UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E FÍSICA MOLECULAR

Caroline Bevilacqua Micalli

Estudo do comportamento térmico dos antibióticos aminoglicosídeos estreptomicina
e tobramicina.

São Carlos
2018

Caroline Bevilacqua Micalli

Estudo do comportamento térmico dos antibióticos aminoglicosídeos estreptomicina e tobramicina.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química Analítica e Inorgânica.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro.

São Carlos
2018

Dedico este trabalho à minha família: ao meu marido Ian, aos meus pais Sandra e Paulo e a minha avó Santa, pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde para enfrentar, com sabedoria, mais esse desafio de minha vida.

Ao meu marido Ian por estar sempre ao meu lado, me apoiando com muito amor e carinho.

À minha família pelo apoio e carinho por todos esses anos, em toda minha trajetória, principalmente à minha avó Santa.

Aos meus familiares Selma, Gastão, Maria Paula e Maria Fernanda, que estão sempre presentes em nossas vidas, nos ajudando e apoiando.

Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro pela orientação durante a realização deste trabalho.

Às técnicas Dra. Ana Paula G. Ferreira e Dra. Priscila Cervini por toda a ajuda.

Ao pessoal do Grupo LATEQS pela amizade e companheirismo.

Ao Instituto de Química de São Carlos e a Universidade de São Paulo pela infraestrutura fornecida para a realização do projeto.

A todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho.

Resumo

Este trabalho propôs estudos sobre a caracterização do comportamento térmico dos aminoglicosídeos estreptomicina e tobramicina, que são antibióticos bactericidas, utilizados e conhecidos no combate a microrganismos patogênicos tanto na medicina humana quanto veterinária, que agem interrompendo a síntese de proteínas. Após a caracterização espectroscópica dos analitos, foram realizadas medidas termogravimétricas, em atmosfera de ar e nitrogênio, que possibilitaram a determinação da estabilidade térmica dos fármacos e o reconhecimento das etapas de decomposição, sendo o sulfato de estreptomicina estável até 160°C e a tobramicina até 250°C. A calorimetria exploratória diferencial forneceu informações a respeito de processos físicos com variação de entalpia, em que o sulfato de estreptomicina é amorfo e a tobramicina apresentou polimorfos. Os gases envolvidos foram analisados usando termogravimetria acoplada à espectroscopia vibracional na região do infravermelho (TG-FTIR), observando a liberação de NH₃, CO₂, ácido isociânico, SO₂, HCN e uma banda não identificada do sulfato de estreptomicina e CO₂, NH₃ e CH₄ da tobramicina. Os intermediários de decomposição térmica foram caracterizados por CG-MS e o conjunto de todas essas informações forneceu um possível mecanismo para o comportamento térmico desses fármacos. Além disso, foram estudados os polimorfos apresentados pela Tobramicina utilizando *hot stage* e DRX. Também foi sintetizado, caracterizado e analisado por TG, DSC e TG-FTIR, o complexo de tobramicina com o íon Cu²⁺, que apresenta alto potencial anti-inflamatório, na qual apresentou rendimento de 75%. Os resultados mostraram a estabilidade térmica do complexo similar ao fármaco puro e os gases envolvidos observados através da termogravimetria acoplada à espectroscopia vibracional na região do infravermelho (TG-FTIR) foram H₂O, NH₃, CO₂, CH₃OH, e SO₂, não sendo possível descrever um mecanismo de decomposição, pois alguns intermediários não foram identificados.

Palavras chave: Aminoglicosídeos, Estreptomicina, Tobramicina, Análise térmica, Mecanismo de decomposição.

Abstract

A study regarding characterization of the thermal behavior of aminoglycosides streptomycin and tobramycin which are antibiotics is presented. These antibiotics are widely used against pathogenic microorganisms and act by interrupting the synthesis of proteins. After spectroscopic characterization of the analytes, thermogravimetric measurements were performed under air and nitrogen atmospheres to evaluate thermal stability of the drugs and their decomposition steps. The streptomycin sulphate being stable up to 160 ° C and tobramycin up to 250 ° C. Differential scanning calorimetry provided information regarding physical processes with enthalpy change. The streptomycin sultate is amorphous and tobramycin has polymorphs. Evolved gas analysis was performed using thermogravimetry coupled to infrared spectroscopy (TG-FTIR), observing the release of NH₃, CO₂, ácido isociânico, SO₂, HCN and an unidentified strip of streptomycin sulphate and CO₂, NH₃ e CH₄ from tobramycin. Decomposition intermediates were characterized by CG-MS and the set of all these results allowed the proposition of a mechanism for the thermal behavior of drugs. In addition, the polymorphs presented by Tobramycin using *hot stage* and XRD were studied. The complex of tobramycin with the Cu²⁺ ion was also synthesized, characterized and analyzed by TG, DSC and TG-FTIR. The complex has a high anti-inflammatory potential. The yield of the synthesis was 75%. The results showed the thermal stability of the pure drug-like complex and revealed the possible decomposition steps, however the TG-FTIR evolved gas analysis was not conclusive to propose a mechanism for the thermal decomposition of the complex. The gas observed was H₂O, NH₃, CO₂, CH₃OH, e SO₂.

Key words: Aminoglycosides, Streptomycin, Tobramycin, Thermal analysis, Decomposition mechanism.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fórmula estrutural da estreptomicina.	18
Figura 2 - Fórmula estrutural da Tobramicina.....	19
Figura 3 - Espectro de FTIR para o fármaco sulfato de estreptomicina.	33
Figura 4 - Espectro de RMN ¹³ C do sulfato de estreptomicina.	34
Figura 5 - Curvas TG/DTG/DTA do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N ₂ , com vazão de 50 mL min ⁻¹ , razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , porta amostra de α-alumina e massa de amostra de 7,0 mg (± 0,1 mg).	36
Figura 6 - Curvas TG/DTG/DTA do sulfato de estreptomicina em atmosfera de ar seco, com vazão de 50 mL min ⁻¹ , razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , porta amostra de α-alumina e massa de amostra de 7,0 mg (± 0,1 mg).	37
Figura 7 - Curva DSC do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N ₂ (50 mL min ⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa e massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg. ...	39
Figura 8 - Curva DSC do 1º aquecimento do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N ₂ (50,0 mL min ⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa, massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg entre o intervalo de 0 e 195 °C.	40
Figura 9 - Gráfico de Gram-Schmidt para a decomposição do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N ₂	41
Figura 10 - Diagrama tridimensional para a decomposição do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N ₂ , com sinal de absorbância no IV em função do tempo e da temperatura.	41
Figura 11 - Espectros de FTIR do sulfato de estreptomicina obtidos nos tempos de 21,0; 24,7; 29,0; 32,0; 33,0; 43,0; 50,0 e 58,0 minutos, de aquecimento no TG.	42
Figura 12 - Comparação do espectro de infravermelho, na fase gasosa, obtido aos 24,7 minutos (264,1 °C) de análise e aqueles de água e amônia da base de dados Coblenz S. [43].	43
Figura 13 - Comparação do espectro de infravermelho aos 33,0 minutos (347,1 °C) de análise com aqueles de CO ₂ e SO ₂ da base de dados Coblenz S. [43].	44
Figura 14 - Comparação do espectro de infravermelho aos 27,4 minutos (291,1 °C) de análise da amostra com àquele do ácido isociânico da base de dados EPA Vapor Phase [44].	45

Figura 15 - Comparação do espectro de infravermelho aos 43,25 minutos (452,1 °C) de análise da amostra com espectro da base de dados EPA Vapor Phase [44]	45
Figura 16 - Comparação do espectro de infravermelho aos 33,0 minutos (347,1 °C) de análise da amostra com espectros da base de dados Coblenz S. [43].	46
Figura 17 - Mecanismo proposto para decomposição térmica do sulfato de estreptomicina.	48
Figura 18 - Espectro na região do infravermelho da Tobramicina.	49
Figura 19 - Espectro de RMN ¹ H da Tobramicina.	50
Figura 20 - Espectro de RMN ¹³ C da Tobramicina.	50
Figura 21 - Curvas TG/DTG/DTA da tobramicina em atmosfera de N ₂ , com vazão de 50 mL min ⁻¹ , razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , porta amostra de α-alumina e massa de amostra de 7,0 mg (± 0,1 mg).	52
Figura 22 - Curvas TG/DTG/DTA da amostra de tobramicina em atmosfera de ar seco, com vazão de 50 mL min ⁻¹ , razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , porta amostra de α-alumina e massa de amostra de 7,0 mg (± 0,1 mg).	52
Figura 23 - Curva DSC da Tobramicina, utilizando ciclos de aquecimento-resfriamento-aquecimento entre -60 °C e 250 °C, em atmosfera de N ₂ (50,0 mL min ⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa e massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg.	55
Figura 24 - Imagens obtidas pela microscopia <i>hot stage</i> em diferentes temperaturas.	56
Figura 25 - Difrátogramas de raios X das amostras de tobramicina coletadas em diferentes temperaturas.	57
Figura 26 - Gráfico de Gram-Schmidt para a decomposição da tobramicina em atmosfera de N ₂	60
Figura 27 - Diagrama tridimensional para a decomposição da Tobramicina em atmosfera de N ₂ , com sinal de absorbância no IV em função do tempo e da temperatura.	61
Figura 28 - Espectros TG-FTIR obtidos para a tobramicina nos tempos de 9,9; 15,8; 29,8; 32,0 e 50,0 minutos, de aquecimento.	62
Figura 29 - Comparação do espectro de infravermelho, na fase gasosa, obtido aos 29,8 minutos (318,2 °C) de análise e aqueles de água, amônia, metanol e dióxido de carbono da base de dados Coblenz S. [43].	63

Figura 30 - Comparação do espectro de infravermelho, na fase gasosa, obtido aos 50,0 minutos (520,2 °C) de análise e aquele do metano da base de dados Coblenz S. [43].	64
Figura 31 - Mecanismo de decomposição térmica proposto para a tobramicina.	66
Figura 32 - Espectro de UV-Vis obtido do sal de cobre e do complexo Cu(II)-tobramicina.	67
Figura 33 - Espectro de infravermelho da Tobramicina e do complexo Cu(II)-tobramicina.	68
Figura 34 - Curvas TG/DTG/DTA do complexo Cu(II)-tobramicina em atmosfera de N ₂ , com vazão de 50 mL min ⁻¹ , razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , porta amostra de α-alumina e massa de amostra de 5,0 mg (± 0,1 mg).	70
Figura 35 - Curvas TG/DTG/DTA do complexo Cu(II)-tobramicina em atmosfera de ar seco, com vazão de 50 mL min ⁻¹ , razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , porta amostra de α-alumina e massa de amostra de 5,0 mg (± 0,1 mg).	70
Figura 36 - Resultado obtido pela análise por EDS do resíduo da análise térmica, indicando os elementos encontrados no composto.	73
Figura 37 - DRX com ângulo rasante do resíduo de decomposição térmica do complexo de Cu-tobramicina obtido pela análise térmica após aquecimento em 1000 °C.	74
Figura 38 - Curva DSC do complexo Cu(II)-tobramicina, em atmosfera de N ₂ (50,0 mL min ⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa e massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg.	76
Figura 39 - Gráfico de Gram-Schmidt para a decomposição do complexo de Cu(II)-tobramicina em atmosfera de N ₂ .	77
Figura 40 - Diagrama tridimensional para a decomposição do complexo Cu-Tobramicina em atmosfera de N ₂ , com sinal de absorbância no IV em função do tempo e da temperatura.	78
Figura 41 - Espectros de FTIR obtidos para os gases evolvidos durante o aquecimento do complexo nos tempos de 12,3; 19,2; 23,3; 25,7; 28,1; 32,9 e 54,5 minutos.	79
Figura 42 - Espectro de infravermelho aos 23,3 minutos (255,5 °C) de análise da amostra, comparado com a base de dados Coblenz S [43].	80
Figura 43 - Espectro de infravermelho aos 28,1 minutos (303,5 °C) de análise da amostra, comparado com a base de dados Coblenz S [43].	81

Figura 44 - Possíveis pontos de coordenação com o metal do fármaco Tobramicina.	82
Figura 45 - Possibilidades de complexos formados em alguns dos sítios ativos do fármaco apresentados anteriormente.....	83
Figura 46 - Estrutura do complexo formado de Cu(II)-Tobramicina, com o metal realizando a) 4 ligações e b) 6 ligações, na qual 2 são moléculas de água coordenadas ao metal.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Atribuição das bandas obtidas no do espectro de FTIR do sulfato de estreptomicina.	34
Tabela 2 - Principais sinais do espectro de RMN de ^{13}C da amostra do sulfato de estreptomicina.	35
Tabela 3 - Dados da análise de TG do sulfato de estreptomicina sob atmosfera de nitrogênio e ar.	38
Tabela 4 - Atribuição das bandas observadas no espectro de FTIR dos gases evoluídos na decomposição térmica do sulfato de estreptomicina.	47
Tabela 5 - Atribuição das bandas obtidas pelo espectro na região do infravermelho da tobramicina.	49
Tabela 6 - Atribuições dos picos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da Tobramicina.	51
Tabela 7 - Dados obtidos a partir das curvas TG/DTG/DTA da tobramicina sob atmosfera de nitrogênio e ar.	54
Tabela 8 - Resumo dos resultados das curvas DSC da Tobramicina sob atmosfera de N_2	56
Tabela 9 - Picos dos difratogramas de raios X para as diferentes formas da amostra de Tobramicina, comparados com as formas polimórficas descritas na literatura, nas referências 14 e 24.	59
Tabela 10 - Proposta de atribuição das bandas do FTIR dos gases evoluídos na decomposição térmica da Tobramicina.	65
Tabela 11 - Tentativa de atribuição das bandas do espectro na região do infravermelho do complexo de Cu(II) -tobramicina.	69
Tabela 12 - Resultados obtidos na análise elementar.	72
Tabela 13 - Resultados experimentais da análise elementar do fármaco Tobramicina e do complexo sintetizado Cu(II) -tobramicina em comparação com os valores calculados, de acordo com os possíveis rendimentos.	72
Tabela 14 - Resultados obtidos por DRX para o resíduo de decomposição térmica do Cu -tobramicina obtido pela análise térmica após aquecimento em $1000\text{ }^\circ\text{C}$, em comparação com a ficha cristalográfica.	74
Tabela 15 - Resultados da análise de TG/DTG/DTA do complexo Cu(II) -tobramicina sob atmosfera de nitrogênio e ar.	75

