



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Fabício Havy Dantas de Andrade

**ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO AGENTE
ESQUISTOSSOMICIDA E TRIPANOSSOMICIDA (LPSF/GQ-238)**

Recife
2016

Fabício Havy Dantas de Andrade

**ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO AGENTE
ESQUISTOSSOMICIDA E TRIPANOSSOMICIDA (LPSF/GQ-238)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva

Recife

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchoa, CRE4-1010

A553e Andrade, Fabricio Havy Dantas de. *Estudos de caracterização de um novo agente esquistossomídeo e tripanossomídeo (LP8F/GQ-238) / Fabricio Havy Dantas de Andrade.* – 2016.
116 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio Santos de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndices.

1. Tiazolidinas. 2. Doença de chagas. 3. Esquistossomose. I. Souza, Fábio Santos de (Orientador). II. Título.

Fabício Havy Dantas de Andrade

**ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE UM NOVO AGENTE
ESQUISTOSSOMICIDA E TRIPANOSSOMICIDA (LPSF/GQ-238)**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

APROVADO: 16 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINARORA

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza
Universidade Federal da Paraíba
Orientador

Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão
Universidade Federal do Rio grande do Norte
Examinador Externo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dr^a. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcante de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico aos amigos do Laboratório unificado de desenvolvimento de medicamentos (LUDEM). Em especial ao amigo e orientador Profº Drº Fabio Santos de Souza, pelos anos de ensinamento profissional, pessoal e por nos ensinar que a ética e o aprendizado profissional são os melhores resultados!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não ter me deixado desistir;

Aos meus pais, e familiares pelo amor e confiança inabalável em mim;

A minha esposa, Weslânia;

Ao orientador e amigo Fábio Santos de Souza, pela confiança, incentivo, e dedicação;

A todos que fazem parte do LUDEM. (Tainara, Rayanne, Renata, Deisiane, Cinthia, Ravelly, Natalia, Monik, Agna, Fernando, Valmir, Geovani, Venâncio, John, Agnaldo e a tantos outros que fizeram parte desta equipe;

A todos que fazem parte do LPSF/UFPE. (Jamerson, Willams, Anikercia, Tiago Bento, Cezar e a tantos outros que fazem parte da equipe.

As Professoras Rosali e Maria do Carmo (Nena) pela confiança e apoio durante está jornada;

Ao profº Dr Rui Macedo pelos ensinamentos e apoio a pesquisa na realização deste trabalho;

Aos amigos Severino neto, Mara e José Valdilânio por quem tenho profunda admiração;

A todos os professores e funcionários da PPGCF/UFPE;

A todos os colegas do PPGCF da UFPE, e a Salvana pela ajuda.

A CAPES e FACEPE (PPSUS) pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

A aluna Isabella Nayara Santos Silva (bolsista do PPSUS-FACEPE) pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos profs. Drº Sandro Marden Torres do Departamento de Engenharia de Matérias da UFPB, e Drº Pedro Rolim do LTM da UFPE.

“Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É saber falar de si mesmo. É não ter medo dos próprios sentimentos”

Fernando Pessoa

RESUMO

ANDRADE, F.H.D. **Estudos de caracterização de um novo agente esquistossomicida e tripanossomicida (LPSF/GQ-238)**. 2016. 116f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

O 3-(2,6-difluór-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238) é um análogo indólico-tiazolidínico, apresenta potencial atividade esquistossomicida e tripanossomicida. Poucos relatos na literatura mostram a eficácia de uma substância contra a esquistossomose e a doença de chagas. Estas doenças são consideradas doenças debilitantes e afeta milhões de pessoas no mundo. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química do LPSF/GQ-238 visando conhecer suas propriedades químicas e físicas para desenvolvimento de uma nova alternativa de tratamento para as doenças supracitadas. O estudo abrangeu a caracterização físico-química, estabilidade térmica e compatibilidade fármaco-excipiente por técnicas espectroscópicas (IV, RMN), termoanalíticas (DSC, DSC-fotovisual, TG e Pyr-CG/EM), validação do método analítico, bem como DRX e MEV. Os resultados obtidos da avaliação físico-química do LPSF/GQ-238 frente a diferentes técnicas permitiram caracterizá-lo do ponto de vista físico, químico e morfológico. O protótipo apresentou-se com 99,5% de pureza, funde a $272,48 \pm 0,28$ °C e entalpia de $78,31 \pm 4,31$ J.g⁻¹ com pico endotérmico de fusão característico de uma forma cristalina que foi corroborado pela DRX, com habito cristalino do tipo agulha por MEV, apresenta baixa solubilidade aquosa e cinética de decomposição de ordem zero. O estudo de compatibilidade evidenciou possíveis incompatibilidades químicas e/ou físicas entre o LPSF/GQ-238 e os excipientes estudados. Concluí-se que a caracterização da NEQ obteve resultados sólidos sobre o comportamento físico e químicos de um protótipo antiparasitário para tratar a esquistossomose e a doença de chagas.

Palavras-chave: Tiazolidinas. Doença de chagas. Esquistossomose.

ABSTRACT

ANDRADE, F.H.D. **Characterization studies of a new schistosomicidal and trypanocidal agent (LPSF/GQ-238)**. 2016. 116f. Dissertation (Master).Federal University of Pernambuco, Recife, in 2016.

The 3-(2,6-difluoro-benzyl)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ylmethylene)thiazolidine-2,4-dione (LPSF/GQ-238) is an indole-thiazolidine analogue with schistosomicidal and trypanocidal potential activity. Few reports in the literature show the effectiveness of a substance against schistosomiasis and Chagas disease simultaneously. These are considered debilitating diseases affecting millions of people worldwide. The objective of this study was to perform the physicochemical characterization of LPSF/QA-238 aiming to know their chemical and physical properties for the development of a new alternative treatment for the above diseases. The study covered the physicochemical characterization, thermal stability, and drug-excipient compatibility by spectroscopic techniques (IR, NMR), thermoanalytical (DSC, DSC-fotovisual, TG and Pyr-GC/MS), validation of analytical method, as also, XRD and SEM. The results of physicochemical evaluation of LPSF/QA-238 compared to different techniques allowed characterize it physical, chemical and morphologically. The prototype presented 99.5% purity, melting at 272.48 ± 0.28 °C and enthalpy of 78.31 ± 4.31 Jg⁻¹, endothermic peak of melting characteristic of a crystalline form which was confirmed by XRD, with crystalline habit needle type observed in the SEM, has low aqueous solubility and kinetics of order decomposition zero. The compatibility study highlighted possible chemical and / or physical incompatibilities between LPSF / QA-238 and the excipients studied. It is concluded that the new chemical entity characterization obtained actual results about the physical and chemical behavior of a prototype antiparasitic to treat schistosomiasis and Chagas disease.

Keywords: Thiazolidines. Chagas disease. Schistosomiasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do T. cruzi, no hospedeiro invertebrado (esquerda) e no vertebrado (direita).	27
Figura 2 – T. cruzi no Sangue, nos tecidos e as lesões que provoca no coração.....	28
Figura 3 - Estrutura química do LPSF/GQ-238	31
Figura 4 - Sistema de Pir-CG/EM usando pirolisador de microforno equipado com cromatógrafo a gás e espectrômetro de massas com quadrupolo.	50
Figura 5 - Rota sintética do LPSF/GQ-238.....	54
Figura 6 - Fluxograma estudo de compatibilidade térmica.....	61
Figura 7 - Espectro infravermelho do LPSF/GQ-238 obtidos por sedimentação em KBr.....	63
Figura 8 - Cromatogramas do branco, solução padrão e solução amostra a 10 µg.mL ⁻¹ a 379 nm.	65
Figura 9 - Cromatograma das diferentes concentrações do LPSF/GQ-238 no estudo de linearidade.	67
Figura 10 - Linearidade obtida com faixa determinada de 10-190% para curva de calibração (Curva média).....	68
Figura 11 - Gráfico de resíduo.....	68
Figura 12 - Gráfico de avaliação da significância estatística da linearidade	69
Figura 13 - Curvas DSC, nas razões de 2, 5, 10, 20 e 40 °C.min ⁻¹ do LPSF/GQ-238.	73
Figura 14 - DSC-fotovisual do LPSF/GQ-238 na razão de aquecimento de 2 °C.min ⁻¹	75
Figura 15 - Curva termogravimétrica dinâmicas do LPSF/GQ-238.	76
Figura 16 - Curvas TG isoterma em atmosfera oxidativa.	79
Figura 17 - Pirogramas do LPSF/GQ-238 à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.	81
Figura 18 - Pirogramas do TZD à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.	83
Figura 19 - Pirogramas do LPSF/GQ-175 à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.	84
Figura 20 - Pirogramas do 5-bromo indol 3-carboxaldeído à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.	85

Figura 21 - Via de degradação do 5-Br-indol 3-carboxaldeído.	85
Figura 22 - Estrutura química do LPSF/GQ-238 com numeração dos elementos químicos do composto.....	87
Figura 23 - Sobreposição dos pirogramas da LPSF/GQ-238 e seus intermediários à 450 °C.....	88
Figura 24 - Sobreposição dos pirogramas da LPSF/GQ-238 e seus intermediários à 650 °C.....	88
Figura 25 - Difratoograma de Raio-X do LPSF/GQ-238 e os Índices de Miller (hkl). ..	90
Figura 26 - Difratoograma de Raio-X do LPSF/GQ-238.....	91
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura do LPSF/GQ-238.....	91
Figura 28 - Curvas de DSC e TG dos IFs e das misturas físicas (MF).....	95
Figura 29 - IV-TF dos IFs e das misturas físicas em pastilhas de KBr. Erro! Indicador não definido.	
Figura 30 - DSC-fotovisual da mistura física LPSF/GQ-238:PEG com razão de aquecimento de 10 °C.min-1.	99
Figura 31 - DSC-fotovisual da mistura física LPSF/GQ-238:PVP com razão de aquecimento de 10 °C.min-1.	100
Figura 32 - DSC-fotovisual da mistura física LPSF/GQ-238:Soluplus com razão de aquecimento de 10 °C.min-1.	100
Figura 35 - Espectros de massa obtidos por Pir-CG/EM para os diferentes compostos químicos utilizados ou formados a partir da pirólise.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade tripanossomicida do LPSF/GQ-238 contra formas epimastigotas e tripomastigotas.	31
Tabela 2 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados	34
Tabela 3 - Classificação dos métodos segundo sua finalidade.	35
Tabela 4 - Parâmetros necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.	36
Tabela 5 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.	38
Tabela 6 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.	42
Tabela 7 - Tipos de transformações de fase sólida.	44
Tabela 8 - Valores obtidos de número de onda utilizando IV-TF do LPSF/GQ-238.	62
Tabela 9 - Classificação da solubilidade do LPSF/GQ-238 segundo a FB em diferentes solventes.	64
Tabela 10 - Áreas relativas as curvas de calibração obtidas no estudo de linearidade.	66
Tabela 11 - Repetibilidade e precisão intermediária.	70
Tabela 12 - Exatidão em três diferentes níveis.	71
Tabela 13 - Dados para avaliação da robustez considerando proporção da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura de acondicionamento da coluna cromatográfica.	72
Tabela 14 - Valores de Tonset, Tendset, Tpico, pureza, entalpia e valor de compensação do LPSF/GQ-238 em diferentes razões de aquecimento.	74
Tabela 15 - Dados do perfil de degradação do LPSF/GQ-238 em atmosfera inerte e oxidativa.	76
Tabela 16 - Dados cinéticos isotérmicos e não isotérmicos do LPSF/GQ-238	78
Tabela 17 - Valores de K para as temperaturas de decomposição isotérmica.	79
Tabela 18 - Valores de tempo de retenção e relação massa:carga dos produtos formados por quebra ou volatilização da LPSF/GQ-238 à 450 e 650 °C.	82
Tabela 19 - Valores de tempo de retenção e relação massa:carga dos produtos formados por quebra ou volatilização da tiazolidina (TZD) à 450 e 650 °C	83

Tabela 20 - Valores de tempo de retenção e relação massa:carga dos produtos formados por quebra ou volatilização da LPSF/GQ-175 nas temperaturas de 450 e 650 °C.....	84
Tabela 21 - Valores de tamanho do cristalito e das distâncias interplanares do LPSF/GQ-238.....	90
Tabela 22 - Valores do estudo de compatibilidade utilizando DSC e TG.	97
Tabela 23 - Assinalamentos vibracionais dos IFs e suas misturas físicas (MF).....	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2 θ	2theta
%	Porcentagem ou porcentagem
A	Fator de frequência ou fator pré-exponencial
Å	Angstrom
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C _q	Carbono quaternário
C _s	Carbono secundário
C _t	Carbono terciário
CV%	Desvio Padrão Relativo
DAD	Detector com arranjo de diodo
DC	Doença de Chagas
DESVPAD	Desvio Padrão
d _{hkl}	Distâncias interplanares
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRX	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DSC-fotovisual	DSC acoplada ao sistema fotovisual
DTA	análise térmica diferencial
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
Ea	Energia de ativação
ELISA	Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay
eV	Eletrovolt
FB	Farmacopéia brasileira
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase Estacionaria
FM	Fase Móvel
GOF	Goodness of Fit
ICH	International Conferenceon Harmonisation
IF	Insumo farmacêutico
IFA	Insumo farmacêutico ativo

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
IV-FT	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
kV	Kilovolts
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massa
LD	Limite de detecção
LPSF	Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos
LQ	Limite de quantificação
m/z	Relação massa por carga
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
MHz	megahertz
MM	Massa molar
Mpa	Megapascal
NEQ	novas entidades químicas
OMS	Organização mundial de saúde
P&D	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
P.A	Para análise
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Psi	Libra por polegada quadrada
PTFE	Politetrafluoretileno
PVP	Polivinilpirrolidona
Pyr-CG/EM	Pirólise acoplado a cromatografia gasosa e espectrômetro de massas
R	Constante geral dos gases ($8,31 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$)
r	Coeficiente de correlação de Pearson
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RE	Resolução
R _{exp}	Valor de refinamento esperado
RMN	Ressonância magnética nuclear

Rwp	Valor de refinamento final
SUS	Sistema Único de Saúde
Tc	Tamanho do cristalito
T_{endset}	Temperatura final
T_g	transição vítrea
TG	Termogravimetria
T_{onset}	Temperatura inicial
T_{pico}	Temperatura do pico
Tr	Tempo de retenção
TZD	Tiazolidina
UV-Vis	Ultravioleta-visível
ΔH	Entalpia
ΔH_{fus}	variação da entalpia de fusão
Δ_m	Variação de massa (%)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNS)	23
3.2 Esquistossomose Mansonii	24
3.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> e Doença de Chagas	26
3.4 Novas alternativas para as DTNS	30
3.5 Técnicas analíticas aplicadas na identificação química de compostos	32
3.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)	32
3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	32
3.6 Solubilidade	33
3.7 Desenvolvimento e validação de método analítico	34
3.7.1 Especificidade e Seletividade	36
3.7.2 Linearidade	37
3.7.3 Intervalo	37
3.7.4 Limites de detecção e quantificação	38
3.7.5 Precisão	39
3.7.5.1 Repetibilidade	39
3.7.5.2 Precisão intermediária	40
3.7.5.3 Reprodutibilidade	40
3.7.6 Exatidão	40
3.7.7 Robustez	41
3.8 Caracterização do estado sólido	42
3.9 Estabilidade	45
3.10 Análise térmica	47
3.10.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	47
3.10.2 Termogravimetria (TG)	49
3.11 Pirólise acoplada a CG/EM	49
3.12 Difração de Raio-X (DRX)	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Amostras	53
4.2 Síntese do LPSF/GQ-238	53
4.2.1 Síntese da tiazolidina-2,4-diona	53
4.2.2 Síntese do derivado 3-(2,6-difluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-175)	53

4.2.3	<i>Síntese do derivado 3-(2,6-difluór-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238)</i>	55
4.3	Identificação química	55
4.3.1	<i>Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)</i>	55
4.3.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	55
4.4	Teste de solubilidade segundo a Farmacopéia Brasileira 5º edição	56
4.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	56
4.5.1	<i>Preparação das amostras</i>	56
4.5.2	<i>Validação do método analítico</i>	57
4.6	Análise térmica	58
4.6.1	<i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	58
4.6.2	<i>DSC acoplado ao sistema fotovisual (DSC-fotovisual)</i>	58
4.6.3	<i>Termogravimetria (TG)</i>	59
4.7	Pirólise acoplada a CG/EM	59
4.8	Difração de Raio-X (DRX)	60
4.9	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	60
4.10	Estudo de compatibilidade	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Identificação química do LPSF/GQ-238	62
5.2	Estudo de solubilidade segundo a Farmacopéia Brasileira	64
5.3	Desenvolvimento e validação de método analítico	64
5.3.1	<i>Especificidade e seletividade</i>	65
5.3.2	<i>Linearidade</i>	65
5.3.3	<i>Limite de Quantificação e Limite de Detecção</i>	69
5.3.4	<i>Intervalo</i>	69
5.3.5	<i>Precisão</i>	70
5.3.5.1	<i>Repetibilidade (Precisão intra-corrida)</i>	70
5.3.5.2	<i>Precisão Intermediária (Precisão inter-corridas)</i>	70
5.3.6	<i>Exatidão</i>	71
5.3.7	<i>Robustez</i>	71
5.4	Estudos térmicos	72
5.4.1	<i>DSC e DSC-fotovisual</i>	72
5.4.2	<i>Termogravimetria</i>	75
5.5	Pirólise acoplada a CG/EM	80
5.6	Difração de Raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	89
5.7	Estudo de compatibilidade	92
6	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE	113

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças que se desenvolvem, principalmente, entre as populações mais pobres, e custam aos países em desenvolvimento bilhões de dólares a cada ano (WHO, 2015a). Dentre essas, a esquistossomose e a Doença de Chagas (DC) são um grave problema de saúde pública causados por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* e pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, respectivamente (PEREIRA et al., 2011; GRYSEELS, 2012).

Poucos relatos na literatura mostram a eficácia de uma substância contra a esquistossomose e a DC simultaneamente (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2014). Estas doenças são consideradas doenças debilitantes que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Nesse sentido o desenvolvimento de um novo fármaco eficiente para o tratamento das duas enfermidades mostra-se como uma excelente estratégia de tratamento simultâneo e/ou produção de um medicamento antiparasitário com atividade contra o protozoário (*Trypanosoma cruzi*) e o helminto (*Schistosoma mansoni*).

Assim, a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas encontra-se em crescente esforço no tocante a descoberta e produção de novos medicamentos, estima-se que apenas 0,003% das novas entidades químicas (NEQs) em estudo cheguem ao mercado, dentre as causas que explicam esses inúmeros fracassos estão problemas derivados de sua biodisponibilidade e toxicidade, que podem estar relacionados ao escasso conhecimento acerca da natureza físico-química da molécula em estudo (MAXIMIANO et al., 2010).

Aliado a esse problema de desenvolvimento de NEQs e prevalência de DTNs existe a necessidade de novas alternativas terapêuticas que ampliem o leque de tratamentos para essas doenças.

Nesse contexto, há relatos na literatura de estudos utilizando compostos tiazolidínicos com promissora atividade antiparasitária, entre eles o LPSF/GQ-238 apresentou melhor atividade, matando 100% dos parasitos em 24 horas na dose de 100 µg.mL⁻¹ (SILVA, 2010; LUIS, 2012; OLIVEIRA et al., 2015).

Todavia o sucesso do desenvolvimento de uma formulação farmacêutica baseia-se no profundo conhecimento dos insumos farmacêuticos (IFs) utilizados na formulação, sobretudo do insumo farmacêutico ativo (IFA) (STORPIRTIS, 2009).

A maioria dos IFAs pode apresentar-se em diferentes formas no estado sólido, como: polimorfos, solvatos, hidratos e o estado amorfo. Essas formas sólidas, por vezes, diferem muito em suas características físico-químicas, mecânica e propriedades biofarmacêuticas, por conseguinte, influenciam na qualidade, na segurança e na eficácia dos medicamentos. As propriedades da partícula que influenciam no desempenho do medicamento, incluem: a forma da partícula, o tamanho, a distribuição de tamanho de partícula, a área superficial, porosidade e a morfologia da superfície. As quais são importantes para conhecer o comportamento e desempenho dos fármacos, principalmente as NEQs e substâncias que possuam baixa solubilidade (SHETE et al., 2010).

Dessa forma o controle das propriedades físico-químicas de um IFA torna-se um passo crítico no desenvolvimento de medicamentos, desde a forma de pó ao produto formulado, visto que as mudanças na forma sólida podem impactar na solubilidade, processo de fabricação e estabilidade (PATEL et al., 2012a; PATEL et al., 2012b).

Nesse processo as técnicas termoanalíticas mostram-se bastante úteis para o conhecimento das características físico-químicas dos IFs, entre estas destacam a calorimetria diferencial de varredura (DSC), DSC-fotovisual, Pyr-CG/EM e a termogravimetria (TG), aliadas a outras técnicas complementares como a Difração de raio-X (DRX), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de vibração na região do infravermelho (IV) são essenciais para a caracterização em estado sólido dos IFs.

Mediante os grandes benefícios que os medicamentos podem trazer para humanidade, desde que os mesmos sejam produtos de qualidade, eficácia e segurança garantidas, e a necessidade destes direcionados ao tratamento de DTN, a finalidade do presente trabalho consiste em caracterização físico-química e desenvolver metodologia para quantificação do LPSF/GQ-238, bem como avaliar a compatibilidade desse novo candidato a fármaco antiparasitário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver estudo de caracterização físico-química e metodologia para quantificação do LPSF/GQ-238, bem como avaliar a compatibilidade físico-química desse novo candidato a fármaco antiparasitário.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar através de métodos espectroscópicos a estrutura química do LPSF/GQ-238 (IV-TF, RMN);
- ✓ Realizar estudos de solubilidade de acordo com Farmacopéia Brasileira 5ª edição;
- ✓ Validar método analítico por CLAE aplicado para quantificação do LPSF/GQ-238;
- ✓ Caracterizar LPSF/GQ-238 por difração de raios-X;
- ✓ Caracterizar LPSF/GQ-238 por microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Caracterizar através de técnicas termoanalíticas (TG, DSC, DSC acoplado ao sistema fotovisual);
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos de estabilidade térmica do LPSF/GQ-238 através dos dados termogravimétricos dinâmicos e isotérmicos;
- ✓ Avaliar o comportamento térmico de decomposição do LPSF/GQ-238 através da pirólise acoplada à cromatografia gasosa capilar e espectrometria de massa (Pir-CG/EM);
- ✓ Avaliar a compatibilidade do fármaco e excipientes farmacêuticos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

As DTNs são um grupo de doenças com características distintas que se desenvolvem principalmente entre as populações mais pobres, são 17 DTNs priorizadas pela OMS, endêmicas em 149 países e afetam mais de 1,4 bilhões de pessoas, custando aos países em desenvolvimento bilhões de dólares a cada ano, essas estão compostas por parasitas presentes em quatro classes diferentes: protozoários, helmintos, bactérias e vírus (WHO, 2015a).

Destes países afetados pelas DTNs, o Brasil destaca-se por possuir uma extensão continental, localização próxima da linha do equador e apresentar grandes índices de desigualdades sociais, principalmente de distribuição de renda, esses são alguns dos indicadores que podem justificar a grande quantidade de pessoas infectadas com uma ou mais DTNs no Brasil, como por exemplo, a esquistossomose onde o Brasil é responsável por aproximadamente 96% dos casos desta doença na América Latina e Caribe (HOTEZ e FUJIWARA, 2014).

A esquistossomose é um grave problema de saúde pública causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* (GRYSEELS, 2012). Dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014) mostraram que essa parasitose afeta cerca de 240 milhões de pessoas no mundo, além de estimar que mais de 700 milhões habitem áreas de risco propensas a contrair a doença. Outra importante NTD é a Doença de Chagas, que é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, estima-se que entre 6 e 7 milhões de pessoas estão infectados em todo o mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2015b), e mais de 25 milhões de pessoas estão em risco de contraí-la (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2014).

Atualmente o Praziquantel e a Oxamniquina são os únicos fármacos usados para o tratamento da esquistossomose. No entanto, oxamniquina apresenta atividade apenas contra o *S. mansoni* e o praziquantel é o único fármaco disponível para o tratamento contra todas as formas de esquistossomose (STELMA et al., 1995, ISMAIL et al., 1996, WHO, 2014), mesmo que este fármaco apresente resultados satisfatórios como agente esquistossomicida sua atividade contra vermes imaturos que estão presentes em infecções recentemente adquiridas são limitadas (GONNERT e ANDREWS, 1977) e há possibilidade de resistência a drogas indica

uma necessidade de identificar novas drogas esquistossomicidas ativos contra vários estágios do ciclo de vida do parasita (WANG, WANG e LIANG, 2012).

Outra parasitose que afeta os brasileiros é a DC causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, na ocorrência da doença, observam-se duas fases clínicas: uma aguda, que pode ou não ser identificada, podendo evoluir para uma fase crônica caso não seja tratada com medicação específica (BRASIL, 2014a).

A nifurtimox e o benznidazol são os medicamentos de escolha no tratamento da DC (WHO, 2015b), este último é distribuído gratuitamente no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS) sendo indicado para tratamento da doença na fase aguda da infecção (BRASIL, 2014a), no entanto são fármacos que apresentam vários efeitos colaterais e tem eficácia limitada, especialmente na forma crônica da doença. Estas limitações justificam a urgência na identificação e desenvolvimento de novos fármacos tripanossomicidas (HOTEZ et al., 2007). Para Hotez et al. (2007) as estratégias para o controle e a eliminação do *T. cruzi* estão disponíveis, mas o sucesso vai depender certamente do desenvolvimento de novos fármacos.

3.2 Esquistossomose mansoni

A esquistossomose mansoni é uma doença parasitária causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, cujas formas adultas habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo (homem) e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*. Trata-se de uma doença, inicialmente assintomática, que pode evoluir para formas clínicas extremamente graves e levar o paciente a óbito (BRASIL, 2015c).

O agente etiológico da esquistossomose é o *S. mansoni*, pertencente à classe *Trematoda*, família *schistossomatidae* e gênero *Schistosoma*. São helmintos digenéticos, delgados, de coloração branca e sexos separados, em que a fêmea adulta, mais alongada encontra-se alojada no canal ginecóforo do macho (BRASIL, 2005b).

Os hospedeiros intermediários são moluscos, pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, conhecidos como planorbídeos e, popularmente, como caramujos. Esses caramujos planorbídeos desenvolvem-se e vivem na água doce parada ou com pouca correnteza (FIOCRUZ, 2015), no Brasil somente três espécies

são consideradas hospedeiros intermediários naturais da esquistossomose: *B. glabrata*, *B. stramineae* *B. tenagophila* (BRASIL, 2014c).

No Brasil, aproximadamente, 25 milhões de pessoas vivem em áreas com risco de contrair a doença, os estados do Nordeste e Sudeste são os mais afetados, sendo que a ocorrência está diretamente ligada à presença dos caramujos. Atualmente a doença é detectada em todas as regiões do país, onde áreas endêmicas e focais abrangem 19 unidades federadas e compreendem os Estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte (faixa litorânea), Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (predominantemente no Norte e Nordeste do Estado). No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (BRASIL, 2014b).

A maioria das pessoas infectadas pode permanecer assintomática dependendo da intensidade da infecção; clinicamente, a esquistossomose pode ser dividida em duas fases: fase aguda e fase crônica. Na fase aguda observam-se dois sintomas bem característicos: a dermatite cercariana e a febre de Katayama, onde o primeiro corresponde à fase de penetração das larvas (cercárias) através da pele, variando desde quadro assintomático até a apresentação de quadro clínico de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido podendo durar até 05 dias após a infecção, e o segundo surge após 3 a 7 semanas de exposição pode aparecer quadro caracterizado por febre, anorexia, dor abdominal e cefaléia, com menor frequência, o paciente pode referir diarreia, náuseas, vômitos, tosse seca (SILVA et al., 2012; FIOCRUZ, 2015).

A esquistossomose crônica inicia-se após 06 meses da infecção, podendo surgir os sinais de progressão da doença para diversos órgãos, e atingir graus extremos de severidade como: hipertensão pulmonar e portal, ascite, ruptura de varizes do esôfago (FIOCRUZ, 2015).

O praziquantel e a oxamniquina são os únicos fármacos usados para o tratamento da esquistossomose. No entanto, a oxamniquina apresenta atividade apenas contra o *S. mansoni* e o praziquantel é o único fármaco disponível para o tratamento contra todas as formas de esquistossomose; é eficaz, seguro e barato, embora possa haver reinfecções após o tratamento, o risco de doença grave diminui. (STELMA et al., 1995; ISMAIL et al., 1996; WHO, 2014).

