo entre a solubilidade do material obtido com o fármaco puro.

No estudo dos complexos MBZ-AM mostrado na TABELA 16, verifica-se que quando se utilizou o etanol como solvente, houve uma diminuição de solubilidade para a amostra MBZ-AM (62,5%) que corresponde ao percentual de MBZ em relação ao excipiente (amido) comumente utilizado na forma comercial deste fármaco. Isso se deve à alta concentração deste API e/ou de o processo de encapsulação não ter sido efetivo na redução do tamanho de partícula do fármaco uma vez que o MBZ apresenta certa tendência à plasticidade quando submetido a processos de secagem, o que pode ter influenciado na solubilidade não promovendo as melhorias desejadas. Pelo espectro de RMN (FIGURA 49) foi possível constatar que a diminuição da solubilidade não está relacionada a uma transição polimórfica, visto que após o processo de encapsulação o sistema MBZ-AM (62,5%) continua sendo uma mistura entre as formas A e C do MBZ.

Com relação aos complexos de MBZ- AM nas proporções de 50% e 5% não houve alterações relevantes de solubilidade quando comparados à amostra de MBZ puro.

TABELA 16 - Solubilidade do MBZ e seus complexos em etanol.

Amostra	Solubilidade (mg.mL⁻¹)	Desvio Padrão
MBZ	0,1498	0,07
MBZ- AM (62,5%)	0,0910	0,56
MBZ- AM (50%)	0,1232	0,36
MBZ- AM (5%)	0,1185	0,78

Geralmente, quando um fármaco pouco hidrossolúvel é distribuído em uma matriz hidrofílica resulta em sistema de liberação rápida. Este sistema quando é dissolvido em um meio aquoso libera diminutos cristais do fármaco, que devido à superfície de contato aumentada, exibe uma maior solubilidade no meio solvente. Isso não foi o observado neste trabalho, pois tentamos efetuar o teste de solubilidade dos complexos MBZ-AM em água, porém sem sucesso, pois não foi

possível obter a leitura das absorvâncias no UV, indicativo de que a solubilidade do MBZ em meio aquoso diminuiu nos complexos. Isso pode ter ocorrido devido o processo de encapsulação e/ou moagem dos sistemas não ter sido efetivo na redução do tamanho de partícula do fármaco e conseqüentemente interferiu nos testes de solubilidade.

6.4 - CONCLUSÕES

Foi possível avaliar os sistemas do tipo MBZ-AM pela técnica de RMN no estado sólido, sendo possível verificar uma transição polimórfica no MBZ (forma C para A) ocasionada pelo processo de moagem. A amostra comercial consiste em uma mistura das formas A e C e os sistemas de encapsulação mostraram estar sofrendo um processo de amorfização, uma estratégia utilizada pela indústria para fármacos de solubilidade muito baixa, tal como o MBZ.

TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATO

7- TENOFOVIR DISOPROXIL FUMARATO

7.1- OBJETIVOS

Esta parte do trabalho teve por objetivo específico explorar a caracterização do TDF de maneira mais refinada pela técnica de RMN no estado sólido.

7.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7.2.1 - Obtenção da amostra de TDF

A amostra de TDF foi fornecida pela indústria CYG Biotech.

7.2.2- Medidas de RMN no estado sólido

TABELA 17 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^{13}C -RMN 1D para o TDF.

Parâmetros utilizados (nomenclatura Bruker)	Valores
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Duração do pulso de contato (p15)	5 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 (SW)	295 ppm
Frequência de rotação	5 kHz

TABELA 18 - Parâmetros de aquisição utilizados nos experimentos de ^1H - ^{13}C FSLG HETCOR para o TDF.

Parâmetro (nomenclatura Bruker)	Valor
Tempo de espera entre cada aquisição (d1)	3 s
Duração do pulso de contato (p15)	1ms
Potência do pulso de contato (p11)	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
Frequência de rotação	10 kHz
Campo LG	83 kHz
Campo para desacoplador	83 kHz

7.2.3- Caracterização por espectroscopia FT-Raman

Para a obtenção dos espectros Raman, foi utilizado um espectrofotômetro FT-Raman, da marca Bruker, modelo RFS/100/S, usando um laser de Nd: YAG com potência de 60 mW e comprimento de onda de 1064 nm, com precisão nas frequências dos modos em torno de 4 cm^{-1} , na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

7.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A literatura relata três polimorfos (I, A, e B) para o TDF (LEE et al., 2010), sendo que a caracterização estrutural prévia desta molécula foi feita por difração de raios X, termoanálises, espectroscopias vibracionais e RMN no estado sólido. Neste estudo a RMN foi utilizada apenas para diferenciar os polimorfos. Recentemente, GOMES et al. (2015) caracterizaram a forma polimórfica I do TDF, onde foi verificada uma transição polimórfica conformacional (Forma I-1) após aquecimento por meio de experimentos de RMN no estado sólido, DSC e raios-X de pó. Neste contexto, o interesse na caracterização desse fármaco surgiu com o intuito de explorar a caracterização do TDF de maneira mais refinada por RMN no estado sólido.

A FIGURA 56 apresenta os espectros de carbono-13 obtidos pelas técnicas de CPTOSS, CPNQS e CPPI. A utilização destas três técnicas permitiu fazer a atribuição de todos os sinais. O espectro de ^{13}C -CPTOSS aqui relatado não é correspondente a nenhuma das formas que foram anteriormente atribuídos por LEE et al. (2010). A princípio, é possível verificar neste mesmo espectro um número maior de ressonância do que o número de átomos de carbonos não equivalentes, o que sugere a existência de mais de uma molécula na unidade assimétrica da célula unitária.