Tabela 16 - Tentativa de atribuição das bandas do FTIR dos gases evoluídos na decomposição térmica do complexo Cu(II)-Tobramicina.	82
--	-----------

Lista de Abreviaturas e Siglas

C¹³ RMN	–	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
dm/dT	–	Derivada da massa em relação à temperatura
DSC	–	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	–	Análise térmica diferencial
DTG	–	Termogravimetria derivada
EGA	–	Análise de gases evolvidos
FT-IR	–	Espectroscopia de infravermelho
GC-MS	–	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
¹H RMN	–	Ressonância magnética nuclear de um próton
ICTAC	–	Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria
mRNA	–	RNA mensageiro
N₂	–	Nitrogênio
OMCs	–	compostos organometálicos
TBA	–	<i>tert</i> -butanol
TG	–	termogravimetria
TG-FTIR	–	termogravimetria acoplada à espectroscopia na região do infravermelho
TG-MS	–	termogravimetria acoplada à espectrometria de massas
UV-Vis	–	espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-visível
XRD	–	Difração de raios X
β	–	Razão de aquecimento
Δm	–	Perda de massa
ΔT	–	Diferença de temperatura

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Antibióticos	16
1.1.1. Aminoglicosídeos	16
1.2. Fundamentos teóricos	20
1.2.1. Considerações sobre análise térmica	20
1.2.2. Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)	21
1.2.3. Análise Térmica Diferencial (DTA)	21
1.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	22
1.3. Análise térmica dos antibióticos estreptomicina e tobramicina.	22
2. Objetivos	28
3. Parte experimental	29
3.1. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho	29
3.2. Espectroscopia de Ressonância Nuclear de ^{13}C e ^1H	29
3.3. Termogravimetria e termogravimetria derivada	30
3.4. Calorimetria exploratória diferencial	30
3.5. Termogravimetria acoplada à espectroscopia vibracional na região do infravermelho	30
3.6. GC-MS	31
3.7. Microscopia Hot Stage	31
3.8. Difractometria de raios-X	31
3.9. Síntese do metalofármaco Cu(II)-tobramicina	32
3.10. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível	32
3.11. Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X	32
3.12. Análise Elementar	32
4. Resultados e discussão	33
4.1. Caracterização estrutural do sulfato de estreptomicina	33
4.2. Estudos termooanalíticos do sulfato de estreptomicina	36
4.3. Análise dos gases evolvidos do sulfato de estreptomicina	40
4.4. Caracterização estrutural da tobramicina	49
4.5. Estudos termooanalíticos da tobramicina	51
4.6. Análise dos gases evolvidos da Tobramicina	60
4.7. Caracterização estrutural do complexo Cu(II)-tobramicina.	67
4.8. Estudos termooanalíticos do complexo Cu(II)-tobramicina.	69

5. Conclusão	85
Referências Bibliográficas	87

1. Introdução

1.1. Antibióticos

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir e combater microrganismos causadores de infecções no organismo humano [1].

Suas diferentes classes apresentam inúmeras diferenças nas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro antibacteriano e nos mecanismos de ação. Por isso, é necessária uma classificação desses fármacos, sendo a mais comum àquela baseada na estrutura química e mecanismo de ação [1].

Assim, em combinação com os dados farmacocinéticos, os antibióticos podem ser classificados como *bactericidas*, quando causam a morte da bactéria, ou *bacteriostáticos*, quando promovem a inibição do crescimento microbiano, sem necessariamente causarem sua morte [2].

O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928. A atividade da penicilina era superior à das sulfas e a demonstração que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou pesquisas de novos antibióticos, especialmente em culturas de fungos e actinobactérias [3].

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclínas, **aminoglicosídeos**¹, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas [1].

1.1.1. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são agentes antimicrobianos usados frequentemente no tratamento de doenças em seres humanos e animais. São caracterizados pela presença de um anel aminociclitol, um hidroxíciclohexano amino substituído ligado a dois ou a mais aminoaçúcares por ligações glicosídicas [4].

¹ Objeto desse estudo.

Os antibióticos desta classe são: amicacina, apramicina, arbecacina, canamicina, **estreptomicina**², antraciclinas, neomicina, **tobramicina**², paromomicina, gentamicina, netilmicina e isepamicina [4].

Os aminoglicosídeos são comercializados na forma de base livre ou como um sal e possuem natureza extremamente higroscópica [5]. São compostos altamente polares e apresentam atividade melhorada em meios levemente alcalinos, com pH próximo de 7,4; quando estão positivamente carregados, facilitando a transposição da parede celular em bactérias [1-6].

Os medicamentos desta classe atuam como bactericidas por se ligarem especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo seu movimento ao longo do mRNA e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas [6]. O uso contínuo de antibióticos aminoglicosídeos deve ser cuidadosamente controlado, pois estes princípios ativos apresentam elevada nefrotoxicidade e ototoxicidade [1].

Na medicina veterinária, os aminoglicosídeos são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas, como por exemplo, enterites e mastites, sendo também adicionados aos alimentos oferecidos aos animais para a prevenção de doenças e para promover o seu crescimento. Os mais comumente utilizados são a gentamicina, neomicina e estreptomicina [7].

No presente trabalho, os aminoglicosídeos escolhidos para estudo foram à estreptomicina e a tobramicina, pelo fato de serem alguns dos ativos mais utilizados dessa classe e devido ao número reduzido de estudos termoanalíticos, notadamente estudos de gases envolvidos, encontrados na literatura.

1.1.1.1. *Estreptomicina*

A estreptomicina, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 1, foi o primeiro aminoglicosídeo a ser descoberto, em 1943, e o primeiro agente específico ativo no tratamento da tuberculose e infecções por bactérias *Gram*-negativas [7].

² Objetos desse estudo.

Figura 1 - Fórmula estrutural da estreptomicina.

A estreptomicina é uma molécula tricíclica tribásica composta por carboidratos, que consistem em estreptidina (1,3-diguanina-2,4,6-tetrahidroxiciclohexano), estreptose (5-desoxi-3-C-formilhexose) e uma N-metil-L-glicosamina, ligados por ligações glicosídicas. Os dois grupos guanidínicos presentes são fortemente básicos e ativos [1].

Obtida a partir do fungo *Streptomyces griseus*, é um antibiótico bactericida de espectro restrito e o membro mais conhecido da família dos aminoglicosídeos [8]. É solúvel em água e atua inibindo a síntese proteica de bactérias, por se ligar à subunidade 30S dos ribossomos, causando um erro na tradução [8].

Atualmente, é utilizada também em combinação com outros fármacos [8], como por exemplo, pelo seu sinergismo com a penicilina, sendo administradas em conjunto [9].

1.1.1.2. Tobramicina

A tobramicina, outro antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 2, foi isolada pela primeira vez por Eli Lilly em 1967 [4].

Figura 2 - Fórmula estrutural da Tobramicina.

Dentre suas características, é altamente solúvel em água, praticamente insolúvel em clorofórmio, higroscópica e estável por longos períodos em soluções com valores de pH entre 1-11 e temperatura entre 5-37 °C [4;10]. Sendo um antibiótico ativo contra muitas bactérias *Gram*-negativas e *Gram*-positivas aeróbias, tem sido incorporada em implantes ortopédicos utilizados para o tratamento de osteomielite [11].

Para o tratamento dessa doença, novas pesquisas têm utilizado polímeros com tobramicina como veículos para melhorar sua atividade [12]. Outros estudos promissores mostram resultados contra a *Pseudomonas aeruginosa* no tratamento de infecções pulmonares [4] e, atualmente, é comercializado na forma de colírio para o tratamento de conjuntivites bacterianas.

De acordo com a literatura, a disposição das moléculas de alguns aminoglicosídeos, como é o caso da tobramicina, pode determinar seu estado sólido, podendo existir no estado cristalino, com frações amorfas, completamente amorfas ou ainda como hidratos [4]. Está comercialmente disponível como uma base livre cristalina, monohidratada, di-hidratada ou tri-hidratada, além de existir na forma de sal (sulfato de tobramicina) [13].

A tobramicina, na forma de base livre, pode existir como sólido cristalino em quatro formas, sendo duas anidras e uma monohidratada. A quarta forma, a tobramicina amorfa, pode ser preparada através de técnicas como a de “*spray drying*” [14].

1.2. Fundamentos teóricos

1.2.1. Considerações sobre análise térmica

A definição traduzida de análise térmica, aprovada em 2006, pelo Conselho da Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC) é:

“Análise térmica é o estudo da relação entre uma propriedade da amostra e sua temperatura, enquanto a amostra é aquecida ou resfriada de maneira controlada”
[15] (tradução livre, da autora).

Dentre as técnicas termoanalíticas mais conhecidas, tem-se a termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise térmica diferencial (DTA). Essas técnicas necessitam de complementação entre si e outras técnicas analíticas para interpretação mais completa de seus resultados, pois são essencialmente quantitativas [16].

As técnicas complementares, como difração de raios X (DRX), espectroscopia vibracional na região do infravermelho, de massas, dentre outras, são utilizadas para uma melhor interpretação de fenômenos de maior complexidade [17-18], como, por exemplo, o polimorfismo e na caracterização de intermediários formados entre as etapas da degradação térmica. Há também a possibilidade do uso de técnicas termoanalíticas acopladas a técnicas capazes de promover a identificação de produtos voláteis, por exemplo, termogravimetria acoplada à espectrometria de massas (TG-MS) ou à espectroscopia vibracional na região do infravermelho, com transformada de Fourier (TG-FTIR).

A análise térmica pode ser utilizada no controle de matéria-prima e produto acabado, pois apresenta potencialidades para ser utilizada no desenvolvimento e caracterização de novos produtos e na avaliação dos processos produtivos, podendo auxiliar na predição do prazo de validade dos produtos [19]. Além disso, pode fornecer informações importantes para o descarte ou incineração do material.

Algumas considerações sobre as técnicas termoanalíticas a serem utilizadas nesse trabalho são descritas a seguir.

a) Identificação e caracterização: determinação do ponto de fusão, mudanças de fase, identificação baseada na fusão, transições vítreas e conteúdo de umidade e controle de qualidade;

b) Estabilidade: Decomposição térmica, análise cinética de decomposição, identificação baseada na fusão e estabilidade de hidratos e solvatos;

c) Polimorfismo e pseudo-polimorfismo;

d) Pureza;

e) Diagramas de fase;

f) Quantificação e detecção [20].

A seguir são apresentadas algumas considerações sobre as técnicas termoanalíticas a serem utilizadas nesse trabalho:

1.2.2. Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

A Termogravimetria (TG) é uma técnica termoanalítica na qual a variação da massa é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura.

Esta técnica possibilita conhecer as alterações que a variação de temperatura pode provocar na massa dos materiais e, assim, estabelecer a faixa de temperatura em que os materiais começam a se decompor (estabilidade térmica) e, também, acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras [18].

A Termogravimetria Derivada (DTG) representa a variação de massa em relação a tempo ou temperatura (dm/dt ou dm/dT), expressa em função da temperatura ou tempo, sendo esta nada mais que um tratamento matemático dos dados obtidos na TG. Essa curva permite avaliar o início e fim dos eventos de perda de massa com maior resolução [16].

1.2.3. Análise Térmica Diferencial (DTA)

A Análise Térmica Diferencial (DTA) é uma técnica pela qual a diferença de temperatura entre a substância e um material de referência, termicamente estável, é medida em função da temperatura da referência, enquanto ambos são submetidos a

uma programação controlada de temperatura. Os picos obtidos são característicos de eventos exotérmicos e endotérmicos [18].

1.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) mede a diferença de energia entre uma substância e um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, quando ambas são submetidas a uma programação de temperatura controlada.

Essa técnica permite avaliar as variações de entalpia que ocorrem durante um processo físico ou químico gerando dados quantitativos de mudanças de estado físico, transições de fase e reações de desidratação oxirredução, decomposição, entre outras, mesmo na ausência de variação de massa [18].

1.3. Análise térmica dos antibióticos estreptomicina e tobramicina.

São vários os estudos que podem ser desenvolvidos para os fármacos utilizando técnicas termoanalíticas, como, por exemplo, aqueles referentes à determinação da estabilidade térmica, compatibilidade fármaco-excipiente, cinética de reação, controle de qualidade, caracterização de polímeros, mudanças de estado, diagrama de fases, determinação quantitativa, determinação de pureza, entre outros [18].

Alguns dos trabalhos sobre aminoglicosídeos, que envolvem técnicas termoanalíticas, em conjunto ou não com outras técnicas são descritos brevemente a seguir.

PAWAR *et al*, em 2013, publicaram um trabalho que descreve a preparação, otimização e caracterização de filmes de curativos contendo goma carragena carregados com diclofenaco de sódio e sulfato de estreptomicina. As técnicas DSC e DRX mostraram caráter amorfo desses sais, sugerindo dispersão molecular de ambos os fármacos, além da interação medicamentosa com íons sulfato, carregados negativamente [21].