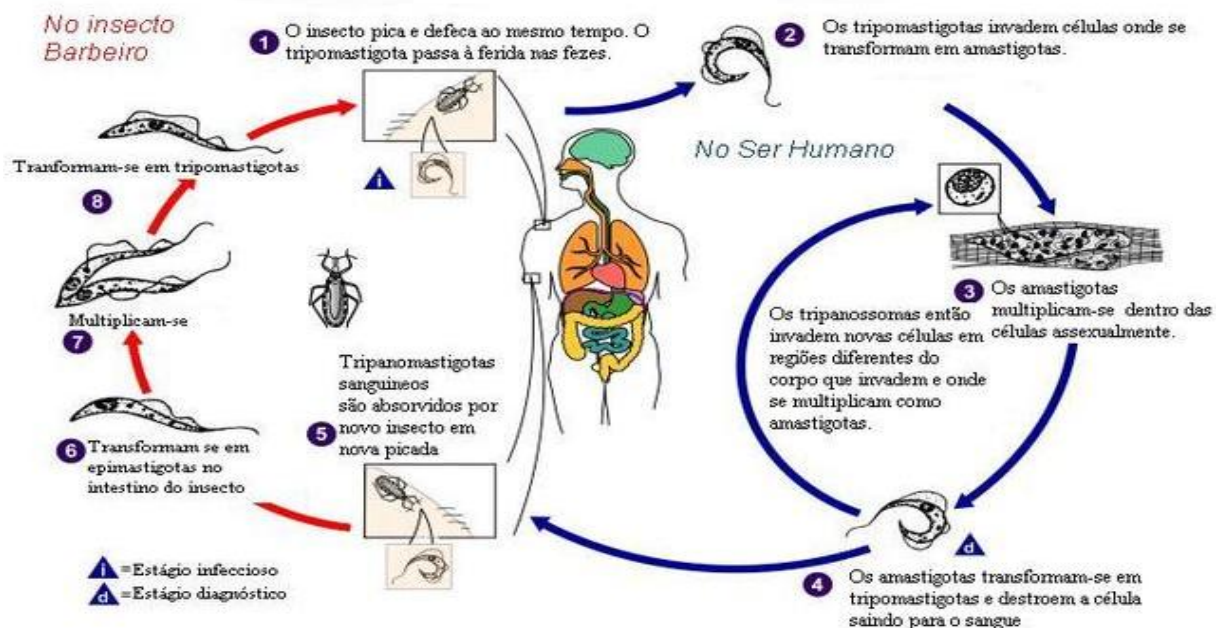
3.3 *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas

A Doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, endêmica nas Américas do Sul e Central, no entanto esta doença atualmente vem se espalhando nos Estados Unidos, Canadá, Europa e Austrália, devido ao forte fluxo de imigrantes portadores da doença (DANDAPANI et al., 2014). Ela é transmitida ao homem e a mais de 150 espécies de mamíferos domésticos e selvagens por insetos sugadores de sangue da subfamília Triatominae, embora tenham sido identificadas cerca de 140 espécies de triatomíneos poucos são vetores competentes para *T. cruzi*, onde os principais vetores são *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus* nos países da América do Sul; aves, répteis e anfíbios são refratários ao protozoário, no entanto, em algumas situações aves (sobretudo galinhas) são fontes importantes de refeições de sangue para triatomíneos, que são estritamente hematófagos (RASSI e REZENDE, 2012).

Este parasita apresenta um ciclo de vida heteroxênico (Figura 1), no homem o ciclo é composto de duas formas principais com diferentes funções biológicas e morfológicas: uma forma infecciosa circulante, mas não replicativa, conhecida como forma tripomastigota, e uma forma replicativa e intracelular, conhecida como forma amastigota.

Sua transmissão vetorial ocorre da seguinte forma: o triatominae ao se alimentar com sangue defeca próximo a ferida da picada, e tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes entram na mucosa após o homem coçar a ferida e interagem com células do sistema mononuclear fagocitário em seguida os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, que passam por vários ciclos de replicação por divisão binária simples dentro das células até voltarem à forma tripomastigotas e destruir a célula infectada. Os tripomastigotas infectam outras células vizinhas ou entram na corrente sanguínea para infectar células em outros locais do corpo (NEVES, 2004; CHATELAIN, 2015).

Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*, no hospedeiro invertebrado (esquerda) e no vertebrado (direita).



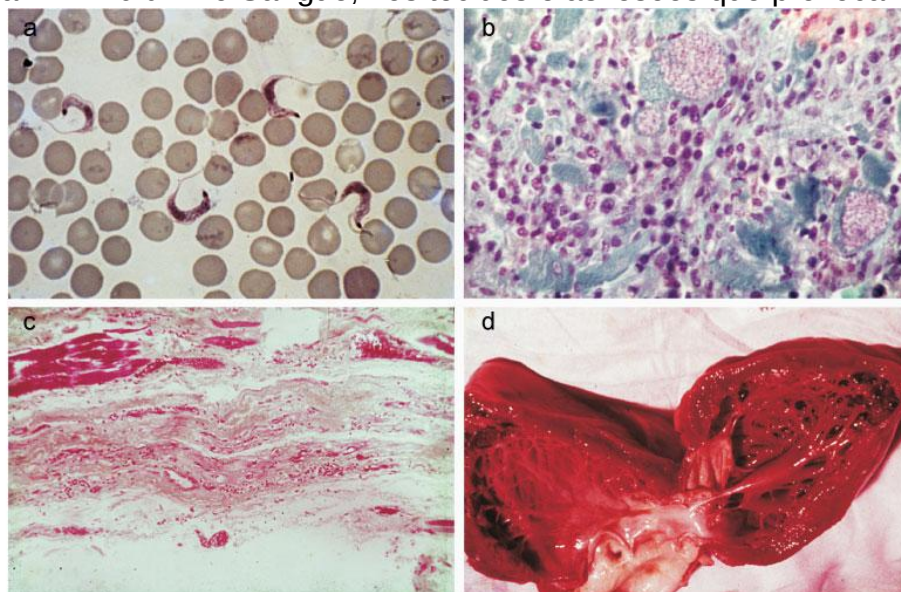
Fonte: adaptado de CHATELAIN, 2015.

A transmissão vetorial ocorre principalmente nas Américas, no entanto essa pode ser realizada por diversas maneiras, onde são classificadas em transmissão comum e transmissão incomum ou acidental: a transmissão comum: ocorre através da picada de triatomíneos, transfusão de sangue contaminado com *T. cruzi*, a transmissão oral (ingestão de alimentos ou bebidas contaminados por fezes de triatomíneos) e transmissão vertical ou congênita (parasita atravessa a barreira placentária), as incomuns ou acidentais: incluem a transmissão durante o transplante de órgãos, a ingestão de leite materno contaminado com o protozoário, acidentes de laboratório, contaminação de alimentos com secreções das glândulas anais de marsupiais que abrigam o parasita, picadas de artrópodes contaminados (demonstradas experimentalmente), e relação sexual (no período menstrual) (DIAS, NETO e LUNA, 2011).

Esta doença apresenta três fases clínicas: uma fase aguda de duração variável de 2 a 8 semanas caracteriza-se pela alta parasitemia, fase assintomática indeterminado ou latente crônica que pode durar por toda a vida ou por até 20 anos antes de desenvolver a fase crônica sintomática, onde cerca de 30% dos pacientes desenvolvem anormalidades cardíacas (cardiopatia chagásica) e/ou distúrbios digestivos (megacólon/megaesôfago) (RASSI JR et al, 2010; BIANCHI et al., 2015).

Os parasitas depositados em feridas de pele ou mucosas estimulam uma reação inflamatória local (inoculação chagoma ou sinal de Romana), os tripomastigotas circulantes envoltos por macrófagos são levados para o fígado, o baço, os gânglios linfáticos, e os músculos cardíacos e esqueléticos para formar ninhos de amastigotas. Com a ruptura dos pseudoquistos no miocárdio ou plexos mioentéricos, a miocardite aguda ocorre mediada por linfócitos TCD4+, TCD8+ e interleucinas (principalmente IL-2 e IL-4), onde reação inflamatória é mantida pela presença de *T. cruzi*, ou os seus fragmentos e pelo DNA do parasita, com uma reação de hipersensibilidade atrasada, a dilatação da microcirculação e fibrose, assim induzindo miocardiopatia dilatada crônica, arritmia, megaesôfago e megacólon. A Figura 2 mostra *T. cruzi* e as lesões que provoca no coração (COURA, 2007).

Figura 2 – *T. cruzi* no Sangue, nos tecidos e as lesões que provoca no coração



Legenda: a - Tripomastigotas circulantes no sangue durante a fase aguda, b - pseudocistos de amastigotas nas fibras miocárdicas na fase aguda da DC, c - fibroses do sistema de condução do miocárdio na fase crônica da doença, d - hipertrofia do miocárdio e dilatação das cavidades do coração com presença de trombos na fase crônica da DC.

Fonte: COURA, 2007.

O diagnóstico da infecção aguda é baseado principalmente na busca do parasita circulante no sangue, onde os exames microscópicos do sangue ou do creme leucocitário é a maneira mais simples de detectar os tripomastigotas, já os testes sorológicos não são úteis no diagnóstico da DC aguda, embora a

detecção antimunoglobulina M (IgM) poderia ser utilizada (RASSI JR, RASSI e MENDONÇA, 2012), na fase crônica, por causa da baixa parasitemia, o diagnóstico baseia-se na detecção sorológica de imunoglobulina G específica (IgG), sendo recomendado métodos sorológicos como imunofluorescência indireta, ELISA, hemaglutinação indireta ou fixação de complemento ou ainda a pesquisa por métodos indiretos como o xenodiagnóstico, hematocultura ou inoculação em animais de laboratório (NEVES, 2004; COURA e BORGES-PEREIRA, 2012). Para Rassi JR, Rassi e Mendonça (2012) a confirmação da DC é obtida a partir de 2 resultados positivos por técnicas convencionais.

A depender do início do tratamento e do tipo de cepa do *T. cruzi*, os medicamentos recomendados pela organização mundial de saúde são o benzonidazol (5 a 7,5 mg/kg/dia) e o nifurtimox (7,5 a 10 mg/kg/dia) durante 60 dias, podendo alcançar resultados satisfatórios próximos de 80% dos casos, na fase aguda da doença. No entanto, quando o paciente já se encontra na fase crônica da doença esses índices de cura caem substancialmente, mas estudos vêm mostrando que a utilização do benzonidazol e nifurtimax em ambas as fases da doença diminuem a parasitemia e reduzem os danos na musculatura esquelética e cardíaca.

Nifurtimox é um nitrofurano com mecanismo de ação que envolve a produção de grupos nitros que na presença de oxigênio impede a capacidade de *T. cruzi* para desintoxicar os radicais livres que atuam sobre ela. O benzonidazol atua por ligação dos seus metabolitos no DNA do parasita, e aos seus lipídios e proteínas (RASSI JR, RASSI e MENDONÇA, 2012).

Diversas substâncias têm sido testadas contra a *T. cruzi* onde o posaconazol um inibidor do ergosterol mostrou resultados promissores como mostrado por Olivieri et al. (2010) que estudaram os efeitos do posaconazol e do benzonidazol em modelo murino da doença de chagas na fase aguda, e demonstram que o tratamento com posaconazol promove uma resposta imunitária diferente e impede a inflamação e dano cardíaco, sendo mais eficaz do que benzonidazol em ambos os casos, e reforçam a noção de que este triazol poderia ser uma opção superior para o tratamento de infecções de *T. Cruzi* em seres humanos, no entanto estudos recentes utilizando seres humanos com a doença no estágio crônico obtiveram taxas de cura (teste de negativo após o tratamento) menores para o posaconazol em relação ao benzonidazol por Molina et al. (2014).

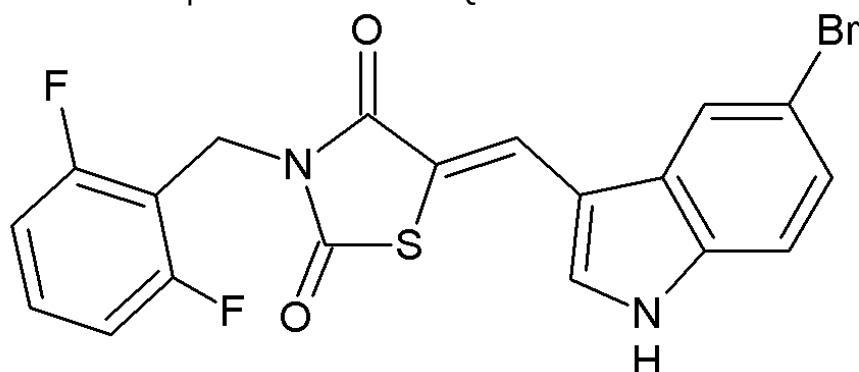
Para Bahia et al. 2012 novos tratamentos seguros e eficazes para a doença de chagas são urgentemente necessários, onde as opções atuais de quimioterapia têm limitações significativas, incluindo a falha para alcançar uniformemente cura parasitológica ou impedir a fase crônica da doença.

3.4 Novas alternativas para as DTNS

A tiazolidina (TZD) é um composto químico formado por um anel heterociclíco com múltiplas aplicações (SHAIKH, PATEL e RAJANI, 2013), esses compostos apresentam diversas atividades farmacológicas, entre elas destacam-se atividades antiparasitárias como: antimicrobiana (SAKHUJA et al., 2011; TOMASIC et al., 2011; ZIDAR et al., 2010), antitripanossoma cruzi (MOREIRA et al., 2013), antimalárica (RUIZ et al., 2011). Logo, as tiazolidinas surgem como perspectivas de novos fármacos podendo, assim contribuir nos estudos para a descoberta de compostos potencialmente bioativos.

Estudos utilizando compostos tiazolidínicos mostram promissora atividade no combate a esquistossomose. Silva (2010) estudando diferentes derivados TZD para o combate a esquistossomose, “in vitro”, obteve 86% de mortalidade dos parasitos, após seis dias de exposição dos parasitos adultos a $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do LPSF/SF-25, Luiz (2012) estudou dois derivados TZD, “in vitro”, o LPSF/GQ-58 e o LPSF/TA-02, onde foi observado que em todas as concentrações houve diminuição da motilidade dos parasitos, mas a maior taxa de mortalidade encontrada foi 22% após seis dias de exposição dos parasitos a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do LPSF/GQ-58, Oliveira (2013) estudando diversos derivados TZD contra o *S. mansoni* observou um aumento na atividade esquistossomicida devido à presença do bromo no núcleo indólico, onde o LPSF/GQ-238 (Figura 3) obteve melhor atividade, matando 100% dos parasitos em 24 horas na dose de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 3 - Estrutura química do LPSF/GQ-238



O LPSF/GQ-238 também mostrou atividade contra as fases Epimastigota (Cepa Dm 28c) e Tripomastigota (cepa Y) do protozoário *T. cruzi*, como mostrado na Tabela 1, onde o composto apresentou um IC₅₀ menor que os fármacos de referência utilizados para tratamento desta parasitose.

Tabela 1 - Atividade tripanossomicida do LPSF/GQ-238 contra formas epimastigotas e tripomastigotas

IFs	Atividade Tripanossomicida IC ₅₀ * (µg.mL ⁻¹)	
	Epimastigota (Cepa Dm 28c)	Tripomastigota (Cepa Y)
LPSF/GQ-238	0,98	0,43
Benzinidazol	12,7	1,63
Nifurtimox	1,64	0,79

Legenda: *IC₅₀: Representa a concentração necessária para obter 50% de inibição

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2015.

Este composto de nome químico 3-(2,6-difluór-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238), possui poucas características físicas e químicas descritas na literatura e nenhum estudo de estabilidade relatado sendo necessária a realização de estudos de caracterização para se conhecer as propriedades físicas e químicas deste promissor antiparasitário.

3.5 Técnicas analíticas aplicadas na identificação química de compostos

3.5.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

Segundo Gorog (2015) a identificação é o primeiro passo no complexo processo de controle de qualidade e nos aspectos da qualidade na pesquisa de novas drogas sintéticas. É também uma ferramenta importante na luta contra a falsificação de medicamentos. Cada molécula tem uma impressão digital única de frequências de vibração, o que torna a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF) uma técnica altamente específica para a identificação molecular (BUNACIU, ABOUL-ENEIN e HOANG, 2015).

Esta técnica se baseia na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética de comprimento de onda na região do infravermelho, que induz transições vibracionais e rotacionais (STORPIRTIS, 2009), a faixa espectral do infravermelho pode ser dividida em três regiões:

- IV distante: entre 10 a 400 cm^{-1} ;
- IV médio: entre 400 a 4.000 cm^{-1} ;
- IV próximo: entre 4000 a 20.000 cm^{-1} .

Onde a região do IV médio é a mais utilizada na área farmacêutica com finalidades de identificação de substâncias.

O IV é atualmente a técnica mais utilizada na identificação de fármacos (GOROG, 2015), esta técnica possui diversas vantagens, como: utilizar pequena quantidade de amostra (aproximadamente 1mg), resultados rápidos e de fácil interpretação, não utiliza solventes orgânicos e possui baixo custo de manutenção.

3.5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é outra técnica amplamente utilizada na identificação de fármacos, e diferente da CLAE, por exemplo, não necessita a utilização de padrões certificados para a identificação de fármacos.

A RMN é uma ferramenta analítica essencial para a elucidação da estrutura de compostos sintéticos e naturais desconhecidos. Além disso, ela pode fornecer

informações qualitativas e quantitativas utilizando o pressuposto que a intensidade do sinal é diretamente proporcional ao número de núcleos que dão origem a uma ressonância específica. Essa técnica possui como vantagens: simples desenvolvimento do método, fácil preparação da amostra, tempos de análise relativamente curtos e não necessita de padrão de referência (idêntico ao composto) (SIMMLER et al., 2014).

Portanto, a obtenção de novos derivados Indólico-tiazolidínicos e sua caracterização são etapas relevantes para a obtenção de novos protótipos bioativos. A utilização de técnicas de caracterização convencionais ^1H RMN, ^{13}C RMN e IV fornecem informações indispensáveis à elucidação estrutural da molécula (WORZAKOWSKA e ŚCIGALSKI, 2014; VIEIRA et al., 2014).

3.6 Solubilidade

Desde o sequenciamento do genoma humano, o número de compostos em desenvolvimento aumentou 62% e as despesas totais em P&D duplicaram. Mas, o número médio de novas drogas aprovadas pelo FDA nos EUA vem diminuindo a cada ano desde a década de 1990 (HAY, 2014).

Embora exista um esforço crescente para o desenvolvimento de novos medicamentos, estima-se que apenas 0,003% das NEQs em estudo cheguem ao mercado. Além das características farmacológicas desejáveis para um potencial medicamento, as características de solubilidade, estabilidade, toxicidade e produção influenciam na triagem dessas moléculas ativas (MAXIMIANO et al., 2010) onde mais de 75% das NEQs são pouco solúveis (HE e HO, 2015).

No desenvolvimento de novos fármacos a solubilidade mostra-se como um parâmetro fundamental, onde fármacos pouco solúveis, por vezes, são eliminados ou substituídos por análogos mais solúveis nas fases posteriores do estudo. Para as formulações farmacêuticas no estado sólido esta característica torna-se ainda mais importante, pois para os IFAs serem absorvidos estes precisam estar dissolvidos nos líquidos corpóreos.

No decorrer dos anos, a dificuldade de descobrir ou sintetizar novos fármacos com boa solubilidade impôs as indústrias farmacêuticas a desenvolverem novos medicamentos utilizando fármacos poucos solúveis em água, porém para melhorar esta característica algumas técnicas estão sendo utilizadas como: a redução do

tamanho de partícula, desenvolvimento de dispersões sólidas, co-cristais, co-moagem, co-solvente entre outras (SAVJANI et al., 2012).

Na Farmacopéia Brasileira 5^o ed., os ensaios de solubilidade são feitos com intuito de prever a solubilidade das substâncias, a 25°C, em água ou outro solvente pré-determinado, e seus resultados são expressos em uma parte do soluto dissolvido em *n* partes do solvente, como mostrado na Tabela 2 (BRASIL, 2010).

Tabela 2 - Termos descritivos de solubilidade e seus significados

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1.000 partes
Muito pouco solúvel	De 1.000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

Fonte: Farmacopéia Brasileira 5^oed.

3.7 Desenvolvimento e validação de método analítico

No atual contexto mundial, em que a competitividade industrial é crescente, o domínio da tecnologia, ou seja, a aplicação de princípios, métodos, instrumentos, ou processos elaborados a partir da pesquisa científica para desenvolver e aperfeiçoar produtos é essencial para qualquer país.

No intuito de controlar a qualidade dos produtos elaborados pela indústria farmacêutica, o desenvolvimento de métodos analíticos que resultem em respostas rápidas, precisas, e com baixo custo, são fatores chave para desenvolvimento de um medicamento. Com isso, surge a necessidade de desenvolver métodos analíticos cada vez mais seletivos e sensíveis. Neste ponto, as ciências analíticas desempenham um papel fundamental no tocante ao estabelecimento de protocolos analíticos compreendendo desde o preparo da amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse (RAO e NAGARUJU, 2003).

O método de validação objetiva demonstrar e/ou confirmar que um método é adequado a função pretendida (específica) (ICH Q2a, 1995; BRASIL, 2003; FDA, 2015).

A validação garante através de resultados significativos e adequados a tomada de decisão usando características de desempenho, tais como exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, intervalo, e robustez. (BRASIL, 2003; FDA, 2015)

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 estabelecendo o “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”, na qual é estabelecido que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

Os métodos analíticos são classificados em quatro diferentes grupos conforme a sua finalidade (Tabela 3) (ICH Q2a, 1995; BRASIL, 2003).

Tabela 3 - Classificação dos métodos segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação.

Fonte: Brasil, 2003.

Além de classificar nas quatro categorias também há a definição dos parâmetros obrigatórios ou não conforme cada uma delas (Tabela 4). A ICH Q2a (1995) não traz, a robustez, como parâmetro obrigatório da validação, recomendando assim sua avaliação no desenvolvimento do método.

Tabela 4 - Parâmetros necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.

PARÂMETRO		CATEGORIA				
		I	II		III	IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de Detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

Legenda: * Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico. ** Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: Brasil, 2003.

3.7.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade é a capacidade de avaliar o analito de forma inequívoca na presença de outros componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação, matriz entre outros (ICH Q2a, 1995).

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento de detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo. Entretanto, os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações (BRASIL, 2003; INMETRO, 2005).

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras, a primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (RIBANI et al., 2004), a segunda maneira é através da avaliação com detectores (arranjo de diodos, espectrômetro de massas) que comparam o espectro do pico obtido na separação

com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro.

3.7.2 *Linearidade*

Para Bottoli, Freyre e Reyes (2008) classifica-se um teste como linear quando o mesmo oferece resultados diretamente proporcionais à concentração da substância de interesse, dentro de uma faixa de aplicação, sendo que esta relação matemática deve seguir uma curva analítica, para sua quantificação são utilizados métodos como a padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição de padrão.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, considera-se que um método possui linearidade quando forem realizadas análises de no mínimo 5 concentrações diferentes e estas possuírem coeficiente de correlação de Pearson ($r \geq 0,99$) (BRASIL, 2003).

Apesar de ser esta a exigência descrita na resolução, é importante a aplicação de análise estatística para avaliar a significância da regressão e o ajuste do modelo utilizando, por exemplo, técnicas como a Análise de Variância (ANOVA) e análise dos resíduos.

3.7.3 *Intervalo*

O intervalo é a faixa dentro dos limites da linearidade onde é confirmada a exatidão, precisão e linearidade, sendo dependente do ensaio a ser realizado, pois conforme descrito na Resolução 899/03 deve cumprir pelo menos os limites estabelecidos na Tabela 5.

Tabela 5 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Finalidade do teste
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80 a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor

Fonte: Brasil. 2003.

3.7.4 Limites de detecção e quantificação

Em termos práticos, o limite de detecção (LD) é a menor quantidade de uma substância em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada em um valor exato. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade de uma substância na amostra que pode ser determinada quantitativamente com exatidão e precisão adequada.

Os limites de detecção e quantificação podem ser definidos pelos parâmetros das curvas de calibração conforme *Equações 1 e 2*, respectivamente.

$$LD = \frac{3 \times \text{Desvio Padrão da Regressão Linear}}{\text{Inclinação da Reta}} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10 \times \text{Desvio Padrão da Regressão Linear}}{\text{Inclinação da Reta}} \quad (2)$$

Outras formas de determinar os limites de detecção e quantificação:

✓ Visual: adiciona-se concentrações conhecidas do analito à matriz, possibilitando o conhecimento do menor nível em que se possa detectá-lo com clareza.

✓ Relação Sinal/Ruído: o Limite de Detecção é determinado através da comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito na matriz e um branco dessas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada.

3.7.5 Precisão

Durante a validação de métodos analíticos, a precisão subdivide-se em três níveis distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade que podem ser expressos como Desvio Padrão Relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a *Equação 3*.

$$DPR = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média Determinada}} \times 100 \quad (3)$$

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades apresentam um DPR de 1 a 2%, sendo admitido não mais que 5% para os métodos analíticos e 20% nos bioanalíticos no nível do limite de quantificação. Adicionalmente podem ser utilizados testes estatísticos para comparação da igualdade estatística das médias e/ou das variâncias entre diferentes grupos de dados da precisão intermediária ou da reprodutibilidade.

3.7.5.1 Repetibilidade

A repetibilidade (precisão intra-corrída) demonstra a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (ICH Q2a, 1995; BRASIL, 2003). Esta pode ser verificada utilizando, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3

concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

3.7.5.2 Precisão intermediária

A avaliação do efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, ou diferentes analistas, ou diferentes equipamentos, ou uma combinação destes fatores é medida pela chamada precisão intermediária (BRASIL, 2003; BOTTOLI, FREYRE e REYES, 2008; BRASIL, 2010).

A precisão intermediária é realizada da mesma forma que a repetibilidade, diferindo pelo fato de inserir variáveis diferentes a exemplo de diferentes analistas e/ou dias para sua execução.

3.7.5.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) indica a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas (BRASIL, 2003).

Segundo Ribani et al. (2004) é muito comum o aparecimento de divergências entre os resultados obtidos por laboratórios diferentes que desenvolvem o mesmo teste analítico em estudos colaborativos. Sendo assim os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar a reprodutibilidade do método, a exemplo dos métodos oficiais publicados em farmacopéias.

3.7.6 *Exatidão*

A proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro é a exatidão.

A exatidão é calculada como percentagem da recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as

médias e o valor verdadeiro aceito, acrescido dos intervalos de confiança. É determinado através de 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 réplicas cada, perfazendo um total de 9 determinações. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente conforme *Equação 4* (BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (4)$$

Adicionalmente podem ser utilizados testes estatísticos para comparação da igualdade estatística das médias e/ou das variâncias entre diferentes grupos de dados da exatidão para mostrar que não há influência da concentração na recuperação.

3.7.7 Robustez

Durante o desenvolvimento de metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

De acordo com o INMETRO (2005), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por modificações pequenas e deliberadas em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em cromatografia gasosa, bem como o tempo de extração, agitação, entre outros.

A tabela 6 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método e que podem ser avaliados na análise da robustez do método, conforme Brasil (2003).

Tabela 6 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Variável	Condições a serem analisadas
Preparo das Amostras	✓ Estabilidade das soluções analíticas ✓ Tempo de extração
Espectrofotometria	✓ Variação do pH da solução ✓ Temperatura ✓ Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	✓ Variação do pH da fase móvel ✓ Variação na composição da fase móvel ✓ Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ✓ Temperatura ✓ Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	✓ Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ✓ Temperatura ✓ Velocidade do gás de arraste

Fonte: Brasil, 2003.

3.8 Caracterização do estado sólido

Nas últimas duas décadas tem se observado um aumento no número de novos fármacos com baixa solubilidade aquosa e baixa dissolução (VAN DEN MOOTER, 2012). De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, um composto é pouco solúvel, se a dose mais elevada não puder ser dissolvida em 250 mL, em pH entre 1 e 7 (AMIDON et al., 1995).

Os sólidos farmacêuticos podem existir em diversas formas cristalinas, e no estado cristalino os fármacos podem ser classificados, como solvatos, hidratos, anidros e no estado amorfo (CHIENG, RADES e AALTONEN, 2011). Os fármacos são classificados como solvatos quando apresentam na sua rede cristalina moléculas de solvente, como: etanol, metanol, acetato de etila, entre outros, hidratos são assim denominados por apresentarem moléculas de água inseridas na estrutura cristalina, os fármacos anidros são formados por arranjos cristalinos contendo

apenas a molécula do fármaco e o estado amorfo não apresenta arranjo cristalino organizado.

Uma grande preocupação da indústria farmacêutica e da comunidade científica é o aumento no número de fármacos que apresentam polimorfismo, devido estes possuírem diferentes perfis de solubilidade, estabilidade, propriedades físico-químicas afetando assim os parâmetros biofarmacêuticos, segundo Stahly (2007) 80-90% dos compostos orgânicos podem existir em várias formas cristalinas.

O polimorfismo, por alguns anos, foi considerado pela comunidade farmacêutica um ponto negativo para os fármacos que apresentam diferentes formas no estado sólido, no entanto, com o conhecimento das características dos polimorfos, a possibilidade de modificação do arranjo cristalino para o melhoramento da solubilidade passou a ter importância fundamental no estudo dos fármacos.

