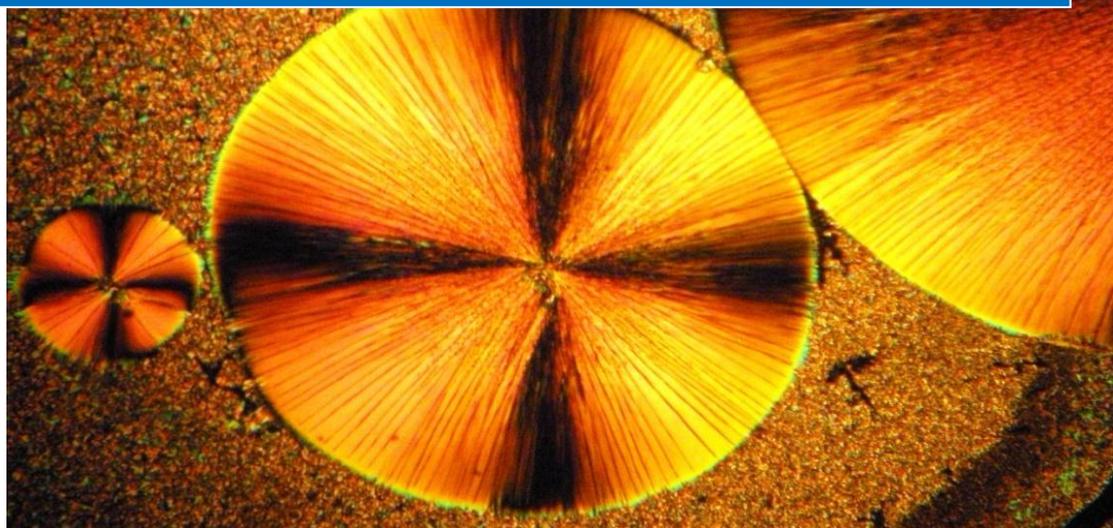




Universidade
Federal do Ceará

Polimorfismo em Fármacos



Sara Braga Honorato

Departamento de Física

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

SARA BRAGA HONORATO

POLIMORFISMO EM FÁRMACOS

FORTALEZA

2009

SARA BRAGA HONORATO

POLIMORFISMO EM FÁRMACOS

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Física.

Área de concentração: Física da Matéria Condensada

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala

FORTALEZA

2009

A748p Honorato, Sara Braga
Polimorfismo em fármacos/ Sara Braga Honorato. – Fortaleza:
[s.n], 2009.
156 f. : il. ; enc.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,
2009.

1. Física do Estado Sólido. 2. Drogas. I. Título.

CDD 530.41

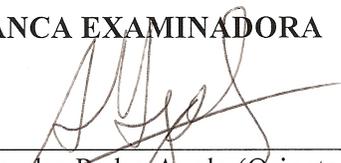
Sara Braga Honorato

Polimorfismo em fármacos, hidratos e sais: estudo das propriedades de estado sólido

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Física, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Física.

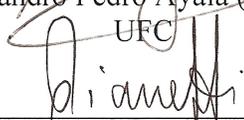
Aprovada em 10 / 08 / 2009

BANCA EXAMINADORA



Dr. Alejandro Pedro Ayala (Orientador)

UFC



Dr. Gerson Antônio Pianetti

UFMG



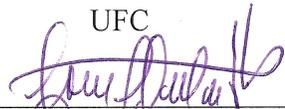
Dra. Nereide Stela Santos Magalhães

UFPE



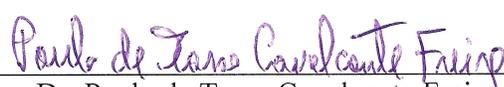
Dr. Manoel Odorico de Moraes

UFC



Dr. Josué Mendes Filho

UFC



Dr. Paulo de Tarso Cavalcante Freire

UFC

Em primeiro lugar a Deus...
Aos meus pais, Maria José e Honorato,
pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A elaboração de um trabalho para uma tese de doutorado é um esforço coletivo, mesmo que a redação seja redigida por uma pessoa. Muitos parâmetros corroboram para a composição, quer seja uma conversa casual que acontece com algum professor ou amigo, ou algum evento que se vai e abre sua mente para fazer novos experimentos, vislumbrar novas áreas, ou até mesmo uma disciplina que se estuda na faculdade. Pois bem, a história desse trabalho começou com uma disciplina opcional de Física Moderna que resolvi me matricular durante o meu curso de graduação. Ao cursar essa disciplina conheci o professor Alejandro Pedro Ayala, meu orientador nesta tese, que se mostrou uma pessoa acessível e dedicada à pesquisa, incentivando-me sempre. Acabei fazendo o mestrado na minha área de formação, em Química Inorgânica. Durante esse período continuamente recorria à física para usar equipamentos ou até mesmo apenas para esclarecer algumas dúvidas sobre espectroscopia e fui percebendo que esta área me interessava e muito. Posteriormente, então, optei em fazer o doutorado no Departamento de Física e venho aqui, por meio desta, agradecer a todos que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Primeiramente gostaria de agradecer ao Departamento de Física e em especial ao Curso de Pós-Graduação em Física pela oportunidade oferecida e por me receber tão generosamente de braços abertos durante esses quatro anos.

Meus agradecimentos ao professor Alejandro Pedro Ayala por acreditar no meu potencial, pela orientação, ajuda constante, enorme dedicação em todas as etapas deste trabalho, e principalmente, pelo bom convívio nesses anos.

Ao professor Josué Mendes Filho que sempre nos passa ensinamentos com sua experiência e pelo seu esforço incessante em proporcionar boas condições de trabalho.

Aos membros da banca, por aceitarem participar desta defesa e contribuir para a sua melhora.

Aos professores do Departamento de Física da UFC, Francisco Erivan, Maria Marlúcia, Paulo de Tarso, Antônio Gomes, José Soares Andrade Jr., Eloneid Felipe, Ilde Guedes, Raimundo Nogueira, Valder Freire, Jeanlex Souza e Eduardo Bedê, pela acolhida e valiosos ensinamentos.

Ao Professor Javier Alcides Ellena do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) pela participação ativa nesse projeto, pelas frutíferas discussões e ajuda com a resolução das estruturas cristalinas.

À Doutora Núbia Boechat e ao Jorge Souza Mendonça do Farmanguinhos/Fiocruz, pelas valorosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho e que gentilmente forneceram as amostras de benzonidazol e dietilcarbamazina.

À Professora Poonam Tandom da Universidade de Lucknow (Índia), pela colaboração nas simulações computacionais.

À Agência Córdoba Ciência da Argentina (Unidade CEPROCOR), pelo uso das instalações durante o estágio sanduíche e ao Alejandro Germanier, pesquisador da agência e chefe do grupo, por facilitar minha estadia enormemente dando todo o suporte necessário.

Ao professor Alberto Wolfenson da Universidade Nacional de Córdoba (Faculdade de Matemática, Astronomia e Física) e à doutora Silvia Cuffini da CEPROCOR, pelos imensos esforços em me acomodar bem na Argentina, pela amizade, atenção e afabilidade.

À professora Maria Elizabete Amaral de Moraes e ao professor Manoel Odorico de Moraes da Unidade de Farmacologia Clínica (UNIFAC) pela atenção de sempre e inestimável apoio, em especial por proverem infra-estrutura para os testes de dissolução do mebendazol.

À professora Nágila Ricardo pelo estímulo e conselhos.

Ao professor José Marcos Sasaki por disponibilizar o laboratório de raios X e à Joseane Alves pelas medidas.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Física, Francisco Ferreira, Arian Paulo, Alexandre Paschoal, Márcia de Windsor, Acrisio Lins, Tayroni Alves, Daniel Matos, Euzenil de Oliveira, Luciana Magalhães, Erivelton Façanha, Francisco Franciné, Marcelo Zimmer, Ricardo Pires, Sérgio Gomes, Aldilene Saraiva, Cleânio Lima, Daniela Maionchi, Luciana Angélica, João Cláudio, Mairton Cavalcante, Bruno Abagaro, José Júnior, Talita Vasconcelos, Cláudio Lucas, Sara Rocha, Diniz Maciel, José Silva e Gilberto Saraiva pelo companheirismo e momentos compartilhados ao longo desses anos.

Ao Clenilton Costa dos Santos pela valiosa ajuda na formatação e inúmeras discussões e ao Eder Nascimento Silva pelo grande apoio nas várias etapas do doutorado.

Aos integrantes do grupo de Cristalografia do IFSC-USP, em especial ao Felipe Martins, Rodrigo Corrêa, Cecília Carolina, Leandro Ribeiro e Marcelo Barbosa pelas inúmeras conversas sobre a técnica de raios X.

Aos técnicos de raios X do IFSC-USP, José Augusto Lopes e José Geraldo Catarino.

Aos colegas da CEPROCOR Maribel Ferro, Gabriela Castelli, Romina Collino, Lara Antonini, Gabriel Spahn, Silvia Farfán e Cecilia Taballione pelas conversas e ajuda durante o período que estive na Argentina e pela amizade que mantemos até hoje.

Aos amigos da química, Marília Oliveira, Leônia Gonzaga, Fabíola Odete, Durcilene Alves, Jeanny Maciel, Pablyana Leila, Maria Elenir, Johnny Peter, Igor Marques, Célio Feitosa e Walber Ribeiro.

Aos funcionários do Departamento de Física, em especial o pessoal da coordenação da pós-graduação, Rejane Coelho e Ana Cleide Sampaio, da coordenação da graduação, Maria Creusa da Silva e Michelle Baracho, aos rapazes da eletrônica, Everton Prata, Edmar Lima e da oficina mecânica, Francisco Sales de Lima e Ronaldo Pereira da Silva.

Ao pessoal da biblioteca pela presteza em todos os momentos necessários.

Aos meus pais, Maria José e Antônio Honorato, irmãos e familiares pelo incentivo.

À duas grandes amigas cuja companhia foi e é fundamental pra mim, Milena Melo e Andrea Pires.

À FUNCAP e ao CNPq pela provisão da bolsa de doutorado, e à CAPES pela bolsa do estágio sanduíche.

[...]

Existe um outro tipo de tentação, mais perigosa ainda. Essa é a doença da curiosidade (...) É ela que nos leva a tentar descobrir os segredos da natureza, aqueles segredos que estão além da nossa compreensão, que não nos podem trazer nada e que os homens não devem desejar aprender (...) Nessa imensa selva, cheia de armadilhas e perigos, tenho me afastado, e me mantido longe desses espinhos. No meio de todas essas coisas que flutuam incessantemente à minha volta no dia a dia, nada jamais me surpreende, e eu nunca sou tomado por um desejo genuíno de estudá-las (...) Eu não sonho mais com as estrelas.

Santo Agostinho de Hipona [cit. em Sagan, C. "The Dragons of Eden", p. 247]

RESUMO

O polimorfismo é a habilidade de um material existir em mais de uma forma cristalina. É bem estabelecido que os fármacos podem existir em diversas formas polimórficas e estas propriedades possuem um impacto na qualidade/desempenho dos medicamentos, tais como a estabilidade química, a dissolução e a biodisponibilidade. A proposta desse trabalho foi realizar uma caracterização e monitoração das propriedades do estado sólido de quatro princípios ativos farmacêuticos bastante utilizados no mercado brasileiro. Estes fármacos foram escolhidos com o intuito de investigar alguns dos aspectos mais relevantes do polimorfismo. O mebendazol foi utilizado para demonstrar o efeito da estrutura cristalina na solubilidade e também o possível comprometimento da biodisponibilidade de comprimidos do mesmo. O estudo do benzonidazol confirma a necessidade de uma caracterização cuidadosa das formas sólidas. Após quase cinquenta anos de uso no combate da doença de Chagas, esse trabalho mostrou que o benzonidazol exibe pelo menos três polimorfos os quais podem ser estabilizados à temperatura ambiente e poderiam afetar seu desempenho. Com o secnidazol uma família de formas sólidas de uso muito freqüente foi investigada, os hidratos. Este IFA é ministrado na forma de um hemihidrato. A estabilidade desta estrutura foi averiguada e o processo de desidratação monitorado. A existência de polimorfos na fase anidra foi verificada. Finalmente, a dietilcarbamazina foi eleita como exemplo de um fármaco utilizado na forma de sal, neste caso um citrato. Tanto o sal como o composto base foram estudados por diversas técnicas de caracterização em estado sólido e as propriedades físico-químicas de ambos foram comparadas. Neste caso, quatro formas cristalinas do sal foram encontradas mostrando que o polimorfismo não é uma propriedade exclusiva de sistemas mono-componentes. Em geral, os resultados desse trabalho demonstram como o uso combinado dos métodos da Física do Estado Sólido fornece uma descrição detalhada de propriedades importantes para o entendimento do fenômeno do polimorfismo em fármacos, dando suporte ao desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes.

Palavras-chaves: polimorfismo, mebendazol, secnidazol, benzonidazol, dietilcarbamazina, estrutura cristalina, espectroscopia vibracional, análise térmica.

ABSTRACT

Polymorphism is the ability of a solid material to exist in more than one crystalline structure. It is well established that pharmaceutical solids could exhibit diverse polymorphic forms and these properties have a direct impact in the drug quality/performance, such as chemical stability, dissolution and bioavailability. The proposal of this work was to characterize and monitor the solid state properties of four active pharmaceutical ingredients regularly used in the Brazilian market. These drugs had been chosen in order to investigate some of the most significant aspects of polymorphism. Mebendazole was used to demonstrate the effect of the crystal structure on the solubility and, therefore, the possible reduction of the bioavailability of tablets. The study of benzonidazole has confirmed the necessity of a careful characterization of the solid forms. After nearly fifty years of being used in the combat of Chagas' disease, our work showed that this compound exhibits at least three polymorphs, which can be stabilized at room temperature and could affect its performance. With the secnidazole we investigate a family of solid forms frequently used in formulations, the hydrates. This drug is delivered in the form of a hemi-hydrate. The stability of this structure was investigated and the process of dehydration was monitored. The existence of polymorphs in the anhydrous phase was also confirmed. Finally, the diethylcarbamazine was chosen as an example of a formularization based on a salt, in this case a citrate. Both the salt and the base compound were studied by diverse solid state techniques and the corresponding physicochemical properties were compared. In this case, four crystal forms of the salt had been found showing that the polymorphism is not a property exclusive of mono-component systems. In general, the results of this work demonstrated that by combining Solid State Physics methods it is possible to obtain a detailed description of properties which are relevant for the understanding of the polymorphism phenomenon providing additional support to the development of safe and efficient medicines.

Keywords: polymorphism, mebendazole, benzonidazole, secnidazole, diethylcarbamazine, crystal structure, vibrational spectroscopy, thermal analysis.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1 Introdução.....	1
2 Mebendazol.....	13
2.1 Introdução.....	13
2.2 Materiais e Métodos.....	16
2.3 Resultados.....	17
2.4 Conclusões.....	26
3 Benzonidazol.....	28
3.1 Introdução.....	28
3.2 Preparação dos cristais.....	31
3.3 Estruturas Cristalinas.....	33
3.4 Espectroscopia Vibracional.....	38
3.5 Análise Térmica.....	41
3.5.1 Termogravimetria.....	41
3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	42
3.6 Termomicroscopia polarizada.....	44

3.7	Difração de raios X de pó	46
3.8	Diagrama de energia/temperatura.....	47
3.9	Conclusões.....	50
4	Secnidazol.....	51
4.1	Introdução	51
4.2	Detalhes experimentais.....	52
4.3	Estrutura Cristalina e Difração de raios X.....	54
4.4	Espectroscopia Vibracional	58
4.4.1	Detalhes Computacionais	58
4.4.2	Otimização da Geometria.....	58
4.4.3	Espectro vibracional	59
4.4.4	Transições de fase.....	69
4.5	Análise térmica	70
4.5.1	Termogravimetria	71
4.5.2	Calorimetria Exploratória Diferencial	73
4.6	Termomicroscopia polarizada	75
4.7	Transições de fase.....	76
4.8	Conclusões.....	79
5	Dietilcarbamazina.....	80
5.1	Introdução	80
5.2	Preparação dos cristais.....	82
5.2.1	Cristalização da DEC	83
5.2.2	Cristalização do DEC-CIT	83
5.3	Estruturas Cristalinas.....	84
5.4	Análise Térmica.....	92
5.4.1	Termogravimetria	92
5.4.2	Calorimetria Exploratória Diferencial	95

5.5	Espectroscopia Vibracional	96
5.6	Transições de fase.....	99
5.6.1	Análise Térmica.....	99
5.6.2	Relações termodinâmicas entre as fases do DEC-CIT	100
5.6.3	Espectroscopia Raman dependente da temperatura.....	102
5.7	Conclusões.....	104
6	Considerações Finais	105
7	Referências	112
8	Anexo A	124
9	Anexo B.....	134

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Medicamentos em escala mundial desenvolvidos entre 1975 e 2004 [10,11].	2
Figura 1.2. Diagrama dos diferentes tipos de formas sólidas.	4
Figura 1.3. Diagramas de fase de energia livre para sistemas polimórficos. (a) sistema enantiotrópico; (b) sistema monotrópico [49].	6
Figura 1.4. Esquema de classificação para sólidos orgânicos.	8
Figura 1.5. Concentração no plasma do (a) cloranfenicol e (b) ácido mefenâmico em função do tempo [63].	10
Figura 1.6. Solubilidade relativa entre 81 pares de polimorfos de 55 compostos [64].	10
Figura 2.1. Estrutura molecular do MBZ.	13
Figura 2.2. (a) Curva de TG para os polimorfos do MBZ. (b) Curva de DSC para os polimorfos do MBZ.	18
Figura 2.3. Difractogramas de raios X dos polimorfos do MBZ.	18
Figura 2.4 Espectros Raman dos polimorfos do MBZ.	19
Figura 2.5. Espectro vibracional na região do infravermelho próximo dos polimorfos do MBZ.	19
Figura 2.6. Espectro vibracional na região do infravermelho médio dos polimorfos do MBZ.	20
Figura 2.7. Comparação dos espectros Raman dos polimorfos A e C do MBZ com espectros representativos dos comprimidos investigados.	21
Figura 2.8. Comparação dos espectros no infravermelho próximo dos polimorfos A e C do MBZ com espectros representativos dos comprimidos investigados.	21
Figura 2.9. Perfis de dissolução do MBZ em função da concentração do polimorfo C em HCl 0,1 N contendo 1% (meio I) e 0% (meio II) de lauril sulfato de sódio.	23
Figura 2.10. Porcentagem de amostra dissolvida em 120 min em função da concentração do polimorfo C do MBZ usando o método da USP 30 (meio I) e o método modificado (meio II).	24
Figura 2.11. Perfis de dissolução de comprimidos comerciais do MBZ em HCl 0,1N contendo 1% (meio I) e 0% (meio II) de lauril sulfato de sódio.	25
Figura 3.1. Fórmula estrutural do BZN.	29

Figura 3.2. (a) Imagens de MEV da matéria prima do BNZ. (b) Resultado da cristalização.	33
Figura 3.3. Cella unitária do BNZ.	34
Figura 3.4. Unidade assimétrica do BNZ na estrutura cristalina.	35
Figura 3.5. Projeção ao longo do eixo cristalográfico a mostrando os arranjos de ligações de hidrogênio do BZN.	36
Figura 3.6. Interações do tipo C-H...N e C-H...O observadas entre as moléculas do BZN ao longo do eixo cristalográfico b.	36
Figura 3.7. Comparação entre os difratogramas experimental e calculado do BZN.	38
Figura 3.8. Espectros de espalhamento Raman e de absorção no infravermelho do BZN.	39
Figura 3.9. Espectro vibracional na região do infravermelho próximo do BZN.	41
Figura 3.10. Curva de TG para o BZN mostrando no detalhe os espectros de FT-IR dos gases liberados durante a varredura de temperatura.	42
Figura 3.11. Curva de DSC do BZN.	43
Figura 3.12. Termogramas de ciclos sucessivos de aquecimento resfriamento no BNZ.	45
Figura 3.13. Termomicroscopia polarizada do BZN. (a) amostra recristalizada; (b) fundida e recristalizada com sementes da forma I; (c) fundida e resfriada rapidamente; (d) 60°C; (e) 100°C e (f) 160°C.	46
Figura 3.14. Detalhe do espectro de difração de raios X em pó do BNZ comparando o padrão calculado com a matéria prima e a recristalização após a fusão da mesma.	47
Figura 3.15. Diagrama Energia/temperatura dos polimorfos do BZN.	50
Figura 4.1. Fórmula estrutural do SNZ.	51
Figura 4.2. Comparação do padrão de raios X experimental e calculado (estrutura cristalina do hemihidrato de SNZ).	53
Figura 4.3. (a) Imagem de microscopias eletrônica e (b) óptica polarizada do SNZh.	53
Figura 4.4. Empacotamento das celas unitárias do SNZh ao longo do eixo a.	54
Figura 4.5. Unidade assimétrica da estrutura cristalina do SNZh.	55
Figura 4.6. Representação das ligações de hidrogênio clássicas do composto SNZh.	56
Figura 4.7. Representação das ligações de hidrogênio não-clássicas do composto SNZh.	57

Figura 4.8. Comparação entre as geometrias das conformações experimental e otimizada do SNZ.....	59
Figura 4.9. Espectros Raman experimental e calculado do SNZ na região de 300-1650 cm^{-1} e em 2600-3900 cm^{-1} (O detalhe mostra os espectros Raman na região de 30-300 cm^{-1}).	65
Figura 4.10. Espectros de absorção no infravermelho experimental e calculado do SNZ nas regiões 400-1650 cm^{-1} e 2700-3900 cm^{-1}	65
Figura 4.11. Comparação dos espectros Raman do SNZh (30°C) e na forma fundida (90°C) com uma forma obtida com cálculos de DFT.....	70
Figura 4.12. Análise térmica diferencial e termogravimétrica do SNZh.....	72
Figura 4.13. Infravermelho dos gases liberados durante a decomposição do SNZh.....	72
Figura 4.14. Curvas de DSC dos três aquecimentos sucessivos realizados no SNZh. As temperaturas indicadas correspondem aos <i>onsets</i> dos picos.....	74
Figura 4.15. Diagrama energia/temperatura dos polimorfos do SZNa.....	75
Figura 4.16. Imagens de microscopia óptica polarizada do SNZ em óleo de silicone. (a) 20°C e (b) 70°C; recristalização após a fusão (c) 20°C e (d) 70°C.	76
Figura 4.17. Espectros Raman na região de baixa energia do SNZh no primeiro e segundo aquecimentos.....	78
Figura 4.18. Espectros Raman do SNZh na região de alta energia no primeiro aquecimento.....	78
Figura 5.1. Fórmula estrutural da dietilcarbamazina.....	81
Figura 5.2. Cristais de DEC.....	83
Figura 5.3. Cristais do DEC-CIT crescidos em etanol.	84
Figura 5.4. Cella unitária da estrutura cristalina da DEC.....	85
Figura 5.5. Unidade assimétrica da estrutura cristalina da DEC.....	85
Figura 5.6. Interações intermoleculares da DEC.....	86
Figura 5.7. (a) Arranjo cristalino da DEC. (b) Arranjo cristalino do DEC CIT.....	86
Figura 5.8. Comparação entre os difratogramas experimental e calculado da DEC.....	87
Figura 5.9. Cella unitária do cristal do DEC-CIT.....	88
Figura 5.10. Unidade assimétrica da estrutura cristalina do DEC-CIT.....	89
Figura 5.11. Comparação entre os difratogramas experimental e calculado do DEC-CIT.....	89
Figura 5.12. Interações intermoleculares do DEC-CIT.....	91

Figura 5.13. Superposição das conformações moleculares da DEC encontradas nas estruturas cristalinas da DEC base (azul) e DEC-CIT (laranja).....	92
Figura 5.14. (a) Curva de TG/DTG para a DEC. (b) Espectros de IR dos gases liberados durante a TG da DEC.....	93
Figura 5.15. Comparação dos espectros de Infravermelho da DEC pura e da DEC gás.....	94
Figura 5.16. (a) Curva de TG/DTG para o DEC-CIT. (b) Espectros de IR dos gases liberados durante a TG do DEC-CIT.....	94
Figura 5.17. Comparação dos espectros de Infravermelho dos gases liberados pela DEC e DEC-CIT.....	95
Figura 5.18. Curva de DSC da DEC e do DEC-CIT.....	96
Figura 5.19. Espectros Raman da DEC e do DEC-CIT na região de 30 - 3500 cm^{-1}	97
Figura 5.20. Espectros infravermelho da DEC e do DEC-CIT na região de 400 - 4000 cm^{-1}	98
Figura 5.21. Espectros de Infravermelho da DEC e do DEC-CIT na região de 4000 - 12000 cm^{-1}	98
Figura 5.22. DSC do DEC-CIT em vários ciclos: (a) resfriamento (b) aquecimento a 10K/min e rápido resfriamento (~80K/min) e (c) aquecimento a 10K/min.....	100
Figura 5.23. Espectros Raman do DEC-CIT a baixa temperatura.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Solventes usados nos ensaios de solubilidade com o BZN.	32
Tabela 3.2 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio (distâncias em Å e ângulos em °) do cristal de BZN.	37
Tabela 4.1 - Dados cristalográficos para o SNZa e o SNZh [110].	55
Tabela 4.2 - Distâncias e ângulos para as ligações de hidrogênio do composto SNZh.	57
Tabela 4.3 - Números de onda teóricos e experimentais (cm^{-1}) do SNZh.	61
Tabela 4.4 - Parâmetros termodinâmicos dos picos observados nas curvas de DSC do SNZh e SNZa.	74
Tabela 5.1 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio (distâncias em Å e ângulos em °) do cristal do DEC-CIT.	90
Tabela 5.2 - Parâmetros de cela do DEC-CIT em função da temperatura.	99

LISTA DE ABREVIATURAS

DNDi	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
TDR	Treinamento em Doenças Tropicais
OMS	Organização Mundial de Saúde
P&D	Pesquisa e o Desenvolvimento
PCC	Ponto Crítico de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
MBZ	Mebendazol
USP	United States Pharmacopoeia
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
XRPD	Difração de Raios X de Pó
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NIR	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
MIR	Espectroscopia no Infravermelho Médio
FAR	Espectroscopia no Infravermelho Distante
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
BZN	Benzonidazol
Farmanguinhos	Instituto de Tecnologia em Fármacos
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CIF	<i>Crystallographic Information File</i>
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
TG	Termogravimetria
DTA	Análise Térmica Diferencial
SNZ	Secnidazol
PED	Distribuição de Energia Potencial

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SNZa	Secnidazol Forma Anidra
SNZh	Secnidazol Forma Hemihidrato
DFT	Teoria do Funcional da Densidade
DEC	Dietilcarbamazina
DEC-CIT	Citrato de Dietilcarbamazina
SE	Elétrons Secundários
EBS	Elétrons Dispersados Frontalmente
ATR	Refletância Total Atenuada
ΔG	Energia Livre de Gibbs
Tt	Temperatura de Transição

1 Introdução

A Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (*Drugs for Neglected Diseases initiative*, DNDi) é uma organização de desenvolvimento de fármacos sem fins lucrativos focada em melhorar a saúde e a qualidade de vida de povos que sofrem com doenças negligenciadas. Também chamadas frequentemente de doenças tropicais, são um grupo de infecções endêmicas de populações de baixa renda em regiões de países em desenvolvimento dos continentes Africano, Asiático e Americano. Incluem doenças como malária, tuberculose, tripanossomíase africana (doença do sono), doença de Chagas, dengue, leishmaniose, esquistossomose, oncocercíase, filariose linfática e algumas verminoses [1]. A estimativa de mortes anualmente para as doenças negligenciadas é de 500.000, equivalendo a aproximadamente um quarto das mortes pelo vírus HIV/AIDS e a um meio dos óbitos por malária [2, 3].

Como as doenças negligenciadas afligem principalmente pessoas pobres, não existe incentivo adequado para a Pesquisa e o Desenvolvimento (P&D) de medicamentos para este tipo de doenças. Por isso a DNDi foi fundada em 2003 pelos Médicos Sem Fronteiras e cinco organizações de investigação do setor público: *Kenya Medical Research Institute*, *Indian Council of Medical Research*, *Malaysian Ministry of Health*, Fundação Oswaldo Cruz, o *Institut Pasteur* da França e além disso o PNUD/Banco Mundial/Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS/TDR), que atua como observador permanente da iniciativa [4-8].

Os principais objetivos da DNDi são: desenvolvimento de novos tratamentos relevantes para povos que sofrem com as doenças negligenciadas, pesquisar e desenvolver medicamentos eficazes preenchendo as lacunas que existem em P&D de medicamentos para essas doenças e reforçar a capacidade de pesquisa existente nos países onde as doenças negligenciadas são endêmicas [9].

Em geral, os medicamentos para as doenças negligenciadas foram desenvolvidos há muitos anos, além da complicação de serem difíceis de administrar, com toxicidades significativas, tornaram-se cada vez mais ineficazes devido ao surgimento de resistências. Dos

1.556 fármacos aprovados entre 1975 e 2004, somente 21 (1,3%) foram desenvolvidos especificamente para doenças negligenciadas, mesmo que estas doenças englobassem 11,4% da carga total de doenças (Figura 1.1) [10, 11].

A P&D de medicamentos sempre requer grandes desafios tecnológicos, altos investimentos de capital e é conduzida basicamente pelos incentivos de mercado. Como as pessoas afetadas por doenças negligenciadas não têm poder de compra, a indústria farmacêutica e o setor público dos países ricos praticamente não investem na descoberta de medicamentos para este tipo de enfermidade uma vez que não oferecem suficientes retornos financeiros. Fatores adicionais que contribuem para a falta de interesse em P&D de medicamentos para doenças negligenciadas é a pobre infra-estrutura reguladora em muitos países e fármacos ineficazes.

Os medicamentos genéricos são uma alternativa para tornar acessível o tratamento das doenças negligenciadas. Os genéricos são análogos de produtos farmacêuticos inovadores cujas patentes já expiraram e que contêm o mesmo princípio ativo, dose e forma farmacêutica e é administrado pela mesma via que o medicamento de referência. No Brasil, o Ministério da Saúde mediante a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) avalia os estudos de equivalência e bioequivalência (termo na farmacocinética usado para avaliar a equivalência terapêutica *in vivo* prevista de duas preparações de um mesmo fármaco) e equivalência farmacêutica (verifica se o medicamento cumpre com os testes farmacopéicos, destacando-se os testes de identificação da substância ativa e dos produtos secundários, verificação do teor do fármaco, da dissolução e do perfil de dissolução) entre o genérico e o medicamento de referência para comprovar a sua qualidade. Apesar de todas as exigências para se ratificar a qualidade de um medicamento, tem-se encontrado frequentemente problemas nos testes de dissolução de fármacos que são de fundamental importância na verificação da qualidade de um medicamento e, assim, comprometem-se, desde o início, os testes de bioequivalência [12-15].

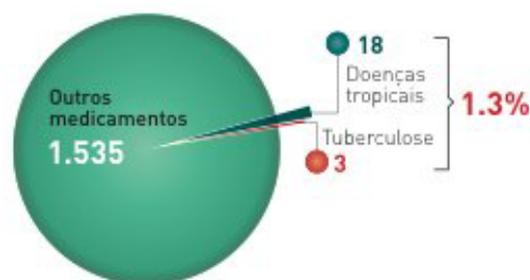


Figura 1.1. Medicamentos em escala mundial desenvolvidos entre 1975 e 2004 [10, 11].

Com todas as complicações vistas que podemos encontrar num medicamento é essencial se estudar melhor os ingredientes farmacêuticamente ativos (IFAs), essencialmente os voltados para as doenças negligenciadas, pois eles possuem uma boa caracterização quanto a sua atividade biológica, mas carecem de investigações de suas propriedades de estado sólido. Embora novas vias de administração para IFAs continuem a ser desenvolvidas, a maioria dos compostos ainda são administrados na forma de dosagem sólida [16]. Qualquer característica que possa afetar a estabilidade ou a disponibilidade do fármaco na forma de dosagem sólida deve ser monitorada e controlada. Portanto, a caracterização físico-química dos sólidos tornou-se uma área extremamente importante [17-26]. Uma questão relevante diz respeito à reatividade química dos IFAs, onde a atenção é concentrada nas reações de estado sólido que ocorrem na grande maioria dos fármacos ou em suas formas de dosagem [27]. Outra área igualmente fundamental do estado sólido em produtos farmacêuticos é o estudo das propriedades cristalográficas que determina possíveis variações nos aspectos estruturais dos fármacos [28-33].

Byrn e colaboradores [34] forneceram uma série de definições úteis classificando em grupos as características das várias formas sólidas que podem ser encontradas para um dado fármaco. Compostos podem ser polimorfos (habilidade de uma substância existir com duas ou mais fases cristalinas que têm diferentes arranjos e/ou conformações das moléculas na estrutura do cristal), solvatos ou pseudo-polimorfos (formas contendo moléculas de solventes dentro da estrutura cristalina), dessolvatos (formas as quais o solvente é removido de um solvato específico e que ainda retenha a estrutura cristalina original), amorfo (formas sólidas que não têm nenhuma ordem molecular) (Figura 1.2). Uma detalhada avaliação de possíveis variações na estrutura cristalina é essencial para o desenvolvimento de um novo fármaco. Assim, a FDA (*Food and Drug Administration*), órgão americano que aprova e regula o uso de medicamentos neste país, exige que procedimentos analíticos sejam usados para detectar formas polimórficas, hidratados ou amorfos de um fármaco [34]. Então, séries denominadas “diagramas de fluxo” e “árvores de decisão” devem ser usadas para caracterizar a estrutura cristalina dos compostos em desenvolvimento para o registro com as autoridades reguladoras. Pelo diagrama de fluxo tem-se uma visão clara e simples dos passos envolvidos no processo de desenvolvimento de um medicamento. Ele serve para indicar as etapas mais importantes no processo e também ter um detalhamento suficiente para identificar possíveis perigos. Já a árvore de decisões é uma seqüência de questões que se agrupam semelhante ao diagrama e que estabelece limites críticos para cada ponto crítico de controle (PCC) [34].

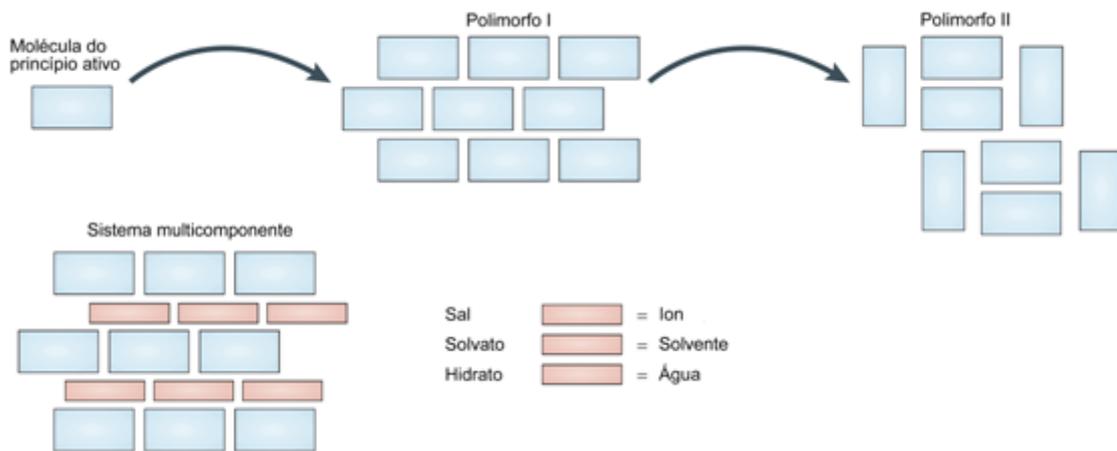


Figura 1.2. Diagrama dos diferentes tipos de formas sólidas.

O polimorfismo é um fator importante na tecnologia farmacêutica uma vez que aproximadamente 40% dos fármacos processados em comprimidos possuem mais de uma forma polimórfica ou pseudo-polimórfica. Portanto, o polimorfismo deve ser detectado, quantificado e controlado durante todas as etapas de preparação de um medicamento, desde a síntese do princípio ativo até sua estocagem nas prateleiras. Há a possibilidade de selecionar uma forma com ótimas propriedades para um problema especial, desde que diferentes modificações mostrem diferentes propriedades. Os problemas de estabilidade em um fármaco acontecem frequentemente, pois nem sempre a forma mais estável é a adequada para formulação. Então, nestas circunstâncias, a forma metaestável pode se transformar na de menor energia [35-37].

Transições polimórficas são iniciadas frequentemente por operações farmacêuticas, tais como secagem, moagem, compressão, etc. [38-44]. Uma solubilidade completa, por exemplo, é uma condição prévia para um bom efeito dentro do organismo de um dado fármaco administrado por oral. Para se alcançar uma solubilidade satisfatória, as vantagens de polimorfos específicos ou amorfos devem ser usadas [24]. Como uma desvantagem, os materiais amorfos frequentemente se recristalizam em temperatura ambiente. Sua habilidade de recristalização é aumentada por operações farmacêuticas como a trituração, a granulação e a compressão das quais os materiais obtêm a energia necessária para a ativação [37]. O termo transição polimórfica refere-se à interconversão entre as formas polimórficas. A relação da estabilidade entre um par de polimorfos pode ser classificada como monotrópica ou enantiotrópica. E isso vai depender se uma forma pode se transformar reversivelmente na

outra ou não. Em um sistema enantiotrópico, uma transição reversível entre os polimorfos é possível desde que a temperatura de transição definida esteja abaixo do ponto de fusão. Já em um sistema monotrópico, uma transição irreversível é observada entre os polimorfos abaixo do ponto de fusão. Quatro regras úteis foram desenvolvidas por Burger e Ramburger [45-47] para determinar qualitativamente a natureza enantiotrópica e monotrópica da relação entre os polimorfos. Estas regras são:

(1) regra do calor de transição: a transição entre duas formas enantiotrópicas é sempre endotérmica em temperaturas abaixo de seu ponto de fusão e exotérmica se a transição for entre formas monotrópicas ou a temperatura de transição é maior que o ponto de fusão;

(2) regra do calor fusão: se a forma de maior ponto de fusão possui o menor calor de fusão as formas são enantiotrópicas, caso contrário, elas são monotrópicas;

(3) regra da densidade: se uma modificação é menos densa, é menos estável no zero absoluto;

(4) regra do infravermelho: para ligações de hidrogênio em cristais, a modificação para que a primeira faixa de absorção no espectro infravermelho esteja em frequências mais elevadas tem entropia maior.

Pelo uso das regras antecedentes é estabelecido se os polimorfos de um determinado fármaco são enantiotrópicos ou monotrópicos. Depois o próximo passo é definir o domínio da estabilidade termodinâmica (ou metaestabilidade) de cada fase cristalina de uma substância em função da temperatura. O gráfico da diferença da energia livre de Gibbs, ΔG , *versus* temperatura absoluta, T, fornece a mais completa e quantitativa informação sobre a relação de estabilidade dos polimorfos [19], com o mais estável polimorfo tendo a mais baixa energia livre de Gibbs. A ΔG entre os polimorfos pode ser obtida usando diversas técnicas em diferentes temperaturas, tal como solubilidade, taxa de dissolução intrínseca e calorimetria [48]. Os diagramas de fase da energia livre de Gibbs *versus* temperatura para sistemas polimórficos enantiotrópicos e monotrópicos são mostrados na Figura 1.3. Para um sistema enantiotrópico, um polimorfo é estável abaixo da temperatura de transição (T_t), enquanto o outro é estável acima da T_t . Apenas um polimorfo é estável a temperaturas menores que o ponto de fusão para um sistema monotrópico [49].

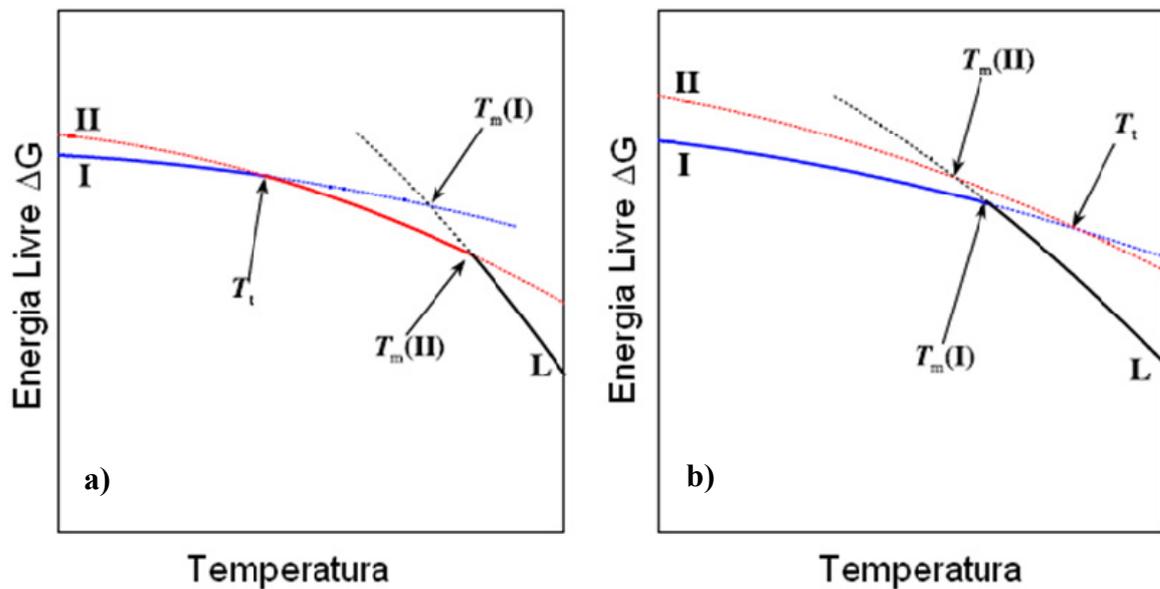


Figura 1.3. Diagramas de fase de energia livre para sistemas polimórficos. (a) sistema enantiotrópico; (b) sistema monotrópico [49].

As conseqüências farmacêuticas do polimorfismo e formação de solvatos são conhecidas há bastante tempo [26]. Sabe-se que diferentes estruturas cristalinas de uma dada entidade química têm diferentes células unitárias e assim podem exibir diferentes graus de solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, propriedades físicas, termodinâmicas, espectroscópicas, interfaciais, propriedades mecânicas, etc. [50]. A ocorrência do polimorfismo é bastante comum para moléculas orgânicas e um grande número de compostos polimórficos já foram anotados e catalogados [35, 51-53]. Métodos complementares têm sido desenvolvidos para o estudo de polimorfos e solvatos [17, 18, 54], porém os métodos clássicos de difração de raios X, espectroscopia vibracional, microscopia, análise térmica e estudos de solubilidade são os mais indicados. Deve-se enfatizar que o critério para a existência de tipos polimórficos é a não equivalência das estruturas cristalinas. Para agentes farmacêuticos, este critério exige que os testes padrões de difração de raios X de pó não sejam equivalentes para as várias formas. No anexo no final deste trabalho são abordadas técnicas que foram utilizadas para a caracterização dos fármacos estudados.

Os métodos espectroscópicos são de grande valor para confirmar a existência do polimorfismo (ou da formação do solvato). A espectroscopia de absorção no infravermelho (IR) e o espalhamento Raman contêm informações sobre movimentos específicos dos grupos funcionais no sólido. Se as vibrações moleculares são afetadas pelas diferenças estruturais que

caracterizam o polimorfismo, então estudos de vibrações serão úteis para uma avaliação da origem do efeito [55].

As propriedades de um material sólido dependem não somente da identidade de seus componentes, mas também de seus arranjos moleculares. Os sólidos cristalinos são aqueles em que os seus constituintes átomos, moléculas ou íons são arranjados em ordem regular, repetindo o padrão em três dimensões. É bastante comum que um sólido cristalino exista em mais de um arranjo cristalino que é o polimorfismo já mencionado [56].

Os cristais podem também conter mais de um tipo de átomo, composto iônico ou molécula, caracterizando os co-cristais que terão propriedades diferentes das dos cristais feitos por um único componente. Há atualmente uma controvérsia na literatura a respeito das convenções de nomeação para os cristais que contêm mais de um componente (cristais multi-componentes). Materiais deste tipo são os hidratos e os solvatos, os quais contêm a molécula do “anfitrião” (o IFA para fármacos) e água ou solvente como um “convidado” [56]. A maioria dos fármacos também são fracos eletrólitos capazes também de formar sais, o que acontece com um princípio ativo que é investigado nesta tese, a dietilcarbamazina. Para facilitar o entendimento dessas estruturas foi montado o esquema da Figura 1.4. É importante salientar que cristais de um único componente ou co-cristais podem ser polimórficos, isto é, cada um deles pode exibir mais de uma forma cristalina sem mudar sua composição química. Na Figura 1.4, co-cristais consistem de dois ou mais componentes que formam uma única estrutura cristalina tendo propriedades exclusivas. Essa definição exige esclarecimento do significado de “componente”. Se um componente é definido como sendo um átomo, composto iônico ou molécula, então um co-cristal transforma-se mais especificamente em um ou outro: (1) um cristal que contém dois ou mais diferentes átomos ou moléculas ou (2) um cristal que contém um composto iônico acrescido de átomos adicionais, compostos iônicos ou moléculas. Note que os sais podem igualmente existir em uma forma não cristalina [56]. Um sal contém compostos iônicos individuais, mas múltiplos íons. A formação de sais em compostos orgânicos envolve a transferência de prótons de um ácido para a base. Estudos de estruturas cristalinas revelaram que se um próton é transferido de um componente para outro em um sólido cristalino é dependente do ambiente cristalino e não pode ser previsto pelo valor do ΔpK_a apenas [57].

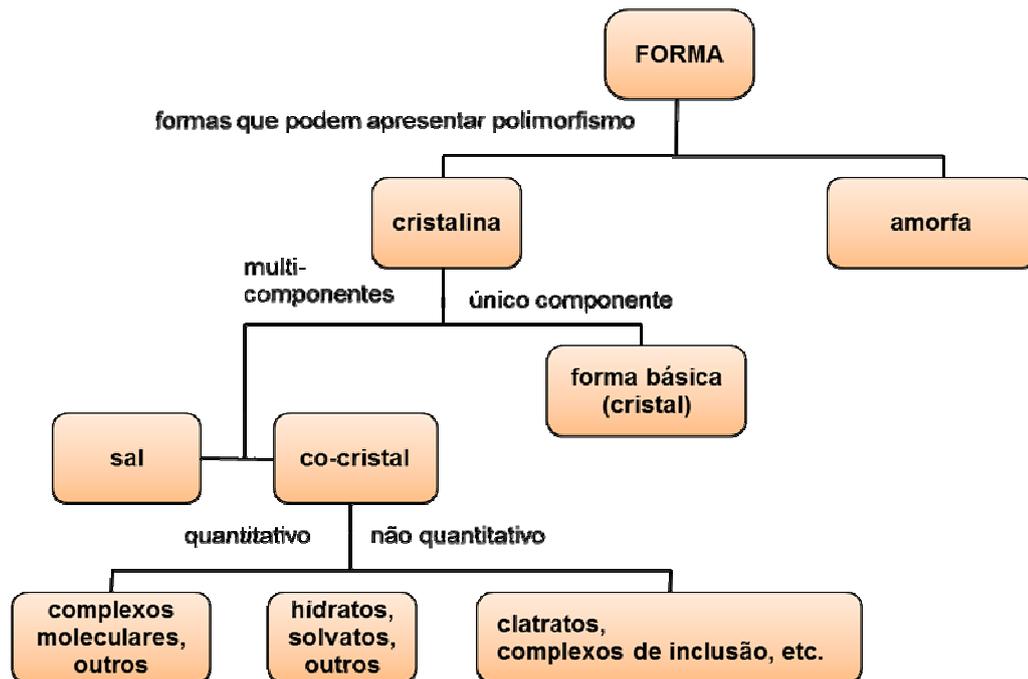


Figura 1.4. Esquema de classificação para sólidos orgânicos.

As indústrias farmacêuticas reconheceram a importância do polimorfismo apenas recentemente. Um trabalho de revisão publicado em 1969 pelo microscopista Walter McCrone intitulado *Pharmaceutical Applications of Polymorphism* [26] é identificado como o início dos estudos sobre polimorfismo. Um evento culminante foi a remoção temporária do mercado do medicamento anti-retroviral Norvir em 1998, que ocorreu por causa do aparecimento de um polímorfo previamente desconhecido do princípio ativo ritonavir. A forma de dosagem do Norvir consistia em cápsulas semi-sólidas com uma solução contendo ritonavir [58]. A nova forma cristalina era mais estável e conseqüentemente menos solúvel que a velha forma e cristalizava-se dentro das cápsulas, tornando-se uma formulação não manufaturável.

A FDA publicou um guia para desenvolvimento de fármacos em 2000 que afirma: “Alguns novos fármacos existem em diferentes formas cristalinas que diferem em suas propriedades físicas. Polimorfismo pode também incluir solvatos, hidratos ou formas amorfas. Diferenças nessas formas podem, em alguns casos, afetar a qualidade ou a performance dos novos fármacos. Nos casos os quais existem essas diferenças, a biodisponibilidade e a estabilidade do fármaco devem ser especificadas” [59]. Essa provisão, junto com o dano comercial e humano que pode ocorrer como ilustrado com o Norvir, tem conduzido a maioria

das companhias farmacêuticas a incorporar processos para identificar e caracterizar formas polimórficas de IFAs durante o desenvolvimento de um fármaco.