HUSSEIN-AL-ALIDO *et al*. apresentaram, em 2014, um estudo em que descrevem a preparação, caracterização e liberação controlada da estreptomicina incorporada em nanopartículas de quitosana para melhorar o tratamento de

infecções bacterianas. O estudo termoanalítico apresentado foi de suma importância para conhecer a estabilidade térmica do material e a perda de água devido ao aquecimento [22].

Em 2010, OSZLÁNCZIA *et al.* publicaram um trabalho sobre a influência de antibióticos aminoglicosídicos no comportamento térmico e estrutural de modelos de membranas fosfolipídicas sintéticas. A tobramicina e estreptomicina diminuíram a energia dos sistemas e induziam a formação de combinações de camadas [23].

DASH e SURYANARAYANAN, em 1991, utilizaram as técnicas termoanalíticas TG e DSC para estudar amostras de Tobramicina obtidas de duas fontes, focando-se na desidratação da molécula e as possíveis formas polimórficas. As amostras foram submetidas à análise por difração de raios X, análise térmica e titulometria de Karl Fischer. Através do DRX, foram identificados dois polimorfos, cuja solubilidade foi estudada utilizando técnicas cromatográficas [24]. A análise térmica foi realizada até 250 °C, não sendo realizadas análises utilizando DSC subambiente, nem medidas de caracterização dos gases envolvidos durante o aquecimento, tampouco se buscou caracterizar os intermediários de reação. Os resultados em relação ao polimorfismo divergem de fontes mais atuais [14], em que se descrevem a existência de quatro formas polimórficas, enquanto neste artigo são descritas apenas três formas.

PILCER *et al.*, em 2013, descreveram um trabalho onde a tobramicina foi seca por pulverização a diferentes temperaturas a fim de obter formulações de pó seco para inalação. Os pós foram caracterizados e estudou-se o desempenho do aerossol. Os resultados indicam que essas novas formulações livres de transportadores fornecem uma alternativa atraente para o fornecimento de altas doses de antibióticos diretamente ao local da infecção, minimizando a distribuição sistêmica [25].

WITTAYA-AREEKUL *et al.*, em 2002, realizaram um estudo no qual um sistema de solvente *terc*-butanol (TBA) e água verificou-se ser um meio útil para a produção de sulfato de tobramicina, que foi analisado termicamente por DSC. O método foi otimizado a fim de obter um menor nível de solvente residual no sal de tobramicina [13].

A patente de nº US9186817B2 se refere ao método de preparo por ‘*spray drying*’ do sulfato de tobramicina e suas propriedades térmicas. As curvas TG e DTG

são mostradas, sendo apenas evidenciados os picos exotérmicos e endotérmicos, sem maiores descrições [26].

Como se pode ver pelos poucos trabalhos apresentados, há um número relativamente pequeno de estudos termoanalíticos a respeito dos fármacos estreptomicina e tobramicina. Estes estudos apresentam-se, muitas vezes, como meras descrições para complementar outros estudos, sem aprofundamento da discussão de seus resultados termoanalíticos, principalmente sobre o comportamento térmico desses antibióticos.

A importância do uso dos antibióticos, o crescente aumento do número de fabricantes, o advento dos medicamentos genéricos no Brasil, suas formas de controle e métodos de produção no que diz respeito à saúde pública, enquanto as medidas preventivas não medicamentosas são falhas, justificam estudos que contribuam para o entendimento de suas características, a estabilidade térmica do material e a necessidade de métodos de controle de qualidade e durabilidade e eventuais processos de remediação ambiental, inclusive incineração.

Assim, este projeto visa oferecer informações sobre a estabilidade térmica desses fármacos envolvendo sua degradação térmica que possam contribuir para o entendimento desses compostos, sendo de fundamental importância para estudos de remediação ambiental e entendimento da degradação, além de alternativas para o controle de qualidade desses fármacos.

1.4. Polimorfismo

A administração de fármacos ocorre, principalmente, por meio de formas sólidas, portanto a forma cristalina do fármaco assume grande importância no processo de formulação de novos medicamentos e na fabricação daqueles já em comercialização, principalmente no que se refere à sua relacionada à biodisponibilidade, quando sob utilização pelo paciente.

Dentre as características físico-químicas dos fármacos na forma sólida está o **polimorfismo** que é a habilidade de um sólido existir em duas ou mais formas cristalinas com diferentes conformações moleculares, podendo existir na forma de solvatos, hidratos, sais, cocristais e amorfos [27].

A ocorrência de formas polimórficas é relativamente comum, e pode ser resultado direto do processo de síntese e cristalização do fármaco, do processo de

fabricação da forma farmacêutica, podendo afetar a qualidade e a biodisponibilidade do fármaco. Desta forma, no âmbito farmacêutico, é de fundamental importância entender esse fenômeno, identificar o(s) polimorfo(s) possível e controlar a síntese, tanto na fase de desenvolvimento do produto como durante o período de comercialização, quando apenas um dos polimorfos é desejado [28].

Dentre as técnicas utilizadas para identificar a presença de polimorfos estão a determinação de ponto de fusão, espectro de infravermelho, difração de raios X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), ressonância magnética nuclear (RMN), entre outras [27].

Entre os aminoglicosídeos escolhidos para o trabalho, de acordo com a literatura, apenas a Tobramicina pode apresentar polimorfismo. No estudo de DASH e SURYANARAYANAN, de 1991, concluiu-se que a tobramicina estudada era monohidratada, e, quando aquecida no DSC fundiu e se recristalizou em uma forma anidra metastável, que volta a fundir em 217 °C. A diferença de energia livre entre elas foi calculada, observando que, tanto a velocidade de aquecimento no DSC quanto à quantidade de amostra utilizada influenciou significativamente nos valores de entalpia referentes aos eventos térmicos. Estas observações foram atribuídas à presença de umidade na amostra [24].

Enquanto DASH e SURYANARAYANAN [24], em 1991, observaram duas formas polimórficas em seu trabalho, o relatório de avaliação da Tobramicina da Agência Nacional Europeia [14] cita que a tobramicina possui quatro formas polimórficas, podendo ser duas anidras, uma monohidratada e uma amorfa.

1.5. Metalofármacos

Atualmente, há um grande interesse no estudo de complexos metálicos, tendo em vista suas potencialidades no uso farmacêutico, na forma dos metalofármacos ou como agentes de diagnóstico, além da necessidade de se compreender os mecanismos de ação farmacêutica em nível molecular [29].

Desde a descoberta do efeito inibidor da cisplatina, em 1969, sobre a multiplicação das células e de sua aplicação na quimioterapia para o tratamento do câncer, houve um aumento no interesse científico em desenvolver novos fármacos com íons metálicos em sua composição [29].

Há diversas vantagens em se utilizar íons metálicos para o desenvolvimento ou modificação de fármacos, como a variedade de coordenação e geometrias, acessibilidade a diferentes estados de óxido-redução, características termodinâmicas e cinéticas particulares, bem como as propriedades intrínsecas dos cátions metálicos e seus ligantes que, por vezes, são significativamente alteradas, quando o complexo metálico é formado [30].

Complexos inorgânicos de diversos íons metálicos exibem grande potencialidade como agentes antitumorais, antibacterianos, anti-inflamatórios, agentes terapêuticos e de diagnóstico. Devido a isso, complexos de íons metálicos como $\text{Fe}^{2+/3+}$, Sb^{5+} , V^{5+} , $\text{Co}^{2+/3+}$, $\text{Cr}^{2+/3+}$, Mn^{2+} , Al^{3+} , Bi^{3+} e lantanídeos, com fármacos vêm sendo utilizados na medicina e novos complexos têm sido sintetizados e investigados com maior interesse ao longo dos últimos anos [31].

Estudos envolvendo complexos de íons metálicos com os aminoglicosídeos objetos de estudo dessa dissertação, são citados nos trabalhos a seguir. Neles, a análise térmica foi utilizada como uma ferramenta de caracterização.

MISHRA publicou dois trabalhos em 2010 e 2012, nos quais sintetiza compostos de coordenação de estreptomicina com Co (II) , Ni (II) , Cu(II) , Fe(II) , entre outros, utilizando técnicas como espectroscopia de ^1H RMN, análise térmica, difratometria de raios X e análise elementar na sua caracterização. Parâmetros cinéticos de decomposição térmica em fase sólida foram calculados utilizando técnicas termoanalíticas e o método de Coats-Redfern, indicando uma cinética de primeira ordem. Os autores apresentaram as perdas de massa, os dados cristalográficos e a atividade biológica de cada complexo, obtendo resultados promissores, com maior potencial antibiótico [32- 33].

RAJIV e RAJNI apresentaram, em 2011, um trabalho em que utilizaram a estreptomicina para preparar complexos metálicos orgânicos (OMCs), após reações com ZnCl_2 , CdCl_2 e PbCl_2 . Os produtos foram caracterizados por análise elementar, ^1H e ^{13}C RMN, espectroscopia de massas, análise térmica (TG e DTA) e difração de raios X. Indicando assim, a cinética de decomposição de primeira ordem e os modelos moleculares foram otimizados por cálculos teóricos. Os sítios de ligação dos metais na estreptomicina foram determinados por meio do modelo da superfície acessível ao solvente. As geometrias e moléculas em três dimensões foram apresentadas [34].

PATWARDHAN e COWAN publicaram em 2011 um trabalho que demonstra como a presença de múltiplos grupos hidroxila e amina em múltiplos anéis criam sítios potenciais de coordenação de cobre, porém nem todos efetivamente estabelecem coordenação. O trabalho apresenta estudos sobre a caracterização estrutural de complexos metálicos com os aminoglicosídeos, em que uma das técnicas utilizadas é a espectroscopia de UV-Vis [35].

JEZOWSKA-BOJCZUK *et al.*, em 1998, estudaram os equilíbrios e a complexação entre o Cu(II) e a tobramicina utilizando várias técnicas analíticas. Encontraram uma variedade de complexos mononucleares de uma fórmula geral CuH_nL , com “n” entre 3 e 2. As suas características foram comparadas à da Canamicina B, outro antibiótico da classe dos aminoglicosídeos [36].

SEKAR *et al.*, em 2013, descreveu a análise de espectrometria de massas por ionização por *eletrospray* do complexo de tobramicina com Cu(II) e Fe(III). Esse método mostrou ser simples, preciso e reproduzível para identificação desses complexos [37].

GZIUT *et al.*, em 2013, publicaram um trabalho que demonstra a potencial atividade anti-inflamatória do complexo Cu(II)-tobramicina, além da atividade bactericida, sendo melhor que do fármaco puro [38].

No trabalho de KOZŁOWSKI, H. *et al.* publicado em 2005, identifica os grupos amino dos aminoglicosídeos como sítios de coordenação muito eficientes para íons Cu^{2+} e demonstra que essa coordenação pode alterar os efeitos farmacológicos no corpo humano [39].

No presente trabalho, o interesse de complexar cobre ao fármaco tobramicina se deve às propriedades biológicas do cobre e considerando o fato de que drogas administradas na forma de complexos podem apresentar uma maior atividade biológica em relação às substâncias orgânicas livres, como apresentado no trabalho de GZIUT *et al.* [38], em que o complexo de Cu(II)-tobramicina tem uma alta atividade anti-inflamatória, mas não apresentam sua estabilidade térmica.

2. Objetivos

Estudar o comportamento e o mecanismo de decomposição térmica da estreptomicina e da tobramicina, dois antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, utilizando as técnicas termoanalíticas TG, DSC e TG-FTIR e, com base nestas informações, propor um mecanismo para o comportamento térmico desses antibióticos.

Sintetizar, caracterizar e estudar o comportamento térmico do metalofármaco Cu(II)-tobramicina, que possui alta atividade anti-inflamatória, e poderá ser comparado com o fármaco puro em relação a sua estabilidade térmica, polimorfismo e os gases envolvidos durante a decomposição, utilizando as técnicas termoanalíticas citadas acima.

3. *Parte experimental*

A amostras dos fármacos em estudo foram adquiridos da Sigma Aldrich®, sendo o sulfato de estreptomicina com ≥ 720 IU mg^{-1} e a tobramicina, um padrão farmacêutico secundário. Para caracterização dos fármacos foram utilizadas técnicas espectroscópicas. Ambos foram utilizados nos estudos termoanalíticos sem tratamento prévio.

3.1. *Espectroscopia vibracional na região do infravermelho*

Os espectros de infravermelho do sulfato de estreptomicina e da tobramicina foram obtidos em um Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier, IRAffinity 1 da marca Shimadzu. As amostras sólidas foram preparadas na forma de pastilhas com brometo de potássio, previamente seco em estufa. Para tanto, 80 mg de KBr e 4 mg da amostra, foram pesadas, trituradas em almofariz de agatha e prensadas em uma prensa manual. No caso da Tobramicina, que apresenta alta higroscopicidade, foi necessária uma secagem prévia da amostra em uma estufa à vácuo da Nova Ética, a temperatura de 40 °C durante 12 horas, previamente ao preparo das pastilhas.

Para caracterização do complexo de cobre, utilizou-se um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier da marca Bomem e modelo MB-102. As amostras foram preparadas de forma semelhante às bases livres

3.2. *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H*

Para a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizado um espectrômetro de ressonância magnética nuclear da marca Agilent Technologies e moledor 500/54 premium shielded. Para a aquisição dos espectros, foram preparadas soluções contendo em torno de 6 mg de antibiótico em 600 μL de água deuterada.