No intuito de melhorar a solubilidade, a taxa de dissolução e consequentemente a biodisponibilidade de medicamentos pouco solúveis em água, pesquisadores vêm modificando a estrutura cristalina na busca de transformar polimorfos estáveis em fármacos metaestáveis ou amorfos com características de solubilidade e estabilidade adequadas para a fabricação de medicamentos.

A Tabela 7 mostra alguns dos mecanismos e operações usadas nas transformações de fase no estado sólido.

Tabela 7 - Tipos de transformações de fase sólida.

Transformação de fase	As formas sólidas que ocorrem	Mecanismo	Operação de tratamento
Transformação polimórfica	Cristal A ↔ Cristal B	Sólido-Sólido transformação mediada por solução, via da fusão	Compressão, moagem, aquecendo cristalização de aquecimento acima do ponto de fusão e posterior resfriamento
Dessolvatação	Solvato → Amorfa ou Cristal, desidratação severa e branda, respectivamente.	Sólido-Sólido	Operações de secagem como: secagem em leito fluidizado, secagem por pulverização, secagem por congelamento; armazenamento em condições secas
Amorfização	Cristal ou Solvato → Amorfa (desidratação severa)	Sólido-Sólido, mediada por solução, através de transformação de fusão	Compressão, moagem, hidratos de desidratação, secagem por pulverização, liofilização
Recristalização	Amorfa → Cristal	Sólido-Sólido	Calor, umidade ou cristalização induzida por plastificante; recristalização durante o armazenamento

Fonte: Adaptado de HEINZ et al., 2009.

Como visto na Tabela 7, diversas técnicas são usadas na transformação cristalina dos fármacos, mas para garantir a qualidade da matéria prima produzida é necessário um profundo conhecimento das características físico-químicas dos IFs, onde as técnicas térmicas (TG, DSC, DTA) e técnicas não térmicas (IV-FT, DRX, MEV entre outras) podem ser utilizadas na caracterização de sólidos.

Segundo Brittain et al. (1997) para uma completa caracterização do estado sólido é necessária a utilização de técnicas que caracterizem os diferentes níveis do fármaco, entre estes níveis destaca-se: caracterização em nível molecular (propriedades associadas com moléculas individuais), em nível de partículas (propriedades relativas a partículas sólidas individuais) e em nível de massa (propriedades associadas com um conjunto de partículas).

3.9 Estabilidade

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005; SILVA et al., 2009).

A estabilidade dos fármacos é um tema de grande preocupação, pois afeta a segurança e eficácia do medicamento. As orientações da FDA e do ICH indicam a necessidade de teste de estabilidade para compreender o comportamento dos fármacos frente a vários fatores ambientais. O conhecimento da estabilidade da molécula ajuda na seleção adequada da formulação e embalagem, bem como proporciona condições sobre armazenamento e vida de prateleira (COLLIER 2010, BLESSY, 2014).

A estabilidade é uma propriedade importante de um novo produto farmacêutico, pois os estudos de estabilidade são rotineiramente realizados pelas indústrias farmacêuticas, a fim de avaliar qualquer tipo de degradação química e física do produto; onde as amostras individuais são tomadas em momentos pré-determinados e analisadas a fim de verificar a diminuição no teor do ativo farmacêutico, aumento no teor de produtos de degradação, e alterações de comportamento de dissolução (SOUZA, MACEDO, VERAS, 2002).

Estudos de compatibilidade e cinética de degradação são extensivamente usados para prever a estabilidade dos fármacos isolados ou em mistura, como mostrado nos trabalhos de Lira et al. (2007); Felix (2009); Mendonça et al. (2014); Galvão et al. (2015).

Atualmente para o registro de novos medicamentos a legislação brasileira exige a realização de estudos de estabilidade segundo a resolução 01 de 29 de julho de 2005 (Guia para a realização de estudos de estabilidade), no entanto, estes estudos são demorados e dispendiosos. Nesse sentido, as técnicas termoanalíticas mostram-se uma alternativa útil na previsão da estabilidade de fármacos e misturas, pois são técnicas que podem gerar resultados rápidos e confiáveis.

No estudo de compatibilidade de formulações farmacêuticas os deslocamentos, desaparecimentos ou aparecimentos de novos picos/eventos térmicos que estavam ausentes nas curvas de compostos puros, são sinais de possíveis interações sendo necessária a realização de análises por outras técnicas complementares, tais como DRX, RMN, cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massa (LC-MS/MS) e IV-TF (TITA et al., 2011; LAVOR et al., 2014)

Segundo Tita et al. (2011) o estudo de compatibilidade de fármacos e excipientes representa uma importante etapa no estudo de pré-formulação. Onde as possíveis interações físico-químicas entre os fármacos e excipientes podem afetar a natureza física, a química, a estabilidade e a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a sua eficácia e segurança terapêutica.

Felix (2009) estudando a cinética de degradação do salbutamol, fármaco e medicamento, em condições isotérmicas e não-isotérmicas, utilizando modelos matemáticos de Arrhenius e Ozawa, observou uma maior estabilidade do medicamento salbutamol em comparação ao fármaco isolado, utilizando como referência os valores de E_a .

Através da equação de Arrhenius pode-se calcular os parâmetros cinéticos,

$$k(T) = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (5)$$

A = fator de frequência ou fator pré-exponencial

E_a = energia de ativação

R = constante geral dos gases ($8,31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T = temperatura absoluta (K)

A realização de estudos cinéticos revela informações sobre o mecanismo de decomposição e estabilidade, podendo ser obtido os valores de energia de ativação (E_a), ordem de reação (n) e fator pré-exponencial (A) (LEDETI et al., 2015). Além dos parâmetros cinéticos já citados, a equação de arrhenius também permite prever o prazo de validade dos fármacos e o tempo de meia vida das substâncias, como mostrado nos trabalhos de Soares-Sobrinho et al. (2010); Procopio et al. (2011).

3.10 Análise térmica

A análise térmica durante o desenvolvimento completo de um novo medicamento é importante na fase inicial de pesquisa química, contribuindo para um melhor conhecimento e gestão das características inerentes aos compostos (LIZARRAGA, ZABALETA, PALOP, 2007).

As técnicas termoanalíticas medem uma propriedade física e/ou química em função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura sob uma atmosfera específica (GIRON, 1998; MENDONÇA et al., 2014; GALVAO et al., 2015).

Entre as técnicas térmicas a TG, a DSC e a DTA, são as principais técnicas termoanalíticas utilizadas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, caracterização térmica, estudos de compatibilidade, identificação de polimorfos, estabilidade térmica (ALVES et al., 2010; LAVOR et al., 2014).

Segundo Macêdo et al. (2000) a utilização de técnica limpa, a velocidade e simplicidade dos métodos de análise térmica contribuem para o crescimento e importância da análise térmica no controle de qualidade dos IFAs, onde a DSC é uma técnica térmica em que diferenças no fluxo de aquecimento de uma substância e a referência são medidas em função da temperatura da amostra, enquanto as duas são sujeitas a um programa controlado de temperatura (PROCÓPIO et al., 2011).

3.10.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A DSC é considerada permite a detecção quantitativa de todos os processos energéticos, permite explorar o processo de fusão, cristalização, evaporação, equilíbrios de fase, sublimação, transformações vítreas e polimórficas, desidratação, isomerização, adsorção e degradação da substância (EMAMI et al., 2014). Quando a amostra sofre uma alteração de temperatura, devido a uma reação exotérmica ou endotérmica, a diferença de fluxo de calor usada para manter a amostra e a referência na mesma temperatura pode ser medida. Essa diferença pode ser devido a reações químicas (decomposição de combustão), mudança de estado (fusão, sublimação) ou transições cristalinas (OLIVEIRA et al., 2011a).

Existem várias diferenças entre as técnicas de DSC e DTA. O DTA detecta diferenças de temperatura, enquanto a DSC detecta alterações na entalpia (diferença de fluxo de calor). A DTA é uma técnica robusta e mais antiga que o DSC. Sendo a DSC mais sensível do que a DTA. Esta usa quantidade de amostra cerca de quatro vezes maior do que a DSC e tem o microvolts (mV) como unidade, uma vez que a DSC é expressa em miliwatts (mW), o cadinho de alumina aberto é usado na DTA, enquanto a DSC utiliza cadinho de alumínio fechado. Com o DTA é possível atingir temperaturas acima de 1000 °C enquanto o DSC trabalha com temperaturas inferiores a 800 °C, pela combinação de DTA e técnicas de DSC, os dados térmicos podem ser melhor interpretados (HAINES et al., 1998; BARROS LIMA et al., 2015).

A DSC acoplada ao sistema fotovisual é uma técnica que combina medida do fluxo de calor e monitoramento visual de eventos físicos e químicos simultaneamente durante a análise através de captura de imagem, permite visualizar processos de decomposição que envolve libertação de gás e perda de água de cristalização (MACEDO, NASCIMENTO, VERAS, 2002). Macêdo e Nascimento (2002) utilizando este equipamento confirmaram que o fármaco tiabendazol inicia sua decomposição em temperatura inferior a fusão do composto. DA SILVA et al (2009) mostrou diferença nos pontos de fusão dos diferentes lotes de indinavir estudados. Esta técnica também foi usada nos trabalhos de Macêdo, Nascimento, Veras (2002); Souza et al. (2002); Lira et al. (2007); Galvão et al. (2015) como uma técnica fundamental na confirmação de incompatibilidade química e física de misturas farmacêuticas.

3.10.2 Termogravimetria (TG)

A TG é uma técnica termoanalítica na qual a variação de massa da amostra é medida em função da temperatura e/ou tempo, a amostra é colocada numa termobalança de alta precisão no interior do forno e continuamente pesada durante a análise, sua perda de massa é associada com uma reação térmica é medida entre os pontos de inflexão da curva da TG (PLANTE, FERNANDEZ e LEIFELD, 2009).

A TG é a técnica termoanalítica mais utilizada para estudar a degradação térmica de polímeros e compostos orgânicos, normalmente, a cinética de degradação térmica depende não apenas da natureza do material, mas também das condições experimentais, tais como: massa da amostra, tipo de cadinho, fluxo e tipo de gás utilizado. A escolha do gás pode afetar a taxa de degradação, bem como o número dos passos de perda de massa, a temperatura de início e no final do processo, e a massa do resíduo (VYAZOVKIN et al., 2014).

Roumeli et al. (2012) estudando a caracterização e decomposição cinética do trandolapril em atmosfera de ar e azoto observaram diferenças no comportamento térmico, onde atmosfera inerte mostrou duas etapas de degradação térmica, e o composto foi totalmente volatilizado ao final da análise; na atmosfera oxidativa o composto mostrou três etapas de degradação, e ao final da análise houve deposição de compostos carbonizados no porta amostra, os autores concluíram que em atmosferas diferentes o composto possui mecanismos de degradação térmica diferentes.

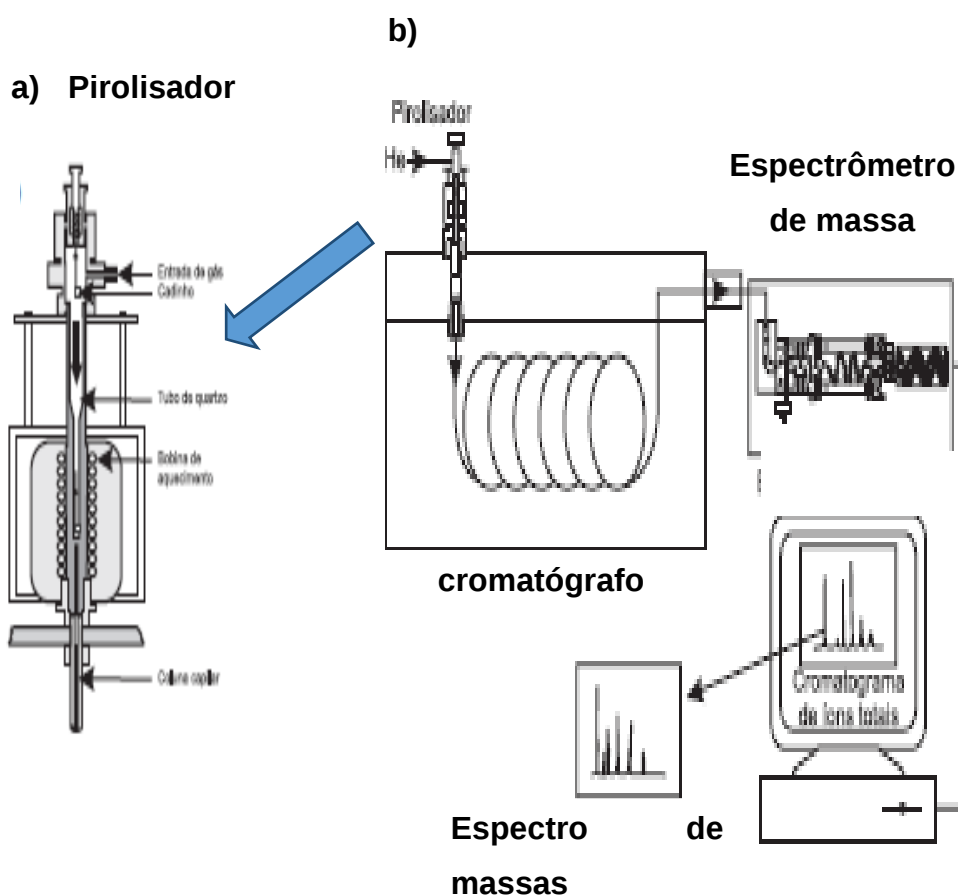
3.11 Pirólise acoplada a CG/EM

Pirólise analítica é uma técnica de caracterização térmica, na ausência de oxigênio, que resulta em reações de degradação química (SILVEIRA, BARBOSA e PILO-VELOSO, 2008).

Pir-CG em combinação com espectrometria de massa (EM) é usada para obter informação estrutural sobre as macromoléculas através da análise dos produtos de degradação térmica (FIES et al., 2013), no entanto Zhang et al. (2015) adverte que técnicas que lidam com análise em tempo real capaz de obter informações sobre degradações a temperaturas diferentes dificilmente podem distinguir os compostos complexos e estruturas geradas a uma temperatura elevada.

A CG/EM é normalmente empregada na análise de compostos voláteis até 450 °C, porém para o estudo de substâncias com temperaturas de volatilização superiores ou para o estudo de produtos de degradação térmica é necessário a utilização de microfornos acoplados ao CG/EM, esses microfornos podem atingir temperaturas superiores a 1000 °C, com aquecimento na forma de gradiente ou temperatura fixa, como mostrado na figura 4-a, no pirolisador de microforno a amostra é injetada em uma temperatura previamente programada (fixa), onde a temperatura induz a fragmentação e/ou volatilização dos compostos, a quantidade de amostra deve ser extremamente pequena (<0,1 mg) (SILVEIRA, BARBOSA, PILO-VELOSO, 2008), esses voláteis, são arrastados diretamente por um gás inerte (geralmente N₂ ou He), em seguida os compostos são separados e identificados no cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massas, respectivamente, como mostrado na figura 4-b

Figura 4 - Sistema de Pir-CG/EM usando pirolisador de microforno equipado com cromatógrafo a gás e espectrômetro de massas com quadrupolo.



Na área farmacêutica a técnica de Pir-CG/EM é frequentemente utilizada como uma técnica complementar aos dados de TG e DSC para o entendimento dos processos de degradação térmica, esta técnica pode ser usada também no controle de qualidade, como por exemplo, na identificação de impurezas resultantes da síntese como observado por Moura et al. (2009).

Moura et al. (2009) estudando o comportamento do fluconazol por técnicas térmicas (TG, DSC e Pir-CG/EM) observou que este fármaco volatiliza sem degradação em 250 °C, mas em temperaturas superiores (500 e 750 °C) o fármaco fragmenta-se em diversos compostos químicos, resultado que foi também confirmado por DSC-fotovisual.

Boer et al. (2013) estudando o comportamento do tacrolimus, um fármaco de alto peso molecular, por técnicas térmicas (TG, DSC e Pir-CG/EM) correlacionou as quebras da molécula com as perdas de massa na TG, podendo ter uma previsão das partes da molécula que se degrada com maior facilidade, concluindo assim que apesar da técnica Pir-GC/EM promover um processo de fragmentação drástica, o que é inerente a técnica, foi possível identificar os principais íons de fragmentação do tacrolimus.

Procópio et al. (2011) estudando o comportamento de degradação da sinvastatina por Pir-CG/EM identificou e quantificou em percentual de massa os fragmentos de degradação do fármaco, corroborando com os dados obtidos por técnicas termoanalíticas (TG, DSC, DSC-fotovisual).

3.12 Difração de Raio-X (DRX)

Como já citado acima, o número de fármacos que apresentam diferentes formas sólidas aumentou consideravelmente nas últimas décadas e atualmente é alvo de intensa investigação por parte da comunidade farmacêutica, onde a DRX apresenta-se como uma das principais técnicas utilizadas na caracterização de novos fármacos (KIANG et al., 2015).

Para Palermo, Anderson e Drennen III (2012) a combinação de DRX e análise térmica continua a ser o padrão-ouro para estabelecer se um material é amorfo ou cristalino. Em DRX de pó, os materiais amorfos ou com baixa cristalinidade resultam num difratograma com halo amorfo; Por outro lado, a estrutura de repetição de

amostras cristalinas irá difratar raios-X produzindo picos relativamente agudos que ocorrem em ângulos de recolha muito específico, estas informações devem estar acompanhadas de um evento de transição vítrea (t_g) e a ausência de fusão endotérmica no primeiro caso, e pelo menos um pico endotérmico correspondendo à fusão no segundo caso.

Garekani et al. (2001) estudando a recristalização do ibuprofeno a partir de diferentes solventes orgânicos (metanol, etanol, isopropanol e hexano) obteve o mesmo polimorfo (mesma estrutura cristalina) com hábitos cristalinos diferentes. As amostras cristalizadas a partir de metanol e etanol formaram hábito cristalino poliédrico, com hexano foi do tipo agulha e com o isopropanol foram cristais alongados. A modificação do hábito cristalino teve grande influência sobre as propriedades mecânicas (compressibilidade, taxa de fluxo, e densidade a granel) dos cristais. As amostras obtidas a partir de metanol e etanol apresentaram maior densidade e melhor taxa de fluxo, enquanto com hexano apresentou a menor densidade e a pior taxa de vazão. Assim encontrar NEQs com morfologias alongadas durante a descoberta e o desenvolvimento torna se mais comum a cada dia (HO et al., 2012), entre estes, os cristais em forma de agulha são conhecidos por serem mais difíceis de processar (GAREKANI et al., 2001; WITZLEB et al., 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

O 3-(2,6-difluor-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238) foi fornecido pelo Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE), sobre a coordenação da Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima.

4.2 Síntese do LPSF/GQ-238

A síntese do LPSF/GQ-238 foi realizada no Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE) sobre a coordenação da Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima. O LPSF/GQ-238 foi inicialmente sintetizado e descrito por Oliveira (2013); Oliveira et al. (2015).

Esta síntese foi realizada em três etapas como descrita a seguir e ilustrada na figura 5.

4.2.1 Síntese da tiazolidina-2,4-diona

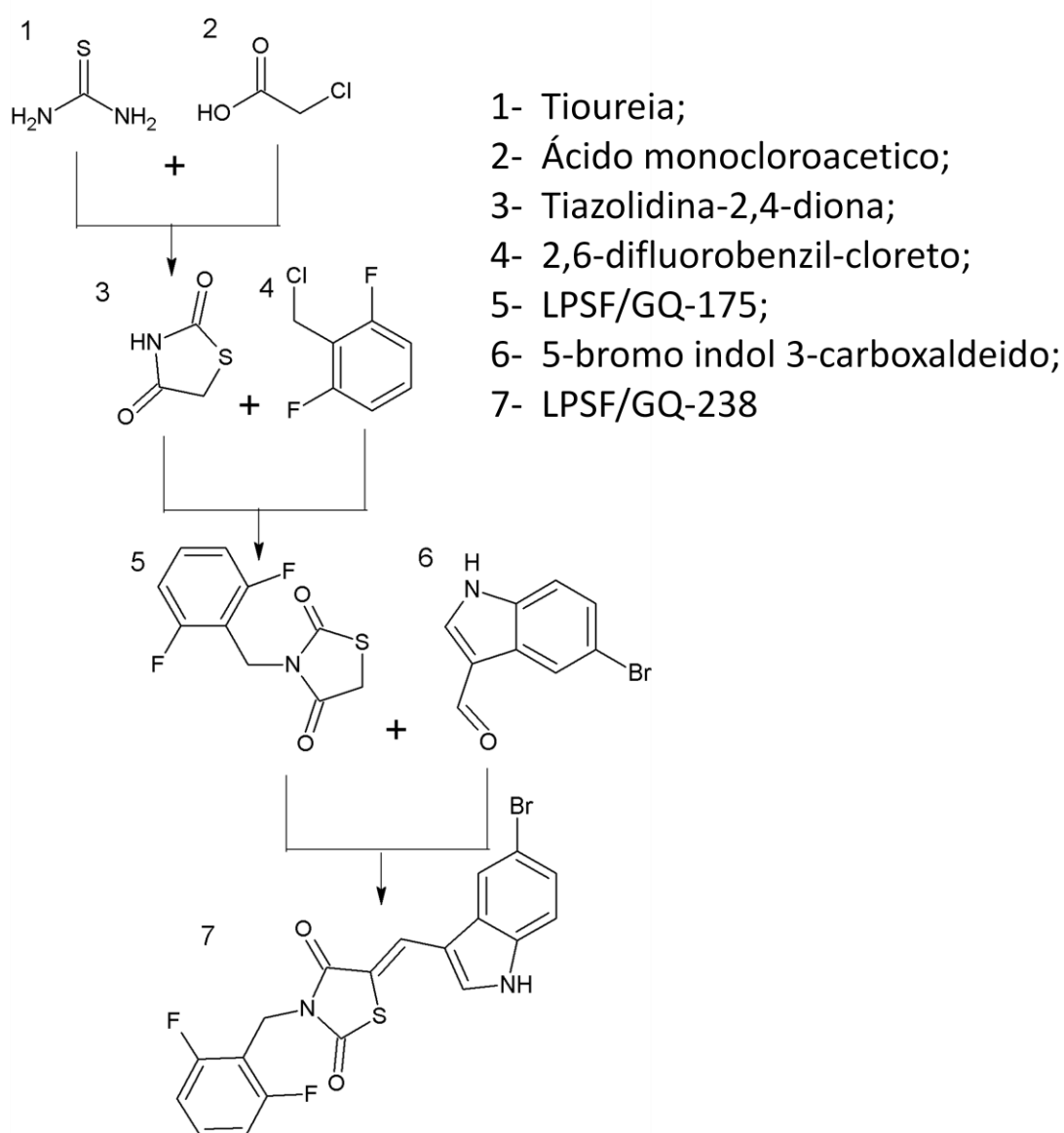
Em um balão de fundo redondo, com capacidade de 250 mL foram adicionados 40,00 g (0,52548 mol) de Tioureia (MM 76,12 g.mol⁻¹) e 49,65 g (0,52545 mol) de ácido monocloroacético (MM 94,49 g.mol⁻¹) previamente solubilizado em água à quente (200 mL) e deixado sob agitação e refluxo por 40 horas a temperatura de 80 °C. Ao final da reação, o produto foi deixado à temperatura ambiente para a formação dos cristais (precipitação), em seguida a amostra foi secada a temperatura ambiente.

4.2.2 Síntese do derivado 3-(2,6-difluor-benzil)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-175)

Em um balão de fundo redondo, com capacidade de 250 mL foram adicionados 15 g (0,12820 mol) de tiazolidina-2,4-diona (117 g.mol⁻¹) e 5,1282 g (0,12820 mol) de hidróxido de sódio (40 g.mol⁻¹) previamente solubilizado numa mistura etanol/água 6:4 (60 mL) e deixado sob agitação por 15 minutos a

temperatura ambiente. Ao sal de sódio de tiazolidina-2,4-diona formado, adicionou-se, aos poucos, quantidade equimolar do 2,6-difluorobenzil-cloreto (MM 162,56 g.mol⁻¹). A reação foi mantida em refluxo por 42 horas a temperatura entre 60-70 °C. Ao final da reação, o produto esperado precipitou-se naturalmente com a retirada do calor, foi filtrado e seco a temperatura ambiente. Para atestar a pureza do composto foram realizadas análises por cromatografia em camada delgada e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Figura 5 - Rota sintética do LPSF/GQ-238.



4.2.3 Síntese do derivado 3-(2,6-difluór-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238)

Em um balão de fundo redondo, com capacidade de 250 mL foram adicionados 4,8669 g (0,02172 mol) do 5-bromo indol 3-carboxaldeido ($224,05 \text{ g.mol}^{-1}$) e 5,2833 g (0,02172 mol) do LPSF/GQ-175 ($243,22 \text{ g.mol}^{-1}$) na presença de 3 mL de etilamonilformato como catalisador e 100 mL de etanol absoluto como solvente. A mistura reacional foi mantida em refluxo por aproximadamente 40 minutos sobre agitação a 50 °C. O produto foi então filtrado e purificado com sucessivas lavagens em etanol absoluto e seco a temperatura ambiente.

4.3 Identificação química

4.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

O espectro de infravermelho foi obtido utilizando um IV-FT (Shimadzu®, IRPrestige-21). As amostras analisadas foram obtidas por sedimentação com brometo de potássio, sendo o resultado obtido da média de 32 varreduras, de 4000 a 600 cm^{-1} na resolução de 4 cm^{-1} .

4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro (VARIAN®, VNMRS-400) operado a 400 MHz para hidrogênio (RMN ^1H) e 100 MHz para carbono-13 (RMN ^{13}C), como referência para a calibração do espectro de RMN utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) e aproximadamente 25 mg do LPSF/GQ-238 foram solubilizados em DMSO_{d6} , as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades das RMN ^1H foram indicadas segundo a conversão: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), tl (tripleto largo), q (quadrupeto) e m (multipeto).

4.4 Teste de solubilidade segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição

Para os testes de solubilidade foram utilizados uma parte do LPSF/GQ-238 e adicionado os solventes em partes iguais ao composto, a fim de perfazer todas as quantidades parte (soluto) / parte (solvente) do teste. Os solventes foram escolhidos de acordo com seu grau de polaridade. Para o teste foram utilizados água destilada, etanol P.A 99,5% (Neon), metanol P.A (QEEL), acetonitrila P.A (Vetec), acetato de etila P.A (Tedia), éter etílico P.A (Vetec), hexano P.A (Cinética), HCl 0,1M pH 1, tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,8 e NaOH 0,1M pH 12. Todos os testes foram realizados em triplicata a temperatura de 25 °C.

4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a validação do método analítico foi utilizado um CLAE (Shimadzu®, Série Prominence) equipado com um sistema de bomba multissolvente (LC-20AT), sistema de injeção automático (SIL-20A), um sistema de degaseificação (DGU-20A₅), um forno para coluna (CTO-20A) e um detector UV-VIS com arranjo de diodos (SPD-M20A). A coluna utilizada foi uma Shim-pack CLC-C8 (250 mm x 4,6 mm ID, com partículas de 5 µm e 100Å de diâmetro do poro). A temperatura do forno foi mantida a 40 °C e a fase móvel consistiu da mistura acetonitrila:água (60:40). O volume de injeção foi fixado em 20 µL, a velocidade de fluxo da fase móvel foi mantida constante a 1,0 mL.min⁻¹. e a detecção efetuada por espectrofotometria no ultravioleta em número de onda de 379nm. O software LC Solution® (Shimadzu®, Japão) foi usado para controlar o equipamento na aquisição e análise dos dados.

4.5.1 Preparação das amostras

As amostras foram pesadas analiticamente, diluídas em balão volumétrico com acetonitrila e sonicadas por 8 min. Retirou-se da amostra uma alíquota volumétrica que foi diluída em acetonitrila obtendo-se a concentração final de 10 µg.mL⁻¹. Em seguida, as amostras foram filtradas em membranas filtrantes de porosidade de 0,45 µm PTFE.

4.5.2 Validação do método analítico

O método foi validado seguindo parâmetros da RE 899, de 29 de maio de 2003, a conformidade dos dados obtidos também foi avaliada segundo a mesma resolução (BRASIL, 2003). A análise estatística dos resultados obtidos, segundo Análise de Variância (ANOVA) e teste t Student.

O parâmetro seletividade/especificidade foi verificado através da análise comparativa entre a amostra, análise do padrão e análise do branco onde foi utilizado o solvente (acetonitrila) como branco.

A variação média do estudo foi realizada no intervalo de 10 a 190%. Foi preparada uma solução estoque de LPSF/GQ-238 em acetonitrila com 8 min de agitação por ultrasson na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Posteriores diluições volumétricas foram realizadas utilizando o solvente acetonitrila para análise de três curvas autênticas nas concentrações de 1,0; 4,0; 7,0; 10,0; 13,0; 16,0; e 19,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram tratados estatisticamente por cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) é de 0,99.

Já os limites de detecção e de quantificação foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares (b) das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares (a) das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10, respectivamente.