No espectro de ^{13}C -CPNQS, ocorre a supressão de sinais de carbonos hidrogenados, só aparecendo os sinais em 172,5 (C1' e C4'); 153,9 (C9, C27 e C18); 150,8 (C5) e 117,6 (C4) ppm. Verifica-se um sinal residual das metilas terminais devido à mobilidade natural desses grupos. Além disso, pode ser observado a diminuição da intensidade do sinal em 150,8 ppm que é referente a um carbono quaternário(C5) devido a sobreposição deste com um grupo metínico (C7), pois ambos apresentam o mesmo deslocamentos químicos.

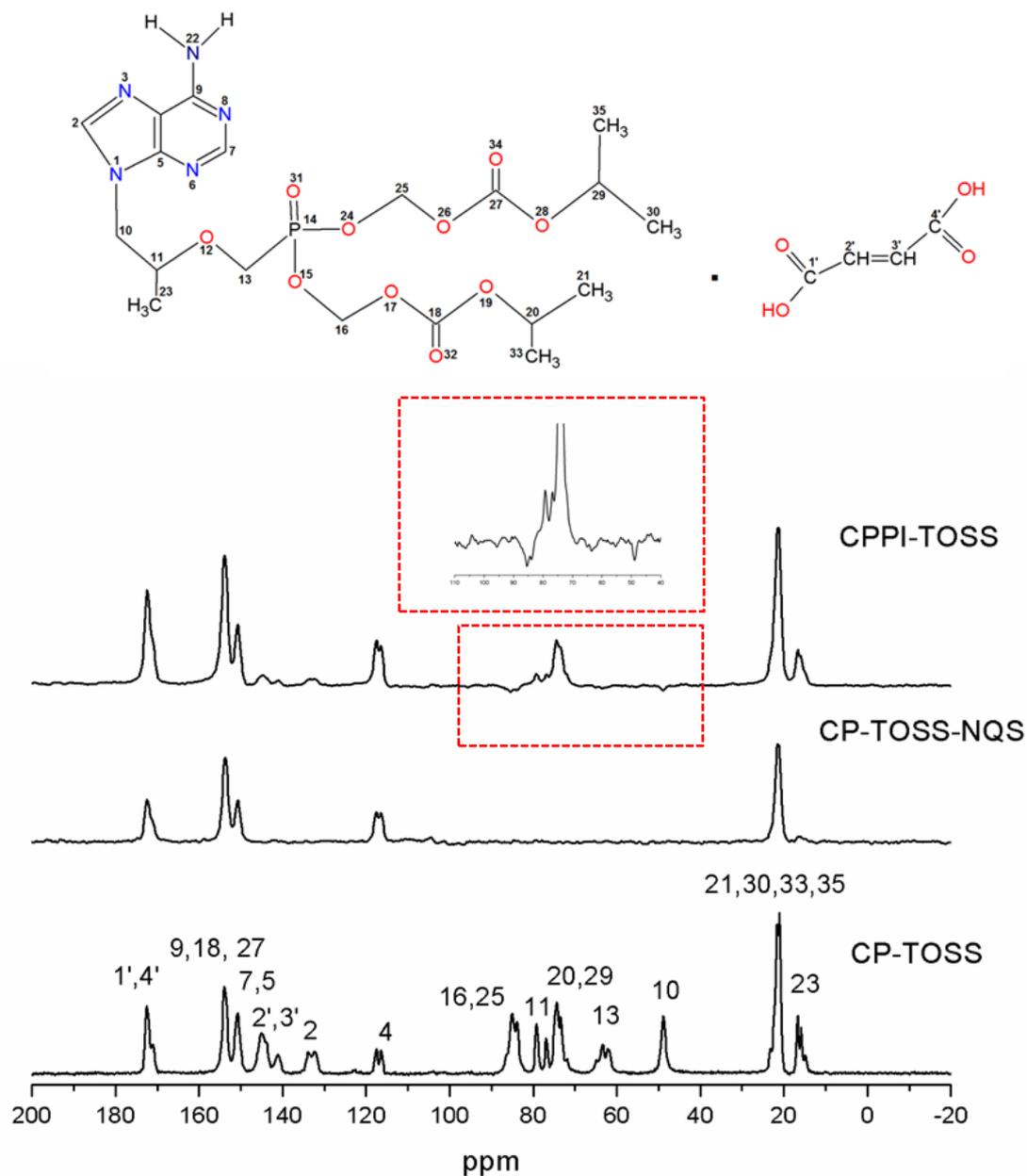


FIGURA 56 - Espectros ^{13}C (CP-TOSS, CP-TOSS-NQS e CPPI-TOSS) para o TDF.

No espectro de ^{13}C -CPPI-TOSS verifica-se que os grupos metilenos aparecem com fase negativa em deslocamentos químicos de 85,1 (C16 e C25); 63,4 (C13) e 48,9 (C10) ppm, enquanto que as metilas e carbonos quaternários surgem com fase positiva e os grupos metínicos são anulados no espectro. O C7 apesar de ser um carbono metínico não é anulado devido a sua sobreposição com o sinal do C5, que é correspondente a um carbono quaternário, aparecendo assim em fase positiva.

Já no espectro de CP-TOSS os sinais em 145,0; 83,9 e 64,8 ppm sugerem a existência de uma mistura das formas polimórficas I e B deste fármaco (LEE et al., 2010; GOMES et. al., 2015). Porém a presença de um novo sinal em 76,89 ppm e os diferentes desdobramentos dos grupo metileno (C13) e metilas (C23) sugerem a existência de uma nova forma polimórfica. Os sinais das carbonilas do fumarato (C1' e C2') aparecem em 172,5 ppm e os grupos metínicos em 141,2 ppm. A atribuição dos sinais do TDF é apresentada no espectro de CPTOSS.

