



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

LAURA MARIA TEODORIO VIDAL

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, POLIMORFISMO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS
RIPARINAS

FORTALEZA – CE

2017

LAURA MARIA TEODORIO VIDAL

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, POLIMORFISMO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS
RIPARINAS

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala.

FORTALEZA – CE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V691e Vidal, Laura Maria Teodoro.
Elucidação estrutural, polimorfismo e estudo físico-químico das riparinas / Laura Maria Teodoro Vidal. –
2017.
46 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Alejandro Pedro Ayala.
1. Riparina I e II. 2. Elucidação estrutural. 3. Análise térmica. 4. Polimorfismo. 5. Espectroscopia
vibracional. I. Título.

CDD 615

LAURA MARIA TEODORIO VIDAL

ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, POLIMORFISMO E ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DAS
RIPARINAS

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharela em Farmácia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Tamara Gonçalves Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais e à minha irmã e a todos que
acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e verba para realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala, pela excelente orientação e por se tornar, diversas vezes, um pai durante esses anos de iniciação científica. Obrigada pela paciência.

A Profa. Dra. Cléa Florenço de Sousa, por ter me orientado nos dois primeiros anos de graduação e ter me inserido no meio da pesquisa acadêmica.

A Profa. Dra. Kalyne Almeida, por ter me apresentado ao Prof. Dr. Alejandro e ter aberto meus olhos para esta linha de pesquisa. Obrigada por ter aceito avaliar este trabalho e contribuir de forma construtiva com suas observações, colocações e correções.

À Profa. Dra. Tamara Gonçalves pelos ensinamentos dados no último semestre de curso e ensinado que o bom profissional é aquele que tem brilho no olho. Agradeço também por ter aceitado compor a banca examinadora deste trabalho.

À Anaclecia Moreira, pela amizade durante esses cinco anos de graduação. Obrigada pelas brincadeiras, risadas, lanches na cantina da química e estudos em grupo.

À Beatriz Bezerra, pela orientação durante esses anos de pesquisa. Obrigada pela amizade e pelo apoio tanto acadêmico como pessoal.

Ao Bruno Sousa, por ter me ajudado diversas vezes a usar os equipamentos necessários a este trabalho. Obrigada pela amizade e por acreditar em mim e na minha colação de grau.

À Jessica Castro, pela excelente ajuda e orientação. Obrigada por tantos ensinamentos.

À Keilla Façanha, que se tornou uma amiga de grande valor quando mais precisei. Obrigada por todo apoio, incentivo e por diversas vezes ter me cedido material de estudo e ter sanado minhas dúvidas.

À Silmara Alves e Yara Santiago, que além de colegas de laboratório se tornaram grandes amigas e companheiras de viagem. Agradeço por todo o apoio, ajuda e ensinamentos no âmbito acadêmico, mas agradeço principalmente pela amizade e amor que recebi de vocês.

Ao Wellington Castro e Wendell Saraiva, por terem se tornados tão especiais para mim. Lembrarei sempre de vocês.

À minha família pelo apoio emocional durante esses cinco longos anos de graduação. Não foi fácil. Sem vocês eu não teria conseguido.

Ao Rodrigo Diógenes, pelo companheirismo, compreensão, carinho e paciência neste último semestre de curso. Obrigada.

À Thais Vieira, por todo apoio e conversa durante esses meses. Sempre foi de grande ajuda e estímulo.