3.3. Termogravimetria e termogravimetria derivada

As curvas TG/DTG foram obtidas em um módulo simultâneo TG-DTA Q600, controlado pelo programa Thermal Advantage for Q Series® V4.5a, ambos da TA Instruments. As medidas foram realizadas em atmosfera dinâmica de ar seco ou nitrogênio, 10 °C min⁻¹, com uma vazão de 50,0 mL min⁻¹ e intervalo de temperatura de aproximadamente 25 a 1000 °C. Os suportes de amostra e referência utilizados foram de α -alumina, com massa de 7,0 mg ($\pm$ 0,1 mg) para o sulfato de estreptomicina e a tobramicina e para o complexo foi utilizado 5,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

3.4. Calorimetria exploratória diferencial

As curvas DSC foram obtidas em um módulo calorimétrico DSC Q10, com acessório de resfriamento “*Refrigerating Cooling System (RCS)*”, gerenciado pelo *software* Thermal Advantage for Q Series®, ambos da TA Instruments. A razão de aquecimento utilizada foi de 10 °C min⁻¹, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50,0 mL min⁻¹), sendo o suporte de amostra em alumínio fechado com orifício central na tampa ($\varnothing$ =0,7 mm) e massa da amostra de aproximadamente 5,0 mg. O intervalo de temperatura da análise variou de -40 até 195 °C para estreptomicina e de -40 até 250 °C para a tobramicina. As curvas foram obtidas no modo aquecimento-resfriamento-aquecimento.

3.5. Termogravimetria acoplada à espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Para a caracterização dos produtos voláteis de decomposição térmica utilizou-se o módulo SDT- Q600 acoplado ao espectrofotômetro Nicolet iS10 FTIR. A linha de transferência consistiu de um tubo de aço inoxidável de 1200 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno, aquecida à temperatura constante de 225 °C. A cela do compartimento do detector DTGS foi aquecida a 250 °C. As amostras foram obtidas com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio, na vazão de 50 mL min⁻¹ e com massa de amostra aproximadamente 15,0 mg.

3.6. GC-MS

Para o sulfato de estreptomicina, os intermediários da degradação térmica foram obtidos pelo aquecimento prévio da amostra até 210 e 235 °C e analisados em um sistema de cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas da Schimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra, com temperatura da interface de 300 °C, fluxo de gás nitrogênio de 1,8 mL min⁻¹ e coluna de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e mantida a 300 °C.

3.7. *Microscopia hot stage*

As análises de microscopia *Hot Stage* foram realizadas para o fármaco tobramicina utilizando o equipamento Mettler HS82 acoplado a um microscópio ótico Olympus BX51 equipado com uma câmera digital Olympus SC30. A amostra foi aquecida em uma condição de 10 °C min⁻¹ até uma temperatura inicial de aproximadamente 120 °C e, em seguida, a 3 °C min⁻¹ até 240 °C.

3.8. *Difratometria de raios X*

Para investigação do polimorfismo da tobramicina utilizou-se um equipamento Rigaku Rotaflex, modelo RU200B. As medidas foram realizadas no intervalo de 2 θ , 5° a 60°, com varredura normal de passo de 0.02° s⁻¹, velocidade de 0,5° min⁻¹, tensão de 40 kV e 60 mA e ânodo de Cu.

Além disso, também foram feitas medidas do resíduo de decomposição do complexo de cobre com tobramicina, usando um equipamento Siemens D-5000, utilizando a radiação de cobre (K_{α} = 1,5406 angstrom), passo de varredura de 0,03° s⁻¹ em uma região de 2 θ entre 15° e 75°. Os difratogramas obtidos foram comparados com os padrões do arquivo JCPDS (45-0937) (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) do banco de dados MDI Jade 5.0 [40] para o CuO.

3.9. Síntese do metalofármaco Cu(II)-tobramicina

A síntese do metalofármaco Cu(II)-tobramicina foi realizada seguindo o método descrito por SREEDHARA, FREED e COWAN [42] para complexação de Cu^{2+} com a kanamicina, também utilizado no trabalho de GZIUT *et. al.* [38]. Resumidamente, quantidades equimolares de tobramicina (0,1 mmol, 46,75 mg) e sulfato de cobre pentahidratado (0,1 mmol, 24,97 mg) foram solubilizados em 10 mL de água. Em seguida, a solução de sulfato de cobre foi adicionada à solução do fármaco e mantidos sob agitação durante 24 horas, resultando em uma solução azul. Para precipitação, foram adicionados 5 mL de etanol e o precipitado formado foi filtrado e lavado em etanol durante 6 horas sob agitação. Em seguida, foi armazenado em dessecador até secagem completa.

3.10. Espectroscopia na região do ultravioleta-visível

As medidas por UV-Visível do complexo de Cu(II)-tobramicina e do sulfato de cobre(II) pentahidratado foram realizadas em um espectrofotômetro da marca Jasco, modelo V-630.

3.11. Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X

A caracterização do resíduo do complexo de cobre(II) com tobramicina obtido da curva TG/DTG/DTA foi feita usando um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Leo, modelo 440.

3.12. Análise Elementar

Os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foram determinados utilizando um equipamento do tipo CHNS-O, modelo EA 1180 (Fison's).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização estrutural do sulfato de estreptomicina

Com o intuito de caracterizar o sulfato de estreptomicina foram realizadas medidas espectroscópicas de FTIR e RMN de ^{13}C .

O espectro FTIR obtido, Figura 3, apresentou bandas referentes ao fármaco analisado que concordam com o proposto por PESTANA E BALADAN [42]. As principais atribuições das bandas do espectro são apresentadas na Tabela 1.

Figura 3 – Espectro FTIR para o fármaco sulfato de estreptomicina.

Tabela 1 - Atribuição das bandas obtidas no do espectro de FTIR do sulfato de estreptomicina.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3500 – 3100	Deformação axial de O-H (a,f*) e deformação axial N-H (a,f*)
2960 e 2926	Deformação axial C-H em CH ₃ e CH ₂ (m*)
1674	Deformação axial C=O de aldeído (f*)
1620	Deformação no plano N-H (m*)
1389	Deformação angular do C-H de aldeído (m*)
1100	Deformação axial simétrica de C-O-C (f*)
610	Deformação de ligações C-H (m*)

*(a) = amplo; (m) = intensidade média; (f) = intensidade forte.

A caracterização do fármaco também foi realizada por ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C), cujo espectro é apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Espectro de RMN ¹³C do sulfato de estreptomicina.

Os picos obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C estão apresentados na Tabela 2 e estão em concordância com o apresentado por PESTANA e BALADAN [42], para o sulfato de estreptomicina.

Tabela 2 - Principais sinais do espectro de RMN de ^{13}C da amostra do sulfato de estreptomicina.

Posição	^{13}C (δ/ppm)	
	Experimental	Literatura [42]
1	157,6	158,5
2	60,3	60,0
3	73,2	74,4
4	60,0	59,6
5	158,1	159,1
6	73,0	74,0
7	71,4	71,8
8	78,0	79,1
9	105,8	106,9
10	77,5	78,5
11	84,1	85,5
12	89,2	90,5
13	82,2	83,3
14	12,3	13,8
15	94,2	95,5
16	61,3	61,6
17	32,0	33,5
18	69,4	70,8
19	69,1	70,6
20	72,8	72,7
21	61,3	62,6

Os resultados da caracterização espectroscópica sugerem que a amostra de sulfato de estreptomicina, apresenta elevado grau de pureza para o fármaco.

4.2. Estudos termoanalíticos do sulfato de estreptomicina

O comportamento térmico do sulfato de estreptomicina foi estudado utilizando TG/DTG/DTA, DSC e a análise dos gases evoluídos por TG-FTIR. Os intermediários de decomposição foram analisados por GC-MS. Todos esses resultados foram combinados visando propor um mecanismo de decomposição térmica.

As curvas TG/DTG apresentaram perfis de perda de massa com três eventos em atmosfera de N₂ e quatro em ar, que podem ser observados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. O evento adicional observado em ar foi atribuído à queima do material carbonizado.

Figura 5 - Curvas TG(preta)/DTG(azul)/DTA(vermelha) do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N₂, com vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, porta amostra de α -alumina e massa de amostra de 7,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

Figura 6 - Curvas TG(preto)/DTG(azul)/DTA(vermelho) do sulfato de estreptomicina em atmosfera de ar seco, com vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, porta amostra de α -alumina e massa de amostra de 7,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

Em atmosfera de N₂, a primeira etapa de perda de massa refere-se à saída de 3,5 moléculas de água de acordo com cálculos estequiométricos (TG: 8,2%, calc.: 8,4%),. Segundo as curvas DTG, essa desidratação se deu, na verdade, em dois eventos consecutivos. No primeiro deles, a perda foi de 2,4% (2,5% calc.), referente à saída de 1,5 moléculas de água e ocorreu entre 25 e 60,1 °C.

O segundo ocorreu entre 60,1 e 153,5 °C, com perda de 5,8% (5,9% calc.), equivalentes à saída de 2,5 moléculas de água.

Na segunda etapa de perda de massa, entre 153,2 e 235,8 °C, os cálculos estequiométricos sugerem a saída de quatro moléculas de amônia, (TG: 8,7%, calc.: 8,5%).

A terceira etapa corresponde à liberação dos gases identificados pelo TG-FTIR, que serão descritos na sessão referente à análise de gases evoluídos.

Sob atmosfera de ar, observaram-se eventos semelhantes aos descritos acima e os resultados quantitativos obtidos em ambos os casos são sumarizados na Tabela 3, na qual se inclui uma tentativa de atribuição de cada etapa. Ali são apresentados intervalos de temperatura, perdas de massa calculadas e experimentais e temperaturas dos picos DTA.

Tabela 3 - Dados da análise de TG do sulfato de estreptomicina sob atmosfera de nitrogênio e ar.

Descrição do evento / atmosfera	ΔT(°C)	TG		DTA
		Perda de massa (%)		T _{pico} (°C)
		Exp.	Calc.	
Nitrogênio				
C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂ . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) → C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O _{10,5} . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) + 1,0 H ₂ O _(g)	25,0 – 60,1	2,4	2,5	48,8 ^b
C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O _{10,5} . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) → C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₈ . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) + 2,5 H ₂ O _(g)	60,1 – 153,5	5,8	5,9	89,7 ^b
C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₈ . 1,5 H ₂ SO _{4(s)} → C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₈ . 1,5 H ₂ SO _{4(s)} + 4 NH _{3(g)}	153,5 – 235,8	8,7	8,5	-
C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₈ . 1,5 H ₂ SO _{4(s)} → C ₁₇ H ₁₄ O _{7(s)} + CO ₂ (g) + SO _{2(g)} + HNCO _(g) + HCN _(g)	235,8 – 1000	58,6	82,5 ^a	-
resíduo	-	24,5		-
Ar				
C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂ . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) → C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O _{10,5} . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) + 1,5 H ₂ O _(g)	25,0 – 61,2	2,5	2,5	35,0 ^b
C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O _{10,5} . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) → C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₈ . 1,5 H ₂ SO ₄ (s) + 2,5 H ₂ O _(g)	61,2 – 152,5	5,7	5,9	94,7 ^b
C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₈ . 1,5 H ₂ SO _{4(s)} → C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₈ . 1,5 H ₂ SO _{4(s)} + 4 NH _{3(g)}	152,5 – 238,6	8,9	8,5	-
C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₈ . 1,5 H ₂ SO _{4(s)} → C ₁₇ H ₁₄ O _{7(s)} + CO ₂ (g) + SO ₂ (g) + HNCO _(g) + HCN _(g)	238,6 – 370,0	38,6	82,5 ^a	-
queima do material carbonizado	370,0 – 733,9	43,9		374,2 ^c
resíduo	-	0,0		

^a soma da perda de massa e do resíduo, ^b pico exotérmico, ^c pico endotérmico.

A curva DSC do sulfato de estreptomicina, apresentada na Figura 7, foi obtida em ciclos de aquecimento e resfriamento (*heat-cool-heat cycles*) em temperaturas entre -60 e 150 °C. Não foi observada a fusão da amostra, confirmando as informações da literatura de que se trata de um fármaco amorfo [5].

Figura 7 - Curva DSC do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa e massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg.

Para integração da curva do 1º aquecimento, foi necessária repetir a análise até uma temperatura de 195 °C, como observado na Figura 8. A variação de entalpia do evento endotérmico relacionado com a perda de água, observado entre 25,5 e 195 °C, para definição adequada da linha base.

Figura 8 - Curva DSC do 1º aquecimento do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹) com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa, massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg entre o intervalo entre 0 e 195 °C.

Neste intervalo de temperatura (linha vermelha do gráfico), o primeiro ciclo de aquecimento revelou um evento endotérmico relacionado com a perda de água entre 25,8 e 168,6 °C, com uma variação de entalpia de $\Delta H = 216,1 \text{ J g}^{-1}$.

4.3. *Análise dos gases evolidos do sulfato de estreptomicina*

A identificação dos voláteis gerados pela decomposição térmica da estreptomicina, na forma de sulfato, foi realizada por termogravimetria acoplada à espectroscopia na região do infravermelho (TG-FTIR). As bases de dados COBLENZ S. [43] e EPA Vapor Phase [44] foram utilizadas para caracterização desses voláteis.

A evolução dos voláteis pode ser visualizada pelo gráfico de Gram-Schmidt apresentado na Figura 9. Em 3D, na Figura 10, apresenta-se o gráfico que relaciona a intensidade do sinal em função do tempo de análise e temperatura. O máximo de detecção dos gases provenientes da decomposição do fármaco ocorreu aos 33,2 minutos de análise, correspondendo a 339 °C.

Figura 9 - Gráfico de Gram-Schmidt para a decomposição do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N_2 .

Figura 10- Diagrama tridimensional para a decomposição do sulfato de estreptomicina em atmosfera de N_2 , com sinal de absorbância no IV em função do tempo e da temperatura.

Na Figura 11 é possível observar uma comparação da evolução espectral ao longo do tempo.