O mapa FSLG-HETCOR para o TDF (FIGURA 57), mostra a presença do sinal em 15,8 ppm que é um indicativo de formação de ligação de hidrogênio intermolecular entre o N8 do tenofovir com a hidroxila de uma molécula do ácido fumárico e também entre o hidrogênio do nitrogênio (N22) com a carbonila do fumarato (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012).

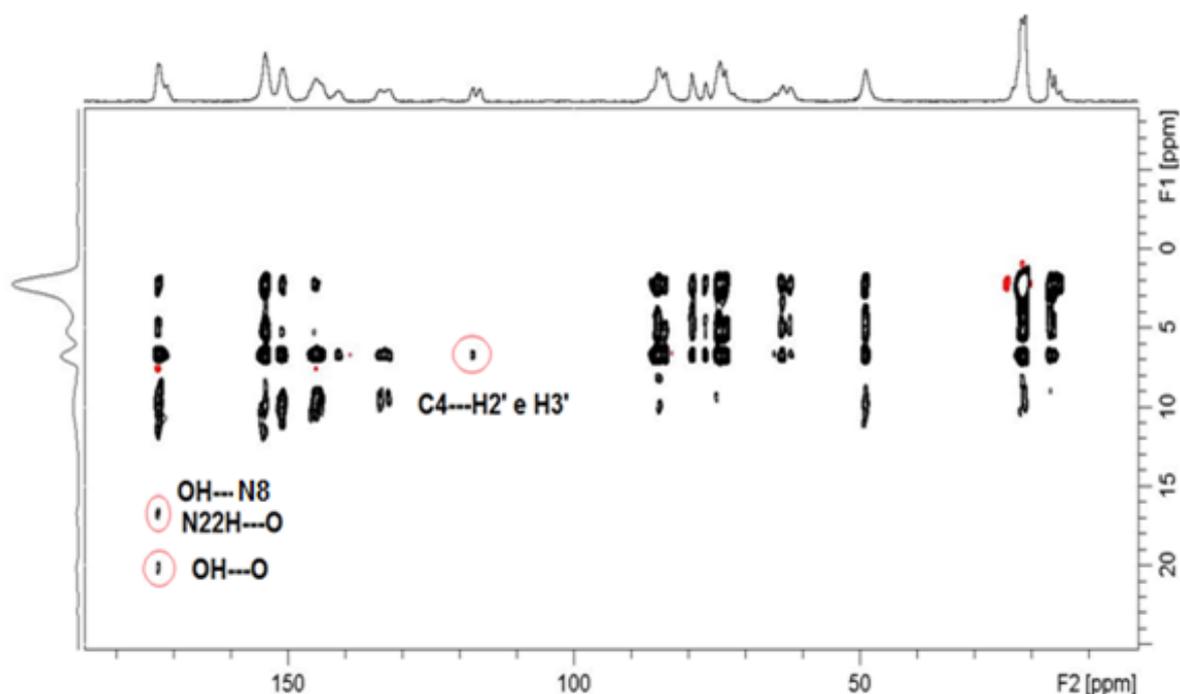


FIGURA 57 - Mapa de correlação $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ FSLG- HETCOR do TDF

Outro indício sobre a presença desta interação intermolecular pode ser visualizado no espectro de ^{15}N -CPMAS (FIGURA 58), onde o nitrogênio N3 apresenta um intenso desdobramento (~137,9/143,2 ppm) que pode ser devido a existência de duas formas polimórficas distintas. O mesmo comportamento é observado para o nitrogênio N22, que aparece mais blindado (~63,9/67,1 ppm) em

relação aos demais nitrogênios, apresentando um grande alargamento e desdobramento significativo.

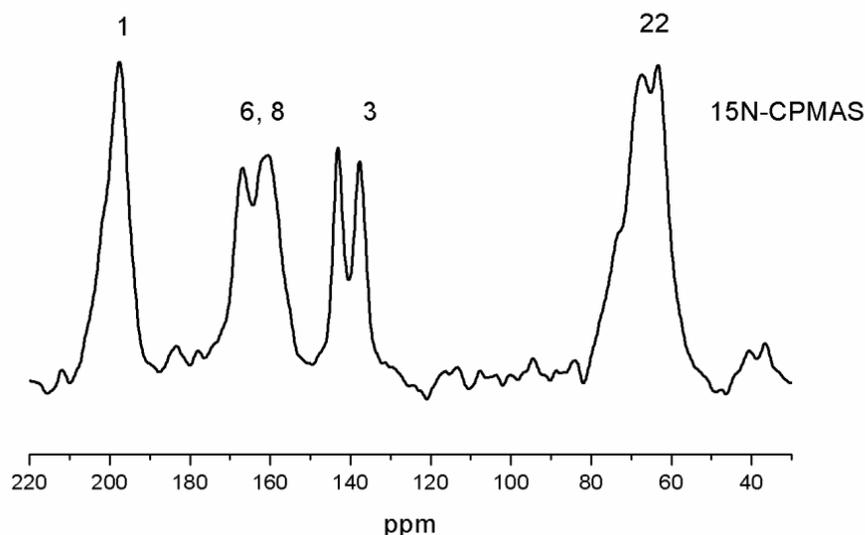


FIGURA 58 - Espectro de ^{15}N -CPMAS do TDF com atribuições dos sinais.