À todos que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho, muito obrigada.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.” (Louis Pasteur)

RESUMO

As riparinas I e II são alcaloides que foram isoladas e sintetizadas por Barbosa-Filho *et al.* (1990), sendo provenientes de uma típica planta da Amazônia, cientificamente denominada de *Aniba riparia*. Essas moléculas são formadas a partir da junção da tiramina com o ácido benzoico, e suas estruturas químicas se diferem pela substituição de uma hidroxila no anel aromático. Diversos pesquisadores iniciaram estudos sobre seus potenciais efeitos terapêuticos em estudos pré-clínicos, elucidando seus efeitos terapêuticos em modelos comportamentais animais, dentre eles efeitos antidepressivos, ansiolíticos e antibacterianos. Este projeto teve como objetivo principal a caracterização físico-química das riparinas I e II, com foco na análise térmica e identificação de possíveis polimorfos. Para obtenção desses resultados, diversas técnicas foram utilizadas, como: Espectroscopia Raman e de absorção na região do infravermelho, termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), difração de raios-X em pó (DRXP) e raios-X de monocristal (DRXM). A estrutura cristalina da riparina II foi elucidada, visto não haver dados reportados na literatura. A riparina II apresentou um maior ponto de fusão em relação a riparina I, que pode ser explicado pela hidroxila a mais na estrutura química da riparina II, que forma uma ligação intramolecular $O7A \cdots H2A - O2A$, ocasionando uma maior estabilidade nesta substância. Além disso, foi possível identificar o fenômeno do polimorfismo na riparina I, tornando seu estudo essencial a fim de evitar polimorfos menos estáveis e menos seguros, garantindo a segurança e a eficácia na administração do produto e a otimização dos estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Riparina I e II. Difração de raio-X. Elucidação estrutural. Análise térmica. Polimorfismo. Espectroscopia vibracional.

ABSTRACT

Riparins I and II are alkamides that have been isolated and synthesized by Barbosa-Filho *et al.* (1990). from a typical Amazonian plant, scientifically called *Aniba riparia*. These molecules are formed from the junction of tyramine with benzoic acid, and their chemical structures differ by the substitution of a hydroxyl in the aromatic ring. Several researchers have begun studies on its potential therapeutic effects in preclinical studies, elucidating its therapeutic effects in animal behavioral models, including antidepressant, anxiolytic and antibacterial effects. This project had the main objective the physical-chemical characterization of riparins I and II, focusing on thermal analysis and identification of possible polymorphs. In order to obtain these results several techniques were used, such as: Raman and infrared spectroscopy, thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD) and single-crystal X-ray diffraction (SCXRD). The crystalline structure of riparin II was elucidated, due there is no data reported in the literature. Riparins II a higher melting point compared to riparin I, which can be explained by the hydroxyl in the chemical structure of riparin II, that forms an intramolecular bonding $O7A \cdots H2A - O2A$, occasioning a major stability in this substance. Moreover, it was possible to detect the phenomenon of the polymorphism in riparina I, becoming its study essential in order to avoid less stable and less secure polymorphs, ensuring safety and efficacy in administering the product and optimizing preclinical studies.

Keywords: Riparin I. Riparin II. X-Ray Diffraction. Crystalline structure elucidation. Thermal analysis. Polymorphism. Vibrational spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da riparina I (a), riparina II (b), riparina III (c) e riparina IV (d).	12
Figura 2 - Estrutura química da riparina I (a), riparina II (b), riparina III (c) e riparina IV (d).	15
Figura 3 - Esquema de classificação de formas sólidas.....	18
Figura 4 - Curva DSC/TG da riparina I.	27
Figura 5 - Curvas de DSC da riparina I.	28
Figura 6 - Difração de raios-X em pó da riparina I e riparina I recristal.....	30
Figura 7 - Difratoograma da riparina I em função da temperatura.....	31
Figura 8 - Difratoograma comparando polimorfo α e β , riparina I à 45° C e 120° C.	32
Figura 9 - Difratoograma comparando polimorfo β , α , δ e riparina I à 25 °C.....	33
Figura 10 - Difratoogramas da riparina I por <i>Marques et al.</i> (2005) e os polimorfos descritos nesta monografia.....	34
Figura 11 - Espectro Raman dos polimorfo β e α	35
Figura 12 - Cristal da riparina II.....	36
Figura 13 - Projeção do eixo a da cela unitária da riparina II.	37
Figura 14 - Unidade assimétrica da riparina II.	38
Figura 15 - Padrão experimental (a) e padrão calculado (b) da riparina II.	40
Figura 16 - Espectro infravermelho e Raman da riparina II.....	41
Figura 17 - Espectro Raman da riparina I e II.	42
Figura 18 - Curva de DSC/TG da riparina II.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais técnicas utilizadas na análise térmica.	24
Tabela 2 - Dados cristalográficos da riparina II.	37
Tabela 3 - Ligações intermoleculares na riparina II.	39