Figura 11 - Espectros de FTIR do sulfato de estreptomicina obtidos nos tempos de 21,0; 24,7; 29,0; 32,0; 33,0; 43,0; 50,0 e 58,0 minutos, de aquecimento no TG.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Durante toda a análise, foram observadas bandas características de água na região de 400 a 550 cm^{-1} , 1250 a 1800 cm^{-1} e entre 3500 e 4000 cm^{-1} , confirmando a desidratação na primeira etapa de decomposição, observada na curva TG.

Os sinais referentes à amônia, em 931,8; 966,1 e 3334,6 cm^{-1} puderam ser detectados a partir de 23,6 minutos (253,1 $^{\circ}\text{C}$) e continuarem presentes nos espectros até 81,9 minutos de análise (836,1 $^{\circ}\text{C}$).

Na Figura 12 são apresentados os espectros de infravermelho, em fase gasosa, obtidos aos 24,7 minutos de análise, assim como os espectros de água e amônia obtidos da base de dados COBLENZ S. [43], para comparação.

Figura 12 - Comparação do espectro de infravermelho, na fase gasosa, obtido aos 24,7 minutos (264,1 $^{\circ}\text{C}$) de análise e aqueles de água e amônia (indicado pela linha tracejada azul) da base de dados Coblenz S. [43].

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Em seguida, no espectro obtido aos 24,6 minutos (263,1 $^{\circ}\text{C}$), surgiram bandas características de dióxido de carbono, em 2357,8 e 2380,2 cm^{-1} , que se mantêm presentes nos espectros até 37,5 minutos de análise (em torno de 392,1 $^{\circ}\text{C}$).

Foram ainda observadas bandas características de ácido isociânico, em 2286 e 2250 cm^{-1} , aos 24,6 minutos de análise (263,1 $^{\circ}\text{C}$); que se mantiveram presentes até 43,5 minutos de análise (em torno de 452,1 $^{\circ}\text{C}$).

Bandas de dióxido de enxofre na fase gasosa foram observadas em 1349; 1363,6; 1373,1 cm^{-1} e um par de bandas de menor intensidade em 2488,9 e 2511,9 cm^{-1} . Essas bandas puderam ser observadas desde os 27,7 minutos (294,1 $^{\circ}\text{C}$) e permaneceram presentes até 38,4 minutos (401,1 $^{\circ}\text{C}$).

O espectro de infravermelho aos 33 minutos de análise é apresentado na Figura 13 em comparação com os espectros do CO_2 e do dióxido de enxofre, obtidos nas bases de dados COBLENZ S. [43]. O espectro obtido aos 27,4 minutos (291,1 $^{\circ}\text{C}$) foi comparado com o do ácido isociânico da base de dados EPA Vapor Phase [44], na Figura 14.

Figura 13 - Comparação do espectro de infravermelho aos 33,0 minutos (347,1 $^{\circ}\text{C}$) de análise com aqueles de CO_2 e SO_2 da base de dados Coblenz S. [43] indicados pelas linhas tracejadas.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Figura 14 - Comparação do espectro de infravermelho aos 27,4 minutos (291,1 °C) de análise da amostra com aquele do ácido isociânico da base de dados EPA Vapor Phase [44] indicados pelas linhas tracejadas.

Fonte: autoria própria e base de dados EPA Vapor Phase [44].

Aos 34,5 minutos de análise (362,1 °C), foram observadas bandas em 2315 e 2364 cm⁻¹ com perfil e região característica do cianeto de hidrogênio, que se mantém até o final da análise, como mostra a Figura 15, no tempo de 43,2 minutos.

Figura 15 - Comparação do espectro de infravermelho aos 43,25 minutos (452,1 °C) de análise da amostra com espectro da base de dados EPA Vapor Phase [44] indicados pelas linhas tracejadas.

Fonte: autoria própria e base de dados EPA Vapor Phase [44].

Além dessas bandas, também foram observados sinais em 2046,4 e 2071 cm^{-1} , que se apresentaram desde os 27,3 minutos de análise (290,1 $^{\circ}\text{C}$) até os 58 minutos de análise (597,1 $^{\circ}\text{C}$). Esses sinais, apesar de bem intensos são de difícil identificação e compatíveis com espectros de isotiocianatos e também com o espectro do sulfeto de carbonila, mas não foi possível atribuí-los com certeza a nenhum composto. A Figura 16 apresenta os espectros obtidos aos 33 minutos de análise, de uma cadeia alil isocianato e do sulfeto de carbonila obtidos na base de dados COBLENZ S. [43], para comparação.

Porém não é possível afirmar qual seria o sinal correspondente correto, pois a possibilidade destes gases se formarem é pequena.

Figura 16 - Comparação do espectro de infravermelho aos 33,0 minutos (347,1 $^{\circ}\text{C}$) de análise da amostra com espectros da base de dados Coblenz S. [43] indicados pela linha tracejada.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

As informações obtidas por TG-FTIR corroboram os dados da curva TG/DTG e permitiram relacionar as etapas de perda de massa com a maioria dos respectivos gases evolvidos. As atribuições das bandas observadas no espectro de FTIR estão sumarizadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Atribuição das bandas observadas no espectro de FTIR dos gases evoluídos na decomposição térmica do sulfato de estreptomicina.

Compostos	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Principal Atribuição	T _i - T _f (°C)	Tempo (min)
Água	400 – 550; 1250 – 1800; 3500 – 4000.	<i>O – H</i>	17,1 – 1017,1	0 – 100
Amônia	930,5; 965,4; 3335,7	<i>N – H</i>	253,1 – 836,1	23,6 – 81,9
Dióxido de carbono	628; 2357,8; 2380,2	<i>C = O</i>	263,1 – 392,1	24,6 – 37,5
Ácido isociânico	2279; 2253,8	<i>HN = C = O</i>	263,1 – 452,1	24,6 – 43,5
Dióxido de enxofre	1339,5; 1358,6; 1377,8;	<i>S = O</i>	294,1 – 401,1	27,7 – 38,4
Cianeto de hidrogênio	713,8	<i>C ≡ N</i>	362,1 – 1017,1	34,5 – 100,0
Não identificado	2048,5; 2072	Não atribuído	290,1 – 592,1	27,3 – 58,0

Foram coletados os intermediários de decomposição em 210 e 235 °C e analisados utilizando GC-MS. Os resultados não foram totalmente esclarecedores, tendo sido possível identificar os resíduos como sendo hidrocarbonetos de cadeia longa.

Com essas informações, foi possível propor um mecanismo para a decomposição térmica do sulfato de estreptomicina, apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Mecanismo proposto para decomposição térmica do sulfato de estreptomicina.

4.4. Caracterização estrutural da tobramicina

Inicialmente, foram realizada uma caracterização espectroscópica por FT-IR e RMN para a tobramicina. O espectro de FT-IR obtido, Figura 18, apresentou bandas referentes ao fármaco analisado que concordam com o proposto por PIGNATELLO [45]. Algumas das principais atribuições das bandas são apresentadas na Tabela 5.

Figura 18- Espectro na região do infravermelho da Tobramicina.

Tabela 5- Atribuição das bandas obtidas pelo espectro na região do infravermelho da tobramicina.

Nº de onda (cm ⁻¹)	Atribuições
3400 – 3200	Deformação axial N-H (a,f) e deformação axial O-H (a,f)
2920	Deformação axial C-H Alifático (m)
1580	Deformação no plano N-H (f)
1470	Deformação angular CH ₂ (m)
1384 -1344	Deformação no plano O-H (m)
1040	Deformação axial C-N (f) e deformação axial C-O (f)

(a)= amplo; (m) = intensidade média; (f) = intensidade forte.

A caracterização deste fármaco também foi realizada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C), cujos espectros são apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

Figura 19 - Espectro de RMN ^1H da Tobramicina.

Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C da Tobramicina.

Os picos obtidos nos espectros de RMN de ^1H ^{13}C e suas principais atribuições estão sumarizados na Tabela 6 e estão em concordância com o apresentado por HOLZGRABER [46], para a tobramicina.

Tabela 6 - Atribuições dos picos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da Tobramicina.

Posição	^{13}C (δ/ppm)		^1H (δ/ppm)	
	Experimental	Literatura [46]	Experimental	Literatura [46]
1	50,3	50,4	2,9	2,9
2	35,3	35,5	1,1 / 1,9	1,2 / 1,9
3	49,0	49,2	2,9	2,9
4	86,0	86,5	3,4	3,3
5	74,4	74,5	3,7	3,6
6	88,0	88,1	3,2	3,2
7	99,3	99,7	5,1	5,1
8	49,4	49,4	2,8	2,8
9	34,6	34,9	1,5 / 1,9	1,6 / 2,0
10	66,1	66,2	3,5	3,5
11	73,1	73,7	3,6	3,6
12	41,4	41,6	2,8 / 2,9	2,7 / 2,9
13	99,9	100,0	4,9	5,0
14	71,5	71,8	3,5	3,5
15	54,1	54,2	3,1	3,0
16	69,2	69,3	3,4	3,3
17	72,1	72,1	3,8	3,9
18	60,3	60,3	3,8	3,8

4.5. Estudos termoanalíticos da tobramicina

O comportamento térmico da tobramicina foi estudado utilizando as técnicas termoanalíticas TG, DSC, TG-FTIR e microscopia *Hot Stage*. As curvas TG/DTG/DTA, em atmosfera de nitrogênio e ar são apresentadas nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Figura 21 - Curvas TG(preto)/DTG(azul)/DTA(vermelho) da tobramicina em atmosfera de N₂, com vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, porta amostra de α -alumina e massa de amostra de 7,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

Figura 22 - Curvas TG(preto)/DTG(azul)/DTA(vermelho) da amostra de tobramicina em atmosfera de ar seco, com vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, porta amostra de α -alumina e massa de amostra de 7,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

Sob atmosfera de nitrogênio, Figura 21, a curva TG apresentou três eventos de perda de massa.

Na primeira e segunda etapa de perda de massa, tanto em atmosfera de N₂ ou em ar, sugere-se a perda de moléculas de água. Pelos cálculos estequiométricos, foi liberada uma molécula de água na primeira etapa (TG: 3,1%, calc.: 3,5%) e 1,5 molécula de água na segunda etapa (TG: 5,0%, calc.: 5,30%).

Em atmosfera de N₂, a curva se mantém estável, não havendo perdas de massa, entre 167,5 e 252,8 °C, sendo observadas nessa região apenas transições de fase no estado sólido, na curva DTA. Assim, o evento observado antes do início da decomposição da amostra, é sua fusão em 240,3 °C e, em seguida, o fármaco se decompõe em uma única etapa.

Na decomposição do fármaco já desidratado na curva TG e de acordo com os dados do TG-FTIR, pode-se sugerir a saída de dióxido de carbono, amônia, metanol e o gás metano (TG: 68,0%, calc.: 67,9%).

Em atmosfera de ar, a curva TG também apresentou eventos similares à curva em atmosfera de nitrogênio até aproximadamente 170 °C. A decomposição do material ocorreu entre 244,9 e 396,8 °C e a perda observada foi de 47,9%. Porém, foi observado um evento adicional na curva TG, Figura 22, correspondente à queima do material carbonizado, no final da decomposição entre 396,8 e 1000 °C (43,8% exp.).

A Tabela 7 resume os resultados quantitativos nas curvas TG/DTG/DTA, em ar e nitrogênio e, na qual, se inclui uma tentativa de atribuição de cada etapa. Ali são apresentados intervalos de temperatura, perdas de massa calculadas e experimentais e temperaturas dos picos DTA.

Tabela 7 - Dados obtidos a partir das curvas TG/DTG/DTA da tobramicina sob atmosfera de nitrogênio e ar.

Descrição do evento / atmosfera	ΔT (°C)	TG		DTA
		Perda de massa (%)		T _{pico} (°C)
		TG	Calc.	
Nitrogênio				
$C_{18}H_{37}N_5O_{9(s)} \rightarrow C_{18}H_{35}N_5O_{8(s)} + 1,0 H_2O_{(g)}$	25,0 – 79,9	3,1	3,5	78,4 ^b
$C_{18}H_{35}N_5O_{8(s)} \rightarrow C_{18}H_{33}N_5O_{7(s)} + 1,5 H_2O_{(g)}$	79,9 – 167,5	5,0	5,3	130,1 ^c
$C_{18}H_{33}N_5O_{7(l)} \rightarrow C_{16}H_{26}N_4O_{5(l)} + CO_{2(g)} + NH_{3(g)} + CH_{4(g)}$	252,8 – 1000	68,0	67,9	-
resíduo	-	23,9	23,3	-
Ar				
$C_{18}H_{37}N_5O_{9(s)} \rightarrow C_{18}H_{35}N_5O_{8(s)} + 1,0 H_2O_{(g)}$	25,0 – 75,8	2,9	3,5	57,6 ^b
$C_{18}H_{35}N_5O_{8(s)} \rightarrow C_{18}H_{33}N_5O_{7(s)} + 1,5 H_2O_{(g)}$	75,8 – 169,6	5,1	5,3	97,8 ^c
$C_{18}H_{33}N_5O_{7(l)} \rightarrow C_{16}H_{26}N_4O_{5(l)} + CO_{2(g)} + NH_{3(g)} + CH_{4(g)}$	244,9 – 420,1	47,9	91,2 ^a	-
queima do material	420,1 – 693,7	43,8		445,9 ^c
resíduo	-	0,3		

^a soma da perda de massa e do resíduo, ^b pico endotérmico, ^c pico exotérmico.

As curvas DSC da tobramicina foram obtidas no modo aquecimento-resfriamento-aquecimento e são apresentadas na Figura 23.

No primeiro aquecimento, observa-se um evento endotérmico entre 100 e 130 °C, que se refere à evaporação de água. Em seguida, surgem uma série de picos endo e exotérmicos, apresentados na Tabela 8, que podem ser atribuídos a processos de fusão seguidos de conversões polimórficas.

Tanto no resfriamento, quanto no segundo aquecimento, observaram-se apenas transições de segunda ordem, sugerindo a irreversibilidade dos eventos.