O carbono quaternário C4, apresenta sinais por correlação por difusão de spins com os hidrogênios da ligação dupla do ácido fumárico em 6,77 ppm, devido a relativa proximidade espacial destas moléculas. Já o nitrogênio N1 apresenta um deslocamento químico de 197,6 ppm.

O sinal em 19,2 ppm no mapa de correlação $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ -FSLG-HETCOR, é um indicativo da presença de ligação de hidrogênio intermolecular entre as carboxilas de duas moléculas de ácido fumárico (CHIEROTTI e GOBETTO, 2012). O nitrogênio N1 apresenta deslocamento químico em 197,6 ppm, enquanto os nitrogênios N6 e N8 surgem em 160,8/ 167,1 ppm. É observado um grande alargamento desses sinais, o que também é compatível com a existência de duas ou mais formas polimórficas.

Baseado na técnica de RMN uni e bidimensional, propomos a possível interação intermolecular verificada em nossos estudos (FIGURA 59).

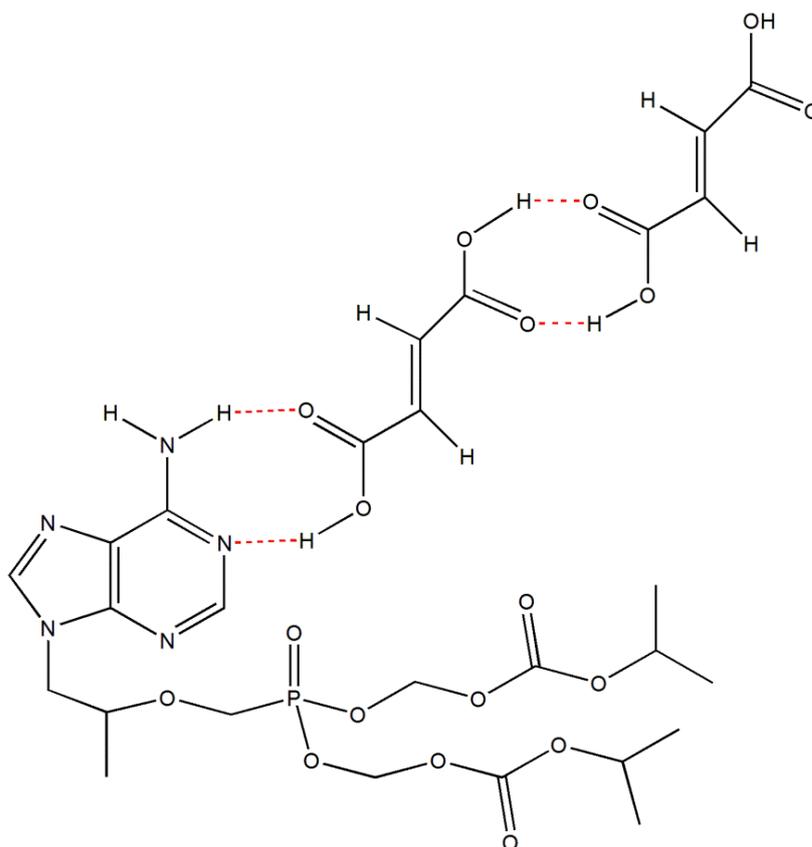


FIGURA 59 - Proposta das interações intermoleculares no TDF.

O FTIR do TDF relatados na literatura para as formas I e B são semelhantes, permitindo a distinção somente da forma A com relação às três formas polimórficas. A literatura relata também que o espectro RAMAN do TDF forma I é ligeiramente diferente da forma B, onde na forma I verifica-se uma banda em aproximadamente 1256 cm^{-1} enquanto a forma B apresenta uma banda em 1263 cm^{-1} . A forma B possui três picos diferentes em aproximadamente 1450 cm^{-1} enquanto a forma I possui somente dois picos distintos, um dos quais apresenta um ombro. Já na região próxima a 1520 cm^{-1} a forma do pico do TDF forma I é ligeiramente diferente da forma B. Assim como no FTIR, o espectro RAMAN do TDF forma A é bastante distinto das demais formas (LEE et al., 2010).

Para fins de comparação foi obtido um espectro RAMAN da amostra de TDF em estudo (FIGURA 60) onde se verifica um pico em aproximadamente 1257 cm^{-1} , dois picos na região de 1450 cm^{-1} e um pico em 1520 cm^{-1} , que sugerem a existência da forma I do TDF para esta amostra em estudo.