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrida), precisão intermediária (precisão intercorridas). Na repetibilidade, o método foi verificado por 6 determinações autênticas a 100% da concentração do teste (10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), analisadas em um pequeno intervalo de tempo. Na precisão intermediária foram realizadas análises em dois dias diferentes com dois analistas diferentes.

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade e do intervalo, sendo verificada a partir de amostras obtidas em triplicata para cada concentração perfazendo três níveis: baixo, médio e alto com concentrações de 2,0; 10,0 e 18,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

No parâmetro robustez foi analisada a possível influência de pequenas variações ocasionadas pela temperatura do forno (38 e 42 °C), pelo fluxo (0,9 e 1,1 mL.min^{-1}) e força de eluição da fase móvel acetonitrila:água (58:42% e 62:38%),

para cada condição foram realizadas 3 análises da amostra e 3 análises do padrão na mesma concentração.

4.6 Análise térmica

4.6.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As curvas calorimétricas foram obtidas em um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu[®], modelo DSC-50) usando um cadinho hermeticamente fechado de alumínio. O equipamento foi calibrado utilizando índio ($156,6 \pm 0,3$ °C) e zinco ($419,5 \pm 1$ °C) como padrão. O sinal de fluxo de calor foi calibrado pelo calor de fusão do índio ($28,59 \pm 0,3$ J.g⁻¹). Os experimentos foram conduzidos com elevação da temperatura no intervalo de 25-450 °C nas razões de aquecimento de 2, 5, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹, em fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. A massa da amostra foi de $2,0 \pm 0,1$ mg. Os dados DSC foram analisados usando o Software TasyS da Shimadzu[®].

A pureza do LPSF/GQ-238 foi calculada através da aplicação da equação de Van't Hoff (ARAUJO et al., 2010).

$$T_s = T_o - \frac{X_1 R T_o^2}{\Delta H_f} \cdot \frac{1}{F} \quad (6)$$

Onde:

T_s = temperatura da amostra

T_o = ponto de fusão teórico do composto puro (K)

X_1 = fração molar da impureza

R = constante dos gases (8,314 J mol⁻¹K⁻¹)

ΔH_f = calor de fusão do composto principal puro (J mol⁻¹)

F = fração da amostra que fundiu em T_s

4.6.2 DSC acoplado ao sistema fotovisual (DSC-fotovisual)

Os dados DSC-fotovisual foram obtidos em um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu[®], modelo DSC-50) acoplado a um sistema fotovisual, equipado com um microscópio (Olympus[®], modelo SZ-CTV60) e uma câmera (Sony[®], modelo VCC-520). As amostras foram colocadas em um cadinho aberto de alumínio e aquecidas no intervalo de temperatura de 25-400 °C com taxa de aquecimento de 2, 5 e 10 °C.min⁻¹ nas mesmas condições de fluxo de nitrogênio da DSC convencional.

As fotos foram capturadas com o Software (Asymetrix DVP 4.0) em tempo real para observar as transições de fase nas amostras.

4.6.3 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu®, modelo TGA-50) utilizando cadinho de alumina. O aparelho foi calibrado com oxalato de cálcio monoidratado. Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25-900 °C nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40 °C.min⁻¹. No estudo dinâmico serão avaliadas duas atmosferas diferentes, uma inerte utilizando nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e outra oxidativa utilizando ar sintético e nitrogênio com fluxo de 20 e 50 mL.min⁻¹, respectivamente. A massa da amostra foi de 2,0 ± 0,1 mg.

As curvas TG isotérmicas foram obtidas no mesmo equipamento sob as mesmas condições de atmosfera oxidativa e de massa das curvas TG dinâmicas. As temperaturas utilizadas para os estudos isotérmicos foram escolhidas de acordo com o início da degradação da NEQ nas curvas TG dinâmicas para a maior temperatura e as demais temperaturas foram intervaladas a cada 10 °C (255, 265, 275, 285 e 295 °C). Os dados da TG dinâmica foram analisados usando o Software TasyS da Shimadzu®.

4.7 Pirólise acoplada a CG/EM

Para estudos de pirólise foi utilizado um pirolisador acoplado a um sistema de cromatografia gasosa (Shimadzu®, GCMS-QP5050A), diretamente ligado a um espectrômetro de massas com detector de ionização eletrônica. A ionização dos componentes foi realizada por impacto eletrônico com energia de ionização de 70 eV. O espectrômetro foi operado no modo SCAN, varrendo uma faixa de massa m/z 50-450. A temperatura da fonte de íons foi de 280 °C. Foi utilizada uma coluna capilar com fase estacionária fenil:dimetilpolissiloxano (5:95), com 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de tamanho de partícula. O programa de temperatura constou de dois segmentos: no primeiro a coluna foi aquecida a partir da temperatura inicial (70 °C) com uma taxa de aquecimento de 10

°C.min⁻¹ até a temperatura final de 280 °C, e, no segundo foi mantida na temperatura isotérmica de 280 °C por 5 min. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL.min⁻¹ e razão de split de 1:10. A amostra correspondente a um cristal de LPSF/GQ-238, tiazolidina-2,4-diona (TZD), LPSF/GQ-175, 5-bromo indol 3-carboxaldeído, foram colocadas em cadinho de platina e introduzidas no pirolisador nas temperaturas de 450 e 650 °C, separadamente para cada experimento.

4.8 Difração de Raio-X (DRX)

Os difratogramas do LPSF/GQ-238 foram realizados usando Difratorômetro de Raio-X (BRUKER®, D2 PHASER) através de radiação de Cu-K α , empregando o método do pó, avaliado na faixa de $0^\circ \leq 2\theta \leq 40^\circ$, e velocidade de análise de 1 passo a cada 3 segundos o aparelho operou a 30 kV-10 mA com incremento de 0,02.

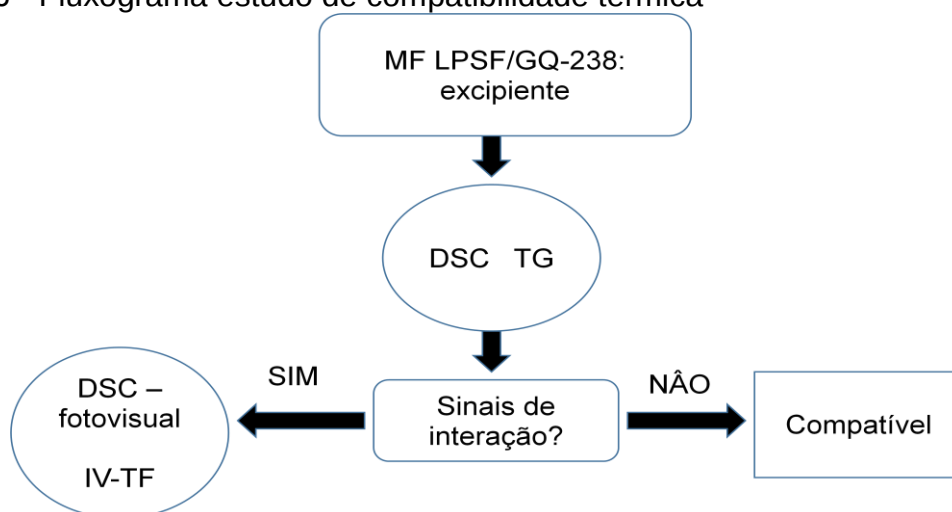
4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação da morfologia dos cristais de LPSF/GQ-238 foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio (ZEISS®, LEO 1430), após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 1,5 min (Metalizador EMITECH®, k550x). As eletromicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 KV.

4.10 Estudo de compatibilidade

O estudo de compatibilidade foi realizado utilizando PEG 6000, PVP-K30 e SOLUPLUS® como excipientes, a mistura do LPSF/GQ-238 foi realizada na proporção 1:1 massa/massa, a NEQ mais o excipiente foram misturados utilizando gral e pistilo, após o termino da mistura, o material foi tamisado utilizando tamis de 450 nm. A figura 6 mostra o fluxograma com as etapas do estudo e a tomada de decisão.

Figura 6 - Fluxograma estudo de compatibilidade térmica



Para o estudo de compatibilidade utilizou-se a metodologia descrita nos itens 4.2.1 para as análises de IV-FT, as curvas de DSC, DSC-fotovisual e TG foram utilizados as metodologias descritas nos itens 4.5.1 e 4.5.2, 4.5.3 respectivamente, onde foram utilizados $2,0 \pm 0,1\text{mg}$ da mistura física, razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ e atmosfera de nitrogênio com fluxo de $50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$, para as três técnicas termoanalíticas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação química do LPSF/GQ-238

As técnicas espectroscópicas são largamente utilizadas para a identificação e elucidação estrutural de compostos orgânicos (FERMINO et al., 2015), a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV) e a ressonância magnética nuclear (RMN) destacam-se por ser técnicas, rápidas, fáceis e confiáveis.

Oliveira et al. (2015) descreveu a síntese e a elucidação da estrutura química, do LPSF/GQ-238, em seus trabalhos com derivados indólico-tiazolidínico. A tabela 8 mostra os valores de número de onda (cm^{-1}) obtidos neste trabalho. Esses resultados são importantes tanto na elucidação da estrutura química quanto para comprovar a reprodutibilidade e seletividade da rota sintética na produção do LPSF/GQ-238.

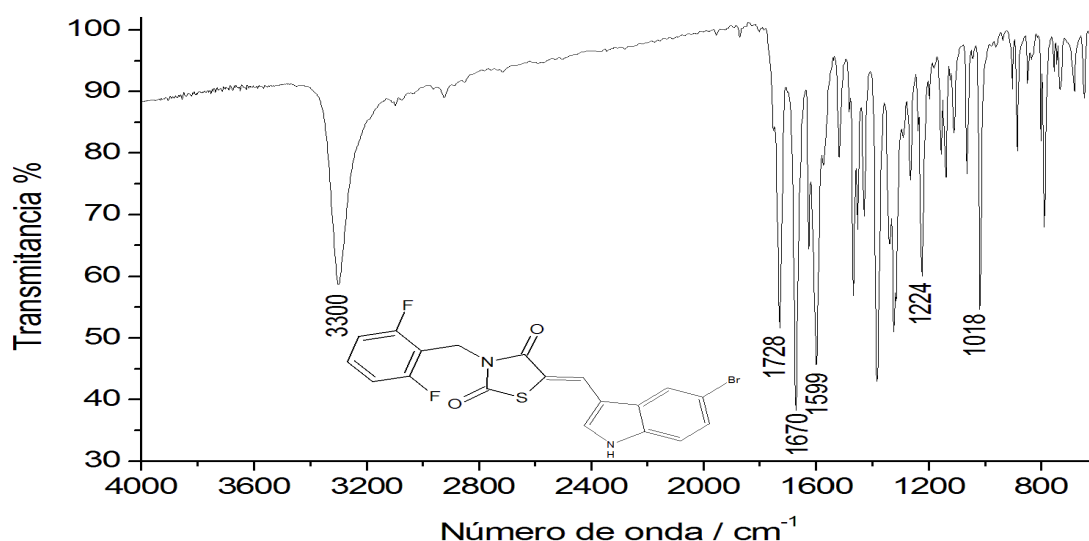
Tabela 8 - Valores obtidos de número de onda utilizando IV-TF do LPSF/GQ-238

Grupos químicos	PLSF/GQ-238 (lote 01)	PLSF/GQ-238*
N-H	3300 (cm^{-1})	3297 (cm^{-1})
C=O	1670 e 1728 (cm^{-1})	1669 e 1728 (cm^{-1})
C=C	1599 (cm^{-1})	1598 (cm^{-1})

Fonte: *Adaptado de Oliveira et al., 2015.

O espectro na região do IV do LPSF/GQ-238 (Figura 7) apresenta bandas de estiramento típicas de amina secundária (N-H) com número de onda de 3300 cm^{-1} , bandas referentes ao estiramento do (C=O) que absorvem nos números de onda de 1728 e 1670 cm^{-1} , banda de estiramento do grupo vinílico C=C em 1598 cm^{-1} . A presença dos haletos de arila é confirmada pelas absorções em 1224 e 1018 cm^{-1} referentes ao fluoreto e brometo de arila, respectivamente.

Figura 7 - Espectro infravermelho do LPSF/GQ-238 obtidos por sedimentação em KBr.



As atribuições dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , feitas para o composto obtido, basearam-se nos dados obtidos em dois experimentos de RMN, tais como: RMN ^1H e ^{13}C (APT), o resultado foi comparado ao obtido por Oliveira et al. (2015).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) 11,92 (s, 1H, N-H), 8,17 (d, 2H, indol, $J=11,6$ Hz), 7,80 (s, 1H, =C-), 7,45 (d, 1H, indol, $J=8,4$ Hz), 7,4 (t, 1H, benzil, $J=8$ Hz), 7,35 (d, 1H, indol, $J=8$ Hz), 7,08 (t, 2H, Ar, $J=8$ Hz); 4,9 (s, 2H, CH₂), Rmn ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6): 166,21(1C_q); 164,6(1C_q); 162,19(1C_q); 159,72(1C_q); 134,95(1C_q); 130,56(1C_t); 130,08(1C_t); 128,61(2C_q); 125,76(1C_t); 121,13(1C_t); 114,35(1C_q); 113,96(1C_t); 113,86(1C_t); 111,70(1C_t); 111,45(1C_t); 110,90(1C_q); 110,07(1C_q); 33,48(1C_s)

Os resultados mostraram pequenos deslocamentos nos valores de absorção no espectro, mas os valores estão dentro da faixa do deslocamento, concluindo que o LPSF/GQ-238 apresenta a mesma estrutura do composto sintetizado por Oliveira et al. (2015).

5.2 Estudo de solubilidade segundo a Farmacopéia Brasileira

O estudo de solubilidade segundo a farmacopéia prevê a solubilidade do fármaco nos diferentes solventes analisados, de modo a auxiliar na tomada de decisões e orienta na escolha das diferentes técnicas e processos que poderão ser utilizados no desenvolvimento e caracterização, considerando suas limitações. O LPSF/GQ-238 mostrou-se insolúvel em hexano, água e meios aquosos com diferente faixas de pH (Tabela 9), pouco solúvel em acetonitrila e acetato de etila, devido a NEQ apresentar melhor solubilidade em acetonitrila em relação a outros solventes comumente utilizados em CLAE (água, solução tampão, metanol, etanol) esse solvente foi escolhido como diluente do LPSF/GQ-238 na validação do método analítico.

Tabela 9 - Classificação da solubilidade do LPSF/GQ-238 segundo a FB em diferentes solventes

Solvente	Volume de solubilização	Classificação*
Água destilada	Mais de 10.000 partes	Insolúvel
Etanol	De 1.000 a 10.000 partes	Muito pouco solúvel
Metanol	De 1.000 a 10.000 partes	Muito pouco solúvel
Acetonitrila	De 100 a 1.000 partes	Pouco solúvel
Acetato de etila	De 100 a 1.000 partes	Pouco solúvel
Eter etílico	De 1.000 a 10.000 partes	Muito pouco solúvel
Hexano	Mais de 10.000 partes	Insolúvel
HCl 0,1M (pH 1)	Mais de 10.000 partes	Insolúvel
Tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,8)	Mais de 10.000 partes	Insolúvel
NaOH 0,1M (pH 12)	Mais de 10.000 partes	Insolúvel

Legenda: *segundo a Tabela 2

5.3 Validação de método analítico

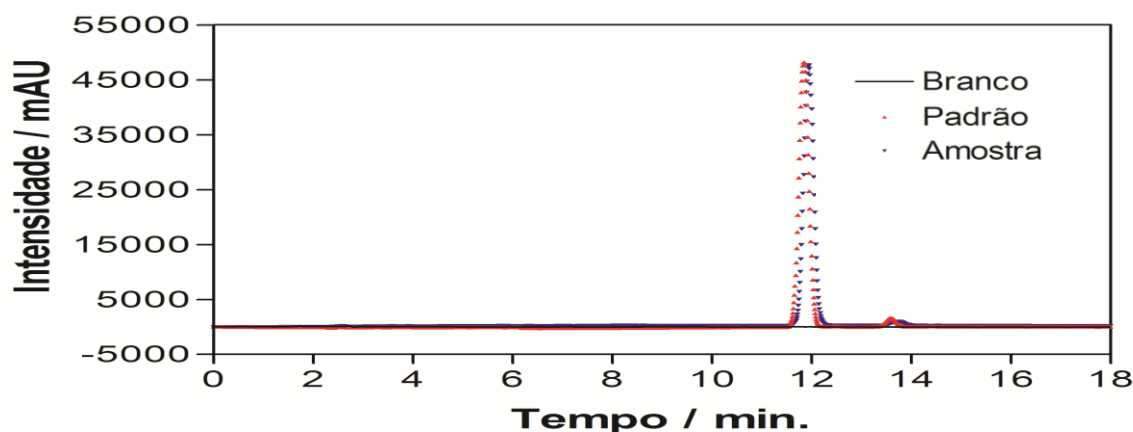
A validação de método analítico tem papel fundamental no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, pois tem a função de garantir que o método utilizado para a análise quali e/ou quantitativa seja específico, seletivo, possua boa

precisão e exatidão nas quantificações e seja um método robusto, estas características dependem da função a que se destina. A validação segundo a RE: 899/2003 é realizada, principalmente, para produtos que não possui métodos analíticos descritos em compêndios oficiais, como é o caso do LPSF/GQ-238.

5.3.1 Especificidade e seletividade

A especificidade do método consistiu da análise buscando avaliar possíveis interferentes presentes na solução amostra e na solução diluente. Não foi observado nenhum pico interferente na solução diluente (branco) com o pico do LPSF/GQ-238, quando se comparou os cromatogramas obtidos das soluções padrão e amostra (Figura 8), é possível observar sobreposição de picos com intensidade semelhantes em aproximadamente 11,90 min e um pequeno pico de impureza em 13,70 min nas soluções amostra e padrão. A especificidade foi comprovada por análises de pureza de pico realizadas em Detector com arranjo de diodo (DAD).

Figura 8 - Cromatogramas do branco, solução padrão e solução amostra a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a 379 nm.



Há pureza de pico das soluções amostra e padrão através do DAD não foram observados sinais de impurezas co-eluídas junto a NEQ com valor de pico de pureza igual a 1,00.

5.3.2 Linearidade

Segundo a resolução supracitada a linearidade deve ser capaz de estabelecer uma relação diretamente proporcional entre sinal analítico *versus* concentração.

As curvas de calibração foram construídas utilizando sete pontos, com níveis de concentração de 10, 40, 70, 100, 130, 160 e 190%. Tomou-se a concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do LPSF/GQ-238 como a concentração correspondente a 100% da curva de linearidade.

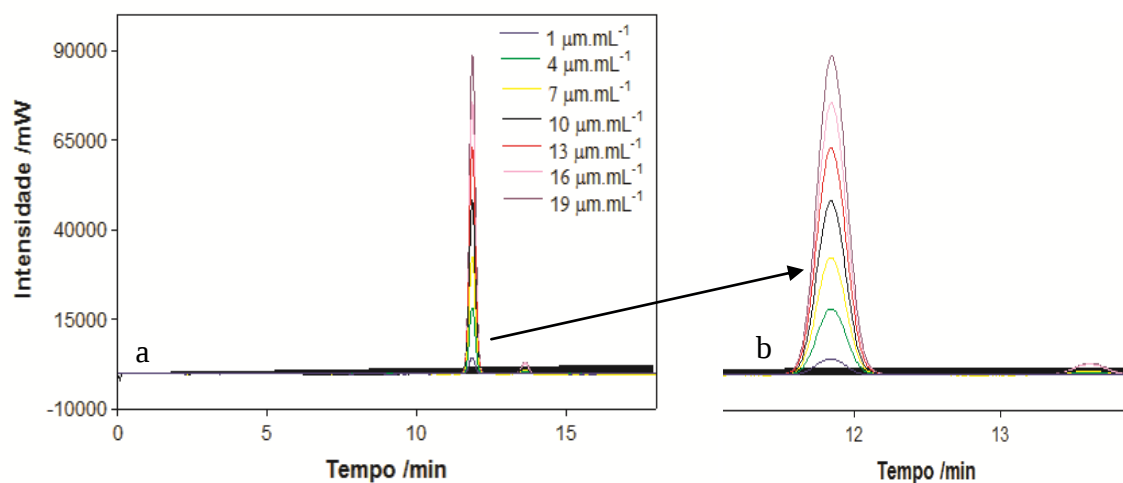
Este procedimento foi realizado em triplicata para cada um dos sete níveis analisados. As curvas obtidas demonstraram que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do marcador na amostra, como mostrado na tabela 10 e figura 11.

Tabela 10 - Áreas relativas as curvas de calibração obtidas no estudo de linearidade.

<u>Concentração</u>		<u>Curvas</u>			Curva Média ¹	CV%	* valor p
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	%	1	2	3			
1	10	64309	64273	64632	64404,70	0,31	1,00
4	40	264487	264786	264977	264750,00	0,09	
7	70	472835	473518	473635	473329,33	0,09	
10	100	686453	687484	687094	687010,33	0,08	
13	130	917871	917521	918855	918082,33	0,08	
16	160	1096552	1096658	1098103	1097104,33	0,08	
19	190	1288892	1287726	1289686	1288768,00	0,08	

Legenda: ¹Média das três curvas da linearidade; * Diferença estatisticamente significativa para valor $p \leq 0,05$.

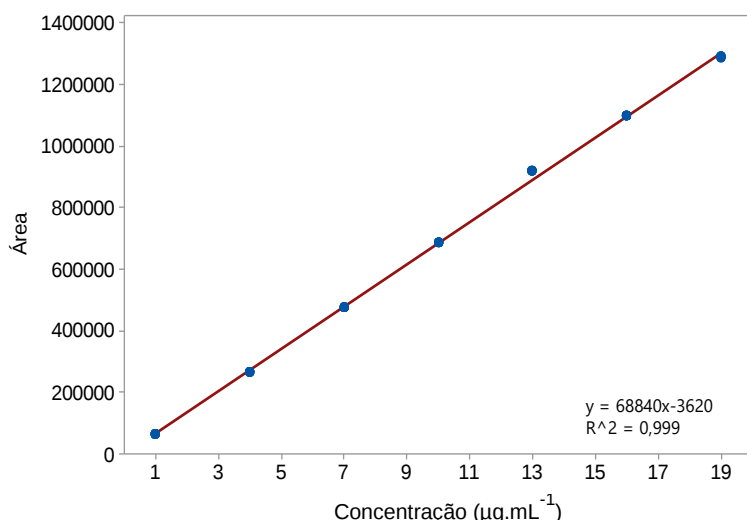
Figura 9 - Cromatograma das diferentes concentrações do LPSF/GQ-238 no estudo de linearidade.



Legenda: Cromatogramas das diferentes concentrações do LPSF/GQ-238, a - na faixa de 1 -18 min, b – na faixa de 11 a 14 min.

A figura 12 mostra a curva da média da linearidade, onde a equação de regressão linear da curva foi $y = 68840x - 3620$ com coeficiente de correlação (R^2) da linearidade igual a 0,999 e está dentro do critério preconizado na resolução supracitada ($R^2 \geq 0,99$).

Figura 10 - Linearidade obtida com faixa determinada de 10-190% para curva de calibração (Curva média).



O gráfico de resíduo (Figura 13) mostra uma distribuição normal dos valores. Conclui-se que 99,91% da variação de área pode ser explicada pelo modelo de regressão e existe correlação positiva significativa, valor de F crítico (4,38) foi menor que o F calculado (21797,56), significando que quando a concentração aumenta a área tende a aumentar, como mostrado na figura 14.

Figura 11 - Gráfico de resíduo.

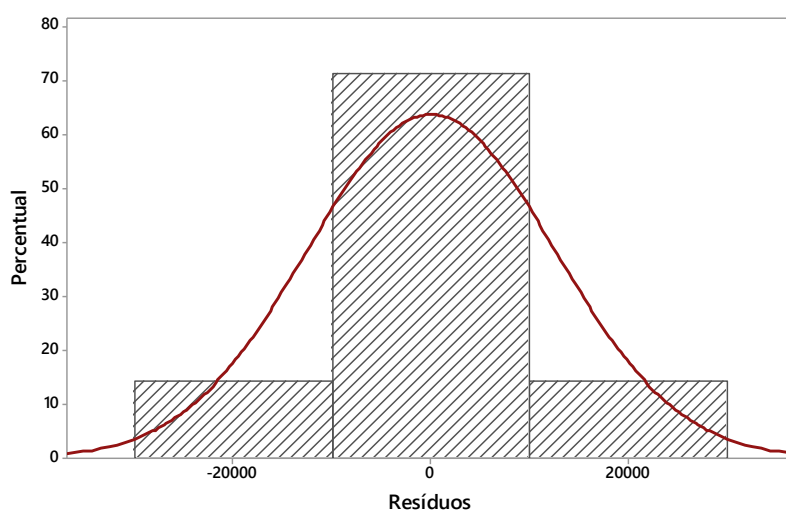
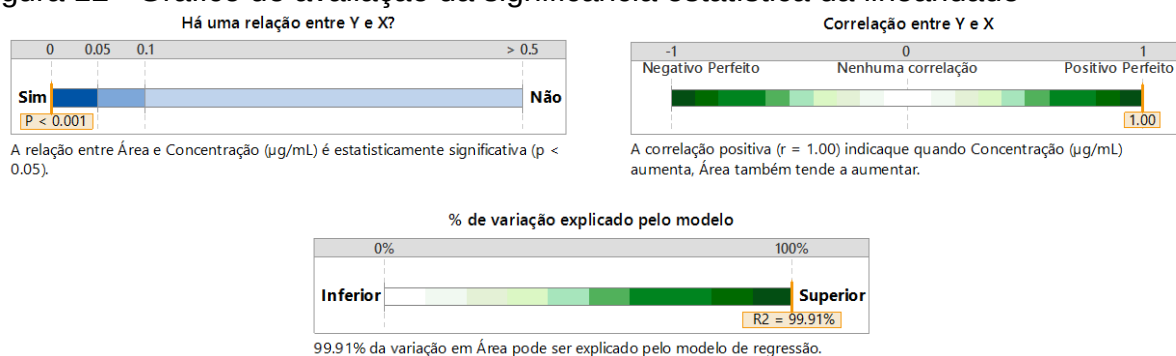


Figura 12 - Gráfico de avaliação da significância estatística da linearidade



A análise estatística dos dados das três curvas através da ANOVA fator único não mostrou diferença estatística significativa entre elas considerando os valores de F crítico (3,55) são maiores que os valores de F calculado ($6,77 \times 10^{-6}$) e nível de significância de 95%.

5.3.3 Limite de Quantificação e Limite de Detecção

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas. Já o limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado.

A partir dos valores da curva de calibração os limites de quantificação e detecção foram calculados e obteve-se valores de 1,86 e $0,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

5.3.4 Intervalo

O intervalo é a faixa de trabalho onde a amostra apresenta boa precisão e exatidão, neste trabalho o intervalo foi definido entre 2 a $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.3.5 Precisão

5.3.5.1 Repetibilidade (Precisão intra-corrida)

Repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Para avaliar a precisão intra-corrida foram feitas 6 corridas na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%), considerando um desvio padrão relativo de no máximo 5%. Os resultados encontram-se na tabela 11.

5.3.5.2 Precisão Intermediária (Precisão inter-corridas)

Precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Foram realizadas 12 injeções na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, analisando o pico cromatográfico do LPSF/GQ-238. A precisão intermediária foi realizada em dias e por analistas diferentes. Onde a concentração da solução amostra em dias diferentes mostrou-se superior a $9,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 11) confirmando boa precisão do método analítico. Segundo análise estatística ANOVA não houve variação significativa entre os dados considerando um nível de confiança de 95%, valor p igual a 0,67.

Tabela 11 - Repetibilidade e precisão intermediária.

Dia	¹ Repetibilidade				² Precisão intermediária		
	Área	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	**0%	CV%	**0%	CV%	*Valor-p
1	682763,50	9,97	99,71	2,19	99,06	1,62	0,67
2	681842,67	9,93	99,28	0,99			

Legenda: *Valores estatisticamente significativos para valor-p $\leq 0,05$ (n = 12). ** Valores percentuais calculados em relação a concentração teórica de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. ¹Valores médios obtidos a partir de n = 6 em cada dia. ²Valor médio obtido a partir de n = 12.

5.3.6 Exatidão

Exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão do método analítico foi avaliada através da análise em três concentrações: baixa, média e alta, referentes aos valores de 20, 100 e 180% à concentração obtida na precisão. As amostras foram preparadas em triplicata e os resultados obtidos são mostrados na tabela 12, onde é possível visualizar que o método tem exatidão, com erro padrão relativo entre 0,84 e 2,88, e que não houve diferença estatisticamente significativa na recuperação entre os diferentes níveis (valor $p = 0,06$), como nível de confiança de 95%.

Tabela 12 - Exatidão em três diferentes níveis.