Entre os casos mais conhecidos de biodisponibilidade variável devido ao polimorfismo envolvendo dosagem em humanos estão aqueles do palmitato de cloranfenicol, ácido mefenâmico, oxitetraciclina e carbamazepina. Aguiar *et al.* [60] demonstraram que em seres humanos a absorção do polimorfo B do palmitato de cloranfenicol foi significativamente maior do que a do polimorfo A. O pico dos níveis séricos de cloranfenicol foi linearmente proporcional à porcentagem da forma B em misturas das formas A e B (Figura 1.5). O palmitato de cloranfenicol é um pró-fármaco do cloranfenicol que foi preparado para proporcionar um derivado sem sabor [61]. Glazko *et al.* [62] relataram que o palmitato de cloranfenicol seria hidrolisado no intestino antes do fármaco ser absorvido. Aguiar e colaboradores provaram que a hidrólise *in vitro* deste pró-fármaco pela pancreatina foi dependente do polimorfo, com significativa hidrólise no caso da forma B e pouca hidrólise para a forma A. Aguiar e Zelmer [63] demonstraram que a forma B se dissolve mais rapidamente do que o polimorfo A, tendo uma maior solubilidade. Eles também relataram sobre a absorção dos dois polimorfos do ácido mefenâmico [63], mostrando que os mesmos exibem quase idênticos níveis sanguíneos (Figura 1.5). Pudipeddi e Serajuddin [64] compararam as solubilidades de 81 pares de polimorfos de 55 princípios ativos e verificaram que em geral uma forma cristalina pode ser até 6 vezes mais solúvel que a outra (Figura 1.6). Estes resultados mostram claramente que a biodisponibilidade de um princípio ativo pode ser fortemente influenciada pela presença de diferentes formas cristalinas de um mesmo composto.

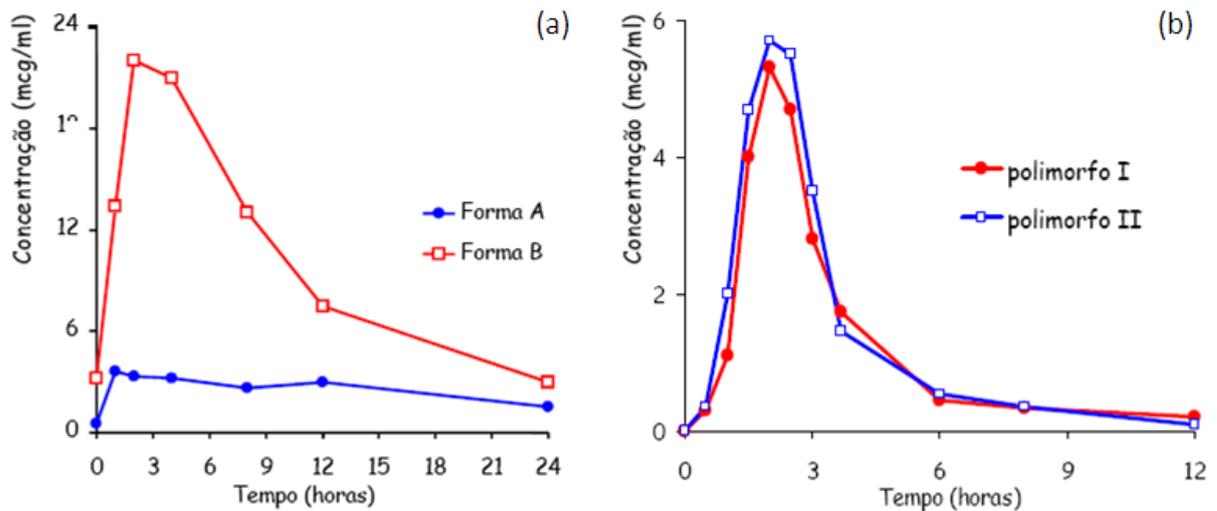


Figura 1.5. Concentração no plasma do (a) cloranfenicol e (b) ácido mefenâmico em função do tempo [63].

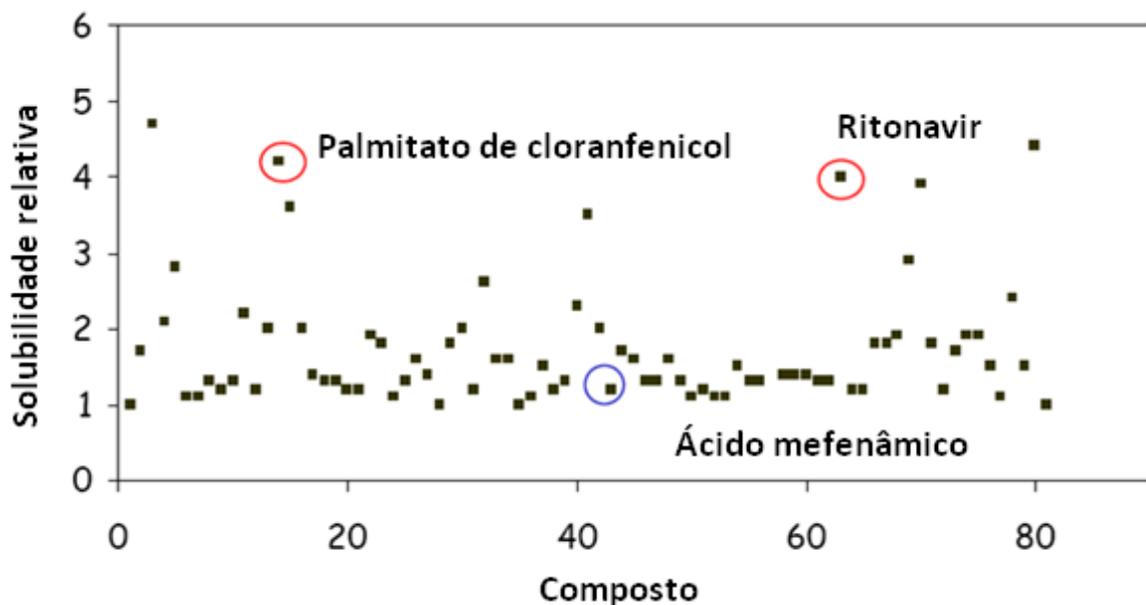


Figura 1.6. Solubilidade relativa entre 81 pares de polimorfos de 55 compostos [64].

Com base no exposto é possível concluir que um grande desafio da indústria farmacêutica é a escolha e o controle da forma cristalina de um princípio ativo. Do ponto de vista analítico é necessário o desenvolvimento de melhores métodos qualitativos para identificar um único polimorfo em uma mistura de polimorfos e para determinar as porcentagens do conteúdo amorfo ou cristalino de um fármaco. Um entendimento crescente

do fenômeno do polimorfismo deve possibilitar o controle sobre o processo de cristalização a fim de obter seletivamente o polimorfo desejado ou suprimir o crescimento de um indesejado. As mudanças de fase durante o processamento são um problema que pode ser evitado por estudos iniciais cuidadosos. A disponibilidade de dados estruturais detalhados combinados com projetos estratégicos tem conduzido a significativos avanços no controle de polimorfos obtidos em uma cristalização. Com todas as informações disponíveis destes estudos iniciais, deve ser possível projetar e selecionar as condições de processamento que gerará certo polimorfo e manterá a forma desejada do começo ao fim durante os vários estágios de processamento e de síntese do fármaco. E com esta finalidade que se estudou os quatro fármacos investigados nesse trabalho que não foram selecionados ao acaso, pois cada um se enquadra numa forma sólida diferente e com importância significativa em suas respectivas profilaxias. Além de contribuir ao entendimento do polimorfismo em cada um dos fármacos averiguados, os resultados apresentam uma visão multidisciplinar do problema, combinando métodos experimentais característicos da física, química, farmácia e farmacologia.

Dentro dessa filosofia um antiparasitário de uso freqüente foi investigado no Capítulo 2, o mebendazol. O mesmo possui formas polimórficas bem conhecidas para as quais a dependência com a solubilidade foi analisada. Assim, nesse Capítulo abordou-se um dos temas mais relevantes do ponto de vista de saúde pública que é o impacto do polimorfismo na biodisponibilidade, avaliando a cinética de liberação *in vitro*.

No Capítulo 3 o caso simples de um sistema mono-componente foi investigado através do benzonidazol, fármaco empregado no tratamento da doença de Chagas. Mesmo sendo um fármaco utilizado há muito tempo, existem grandes lacunas relacionadas às suas propriedades de estado sólido.

No Capítulo 4 a atenção foi voltada para os hidratos. Este caso particular de um solvato pode ser encontrado em várias etapas do processo de produção de um fármaco, sendo também utilizado em algumas formulações e, às vezes, aparecendo como um produto indesejado em consequência da higroscopicidade de algumas formas cristalinas. O fármaco escolhido para este estudo foi o secnidazol, o qual é encontrado na forma de um hemi-hidrato. Entre outras coisas, o processo de desidratação e rehidratação desta substância foram investigados.

No Capítulo 5 estudou-se a dietilcarbamazina que é usualmente ministrada na forma de um sal. A escolha desses tipos de formas cristalinas é um dos caminhos mais freqüentemente empregados para contornar problemas associados à formulação, tais como,

solubilidade e estabilidade. As propriedades físico-químicas deste sal e sua base foram comparadas com a finalidade de descrever as vantagens deste tipo de formulação.

Finalmente, no Capítulo 6, um resumo dos principais resultados e as conclusões gerais deste trabalho foram apresentados.

2 Mebendazol

2.1 Introdução

Infecções por ascaridíase, tricuriase, ancilostomíase e necatoríase são as doenças tropicais negligenciadas mais frequentes [65]. Estimativas recentes indicam que um quarto da população mundial está contaminada com um ou vários destes parasitas [66, 67], causando epidemias que podem ser tão graves quanto àquelas da malária ou da tuberculose [68, 69]. Devido isso, a OMS e outros órgãos defenderam a execução de programas desparasitários em massa para atingir simultaneamente estas infecções. Recentemente, uma análise detalhada dos ensaios terapêuticos relatados na literatura apoiou a iniciativa da OMS [65]. Os programas desparasitários foram beneficiados pela expiração das patentes de diversos fármacos (mebendazol, albendazol e praziquantel) cujas versões genéricas e similares estão agora disponíveis a custos muito baixos [68, 70].

O Mebendazol (MBZ) (éster metílico do ácido (5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il) carbâmico) (Figura 2.1) é um fármaco vermífugo de amplo espectro que produz taxas elevadas de cura nas infestações por ascaridíase, enterobíase, tricuriase, ancilostomíase e necatoríase [65]. O largo espectro de atividade, elevada eficácia e facilidade de administração exibida pelo MBZ motivou sua vasta utilização em programas desparasitários de grande escala, a maioria deles direcionados a crianças em idade escolar em países em desenvolvimento [70, 71]. Devido ao impacto de tais programas na qualidade de vida destas crianças, o MBZ foi incluído pela OMS na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais como a referência para o grupo terapêutico dentro da classe farmacológica de anti-helmínticos intestinais [72].

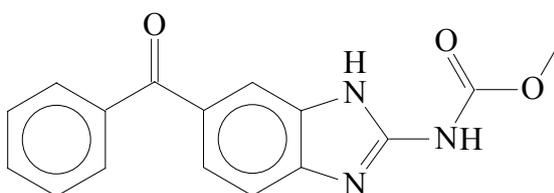


Figura 2.1. Estrutura molecular do MBZ.

O extenso uso do MBZ e do albendazol para tratar infecções por nematóides intestinais em populações humanas tem aumentado a preocupação com relação à necessidade de procedimentos de monitoramento que sejam apropriados para identificar o surgimento de resistência a fármacos [68, 73, 74]. Um fator que deve ser considerado com cautela neste problema é a qualidade dos fármacos anti-helmínticos. Medicamentos de baixa qualidade podem contribuir para a falha dos programas desparasitários, bem como também ao aparecimento de resistência a fármacos. Assim, a qualidade do fármaco é crítica, sobretudo nos países em desenvolvimento onde coexistem anti-helmínticos genéricos importados e produzidos localmente. Em face do exposto, percebe-se que os comprimidos podem ter variações em propriedades tais como pureza, desintegração, dissolução e biodisponibilidade, afetando a eficácia terapêutica.

Outro fator que pode contribuir para a variação da eficácia de uma forma farmacêutica é o polimorfismo do IFA. Considerando os carbamatos de benzimidazóis usados geralmente em programas desparasitários, MBZ e albendazol, apenas o primeiro exhibe polimorfismo. No estado sólido o MBZ cristaliza-se em três formas polimórficas: A, B e C. Vários autores indicam possíveis diferenças na biodisponibilidade dos polimorfos do MBZ [75, 76]. Mesmo que algumas discrepâncias sejam relatadas na literatura sobre as solubilidades relativas das formas B e C, todos os autores concordam que a forma A é a menos solúvel. Já a forma C é a preferida farmaceuticamente uma vez que sua solubilidade é suficientemente adequada para assegurar uma ótima biodisponibilidade sem exibir a toxicidade associada à forma B [12, 75, 77, 78]. Além disso, ensaios terapêuticos executados em 958 crianças em idade escolar na Tailândia usando um placebo e os polimorfos A e C do MBZ sugeriram que a forma A tem eficácia similar à do placebo no controle de infecções por ancilostomíase, necatoríase e tricuriase [75]. Outros autores também relataram sobre a influência do polimorfismo na eficácia anti-helmíntica do MBZ e propuseram que ao menos 30% da forma A na formulação é suficiente para suprimir a atividade farmacológica desejável [76, 79].

Com a finalidade de compreender os problemas associados à formulação do MBZ, primeiramente é necessário considerar as exigências do controle de qualidade para estes comprimidos. A Anvisa, assim como muitas outras agências ao redor do mundo, publicou uma monografia descrevendo os testes necessários para garantir a qualidade do MBZ [80]. Devido à solubilidade muito limitada do MBZ na água e em solventes orgânicos, que afeta a absorção e o comportamento no organismo, a farmacopéia brasileira e a dos Estados Unidos

preconizam o mesmo teste de dissolução [80, 81]. O meio de dissolução prescrito pela USP 30 é 900 mL de ácido clorídrico 0,1 M contendo 1% de lauril sulfato de sódio [81]. Meios de dissolução para fármacos insolúveis em água contêm geralmente um surfactante (lauril sulfato de sódio) para ajudar no processo de dissolução [82]. Sob estas circunstâncias, o lauril sulfato de sódio melhora a solubilidade deste fármaco devido ao aumento da molhabilidade e à solubilização micelar. Diversos autores verificaram que o teste de dissolução descrito pela USP 30 não tem nenhuma seletividade para identificar as formas cristalinas [12, 76, 83]. Assim, a necessidade de modificar esse teste de dissolução a fim de adaptá-lo para discriminar os polimorfos do MBZ foi repetidamente questionada. Swanepoel *et al.* [12] investigaram a influência do meio de dissolução na eficácia do teste da USP mostrando que as propriedades de dissolução dos três polimorfos são iguais (mais de 75% dissolvido após 120 min). Sem adicionar o surfactante ao meio os polimorfos exibiram perfis desiguais de dissolução. A forma mais solúvel foi o polimorfo C (70% dissolvido após 120 min), seguido pelo polimorfo B (37% dissolvido após 120 min) e pelo polimorfo A (20% dissolvido após 120 min). Logo, o meio de dissolução modificado fornece um método para distinguir entre os polimorfos do MBZ.

Diante do que foi visto nota-se que as discrepâncias nos testes de dissolução é um fato e o estudo apurado destes experimentos é de extrema acuidade. Porém, antes de se realizar uma análise comparativa destes testes, uma caracterização físico-química completa dos três polimorfos do MBZ é necessária para garantir a pureza das amostras a serem investigadas. Além disso, o conhecimento preciso da estabilidade termodinâmica dos polimorfos e a relação entre as diferentes fases sólidas de um fármaco é um pré-requisito para o entendimento do processo de biodisponibilidade.

Métodos analíticos como análise térmica, difração de raios X de pó, espalhamento Raman, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e médio (MIR) são recursos empregados na identificação e caracterização de polimorfos com grande sensibilidade. Por conseguinte, algumas destas técnicas foram utilizadas para estudar os polimorfos do MBZ, adquirindo um conhecimento vasto das propriedades de estado sólido do fármaco, diferenciando suas formas polimórficas e avaliando sua estabilidade térmica.

O Brasil, bem como vários países no mundo, adota um programa de medicamentos genéricos a fim de garantir o acesso destes insumos de primeira necessidade por parte da população de baixa renda. Com o intuito de avaliar a incidência dos polimorfos do MBZ no

mercado brasileiro, e de posse da caracterização completa dos polimorfos, foram analisados nove comprimidos diferentes deste fármaco, incluindo o que é indicado pela Anvisa como medicamento de referência. Com o objetivo de realizar esta investigação, a forma cristalina usada na formulação dos comprimidos foi determinada por difração de raios X de pó e por espectroscopia Raman. Identificada a forma polimórfica, testes de dissolução oficiais (farmacopéia) e com o meio modificado foram executados para definir a sensibilidade destes métodos para a forma cristalina. Além disso, diferentes misturas físicas da forma A e C foram medidas a fim de analisar a influência da concentração relativa no perfil de dissolução.

2.2 Materiais e Métodos

A matéria-prima do MBZ cristalizado nas formas A e C foi fornecida pela Red Pharm Commercial e comprimidos de 100 mg foram obtidos diretamente do mercado. Todos os comprimidos estavam dentro das especificações permitidas de qualidade e tinham pelo menos dois anos de validade.

Os estudos de dissolução apresentados neste trabalho foram executados usando o método 2 (pá) da USP 30 [81]. A temperatura do meio foi mantida em $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. As pás foram giradas em 75 rpm e as amostras foram retiradas do meio de dissolução em 5, 10, 15, 30, 60 e 120 min. Dois meios de dissolução foram usados nos testes de solubilidade: meio I (1 mL das amostras em 9 mL de ácido clorídrico 0,1 N e lauril sulfato de sódio 1%) e meio II (1 mL das amostras em 4 mL de ácido clorídrico 0,1 N). As seguintes diluições foram realizadas em tubos de ensaio: 1:10 das amostras dissolvidas no meio I e 1:5 das amostras dissolvidas no meio II. As soluções posteriormente foram analisadas com espectrofotômetro UV-VIS em 248 nm.

Os testes de dissolução nas misturas de matérias-primas (distribuição de tamanho de partículas) do MBZ na forma A e C foram executados começando com suspensões tendo concentrações variando de 100% da forma A a 100% da forma C (0, 10, 50, 90 e 100% da forma C correspondem respectivamente a 100, 90, 50, 10 e 0% da forma A). Adicionaram-se 50 mL do meio da solução em cada estágio experimental (meio I e II). Agitou-se usando um misturador vortex, sendo imediatamente colocada em uma cuba de dissolução na qual havia 850 mL do meio de dissolução em 37°C para realizar o teste de dissolução, de acordo com as

condições experimentais. Neste caso, as amostras foram retiradas do meio de dissolução em 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min e avaliadas.

2.3 Resultados

Como ponto de partida no estudo com o MBZ, realizou-se uma caracterização físico-química de seus três polimorfos. Na Figura 2.2 são apresentados os resultados da análise térmica, onde são mostradas as curvas de TG e DSC. Nas duas técnicas podem ser observadas anomalias a aproximadamente 250°C e 320°C, as quais estão associadas a dois processos de decomposição. No entanto, o evento mais relevante é uma pequena anomalia exibida pelas curvas de DSC das formas B e C por volta de 180°C. Estes eventos exotérmicos, que não possuem uma correspondência na TG, podem ser classificados como transformações sólido-sólido e evidenciam transição desses polimorfos para a forma A.

A calorimetria não é uma técnica que fornece informação direta da forma cristalina de uma substância. Assim, utilizamos a difração de raios X e a espectroscopia vibracional que são técnicas mais adequadas para realizar esta tarefa. A Figura 2.3 mostra os padrões de difração dos três polimorfos, onde podem ser claramente observados picos característicos de cada uma das estruturas cristalinas. A mesma conclusão pode ser obtida da análise dos espectros Raman (Figura 2.4), infravermelho próximo (Figura 2.5) e infravermelho médio (Figura 2.6). Cada uma destas técnicas tem vantagens e desvantagens, mas todas possuem a especificidade necessária para serem empregadas como técnicas de rotina para o estudo do polimorfismo do MBZ.

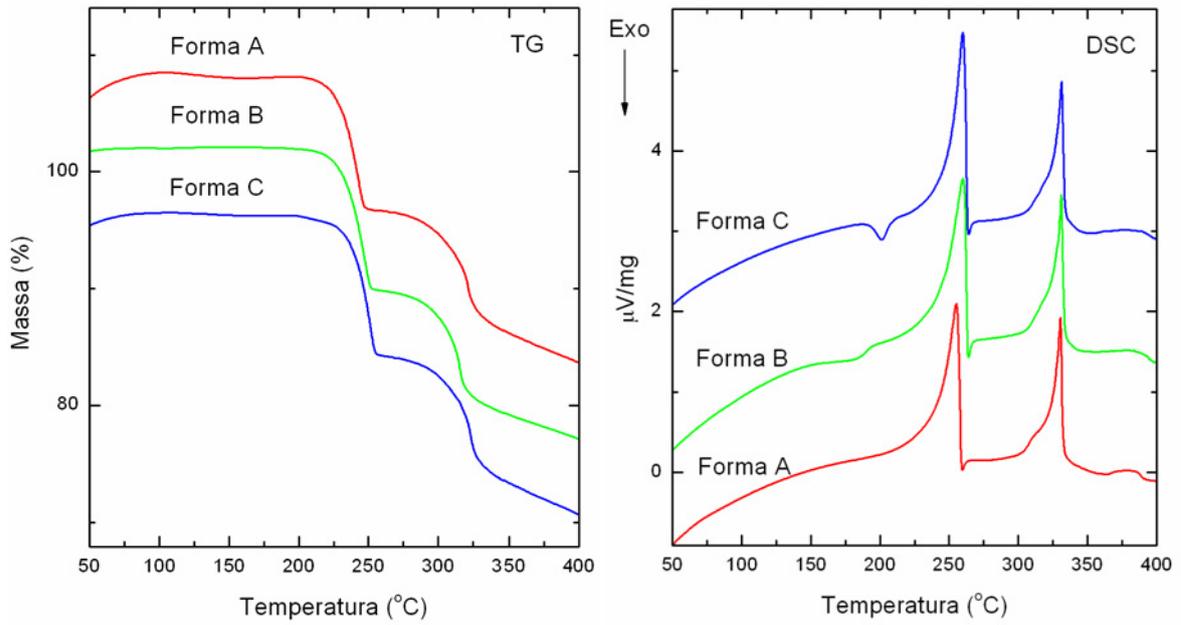


Figura 2.2. (a) Curva de TG para os polimorfos do MBZ. (b) Curva de DSC para os polimorfos do MBZ.

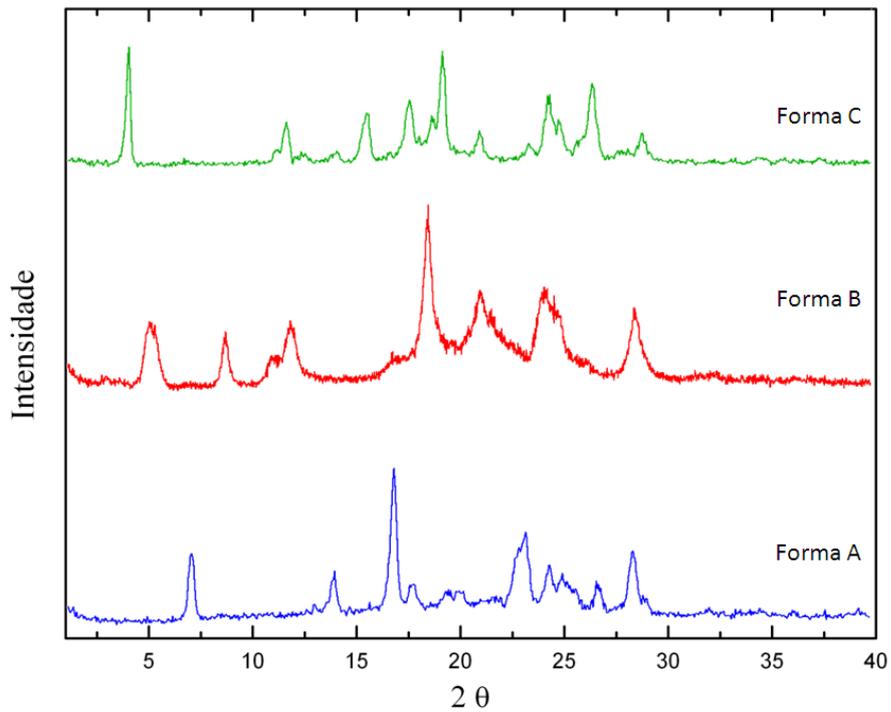


Figura 2.3. Difractogramas de raios X dos polimorfos do MBZ.

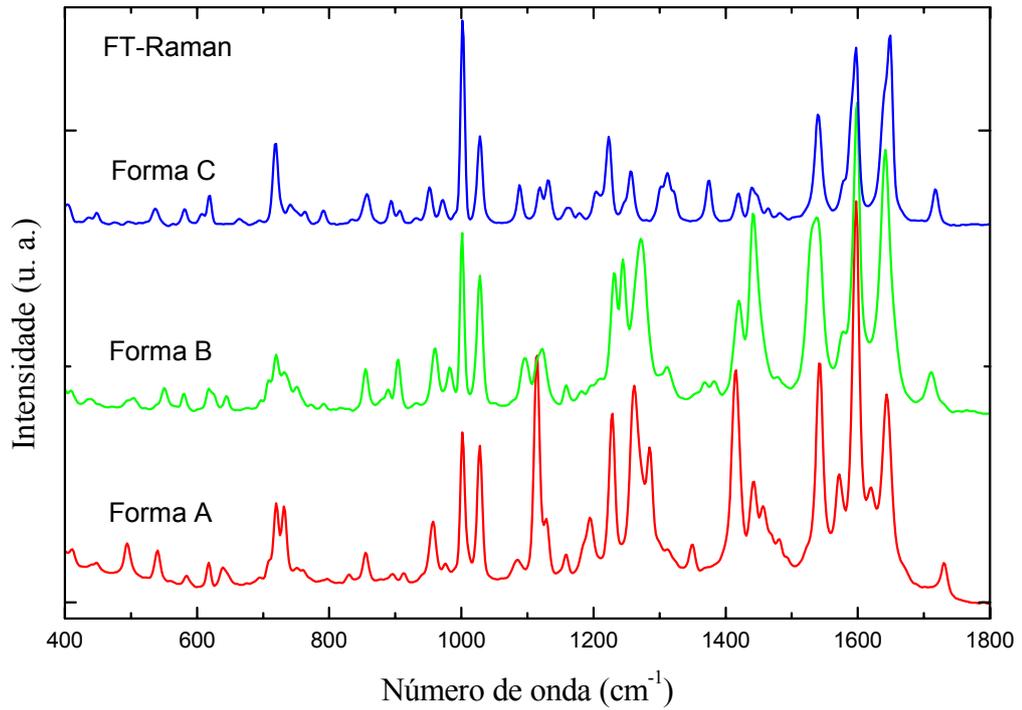


Figura 2.4 Espectros Raman dos polimorfos do MBZ.

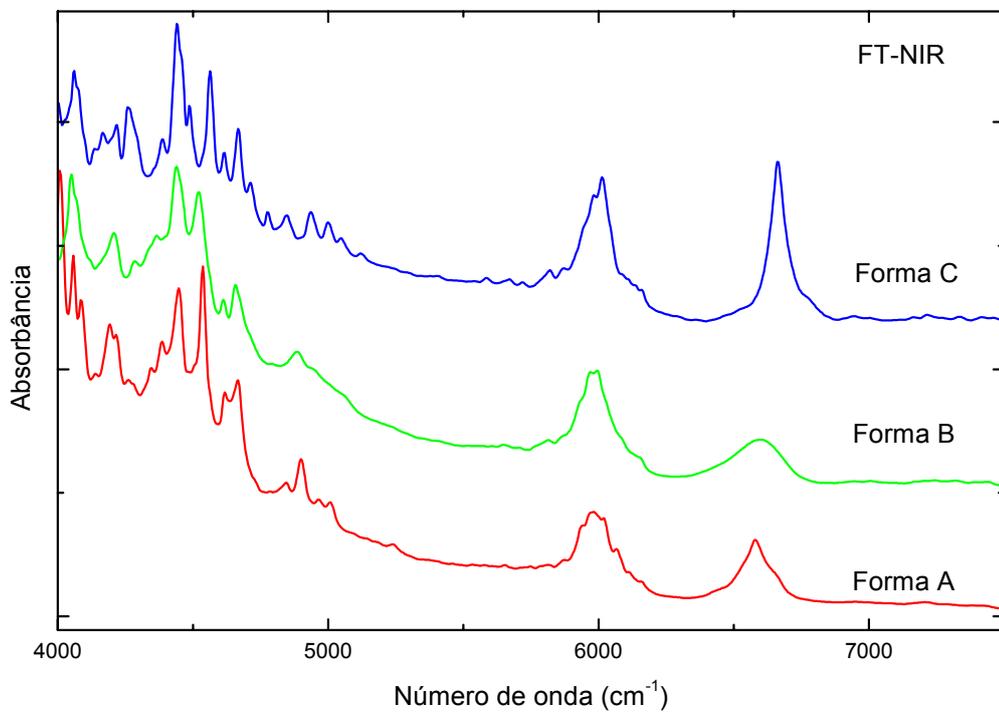


Figura 2.5. Espectro vibracional na região do infravermelho próximo dos polimorfos do MBZ.

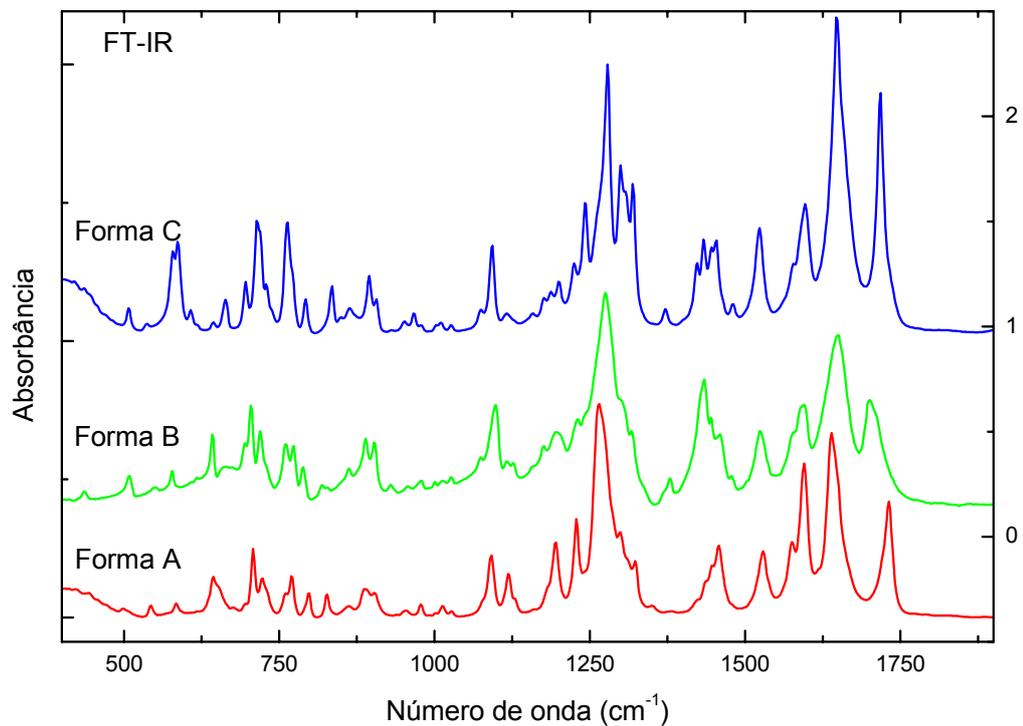


Figura 2.6. Espectro vibracional na região do infravermelho médio dos polimorfos do MBZ.

Com o intuito de determinar a forma cristalina usada na formulação dos comprimidos comerciais, a difração de raios X em pó e medidas de espalhamento Raman (Figura 2.7) e absorvância no infravermelho próximo (Figura 2.8) foram realizadas nos comprimidos investigados. É sabido que os métodos experimentais empregados têm bastante seletividade para distinguir o polimorfismo do MBZ [84, 85]. De acordo com estes resultados, observou-se que das nove marcas diferentes dos comprimidos usados neste estudo, oito foram formuladas usando a forma A (amostras identificadas como MBZ 2 a MBZ 9) e apenas uma utilizando a forma C (amostra identificada como MBZ 1).

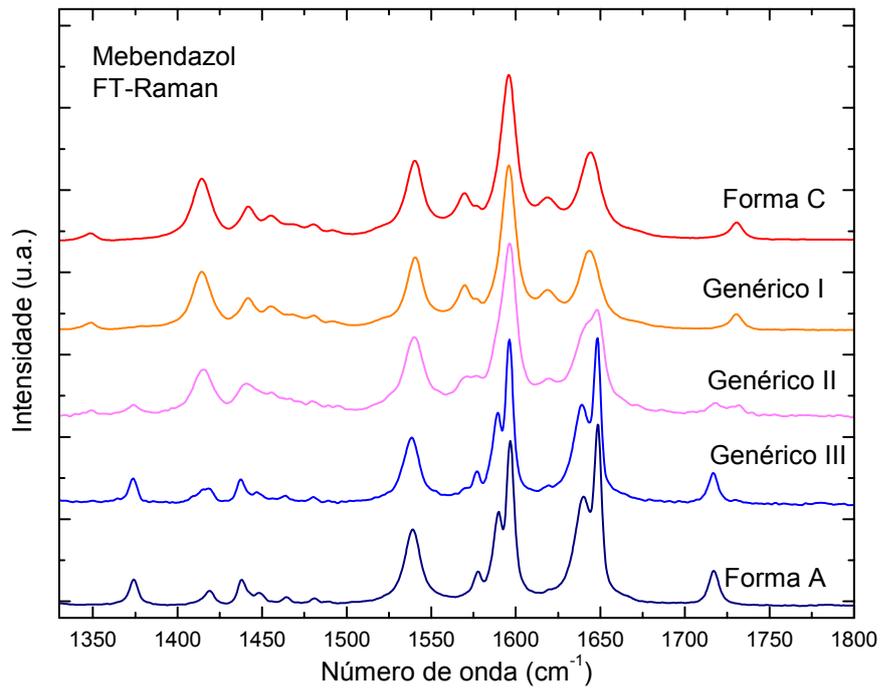


Figura 2.7. Comparação dos espectros Raman dos polimorfos A e C do MBZ com espectros representativos dos comprimidos investigados.

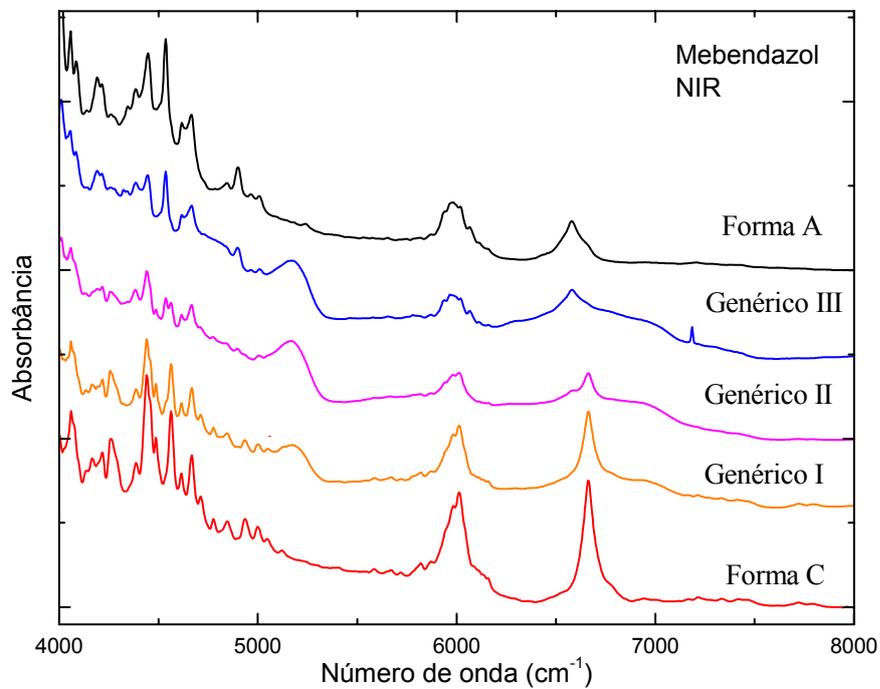


Figura 2.8. Comparação dos espectros no infravermelho próximo dos polimorfos A e C do MBZ com espectros representativos dos comprimidos investigados.

Diversos autores relataram sobre a solubilidade variável dos polimorfos do MBZ [12, 76, 83], focalizando principalmente em comparar as solubilidades dos polimorfos puros pelo método da USP 30 [81] e pelos meios modificados [12]. No melhor de nosso conhecimento, nenhuma investigação da influência do meio na solubilidade das misturas destes polimorfos foi realizada. Por isso, amostras com concentrações variando de 0 a 100% da forma C foram submetidas aos testes de dissolução usando os meios I e II. Os perfis de dissolução correspondentes são mostrados na Figura 2.9. Em geral, pode-se observar que estes perfis seguem o comportamento previsto. No meio I todas as amostras dissolveram rapidamente alcançando valores em torno de 80% depois de 120 min. Por outro lado, no meio II, a porcentagem do fármaco dissolvido aumenta quando a quantidade do polimorfo A decresce. Este efeito pode ser facilmente explicado considerando a baixa solubilidade da forma A quando comparada com a forma C. Entretanto, uma inspeção detalhada da dependência da concentração do perfil de dissolução no meio I revela um comportamento oposto. Neste meio, a solubilidade das amostras diminui quando a concentração da forma A decresce, sugerindo que o efeito do agente tensoativo na dissolução do polimorfo A é mais forte do que no polimorfo C. A Figura 2.10 mostra a dependência da concentração na porcentagem do fármaco dissolvido após 120 min. Mesmo exibindo comportamentos opostos, uma relação linear entre a quantidade da forma C e a solubilidade da amostra é observada. Considerando que pelo menos 30% da forma A nos comprimidos é suficiente para suprimir a atividade farmacológica desejável [76, 79], poderia ser possível usar esses resultados para elaborar um modelo para determinar a concentração da forma C dos perfis de dissolução. Entretanto, já que o perfil de dissolução pode ser afetado pelos parâmetros relativos à formulação e a solubilidade é diretamente determinada pelo empacotamento cristalino das moléculas do fármaco nos diferentes polimorfos, técnicas experimentais sensíveis à estrutura cristalina, como a espectroscopia vibracional ou a difração de raios X de pó, são aconselháveis para executar esse trabalho.

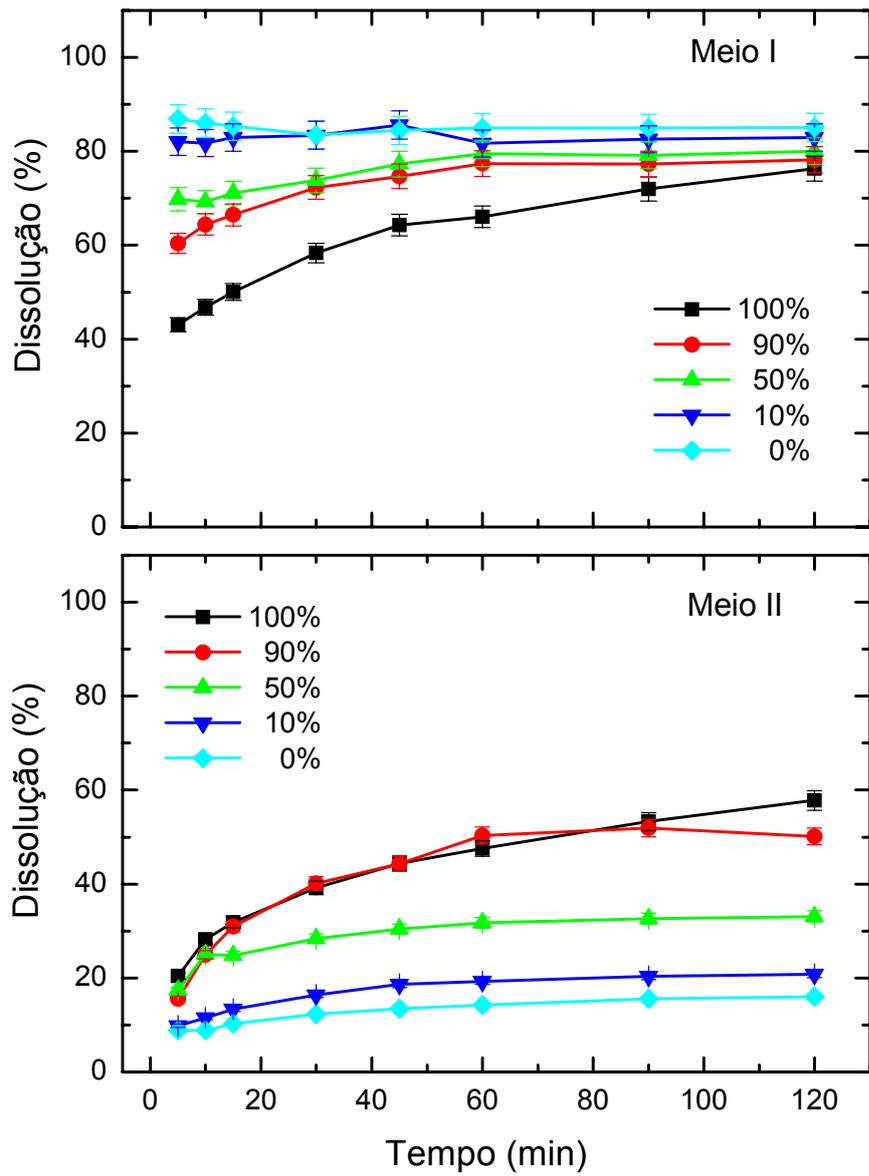


Figura 2.9. Perfis de dissolução do MBZ em função da concentração do polimorfo C em HCl 0,1 N contendo 1% (meio I) e 0% (meio II) de lauril sulfato de sódio.

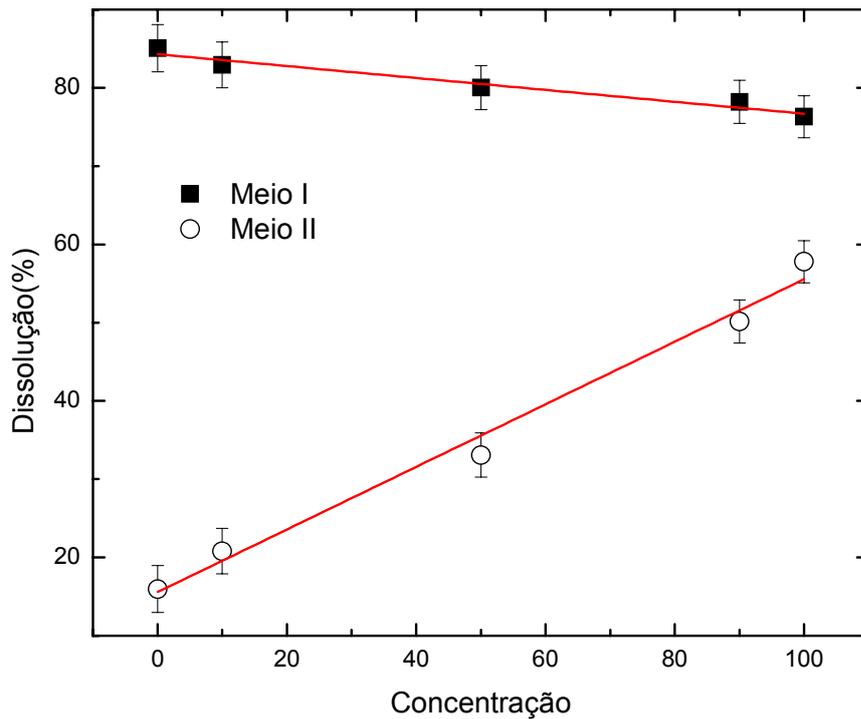


Figura 2.10. Porcentagem de amostra dissolvida em 120 min em função da concentração do polimorfo C do MBZ usando o método da USP 30 (meio I) e o método modificado (meio II).

O polimorfismo do MBZ e suas implicações na biodisponibilidade foram discutidos por diversos autores, mas não há quase nenhuma informação sobre sua incidência em medicamentos comerciais. Além disso, o método de dissolução modificado (meio II) proposto por Swanepoel *et al.* [12], que foi aplicado nesse trabalho às misturas da forma A e C, fornece uma ferramenta para identificar formulações irregulares mas não foi testado em amostras comerciais. No caso de produtos formulados o efeito dos excipientes nos testes de dissolução deve ser verificado antes de se fazer qualquer modificação da farmacopéia. Assim, os perfis de dissolução das nove diferentes marcas de comprimidos do mebendazol selecionadas para esse estudo usando os meios I e II são mostrados na Figura 2.11. Os comprimidos contendo IFA/excipientes variando na proporção de 1:1 até 1:2 foram investigados. Os resultados em produtos formulados confirmam claramente a conclusão obtida da análise das matérias-primas. No meio I, todos os comprimidos exibiram perfis de solubilidade similares estando em bom acordo com as especificações da farmacopéia (> de Q; 75%). Apesar da quantidade de excipientes existentes nos comprimidos, o meio II confirmou ser eficaz para garantir a forma cristalina no caso dos comprimidos formulados com polimorfos puros A ou C.

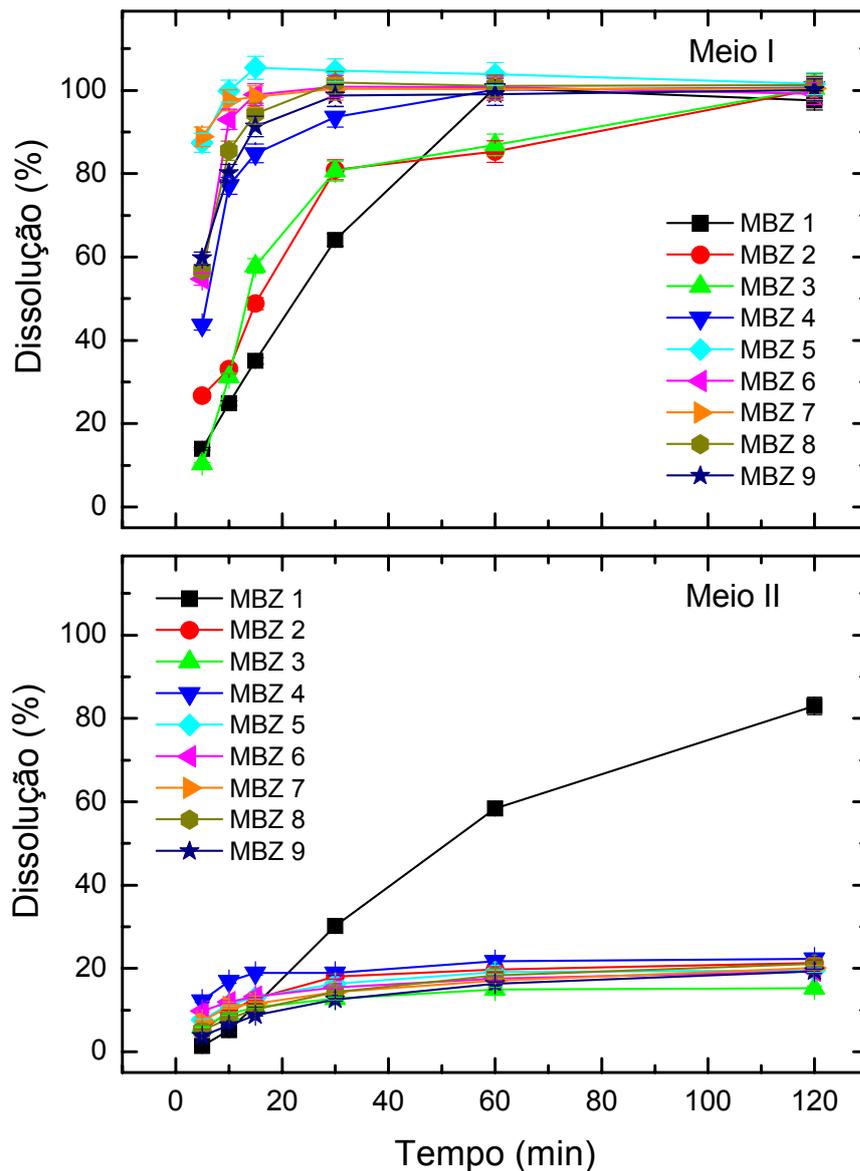


Figura 2.11. Perfis de dissolução de comprimidos comerciais do MBZ em HCl 0,1N contendo 1% (meio I) e 0% (meio II) de lauril sulfato de sódio.

Observou-se que o único comprimido formulado com a forma C poderia estar de acordo com as especificações da farmacopéia, uma vez que ele se dissolveu mais de 75% após 120 min. Entretanto, o método completo deve ser revisto a fim de estudar não somente a forma A e C, mas também a forma B e misturas de polimorfos. Nenhuma das amostras evidenciou a presença de um segundo polimorfo, mas este efeito foi observado em comprimidos não incluídos nos testes de dissolução. Conforme apresentado na Figura 2.9, pode-se esperar uma dependência contínua da solubilidade em função da concentração da

forma C. Então, os comprimidos não deveriam ser avaliados por uma simples porcentagem de dissolução como também deve ser estabelecido um limite da concentração dos polimorfos indesejados. Entretanto, como dito anteriormente, técnicas como a espectroscopia vibracional ou a XRPD podem fornecer um método muito mais acurado para identificar os polimorfos do MBZ em matérias-primas e produtos formulados.