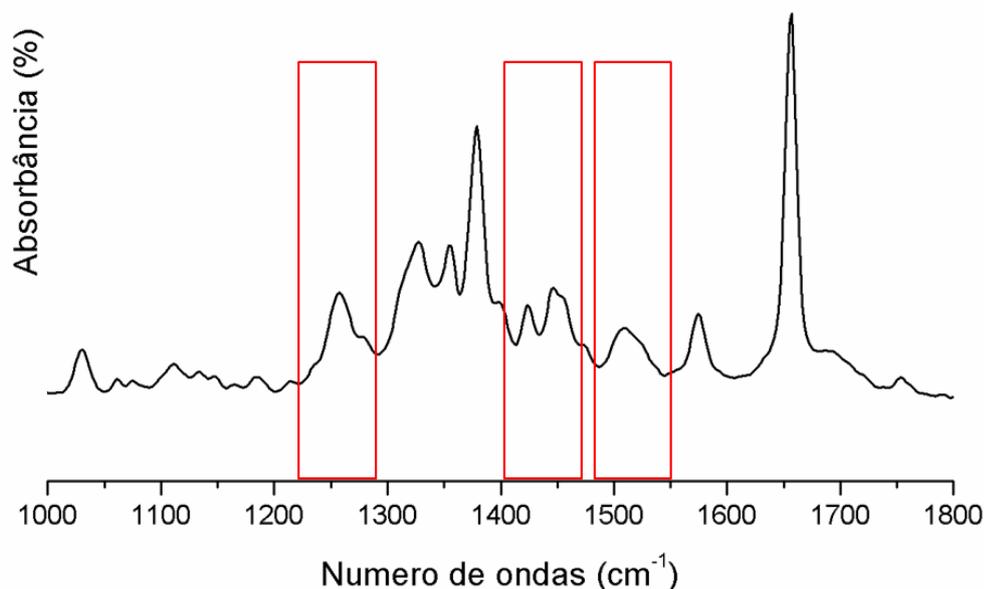


FIGURA 60 - Espectro RAMAN do TDF.

De acordo com LEE et al. (2010) o difratograma das formas B e I, apresentam um pico acentuado em cerca de 5° e três picos de alta intensidade em aproximadamente 20° , 25° e 30° , sendo que para a forma B estes últimos estão mais deslocados para maiores valores de 2θ .

A amostra de TDF foi submetida a uma análise de raios-X de pó (FIGURA 61) em que foi observado os mesmos picos relatados acima, que se correlaciona principalmente com a forma I do TDF (LEE et al., 2010; GOMES et al., 2015), porém os picos em aproximadamente $12,8^\circ$ e 23° indicam um padrão de difratograma distinto das três formas até então relatados na literatura (A, B e I), sugerindo a existência de uma possível nova forma cristalina, assim como foi constatado pela técnica de RMN no estado sólido.

Em seus estudos, LEE et al. (2010) relata que a forma A do TDF apresenta um ponto de fusão em $118,11^\circ\text{C}$ e o da forma I em $113,77^\circ\text{C}$. Já a forma B passa por um processo de recristalização a uma temperatura inferior a 100°C e posteriormente por uma fusão a $111,02^\circ\text{C}$. No termograma obtido verificou-se uma endoterma de fusão á $120,60^\circ\text{C}$ (FIGURA 62) sugerindo a existência de uma nova forma cristalina, possivelmente mais estável que as citadas anteriormente, em termos de estabilidade termodinâmica.

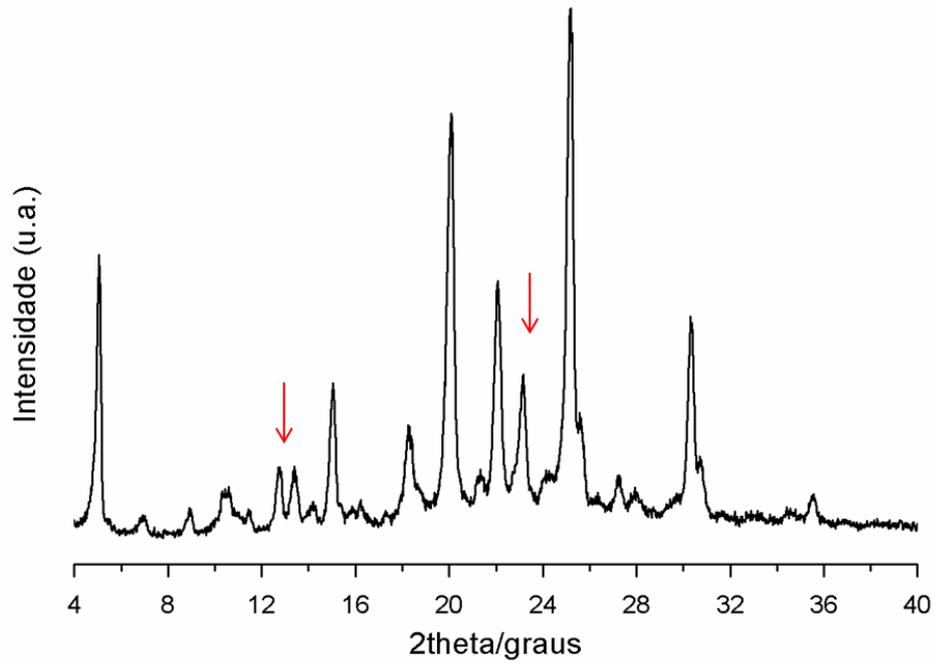


FIGURA 61 - Difratoograma de Raios-X do TDF.