Concentração teórica		Área	¹ Concentração experimental		CV%	EPR	*Valor-p
$\mu\text{g mL}^{-1}$	%		$\mu\text{g mL}^{-1}$	**%			
2	20	133792,7	1,94	97,12	0,46	2,88	
10	100	682997,3	9,92	99,16	1,30	0,84	0,06
18	180	1227639	17,82	99,02	0,74	0,98	

Legenda: *Valores estatisticamente significativos para valor- $p \leq 0,05$ ($n = 9$). **Valores percentuais calculados em relação a concentração teórica. ¹Valores médios obtidos a partir de $n = 3$

5.3.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Os parâmetros monitorados foram temperatura, fluxo da fase móvel e proporção da fase móvel. Investigaram-se variações no teor do LPSF/GQ-238 em função da área do pico cromatográfico. As avaliações foram realizadas em uma sequência de três corridas nas condições cromatográficas estabelecidas no método e levou-se em consideração na análise estatística do parâmetro robustez, mostrado na tabela 13.

Para determinar a concentração percentual da NEQ presente na amostra, tomou-se como concentração teórica o valor de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 13 - Dados para avaliação da robustez considerando proporção da fase móvel, fluxo da fase móvel e temperatura de acondicionamento da coluna cromatográfica

Condição	Tempo	¹ Concentração		**IC 95%	CV%	*Valor p
		$\mu\text{g.mL}^{-1}$	%			
Injeção	² Tempo 0 h	11,90	9,92	99,16	(95.9; 102.4)	1,30
	Tempo 24 h	11,86	9,80	97,99	(95.9;100.1)	0,88
Fluxo	0,9 mL.min ⁻¹	13,14	9,79	97,93	(95.9;99.9)	0,82
	1,1 mL.min ⁻¹	10,82	9,74	97,41	(94.4;100.5)	1,26
Temperatura	38 °C	12.22	9,91	99,14	(95.1;103.2)	1,63
	42 °C	11.60	9,79	97,95	(97.8;98.1)	0,08
Fase Móvel (ACN:Água)	58:42	15,04	9,79	97,87	(97.6;98.1)	0,10
	62:38	10,24	9,72	97,21	(94.6;99.8)	1,07

Legenda: *Valores estatisticamente significativos para valor-p $\leq 0,05$ (n = 3).**Intervalo de Confiança 95%,¹Valores de concentração percentuais calculados em relação a concentração do padrão nas mesmas condições da amostra. ¹Valores médios obtidos a partir de n = 3, ²Paramentos fase móvel (ACN:água 60:40), temperatura do forno 40 °C, e fluxo da fase móvel 1,0 mL.min⁻¹.

A Estabilidade foi realizada analisando-se injeções nos tempos zero e 24 horas de preparo. Os dados de estabilidade mostram que até 24 horas a amostra apresentou estabilidade mantendo-se a temperatura ambiente, ao abrigo da luz e que a variação obtida se mostrou satisfatória.

Segundo a análise estatística ANOVA não houve variação significativa entre os dados considerando a um nível de significância de 95%.

5.4 Estudos térmicos

5.4.1 DSC e DSC-fotovisual

A análise da curva de DSC do LPSF/GQ-238 na razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ mostrou um pico endotérmico na faixa de $272,48 \pm 0,28$ °C com entalpia de $78,31 \pm 4,31$ J.g⁻¹, referente à fusão do composto.

A análise das curvas DSC do LPSF/GQ-238, nas razões de aquecimento 2, 5, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹ foi possível observar um único processo endotérmico no intervalo 25-300 °C, correspondentes ao processo de fusão da molécula, os quais

apresentaram alargamento com o aumento da razão de aquecimento devido ao relaxamento térmico como mostrada na figura 15 e tabela 14.

Figura 13 - Curvas DSC, nas razões de 2, 5, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹ do LPSF/GQ-238.

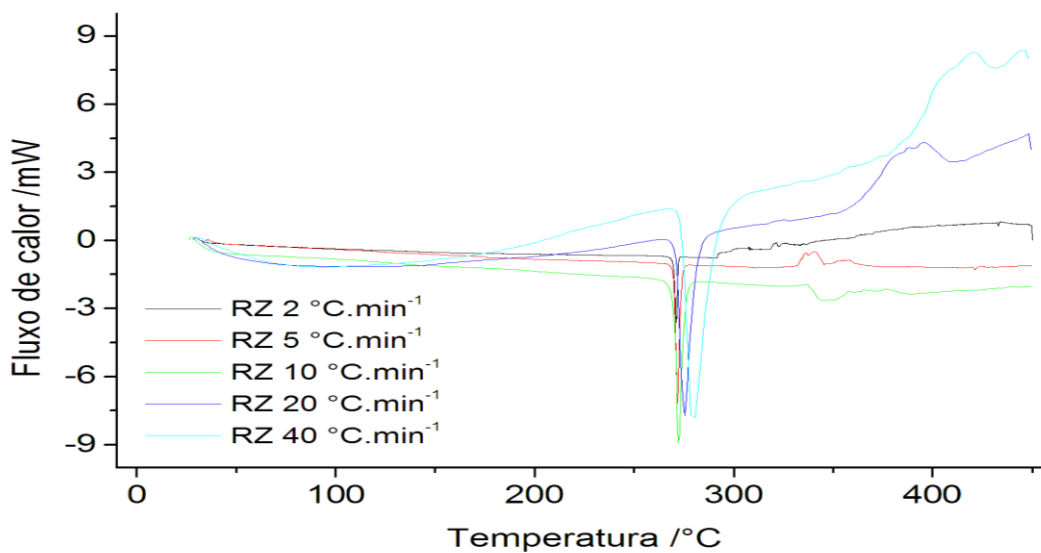


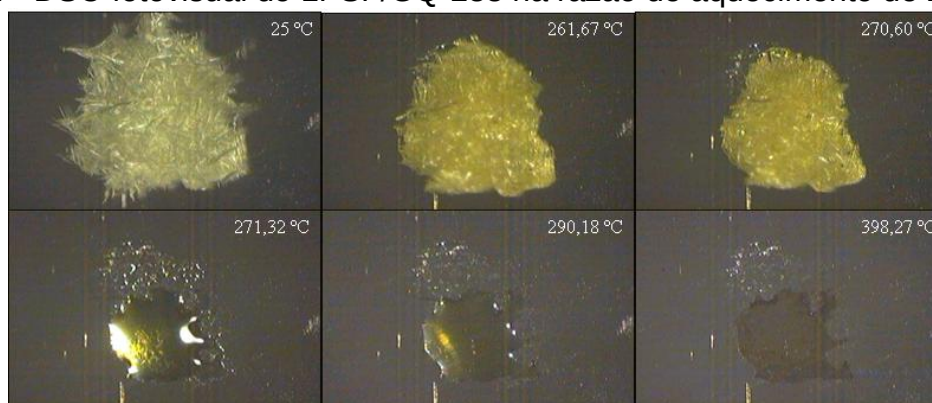
Tabela 14 - Valores de T_{onset} , T_{endset} , T_{pico} , pureza, entalpia e valor de compensação do LPSF/GQ-238 em diferentes razões de aquecimento.

Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$)	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{endset} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{pico} ($^{\circ}\text{C}$)	Entalpia ($\text{J}.\text{g}^{-1}$)	Pureza (%)	Compensação value (%)
2	267,30	272,85	271,43	73,79	99,52	11,80
5	267,64	275,79	271,44	82,92	99,50	13,30
10	265,35	279,70	272,48	78,31	98,65	16,24
20	265,81	289,35	275,09	71,93	98,35	19,21
40	268,39	300,56	278,98	71,57	96,99	28,18

Na presença de pequena quantidade de impurezas ocorre diminuição do ponto de fusão e alargamento do pico de fusão da amostra. A pureza da NEQ foi calculada utilizando a equação de Van't Hoff obtendo pureza de $99,52 \pm 0,03$ % na razão de $2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

A figura 16 mostra as fotos obtidas no DSC-fotovisual na razão de aquecimento de $2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ onde as faixas de temperatura de fusão do DSC convencional estão de acordo aos eventos térmicos visualizados no DSC-fotovisual. Foram observadas mudanças de coloração do LPSF/GQ-238 com o aumento da temperatura, a análise no DSC-fotovisual nas diferentes razões de aquecimento estudadas 2, 5, $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ não mostraram diferenças significativas entre as diferentes razões de aquecimento na comparação com a DSC convencional.

Figura 14 - DSC-fotovisual do LPSF/GQ-238 na razão de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$

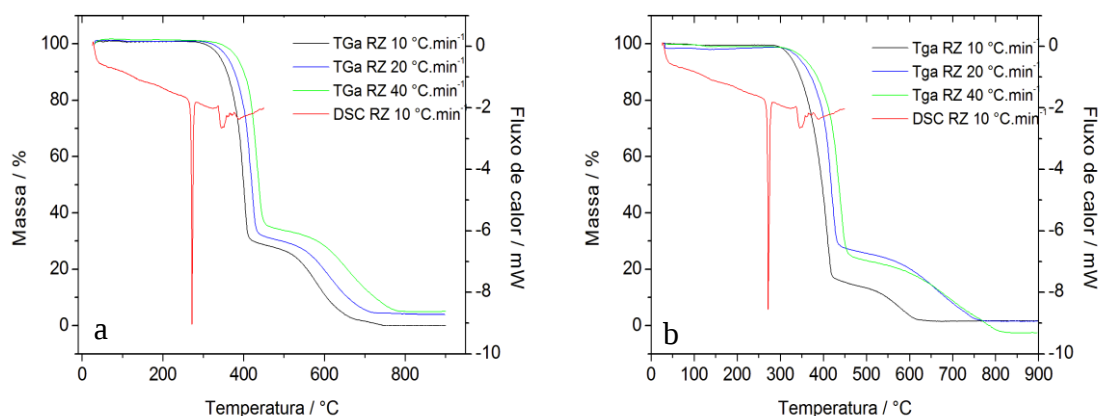


5.4.2 Termogravimetria

As curvas termogravimétricas dinâmicas do LPSF/GQ-238, em atmosfera Oxidativa (ar sintético) nas razões de aquecimento de 10, 20 e $40\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ (Figura 17-a) mostram comportamento semelhante entre as razões de aquecimento, a NEQ mostrou-se estável até $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ nas diferentes razões de aquecimento estudadas nesta atmosfera, nas razões de aquecimento são verificadas duas etapas consecutivas de perda de massa em todas as razões estudadas (Tabela 15).

As curvas termogravimétricas dinâmicas do LPSF/GQ-238, em atmosfera Inerte (N_2) nas razões de aquecimento de 10, 20 e $40\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ (Figura 17-b) mostram comportamento semelhante entre as razões de aquecimento, nestas condições a NEQ mostrou-se estável até $274\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nas razões de aquecimento são verificadas duas etapas consecutivas de perda de massa em todas as razões estudadas, semelhantes à condição oxidativa, as faixas de degradação nas duas temperaturas mantiveram-se próximas, como mostrado na tabela 15, em atmosfera oxidativa e inerte foi possível observar uma maior perda de massa na razão de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ provavelmente, devido à menor velocidade de aquecimento não favorecer rearranjos/reações entre as moléculas da NEQ.

Figura 15 - Curva termogravimétrica dinâmicas do LPSF/GQ-238.



Legenda: a - em atmosfera oxidativa (ar sintético), b - em atmosfera inerte (N_2), ambas as TGs foram realizadas nas razões de aquecimento de 10, 20 e 40 $^{\circ}C.min^{-1}$ e DSC na razão de aquecimento de 10 $^{\circ}C.min^{-1}$.

Tabela 15 - Dados do perfil de degradação do LPSF/GQ-238 em atmosfera inerte e oxidativa.

Razão de aquecimento ($^{\circ}C.min^{-1}$)	1° etapa			2° etapa		
	Onset ($^{\circ}C$)	Endset ($^{\circ}C$)	$\Delta m\%$	Onset ($^{\circ}C$)	Endset ($^{\circ}C$)	$\Delta m\%$
10 _{Ox}	377,63	410,51	70,27	542,04	642,55	30,86
10 _{In}	374,74	417,94	82,92	546,10	609,79	12,51
20 _{Ox}	392,40	425,98	66,26	573,26	704,32	25,36
20 _{In}	402,16	427,74	72,14	581,71	725,30	23,20
40 _{Ox}	416,66	449,43	64,52	579,64	719,77	23,41
40 _{In}	408,34	451,24	71,75	609,10	784,85	22,51

Legenda: Ox- atmosfera oxidativa (ar sintético), In – atmosfera inerte,

O estudo da cinética é uma das mais importantes aplicações da análise térmica uma vez que proporciona o conhecimento dos parâmetros cinéticos, mecanismos e modelos matemáticos associados ao processo de decomposição térmica (MOTHÉ, DE MIRANDA, 2013). Para Vyazovkin et al. (2011) a melhor

maneira de obter adequadamente os modelos cinéticos é através da combinação de experimentos isotérmicos e não isotérmicos. Dentre os estudos de caracterização no estado sólido, a determinação dos parâmetros cinéticos é essencial para conhecer a estabilidade das substâncias em estudo. Estes objetivam determinar o mecanismo de reação de decomposição e calcular os parâmetros da equação de Arrhenius (energia de ativação (E_a), fator pré-exponencial (A) e ordem de reação (n)) utilizando análise térmica (TITA et al., 2008). Dentre os modelos cinéticos, os isoconvencionais, como os modelos de Ozawa e Kissenger e Friedman são bastante utilizados para o cálculo do tripleto cinético de diversos fármacos, estes métodos isoconvencionais que avaliam a energia de ativação são vantajosos, uma vez que não requer o conhecimento da forma analítica da função de conversão e dão a possibilidade de evidenciar a variação da energia de ativação com o grau de conversão (FULIAS et al., 2013), outra vantagem desse método é a utilização de dados não-isotérmicos (dinâmicos) para os cálculos, sendo esses dados obtidos de forma mais rápida que os isotérmicos, também nas curvas TG dinâmicas é possível evidenciar a temperatura inicial e a quantidade de etapas de degradação das substâncias dados de difícil obtenção por isoterma.

Segundo Tita et al. (2013) os valores da energia de ativação podem ser utilizados no controle de qualidade de medicamentos, visando melhorar o produto final e determinar a qualidade de medicamentos através dos parâmetros tecnológicos. Portanto, o estudo cinético pode ser uma alternativa rápida e/ou um método complementar para estimar o tempo de conservação de medicamentos.

Os dados da TG dinâmica nas atmosferas O_2 e N_2 (Tabela 16) foram utilizados para calcular os parâmetros cinéticos utilizando o modelo de Ozawa (MACEDO e NASCIMENTO, 2002; GOMES et al., 2007).

Tabela 16 - Dados cinéticos isotérmicos e não isotérmicos do LPSF/GQ-238

Parâmetros cinéticos	Dinâmica		Isotérmica
	Ozawa		Arrhenius
	N ₂	Ar sintético	Ar sintético
Ea (kJ/mol)	119,93	144,67	191,45
A (min. ⁻¹)	2,56E+08	2,87E+10	2,91E+11
Ordem de reação (n)	0	0	0

Os dados da TG isotérmica foram utilizados para determinar os parâmetros cinéticos utilizando a equação de Arrhenius. A ordem de reação foi obtida pelo método gráfico e sua correlação linear apresentou valores similares para zero, primeira e segunda ordem, a definição sobre a ordem de reação de decomposição térmica do LPSF/GQ-238 foi resultante da comparação entre os parâmetros obtidos através dos dados da TG dinâmica e TG isotérmica após comparação dos valores obtidos com os modelos de Arrhenius e de Ozawa. A ordem escolhida foi à reação de ordem zero.

No estudo de estabilidade térmica a constante de velocidade (K) consiste do parâmetro utilizado diretamente na determinação do tempo de estabilidade de um fármaco. Entre os diferentes modelos cinéticos aplicados na correlação do método termogravimétrico e o método convencional, o modelo de Arrhenius tem sido proposto como o que mais se aproxima dos valores reais obtidos no estudo de estabilidade de longa duração. Os dados calculados a partir da TG isotérmicos da NEQ nas temperaturas de 255, 265, 275, 285 e 295 °C, na qual a ordem zero foi melhor definida pelo modelo de Ozawa, visto que os valores dos coeficientes de correlação calculados utilizando a equação de Arrhenius apresentou um baixo poder discriminante com r^2 maior que 0,99 em todas as ordens de reação estudadas. Os valores k_0 mostraram modelagem matemática com uma boa correlação nas funções exponencial, potencial e polinomial com r^2 maior que 0,99. Os resultados evidenciam que a NEQ apresenta um comportamento cinético característico de uma substância com elevada estabilidade térmica, com valores k_0 mínimo e máximo de $1,90 \times 10^{-6}$ a $4,08 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ na faixa de temperatura 255 a 295 °C.

A Tabela 17 mostra os valores da K nas temperaturas estudadas e o coeficiente de correlação linear, utilizando o gráfico de arrhenius, $\ln K \text{ (s}^{-1}\text{)}$ versus $1/T(K)$, a energia de ativação aparente (E_a) e o fator pré-exponencial (A), foram calculados através da regressão linear do gráfico ($y = ax + b$), onde “a” é igual ao coeficiente angular da reta, o valor de E_a foi obtido pela multiplicação de “a” pela constante universal dos gases ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) e A é igual a interseção da reta (ALVES et al., 2010; TITA et al., 2013). Os valores de E_a e A estão representados na Tabela 16.

Figura 16 - Curvas TG isoterma em atmosfera oxidativa.

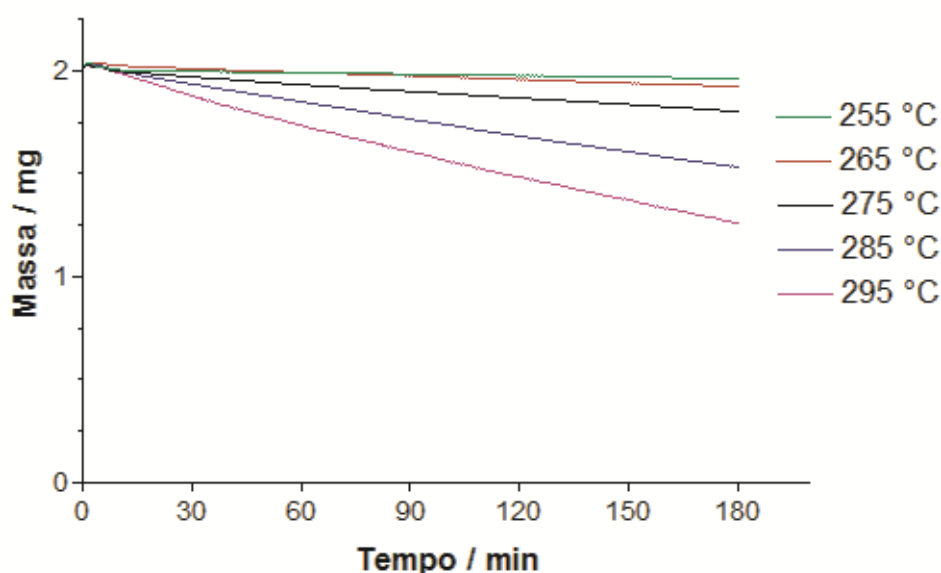


Tabela 17 - Valores de K para as temperaturas de decomposição isotérmica.

Constante Arrhenius (s^{-1})	Temperaturas isotermas ($^{\circ}\text{C}$)					$*R^2$
	255	265	275	285	295	
K_0	1,90E-06	4,91E-06	9,15E-06	2,30E-05	4,08E-05	$0,9974 \pm 0,00168$
K_1	2,76E-06	7,11E-06	1,40E-05	3,74E-05	7,36E-05	$0,9975 \pm 0,00173$
K_2	1,93E-06	5,09E-06	9,85E-06	2,83E-05	5,98E-05	$0,9965 \pm 0,00259$

Legenda: *n=3.

5.5 Pirólise acoplada a CG/EM

Algumas substâncias químicas podem apresentar mecanismos de degradação térmicos complexos, que podem estar relacionados, aos grupos químicos presentes nas moléculas, tipos de ligações e interações intermoleculares.

A Pir-CG/EM pode ser utilizada como uma ferramenta rápida e confiável no acompanhamento da síntese de compostos, visto que, durante a síntese química alguns intermediários químicos/reagentes podem não ser consumidos totalmente e virem a precipitar junto ao fármaco, além disso, o detector de massa consegue diferenciar os compostos volatilizados a partir do espectro de massas do composto, formando diferentes padrões de quebras mesmo em composto de massas semelhantes, essa técnica também apresenta outras vantagens como observado por Dongsowan et al. (2008) a análise por Pir-CG/EM evita erros de preparação de amostra, pois estas são diretamente adicionadas no pirolisador, além disso evita reações indesejadas a partir de agentes de derivação caros, os quais são normalmente usados no tratamento de amostras antes da análise por CG/EM, por exemplo.

Os pirogramas obtidos do LPSF/GQ-238 nas diferentes temperaturas estudadas (Figura 19) e os espectros de massas dos compostos descritos neste trabalho encontram-se no Apêndice. Na temperatura de 450 °C correspondente a primeira etapa de decomposição térmica dinâmica, a ocorrência de diversos fragmentos da molécula, onde os três picos majoritários são 169, 267 e 243 m/z. Na temperatura de 650 °C, correspondendo à segunda etapa de decomposição térmica na curva TG dinâmica, pode ser observado a presença de diversos fragmentos, onde os picos majoritários nessa temperatura são 169 e 243 m/z semelhante a temperatura de 450 °C (Tabela 18), observa-se a presença de outros picos ausentes em 450 °C com m/z de 252, 210, 251, além de novos compostos formados foi observado o íon molecular correspondente ao LPSF/GQ-238 em 21,15 min com 448 m/z indicando que o LPSF/GQ-238 não foi totalmente decomposto nas temperaturas utilizadas neste trabalho.

Os espectros de massa obtidos para o LPSF/GQ-238 foram comparados aos dados espectrais disponíveis na biblioteca WILEY229 do equipamento, onde não foi possível identificar os compostos formados pela degradação do LPSF/GQ-238 através dessa ferramenta. Assim o mesmo procedimento foi realizado nos

intermediários da síntese química do LPSF/GQ-238 para identificar quais os possíveis produtos formados pela degradação visando correlacionar os produtos formados pela pirólise do LPSF/GQ-238 e seus intermediários, nas mesmas condições de análise.

Figura 17 - Pirogramas do LPSF/GQ-238 à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.

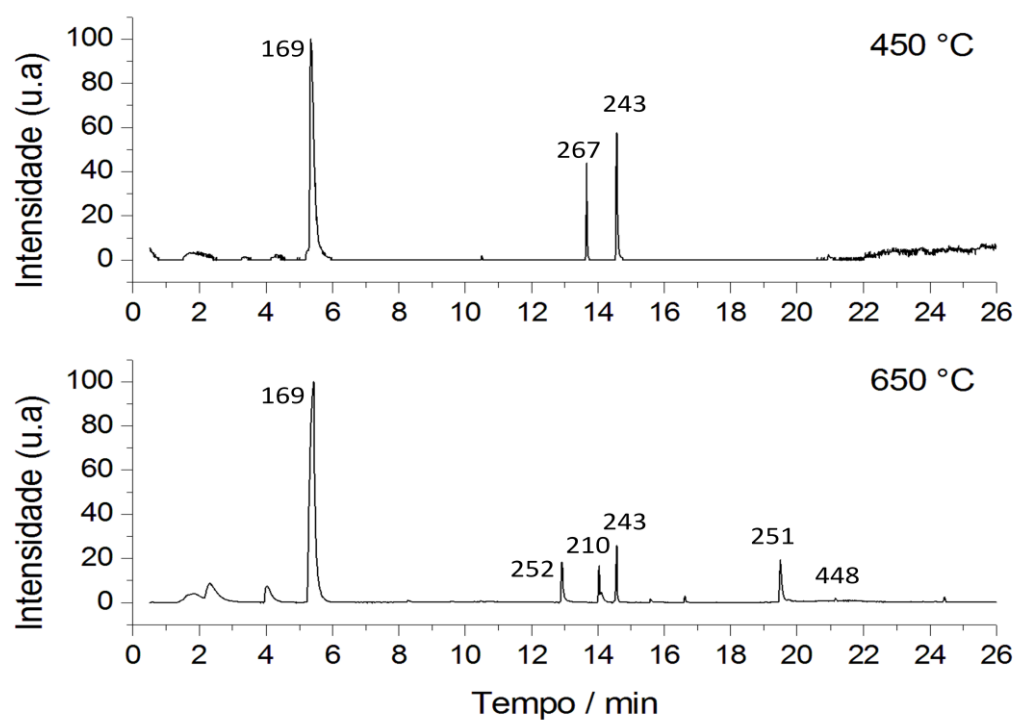


Tabela 18 - Valores de tempo de retenção e relação massa:carga dos produtos formados por quebra ou volatilização da LPSF/GQ-238 à 450 e 650 °C.

Tempo de retenção (min)	450 °C	650 °C
	Relação massa: carga (m/z)	Relação massa: carga (m/z)
1,32	60	60
1,49	76	76
2,40	127	127
4,02	139	139
5,22	169	169
10,31	254	-
13,50	267	-
14,04	-	210
14,59	243	243
19,52	-	251
21,15	-	448

A análise da degradação do TZD (Figura 20 e Tabela 19), produto final da primeira etapa de síntese, através da pirólise a 450 °C evidenciou a ocorrência de três picos: o majoritário com 117 m/z, correspondendo ao TZD, e dois outros com 60 e 76 m/z correspondentes a degradação de fração da molécula inicial. Na temperatura de 650 °C temos a decomposição total do TZD sendo majoritários os picos com 60 e 76 m/z, também presentes na temperatura de 450 °C, e aparecendo dois novos com 84 e 124 m/z, os quais podem ser derivados de rearranjos químicos favorecidos pela alta temperatura que se realizou o experimento.

Figura 18 - Pirogramas do TZD à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.

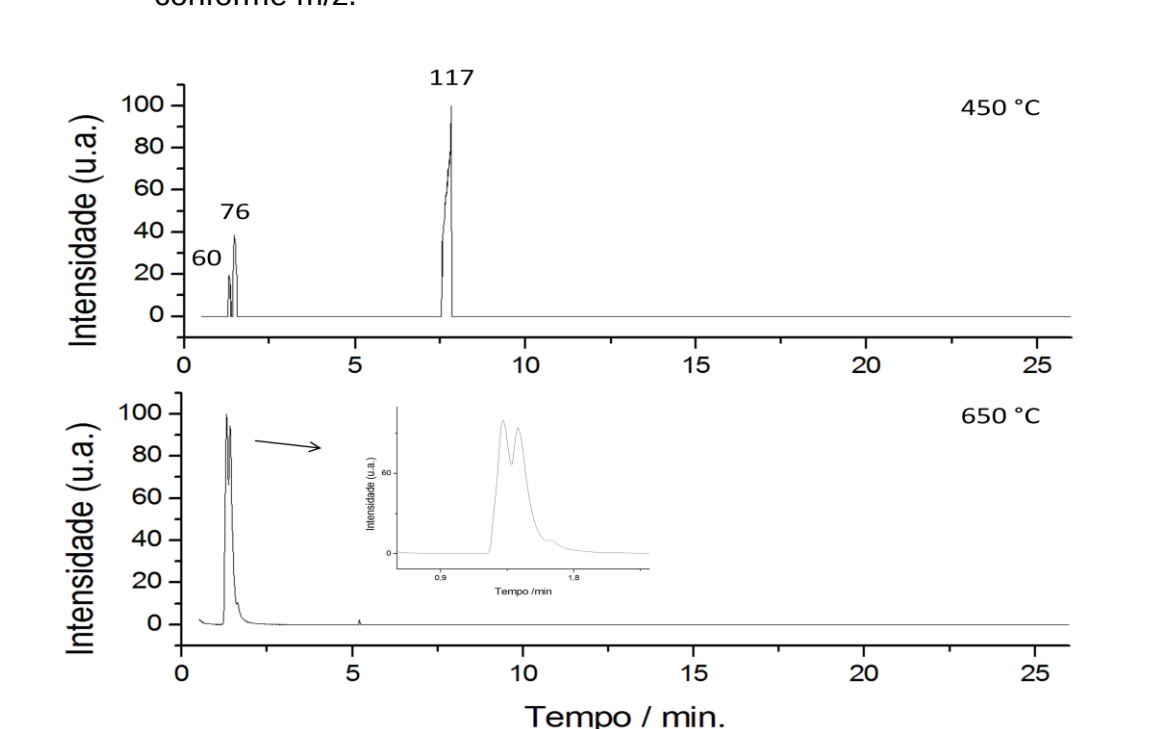


Tabela 19 - Valores de tempo de retenção e relação massa:carga dos produtos formados por quebra ou volatilização da tiazolidina (TZD) à 450 e 650 °C

Tempo de retenção (min)	450 °C	650 °C
	Relação massa: carga (m/z)	Relação massa: carga (m/z)
1,32	60	60
1,49	76	76
1,91	-	84
5,20	-	124
7,74	117	-

A análise o LPSF/GQ-175 (Figura 21 e Tabela 20) produto final da segunda etapa de síntese, através da pirólise a 450 °C o pico em 14,59 min com 243 m/z corresponde ao composto analisado, observou-se dois outros picos de baixa intensidade com m/z de 60 e 169. A pirólise a 650 °C ocorreu a formação de novos fragmentos onde o picos majoritários foram 169 e 243 m/z, como o LPSF/GQ-175 possui em sua estrutura a molécula de TDZ os produtos derivados desta (60 e 76

m/z) estão presentes na degradação do LPSF/GQ-175, também foram formados outros compostos possivelmente da quebra da molécula e/ou rearranjos químicos.

