UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

KARINA DE PAULA

**Caracterização de estado sólido de fármacos: Cloridrato de
Mebendazol Monohidratado e Estradiol 17 β Valerato**

São Carlos
2012

KARINA DE PAULA

**Caracterização de estado sólido de fármacos: Cloridrato de
Mebendazol Monohidratado e Estradiol 17 β Valerato**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Física aplicada
Opção: Biomolecular.
Orientador: Prof. Dr. Javier Alcides Ellena

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Paula, Karina

Caracterização de estado sólido de fármacos:
Cloridrato de Mebendazol Monohidratado e Estradiol
17 β Valerato / Karina de Paula; orientador Javier
Alcides Ellena - versão corrigida -- São Carlos,
2012.

121 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Estado sólido. 2. Cloridrato de Mebendazol
Monohidratado. 3. Estradiol 17 Valerato. I. Ellena,
Javier Alcides, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico esta dissertação aos meus pais Donizetti e Jane por todo apoio e amor incondicional, por toda dedicação e por me ajudar a nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me dar força e coragem para continuar.

Ao Prof.^o Dr. Javier A. Ellena, pela orientação, pela confiança para a realização do meu trabalho, compreensão, pelo apoio, pelas discussões e broncas que com certeza foi para meu crescimento profissional e principalmente por sua paciência.

Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Ao Prof.^o Dr. Alejandro Pedro Ayala e à sua orientanda Sara Braga Honorato, da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração nas análises térmicas e espectroscópicas vibracionais.

Ao grupo de cristalografia principalmente o pessoal da sala 25: Cecília Carolina Pinheiro da Silva, Rodrigo S. Corrêa, Felipe T. Martins, Leandro Ribeiro, Marcelo B. de Andrade, Jahyr E. Theodoro, Márcio D. Bocelli, Rebeka Oliveira, Carolina Mafud, Juan Tenório, pela ajuda nos trabalhos e por todo o apoio e amizade, também pelo nosso cafezinho e saidinhas, Bernadete A. Roberto e Catiane C. Oliveira e Farmácia do Rosário pelo oferecimento das amostras.

Aos meus pais Donizetti e Jane por sempre me mostrarem o certo e me apoiando em todas as coisas, em todos os momentos.

A toda a minha família: tios, primos, vós e aos meus amigos que sempre me deram coragem também para chegar até aqui.

Ao Rodrigo Romano pelo seu companheirismo, paciência e amor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior CAPES pela bolsa concedida.

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
Se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.
(Chico Xavier)*

RESUMO

PAULA, K. da. **Caracterização de estado sólido de fármacos:** Cloridrato de Mebendazol Monohidratado e Estradiol 17 β Valerato. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Os Insumos farmacêuticos ativos (IFA) são em sua maioria produzidos e comercializados na forma de formulações sólidas. A eficácia terapêutica de cada IFA, no entanto, está diretamente relacionada com suas características no estado sólido. Desta forma, o controle e o entendimento da química das características físico-químicas de estado sólido dos IFAs, como produtos formulados ou substâncias puras, é uma importante parte do processo de desenvolvimento de novos medicamentos. Dentro deste marco, o presente trabalho tem o intuito de obter e caracterizar novas formas sólidas de dois compostos farmacêuticos, sendo eles, o fármaco anti-helmíntico Mebendazol e o hormônio Estradiol 17 β Valerato. A caracterização destes compostos foi realizada por meio da técnica de difração de raios X de monocristais e complementada com dados provenientes de outras técnicas tais como espectroscopia Infravermelho e Raman e análise térmica. A partir da amostra de mebendazol obteve-se um novo sal, o mesilato de mebendazol monohidratado que cristaliza no grupo espacial triclinico $P\bar{1}$. A unidade assimétrica deste composto apresenta uma molécula de MBZ, uma molécula de mesilato (metil sulfonato) e uma molécula de água. A análise estrutural mostrou que a molécula do princípio ativo apresenta ligação de hidrogênio intramolecular assistida por ressonância. No que diz respeito às interações intermoleculares, a presença dos íons mesilato e da água fazem com que o empacotamento cristalino seja mais compacto que o apresentado pelas outras formas sólidas reportadas na literatura devido à presença de ligações de hidrogênio fortes. Estas ligações dão lugar à formação de cadeias infinitas nas quais as moléculas de MBZ estão unidas por interações fortes envolvendo os íons mesilato. Essas cadeias por sua vez se arranjam de maneira a formar estruturas bidimensionais unidas entre si por interações envolvendo as moléculas de água, o que estabiliza o empacotamento tridimensional. O Estradiol 17 β Valerato, utilizado para tratamento de menopausa e em pílulas anticoncepcionais, não apresenta na literatura nenhuma caracterização

de estado sólido. O mesmo cristalizou no grupo espacial não centrossimétrico $P2_1$ com duas moléculas por unidade assimétrica as quais mostram evidências de desordem vibracional na cadeia terminal do grupo valerato. A análise térmica mostrou que este composto funde a 145°C sendo que o processo de decomposição da amostra acontece em 262°C . Analisando o comportamento térmico desse insumo a baixa temperatura constatou-se que ele apresenta uma transição de fase estrutural de primeira ordem em -22°C ao descer a temperatura e em -16°C ao subir. A caracterização estrutural deste sólido farmacêutico a 100K permitiu observar que a transição de fase está relacionada com uma forte mudança conformacional do grupo valerato.

Palavras-chave: Polimorfismo. Caracterização estrutural. Estado Sólido. Cloridrato de Mebendazol Monohidratado. Estradiol 17β Valerato.

ABSTRACT

PAULA, K. da. **Solid state characterization of the drugs:** Mebendazole Hydrochloride Monohydrate and 17 β Estradiol Valerate. 2012. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The active pharmaceutical ingredients (API) are mostly produced and marketed in the form of solid formulations. The therapeutic efficacy of each API, however, is directly related to its characteristics in the solid state. Thus the control and understanding of the chemistry of the physicochemical characteristics of solid state APIs as pure substances or formulated products, is an important part of the process of developing new drugs. Within this framework, this paper aims to obtain and characterize new solid forms of two pharmaceutical compounds, among them, the anthelmintic drug Mebendazole and hormone 17 β estradiol valerate. The characterization of these compounds was performed by means of diffraction X-ray single crystal and supplemented with data from other techniques such as infrared and Raman spectroscopy and thermal analysis. From the sample mebendazole obtained a new salt, mesylate monohydrate mebendazole which crystallizes triclinic space group $P\bar{1}$. The asymmetric unit of this compound exhibits a MBZ molecule, a molecule of mesylate (methyl sulphonate) and one water molecule. Structural analysis showed that the molecule of the active principle presents intramolecular hydrogen bond assisted by resonance. In respect of intermolecular interactions, the presence of mesylate ion and the water cause the crystal packing is more compact than that shown by the solid forms reported in the literature by the presence of strong hydrogen bonding. These bonds give rise to the formation of endless chains in which molecules are joined by MBZ strong interactions involving ions mesylate. These chains in turn are arranged so as to form two-dimensional structures but joined by interactions between the molecules involving water which stabilizes the three-dimensional packaging. The 17 β Estradiol valerate, used for treatment of menopause and in oral contraceptives, there has no literature characterization of the solid state. The same crystallized in the no centrosymmetric space group $P2_1$ with two molecules per asymmetric unit which show evidence of vibrational disorder in the chain terminal group valerate. Thermal analysis showed that this compound melting at 145°C and the process of decomposition of the sample occurs in 262°C. By analyzing the

thermal behavior of this input at low temperature it was found that it presents a structural phase transition of first order in -22°C to lower the temperature and -16°C to rise. The structural characterization of this solid pharmacist 100K allowed observing the phase transition is related to a strong conformational change valerate group.

Keywords: Polymorphism. Structural characterization. Solid State. Mebendazole hydrochloride monohydrate. 17β estradiol valerate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Formas sólidas dos compostos farmacêuticos.....	24
Figura 1.2 -	Diferentes arranjos e/ou conformações das moléculas na estrutura cristalina-polimorfos.....	26
Figura 1.3 -	Formação de solvatos e hidratos farmacêuticos.....	28
Figura 1.4 -	Formação de sais farmacêuticos.....	29
Figura 1.5 -	Formação de amorfos farmacêuticos.....	30
Figura 1.6 -	Formação de cocristais farmacêuticos.....	30
Figura 1.7 -	Curva de biodisponibilidade de um fármaco (quantidade absorvida=concentração plasmáticas X velocidade de absorção e excreção=tempo na circulação sistêmica.	34
Figura 2.1 -	Esquema da técnica de cristalização por evaporação lenta do solvente.	42
Figura 2.2 -	Passos seguidos para a determinação estrutural.....	44
Figura 2.3 -	Difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®), mostrando em destaque a cabeça goniométrica e o monocristal.....	45
Figura 2.4 -	Padrão de difração obtido para o mesilato monohidratado de mebendazol.....	45
Figura 2.5 -	Foto mostrando os equipamentos de DSC e TGA instalados no Instituto de Física de São Carlos.....	48
Figura 3.1 -	Monocristais de MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O.....	52
Figura 3.2 -	a) Difratoograma de pó experimental e b) difratoograma de pó teórico do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O.....	54
Figura 3.3 -	Diagrama tipo ORTEP-3 da unidade assimétrica do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O mostrando a numeração dos átomos e elipsoides térmicos com 50% de probabilidade. As interações intramoleculares clássicas estão tracejadas em roxo e as interações não clássicas em azul.	55
Figura 3.4 -	Desenho mostrando a região do efeito LHAR do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O ..	57
Figura 3.5 -	Planos entre os anéis benzimidazol e carbamato e o anel benzoíla	59
Figura 3.6 -	Empacotamento cristalino do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O, mostrando os canais hidrofílicos com os íons mesilato e as moléculas de água (a), em (b) a formação de fileiras intercaladas por moléculas de MBZ e íons ao longo da direção [100] em (c), ao longo da direção [010] e em (d) formação dos canais iônicos.....	60
Figura 3.7 -	Interações intermoleculares do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O ao longo da direção [010]. As interações intermoleculares clássicas estão esquematizadas como linhas tracejadas em azul e as não clássicas em roxo.....	62
Figura 3.8 -	Interações π - π no empacotamento cristalino do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O	63
Figura 3.9 -	Histogramas dos parâmetros conformacionais escolhidos, obtidos pelo programa MOGUL.....	66
Figura 3.10 -	Superposição da unidade assimétrica das formas sólidas do MBZ reportadas na literatura com o MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O (azul): (a) MBZ•Hbr (vermelho); (b) MBZ•HCl (laranja); (c) MBZ•Propiônico (rosa) e (d) Forma C (verde).....	68
Figura 3.11 -	Espectros infravermelho do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O.....	69
Figura 3.12 -	Espectro Raman do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O.....	70
Figura 4.1 -	Estrutura molecular do E1, E2 e E3.....	77
Figura 4.2 -	Estrutura molecular do Estradiol 17 β valerato.....	78
Figura 4.3 -	Cristais obtidos para o E2 β V.....	80
Figura 4.4 -	Diagrama tipo ORTEP-3 da unidade assimétrica do E2 β V a temperatura ambiente, mostrando a numeração dos átomos e	81

	elipsoides térmicos com 30% de probabilidade	
Figura 4.5 -	Ângulo formado pelos planos médio através dos anéis A, B, C e D para ambas as moléculas	82
Figura 4.6 -	(a) Superposição das moléculas A em vermelho e B em azul, (b) principais ângulos de torção que descrevem a conformação da cadeia valerato.....	83
Figura 4.7 -	Interações intramoleculares da molécula A e B do E2 β V a temperatura ambiente.....	84
Figura 4.8 -	Interações intermoleculares do E2 β V que forma a cadeias ao longo do eixo c.	85
Figura 4.9 -	Representação da interação C–H... π na estrutura a temperatura ambiente.....	87
Figura 4.10 -	Histograma do comprimento de ligação O3A-C19A obtido com o uso do programa MOGUL	88
Figura 4.11 -	Espectro Infravermelho do E2 β V.	89
Figura 4.12 -	Espectro Raman do E2 β V	90
Figura 4.13 -	Curvas de DSC do E2 β V	90
Figura 4.14 -	Curvas de TGA do E2 β V	91
Figura 4.15 -	Diagrama tipo ORTEP-3 da unidade assimétrica do E2 β V a 100K, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides térmicos com 30% de probabilidade	92
Figura 4.16 -	Empacotamento cristalino visto ao longo do eixo a da estrutura a temperatura ambiente (a) e 100K (b).	93
Figura 4.17 -	Curvas de DSC do E2 β V obtidas durante os ciclos de resfriamento e aquecimento a partir da temperatura ambiente.....	94
Figura 4.18 -	(a) Sobreposição entre as moléculas nas diferentes temperaturas. (b) Valores dos ângulos de torção que descrevem a conformação da cadeia terminal do grupo valerato do E2 β V a ambas as temperatura	95
Figura 4.19 -	(a) Interações intramoleculares da estrutura a 100K; (b) interações intramoleculares da temperatura de 298K	97
Figura 4.20 -	Interações intermoleculares do E2 β V para a baixa temperatura	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.3.1 -	Técnicas de caracterização de insumos farmacêuticos ativos, e seus principais aspectos	36
Tabela 3.1 -	Dados estruturais do mesilato de mebendazol monohidratado	53
Tabela 3.2 -	Parâmetros geométricos que caracterizam as interações intramoleculares do mesilato de MBZ. Os símbolos "D" e "A" se referem a átomos doador e receptor de hidrogênio, respectivamente	56
Tabela 3.3 -	Comprimentos de ligação do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O envolvidos na interação intramolecular ressonante comparados com os respectivos valores estatísticos obtidos usando o programa MOGUL	57
Tabela 3.4 -	Ângulos de torção selecionados para a molécula de MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O	58
Tabela 3.5 -	Parâmetros geométricos que caracterizam as Interações Intermoleculares do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O. Os símbolos "D" e "A" se referem a átomos doador e receptor de hidrogênio, respectivamente ...	60
Tabela 3.6 -	Valores de comprimentos de ligação (Å), ângulos de valência (°) e ângulos de torção (°) divergentes obtidos por meio da análise pelo programa MOGUL para o MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O.	64
Tabela 3.7 -	Dados cristalográficos das formas do MBZ reportadas na literatura	67
Tabela 3.8 -	Modos de vibração selecionados para os espectros de IV e Raman do MBZ-H•MeSO ₃ •H ₂ O.....	71
Tabela 4.1 -	Dados cristalográficos do E2βV	80
Tabela 4.2 -	Parâmetros geométricos que caracterizam as interações intermoleculares do E2βV. Os símbolos "D" e "A" se referem a átomos doador e receptor de hidrogênio, respectivamente	84
Tabela 4.3 -	Geometria (Å,°) das ligações de hidrogênio intermoleculares fortes no composto E2βV. Os símbolos "D" e "A" significam doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente	86
Tabela 4.4 -	Maiores discrepâncias para comprimentos de ligação (Å), ângulos de valência (°) e ângulos de torção (°) da estrutura E2βV obtidas com o uso do MOGUL.....	87
Tabela 4.5 -	Dados cristalográficos do E2βV coletados a temperatura ambiente e baixa temperatura.....	92
Tabela 4.6 -	Interações intramoleculares do E2βV para a baixa temperatura. Os símbolos "D" e "A" são doador e receptor de hidrogênio, respectivamente	96
Tabela 4.7 -	Geometria (Å,°) das ligações intermoleculares de hidrogênio do E2βV a 100K. Os símbolos "D" e "A" significam doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCS	Sistemas de classificação Biofarmacêutica
API	Active Pharmaceutical Ingredient
CCD	Charge-Coupled Device
Cg	Centróide
CSD	Cambridge Estructural Database
DHEA	Desidroepiandrosterona
DRXMC	Difração de Raios X por Monocristal
DRXP	Difração de Raios X por Pó
DSC	Differential Scanning Analysis
E1	Estrona
E2	Estradiol 17 β Valerato
E3	Estriol
FSH	Hormônio Estimulante Folicular
FDA	Food and Drug Administration
GnRH	Hormônio Liberador de Gonatrofina
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IR	Infrared
LH	Hormônio Luteinizante
LHAR	Ligação de Hidrogênio Assistida por Ressonância
MBZ	Mebendazol
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mRNA	RNA mensageiro
NDA	New Drug Application
OMS	Organização Mundial da Saúde
RAHB	Resonance assisted Hydrogen Bon
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMSD	Root Mean Square-Desvio Quadrático Médio
SEM	Scanning Electron Microscope
SERMs	Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrogênio
TGA/TG	Termogravimetric Analysis

vdW

Wan Der waals

Sumário

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	FORMAS CRISTALINAS DE FÁRMACOS	23
1.2	POLIMORFOS, SOLVATOS, AMORFOS, SAIS E CO-CRISTAIS	25
1.2.1	Polimorfos	25
1.2.2	Solvatos.....	27
1.2.3	Sais	29
1.2.4	Amorfos	29
1.2.5	Cocristais.....	30
1.2.6	Polimorfismo na Indústria Farmacêutica	31
1.2.7	Propriedades físico-químicas das formas cristalinas.....	32
1.2.8	Biodisponibilidade e Higroscopicidade.....	33
1.3	TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS	35
1.4	OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	37
2	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	39
2.1	CRISTALIZAÇÃO	39
2.2	TÉCNICAS DE CRISTALIZAÇÃO	41
2.2.1	Evaporação lenta do solvente	41
2.3	PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS	42
2.4	DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR MONOCRISTAL	43
2.5	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	47
2.6	ANÁLISES TÉRMICAS	47
3	MEBENDAZOL	49
3.1	INTRODUÇÃO	49
3.2	EXPERIMENTAL.....	52
3.2.1	Materiais	52
3.2.2	Formação do Sal.....	52
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
3.3.1	Conformação molecular	55
3.3.2	Empacotamento cristalino e interações intermoleculares.....	59
3.3.3	Análise estatísticas dos parâmetros moleculares.....	63
3.3.4	Comparação com estruturas já reportadas na literatura.....	66
3.3.6	Espectros Vibracionais.....	68
3.4	CONCLUSÃO	74

4 ESTRADIOL 17β VALERATO	75
4.1 INTRODUÇÃO	75
4.2 EXPERIMENTAL	79
4.2.1 Obtenção de cristais	79
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
4.3.1 Conformação molecular	82
4.3.2 Empacotamento Cristalino	84
4.3.3 Análise Estatística da Conformação Molecular	87
4.3.4 Caracterização Espectroscópica e Térmica	88
4.3.5 Transição de Fase	91
4.3.6 Conformação Molecular a 100K	95
4.3.7 Interações intra e intermoleculares a baixa temperatura	96
4.4 CONCLUSÃO	99
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	101
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES	113
Apêndice A – Técnicas utilizadas neste trabalho	113
Apêndice B – Mesilato Monohidratado de Mebendazol	117
Apêndice C – Estradiol 17 β Valerato	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 FORMAS CRISTALINAS DE FÁRMACOS

Insumos farmacêuticos ativos (IFAs – do inglês *active pharmaceutical ingredient*, API) ou fármacos são definidos como substâncias que apresentam algum tipo de atividade farmacológica, sendo, portanto, destinados ao emprego em medicamentos e responsáveis pelos seus efeitos farmacológicos. Atualmente, a maioria dos medicamentos são produzidos e comercializados na forma de dosagem oral e com formulações sólidas, isto é, nas formas de comprimidos, cápsulas, drágeas, pílulas, etc. Isto deve-se ao fato de que, em geral, a forma sólida é mais conveniente e compacta. A forma sólida é a forma mais estável e econômica de distribuição de produtos farmacêuticos.¹

A eficácia terapêutica de cada IFA, no entanto, está diretamente relacionada com suas características no estado sólido. Desta forma o controle e o entendimento da química dos IFAs, como produtos formulados ou substâncias puras, é uma importante parte do processo de desenvolvimento de novos medicamentos.²⁻⁴ Os IFAs podem apresentar inúmeras formas no estado sólido, de origem sintética ou natural, cada uma podendo exibir diferentes propriedades físico-químicas, tais como cor, morfologia, estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade.⁵⁻⁸ Dentre essas formas, destacam-se os polimorfos (IFAs com mesma fórmula química, mas diferente estrutura cristalina), os solvatos (IFAs com moléculas de solventes agregadas à sua rede cristalina), os sais (IFAs cristalizados com ácidos ou bases), os cocristais (IFAs cristalizados com outras substâncias sólidas e neutras em condições ambientes, inclusive cristalizados com outros IFAs) e os amorfos (IFAs com estruturas cristalinas desordenadas no espaço tridimensional).^{1,9-11} Assim, é de fundamental importância e interesse coletivo procurar conhecer as propriedades físico-químicas de cada forma sólida de um IFA, visando com isso o desenvolvimento de formulações farmacêuticas mais eficazes que representem menos riscos à saúde da população.^{5,11-14}

Nesse contexto, é ainda válido considerar que além de formas sólidas distintas, os IFAs podem ainda apresentar formas estáveis ou metaestáveis. Normalmente a forma mais estável é escolhida para o desenvolvimento de um produto final, no entanto, fases metaestáveis ou amorfas estão sendo cada vez mais empregadas em formulações devido aos seus melhores perfis de atividade, quando comparadas com as fases cristalinas ordenadas.^{2,12}

De modo resumido a Figura 1.1 apresenta um diagrama de compostos farmacêuticos quando no estado sólido. Dessas, as formas mais comumente encontradas em formulações serão abordadas com maiores detalhes nas subseções seguintes.

Figura 1.1 – Formas sólidas dos compostos farmacêuticos.