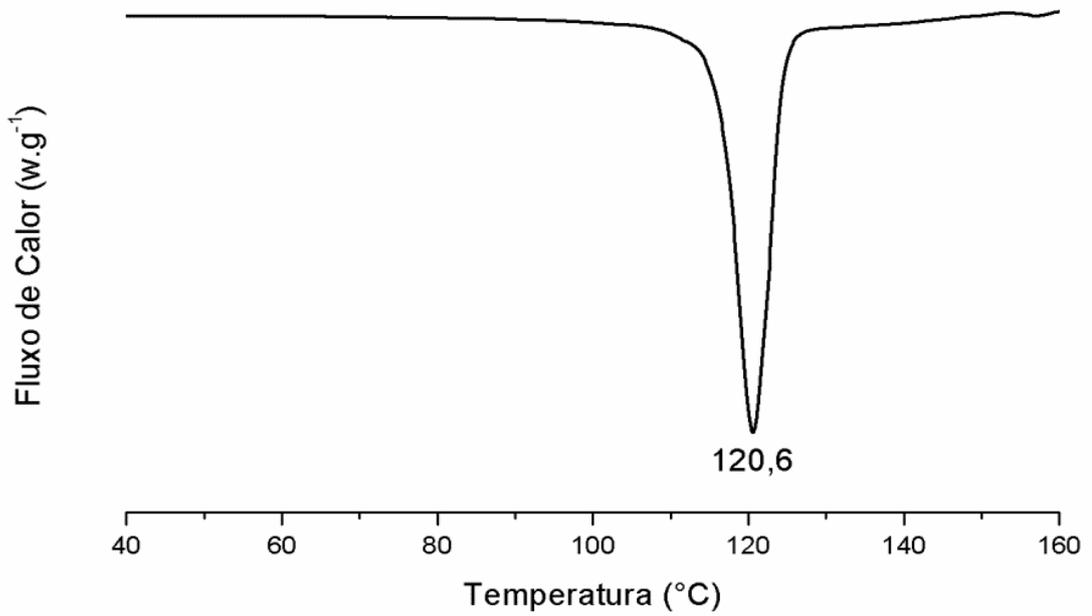


FIGURA 62 - Termogramas de DSC do TDF.

7.4- CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos, tanto pela técnica de RMN no estado sólido quanto pelas técnicas de raios-X e DSC, conclui-se que o TDF se encontra em uma nova forma polimórfica que difere das formas já descritas na literatura para este fármaco.

CONCLUSÕES GERAIS

8 – CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos por RMN no estado sólido mostraram-se de grande relevância no estudo da química supramolecular dos sólidos farmacêuticos avaliados, sendo possível contribuir para o estudo estrutural de formas farmacêuticas, identificar formas polimórficas de fármacos, averiguar transições de fases tanto nos API quanto em amostras comerciais e verificar a presença de interações moleculares (intermolecular e intramolecular) por meio de RMN bidimensional.

Neste trabalho foi mostrado que esta técnica apresenta um grande potencial, configurando-se como uma ferramenta com ampla aplicabilidade para a caracterização de novos polimorfos, mas que certamente deve ser aplicada em conjunto com outras técnicas de forma a aproveitar a complementaridade oferecida quando diferentes técnicas são utilizadas em conjunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPERLEY, D. C.; HARRIS, R. K. & HODGKINSON, P. "Solid State NMR: Basic Principles & Practice Solid State NMR". 1a ed. New York, Momentum Press, 2012.

ARAUJO, G.L.B.; FARIA, D.L.A.; ZAIM, M.H.; CARVALHO, F.M.S.; ANDRADE, F.R.D. & MATOS, J.D.R. "Thermal studies on polymorphic structures of tibolone". J Therm Anal Calorim., 102 (1): 233, 2010.

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.

BERNSTEIN, J. "Polymorphism in Molecular Crystal". New York: Oxford University Press, 2002.

BLAGDEN, N.; DE MATAS, M.; GAVAN, P. T. & YORK, P. "Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates". Adv. Drug Deliv. Ver., 59 (7): 617, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 02 de março de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Glossário de Definições Legais. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/glossario/glossario_b.htm>; Acesso em :23 de novembro de 2015.

BERNAL, A.; COUTO, B.; BREVIGLIERI, S.T.; CAVALHEIRO, É.T.G. "Influence of some experimental parameters on the results of differential scanning calorimetry – DSC". Quim. Nova, **25**: 849, 2002.

BRECHTL, J.R.; BREITBART, W.; GALIETTA, M.; KRIVO, S. & ROSENFELD, B. "The use of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with advanced HIV infection: impact on medical, palliative care, and quality of life outcomes". J Pain Symptom Manage, 21 (1): 41, 2001.

BRITAIN, H. G. "Effects of mechanical processing on phase composition" J. Pharm. Sci., **91**: 1573, 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.
- CAIRA, M. R.; DEKKER, T. G. & LIEBENBERG, W. "Structure of a 1:1 complex between the anthelmintic drug mebendazole and propionic acid". *J. Chem. Crystallogr.*, 28 (1): 11, 1998.
- CANEVAROLO JR, S.V. "Técnicas de caracterização de polímeros". 1ª ed. Artliber editora, São Paulo, 2007.
- CAVALCANTI, N.C.T.; SOUSA, G.D.; TABOSA, M.A.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; LEAL, L.B. & SANTANA, D.P. "Assay and physicochemical characterization of the antiparasitic albendazole". *Braz. J. Pharm. Sci.*, **48**: 281, 2012.
- CHATTAH, A. K.; ZHANG, R.; MROUE, K.H.; PFUND, L. Y.; LONGHI, M. R. RAMAMOORTHY, A. & GARNERO, C. "Investigating Albendazole Desmotropes by Solid-State NMR Spectroscopy". *Mol. Pharm.*, **12**: 731, 2015.
- CHIEROTTI, M. R. & GOBETTO, R. "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.
- CHILDS S.L.; STAHLY G.P. & PARK A. "The salt-cocystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state". *Mol. Pharm.* **4**: 323, 2007.
- DESIRAJU, G. R. "Crystal engineering: A brief overview". *J. Chem. Sci.*, 122 (5): 667, 2010.
- FERREIRA, M. J. G.; GARCÍA, A.; LEONARDI, D.; SALOMON, C. J.; LAMAS, M. C. & NUNES, T. G. "13C and 15N solid-state NMR studies on albendazole and cyclodextrin albendazole complexes". *Carbohydr. Polym.* **123**:130, 2015.
- 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.
- GALLANT, J. E. & DERESINSKI, S. "Tenofovir disoproxil fumarate". *Clin. Infect. Dis.*, **37**: 944, 2003.
- GARBUIO, A.Q.P.; HANASHIRO, T.; MARKMAN, B.; FONSECA, F.L.A.; PERAZZO, F. F. & ROSA, P. C. P. "Evaluation and study of mebendazole polymorphs present in raw materials and tablets available in the Brazilian pharmaceutical market". *J. App. Pharm. Sci.*, 4 (11): 1, 2014.