Observam-se semelhanças com a curva DSC da Tobramicina apresentada por DASH e SURYANAYANAN [24], exceto pelo pico exotérmico em 223 °C.

Figura 23 - Curva DSC da Tobramicina, utilizando ciclos de aquecimento-resfriamento-aquecimento entre -60°C e 250 °C, em atmosfera de N₂ (50,0 mL min⁻¹) com razão de aquecimento de 10,0 °C min⁻¹, suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa e massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg.

Tabela 8 - Resumo dos resultados das curvas DSC da Tobramicina sob atmosfera de N₂.

Descrição do evento / atmosfera	DSC	
	$\Delta T / ^\circ\text{C}$ ou T_{onset}	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$
Perda de água	91,0 - 146,0	40,8 ^a
Fusão da Fase I	179,4	45,5 ^a
Recristalização para Fase II	203,4	28,8 ^b
Fusão da Fase II	221,1	1,8 ^a
Recristalização para Fase III	223,5	3,0 ^b
Ponto de Fusão	240,3	112,2 ^a

^a endo = pico endotérmico; ^b exo= pico exotérmico.

Em uma tentativa de observar as transformações de fase e eventuais fusões, foram obtidas imagens usando *hot stage microscopy*, cujos resultados são apresentados na Figura 24. Na temperatura de 135 °C observa-se a perda de vapor de água. O início da fusão do fármaco ocorre em 161 °C e em 170 °C, já no estado líquido, começam a ocorrer mudanças internas, observadas nas temperaturas de 185; 200 e 208 °C, porém não foi possível defini-las, nem observar a recristalização do fármaco e respectivas fusões, pois há o embaçamento da lâmina do microscópio.

Figura 24 - Imagens obtidas pela microscopia Hot stage em diferentes temperaturas.

Para avaliação das diferentes formas sólidas da tobramicina, a amostra foi aquecida em diferentes temperaturas no DSC após 5,0 minutos de isoterma nas temperaturas selecionadas e analisadas por difração de raios X. Os difratogramas obtidos estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Difratogramas de raios X das amostras de tobramicina coletadas em diferentes temperaturas.

Como observado nos difratogramas da Figura 25, a tobramicina apresenta grau de cristalinidade relativamente baixo, que aumenta na amostra coletada aos 223 °C.

De acordo com os estudos de DASH [24], a tobramicina obtida por recristalização a partir da água, apresenta-se com uma rede cristalina similar ao hidrato de tobramicina, com baixa cristalinidade ou ainda recristaliza-se com uma rede cristalina diferente da original.

A Tabela 9 apresenta os picos principais de cada amostra em comparação com os padrões encontrados na literatura. Com base nesses resultados, pode-se concluir que foram encontradas três fases polimórficas, nas quais duas são apresentadas por DASH [24] e uma delas (TOB 223 °C), apesar de ser citada na literatura [14], não tem maiores informações reportadas sobre suas características cristalográficas para uma comparação.

Tabela 9- Picos dos difratogramas de raios X para as diferentes formas da amostra de Tobramicina, comparados com as formas polimórficas descritas na literatura, nas referências 14 e 24.

Amostra		2θº																									
Tobramicina monohidratada (literatura) [14]	5,7*	-	8,5*	-	10,0*	10,9*	11,8*	-	-	14,3*	-	-	17,8*	18,5*	18,9*	19,4*	20,2*	20,9*	21,8*	22,7*	23,4*	-	-	-	-		
	5,6	-	8,3*	9,0	9,7*	10,5	11,5	-	-	14,0*	-	-	17,5	18,2*	18,7*	19,2	19,9	20,7*	21,6	22,4	23,1	-	-	-	-		
Tobramicina padrão (literatura) [24]	6,0*	-	8,6*	-	9,9*	10,9*	11,8*	-	12,7	14,3*	-	-	17,8*	18,4*	19,0*	-	20,2*	20,9*	21,7*	22,7*	23,5*	-	-	-	-		
Tobramicina 200ºC (Forma 1)	5,7	-	7,6	9,2	-	10,8	12,0*	12,4*	12,7	14,8*	15,3	16,2	17,1*	17,7	18,9*	-	-	20,5*	21,8*	22,4*	23,2*	24,6	26,9	28,9	32,3		
Tobramicina 223ºC (Forma 2)	-	-	7,5	9,2	-	10,8	12,0*	-	12,9	14,9*	15,3	16,1	17,2*	18,0	18,8*	-	-	20,5*	21,9	-	23,1	24,5	26,9	29,1	32,2		

Legenda: (*) picos de maior intensidade.

4.6. Análise dos gases evolvidos da Tobramicina

Na análise de gases evolvidos, por TG-FTIR foram obtidas informações sobre os voláteis liberados durante a decomposição térmica da tobramicina base livre. A identificação dos gases também foi realizada utilizando as bases de dados da COBLENZ S. [43] para comparações.

A evolução dos voláteis pode ser visualizada pelo gráfico de Gram-Schmidt apresentado na Figura 26. O máximo de detecção dos gases provenientes da decomposição do fármaco ocorreu aos 29,8 minutos de análise, correspondendo a 318,4 °C.

Figura 26 - Gráfico de Gram-Schmidt para a decomposição da tobramicina em atmosfera de N₂.

A Figura 27 apresenta o gráfico em 3D, que relaciona a intensidade do sinal de FTIR com ambos o tempo e a temperatura de análise.

Figura 27 - Diagrama tridimensional para a decomposição da Tobramicina em atmosfera de N₂, com sinal de absorvância no IV em função do tempo e da temperatura.

Na Figura 28 são apresentados os espectros obtidos ao longo do tempo de análise pelo TG-FTIR para a tobramicina, em várias temperaturas.

Figura 28 - Espectros TG-FTIR obtidos para a tobramicina nos tempos de 9,9; 15,8; 29,8; 32,0 e 50,0 minutos, de aquecimento.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Ao longo da análise de TG-FTIR, observaram-se bandas características de água na região de 400 a 550 cm^{-1} ; 1250 a 1800 cm^{-1} e entre 3500 e 4000 cm^{-1} , confirmando a perda de água na primeira e segunda etapa de perda de massa, conforme proposto a partir das curvas TG.

Os sinais referentes à amônia em 931,8; 963,8 e 3328 cm^{-1} apresentaram-se a partir de 27 minutos (290,2 °C) até 71,3 minutos de análise (733,2 °C).

A partir de 27,9 minutos de análise (299,2 °C), bandas características de metanol apareceram na região de 3000 cm^{-1} (banda larga) e em 1000 cm^{-1} e se mantiveram presentes nos espectros de IV até 35,2 minutos (372,2 °C).

Aos 30,5 minutos de análise (325,2 °C), foram observadas bandas características do dióxido de carbono em 2300,0 e 2279,2 cm^{-1} , que permaneceram presentes nos espectros de IV até 34,4 minutos de análise (364,2 °C).

Na Figura 29 são apresentados os espectros de infravermelho na fase gasosa obtidos aos 29,8 minutos de análise, assim como os espectros de água, amônia, metanol e dióxido de carbono, obtidos da base de dados do COBLENZ S. [43].

Figura 29 - Comparação do espectro de infravermelho, na fase gasosa, obtido aos 29,8 minutos (318,2 °C) de análise e aqueles de água, amônia, metanol e dióxido de carbono da base de dados Coblenz S. [43] indicados pela linha tracejada.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Aos 47,9 minutos (499,2 °C), há o surgimento de uma banda de baixa intensidade em 3000 cm^{-1} referente às deformações C-H de hidrocarbonetos

alifáticos, que se mantêm até 63,7 minutos (657,2 °C) de análise. Essa banda pode ser referente à liberação de metano.

Na Figura 30 são apresentados os espectros de infravermelho na fase gasosa obtidos aos 50 minutos de análise, assim como o espectro do metano obtido da base de dados do COBLENZ S. [43].

Figura 30 - Comparação do espectro de infravermelho, na fase gasosa, obtido aos 50,0 minutos (520,2 °C) de análise e aquele do metano da base de dados Coblenz S. [43] indicado pela linha tracejada.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Uma proposta para a atribuição das bandas presentes nos espectros da fase gasosa referentes aos gases evoluídos durante a decomposição térmica da Tobramicina é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10 – Proposta de atribuição das bandas do FTIR dos gases evoluídos na decomposição térmica da Tobramicina.

Compostos	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Principal Atribuição	T _i - T _f (°C)	Tempo (min)
Água	400 – 550; 1250 – 1800; 3500 – 4000.	<i>O – H</i>	20,22 – 1022,06	0 – 100
Amônia	930.5; 965.4; 3335.7	<i>N – H</i>	290,22 – 733,22	27,0 – 71,3
Metanol	3000,0; 1000,0	<i>O – H</i>	299,2 – 372,2	27,9 – 35,2
Dioxido de carbono	2279,0	<i>C = O</i>	325,22 – 364,22	30,5 – 34,4
Metano	3000,0; 1302,0	<i>C – H</i>	499,22 – 657,22	47,9 – 63,7

A partir dos dados resultados das curvas TG e pelo TG-FTIR, foi elaborada uma proposta para o mecanismo referente a o comportamento térmico da tobramicina, que é representada na Figura 31.

Figura 31 - Mecanismo de decomposição térmica proposto para a tobramicina.

4.7. Caracterização estrutural do complexo Cu(II)-tobramicina.

Após a síntese do complexo utilizou-se a espectrofotometria na região do UV-Vis para investigar se houve a formação de complexo entre a tobramicina e o sulfato de cobre. A Figura 32 apresenta os espectros do sal utilizado inicialmente e do complexo.

Figura 32- Espectro de UV-Vis obtido do sal de cobre e do complexo Cu(II)-tobramicina.

Os espectros da Figura 32 revelam que o complexo apresenta um perfil distinto do sal de origem, com um máximo de absorção em 250 nm, em concordância com o que é descrito na literatura [38].

O cobre, na sua forma mais estável (estado de oxidação 2+), apresenta configuração eletrônica d⁹. Grande parte dos complexos de Cu(II) é azul ou verdes devido às absorções d-d em regiões entre 600-900 nm [47].

Neste caso, o complexo obtido exibe absorção de alta intensidade em 250nm e uma pequena variação próxima de 650 nm, resultando na coloração azul. A banda de transferência de carga é a mais intensa (250 nm), enquanto que as transições d-d aparecem em 650 nm, não sendo muito evidenciadas, pois complexos de cobre podem apresentar baixa absorvidade [47].

No caso da banda de transferência de carga, o íon metálico pode atuar como receptor de elétrons e o ligante, no caso a tobramicina, como doador.

Utilizando também a espectroscopia vibracional na região do Infravermelho, foram observadas diferenças entre os espectros do fármaco original e do complexo sintetizado, como mostra a Figura 33.

Figura 33 - Espectro de infravermelho da Tobramicina e do complexo Cu(II)-tobramicina.

As bandas presentes entre 600 e 400 cm⁻¹ são características de ligações entre o cobre e o oxigênio, sendo outro indício de complexação. A Tabela 11 apresenta uma tentativa de atribuição das bandas observadas no espectro IV do complexo Cu-tobramicina.

Tabela 11- Tentativa de atribuição das bandas do espectro na região do infravermelho do complexo de Cu(II)-tobramicina.

Bandas ν (cm⁻¹)	Atribuição
3500-3100	Deformação axial de O-H (a,f*) e deformação axial N-H (a,f*)
2936	Deformação axial C-H em CH ₃ e CH ₂ (m*)
1640	Deformação axial C=O de aldeído (f*)
1529	Deformação no plano N-H (m*)
1398	Deformação angular do C-H de aldeído (m*)
1113	Deformação axial simétrica de C-O-C (f*)
600 – 400	Deformação de ligações Cu-O (m*)

4.8. *Estudos termoanalíticos do complexo Cu(II)-tobramicina.*

Após a caracterização espectroscópica do complexo, foram realizados estudos termoanalíticos para avaliar o comportamento térmico deste complexo utilizando TG/DTG/DTA, DSC e a análise dos gases evoluídos por TG-FTIR, além dos intermediários de decomposição.

As curvas TG/DTG/DTA apresentaram perfis de perda de massa com quatro eventos na atmosfera de N₂, que podem ser observados na Figura 34. As curvas TG/DTG/DTA, na atmosfera de ar, apresentaram perfis de perda de massa com cinco eventos, como mostrado na Figura 35.

Figura 34 - Curvas TG(preto)/DTG(azul)/DTA(vermelho) do complexo Cu(II)-tobramicina em atmosfera de N₂, com vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, porta amostra de α -alumina e massa de amostra de 5,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

Figura 35 - Curvas TG(preto)/DTG(azul)/DTA(vermelho) do complexo Cu(II)-tobramicina em atmosfera de ar seco, com vazão de 50 mL min⁻¹, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, porta amostra de α -alumina e massa de amostra de 5,0 mg ($\pm$ 0,1 mg).

Na primeira etapa de perda de massa, tanto em atmosfera de N₂ como em ar, sugere-se a perda de moléculas de água (TG: 12,36%) e o resíduo obtido na curva TG em ar, refere-se ao CuO (TG: 12,24%).

Na segunda etapa, pode-se supor a liberação dos gases envolvidos identificados pelo TG-FTIR como sendo metanol, amônia, dióxido de carbono e água.

Na terceira etapa não foi possível identificar gases envolvidos pelo TG-FTIR e nem pelo GC-MS devido à pequena quantidade de material.

A quarta etapa, em atmosfera de ar, deve-se a queima do material carbonizado e a quinta etapa, a perda do íon trióxido de enxofre proveniente do CuSO₄ que não complexou, como será explicado a seguir.

Utilizando os dados da curva TG como base, pode-se calcular a massa molar do complexo através de um sistema de equações contendo duas incógnitas, o teor de água (x) e o de cobre (y) presentes no complexo.