As formas sólidas dos fármacos são de grande importância para a formulação de novos medicamentos, principalmente no que se refere à sua eficácia. No Brasil, os medicamentos de origem sintética estão divididos em três categorias de acordo com o registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): medicamentos novos, similares e genéricos.¹⁵ Os medicamentos novos compreendem IFAs inovadores e são utilizados como referências para os demais medicamentos presentes no mercado, denominados similares e genéricos. Esses últimos, para serem aprovados e liberados para produção e comercialização, devem comprovar eficácia, equivalência farmacêutica e biodisponibilidade semelhantes às do medicamento de referência adotado.¹⁶ No entanto, no caso dos medicamentos

genéricos, a premissa é que o ingrediente ativo apresente uma taxa de absorção similar à do medicamento de referência, para que seja terapeuticamente inserido no mercado de forma segura e eficaz.³

Uma parte muito importante do processo de desenvolvimento e fabricação de um fármaco é o controle das características físico-químicas do mesmo no estado sólido. Algumas destas características incluem a sua estrutura cristalina (arranjo tridimensional interno das moléculas que compõem um cristal), o seu hábito cristalino (morfologia externa) e o tamanho das partículas que o compõem. Cada forma sólida de um fármaco pode possuir propriedades físico-químicas diferentes e entre elas se incluem a solubilidade e a biodisponibilidade do fármaco.¹⁷

Para o desenvolvimento de um novo fármaco (*NDA – New Drug Application*) um dos aspectos fundamentais a ser considerado é a aquisição de informações sobre a existência de diferentes formas sólidas e o impacto das mesmas sobre a qualidade e o desempenho do composto. De acordo com o FDA (do inglês *Food and Drug Administration*), órgão norte-americano que regula e aprova o uso de medicamentos nesse país, é necessário que procedimentos analíticos sejam implementados para a caracterização e detecção de possíveis formas polimórficas, hidratos, sais, amorfos e/ou co-cristais de compostos candidatos a fármacos.¹⁸ Isto sugere a regulamentação das etapas e dos processos envolvidos na produção e no desenvolvimento de um fármaco, para que o mesmo possa ser aprovado para uso como medicamento. Tais normas provêm o controle de formas cristalinas dos fármacos.¹⁸

1.2 POLIMORFOS, SOLVATOS, AMORFOS, SAIS E CO-CRISTAIS

1.2.1 Polimorfos

Polimorfismo, do grego *poly* = muitos e *morph* = forma, define a “propriedade que apresentam os compostos químicos de cristalizarem em várias formas genericamente distintas”.^{19,20} O polimorfismo foi observado pela primeira vez

pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth em 1788, que identificou duas formas do carbonato do cálcio, a calcita e a aragonita.^{19,20}

Porém, o termo só foi definido em 1965, pelo químico norte-americano Walter Cox McCrone: “um polimorfo é uma fase de um sólido cristalino de um dado composto resultante da possibilidade de pelo menos dois arranjos diferentes das moléculas deste mesmo composto no estado sólido” (tradução nossa) (veja Figura 1.2).¹⁹⁻²¹

Figura 1.2 – Diferentes arranjos e/ou conformações das moléculas na estrutura cristalina - polimorfos.

Atualmente, o polimorfismo cristalino é definido como a capacidade de um composto de existir no estado sólido em mais de um arranjo cristalino (Figura 1.2). Na indústria farmacêutica, o termo polimorfismo é utilizado do modo mais amplo possível, englobando tanto as formas cristalinas ordenadas (arranjos organizados das moléculas) quanto às formas amorfas (arranjos desordenados).^{19,21}

Das mais de 600.000 estruturas cristalinas depositadas no banco de dados da Cambridge (CSD, do inglês *Cambridge Structural Database*)²², no qual são depositadas todas as estruturas de compostos orgânicos e organometálicos, cerca de 15.000 tratam-se de estruturas polimórficas.²³ Dentre elas se incluem 70% dos barbituratos, 60% das sulfonamidas e 23% dos esteroides, evidenciando a ocorrência de um número considerável de polimorfos.²⁴

De acordo com as diferenças estruturais no empacotamento das redes cristalinas, os polimorfos se dividem em polimorfos conformacionais e polimorfos orientacionais.²⁵

No *polimorfismo conformacional* as moléculas flexíveis (que possuem liberdade de rotação sobre as ligações químicas) são capazes de se contorcerem e, portanto, empacotarem-se em diferentes estruturas tridimensionais.²⁶ No *polimorfismo orientacional*, ou de *empacotamento*, as moléculas rígidas (que não possuem liberdade de rotação sobre as ligações químicas) empacotam-se de modo diferenciado e originam estruturas tridimensionais distintas.²⁷

Dentre as propriedades físico-químicas mais afetadas pelo polimorfismo, merece destaque a solubilidade, que é um fator determinante para a liberação e absorção do fármaco, apresentando um importante papel na biodisponibilidade^{21,28}. É possível que um sólido farmacêutico, com boa solubilidade em determinada forma polimórfica, apresente uma nova forma polimórfica, com solubilidade reduzida ou até mesmo ausente, resultando em perda de atividade biológica, ou solubilidade aumentada, resultando em toxicidade no organismo.^{26,27}

1.2.2 Solvatos

Em muitos estágios do processo industrial de produção de medicamentos, os IFAs são expostos a solventes ou vapores de solventes. Os procedimentos mais importantes nos quais solventes estão envolvidos são a precipitação e a cristalização ou recristalização. Porém, o que ocorre muitas vezes nestes tipos de procedimentos é a captura do solvente de cristalização por parte do sólido, causando quase que invariavelmente problemas na cristalização industrial.²⁹

O solvente é capaz de associar-se com o sólido cristalino de diversas maneiras podendo ligar-se à superfície ou à rede do sólido por meio de interações intermoleculares (ligações de hidrogênio, van der Waals, dipolo-dipolo). Ele pode ser fisicamente aprisionado pelo cristal em crescimento ou pode ser absorvido por regiões desordenadas do cristal. Dentre elas, destaca-se a associação na qual o solvente é capaz de empacotar-se e cristalizar-se juntamente com um IFA como parte da estrutura cristalina, constituindo um *solvato* (Figura 1.3).³⁰

Os solvatos são subdivididos em: *solvatos estequiométricos* e *solvatos não-estequiométricos*. Nos *solvatos estequiométricos*, a razão molar solvente/IFA é constante, de modo que a dessolvatação sempre resultará em novas estruturas

cristalinas, desordenadas ou amorfas, uma vez que o solvente é parte essencial na manutenção da rede molecular. Exemplos importantes incluem a ampicilina tri-hidratada e a teofilina mono-hidratada.²⁷ Já nos *solvatos não-estequiométricos*, a razão molar solvente/IFA é variável, de modo que cabe ao solvente atuar mais como um preenchedor de espaços vazios presentes na rede molecular do IFA. Geralmente IFAs de alto peso molecular, com geometrias atômicas flexíveis, são os que tendem a formar solvatos não-estequiométricos.^{27, 29-31}

Figura 1.3 – Formação de solvatos e hidratos farmacêuticos.

No entanto, ao contrário dos solvatos estequiométricos, os solvatos não-estequiométricos são capazes de perder todo o solvente (*solvato dessolvado*) conservando, porém, as características estruturais do IFA. Por isso, solvatos dessolvados podem ser considerados como polimorfos de IFAs anidros.²⁷

Quando o solvente incorporado à rede cristalina do IFA é a água, ocorre a formação dos chamados *hidratos* (Figura 1.3). Essa classe de solvato é a única a receber nomenclatura diferenciada, uma vez que a água é um dos solventes com maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio, sendo por essa razão amplamente utilizada na preparação de solvatos.^{2,32} Além disso, a formação de hidratos reduz a quantidade de energia liberada no processo de dissolução em água o que, em geral, aumenta a velocidade de dissolução de um IFA.³³

1.2.3 Sais

Muitos IFAs comportam-se como eletrólitos fracos (ácidos ou bases) que, quando submetidos à reação ácido-base apropriada, possuem a capacidade de formar *sais* (Figura 1.4). Nessa reação, ocorre uma transferência de cargas entre o IFA e o ácido ou base incorporado à unidade constituinte do cristal. É essa transferência de carga que caracteriza a formação de um sal (Figura 1.4).^{27,34} A formação de sais farmacêuticos é desejável principalmente para IFAs com problemas de cristalização, de solubilidade, de baixos pontos de fusão, com altos índices de ocorrência de polimorfismo, etc. Portanto, é de fundamental importância a seleção de ácidos e bases adequados às propriedades que se deseja adquirir por meio da formação de sais com IFAs, considerando-se que cada sal apresenta perfis individuais de propriedades físico-químicas, não necessariamente iguais para diferentes sais de um mesmo composto.^{27,35}

Figura 1.4 – Formação de sais farmacêuticos.

1.2.4 Amorfos

Apesar de não se poder estabelecer uma definição clara entre sólidos cristalinos e amorfos, reforçados pela existência de famílias de fases sólidas com diferentes tipos de desordem, esses sólidos parcialmente cristalinos recebem o nome de mesofases (Figura 1.5). No contexto do polimorfismo, dependendo da definição adotada, uma fase amorfa pode ou não ser considerada um polimorfo. Às vezes, o termo polimorfismo é empregado para incluir também diferentes formas amorfas de um mesmo composto.³⁶

Embora as mesofases não superem o uso de formas cristalinas de IFAs, nas ultimas décadas as mesmas têm sido mais amplamente empregadas em determinadas formulações farmacêuticas. Isso se deve principalmente ao fato de que os sólidos amorfos, por não exibirem arranjo ordenado de longa escala, assemelhando-se, portanto, ao arranjo molecular dos líquidos, apresentarem melhores perfis de velocidade de dissolução, solubilidade, biodisponibilidade e até mesmo de compressibilidade quando comparados às formulações com IFAs cristalinos.³⁶

1.2.6 Polimorfismo na Indústria Farmacêutica

O polimorfismo tem importante aplicação na indústria farmacêutica, principalmente no que se refere à obtenção de um princípio ativo com propriedades farmacocinéticas aperfeiçoadas. Sua ocorrência indesejada é capaz de afetar a estabilidade química do composto candidato a IFA, resultando em diferentes propriedades físico-químicas, podendo também afetar a biodisponibilidade do mesmo em relação a outros princípios ativos. Devido a isso, a implementação de um novo princípio ativo pela indústria farmacêutica depende de vários fatores, dentre os quais que o IFA seja suficientemente solúvel e estável e se mantenha na mesma forma durante as diferentes condições de fabricação e de processamento. Assim, para o preparo de um novo medicamento, faz-se necessário procurar conhecer todas as possíveis formas polimórficas de um fármaco assim como a sua estabilidade relativa.^{36,40} O desconhecimento destas formas e de suas respectivas propriedades pode causar sérios problemas do ponto de vista econômico, uma vez que a via de obtenção de polimorfos de um mesmo composto é patenteável. Devido a isso, o polimorfismo tem contribuído para o desenvolvimento de medicamentos.⁴⁰

De maneira geral, ao buscar diferentes arranjos cristalinos para um determinado fármaco, geralmente o que se deseja é melhorar sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, a eficácia do medicamento. Portanto, a engenharia de cristais moleculares é uma estratégia fundamental no que se refere a aperfeiçoar a eficácia dos medicamentos, uma vez que diferentes modificações cristalinas de um mesmo composto podem ser mais ou menos solúveis, estáveis, tóxicas, etc.²⁷

Alguns dos possíveis problemas oriundos da ocorrência de polimorfismo de fármacos na indústria farmacêutica, em relação às principais alterações que podem causar um grande impacto na sua toxicidade e atividade são: estabilidade química, alterações físicas durante a armazenagem, higroscopicidade, purificação e processabilidade do medicamento. Algumas conseqüências disso são: alteração do perfil de degradação, homogeneidade do fármaco, atividade, toxicidade, solubilidade, modificações de características físicas, dentre outras.^{41,42}

Do ponto de vista sanitário, o controle de qualidade de um medicamento requer que qualquer característica de um fármaco, que possa afetar sua

estabilidade, sua biodisponibilidade e sua segurança devam ser controladas e monitoradas.⁴²

1.2.7 Propriedades físico-químicas das formas cristalinas

A cada forma sólida de um fármaco, seja ele um polimorfo, sal, cocrystal, solvato, hidrato e/ou amorfo, estão associadas propriedades físico-químicas, que podem diferir entre si.

Algumas dessas propriedades físico-químicas que podem diferir entre as formas cristalinas são: (1) propriedades de empacotamento: higroscopicidade, volume, densidade molar, índice de refração, condutividade elétrica e térmica; (2) propriedades termodinâmicas: energia interna, potencial químico, solubilidade, pressão de vapor, etc.; (3) propriedades espectroscópicas: transições vibracionais (absorção do espectro do infravermelho e Raman), transições eletrônicas (ultravioleta), transições rotacionais (absorção do espectro do infravermelho e microondas) e transições nucleares (spin) (espectro de ressonância magnética nuclear); (4) propriedades cinéticas: a razão de dissolução, as variações nas reações de estado sólido e a estabilidade; (5) propriedades de superfície: energia livre de superfície, forma e tensões interfaciais e (6) propriedades mecânicas: força tensão e dureza.^{3,27}

Entre as propriedades físicas mais importantes, a serem consideradas nos fármacos, pode-se citar:

- Velocidade de Dissolução e Solubilidade;
- Biodisponibilidade e Bioequivalência;
- Higroscopicidade;
- Estabilidade Física e Química;
- Manufaturabilidade.

A *dissolução* é o processo pelo qual um fármaco, no estado sólido, torna-se diluído em um determinado solvente.³ Para que haja a absorção do fármaco, primeiramente o mesmo precisa ser dissolvido no líquido do local de absorção.⁴³

A *solubilidade* é a massa de soluto que se dissolve em uma massa ou volume específico de solvente em função da temperatura e da pressão.³ Esta é um fator determinante para a absorção do fármaco no sistema.⁴⁴ Um fármaco pode ser definido como "pouco solúvel" quando sua velocidade de dissolução for menor que o tempo do transporte intestinal desse fármaco, resultando em uma biodisponibilidade incompleta.⁴⁵ A solubilidade aquosa de um fármaco depende das características moleculares dos mesmos.⁴⁶ Esta solubilidade aquosa consiste em um importante parâmetro para determinar a velocidade da sua dissolução, e nos fármacos "pouco ou fracamente solúveis", esta solubilidade normalmente é menor que 100µg/mL.⁴⁵

A dissolução é uma propriedade dinâmica, enquanto que a solubilidade é uma propriedade estática, mas ambas constituem as características mais importantes de um fármaco, uma vez que seus valores determinam a biodisponibilidade do fármaco para o efeito terapêutico desejado.³

1.2.8 Biodisponibilidade e Higroscopicidade

Para o FDA a *biodisponibilidade* significa "*a velocidade e extensão pela qual uma substância ou porção terapêutica é absorvida da forma farmacêutica e torna-se disponível no local de ação do fármaco*".^{18,47}

No Brasil, a Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999 estabeleceu as bases legais para a instituição do medicamento genérico no País. Nela, o termo biodisponibilidade foi estabelecido como "*a extensão de absorção e a velocidade de um princípio ativo em uma forma de dosagem, a partir da curva de concentração/tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina*".^{48,49}

Uma das preocupações de agentes regulatórios em relação ao polimorfismo em fármacos baseia-se no efeito que o mesmo pode ter sobre a biodisponibilidade/bioequivalência do medicamento. A influência do polimorfismo na biodisponibilidade do fármaco é considerada a consequência mais importante do fenômeno na área farmacêutica e ocorre quando existe dependência entre a velocidade de absorção e a velocidade de dissolução *in vivo*.⁵⁰

A biodisponibilidade é caracterizada por uma curva de concentração do fármaco na circulação sistêmica *versus* o tempo. Dois dos parâmetros mais importantes que caracterizam esta curva é a concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) – que é a quantidade máxima absorvida a partir da dose administrada ou o pico de absorção menos o tempo gasto para atingir tal concentração máxima ou pico de concentração ($t_{\text{máx}}$) (Figura 1.7).^{27,47}

Figura 1.7 – Curva de biodisponibilidade de um fármaco (quantidade absorvida=concentração plasmática X velocidade de absorção e excreção=tempo na circulação sistêmica).

De acordo com a Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, “*bioequivalência*” consiste na “*demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativo(s), e que tenham comparável biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental*”.⁴⁸

Dois fármacos são considerados bioequivalentes quando: (1) a extensão de absorção é pouco divergente entre eles ou a diferença na velocidade de absorção é intencional ou (2) a extensão e a velocidade de absorção dos mesmos não apresentam diferenças significativas quando administrados com a mesma dose molar do ingrediente ativo e sob as mesmas condições experimentais.⁴⁸

Estudos de biodisponibilidade e bioequivalência são de grande importância para a determinação da segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos.^{16,48} Deste modo, os estudos realizados de biodisponibilidade são úteis para definir qual é o efeito(s) da forma de dosagem na farmacocinética do mesmo, enquanto que os estudos de bioequivalência são utilizados para efeitos de comparação entre biodisponibilidade de um mesmo princípio ativo em produtos farmacêuticos diferentes.⁵¹

O termo *Higroscopicidade* é utilizado na literatura farmacêutica para a descrição da percepção de umidade dos materiais, ou seja, é a capacidade de um composto em ganhar ou perder água quando em contato ou exposto a uma grande quantidade de umidade, porém ainda não possui uma definição explícita.⁵²⁻⁵⁴ Diferentes propriedades físico-químicas, tais como morfologia, cristalinidade, estrutura do cristal e o estado de hidratação (se hidrato ou anidro) afetam a absorção de água sob diferentes condições experimentais.⁵² Por tal motivo a higroscopicidade é sempre analisada nos primeiros estágios de seleção de novos compostos candidatos à formulação de novos medicamentos.^{52,53}

A *estabilidade* do medicamento é uma preocupação quanto ao efeito que o polimorfismo pode causar sobre elas. Esta estabilidade é baseada em diferenças de reatividade química entre várias formas polimórficas.⁵⁵ Nas propriedades físicas as diferenças dependem da estrutura do polimorfo, formulação e processamento. Durante o processamento pode ocorrer transformação de fase e alteração na formulação (por exemplo: compactação, secagem, moagem).⁵⁵

Outra preocupação relevante em relação ao polimorfismo de fármaco é a ação que ele pode ter sobre a *produção* ou *manufaturabilidade* dos medicamentos. A produção de medicamentos depende não apenas das propriedades mecânicas e morfológicas intrínsecas da forma do fármaco, mas também do processo de produção e formulação do mesmo.⁵⁶

1.3 TÉCNICAS UTILIZADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

Os sólidos farmacêuticos podem ser caracterizados e diferenciados pelas suas propriedades físico-químicas empregando métodos tais como técnicas de

microscopia óptica e eletrônica, as quais permitem visualização do hábito cristalino fornecendo informações valiosas durante a triagem pela busca das formas polimórficas, a difração de raios X, a análise térmica (DSC e TG) e a espectroscopia vibracional (IR, Raman).^{5,8,57} A Tabela 1.3.1 resume os métodos analíticos utilizados para a caracterização de sólidos farmacêuticos. Algumas destas técnicas utilizadas neste trabalho serão discutidas brevemente a seguir. No Apêndice A encontra-se uma breve discussão das técnicas que foram utilizadas neste trabalho.

Tabela 1.3.1 – Técnicas de caracterização de insumos farmacêuticos ativos e seus principais aspectos.^{36,41,58-59}

Técnica	Medidas obtidas	Aplicações
<i>FTIR, DRIFT, ATR</i>	Espectro no Infravermelho (IR)	Vibrações intramoleculares; Quantificação de fases; Formas polimórficas: picos de deslocamento; Avaliação de solventes e solvatos; Informações químicas com configurações de imagens Pouca quantidade de amostra
Calorimetria Diferencial De Varredura (DSC)	Fluxos de calor <i>versus</i> temperatura	Pequena quantidade de amostra; Análise quantitativa e qualitativa; Informações termodinâmicas, que possibilitam o estudo de transições e quantificação limitada em função de efeitos cinéticos e as impurezas modificam o ponto de fusão.
<i>Termogravimetria (TG)</i>	Variação de massa em função da temperatura	Pouca quantidade de amostra; Transições envolvendo ganho ou perda de massa; Temperatura de decomposição; Estudos de estabilidade; Estudos de solvatos, hidratos;
<i>Raman</i>	Espectro Raman	Informações complementares ao IR; Quantificação de fases; Não é necessário preparo da amostra; Rápida aquisição de dados; Método não destrutivo; Resistente à água.
<i>Microscopia, SEM</i>	Microscopia por reflexão da luz por elétrons	Microscopia térmica, IR e Raman; Determinação de sistemas cristalinos; Análise de superfície.

1.4 OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

O objetivo desta dissertação foi o desenho, obtenção e caracterização de novas modificações sólidas de insumos farmacêuticos com o intuito de contribuir ao desenho de medicamentos com propriedades farmacocinéticas aprimoradas. A caracterização estrutural das formas sólidas obtidas foi realizada utilizando dados de difração de raios X em amostras monocristalinas complementadas com aqueles obtidos por espectroscopias vibracionais e análise térmica. Com todas essas técnicas foi possível se ter uma ampla informação das propriedades do estado sólido destes insumos. Neste contexto decidimos estudar dois fármacos amplamente comercializados e que apresentam uma vasta literatura referente aos seus problemas associados com o polimorfismo e novas formas sólidas.

No Capítulo 1 encontra-se uma introdução à caracterização e os tipos de formas sólidas, assim como suas propriedades físico-químicas, abordando também sucintamente o polimorfismo de fármacos e as principais técnicas que são utilizadas para a análise e caracterização dos mesmos.

O Capítulo 2 contém as etapas de cristalização para a obtenção de novas formas cristalinas e uma breve descrição das técnicas que foram utilizadas neste trabalho.

O Capítulo 3 a caracterização de um novo sal de mebendazol, sendo, mesilato de mebendazol monohidratado. Este por sua vez apresenta formas polimórficas que foram correlacionadas a este novo sal para uma comparação entre suas diferentes estruturas.

No Capítulo 4 descreve-se a caracterização de uma nova forma sólida do hormônio estradiol, utilizado em anticoncepcional muito utilizado nos dias de hoje. Foram realizadas técnicas complementares como análises vibracionais e térmicas em função da temperatura.

No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões gerais deste trabalho e suas perspectivas.