GOMES, E.C.L.; MUSSEL, W.N.; RESENDE, J.M.; FIALHO, S.L.; BARBOSA, J. & CARIGNANI, E. "Characterization of tenofovir disoproxil fumarate and its behavior under heating". *Crystal Growth & Design*, 15 (4): 1915, 2015.

HIGGINS, J., ZHOU, X., LIU, R., & HUANG, T. T. S. "Theoretical study of thermal decomposition mechanism of oxalic acid". *J. Phys. Chem. A*, 101(14): 2702, 1997.

HILFIKER, R. "Polymorphism in the pharmaceutical industry, Wiley-VHC: Weinheim". 2006.

HONORATO, S.B. Polimorfismo em fármacos. Fortaleza, Curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, 2009. Tese de doutorado, 156p.

ISLÁN, M. A & MONTES, M. E. "Polimorfismo farmacéutico: repercusiones industriales y farmacocinéticas". *Offarm: Farmacia y Sociedad*. 25 (8): 94, 2006.

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. Bio., Anal.* **51**: 512, 2010.

KHAN, M., ENKELMANN, V. & GUNTHER, B. "Heterosynthon mediated tailored synthesis of pharmaceutical complexes: a solid-state NMR approach". *Cryst Eng. Comm.*, **13**: 3213, 2011.

KHOMANE, K. S.; MORE, P. K.; RAGHAVENDRA, G. & BANSAL, A. K. "Molecular Understanding of the Compaction Behavior of Indomethacin Polymorphs". *Mol. Pharm.*, **10**: 631, 2013.

KIPP, J. E. "The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs". *Int. J. Pharm.*, 284(1-2):109, 2004.

KRATOCHVIL, B. "Solid forms of pharmaceutical molecules". In Prague Institute of Chemical Technology. 2011.

LEE, E.H.; SMITH, D.T.; FANWICK, P.E. & BYRN, S.R. "Characterization and Anisotropic Lattice Expansion/Contraction of Polymorphs of Tenofovir Disoproxil Fumarate". *Crystal Growth & Design.*, 10 (5): 2314, 2010.

LEE, J.; BOERRIGTER, S. X. M.; JUNG, Y. W.; BYUN, Y.; YUK, S. H.; BYRN, S. R.; LEE, E. H. "Organic Vapor Sorption Method of Isostructural Solvates and Polymorph of Tenofovir Disoproxil Fumarate", *Eur. J. Pharm. Sci.* **50**: 253, 2013.

LLINAS, A. & GOODMAN, J.M. "Polymorph control: past, present and future". *Drug Discovery Today*, 13 (5/6): 198, 2008.

- LUCZAKA, A; JALLOB, L. J.; DAVEB, R. N. & IQBAL, Z. "Polymorph stabilization in processed acetaminophen powders". Powder Technology, **236**: 52, 2013.
- MANADAS, R.; PINA, M.E. & VEIGA, F. "A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada". Rev. Bras. Cien. Farm. São Paulo, 38 (4): 375, 2002.
- 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.
- MARTÍNEZ, P. B. & NAVARRO, M. G. "Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos y Operaciones Básicas". Tecnología Farmaceutica. Vila Jato, J. L.; Síntesis: Madrid, 2001. vol I.
- McCRONE, W.C. "In Physics and chemistry of the organic solid state". **2**: 725, 1965.
- MIRZA, S.; MIROSHNYK, I.; HEINÄMÄKI, J. & YLIRUUSI, J. "Co-crystals: an emerging approach for enhancing property of pharmaceutical solids". 24 (2): 90, 2008.
- MISHRA, S.; AYALA, A. P. ; HONORATO , S. B. & SIESLER, H. W. "Molecular Structure and Vibrational Spectroscopic Investigation of Secnidazole Using Density Functional Theory". J. Phys. Chem. A., 113 (1): 273, 2009.
- MOHANACHANDRAN, P.S., SINDHUMO, P.G., KIRAN, T.S. Enhancement of solubility and dissolution rate: an overview. Int. J. of Comp. Pharm., **4**: 1, 2010.
- MONOSSETTE, S. L.; ALMARSSON, Ö.; PETERSON M. L.; REMENAR, J. F.; READ, M. J.; LEMMO, A. V.; ELLIS, S.; CIMA, M. J. & GARDNER, C. R. "High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids". Adv. Drug. Deliv. Rev., 56 (3): 275, 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.
- MORIWAKI, C.; COSTA, G.L.; FERRACINI, C.N.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M.; PINEDA, E.A.G. & MATIOLI, G. "Enhancement of solubility of albendazole by complexation with β -cyclodextrin". Brazilian J .Chem. Eng., **25**: 255, 2008.
- NANGIA, A. "Supramolecular chemistry and crystal engineering". J. of Chem. Sci., 122 (3): 295, 2010.

NASCIMENTO, A.C. & SANTANA, C.C. "Resolução enantiomérica do secnidazol". *Revista de Engenharia e Tecnologia.*, 3 (2): 64, 2011.

OMAR, W. & ULRICH, J. "Solid Liquid Equilibrium, Metastable Zone, and Nucleation Parameters of the Oxalic Acid–Water System". *Cryst. Growth Des.*, 6 (8): 1927, 2006.