Albonico *et al.* [73] relataram uma redução aparente da eficácia do MBZ no tratamento de infecções por ancilostomíase e necatoríase nas populações submetidas a programas desparasitários periódicos. Esta observação sugere a possibilidade de uma resistência emergente da infecção ao MBZ. Embora a forma cristalina usada nesse trabalho não seja relatada explicitamente, os comprimidos usados nos experimentos pertencem às companhias que somente formulam MBZ na forma C. Por outro lado, nenhuma informação está disponível sobre a forma cristalina nos comprimidos usados em diversos programas desparasitários. Bennett e Guyatt [68] sugeriram que a baixa eficácia de anti-helmínticos na Ásia poderia originar não apenas variações genéticas nos parasitas, mas também na qualidade dos fármacos. As diferenças na solubilidade entre as formas cristalinas do MBZ afetarão provavelmente a biodisponibilidade desse IFA, caso contrário, como proposto, acarretará diminuição da eficácia nos comprimidos formulados com a forma A. Como essas mudanças na biodisponibilidade dos comprimidos podem afetar a eficiência dos programas de controle e combate às paratitoses e o quanto contribuem ao aparecimento de resistência são ainda questões abertas.

2.4 Conclusões

O polimorfismo do MBZ é um assunto muito bem conhecido que pode ter impacto direto na eficácia de medicamentos genéricos contendo este IFA. Os resultados confirmaram claramente que o teste de dissolução prescrito em diversas farmacopéias não é capaz de distinguir o caráter polimórfico do MBZ em comprimidos comerciais. Conseqüentemente, em mercados com um programa de genéricos bastante difundido, a falta de especificações e controle de qualidade precisos poderiam causar a difusão das misturas polimórficas, cuja atividade terapêutica ainda não é bem compreendida. Uma alternativa ao método padrão é

fornecida pelo meio de dissolução modificado que é potencializado quando combinado com os métodos experimentais sensíveis à estrutura cristalina.

Além disso, a análise das misturas das formas A e C mostra uma dependência contínua da solubilidade na concentração relativa. Entretanto, comportamentos opostos foram observados nos meios I e II, sugerindo que o surfactante usado no primeiro meio solubiliza mais eficientemente a forma A do que a forma C. Posteriores investigações neste campo precisam ser realizadas a fim de fornecer uma melhor descrição desse processo.

A terapia oral das infecções helmínticas, as mais prevalentes entre as doenças tropicais negligenciadas, com amplos programas desparasitários é uma das principais iniciativas da OMS. Entretanto, estes programas foram beneficiados com o aumento do mercado de genéricos que pode fornecer fármacos a baixo custo, mas a boa qualidade das matérias-primas é uma condição necessária para assegurar a eficácia destes medicamentos. O MBZ é um caso interessante que mostra que pesquisadores e administradores de programas devem estar cientes do impacto do polimorfismo, ou mais geralmente, das propriedades de estado sólido dos princípios ativos a fim de garantir o sucesso de um programa de combate à paratitoses.

3 Benzonidazol

3.1 Introdução

A doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) é uma parasitose endêmica em algumas áreas da América Latina [86]. A doença é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* [87]. É uma das mais sérias doenças parasitárias na América Latina, onde 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi* [88]. Mais de 100 milhões estão vivendo em risco de infecção [86]. Existem diferentes formas de contaminação: 1) Via sanguínea, através da picada do inseto vetor infectado com *T. cruzi*, que corresponde por 80-90% da transmissão da doença; 2) Via transfusão sanguínea ou transmissões congênitas, sendo responsável por 0,5-8% da infecção; 3) Outras formas menos comuns, por exemplo: através de alimentos ou bebidas contaminados ou por órgãos infectados usados em transplantes [86]. Apesar de ser amplamente transmitida por insetos triatomíneos, a transfusão de sangue é um relevante mecanismo de contração da doença, sendo a violeta de genciana usada como agente quimioprolático nos bancos de sangue das áreas endêmicas [89].

A doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda com parasitemia detectável e miocardite aguda em 8% dos casos [90]. A fase aguda dura de 6 a 8 semanas [91]. O índice de mortalidade para pessoas nessa fase está em torno de 10% [86]. O aumento do volume do baço e crescimento de um ou mais linfonodos (também chamados de gânglios linfáticos), especialmente dos situados no pescoço, axilas e virilhas são o diferencial da fase aguda da infecção [92].

Uma vez passada a fase aguda, parte dos pacientes infectados restabelece uma aparência saudável, onde danos em órgãos não podem ser demonstrados pelos métodos correntes de diagnósticos clínicos. A infecção pode ser verificada apenas por testes sorológicos ou parasitológicos. Essa forma de fase crônica da infecção da doença de Chagas é chamada de forma indeterminada [90]. O tratamento geralmente envolve quimioterapia com 5-nitrofurano (Nifurtimox) e N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl) acetamida (Benzonidazol) (Figura 3.1) [87]. O benzonidazol (BZN) é usado no tratamento da fase aguda da doença, nos

casos de infecção congênita e infecção acidental [88]. O uso dos dois fármacos tem mostrado eficácia limitada e fortes efeitos colaterais [92].

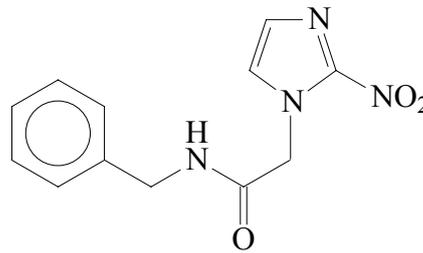


Figura 3.1. Fórmula estrutural do BZN.

O uso desses fármacos para o tratamento da fase aguda da doença é amplamente aceita [86]. Permanecem controvérsias sobre a eficácia da quimioterapia, especialmente para indivíduos na fase crônica e assintomáticos [91]. Os indesejáveis efeitos colaterais de ambos os fármacos são os maiores obstáculos aos seus usos, freqüentemente forçando o médico a interromper o tratamento [86]. Embora as bases bioquímicas para a atividade do BZN permaneçam não completamente entendidas, estudos experimentais sugeriram que o BZN pode interferir diretamente na síntese de macromoléculas, via ligação covalente ou outros tipos de interação entre nitroredução de intermediários e vários componentes celulares, como DNA, lipídeos e proteínas do *T. cruzi* [93].

Existe uma necessidade de encontrar fármacos apropriados ou regimes terapêuticos com os fármacos existentes que possam ser usadas em indivíduos infectados por *T. cruzi* para prevenir o desenvolvimento de formas clínicas severas da doença [91].

Os mais freqüentes efeitos adversos observados no uso do nifurtimox são anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência, manifestações digestivas como náuseas ou vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais e diarreia. No caso do BZN, manifestações na pele são as mais notórias como, por exemplo, hipersensibilidade, dermatite e edema generalizado. Os pacientes também têm febres constantes, dores musculares e nas articulações e algumas alterações sanguíneas como a redução do número de plaquetas e a falta ou acentuada redução de leucócitos granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), que são subtipos específicos de um tipo de célula sanguínea, os glóbulos brancos. Estes elementos são os principais agentes contra as infecções. A doença apresenta um elevado risco do paciente contrair infecções, contra as quais o organismo não se encontra preparado para defender-se. Estudos experimentais de toxicidade com nifurtimox evidenciaram neurotoxicidade, dano

testicular, toxicidade ovariana e efeito deletério da glândula adrenal, cólon, esôfago e tecido mamário. Ambos os fármacos exibiram significativos efeitos mutagênicos e mostraram ser tumorigênicos ou carcinogênicos em alguns estudos. [86].

Diferenças notórias na eficácia da quimioterapia são observadas, especialmente quando os esquemas terapêuticos são executados em áreas geográficas distintas [94]. As estirpes de *T. cruzi* apresentam diferentes suscetibilidades ao BZN e nifurtimox. Isto pode explicar em parte as diferenças na eficácia da terapêutica [87]. Durante os últimos 20 anos, as suscetibilidades ao BZN e nifurtimox de várias estirpes isoladas de diferentes áreas geográficas têm sido determinadas [94]. Nesse contexto, 56% das estirpes de *T. cruzi* têm sido consideradas susceptíveis ao BZN, 16,82% têm sido consideradas parcialmente susceptíveis e 27,1% têm sido consideradas resistentes. Um fator que pode contribuir para essas diferenças durante o tratamento da doença de Chagas pode ser o tipo de estirpe predominante em cada área geográfica. Um fator bem conhecido envolvido na resistência à quimioterapia é o alto grau de diversidade genética das estirpes de *T. cruzi*. O modelo de evolução clonal postulado para o *T. cruzi* prediz uma correlação entre a divergência filogenética dos genótipos clonais de *T. cruzi* e suas características biológicas, incluindo suas suscetibilidades aos fármacos. Isto tem sido verificado por vários parâmetros experimentais, incluindo a susceptibilidade aos fármacos *in vitro* [94].

As estirpes de *T. cruzi* são populações multiclonais complexas que diferem em suas características biológicas e genéticas, e em seu comportamento no hospedeiro vertebrado [95]. Estirpes de *T. cruzi* representam subespécies, baseadas em características intrínsecas como composição genética, susceptibilidade a quimioterapia e amostras de enzimas. Estudos da relação parasita-hospedeiro têm revelado marcantes diferenças na determinação de lesões teciduais, dependendo de tropismo, virulência e patogenicidade das estirpes de *T. cruzi*. Um extenso estudo das características biológicas das estirpes e perfis histopatológicos em animais experimentais levou a agrupá-las desde 1970, em poucos tipos bem definidos: Tipos I, II e III. Um possível fundamento genético para o comportamento biológico das três estirpes tem sido investigado a nível fenotípico, por análise isoenzimática de protótipos e outras estirpes representativas, isoladas de diferentes áreas geográficas [95].

Apesar de um elevado número de pacientes infectados com *T. cruzi*, os fármacos disponíveis na atualidade carecem de uma alta eficácia no tratamento clínico da doença de Chagas. Estratégias alternativas estão sendo planejadas para identificar fármacos dentre os já disponíveis no mercado que possam ser usados em combinação para proporcionar um efeito

sinérgico e melhorar a eficácia da quimioterapia. Segundo Araújo *et al.* [96], foi investigado um possível efeito sinérgico de fármacos em camundongos inoculados com isolados de *T. cruzi* susceptíveis (CL), moderadamente resistentes (Y) e naturalmente resistentes (cepa Colombiana) contra BZN e nifurtimox [96]. Os dados demonstraram que a combinação do BZN com cetoconazol induzem a um efeito sinérgico em camundongos infectados com as cepas (CL) e (Y) isoladas. Nenhuma diferença foi encontrada em animais infectados com a cepa Colombiana isolada, sugerindo que o efeito sinérgico do BZN e do cetoconazol é influenciado pelo parasita isolado e que isso pode ser importante em estudos adicionais para combinações úteis de fármacos. Além disso, foi observado que o rápido tratamento com cetoconazol pode aumentar o índice de cura em animais infectados com a cepa (Y) isolada. Nenhum efeito positivo em relação ao índice de cura foi observado com a combinação do BZN e ofloxacina. Os resultados enfatizaram a importância daqueles compostos já existentes no mercado com efeitos sinérgicos capazes de intensificar a cura de infecções por *T. cruzi* [87, 96].

Mesmo com todas as iniciativas da atualidade em tentar desenvolver novos fármacos ativos contra o *T. Cruzii*, o BZN é um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento da doença de Chagas. No entanto, verificou-se que não existem informações sobre este princípio ativo na fase sólida, apesar de este ser principalmente administrado na forma de comprimidos.

3.2 Preparação dos cristais

O primeiro problema em cristalização é com relação à escolha do solvente no qual o material a ser cristalizado mostre um perfil de solubilidade desejado. Para um resultado satisfatório, o material deve ser moderadamente solúvel na temperatura ambiente e completamente solúvel próximo ao ponto de ebulição do solvente escolhido. A polaridade entre solvente e soluto é que determina a solubilidade dos compostos orgânicos. Se o soluto é muito polar, será necessário um solvente muito polar para dissolvê-lo. Se for apolar, será necessário um solvente apolar para dissolvê-lo. Geralmente compostos que têm grupos funcionais capazes de formar pontes de hidrogênio serão mais solúveis em solventes hidroxílicos, como a água ou álcoois, do que em hidrocarbonetos, como tolueno ou hexano. Então, conhecer a solubilidade do material é algo indispensável para se começar qualquer cristalização. Assim, foram feitos ensaios do BZN (Tabela 3.1) com os solventes mais

comuns em laboratório. O BZN utilizado neste trabalho foi fornecido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos/Fiocruz, do grupo de pesquisa da Dra. Núbia Boechat. Observou-se a ação dos solventes a frio e à temperatura de ebulição, a formação de cristais durante o resfriamento e o volume necessário por grama da amostra a ser purificada. Para minimizar as perdas do material para a água-mãe saturou-se o solvente em ebulição com o soluto.

Tabela 3.1 - Solventes usados nos ensaios de solubilidade com o BZN.

Solventes	Ponto de ebulição (°C)	Temperatura ambiente (25°C)	Aquecido
Água	100	Insolúvel	Insolúvel
Acetona	56	Facilmente solúvel	Completamente solúvel
Acetato de etila	77	Parcialmente solúvel	Completamente solúvel
Piridina	115	Facilmente solúvel	Completamente solúvel
Etanol	78	Parcialmente solúvel	Completamente solúvel
Metanol	65	Solúvel com agitação	Completamente solúvel
Hexano	69	Insolúvel	Insolúvel
Tolueno	111	Insolúvel	Insolúvel
Diclorometano	40	Insolúvel	Solúvel com agitação
Ácido acético glacial	118	Solúvel com agitação	Completamente solúvel
Éter etílico	35	Insolúvel	Insolúvel
Tetracloro de carbono	77	Insolúvel	Insolúvel
N-N-dimetilformamida	153	Facilmente solúvel	Completamente solúvel

A partir dos resultados obtidos com o ensaio de solubilidade do BZN, decidiu-se tentar a cristalização do mesmo em acetona, acetato de etila e etanol. Então, pesaram-se 50,0 mg do material e adicionou-se o solvente em pequenas quantidades. Agitou-se em temperatura ambiente e depois a solução supersaturada foi aquecida sempre com agitação até a completa dissolução. Em seguida fez-se filtração à quente para eliminar eventuais impurezas no

material. O erlenmeyer foi coberto com filme plástico perfurado e armazenado em repouso nas condições: em torno de 5°C acondicionado num refrigerador e também numa temperatura de 20°C sobre uma mesa anti-vibração. Conseguiu-se formação de pequenos cristais utilizando o etanol como solvente a baixa temperatura. Posteriormente os cristais foram secos em um vidro de relógio ao ar livre e analisados por MEV. Na Figura 3.2 podemos observar que tanto a matéria prima quanto o resultado da recristalização apresentam o mesmo hábito cristalino. O hábito cristalino do BNZ é acicular com dimensões variando de dezenas de microns (matéria prima) até alguns milímetros (recristalização).

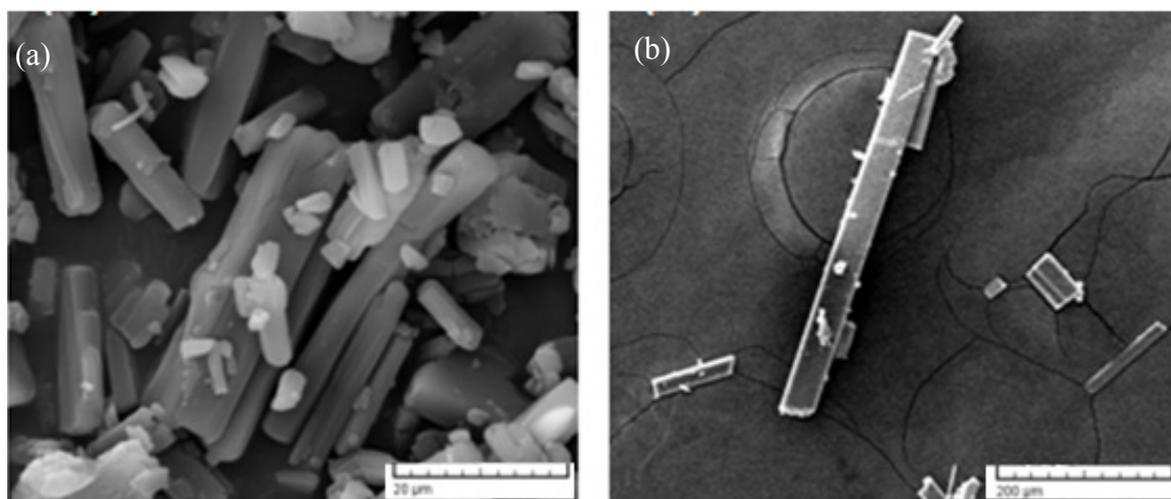


Figura 3.2. (a) Imagens de MEV da matéria prima do BNZ. (b) Resultado da cristalização.

3.3 Estruturas Cristalinas

Uma investigação experimental de um sólido quase sempre começa pelo estudo da estrutura cristalina do material sob análise. De maneira geral, pode-se afirmar que todas as propriedades de um sólido cristalino se relacionam de um modo ou outro à sua estrutura cristalina. A técnica mais comum usada para a determinação dessas estruturas é a difração de raios X em monocristais. Esta radiação possui um comprimento de onda da ordem de alguns

ângstroms, a mesma ordem do espaçamento entre os átomos de um cristal [97], permitindo um conhecimento completo da estrutura, da forma e tamanho da célula unitária bem como as respectivas posições atômicas.

No caso do BZN, como nos outros compostos investigados neste trabalho, a determinação da estrutura cristalina foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Javier Alcides Ellena do Instituto de Física de São Carlos. Os dados obtidos a partir da difração de raios X foram coletados em um difratômetro Nonius Kappa CCD à temperatura de 150K. O BZN cristaliza em um sistema monoclinico não-centrossimétrico com grupo espacial $P2_1$ e $Z = 2$, com parâmetros de rede $a = 4.687\text{Å}$, $b = 10.994\text{Å}$, $c = 12.025\text{Å}$, $\beta = 91.167^\circ$. A cela unitária do BZN determinada a partir da difração de raios X em um monocristal é mostrada na Figura 3.3.

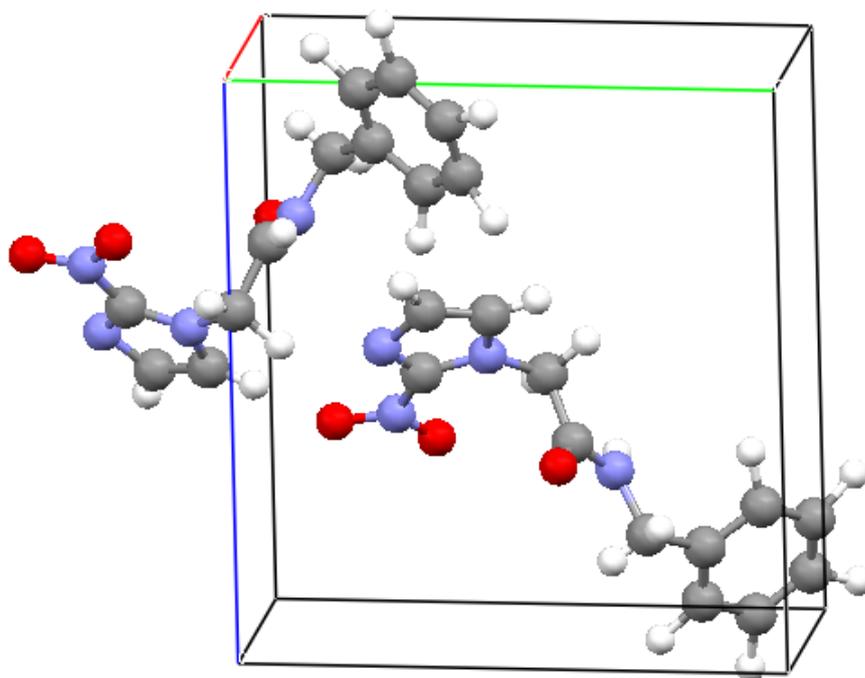


Figura 3.3. Cella unitária do BNZ.

Pode-se observar através dos dados obtidos que o radical nitro ligado ao imidazol (alcalóide heterocíclico aromático de 5 membros com 2 nitrogênios) na Figura 3.4 encontra-se praticamente coplanar ao anel, apresentando uma pequena torção de $6,22^\circ$. A análise indica uma ressonância do grupo acetamida envolvendo os átomos N, O e C caracterizada pelas distâncias: $O-C = 1,203\text{Å}$, $C-N = 1,310\text{Å}$, e $O-N = 1,215\text{Å}$. Isto pode ser justificado observando-se que os ângulos em torno do nitrogênio da cadeia principal são maiores (120°)

do que os esperados para hibridização sp^3 ($109,5^\circ$). Sugere-se, dessa maneira, que o par de elétrons livres desse nitrogênio encontra-se deslocalizado, conferindo-lhe assim, um caráter sp^2 como observado na análise da estrutura intramolecular.

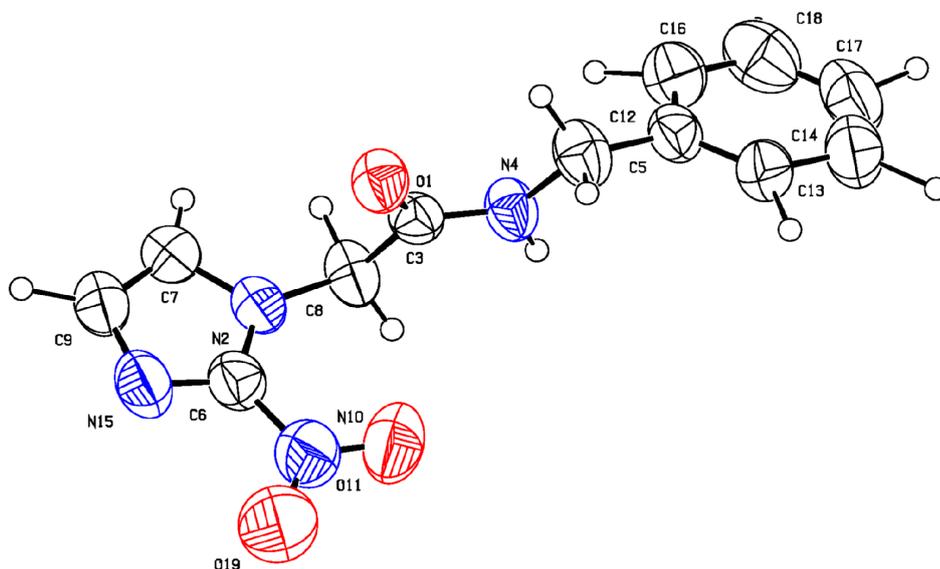


Figura 3.4. Unidade assimétrica do BNZ na estrutura cristalina.

Os resultados mostram que as moléculas do BZN formam cadeias estabilizadas por 2 tipos de ligações de hidrogênio, sendo 3 intermoleculares ($N4-H4...O1$, $C8-H8A...O1$, e $C13-H13...O11$) e uma intramolecular ($C8-H8A...O11$) (Tabela 3.2). Em adição às ligações de hidrogênio intermoleculares do tipo $N-H...O$ que possibilitam a formação de cadeias infinitas ao longo do eixo a (Figura 3.5), também é observada uma ligação de hidrogênio não-clássica ($CH...N$) na qual é baseada uma outra cadeia ao longo do eixo b, formando uma rede bidimensional (Figura 3.6).

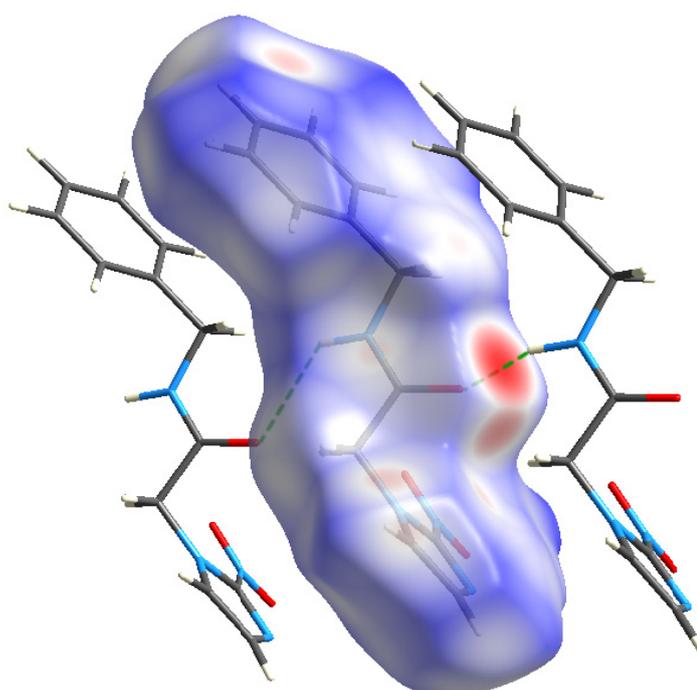


Figura 3.5. Projeção ao longo do eixo cristalográfico a mostrando os arranjos de ligações de hidrogênio do BZN.

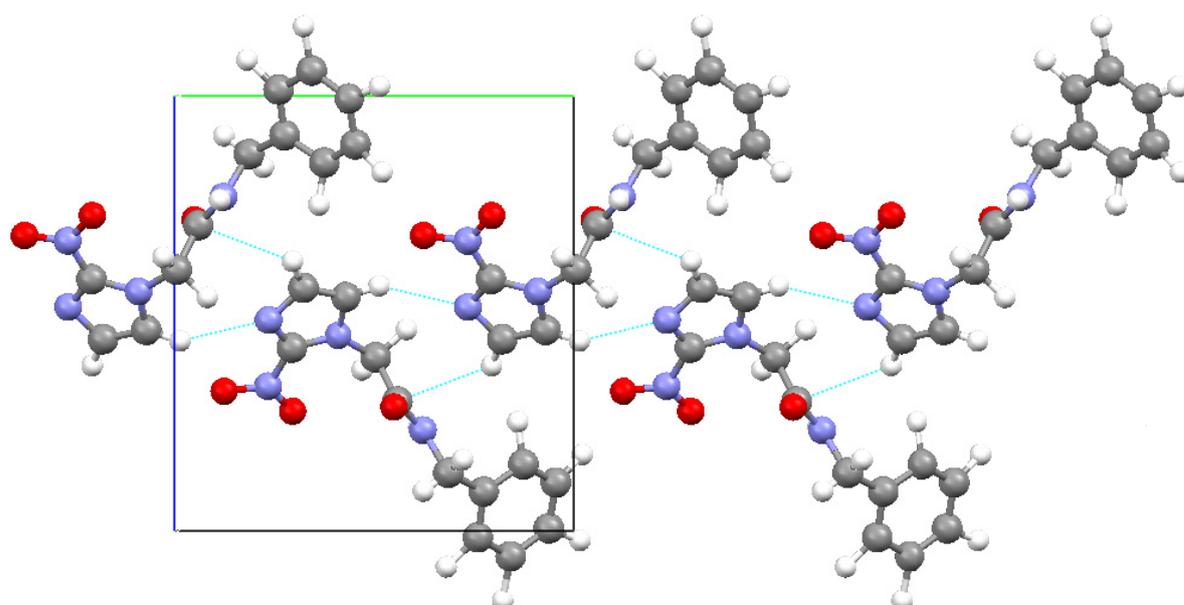


Figura 3.6. Interações do tipo C-H...N e C-H...O observadas entre as moléculas do BZN ao longo do eixo cristalográfico b.

Tabela 3.2 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio (distâncias em Å e ângulos em °) do cristal de BZN.

D - H...A	D - H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D - H...A (°)
Interações Intermoleculares				
N4--H4...O1	0,94	1,96	2,871	162
C8--H8A...O1	0,96	2,40	3,164	136
C13--H13...O11	1,31	2,43	3,586	144
Interação Intramolecular				
C8--H8A...O11	0,96	2,29	2,785	111

Utilizando o programa Mercury 1.4.2 [98] distribuído pelo *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) foi visualizada, a partir de arquivos CIF (*Crystallographic Information File*), a estrutura tridimensional do BZN e o arranjo da sua cela unitária mostrada anteriormente, bem como se obteve o difratograma de raios X de pó teórico. A Figura 3.7 mostra a sobreposição dos difratogramas em pó experimental e calculado do BZN. Na comparação dos dois difratogramas podemos observar que todas as reflexões do padrão experimental são reproduzidas pelo calculado, tanto nas posições como nas intensidades relativas. Ou seja, não foram observadas alterações significativas no padrão dos difratogramas, indicando que não há mudança de estrutura cristalina. Confirmando o que já tinha sido sugerido pela microscopia eletrônica, a difração de raios X mostra que o BZN como matéria prima se encontra na mesma estrutura cristalina que a determinada a partir de sua recristalização.

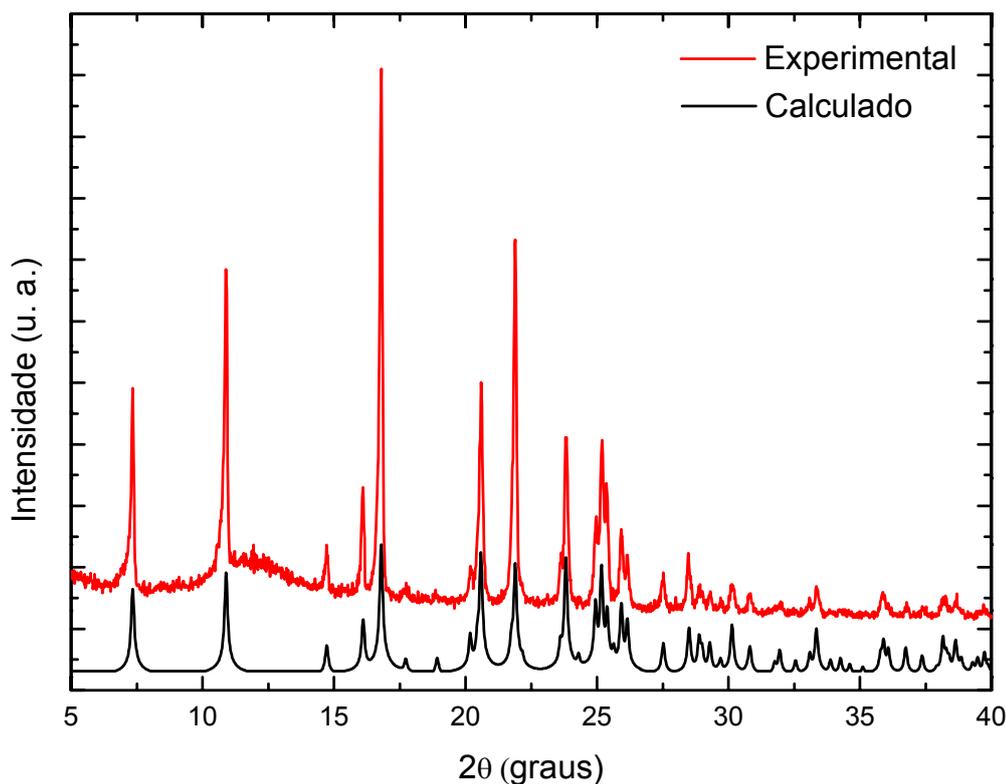


Figura 3.7. Comparação entre os difratogramas experimental e calculado do BZN.

3.4 Espectroscopia Vibracional

Com o intuito de fornecer uma caracterização completa do BZN no estado sólido que pudesse ser empregada no controle de qualidade das matérias-primas, investigou-se este princípio ativo através da espectroscopia vibracional. As técnicas utilizadas neste trabalho foram o espalhamento Raman e as espectroscopias no infravermelho médio e próximo. Os espectros Raman e de infravermelho médio foram comparados na Figura 3.8 e a discussão foi dividida em regiões.

Região de Alta Energia (2800-3600 cm^{-1}): Nessa região de análise podem-se verificar vibrações de estiramentos do NH, CH e CH_2 (Figura 3.8). O modo observado em 3272 cm^{-1} é relativo ao estiramento simétrico do NH da amida primária, enquanto que as vibrações em $2868\text{-}2981 \text{ cm}^{-1}$ estão relacionadas com o estiramento do CH_2 . O modo encontrado em 3115 cm^{-1} e 3131 cm^{-1} é uma vibração do tipo estiramento do CH do anel do grupo imidazólico. Entre $3000\text{-}3092 \text{ cm}^{-1}$ encontram-se os modos de estiramento dos CH do benzil.

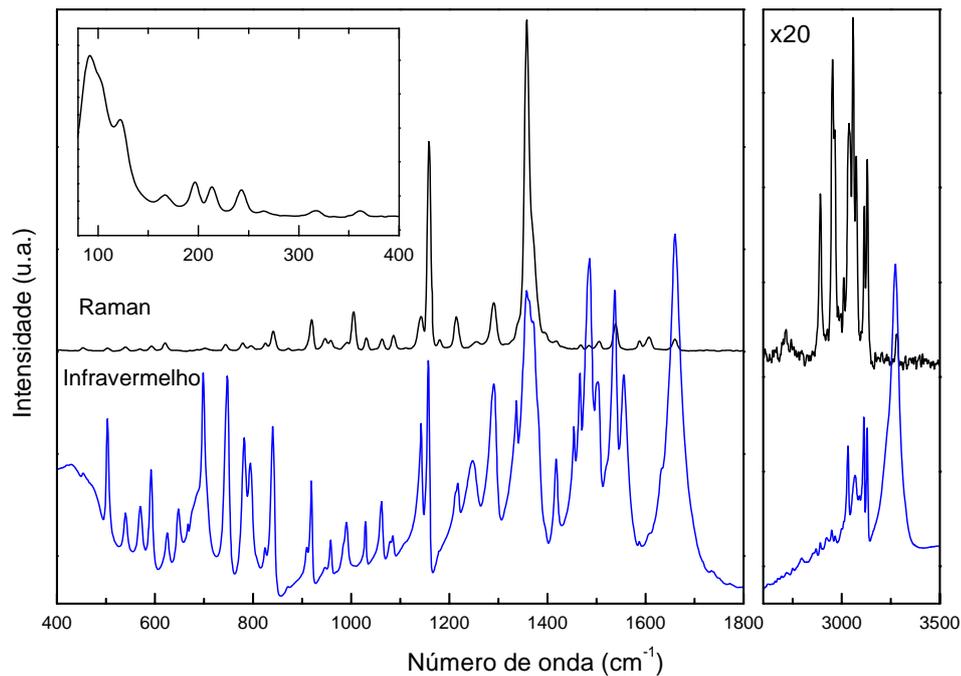


Figura 3.8. Espectros de espalhamento Raman e de absorção no infravermelho do BZN.

Região de Média Energia (1150-1700 cm^{-1}): Pode-se observar um modo bem intenso no infravermelho em 1662 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O da amida primária. É interessante ressaltar que existe um deslocamento importante para baixas energias devido o grupo carbonila participar da ligação de hidrogênio NH...O que estabiliza a estrutura cristalina. Nos espectros Raman podem ser identificados dois modos em 1588 cm^{-1} e 1609 cm^{-1} referentes ao estiramento C=C do anel benzílico. Uma vibração do tipo deformação do NH no plano pode ser identificada em 1556 cm^{-1} ; enquanto a banda observada em 1535 cm^{-1} é devida à vibração assimétrica do grupo nitro (NO_2). Entre 1436 - 1514 cm^{-1} encontram-se deformações do grupo CH. Em 1310 - 1403 cm^{-1} têm as deformações assimétricas do grupo CH_2 , as quais devem receber uma contribuição do estiramento simétrico do grupo NO_2 . Entre 1110 - 1170 cm^{-1} existem as deformações axiais dos C=C do anel benzílico.

Região de Baixa Energia (400-1100 cm^{-1}): Nessa região os modos de estiramento C-C e o restante das deformações e torções devem ser identificados. Os modos fortes entre 890 - 1100 cm^{-1} são referentes à respiração do anel benzênico. Um modo forte no infravermelho em 698 cm^{-1} é da deformação do NH fora do plano. Existem duas bandas em 768 - 810 cm^{-1} referentes às deformações dos hidrogênios fora do plano do anel ligados ao fenila mono-substituído.

Região de Vibração dos Modos da Rede (<200cm⁻¹): Algumas bandas observadas abaixo de 200 cm⁻¹ podem ser assinaladas experimentalmente como deformações do esqueleto molecular junto com outras bandas espectrais que podem ser originadas das ligações de hidrogênio intermoleculares entre os grupos NH e C=O de moléculas vizinhas (detalhe da Figura 3.8). No entanto, uma classificação detalhada destes modos não é possível sem a ajuda de simulações computacionais.

Região do infravermelho próximo (4000 a 10000 cm⁻¹): A teoria de modos normais considera que as vibrações dos átomos em determinadas frequências seguem uma lei de força harmônica a qual é válida para amplitudes vibracionais infinitesimais em torno da posição de equilíbrio. Para amplitudes finitas (movimentos vibracionais anarmônicos), entretanto, a teoria de modos normais e coordenadas normais associadas encontra dificuldades para descrever as transições vibracionais de alta energia. Na espectroscopia do infravermelho próximo (NIR), que corresponde à faixa espectral de 800 nm a 2.5 μm (12.500-4000 cm⁻¹), a radiação possui energia suficiente para excitar os sobretoms e combinações das vibrações moleculares fundamentais, sendo observadas, principalmente, as vibrações associadas às ligações de carbono, nitrogênio e oxigênio com hidrogênio.

Na Figura 3.9 na região de 4000 a 5400 cm⁻¹ identificam-se grupos de bandas associados com as combinações $\nu(\text{CH})+\nu(\text{C}=\text{O})$, $\nu(\text{CH})+\delta(\text{CH})$, e $\nu(\text{NH})+\delta(\text{NH})$. Seguindo, observa-se o primeiro sobretom dos estiramentos do CH (~6000 cm⁻¹) e NH (~6500 cm⁻¹) e suas combinações com as deformações $\delta(\text{CH})$ (~7200 cm⁻¹). Esta classificação das bandas NIR é melhor entendida quando se considera que os estiramentos $\nu(\text{CH})$ são esperados na região de 2800-3000 cm⁻¹, o $\nu(\text{C}=\text{O})$ na região de 1820 a 1680 cm⁻¹ e $\delta(\text{CH})$ na região de 1350-1470 cm⁻¹, tal que suas combinações ($\nu(\text{CH})+\delta(\text{CH})$ e $\nu(\text{CH})+\nu(\text{C}=\text{O})$) e o primeiro sobretom (2 $\nu(\text{CH})$) correspondem, respectivamente, às regiões de 4150-4470 cm⁻¹, 4425-4725 cm⁻¹ e 5600-6000 cm⁻¹ no NIR. No caso das ligações NH, o $\nu(\text{NH})$ é observado a ~3400 cm⁻¹ e $\delta(\text{NH})$ a ~1500 cm⁻¹ tal que a combinação $\nu(\text{NH})+\delta(\text{NH})$ e o sobretom 2 $\nu(\text{NH})$ determinam as bandas NIR de ~4900 cm⁻¹ e ~6800 cm⁻¹, respectivamente.

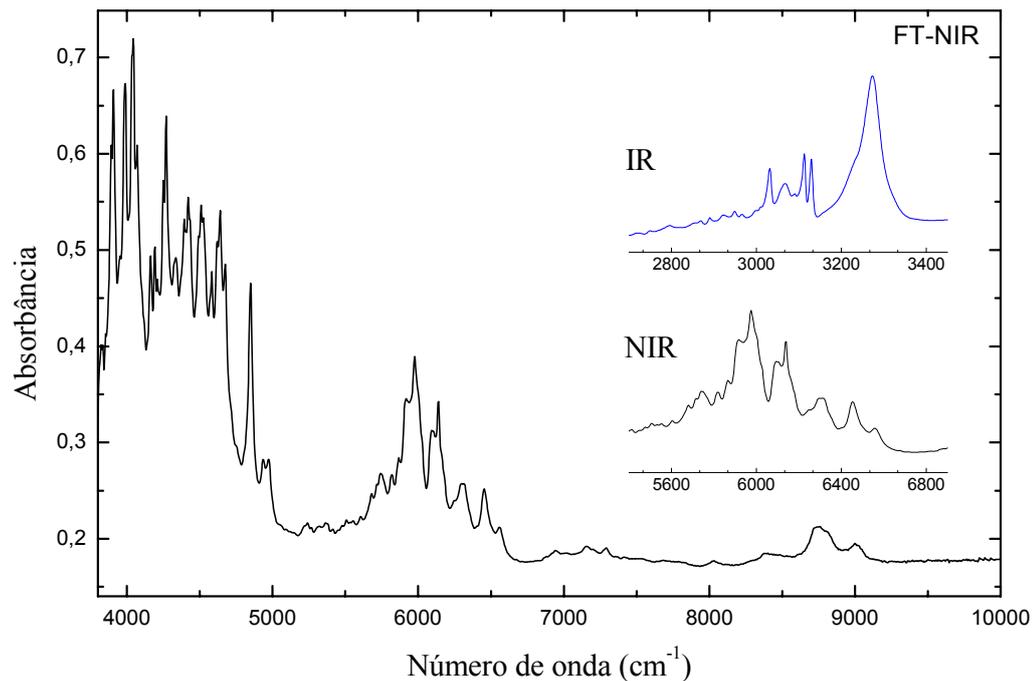


Figura 3.9. Espectro vibracional na região do infravermelho próximo do BZN.

3.5 Análise Térmica

Nas medidas de análise térmica usou-se um equipamento que combina em uma mesma análise a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG) acoplados à espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Com esses métodos acoplados, os gases liberados de uma amostra, durante o experimento termoanalítico, são detectados e identificados, obtendo-se, dessa forma, três informações complementares na mesma amostra em uma única experiência.

3.5.1 Termogravimetria

O estudo da estabilidade térmica do BZN foi realizado na faixa de temperatura de 50 a 450°C usando uma razão de aquecimento de 10K/min em atmosfera de nitrogênio. Pode-se observar na Figura 3.10 a curva termogravimétrica do BZN com dois eventos. O BZN é estável até a temperatura de aproximadamente 273°C, onde o primeiro evento começa e é caracterizado pela decomposição. Este processo é muito nítido, terminando em torno de 286°C e é acompanhado por uma perda de massa de 25,6%. A análise dos gases liberados

pela espectroscopia de absorção no infravermelho (detalhe da Figura 3.10) revelou que a decomposição é caracterizada pela liberação de vapor de água (H_2O , faixa de $2000 - 1250 \text{ cm}^{-1}$), acompanhada de amônia (NH_3 , em torno de 900 cm^{-1}) e CO_2 ($2400 - 2200 \text{ cm}^{-1}$). Considerando-se que cada molécula é liberada durante a decomposição do BZN, elas combinadas correspondem a 30% da massa do BZN, ou seja, estão de acordo com o resultado da TG. Um segundo processo de decomposição, com *onset* em torno de 303°C evidencia uma perda de massa de 30,6% em 450°C .

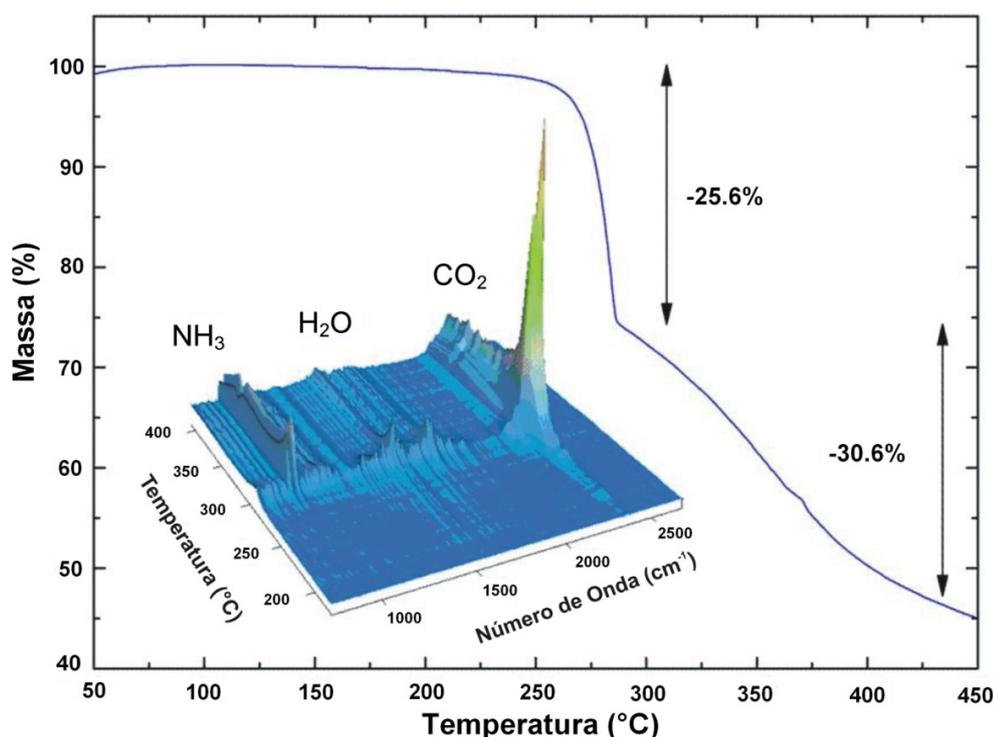


Figura 3.10. Curva de TG para o BZN mostrando no detalhe os espectros de FT-IR dos gases liberados durante a varredura de temperatura.

3.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

A Figura 3.11 apresenta a curva de DSC para o BZN onde duas anomalias bem definidas são observadas claramente. O primeiro evento é endotérmico e está associado à fusão do material com *onset* em torno de 190°C e ΔH de 138 J/g . Em seguida tem-se uma anomalia exotérmica com *onset* em torno de 273°C e uma entalpia de decomposição de 1138 J/g . Finalmente, um último evento exotérmico muito fraco e longo com *onset* em 300°C pode

ser observado e corresponde a um segundo processo de decomposição. O detalhe da Figura 3.11 mostra processos de aquecimento/resfriamento, onde a temperatura mais alta foi limitada a 200°C a fim de evitar a decomposição do BZN. No processo de resfriamento um pico exotérmico foi observado em aproximadamente 89,6°C, o qual está associado à recristalização da fase fundida. Além disso, foi observado que no segundo aquecimento a anomalia correspondente à fusão se desloca para menores temperaturas. Este resultado sugere a existência de um processo mais complexo e por isso, medidas detalhadas do processo de fusão/recristalização do BNZ foram realizadas.

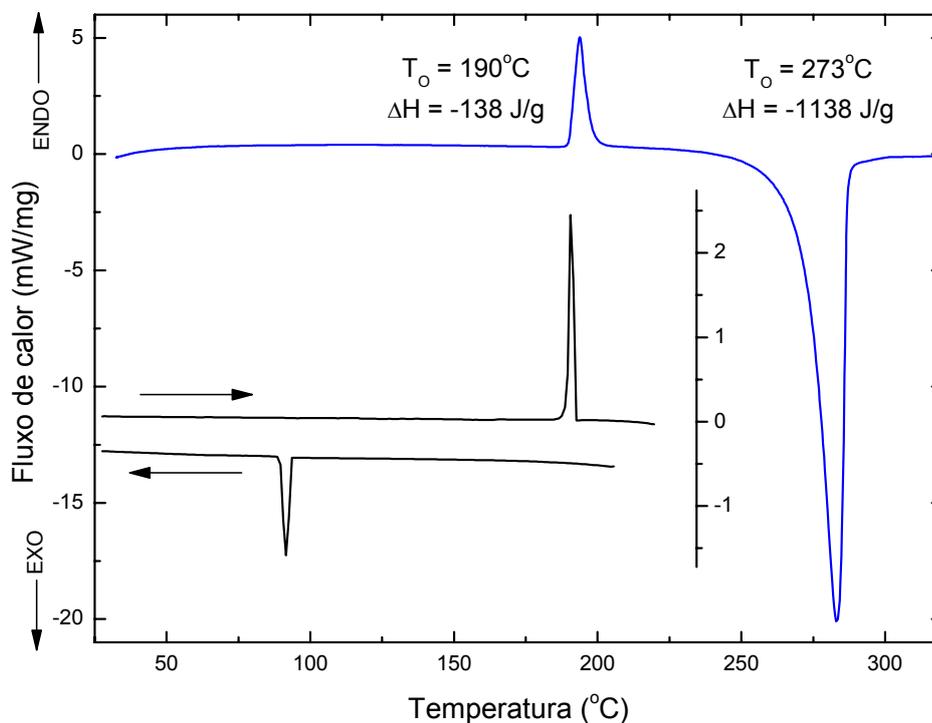


Figura 3.11. Curva de DSC do BZN.

No intuito de investigar a existência de transições de fase do BNZ, um grande número de medidas DSC foram realizadas com diversas taxas de variação de temperatura, além de uma mesma amostra ser submetida a vários ciclos de aquecimento/resfriamento. Pelas medidas de TG foi possível verificar que o processo de decomposição começa acima dos 200°C, motivo pelo qual esta foi a temperatura limite estabelecida para o estudo das transições de fase. A taxa de aquecimento variou entre 1 e 10 K/min, enquanto que para o resfriamento foram empregadas taxas entre 1 e 100 K/min.