2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.1 CRISTALIZAÇÃO

A cristalização é um dos métodos de grande importância para a obtenção de compostos sólidos com um alto grau de pureza durante os estágios iniciais ou finais da purificação e separação dos compostos. O objetivo principal da cristalização é a determinação da zona de metaestabilidade associada à nucleação e crescimento de cristais.^{42,60} Nela criam-se condições termodinâmicas (pH, proporção de solventes, taxa de vaporização da matriz do solvente, pressão, temperatura e fase aquosa quando presente), que levam as moléculas a se agruparem em estruturas organizadas.³⁴

A *Zona de metaestabilidade* é definida pela diferença entre a temperatura inicial de precipitação de soluto, para um dado valor de concentração da solução, e a temperatura de saturação. O conhecimento dessa função em relação à velocidade de arrefecimento permite o estudo da cinética da cristalização assim como delinear procedimentos para a nucleação e o crescimento de cristais em condições controladas.⁶⁰ Na *nucleação* dá-se a formação de núcleos cristalinos. Ela ocorre quando o solvente/soluto atinge a saturação, começando assim a precipitação do soluto. Isto faz com que as moléculas do sólido se agreguem para a formação de pequenas partículas (nano cristais), o produto da nucleação são sementes (germes) que darão posteriormente origem ao cristal.^{61,62} É nesse estágio em que há um arranjo das moléculas de uma forma periódica e definida.³⁴

Os processos da nucleação podem ser divididos em:

Nucleação Primária	Homogênea
	Heterogênea
Nucleação Secundária	Originada por cristais
	Originada por camada intermediária
	Contato

A nucleação primária está caracterizada por mecanismos nos quais não se requer cristais pré-existentes. Neste caso a solução é absolutamente pura e a nucleação primária pode ser homogênea. Isto leva a flutuações espontâneas na densidade do líquido que permitem a formação da forma sólida mais estável.^{34,62} A nucleação primária heterogênea está relacionada com a indução da cristalização por partículas exógenas como, por exemplo, poeiras em suspensão provenientes da atmosfera ou impurezas dissolvidas.⁶⁰

A nucleação secundária é resultante da adição de pequenos cristais do composto em estudo na solução saturada que funcionam como núcleos de precipitação. Tal procedimento é o método mais utilizado em nível industrial devido à obtenção de uma melhor reprodutibilidade na determinação da zona de metaestabilidade.^{60,62} Diversos mecanismos de nucleação secundária são conhecidos. Dentre eles pode-se mencionar a nucleação por contato, onde núcleos cristalinos são gerados na fase sólida, e nucleação na camada intermediária, onde núcleos são gerados na camada líquida aderida a uma superfície.⁶²

Por fim, o *crescimento de cristais* é definido como a variação de ao menos uma dimensão do cristal em relação a um período de tempo: uma vez formada a semente de cristalização na solução de soluto, as moléculas se aproximam dela, atraídas por interações intermoleculares levando à agregação delas em torno da semente.^{61,63} Dependendo das condições, a nucleação ou o crescimento podem ser predominantes um sobre o outro, o que origina cristais com tamanhos e formatos diferentes. Logo, uma das características do processo de cristalização é que o mesmo composto pode dar origem a diferentes formas cristalinas dependendo das condições de operação.³⁴

Para se obter um bom cristal adequado para a realização de experimentos de difração de raios X em monocristal, é preciso que as moléculas estejam associadas e empacotadas exatamente da mesma maneira em um arranjo tridimensional. É também necessário que a amostra esteja na forma de um monocristal com dimensões adequadas, em torno de (0,1 X 0,1 X 0,1) mm, e não possuam imperfeições como germinações, impurezas, etc.⁶⁴

2.2 TÉCNICAS DE CRISTALIZAÇÃO

Na cristalização precisa-se avaliar um grande número de fatores tais como a pressão, a temperatura, os solventes, a concentração dos reagentes, os tipos e as dimensões dos recipientes a serem utilizados para a cristalização, entre outros.⁶⁵

Existem variadas técnicas para a obtenção de monocristais. Uma das mais utilizadas é a de evaporação lenta do solvente. Esta foi a técnica utilizada neste trabalho devido a seu baixo custo e praticidade. Porém existem outras técnicas tais como a de difusão de vapor e de difusão líquida.⁶¹

2.2.1 Evaporação lenta do solvente

A técnica de evaporação lenta do solvente é de simples execução e fornece em muitos casos bons resultados na obtenção de monocristais. Nessa técnica, o sólido a ser cristalizado é dissolvido em um solvente ou em uma mistura de solventes, que apresentam características de evaporação rápida, permitindo que apareçam germes de cristalização. (Figura 2.1).⁶³

As etapas fundamentais tais como a escolha do solvente, podem influenciar o crescimento dos cristais. Os recipientes devem ser escolhidos de forma adequada, pois é um fator determinante para a evaporação do solvente. Quando eles têm diâmetros grandes a evaporação pode ser mais rápida, enquanto que um recipiente com diâmetro menor leva a uma evaporação mais lenta. A temperatura pode ser um fator a ser controlado.

Nesse procedimento o uso de recipientes menores mantidos semi-abertos pode ser indispensável, pois permite que o solvente evapore mais devagar. Isto propicia a formação de uma rede mais ordenada.^{61,63}

Figura 2.1– Esquema da técnica de cristalização por evaporação lenta do solvente.

Cada um dos compostos utilizados nesse trabalho foi cristalizado através da técnica de evaporação lenta do solvente, realizada em recipientes abertos e mantidos em temperatura ambiente.

2.3 PREPARAÇÕES DAS AMOSTRAS

As amostras de Estradiol Valerato foram cedidas pela farmácia Rosário, São Carlos-SP, Brasil. Os protocolos de cristalização deste insumo farmacêutico foram desenvolvidos no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos - USP. Para a obtenção de monocristais de Estradiol Valerato foram realizados vários testes de cristalização utilizando a técnica de evaporação lenta do solvente em temperatura ambiente. O protocolo de cristalização do Mesilato de Mebendazol Monohidratado foi desenvolvido em colaboração com a Profa. Griselda Narda da Universidad Nacional de San Luis, Argentina. As descrições completas das técnicas de cristalização destes fármacos se encontram com mais detalhes em seus respectivos capítulos.

2.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR MONOCRISTAL

Cristais de boa qualidade foram selecionados para a realização de experimento de DRXM. Os mesmos foram analisados com uma lupa com polarizadores e régua milimétrica (Olympus®) com o intuito de verificar a sua qualidade. Após os cristais serem selecionados foram montados em um capilar de vidro, que não difrata a radiação X por ser amorfo. O capilar deve ser de espessura menor ou igual a do cristal a ser colado para que suporte o peso do mesmo, mas não atrapalhe a medida. O cristal é colado no capilar utilizando uma cola de secagem rápida do tipo epóxi. A Figura 2.2 mostra os passos que foram seguidos para a determinação estrutural.

Para a realização das coletas de dados de difração de raios X dos compostos analisados neste trabalho foi utilizado um difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®) instalado no Instituto de Física de São Carlos. Este equipamento possui uma câmera CCD (*Charge-Coupled Device*) de 95mm como detector. É constituído por uma fonte de raios X tipo tubo selado, um goniômetro com geometria *kappa*, no qual possui um sistema de quatro graus de liberdade sendo eles: θ (*theta*), ω (*ômega*), κ (*kappa*) e φ (*phi*). Neste último eixo está localizada a cabeça goniométrica na qual é montado o cristal e a qual está apoiada sobre o bloco *kappa*.⁶⁶

Figura 2.2 – Passos seguidos para a determinação estrutural.

O bloco kappa está posicionado sobre o bloco ômega, podendo rotacionar em torno do eixo ω (ômega), sendo este posicionado à base do difratômetro. Um quarto eixo rotacional, que é responsável pelo movimento do detector é o 2θ (dois theta). Ele também apresenta um movimento translacional e rotacional, DX, o qual determina a distância entre o detector e o cristal (Figura 2.3). Nas medidas que foram realizadas a baixa temperatura utilizou-se um soprador de nitrogênio líquido Oxford Cryosystem.

Figura 2.3 – Difratorômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®), mostrando em destaque a cabeça goniométrica e o monocristal.

Para a realização dos experimentos foram empregados valores de DX no intervalo entre 31mm e 40mm. Os raios X foram gerados usando um tubo selado com anodo de molibdênio (radiação de $K\alpha$ de Mo monocromatizada por grafite, $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).⁶⁶ Quando os raios X incidem na amostra se gera um padrão de difração como o mostrado na Figura 2.4. O primeiro passo da coleta consiste na indexação das reflexões, da obtenção da matriz de orientação e na determinação dos parâmetros de cela unitária.

Figura 2.4 – Padrão de difração obtido para o mesilato monohidratado de mebendazol.

As coletas de dados foram realizadas variando 2θ , com uma redundância entre 2-3. A redundância é definida como o número de vezes que 90% das reflexões foram coletadas. As coletas foram realizadas utilizando o programa COLLECT.⁶⁷ Depois de realizadas as coletas de dados às reflexões correspondentes foram indexadas e integradas utilizando o pacote de programas HKL Denzo-Scalepack.⁶⁸

Para a resolução e o refinamento das estruturas foi utilizado o pacote de programas do WINGX.⁶⁹ Três programas foram utilizados para a determinação das fases de cada uma das estruturas, sendo eles, SHELXS-97,^{70,71} SIR92⁷² ou SIR2004⁷³.

Os modelos foram refinados pelo método de mínimos quadrados usando matriz completa em F^2 com o programa SHELXL-97^{71,74}. Os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono e oxigênio foram refinados de acordo com o modelo de comprimento de ligações fixo (comprimento de ligação do C-H na metila de 0,96 Å, do O-H de 0,82 Å e do C-H no metileno de 0,97), utilizando um parâmetro térmico isotrópico 20% maior do que o parâmetro térmico equivalente do átomo ao qual cada um estava ligado. Tal porcentagem foi incrementada para 50% para átomos de hidrogênio dos grupos metilas e H₂O.²⁷

Todos os átomos que não sejam hidrogênios foram refinados anisotropicamente. Os átomos de hidrogênio C-H foram posicionados estereoquimicamente e foram refinados com parâmetros de deslocamento fixos individuais [$U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(Csp^2)$ ou $1,5 U_{eq}(Csp^3)$], utilizando um modelo de anel aromático, para o comprimento de ligação C-H foi fixado a uma distância de 0,93 Å. A distância N-H foi localizada no mapa de densidade eletrônica (Fourier diferença) e sua posição foi fixado tal como inicialmente encontrado, com $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(N)$. Para o composto mebendazol descrito no capítulo 3 foi realizado correção por absorção.

Após o refinamento os dados cristalográficos foram validados utilizando o programa Platon.⁷⁵ As geometrias moleculares foram analisadas usando o programa MOGUL.⁷⁶ Foram utilizados os programas MERCURY,⁷⁷ ORTEP-3⁷⁸ e DIAMOND⁷⁹ para a elaboração do material gráfico.

2.5 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

As análises por espectroscopia no IV e Raman foram realizadas em um espectrômetro por transformada de Fourier FT-IR/FT-Raman Vertex 70 (Burker) equipado com um laser de Nd:YAG9 ($\lambda = 1064$ nm, potencia de 200 mw) e um detector de Ge esfriado com nitrogênio líquido a uma resolução de 4 cm^{-1} .

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, nelas se utilizaram 200mg de KBr, cuja dessecação foi feita na estufa a 120°C por 24h, para em seguida ser triturado em almofariz com as amostras de 1mg do fármaco correspondente. Em ambos os casos a mistura foi comprimida em uma prensa hidráulica (Potente Brasil®, 15 toneladas) por três minutos sob pressão de 4 toneladas. As análises de transmissão foram obtidas através de 356 varreduras onde a combinação de todas promoveu um espectro médio. Para o espalhamento Raman as amostras foram assentadas em porta amostras de alumínio onde há hemisférios torneados com raio de 2mm.

As medidas foram realizadas em colaboração pelo Prof. Alejandro Pedro Ayala da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

2.6 ANÁLISES TÉRMICAS

Nas medidas de DSC as amostras foram mantidas sob fluxo de calor em atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 ml/min e taxa de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, no equipamento DSC – TA 60 WS Shimadzu. Antes da medição o equipamento foi purgado por 15 minutos para a remoção de todo o ar, em seguida 5 mg de cada amostra foi pesada diretamente sobre cadinhos os quais foram selados e perfurados antes das análises. Cadinhos de alumínio foram utilizados como porta amostra de referência.

Nas análises de TG as mesmas condições utilizadas em DSC foram mantidas, mas usou-se cerca de 10 mg de cada amostra. As medidas foram feitas

sob atmosfera de nitrogênio no equipamento TGA – 50/50H (Shimadzu) de análise térmica simultânea.

Os aparelhos de DSC e TGA estão instalados no Instituto de Física de São Carlos (Figura 2.5)

Figura 2.5 – Foto mostrando os equipamentos de DSC e TGA instalados no Instituto de Física de São Carlos.

3 MEBENDAZOL

3.1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por ascaridíase, uncinariasis, oxiuríase, tricuriase, ancilostomíase e necatoríase são as doenças negligenciadas tropicais mais frequentes.⁸⁰ Atualmente estimativas mostram que um quarto da população mundial está infectado com estes parasitas.^{81,82} Devido a isso recentemente foi realizada uma análise dos ensaios terapêuticos relatados na literatura apoiada por uma iniciativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde defenderam a execução de programas desparasitários para que pudessem atingir simultaneamente estas infecções.⁸⁰ Os fármacos beneficiados com estes programas foram o mebendazol, o albendazol e o praquizantel, porém levando a versões genéricas a custos muito baixos.⁸³

O mebendazol (MBZ), éster metílico do ácido carbâmico (*5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il*), $C_{16}H_{13}N_3O_3$, (Esquema 3.1), foi o fármaco escolhido para este estudo. É um medicamento com ação vermífuga de amplo espectro utilizado para o tratamento das infestações isoladas ou mistas causadas por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Taenia solium* e *Taenia saginata*. Estes são vermes nematódeos com menos de 15 cm de comprimento e parasitas do intestino dos mamíferos, conhecidos popularmente como “lombriga”. É indicado como fármaco de segunda escolha em alguns estágios sanguíneos de infestação, necessitando nesses casos de absorção sistêmica.⁸⁴

O MBZ é comercializado atualmente sob diversos nomes tais como Ovex[®], Vermox[®], Lomper[®], etc. No Brasil o MBZ está entre os medicamentos dispensados de realizar o estudo de bioequivalência. De acordo com a RE nº 897 de 29 de maio de 2003 – Guia para Isenção e Substituição de Estudos de Bioequivalência – o mebendazol se encaixa no item 1.8 da referida resolução que isenta do estudo de bioequivalência “medicamentos de uso oral cujos fármacos não sejam absorvidos no trato gastrointestinal”.⁴⁹

Esquema 3.1 – Estrutura molecular do mebendazol

O MBZ foi incluído pela OMS na Lista Modelo de Medicamentos Essenciais como a referência para o grupo terapêutico dentro da classe farmacológica de anti-helmínticos intestinais.⁸⁵ Como outros anti-helmintos, seu principal mecanismo de ação é coerente com a tubulina vinculativa, inibindo de forma seletiva a absorção de glicose no parasita. Isto provoca a depleção dos depósitos de glicogênio nos microtúbulos das células tegumentárias e intestinais do parasita, resultando em sua imobilização e morte em diferentes nematódeos.^{82,83} Este fármaco é considerado terapia alternativa a doses altas em infecções por *Toxocara*, *Trichinella spiralis* *volvulus* e *Equinococcus granulosus*. Sua absorção é muito escassa no trato gastrointestinal, e, portanto, sua biodisponibilidade é baixa, além de sofrer uma intensa eliminação (80%) de primeiro passo hepático. O MBZ tem sua absorção aumentada quando administrado de forma concomitante com as refeições. Sua ligação com as proteínas plasmáticas é muito elevada (95%), sua meia-vida é de 1 a 5 horas e pode ser prolongada em pacientes com insuficiência hepatocelular. Sua eliminação é realizada parcialmente pelo fígado e finalmente pela urina, tanto na forma de fármaco ativo como metabolizado.⁸⁶

Devido à necessidade de procedimentos de monitoramento que sejam apropriados para identificar o surgimento de resistências a fármacos, há uma preocupação relevante devido ao extenso uso do MBZ para tratar infecções por nematoides intestinais em populações humanas.^{83,87-88} Um fato que deve ser considerado neste problema é a qualidade dos fármacos anti-helmínticos. Medicamentos com baixa qualidade contribuem para a falha dos programas desparasitários e também para o aparecimento de resistência ao princípio ativo. Portanto, especialmente nos países em desenvolvimento onde anti-helmínticos

genéricos são importados e produzidos localmente, a qualidade do mesmo é crítica.⁸⁷

Os comprimidos podem ter variações em suas propriedades tais como pureza, dissolução e desintegração, entre outras, que acabam afetando a biodisponibilidade terapêutica do fármaco. Outro fator que tem sido bastante estudado e que também contribui para a variação da eficácia de uma formulação farmacêutica é o polimorfismo do IFA. Considerando os carbamatos de benzimidazóis usados geralmente em programas desparasitários como o MBZ e albendazol, apenas o MBZ apresenta polimorfismo. Este fármaco tem sido investigado por vários autores tanto em relação a este assunto quanto a sua estabilidade físico-química em fases sólidas.^{1,2}

O MBZ é praticamente insolúvel em água e existe em três formas polimórficas (A, B e C). Ele pertence à classe II dos sistemas de classificação Biofarmacêutica (BCS). A forma C é farmaceuticamente favorável e tem sido preferida devido a sua solubilidade, que é suficiente para garantir melhor biodisponibilidade sem exibir a toxicidade associada à forma B.⁸⁸⁻⁹⁰ Essas formas têm sido identificadas e caracterizadas devido as suas diferenças na solubilidade e seus efeitos terapêuticos.^{3,4} Outros autores relataram que 30% do tipo A na formulação é suficiente para suprimir a atividade farmacológica desejável.⁹¹ A forma C foi caracterizada por difração de raios X de monocristal e obtida a partir da recristalização da forma C em metanol. Ela cristaliza no grupo espacial $P\bar{1}$.⁹² Os estudos reportados com os três polimorfos envolvem, principalmente, a sua estabilidade térmica e a sua velocidade de dissolução em diversos solventes. Além destas formas sólidas, alguns sais de MBZ foram também relatados, tais como o bromidrato de mebendazol, que cristaliza no grupo espacial $P2_1/c$,⁹³ e uma recristalização em ácido propiônico, que cristaliza no grupo espacial $P\bar{1}$ e foi caracterizado por DRXM.⁹¹ Outro composto relacionado é o cloridrato de mebendazol, um sal que pode ser facilmente obtido a partir das recristalizações das formas A, B ou C em diversos solventes orgânicos com adição de ácido clorídrico. Ele foi identificado por meio de técnicas de DRXM e DRXP, espectroscopia no infravermelho, análise térmica diferencial e Raman, etc. Este composto cristaliza no grupo espacial $Cmc2_1$.⁹⁴

O presente trabalho relata a caracterização no estado sólido de um novo sal de MBZ, o Mesilato de Mebendazol Monohidratado (5-benzoyl-2-((methoxycarbonyl)amino)-1H-benzo[d]imidazol-3-ium methanesulfonate hydrate) MBZ-H•MeSO₃•H₂O, que foi obtido a partir de diferentes experimentos de cristalização a partir das formas A, B e C em ácido metil sulfônico.

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiais

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico. Os polimorfos A e C foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (Universidad Nacional de San Luis, Argentina), enquanto que o polimorfo B foi obtido por recristalização do polimorfo C em acetonitrila (Merck).

3.2.2 Formação do Sal

A suspensão contendo 100 mg (0,34 mmol) do polimorfo A, B ou C e 50 mL de etanol absoluto (Merck) foi preparada a 298K, sob agitação. Em seguida, 0,5 mL (7,6 mmol) de ácido metilsulfônico (99,5%, Aldrich) foram adicionados lentamente, até a dissolução completa do sólido. A solução foi mantida durante cerca de duas semanas a 288K produzindo cristais incolores prismáticos adequados para a determinação cristalográfica. Os cristais de MBZ-H•MeSO₃•H₂O obtidos são mostrados na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Monocristais de MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

Diversos compostos policristalinos de MBZ-H•MeSO₃•H₂O foram obtidos por dissolução em solventes orgânicos tais como acetona ou metanol (Merck), com uma nova adição de ácido metilsulfônico. Os produtos cristalinos obtidos foram filtrados, lavados com hexano – e com mistura de etanol (20:1) e secos para melhorar as suas características. Foi realizado difração de raios X de pó (DRXP), usando um difratômetro D-MAX-IIIC Rigaku com radiação K α Cu com NaCl e quartzo, como padrões de calibração externa. Estas análises foram realizadas para comprovar a homogeneidade dos experimentos de cristalização. A Tabela 3.1 relaciona os principais dados cristalográficos obtidos para o mesilato de mebendazol monohidratado.

Tabela 3.1– Dados estruturais do mesilato de mebendazol monohidratado.

Temperatura	293(2) K	
Fórmula Empírica	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₇ S	
Peso Molecular (g/mol)	409,41	
Comprimento de onda (Å)	0,71073	
Sistema Cristalino	Triclínico	
Grupo Espacial	P $\bar{1}$	
Dimensões da cela unitária (Å; °)	$a = 6,8339(2)\text{Å}$ $b = 9,3030(3)\text{Å}$ $c = 14,6869(4)\text{Å}$	$\alpha = 86,948(2)^\circ$ $\beta = 86,577(2)^\circ$ $\gamma = 80,693(2)^\circ$
Volume (Å³)	918,89(5)	
Z	2	
Densidade Calculada (Mg/m³)	1,480	
Coeficiente de Absorção (mm⁻¹)	0,223	
F(000)	428	
Tamanho do cristal (mm³)	0,73 x 0,14 x 0,11	
Varição do θ para a coleta de dados(°)	3,02 – 27,48	
Intervalo dos índices	$-8 \leq h \leq 8$, $-11 \leq k \leq 11$, $-19 \leq l \leq 18$	
Reflexões coletadas	7568	
Reflexões independentes	4137 [R _{int} = 0,0287]	
Completeza	98,5 %	
Correção por absorção	Gaussian	
Dados/ restrições/ parâmetros	4137 / 0 / 255	
S	1,066	
R final para $I > 2\sigma(I)$	R1 = 0,0537, wR2 = 0,1439	
R para todos os dados	R1 = 0,0689, wR2 = 0,1569	
Maior e menor pico de densidade		
Eletrônica residual (e.Å⁻³)	0,284 e -0,525	

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 3.2 apresenta o difratograma de pó experimental do MBZ- $\text{H}\cdot\text{MeSO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ em (a) e sua comparação com o difratograma calculado a partir de estrutura cristalina (b).

Figura 3.2 – a) difratograma de pó experimental e b) difratograma de pó teórico do MBZ- $\text{H}\cdot\text{MeSO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Como pode ser observado através da comparação entre os gráficos (a) e (b), as fases obtidas experimentalmente coincidem com os dados teóricos enfatizando alguns picos mais intensos como o que se encontra entre aproximadamente 6° e outro pico em aproximadamente $26,5^\circ$. Outros picos observados a baixa ângulo entre aproximadamente $9,9^\circ$ e 12° , também são picos característicos. Os difratogramas de pó deste composto mostram que todos eles se tratavam da mesma forma polimórfica. Observa-se que existe uma diferença nas intensidades entre eles devido a um efeito de orientação preferencial.

3.3.1 Conformação molecular

A Figura 3.3 mostra um diagrama tipo ORTEP-3⁷⁸ do MBZ-H•MeSO₃•H₂O apresentando a numeração dos átomos e elipsoides com 50% de probabilidade. A unidade assimétrica deste composto apresenta uma molécula de MBZ, uma molécula de mesilato (metil sulfonato conforme nomenclatura IUPAC) e uma molécula de água. Este sal hidratado de MBZ cristaliza no grupo espacial triclinico $P\bar{1}$. O número de formas tautoméricas é reduzido devido a que um hidrogênio do MeSO₃ é anexado ao nitrogênio N(3).

Figura 3.3 – Diagrama tipo ORTEP-3⁷⁸ da unidade assimétrica do MBZ-H•MeSO₃•H₂O mostrando a numeração dos átomos e elipsóides térmicos com 50% de probabilidade. As interações intramoleculares clássicas estão tracejadas em roxo e as interações não clássicas em azul.

A análise da conformação molecular mostra a presença de varias interações intramoleculares ilustradas na Figura 3.3 que estabilizam esta conformação. A Tabela 3.2 descreve os parâmetros geométricos que caracterizam cada uma delas. Algumas delas são fracas tais como as interações intramoleculares não clássicas envolvendo os átomos C(1)–H(1c)•••O(2), C(7)–H(7)•••O(3) e C(16)–H(16)•••O(3).