PAULA, K. ; CAMÍ, G. E. ; BRUSAU, E. V. ; NARDA, G. E. & ELLENA, J. "Mebendazole Mesylate Monohydrate: A New Route to Improve the Solubility of Mebendazole Polymorphs". *J. Pharm. Sci.*, 102 (10): 3528, 2013.

PEDREIRO, L. N." Desenvolvimento e caracterização de dispersão sólida com propriedade mucoadesiva para liberação de zidovudina". Araraquara, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas-UNESP, 2012. Dissertação de mestrado, 98 p.

PINDELSKA, E.; SOKAL, A.; SZELESZCZUK, L.; PISKLAK, D. M. & KOLODZIEJSKI, W. "Solid-state NMR studies of theophylline co-crystals with dicarboxylic acids". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **100**: 322, 2014.

PRANZO, M.B.; CRUICKSHANK, D.; CORUZZI, M.; CAIRA, M.R. & BETTINI, R. "Enantiotropically related albendazole polymorphs". *J. Pharm. Sci.*, 99 (9): 3731, 2010.

RIVERA, A.B.; HERNANDEZ, R.G.; NOVOA DE ARMAS, H.; ELIZASTEGI, D.M. & LOSADA, M.V. "Physico-chemical and solid-state characterization of secnidazole". *Farmaco.*, **55**: 700, 2000.

RUSSO, M. G. ; SANCHO, M. I. ; SILVA, L. M.A. ; BALDONI, H. A. ; VENANCIO, T. ; ELLENA, J. & NARDA, G. E. " Looking for the interactions between omeprazole and amoxicillin in a disordered phase. An experimental and theoretical study". *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **156**: 70, 2016.

SEKHON, B.S. "Pharmaceutical co-crystals-a review". *ARS Pharm.*, 50 (3): 99, 2009.

SHAH, N.; IYER, R. M.; MAIR, H.J.; CHOI, D.S.; TIAN, H.; DIODONE, R.; et al. "Improved human bioavailability of vemurafenib, a practically insoluble drug, using an amorphous polymer-stabilized solid dispersion prepared by a solvent-controlled coprecipitation process". *J Pharm Sci.*, 102(3): 967, 2013.

SHETE, G.; PURI, V.; KUMAR, L. & BANSAL, A. K. "Solid State Characterization of Commercial Crystalline and Amorphous Atorvastatin Calcium Samples". *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **11**: 598, 2010.

SHEWALE, S.; SHETE, A. S.; DOIJAD, R. C.; KADAM, S. S.; PATIL, V. A., & YADAV, A. V. "Formulation and Solid State Characterization of Nicotinamide-based Co-crystals of Fenofibrate". *Indian J. of Pharm. Sci.*, 77 (3): 328, 2015.

SILVA, C.C.P. "Caracterização de estado sólido de insumos farmacêuticos ativos: clorpropamida, nevirapina e dietilcarbamazina". Dissertação (Mestrado em ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

SKIBA, M.L.; COQUARD, A.; BOUNOURE, F.; VÉRITÉ, P.; ARNAUD, P. & SKIBA, M. "Mebendazole complexes with various cyclodextrins: preparation and physicochemical characterization". *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 57:197, 2007.

STAHLY, G.P. "Diversity in single and multiple component crystals: the search for and prevalence of polymorphs and cocrystals". *Crystal Growth & Design*. 7 (6): 1007, 2007.

STEED, J. W. "The role of co-crystals in pharmaceutical design". *Trends Pharmacol. Sci.*, 34 (3): 185, 2013.

STEINER, T. "Competition of hydrogen-bonded acceptors for the strong carboxyl donors". *Acta Crystallogr.B*, 57: 103, 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, 2003a.

SWANEPOEL E.; LIEBENBERG W. & VILLIERS M.M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. *Eur J Pharm Biopharm.* 55: 345, 2003b.

TONGLEI, L. & SHAOXIN, F. "Study of crystal packing on the solidstate reactivity of indomethacin with density functional theory". *Pharm Res.*, 22 (11): 1964, 2005.

TORRADO, S.; TORRADO, S.; CADORNIGA, R. & TORRADO, J.J. "Formulation parameters of albendazole solution". *Int. J. Pharm.*, 140: 45, 1996.

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.

VISHWESHWAR, P.; MCMAHON, J. A.; BIS, J. A. & ZAWOROTKO, M. J., Pharmaceutical co-crystal. *J. Pharm. Sci.*, 95 (3), 499, 2006.

VOGT, F.G.; CLAWSON, J.S.; STROHMEIER, M.; EDWARDS, A.J.; PHAM, T.N. & WATSON, S.A. "Solid- state NMR analysis of organic cocrystals and complexes". Cryst. Growth Des., 9 (2): 921, 2009.

VOGT, F. G. "Characterization of Pharmaceutical Compounds by Solid-state NMR". eMagRes, 4: 255, 2015

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

YU, L. X.; FURNESS, M. S.; RAW, A.; WOODLAND, K. P.; NASHED, N. E.; RAMOS, E.; MILLER, S.P. F.; ADAMS, R. C.; FANG, F.; PATEL, R. M.; HOLCOMBE, F. O. JR.; CHIU, Y. & HUSSAIN, A.S. "Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications". Pharm Res., 20: 531, 2003.

ZHANG, G. G. Z.; LAW, D.; SCHMITT, E. A. & QIU, Y. "Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms". Advanced Drug Delivery Reviews, 56: 371, 2004.

ZHANG G.G.Z.; HENRY R.F.; BORCHARDT T.B. & LOU, X. "Efficient cocrystal screening using solution-mediated phase transformation". J Pharm. Sci., 96: 990, 2007.