Da análise dos termogramas obtidos nas condições experimentais descritas previamente, foi possível observar que o BNZ exibe uma série de eventos os quais são quase independentes das taxas de temperatura usadas. Como já foi mostrado, num primeiro aquecimento o BNZ funde a 190°C (Figura 3.11) e se recristaliza no resfriamento. O processo de cristalização é o fenômeno mais dependente das condições experimentais, podendo ser caracterizado por um ou vários eventos exotérmicos entre 90°C e 140°C. Já no segundo aquecimento, um evento exotérmico muito fraco foi identificado sistematicamente a aproximadamente 105°C, sendo caracterizado por uma entalpia de -8 J/g. A fase resultante desta transição funde a 188°C com $\Delta H = 113$ J/g. Termogramas representativos destes processos são apresentados na Figura 3.12. É importante corroborar que após o primeiro ciclo, aquecimentos consecutivos sempre levaram ao comportamento descrito no segundo aquecimento. Variações da taxa de resfriamento de 1 a 100 K/min não foram capazes de mudar este comportamento. No entanto, num segundo aquecimento realizado numa amostra após aproximadamente 30 dias do primeiro tratamento foi observado novamente o ponto de fusão de 190°C. Assim, pode-se inferir que a fase com ponto de fusão em 188°C é metaestável e sua interconversão para a forma original é um processo muito lento.

3.6 Termomicroscopia polarizada

As anomalias observadas nos termogramas de DSC foram também monitoradas através da técnica de termomicroscopia. Um conjunto de imagens representativas das medidas é apresentado na Figura 3.13. Como já foi discutido previamente, o BNZ como matéria prima ou após a recristalização exibe um hábito acicular (Figura 3.13a), o qual é mantido no aquecimento até a fusão. Este resultado está em bom acordo com o DSC, já que nenhum evento é identificado no primeiro aquecimento. Além disso, cristais com o mesmo hábito cristalino são obtidos se a recristalização após a fusão acontece na presença de sementes dessa forma cristalina (Figura 3.13b). Diante das evidências encontradas a favor da existência de polimorfos do BZN, esta fase foi identificada como Forma I.

Do mesmo modo que no DSC, diferentes taxas de resfriamento após a fusão do BZN foram empregadas, sendo que em todos os casos cristais com hábito de esferulita foram observados na ausência de sementes da Forma I (Figura 3.13c). Num resfriamento rápido alguns cristais isolados deste tipo podem ser facilmente identificados dentro de uma fase

amorfa correspondente ao líquido sub-resfriado. Todavia, no aquecimento, todo o BZN transforma-se para a fase com hábito de esferulita (Figura 3.13d), a qual foi identificada como Forma II. Continuando com o aquecimento, uma nova mudança no hábito cristalino é observada a aproximadamente 100°C (Figura 3.13e). O novo hábito cristalino se difunde rapidamente ao longo de toda a amostra completando a transformação acima de 130°C (Figura 3.13e). A nova fase é mantida até a fusão do material. De acordo com o DSC esta fase deve ser aquela de ponto de fusão em 188°C. Lamentavelmente, a precisão do sistema de termomicroscopia não permite distinguir essa pequena diferença de temperaturas. Entretanto, já foi mostrado que cristais aciculares só são obtidos na presença de sementes da Forma I. No segundo aquecimento, na ausência de sementes, nenhum dos hábitos observados pode ser correlacionado com o da Forma I, já que a recristalização da fusão leva às esferulitas da Figura 3.13c. Deste modo, a fase intermediária entre a Forma II e a fusão possui as características de um novo polimorfo e será identificada como Forma III.

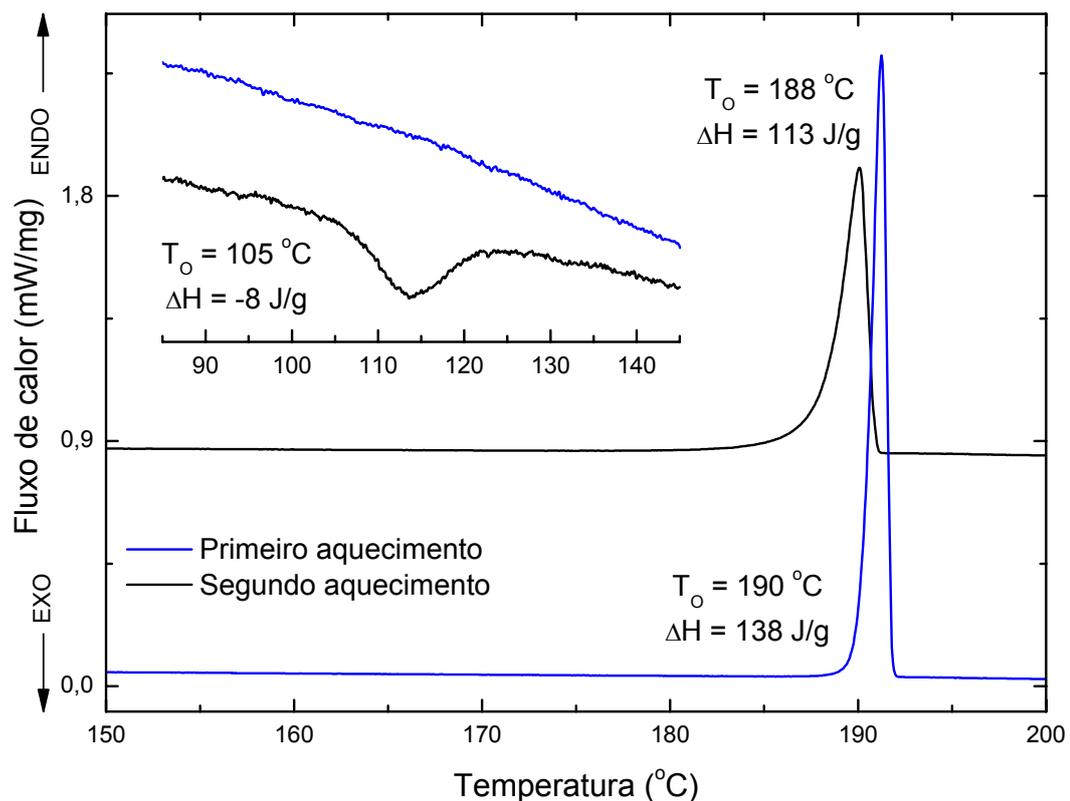


Figura 3.12. Termogramas de ciclos sucessivos de aquecimento resfriamento no BNZ.

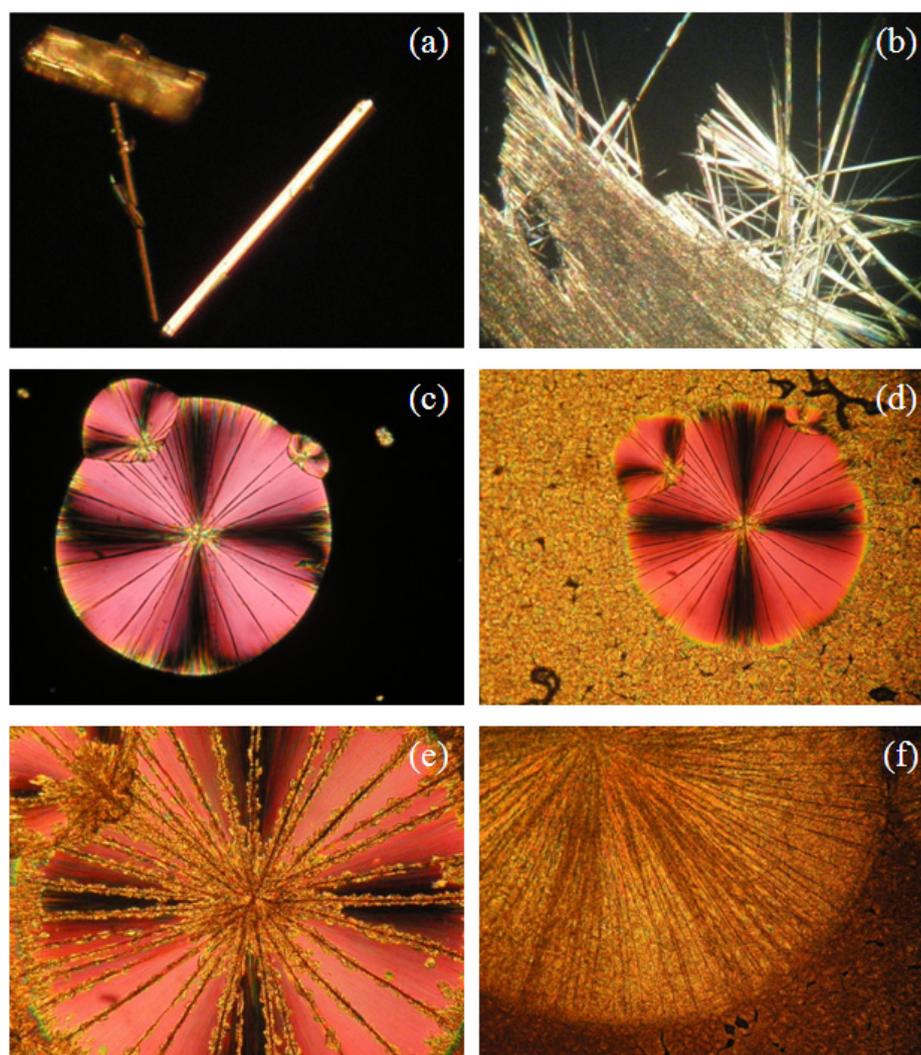


Figura 3.13. Termomicroscopia polarizada do BZN. (a) amostra recristalizada; (b) fundida e recristalizada com sementes da forma I; (c) fundida e resfriada rapidamente; (d) 60°C; (e) 100 °C e (f) 160°C.

3.7 Difração de raios X de pó

A existência de pelo menos um segundo polimorfo na temperatura ambiente também foi confirmada através de difração de raios X de pó. Por isso, a matéria prima foi aquecida a 200°C para obter BNZ na fase líquida, a qual foi resfriada novamente à temperatura ambiente. Os padrões de difração da amostra original e da recristalizada são apresentados na Figura 3.14, onde também foi incluído o padrão calculado a partir da estrutura cristalina resolvida em

monocristais. Nesta figura pode ser claramente observado que o padrão da matéria prima é exatamente descrito pela estrutura previamente resolvida. Por outro lado, na amostra fundida podem ser identificadas diferenças que a caracterizam como uma nova forma cristalina. Portanto, além dos pequenos deslocamentos observados nas reflexões por volta de $16,5^\circ$ e 22° , as evidências mais relevantes da mudança estrutural estão no desaparecimento da reflexão em $20,6^\circ$ e $26,0^\circ$. Estes resultados demonstram que após a fusão o BZN se recristaliza numa nova forma, confirmando o caráter polimórfico desse composto.

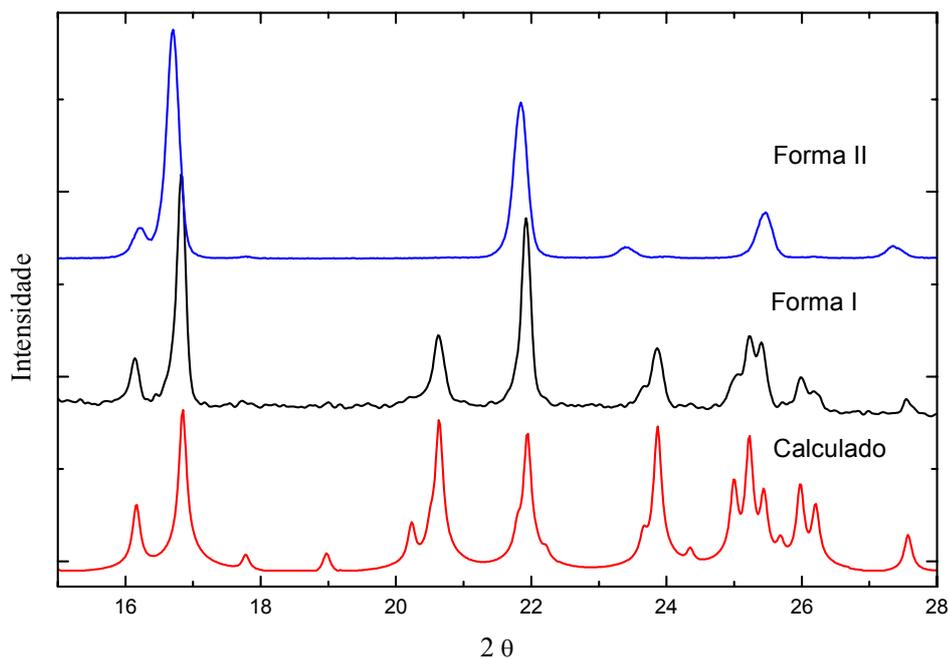


Figura 3.14. Detalhe do espectro de difração de raios X em pó do BNZ comparando o padrão calculado com a matéria prima e a recristalização após a fusão da mesma.

3.8 Diagrama de energia/temperatura

No estudo de sistemas polimórficos, conhecer a relação entre as energias livres das diferentes formas é de grande importância para entender a estabilidade termodinâmica das mesmas. Como já foi descrito, as informações obtidas das medidas de análise térmica podem ser usadas para construir diagramas de energia relacionando os polimorfos.

As relações entre as estabilidades termodinâmicas dos polimorfos podem ser determinadas através das regras do calor de fusão (HFR), do calor de transição (HTR) [45, 46,

99] e dos pontos de fusão. Três polimorfos ($n = 3$) foram identificados dando origem a $(n-1)$ $n/2 = 3$ pares que podem estar relacionados monotropicamente ou enantiotropicamente. Logo, a construção de diagramas energia/temperatura será de grande ajuda para descrever o comportamento desse sistema polimórfico.

De acordo com a regra HFR é bem evidente que o polimorfo de maior ponto de fusão (I) está monotropicamente relacionado com o polimorfo III, já que sua entalpia de fusão é maior. Embora não seja possível medir o ponto de fusão da forma II, pode-se concluir que está monotropicamente relacionada à forma III devido haver uma transição exotérmica. Isso sugere que o ponto de fusão da forma II deve ser superior ao da forma III. Foi calculado o calor de fusão da forma II Usando a lei de Hess como a soma dos calores de transição II→III e de fusão da forma III. Assim, o calor de fusão da forma II é aproximadamente 105 J/g. O fato de essa ser a menor entalpia de fusão sugere que a forma II é a menos estável, e, portanto, deve existir uma relação monotrópica com as outras duas formas. Em virtude disso, a curva de energia livre isobárica que representa a forma II não deve ter interseção com as das formas I e III, como mostrado na Figura 3.15.

Com base nos valores dos pontos de fusão e entalpias de fusão é possível estimar a ordem das transições [45, 46, 99]. Estes cálculos permitem confirmar as conclusões obtidas dos diagramas de energia/temperatura (Figura 3.15) e verificar as relações entre pares de polimorfos (monotrópica: $T_{trs} > T_{fus}$ e enantiotrópica: $T_{trs} < T_{fus}$). Os cálculos são baseados na seguinte equação:

$$T_{trs} = \frac{\Delta_{fus}H_2 - \Delta_{fus}H_1 + (C_{p,liq} - C_{p,1})(T_{fus,1} - T_{fus,2})}{\frac{\Delta_{fus}H_2}{T_{fus,2}} - \frac{\Delta_{fus}H_1}{T_{fus,1}} + (C_{p,liq} - C_{p,1})\ln\left(\frac{T_{fus,1}}{T_{fus,2}}\right)} \quad (1)$$

onde T_{trs} é o ponto de transição termodinâmico (em K), $\Delta_{fus}H$ o calor de fusão (J/g) e C_p o calor específico (J/g.K). Os sub-índices 1 e 2 correspondem às formas de maior e menor ponto de fusão, respectivamente. Como os calores específicos do líquido ($C_{p,liq}$) e da forma de alto ponto de fusão ($C_{p,1}$) usualmente não estão disponíveis, a correção empírica $C_{p,liq} - C_{p,1} = \kappa \Delta_{fus}H_1$ pode ser empregada. Os valores típicos de κ vão de 0.001 a 0.007 K, com um valor médio de $\kappa \sim 0.003/K$ [100]. Assim, obtendo-se:

$$T_{trs} = \frac{\Delta_{fus}H_2 - \Delta_{fus}H_1 + \kappa\Delta_{fus}H_1(T_{fus,1} - T_{fus,2})}{\frac{\Delta_{fus}H_2}{T_{fus,2}} - \frac{\Delta_{fus}H_1}{T_{fus,1}} + \kappa\Delta_{fus}H_1 \ln\left(\frac{T_{fus,1}}{T_{fus,2}}\right)} \quad (2)$$

Usando esta relação, a temperatura de transição I-III em 200°C foi calculada. Como este valor é superior aos pontos de fusão dos dois polimorfos, pode-se confirmar que os mesmos estão relacionados monotropicamente. Por outro lado, não se tem conhecimento dos valores do calor de fusão e do ponto de fusão da forma II para aplicar a equação (2) aos pares II-III e II-I. No entanto, esta equação foi adaptada por Henck [101] para determinar o ponto de fusão a partir da temperatura de transição:

$$T_{fus,2} = \frac{\Delta_{fus}H_2 T_{fus,1} T_{trs}}{T_{fus,1} \Delta_{fus}H_2 + T_{trs} \Delta_{fus}H_1 - T_{fus,1} \Delta_{fus}H_1} \quad (3)$$

Considerando o calor de fusão da forma II estimado através da lei de Hess, o valor estimado para o ponto de fusão da forma II é 194°C. De acordo com as regras de Burger [45, 46] seria esperado que o ponto de fusão da forma II fosse o menor entre todos os polimorfos. No entanto, o valor estimado é levemente superior ao da forma I. Considerando que as equações empregadas são baseadas em diversas aproximações, pode-se esperar que os valores obtidos tenham um erro experimental considerável. Assim, como as duas temperaturas medidas experimentalmente e a calculada estão distribuídas num intervalo de ~3% do valor médio, pode-se considerar que os resultados dos cálculos não têm precisão suficiente para confirmar ou refutar as conclusões apresentadas previamente. O fato de os valores serem muito próximos sugere que as diferenças de energia entre os polimorfos sejam pequenas. Isso está em boa concordância com a observação de que as diferentes formas cristalinas podem ser facilmente estabilizadas na temperatura ambiente. Também foi verificado que a forma II, e provavelmente a III, é metaestável na temperatura ambiente com uma taxa de conversão relativamente lenta. Devido a isso, não pode ser descartada a possibilidade que estas fases sejam obtidas em alguma etapa do processo de produção do BZN. Investigações adicionais devem ser realizadas para verificar se estes polimorfos são bioequivalentes e seu possível impacto na eficácia do BZN.

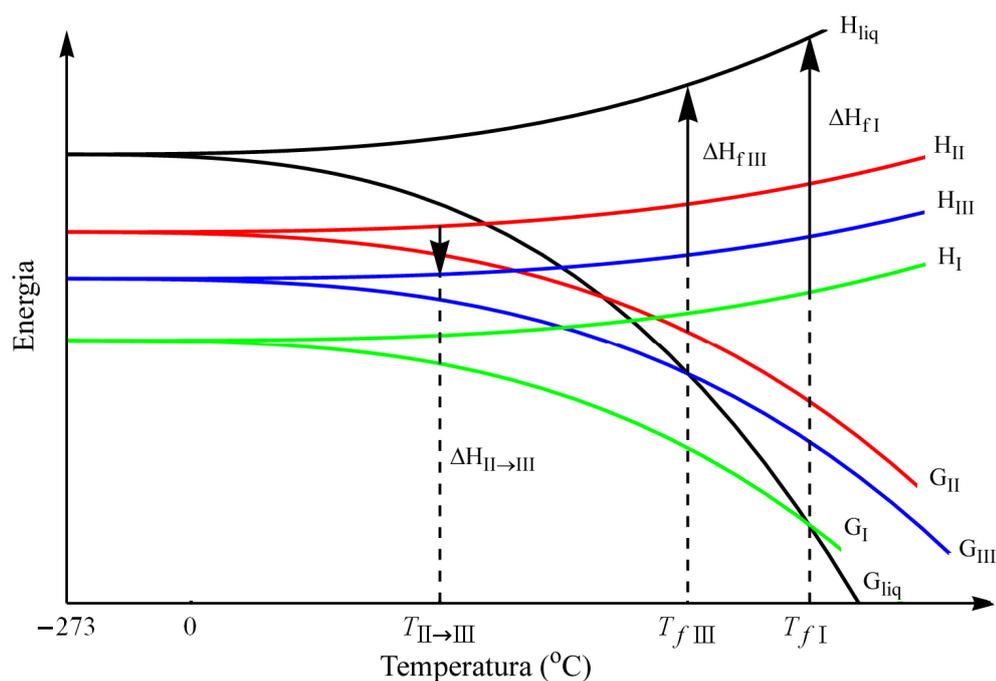


Figura 3.15. Diagrama Energia/temperatura dos polimorfos do BZN.

3.9 Conclusões

Uma caracterização físico-química detalhada do BZN foi realizada nesse capítulo. A estrutura cristalina desse composto foi discutida em detalhes baseados nos dados da difração de raios X em monocristal, que permitiram a comparação do difratograma padrão teórico do pó com o da matéria-prima. Obteve-se a impressão digital vibracional do BZN por espalhamento Raman e por espectroscopia de absorção no infravermelho (médio e próximo), fornecendo, destarte, informações valiosas para o desenvolvimento de novas rotas de síntese do BZN e para o aprimoramento de procedimentos de controle de qualidade a serem aplicados na validação de matérias-primas e de produtos formulados.

A contribuição mais relevante desse estudo do BZN foi ter demonstrado que esse princípio ativo exibe polimorfismo. Mesmo sendo empregado no tratamento da doença de Chagas há quase 50 anos, não existem reportes na literatura que sugerem essa propriedade. Além disso, é importante levar em consideração que a forma II é metaestável e possui uma taxa de conversão muito lenta para a forma I. Como esta última é empregada na formulação do BNZ, cuidados adicionais devem ser aplicados para garantir a pureza polimórfica das matérias-primas.

4 Secnidazol

4.1 Introdução

O secnidazol (SNZ) é um princípio ativo pertencente à classe dos 5-nitroimidazóis e está estruturalmente relacionado aos comumente usados: metronidazol e tinidazol. Esses fármacos mostram um espectro comum de atividade agindo contra microorganismos anaeróbios, sendo que parecem ser particularmente mais eficazes no tratamento da amebíase, giardíase, tricomoníase e infecções bacterianas da vagina [102]. O SNZ corresponde ao 1-(2-hidroxi-propil)-2-metil-5-nitroimidazol segundo a nomenclatura da IUPAC, com a fórmula estrutural representada na Figura 4.1. Ele pode ser administrado no tratamento a pacientes atingidas por infecções bacterianas da vagina, apresentando eficácia semelhante ao realizado com o metronidazol, sendo este administrado em múltiplas doses [103]. Os agentes da classe dos nitroimidazóis usados no tratamento da giardíase incluem metronidazol, tinidazol, ornidazol e SNZ. Essa classe foi descoberta em 1955, sendo altamente eficaz contra várias infecções causadas por protozoários [104].

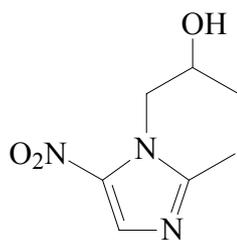


Figura 4.1. Fórmula estrutural do SNZ.

O SNZ possui longa ação e normalmente administra-se em uma única dose. O regime mais comum é de 2g para adultos e 30 mg/kg para crianças. Doses de 2g administradas uma única vez produzem picos de concentração que variam de 35,7 a 46,3 mg/L, sendo alcançados entre 1,2 - 3,0 horas [105]. Estudos clínicos demonstraram uma taxa de eficácia acima de 85% com doses únicas em adultos, e em crianças sua dosagem é tão efetiva como num tratamento de 7-10 dias com metronidazol. O fármaco é rapidamente e completamente absorvido, tendo

uma meia vida de eliminação de 17 - 29 horas, sendo metabolizado via oxidativa no fígado [104, 106]. Os efeitos adversos relatados são mais notadamente distúrbios gastrointestinais (náusea, anorexia, dor abdominal), porém não requerem descontinuação do uso. A conveniência e a facilidade de administração numa dose única combinadas ao bom perfil de tolerância faz do SNZ uma opção adequada a outros tratamentos de dose única e uma alternativa atrativa aos regimes de doses múltiplas de outros fármacos da classe.

O SNZ possui significativa degradação em condições alcalinas e na presença de luz, sendo mais suave em meio ácido e neutro. Vários procedimentos analíticos têm sido relatados para a determinação do SNZ em preparações farmacêuticas, tanto isoladamente como em combinação com outros fármacos. Os métodos relatados incluem potenciometria, polarografia, cromatografia com fluido supercrítico, CLAE, voltametria e espectrofotometria. A maior parte dos métodos espectrofotométricos sofre desvantagens, como escala estreita de determinação, requerem aquecimento ou extração, longo tempo para a reação se completar e uso de sistemas não aquosos [107, 108].

Duas formas cristalinas são atribuídas ao SNZ: uma anidra (SNZa) e um hemihidrato (SNZh), contudo apenas o hidrato é estável à temperatura ambiente. Neste capítulo, a estabilidade das formas do SNZ será estudada de forma singular, combinando diferentes técnicas da Física do Estado Sólido com os cálculos quânticos de primeiros princípios.

4.2 Detalhes experimentais

Amostras de SNZ foram caracterizadas por difração de raios X de pó a fim de identificar a correspondente forma sólida. Os padrões de difração experimental e simulado do SNZ são mostrados na Figura 4.2. O programa FULLPROF [109] foi usado para ajustar o padrão simulado ao experimental, junto com alguns parâmetros instrumentais (intensidade total, linha de base, formas de linha, deslocamento do zero, etc.). Uma excelente concordância entre o padrão simulado baseado na estrutura cristalina reportada e os dados experimentais mostra claramente que as amostras estão na forma do SNZh.

Imagens obtidas através de microscopia eletrônica e microscopia óptica polarizada em amostras recristalizadas mostram que o SNZh exibe um hábito cristalino de lâminas, sendo este muitas vezes confundido com um hábito acicular (Figura 4.3).

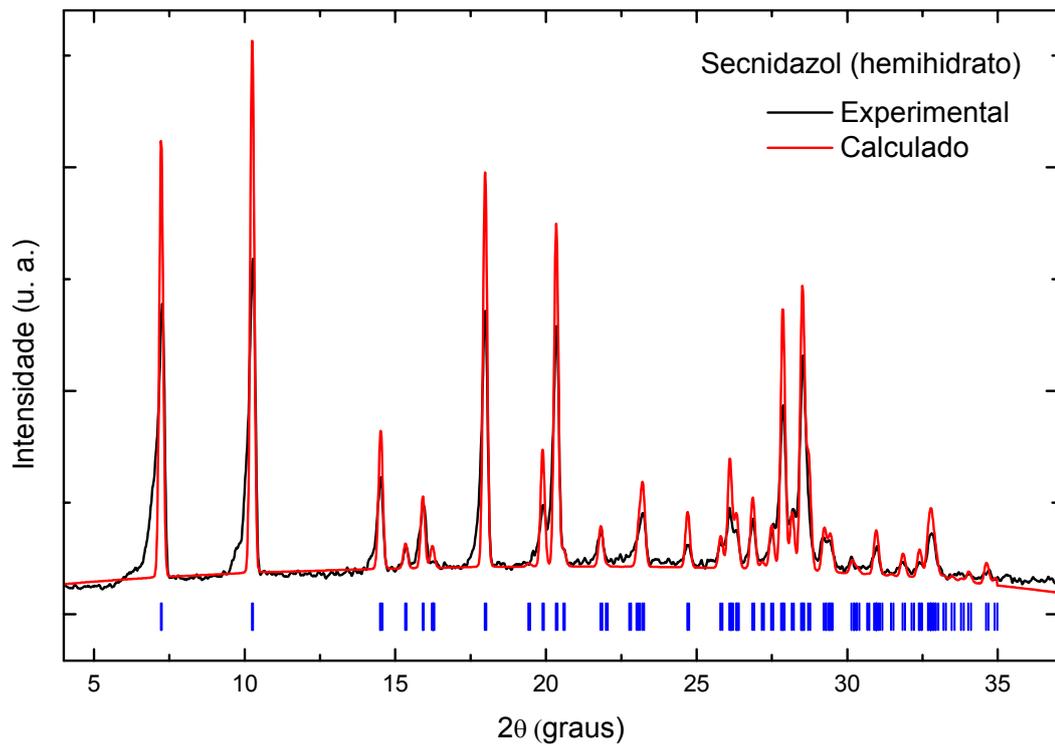


Figura 4.2. Comparação do padrão de raios X experimental e calculado (estrutura cristalina do hemihidrato de SNZ).

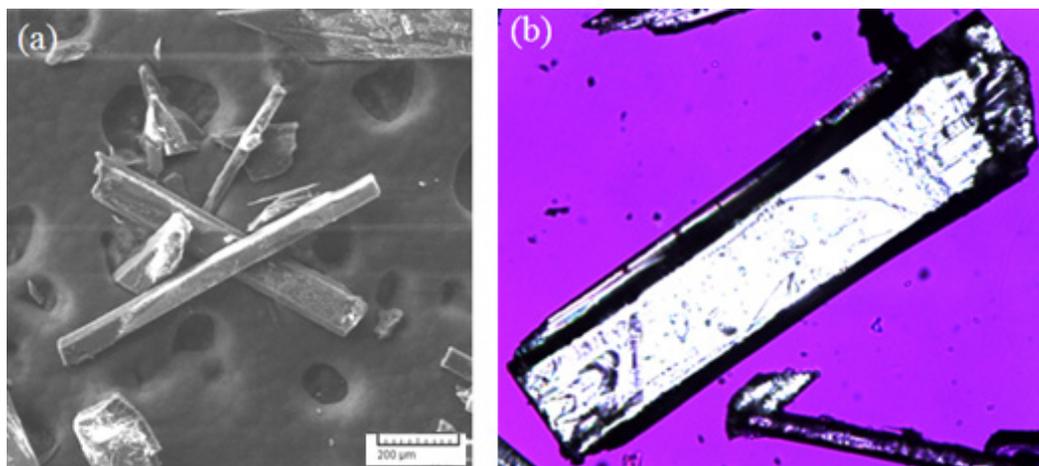


Figura 4.3. (a) Imagem de microscopias eletrônica e (b) óptica polarizada do SZNh.

4.3 Estrutura Cristalina e Difração de raios X

A estrutura cristalina do SNZh foi resolvida por Novoa de Armas *et al.* [110]. A mesma possui simetria monoclinica com parâmetros de rede $a = 12.424 \text{ \AA}$, $b = 12.187 \text{ \AA}$, $c = 6.6621 \text{ \AA}$ e $\beta = 100.9^\circ$, pertencendo ao grupo espacial $P2_1/c$. Os principais dados cristalográficos são apresentados na Tabela 4.1. Embora a estrutura cristalina do SNZa não tenha sido resolvida, os parâmetros de rede obtidos por Novoa de Armas *et al.* [110] de medidas de difração de raios X de pó estão enumerados na Tabela 4.1. Pela comparação das estruturas do SNZh e do SNZa foi observado que os dois compostos possuem o mesmo número de moléculas por cela unitária, ou seja, $Z = 4$. No SNZh as moléculas de água ocupam apenas 50% dos sítios permitidos (ocupação 0,5), formam cadeias ao longo do eixo a (Figura 4.4) e facilitando seu deslocamento dentro da rede cristalina.

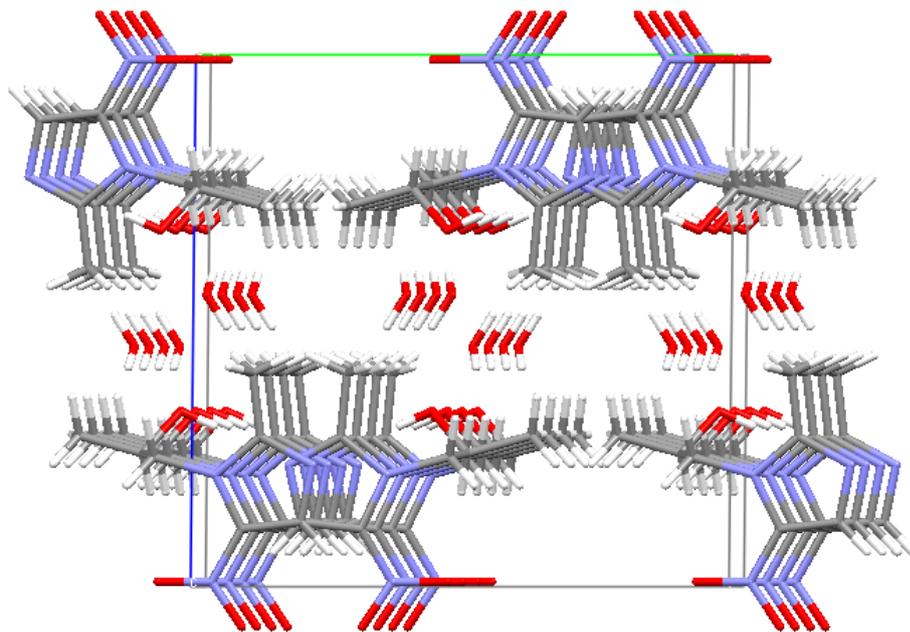


Figura 4.4. Empacotamento das celas unitárias do SNZh ao longo do eixo a .

Tabela 4.1 - Dados cristalográficos para o SNZa e o SNZh [110].

Fórmula molecular	$C_7H_{11}N_3O_3$	$C_7H_{11}N_3O_3 \cdot \frac{1}{2} H_2O$
Massa molar	185,18 g/mol	203 g/mol
Parâmetros de rede	$a = 12.426 \text{ \AA}$	12.424 \AA
	$b = 12.187 \text{ \AA}$	12.187 \AA
	$c = 6.662 \text{ \AA}$	6.662 \AA
	$\beta = 100.9^\circ$	100.9°
Volume da cela	$V = 990.66 \text{ \AA}^3$	990.5 \AA^3
Grupo espacial		$P2_1/c$
Números de moléculas por cela unitária	$Z = 4$	$Z = 4$

Na Figura 4.5 está representada a unidade assimétrica do composto SNZh com a identificação de seus respectivos átomos. A representação é feita pelo ORTEP [111]. A numeração dos átomos de hidrogênio foi omitida para melhor visualização. Os elipsóides foram desenhados com 50% de probabilidade.

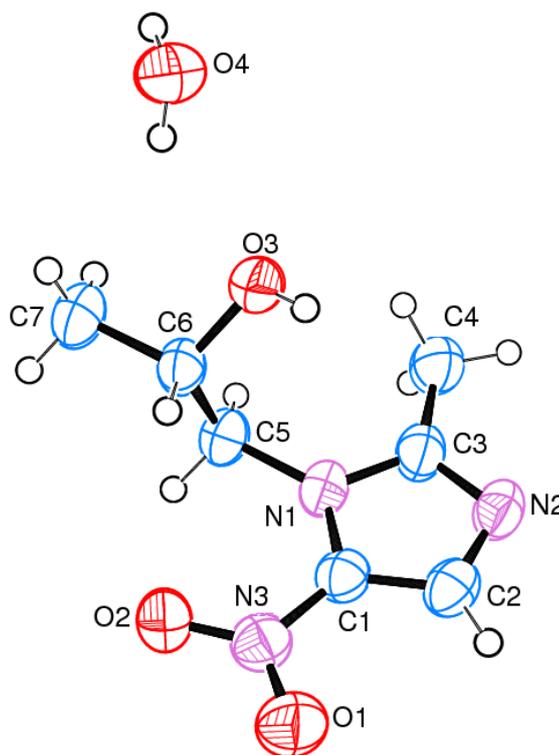


Figura 4.5. Unidade assimétrica da estrutura cristalina do SNZh.

A estrutura cristalina do SNZh mostra a presença de quatro moléculas de SNZ por célula unitária com $Z = 4$ e confirma a existência de um hidrato. Na cela unitária existem quatro moléculas de água formando ligações de hidrogênio fortes com as moléculas do SNZ [112]. A presença dessas ligações de hidrogênio do tipo $2^*O4-H4A...O3$ e $2^*O4-H4B...O3$ (Tabela 4.2) funcionam como forte agente estabilizador do arranjo cristalino. Estas interações são promovidas pelas moléculas de água que se encontram entre os SNZ e se ligam pela hidroxila do radical propil (Figura 4.6). O átomo H4A age como o agente doador da ligação de hidrogênio ao átomo O3. Enquanto que o átomo H3 em $(1 O3-H3...N2)$ age como doador ao N2 constituindo a mais fraca ligação de hidrogênio. Isso é justificado pelo fato do N2 estar estabilizado pela ressonância do anel imidazólico, sendo difícil a interação dos seus pares de elétrons π livres (Figura 4.6). As ligações de hidrogênio não-clássicas deste composto encontram-se representadas na Figura 4.7. Dois tipos de ligações de hidrogênio são mostradas na Figura 4.7: uma intermolecular, $C2-H2...O2$, e a outra intramolecular, $C5-H5B...O2$, sendo a mais forte do composto (Tabela 4.2).

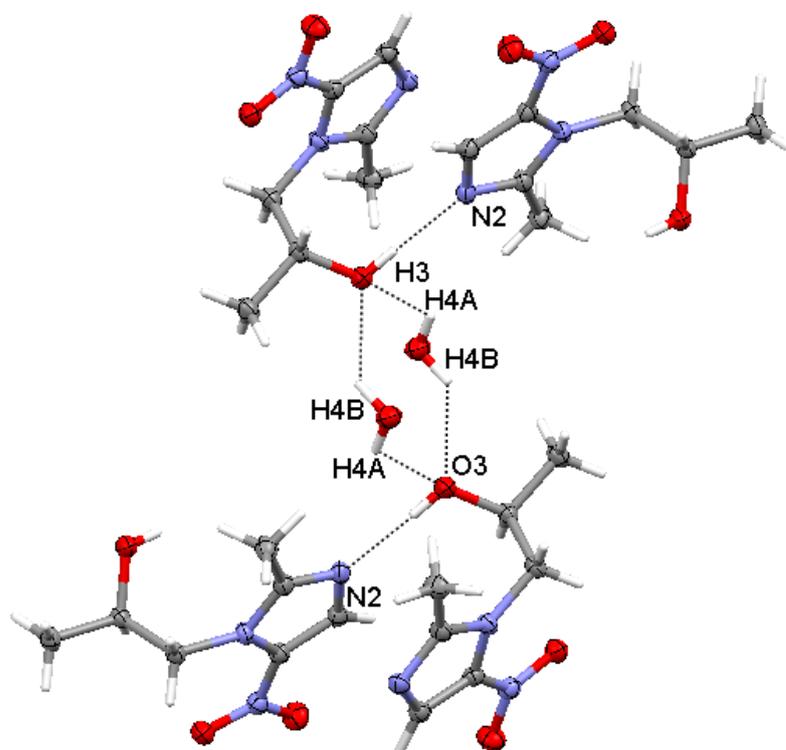


Figura 4.6. Representação das ligações de hidrogênio clássicas do composto SNZh.

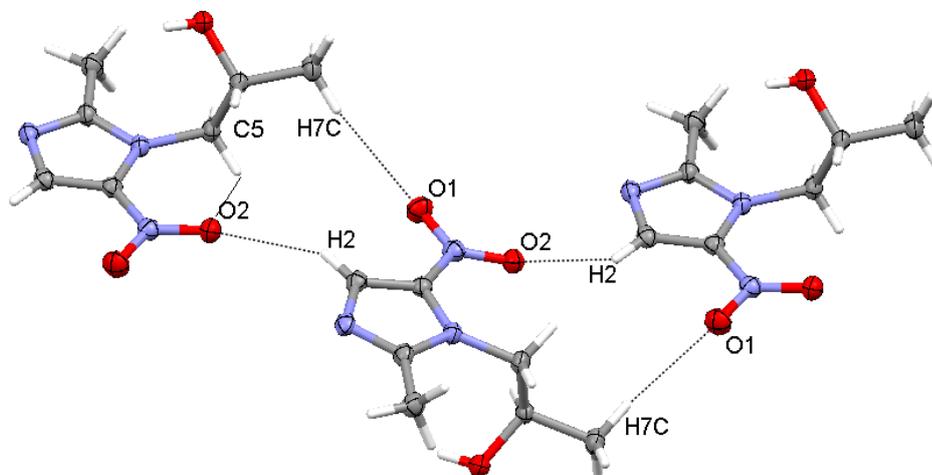


Figura 4.7. Representação das ligações de hidrogênio não-clássicas do composto SNZh.

Tabela 4.2 - Distâncias e ângulos para as ligações de hidrogênio do composto SNZh.

D-H...A	H...A (Å)	D...A (Å)	D - H...A (°)
2*O4--H4A...O3	2,20	2,7184	119
2*O4--H4B...O3	2,17	2,8478	137
1 O3--H3...N2	1,97	2,7907	174
1 C2--H2...O2	2,49	3,3444	152
1 C4--H4B...O4	2,60	3,3876	140
1 C5--H5A...O4	2,52	3,4427	158
1 C5--H5B...O2	2,42	2,8680	108

4.4 Espectroscopia Vibracional

4.4.1 Detalhes Computacionais

A estrutura eletrônica e a geometria otimizada da molécula do SNZ foram computadas pela teoria do funcional da densidade (DFT) [113] usando o programa Gaussian 03 [114]. Utilizamos o funcional de troca híbrido de Becke e os funcionais de correlação de Lee-Yang-Parr (B3LYP) [115-117]. A base utilizada foi a 6-31++G(d,p), com as funções de polarização d para átomos pesados e p para átomos de hidrogênio. Para complementar, também utilizamos funções difusas tanto para os átomos pesados quanto para o hidrogênio [118, 119]. As intensidades absolutas de espalhamento Raman e absorção no infravermelho foram calculadas considerando uma aproximação harmônica, no mesmo nível da teoria como foi usado para otimizar a geometria. A análise dos modos normais de vibração foi efetuada em termos da distribuição de energia potencial (PED) e foi calculada para cada coordenada interna usando simetrias localizadas [120, 121]. Para esta finalidade uma série completa de 66 coordenadas internas foram definidas usando as recomendações de Pulay [120, 121]. As atribuições vibracionais dos modos normais foram propostas com base na PED calculada usando o programa GAR2PED [122]. Os espectros Raman e infravermelho foram simulados usando uma forma de linha Lorentziana pura ($\text{fwhm} = 8 \text{ cm}^{-1}$). A visualização e confirmação dos modos normais de vibração foram feitas usando o programa CHEMCRAFT [123].

4.4.2 Otimização da Geometria

Os cálculos da otimização da geometria foram realizados adotando a conformação do SNZ determinada por difração de raios X em monocristal [124] como a geometria inicial. A otimização da geometria produziu uma molécula que é extraordinariamente semelhante a da unidade assimétrica cristalográfica. As estruturas otimizada e experimental da molécula foram comparadas por sobreposição usando o método dos mínimos quadrados que minimiza as distâncias entre os átomos (não hidrogênios) (Figura 4.8). O consenso entre a geometria otimizada e a experimental é excelente mostrando que a otimização da geometria reproduz quase exatamente a conformação experimental (desvio médio total $0,078 \text{ \AA}$). As principais diferenças encontram-se na orientação dos grupos metil e hidroxil. O último exhibe o maior desvio dos resultados experimentais, mas este efeito pode ser associado com as ligações de hidrogênio $\text{O13H}\cdots\text{Ow}$ e $\text{O13H}\cdots\text{N4}$, que estabilizam a estrutura cristalina.



Figura 4.8. Comparação entre as geometrias das conformações experimental e otimizada do SNZ.

4.4.3 Espectro vibracional

O número total de átomos na molécula do SNZ é 24, daí, 66 modos normais ($3n - 6$) devem ser observados. A conformação molecular obtida da estrutura cristalina, assim como a resultada pela otimização da geometria, não exibem nenhuma simetria especial, sendo assim a molécula pertence ao grupo pontual C_1 .

Como um sólido cristalino, o SNZ e as moléculas de água estão localizados em sítios gerais ($4e$ na notação de Wickoff) no grupo espacial centrossimétrico $P2_1/c$ (C_{2h}^5). Considerando que cada estrutura cristalina tem quatro moléculas de SNZ e quatro moléculas de água por célula unitária (os sítios da H_2O têm ocupação 0.5), isto dá $3N - 3 = 321$, [$N = 4 \times (24+3) = 108$] modos vibracionais (rotações da molécula livre se transformam em fônons libracionais; as translações tornam-se fônons acústicos, que têm frequência zero no ponto gama). Usando o método dos sítios de simetria proposto por Rousseau *et al.* [125], os modos vibracionais do SNZh são distribuídos nas representações irreduzíveis do grupo pontual C_{2h} como mostrado a seguir:

$$\Gamma_{\text{vib}}(321) = 81A_g + 81B_g + 80A_u + 79B_u \quad (4)$$

De acordo com o princípio de exclusão mútua, no caso de uma estrutura centrossimétrica, as representações ativas no Raman não são ativas no infravermelho, e vice-versa. Assim, 156 e 153 modos vibracionais exibem Raman (A_g e B_g) e infravermelho (A_u e B_u), respectivamente. Entretanto, em um cristal orgânico, o campo cristalino não é geralmente forte bastante para separar as componentes (representações irreduzíveis) dos modos internos da molécula, que se tornam acidentalmente degenerados. Assim, o espectro vibracional é determinado principalmente pelos modos da molécula livre observados em frequências mais elevadas, junto com os modos da rede cristalina (translacionais e libracionais) na região espectral de baixa frequência.

As seções de choque de espalhamento Raman, $\partial\sigma_j/\partial\Omega$, que são proporcionais às intensidades Raman, podem ser calculadas através da amplitude do espalhamento Raman e números de onda previstos para cada modo normal usando a relação [126, 127]:

$$\frac{\partial\sigma_j}{\partial\Omega} = \left(\frac{2^4 \pi^4}{45} \right) \left(\frac{(v_0 - v_j)^4}{1 - \exp\left[\frac{-hcv_j}{kT}\right]} \right) \left(\frac{h}{8\pi^2 cv_j} \right) S_j \quad (5)$$

onde S_j e v_j são as atividades de espalhamento e as frequências previstas (cm^{-1}), respectivamente do modo normal j^{th} . A frequência de excitação Raman é v_0 (cm^{-1}) e h , c , e k são constantes universais.

As intensidades calculadas no Raman e infravermelho foram convolucionadas conforme cada modo vibracional previsto com uma forma de linha Lorentziana ($\text{fwhm} = 8 \text{ cm}^{-1}$) para produzir espectros simulados. As atribuições foram feitas com base nas intensidades relativas, forma de linha e PED. Os números de onda atribuídos para o confôrmero mais estável junto com a PED para cada modo normal é dado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Números de onda teóricos e experimentais (cm⁻¹) do SNZh.