Figura 19 - Pirogramas do LPSF/GQ-175 à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.

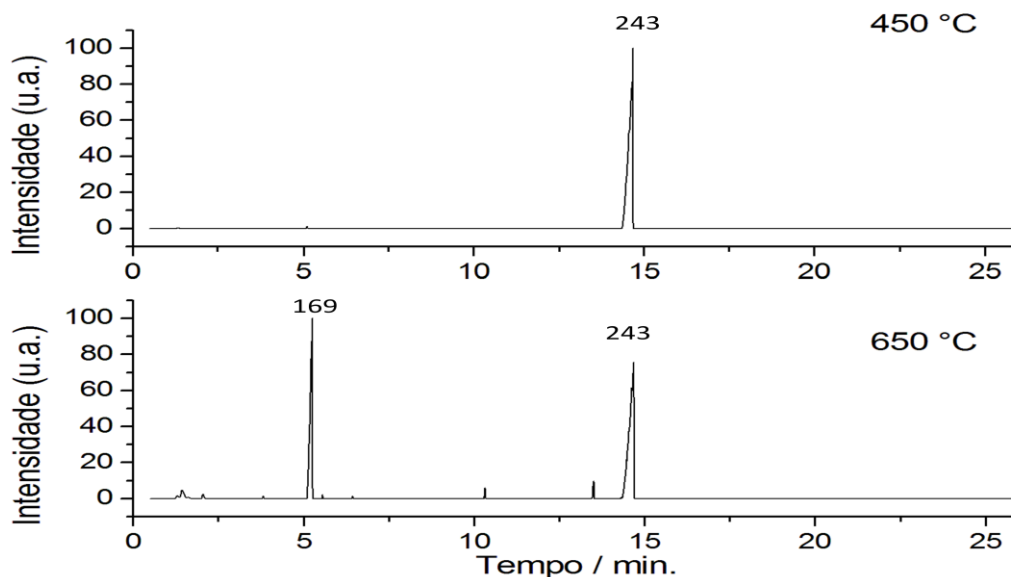


Tabela 20 - Valores de tempo de retenção e relação massa:carga dos produtos formados por quebra ou volatilização da LPSF/GQ-175 nas temperaturas de 450 e 650 °C

Tempo de retenção (min)	450 °C	650 °C
	Relação massa: carga (m/z)	Relação massa: carga (m/z)
1,32	60	60
1,49	-	76
2,40	-	127
5,22	169	169
10,31	-	254
13,50	-	267
14,59	243	243

A Figura 22 mostra os pirogramas do composto 5-bromo indol 3-carboxaldeído, intermediário utilizado na etapa final da síntese do LPSF/GQ-238, obtidos em 450 e 650 °C onde foi observada a presença de um pico em 12,7 min com 197 m/z identificado como 5-bromo indol, o qual resulta da quebra da ligação do

carboxaldeído no carbono 3 do intermediário como mostrado na figura 23. Na degradação do LPSF/GQ-238 a quebra da ligação do 5-bromo-indol possivelmente ocorre em um ponto diferente, pois não foi visualizado picos com 197 m/z nos pirogramas do LPSF/GQ-238.

Figura 20 - Pirogramas do 5-bromo indol 3-carboxaldeído à 450 e 650 °C mostrando os picos identificados conforme m/z.

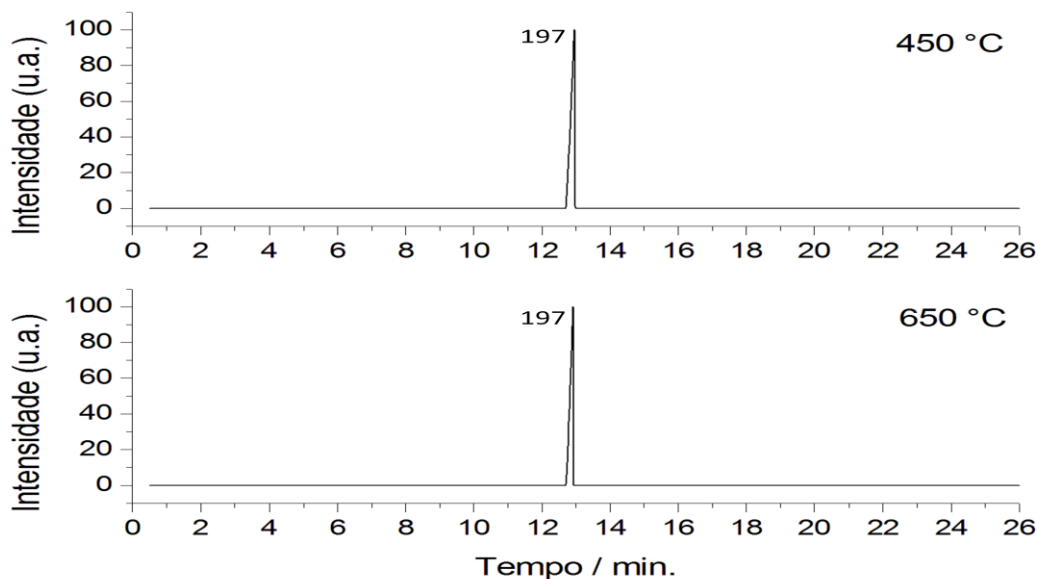
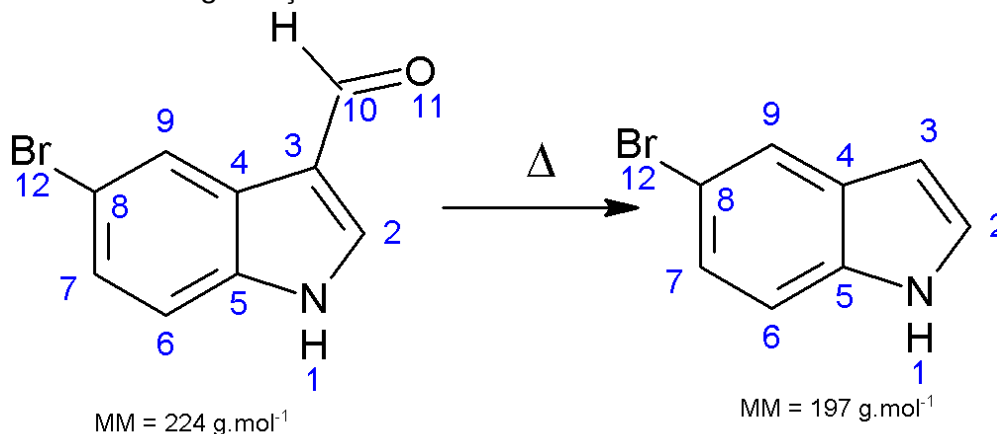


Figura 21 - Via de degradação do 5-Br-indol 3-carboxaldeído.



Diante da multiplicidade de compostos formados na degradação do LPSF/GQ-238. Foi possível correlacionar alguns compostos formados pela pirólise do LPSF/GQ-238 e seus intermediários. O composto com m/z de 60 é derivado da TZD, os compostos com m/z 169 e 243 são derivado do LPSF/GQ-175 e o mesmo,

respectivamente, o 5-bromo indol não foi observado nos pirogramas do LPSF/GQ-238 nas diferentes temperaturas estudadas.

A Pir-CG/EM apresenta-se como uma técnica útil no entendimento da degradação/volatilização de alguns compostos químicos. A análise dos intermediários químicos do LPSF/GQ-238 mostrou-se útil para compreender quais partes da molécula possui maior fragilidade de quebra, como também facilita a identificação das quebras da molécula com seus intermediários, visto que, essas quebras não foram identificadas pela biblioteca do software.

O LPSF/GQ-238 apresenta mecanismo de degradação complexo, pois possuem diversas fragmentações e/ou rearranjos químicos, nas temperaturas estudadas essas características dificultam a identificação estereoquímica da molécula por TG, mas pode prever os possíveis produtos de degradação térmica do composto em condições normais de armazenamento.

A análise do LPSF/GQ-238 e seus intermediários químicos através da Pir-CG/EM mostra-se como técnica rápida podendo ser utilizada para a identificação de contaminantes provenientes dos intermediários que por ventura não sejam totalmente consumidos.

Os intermediários da LPSF/GQ-238 na menor temperatura estudada (450 °C) sofrem volatilização com baixas taxas de degradação como já mostrado acima, outras características adicionais contribuem na identificação dos intermediários; a TZD possui massa igual a 117 g.mol⁻¹, e na menor temperatura ocorre volatilização de parte da TZD, caso esse composto seja totalmente consumido na formação do LPSF/GQ-175 (intermediário) ou do LPSF/GQ-238 (produto final) este não estará presente, como observado nos pirogramas (Figuras 19 e 21), a degradação destes compostos não produziram a TZD, portanto a quebra da ligação no LPSF/GQ-175 (intermediário) ou do LPSF/GQ-238 (produto final) ocorre na estrutura básica correspondente a TZD, pois a TZD seria facilmente identificada nos pirogramas á 450 °C em 7,74 min. O composto 5-bromo indol 3-carboxaldeido (MM 224 g/mol) é um intermediário químico utilizado na 3ª etapa da síntese química, esse composto antes da volatilização ocorre à quebra da ligação carboxaldeido, onde o composto volatilizado apresenta m/z de 197 (tr= 12,83 min), mas esse composto não foi evidenciado na degradação do LPSF/GQ-238 na temperatura de 450 °C, provavelmente tenha ocorrido a quebra entre os carbonos C5-C15 (Figura 24) da LPSF/GQ-238 formando o composto com m/z igual a 210 (tr= 14,04 min), este último

apresenta o espectro semelhante ao 5 bromo-indol (Apêndice). O LPSF/GQ-175 ($MM = 243 \text{ g.mol}^{-1}$) na temperatura de 450°C volatiliza-se praticamente se degradação.

A figura 25 apresenta a sobreposição dos pirogramas do LPSF/GQ-238 e seus intermediários (TZD, LPSF/GQ-175 e 5Br-indol) a 450°C , essa temperatura de análise mostrou-se adequada para o controle de qualidade da síntese química da NEQ, já a temperatura de 650°C não mostrou-se seletiva para tal controle, visto que a TZD nesta temperatura ocorre a degradação completa da mesma não sendo evidenciado sua presença, outra dificuldade e que nesta temperatura o LPSF/GQ-175 apresenta diversas fragmentações e aumento na concentração da nova entidade com m/z igual a 169, essa mesma característica também pode ser observada para a LPSF/GQ-238 (Figura 26), portanto a temperatura de 650°C não pode ser considerada a melhor faixa de temperatura utilizada no monitoramento de impurezas provenientes de precursores e seus produtos intermediários utilizados na síntese química do LPSF/GQ-238.

Figura 22 - Estrutura química do LPSF/GQ-238 com numeração dos elementos químicos do composto.

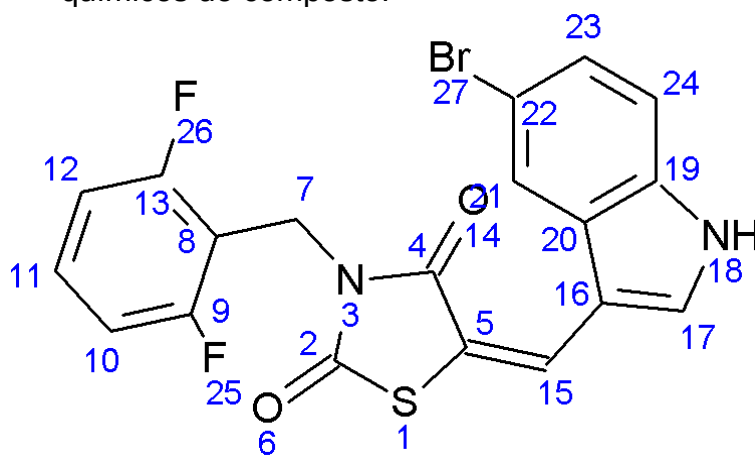


Figura 23 - Sobreposição dos pirogramas da LPSF/GQ-238 e seus intermediários à 450 °C.

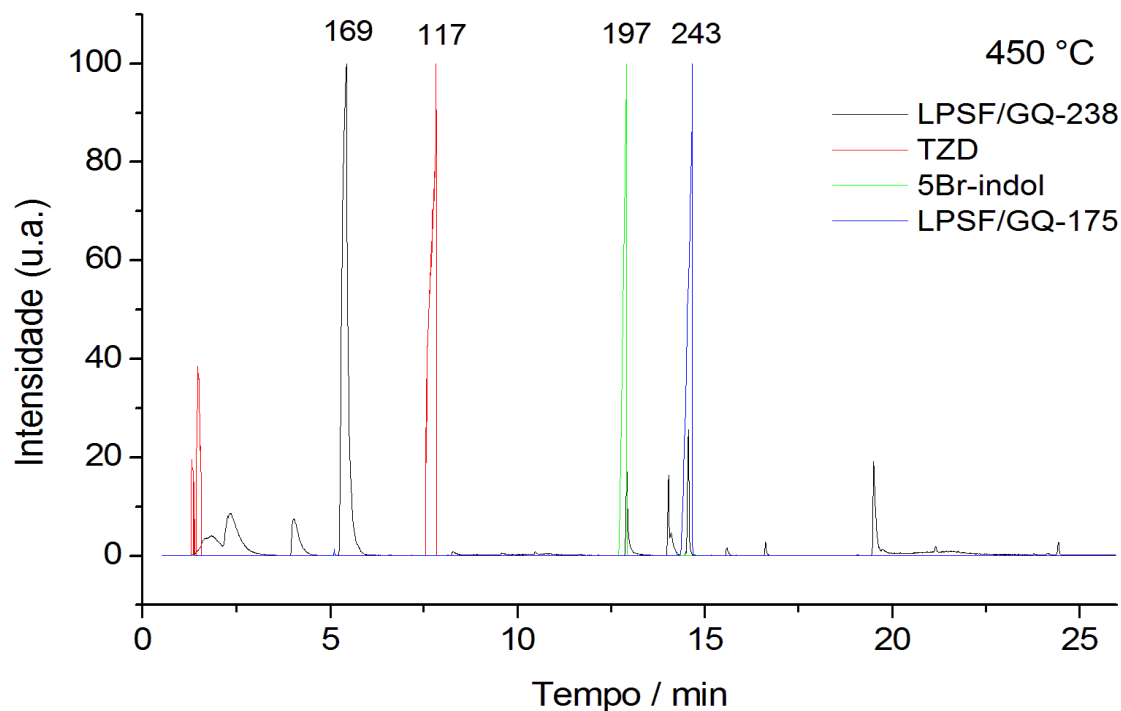
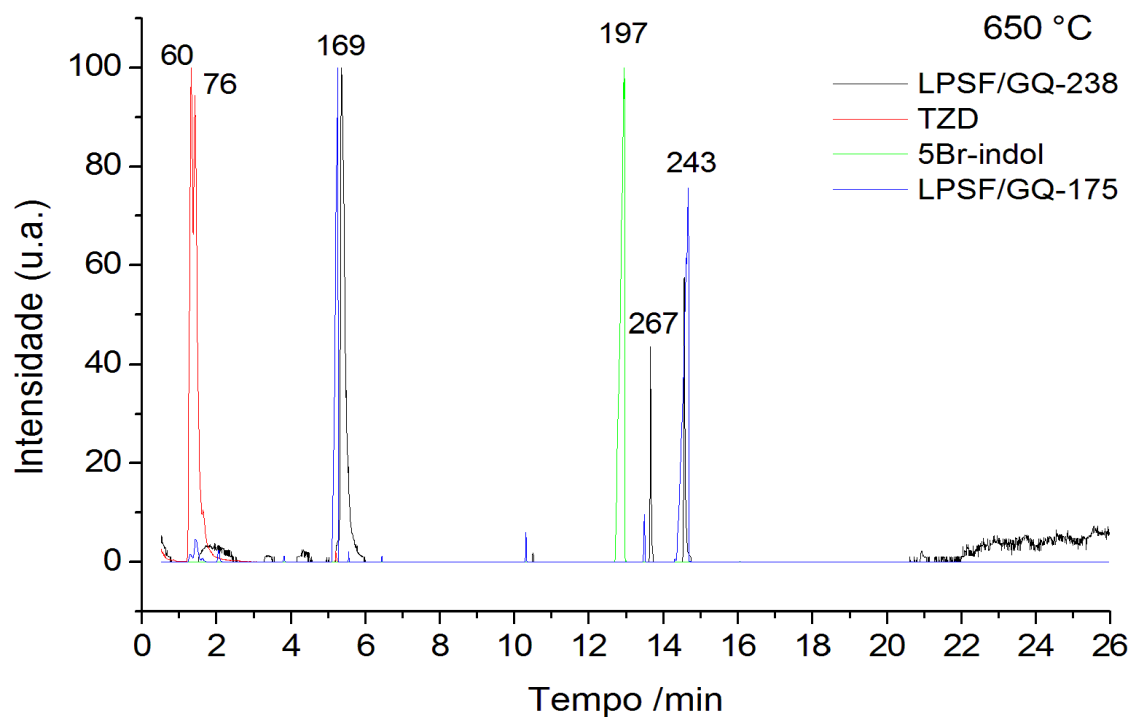


Figura 24 - Sobreposição dos pirogramas da LPSF/GQ-238 e seus intermediários à 650 °C.



5.6 Difração de Raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O padrão difratométrico do fármaco revela a presença de picos intensos em $2\theta = 9,134^\circ$; $13,296^\circ$; $14,928^\circ$; $20,362^\circ$; $23,762^\circ$ e $27,646^\circ$ mostrando um padrão cristalino (Figura 27), o tamanho do cristalito foi calculado usando a Equação de Scherrer e a distância interplanar utilizando a lei de Bragg (SANTOS et al., 2011; IBIAPINA et al., 2013). A tabela 21 mostra os valores da distância interplanar (d_{hkl}) e o tamanho do cristalito (TC) dos picos com maior intensidade, esses dados podem ser utilizados para a diferenciação de formas polimórficas no futuro.

O método de Rietveld foi utilizado no cálculo da cristalinidade da NEQ, este método consiste no ajuste do difratograma teórico de um composto, calculado a partir de seus dados cristalográficos, ao seu difratograma experimental, o método utiliza as funções matemáticas de pico, com grande grau de precisão (Gaussian, Lorentzian, Voight, Pseudo-Voight, Pearson VII, etc.)(YOUNG, LARSON, PAIVA-SANTOS, 2000). Na figura 28 observa-se a sobreposição dos difratogramas teórico (em lilás) e experimental (em preto) onde ocorreu grande similaridade entre ambos demonstrando o ajuste do método utilizado.

Utilizou-se o software TOPAS e aplicou-se o modelo de melhor ajuste (Pseudo-Voight) para os difratogramas da NEQ, o grau cristalino foi calculado obtendo valor de 100 % de cristalinidade, os valores de R_{exp} , R_{wp} e GOF foram de 1,19, 2,93 e 2,46, respectivamente, estes parâmetros são referentes ao ajuste do método utilizado para cálculo do grau de cristalinidade do composto. Na literatura científica dados de DRX que apresentarem valores R_{exp} e R_{wp} próximos entre si, e GOF próximo de 1 possuem melhor ajuste e portanto são mais confiáveis, no entanto neste trabalho o difratograma apresenta elevação de linha de base no início da análise até $8,5^\circ 2\theta$ e essa característica poderia predizer algum grau amorfo da substância, mas durante toda a análise a linha de base manteve-se reta não apresentando formação de halo característico de substância amorfa.

Tabela 21 - Valores de tamanho do cristalito e das distâncias interplanares do LPSF/GQ-238.

2θ ($^{\circ}$)	TC (nm)	d_{hkl} ($\text{\AA}$)
6,755	10^4	13,08
9,133	10^4	9,68
13,296	322	6,66
14,928	1442	5,93
20,362	155	4,36
21,206	116	4,19
23,761	113	3,74
27,646	97	3,22

Legenda: TC = tamanho do cristalito, d = distância interplanar

Figura 25 - Difratoograma de Raio-X do LPSF/GQ-238 e os Índices de Miller (hkl).

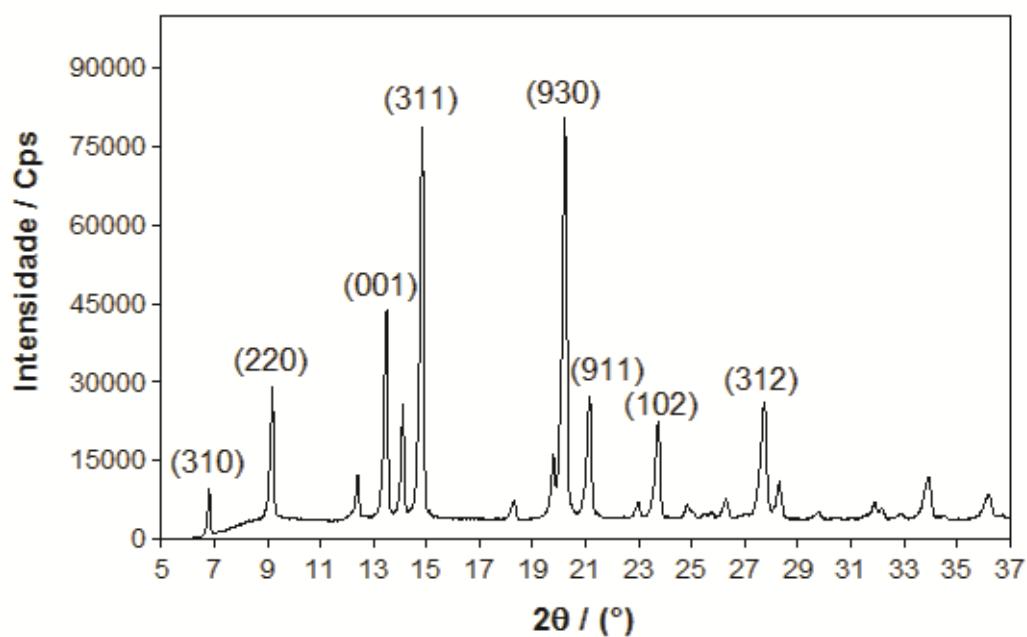
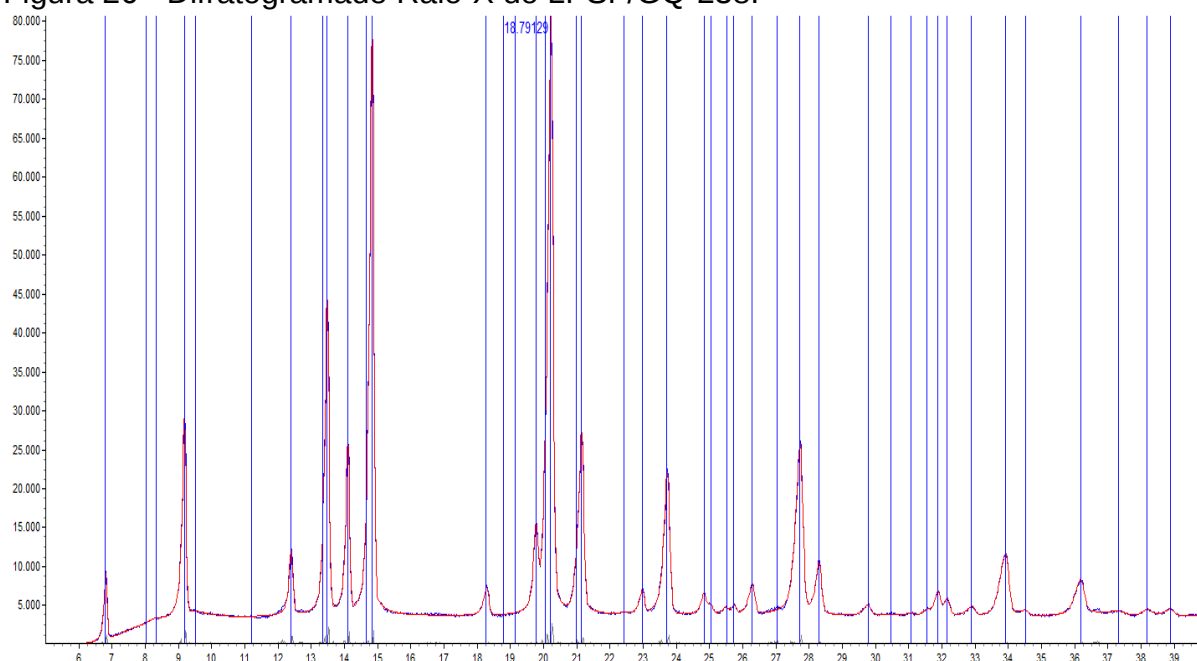


Figura 26 - Difratoograma de Raio-X do LPSF/GQ-238.

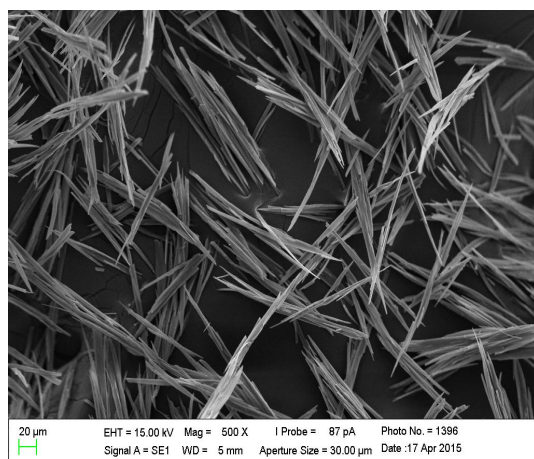


Legenda: Em lilás- difratograma teórico, em preto difratograma experimental, linhas na vertical- inserção de picos difratados.

Nas figuras do MEV com aumento 500 e 10.000 vezes, pode-se observar a presença de hábito cristalino do tipo agulha. As imagens de MEV corroboram com os dados de DRX da LPSF/GQ-238. Vieira et al. (2014) estudando o LPSF/GQ-130, derivado tiazolidínico com atividade antiinflamatória, evidenciaram que o composto também se apresenta na forma cristalina e possui hábito cristalino do tipo agulha.

Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura do LPSF/GQ-238.

a



b



Legenda: a - aumento de 500x, b - 10.000x.

5.7 Estudo de compatibilidade

As técnicas termoanalíticas, embora não estejam descritas nos compêndios oficiais como método de escolha para avaliar a estabilidade e compatibilidade de fármaco e/ou excipiente, são técnicas largamente utilizadas por pesquisadores em todo o mundo, onde estudos de compatibilidade usando DSC e TG são utilizados como métodos preditivos, onde a ausência de alterações no perfil térmico dos componentes da mistura indica uma não compatibilidade, caso estas alterações estejam presentes outros métodos devem ser utilizados, como: IV-TF, Raman, CLAE entre outros.

Segundo Lavor et al. (2013) a presença de deslocamentos de 5 °C para mais ou para menos nas temperaturas características dos compostos isolados, desaparecimento ou aparecimento de novos picos/eventos térmicos que estavam ausentes nas curvas, são sinais de possíveis interações sendo necessário a realização de análises por outras técnicas complementares.

Neste estudo foi avaliada a compatibilidade entre os Polímeros PEG 6000, PVP-K30 e Soluplus® com o LPSF/GQ-238 na proporção 1:1 (m/m).

O PEG 6000 foi o único excipiente que apresentou um pico endotérmico referente à fusão do composto, devido este polímero possuir caráter cristalino, a fusão do mesmo ocorreu em aproximadamente 66,46 °C com ΔH de 166,23 J.g⁻¹, porém a mistura física deste com a NEQ deslocou a temperatura de fusão do PEG 6000 para 64,30 °C com ΔH de 84,35 J.g⁻¹. A figura 30-a mostra deslocamento na temperatura de fusão, mudança no perfil do pico de fusão e diminuição da entalpia da NEQ, como mostrada na tabela 22. A curva TG da mistura mostra mudança no perfil de degradação da NEQ, onde ocorreu aumento na temperatura de degradação na 2ª etapa e aumento na quantidade de matéria carbonizada no porta amostra ao final da análise, estas evidências sustentam um possível interação entre o LPSF/GQ-238 e o PEG 6000, sendo necessário a utilização de outras técnicas para confirmar incompatibilidade, resultados semelhantes foram descritos por Araujo et al. (2003) quando estudavam o comportamento do antirretroviral zidovudina com este polímero.