SUMÁRIO

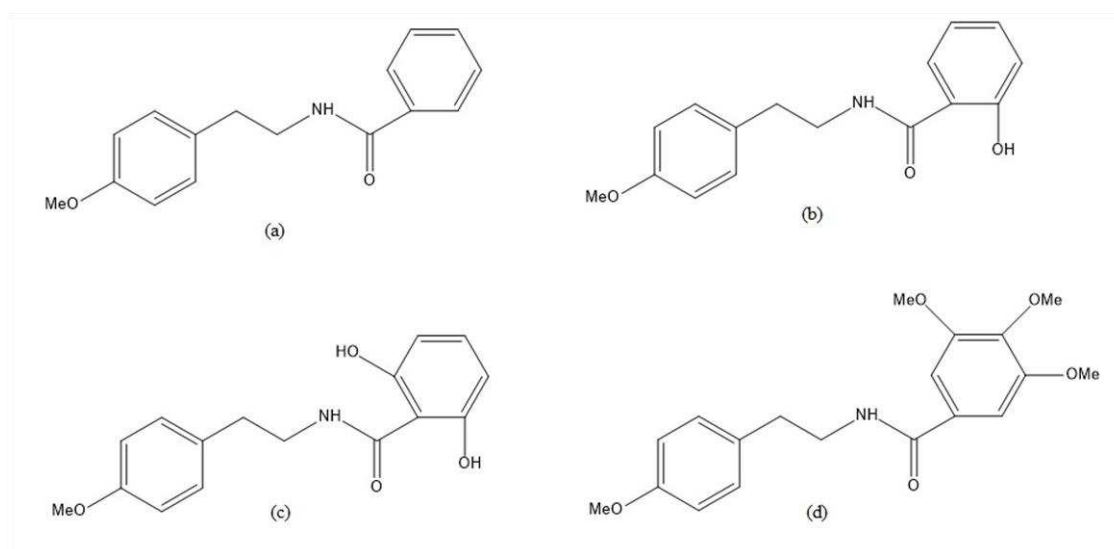
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	14
2.1 <i>Aniba riparia</i> e riparinas	14
2.2 Potencial efeito terapêutico das riparinas	15
2.3 A importância do estudo das formas sólidas	16
2.4 Formas cristalinas de fármacos	17
2.4.1 <i>Polimorfo</i>	18
2.4.2 <i>Solvatos/Hidratos</i>	19
2.4.3 <i>Sais</i>	19
2.4.4 <i>Co-cristais e amorfos</i>	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Matéria prima	22
4.2 Microscopia óptica	22
4.3 Espectroscopia Vibracional.....	22
4.3.1 <i>Espectroscopia vibracional Raman</i>	22
4.3.2 <i>Espectroscopia vibracional de infravermelho</i>	22
4.4 Difração de raios-X em pó	23
4.5 Difração de raios-X de Monocristal	23
4.6 Análise Térmica	24
4.6.1 <i>Termogravimetria (TG)</i>	24
4.6.2 <i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	25
5 RESULTADOS	26

5.1 RIPARINA I.....	26
5.1.1 <i>Análise Térmica</i>	26
5.1.1.1 <i>Termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	26
5.1.2 <i>Difração de raios-X em pó</i>	29
5.1.3 <i>Espectroscopia vibracional Raman</i>	35
5.1.4 <i>Classificação dos polimorfos</i>	35
5.2 RIPARINA II.....	36
5.2.1 <i>Descrição da estrutura cristalina</i>	36
5.2.2 <i>Difração de raios-X em pó</i>	39
5.2.3 <i>Espectroscopia vibracional</i>	40
5.2.4 <i>Análise térmica</i>	42
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