DFT		Raman	IR	PED ^b
Sem Escala	Escalado			
3842	3667	--	3452	OH[ν(OH)](100)
3262	3114	3137	3133	R[ν(C3H)](99)
3158	3014	3015	3015	CH2[ν _a (CH ₂)](99)
3145	3002	3003	2998	Me1[ν _a (CH ₃)](97)
3101	2960	2984	2984	Me2[ν _a (CH ₃)](96)
3097	2956	2975	2974	Me1[ν _a (CH ₃)](74)+ Me2[ν _a (CH ₃)](15) + CH2[ν(CH ₂)](7)
3096	2955	2934	2937	Me2[ν _a (CH ₃)](71) + Me1[ν _a (CH ₃)](22)
3090	2949	--	2918	CH2[ν _s (CH ₂)](83) + Me2[ν _a (CH ₃)](14)
3037	2899	2906	2896	CH[ν(C7H)](94)
3032	2894	2878	2871	Me1[ν _s (CH ₃)](99)
3028	2890	2849	2850	Me2[ν _s (CH ₃)](100)
1562	1538	1536	1529	NO2[ν _a (NO)+δ(N10C2)+δ (NO ₂)](63)+ R[ν(CC)+ ν(NC)] (26)
1540	1516	--	--	R[ν _a (NC)+δ(C3H)](34)+NO2[ν _a (NO)](22)+Me1[δ _a (CH ₃) + ν (CC)](14)
1504	1481	1489	1489	R[ν(NC)+ δ _{ring} +ν(CC)](36) +Me1[ν(CC)+δ _a (CH ₃)] (27) +CH2[δ (CH ₂)](8) +Me2[δ(CH ₃)](6)
1499	1476	1489	1488	R[ν(CC)+δ _{ring}](36)+NO2[ν _a (NO)](24)+Me1[δ _a (CH ₃) (16)]
1496	1474	--	--	Me2[δ _a (CH ₃)+ρ (CH ₃)](80)
1493	1470	--	--	Me2[δ _a (CH ₃)+ρ(CH ₃)](81)+Me1[δ(CH ₃)](5)
1484	1462	1471	1468	Me1[δ _a (CH ₃) +δ(CH ₃)](89)
1472	1450	1461	1448	CH2[δ(CH ₂)](54) +Me1[δ _a (CH ₃)](21)
1454	1432	1437	1430	R[ν(NC)](32)+CH2[δ(CH ₂)+ ν(NC)](25)+Me1[δ _a (CH ₃)] (15)+ NO2[δ(N10C2)+ ν(CN)+ν(NO)](12)
1421	1400	1408	--	CH2[ω(CH ₂)+δ(CH ₂)](34)+CH[ρ(CH)+ν(CC)](32)+ Me2[δ _s (CH ₃)](19) + OH[δ(OH)] (7)
1415	1395	1390	1392	Me1[δ _s (CH ₃)(49)]+CH2[γ (CH ₂)](6)+CH[ρ(CH)] (5) +Me2[δ _s (CH ₃)](5)+R[ν _a (CN)](5)+NO2[ν(C2N10)](5)
1411	1390	--	--	Me2[δ _s (CH ₃)](70) + ν(CC)(9)+ CH[ρ(CH)](5)
1391	1371	--	1379	NO2[ν(C2N10)+ν _a (NO)+ δ(NO ₂)](25) + CH[ρ(CH)] (20) +R[ν(CN)+δ(C3H)] (25) + CH2[γ(CH ₂)](15)
1387	1367	1369	1357	NO2[ν(NO)+ν(C2N10)+ δ(NO ₂)](31)+Me1[δ _s (CH ₃) (29)]+CH[ρ(CH)](16)+CH2[ω(CH ₂)](7)+R[ν(CN)](5)]

1379	1360	1345	1333	R[$\nu(\text{NC})$](36) + CH ₂ [$\gamma(\text{CH}_2)$](22) + CH[$\rho(\text{CH})$](11)
1350	1331	1307	1305	CH[$\rho(\text{CH})$](49) + CH ₂ [$\omega(\text{CH}_2)$](32)
1297	1279	1272	1271	R[$\nu(\text{NC}) + \delta_{\text{ring}}$](28) + CH ₂ [$\gamma(\text{CH}_2)$](21) + OH[$\delta(\text{OH})$](20) + CH[$\rho(\text{CH})$](7)
1292	1275	1265	1264	R[$\nu(\text{CN}) + \delta(\text{C3H}) + \delta_{\text{ring}} + \nu(\text{NC})$](53) + NO ₂ [$\nu(\text{NC}) + \nu_a(\text{NO}) + \delta(\text{NO}_2)$](37)
1226	1210	--	1196	CH ₂ [$\rho(\text{CH}_2)$](21) + OH[$\delta(\text{OH})$](20) + R[$\nu(\text{NC}) + \delta(\text{C3H}) + \delta_{\text{ring}}$](20) + CH[$\rho(\text{CH})$](17)
1216	1201	1192	1184	R[$\nu(\text{CN}) + \nu(\text{CC}) + \delta_{\text{ring}} + \nu(\text{NC}) + \delta(\text{C3H})$](55) + CH ₂ [$\nu(\text{NC})$](19) + NO ₂ [$\nu(\text{NO})$](11) + Me1[$\nu(\text{CC})$](5)
1176	1164	1155	1151	R[$\delta_{\text{ring}} + \delta(\text{C3H}) + \nu_a(\text{CN})$](68) + NO ₂ [$\nu(\text{C}_2\text{N}_{10})$](9) + CH ₂ [$\nu(\text{NC})$](5)
1136	1124	1138	1138	Me ₂ [$\rho(\text{CH}_3)$](30) + OH[$\nu(\text{CO})$](22) + $\delta(\text{C}_8\text{OC}_7)$ (14) + $\nu(\text{CC})$ (7) + CH ₂ [$\rho(\text{CH}_2)$](8)
1117	1105	1111	1110	$\nu(\text{CC})$ (28) + Me ₂ [$\rho(\text{CH}_3)$](25) + OH[$\nu_a(\text{CO}) + \delta(\text{OH})$](19) + $\delta(\text{CCO})$ (11) + CH ₂ [$\delta(\text{NC}_7\text{C}_6)$](6)
1074	1063	1086	1085	$\nu(\text{CC})$ (32) + OH[$\delta(\text{OH}) + \nu_a(\text{CO})$](24) + CH ₂ [$\rho(\text{CH}_2)$](12) + $\delta(\text{CCO})$ (6) + Me ₂ [$\rho(\text{CH}_3)$](5)
1065	1054	1044	1039	Me1[$\rho(\text{CH}_3) + \delta_a(\text{CH}_3) + \delta_{\text{oop}}(\text{C}_9\text{C}_5)$](85) + R[τ_{ring}](5)
1018	1008	1007	1008	Me1[$\rho(\text{CH}_3)$](46) + R[$\nu(\text{NC})$](20)
983	975	983	981	R[$\delta_{\text{ring}} + \nu(\text{NC}) + \delta(\text{C}_3\text{H})$](50) + Me1[$\rho(\text{CH}_3) + \nu(\text{CC})$](20) + CH ₂ [$\rho(\text{CH}_2) + \delta(\text{C}_6\text{N}_1)$](7)
940	932	937	935	Me ₂ [$\rho(\text{CH}_3)$](37) + $\nu(\text{CC})$ (30) + OH[$\nu_a(\text{CO})$](20)
902	896	906	904	CH ₂ [$\rho(\text{CH}_2)$](40) + Me ₂ [$\delta(\text{CH}_3)$](14) + $\nu(\text{CC})$ (9) + R[$\nu(\text{NC})$](11)
890	884	879	878	R[$\delta_{\text{oop}}(\text{C}_3\text{H}) + \tau_{\text{ring}}$](94)
849	844	842	842	OH[$\nu(\text{CO})$](31) + $\nu(\text{CC})$ (27) + Me ₂ [$\rho(\text{CH}_3)$](12) + CH ₂ [$\delta(\text{NC}_7\text{C}_6) + \rho(\text{CH}_2)$](12) + CH[$\rho(\text{CH})$](5)
840	835	829	827	NO ₂ [$\delta(\text{NO}_2) + \nu(\text{NC}) + \nu(\text{NO}_2)$](71) + R[δ_{ring}](15)
783	780	775	777	CH ₂ [$\nu(\text{NC}) + \delta(\text{NC}_7\text{C}_6)$](35) + R[$\delta_{\text{ring}} + \nu(\text{NC})$](19) + Me1[$\nu(\text{CC})$](13) + $\delta(\text{C}_6\text{C}_8\text{C}_7)$ (5)
736	733	743	742	NO ₂ [$\delta_{\text{oop}}(\text{NO}_2) + \delta_{\text{oop}}(\text{N}_{10}\text{C}_2)$](92) + R[τ_{ring}](6)
697	695	691	691	R[$\tau_{\text{ring}} + \delta_{\text{ring}}$](50) + Me1[$\delta_{\text{oop}}(\text{C}_9\text{C}_5) + \nu(\text{CC})$](26)
681	681	675	675	R[$\tau_{\text{ring}} + \delta_{\text{ring}}$](57) + Me1[$\delta_{\text{oop}}(\text{C}_9\text{C}_5) + \nu(\text{CC})$](24)
607	609	609	609	R[τ_{ring}](70) + NO ₂ [$\delta_{\text{oop}}(\text{N}_{10}\text{C}_2)$](14) + CH ₂ [$\delta_{\text{oop}}(\text{C}_6\text{N}_1)$](8)
574	576	572	569	NO ₂ [$\rho(\text{NO}_2) + \delta(\text{N}_{10}\text{C}_2)$](52) + CH ₂ [$\delta(\text{C}_6\text{N}_1)$](12) + Me1[$\delta(\text{C}_5\text{C}_9)$](12) + R[$\nu(\text{CC})$](5)
481	486	495	495	$\delta(\text{CCO})$ (25) + CH ₂ [$\delta(\text{NC}_7\text{C}_6)$](11) + Me1[$\delta(\text{C}_5\text{C}_9)$]

463	468	476	475	(10)+NO2[ν (C2N10)](7) + ν (CC) (6)+R[τ_{ring}](5) δ (CCO)(59) +CH2[τ (N1C6) + ρ (CH ₂)] (19) + δ (C6C8C7) (8)
423	429	428	432	NO2[ν (C2N10)+ δ (NO2)+ ρ (NO ₂)] (31)+ δ (CCO) (24)+R[δ_{ring}](10)+ CH2[δ (C6N1)](9)
391	398	395	--	NO2[δ (OC2N10)+ ν (C2N10)](28)+ Me1[δ (C5C9)] (24)+ CH2[δ (C6N1)](16)+ R[ν (N1C2)](8)
336	344	351	--	CH2[δ (C6N1)+ δ (CH ₂)+ δ_{oop} (C6N1)](32)+ Me1 [δ (C5C9)] (22)+ δ (C6C8C7) (18)
309	318	331	--	CH2[δ (C6N1)+ ν (N1C6)] (16)+ δ (C6C8C7)(15)+ δ (CCO)(12)+ Me1[δ_{oop} (C9C5)](12)+NO2[ρ (NO ₂)] (10)
284	284	298	--	Me1[δ_{oop} (C9C5)](32)+NO2[δ_{oop} (N10C2)](28)+CH2 [τ (N1C6)](8)+R[τ_{ring}](7)
260	271	278	--	CH2 [δ_{oop} (C6N1) + δ (C6N1)+ δ (NC7C6)](30)+ NO2[δ_{oop} (N10C2)](20)+ δ (C6C8C7)(18) + δ (CCO) (13) +Me1[δ (C5C9)](5)
232	243	--	--	OH[τ (CO)](83)
226	237	234	--	Me2[τ (C7C8)](59)+NO2[δ (N10C2)](15)+OH [τ (CO)] (10) +Me1[δ (C5C9)](5)
211	223	221	--	NO2[δ (N10C2)+ ρ (NO ₂)](43)+ Me2[τ (C7C8)] (33)+ Me1[δ (C5C9)](6)+ δ (C6C8C7)(5)
147	161	169	--	Me1[τ (C5C9)](86)
136	150	147	--	NO2[δ_{oop} (N10C2)](41)+CH2[δ (NC7C6)+ δ_{oop} (C6N1) + τ (N1C6)](30) +Me1[δ_{oop} (C9C5)](8) + R[τ_{ring}](5)
101	117	123	--	CH2[τ (N1C6)+ δ_{oop} (C6N1)+ δ (NC7C6)](42)+ NO2[τ (C2N10)](39)
77	93	92	--	CH2[τ (N1C6) + δ_{oop} (C6N1) + δ (NC7C6)](77) + NO2[δ_{oop} (N10C2)](8)
60	76	75	--	τ (C6C7) (55)+ NO2[τ (C2N10)](14)+CH2[τ (N1C6) + δ (C6N1)](14)
43	60	60	--	CH2[τ (N1C6)+ δ_{oop} (C6N1)](47)+ NO2[τ (C2N10)+ δ_{oop} (N10C2)](31) + τ (C6C7) (9)
--	--	43	--	Lattice

^aAtribuição dos modos normais de vibração em termos da distribuição de energia potencial (PED). Tipos de vibrações: ν , estiramento; δ , deformação; oop, dobramento fora do plano; ω , *waging*; γ , *twisting*; ρ , *rocking*; τ , torção [128]. ^bDistribuição de energia potencial (contribuição ≥ 5).

A comparação dos números de onda calculados com os valores experimentais da Tabela 4.3 revela uma superestimação dos números de onda dos modos vibracionais. Isto se dá devido desconsiderar a anarmonicidade presente no sistema real. Os números de onda vibracionais foram obtidos dos cálculos de DFT usando um procedimento de duplo escalonamento para a região de impressão digital (abaixo de 1800 cm^{-1}) e estiramento X-H (acima de 1800 cm^{-1}), respectivamente [129, 130]. Todos os números de onda vibracionais calculados relatados neste trabalho estão escalados. Os espectros Raman e de absorção no infravermelho experimental e calculado são mostrados nas Figura 4.9 e Figura 4.10, respectivamente.

Vibrações C-OH: No espectro de FT-IR do SNZ (Figura 4.10), o pico característico que corresponde ao modo de estiramento do grupo OH é identificado em 3452 cm^{-1} , enquanto que o calculado está em 3667 cm^{-1} . Nos espectros Raman esta banda está presente e é larga e fraca ao redor de 3460 cm^{-1} . Os modos de deformação do OH foram calculados para estarem em 1279 e 1210 cm^{-1} , mas eles são observados em 1271 e 1196 cm^{-1} nos espectros de IR e em 1272 cm^{-1} nos espectros Raman. Os modos de estiramento $\nu(\text{CO})$ nos números de onda calculados 1124 e 932 cm^{-1} correspondem às bandas observadas em 1138 e 935 cm^{-1} nos espectros de IR e em 1138 e 937 cm^{-1} nos espectros Raman. Estes dois modos têm uma contribuição de quase 20% de $\nu(\text{CO})$, embora a contribuição de $\rho(\text{CH}_3)$ seja de quase 30%. Isso é por causa de um intenso acoplamento entre estes modos. Os modos vibracionais calculados para estarem em 486 e 468 cm^{-1} têm uma importante contribuição das coordenadas internas correspondendo à deformação $\delta(\text{CO})$. Estes modos são observados em 495 e 476 cm^{-1} nos espectros Raman e aproximadamente nas mesmas posições nos espectros de IR. A torsão em torno do CO é calculada a 243 cm^{-1} .

Vibrações CC e CH: Os estiramentos CC são calculados para estarem em 1105 , 1063 e 844 cm^{-1} , e as bandas correspondentes são observadas em 1111 , 1086 e 842 cm^{-1} nos espectros de IR e Raman. O estiramento do C7-H previsto em 2899 cm^{-1} pelo cálculo com DFT está em excelente acordo com as bandas experimentais em 2906 cm^{-1} nos espectros Raman e em 2896 cm^{-1} nos espectros de IR. O modo *rocking* do CH é calculado em 1331 cm^{-1} . A banda correspondente é observada em 1305 cm^{-1} nos espectros de IR e em 1307 cm^{-1} nos espectros Raman.

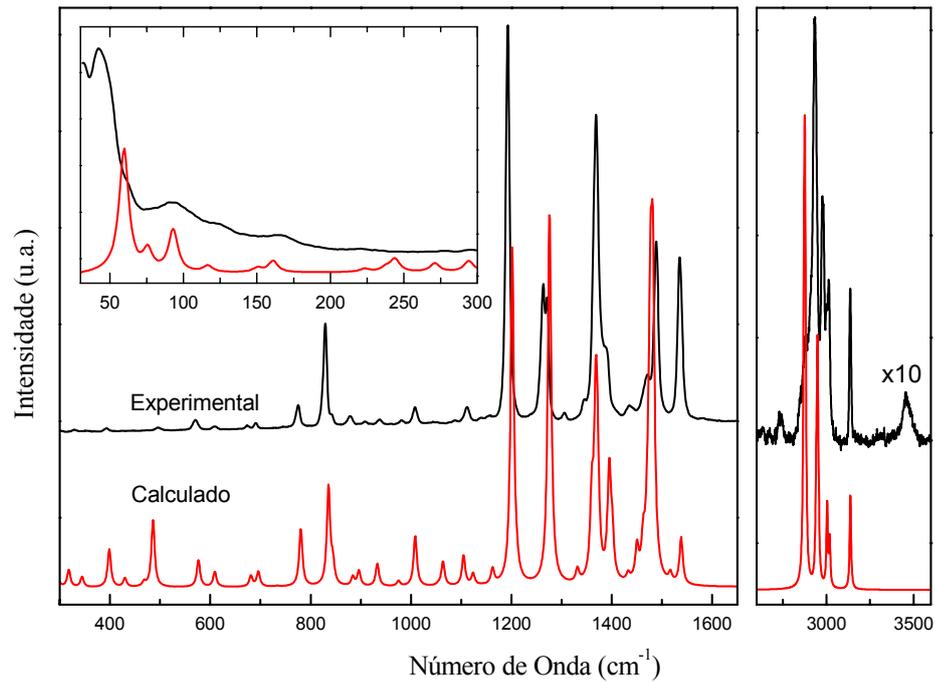


Figura 4.9. Espectros Raman experimental e calculado do SNZ na região de 300-1650 cm^{-1} e em 2600-3900 cm^{-1} (O detalhe mostra os espectros Raman na região de 30-300 cm^{-1}).

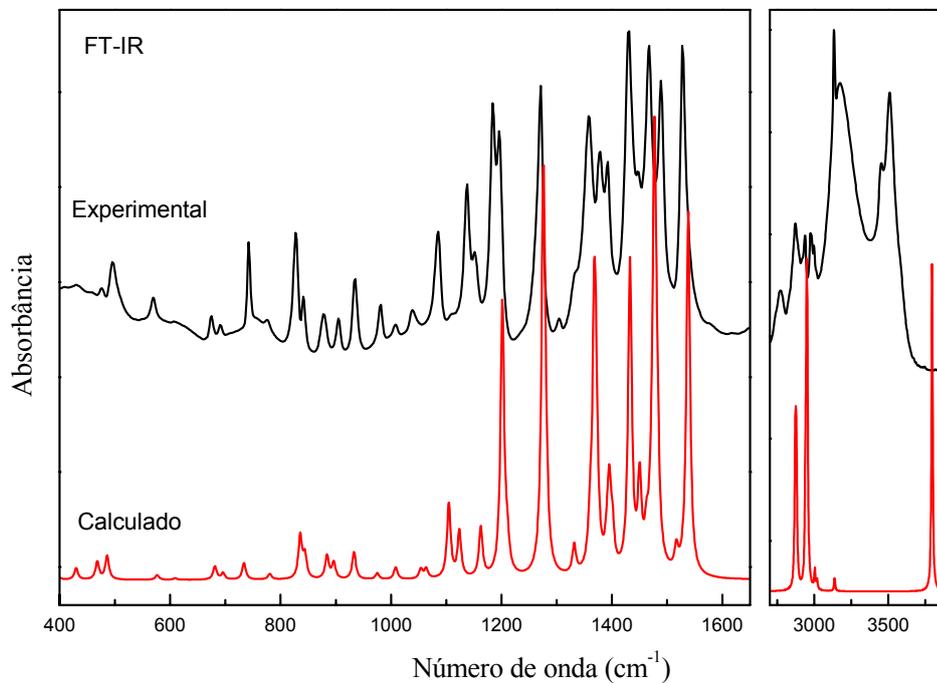


Figura 4.10. Espectros de absorção no infravermelho experimental e calculado do SNZ nas regiões 400-1650 cm^{-1} e 2700-3900 cm^{-1} .

Vibrações do grupo N-CH₂: A molécula contém um grupo CH₂ conectado ao anel. A vibração de estiramento assimétrico do CH₂ é prevista em 3014 cm⁻¹ e combina bem com os números de onda do IR e Raman. O modo de estiramento simétrico do CH₂ é calculado para estar em 2949 cm⁻¹, e é atribuído à banda em 2918 cm⁻¹ nos espectros de IR. O modo de deformação CH₂ é calculado em 1450 cm⁻¹, e o pico correspondente é observado em 1461 cm⁻¹ nos espectros Raman e em 1448 cm⁻¹ nos espectros de IR. O modo *wagging* do CH₂ ocorre em 1305 cm⁻¹ nos espectros de IR e em 1408 e 1307 cm⁻¹ nos espectros Raman. Os valores calculados são 1400 e 1331 cm⁻¹. Os modos *rocking* do grupo CH₂ correspondem a bandas de médias intensidades em 1196 e 904 cm⁻¹ nos espectros de IR, e somente uma banda Raman em 906 cm⁻¹ é observada. Os números de onda calculados correspondentes estão em 1210 e 896 cm⁻¹, como mostrado na Tabela 4.3.

Vibrações do grupo C-CH₃: Dois grupos metílicos (CH₃) estão presentes na molécula. Um deles está conectado diretamente ao anel, e o outro está conectado ao grupo do CH. O grupo CH₃ tem diversos modos associados a ele, como estiramentos simétricos e assimétricos, *bends*, *rocks* e modos de torção. As atribuições de todos estes fundamentos estão na Tabela 4.3. Os primeiros modos do grupo metila $\nu_s(\text{CH}_3)$ estão em 2878 cm⁻¹ e os modos $\nu_a(\text{CH}_3)$ são observados em 3003 e 2975 cm⁻¹ nos espectros Raman. O modo de estiramento calculado do $\nu_s(\text{CH}_3)$ é prevista em 2894 cm⁻¹, e dois modos calculados de estiramento assimétrico $\nu_a(\text{CH}_3)$ devem ser observados em 3002 e 2956 cm⁻¹. Nos espectros de IR, modos $\nu_a(\text{CH}_3)$ estão em 2998 e 2974 cm⁻¹ e um modo $\nu_s(\text{CH}_3)$ é observado em 2871 cm⁻¹. O pico correspondente ao modo de estiramento simétrico é relativamente forte. Foram identificados modos de deformação assimétricos Me1 [$\delta_a(\text{CH}_3)$] em 1468 e 1448 cm⁻¹ nos espectros de IR e em 1471 e 1461 cm⁻¹ nos espectros Raman. Estes modos estão calculados para serem em 1462 e 1450 cm⁻¹. Os modos simétricos Me1 [$\delta_s(\text{CH}_3)$] são atribuídos aos picos observados em 1390 e 1369 cm⁻¹ nos espectros Raman e em 1392 e 1357 cm⁻¹ nos espectros de IR. Os valores calculados correspondentes são 1395 e 1367 cm⁻¹. Os modos *rocking* do CH₃ são atribuídos aos picos fracos Raman em 1044 e 1007 cm⁻¹ e os picos de IR em 1039 e 1008 cm⁻¹ para o primeiro grupo metila. Os valores calculados do modo *rocking* do CH₃ são obtidos em 1054 e em 1008 cm⁻¹. O número de onda calculado em 161 cm⁻¹ mostra uma maior contribuição da torsão do CH₃ em torno da ligação C5-C9, e isto combina bem com o número de onda observado (169 cm⁻¹) nos espectros Raman. O valor comparativamente baixo deste

modo é devido à forte união do anel imidazólico com o grupo metila por meio da ligação C5-C9. Calculou-se a deformação para fora do plano em 284 cm^{-1} , e esta é observada em 298 cm^{-1} nos espectros Raman. O modo de estiramento assimétrico do segundo grupo metila é calculado em 2955 cm^{-1} e coincide bem com o pico observado em 2934 cm^{-1} nos espectros Raman e está aproximadamente na mesma posição nos espectros de IR. O estiramento simétrico do grupo metila foi calculado para estar em 2890 cm^{-1} e corresponde bem à banda em 2849 cm^{-1} observada em ambos espectros Raman e IR. O modo de deformação simétrico do metila calculado $\text{Me}_2[\delta_s(\text{CH}_3)]$ está em 1390 cm^{-1} e os assimétricos calculados $\text{Me}_2[\delta_a(\text{CH}_3)]$ estão em 1474 e 1470 cm^{-1} . O modo *rocking* do CH_3 é atribuído aos fracos picos Raman em 1138 e 1111 cm^{-1} e picos de IR fortes em 1138 e 1110 cm^{-1} . Estes dois modos *rocking* são calculados para estar em 1124 e 1105 cm^{-1} . O modo de torção calculado do C7-C8 para o segundo grupo metila está em 237 cm^{-1} , e coincide com a banda observada nos espectros Raman.

Vibrações C-NO₂: A molécula de SNZ possui somente um grupo NO₂, o qual origina uma vibração de estiramento simétrico e assimétrico. Os modos de estiramento simétrico e assimétrico aparecem em 1367 e 1538 cm^{-1} , respectivamente, e ambos os modos são altamente acoplados. As deformações simétricas e assimétricas do grupo NO₂ aparecem em $827/829\text{ cm}^{-1}$ e $742/743\text{ cm}^{-1}$ nos espectros de IR e Raman. Estes modos foram calculados para estarem em $835/733\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. O modo *rocking* do grupo NO₂ é observado em 572 cm^{-1} nos espectros Raman. Ele foi calculado em 576 cm^{-1} e é atribuído ao pico em 569 cm^{-1} nos espectros de IR. É igualmente um modo misturado que contém a contribuição da deformação do C-N. O modo de estiramento calculado da banda C-N (grupo NO₂ conectado ao anel) em 1371 cm^{-1} e foi atribuído à banda em 1379 cm^{-1} nos espectros de IR. As deformações calculadas do C-N estão em 223 cm^{-1} . A deformação fora do plano calculada do C-N está em 150 cm^{-1} e é atribuída a uma banda em 147 cm^{-1} nos espectros Raman. O modo com o mais baixo número de onda é o modo da torção do C-N. As torções calculadas do C-N estão em 117 e 60 cm^{-1} , e elas são observadas em 123 e 60 cm^{-1} nos espectros Raman.

Vibrações do anel: A vibração de estiramento C-H do anel é geralmente forte nos espectros de IR e Raman. O número de onda do $\nu(\text{CH})$ do anel é previsto em 3137 cm^{-1} nos espectros Raman e em 3133 cm^{-1} nos espectros de IR. Ele é calculado em 3114 cm^{-1} , e assim,

coincide bem com as observações experimentais. O número de onda calculado em 1516 cm^{-1} tem uma maior contribuição do estiramento do CN no anel imidazólico. A principal contribuição do modo de estiramento do CN no anel imidazólico é obtida dos modos vibracionais em 1432 e 1360 cm^{-1} , e estes são observados em 1430 e 1333 cm^{-1} nos espectros de IR e em 1437 e 1345 cm^{-1} nos espectros Raman. Os modos de estiramento calculado $R[\nu(\text{CN})]$ em 1275 e 1201 cm^{-1} estão acoplados com o estiramento $R[\nu(\text{CC})]$ e outros modos. Este modo de estiramento corresponde aos picos em 1265 e 1192 cm^{-1} nos espectros Raman e em 1264 e 1184 cm^{-1} nos espectros de IR. Os estiramentos calculados $R[\nu(\text{CC})]$ estão em 1538 e 1476 cm^{-1} e são atribuídos às bandas em 1529 e 1488 cm^{-1} nos espectros de IR e em 1536 e 1489 cm^{-1} nos espectros Raman.

As deformações calculadas do anel estão em 1164 e 975 cm^{-1} , e estas são observadas em 1155 e 983 cm^{-1} nos espectros Raman e em 1151 e 981 cm^{-1} nos espectros de IR. A deformação fora do plano calculada do $R[\delta_{\text{oop}}(\text{C3H})]$ em 884 cm^{-1} coincide bem com os espectros de IR e Raman. As torções calculadas do anel estão em 695 , 681 e 609 cm^{-1} . Estas possuem também excelente acordo com os valores experimentais observados de IR e Raman.

Usando um espectrômetro triplo em configuração subtrativa, a região de baixa energia do espectro de Raman é facilmente obtida (detalhe da Figura 4.9) [131]. Este equipamento fornece uma ótima rejeição da intensa dispersão Rayleigh que baixa a linha de excitação do limite espectral para além de 30 cm^{-1} quando comparada com espectrômetros simples e espectrômetros por transformada de Fourier. A extensão da faixa espectral nos permite observar os modos vibracionais da rede cristalina e os do esqueleto molecular. Nossos resultados mostraram um excelente acordo entre os valores calculados e experimentais nessa região espectral, permitindo-nos estabelecer uma atribuição detalhada de todas estas bandas. Apenas uma banda, localizada em 43 cm^{-1} , não pôde ser associada com nenhum modo vibracional da molécula simples, e esta foi classificada como uma vibração da rede. É interessante observar que as vibrações da rede são esperadas geralmente abaixo de 200 cm^{-1} . Entretanto, nossos resultados mostram que estes tipos de modos estão numa região de número de onda muito baixo, provavelmente abaixo de 50 cm^{-1} . Todos os modos acima de 50 cm^{-1} foram classificados como deformações e torções da molécula do SNZ. Assim, os modos da estrutura associados com as translações e librações da molécula encontram-se abaixo de 50 cm^{-1} e podem ser apenas observados usando espectroscopia Raman dispersiva (espectrômetro subtrativo), espectroscopia de infravermelho distante (FAR), ou espectroscopia de terahertz.

4.4.4 Transições de fase

Mesmo que os espectros calculados reproduzam muito bem os experimentais, deve-se levar em consideração que estes últimos foram realizados numa fase sólida: o hemihidrato de secnidazol. Como será mostrada nas próximas seções, esta forma cristalina passa para sua forma anidra e funde a aproximadamente 70°C. Com o intuito de discutir o efeito da estrutura cristalina no espectro vibracional, na Figura 4.11 o espectro Raman do SNZ calculado foi comparado com os dados experimentais obtidos em 30 e 90°C, correspondendo este último à fase líquida da molécula. Como observado anteriormente, os resultados de DFT reproduzem muito bem os dados experimentais, porém características interessantes podem ser identificadas entre os espectros experimentais nos estados sólido e líquido. Primeiramente, observou-se que a banda em 1192 cm⁻¹ permanece aproximadamente inalterada no estado fundido. Esta banda está associada à respiração do anel imidazólico. Na forma sólida este anel participa da ligação de hidrogênio OH...N que estabiliza a estrutura cristalina. Entretanto, esta interação não parece ser forte bastante para afetar a frequência de respiração do anel. As bandas vizinhas, localizadas em 1265 e 1272 cm⁻¹ exibem um comportamento diferente. Na temperatura ambiente elas são divididas em duas bandas (1265 e 1272 cm⁻¹) e fundem em apenas uma banda (1265 cm⁻¹) a 90°C. De acordo com a Tabela 4.3, a primeira banda em 1265 cm⁻¹ está relacionada à deformação do anel imidazólico do grupo nitro, enquanto que a segunda em 1272 cm⁻¹ tem contribuições tanto das deformações do anel assim como dos grupos metileno e hidroxil. Embora os cálculos de DFT previssem uma insignificante intensidade Raman para estes últimos, esta é uma das bandas mais intensas no espectro Raman. Este comportamento anômalo pode ser explicado considerando que o grupo hidroxil participa de todas as principais interações intermoleculares do SNZh. A mudança na polarizabilidade do modo vibracional devido a estas interações pode facilmente afetar a secção de espalhamento Raman. Não obstante, a perda das ligações de hidrogênio intermoleculares na forma fundida reduz a intensidade desta banda já que a molécula adquire agora uma configuração similar à conformação da molécula usada para o modelo teórico. As bandas restantes observadas na região espectral apresentada na Figura 4.11 não indicam nenhuma evidência de outros efeitos que produzam mudança ou alargamento das bandas, que são esperados em um líquido completamente desordenado.

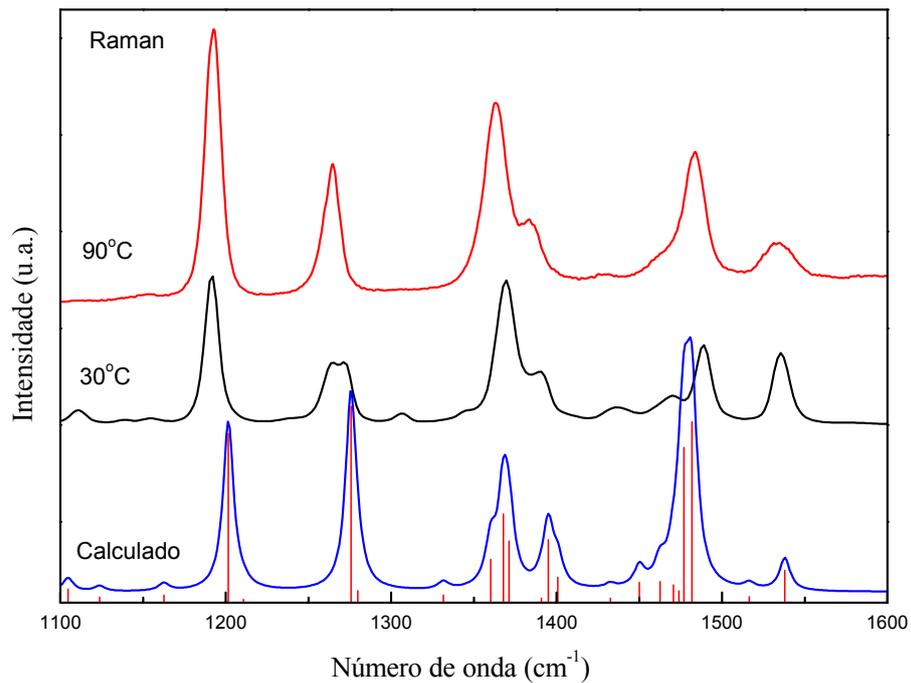


Figura 4.11. Comparação dos espectros Raman do SNZh (30°C) e na forma fundida (90°C) com uma forma obtida com cálculos de DFT.

4.5 Análise térmica

No caso dos solvatos, e particularmente dos hidratos, determinar a estabilidade térmica é um fator delimitante para poder definir se estas formas sólidas são adequadas para serem usadas em formulações farmacêuticas. Os processos de produção de uma droga podem envolver a presença de água durante sua cristalização, na fabricação ou na formulação do produto final pela adição dos excipientes. Com as discussões ao longo do texto sabe-se que as novas fases onde a água é uma parte do cristal são chamadas de hidratos e normalmente possuem propriedades completamente novas no estado sólido, como é no caso a do objeto desse estudo: o SNZh. Em hidratos a combinação de forças intermoleculares (ligações de hidrogênio) e o empacotamento cristalino produzem interações no estado sólido muito fortes que estabilizam novas estruturas cristalinas. A hidratação e desidratação dos cristais ocorrem facilmente com o efeito da temperatura. O comportamento de uma forma anidra de uma droga com a água depende dos diagramas de fase específicos para cada substância. Dentro desse contexto, nessa seção apresentaremos um estudo da estabilidade térmica do SNZh.

4.5.1 Termogravimetria

Como ponto de partida para investigar o efeito da temperatura no SNZh foi registrada a perda de massa em função da temperatura através de medidas termogravimétricas. A curva TG (Figura 4.12) mostra três processos de perda de massa. O de maior variação de massa ocorreu entre 232 e 270°C e correspondeu a um decréscimo de 56%. Este processo é seguido por uma queda menor entre 275 e 320°C, onde é liberada 9% da massa. Analisando a curva de DTA obtida simultaneamente com a TG (Figura 4.12) podemos observar que o processo descrito é fortemente exotérmico e pode ser associado à decomposição da molécula de SNZ. Isto é confirmado pela medida do espectro IR dos gases liberados durante o aquecimento (Figura 4.13). Nessa figura podemos identificar que durante o evento exotérmico são liberados CO₂, água e outros compostos orgânicos caracterizando univocamente um processo de decomposição.

O evento na TG mais relevante para o estudo é observado em aproximadamente 66°C, como mostra o detalhe da Figura 4.12. Na mesma pode ser observado que um decréscimo de 1% corresponde a um evento endotérmico na DTA. Este processo é indubitavelmente associado à perda de água como confirmam os espectros IR dos gases liberados. Assim, os gases despreendidos apresentam a assinatura característica do espectro rotacional do vapor de água como observado em torno de 3450 cm⁻¹ (Figura 4.13). Com base nestes resultados podemos concluir que o SNZh é estável até cerca de 66°C, quando acontece o processo de desidratação e fusão do material.

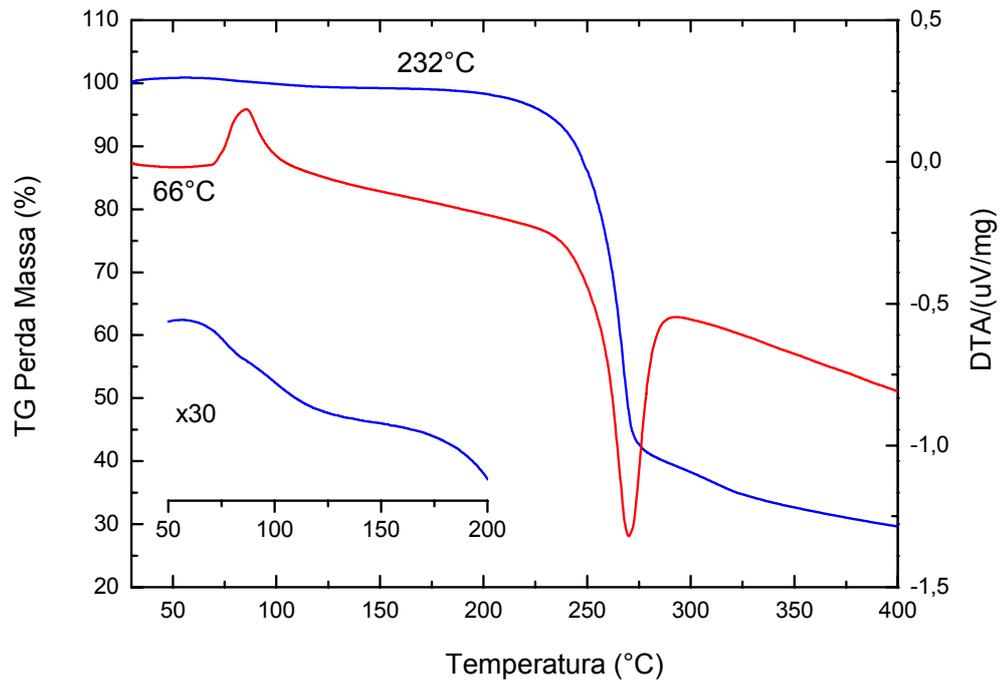


Figura 4.12. Análise térmica diferencial e termogravimétrica do SNZh.

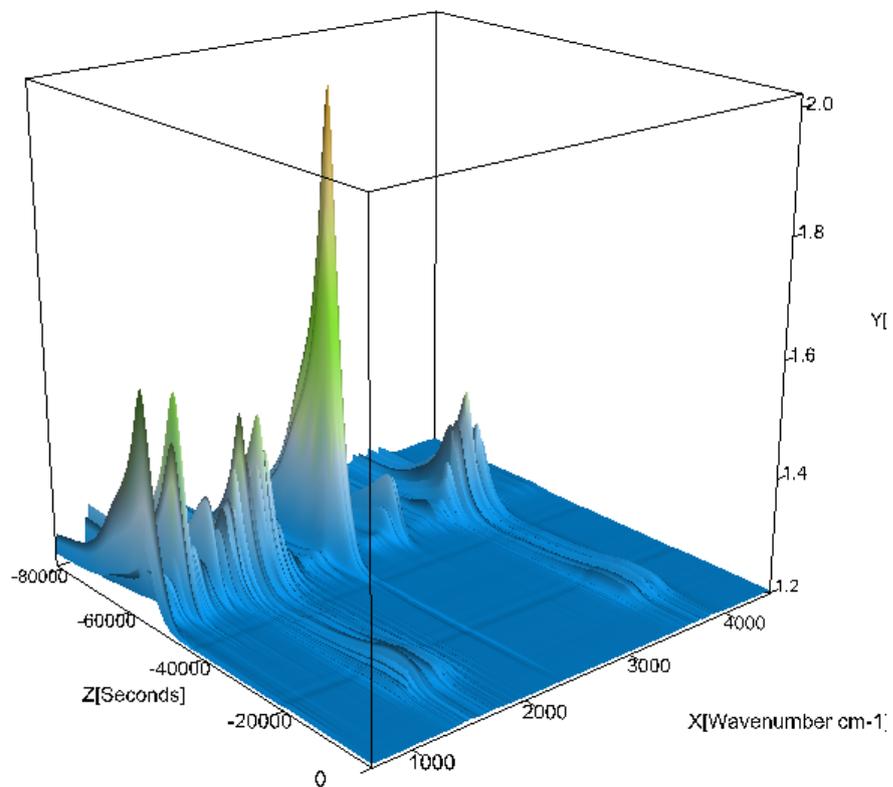


Figura 4.13. Infravermelho dos gases liberados durante a decomposição do SNZh.

4.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas de DSC para o SNZh estão mostradas na Figura 4.14. Foram feitos três ciclos de aquecimento e resfriamento em atmosfera de nitrogênio numa taxa de 10K/min de 0°C a 100°C. Observamos que com o primeiro aquecimento há um pico endotérmico intenso com temperatura de *onset* de 67,0°C que se corresponde com o previamente observado nas medidas TG/DTA. O mesmo já foi associado à liberação de água pelo SNZh. Levando em consideração estes resultados, poderíamos associar este pico à desidratação e fusão do SNZh. No entanto, pode ser observado que este pico é largo e possui uma certa estrutura, apresentando pelo menos um ombro. Assim, um segundo ciclo de aquecimento foi realizado usando a mesma amostra. Nesse ponto é importante salientar que nenhum evento foi observado nos processos de resfriamento da amostra. Além disso, como todo o tratamento térmico é realizado em atmosfera de N₂ seco, a recristalização desta amostra somente pode induzir para a fase anidra. No novo aquecimento, tem-se o aparecimento de um pico exotérmico com *onset* em 53,8°C, o qual é também observado num terceiro aquecimento com aproximadamente os mesmos parâmetros termodinâmicos. O fato desse evento ser repetitivo sugere a existência de dois polimorfos da forma anidra. Estes polimorfos deveriam estar relacionados monotropicamente, uma vez que a transformação entre eles está associada a um evento exotérmico. Identificando a forma mais estável como o polimorfo I, podemos sugerir que o evento exotérmico observado a 53,8°C é a transformação monotrópica entre os polimorfos II e I. A fusão do polimorfo I é observada através de um pico endotérmico agudo, característico desse tipo de processo, em 73,8°C. Já no terceiro aquecimento, um novo evento exotérmico é observado em 22,2°C. No entanto, devido às medidas serem dinâmicas, usualmente é observado que as amostras não recristalizam completamente na temperatura ambiente. Como consequência, um evento exotérmico associado à recristalização das mesmas é esperado no novo aquecimento. Este fenômeno descreveria muito bem o termograma registrado no terceiro aquecimento, isto é, a transformação da forma amorfa ao polimorfo II, que logo se transformará na I em 54,1°C e fundirá em 74,0°C. Os parâmetros termodinâmicos característicos das fases descritas são apresentado na Tabela 4.4. Baseados nestes resultados e aplicando as regras de Burger [45, 46, 99] construímos o diagrama energia/temperatura correspondente aos polimorfos do SNZa (Figura 4.15). Nesse diagrama é claramente evidenciado o caráter monotrópico da transição II-I.

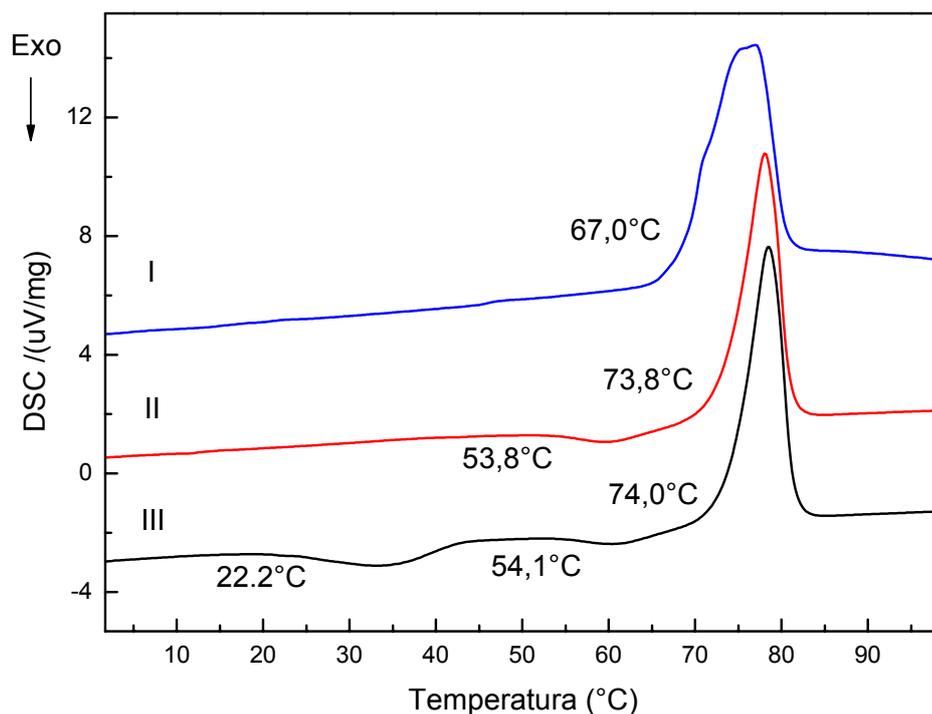


Figura 4.14. Curvas de DSC dos três aquecimentos sucessivos realizados no SNZh. As temperaturas indicadas correspondem aos *onsets* dos picos.

Tabela 4.4 - Parâmetros termodinâmicos dos picos observados nas curvas de DSC do SNZh e SNZa.

Aquecimento \ Pico	I		II		III	
	<i>Onset</i> (°C)	Entalpia (J/g)	<i>onset</i> (°C)	Entalpia (J/g)	<i>onset</i> (°C)	Entalpia (J/g)
I	-	-	-	-	67,6	128,1
II	-	-	53,8	-8,3	73,8	89,0
III	22,2	-16,1	54,1	-6,5	74,0	96,3

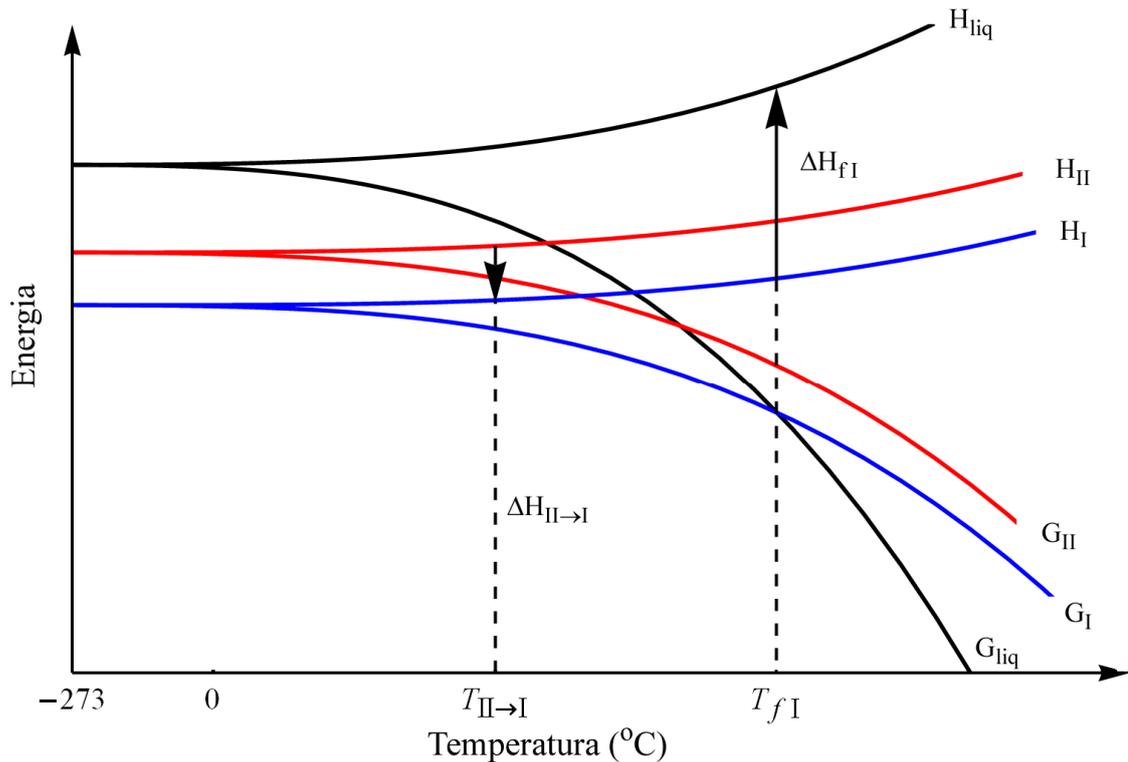


Figura 4.15. Diagrama energia/temperatura dos polimorfos do SZNa

4.6 Termomicroscopia polarizada

Imagens de termomicroscopia polarizada foram registradas com o objetivo de investigar as transições de fase descritas previamente. Numa primeira experiência, uma amostra de SNZ foi submersa em óleo de silicone e aquecida até a fusão (Figura 4.16a). O uso desse óleo é uma ferramenta muito útil no estudo de solvatos. Sendo esse óleo estável até no mínimo 250°C, o processo de desolvatação pode, em geral, ser estudado num meio inerte. No caso do SNZh, os resultados de TG e DSC sugerem que a água é liberada antes da fusão. Isto é verificado na Figura 4.16b, onde o cristal ainda não fundiu, mas diversas bolhas de água podem ser identificadas sobre o mesmo (áreas circuladas na Figura 4.16b). Essas bolhas são originadas da água liberada pelo SNZh, a qual não pode ser eliminada como vapor devido à presença do óleo de silicone. Nota-se também que nem o hábito cristalino, nem a cristalinidade mudam após a desidratação. Esta observação não é usual num hidrato, já que a saída de água produz normalmente um grande número de defeitos no cristal. A segunda experiência realizada teve como ponto da partida uma amostra de SNZ fundida e

recristalizada à temperatura ambiente (Figura 4.16c). Estas condições correspondem à fase que identificamos como Forma II. Num segundo aquecimento, em bom acordo com o observado no DSC, a Forma II sofre uma transformação estrutural evidenciada pela mudança abrupta do hábito cristalino (Figura 4.16d). A nova fase, que funde a uma temperatura levemente superior, pode ser associada à Forma I. Deste modo, a dinâmica de transições de fase proposta a partir de resultados calorimétricos pode ser confirmada pela observação direta das transformações na morfologia do SNZ.