Sabendo que a massa molar da tobramicina, C₁₈H₃₇N₅O₉, é de 467,52 g mol⁻¹, e que a massa molar do CuSO₄ é 159,55 g mol⁻¹, pode-se montar uma regra de três, aplicada para perda de água:

$$\frac{467,52 + 18,01x + 159,55y - 100\%}{18,01x - 12,36\%}$$

Que resulta na Equação 1:

$$5778,55 + 222,60x + 1962,42y = 1801,00x \quad (1)$$

Também é possível montar uma segunda regra de três utilizando o resíduo de 12,24% de CuO (MM=79,546 g mol⁻¹), sendo que 79,89% do resíduo obtido pela curva TG em ar refere-se apenas ao cobre:

$$\frac{467,52 + 18,01x + 159,55y - 100\%}{63,55y - 9,78\%}$$

Assim a Equação 2:

$$4571,3617 + 176,20x + 1560,04y = 6354,60y \quad (2)$$

Com essas duas equações, têm-se o seguinte sistema de equações:

$$\begin{cases} x = 3,66 + 1,25y \\ y = 0,95 + 0,037x \end{cases}$$

Resolvendo esse sistema, encontra-se que:

$$x = 4,90 ; y = 1,13$$

Com isso, calcula-se que o complexo possui 4,9 moléculas de água e 1,13 de cobre. Assim, a massa molar utilizando esses resultados é de:

$$MM = 467,52 + (18,01 \times 4,90) + (159,55 \times 1,13) = 736,03 \text{ g/mol} \quad (3)$$

Esses resultados ainda foram ajustados com o auxílio dos resultados da análise elementar, que são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos na análise elementar.

Substância	% Análise Elementar			
	C	H	N	S
<i>TOB livre</i>	41,96	8,03	14,42	0
<i>Complexo</i>	27,62	5,81	8,39	4,87

Como a quantidade de cobre encontrado nos cálculos é maior que a proporção equimolar (1 Tob: 1 CuSO₄), pode-se supor que a reação não foi de 100% de rendimento, restando um resíduo de sal de cobre que precipitou junto com o complexo.

Aproximando a quantidade de água no complexo para cinco moléculas e realizando cálculos para saber qual a proporção que mais se aproxima dos resultados da análise elementar, têm-se os resultados apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados experimentais da análise elementar do fármaco Tobramicina e do complexo sintetizado Cu(II)-tobramicina em comparação com os valores calculados, de acordo com os possíveis rendimentos.

Fórmula proposta	Análise Elementar (%)							
	C _{calc.}	C _{exp.}	H _{calc.}	H _{exp.}	N _{calc.}	N _{exp.}	S _{calc.}	S _{exp.}
<i>TOB pura</i>	42,00	41,96	8,28	8,03	13,67	14,42	0	0
<i>TOB + 1,00 CuSO₄ + 5,0 H₂O</i>	30,22	27,62	6,35	5,81	9,79	8,39	4,47	4,87
<i>TOB + 1,14 CuSO₄ + 5,0 H₂O</i>	28,29	27,62	6,08	5,81	9,16	8,39	5,23	4,87
<i>TOB + 1,25 CuSO₄ + 5,0 H₂O</i>	27,97	27,62	6,00	5,81	9,00	8,39	5,01	4,87
<i>TOB + 1,30 CuSO₄ + 5,5 H₂O</i>	27,99	27,62	6,00	5,81	9,07	8,39	5,30	4,87
<i>TOB + 1,25 CuSO₄ + 6,0 H₂O</i>	27,96	27,62	6,14	5,81	9,06	8,39	5,17	4,87
<i>TOB + 1,40 CuSO₄ + 5,0 H₂O</i>	27,68	27,62	4,78	5,81	8,97	8,39	5,79	4,87
<i>TOB + 1,40 CuSO₄ + 5,0 H₂O</i>	27,36	27,62	4,71	5,81	8,87	8,39	4,00	4,87

Assim, a melhor fórmula proposta é para o complexo com 75% de rendimento, contendo 5 moléculas de H₂O, em que a massa molar final do complexo foi definida como sendo de 757,05 g mol⁻¹ e sua fórmula molecular aproximada é de [(Cu_{1,25}C₁₈H₃₇N₅O₉)(SO₄)_{1,25} · 5 H₂O].

Essa possibilidade de 25% de CuSO₄ estar presente sem complexar pode ser comprovada pela 5ª perda de massa na curva TG na presença de O₂ de 2,5% (15,62 g mol⁻¹) entre 550 e 720 °C, que corresponde à perda de um SO₃.

Para confirmação de óxido de cobre como resíduo obtido, este material foi coletado e analisado por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios X (EDS), em diferentes regiões, permitindo a identificação dos elementos químicos presentes na amostra, como sendo oxigênio e cobre, como mostrado na Figura 36.

Figura 36 - Resultado obtido pela análise por EDS do resíduo da análise térmica, indicando os elementos encontrados no composto.

Esse mesmo resíduo da curva TG adicionado a uma fita de carbono foi analisado também por DRX com ângulo rasante, obtendo sinais que comprovam a presença de óxido de cobre.

A Figura 37 apresenta o DRX obtido do resíduo, em que se encontra a fase monoclinica do CuO. Observa-se que há um sinal com alto grau de amorficidade, referente à fita de carbono, e picos intensos característicos do óxido de cobre, em comparação com os padrões da ficha 48-1548 do banco de dados MDI Jade 5.0 [40]. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 14.

Figura 37 - DRX com ângulo rasante do resíduo de decomposição térmica do complexo de Cu(II)-tobramicina obtido pela análise térmica após aquecimento em 1000 °C.

Tabela 14 - Resultados obtidos por DRX para o resíduo de decomposição térmica do Cu(II)-tobramicina obtido pela análise térmica após aquecimento em 1000 °C, em comparação com a ficha 48-1548 do banco de dados MDI Jade 5.0 [40].

2θ/°		
Pico	Experimental	Referência 40
1	32,4	32,5
2	35,5	35,5
3	38,5	38,7
4	49,1	48,7
5	53,4	53,5
6	58,5	58,3
7	61,7	61,6
8	65,6	65,8
9	68,1	68,1

Assim, com base nessas informações e com os gases identificados pelo TG-FTIR (como serão mostrados a seguir), os resultados quantitativos das curvas TG-DTA/DTA encontram-se sumarizadas na Tabela 15.

Tabela 15- Resultados da análise de TG/DTG/DTA do complexo Cu(II)-tobramicina sob atmosfera de nitrogênio e ar.

Descrição do evento / atmosfera	ΔT (°C)	TG		DTA
		Perda de massa (%)		T _{pico} (°C)
		TG	Calc.	
Nitrogênio				
$(Cu_{1,25}C_{18}H_{37}N_5O_9)(SO_4)_{1,25} \cdot 5 H_2O \rightarrow (Cu_{1,25}C_{18}H_{37}N_5O_9)(SO_4)_{1,25} + 5 H_2O_{(g)}$	25,0 – 178,9	13,1	14,4	72,6 ^c
$(Cu_{1,25}C_{18}H_{37}N_5O_9)(SO_4)_{1,25} \rightarrow \text{Resíduo } 1^a + 1 CH_3OH_{(g)} + 3 NH_{3(g)} + 1 CO_{2(g)} + H_2O_{(g)}$	178,9 – 275,5	20,5	20,3	262,3 ^d
$\text{Resíduo } 1^a \rightarrow \text{Resíduo carbonizado}^a$	275,5 – 520,0	35,9	65,3 ^b	294,8 ^d
<i>Decomposição do resíduo carbonizado</i>	520,0 – 1000			-
<i>Resíduo final</i>	-	30,5		-
Ar				
$(Cu_{1,25}C_{18}H_{37}N_5O_9)(SO_4)_{1,25} \cdot 5 H_2O \rightarrow (Cu_{1,25}C_{18}H_{37}N_5O_9)(SO_4)_{1,25} + 5 H_2O_{(g)}$	25,0 – 172,3	12,4	14,4	66,4 ^c
$(Cu_{1,25}C_{18}H_{37}N_5O_9)(SO_4)_{1,25} \rightarrow \text{Resíduo } 1^a + 1 CH_3OH_{(g)} + 3 NH_{3(g)} + 1 CO_{2(g)} + H_2O_{(g)}$	172,3 – 275,3	20,2	20,3	244,1 ^d
$\text{Resíduo } 1^a \rightarrow \text{Resíduo } 2^a$	275,3 – 354,9	19,9	50,1 ^b	308,6 ^d
$\text{Resíduo } 2^{a,e} \rightarrow \text{Resíduo carbonizado}$	370,0 – 565,0	32,7		408,9 ^d / 485,8 ^d
$CuSO_{4(s)} \rightarrow CuO_{(s)} + SO_{3(g)}$	565,0 – 720,0	2,5	2,5	673,5 ^c
<i>Resíduo de CuO</i>	-	12,3	12,7	-

^a não identificado por GC-MS; ^b soma da quarta perda e resíduo; ^c endotérmico ; ^d exotérmico; ^e ocorre em múltiplas etapas, segundo as curvas DTG e DTA.

A curva DSC do complexo apresentada na Figura 38, foi obtida em ciclos de aquecimento e resfriamento (*heat-cool-heat cycles*) em temperaturas entre -60 e 185 °C. O primeiro ciclo de aquecimento revelou um evento endotérmico relacionado com a perda de água entre 26,2 e 183,5 °C, com uma variação de entalpia de 325,3 J g⁻¹. Diferentemente do fármaco tobramicina puro, este não apresentou picos de fusão da amostra e também não há indícios do polimorfismo. Os demais ciclos não apresentaram picos mostrando que não há processos de cristalização em outras formas polimórficas, nesse intervalo de temperatura.

Figura 38- Curva DSC do complexo Cu(II)-tobramicina, em atmosfera de N₂ (50,0 mL min⁻¹) com razão de aquecimento de 10,0 °C min⁻¹, suporte de amostra em alumínio fechado com orifício na tampa e massa de amostra de 5,0 mg ± 0,1 mg.

Na análise de TG-FTIR foram obtidas informações sobre os gases evoluídos durante a decomposição do complexo. A identificação dos gases também foi realizada utilizando as bases de dados da COBLENZ S. [43] para comparações.

A evolução dos voláteis pode ser visualizada pelo gráfico de Gram-Schmidt apresentado na Figura 39. O máximo de detecção dos gases provenientes da decomposição do fármaco ocorreu aos 29,4 minutos de análise, correspondendo a 316,9 °C.

Figura 39 - Gráfico de Gram-Schmidt para a decomposição do complexo de Cu(II)-tobramicina em atmosfera de N₂.

A Figura 40 apresenta o gráfico em 3D, que relaciona a intensidade do sinal de FTIR com ambos o tempo e a temperatura de análise.

Figura 40 – Diagrama tridimensional para a decomposição do complexo Cu-Tobramicina em atmosfera de N₂, com sinal de absorbância no IV em função do tempo e da temperatura.

Na Figura 41 é possível observar uma comparação dos espectros de FTIR obtidos em fase gasosa em diferentes tempos do aquecimento do complexo Cu-Tobramicina.

Figura 41 - Espectros de FTIR obtidos para os gases evoluídos durante o aquecimento do complexo nos tempos de 12,3; 19,2; 23,3; 25,7; 28,1; 32,9 e 54,5 minutos.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Desde o início da análise de TG-FTIR até o final, observaram-se bandas características de água na região de 400 a 550 cm^{-1} , 1250 a 1800 cm^{-1} e entre 3500 e 4000 cm^{-1} , confirmando a perda de água na primeira etapa de perda de massa da curva TG.

Aos 20,3 minutos de análise (225,5 $^{\circ}\text{C}$) aparecem sinais característicos do metanol em 3000 cm^{-1} (banda larga) e em 1000 cm^{-1} .

Os sinais referentes à amônia em 931,8, 963,8 e 3328,0 cm^{-1} , se apresentaram nos espectros obtidos a partir de 20,7 minutos (229,5 $^{\circ}\text{C}$) até 27,2 minutos de análise (294,5 $^{\circ}\text{C}$).

Aos 23,1 minutos de análise (253,5 $^{\circ}\text{C}$), foram observadas bandas características do dióxido de carbono em 2300,0 e 2279,2 cm^{-1} , que permaneceram presentes nos espectros até 27,5 minutos de análise (297,5 $^{\circ}\text{C}$).

Na Figura 42 são apresentados os espectros de infravermelho na fase gasosa obtidos aos 23,3 minutos de análise, assim como os espectros da água, metanol, amônia e dióxido de carbono, obtidos da base de dados do COBLENZ S. [43].

Figura 42- Espectro de infravermelho aos 23,3 minutos (255,5 $^{\circ}\text{C}$) de análise da amostra, comparado com a base de dados Coblenz S [43] da água, metanol, dióxido de carbono e amônia indicados pelas linhas tracejadas.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

Aos 26 minutos (282,5 °C), sinais característicos do dióxido de enxofre oriundos do sulfato presente no complexo como contra-íon aparecem em 1339,5, 1358,6 e 1377,8, como apresentado na Figura 43.

Figura 43 - Espectro de infravermelho aos 28,1 minutos (303,5 °C) de análise da amostra, comparado com o SO₂ da base de dados Coblenz S. [43] indicado pelas linhas tracejadas.

Fonte: autoria própria e base de dados Coblenz S. [43].

A Tabela 16 apresenta uma tentativa de atribuição dos sinais obtidos nos espectros IV dos gases envolvidos na decomposição térmica do complexo Cu(II)-Tobramicina.

Tabela 16 – Tentativa de atribuição das bandas do FTIR dos gases evoluídos na decomposição térmica do complexo Cu(II)-Tobramicina.