Porém outras são ligações de hidrogênio fortes, tais como a N(3)-H(3)···O(2), envolvendo a carbonila do grupo metoxycarbonil e o nitrogênio N3 do heterociclo. Essa interação estabiliza a conformação do carbamato e está ilustrada em linhas tracejadas em roxo na Figura 3.3. O mesilato de MBZ apresenta um nitrogênio azólico, N(3), ao contrário de outros compostos, como o cloridrato de MBZ, em que o nitrogênio azólico é posicionado em N(2).⁹⁴ A distância que separa H(3) de O(2) é de 2,117 Å. Uma vez que a interação entre os grupos carbonila e amina é uma interação forte, sendo à distância N(3)···O(2) de 2,724(2) Å e o ângulo da interação N(3)-H(3)···O(2) de 117,7(9)°.

Tabela 3.2 – Parâmetros geométricos que caracterizam as interações intramoleculares do mesilato de MBZ. Os símbolos “D” e “A” se referem a átomos doador e receptor de hidrogênio, respectivamente.

D-H···A	D-H (Å)	D···A (Å)	H···A (Å)	D-H···A (°)
N(3)-H(3)···O(2)	0,990	2,724(2)	2,117	117,76(9)
C(1)-H(1c)···O(2)	0,960	2,680(3)	2,565	86,30(13)
C(7)-H(7)···O(3)	0,930	2,758(3)	2,440	99,99(13)
C(16)-H(16)···O(3)	0,930	2,802(3)	2,542	96,35(14)

A ligação de hidrogênio intramolecular clássica, N(3)-H(3)···O(2), é estabilizada por um efeito de ressonância envolvendo os átomos H(3)-N(3)-C(3)-N(1)-C(2)-O(2). Este comportamento recebe o nome de ligação de hidrogênio assistida por ressonância (LHAR) cujo nome deriva do inglês “*Resonance Assisted Hydrogen Bond*” (RAHB).^{95,96} Este efeito tem sido bastante estudado desde o final da década de 80 principalmente em sistemas que apresentam tautomerismo.⁹⁶ Desde então vários sistemas moleculares são descritos por este tipo de interação intramolecular caracterizada por uma interação entre o hidrogênio ligado a um átomo eletronegativo (N) e outro átomo eletronegativo da mesma molécula (=O) conectada por um sistema π conjugado (O=C-C=C-OH, O=C-C=C-NH ou O=C-N=C-NH).^{95,96}

Este efeito de deslocalização eletrônica é de grande importância para a estabilização da interação intramolecular (efeito LHAR). O hidrogênio faz uma

“ligação” com os outros átomos que estão envolvidos no híbrido de ressonância formando um anel de seis membros (Figura 3.4). Observando os valores dos comprimentos de ligação na Tabela 3.3 vemos que os comprimentos de ligação dos átomos envolvidos na interação ressonante sofrem variações em relação aos valores médios. Assim, as ligações N(3)–C(3) e C(2)–O(2) são mais curtas e as ligações C(3)–N(1) e N(1)–C(2) mais longas devido ao efeito de ressonância do grupo acetoamida. Este efeito LHAR faz com que os elétrons livres não estabeleçam uma ligação fixa podendo ocorrer assim a deslocalização eletrônica.

Figura 3.4 – Desenho mostrando a região do efeito LHAR do MBZ.

Tabela 3.3 – Comprimentos de ligação do MBZ-H•MeSO₃•H₂O envolvidos na interação intramolecular ressonante comparados com os respectivos valores estatísticos obtidos usando o programa MOGUL.⁷⁶

Fragmento	Comprimento de Ligação	Valor médio (Å)
N(3)–C(3)	1,341(2)	1,349
C(3)–N(1)	1,355(2)	1,336
N(1)–C(2)	1,381(2)	1,374
C(2)–O(2)	1,195(2)	1,211

Este efeito de ressonância pode ser observado também, analisando a planaridade do anel quelante de seis membros composto pelos átomos O(2),C(2),N(1),C(3),N(3),H(3). O maior desvio do plano de mínimos quadrados passando por estes átomos é de -0,0113(5)Å para H(3) (desvio quadrático médio total de 0,0147Å), mostrando que esse sistema é sensivelmente planar.

Na Tabela 3.4 encontram-se os valores dos principais ângulos de torção para o mesilato de MBZ e a lista completa dos valores dos ângulos encontram-se no

Apêndice B. De acordo com os valores observados para os ângulos de torção C(3)-N(1)-C(2)-O(2), de $-5,0(3)^\circ$, e C(3)-N(1)-C(2)-O(1), de $174,2(16)^\circ$, podemos inferir que o anel benzimidazol é quase planar (Figura 3.5). O carbamato é mantido no plano dos benzimidazóis, mas o metoxi terminal (carbonila) afasta-se deste plano em cerca de 6° . Também é importante notar que o plano que contém a benzoíla está deslocado 43° em relação ao plano contendo o anel benzimidazol e o grupo carbamato. Este desvio é menor que os observados para cloridrato de mebendazol, $56,80^\circ$, o MBZ propiônico $29,4^\circ$, e o MBZ bromidrato, 63° .^{91,93-94}

Tabela 3.4 – Ângulos de torção selecionados para a molécula de MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

<i>Fragmentos</i>	<i>Valores de Torção (°)</i>
C3–N1–C2–O2	-5,0(3)
C3–N1–C2–O1	174,2(2)
C1–O1–C2–O2	0,3(3)
C1–O1–C2–N1	-178,9(2)
O3–C10–C11–C16	30,5(3)
O3–C10–C11–C12	-117,2(2)

O grupo carbonila da benzoíla está torcido em relação ao plano do benzimidazol. Isto pode ser notado analisando o ângulo de torção C(7)–C(8)–C(10)–O(3), de $14,5(3)^\circ$, significativamente maior que o esperado para um sistema conjugado perfeito (0°). Da mesma forma, o grupo carbonil não é coplanar com o anel fenílico, uma vez que o ângulo de torção C(12)–C(11)–C(10)–O(3) é de $-147,2(1)^\circ$, em vez de 0° . Reforçando a relativa falta de planaridade entre a ligação da carbonila e os dois sistemas cíclicos ligados a ela, pode se observar que o átomo O(3) desvia $0,60(1) \text{ \AA}$ e $0,61(1) \text{ \AA}$ dos planos médios através do grupo benzimidazol e fenil, respectivamente. Portanto não há nenhum efeito de ressonância entre os grupos carbonila e benzoil.

Figura 3.5 – Planos entre os anéis benzimidazol e carbamato e o anel benzoila.

Passando-se um plano médio sobre o grupo benzimidazol obtém-se um desvio RMSD de 0,0043 Å, sendo o átomo que mais desvia deste plano o C(9) [-0,010(1) Å]. Por outro lado quando se passa um plano médio pelo grupo benzoil o valor do RMSD é de 0,1426Å, sendo o átomo que mais desvia deste plano é o O(3) [0,282(1) Å].

3.3.2 Empacotamento cristalino e interações intermoleculares

A estrutura cristalina do MBZ-H•MeSO₃•H₂O apresenta um empacotamento tridimensional estabilizado por interações intermoleculares clássicas e não clássicas assim como interações do tipo π - π . Estas interações originam canais hidrofílicos nos quais se distribuem os íons mesilato e as moléculas de água como pode ser visto na Figura 3.6(a). Este empacotamento é mantido por fileiras de moléculas de MBZ alternadas por colunas dos íons mesilato, relacionados por um centro de inversão, como mostrado na Figura 3.6(b). As moléculas de MBZ estão se arranjando em torno dos canais iônicos para a formação destas fileiras (Figura 3.6(d)).

Figura 3.6 – Empacotamento cristalino do MBZ-H•MeSO₃•H₂O, mostrando os canais hidrofílicos com os íons mesilato e as moléculas de água (a), em (b) a formação de fileiras intercaladas por moléculas de MBZ e íons ao longo da direção [100] em (c), ao longo da direção [010] e em (d) formação dos canais iônicos.

Tabela 3.5 – Parâmetros geométricos que caracterizam as interações intermoleculares do MBZ-H•MeSO₃•H₂O. Os símbolos "D" e "A" se referem a átomos doador e receptor de hidrogênio, respectivamente.

D-H...A	D- H (Å)	D...A (Å)	H...A (Å)	D-H...A (°)
N(2)-H(2)...O1w ⁱ	0,951	2,679(2)	1,785	155,3(1)
O(1w)-H(11w)...O(5) ⁱⁱ	0,955	2,776(2)	1,823	175,9(1)
N(1)-H(1)...O(6) ⁱ	0,984	2,728(2)	1,744	177,7(1)
N(3)-H(3)...O(4) ⁱⁱ	0,990	2,755(2)	1,959	135,6(1)
O(1w)-H(12w)...O(6) ⁱⁱⁱ	0,820	2,879(2)	2,076	166,2(1)
C(6)-H(6)...O(4) ⁱⁱ	0,930	3,227(3)	2,614	123,9(1)

Operações de Simetria: ⁱ) -x+1,-y,-z; ⁱⁱ) -x+1,-y+1,-z; ⁱⁱⁱ) x+1,y,z

Na Tabela 3.5 estão descritas as principais interações intermoleculares do MBZ-H•MeSO₃•H₂O. A análise do padrão de interações intermoleculares que estabilizam a rede cristalina mostrou que as moléculas de MBZ participam de quatro ligações de hidrogênio, sendo três delas ligações de hidrogênio clássicas, do tipo N–H•••O e O–H•••O, e uma não clássica, do tipo C–H•••O. Uma análise destas interações intermoleculares mostra que a ligação de hidrogênio N(1)-H(1)•••O(6) liga o nitrogênio do grupo carbamato ao oxigênio do íon mesilato. Por outro lado, o nitrogênio N(3) do grupo benzimidazol, além de participar na interação intramolecular ressonante mencionada anteriormente, está também envolvido numa ligação de hidrogênio com o oxigênio O(4) de um outro íon mesilato. Este mesmo oxigênio O(4) éceptor, também, de uma ligação de hidrogênio não clássica envolvendo um átomo de carbono do grupo benzimidazol, C(6)–H(6)•••O(4). Estas três interações intermoleculares fortes mencionadas dão origem a cadeias infinitas unidimensionais ao longo do eixo *b* (Figura 3.7). Essas cadeias formam arranjos bidimensionais nos quais as cadeias sucessivas estão rodadas 180° ao longo do eixo, o que coloca os grupos fenilos de uma cadeia na direção dos da outra.

Esses arranjos bidimensionais estão ligados entre si formando um empacotamento tridimensional através de interações intermoleculares envolvendo as moléculas de água. Assim, cada íon mesilato interage com duas moléculas de água diferente através de ligações de hidrogênio fortes envolvendo os seus oxigênios O(5) e O(6), O(1w)–H(11w)•••O(5) e O(1w)-H(12w)•••O(6). As moléculas de água, por sua vez, se comportam como aceptoras de outra ligação de hidrogênio clássica envolvendo o nitrogênio N(2) do grupo benzimidazol, N(2)–H(2)•••O(1w).

Figura 3.7 – Interações intermoleculares do MBZ-H•MeSO₃•H₂O ao longo da direção [010]. As interações intermoleculares clássicas estão esquematizadas como linhas tracejadas em azul e as não clássicas em roxo.

Como já foi mencionado, outro tipo de interação molecular presente no empacotamento cristalino do MBZ-H•MeSO₃•H₂O são as interações π - π . Estas interações atrativas são por definição contatos hidrofóbicos envolvendo anéis aromáticos. São também chamadas de “ π -stacking” e ocorrem entre dois sistemas π deslocalizados.⁹⁷ De acordo com Hunter e Sandres, (1990), a energia de interação entre as moléculas pode ser descrita como o somatório de várias energias, tais como mostradas na equação (1).^{61,97}

$$E_{\text{total}} = E_{\text{eletrostático}} + E_{\text{indução}} + E_{\text{dispersão}} + E_{\text{repulsão}} \quad (1)$$

No caso das interações π - π , a contribuição à diminuição da energia cristalina está relacionada principalmente aos efeitos eletrostáticos. Neste tipo de interação os anéis se arranjam de maneira a se posicionarem paralelos uns aos

outros, mas apresentando um deslocamento dos seus centroides no plano dos anéis levando assim a uma diminuição de repulsão eletrônica.^{61,98} Um dos principais parâmetros utilizados para avaliar as interações π - π é a distância entre os centroides (Cg) dos anéis em contato. Geralmente esta distância fica no intervalo de 3,4 a 3,8 Å.⁹⁷ Mesmo sendo uma interação fraca, ela representa uma grande contribuição para o agregado das moléculas na hora de formar um cristal, diminuindo assim a energia cristalina. A Figura 3.8 apresenta os contatos π - π presentes no empacotamento cristalino do MBZ-H•MeSO₃•H₂O. Neste caso os centroides estão separados por uma distância de 3,743 Å, com um deslocamento entre estes centroides de 26,33°.

Figura 3.8 – Interações π - π no empacotamento cristalino do MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

3.3.3 Análises estatísticas dos parâmetros moleculares

A conformação molecular do MBZ foi analisada também utilizando o programa MOGUL.⁷⁶ Este programa, desenvolvido em 2004 pela CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*) contém informações estruturais que permitem um rápido acesso a valores de comprimento de ligação, ângulos de valência e ângulos de torções de estruturas com geometrias similares e específicas de cada estrutura depositada na base de dados estruturais de Cambridge (CSD, *Cambridge Structural*

Database).²² Uma boa concordância entre os valores desses parâmetros da estrutura sob análise em relação às demais estruturas já depositadas é o que se espera para que seja possível alcançar uma boa resolução da estrutura e de refinamento. Os resultados obtidos no programa MOGUL⁷⁶ compreendem histogramas em função da quantidade de estruturas depositadas no CSD²² contendo determinado fragmento de átomos *versus* os valores encontrados para este fragmento. Estes por sua vez são dados em angstroms (Å) quando se referem a comprimentos de ligação e em graus (°) para ângulos de valência (entre três átomos) e ângulos de torção (entre quatro átomos não cíclicos e quando se referem a comprimentos de ligação covalente). Porém, para que tal análise seja confiável, deve-se escolher parâmetros que contenham mais de 100 estruturas depositadas, uma vez que poucas estruturas não fornecem, na maioria das vezes, gaussianas com valores preferenciais e sim valores espalhados, distribuídos ao longo de todo o gráfico.

Para o MBZ foram selecionadas para a realização desta análise apenas moléculas com fatores R menores que 5% e foram excluídas as estruturas organometálicas. Esta análise revelou que tanto os ângulos de ligação quanto os comprimentos de ligações estão de acordo com os valores esperados para uma estrutura com bom refinamento e boa qualidade. Porém foi possível evidenciar alguns comportamentos estruturais interessantes. A Tabela 3.6 mostra os parâmetros que apresentaram os maiores desvios em relação à média esperada. No Apêndice B encontra-se a lista completa dos valores estáticos dos parâmetros geométricos, comprimentos e ângulos de ligação encontrados para a molécula de MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

Tabela 3.6 – Valores de comprimentos de ligação (Å), ângulos de valência (°) divergentes obtidos por meio da análise pelo programa MOGUL⁷⁶ para o MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

Comprimento de Ligação	Valor encontrado	Número de estruturas	Valor médio	Mediana	Desvio padrão	z-score
C7—C8	1,406	2417	1,389	1,390	0,011	1,536
O2—C2	1,195	1373	1,211	1,212	0,011	1,510
C11—C10	1,501	450	1,490	1,491	0,010	1,183
O3—C10	1,226	960	1,227	1,223	0,014	0,044
Ângulo de Valência						
C6—C7—C8	122,775	2684	120,791	120,771	0,951	2,086
C7—C6—C5	116,203	744	120,054	120,640	1,798	2,142
C7—C8—C10	116,949	714	120,577	120,767	1,993	1,821
C16—C11—C10	117,436	714	120,577	120,767	1,993	1,576
C12—C11—C10	123,627	714	120,577	120,767	1,993	1,530
O3—C10—C11	118,351	450	119,878	119,945	1,520	1,004

Na Tabela 3.6 foi possível visualizar que as ligações C(7)-C(8) e O(2)=C(2) são as que apresentam a maior discordância. A diferença encontrada para a primeira ligação se deve ao fato do carbono C(7) participar de uma interação intramolecular com o oxigênio O(3) como descrito anteriormente. A diferença no segundo comprimento de ligação se deve à presença da interação ressonante envolvendo os átomos H(3)-N(3)-C(3)-N(1)-C(2)-O(2). Este efeito levou a uma redistribuição de carga eletrônica que tem como consequência a diminuição do comprimento de ligação O(2)=C(2) quando comparado com o valor esperado. As outras ligações que estão envolvidas na ressonância também apresentam variações.

Na Figura 3.9 estão representados os histogramas obtidos para os comprimentos de ligação O(3)-C(10) e O(2)=C(2), além daqueles obtidos para o ângulo de ligação O(3)-C(10)-C(11) e o ângulo de torção O(3)-C(10)-C(8)-C(9). Pode se observar que o comprimento de ligação O(3)=C(10) é levemente maior que a média devido também à interação intermolecular ressonante.

(continua)

(continuação)

Figura 3.9 – Histogramas dos parâmetros conformacionais escolhidos obtidos utilizando o programa MOGUL.⁷⁶

3.3.4 Comparação com estruturas já reportadas na literatura

A Tabela 3.7 contém os parâmetros de cela das diferentes formas sólidas do MBZ reportadas na literatura. A sobreposição das conformações moleculares apresentadas pelas moléculas de MBZ nas diferentes formas sólidas mostra que as principais diferenças se encontram no anel fenílico e na rotação da região do grupo metil carbamato. Porém em todas elas o grupo carbamato é coplanar com o anel benzimidazol (dentro do erro experimental), isto pode ser visualizado na Figura 3.10 onde foi feito uma sobreposição da molécula de MBZ-H•MeSO₃•H₂O com as das outras formas do MBZ.

Tabela 3.7 – Dados cristalográficos das formas do MBZ reportadas na literatura.

		MBZ•Br ^{a)}	MBZ•HCl ^{b)}	MBZ•Prop. ^{c)}	MBZ•C ^{d)}
Grupo Espacial		P2 ₁ /c	Cmc2 ₁	P-1	P-1
Parâmetros de cela unitária (Å)	a	14,750(10)	6,558(0)	5,928(2)	5,148(0)
	b	6,602 (5)	7,793(0)	11,066(2)	7,878(1)
	c	16,390 (10)	30,458(2)	14,337(6)	17,907(3)
Ângulo da cela ≠ 90.00°		β 94,65 (6)°	—	α 94,89(0)°	α 82,42(0)°
				β 101,56(3)°	β 82,74(0)°
				γ 96,18(2)°	γ 71,09(1)°
Volume da Cella (Å³)		1540,8	1556,8(2)	910,5 (5)	678,3(2)
Z		4	4	2	2
ρ_{calculada} (g.cm⁻³)		1,571	1,420	1,347	1,446
Referências a)93, b)94, c)91, d)92					

A Figura 3.10(b) apresenta a sobreposição do MBZ-H•MeSO₃•H₂O em azul com a molécula de MBZ•HCl em laranja. Neste caso não foi possível obter uma sobreposição adequada como nos outros casos. Isto se deve ao fato da conformação molecular do MBZ no MBZ•HCl serem diferentes às encontradas nos outros casos. Esta diferença conformacional está relacionada à ligação σ (Sigma) entre o nitrogênio e o oxigênio do grupo carbamato. No MBZ-H•MeSO₃•H₂O o grupo metóxi e o grupo benzoil estão na conformação *trans*, enquanto que no MBZ•HCl estes mesmos grupos encontram-se na orientação *cis*.⁹⁴ Tais diferenças na conformação do grupo carbamato são caracterizadas por rotações em torno das ligações C(2)–N(1) e N(1)–C(3). As diferenças também estão relacionadas aos valores dos ângulos de torção no anel ressonante entre os átomos N(3)–C(3)–N(1)–C(2), com valor de 2,1(2)° para o MBZ-H•MeSO₃•H₂O e 0,000(2)°, -5(3)° e 179,9(4)°, para o MBZ•HCl,⁹⁴ MBZ•Br⁹³ e ácido MBZ•propiónico,⁹¹ respectivamente. Para o ângulo de torção C(3)–N(1)–C(2)–O(2) temos valores de -5,0(3)° para o MBZ•MeSO₃H•H₂O e 180(1)°, 7(3)° e -0,7(7)° para o MBZ•HCl, MBZ•Br e ácido MBZ•propiónico, respectivamente. É interessante ressaltar, também, que todas as formas do MBZ apresentam uma interação intramolecular ressonante do tipo da encontrada no MBZ-H•MeSO₃•H₂O. Porém, no caso do MBZ•HCl esta interação ressonante liga o nitrogênio do grupo benzinidazol com o oxigênio O(1), em lugar do oxigênio O(2), o que estabiliza a conformação molecular diferente descrita anteriormente.

Figura 3.10 – Superposição da unidade assimétrica das formas sólidas do MBZ reportadas na literatura com o MBZ-H•MeSO₃•H₂O (azul): (a) MBZ•HBr (vermelho); ⁹³ (b) MBZ•HCl (laranja); ⁹⁴ (c) MBZ•Propiônico (rosa) ⁹¹ e (d) Forma C (verde). ⁹²

3.3.6 Espectros Vibracionais

O espectro FTIR do MBZ-H•MeSO₃•H₂O é apresentado na Figura 3.11, enquanto que o espectro FT-Raman é mostrado na Figura 3.12. A Tabela 3.8 mostra a atribuição dos modos de vibração que será discutida a seguir. Os espectros do MBZ-H•MeSO₃•H₂O são muito ricos em bandas, por isso sua interpretação será realizada na base dos grupos funcionais mais importantes, tais como os grupos carbonil, NH e carbamatos no anel benzimidazol. As diferenças substanciais entre os espectros das diferentes formas sólidas do MBZ•HCl e MBZ-H•MeSO₃•H₂O dependem desses grupos.

Figura 3.11 – Espectro infravermelho do MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

Modos NH e OH:

Nos polimorfos do MBZ (A, B e C) o modo de estiramento ν_{NH} aparece como uma única banda localizada na região de 3410, 3370 e 3340 cm^{-1} , respectivamente.⁹⁹ Comparando estes espectros com o do grupo benzimidazol¹⁰⁰ e carbamato¹⁰¹ é possível associar estas bandas com a ligação NH pertencente ao carbamato, pois nenhuma banda IV intensa desta natureza é observada no benzimidazol, mas uma faixa semelhante está presente no carbamato. No MBZ•HCl, o alongamento NH é observado na região entre 3216 e 3144 cm^{-1} .

A segunda banda foi atribuída ao nitrogênio azóico do MBZ•HCl, devido a sua ligação OH de maior distancia.⁹⁴ No caso da MBZ-H•MeSO₃•H₂O, são considerados três bandas intensas em 3475, 3370 e 3210 cm^{-1} (Figura 3.11). A atribuição de NH em frequências mais baixas do que a correspondente às outras formas sólidas dos polimorfos MBZ é devido ao fato de que as ligações de hidrogênio são consideravelmente mais fortes no MBZ-H•MeSO₃•H₂O devido à forte basicidade do mesilato.