As riparinas I e II, ilustradas na Figura 1, juntamente com as riparinas III e IV, são substâncias que foram isoladas e sintetizadas por Barbosa-Filho *et al.* (1990). As riparinas III e IV estão ilustradas aqui apenas para efeito de comparação entre as quatro substâncias. A riparina IV é uma exceção, pois não tem origem vegetal e foi desenhada e sintetizada para possuir o mesmo núcleo das demais riparinas. Essas substâncias são formadas a partir da junção da tiramina com o ácido benzoico e diferem entre si principalmente pelas substituições das hidroxilas no anel aromático, exceto pela riparina IV que possui grupos metóxi substituídos.

Figura 1 - Estrutura química da riparina I (a), riparina II (b), riparina III (c) e riparina IV (d).



Fonte: Elaborada pelo autor.

As riparinas I, II e III são oriundas de uma planta típica da Amazônia, popularmente conhecida como “louro”, e portadora do nome científico *Aniba riparia*. Essas substâncias são, portanto, produtos naturais, mais especificamente alcaloides naturais, provenientes da metabolização da planta, denominados como metabólitos secundários ativos, com ação sobre células do sistema nervoso central (TORRES; CHAVES, 2001).

Essa característica das riparinas levou a diversos pesquisadores estudarem seus potenciais efeitos terapêuticos em estudos pré-clínicos, e no decorrer dos últimos anos, inúmeros artigos e trabalhos científicos foram publicados sobre essas substâncias, elucidando seus efeitos terapêuticos em modelos comportamentais animais em neurociência.

Durante o desenvolvimento e estudo de substâncias que apresentam atividade biológica e são candidatas a possíveis novos fármacos, é necessário realizar caracterização

físico-química, pois para substâncias no estado sólido, o arranjo dos átomos influencia em determinadas propriedades das substâncias, como ponto de fusão, solubilidade e absorção e biodisponibilidade. Esses estudos são necessários especialmente quando ocorre o fenômeno do polimorfismo, onde as moléculas podem se arranjar em duas ou mais formas diferentes ao longo da sua estrutura. Dessa forma, entender a substância no seu aspecto químico e físico é essencial para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica segura, eficaz e de qualidade.

Diversas técnicas específicas são usadas para caracterizar e estudar as substâncias no estado sólido. Dentre as características físico-químicas, esta monografia teve o objetivo de elucidar a estrutura cristalina da riparina II, com o intuito de compreender como essa substância se comporta no estado sólido. Teve também o objetivo de estudar o polimorfismo e o perfil térmico, bem como de determinar as vibrações moleculares através da espectroscopia vibracional.

De acordo com o exposto anteriormente, entende-se a relevância deste trabalho, que tem o intuito de caracterizar as riparinas I e II, visando compreendê-las física e quimicamente, garantindo a segurança e a eficácia na administração dessas substâncias em ensaios pré-clínicos e padronizar as riparinas que são utilizadas nestes estudos, otimizando, assim, os ensaios realizados.

Esta monografia está dividida em 5 tópicos, sendo este o primeiro, que teve como finalidade apresentar o objeto de estudo e sua relevância ao leitor. O tópico II refere-se à revisão de literatura, o qual traz definições e explicações relevantes à compreensão deste trabalho. O tópico III especifica os objetivos e o tópico IV aborda os materiais e métodos utilizados para realização deste trabalho. O tópico V apresenta os resultados obtidos das análises feitas da riparina I e II, respectivamente, abordando desde a elucidação da estrutura cristalina até a determinação do perfil térmico. Por fim, o tópico VI traz conclusões sobre o trabalho realizado.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