Já a curva de DSC do PVP-K30 evidência um pico endotérmico largo referente à volatilização da água entre 35 á 97 °C com Δm de 9,61% na TG (NUNES et al., 2009) após este evento ocorreu a transição vítrea do composto na faixa de

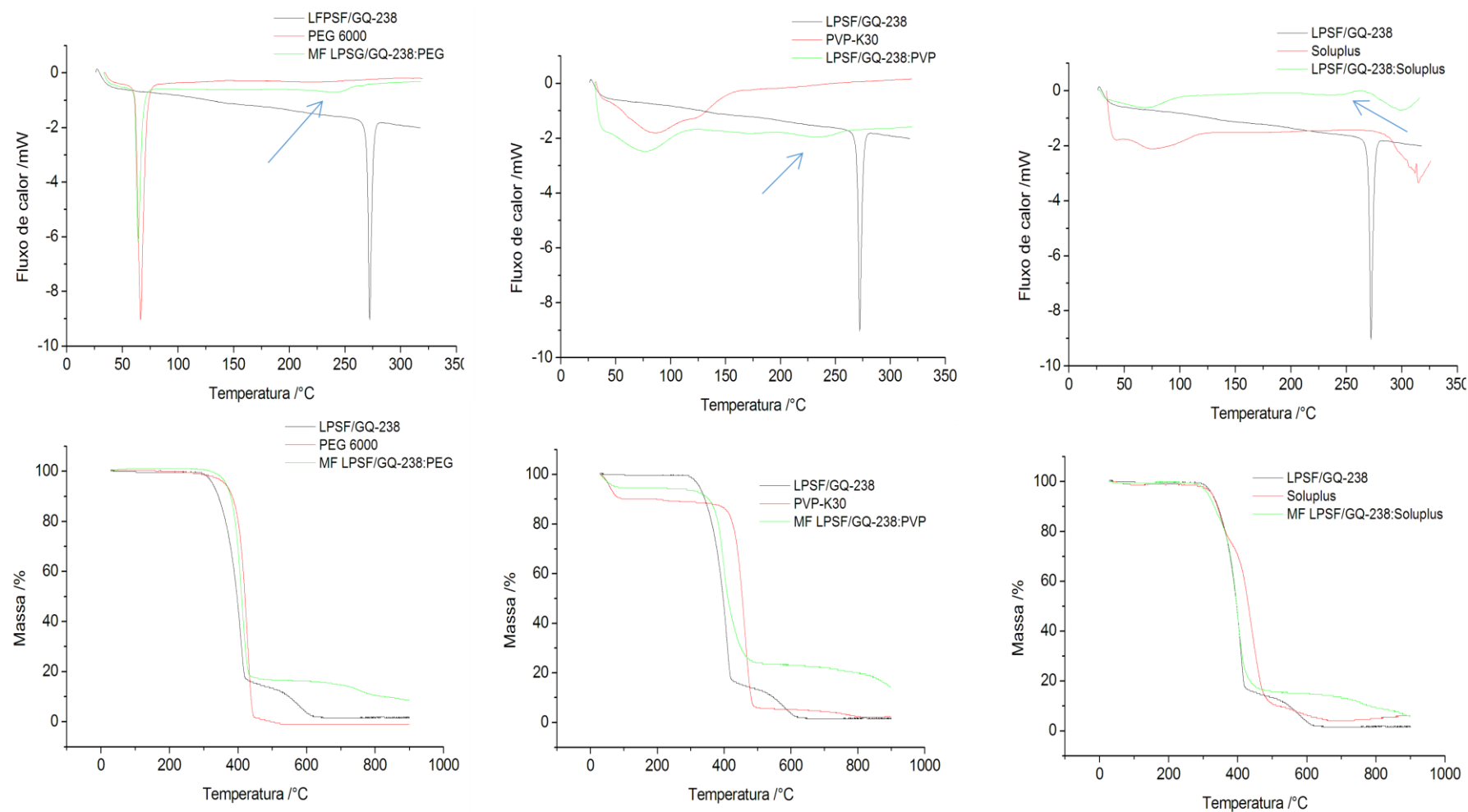
120 a 165 °C com $T_{g_{pico}}$ em aproximadamente 160 °C, também evidenciada por De Paula e Mano (2012), onde não foi possível calcular a entalpia deste eventos devido a sobreposição de ambos, nas curvas TG não foram observados variações de massa nesta faixa de temperatura (120 – 165 °C), porém a TG evidenciou uma pequena variação de massa entre 210 a 226 °C com $\Delta m = 1,11\%$ (TITA et al., 2014), no entanto o principal evento de degradação térmica ocorreu entre 438,74 e 478 °C com $\Delta m = 81,99\%$ como observado na Tabela 22 e Figura 30.

As curvas DSC da MF LPSF/GQ-238:PVP evidenciaram um evento endotérmico referente à perda de água na faixa de temperatura entre 37 e 110 °C com $\Delta H = 112 \text{ J.g}^{-1}$, este evento confirmado nas curvas TG com $\Delta m = 4,9\%$, foi possível calcular a entalpia deste evento devido ter ocorrido deslocamento para maiores valores da temperatura vítrea. O deslocamento da temperatura vítrea pode significar aumento da estabilidade da mistura física em relação ao fármaco isolado como descrito por Baird e Taylor (2012). Assim, ao aumentar o valor de T_g do PVP minimiza o relaxamento molecular e rearranjo responsável pela devitrificação (GUPTA, KAKUMANU e BANSAL, 2004). A T_g da mistura física ocorreu na faixa de temperatura entre 129 – 189 °C nesta mesma faixa de temperatura não ocorreu variação de massa nas curvas TG, mas também foi observado um evento de perda de massa entre 209 e 230 °C com $\Delta m = 0,686\%$ referente a degradação do excipiente, no entanto esse valor foi 20% superior ao esperado (0,55%) este evento ocorreu na mesma faixa de fusão da MF que foi antecipada de 272 °C para 230 °C devido a uma possível interação entre a NEQ e o excipiente. No entanto o principal evento de perda de massa na curva TG ocorreu entre 382 e 428 °C com $\Delta m = 69,72\%$. A decomposição da mistura física obteve perfil de degradação térmica distinto do excipiente e da NEQ onde ocorreu deslocamento na temperatura de degradação e aumento na quantidade de matéria carbonizada no porta amostra ao final da análise, estas evidências sustentam um possível interação entre o LPSF/GQ-238 e o PVP K-30, sendo necessário a utilização de outras técnicas para confirmar incompatibilidade.

O copolímero Soluplus® apresentou na curva DSC um pico endotérmico largo referente a perda de água e a transição vítrea com $T_{pico} = 104,5 \text{ °C}$, o outro evento endotérmico em aproximadamente 328,27 °C refere-se à degradação do copolímero como confirmado pela TG, as curvas TGs confirmaram a perda de água de adsorção (TERIFE et al, 2012) na faixa de temperatura entre 40 e 84 °C com $\Delta m = 1,3\%$.

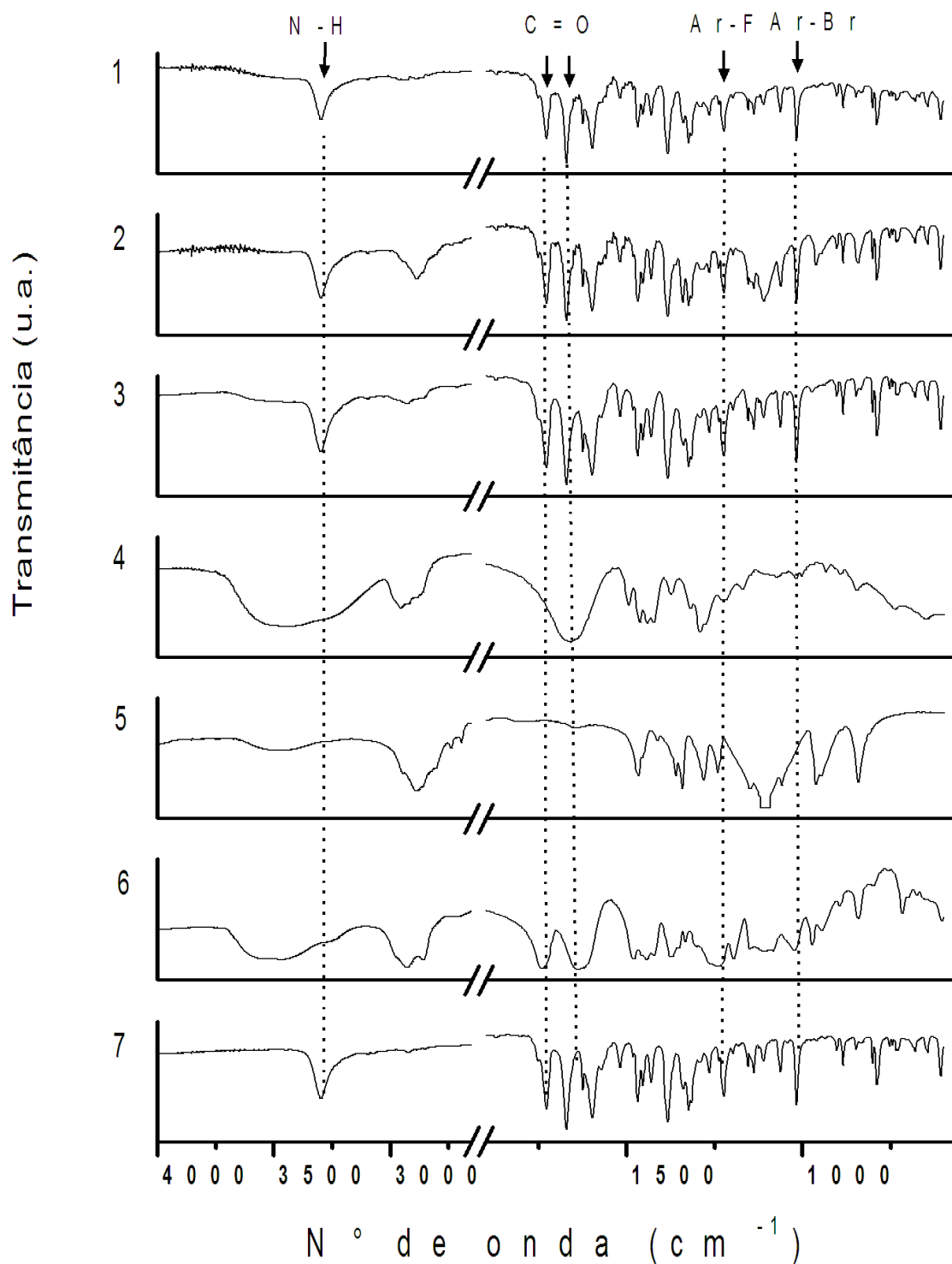
A mistura física apresentou na DSC um pico endotérmico referente a perda de água seguido pela transição vítrea com $T_{\text{pico}} = 86,56 \text{ }^{\circ}\text{C}$; como mostrado na figura 30-c, é notória a antecipação da T_g da mistura física em cerca de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em relação a do excipiente, esse evento pode significar diminuição da estabilidade da MF (BAIRD, TAYLOR, 2012). Mas uma mudança na T_g é esperada quando o IFA é dissolvido no excipiente polimérico, por outro lado, o polímero de T_g não mudará se os dois compostos não se encontram numa fase e a IFA permanece cristalina. O efeito das moléculas IFA dissolvidos em um polímero de T_g pode ser explicada em termos de interações moleculares ou volume livre. A teoria de volume livre assume que o espaço entre moléculas é livre (ou seja, é "espaço vazio"), e que o volume livre aumenta com a mobilidade molecular. Quando uma molécula pequena se dissolve no polímero, aumenta o volume livre entre cadeias de polímero e deste modo a temperatura de transição vítrea do sistema diminui (TERIFE et al., 2012). A mistura física também proporcionou deslocamento na temperatura de fusão da NEQ de aproximadamente $272 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para $234 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com redução de entalpia de $78,31$ para $11,96 \text{ J.g}^{-1}$. A perda de água foi confirmada pela TG na faixa entre 31 e $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ com $\Delta m = 0,455 \%$, a curva TG também mostra antecipação na temperatura de degradação da mistura com T_{onsetD} de $307,09 \text{ }^{\circ}\text{C}$ como mostrado na tabela 22, estas evidências sustentam uma possível interação entre o LPSF/GQ-238 e o Soluplus[®], sendo necessário a utilização de outras técnicas para confirmar incompatibilidade.

Figura 28 - Curvas de DSC e TG dos IFs e das misturas físicas (MF).



Legenda: Seta= pico de fusão da mistura LPSF/GQ-238:excipientes.

Figura 29 - IV-TF dos IFs e das misturas físicas em pastilhas de KBr.



Legenda: 1-MF LPSF/GQ-238:PEG, 2-MF LPSF/GQ-238:PVP, 3- MF LPSF/GQ-238:Soluplus, 4- PEG 6000, 5- PVP K-30, 6- Soluplus®, 7- LPSF/GQ-238.

Tabela 22 - Valores do estudo de compatibilidade utilizando DSC e TG.

Compostos	*T _{onsetf}	**T _{melting}	¹ T _g	ΔH	T _{onsetD}	² Δm
	(°C)	(°C)	(°C)	(J.g ⁻¹)	(°C)	(%)
LPSF/GQ-238	265,35	272,48	-	78,31	374,74	82,92
LPSF/GQ-238:PEG	227,45	239,31	-	15,22	399,11	83,51
LPSF/GQ-238:PVP	212,87	230,24	165,07	23,70	383,51	69,92
LPSF/GQ-238:Soluplus	206,13	234,38	88,56	11,96	307,09	15,21
PEG 6000	61,71	66,46	-	166,23	406,44	95,88
PVP-K30	-	-	143,88	-	438,74	81,99
Soluplus	-	-	104,45	-	328,27	20,25

Legenda: *temperatura do início da fusão, **temperatura do pico de fusão, ¹temperatura da transição vítrea, ²variação de massa do principal evento de decomposição térmica.

Para a confirmação de possíveis incompatibilidades foram utilizados a IV-TF e a DSC-fotovisual, como indicado no fluxograma da figura 6, a técnica IV-TF tem sido bastante empregada na elucidação de possíveis interações químicas. Neste trabalho a IV-TF da mistura e seus componentes foram realizados sem prévio tratamento térmico, assim possíveis interações físicas e/ou químicas catalisadas por temperatura podem não estar presentes nas espectroscopias de vibração na região do infravermelho.

A figura 31 mostra as espectroscopias de IV-TF da mistura e seus componentes isolados, onde não ocorreu deslocamento nas bandas de absorção da mistura física em relação ao LPSF/GQ-238, como mostrada na tabela 23, podendo concluir que os espectros de IV-TF da mistura apresentam-se como uma sobreposição das absorções da NEQ e o excipiente.

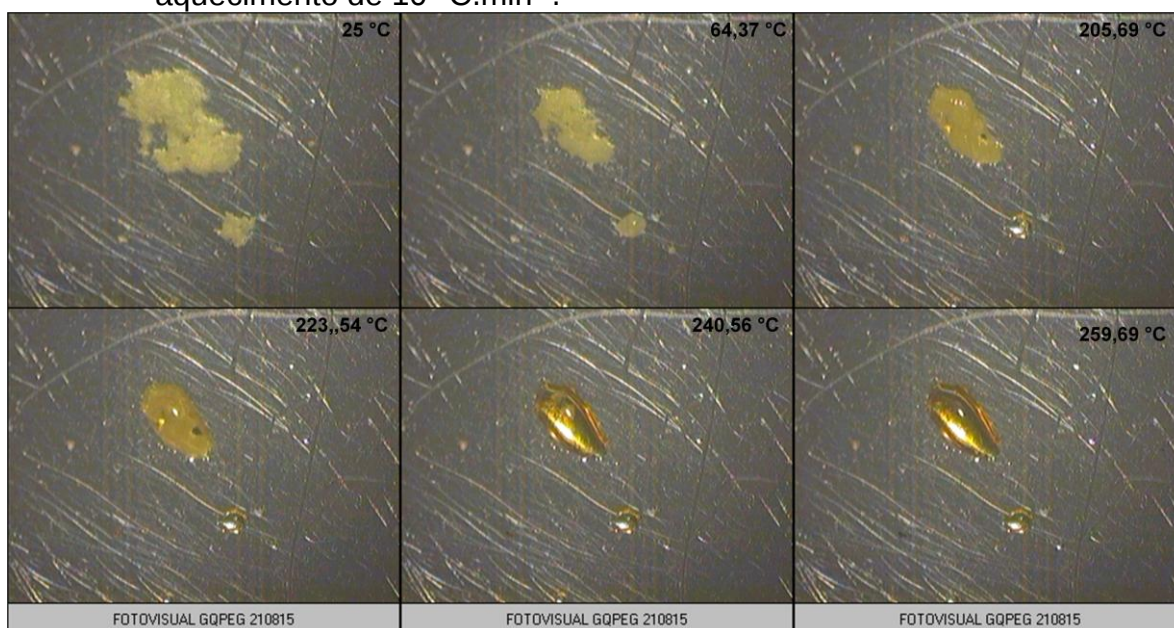
Tabela 23 - Assinalamentos vibracionais dos IFs e suas misturas físicas (MF).

Compostos	Grupos funcionais				
	N-H	C=O	C=O	Ar-F	Ar-Br
LPSF/GQ-238	3300	1728	1670	1224	1018
LPSF/GQ-238:PEG	3300	1728	1670	1224	1018
LPSF/GQ-238:PVP	3300	1728	1670	1224	1018
LPSF/GQ-238:Soluplus	3300	1728	1670	1224	1018

A técnica de DSC-fotovisual pode ser usada como técnica complementar para a elucidação de eventos térmicos como mostrado nos trabalhos de Macedo, Nascimento (2002) e Procópio et al. (2011).

Na mistura física LPSF/GQ-238:PEG a técnica DSC-fotovisual confirma a existência de uma forte interação entre a NEQ e o polímero, no entanto esta interação não pode ser classificada como incompatibilidade, pois o deslocamento do pico de fusão para temperaturas mais baixas foi possivelmente causado pela solubilização da NEQ na matriz polimérica do excipiente fundido, o aspecto visual da mistura após sua fusão mostra-se semelhante ao fármaco isolado, como mostrada na figura 32.

Figura 30 - DSC-fotovisual da mistura física LPSF/GQ-238:PEG com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.



Na mistura física LPSF/GQ-238:PVP a técnica DSC-fotovisual confirma a existência de uma forte interação entre a NEQ e o polímero com incompatibilidade, corroborando com a DSC e TG, nesta mistura a DSC-fotovisual mostrou diferença no aspecto visual da mistura ao fármaco isolado, onde é possível observar sinais de degradação na mistura junto a etapa de fusão a $243,77\text{ }^{\circ}\text{C}$ como mostrada na figura 33, resultado semelhante de incompatibilidade foi relatada por Tita et al. (2014).

Por fim, a mistura física LPSF/GQ-238:Soluplus utilizando técnica DSC-fotovisual confirma a existência de uma forte interação entre a NEQ e o copolímero, no entanto esta interação não pode ser classificada como incompatibilidade, pois o deslocamento do pico de fusão para temperaturas mais baixas foi possivelmente causado pela solubilização da NEQ na matriz polimérica do excipiente amorfo, o aspecto visual da mistura após sua fusão mostra-se semelhante ao fármaco isolado, como mostrada na figura 34.

Figura 31 - DSC-fotovisual da mistura física LPSF/GQ-238:PVP com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.

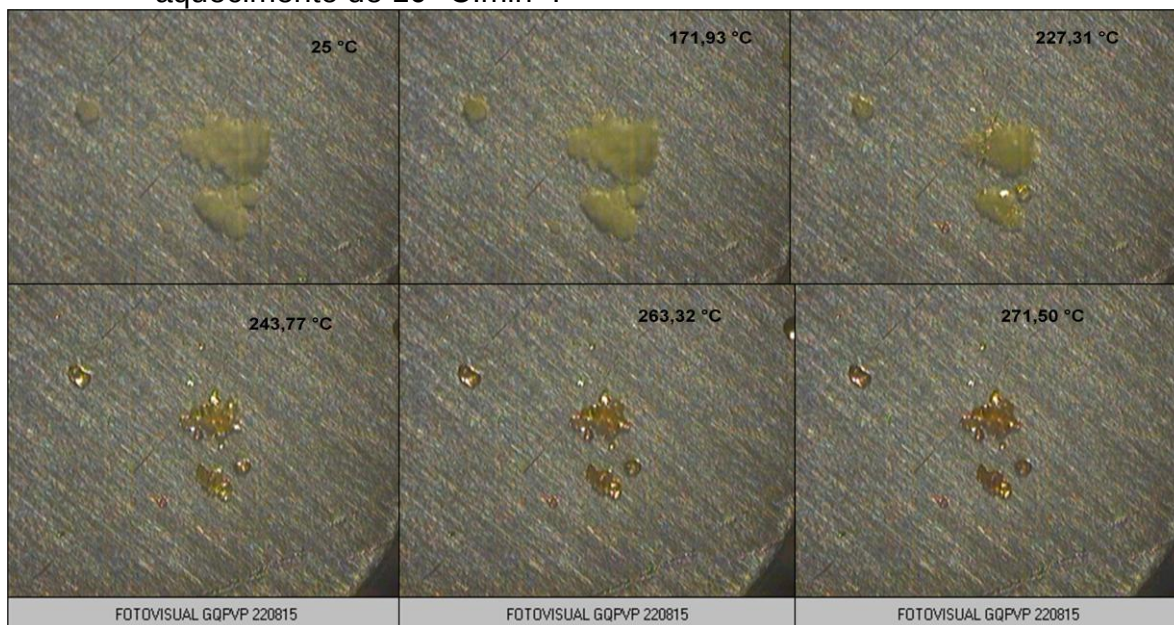
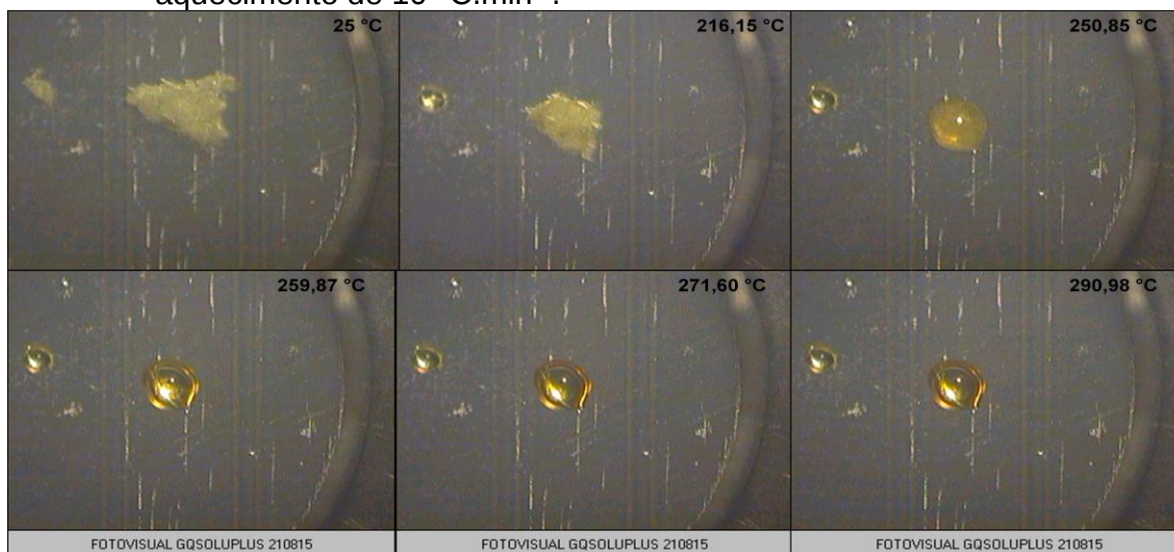


Figura 32 - DSC-fotovisual da mistura física LPSF/GQ-238:Soluplus com razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$.



A DSC-fotovisual mostrou-se como uma técnica fundamental na elucidação de possíveis incompatibilidades, corroborando com a TG e DSC convencional, onde foi confirmada interação da NEQ com todos os polímeros usados neste estudo, porém apenas a mistura utilizando o PVP-K30 como excipiente apresentou incompatibilidade.

6 CONCLUSÕES

A rota de síntese do derivado 3-(2,6-difluór-benzil)-5-(5-bromo-1*H*-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238) resultou na obtenção de um produto com elevado grau de pureza e com rendimento satisfatório. Sua qualidade foi comprovada por técnicas espectroscópicas confirmando sua estrutura química e por diversas técnicas analíticas.

Os parâmetros de solubilidade foram determinados segundo critérios da Farmacopéia brasileira, onde mostraram que o composto é insolúvel em água e hexano, muito pouco solúvel em etanol e metanol, pouco solúvel em acetonitrila e acetato de etila; sendo este um dos principais desafios no desenvolvimento farmacêutico utilizado esta substância.

O método cromatográfico desenvolvido para quantificação da NEQ demonstrou-se adequado no que se refere à especificidade, linearidade, precisão, recuperação e limite de quantificação cumprindo as exigências da RE 899/2003.

A caracterização físico-química utilizando técnicas termoanalíticas (DSC, DSC-fotovisual, TG) mostrou que a NEQ apresenta-se na forma cristalina confirmada por DRX, possui elevado ponto de fusão e alta estabilidade térmica com início de degradação acima de 274 °C.

O estudo cinético realizado a partir do modelo de Ozawa em atmosfera inerte e ar sintético mostraram cinética de ordem zero e reprodutibilidade da E_a , porém a NEQ mostra diferenças no perfil térmico na atmosfera oxidativa em relação a inerte com uma maior velocidade de degradação, os dados de cinética foram confirmados pelo modelo isotérmico a partir da equação de Arrhenius que também mostrou ordem zero.

Através da Pyr-CG/EM buscou-se melhor compreender o mecanismo de degradação da NEQ, concluindo que a mesma possui mecanismo de degradação complexo. Esta técnica também mostrou-se satisfatória no que se refere à seletividade e sensibilidade, sendo demonstrada sua aplicação no controle de qualidade da síntese química, podendo avaliar e identificar a presença de contaminantes resultantes da síntese.

A LPSF/GQ-238 apresenta-se totalmente cristalino e a MEV evidenciou que o LPSF/GQ-238 apresenta hábito cristalino do tipo agulha.

O estudo de compatibilidade entre o LPSF/GQ-238 e o excipiente PEG 6000 não evidenciou incompatibilidade, a mistura física do NEQ com Soluplus[®] mostrou interações físicas características de um processo de amorfização do fármaco. Entretanto o PVP-K30 mostrou mudanças nas características físicas e químicas da mistura com amorfização e diminuição da estabilidade térmica da mistura.

Tendo em vista a importância do 3-(2,6-difluor-benzil)-5-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetileno)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/GQ-238) como um promissor agente antiparasitário sua caracterização físico-química por técnicas térmicas e não térmicas apresentou informações essenciais. Trazendo assim, subsídios para o desenvolvimento farmacotécnico de diversas formulações a partir dessa NEQ.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. et al. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 343-351, 2010.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, n. 2, p. 303-314, 2003.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Determination of the melting temperature, heat of fusion, and purity analysis of different samples of zidovudine (AZT) using DSC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 37-43, 2010.
- BAHIA, M. T. et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. V.6(11), p. e1870, 2012.
- BAIRD, J. A.; TAYLOR, L. S. Evaluation of amorphous solid dispersion properties using thermal analysis techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 5, p. 396-421, 2012.
- BARROS-LIMA, Í. P. et al. Compatibility study of tretinoin with several pharmaceutical excipients by thermal and non-thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 733-747, 2015.
- BIANCHI, F. et al. Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0003465-e0003465, 2015.
- BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.
- BÖER, T. M. et al. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC–MS in the characterization of tacrolimus. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, p. 18-23, 2013.
- BOTTOLI, C. B. G.; FREIRE, M. T. A.; REYES, S. F. F. G. R. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1522-32, 2008.
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5. ed. Brasília: FioCruz,. 2010. V. 1.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 02 jun 2003.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade.. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 01 ago. 2005.

BRASIL, Ministério da saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 6º Edição. Brasília, DF, 816p, 2005b.

BRASIL, Ministério da saúde, 2015a <<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/esquistossomose>>> acesso em 13/04/2015.

BRASIL, Ministério da saúde, 2014a <<http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/esquistossomose_mansonica.htm>> acesso em 13/04/2015

BRASIL, Ministério da saúde, 2014b <<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>>> acesso em 13/04/2015)

BRASIL, Ministério da saúde, 2014c <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doenca-de-chagas>>> acesso em 24/09/2015

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução-RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União – **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 05 abr. 2010.

BRITTAİN, H. G. Spectral methods for the characterization of polymorphs and solvates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 4, p. 405-412, 1997.

BUNACIU, A. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; HOANG, V. D.. Vibrational spectroscopy used in polymorphic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 14-22, 2015.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, p. 22-35, 2014.

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, 2011.

COLLIER, J. W. et al. Influence of formulation and processing factors on stability of levothyroxine sodium pentahydrate. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 818-825, 2010.

COURA, J. R.: Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.: Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 286-296, 2012.

EMAMI, S. et al. Development and Physicochemical Characterization of Sirolimus Solid Dispersions Prepared by Solvent Evaporation Method. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 4, p. 369, 2014.

DA SILVA, R. M. F. et al. Thermal characterization of indinavir sulfate using TG, DSC and DSC-photovisual. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 965-968, 2009.

DANDAPANI, S. et al. Diversity-oriented synthesis yields a new drug lead for treatment of Chagas disease. **ACS medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 149-153, 2014.