As bandas em 3475 e 3370 cm^{-1} correspondem à água. A atribuição destas bandas é justificada pelo desaparecimento das mesmas no espectro infravermelho do composto aquecido acima de 423K . Devido a semelhança entre as três distâncias de ligação NH apresentadas pelo $\text{MBZ-H}\cdot\text{MeSO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ consideramos que a banda centrada em 3210 cm^{-1} corresponde ao estiramento NH. Conforme mostrado anteriormente na Figura 3.7, ambos os nitrogênios do anel benzimidazol estão protonados e interagindo através de ligações de hidrogênio com dois átomos de oxigênio (O1W pertencente à molécula de água e O(4) pertencente ao íon mesilato), enquanto que o nitrogênio do carbamato está envolvido em uma ligação de hidrogênio com o oxigênio O(6) do mesilato.

Figura 3.12 – Espectro Raman do $\text{MBZ-H}\cdot\text{MeSO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$.

No $\text{MBZ-H}\cdot\text{MeSO}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, o número de formas tautoméricas é reduzido devido a que um hidrogênio da MeSO_3H é anexado ao nitrogênio N(3). No entanto, este efeito parece não ser completamente suprimido desde que uma banda larga característica ainda está presente (modo em 2645 cm^{-1}).¹⁰² Os modos de deformação do NH aparecem no espectro IV em 1650 , 1635 (sh) e 1600 cm^{-1} , enquanto que as bandas Raman ocorrem em 1650 (sh), 1635 e 1600 cm^{-1} . Esses modos aparecem em frequências mais altas porque as ligações de hidrogênio na estrutura cristalina impediram as flexões angulares. Além disso, a banda centrada

em 1650 cm^{-1} apresenta dois componentes associados ao modo de estiramento C=O (cetônico).

Tabela 3.8 – Modos de vibração selecionados para os espectros de IV e Raman do MBZ-H•MeSO₃•H₂O.

Modos	FTIR (Comprimento de onda) (cm ⁻¹)	Raman (Comprimento de onda) (cm ⁻¹)
vOH (água)	3475 (m), 3370 (m)	-
Modos vNH	3210 (m)	-
Modo Benzimidazol	2645 (m)	-
δNH + vC=O (cetona)	1650 (s)	1650 (sh)
δNH + vCN	1635 (w)	1635 (m)
δNH + δH ₂ O	1600 (m)	1599 (m)
vCN	1565 (m), 1505 (w)	1567(w), 1499 (vw)
vC=O (carbamato)	1750 (s)	1750 (w)
vC-O-C	1365 (w)	1369 (m)
vC-C	1290 (w)	-
Modos SO		
v _{as} SO	1240 (s), 1155 (s)	1240(w), 1150 (w)
v _s SO	1040 (s)	1050 (w)
vCH (aromático)	3100(m), 3070(m), 3060 (m)	3099 (vw), 3074 (w), 3064 (sh), 3011 (vw)
vCH (alifático)	2955 (m)	2957 (vw), 2933 (w)
δCH	1444 (m), 1427 (vw), 1419(w), 1323 (m), 1201 (m), 1185 (m), 1110(w), 1085 (m,d), 1002 (w), 969 (vw), 958 (w)	-
ρCH	897 (m), 884(w), 848 (m), 788 (vw), 775 (m), 749(w), 721(w), 711 (m), 693(w), 657 (w)	-
Modos de estiramento	581(w), 554 (m), 516(w), 491 (m), 439(w), 404 (vw), 383 (vw), 369 (vw), 341 (vw), 304 (vw)	-

s: forte, m: média, w:fraco, vw: muito fraco, sh: shoulder, d: doublet, v: alongamento, δ: deformação, ρ: rocking, s: simétrica, as: assimétrica.

Modo CO

Os polimorfos A, B e C apresentam modos de estiramento C=O (carbonila) em 1730 , 1720 e 1700 cm^{-1} , respectivamente. ⁹⁹ No caso do MBZ•HCl eles são

observados em 1767 cm^{-1} no espectro IV e 1760 cm^{-1} no espectro Raman.⁹³ No espectro do MBZ-H•MeSO₃•H₂O vemos que, igual ao MBZ•HCl, estas ligações reforçam os grupos carbonila do carbamato, por isso aparece em frequências mais altas do que nos outros polimorfos. Neste caso, aparece no espectro IV em 1752 cm^{-1} e no Raman está em 1750 cm^{-1} . Como foi mencionado, o modo de estiramento C=O (cetônico) se observa sobreposto, correspondendo à deformação do NH em 1651 cm^{-1} . Um fato interessante é que ambas as carbonilas estão formando ligações de hidrogênio. A banda presente em 1366 cm^{-1} no IV e 1369 cm^{-1} no Raman foram atribuídas ao modo de estiramento C-O-C. Esse comportamento está de acordo com o empacotamento cristalino dado que a ligação de hidrogênio na qual está envolvido o oxigênio O(2) do grupo carbamato não é muito diferente da observada na estrutura do MBZ•HCl.⁹⁴

Modo CN

O modo de estiramento CN se encontra sobreposto com o modo NH na região de 1635 cm^{-1} , tanto no espectro IV como no Raman. Outras bandas de média intensidade em 1565 cm^{-1} no espectro infravermelho, e fracas em 1567 cm^{-1} no espectro Raman, são atribuídas também ao modo νCN . Estas bandas são deslocadas para frequências mais baixas em relação aos valores correspondentes à ligação C-N. De acordo com a análise estrutural, as ligações C-N do anel benzimidazol perdem seu caráter de dupla devido à protonação do nitrogênio azólico N(3) e às ligações de hidrogênio dos quais estes átomos participam.

Modo SO

Os modos vibracionais correspondentes ao estiramento assimétrico SO do íon mesilato se observam em 1240 e 1155 cm^{-1} , enquanto que o modo de estiramento simétrico é observado em 1040 cm^{-1} . No espectro Raman essas bandas são observadas como bandas de baixa intensidade em 1240 , 1150 e 1050 cm^{-1}

respectivamente. A mudança para frequências mais baixas esperadas para esse grupo é devido à presença de fortes interações de hidrogênio com a água e com os grupos NH do MBZ.

3.4 CONCLUSÃO

O estudo realizado neste capítulo descreveu a estrutura cristalina de um novo sal de Mebendazol, um Mesilato Monohidratado, utilizando resultados de difração de raios X de monocristal. Estes dados foram comparados com os obtidos para outras formas sólidas já publicadas deste composto (Forma C, Cloridrato de Mebendazol, Mebendazol ácido propiônico e Mebendazol bromidrato).

Assim, verificou-se que o padrão das interações intramoleculares permanece semelhante em todas as moléculas de MBZ. As interações intramoleculares clássicas do tipo $N-H\cdots O$ leva a formação de um anel ressonante. Este anel estabiliza esta ligação de hidrogênio intramolecular devido a um efeito de deslocalização eletrônica. Este efeito recebe o nome de ligação de hidrogênio assistida por ressonância (LHAR). Porém, no caso do $MBZ\cdot HCl$ esta interação ressonante liga o nitrogênio do grupo benzimidazol com o oxigênio O(1), em lugar do oxigênio O(2), o que estabiliza uma conformação molecular diferente à encontrada nas outras formas sólidas.

No que diz respeito às interações intermoleculares, a presença dos íons mesilato e da água fazem com que o empacotamento cristalino seja mais compacto que o apresentado pelas outras formas sólidas reportadas na literatura devido à presença de ligações de hidrogênio fortes. Estas ligações dão lugar à formação de cadeias infinitas nas quais as moléculas de MBZ estão unidas por interações fortes envolvendo os íons mesilato. Essas cadeias por sua vez se arranjam de maneira a formar estruturas bidimensionais unidas entre si por interações envolvendo as moléculas de água, o que estabiliza o empacotamento tridimensional.

Os dados apresentados pelas análises vibracionais corroboraram os dados estruturais, podendo neles também visualizar as bandas correspondentes às ligações de hidrogênio e os grupos funcionais presentes na molécula.

4 ESTRADIOL 17 β VALERATO

4.1 INTRODUÇÃO

Os hormônios são substâncias químicas produzidas no organismo que controlam e regulam a atividade de determinadas células ou órgãos. Os hormônios são secretados por glândulas especializadas, tais como a glândula tireoide, e são essenciais para todas as atividades diárias, incluindo os processos de metabolismo, crescimento, digestão, controle de temperamento e de reprodução.¹⁰³

Os hormônios foram identificados pela primeira vez pelos fisiologistas William Bayliss e Ernest Starling em 1902 quando descobriu o hormônio secretina, um hormônio produzido pelas células do duodeno. Eles o denominaram “hormônio”, do grego *hormo* cujo significado é “pôr em movimento”. Isso reflete o fato de que a presença de hormônios atua como um catalisador para mudanças químicas em nível celular, necessárias para o crescimento, desenvolvimento e energia. Atualmente foram identificados mais de 100 hormônios no corpo humano.^{104-105,107}

Os hormônios circulam livremente na corrente sanguínea até que seja reconhecido por uma célula-alvo. A célula de destino tem um receptor que só pode ser ativado por um tipo específico de hormônio. A natureza química do hormônio também afeta o mecanismo de ação. Todos atuam nas células por meio de seus “receptores”, sendo que cada hormônio têm seu próprio receptor ao qual se vincula, se combinando num modelo de chave e fechadura. Assim, os hormônios circulam por todo fluxo sanguíneo e atuam somente nas células que possuem o receptor apropriado.¹⁰⁴

Existem dois tipos de hormônios conhecidos como esteroides e peptídeos. Os hormônios peptídeos regulam funções como o sono e a concentração de açúcar no organismo. Eles são constituídos de longas cadeias de aminoácidos sendo, às vezes por esse motivo, referidos como “proteínas” hormonais. Exemplo deles é o hormônio de crescimento que auxilia na queima de gordura. Outro hormônio peptídeo é a insulina que inicia o processo de conversão do açúcar em energia celular.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵

Em geral, os hormônios esteroides são hormônios relacionados com a maturação sexual e fertilidade. O cortisol é um exemplo de um hormônio esteróide. Ele tem a função de romper o tecido danificado para que ele possa ser substituído. Esteróides determinam o desenvolvimento físico desde a puberdade até a velhice, bem como os ciclos de fertilidade. Eles são lipossolúveis para que atravessem facilmente a membrana celular.¹⁰⁶

Dentro da classe dos esteroides os principais hormônios femininos são a progesterona e o estrogênio (ou estrógeno). A progesterona é produzida pelos ovários durante a liberação de um óvulo maduro (mais especificamente após a ovulação no corpo lúteo). Ela ajuda a preparação do revestimento do útero (no endométrio) para a aceitação do embrião. Se o óvulo não for fertilizado há uma queda dos níveis de progesterona e ocorre o ciclo menstrual feminino. Na gravidez a progesterona é produzida na placenta, também é armazenada no tecido adiposo (como gordura).^{103,107}

A progesterona é insolúvel em água e é mal absorvida quando administrada por via oral a menos que seja micronizada em óleo. A progesterona pode ser administrada por via vaginal ou retal através de supositórios e também através de injeções, embora tenha uma meia-vida curta que requer uma administração diária². Ela é vendida sob diversos nomes tais como Utrogestan[®], Crinone[®], Evocanil[®], Prometrium[®] dentre muitos outros.¹⁰⁸

O estrogênio é um hormônio produzido na adolescência responsável por aparecimentos de sinais sexuais nas mulheres, indo até a menopausa. A falta dele causa sintomas como ondas de calor em aproximadamente 75 a 80% das mulheres. Tal hormônio estimula as células locais a proliferar-se, ou seja, fazendo com que elas se multipliquem. Um exemplo disso é o aumento da musculatura lisa do útero após a puberdade, chegando a duplicar-se ou triplicar-se de tamanho. Em resumo, as características que distinguem homens e mulheres são devidas ao estrogênio. As consequências de tais características é o estímulo à proliferação de células em determinadas regiões do corpo.¹⁰⁹

Existem três estrógenos naturais que são produzidos na mulher. Eles são: Estrona (E1), Estradiol 17 β (E2) e Estriol (E3) (Figura 4.1). Estes hormônios são chamados por números devido as suas respectivas posições na sequência da biossíntese.¹⁰⁹ Estes três hormônios ocorrem quantitativamente no plasma, sendo que a potência estrogênica do E2 é 12 vezes maior que a do E1 e 80 vezes maior

que a do E3.¹⁰⁹ Tais estrogênios naturais são usados na medicina humana principalmente para o tratamento ginecológico e, em particular, na terapia de reposição hormonal. São também usados no tratamento para o câncer de mama em mulheres na pós menopausa.^{110,111}

Figura 4.1– Estrutura molecular do E1, E2 e E3.

A E1 é um hormônio secretado pelo ovário. Após a menopausa ele é sintetizado através da conversão do esteroide adrenal, chamado de androstenediol, principalmente nas células musculares e tecidos gordurosos. Quanto maior for a quantidade de gordura mais E1 será produzida. O E3 é produzido pela placenta e é sintetizado a partir de um hormônio chamado de DHEA (desidroepiandrosterona) suprido pela mãe ou o córtex adrenal do feto (região externa das glândulas supra-renais onde são produzidos vários hormônios). O feto participa da formação do E3 e a medição deste hormônio indica se a placenta e/ou feto estão bem. O E3 é o principal esteroide sexual presente durante a gravidez.¹¹⁰⁻¹¹²

O E2 é o estrogênio natural mais importante. Como os outros esteroides, é derivado do colesterol e produzido pelos ovários e placenta. Também é produzido pelo tecido adiposo de homens e de mulheres pós menopausa. Ele é usado para tratar baixos níveis de estrogênio no organismo, que é causado por certas condições específicas e no tratamento de alguns sintomas de menopausa. Atua principalmente através da substituição de estrogênios naturais em mulheres que já não produzem mais os níveis de hormônios necessários. O E2 pode ser usado também no tratamento de doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer, ou de acidentes vasculares cerebrais isquêmicos.¹¹⁰⁻¹¹² E1, E2 e E3 possuem um anel aromático (A), porém as diferenças estruturais estão relacionadas ao anel D devido ao tipo e ao arranjo estereoquímico dos grupos funcionais nas posições C-16 e C-

17. E2 pode possuir um grupo hidroxila em C-17, apontando para baixo (configuração α) ou um grupo hidroxila projetado acima a partir da molécula (configuração β). E2 é o estrogênio mais potente que ocorre naturalmente. O E1 difere do E2 porque possui um grupo carbonila na posição C-17 ao invés de uma hidroxila. Já o E3 possui grupos hidroxilas tanto na posição C-16 como na posição C-17.¹¹²

Esses hormônios são sintetizados em laboratório a partir de vegetais e os estrogênios também podem existir em formas conjugadas. Seus efeitos farmacológicos são similares aos dos estrogênios endógenos, um destes estrogênios conjugados é o estradiol 17 β valerato, (estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol(17 β)-,17-pentanoate), C₂₃H₃₂O₃ (Figura 4.2) (será chamado de **E2 β V**). Este estrogênio é usado, também, no tratamento do câncer de próstata em estágio avançado, no qual atua antagonizando hormônios masculinos.¹¹¹

Figura 4.2 – Estrutura molecular do Estradiol 17 β valerato.

O E2 β V se liga e ativa receptores nucleares específicos. Este agente tem leves propriedades anabólicas e metabólicas, podendo tornar o sangue mais coagulado. Ele entra nas células livremente e, em seguida, interage com um receptor alvo celular citoplasmático. Quando o receptor do estrógeno está ligado ao seu ligante isso faz com que entre no núcleo da célula-alvo e regule a transcrição gênica, levando a formação do RNA mensageiro (mRNA). O mRNA, por sua vez interage com os ribossomos para produzir proteínas específicas que expressam o efeito do E2 β V sobre a célula-alvo. O E2 β V liga-se a ambos os receptores de

estrógenos α e β , ao contrário de outros estrógenos que agem em apenas um destes receptores.¹⁰⁶

O início do uso comercial do hormônio estrógeno ocorreu entre as décadas de 1950 e 1960. Atualmente está disponível em diversas formas farmacêuticas.¹¹³ Os estrogênios são comercializados em preparações orais, transdérmicos, injetável e vaginal. No entanto a molécula de E2 β V pode estar ligada a uma posição C3 do grupo alquila fazendo com que a administração seja facilitada. Estas modificações dão origem ao cipionato de estradiol (na forma injetável) e ao acetato de estradiol (aplicações oral e vaginal).

O E2 β V é comercializado sob diversos nomes tais como Merimono[®], usado para reposição hormonal para o tratamento de sintomas da menopausa, e Mesigyna[®], usado na contracepção hormonal, dentre outros. O E2 β V é absorvido pelo trato gastrointestinal se ligando a proteínas plasmáticas. Ele é metabolizado no fígado e excretado via rim na urina. Nas formas orais o E2 β V se encontra em medicamentos como o acetato de estradiol (Estrace[®]) e o valerato de estradiol (EstroFem[®]) assim como em preparações transdérmicas como Alora[®], Climara[®] etc. Na forma injetável ele é encontrado como valerato de estradiol e cipionato de estradiol.^{112,113}

As caracterizações do E2 β V no estado sólido revelaram que o mesmo apresenta outras formas sólidas tais como o estradiol monohidratado¹¹⁴, o estradiol uréia¹¹⁵, etc. Neste contexto e objetivando fornecer informações sobre as propriedades do estado sólido do E2 β V, efetuou-se a caracterização físico-química deste material por DRXM, DSC, TGA e IV e Raman

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Obtenção de cristais

O ingrediente ativo Estradiol 17 β valerato (E2 β V) foi cedido pela Farmácia Rosário, São Carlos – SP. Para a obtenção de cristais com boa qualidade foi utilizada a técnica de evaporação lenta do solvente, solubilizando-se

aproximadamente 0,005g de E2 β V em 1mL de isopropanol. Após alguns dias obteve-se um material cristalino (Figura 4.3) a partir do qual foram selecionados monocristais transparentes para o experimento de difração de raios X.

Figura 4.3 – Cristais obtidos para o E2 β V.

Tabela 4.1 – Dados cristalográficos do E2 β V.

Temperatura [K]	298(2)K
Fórmula Empírica	C ₂₃ H ₃₂ O ₃
Peso Molecular	356,49
Sistema Cristalino/ Grupo Espacial	Monoclínico/ $P2_1$
Dimensões da cela	$a = 7,3730(2)\text{\AA}$
Unitária	$b = 19,8610(6)\text{\AA}$
	$c = 13,9970(4)\text{\AA}$
	$\beta = 90,672(2)^\circ$
Volume [$\text{\AA}^3$]	2049,5(1)
Z	4
Densidade (calculada) [Mg/m^3]	1,155
Coeficiente de Absorção [mm^{-1}]	0,075
$F(000)$	776
Tamanho do Cristal [mm]	0.67 x 0.07 x 0.02
Variação do θ, para a coleta de dados($^\circ$)	2,91 – 24,72
Variação dos Índices	-8,8; -23; 22; -16,16
Reflexões coletadas	6876
Reflexões independentes	6876
Completeza	99,4%
Dados / restrições /parâmetros	6876/ 1 / 476
S	1,034
R final para $I > 2\sigma(I)$	$R_1 = 0,0668$, $wR_2 = 0,1270$
R para todos os dados	$R_1 = 0,1267$, $wR_2 = 0,1502$
Maior e menor pico de densidade eletrônica [$\text{e.\AA}^{-3}$]	0,231 e -0,246

A Tabela 4.1 relaciona os dados cristalográficos assim como parâmetros obtidos no ciclo final de refinamento da estrutura cristalina do Estradiol 17 β Valerato (E2 β V) a partir de dados coletados a temperatura ambiente.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A literatura acerca do estradiol é bastante vasta em relação ao planejamento e caracterização de novas formas sólidas. Em sua maioria as formas reportadas foram caracterizadas por meio de difração de raios X de monocristal (DRXM), Raman, IR e DSC/TG, dentre outras. Porém todas elas se referem ao E2. Neste trabalho uma nova forma do Estradiol, sendo o Estradiol 17 β valerato (E2 β V), foi caracterizada por DRXMC.

Figura 4.4 – Diagrama tipo ORTEP-3⁷⁸ da unidade assimétrica do E2 β V a temperatura ambiente, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides térmicos com 30% de probabilidade.

O E2 β V cristaliza no grupo espacial monoclinico P2₁, apresentando 2 moléculas independentes por unidade assimétrica, nomeadas como moléculas A e B. A Figura 4.4 apresenta um diagrama tipo ORTEP-3⁷⁸ da unidade assimétrica do E2 β V, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides térmicos com 30% de probabilidade. Nela pode-se notar que o tamanho dos elipsoides térmicos dos

átomos C21, C22 e C23, em ambas as moléculas, é sensivelmente maior ao encontrado no resto dos átomos das moléculas evidenciando a presença de uma importante vibração térmica na cadeia valerato a temperatura ambiente. O refinamento usando um modelo de desordem posicional em duas conformações para esta cadeia resultou ser inadequado e instável. Sendo assim, se optou por manter um modelo de uma só conformação com vibrações grandes.

4.3.1 Conformação molecular

Como pode ser visualizado na Figura 4.4 ambas as moléculas do E2 β V são constituídas de um grupo ciclopentanoperidrofenantreno que consiste em 4 anéis cíclicos, não-planares fusionados, sendo três deles com 6 átomos de carbono e um com 5. Todo membro pertencente à classe dos esteroides apresentam esta estrutura. Estes anéis podem possuir configurações *cis* ou *trans*. Os anéis são nomeados como A, B, C e D conforme pode ser visualizado na Figura 4.1. No caso do E2 β V, o anel A adota uma conformação planar, sendo este o único anel aromático. Os anéis B e D adotam uma conformação envelope, enquanto que o anel C uma conformação cadeira. Pode-se notar que ambas as moléculas apresentaram uma conformação molecular na qual a cadeia valerato forma praticamente um ângulo reto com o plano dos anéis fusionados.

Figura 4.5 – Ângulo formado pelos planos médio através dos anéis A e B, C e D para ambas as moléculas.

O plano médio através do anel A forma um ângulo de $8,89^\circ$ com o plano médio através dos outros três anéis. Esse ângulo é de $7,46^\circ$ para a molécula B (Figura 4.5). O ângulo entre o plano médio através dos anéis B, C e D e o grupo O-CO-C da cadeia valerato é de $58,86^\circ$ para a molécula A e de $57,18^\circ$ para a molécula B.

Essas diferenças conformacionais podem ser melhores compreendidas ao se visualizar a Figura 4.6(a) que mostra a superposição das moléculas A e B. Assim pode se observar que a principal diferença nas conformações moleculares de ambas as moléculas está relacionada à posição da cadeia valerato. Esta conformação está caracterizada pelos ângulos de torção ϕ_1 entre os átomos O2-C19-C20-C21, ϕ_2 entre os átomos C19-C20-C21-C22 e ϕ_3 entre os átomos C20-C21-C22-C23 como mostra a Figura 4.6(b).