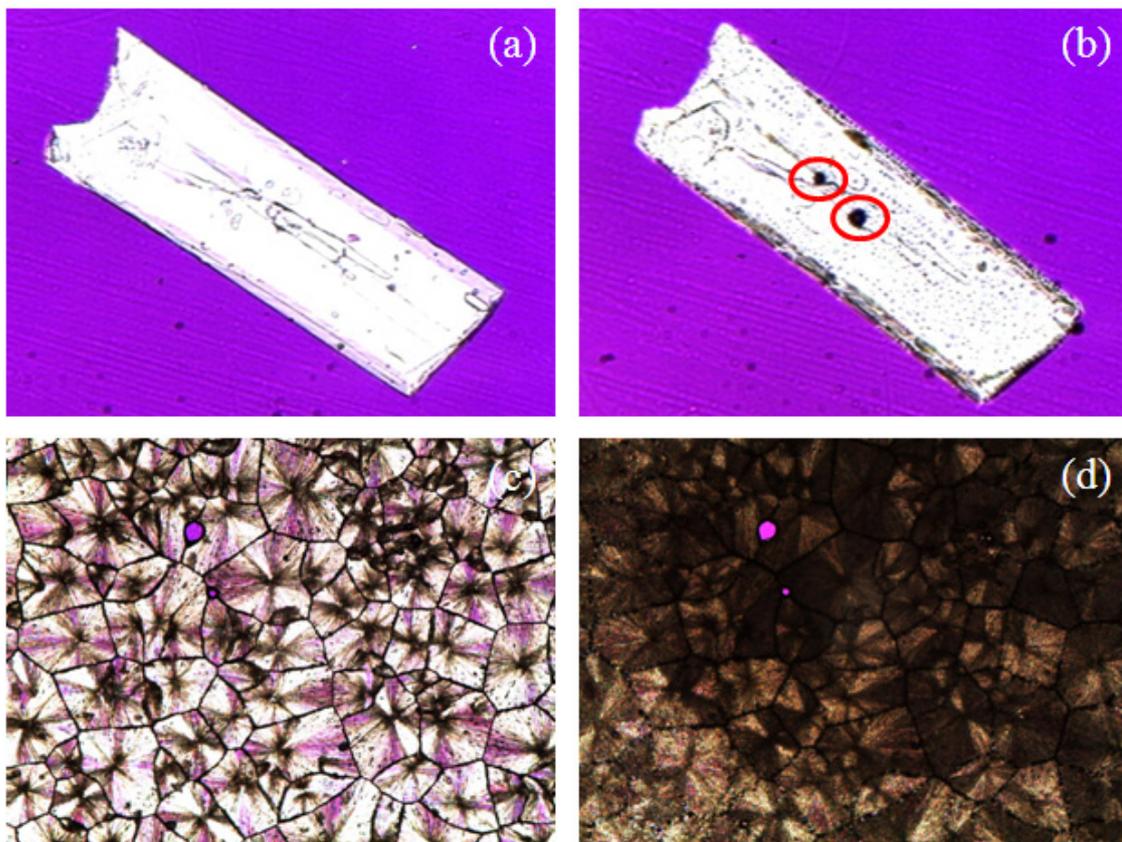


Figura 4.16. Imagens de microscopia óptica polarizada do SNZ em óleo de silicone. (a) 20°C e (b) 70°C; recristalização após a fusão (c) 20°C e (d) 70°C.

4.7 Transições de fase

As transformações estruturais observadas foram investigadas *in situ* usando espectroscopia Raman em função da temperatura. No intuito de comparar estas medidas com os resultados de DSC, dois ciclos de aquecimento-resfriamento foram realizados com a

mesma amostra em condições de baixa umidade para não permitir a transformação do SNZa para o SNZh. Da análise destes resultados deve-se levar em consideração que os espectros Raman são medidos a temperatura constante, uma vez que o aquecimento é realizado em degraus. Já nos termogramas de DSC uma rampa de aquecimento é empregada. Devido a isso, fenômenos dependentes da história térmica da amostra podem ter comportamentos diferentes em ambas as técnicas.

A Figura 4.17 apresenta os espectros Raman em função da temperatura de uma amostra de SNZh em dois aquecimentos sucessivos. No primeiro aquecimento pode ser observado que existe um desdobramento a partir de 60°C da banda por volta de 50 cm⁻¹. Os resultados dos cálculos de DFT permitiram associar esta banda a um modo da rede cristalina, uma vez que a mudança observada é uma evidência clara da existência de uma transição de fase estrutural. Já a 80°C o desaparecimento destes modos está associado à desordem característica da fase líquida no SNZ fundido. Por outro lado, analisando o comportamento das bandas características da água, como por exemplo, o estiramento do OH a 3450 cm⁻¹ (Figura 4.18), onde o desaparecimento desta banda na temperatura de 60°C evidencia o processo de desidratação. Estes resultados mostram claramente que o SNZh não desidrata e funde num único processo, senão que ele passa por uma fase intermediária anidra antes da fusão. Assim, o pico largo e com pelo menos um ombro observado na primeira curva de DSC, corresponde à superposição dos dois processos identificados pela espectroscopia Raman. No segundo aquecimento podemos observar que não há variações importantes do espectro Raman entre a temperatura ambiente e a fusão. Além disso, o espectro característico do segundo aquecimento é similar àquele da fase anidra intermediária entre a desidratação e a fusão. Desse modo percebe-se que após a fusão o SNZ recristaliza numa fase anidra a qual é mantida em ciclos sucessivos de fusão/cristalização. Como foi comentado no começo dessa seção, as diferenças na dinâmica das medidas espectroscópicas e térmicas levam a que as fases metaestáveis só sejam observadas no DSC. Nestes experimentos variações rápidas de temperatura podem estabilizar fases metaestáveis o que não seria possível no caso de variações quase-estáticas, como acontece na espectroscopia Raman.

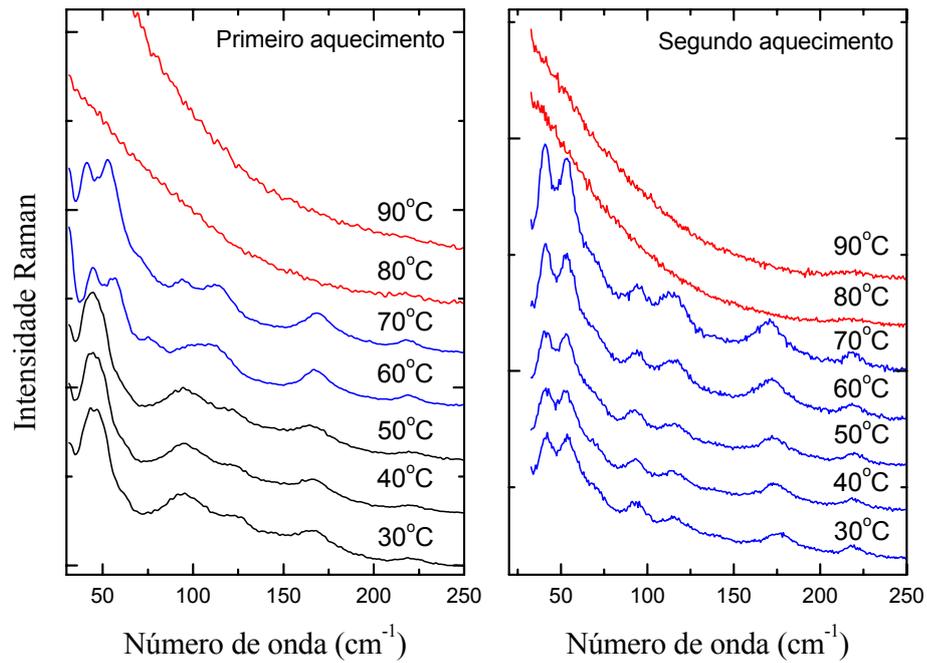


Figura 4.17. Espectros Raman na região de baixa energia do SNZh no primeiro e segundo aquecimentos.

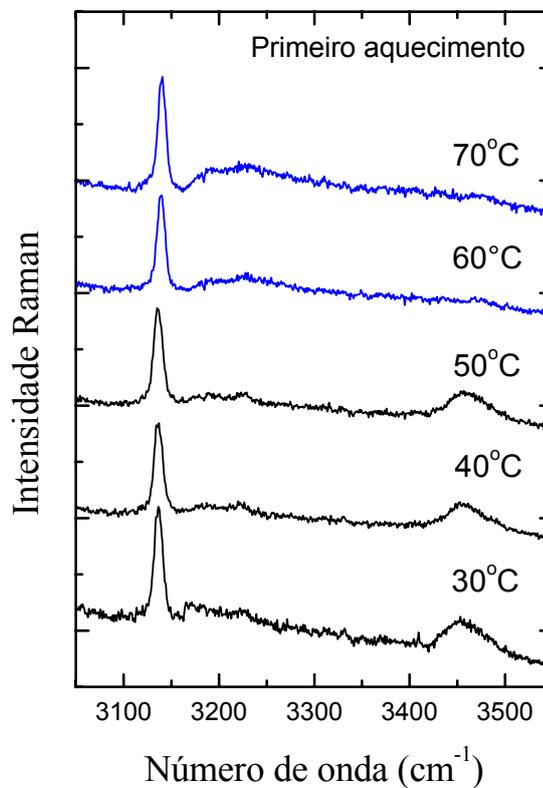


Figura 4.18. Espectros Raman do SNZh na região de alta energia no primeiro aquecimento.

4.8 Conclusões

O SNZh foi caracterizado por difração de raios X, análise térmica e espectroscopia vibracional. No intuito de facilitar a interpretação dos resultados experimentais, a conformação molecular foi otimizada através de cálculos *ab initio* e os modos de vibração calculados. Espectros de infravermelho e Raman foram registrados e as bandas vibracionais foram atribuídas com base na PED obtida dos cálculos de DFT. No geral, uma boa concordância entre os modos experimentais e calculados foi observada. Quanto à estabilidade térmica deste sólido, observou-se que o SNZh sofre um processo de desidratação a 67°C, passando para uma fase anidra a qual funde a 74°C. Isso foi confirmado por medidas de espectroscopia Raman em função da temperatura. Os resultados sugerem a existência de mais de uma forma anidra, todavia estudos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

5 Dietilcarbamazina

5.1 Introdução

Filariose linfática, uma doença parasitária transmitida por um mosquito, é endêmica em mais de 80 países. Afeta pessoas em áreas tropicais, estimando-se que mais de 120 milhões de pessoas estão infectadas no mundo [132-134]. O parasita infectante é normalmente *Wuchereria bancrofti*, ainda que *Brugia malayi* ou *Brugia timori* possam ser responsáveis pela doença no sudeste da Ásia e Indonésia [135]. A transmissão do parasita filarial ao homem se dá mediante a picada do mosquito infectado com microfilárias. O *Culex quinquefasciatus*, geralmente vetor da filariose, se reproduz em águas poluídas e estagnadas. No vetor, as microfilárias passam por uma metamorfose de aproximadamente 7 a 21 dias até se transformarem em larvas infectantes que através da hematofagia do mosquito fêmea é transmitida ao homem [136].

Os parasitas adultos habitam os vasos linfáticos humanos, onde provocam manifestações agudas e crônicas. As manifestações crônicas da doença incluem hidrocele, linfoedema e elefantíase, a qual pode afetar mais de 50% da população adulta das áreas atingidas. As parasitas fêmeas adultas produzem microfilárias que circulam no sangue periférico. No entanto, a periodicidade de circulação de microfilárias varia geograficamente e pode ser subperiódica (constantemente circulantes no sangue com picos em certos horários do dia ou da noite) ou não periódica (circulação constante sem picos) [137].

As larvas migram dos linfonodos e se tornam vermes adultos em torno de seis meses. Durante esse período nenhuma microfilária é encontrada no sangue, embora sintomas subclínicos e danos linfáticos possam ocorrer. Os maiores sintomas resultam da resposta imune à infecção e o tipo de resposta imune varia de acordo com cada indivíduo. A maioria dos pacientes apresenta-se com ataques agudos de “febre filarial” em torno de 15 meses após a infecção. Dor de cabeça e mal-estar são acompanhados de inchaço, eritema e dores na região dos vasos linfáticos. Esses “ataques” duram tipicamente de 3 a 15 dias e são acompanhados de aumento da taxa de eosinófilos no sangue [135].

A filariose linfática tem particularidades importantes e distintas características com relação a sua transmissão: (1) A doença permanece em uma população porque os parasitas adultos em pessoas infectadas produzem microfírias, as quais são transmitidas a outros indivíduos da população por uma variedade de espécies de mosquitos; (2) Os humanos são os únicos reservatórios da infecção por *Wuchereria bancrofti*, o mais comum parasita causador da filariose linfática, que acomete 90% das infecções humanas e existe apenas um pequeno número de reservatórios não humanos para os parasitas da espécie *Brugia malayi*. [138].

O clássico e melhor fármaco antifilarial conhecido é a dietilcarbamazina (DEC), que reduz efetivamente a carga de microfírias, mas possui uma ação limitada sobre os vermes adultos. A atividade da DEC pode se estender até 18 meses após o tratamento e, em geral, doses do fármaco administradas anualmente são necessárias para interromper a transmissão da doença.

A DEC (Figura 5.1), 1-dietilcarbamil-4-metilpiperazina, é um derivado da piperazina e normalmente pode ser preparada na forma de cloridrato, citrato e fosfato. Desde 1947 é distribuída como sal de citrato por inúmeras companhias farmacêuticas sob diferentes nomes. É um pó branco, muito solúvel em água, estável, mesmo em condições de umidade e temperatura muito elevadas, e resiste, inclusive, a autoclavagem. Deve, contudo, ser acondicionada protegida da luz e do contato com o ar. A denominação dietilcarbamazina genericamente se refere à sua forma de citrato, uma vez que é a mais comumente utilizada [139, 140].

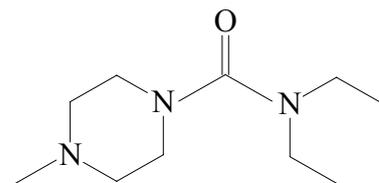


Figura 5.1. Fórmula estrutural da dietilcarbamazina.

A meia vida sangüínea do citrato de dietilcarbamazina (DEC-CIT) não é uniforme na literatura. Pode variar de 5 a 13 horas e sua concentração cai gradativamente à zero dentro de aproximadamente quarenta e oito horas. A excreção da DEC é predominantemente urinária e pH dependente, ou seja, quanto mais ácida for a urina, mais rápida será a sua eliminação e, conseqüentemente, menor a sua meia vida no sangue. Uma vez ingerida, a DEC se distribui rapidamente e de maneira quase uniforme em todos os compartimentos do organismo,

inclusive no líquido hidrocélico e, presumivelmente, em outros líquidos do corpo. Há referência de que o tecido gorduroso constitui uma exceção, parecendo haver uma pequena tendência à acumulação, quando o fármaco é administrado em doses repetidas. A literatura não é explícita com respeito à concentração da DEC na linfa o que representa uma importante lacuna, que precisa ser preenchida, uma vez que o verme adulto se localiza no sistema linfático [141].

A disponibilidade de novos agentes para o controle parasitário e testes de diagnósticos para a filariose linfática têm alterado a perspectiva de controle da doença. Essa mudança foi anunciada pela descoberta da Ivermectina. Recentes estudos têm mostrado que a combinação de DEC e Ivermectina administradas em uma única dose foram mais eficazes na redução da microfilaremia que a administração isolada de qualquer um dos fármacos [134, 141, 142]. Doses diárias de 6mg/kg de peso corpóreo durante 12 dias de DEC foi por muitos anos o tratamento padrão da filariose. Estratégias diferentes de doses únicas administradas em determinados intervalos de tempo têm se mostrado tanto quanto ou mais eficazes na eliminação de microfilárias do que o tratamento padrão de 12 dias.

É importante salientar que a DEC tem sido usada como um eficaz agente no tratamento de pacientes com filariose linfática durante as últimas seis décadas, através do emprego da sua forma citratada, o DEC-CIT. Entretanto, apesar do seu longo período de uso, o modo de ação da DEC e do DEC-CIT, assim como o impacto destas formas sólidas na eficácia farmacêutica, continua sendo pouco conhecido. Daí o motivo da caracterização físico-química desses materiais.

5.2 Preparação dos cristais

A DEC e o DEC-CIT empregados como matérias-primas para a formulação de comprimidos foram fornecidos pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do grupo de pesquisa da Dra. Núbia Boechat.

5.2.1 Cristalização da DEC

O processo de cristalização da DEC foi precedido pelo isolamento deste fármaco a partir do DEC-CIT. Em um béquer de 500 mL pesaram-se 4,13 g do DEC-CIT e 100 mL de água destilada foram adicionados. O pH medido para esta solução foi de 4,0. A seguir e sob agitação magnética foi adicionada, gota a gota, uma solução de NaOH 0,1 M até a neutralização da solução em pH 7. A DEC foi extraída da solução aquosa com diclorometano (3 x 25 mL), seca com sulfato de magnésio anidro e concentrada em rotaevaporador à vácuo. Obteve-se um óleo amarelo claro que foi deixado em freezer por 24 horas e germinado com cristais de DEC, formou um sólido branco com ponto de fusão na faixa de 47-48°C com 83% de rendimento (1,76 g). Os cristais de DEC obtidos possuíam diferentes tamanhos, alguns dos quais foram selecionados para a determinação da estrutura cristalina (Figura 5.2).

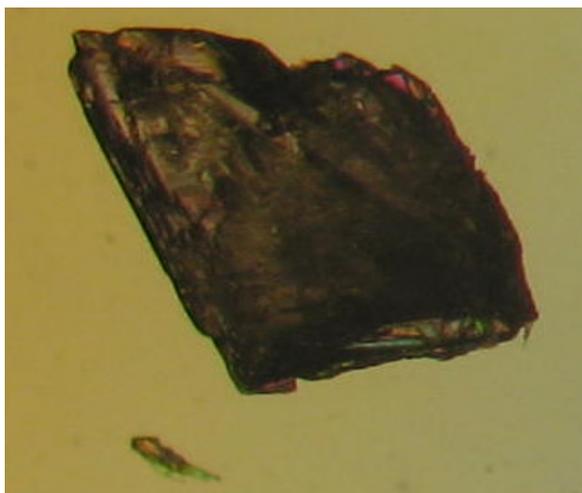


Figura 5.2. Cristais de DEC.

5.2.2 Cristalização do DEC-CIT

O DEC-CIT foi submetido a ensaios de solubilidade com vários solventes (os mesmos usados nos ensaios com o BZN), e posteriormente cresceram-se cristais seguindo o método experimental descrito para o BZN. Os cristais do DEC-CIT foram obtidos com o solvente etanol absoluto a uma temperatura em torno de 5°C. Os cristais do DEC-CIT possuem um hábito cristalino de prisma com base losangular, como pode ser observado na Figura 5.3.

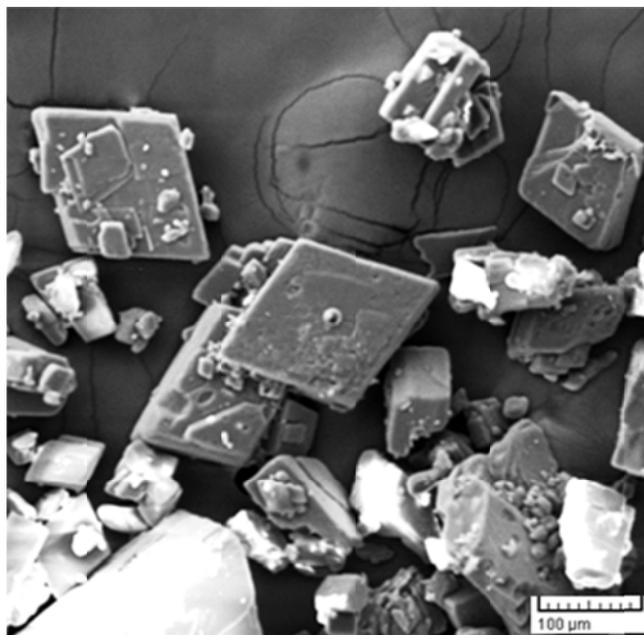


Figura 5.3. Cristais do DEC-CIT crescidos em etanol.

5.3 Estruturas Cristalinas

Os cristais obtidos tanto da DEC como do DEC-CIT tiveram suas estruturas cristalinas determinadas em colaboração com o grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos. No caso da DEC observou-se que cristaliza com quatro moléculas por cela unitária ($Z = 4$), num sistema monoclinico e grupo espacial $P2_1/n$. A cela unitária pode ser observada na Figura 5.4, cujos parâmetros de rede são $a = 11,5392\text{\AA}$, $b = 7,9779\text{\AA}$, $c = 13,5853\text{\AA}$ e $\beta = 112,964^\circ$. A conformação molecular da DEC, na estrutura cristalina, está demonstrada na Figura 5.5. A análise estrutural da DEC revela que o cristal não apresenta ligações de hidrogênio clássicas, mas que está estabilizado por três interações intermoleculares fracas: $O1-H9C$ ($2,55\text{\AA}$), $O1-H13B$ ($2,70\text{\AA}$) e $N4-H5A$ ($2,70\text{\AA}$). Assim, o grupo carbonila se liga com dois grupos metila de duas moléculas diferentes, um pertencente ao piperazinil e outro a um dos grupos etila. Estas duas moléculas, por sua vez, são ligadas por meio de uma interação $CH\cdots N$ entre os grupos etila e piperazinil (Figura 5.6). Este empacotamento leva a um arranjo de baixa densidade (Figura 5.7a) que, como será mostrado mais adiante, tem conseqüências diretas na estabilidade térmica da estrutura cristalina da DEC.

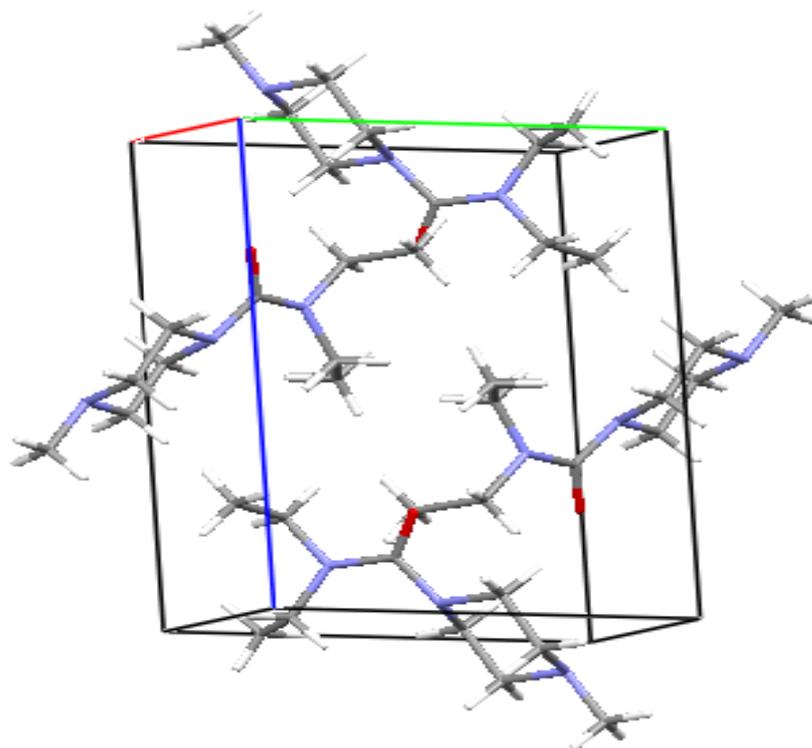


Figura 5.4. Cella unitária da estrutura cristalina da DEC.

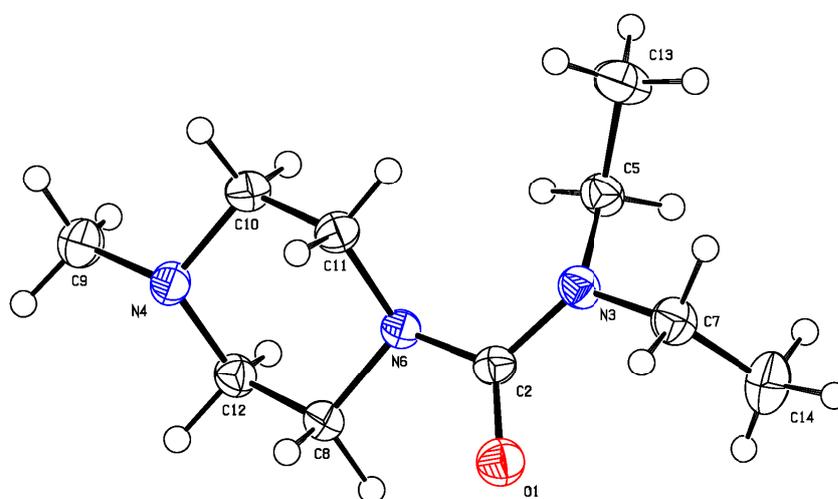


Figura 5.5. Unidade assimétrica da estrutura cristalina da DEC.

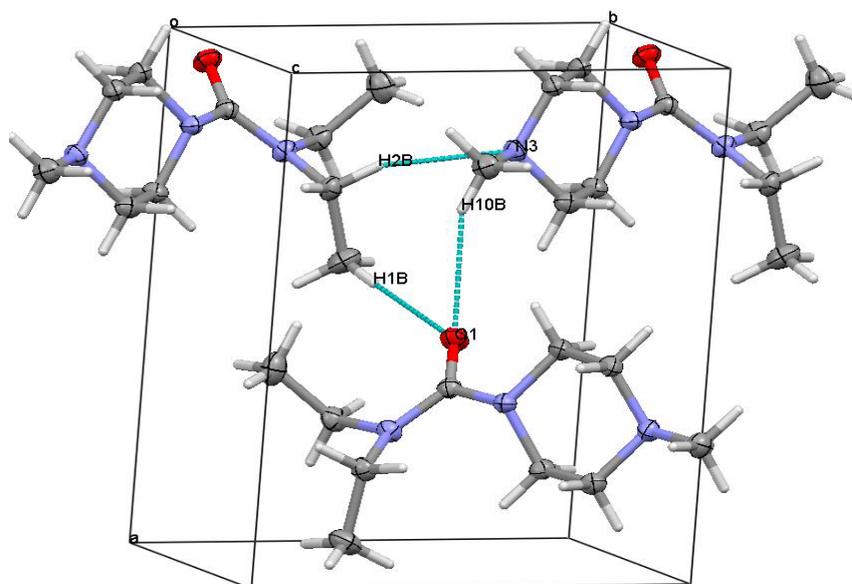


Figura 5.6. Interações intermoleculares da DEC.

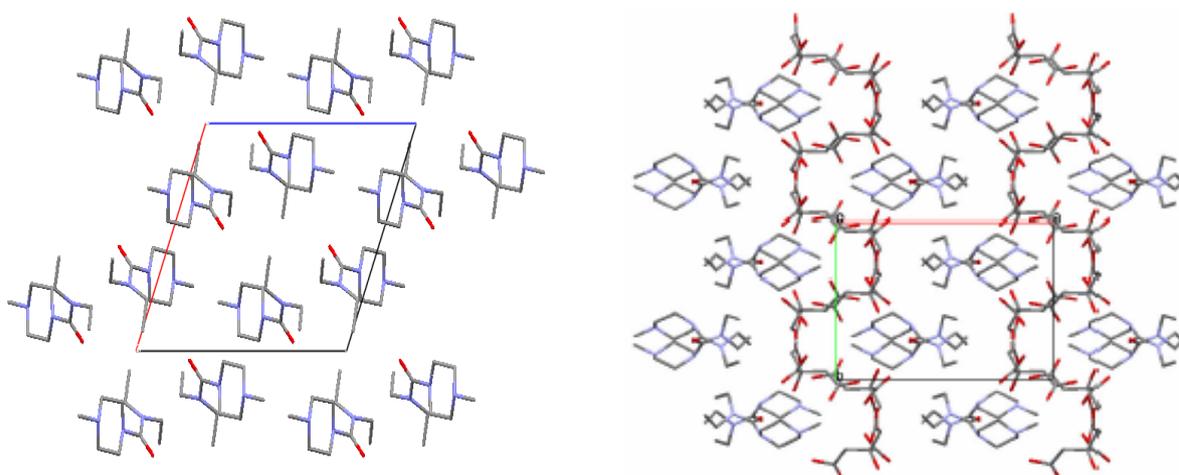


Figura 5.7. (a) Arranjo cristalino da DEC. (b) Arranjo cristalino do DEC CIT.

Utilizando o programa Mercury 1.4.2 distribuído pelo *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) visualizou-se, a partir de arquivos CIF (*Crystallographic Information File*), a estrutura tridimensional da DEC e o arranjo da sua cela unitária mostrada anteriormente, bem como se obteve o difratograma de raios X de pó teórico. A Figura 5.8 mostra a sobreposição dos difratogramas em pó experimental e calculado da DEC. Na comparação dos dois difratogramas é observado um bom acordo entre os padrões experimental e calculado. A grande maioria das reflexões podem ser indexadas tanto pelas posições como pelas intensidades relativas. Isto mostra claramente que ambos os padrões de difração correspondem à mesma estrutura cristalina. Todavia, uma análise mais detalhada revela um pequeno deslocamento das reflexões devido a estrutura cristalina ter sido determinada a 250K. Além disso, também se observou a presença de uma fase amorfa, evidenciada pela banda larga em $\sim 12,5^\circ$, que é condizente com a baixa estabilidade térmica deste composto.

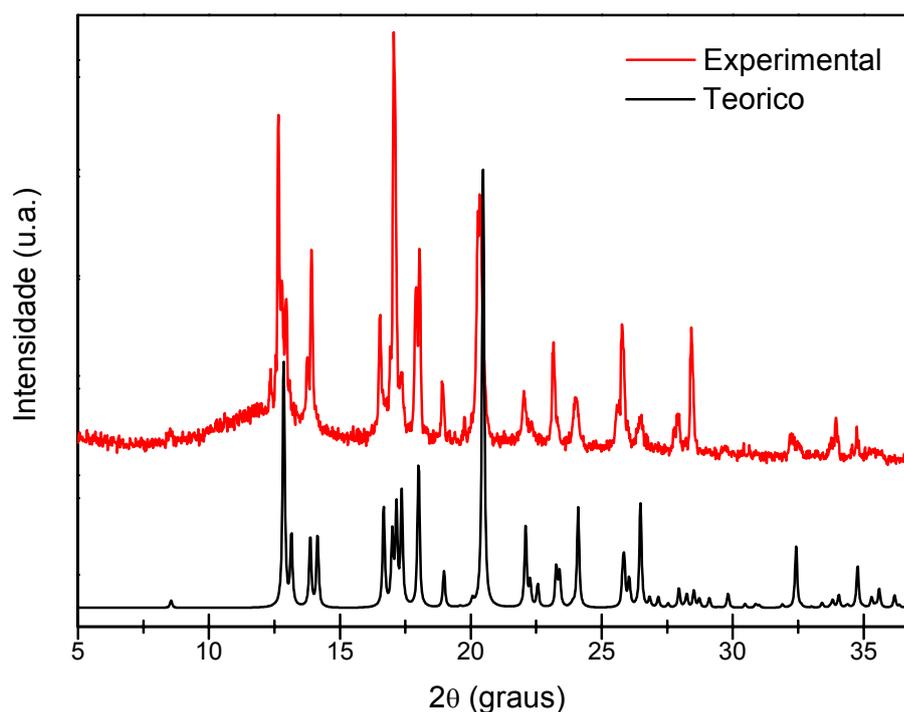


Figura 5.8. Comparação entre os difratogramas experimental e calculado da DEC.

O estudo da estrutura cristalina do DEC-CIT foi realizado tanto a temperatura ambiente como a baixas temperaturas. Isso será discutido num tópico mais à frente. No que diz respeito à estrutura cristalina na temperatura ambiente, os resultados obtidos confirmaram que o DEC-CIT, assim como a DEC, cristaliza-se num sistema cristalino monoclinico com quatro moléculas por célula unitária ($Z = 4$). Porém o cristal do DEC-CIT difere da DEC porque pertence ao grupo espacial $P2_1/c$ (Figura 5.9). Os parâmetros de rede da cela unitária do DEC-CIT na temperatura ambiente são: $a = 13,8051\text{Å}$, $b = 10,2580\text{Å}$, $c = 13,9894\text{Å}$ e $\beta = 93,689^\circ$. A unidade assimétrica do DEC-CIT é mostrada na Figura 5.10, onde pode ser observado que um dos grupos etila exibe uma leve desordem ocupacional provavelmente induzido pela agitação térmica. Outro ponto importante que deve ser observado é a presença de um hidrogênio adicional no N3 do grupo piperazínico. O mesmo é originado da transferência de carga entre o grupo citrato (note a falta de um hidrogênio no O5 ou O6) que caracteriza o DEC-CIT como um sal.

A célula unitária do DEC-CIT também foi visualizada pelo programa Mercury e de posse do arquivo CIF foi feito o cálculo teórico do difratograma de raios X de pó. Constatou-se que as posições das reflexões dos difratogramas do DEC-CIT teórico e experimental são similares, indicando que correspondem à mesma estrutura cristalina (Figura 5.11).

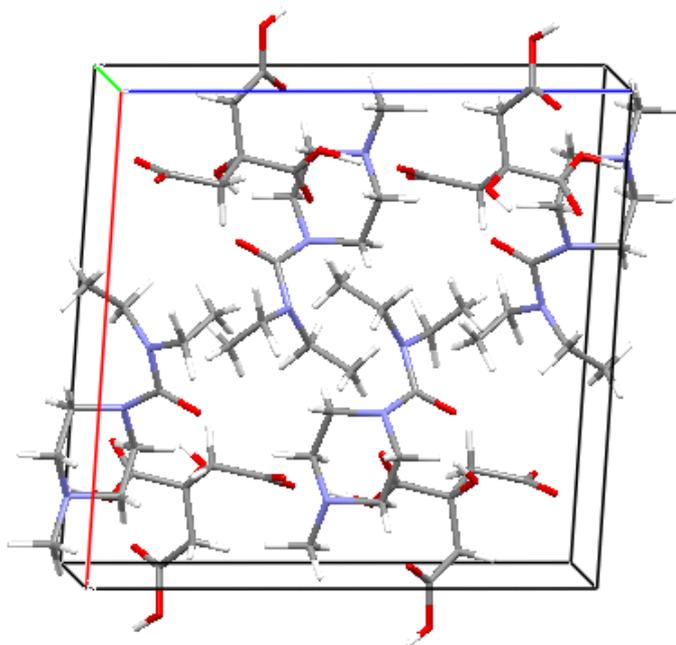


Figura 5.9. Cella unitária do cristal do DEC-CIT.

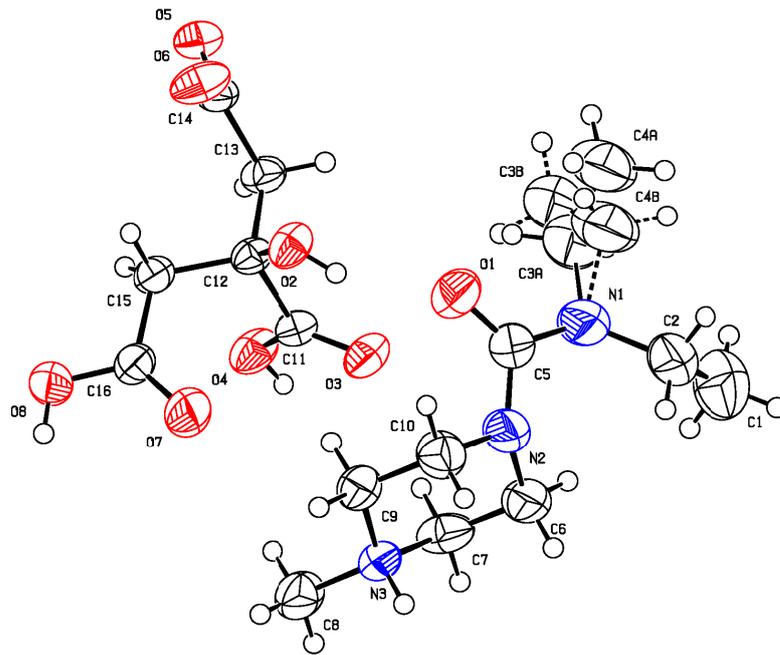


Figura 5.10. Unidade assimétrica da estrutura cristalina do DEC-CIT.

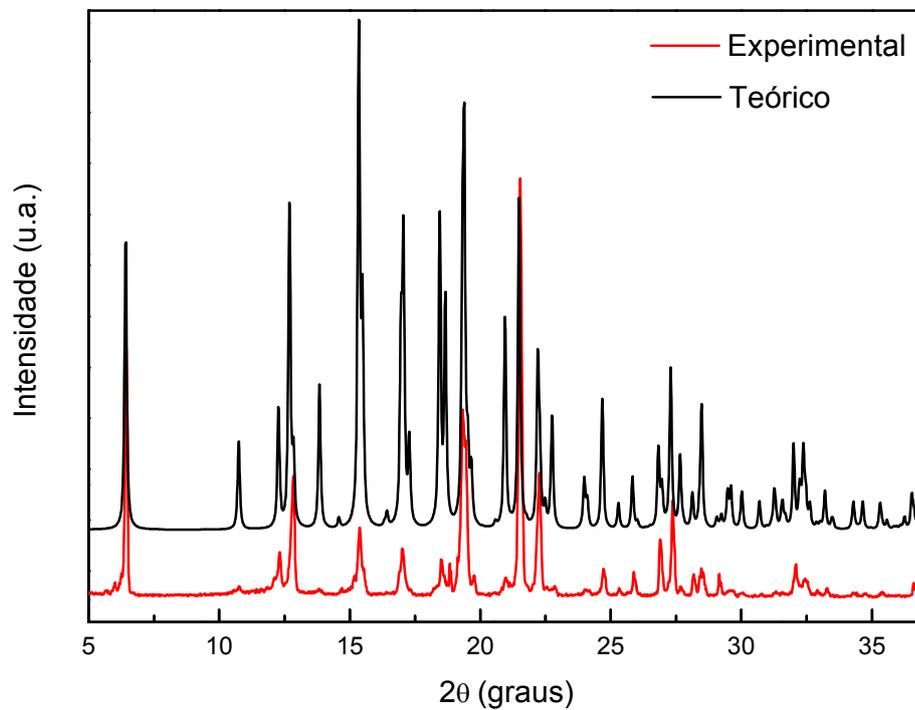


Figura 5.11. Comparação entre os difratogramas experimental e calculado do DEC-CIT.

O DEC-CIT mostra interações inter- e intra-moleculares mais fortes que as da DEC, especialmente aquelas associadas às ligações de hidrogênio entre o princípio ativo e o ânion (Figura 5.12). Isso leva a um arranjo tridimensional mais denso como demonstrado na Figura 5.7b, aumentando a estabilidade se comparada com a DEC. As quatro ligações de hidrogênio intermoleculares mais fortes do DEC-CIT, levando-se em conta a distância do doador para o receptor estão na Tabela 5.1. Os grupos citrato formam uma rede através de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas e carbonilas terminais. Essa rede serve como suporte para as moléculas da DEC, as quais estão ligadas através de dois pontos. O primeiro ponto é dado pelo grupo carbonila da DEC que se liga à hidroxila central do citrato (O2--H2...O1). Uma segunda interação é determinada pelo nitrogênio que recebe a transferência de carga, N3, o qual forma duas ligações de hidrogênio com uma carbonila (N3--H3...O6) e uma hidroxila (N3--H3...O2) de uma molécula do citrato. Os dois conjuntos de interações da DEC com a rede do citrato estão orientados em sentidos opostos com relação a seu esqueleto molecular dando origem a dois pontos de fixação muito estáveis que fornecem uma grande estabilidade a esta estrutura cristalina.

Tabela 5.1 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio (distâncias em Å e ângulos em °) do cristal do DEC-CIT.

D - H...A	D - H	H...A (Å)	D...A (Å)	D - H...A (°)
2 O2--H2...O1	0,82	2,15	2,861	146
1 N3--H3...O2	0,91	2,33	2,933	123
1 N3--H3...O6	0,91	1,97	2,797	150
2 O4--H4...O5	0,82	1,73	2,537	170
2 O8--H8...O5	0,82	1,82	2,643	176

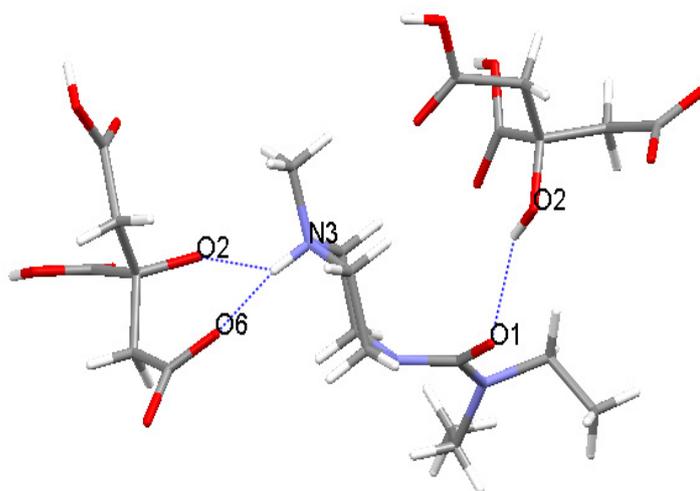


Figura 5.12. Interações intermoleculares do DEC-CIT.

A Figura 5.7 compara os arranjos cristalinos da DEC e do DEC-CIT. É bem interessante observar que os planos do cristal no DEC-CIT se dispõem longitudinalmente na linha central do eixo cristalográfico e que forma um arranjo 3D com camadas de citrato intercaladas com camadas de DEC. As camadas de citrato constituem uma estrutura corrugada em cujas cavidades se ligam as moléculas da DEC. Por outro lado, no caso da DEC, as moléculas exibem um empacotamento muito menos compacto, o que, como será mostrado na continuação, tem um impacto direto na estabilidade de sua estrutura cristalina. As diferenças no empacotamento cristalino levam também a mudanças conformacionais na molécula da DEC. As conformações moleculares encontradas nas estruturas cristalinas da DEC e do DEC-CIT foram comparadas na Figura 5.13. As principais diferenças observadas nessa figura estão nas orientações de um dos grupos etila, possivelmente devido à otimização do empacotamento cristalino e da conformação do grupo piperazinil. A deformação deste grupo pode ser entendida se considerarmos que é num dos seus nitrogênios que se liga o hidrogênio transferido pelo citrato. Logo, o processo de formação do sal não é exclusivamente comandado pela otimização do empacotamento cristalino, mas também pelas mudanças conformacionais que são necessárias para maximizar as interações intermoleculares que aumentam a estabilidade da estrutura do DEC-CIT quando comparada à da DEC.

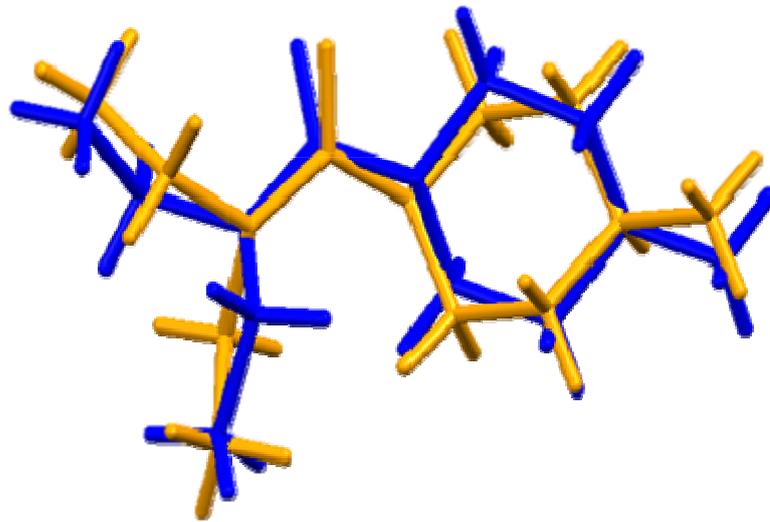


Figura 5.13. Superposição das conformações moleculares da DEC encontradas nas estruturas cristalinas da DEC base (azul) e DEC-CIT (laranja).

5.4 Análise Térmica

Com o conhecimento da importância das técnicas de análise térmica no estudo de formulações farmacêuticas, neste capítulo foi investigado o comportamento térmico da DEC e do DEC-CIT usando as técnicas de TG e DSC acopladas ao infravermelho.

5.4.1 Termogravimetria

A curva de TG da DEC com um único evento de perda de massa é mostrada na Figura 5.14, onde se verifica que a temperatura do início do processo é em torno de 247,7°C. O uso da atmosfera de nitrogênio forneceu uma curva sem resíduo, indicando saída total do material a 275,4°C com perda de massa de 94,3%. A massa residual em 502,2°C é de 6,2%. A Figura 5.14b representa o espectro de IR dos gases liberados pela DEC em função da temperatura, onde observamos uma saída máxima dos gases liberados na temperatura do ponto de inflexão do termograma de TG em 274,9°C. Pela comparação do espectro IR do gás liberado com o da DEC no estado sólido, percebeu-se que não havia produtos orgânicos de decomposição e que o processo observado na TG corresponde simplesmente à ebulição da DEC mudando seu estado físico para vapor Figura 5.15.

Analisando as curvas de TG/DTG do DEC-CIT da Figura 5.16a, verificou-se perda de massa em duas temperaturas diferentes. O primeiro estágio com *onset* em 176,5°C resultou numa perda de massa de 44,76%, e o segundo estágio com *onset* em 244,3°C teve uma perda de massa até a temperatura de 284,7°C de 47,77%. Comparando novamente os espectros IR dos gases liberados pela DEC e DEC-CIT (Figura 5.17), verificou-se que o segundo estágio corresponde à liberação de vapor da DEC uma vez que a temperatura de saída dos gases do DEC-CIT é 273,2°C coincidindo praticamente com o valor encontrado na DEC. Logo pode-se propor que o primeiro estágio deve ser associado à decomposição do citrato, que é caracterizada por uma grande liberação de dióxido de carbono. No entanto, pode ser verificado que este processo também é acompanhado pela liberação de vapor de DEC. Além da confirmação pelo infravermelho, cálculos relativos à massa molar do DEC-CIT e da DEC também ajudaram nesta conclusão.

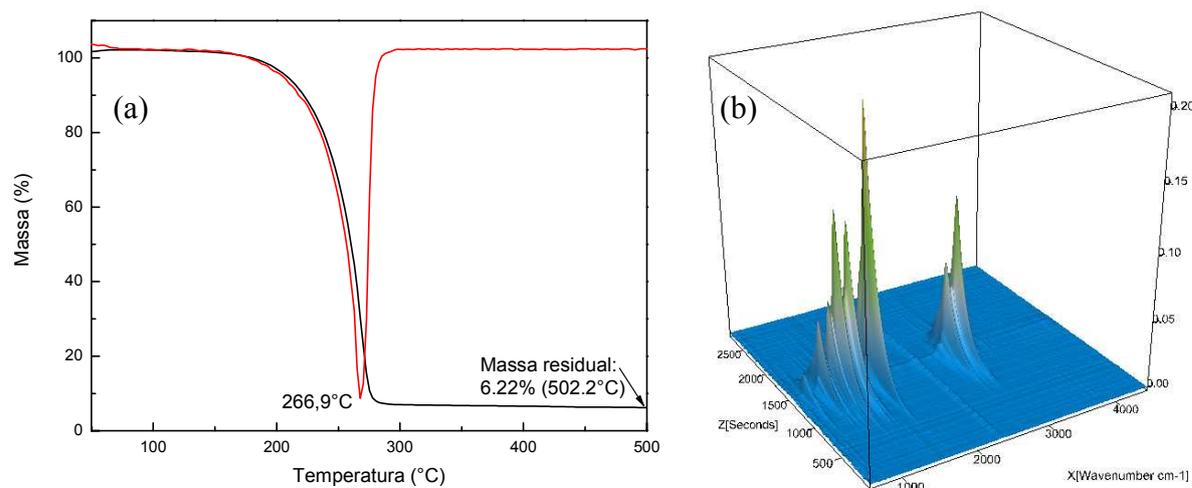


Figura 5.14. (a) Curva de TG/DTG para a DEC. (b) Espectros de IR dos gases liberados durante a TG da DEC.

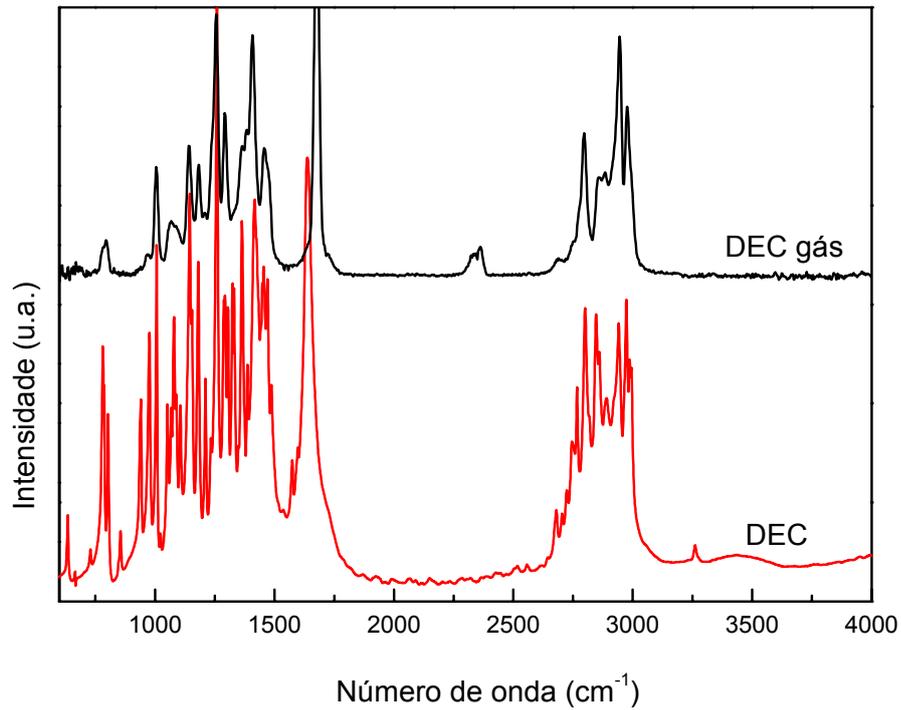


Figura 5.15. Comparação dos espectros de Infravermelho da DEC pura e da DEC gás.