DIAS J. C. P, NETO V. A, LUNA E. J. A. : Mecanismos Alternativos de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões parágrafo SUA Prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** , v. 44 p. 375-379, 2011.

FDA, Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA FVM Program, 2nd Edition, **DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES**, p 1-35, 2015.

FELIX, F. S. et al. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 877-880, 2009.

FERMINO, B. L. et al. Anxiolytic properties of Melissa officinalis and associated mechanisms of action : A review of the literature. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 53–59, 2015.

FRIES, E. et al. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 10, p. 1949-1956, 2013.

FIOCRUZ, 2015

<<http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/esquistossomose_mansonica.htm
>> acesso em 13/04/2015.

FULIAS, A. et al. Thermal behaviour studies of procaine and benzocaine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 1, p. 265-271, 2013.

HAINES, P. J. et al. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. **Principles and Practice**, v. 1, p. 279-361, 1998.

HAY, M. et al. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40-51, 2014.

HO, R. et al. Effect of milling on particle shape and surface energy heterogeneity of needle-shaped crystals. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 10, p. 2806-2816, 2012.

HOTEZ, P. J. et al. Control of neglected tropical diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018-1027, 2007.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 8, p. 601-606, 2014.

HE Y., HO C. Amorphous Solid Dispersions: Utilization and Challenges in Drug Discovery and Development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 104: p. 3237–3258, 2015.

HEINZ A., et al. Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy, **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 61, p. 971–988, 2009.

GALVÃO, F. P. et al. Thermal characterization of some guanyldhydrazones by thermal and nonthermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 879-887, 2015.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals—part 1. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 191-199, 1998.

GOMES, A. P. B. et al., Development of thermogravimetric method to quantitative determination of mebendazole. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. 87(3):919-925, 2007.

GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 52, n. 2, p. 129-150, 1977.

GOROG, S. Identification in drug quality control and drug research. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 114–122, 2015.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, 2012.

GAREKANI, H. A. et al. Crystal habit modifications of ibuprofen and their physicomechanical characteristics. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 27, n. 8, p. 803-809, 2001.

GUPTA, P.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. Stability and solubility of celecoxib-PVP amorphous dispersions: a molecular perspective. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 10, p. 1762-1769, 2004.

IBIAPINO, A. L. et al. Síntese e caracterização de CaZrO₃ e BaZrO₃ nanoestruturados. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 762-767, 2013.

ISMAIL, M. et al. Characterization of isolates of *S. mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 214-218, 1996.

ICH Q2a, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION et al. Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures. Rockville, MD: **Food and Drug Administration**, 1995.

INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2015.

KIANG, Y.H. et al. Conformational Isomerism in Solid State of AMG 853—Structure Studies Using SolidState Nuclear Magnetic Resonance and X-ray Diffraction. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2015.

LIRA, A. M. et al. Compatibility studies of lapachol with pharmaceutical excipients for the development of topical formulations. **Thermochimica acta**, v. 457, n. 1, p. 1-6, 2007.

LAVOR, E. P. et al. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs—excipient compatibility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2303-2309, 2014.

LEDEȚI, I. et al. Kinetic analysis of solid-state degradation of pure pravastatin versus pharmaceutical formulation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 121, n. 3, p. 1103-1110, 2015.

LIZARRAGA, E.; ZABALETA, C.; PALOP, J. A. Thermal stability and decomposition of pharmaceutical compounds. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 3, p. 783-792, 2007.

LUIS, A.F. **Estudos epidemiológicos imunogenéticos e pesquisa de fármacos esquistossomicidas e antifibróticos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 2012.

MACÊDO, R. et al. Application of thermal analysis in the characterization of anti-hypertensive drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 59, n. 3, p. 657-661, 2000.

MACEDO, R. O.; DO NASCIMENTO, T. G.; VERAS, J. W. E. Compatibility and stability studies of propranolol hydrochloride binary mixtures and tablets for TG and DSC-photovisual. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 67, n. 2, p. 483-489, 2002.

MACÊDO, R. O.; DO NASCIMENTO, T. G.. Quality control of thiabendazole pre-formulation and tablets by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 85-92, 2002.

MATOS, J. R. et al., Ilustração da influência da razão de aquecimento nos resultados de termogravimetria. **Química Nova**, v. 23, p. 113-115, 2000.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásicobenznidazol. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1714–1719, 2010.

MEIER, D.; FAIX, O. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. In:Methods in Lignin Chemistry. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 177-199, 1992.

MENDONÇA, C. M. S. et al. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2277-2285, 2014.

MOLINA, I. et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899-1908, 2014.

MOREIRA, T.L.B. et al. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 183-187, 2013.

MOURA, E. et al. Thermal characterization of the solid state and raw material fluconazole by thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 100, n. 1, p. 289-293, 2009.

MOTHÉ, C. G.; DE MIRANDA, I. C. Study of kinetic parameters of thermal decomposition of bagasse and sugarcane straw using Friedman and Ozawa–Flynn–Wall isoconversional methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 2, p. 497-505, 2013.

NEVES, David P. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NUNES, R. S. et al. Thermal behavior of verapamil hydrochloride and its association with excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 1, p. 349-353, 2009.

OLIVEIRA, M. A. et al. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224-1230, 2011a.

OLIVEIRA, J.F. **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE NOVOS DERIVADOS INDÓLICOS-TIAZOLIDÍNICOS-3,5-DISSUBSTITUÍDOS**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2013.

OLIVEIRA J. F. et al. Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones, **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7(6): p. 386-400, 2015.

OLIVIERI, B. P. et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 79-83, 2010.

PALERMO, R. N.; ANDERSON, C. A.; DRENNEN III, J. K. Review: use of thermal, diffraction, and vibrational analytical methods to determine mechanisms of solid dispersion stability. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 7, n. 1, p. 2-12, 2012.

PAULA, E. L.; MANO, V..PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DE BLENDA À BASE DE PDLLA E PVP. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1084-1089, 2012.

PATEL, J.R.; CARLTON, R.A.; YUNIATINE, F.; NEEDHAM, T.E.; WU, L.; VOGT, F.G. Preparation and Structural Characterization of Amorphous Spray-Dried Dispersions of Tenoxicam with Enhanced Dissolution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 101, n. 2, 2012a.

PATEL, J.R.; CARLTON, R.A.; NEEDHAM, T. E.; CHICHESTER, C.O.; VOGT, F.G. Preparation, structural analysis, and properties of tenoxicamcocrystals. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 436, p. 685– 706, 2012b.

PLANTE, A. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; LEIFELD, J. Application of thermal analysis techniques in soil science. **Geoderma**, v. 153, n. 1, p. 1-10, 2009.

PEREIRA, A. C. et al. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (–)-and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**, v. 72, n. 11, p. 1424-1430, 2011.

PROCÓPIO, J. V. V. et al. Application of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC/MS in the qualification of simvastatin pharmaceutical raw material. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 3, p. 665–670, 2011.

RAO, N. R.; NAGARUJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford - ENG, v. 33, n. 3, p. 331-337, 2003.

RASSI JR, A.;RASSI, A. DE REZENDE, J. M.. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.: Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-80, 2004.

ROUMELI, E. et al. Physicochemical characterization and decomposition kinetics of trandolapril. **Thermochimica Acta**, v. 539, p. 92-99, 2012.

RUIZ, F.A.R. et al. Synthesis and antimalarial activity of new heterocyclic hybrids based on chloroquine and thiazolidinone scaffolds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 4562-4573, 2011.

SANTOS, R. L. P. et al. Difração de raios X e refinamento por Rietveld de ferritas $Mn_{0.65}Zn_{0.35}Fe_2O_4$ sintetizada por reação de combustão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6, n. 3, 2011.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SOUZA, F. S.; MACEDO, R. O.; VERAS, J. W. E..Studies of cimetidine pre-formulated and tablets for TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 99-106, 2002.

SAKHUJA, R. ET AL. Design and synthesis of spiro[indole-thiazolidine]spiro[indole-pyrans] as antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 5465–5469, 2011.

SHAIKH, F. M.; PATEL, N. B.; RAJANI, D. SYNTHESIS OF NEW THIAZOLIDINE-2 , 4-DIONE DERIVATIVES AND THEIR ANTIMICROBIAL AND ANTITUBERCULAR ACTIVITY. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology** v. 5674, 2013.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, 2012.

SHETE, G. et al. Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 598–609, 2010.

SILVÉRIO, F. O.; BARBOSA, L. C. A; PILÓ-VELOSO, D..Pyrolysis as an analytical technique. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1543-1552, 2008.

SIMMLER, C. et al. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current opinion in biotechnology**, v. 25, p. 51-59, 2014.

SILVA, K. E. R. et al. Alternativas terapêuticas no combate à esquistossomose mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2012.

SILVA, M. L. A. et al. Furofuranlignans display schistosomicidal and trypanocidal activities. **Phytochemistry**, v. 107, p. 119-125, 2014.

SILVA, A.L. **Potencial terapêutico de novos fármacos na avaliação da atividade esquistossomocida**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2010.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. A preformulation study of a new medicine for Chagas disease treatment: physicochemical characterization, thermal stability, and compatibility of benznidazole. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1391-1396, 2010.

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, 2007.

STORPIRTIS, Sílvia et al. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, v. 321, p. 6, 2009.

STELMA, F.F. et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 167-170, 1995.

VAN DEN MOOTER, G.. The use of amorphous solid dispersions: A formulation strategy to overcome poor solubility and dissolution rate. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 9, n. 2, p. e79-e85, 2012.

VIEIRA, A. C. Q. M. et al. Physical–chemical characterization of new anti-inflammatory agent (LPSF/GQ-130) and evaluation of its thermal compatibility with pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2339-2349, 2014.

VYAZOVKIN, S. et al. ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data. **Thermochimica Acta**, v. 520, n. 1, p. 1-19, 2011.

VYAZOVKIN, S. et al. ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations. **Thermochimica Acta**, v. 590, p. 1-23, 2014.

TERIFE, Graciela et al. Hot melt mixing and foaming of soluplus® and indomethacin. **Polymer Engineering & Science**, v. 52, n. 8, p. 1629-1639, 2012.

TIȚA, B. et al. Comparative kinetic study of decomposition of some diazepam derivatives under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 94, n. 2, p. 447-452, 2008.

TIȚA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221-227, 2011.

TIȚA, D.; FULIAȘ, A.; TIȚA, B. Thermal stability of ketoprofen. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1979-1985, 2013.

TITA, B. et al. Compatibility study between indomethacin and excipients in their physical mixtures. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 118, n. 2, p. 1293-1304, 2014.

TOMASIC, T. et al. Novel 2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase targeting D-Glu- and diphosphate-binding sites. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3964-3975, 2011.

Young, R. A.; Larson, A.C.; Paiva-Santos, C. O., Program DBWS-9807A – Rietveld analysis of X-ray and neutron powder diffraction patterns, **User's Guide**, 2000.

WHO. World Health Organization, 2014.

Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>> Acessado em: 19 março 2015.

WHO. World Health Organization, 2015a. Disponível

em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/> Acessado em: 21 setembro 2015.

WHO. World Health Organization, 2015b. Disponível

em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acessado em: 21 setembro 2015.

ZHANG, H. et al. Study on the thermal degradation behavior of sulfone-containing polybenzoxazines via Py-GC-MS. *Polymer Degradation and Stability*, v. 111, p. 38-45, 2015.

ZIDAR, N. et al. Discovery of Novel 5-Benzylidenetherhodanine and 5-Benzylidenethiazolidine-2,4-dione Inhibitors of MurD Ligase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 6584-6594, 2010.

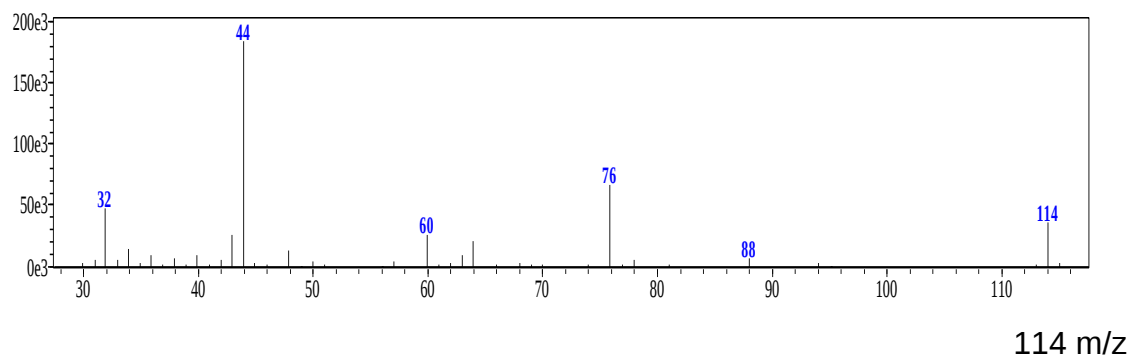
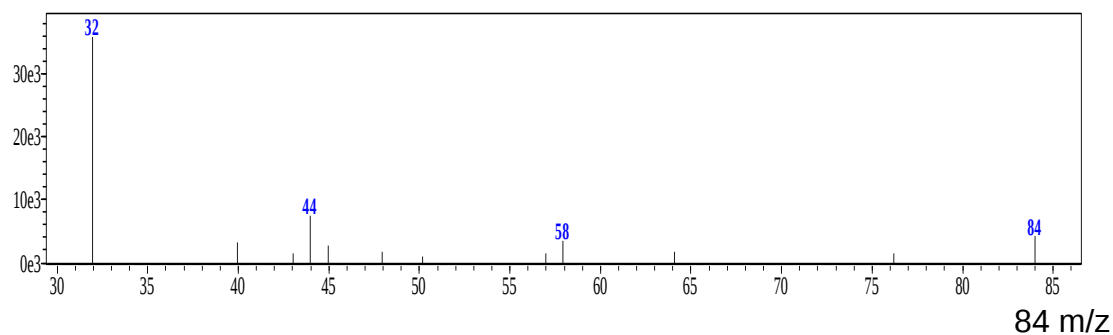
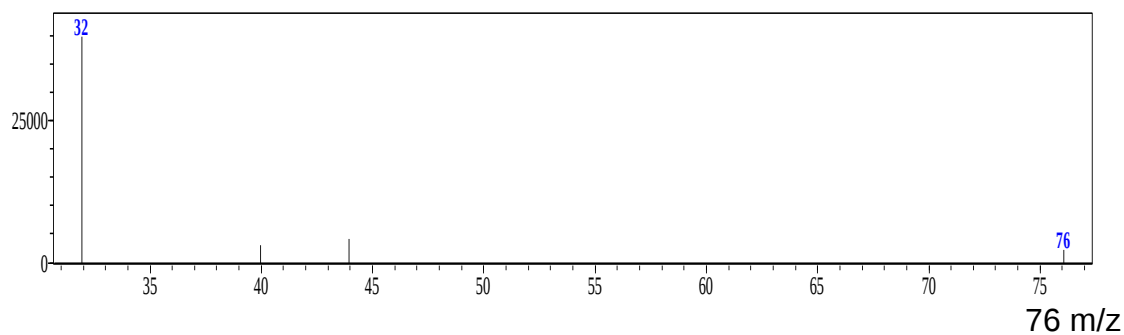
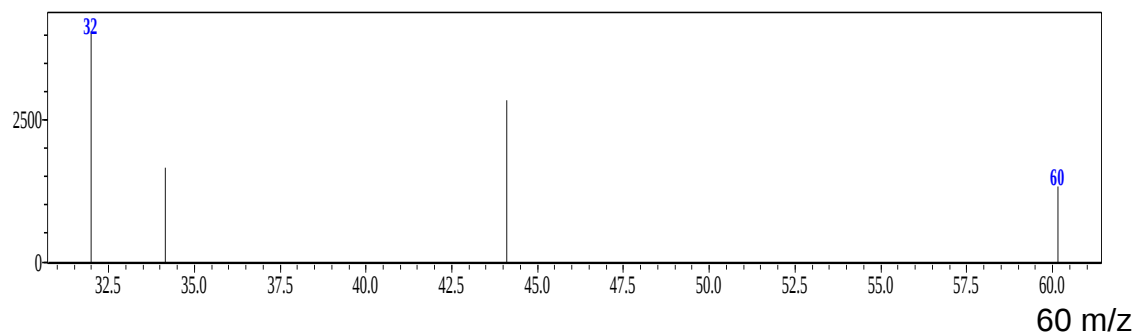
WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871-1877, 2012.

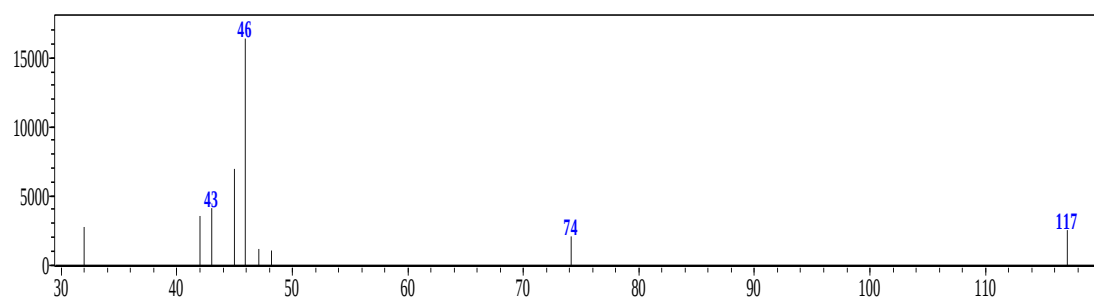
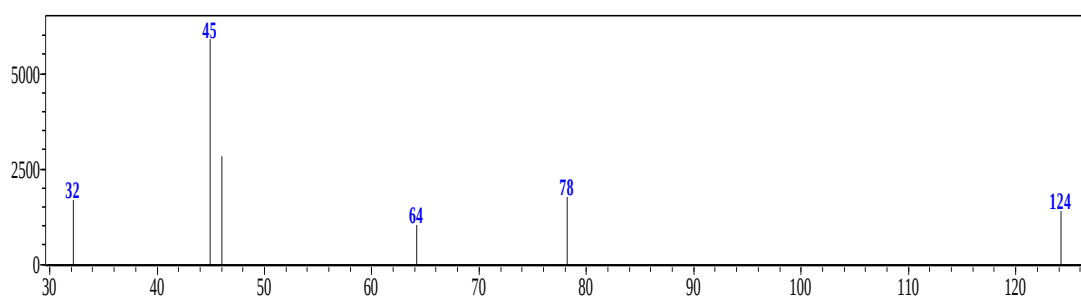
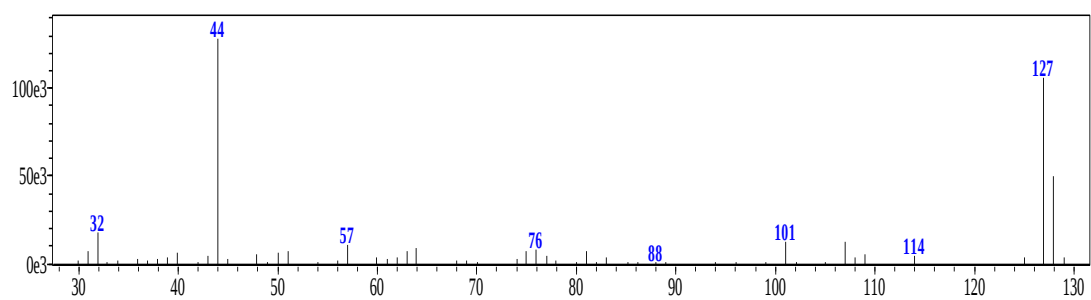
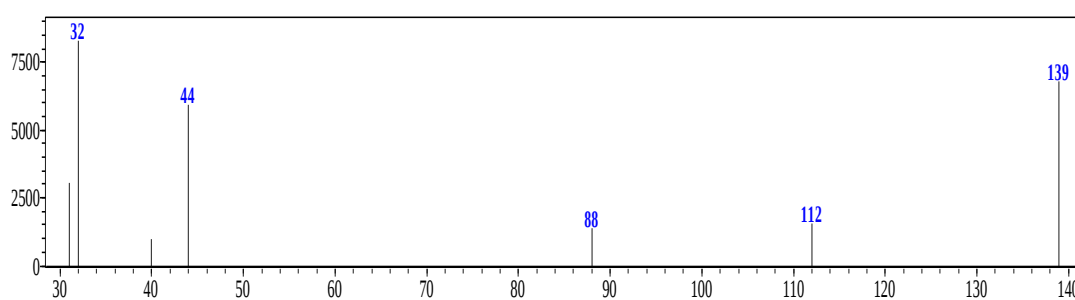
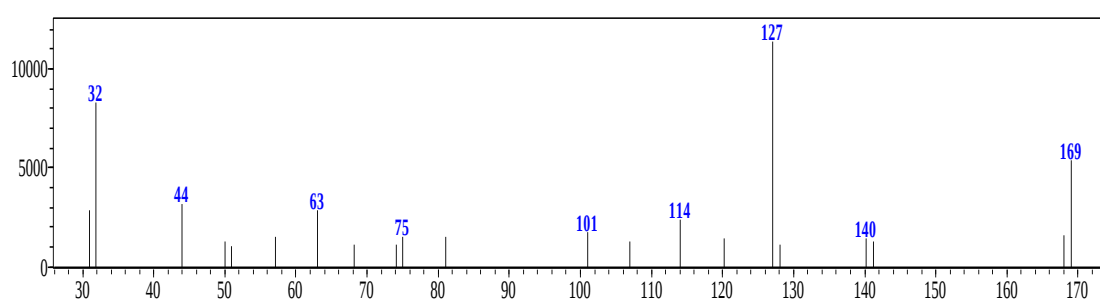
WITZLEB, R. et al. Influence of needle-shaped drug particles on the solid lipid extrusion process. **Powder Technology**, v. 207, n. 1, p. 407-413, 2011.

WORZAKOWSKA, M.; ŚCIGALSKI, P.. Synthesis and thermal behavior of linear neryldiesters in inert and oxidative atmosphere. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 1, p. 783-792, 2014.

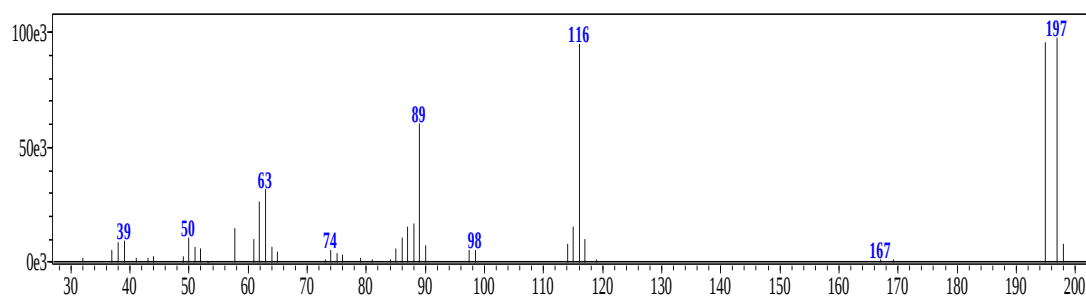
APÊNDICE A – Espectros de massa dos comatogramas

Figura 33 - Espectros de massa obtidos por Pir-CG/EM para os diferentes compostos químicos utilizados ou formados a partir da pirólise.

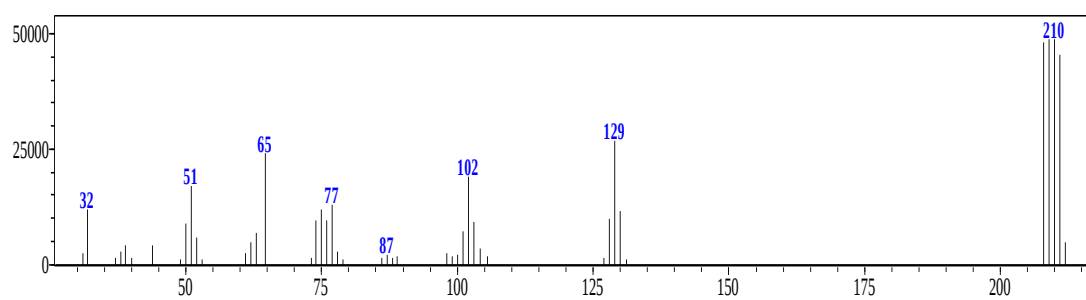


117 m/z 124 m/z 127 m/z 139 m/z 

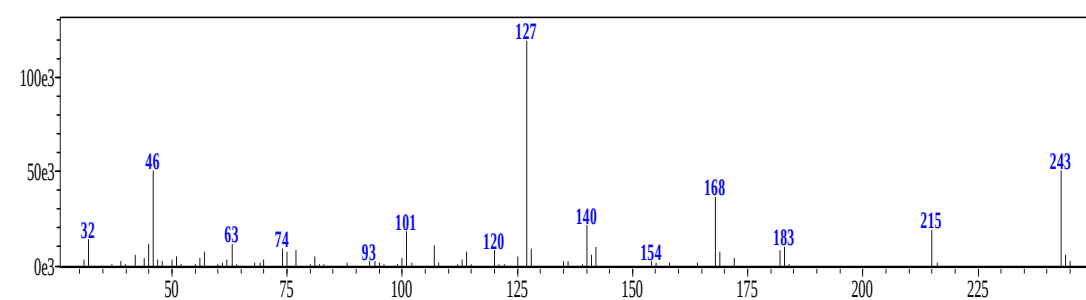
169 m/z



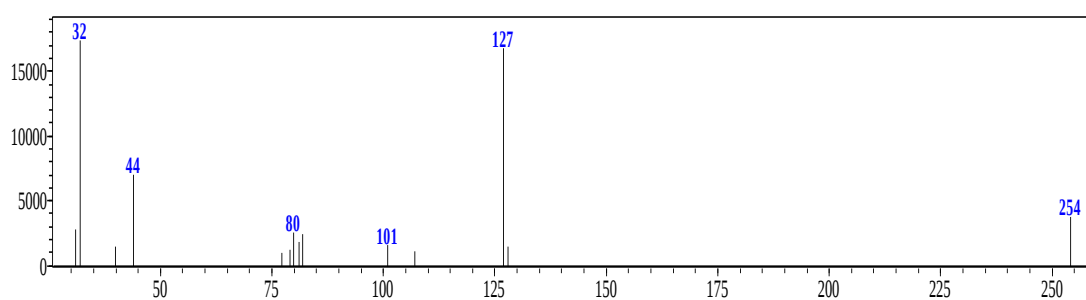
197 m/z



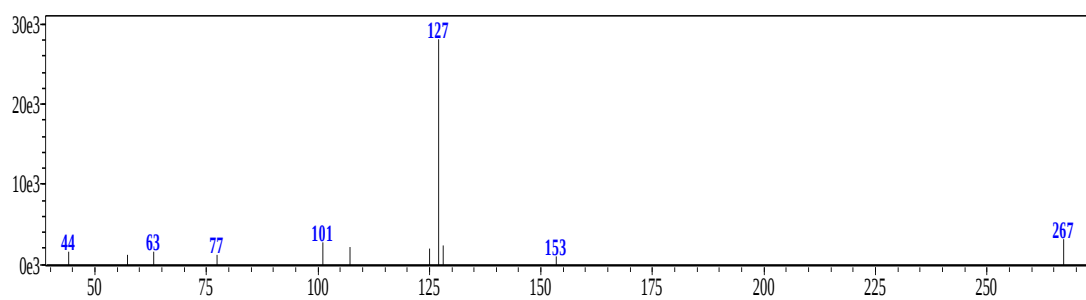
210 m/z

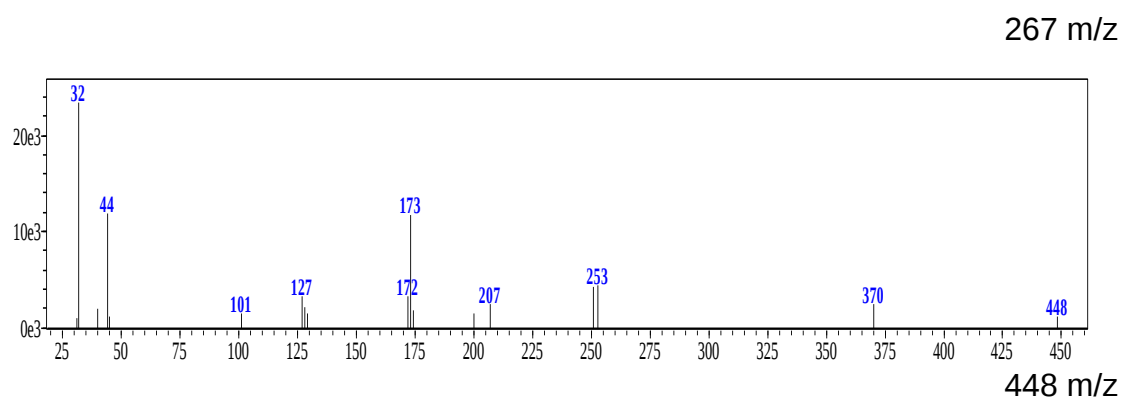


243 m/z



254 m/z





Os números em azul são os valores das quebras dos compostos por pirólise, e o número mais à direita do espectro de massa refere-se ao íon molecular do composto formado ou volatilizado.