Figura 4.6 – (a) Superposição das moléculas A em vermelho e B em azul, (b) principais ângulos de torção que descrevem a conformação da cadeia valerato.

A conformação da cadeia valerato, discutida no parágrafo anterior, está estabilizada por interações intramoleculares fracas do tipo C-H...O em ambas as moléculas. Os parâmetros geométricos que caracterizam essas interações estão listados na Tabela 4.2 e mostrados na Figura 4.7. Ambas as moléculas apresentam cinco interações intramoleculares fracas que estabilizam suas conformações. Duas delas envolvem hidrogênios dos carbonos C16 e C17 do anel D e o oxigênio da carbonila O3, duas envolvendo dois dos hidrogênios da metila substituída no carbono C18 do anel D e o oxigênio O2 da cadeia valerato e a última envolve um

hidrogênio do carbono C21 da cadeia valerato e o mesmo oxigênio O2. As quatro primeiras interações estabilizam a conformação do grupo O-CO-C do substituinte valerato enquanto a última estabiliza a conformação da cadeia de quatro carbonos.

Figura 4.7 – Interações intramoleculares da molécula A e B do E2 β V a temperatura ambiente.

Tabela 4.2 – Parâmetros geométricos que caracterizam as interações intramoleculares do E2 β V. Os símbolos "D" e "A" se referem a átomos doador e receptor de hidrogênio, respectivamente.

D-H...A	D-H(Å)	D...A (Å)	H...A (Å)	D-H...A (°)
Molécula A				
C(16A)-H(16A)...O(3A)	0,970	3,061(6)	2,857	92,8
C(17A)-H(17A)...O(3A)	0,980	2,676(5)	2,543	86,9
C(18A)-H(18B)...O(2A)	0,960	2,750(5)	2,524	93,2
C(18A)-H(18C)...O(2A)	0,960	2,750(5)	2,821	75,9
C(21A)-H(21A)...O(2A)	0,970	2,966(1)	2,714	95,4
Molécula B				
C(16A)-H(16A)...O(3A)	0,970	3,051(6)	2,834	93,5
C(17B)-H(17B)...O(3B)	0,980	2,668(5)	2,528	87,3
C(18B)-H(18D)...O(2B)	0,960	2,751(5)	2,492	95,3
C(18B)-H(18E)...O(2B)	0,960	2,751(5)	2,863	73,6
C(21B)-H(21B)...O(2B)	0,970	2,881(1)	2,625	95,3

4.3.2 Empacotamento Cristalino

O empacotamento cristalino do E2 β V é estabilizado por interações intermoleculares clássicas do tipo O-H...O assim como não clássicas do tipo C-H...O

e $C-H\cdots\pi$. As ligações de hidrogênio fortes do tipo $O-H\cdots O$ dão lugar à formação de cadeias infinitas unidimensionais. Estas interações ligam o grupo hidroxílico do anel A com a carboxila da porção éster do valerato. Essa ligação une duas moléculas equivalentes por simetria, ou seja, ocorrem apenas entre *Molécula A...Molécula A* e *Molécula B...Molécula B*, formando duas cadeias independentes infinitas que crescem ao longo da direção do eixo *c* (Figura 4.8).

Figura 4.8 – Interações intermoleculares do E2βV que formam as cadeias ao longo do eixo *c*.

Assim temos duas cadeias paralelas, uma formada exclusivamente por moléculas A e uma formada por moléculas B. À distância $H3\cdots O3$ na molécula A é de 1,815Å e na molécula B é de 1,959Å. O átomo H3 está covalentemente ligado a O1 a uma distância de 0,982Å para a molécula A e a uma distância de 0,828Å na molécula B, além disso, a distância entre os átomos doadores O1 e aceptores O3 para a molécula A é de 2,790(4)Å e de 2,768(5) Å para a molécula B. Além das ligações de hidrogênio fortes formando as cadeias, o empacotamento cristalino mostra a presença de outras interações intermoleculares não clássicas tais como a existente entre os átomos $C(9B)-H(9B)\cdots O(1A)$, sendo o carbono C(9B) do anel B com o oxigênio O(1A) pertencente a hidroxila na posição β do esqueleto esteroidal. Estas interações fracas do tipo $C-H\cdots O$ unem, assim, cadeias infinitas paralelas de moléculas A e moléculas B (Figura 4.8). Interações intermoleculares $C-H\cdots O$ adicionais ligam cada par de cadeias infinitas com outros pares levando à formação

de um empacotamento tridimensional. Os valores dos parâmetros que caracterizam estas interações podem ser observados com mais detalhes na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Geometria ($\text{\AA}$, $^\circ$) das ligações de hidrogênio intermoleculares fortes no composto E2 β V. Os símbolos “D” e “A” significam doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente.

D–H...A	D–H($\text{\AA}$)	D...A($\text{\AA}$)	H...A ($\text{\AA}$)	D–H...A($\text{\AA}$)
O(1A)–H(3A)...O(3A) ⁽ⁱ⁾	0,982	2,790(4)	1,815	171,0
O(1B)–H(3B)...O(3B) ⁽ⁱⁱ⁾	0,828	2,768(5)	1,959	165,4
C(9B)–H(9B)...O(1A) ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0,980	3,615(5)	2,645	170,5
C(7A)–H(7A)...O(3B) ^(iv)	0,969	3,690(7)	2,736	168,2
C(22B)–H(22D)...O(1B) ^(v)	0,970	3,650(1)	2,784	149,5
C(11A)–H(11A)...O(3B) ^(vi)	0,969	3,306(6)	2,792	142,9
C(11B)–H(11D)...O(3A) ^(vii)	0,969	3,758(5)	2,806	167,6

Operações de simetria: (i) $x, y, z+1$; (ii) $x, y, z-1$; (iii) $-x+2, y+1/2, z$; (iv) $-x+2, y+1/2, -z$; (v) $x-1, y, z-1$; (vi) $-x+1, y+1/2, -z$; (vii) $-x+1, y-1/2, -z+1$

Além destas ligações de hidrogênio existem, também, interações hidrofóbicas do tipo C–H... π que ajudam na estabilização do empacotamento tridimensional. Assim, por exemplo, as cadeias formadas por moléculas A estão unidas a aquelas formadas por moléculas B através de interações C–H... π entre o carbono terminal C23B da cadeia valerato das moléculas B, com o anel aromático A das moléculas A (veja Figura 4.9). Estas interações estão caracterizadas por uma distância C(23B) – Cg1 de 2,846 $\text{\AA}$ e um ângulo de 141,86° (Figura 4.9). Esta interação intermolecular, apesar de ser fraca, contribui para estabilizar, ainda que parcialmente, a conformação da cadeia valerato a temperatura ambiente. A baixa energia de interação desta ligação se põe em evidencia ao observar as altas vibrações térmicas apresentadas pelos átomos terminais desta cadeia.

Figura 4.9 – Representação da interação C–H... π na estrutura a temperatura ambiente.

4.3.3 Análise Estatística da Conformação Molecular

Assim como foi realizado para o MBZ, as distâncias interatômicas, ângulos de valência e ângulos de torção do composto E2βV, foram analisados e comparados com as estruturas depositadas na base de dados CSD²² utilizando o programa MOGUL.⁷⁶ Os valores obtidos revelaram que tanto os comprimentos de ligação quanto os ângulos de valência e de torção determinados experimentalmente estão condizentes com os valores esperados para um bom refinamento das estruturas com boa qualidade. Entretanto, características geométricas peculiares para esta estrutura mostraram desvios de determinados comprimentos (encontram-se descritos no Apêndice C), e ângulos. Alguns dos principais resultados para a molécula A e B encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Maiores discrepâncias para comprimentos de ligação (Å), ângulos de valência (°) da estrutura E2βV obtidas com o uso do MOGUL.⁷⁶

Comprimento de Ligação	Valor encontrado	Número de estruturas	Valor médio	Mediana	Desvio padrão	Iz-scorel
O(3B)–C(19B)	1,189	1000	1,222	1,224	0,030	1,108
O(1A)–C(3A)	1,390	6999	1,367	1,367	0,025	0,918
O(3A)–C(19A)	1,201	1000	1,222	1,224	0,030	0,686
O(2B)–C(17B)	1,449	1647	1,460	1,459	0,019	0,549
O(2A)–C(19A)	1,322	943	1,338	1,339	0,031	0,497
Ângulo de Valência						
O(1B)–C(3B)–C(2B)	123,118	9526	120,055	119,909	2,804	1,092
O(1B)–C(3B)–C(4B)	117,283	4518	119,771	119,782	2,622	0,949
O(1A)–C(3A)–C(4A)	117,846	4518	119,771	119,782	2,622	0,734
O(1A)–C(3A)–C(2A)	122,094	9191	120,055	119,909	2,804	0,727
O(3B)–C(19B)–C(20B)	126,414	2455	123,818	124,662	4,155	0,625

Analisando a Tabela 4.4 podemos observar que as três primeiras ligações que apresentam discrepância envolvem os átomos que participam das ligações de hidrogênio fortes do tipo O-H...O que formam as cadeias ao longo do eixo c. Estas interações levam assim, a uma redistribuição da densidade de carga eletrônica que tem como consequência a diminuição do comprimento de ligação da carbonila, C19-O3, e o aumento do comprimento de ligação da hidroxila C3-O1 em ambas as moléculas. Esta mesma interação é a responsável pelo aumento dos ângulos de valência O1-C3-C2 e a diminuição do ângulo O1-C3-C4 em ambos os casos. As

interações nas quais está envolvido o átomo de oxigênio O2 (veja seção 4.3.1) são as responsáveis pela diminuição dos comprimentos de ligação C-O. Na Figura 4.10 está representada uma análise estatística dos valores do comprimento de ligação O(3A)–C(19A).

Figura 4.10 – Histograma do comprimento de ligação O3A-C19A obtido com o uso do programa MOGUL.⁷⁸

4.3.4 Caracterização Espectroscópica e Térmica

Na análise dos espectros de I.V. (Fig. 4.11) e Raman (Fig. 4.12) do E2βV é possível visualizar os modos de estiramento relacionados às características estruturais. Como foi feito no capítulo anterior para o mesilato de mebendazol as regiões foram divididas em bandas.

Região alta (2800-3600cm⁻¹): Nessa região, podemos verificar vibrações de estiramento OH. O modo relativo ao estiramento OH das ligações intermoleculares é observado em 3400-3200 cm⁻¹ (valor esse atribuído para ligações de hidrogênio intermoleculares) caracterizando-se como largas e fortes no I.V. e fracas no Raman. Além dessas bandas que não podem ser visualizada de modo significativo por espectroscopia Raman, temos os estiramentos relativos aos C_{sp}² dos carbonos que participam do anel aromático. Esses estiramentos aparecem logo acima de 2990cm⁻¹

até 3040cm^{-1} aproximadamente. Já os estiramentos dos C_{sp}^3 aparecem logo abaixo de 2990cm^{-1} até 2800cm^{-1} .

Figura 4.11 – Espectro Infravermelho do E2βV.

Região de Média Energia ($1150\text{-}1700\text{cm}^{-1}$): Nessa região se observam bandas em torno de 1740 cm^{-1} que podem corresponder ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ do éster, no espectro Raman esse modo aparece de médio a fraco. Nessa região, mais na faixa de $1410\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$, ocorrem as bandas características do grupo fenol. Além disso, pode se atribuir o modo relativo ao estiramento assimétrico referente ao COC do éster na faixa de $1275\text{-}1185\text{ cm}^{-1}$.

Figura 4.12 – Espectro Raman do E2βV

Região de Baixa Energia (400-1100 cm^{-1}): Nessa região os modos de estiramento simétrico COC do éster é identificado em 1150-1160 cm^{-1} , sendo este modo fraco no Raman. Essa região abrange, também, outros modos característicos do fenol nas regiões de 720-600 cm^{-1} e 450-375 cm^{-1} . A primeira delas refere-se às vibrações OH fora do plano, que são de tamanho médio a fraco, e a segunda região envolve as vibrações no plano, sendo que neste caso as bandas aparecem fracas no Raman.

Figura 4.13 – Curvas de DSC do E2βV.

As figuras 4.13 e 4.14 mostram as curvas de DSC e TGA do E2βV, respectivamente. Em ambas as curvas podem ser observadas anomalias entre aproximadamente 145°C e 300°C, as quais se associam aos processos de fusão e de decomposição da amostra. O DSC a alta temperatura mostra a presença de um pico endotérmico associado à fusão do material com temperatura *onset* em torno de 145°C. No TGA nota-se uma curva correspondente a um processo de decomposição da amostra em 262°C. Essa perda de massa pode ser atribuída à degradação molecular.

Figura 4.14 – Curvas de TGA do E2βV.

4.3.5 Transição de Fase

No intuito de melhorar a qualidade dos dados, diminuindo ao mesmo tempo as altas vibrações térmicas apresentadas pelos carbonos terminais da cadeia valerato da estrutura medida a temperatura ambiente, os dados de difração de raios X foram re-coletados a baixa temperatura (100(2)K). Os parâmetros de cela obtidos a baixa temperatura se mostraram significativamente diferentes daqueles obtidos a temperatura ambiente, indicando uma possível transição de fase sólido-sólido. Esta transição foi confirmada uma vez resolvida e refinada a estrutura cristalina devido às diferenças conformacionais apresentadas pelas moléculas entre ambas às temperaturas. Na Tabela 4.5 encontram-se os dados cristalográficos e os parâmetros obtidos no ciclo final de refinamento dos dados medidos em ambas as temperaturas para comparação. A Figura 4.15 apresenta um diagrama tipo ORTEP-3⁷⁸ da unidade assimétrica do E2βV medida a 100K, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides térmicos com 30% de probabilidade.

Tabela 4.5 – Dados cristalográficos do E2 β V coletados a temperatura ambiente e baixa temperatura.

Temperatura [K]	298(2)K	100(2)K
Fórmula Empírica	$C_{23}H_{32}O_3$	
Peso Molecular	356,49	
Sistema Cristalino	Monoclínico	
Grupo Espacial	$P2_1$	
Dimensões da cela Unitária	$a = 7,3730(2)$ $b = 19,8610(6)$ $c = 13,9970(4)$ $\beta = 90,672(2)$	$7,568(4) \text{ \AA}$ $18,657(8) \text{ \AA}$ $14,090(13) \text{ \AA}$ $90,32(2)^\circ$
Volume [$\text{\AA}^3$]	2049,51(10)	1989(2)
Z	4	
Densidade (calculada) [Mg/m^3]	1,155	1,190
Coeficiente de Absorção [mm^{-1}]	0,075	0,077
$F(000)$	776	
Tamanho do Cristal [mm]	0,67 x 0,07 x 0,02	
Variação do θ , para a coleta de dados($^\circ$)	2,91 – 24,72	4,09 – 25,3
Variação dos Índices	-8,8; -23,22; -16,16	
Reflexões coletadas	6876	6529
Reflexões independentes	6876	6514
Completeza	99,4%	98,6%
Dados/restrições/parâmetros	6876/1/476	6514/1/482
S	1,034	1,052
R final para $I > 2\sigma(I)$	$R_1=0,0668, wR_2=0,1270$	$R_1=0,0832, wR_2=0,1881$
R para todos os dados	$R_1=0,1267, wR_2=0,1502$	$R_1=0,1422, wR_2=0,2149$
Maior e menor pico de ρ [$\text{e.\AA}^{-3}$]	0,231 e -0,246	0,285 e -0,223

Figura 4.15 – Diagrama tipo ORTEP-3⁷⁸ da unidade assimétrica do E2 β V a 100K, mostrando a numeração dos átomos e elipsoides térmicos com 30% de probabilidade.

A primeira evidência da presença de uma transição de fase foi à variação dos módulos dos parâmetros de cela já que uma diminuição destes valores é esperada com a diminuição da temperatura. Neste caso o eixo **b** teve uma redução de mais de

1,2Å, muito além da variação normalmente esperada, enquanto que o parâmetro de cela **a** teve um aumento de aproximadamente 0,1Å. Ao resolver e refinar a estrutura se constatou que estas mudanças estavam relacionadas com uma importante mudança conformacional da cadeia terminal do grupo valerato que justamente se encontra na direção do eixo **b** a temperatura ambiente. Assim, como era de se esperar, houve uma importante diminuição das vibrações térmicas dos átomos C21, C22 e C23. Porém esta diminuição foi acompanhada de uma mudança conformacional, que levou este grupo terminal, o qual na temperatura ambiente se encontrava na direção quase perpendicular ao plano molecular, a se deslocar na estrutura de baixa temperatura até o mesmo plano dos anéis moleculares. Assim, se observa que ao diminuir a temperatura este grupo rotaciona mudando a conformação molecular o que leva a uma importante diminuição do parâmetro de cela **b**, como pode se observar na Figura 4.16.

Figura 4.16 – Empacotamento cristalino visto ao longo do eixo **a** da estrutura a temperatura ambiente (a) e 100K (b).

Para melhor compreensão dos processos termodinâmicos envolvidos nesta transição de fase foram obtidas curvas de DSC tanto em ciclos de aquecimento quanto de resfriamento. Estas curvas mostraram a presença de uma transição no ciclo de resfriamento da amostra de E2βV a partir da temperatura ambiente. Esta transição está caracterizada por um pico endotérmico com temperatura *onset* de -22°C. No ciclo de aquecimento, no entanto, o pico exotérmico correspondente se

encontra em -16°C (Figura 4.17). Esta transição apresenta assim uma histerese de aproximadamente 3°C .

Figura 4.17 – Curvas de DSC do E2βV obtidas durante os ciclos de resfriamento e aquecimento a partir da temperatura ambiente.

Os picos apresentados pelas curvas de DSC estão relacionados a uma transição de fase reversível de primeira ordem. Esta transição envolve uma mudança estrutural do grupo valerato que, ao diminuir a temperatura, tendem a se ordenar no mesmo plano molecular, ao contrário da temperatura ambiente em que estes átomos se encontram fora do esqueleto esteroidal. Portanto a transição de fase sólido-sólido e as duas estruturas relacionadas a elas foram caracterizadas, o que permitiu a compreensão das mudanças estruturais e térmicas em função da temperatura (Figura 4.17).

4.3.6 Conformação Molecular a 100K

Figura 4.18 – (a) Sobreposição das moléculas nas diferentes temperaturas. (b) Valores dos ângulos de torção que descrevem a conformação da cadeia terminal do grupo valerato do E2 β V a ambas as temperatura.

A estrutura cristalina do E2 β V a 100K possui, também, duas moléculas por unidade assimétrica. A superposição das moléculas da estrutura medida a temperatura ambiente com a das obtidas a baixa temperatura mostra que a mudança conformacional envolve principalmente os átomos terminais da cadeia valerato, C21, C22 e C23. A conformação deste grupo pode ser caracterizada através dos três ângulos de torção utilizados anteriormente para descrever a conformação deste grupo, Φ_1 , Φ_2 e Φ_3 . A Figura 4.18 ilustra a superposição das moléculas nas diferentes temperaturas (a) e em (b) estão relacionados os valores dos ângulos de torção comparados com o da temperatura ambiente e o da baixa temperatura.

4.3.7 Interações intra e intermoleculares a baixa temperatura.

A análise das interações intramoleculares apresentadas pela estrutura à baixa temperatura mostra, como era de se esperar, algumas diferenças quando comparadas as observadas à temperatura ambiente. A Tabela 4.6 descreve as interações intramoleculares com os seus respectivos valores obtidos a 100K e na Figura 4.19 (a) estão esquematizadas as mesmas junto com as interações discutidas anteriormente para a estrutura medida a temperatura ambiente.

Tabela 4.6 – Interações intramoleculares do E2 β V para a baixa temperatura. Os símbolos “D” e “A” são doador e receptor de hidrogênio, respectivamente.

D–H...A	D–H(Å)	D...A(Å)	H...A(Å)	D–H...A(°)
Molécula A				
C(12A)–H(12A)···O(2A)	0,970	3,179(8)	2,990	92,2
C(16A)–H(16A)···O(3A)	0,970	3,128(8)	2,386	99,7
C(17A)–H(17A)···O(3A)	0,980	2,668(7)	2,504	88,7
C(18A)–H(18A)···O(2A)	0,960	2,746(8)	2,439	98,2
C(21A)–H(21A)···O(2A)	0,970	2,904(8)	2,657	94,9
Molécula B				
C(16B)–H(16D)···O(3B)	0,970	3,110(8)	2,919	92,1
C(17B)–H(17B)···O(3B)	0,980	2,708(7)	2,574	87,1
C(18B)–H(18E)···O(2B)	0,960	2,718(8)	2,386	99,7
C(21B)–H(21D)···O(3B)	0,970	2,893(8)	2,637	95,3
C(22B)–H(22C)···O(3B)	0,970	3,408(8)	2,908	113,1

Nessa figura pode se observar que a 298K a conformação da cadeia terminal do grupo valerato da molécula A é estabilizada por uma interação fraca do tipo C–H···O envolvendo o carbono C21 e o oxigênio O2, porém ao diminuir a temperatura esse grupo rotaciona levando à quebra dessa interação e à formação de outra do mesmo tipo, envolvendo também o átomo de carbono C21, mas agora com o oxigênio O3 como receptor. Essa mudança no padrão de interações intramoleculares acaba estabilizando a nova conformação molecular. Algo similar acontece com a molécula B somente que neste caso a mudança conformacional favorece a formação de duas novas interações C–H···O com o oxigênio O3, uma delas envolvendo os átomos de hidrogênio do carbono C21 e outra a do carbono C22. Essa diferença nas interações intramoleculares de ambas as moléculas a 100K leva à estabilização de diferentes conformações para cada uma delas.

Figura 4.19 – (a) Interações intramoleculares da estrutura a 100K; (b) interações intramoleculares da temperatura de 298K.

Os parâmetros geométricos que caracterizam as interações intermoleculares da estrutura do E2 β V a 100K estão descritos na Tabela 4.7 e mostradas na Figura 4.20. Em relação às ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas O–H $\cdots$ O discutidas anteriormente, elas permanecem inalteradas com a diminuição da temperatura. Portanto a 100K continuamos tendo as cadeias infinitas de moléculas A paralelas às de moléculas B ao longo do eixo **c**.

Tabela 4.7 – Geometria (Å,°) das ligações intermoleculares de hidrogênio do E2 β V a 100K. Os símbolos “D” e “A” significam doadores e aceptores de hidrogênio, respectivamente.