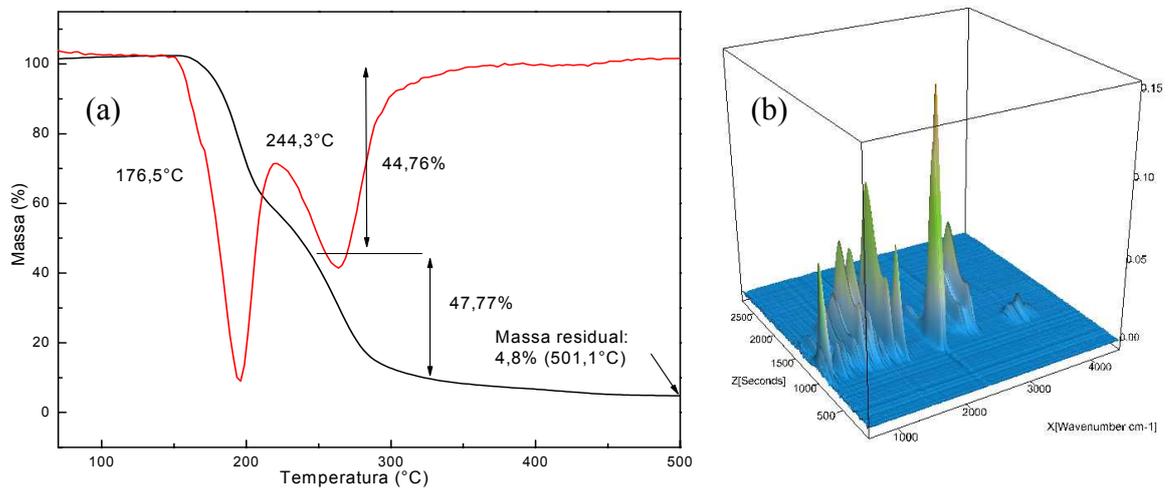


Figura 5.16. (a) Curva de TG/DTG para o DEC-CIT. (b) Espectros de IR dos gases liberados durante a TG do DEC-CIT.

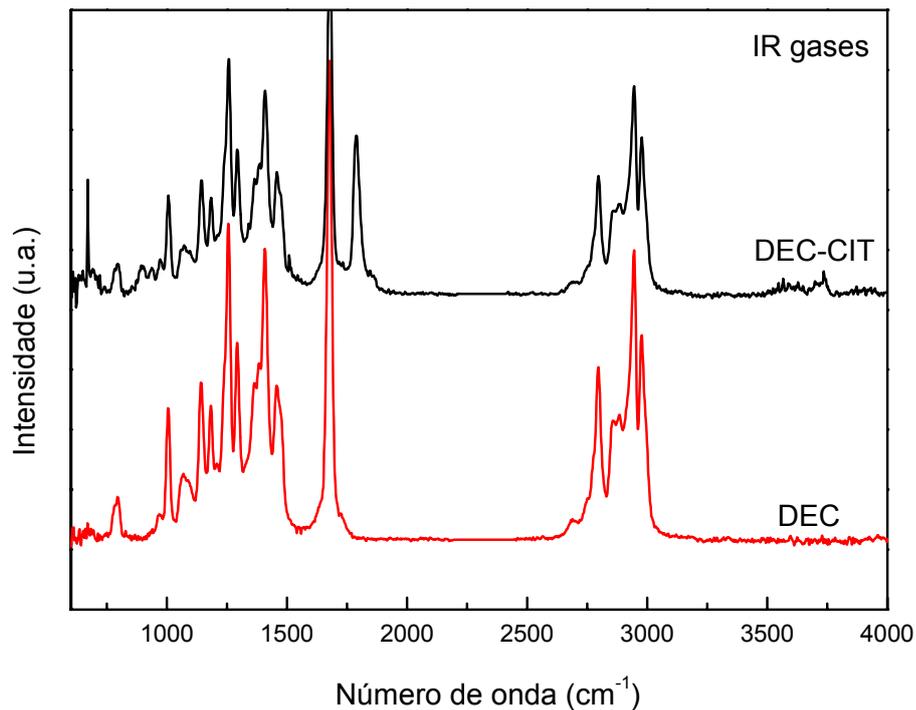


Figura 5.17. Comparação dos espectros de Infravermelho dos gases liberados pela DEC e DEC-CIT.

5.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial

No experimento de DSC realizado com a DEC (Figura 5.18) a amostra apresentou dois eventos endotérmicos, sendo um em 55,2°C com entalpia de fusão de 172,8 J/g e outro evento em 248,3°C correspondendo à liberação da DEC na forma de vapor como já foi mencionado. Ainda na Figura 5.18 visualiza-se o perfil da curva de DSC do DEC-CIT, onde há três eventos endotérmicos acoplados. O primeiro evento por volta de 140,8°C é caracterizado pela fusão do DEC-CIT com valor de energia de ativação de 140,5 J/g. O segundo evento em 152,5°C (209,7 J/g) é devido à decomposição do citrato. E o terceiro evento em 231,8°C (90,09 J/g) é referente ao vapor da DEC.

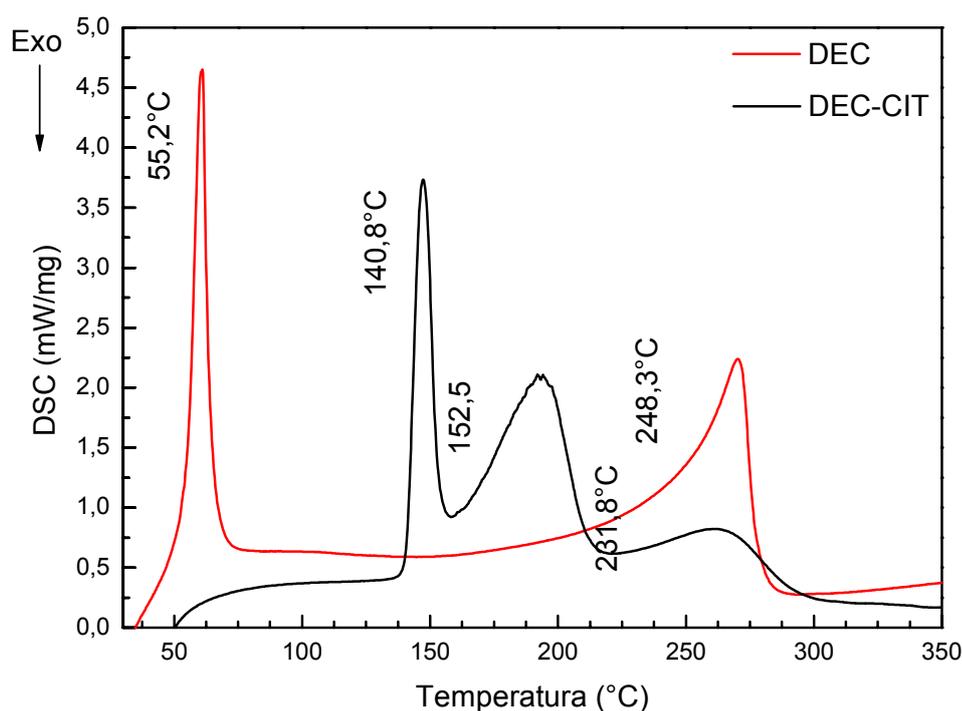


Figura 5.18. Curva de DSC da DEC e do DEC-CIT.

5.5 Espectroscopia Vibracional

Os espectros vibracionais da DEC e do DEC-CIT foram investigados através das espectroscopias Raman e infravermelho (médio e próximo). Os espectros Raman e no infravermelho médio destes compostos são comparados na Figura 5.19 e Figura 5.20. Dentre os principais modos vibracionais atribuídos para a DEC podem-se destacar os estiramentos do grupamento O-H em torno de 3410 cm^{-1} , que só são observados no espectro do DEC-CIT e devem está associados às hidroxilas do citrato. O mesmo argumento pode ser empregado para a banda em 1760 cm^{-1} e o conjunto de bandas entre 2300 e 2700 cm^{-1} , os quais correspondem ao estiramento C=O do citrato e suas combinações com modos de menor energia. Já o modo de 1630 cm^{-1} deve corresponder ao grupo carbonila da molécula de DEC. Por outro lado, os estiramentos CH dos agrupamentos CH_3 e CH_2 , devidos à DEC, são observados entre 2850 e 3000 cm^{-1} , enquanto que as deformações desses grupos devem ser responsáveis por boa parte das bandas presentes nos espectros Raman e infravermelho entre 700 e 1500 cm^{-1} . Contrariamente às claras diferenças identificadas entre os espectros Raman e infravermelho

da DEC e DEC-CIT, o infravermelho próximo é pouco sensível à presença do grupo citrato na estrutura cristalina (Figura 5.21). Isso se deve ao fato de que esta região espectral está determinada pelas combinações e sobretons dos estiramentos CH, NH e OH, os quais estão presentes em menor número no citrato. A evidência mais clara deste grupo molecular está na banda de 6600 cm^{-1} que é originada no primeiro sobretom do estiramento OH observado a 3400 cm^{-1} no espectro infravermelho.

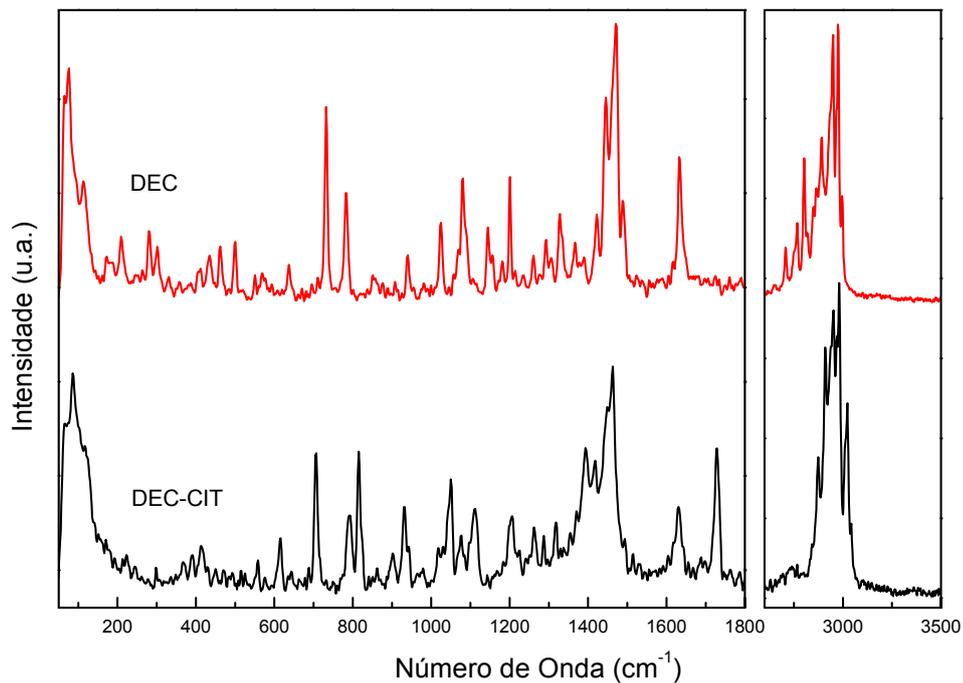


Figura 5.19. Espectros Raman da DEC e do DEC-CIT na região de 30 - 3500 cm^{-1} .

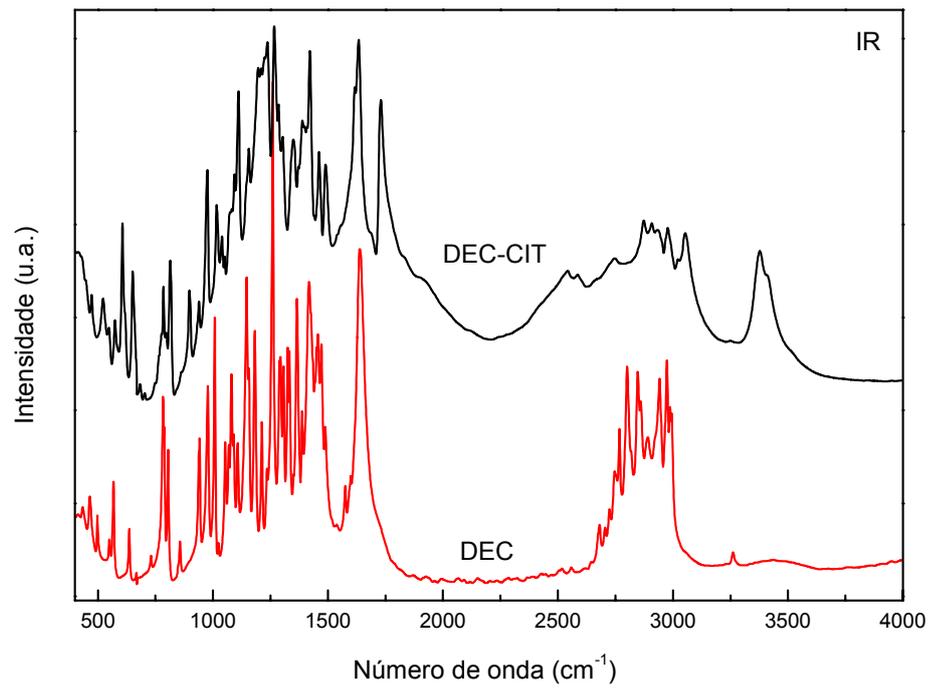


Figura 5.20. Espectros infravermelho da DEC e do DEC-CIT na região de 400 - 4000 cm^{-1} .

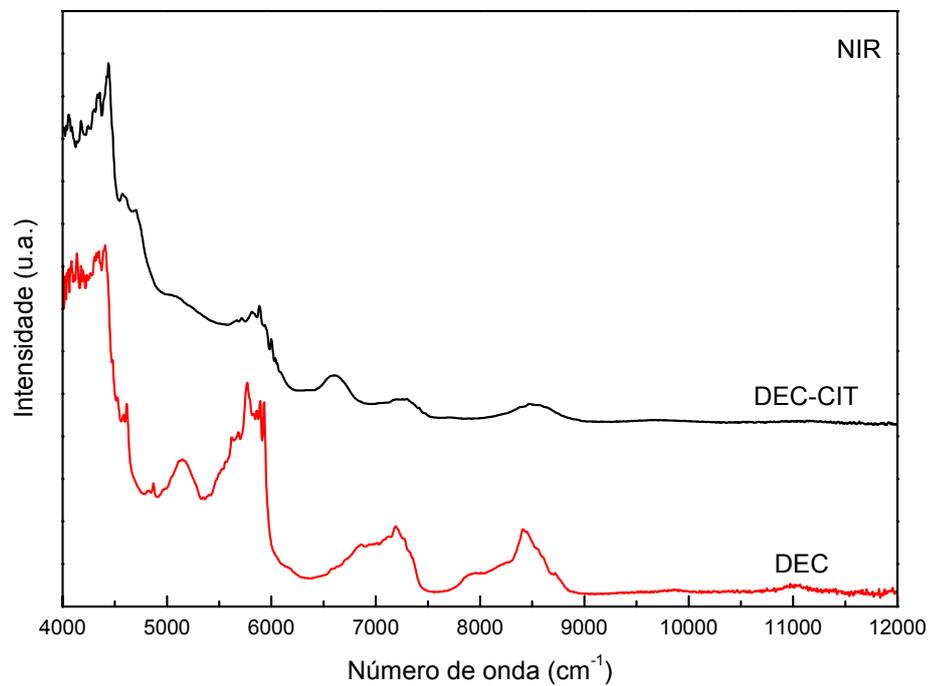


Figura 5.21. Espectros de Infravermelho da DEC e do DEC-CIT na região de 4000 - 12000 cm^{-1} .

5.6 Transições de fase

A DEC não apresentou mudanças significativas nos parâmetros de rede nas temperaturas estudadas, pois nenhuma evidência de uma transformação estrutural foi encontrada. Por outro lado, descobriu-se que o DEC-CIT exibe um aumento anômalo do volume da cela unitária que está associado a uma mudança conformacional da molécula da DEC. Foram observadas quatro transições estruturais do DEC-CIT por difração de raios X em monocristal que são elas: fase I (293K), fase II (235K), fase III (150K) e fase IV (100K). Pela Tabela 5.2 podemos observar as fases cristalinas do DEC-CIT em diferentes temperaturas.

Tabela 5.2 - Parâmetros de cela do DEC-CIT em função da temperatura.

100 K/fase IV	150 K/fase III	235 K/fase II	293 K/fase I
grupo espacial $P\bar{1}$	grupo espacial $P2_1/c$	grupo espacial $P2_1/c$	grupo espacial $P2_1/c$
$a = 13.656(5) \text{ \AA}$	$a = 13.915(2) \text{ \AA}$	$a = 27.4386(7) \text{ \AA}$	$a = 13.8050(3) \text{ \AA}$
$b = 10.259(5) \text{ \AA}$	$b = 10.096(2) \text{ \AA}$	$b = 10.1644(2) \text{ \AA}$	$b = 10.2581(2) \text{ \AA}$
$c = 13.902(6) \text{ \AA}$	$c = 14.089(3) \text{ \AA}$	$c = 14.0536(3) \text{ \AA}$	$c = 13.9890(3) \text{ \AA}$
$\alpha = 90.140(3)^\circ$	$\alpha = 90^\circ$	$\alpha = 90^\circ$	$\alpha = 90^\circ$
$\beta = 95.389(3)^\circ$	$\beta = 103.56(1)^\circ$	$\beta = 95.033(1)^\circ$	$\beta = 93.689(2)^\circ$
$\gamma = 92.677(3)^\circ$	$\gamma = 90^\circ$	$\gamma = 90^\circ$	$\gamma = 90^\circ$
$V = 1937(1) \text{ \AA}^3$	$V = 1924.1(6) \text{ \AA}^3$	$V = 3904.4(2) \text{ \AA}^3$	$V = 1976.9(1) \text{ \AA}^3$
$Z = 4$	$Z = 4$	$Z = 8$	$Z = 4$

5.6.1 Análise Térmica

O comportamento térmico do DEC-CIT por DSC foi investigado para melhor compreender as complexas mudanças de energia envolvidas nas transformações estruturais.

Duas transições estruturais foram observadas com o resfriamento de uma amostra de DEC-CIT a partir da temperatura ambiente. As mesmas foram caracterizadas por picos exotérmicos com *onset* em 224K e 213K (Figura 5.22). Estes eventos são reversíveis, independentes da taxa de aquecimento/resfriamento e exibem uma histerese consideravelmente grande (23K e 13K, respectivamente). A presença de aproximadamente 20K de histerese nas temperaturas das transições de fase e as nítidas anomalias do fluxo de calor sugerem que essas duas transições de fase têm um caráter de primeira ordem. Contrariamente ao bem definido comportamento destas duas transições, um terceiro evento endotérmico foi observado apenas no aquecimento. Pelo resfriamento da amostra a 10 K/min,

um pico endotérmico fraco e largo em 108K foi observado no aquecimento. Esta transição não é observada em taxas de resfriamento mais lentas, porém ela é muito bem definida, se a amostra é aquecida a $\sim 80\text{K}/\text{min}$. Estes resultados sugerem que a fase IV de baixa temperatura é parcialmente estabilizada com taxas de resfriamento lentas. Como consequência, a transição de fase sólido-sólido em 108K depende da história térmica da amostra. Da mesma forma, esta transição foi observada por difratometria de raios X em monocristal somente mediante o resfriamento rápido do cristal a 100K. Os dados cristalográficos e calorimétricos inferem que uma das três transições é sensível a taxa de temperatura, sugerindo que à baixa temperatura a fase IV é metaestável e transforma-se em uma fase estável em 108K.

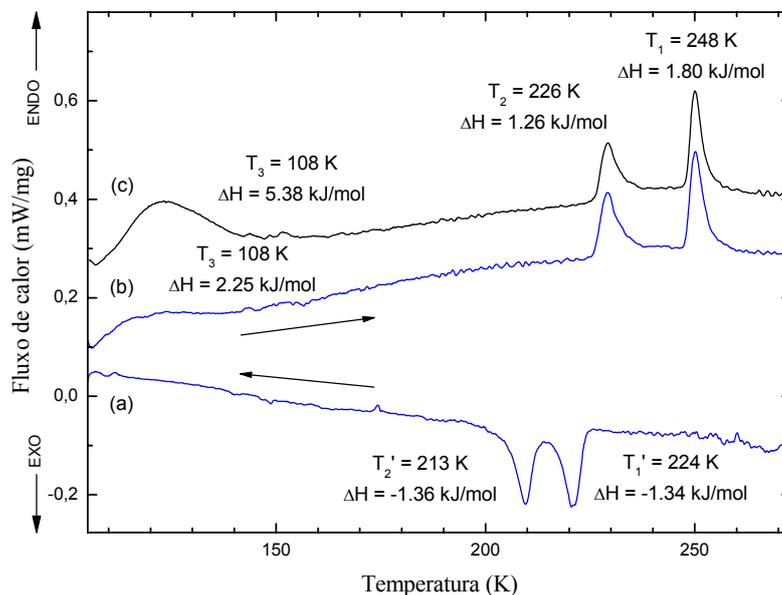


Figura 5.22. DSC do DEC-CIT em vários ciclos: (a) resfriamento (b) aquecimento a $10\text{K}/\text{min}$ e rápido resfriamento ($\sim 80\text{K}/\text{min}$) e (c) aquecimento a $10\text{K}/\text{min}$.

5.6.2 Relações termodinâmicas entre as fases do DEC-CIT

Os valores das entalpias de transição (ΔH) para as duas transformações estruturais em T_2 e T_1 (no aquecimento) estão de acordo com a mudança gradual de uma primeira estrutura ordenada (fase III) para uma estrutura parcialmente desordenada (fase II) e depois para um sistema totalmente desordenado (fase I) (Figura 5.22). No entanto, é interessante observar que o valor medido do ΔH associado à transição da fase III para a fase II após o aquecimento de 150K a 235K é menor do que para a completa transformação para um sistema da fase II para a fase III. Da mesma forma, o valor do módulo do ΔH para a transição da fase I para a fase II

por aquecimento do cristal é menor do que a transformação completa do sistema (da fase II para a fase III) sob a diminuição da temperatura de 215K a 150K (Figura 5.22). Este efeito está diretamente relacionado com as entropias de transição correspondentes ($\Delta S = \Delta H/T$), que, no aquecimento são: $\Delta S_1 = 7,23 \text{ J}/(\text{mol K})$ e $\Delta S_2 = 5,56 \text{ J}/(\text{mol K})$, enquanto as medidas em refrigeração são: $\Delta S_1' = -5,98 \text{ J}/(\text{mol K})$ e $\Delta S_2' = -6,42 \text{ J}/(\text{mol K})$.

O mecanismo molecular das transformações de fase reversíveis envolve dois processos: (i) o surgimento de uma ligação de hidrogênio intermolecular não-clássica associada a uma mudança conformacional e um deslocamento molecular; (ii) a ordenação de um dos grupos alquila também relacionados com a formação de ligações de hidrogênio. Medidas calorimétricas são hábeis para determinar se mecanismos de ordem-desordem ou displacivos estão envolvidos na transição. Se em um caso displacivo a transição ocorre entre duas estruturas ordenadas, então as entropias e entalpias de transição são pequenas. Tais transformações devem ser seguidas por uma mudança relativamente pequena da entropia ($\Delta S \approx 0,1R$, R : constante universal dos gases). Por outro lado, no caso de uma transição tipo ordem-desordem, desde que a transição ocorra de uma fase de baixa temperatura ordenada para uma fase de alta temperatura desordenada, a contribuição da conformação para a entropia é o termo dominante. Se nas fases ordenada e desordenada o número total de configurações é N_1 e N_2 , respectivamente, então o $\Delta S = R \ln (N_2/N_1)$ [143]. No caso, na primeira transição de fase, uma coluna de (DEC)⁺ é ordenada dando origem a uma organização de 1:1 de colunas de ordem e desordem ao longo do eixo *a* (fase II). As moléculas restantes desordenadas são ordenadas após a segunda transição (fase III). Lembrando que grupos alquila estão desordenados entre duas orientações ($N_2 = 2$ e $N_1 = 1$), a estatística da entropia molar para uma completa desordem de um sistema com dois estados energeticamente equivalentes deve ser $R \ln 2$. De acordo com os resultados de DSC, as entropias de transição que acompanham as transformações de primeira e segunda ordem podem ser reescritas como $\Delta S_1' = R \ln 2,05$ e $\Delta S_2' = R \ln 2,16$ no resfriamento e $\Delta S_1 = R \ln 2,39$ e $\Delta S_2 = R \ln 1,96$ no aquecimento. Estes valores estão em excelente concordância com o previsto pela estrutura cristalina que mostram que cada transição de fase é conduzida pelo congelamento dos dois estados desordenados em outro ordenado. No entanto, uma análise detalhada das entropias de transição mostra que as transformações que induzem à fase II (T_1' e T_2) apresentam temperaturas de transição similares de $\sim 225\text{K}$ e entropias de transição $|\Delta S| \sim R \ln 2$. Por outro lado, as transições que resultam na fase II (T_1 e T_2') têm em ambos os casos $|\Delta S|$ superior a $R \ln 2$. O excesso de entropia em relação ao valor teórico é $|\Delta S| \sim 0,15 R \ln 2$, sugerindo que um efeito displacivo

também contribui para o mecanismo de transição. Este fenômeno poderia ser resolvido com o deslocamento dos íons $(DEC)^+$ e $(citrato)^-$, mas novas investigações precisam ser realizadas a fim de esclarecer este processo.

Da fase IV para a fase III, os traços de DSC mostram largos picos endotérmicos associados a esta fase de transição, a qual é caracterizada pela grande variação da entropia ($\approx 44,0 \text{ J}/(\text{mol K})$) da curva (c) na Figura 5.22). Estes valores de entropia em excesso suportam um processo de ordem-desordem, mas a transformação estendida sob uma ampla faixa de temperatura e em função da pré-história térmica da amostra pode ser interpretada como mudanças não simultâneas na dinâmica e orientação do grupo alquila na estrutura [143]. A natureza metaestável da fase IV de baixa temperatura combinada com uma complexa relação estrutural não permite definir claramente o mecanismo principal desta transição de fase.

5.6.3 Espectroscopia Raman dependente da temperatura

Uma vez que as estruturas cristalinas do DEC-CIT em baixas temperaturas foram investigadas por DSC e difração de raios X em monocristal, resultando na observação de várias transições de fase, este composto também foi investigado por espectroscopia Raman em função da temperatura sob resfriamento. Na Figura 5.23 é mostrada a dependência da temperatura dos espectros Raman. A partir da análise desses espectros as duas primeiras transições de fase foram identificadas. Assim, duas alterações relativamente abruptas em torno de 220K e 200K podem ser facilmente identificadas caracterizando as transformações em 224K e 213K. Infelizmente, essas medidas experimentais não foram capazes de atingir taxas de resfriamento rápidas o suficiente para estabilizar a baixa temperatura a fase IV, mas os espectros Raman das fases I, II e III foram registrados. Comparando estes espectros, as principais mudanças correspondem às bandas em aproximadamente 1400 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} . Estas bandas estão associadas com as vibrações dos grupos alquila, $\delta(\text{CH})$ em $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu(\text{CH})$ em torno de 2950 cm^{-1} . Essas observações estão em excelente concordância com os resultados de difração de raios X. Como discutido anteriormente, as estruturas cristalinas em temperatura ambiente e a baixas temperaturas diferem no que diz respeito à orientação desses grupos alquila. Além disso, os resultados confirmam que as mudanças observadas pela difração de raios X não estavam associadas com um simples congelamento de uma desordem termicamente ativada, mas correspondem a transições de fase estruturais bem definidas.

Dois modos vibracionais relacionados ao estiramento de grupos carbonila podem ser identificados nos espectros Raman do DEC-CIT em aproximadamente 1724 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . A grande diferença entre os modos de estiramento da carbonila destas moléculas pode ser devido às diferenças no meio intramolecular e nas interações intermoleculares. O primeiro mais intenso modo pode ser associado ao grupo carbonila que não participa da ligação de hidrogênio do ânion citrato. O segundo modo de estiramento é uma banda muito fraca devido ao grupo carbonila da molécula da DEC. Esta atribuição é suportada pelos espectros de infravermelho e Raman da DEC. Este estiramento da carbonila é particularmente baixo porque os nitrogênios vizinhos induzem um relevante efeito mesomérico, que é combinado com uma ligação de hidrogênio moderada com o citrato. A baixas temperaturas o estiramento carbonila da DEC divide-se na fase II (220K) e é observado sozinho mas deslocado na fase III (1615 cm^{-1}). Esta dependência da temperatura está diretamente relacionada à duplicação do número de moléculas de DEC por célula unitária na fase II. As bandas abaixo de 1200 cm^{-1} apresentam quase nenhuma influência das mudanças estruturais. Este efeito pode ser entendido em termos de estruturas cristalinas, visto que esta região espectral é dominada pelos estiramentos e deformações do anel de piperazina e do esqueleto molecular, que são menos sensíveis às transformações de fase. As transições de fase estruturais também são evidenciadas pela análise da região de baixa energia do espectro Raman a qual também sofre mudanças repentinas em torno de 220K e 200K. Abaixo de 200 cm^{-1} , uma clara visão sobre as interações intermoleculares e conformações moleculares é fornecida pelos modos vibracionais associados à rede cristalina e torções moleculares, como àqueles que determinam a orientação do grupo metila e que desempenham um papel determinante no mecanismo de transição de fase do DEC-CIT.

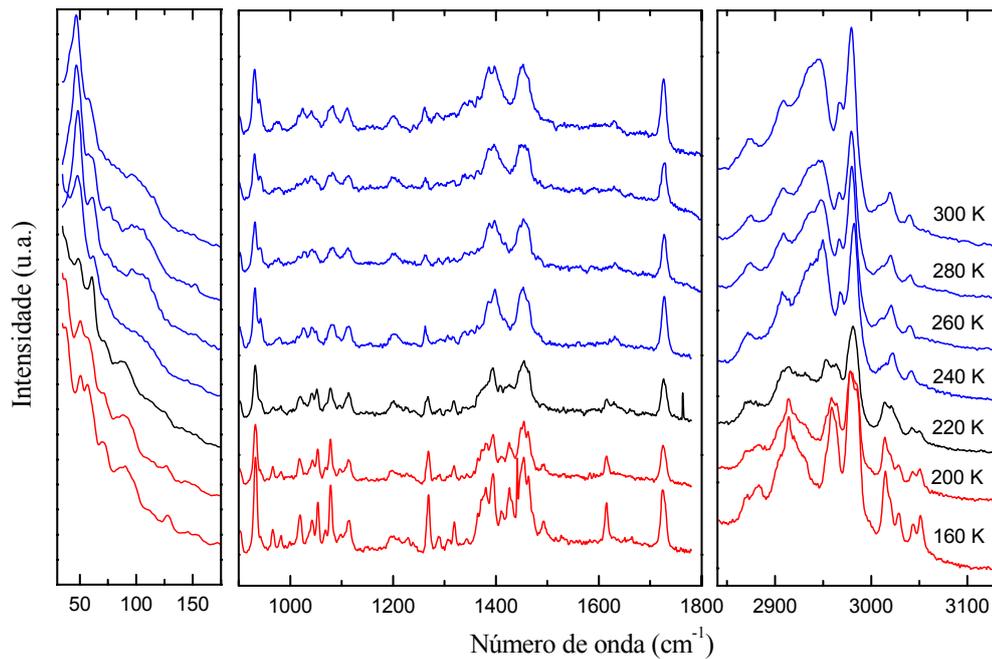


Figura 5.23. Espectros Raman do DEC-CIT a baixa temperatura.

5.7 Conclusões

No que diz respeito ao estudo da DEC e do DEC-CIT, nesse trabalho foram pesquisados diferentes métodos para a cristalização da dietilcarbamazina que forneceram cristais de boa qualidade para levar adiante investigações estruturais. Nos dois compostos investigados, DEC e DEC-CIT, foram determinadas as correspondentes estruturas cristalinas a diferentes temperaturas. Constatou-se que a DEC não apresenta transições de fase a baixas temperaturas, no entanto, quatro formas cristalinas foram identificadas para o DEC-CIT. Ambos os compostos foram cuidadosamente caracterizados através de medidas de análise térmica, microscopia, espectroscopia vibracional e difração de raios X.

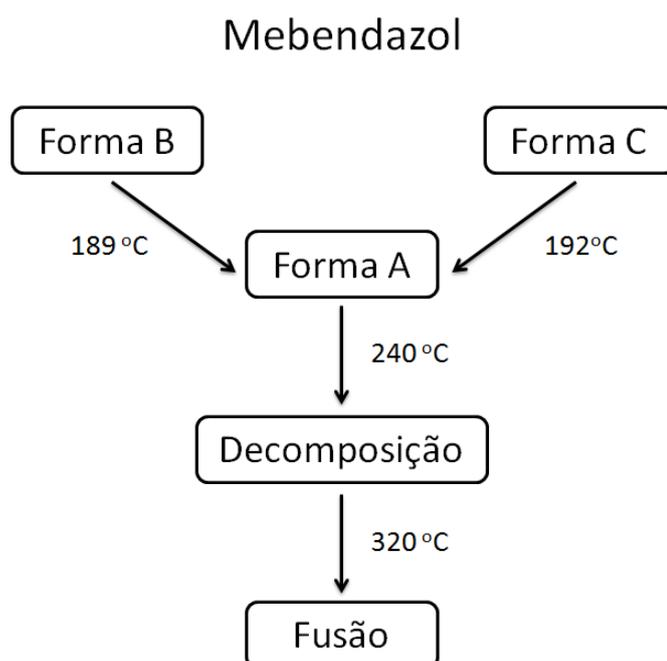
6 Considerações Finais

Nos últimos anos, o fenômeno do polimorfismo exibido pelos fármacos tem chamado a atenção dos pesquisadores tanto pelo seu impacto na qualidade e eficácia dos medicamentos quanto pelas suas implicações na área da propriedade intelectual. As características físico-químicas afetam principalmente os fármacos pouco solúveis que, submetidos a formulações farmacêuticas sólidas, apresentam diferentes velocidades de solubilização *in vivo* o que, conseqüentemente, compromete sua biodisponibilidade. Devido a estes fatores pode-se concluir que as características estruturais e morfológicas de estado sólido dos fármacos pouco solúveis são fatores condicionantes para a qualidade dos medicamentos. A existência de polimorfismo pode influenciar na biodisponibilidade, estabilidade química e física do fármaco e ter implicações no desenvolvimento e equilíbrio da forma farmacêutica. Portanto, podem ser esperadas diferenças na ação do fármaco em termos farmacológicos e terapêuticos devido à presença de polimorfos em formas farmacêuticas sólidas, assim como em suspensões líquidas. Difração de raios X em monocristal e pó, espectroscopia no infravermelho, espalhamento Raman, termomicroscopia e análise térmica são técnicas que têm sido amplamente aplicadas na determinação das várias estruturas de um cristal e nas origens do polimorfismo e pseudo-polimorfismo de um fármaco específico.

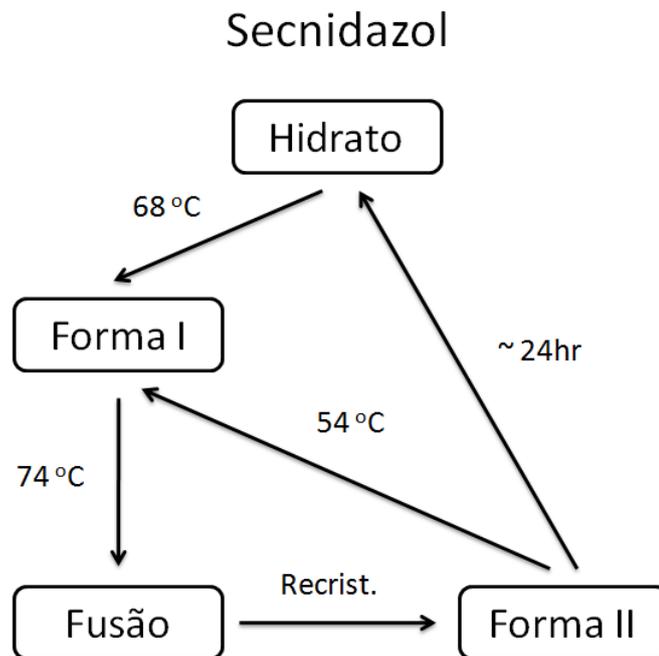
Dentro desse contexto esse trabalho se concentrou em investigar quatro fármacos bastante utilizados no sistema de saúde brasileiro. Os princípios ativos analisados possuem suas patentes vencidas e se encontram no mercado na forma de medicamentos genéricos e similares. Entretanto, a informação relativa à suas propriedades de estado sólido é limitada ou inexistente. Em face do exposto, uma caracterização cuidadosa destes fármacos foi realizada por várias técnicas experimentais. Embora cada um desses estudos tenham sido relevantes pela contribuição ao entendimento da físico-química destes fármacos, num contexto mais geral, os problemas foram escolhidos no intuito de investigar diferentes aspectos do polimorfismo. Assim, numa visão multidisciplinar do problema, foi estudado o impacto do polimorfismo nos perfis de dissolução de medicamentos e nas principais formas cristalinas

empregadas na formulação de medicamentos: formas básica, hidratos e sais. Os resultados obtidos são descritos na continuação.

Dois dos fármacos estudados são antiparasitários de uso corrente, o mebendazol e o secnidazol. Com relação ao mebendazol, o seu polimorfismo já é bem estabelecido: possui três formas polimórficas A, B e C, sendo que a A é a menos solúvel, a B é tóxica e a C é a preferida farmaceuticamente. A intenção com relação ao estudo do mebendazol foi investigar sua bioequivalência pelos testes de dissolução *in vitro*. Como existem bastantes controvérsias sobre a seletividade dos testes de dissolução na identificação de estruturas cristalinas, dois meios de dissolução foram empregados: o prescrito nas farmacopéias (meio I) e uma modificação proposta na literatura (meio II). Testes de dissolução nas misturas de matérias-primas do mebendazol das formas A e C foram realizados e observou-se que no meio I todas as amostras se dissolveram rapidamente atingindo os valores necessários para serem aprovadas nestes testes. Já no meio II a porcentagem do fármaco dissolvido aumenta quando a quantidade de polimorfo A decresce. Pelos resultados seria possível projetar um modelo para determinar a concentração da forma C dos perfis de dissolução, uma vez que o meio modificado distingue os polimorfos do mebendazol. O mesmo procedimento foi aplicado para identificar amostras comerciais, entre elas a escolhida como medicamento de referência para os genéricos. Com base nos resultados da caracterização de estado sólido, foi confirmado que dos nove comprimidos analisados, apenas um estava na forma C. Além disso, o teste de dissolução aplicando o meio padrão não foi capaz de distinguir as formas cristalinas. Por outro lado, usando o meio modificado, dois grupos de comprimidos foram claramente identificados, aqueles formulados com o polimorfo A e a amostra que continha o polimorfo C. Deste modo, foi verificado que em amostras comerciais o teste padrão aplicado para o mebendazol não possui especificidade quanto à forma polimórfica. Sugere-se que as monografias farmacopéicas descrevendo o mebendazol deveriam ser revistas para incluir métodos de avaliação de polimorfismo que garantam que os comprimidos sejam formulados com o polimorfo recomendado. Como no caso dos outros fármacos investigados nesse trabalho, uma caracterização físico-química completa foi realizada e os resultados estão resumidos no seguinte esquema:



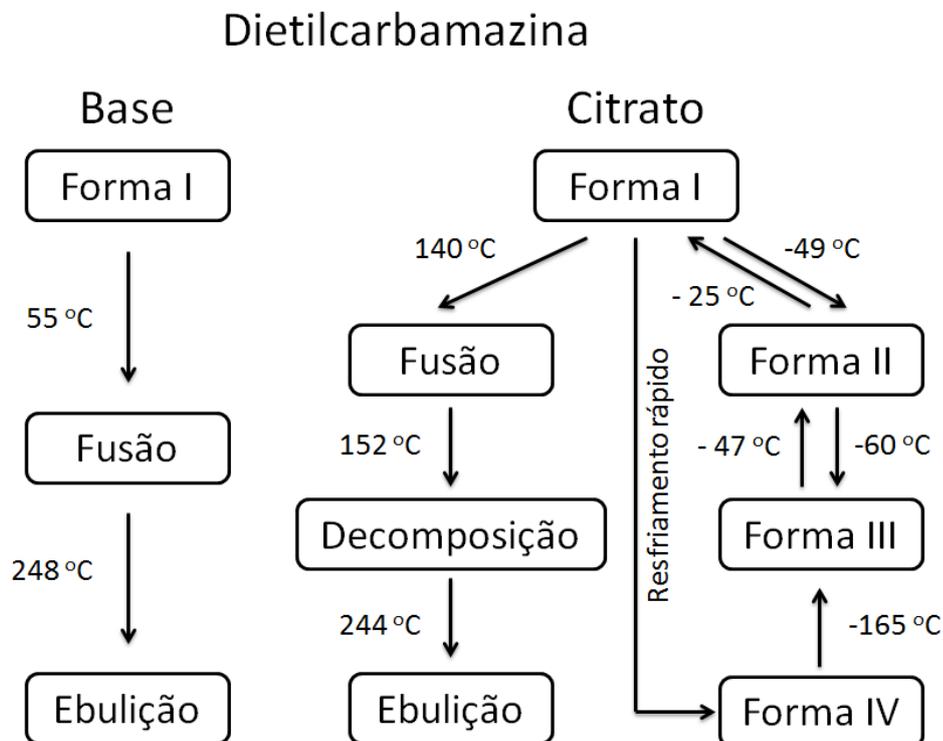
Do ponto de vista das propriedades de estado sólido do secnidazol, duas formas cristalinas foram reportadas: uma anidra e um hemi-hidrato, sendo que a forma anidra é a mais estável à temperatura ambiente. Como foi discutido no Capítulo 1, os hidratos são uma importante classe de sólidos farmacêuticos muito empregados em formulações. Com este objetivo, a estrutura cristalina foi discutida à temperatura ambiente e o espectro vibracional foi investigado. Para auxiliar na interpretação desses resultados, a geometria mais estável e os modos normais de vibração da molécula do secnidazol foram investigados através de cálculos quânticos de primeiros princípios. A análise térmica foi utilizada para averiguar a estabilidade térmica do hemi-hidrato e sua relação com a forma anidra. Estes estudos foram complementados com medidas de IR e Raman em função da temperatura para identificar as transformações de fase características desse composto. Assim, foi observado que o hemihidrato se transforma para uma forma anidra (Forma I) antes da fusão. No resfriamento, o secnidazol recristaliza-se numa segunda forma anidra (Forma II), a qual está relacionada monotropicamente com a primeira. Estes resultados mostram que o secnidazol possui uma dinâmica de transformações estruturais muito interessantes, a qual é resumida a seguir:



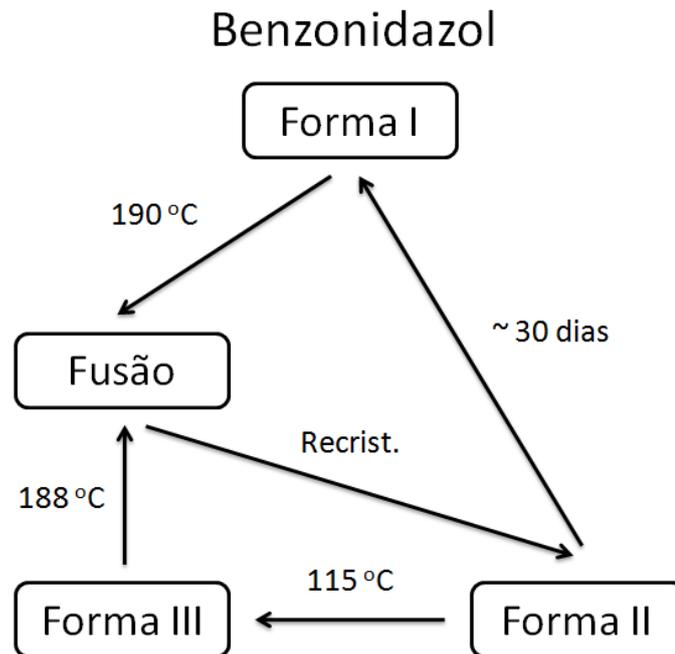
Os outros dois fármacos estudados nesse trabalho são usados na profilaxia de doenças negligenciadas, o benzonidazol para a doença de Chagas e a dietilcarbamazina para a filariose linfática. Por mais que os mesmos sejam objeto de pesquisa há vários anos, não se encontrou até hoje uma forma de minimizar os vários efeitos adversos em pacientes submetidos a tratamentos com estes fármacos. Estudos biológicos dos parasitas causadores dessas enfermidades são excelentes, mas investigações no estado sólido desses fármacos são escassos e pouco esclarecedores.

O princípio ativo utilizado para o combate à filariose linfática é a dietilcarbamazina, porém a forma de sal de citrato (DEC-CIT) é a escolhida para a formulação. Daí o motivo da investigação destes dois compostos. As estruturas cristalinas da dietilcarbamazina e DEC-CIT foram estudadas por difração de raios X em monocristais a várias temperaturas. Estes resultados foram complementados com medidas de espectroscopia vibracional, análise térmica e microscopia. Um resultado interessante foi observado nas medidas termogravimétricas dos dois compostos, a dietilcarbamazina e o DEC-CIT, analisando os gases liberados através dos correspondentes espectros no infravermelho. Em ambos uma grande perda de massa foi registrada em aproximadamente 244°C, a qual poderia ser associada à decomposição da dietilcarbamazina. No entanto, foi verificado que este composto não decompõe a essa temperatura senão que é liberado na forma de vapor. Por outro lado, a

baixas temperaturas a dietilcarbamazina não apresentou mudanças significativas nos parâmetros de rede, uma vez que nenhuma evidência de uma transformação estrutural foi encontrada. No entanto, o DEC-CIT exibiu um aumento anômalo do volume da cela unitária que está associado a uma mudança conformacional da molécula da dietilcarbamazina. À temperatura ambiente o citrato exibiu uma desordem orientacional de um dos grupos etila pertencentes à molécula da dietilcarbamazina, mas ao conferir os parâmetros de cela em baixa temperatura observou-se que o grupo etila ocupa sítios bem definidos. Para confirmar se esse comportamento da forma de citrato tinha sua origem numa transição de fase estrutural ou no congelamento de uma desordem termicamente ativada, este processo foi investigado por espalhamento Raman em função da temperatura. Encontrou-se uma variação abrupta dos espectros, em torno de 220K, nas bandas associadas às vibrações dos grupos metila e modos da rede cristalina, confirmando, desta forma, o caráter de uma transição de fase estrutural. Além disso, uma terceira e quarta formas cristalinas foram identificadas a baixas temperaturas mostrando que o DEC-CIT exibe um rico diagrama de fases. É interessante notar que DEC-CIT não deve ser confundido com um polimorfo da dietilcarbamazina, já que o primeiro é um sal e o segundo a substância base. No entanto, o sal é por si mesmo um composto polimórfico apresentando pelo menos quatro formas cristalinas. As diferentes fases observadas no caso da dietilcarbamazina são apresentadas no seguinte diagrama:



No caso do benzonidazol, a estrutura cristalina foi determinada por difração de raios X em monocristal. Descobriu-se que o benzonidazol cristaliza em um sistema monoclinico não-centrossimétrico com grupo espacial $P2_1$ e $Z = 2$, com parâmetros de rede $a = 4,687\text{Å}$, $b = 10,994\text{Å}$, $c = 12,025\text{Å}$, $\beta = 91,167^\circ$. A molécula é estabilizada por ligações de hidrogênio intermoleculares e uma intramolecular, sendo que duas, em especial a intermolecular N-H...O causa a formação de cadeias infinitas ao longo do eixo a e a não-clássica CH...N promove uma outra cadeia ao longo do eixo b, formando uma rede bidimensional. A investigação estrutural foi complementada por estudos detalhados de espectroscopia vibracional, análise térmica e microscopia fornecendo uma caracterização do benzonidazol no seu estado sólido. Termogramas realizados com vários ciclos de aquecimento/resfriamento antes da temperatura de decomposição do benzonidazol sugeriram o aparecimento de um segundo polimorfo que foi confirmado posteriormente pela termomicroscopia associada a medidas de difração de raios X de pó. Pela termomicroscopia polarizada observou-se que o benzonidazol após sua recristalização num primeiro aquecimento exibe um hábito acicular denominado de Forma I mantida até a fusão. Num segundo aquecimento o benzonidazol tem o hábito cristalino de esferulita, cognominado como Forma II. Identificou-se também outra fase com menor ponto de fusão, Forma III. Um diagrama de fase também foi feito para determinar a estabilidade termodinâmica dos três polimorfos relacionando suas energias. O polimorfo I, que é o de maior ponto de fusão, está monotropicamente relacionado com os polimorfos II e III. Já o polimorfo II está monotropicamente relacionado ao polimorfo III, pois a transição é exotérmica. É importante salientar que o benzonidazol é empregado no combate da doença de Chagas há quase 50 anos, e que, no entanto, sempre foi considerada como um fármaco que não exibe polimorfismo. As análises demonstram que o benzonidazol é um composto polimórfico, com mais de uma forma cristalina que pode ser estabilizada à temperatura ambiente. As implicações destes polimorfos na formulação do benzonidazol devem ser levadas em consideração. O diagrama a seguir resume os resultados obtidos para este princípio ativo:



Percebeu-se ao longo do texto a importância de se escolher a forma mais apropriada de um fármaco nos seus estágios iniciais de desenvolvimento, poupando assim, tempo e custo. Bastante pesquisa tem sido dirigida nos últimos anos para a realização desse objetivo. Isolamento sistemático e adiantada caracterização do maior número de formas possíveis de um fármaco reduzem as possibilidades de surpresas nos estágios de produção devido à identificação de uma nova forma cristalina ou mudanças de fase. Compreender as origens das múltiplas formas sólidas de um fármaco devido às diferenças no arranjo do empacotamento ou na conformação das moléculas transformou-se numa etapa fundamental no desenvolvimento de novos princípios ativos.