Compostos	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Principal Atribuição ^a	T _i - T _f (°C)	Tempo (min)
Água	400 – 550; 1250 – 1800; 3500 – 4000.	<i>O – H</i>	22,5 – 1000,0	0 – 100
Metanol	3000,0; 1092,0	<i>O – H</i>	225,5 – 272,5	20,3 – 25,0
Amônia	930.5; 965.4; 3335.7	<i>N – H</i>	229,5 – 294,5	20,7 – 27,2
Dioxido de carbono	2279,0	<i>C = O</i>	253,5 – 297,5	23,1 – 27,5
Dióxido de enxofre	1339,5; 1358,6; 1377,8;	<i>S = O</i>	282,5 – 502,5	26,0 – 48,0

A estrutura da Tobramicina possui vários pontos de possível coordenação com o metal. Esses pontos estão destacados na Figura 44.

Figura 44- Possíveis pontos de coordenação com o metal do fármaco Tobramicina.

Algumas das possibilidades de complexação estão apresentadas na Figura 45, sendo a estrutura (c) menos provável devido à maior distância de ligação.

Figura 45- Possibilidades de complexos formados em alguns dos sítios ativos do fármaco apresentados anteriormente.

A ligação do metal ao ligante também pode ser bidentada, formando uma estrutura tetraédrica ou conter águas de coordenação (complexo octaédrico), como apresentado na Figura 46, similar às estruturas sugeridas por SEKAR [37].

Figura 46- Estrutura do complexo formado de Cu(II)-Tobramicina, com o metal realizando a) 4 ligações e b) 6 ligações, na qual 2 são moléculas de água coordenadas ao metal.

5. Conclusão

As curvas TG/DTG/DTA e o TG-FTIR revelaram que o fármaco sulfato de estreptomicina começa a se decompor em temperatura próxima de 160,0 °C, em atmosfera de ar sintético com 4 etapas de perda de massa e em atmosfera de N₂ em 3 etapas. Durante a primeira perda de massa foram liberadas quatro moléculas de água, que ocorre em duas etapas observadas na curva DTG. A segunda refere-se à liberação de 4 moléculas de amônia e a terceira etapa ocorre à liberação de vários gases, que foram identificados pelo TG-FTIR tais como o CO₂, SO₂, HCN, ácido isociânico, além de uma banda que não pode ser identificada. Através da curva DSC, confirmou-se que o composto não funde, sendo um fármaco amorfo.

As curvas TG/DTG/DTA e TG-FTIR provenientes do fármaco tobramicina revelam o início da decomposição próximo a 250,0 °C, após a fusão que ocorre aproximadamente em 240,3 °C em atmosfera de ar. As perdas de massa em atmosfera de N₂ ocorreram em 3 etapas, sendo as duas primeiras relacionadas com perdas de água, totalizando 3,5 moléculas de água, e na terceira etapa, a decomposição da amostra, com liberação de CO₂, NH₃ e metano.

A curva DSC revela um evento endotérmico relacionado à perda de água e uma sequência de eventos (endotérmicos e exotérmicos), que envolvem as transições polimórficas. Essas transições foram confirmadas por DRX sendo duas já identificadas na literatura por DASH [24], sendo uma delas compatível com a forma monohidratada devido a alta higroscopicidade da tobramicina e a outra podemos chamar de Forma 1. Uma terceira forma encontrada, Forma 2, diferente dos padrões da literatura e é apenas citada no Relatório Farmacêutico da Agência de Medicina Européia [14].

O complexo de Cu(II)-tobramicina foi sintetizado e caracterizado por UV-Vis e pela técnica de infravermelho. Em seguida, o estudo termoanalítico revelou que o complexo começa a se decompor próximo de 220 °C, sendo apenas um pouco menos estável que o fármaco puro. As curvas TG/DTG/DTA apresentaram 4 perdas de massa em N₂ e 5 perdas em ar, devido à queima do material carbonizado.

O resíduo obtido pela curva TG foi analisado e identificado como CuO por Espectroscopia de Energia Dispersiva por raios X e DRX.

Através de um sistema de equações, montado usando-se a massa molar do fármaco e considerando-se as perdas de águas e os resíduos formados, foi possível

definir a massa molar do complexo formado e utilizando a análise elementar esses valores foram ajustados. Com isso, encontrou-se um rendimento de 75% da reação de complexação e a fórmula molecular proposta para o complexo é $[(\text{Cu}_{1,25}\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_9)(\text{SO}_4)_{1,25} \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}]$, na qual a massa molar calculada foi de $757,05 \text{ g mol}^{-1}$.

A curva de DSC revelou apenas o evento de perda de água e não se observou a fusão da amostra e nem os polimorfos presentes no fármaco puro.

Através do TG-FTIR, observou-se a liberação de H_2O , NH_3 , CO_2 , metanol e SO_2 . Porém, não foi possível descrever um mecanismo de decomposição, pois alguns intermediários não foram identificados nem por espectroscopia de massas e nem por GC-MS.

Referências

- [1] GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- [2] PANKEY L. D.; SABATH, L. D. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.
- [3] CALIXTO, M. F.; CAVALHEIRO, E. T. G. Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. **Química Nova na escola**, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.
- [4] KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Gen Guanabara Koogan; 2008.
- [5] HOPPENTOCHT, M.; HAGEDOORN, P.; FRIJLINK, H. W.; BOER, A. H. Chapter 3: Dry powder inhalation of aminoglycosides. In: Hoppentocht, M. Dry powder inhalation of antibiotics: A promising approach for treatment of infectious diseases [Groningen]. University of Groningen, 2016.
- [6] MCGLINCHEY, T. A.; RAFTER, P.A.; REGAN, F.; MCMAHON G. P. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. **Analytica Chimica**, v. 624, p. 1-15, 2008.
- [7] ARIA, D. P. **Aminoglycoside antibiotics**. John Wiley & Sons, 2007.
- [8] SIDDIQUI, M. R.; WABAI DUR, S. M; AL OTHMAN, Z. A.; ALI, S.; ALAM, S. Kinetic spectrophotometric method for the quantitative analysis of streptomycin sulfate. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 59, n. 3, 2014.
- [9] FABER, B. F; ELIOPOULOS, J. M.; WARD, J. I.; RUOFF, K.; MOELLERING, R. C. Resistance to penicillin-streptomycin synergy among clinical isolates of viridans streptococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 24, p. 871–875, 1983.
- [10] ORGOVÁN, G.; NOSZÁL, B. NMR analysis and site-specific protonation constants of streptomycin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 78– 82, 2012.
- [11] SAMPATH, S. S.; ROBINSON, D. H. Comparison of New and Existing Spectrophotometric Methods for the Analysis of Tobramycin and Other Aminoglycosides. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 5, p. 428-431, 1990.
- [12] BROOKS, A. E.; BROOKS, B. D.; DAVIDOFF, S. N.; HOGREBE, P. C.; FISHER, M.A.; & GRAINGER, D. W. Polymer-controlled release of tobramycin from bone graft void filler. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, p. 518-530, 2013.

- [13] WITTAYA-AREEKUL, S.; NEEDHAM, G. F.; MILTON, N.; ROY, M. L.; NAIL, S. L. Freeze-drying of tert-butanol/water cosolvent systems: A case report on formation of a friable freeze-dried powder of tobramycin sulfate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1147-1155, 2002.
- [14] EUROPEAN MEDICINE AGENCY. **Assessment report**: TOBI Podhaler, n. EMEA/H/C/002155, 2011.
- [15] LEVER, T.; HAINES, P.; ROUQUEROL, J.; CHARLESLEY, E.; ECKEREN, P. V.; BURLETT, D. J. ICTAC nomenclature of thermal analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, p. 545-553, 2014.
- [16] MACKENZIE, R.C. Nomenclature in thermal-analysis. **Thermochim Acta**, v. 28, p. 1, 1979.
- [17] CIDES, L. C. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal Behaviour, Compatibility study and decompositions kinetics of Glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441-445, 2006.
- [18] ARAÚJO A. A. S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M., SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral Zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 206, n. 2, p. 303-314, 2003.
- [19] SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada a cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, 2007.
- [20] DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. G. **Princípios e aplicações de análise térmica**. 2012. 132f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- [21] PAWAR, H. V.; TETTEH, J.; BOATENG, J. S. Preparation, optimisation and characterisation of novel wound healing film dressings loaded with streptomycin and diclofenac. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 102-110, 2013.
- [22] HUSSEIN-AL-ALI, S. H.; ZOWALATY, M. E.; HUSSEIN, M. Z.; ISMAIL, M.; WEBSTER, T. J. Synthesis, characterization, controlled release, and antibacterial studies of a novel streptomycin chitosan magnetic nanoantibiotic. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 549-557, 2014.
- [23] OSZLÁNCZIA, A.; BÓTAB, A.; KLUMPPC, E. Influence of aminoglycoside antibiotics on the thermal behaviour and structural features of DPPE–DPPG model membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 141-148, 2010.
- [24] DASH, A. K.; SURYANARAYANAN, R. Solid-State Properties of Tobramycin. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 9, 1991.

- [25] PILCER, G.; VANDERBIST, F.; AMIGHI, K. Spray-dried carrier-free dry powder tobramycin formulations with improved dispersion properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 4, 2009.
- [26] YEN-CHIH I.IN, T.; YON-LIAN WU, T. **Method for preparing tobramycin sulfate powder**. Estados Unidos, n. 009186817B2, 17 nov, 2015.
- [27] CUFFINI, S. L.; JÚNIOR, A. P.; TOMBARI, D. Polimorfismo em Fármacos. In: Storpirtis *et. al.* **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 3, 2009.
- [28] ARAUJO, G. L. B.; PITALUGA, A.; ANTONIO, S. G.; SANTOS, C. O. P.; MATOS, J. R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v.33, p. 27-36, 2012.
- [29] LIU, W.; GUST, R. Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. **Chemical Society Reviews**, n. 2, 2013.
- [30] BRUIJNINCX, PIETER C. A.; SADLER, P. J. Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 61, p. 1-62, 2009.
- [31] BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; BARREIRO, E. J. Considerações sobre a Química Bioinorgânica Medicinal. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 131-142, 2007.
- [32] MISHRA, P. Biocoordination and computational modeling of streptomycin with Co(II), Ni(II), In(II) and inorganic Sn(II). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 2, n. 2, article 17, 2010.
- [33] MISHRA, P. Synthesis, investigation, spectroscopic characterization and computational modeling of mixed ligand complexes of Cu(II), Fe(II), Co(II), and Bi(II) using biological active streptomycin and oxime. **Elixir International Journal**, v. 48, p. 9361-9366, 2012.
- [34] RAJIV, K.; RAJNI, J. Computational approach on architecture and tailoring of organic metal complexes derived from srteptomycin and Zn, Cd and Pb: antimicrobial effectiveness. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 25, p. 791-798, 2011.
- [35] PATWARDHAN, A.; COWAN, J.A. Influence of charge and structure on the coordination chemistry of copper aminoglycosides. **The Royal Society of Chemistry**, v. 40, p. 1795-1801, 2011.
- [36] JEZOWSKA-BOJCZUK, M.; KARACZYN, A.; KOZLOWSKI, H. Copper(II) binding to tobramycin: potentiometric and spectroscopic studies. **Carbohydrate Research**, v. 313, p. 265–269, 1998.
- [37] SEKAR, R.; KAILASA, S. K.; ABDELHAMID, H. N.; CHEN, Y. C.; WU, H. F. Electrospray ionization tandem mass spectrometric studies of copper and iron

complexes with tobramycin. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 338, p. 23-29, 2013.

[38] GZIUT, M.; MACGREGOR, H. J.; NEVELL, T. G.; MASON, T.; LAIGHT, D.; SHUTE, J. K. Anti-inflammatory effects of tobramycin and a copper-tobramycin complex with superoxide dismutase-like activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, p. 1165-1181, 2013.

[39] KOZIŃOWSKI, H.; KOWALIK-JANKOWSKA, T.; JEZOWSKA-BOJCZUK, M. Chemical and biological aspects of Cu⁺² interactions with peptides and aminoglycosides. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 2323-2334, 2005.

[40] Joint Committee on Powder Diffraction Standards, arquivo JCPDS PDF#45-093, banco de dados MDI Jade 5.0.

[41] SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient inorganic Deoxyribonucleases. Greater than 50-Million-Fold Rate Enhancement in Enzyme-Like DNA Cleavage. **Journal American Chemical Society**, v. 122, p. 8814-8824, 2000.

[42] PESTANA, E. A.; BALABAN, R. Caracterização do fármaco aminoglicosídeo sulfato de estreptomicina por espectroscopia na região do infravermelho, UV - visível e ressonância magnética nuclear 1D e 2D. **Revista Sapientia**, v. 2, n. 2, 2011.

[43] COBLENTZ SOCIETY, INC., "Evaluated Infrared Reference Spectra" in NIST Chemistry Webbook, NIST Standard Reference Database Number 69, Eds. P.J. Linstrom and W.G. Mallard, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, <http://webbook.nist.gov>, (recuperadas: 9 janeiro 2017).

[44] NICOLET - ThermoScientific Co. Nicolet EPA Vapor Phase database. Omnic 8.0 software. ThermoScientific, Madison.

[45] PIGNATELLO, R.; MANGIAFICO, A.; BASILE, L.; RUOZI, B.; FURNERI, P. M. Amphiphilic ion pairs of tobramycin with lipoamino acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1665-1671, 2011.

[46] HOLZGRABER, U.; DEUBNER, R.; SCHOLLMAYER, C.; WAIBEL, B. Quantitative NMR spectroscopy - Applications in drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 5, p. 806-812, 2005.

[47] GZIUT, M. **Investigating copper chelation with tobramycin as an anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis**. University of Portsmouth, 2012.