D–H $\cdots$ A	D–H(Å)	D $\cdots$ A(Å)	H $\cdots$ A(Å)	D–H $\cdots$ A(Å)
C(7B)–H(7D) $\cdots$ O(3A)	0,970	3,622(8)	2,682	163,4
C(9A)–H(9A) $\cdots$ O(1B)	0,980	3,581(7)	2,644	160,0
O(1A)–H(3A) $\cdots$ O(3A) ⁽ⁱ⁾	0,820	2,789(6)	2,004	160,0
O(1B)–H(3B) $\cdots$ O(3B) ⁽ⁱⁱ⁾	0,821	2,797(6)	1,991	167,5
C(21B)–H(21C) $\cdots$ O(1B) ⁽ⁱⁱⁱ⁾	0,970	3,505(8)	2,705	140,0
C(11A)–H(11A) $\cdots$ O(3B) ^(iv)	0,971	3,758(8)	2,793	172,3
C(11B)–H(11D) $\cdots$ O(3A) ^(v)	0,970	3,645(8)	2,806	145,1
Operações de simetria: (i) x,y,z-1; (ii) x,y,z+1; (iii) x-1,y,z+1, (iv) -x,1/2+y,-z; (v) x-1,y,z;				

Estas cadeias infinitas estão unidas entre si através de interações intermoleculares fracas do tipo C–H $\cdots$ O como mostra a Figura 4.20. A primeira delas envolve o hidrogênio H7D do carbono C7 da molécula B e o átomo de oxigênio O3

da molécula A. A outra interação envolve o hidrogênio H9A, ligado ao carbono C9 da molécula A, e o oxigênio O1 das moléculas B. Estas duas ligações formam, assim, pares de cadeias infinitas acopladas, porém este acoplamento é diferente do observado na estrutura medida a temperatura ambiente (ver Figura 4.8). Esta diferença nas interações intermoleculares é também consequência da rotação da cadeia terminal do grupo valerato. As outras três interações intermoleculares listadas na Tabela 4.7 ligam estes pares de cadeias infinitas com outros pares levando à formação de um empacotamento tridimensional.

Figura 4.20 – Interações intermoleculares do E2βV para a baixa temperatura.

4.4 CONCLUSÃO

Neste capítulo descreveu-se a caracterização de estado sólido de uma nova forma sólida do princípio ativo Estradiol 17 β Valerato. Esta caracterização foi realizada utilizando dados de difração de raios X em monocristal juntamente com outras técnicas complementares tais como DSC, TGA, IV e Raman. A análise estrutural mostrou que no estado sólido este hormônio apresenta duas moléculas independentes por unidade assimétrica as quais mostram evidências de desordem vibracional na cadeia terminal do grupo valerato. A análise térmica mostrou que este composto funde a 145°C sendo que o processo de decomposição da amostra acontece em 262°C. Analisando o comportamento térmico desse insumo a baixa temperatura constatou-se que ele apresenta uma transição de fase estrutural de primeira ordem em -22°C ao descer a temperatura e em -16°C ao subir. A caracterização estrutural deste sólido farmacêutico a 100K permitiu observar que a transição de fase está relacionada com uma forte mudança conformacional do grupo valerato. Estudos complementares como difração de Raios-X de pó e cálculos teóricos irão realizados para poder obter uma melhor caracterização dos processos envolvidos nesta transição.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O entendimento e o controle da química dos fármacos são de fundamental importância, pois cada um apresenta propriedades físico-químicas únicas, sendo responsáveis para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas. Estas propriedades podem minimizar o impacto das possíveis mudanças nas formas cristalinas, como também é capaz de auxiliar na escolha das formas sólidas, fazendo com que o medicamento se torne mais eficaz e com seus efeitos colaterais reduzidos.

Diante deste contexto este projeto de pesquisa teve como principal objetivo buscar e caracterizar novas formas de dois fármacos amplamente utilizados no mercado: Mebendazol e Estradiol 17 β Valerato. Como resultado obtivemos um novo sal de mebendazol (mesilato de mebendazol monohidratado), e uma forma sólida do Estradiol 17 β Valerato. Os dados obtidos possibilitaram a caracterização estrutural e cristalina com diversas técnicas, além da compreensão e habilidade sobre o fenômeno de polimorfismo.

Como perspectiva, pretende-se dar continuidade ao estudo realizado para este trabalho com o intuito de buscar novas formas polimórficas destes e de novos IFAs, além da realização de novos testes como de solubilidade destas formas obtidas e possivelmente poder analisa-las como novos candidatos a fármacos.

Em especial o resultado obtido até o momento para o Estradiol 17 β Valerato permitiu a realização de uma caracterização apurada desse princípio, porém novos estudos envolvendo cálculos teóricos e difração de raios X de pó com variação de temperatura irão ser realizados para uma melhor caracterização da transição de fase estudada.

REFERÊNCIAS

- 1 DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 1, p. 42-57, Jan. 2004.
- 2 RAW, A. S. et al. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 397-414, 2004.
- 3 BRITTAIN H. G. (Ed). **Polymorphisms in pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker Inc., 1999. v. 95. 448p.
- 4 RAW, A. S.; YU, L. X. Pharmaceutical solid polymorphism in drug development and regulation - preface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 235-236, 2004.
- 5 NEWMAN, A. W.; BYRN, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discovery Today**, v. 8, n.19, p. 898-905, Oct. 2003.
- 6 GIRON, D. et al. Solid state characterizations of pharmaceutical hydrates. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 453-465, 2002.
- 7 BYRN, S. R. et al. Solid-state pharmaceutical chemistry. **Chemistry of Materials**, v. 6, n. 6, p. 1148-1158, 1994.
- 8 YU, L. et al. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 3, p. 118-127, June 1998.
- 9 CLARKE, H. D. et al. Structure-stability relationships in cocrystal hydrates: does the romiscuity of water make crystalline hydrates the nemesis of crystal engineering? **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 5, p. 2152-2167, May 2010.
- 10 YU, L. X. et al. Applications of process analytical technology to crystallization processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 349-369, Feb. 2004.
- 11 HANCOCK, B. C.; ZOGRAF, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 1, p. 1-12, Jan. 1997.
- 12 HANCOCK, B. C.; PARKS, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 397-404, Apr. 2000.

13 ULRICH, J. Solution crystallization - developments and new trends. **Chemical Engineering & Technology**, v. 26, n. 8, p. 832-835, Aug. 2003.

14 YU, L. X. et al. Scientific considerations of pharmaceutical solid polymorphism in abbreviated new drug applications. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, p. 531-536, Apr. 2003.

15 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Política vigente para a regulamentação de medicamentos no Brasil. Brasília, 2003. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/medicamentos/manual_politica_medicamentos.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2011.

16 BRASIL. Resolução RDC nº 16, de 02 de março de 2007. Aprova o regulamento técnico para medicamentos genéricos, anexo I. acompanha esse regulamento o anexo II, intitulado "folha de rosto do processo de registro e pós registro de medicamentos genéricos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 2007. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25960&word=>>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

17 BYRN, S. et al. Pharmaceutical solids – a strategic approach to regulatory considerations. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 7, p. 945-954, July 1995.

18 FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. **Guidance for industry bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products** – general considerations, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf>> Acesso em 03 jan. 2012.

19 CUI, Y. A material science perspective of pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 339, n. 1-2, p. 3-18, July 2007.

20 MCCRONE, W.C. Polymorphism. In: FOX, D.; LABES, M. M.; WEISSBERGER, A, (Eds). **Physics and chemistry of the organic solid state**. New York: Wiley-Interscience, 1965.

21 DESIRAJU, G. R. Polymorphism: the same and not quite the same. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2008.

22 ALLEN, F. H.; MOTHERWELL, W. D. S. Applications of the cambridge structural database in organic chemistry and crystal chemistry. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 58, n. 1, p. 407-422, June 2002.

23 CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE. Disponível em: <<http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>>. Acesso em: novembro de 2011.

24 CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Challenges in polymorphism of pharmaceuticals. **CRISPS**, v. 5, n. 1, p. 9-12, 2004.

25 STAHLY, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 6, p. 1007-1026, June 2007.

26 NANGIS, A. Conformational polymorphism in organic crystals. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 5, p. 595-604, 2008.

27 DA SILVA, C. C. P. **Caracterização de estado sólido de insumos farmacêuticos ativos: clorpropamida, nevirapina e dietilcarbamazina**. 2010. 187 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

28 GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics**. 4nd. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 406p.

29 HENG, J. Y. Y.; WILLIAMS, D. R. Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II. **Langmuir**, v. 22, n. 16, p. 6905-6909, Aug. 2006.

30 GRIESSER, U. J. The Importance of solvates. In: HILFIKER, R., (Ed.). **Polimorphism in the pharmaceutical industry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH: 2006. p. 211-233.

31 HOSOKAWA, T. et al. Isostructurality among five solvates of phenylbutazone. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 6, p. 1195-1201, Nov.-Dec. 2004.

32 BRITTAIN, H. G. Polymorphism and solvatomorphism 2007. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 98, n. 5, p. 1617-1642, 2009.

33 CHAWLA, G. et al. Characterization of solid-state forms of celecoxib. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 3, p. 305-317, Nov. 2003.

34 MARTINS, F. T. **Química supramolecular de fármacos antirretrovirais inibidores nucleosídeos de transcriptase reversa: novas formas cristalinas e alteração de propriedades de estado sólido**. 2010. 268 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

35 PAULEKUHN, G. S.; DRESSMAN, J. B.; SAAL, C. Trends in active pharmaceutical ingredient salt selection based on analysis of the orange book database. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 6665-6672, Dec. 27, 2007.

- 36 CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 618-644, June 25, 2011.
- 37 SHAN, N.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 440-446, May 2008.
- 38 AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, May 2012.
- 39 RAGER, T.; HILFIKER, R. Cocrystal formation from solvent mixtures. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 7, p. 3237-3241, July 2010.
- 40 PROHENS, R., PUIGJANER, C. Polimorfismo en la industria farmacéutica. **El Farmacéutico**, n.º 373, Universitat de Barcelona, 2007.
- 41 GIRON, D. et al. Thermal analysis, microcalorimetry and combined techniques for the study of the polymorphic behaviour of a purine derivative. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 57, n. 1, p. 61-73, 1999
- 42 COSTA, L. L. **Avaliação do polimorfismo de fármacos utilizados para produção de medicamentos genéricos no Brasil**. 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- 43 ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.
- 44 PANCHAGNULA, R.; THOMAS, N. S. Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 201, n. 2, p. 131-150, May 2000.
- 45 HORTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1, p. 75-87, 2001.
- 46 MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 6, p. 620-643, June 2002.
- 47 LOBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3-12, July 2000.

48 BRASIL. LEI Nº 9.787, DE 10 DE FEVEREIRO DE 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 12 set. 2011.

49 BRASIL. Resolução RDC n.135, de 29 de maio de 2003. A agência nacional de vigilância sanitária aprova regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 out. 2011.

50 SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 335-347, Feb. 2004.

51 SHARGEL, L.; YU, A.B.C. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 4 ed. Stamford: Appleton & Lange, 1999. 768 p.

52 REUTZEL, E. S. M.; NEWMAN, A. W. The physical characterization of hygroscopicity in pharmaceutical solids. In: HILFIKER, R. (Ed.) **Polymorphism**. Weinheim: Wiley-VCH. 2006, p. 235-258.

53 NEWMAN, A. W.; REUTZEL-EDENS, S. M.; ZOGRAFI, G. Characterization of the "hygroscopic" properties of active pharmaceutical ingredients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 3, p. 1047-1059, Mar. 2008.

54 STRENG, W. H. Physical chemical characterization of drug substances. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 10, p. 415-426, Oct. 1997.

55 BERNSTEIN J. **Polymorphism in molecular crystals**. New York: Oxford University Press, 2002. 410p.

56 GUIDANCE for Industry: ANDAs: pharmaceutical solid polymorphism: chemistry, manufacturing, and controls information. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Washington, DC, julho 2007. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

57 STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 67-90, May 2001.

58 GIRON, D. Monitoring of polymorphism – from detection to quantification. **Engeneering in life scienses**, v. 3, n. 3, p. 103-112, 2003.

59 ARAUJO, L. B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

60 BERNARDES, C. E. S. **Cristalização e polimorfismo na 4'-hidroxiacetofenona e estudo da energética de compostos do tipo hidroxifenilcarbonilo**. 2008. 323 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

61 CORRÊA, R. S. **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização, estrutura e suas Interações intra e intermoleculares**. 2009. 182 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

62 NÝVLT, J.; HOSTOMSKY, J.; GIULIETTI, M. **Cristalização**. São Carlos: Edufscar, 2001. 160 p.

63 CUNHA, S. Simple methods of monocrystal formation of organic compounds for X-ray structural studies. **Quimica nova**, v. 31, n. 4, p. 906-909, 2008.

64 STOUT, G. H.; JENSEN, L. H. **X-ray structure determination**.: a practical guide. New York: John Wiley, 1982.

65 COSTA, V. C. **Síntese de compostos com potenciais atividades biológicas ou magnéticas**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências – Química) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

66 ENRAF-NONIUS. **Diffractometer Kappa**. CCD - NoniusBV; Delft: The Netherlands, 1999.

67 COLLECT: data collection software. Nonius:,Delft,: The Netherlands, 1998.

68 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CARTER, C. W.; SWEET, R. M. (Eds.). **Methods in Enzymology: macromolecular crystallography**. New York: Academic Press, 1997. v. 276. part A., p. 307-326.

69 FARRUGIA, L. J. WinGX: suite for small-molecule single-crystal crystallography. **Journal of Applied.Crystallography**, v. 32, p. 837-838, 1999.

70 SHELDRICK, G. M. **SHELXS-97**: program for crystal structure resolution. Germany: University of Göttingen; Göttingen, 1997.

71 SHELDRICK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Crystallographica Section A**, v. 64, p. 112-122, Jan. 2008.

72 ALTOMARE, A. et al. Completion and refinement of crystals-structures with SIR92. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 343-350, June 1993.

73 BURLA, M. C. et al. SIR2004: an improved tool for crystal structure determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 38, p. 381-388, Apr. 2005.

74 _____. **SHELXL-97**: program for crystal structure analysis Germany: University of Göttingen; Göttingen, 1997.

75 SPEK, A. L. Single-crystal structure validation with the program PLATON. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, p. 7-13, Feb. 2003.

76 BRUNO, I. J. et al. Retrieval of crystallographically – derived molecular geometry information. **Journal of Chemical Information and Computer sciences**, v. 44, n. 6, p. 2133-2144, Nov.-Dec. 2004.

77 BRUNO, I. J. et al. New software for searching the cambridge structural database and visualizing crystal structures. **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v. 58, p. 389-397, June 2002.

78 FARRUGIA, L. J. ORTEP-3 for windows – a version of ORTEP-III with graphical user interface (GUI). **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 565, 1997.

79 BERGERHOFF, G. et al. Evaluation of crystallographic data with the program DIAMOND. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 101, n. 3, p. 221-225, 1996.

80 REDDY, M. et al. Oral drug therapy for multiple neglected tropical diseases - A systematic review. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 298, n. 16, p. 1911-1924, Oct. 2007.

81 AWASTHI, S.; BUNDY, D. A. P.; SAVIOLI, L. Helminthic infections. **British Medical Journal**, v. 327, n. 7412, p. 431-433, Aug. 2003.

82 HOTEZ, P. J. et al. Hookworm: "The great infection of mankind". **Plos Medicine**, v. 2, n. 3, p. 187-191, Mar. 2005.

83 BENNETT, A.; GUYATT, H. Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole. **Parasitology Today**, v. 16, n. 2, p. 71-74, Feb. 2000.

84 FRANÇA, F. F. A. C. **Andrejus korolkovas**: dicionário terapêutico. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

85 WORLD HEALTH ORGANIZATION . Prevention and control of schistosomiasis and the soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO Expert Committee. Geneva, 2002. 73 p.

86 PORTAL EDUCAÇÃO. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/81/mebendazol>>. Acesso em: 15 mar 2012.

87 ALBONICO, M. Methods to sustain drug efficacy in helminth control programmes. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2-3, p. 233-242, May 2003.

88 ABOUL-ENEIN, H. Y.; BUNACIU, A. A.; FLESCHEIN, S. Analysis of mebendazole polymorphs by fourier transform IR spectrometry using chemometric methods. **Biopolymers**, v. 67, n. 1, p. 56-60, 2002.

89 EVANS, A. C. et al. Anthelmintic efficacy of mebendazole depends on the molecular polymorph. **South African Medical Journal**, v. 89, n. 11, p. 1118-1118, Nov. 1999.

90 BLATON, N. M. et al. (5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl)-carbamic acid methyl ester hydrobromide (Mebendazole.HBr), C₁₆ H₁₄ Br N₃ O₃. **Crystal Structure Communications**, v. 9, p. 181-186, 1980.

91 CAIRA, M. R.; DEKKER, T. G.; LIEBENBERG, W. Structure of a 1 : 1 complex between the anthelmintic drug mebendazole and propionic acid. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 28, n. 1, p. 11-15, Jan. 1998.

92 MARTINS, F. T. et al. Intermolecular contacts influencing the conformational and geometric features of the pharmaceutically preferred mebendazole polymorph C. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 7, p. 2336-2344, July 2009.

93 BLATON, N. M.; PEETERS, O. M.; DERANTER, C. J. (5-Benzoyl-1h-benzimidazol-2-YL)-Carbamic acid methyl-ester hydrobromide (MEBENDAZOLE.HBR), C₁₆H₁₄BRN₃O₃. **Crystal Structure Communications**, v. 9, n. 1, p. 181-186, 1980.

94 BRUSAU, E. V. et al. Synthesis and characterization of a new mebendazole salt: mebendazole hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 1, p. 542-552, Jan. 2008.

95 GILLI, G. et al. Evidence for resonance-assisted hydrogen-bonding from crystal-structure correlations on the enol form of the beta-diketone fragment. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 3, p. 1023-1028, Feb. 1989.

96 GIACOVAZZO, C. et al. **Fundamentals of Crystallography**. New York ;Oxford University Press, 2006.

97 HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The nature of π - π interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 14, p. 5525-5534, 1990

98 STEED, J. W.; ATWOOD, J. L. **Supramolecular chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. P. 33-34.

99 SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M. M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 345-349, May 2003.

100 ALTOMARE, A. et al. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 32, p. 115-119, Feb. 1999.

101 SPECK, A. L. "**Platon, a multipurpose crystallographic tool.**" Utrecht University, Utrecht, The Netherlands, 2001. Disponível em: <<http://www.cryst.chem.uu.nl/platon/>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

102 MORSY, M. A.; AL-KHALDI, M. A.; SUWAIYAN, A. Normal vibrational mode analysis and assignment of benzimidazole by ab initio and density functional calculations and polarized infrared and Raman spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 106, n. 40, p. 9196-9203, Oct. 2002.

103 KOMESAROFF, P. A. et al. Effects of wild yam extract on menopausal symptoms, lipids and sex hormones in healthy menopausal women. **Climacteric**, v. 4, n. 2, p. 144-50, 2001.

104 GONZALEZ, F. H. Características dos hormônios. In: **Introdução à endocrinologia reprodutiva veterinária**. Porto Alegre. Editora da UFRGS. 2006. Cap.1, p. 1- 16.

105 HORMÔNIOS. Disponível em: <<http://www.mulherdeclasse.com.br/Hormonios.htm>>. Acesso em 21 mar. 2012.

106 LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 1985. p. 194, 195 e 553.

107 BEATO, M.; CHAVEZ, S.; TRUSS, M. Transcriptional regulation by steroid hormones. **Steroids**, v. 61, n. 4, p. 240-251, Apr. 1996.

108 LARK, S. **Making the Estrogen Decision**. McGraw-Hill professional. 1999. p. 22.

109 GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. cap. 56, p. 606-14.

110 SERVOS, M. R. et al. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrona, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 336, p. 155-170, 2005.

111 BRANDÃO, C. C. S. **Remoção dos contaminantes orgânicos β -Estradiol e saxitoxinas (STX, Neo-STX e dc-STX) por meio de nanofiltração: avaliação em escala de bancada**. 2007. 147 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia ambiental e recursos hídricos) – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

112 KIM, C. S. et al. AKT activation promotes metastasis in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4456-4463, Oct. 2005.

113 SAÚDE NA INTERNET. Disponível em: <<http://www.saudenainternet.com.br>>. Acesso em: 04 abr. 2012.

114 ZHUROVA, E. A. et al. 17 alpha-estradiol center dot 1/2 H₂O: super-structural ordering, electronic properties, chemical bonding, and biological activity in comparison with other estrogens. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 47, p. 17260-17269, Dec. 2009.

115 PARRISH, D. et al. Experimental charge density study of estrogens: 17 beta-estradiol center dot urea. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 51, p. 26442-26447, Dec. 2006.

APÊNDICES

Apêndice A – Técnicas utilizadas neste trabalho

Neste anexo segue uma breve descrição dos principais métodos utilizados neste trabalho.

Análise Térmica: Representa um grupo de técnicas nas quais as propriedades das amostras são medidas em função do tempo e da temperatura, quando a mesma é aquecida ou refrigerada em uma atmosfera específica, mantida em uma temperatura constante ou em uma taxa fixa da mudança de temperatura.