De um modo geral, este trabalho teve como objetivo contribuir ao entendimento das propriedades de estado sólido dos fármacos, em especial no que diz respeito ao fenômeno do polimorfismo. Almeja-se que os resultados obtidos possam fornecer aos programas de combate às doenças negligenciadas suporte na procura de novas formas cristalinas que possuam propriedades melhoradas. Os avanços nas pesquisas na área desta Tese certamente permitirão melhorar a biodisponibilidade dos medicamentos, diminuir a toxicidade, facilitar a adesão, dentre outras características que tenham impacto direto na qualidade do tratamento das populações de risco.

7 Referências

- [1] Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*. 2002;359(9324):2188-2194.
- [2] Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A. "Rapid-impact interventions": How a policy of integrated control for Africa's neglected tropical diseases could benefit the poor. *Plos Medicine*. 2005;2(11):1064-1070.
- [3] Pollard AJ, Finn A. Hot topics in infection and immunity in children III. In: Hotez PJ, Ottesen E, Fenwick A, Molyneux DH, eds. *The neglected tropical diseases: The ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their integrated control and elimination*. New York, Kluwer Academic/Plenum, 2006:23-33.
- [4] Pecoul B. New drugs for neglected diseases: From pipeline to patients. *Plos Medicine*. 2004;1(1):19-22.
- [5] Butler D. Topical diseases - Raiding the medicine cabinet. *Nature*. 2003;424(6944):10-11.
- [6] Frankish H. Initiative launched to develop drugs for neglected diseases. *Lancet*. 2003;362(9378):135-135.
- [7] Pecoul B, MacDonald R. Prioritising neglected diseases related to poverty. *British Medical Journal*. 2005;331(7507):12.
- [8] Villa L, Morote S, Bernal O, Bulla D, Albajar-Vinas P. Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and non-endemic countries in the XXI century. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102:87-93.
- [9] Disponível em:<<http://www.dndi.org/overview-dndi/objectives.html>>. Acesso em: 9 abr. 2009.
- [10] Disponível em:<http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx>. Acesso em: 21 fev. 2009.
- [11] Chirac P, Torreele E. Global framework on essential health R&D. *Lancet*. 2006;367(9522):1560-1561.
- [12] Swanepoel E, Liebenberg W, de Villiers MM. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active

- and non-active mebendazole polymorphs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003;55(3):345-349.
- [13] Meyer MC, Straughn AB, Jarvi EJ, Wood GC, Pelsor FR, Shah VP. The Bioinequivalence of Carbamazepine Tablets with a History of Clinical Failures. *Pharmaceutical Research*. 1992;9(12):1612-1616.
- [14] Aaltonen J, Rades T. Towards Physico-Relevant Dissolution Testing: The Importance of Solid-State Analysis in Dissolution. *Dissolution Technologies*. 2009;16(2):47-54.
- [15] Borgherini G. The bioequivalence and therapeutic efficacy of generic versus brand-name psychoactive drugs. *Clinical Therapeutics*. 2003;25(6):1578-1592.
- [16] Lieberman HA, Lachman L, Schwartz JB. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. New York, Marcel Dekker, 1990.
- [17] Brittain HG, Bogdanowich SJ, Bugay DE, Devincendis J, Lewen G, Newman AW. Physical Characterization of Pharmaceutical Solids. *Pharmaceutical Research*. 1991;8(8):963-973.
- [18] Brittain HG. *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. New York, Marcel Dekker, 1995.
- [19] Yu L, Reutzel SM, Stephenson GA. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1998;1(3):118-127.
- [20] Brittain HG. Application of the Phase Rule of the Characterization of Polymorphic Systems. In: Brittain HG, ed. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*. New York, Marcel Dekker, 1999:35-72.
- [21] Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(1):27-42.
- [22] Hancock BC, Zograf G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(1):1-12.
- [23] Morris KR, Griesser UJ, Eckhardt CJ, Stowell JG. Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(1):91-114.
- [24] Hancock BC, Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharmaceutical Research*. 2000;17(4):397-404.
- [25] Carstensen JT, Rhodes CT. *Drug Stability: Principles and Practices (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*. New York, Taylor & Francis, Inc., 2000.
- [26] Haleblia.J, Mccrone W. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1969;58(8):911-929.

- [27] Monkhouse DC, Vancampen L. Solid-State Reactions - Theoretical and Experimental Aspects. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1984;10(8-9):1175-1276.
- [28] Verma AR, Krishna P. *Polymorphism and Polytypism in Crystals*. New York, John Wiley & Sons, 1976.
- [29] Dunitz JD, Bernstein J. Disappearing Polymorphs. *Accounts of Chemical Research*. 1995;28(4):193-200.
- [30] Rodriguez-Hornedo N, Murphy D. Significance of controlling crystallization mechanisms and kinetics in pharmaceutical systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(7):651-660.
- [31] Davey RJ, Allen K, Blagden N, Cross WI, Lieberman HF, Quayle MJ, Righini, S, Seton L, Tiddy GJT. Crystal engineering - nucleation, the key step. *Crystengcomm*. 2002;257-264.
- [32] Zhang GGZ, Gu CH, Zell MT, Burkhardt RT, Munson EJ, Grant DJW. Crystallization and transitions of sulfamerazine polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;91(4):1089-1100.
- [33] Rodriguez-Hornedo N, Murphy D. Surfactant-facilitated crystallization of dihydrate carbamazepine during dissolution of anhydrous polymorph. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(2):449-460.
- [34] Byrn S, Pfeiffer R, Ganey M, Hoiberg C, Poochikian G. *Pharmaceutical Solids - a Strategic Approach to Regulatory Considerations*. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(7):945-954.
- [35] Borka L. Review on Crystal Polymorphism of Substances in the European Pharmacopeia. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1991;66(1):16-22.
- [36] Brittain HG. Effects of Pharmaceutical Processing on Drug Polymorphs and Solvates. In: Brittain HG, Fieser EF, eds. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*. New York, Marcel Dekker, 1999:348-361.
- [37] Schmidt AG, Wartewig S, Picker KM. Potential of carrageenans to protect drugs from polymorphic transformation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2003;56(1):101-110.
- [38] Ibrahim HG, Pisano F, Bruno A. Polymorphism of Phenylbutazone - Properties and Compressional Behavior of Crystals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1977;66(5):669-673.
- [39] Kala H, Traue J, Haack U, Moldenhauer H, Kedvessy G, Selmeczi B. On the Temperature-Dependence of the Modification of Sulfanilamide during Tablet Compression. *Pharmazie*. 1982;37(9):674-675.

-
- [40] Chan HK, Doelker E. Polymorphic Transformation of Some Drugs under Compression. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1985;11(2-3):315-332.
- [41] Otsuka M, Matsuda Y. Polymorphism: pharmaceutical aspects. In: Swarbrick J, Boylan JC, eds. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York, Marcel Dekker, 1988:305-326.
- [42] Ghan GA, Lalla JK. Effect of Compressional Forces on Piroxicam Polymorphs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1992;44(8):678-681.
- [43] Pirttimaki J, Laine E, Ketolainen J, Paronen P. Effects of Grinding and Compression on Crystal-Structure of Anhydrous Caffeine. *International Journal of Pharmaceutics*. 1993;95(1-3):93-99.
- [44] Otsuka M, Otsuka K, Kaneniwa N. Relation between Polymorphic Transformation Pathway during Grinding and the Physicochemical Properties of Bulk Powders for Pharmaceutical Preparations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1994;20(9):1649-1660.
- [45] Burger A, Ramberger R. Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular-Crystals II. Applicability of Thermodynamic Rules. *Mikrochimica Acta*. 1979;2(3-4):273-316.
- [46] Burger A, Ramberger R. Polymorphism of Pharmaceuticals and Other Molecular-Crystals II. Theory of Thermodynamic Rules. *Mikrochimica Acta*. 1979;2(3-4):259-271.
- [47] Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJW. Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;48(1):3-26.
- [48] Henck JO, Kuhnert-Brandstatter M. Demonstration of the terms enantiotropy and monotropy in polymorphism research exemplified by flurbiprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999;88(1):103-108.
- [49] Zhang GGZ, Law D, Schmitt EA, Qiu YH. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(3):371-390.
- [50] Grant DJW. Theory and Origin of Polymorphism. In: Brittain HG, ed. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)*. New York, Marcel Dekker, 1999:1-33.
- [51] Kuhnert-Brandstätter M. *Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals*, Oxford: Pergamon, 1971.
- [52] Borka L, Haleblan JK. Crystal Polymorphism of Pharmaceuticals. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*. 1990;40(1-2):71-94.

- [53] Giron D. Thermal-Analysis and Calorimetric Methods in the Characterization of Polymorphs and Solvates. *Thermochimica Acta*. 1995;248:1-59.
- [54] Threlfall TL. Analysis of Organic Polymorphs - a Review. *Analyst*. 1995;120(10):2435-2460.
- [55] Markovich RJ, Pidgeon C. Introduction to Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy and Applications in the Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research*. 1991;8(6):663-675.
- [56] Stahly GP. Diversity in single- and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. *Crystal Growth & Design*. 2007;7(6):1007-1026.
- [57] Steiner T, Majerz I, Wilson CC. First O-H-N hydrogen bond with a centered proton obtained by thermally induced proton migration. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2001;40(14):2651-2654.
- [58] Chemburkar SR, Bauer J, Deming K, Spiwek H, Patel K, Morris J, et al. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Research & Development*. 2000;4(5):413-417.
- [59] FDA, International Conference on Harmonization: Guidance on Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances, Federal Register (Notices) 65(251):83041-83063 (29 dec. 2000) (ICH Q6A).
- [60] Aguiar AJ, Krc J, Kinkel AW, Samyn JC. Effect of Polymorphism on Absorption of Chloramphenicol from Chloramphenicol Palmitate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1967;56(7):847-853.
- [61] US Patent Publication. Applicants Parke Davis & Co. Inventor Edgerton WH. Chloramphenicol esters and method for obtaining same. US 2662906 A. Published on 15 dec. 1953.
- [62] Glazko AJ, Edgerton WH, Dill WA, Lenz WR. Chloromycetin Palmitate - a Synthetic Ester of Chloromycetin. *Antibiotics and Chemotherapy*. 1952;2(5):234-242.
- [63] Aguiar AJ, Zelmer JE. Dissolution Behavior of Polymorphs of Chloramphenicol Palmitate and Mefenamic Acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1969;58(8):983-987.
- [64] Pudipeddi M, Serajuddin ATM. Trends in solubility of polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(5):929-939.
- [65] Reddy M, Gill SS, Kalkar SR, Wu W, Anderson PJ, Rochon PA. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases - A systematic review. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2007;298(16):1911-1924.

- [66] Awasthi S, Bundy DAP, Savioli L. Helminthic infections. *British Medical Journal*. 2003;327(7412):431-433.
- [67] Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, Brooker S, Buss P. Hookworm: "The great infection of mankind". *Plos Medicine*. 2005;2(3):187-191.
- [68] Bennett A, Guyatt H. Reducing intestinal nematode infection: Efficacy of albendazole and mebendazole. *Parasitology Today*. 2000;16(2):71-74.
- [69] Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections - Fifty years on. *Parasitology Today*. 1997;13(11):438-443.
- [70] Crompton DWT, Montresor A, Nesheim MC, Savioli L. Controlling disease due to helminth infections. World Health Organization. Geneva, 2003.
- [71] Urbani C, Albonico M. Anthelmintic drug safety and drug administration in the control of soil-transmitted helminthiasis in community campaigns. *Acta Tropica*. 2003;86(2-3):215-221.
- [72] Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Report of a World Health Organization Expert Committee. Geneva, 2002.
- [73] Albonico M. Methods to sustain drug efficacy in helminth control programmes. *Acta Tropica*. 2003;86(2-3):233-242.
- [74] Albonico M, Engels D, Savioli L. Monitoring drug efficacy and early detection of drug resistance in human soil-transmitted nematodes: a pressing public health agenda for helminth control. *International Journal for Parasitology*. 2004;34(11):1205-1210.
- [75] Charoenlarp P, Waikagul J, Muennoo C, Srinophakun S, Kitayaporn D. Efficacy of single-dose mebendazole, polymorphic forms A and C, in the treatment of hookworm and *Trichuris* infections. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1993;24(4):712-716.
- [76] Evans AC, Fincham JE, Dhansay MA, Liebenberg W. Anthelmintic efficacy of mebendazole depends on the molecular polymorph. *South African Medical Journal* 1999;89(11):1118.
- [77] Costa J, Fresno M, Guzman L, Igual A, Oliva J, Vidal P, et al. Polymorphic forms of mebendazole: analytical aspects and toxicity. *Circular Farmacêutica*. 1991;49(4):415-424.
- [78] Rodriguez-Caabeiro F, Criado-Fornelio A, Jimenez-Gonzalez A. Experimental chemotherapy and toxicity in mice of three mebendazole polymorphic forms. *Chemotherapy*. 1987;33(4):266-271.
- [79] Ren H, Cheng B, Ma J, Hua D. *Yiyao Gongye*. 1987;18:356-359.

-
- [80] Farmacopéia Brasileira. Farmacopéia Brasileira IV. Mebendazol Comprimidos. São Paulo, Atheneu Editora Ltda, 2002.
- [81] United States Pharmacopoeia. United States Pharmacopoeia. Mebendazole tablets. USP 30: NF 25, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, 2007.
- [82] Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, Mccullough B, Noorizadeh AC, Skelly JP. In vitro Dissolution Profile of Water-Insoluble Drug-Dosage Forms in the Presence of Surfactants. *Pharmaceutical Research*. 1989;6(7):612-618.
- [83] Swanepoel E, Liebenberg W, Devarakonda B, De Villiers MM. Developing a discriminating dissolution test for three mebendazole polymorphs based on solubility differences. *Pharmazie*. 2003;58(2):117-121.
- [84] Ayala AP, Siesler HW, Cuffini SL. Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole: a vibrational spectroscopy investigation. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2008;39(9):1150-1157.
- [85] De Villiers MM, Terblanche RJ, Liebenberg W, Swanepoel E, Dekker TG, Song M. Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005;38(3):435-441.
- [86] Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*. 2006;25(8):471-479.
- [87] Nogueira FB, Krieger MA, Nirde P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SMF. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. *Acta Tropica*. 2006;100(1-2):119-132.
- [88] Kaneshima EN, de Castro-Prado MAA. Benznidazole-induced genotoxicity in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(3):325-329.
- [89] Bernardes LSC, Kato MJ, Albuquerque S, Carvalho I. Synthesis and trypanocidal activity of 1,4-bis-(3,4,5-trimethoxy-phenyl)-1,4-butanediol and 1,4-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4-butanediol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14(21):7075-7082.
- [90] Moncayo A. Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98(5):577-591.
- [91] Andrade A, Martelli CMT, Oliveira RM, Silva SA, Aires AIS, Soussumi LMT, et al. Short report: Benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents

- after a six-year follow-up. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;71(5):594-597.
- [92] Olivieri BP, Cotta-de-Almeida V, Araujo-Jorge T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8⁺ T-Cell expansion and promotes resistance to reinfection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(12):3790-3796.
- [93] Revelli S, Le Page C, Piaggio E, Wietzerbin J, Bottasso O. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*. 1999;118(2):271-277.
- [94] Toledo MJD, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabe C, Tafuri WL, de Lana M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(1):223-230.
- [95] Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: Clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94:185-187.
- [96] Araujo MSS, Martins-Filho OA, Pereira MES, Brener Z. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;45(6):819-824.
- [97] Oliveira IS, Jesus VLB. *Introdução à Física do Estado Sólido*. São Paulo, E.L.d Física, 2005.
- [98] Mercury 1.4.2 distribuído pelo Cambridge Crystallographic Data Centre. Disponível em: < <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/mercury/>>. Acesso em: 14 mar. 2006.
- [99] Grunenberga A, Henck JO, Siesler HW. Theoretical derivation and practical application of energy temperature diagrams as an instrument in preformulation studies of polymorphic drug substances. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;129(1-2):147-158.
- [100] Yu L. Inferring Thermodynamic Stability Relationship of Polymorphs from Melting Data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995;84(8):966-974.
- [101] Henck J-O. *Dissertation*. Innsbruck, 1995.
- [102] Rivera AB, Hernandez RG, de Armas HN, Elizastegi DMC, Losada MV. Physico-chemical and solid-state characterization of secnidazole. *Farmaco*. 2000; 55(11-12):700-707.
- [103] Nunez JT, Gomez G. Low-dose secnidazole in the treatment of bacterial vaginosis. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2005;88(3):281-285.

- [104] Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(1):114-128.
- [105] Ravi SK, Naidu MUR, Sekhar EC, Rao TRK, Shobha JC, Rani PU, et al. Rapid and selective analysis of secnidazole in human plasma using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*. 1997;691(1):208-211.
- [106] Gillis JC, Wiseman LR. Secnidazole - A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in the management of protozoal infections and bacterial vaginosis. *Drugs*. 1996;51(4):621-638.
- [107] Bakshi M, Singh S. ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004;36(4):769-775.
- [108] Saffaj T, Charrouf M, Abourriche A, Abboud Y, Bennamara A, Berrada M. Spectrophotometric determination of metronidazole and secnidazole in pharmaceutical preparations. *IL Farmaco*. 2004;59:843-846.
- [109] Rodríguez-Carvajal J. FULLPROF: a program for Rietveld refinement and pattern matching analysis. *Satellite Meeting on Powder Diffraction of the XV Congress of the International Union of Crystallography*; 1990, p. 127.
- [110] De Armas HN, Hernandez RG, Rivera AB, Hernandez RP, Martinez IH. Crystal pseudopolymorphism of secnidazole bulk drug, C₇H₁₁N₃O₃. *Powder Diffraction*. 1999;14(2):136-141.
- [111] Johnson CK. ORTEP Report ORNL-3794. Oak Ridge National Laboratory. Tennessee, USA, 1965.
- [112] Bilton C, Allen FH, Shields GP, Howard JAK. Intramolecular hydrogen bonds: common motifs, probabilities of formation and implications for supramolecular organization. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science*. 2000;56:849-856.
- [113] Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*. 1964;136(3B):B864-B871.
- [114] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Montgomery JAJr, Vreven T, Kudin KN, Burant JC, Millam JM, Iyengar SS, Tomasi J, Barone V, Mennucci B, Cossi M, Scalmani G, Rega N, Petersson GA, Nakatsuji H, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Klene M, Li X, Knox JE, Hratchian HP, Cross JB, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Ayala PY, Morokuma K, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Zakrzewski VG, Dapprich S, Daniels AD, Strain MC, Farkas O, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Ortiz JV, Cui Q, Baboul AG, Clifford S, Cioslowski J, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Martin RL,

- Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Gonzalez C, Pople JA. *Gaussian03*; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.
- [115] Lee CT, Yang WT, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron-Density. *Physical Review B*. 1988;37(2):785-789.
- [116] Parr RG, Yang W. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. New York, Oxford University Press, 1989.
- [117] Becke AD. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *Journal of Chemical Physics*. 1993;98(7):5648-5652.
- [118] Petersson GA, Allaham MA. A Complete Basis Set Model Chemistry. II. Open-Shell Systems and the Total Energies of the 1st-Row Atoms. *Journal of Chemical Physics*. 1991;94(9):6081-6090.
- [119] Petersson GA, Bennett A, Tensfeldt TG, Allaham MA, Shirley WA, Mantzaris J. A Complete Basis Set Model Chemistry. I. The Total Energies of Closed-Shell Atoms and Hydrides of the 1st-Row Elements. *Journal of Chemical Physics*. 1988;89(4):2193-2218.
- [120] Pulay P, Fogarasi G, Pang F, Boggs JE. Systematic Abinitio Gradient Calculation of Molecular Geometries, Force Constants, and Dipole-Moment Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*. 1979;101(10):2550-2560.
- [121] Fogarasi G, Zhou XF, Taylor PW, Pulay P. The Calculation of Abinitio Molecular Geometries - Efficient Optimization by Natural Internal Coordinates and Empirical Correction by Offset Forces. *Journal of the American Chemical Society*. 1992;114(21):8191-8201.
- [122] Martin JML, Van Alsenoy C. *GAR2PED*. University of Antwerp, Antwerp, 1995.
- [123] Zhurko GA, Zhurko DA. *Chemcraft*. Disponível em: <<http://www.chemcraftprog.com>>. Acesso em: 12 abr. 2006.
- [124] Novoa H, González R, Dago A, Pomés R, Li N. Estructura cristalina del (hidroxi-2-propil)-1-metil-2-nitro-5-imidazol hemi-hidratado. *Rev. CENIC Ciencias Quim*. 1997;28(89).
- [125] Rousseau DL, Bauman RP, Porto SPS. Normal Mode Determination in Crystals. *Journal of Raman Spectroscopy*. 1981;10:253-290.
- [126] Guirgis GA, Klaboe P, Shen SY, Powell DL, Gruodis A, Aleksa V, Nielsen CJ, Tao J, Zheng C, Durig JR. Spectra and structure of silicon-containing compounds. XXXVI - Raman and infrared spectra, conformational stability, ab initio calculations and

- vibrational assignment of ethyldibromosilane. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2003;34(4):322-336.
- [127] Polavarapu PL. Abinitio Vibrational Raman and Raman Optical-Activity Spectra. *Journal of Physical Chemistry*. 1990;94(21):8106-8112.
- [128] Varsanyi G. *Vibrational Spectra of Benzene Derivatives*. New York, Academic Press, 1969.
- [129] Ayala AP, Siesler HW, Wardell SMSV, Boechat N, Dabbene V, Cuffini SL. Vibrational spectra and quantum mechanical calculations of antiretroviral drugs: Nevirapine. *Journal of Molecular Structure*. 2007;828(1-3):201-210.
- [130] Halls MD, Velkovski J, Schlegel HB. Harmonic frequency scaling factors for Hartree-Fock, S-VWN, B-LYP, B3-LYP, B3-PW91 and MP2 with the Sadlej pVTZ electric property basis set. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2001;105(6):413-421.
- [131] Ayala AP. Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering. *Vibrational Spectroscopy*. 2007;45:112-116.
- [132] World Health Organization. Global programme to eliminate lymphatic filariases. Annual report on lymphatic filariases, 2002.
- [133] Saraiva KLA, Silva VA, Dias ESF, Peixoto CA. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reproductive Toxicology*. 2006;22(4):754-759.
- [134] Ottesen EA, Duke BOL, Karam M, Behbehani K. Strategies and tools for the control/elimination of lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 1997;75(6):491-503.
- [135] Whitworth JA, Hewitt K. Filariasis. *Medicine*. 2005;33(8):61-64.
- [136] De Lima AWS. Reações adversas ao tratamento em massa com dietilcarbamazina em populações de áreas endêmicas de filariose linfática no Recife - PE. 2006. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Pernambuco, Recife, 2006.
- [137] Melrose W, Rahmah N. Use of Brugia Rapid dipstick and ICT test to map distribution of lymphatic filariasis in the Democratic Republic of Timor-Leste. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2006;37(1):22-25.
- [138] Patrick L, Trevor M, Robin H. Unfulfilled potential: using diethylcarbamazine-fortified salt to eliminate lymphatic filariasis. *Bulletin of the World Health Organization*. 2007;85(7):545-549.
- [139] Gelband H. Diethylcarbamazine Salt in the Control of Lymphatic Filariasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994;50(6):655-662.

- [140] McGarry HF, Plant LD, Taylor MJ. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Filaria Journal*. 2005;4(4):1-9.
- [141] Dreyer G, Norões J. Diethylcarbamazine no Tratamento da Filariose Bancroftiana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997;30(3):229-240.
- [142] Ismail MM, Jayakody RL, Weil GJ, Fernando D, De Silva MSG, De Silva GAC, et al. Long-term efficacy of single-dose combinations of albendazole, ivermectin and diethylcarbamazine for the treatment of bancroftian filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;95(3):332-335.
- [143] Strukov BA, Levanyuk AP. *Ferroelectric Phenomena in Crystals: Physical Foundations*. New York, Springer, 1997.

8 Anexo A

O trabalho de pesquisa desenvolvido durante esta tese foi baseado na aplicação de diversas técnicas experimentais ao estudo das propriedades de estado sólido de vários fármacos. Cada uma destas técnicas fornece informações relevantes para o entendimento do fenômeno do polimorfismo. Neste anexo, descrevemos brevemente os métodos utilizados e seus correspondentes arranjos experimentais.

Análise Térmica

As técnicas de análise térmica podem ser vantajosamente usadas no controle de qualidade de fármacos. Estas técnicas são comumente utilizadas durante a pré-formulação para estudo de polimorfismo e para estudo de interações do fármaco com os excipientes, desde que as interações físicas possam ser base do desempenho da dosagem do fármaco. Para o controle rotineiro dos produtos de um fármaco, os métodos de termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) são rápidos, exigindo apenas poucos miligramas das amostras e também são automatizados. Uma única varredura pode dar diversas informações qualitativas e quantitativas.

Termogravimetria

A TG é uma técnica analítica usada para determinar a estabilidade térmica de materiais monitorando a mudança de massa que ocorre enquanto é aquecido. A atmosfera da medida pode variar dependendo do objetivo da análise e a massa é registrada em função do aumento da temperatura. Esta técnica é potencializada quando combinada com outros métodos de análise térmica como, por exemplo, acoplada a medidas de DSC ou DTA.

No nosso trabalho as medidas de TG foram feitas em atmosfera de nitrogênio num modelo Netzsch de análise térmica simultânea STA 409 PC Luxx acoplado a um espectrômetro no infravermelho Bruker Tensor 27 (Figura A.1). O STA 409 PC Luxx é projetado para medidas simultâneas de TG-DTA ou TG-DSC. O espectrômetro FT-IR permite

medir os gases liberados durante o tratamento térmico facilitando o entendimento dos processos de decomposição característicos de cada amostra. A escala de temperatura desse equipamento pode variar de 0°C a 1500°C. O STA 409 PC Luxx opera com o software Proteus que inclui todas as rotinas necessárias avaliar dados resultantes.

Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial

Há dois tipos principais de instrumentos térmicos diferenciais disponíveis: análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Estes instrumentos fornecem informação quantitativa sobre eventos exotérmicos, endotérmicos e mudanças da capacidade calorífica em função da temperatura e do tempo (tal como temperatura de fusão, pureza, transição de vítrea, etc). Ambas as técnicas se baseiam na comparação da amostra com uma referência. A diferença básica entre DTA e DSC é que o primeiro mede diferenças de temperatura entre a amostra e a referência enquanto que o DSC mede diferenças de energia.

Na DTA a diferença da temperatura entre uma amostra e um material de referência é medida em função de um ciclo de temperatura pré-programada. Os termopares da amostra e da referência estão localizados abaixo dos cadinhos em um forno eletricamente aquecido. O termopar da amostra é usado pelo microcomputador para controlar a temperatura do forno de modo que a temperatura da amostra aumente linearmente. A diferença de temperatura entre a amostra e a referência é registrada contra a temperatura da amostra. O modelo utilizado nas medidas de DTA foi o STA 409 PC Luxx acoplado ao FTIR da Bruker Tensor 27 (Figura A.1).

O DSC é freqüentemente a técnica analítica térmica preferida por causa de sua habilidade em fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. Estas informações freqüentemente não podem ser obtidas com precisão, facilmente, ou rapidamente usando alguma outra técnica. Existem dois tipos de instrumentação possíveis para aparelhos de DSC: com compensação de potência e com fluxo de calor. No DSC com compensação de potência as temperaturas da amostra e da referência são controladas independentemente usando fornos separados. As temperaturas da amostra e da referência são mantidas idênticas variando a entrada de energia nos dois fornos. Um sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra quando o

processo é endotérmico, e aumenta a energia fornecida para a referência quando o processo é exotérmico. No DSC com fluxo de calor apenas um forno é utilizado. A amostra e a referência são conectadas por um disco de metal e as mudanças da capacidade calorífica ou da entalpia na amostra causam uma diferença na temperatura relativa à referência.

Todas as curvas de DSC deste trabalho foram obtidas em um DSC com fluxo de calor da Netzsch modelo 204 F1 Phoenix (Figura A.2), usando um porta amostra de alumínio no qual uma amostra com massa em torno de 5 mg foi mantida numa atmosfera de nitrogênio. A faixa de temperatura suportada por esse método vai desde -195°C até 600°C . Dependendo da amostra diversos ciclos térmicos envolvendo aquecimentos (taxas de 1 a 10 K/min), resfriamentos (taxas de 1 a 100 K/min) e isotermas foram realizados.

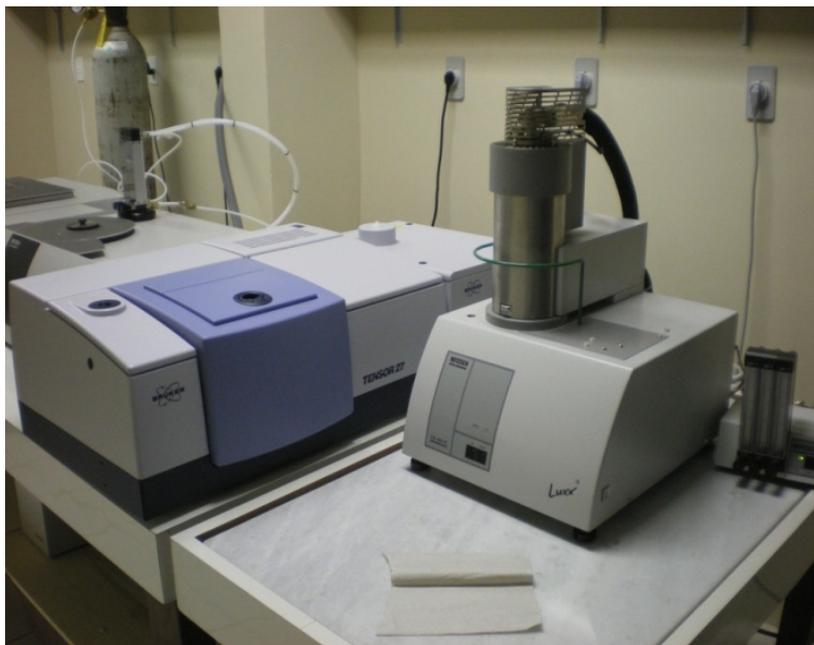


Figura A.1. Equipamento de análise térmica simultânea modelo STA 409 PC Luxx da Netzsch e infravermelho por transformada de Fourier Tensor 27 da Bruker.

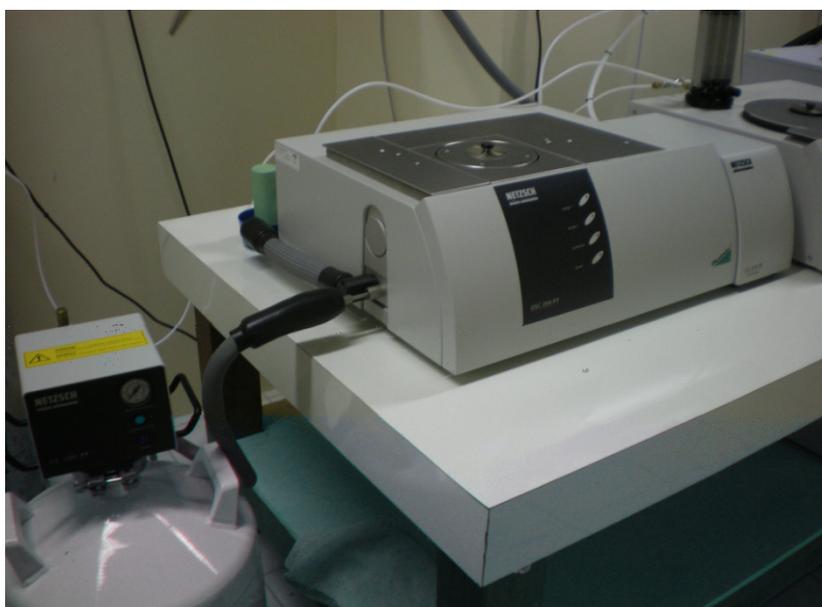


Figura A.2. Equipamento de calorimetria exploratória diferencial modelo 204 F1 Phoenix da Netzsch.

Microscopia Eletrônica de Varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um tipo de microscópio eletrônico que obtém imagens de superfícies das amostras varrendo-as com um feixe de elétrons de alta energia disposto segundo um padrão de linhas paralelas horizontais. Os elétrons interagem com os átomos que compõem a amostra produzindo sinais que contêm informação sobre a topografia de superfície, composição e outras propriedades tais como a condutibilidade elétrica. Os tipos de sinais produzidos pelo MEV incluem elétrons secundários (SE, *secondary electrons*), elétrons dispersados frontalmente (EBS, *back scattered electrons*), raios X característicos, luz (catodoluminescência), etc. Estes tipos de sinais exigem detectores especializados que não estão geralmente presentes em uma única máquina. Os sinais resultam das interações do feixe de elétrons com os átomos que se encontram próximos da superfície da amostra ou na própria superfície da mesma.

As nossas medidas no MEV tiveram apenas o objetivo de caracterização morfológica e foram realizadas no MEV da marca Tescan USA modelo VEGA-II XMU (Figura A.3), usando um detector SE capaz de efetuar análises de caracterização morfológica de materiais metálicos e não-metálicos, com ampliações de até 500.000 vezes, bem como realizar análises elementares semi-quantitativas utilizando detector de energia dispersiva de raios X EDX, marca Bruker AXS. Há um sistema de preparo de amostras por metalização quando da análise de amostras não-metálicas.

Microscopia Óptica

A microscopia óptica é uma técnica muito poderosa para o estudo do polimorfismo em fármacos. A combinação da microscopia polarizada com a termomicroscopia permite identificar novas formas cristalinas bem como estabelecer a relação entre os diferentes polimorfos. O microscópio óptico é um tipo de microscópio que usa a luz visível e um sistema de lentes para ampliar imagens de amostras. Nesse trabalho utilizamos um microscópio óptico Leica DM2500P equipado com polarizadores e objetivas corrigidas para medidas polarizadas (Figura A.4). Um sistema de aquecimento desenvolvido em nosso laboratório foi empregado para realizar estudos desde a temperatura ambiente até 400°C. Imagens das amostras foram registradas com uma câmera digital acoplada ao microscópio.



Figura A.3. Microscópio eletrônico de varredura modelo VEGA-II XMU da Tescan.



Figura A.4. Microscópio óptico Leica DM2500 P.

Espectroscopia Vibracional

A diferença das técnicas de difração de raios X que são sensíveis à ordem de longo alcance, a espectroscopia vibracional (IR e Raman) é sensível à estrutura de curto alcance de sólidos moleculares. Conseqüentemente, estas duas técnicas complementam-se na caracterização dos sólidos farmacêuticos. As espectroscopias no infravermelho (IR) e Raman são usadas no estudo das vibrações moleculares fundamentais, fornecendo uma impressão digital do sólido molecular. Os espectros de Raman são coletados facilmente na região espectral de 40 a 400 cm^{-1} (tipicamente não acessível num espectrômetro IR), onde as vibrações que caracterizam a estrutura cristalina, e, portanto, os diferentes polimorfismos, são observados. A especificidade intrínseca da espectroscopia vibracional faz com que estas técnicas sejam adequadas para realizar análises quantitativas com uma excelente taxa de confiabilidade e repetitividade, motivo pelo qual já estão sendo aceitas como um procedimento de rotina para estas tarefas.

Neste trabalho um espectrômetro infravermelho de transformada de Fourier FT-IR VERTEX 70/Bruker foi utilizado para realizar medidas no infravermelho médio e próximo (Figura A.5). Os espectros IR foram obtidos através dos métodos de pastilhamento com KBr, refletância difusa ou refletância total atenuada (ATR). As medidas Raman em temperatura ambiente foram realizadas no módulo Raman II acoplado ao espectrômetro FT-IR, o qual permite realizar medidas FT-Raman usando como fonte de excitação um laser no infravermelho próximo (1064 cm^{-1}). Já nos experimentos de transições de fase usamos o espectrômetro Raman dispersivo da marca Jobin Yvon T64000 (Figura A.6) equipado com um microscópio Olympus e um detector CCD (*Charge Coupled Device*) resfriado a N_2 líquido para detectar a luz espalhada. Os espectros foram excitados com um laser de argônio ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$) da Coherent modelo 70c. As medidas à baixa temperatura foram feitas usando um criostato de ciclo fechado de He que fornece temperaturas que variam de 7 a 300K. Foi usado também um controlador de temperatura Lakeshore com precisão de $\sim 0.1\text{K}$. Os estudos em alta temperatura ($T > 300 \text{ K}$) foram executados usando um forno resistivo de fabricação caseira.

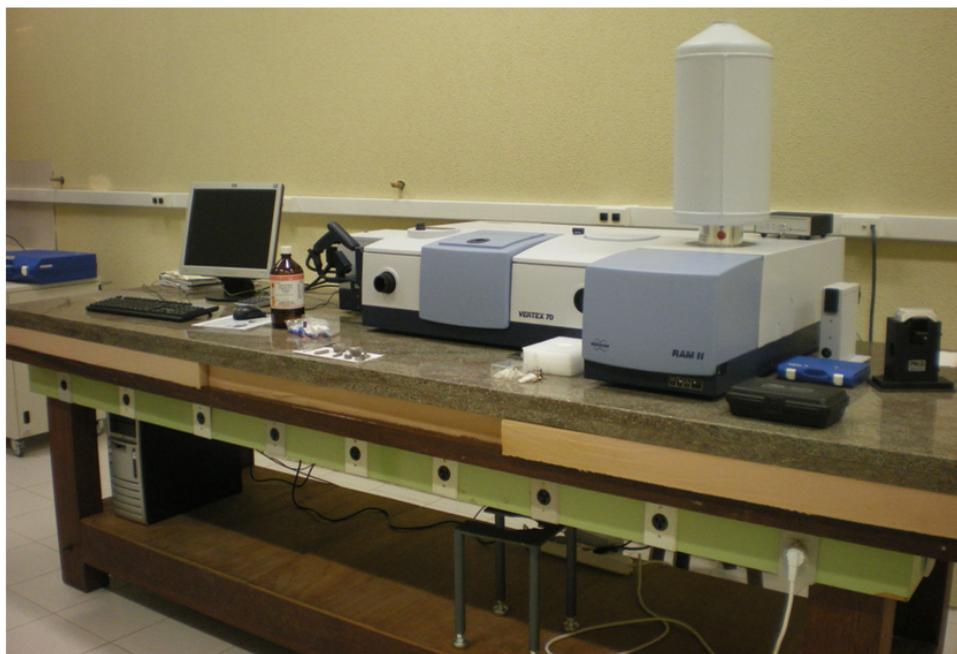


Figura A.5. Espectrômetro FTIR e módulo Raman III – FTIR VERTEX 70/Bruker.

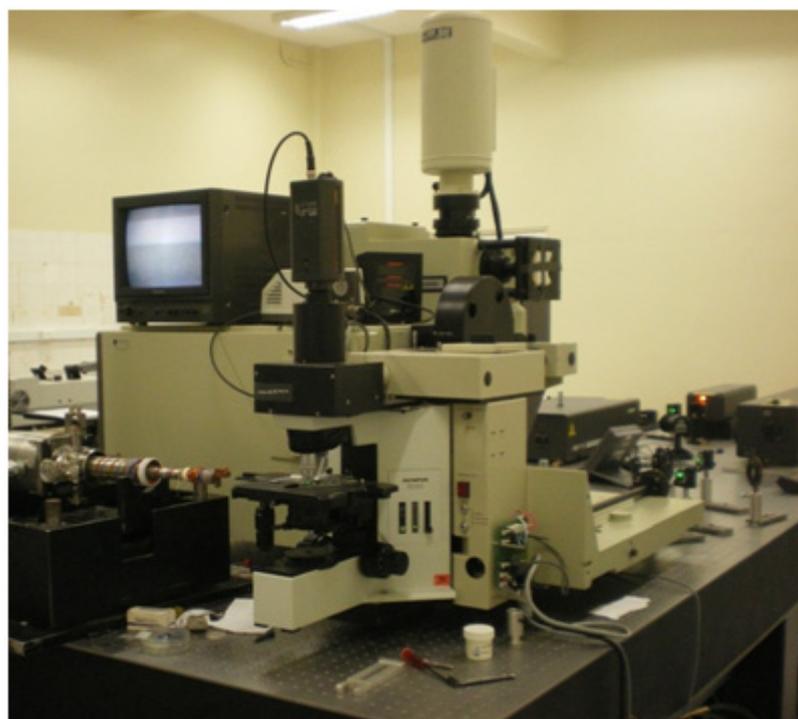


Figura A.6. Espectrômetro Raman Jobin Yvon T64000.

Difração de raios X em monocristal

Na caracterização de novas formas cristalinas a difração de raios X em monocristais é provavelmente uma das técnicas experimentais mais importantes, já que determina diretamente o empacotamento e a conformação das moléculas. Além disso, as interações intermoleculares no sólido podem ser investigadas com resolução atômica. O sucesso da determinação da estrutura de um fármaco através da difração de raios X está fortemente condicionado à qualidade dos cristais. Devido a isso, um grande esforço foi realizado na obtenção de monocristais. No entanto, na falta de monocristais de boa qualidade, a técnica de difração de raios X de pó tem se mostrado uma excelente alternativa. A mesma foi empregada para monitorar transformações polimórficas e de uso rotineiro para a caracterização de matérias primas.

As medidas de raios X em monocristal das amostras foram feitas variando a temperatura desde a ambiente até baixas temperaturas (~100K). Para as experiências em baixas temperaturas utilizou-se um soprador de Nitrogênio líquido Oxford Cryosystem. Um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD (Figura A.7) foi empregado com radiação de Moka ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), monocromador de grafite, um goniostato *kappa* e um detector de área tipo CCD (“*Charge Couple Device*”). O goniostato *kappa* possui um sistema de quatro graus de liberdade: θ (theta), ω (ômega), κ (kappa) e ϕ (phi). A cabeça goniométrica é montada na direção do eixo phi, que se apóia sobre o bloco *kappa*. O terceiro movimento de rotação do cristal é efetuado pelo bloco ômega, que está conectado ao bloco *kappa* e à base do difratômetro. Existe um quarto eixo rotacional, 2θ , que realiza o movimento do detector. Assim, há três possibilidades de rotação para a amostra e uma para o detector. O ângulo entre os eixos *kappa* e ômega e entre os eixos *kappa* e phi é aproximadamente 50° . O detector também pode movimentar-se através do eixo translacional DX, que determina a sua distância ao cristal. Esta distância corresponde a um determinado limite de resolução.

A coleta dos dados foi realizada com o programa COLLECT e a integração das reflexões com o programa HKL Denzo-Scalepack. As correções de absorção foram feitas usando-se um método de multi-varredura. A estrutura foi resolvida pelo método direto com o programa SHELXS-97 e o modelo foi refinado pela matriz total de mínimos quadrados F^2 com o programa SHELXL-97. Todos os hidrogênios foram estereoquimicamente posicionados e refinados como modelos rígidos. Depois que o refinamento foi concluído, a análise da estrutura e algumas visualizações foram feitas com os softwares MERCURY25 e ORTEP-326.

As medidas de difração de raios X de pó a temperatura ambiente foram realizadas utilizando um difratômetro de raios X modelo Rigaku DMAXB (Figura A.8) constituído de um gerador de raios X com potência máxima de 2kW. Todas as medidas foram feitas utilizando radiação CuK em modo contínuo com velocidade de varredura de 1°/min.



Figura A.7. Difratômetro de raios X em pó Rigaku modelo DMAXB.

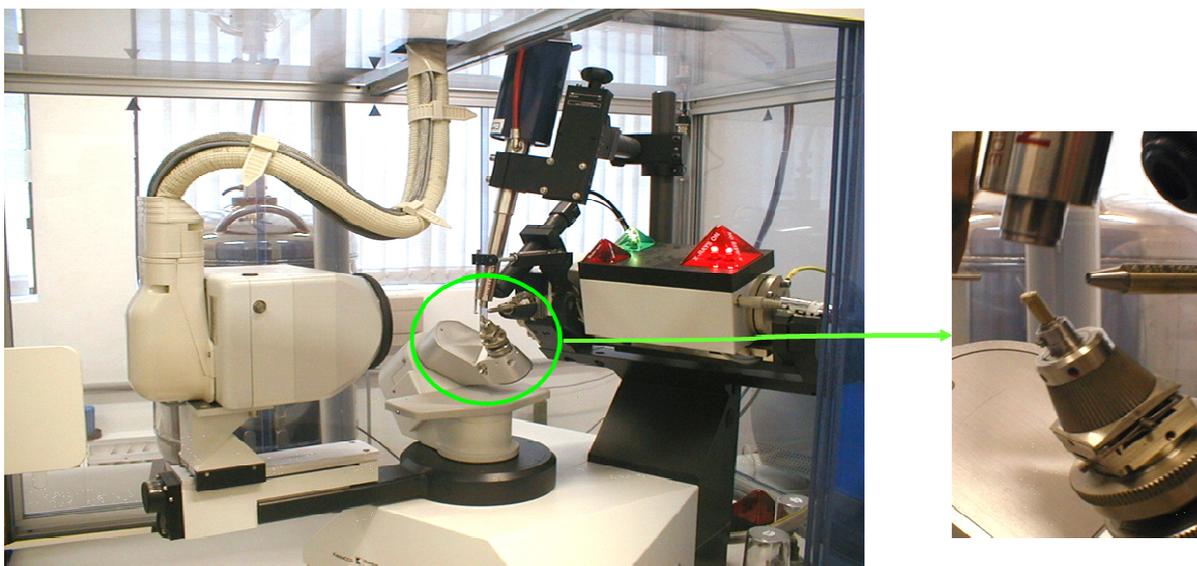


Figura A.8. Difratômetro Kappa-CCD da Enraf-Nonius.

9 Anexo B

Publicações relacionadas à Tese

- [1] Tandon, Poonam; **Honorato, S. B.**; Mishra, Soni; Chaturvedi, Deepika; Gupta, V. P.; Ayala, A. P.; Siesler, H. W. Molecular Structure and Vibrational Spectroscopic Investigation of Secnidazole Using Density Functional Theory. *The Journal of Physical Chemistry A*. **113**, p. 273-281, 2009.
- [2] Da Silva, Cecilia C. P.; Martins, Felipe T.; **Honorato, Sara B.**; Boechat, Núbia; Ayala, Alejandro P.; Ellena, Javier. Triple Structural Transition below Room Temperature in the Antifilarial Drug Diethylcarbamazine Citrate. *Crystal Growth & Design*. **10**, p. 3094-3101, 2010.
- [3] **Sara B. Honorato**; Silvia Farfan; Arnaldo Viana; Josué M. Filho; Gisela C. Camarão; Francisco V. Fachine; Maria E. A. Moraes; Manoel O. Moraes; Maribel Ferro; Viviana Dabbene; Silvia L. Cuffini; Alejandro P. Ayala. Polymorphism Evaluation in Generic Tablets Containing Mebendazole by Dissolution Tests, 2010 (**submetido**).
- [4] **Sara B. Honorato**; Jorge S. Mendonça; Nubia Boechat; Josue M. Filho; Javier Ellena; Alejandro P. Ayala. Polymorphism in the anti-Trypanosoma cruzi drug benznidazole, 2010 (**submetido**).
- [5] **Sara B. Honorato**; Cecília C. P. da Silva; Jorge S. Mendonça; Alejandro P. Ayala, Josué M. Filho; Núbia Boechat; Javier Ellena. Solid state characterization of pure diethylcarbamazine by single crystal X-ray diffraction, thermal analysis, and vibrational spectroscopy, 2010 (**submetido**).

-
- [6] Martins, Felipe T.; Legendre, Alexandre O.; **Honorato, Sara B.**; Ayala, Alejandro P.; Doriguetto, Antônio C.; Ellena, Javier. Solvothermal Preparation of Drug Crystals: Didanosine. *Crystal Growth & Design*. **10**, p. 1885-1891, 2010.
- [7] Ayala, Alejandro Pedro; **Honorato, Sara Braga**; Filho, Josué Mendes; Grillo, Damián; Quintero, Mariano; Gilles, Facundo; Polla, Griselda. Thermal stability of aripiprazole monohydrate investigated by Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. **54**, p. 169-173, 2010.
- [8] **Sara B. Honorato**; Williams Porcal; Alicia Merlino; Lucía Boiani; Carolina Davies; Miguel Ángel Basombrío; Javier Ellena; Hugo Cerecetto; Alejandro P. Ayala; Mercedes González. Understanding the solid forms of 5*E*-phenylethenylbenzofuroxan with different *in vivo* anti-*T. cruzi* activities, 2010 (**submitted**).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)