A análise térmica fornece informações quantitativas e qualitativas sobre as modificações polimórficas, associando as energias com suas transições de fase. Estas técnicas permitem analisar os processos de cristalização, fusão, dessolvatação e sublimação tanto em sistemas amorfos quanto cristalinos.^{1,2}

Os métodos calorimétricos mais usados no estudo de formulações farmacêuticas são a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*), e a Termogravimetria (TG).³

Com essas técnicas é possível analisar a estabilidade térmica de uma determinada substância, fornecendo informações relativas ao ponto de fusão, decomposição, recristalização, desidratação/dessolvatação, transformações polimórficas e vítreas, presenças de impurezas, interações entre princípios ativos e excipientes, etc.¹⁻³

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) mede a diferença entre a energia fornecida a uma determinada substância sob análise e a fornecida a um material de referência.³ É aplicada para análises das mudanças termodinâmicas que ocorrem durante o aquecimento da substância. As curvas de DSC analisadas são observadas como temperatura versus fluxo de calor, sendo possível determinar sinais endotérmicos e exotérmicos das amostras, permitindo também a descrição dos sistemas polimórficos monotrópicos ou enantiotrópicos. Esta técnica permite, também, o estudo de solvatos e hidratos.^{4,5}

Na Termogravimetria (TG) é medida a variação da massa da amostra (perda ou ganho de massa) em função do tempo ou temperatura. Os experimentos para verificar estas variações na massa de um material em função da temperatura

são realizados por meio de uma termobalança, que permite estudos das variadas condições experimentais.⁶ Esta técnica é comumente usada para o estudo de processos de decomposição de compostos e dessolvatação.³

Espectroscopia Vibracional: A espectroscopia vibracional é sensível à estrutura de curto alcance de sólidos moleculares. Divide-se em *espectroscopia de absorção no infravermelho* (IR, do inglês *infrared*) e *espectroscopia Raman*. Ambas são usadas para estudar as vibrações moleculares fundamentais, fornecendo assim uma “impressão digital” do sólido molecular.⁷ Portanto é possível o estudo de ligações de hidrogênio e de mudanças conformacionais.⁸

A espectroscopia vibracional é de grande importância também para a caracterização de solvatos isoestruturais e dessolvatados isomórficos. Os dados dos espectros complementam muito bem os obtidos através da difração na caracterização de polimorfos, porque componentes amorfos e cristalinos podem ser detectados e identificados de acordo com sua estrutura química.^{8,9}

A *espectroscopia Raman* permite uma fácil caracterização das diferenças estruturais, também sendo usada para diferenciação de solvatos e polimorfos, devido a sua habilidade em obtenção de informações sobre a rede vibracional de um cristal.³

A *espectroscopia no (IR)* é uma técnica importante para a caracterização de polimorfos. Os espectros de infravermelho dão os modos vibracionais relacionados com a absorção de um composto na região do infravermelho do espectro.⁸

Microscopia ótica e eletrônica: A microscopia permite observar a morfologia de uma determinada substância, sendo um importante critério para uma análise preliminar e monitoração de processos de cristalização.³

As formas dos cristais podem ser observadas por um microscópio óptico ou um microscópio eletrônico de varredura (MEV), fornecendo a diferenciação entre essas formas cristalinas.⁸⁵ O microscópio eletrônico de varredura, MEV (do inglês *scanning electron microscope*, SEM), trabalha acima de 90.000X, com imagens com elevado grau de informações em três dimensões. Ambos os microscópios são úteis durante os estágios iniciais de desenvolvimento de um fármaco.¹⁰

Difração de raios X: A difração de raios X é um método rápido e eficiente para a avaliação de amostras no estado cristalino. Esse método permite a comprovação da formação de solvatos, também permite identificar as fases cristalinas presentes na amostra, sendo às vezes o único meio de determinação.^{3,10}

Uma das técnicas mais propícias para caracterizar e diferenciar formas polimórficas é a difração de raios X por monocristal (DRXM), a qual permite determinar a estrutura cristalina permitindo distinguir com precisão diferentes arranjos dos átomos nos sólidos.¹⁻³ Esta técnica fornece informações essenciais dos polimorfos em nível atômico, assim como das interações inter e intramoleculares, parâmetros de cela unitária, empacotamento e conformação molecular que são de extrema importância para a compreensão de propriedades químicas dos fármacos.⁹

Na falta de monocristais de boa qualidade, a técnica de difração de raios X em amostras policristalinas (DRXP) tem se mostrado uma boa alternativa para a detecção de polimorfos e pseudopolimorfos sendo usada também para a determinação do grau de cristalinidade e de análise quantitativa das fases nos sólidos polimórficos. Ela permite também a detecção de misturas nesses polimorfos e a presença de impurezas.¹⁻³ Essa técnica fornece uma forma de picos detectados em ângulos de espalhamento no padrão de difração característicos para cada substância.^{1,9}

Referências

- 1 CRAIG, D. Q. M. et al. Pharmaceutical applications of micro-thermal analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 5, p. 1201-1213, May 2002.
- 2 SICHINA, W. J. Characterization of pharmaceuticals using thermal analysis. **American Laboratory**, v. 33, n. 1, p. 16, Jan. 2001.
- 3 SOUZA, C. D. **Preparação e caracterização de estruturas polimórficas da tolbutamida e nifedipina**. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Centro de Estudos Gerais, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.
- 4 GIRON, D. Thermal-analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1-59, Jan. 1995.
- 5 BRITTAIN, H. G. Methods for the characterization of polymorphs and solvates. In: **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York. Marcel Dekker, 1999. v. 95, cap.6, p.227-278.
- 6 ARAUJO, L. B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

7 GRUNENBERG, A.; HENCK, J. O.; SIESLER, H. W. Theoretical derivation and practical application of energy temperature diagrams as an instrument in preformulation studies of polymorphic drug substances. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 129, n. 1-2, p. 147-158, Mar. 1996.

8 SCHMIDT, A. C.; SENFTER, N.; GRIESSER, U. J. Crystal polymorphism of local anaesthetic drugs - part I: pramocaine base in comparison with pramocaine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, n. 2, p. 397-408, 2003.

9 DA SILVA, C. C. P. **Caracterização de estado sólido de insumos farmacêuticos ativos: clorpropamida, nevirapina e dietilcarbamazina**. 2010. 187 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

10 BRITTAIN H. G. (Ed). **Polymorphisms in pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker Inc., 1999. v. 95, 448p.

Apêndice B – Mesilato Monohidratado de Mebendazol

Nesse apêndice são apresentados os valores dos comprimentos e ângulos de ligação e parâmetros geométricos para a estrutura do MBZ-H•MeSO₃•H₂O caracterizada neste estudo. Estes valores experimentais foram analisados de acordo com o programa MOGUL.

Comprimentos de Ligação

Fragmento	valor	número	mínimo	máximo	média	mediana	Desvio Padrão	z – score
O1–C1	1.446(2)	3608	1.196	1.719	1.447	1.447	0.014	0.053
C6–C5	1.383(3)	2923	1.300	1.532	1.392	1.392	0.012	0.762
C6–C7	1.386(3)	2581	1.307	1.451	1.382	1.382	0.010	0.355
C12–C11	1.386(3)	2417	1.285	1.522	1.389	1.390	0.011	0.370
C16–C11	1.401(3)	2417	1.285	1.522	1.389	1.390	0.011	1.117
C7–C8	1.407(3)	2417	1.285	1.522	1.389	1.390	0.011	1.536
C9–C8	1.393(3)	1800	1.242	1.472	1.391	1.391	0.009	0.295
O2–C2	1.195(2)	1373	1.158	1.241	1.211	1.212	0.011	1.510
C13–C12	1.391(3)	1354	1.306	1.563	1.384	1.384	0.013	0.600
C15–C16	1.378(3)	1354	1.306	1.563	1.384	1.384	0.013	0.462
C14–C13	1.381(3)	1300	1.273	1.581	1.376	1.376	0.016	0.275
C15–C14	1.376(3)	1300	1.273	1.581	1.376	1.376	0.016	0.021
O3–C10	1.226(3)	960	1.191	1.295	1.227	1.223	0.014	0.044
C5–N3	1.389(2)	899	1.348	1.418	1.386	1.384	0.013	0.262
C11–C10	1.501(3)	450	1.449	1.512	1.490	1.491	0.010	1.183
C8–C10	1.488(3)	450	1.449	1.512	1.490	1.491	0.010	0.163
O1–C2	1.334(2)	118	1.316	1.363	1.339	1.340	0.009	0.540
O4–S1	1.4196(16)	113	1.394	1.491	1.447	1.449	0.015	1.887
O5–S1	1.4413(16)	113	1.394	1.491	1.447	1.449	0.015	0.387
C2–N1	1.381(2)	106	1.330	1.428	1.374	1.374	0.014	0.546
C4–C5	1.392(2)	91	1.372	1.412	1.392	1.392	0.007	0.012
C4–N2	1.391(2)	88	1.349	1.429	1.391	1.390	0.009	0.044
C17–S1	1.747(2)	57	1.702	1.775	1.754	1.754	0.013	0.535
O6–S1	1.4627(14)	55	1.412	1.470	1.451	1.451	0.013	0.887
C3–N3	1.341(2)	20	1.331	1.376	1.349	1.344	0.013	0.626
C3–N2	1.330(2)	17	1.321	1.361	1.345	1.343	0.010	1.418
C9–C4	1.387(3)	15	1.365	1.407	1.389	1.392	0.012	0.174
C3–N1	1.355(2)	8	1.328	1.351	1.336	1.333	0.009	2.202

Ângulos de Ligação

Fragmento	valor	número	mínimo	máximo	média	mediana	Desvio Padrão	z-score
C6-C7-C8	122.75(18)	268	91.991	129.54	120.791	120.77	0.951	2.086
C13-C12-C11	120.02(19)	2478	107.889	125.758	120.337	120.335	0.804	0.408
C15-C16-C11	120.6(2)	2478	107.889	125.758	120.337	120.335	0.804	0.381
C16-C11-C12	118.89(19)	2420	99.839	124.664	118.721	118.746	0.993	0.176
C14-C13-C12	120.2(2)	1408	114.989	125.859	120.291	120.268	0.775	0.102
C14-C15-C16	120.0(2)	1408	114.989	125.859	120.291	120.268	0.775	0.393
C7-C8-C9	119.98(18)	1204	107.467	125.653	119.296	119.372	1.034	0.664
C15-C14-C13	120.2(2)	1170	113.289	128.237	119.842	119.826	0.837	0.458
C6-C5-N3	131.52(17)	1828	125.856	135.642	130.047	129.983	1.727	0.852
C7-C6-C5	116.22(17)	744	114.741	124.625	120.054	120.640	1.798	2.142
C12-C11-C10	123.62(18)	714	116.214	125.302	120.577	120.767	1.993	1.530
C16-C11-C10	117.45(18)	714	116.214	125.302	120.577	120.767	1.993	1.576
C7-C8-C10	116.92(17)	714	116.214	125.302	120.577	120.767	1.993	1.821
O3-C10-C11	118.34(19)	450	105.717	124.295	119.878	119.945	1.520	1.004
O3-C10-C8	119.83(19)	450	105.717	124.295	119.878	119.945	1.520	0.037
C9-C8-C10	123.05(17)	185	115.801	125.449	120.027	119.427	2.237	1.338
C11-C10-C8	121.81(17)	157	114.247	123.826	120.271	120.281	1.418	1.086
C1-O1-C2	115.31(18)	118	111.196	117.794	115.621	115.651	0.955	0.336
O1-C2-O2	126.17(18)	118	122.387	129.188	124.634	124.710	1.010	1.532
O4-S1-C17	107.00(15)	113	103.010	109.708	106.577	106.634	1.080	0.399
O5-S1-C17	106.18(14)	113	103.010	109.708	106.577	106.634	1.080	0.374
O6-S1-O4	112.39(10)	111	100.586	118.026	111.933	112.176	1.826	0.255
O6-S1-O5	110.79(9)	111	100.586	118.026	111.933	112.176	1.826	0.623
O2-C2-N1	125.37(19)	106	121.260	128.102	125.297	125.415	1.281	0.049
C6-C5-C4	122.04(17)	88	120.510	122.846	121.736	121.685	0.471	0.628
C5-C4-N2	106.93(15)	67	104.867	107.940	106.355	106.370	0.507	1.112
C4-C5-N3	106.44(15)	66	105.148	108.339	106.386	106.370	0.416	0.148
O5-S1-O4	114.33(11)	57	109.757	117.011	112.750	112.787	1.466	1.075
O6-S1-C17	105.48(11)	55	102.916	110.245	106.440	106.387	1.231	0.789
C3-N1-C2	122.63(16)	52	124.016	129.325	127.198	127.159	0.861	5.304
O1-C2-N1	108.45(16)	34	106.291	110.719	109.043	109.079	0.926	0.635
C9-C4-C5	121.60(17)	27	118.778	124.176	121.680	121.497	1.086	0.055
N3-C3-N1	126.33(16)	20	120.555	129.446	124.437	124.492	1.800	1.049
N3-C3-N2	110.22(16)	15	106.574	110.761	109.028	109.049	0.947	1.263
C8-C9-C4	117.40(17)	13	116.819	122.132	120.519	120.851	1.561	2.017
C4-N2-C3	108.16(15)	13	108.209	110.224	108.978	109.002	0.522	1.557
C5-N3-C3	108.25(15)	12	108.353	109.289	108.878	108.803	0.317	2.001
C9-C4-N2	131.47(16)	5	131.401	132.124	131.646	131.541	0.279	0.680
N1-C3-N2	123.43(16)	4	124.886	128.388	126.398	126.159	1.755	1.690

Apêndice C – Estradiol 17 β Valerato

Nesse apêndice são dados os valores dos comprimentos e ângulos de ligação e parâmetros geométricos para a estrutura do E2 β V caracterizada neste estudo para as temperaturas de 298K e 100K. Estes valores experimentais foram analisados de acordo com o programa MOGUL.

Comprimentos de Ligação para a temperatura de 298K

Fragmento	Valor	Número	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Z-Score
C1A–C10A	1.401(5)	1 000	1.152	1.696	1.392	1.392	0.015	0,648
C1B–C10B	1.397(5)	10000	1.152	1.696	1.392	1.392	0.015	0,356
C22A–C21A	1.577(11)	10000	0.743	2.293	1.509	1.518	0.085	0,791
C22B–C21B	1.600(12)	10000	0.743	2.293	1.509	1.518	0.085	1,063
C23A–C22A	1.465(11)	10000	0.495	2.154	1.485	1.508	0.098	0,203
C23B–C22B	1.407(14)	10000	0.495	2.154	1.485	1.508	0.098	0,793
C2A–C1A	1.379(5)	10000	0.882	1.716	1.383	1.383	0.020	0,186
C2B–C1B	1.378(6)	10000	0.882	1.716	1.383	1.383	0.020	0,276
C4A–C5A	1.387(5)	10000	1.114	1.720	1.390	1.390	0.019	0,152
C4B–C5B	1.392(6)	10000	1.114	1.720	1.390	1.390	0.019	0,110
O3A–C19A	1.201(6)	10000	0.923	1.725	1.222	1.224	0.030	0,675
O3B–C19B	1.189(6)	10000	0.923	1.725	1.222	1.224	0.030	1,094
C12A–C11A	1.542(5)	9170	0.984	1.814	1.530	1.529	0.024	0,501
C12B–C11B	1.543(5)	9170	0.984	1.814	1.530	1.529	0.024	0,541
C2A–C3A	1.362(5)	8394	0.850	1.705	1.384	1.385	0.022	1,044
C2B–C3B	1.366(6)	8394	0.850	1.705	1.384	1.385	0.022	0,822
O1A–C3A	1.390(4)	6122	1.119	1.957	1.367	1.367	0.026	0,889
O1B–C3B	1.379(5)	6122	1.119	1.957	1.367	1.367	0.026	0,459
C18A–C13A	1.544(6)	5307	1.366	1.738	1.539	1.539	0.020	0,243
C18B–C13B	1.528(6)	5307	1.366	1.738	1.539	1.539	0.020	0,589
C21A–C20A	1.372(10)	5276	1.148	1.810	1.517	1.521	0.040	3,620
C21B–C20B	1.269(10)	5276	1.148	1.810	1.517	1.521	0.040	6,191
C15A–C14A	1.520(5)	5227	1.264	2.185	1.539	1.537	0.024	0,797
C15B–C14B	1.522(5)	5227	1.264	2.185	1.539	1.537	0.024	0,738
C16A–C15A	1.547(6)	5102	1.119	1.777	1.536	1.539	0.030	0,389
C16B–C15B	1.544(6)	5102	1.119	1.777	1.536	1.539	0.030	0,280
C8A–C14A	1.513(5)	4289	1.064	1.668	1.532	1.531	0.021	0,896
C8B–C14B	1.521(5)	4289	1.064	1.668	1.532	1.531	0.021	0,492
C12A–C13A	1.505(5)	4197	1.404	1.744	1.537	1.537	0.019	1,626
C12B–C13B	1.517(5)	4197	1.404	1.744	1.537	1.537	0.019	1,021
C7A–C8A	1.522(5)	3739	1.365	1.760	1.530	1.529	0.020	0,447
C7B–C8B	1.527(5)	3739	1.365	1.760	1.530	1.529	0.020	0,169
C4A–C3A	1.365(5)	3582	1.149	1.556	1.386	1.387	0.017	1,250
C4B–C3B	1.363(6)	3582	1.149	1.556	1.386	1.387	0.017	1,422
C6A–C5A	1.521(5)	3035	1.177	1.858	1.508	1.508	0.020	0,656
C6B–C5B	1.514(6)	3035	1.177	1.858	1.508	1.508	0.020	0,314
C13A–C14A	1.529(5)	2307	1.311	1.767	1.545	1.544	0.023	0,704
C13B–C14B	1.537(5)	2307	1.311	1.767	1.545	1.544	0.023	0,341
C20A–C19A	1.511(7)	2296	1.228	1.501	1.501	1.502	0.031	0,328
C20B–C19B	1.510(8)	2296	1.228	1.707	1.501	1.502	0.031	0,271
C5A–C10A	1.394(5)	1601	1.233	1.542	1.395	1.395	0.017	0,065
C5B–C10B	1.396(5)	1601	1.233	1.542	1.395	1.395	0.017	0,040
O2A–C17A	1.450(5)	1539	1.288	1.610	1.460	1.459	0.020	0,473
O2B–C17B	1.450(5)	1539	1.288	1.610	1.460	1.459	0.020	0,541
C7A–C6A	1.520(5)	996	1.384	1.659	1.520	1.521	0.020	0,005
C7B–C6B	1.517(6)	996	1.384	1.659	1.520	1.521	0.020	0,233
O2A–C19A	1.322(5)	904	1.172	1.660	1.337	1.338	0.032	0,481
O2B–C19B	1.347(6)	904	1.172	1.660	1.337	1.338	0.032	0,312

(continua)

(continuação)

Fragmento	Valor	Número	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Z-score
C11A–C9A	1.541(5)	685	1.466	1.644	1.535	1.535	0.013	0,449
C11B–C9B	1.533(5)	685	1.466	1.644	1.535	1.535	0.013	0,179
C16A–C17A	1.525(6)	571	1.362	1.771	1.530	1.530	0.024	0,180
C16B–C17B	1.534(6)	571	1.362	1.771	1.530	1.530	0.024	0,222
C9A–C8A	1.533(5)	367	1.452	1.588	1.540	1.540	0.011	0,661
C9B–C8B	1.528(5)	367	1.452	1.588	1.540	1.540	0.011	1,044
C13A–C17A	1.529(5)	230	1.477	1.640	1.534	1.532	0.019	0,288
C13B–C17B	1.523(5)	230	1.477	1.640	1.534	1.532	0.019	0,518

Comprimentos de Ligação para a temperatura de 100K

Fragmento	Valor	Número	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Z-score
O3B–C19B	1.225	10000	0.923	1.725	1.222	1.224	0.030	0.104
C1A–C10A	1.395	10000	1.152	1.696	1.392	1.392	0.015	0.228
C1A–C2A	1.366	10000	0.882	1.716	1.383	1.383	.020	0.877
C1B–C10B	1.400	10000	1.152	1.696	1.392	1.392	0.015	0.566
C1B–C2B	1.385	10000	0.882	1.716	1.383	1.383	0.020	0.077
C22A–C21A	1.508	10000	0.743	2.293	1.509	1.518	0.085	0.009
C22B–C21B	1.529	10000	0.743	2.293	1.509	1.518	0.085	0.234
C23A–C22A	1.525	10000	0.495	2.154	1.485	1.508	0.098	0.412
C23B–C22B	1.524	10000	0.495	2.154	1.485	1.508	0.098	0.397
C4A–C5A	1.377	10000	1.114	1.720	1.390	1.390	0.019	0.682
C4B–C5B	1.366	10000	1.114	1.720	1.390	1.390	0.019	1.271
O3A–C19A	1.185	10000	0.923	1.725	1.222	1.224	0.030	1.223
C12A–C11A	1.539	9170	0.984	1.814	1.530	1.529	0.024	0.372
C12B–C11B	1.532	9170	0.984	1.814	1.530	1.529	0.024	0.080
C2A–C3A	1.393	8394	0.850	1.705	1.384	1.385	0.022	0.396
C2B–C3B	1.400	8394	0.850	1.705	1.384	1.385	0.022	0.757
O1A–C3A	1.366	6122	1.119	1.957	1.367	1.367	0.026	0.037
O1B–C3B	1.350	6122	1.119	1.957	1.367	1.367	0.026	0.651
C18A–C13A	1.561	5307	1.366	1.738	1.539	1.539	0.020	1.099
C18B–C13B	1.519	5307	1.366	1.738	1.539	1.539	0.020	1.009
C21A–C20A	1.520	5276	1.148	1.810	1.517	1.521	0.040	0.064
C21B–C20B	1.500	5276	1.148	1.810	1.517	1.521	0.040	0.429
C15A–C14A	1.502	5227	1.264	2.185	1.539	1.537	0.024	1.563
C15B–C14B	1.522	5227	1.264	2.185	1.539	1.537	0.024	0.711
C16A–C15A	1.565	5102	1.119	1.777	1.536	1.539	0.030	0.985
C16B–C15B	1.560	5102	1.119	1.777	1.536	1.539	0.030	0.822
C8A–C14A	1.527	4289	1.064	1.668	1.532	1.531	0.021	0.199
C8B–C14B	1.534	4289	1.064	1.668	1.532	1.531	0.021	0.132
C12A–C13A	1.488	4197	1.404	1.744	1.537	1.537	0.019	2.494
C12B–C13B	1.524	4197	1.404	1.744	1.537	1.537	0.019	0.665
C7A–C8A	1.501	3739	1.365	1.760	1.530	1.529	0.020	1.505
C7B–C8B	1.528	3739	1.365	1.760	1.530	1.529	0.020	0.119
C4A–C3A	1.386	3582	1.149	1.556	1.386	1.387	0.017	0.018
C4B–C3B	1.389	3582	1.149	1.556	1.386	1.387	0.017	0.140
C6A–C5A	1.514	3035	1.177	1.858	1.508	1.508	0.020	0.274
C6B–C5B	1.516	3035	1.177	1.858	1.508	1.508	0.020	0.389
C13A–C14A	1.521	2307	1.311	1.767	1.545	1.544	0.023	1.044
C13B–C14B	1.512	2307	1.311	1.767	1.545	1.544	0.023	1.442
C20A–C19A	1.518	2296	1.228	1.707	1.501	1.502	0.031	0.543
C20B–C19B	1.483	2296	1.228	1.707	1.501	1.502	0.031	0.560
C5A–C10A	1.392	1601	1.233	1.542	1.395	1.395	0.017	0.157
C5B–C10B	1.402	1601	1.233	1.542	1.395	1.395	0.017	0.422
O2A–C17A	1.443	1539	1.288	1.610	1.460	1.459	0.020	0.847
O2B–C17B	1.453	1539	1.288	1.610	1.460	1.459	0.020	0.326
C7A–C6A	1.539	996	1.384	1.659	1.520	1.521	0.020	0.918
C7B–C6B	1.524	996	1.384	1.659	1.520	1.521	0.020	0.189

(Continua)

(continuação)

Fragmento	Valor	Número	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Z-score
O2A–C19A	1.356	904	1.172	1.660	1.337	1.338	0.032	0.579
O2B–C19B	1.332	904	1.172	1.660	1.337	1.338	0.032	0.161
C10A–C9A	1.529	699	1.431	1.598	1.520	1.521	0.016	0.618
C10B–C9B	1.513	699	1.431	1.598	1.520	1.521	0.016	0.422
C11A–C9A	1.540	685	1.466	1.644	1.535	1.535	0.013	0.432
C11B–C9B	1.487	685	1.466	1.644	1.535	1.535	0.013	3.669
C16A–C17A	1.533	571	1.362	1.771	1.530	1.530	0.024	0.161
C16B–C17B	1.534	571	1.362	1.771	1.530	1.530	0.024	0.203
C9A–C8A	1.540	367	1.452	1.588	1.540	1.540	0.011	0.050
C9B–C8B	1.534	367	1.452	1.588	1.540	1.540	0.011	0.514
C13A–C17A	1.535	230	1.477	1.640	1.534	1.532	0.019	0.076
C13B–C17B	1.526	230	1.477	1.640	1.534	1.532	0.019	0.412