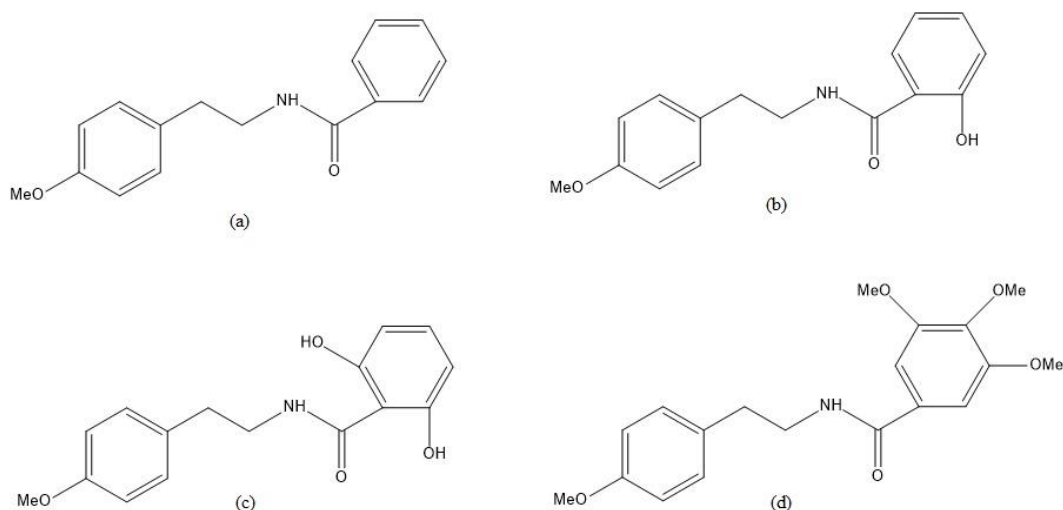
2.1 *Aniba riparia* e riparinas

O gênero *Aniba* faz parte da família Lauraceae, popularmente conhecida como “louro” na Amazônia, abrangendo cerca de 40 espécies de plantas, sendo possível encontrar esse gênero na Amazônia e na Guiana. Análises químicas foram realizadas nas cascas do caule, tornando possível identificar e isolar diversos compostos químicos, como flavonoides, benzilbenzoatos e benzaldeídos. O mesmo ocorreu com o estudo realizado no fruto verde da planta, no qual compostos como benzilbenzoatos, feniletilaminas (O-metil-tiramina) e alguns alcaloides, mais especificamente alcalmidas, foram isolados (BARBOSA-FILHO, 1987).

Do fruto verde *Aniba riparia* (Ness) MEZ foram isolados ésteres metílicos, como N-benzoiltiramina (Riparina I), N-(-2-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina II) e N-(2,6-dihidroxibenzoil) tiramina (Riparina III) (BARBOSA-FILHO, 1987). Essas alcalmidas constituem um grupo especial de alcaloides, por possuírem uma função amida restrita a poucos representantes da natureza. São produtos de metabolização, sendo então, metabolitos secundários, considerados compostos bioativos que apresentaram previamente resposta sobre células do sistema nervoso central (BARBOSA-FILHO, 1990).

As riparinas, Figura 2, são substâncias que apresentaram potenciais efeitos terapêuticos em estudos pré-clínicos em modelos comportamentais animais em neurociência. A diferença entre as três primeiras riparinas se dá pela substituição de uma hidroxila no primeiro anel aromático (R1) da riparina II e duas hidroxilas no R1 da riparina III, enquanto a riparina I não possui nenhuma hidroxila substituída no R1. Ao contrário das demais riparinas, a riparina IV foi posteriormente sintetizada, possuindo o mesmo núcleo das riparinas isoladas da *Aniba riparia*, diferindo das demais por possuir três grupos metóxi ligados ao primeiro anel aromático. (BARBOSA-FILHO, 1990).

Figura 2 - Estrutura química da riparina I (a), riparina II (b), riparina III (c) e riparina IV (d).



Fonte: Elabora pelo autor.

2.2 Potencial efeito terapêutico das riparinas

Vários estudos farmacológicos em modelos comportamentais foram realizados utilizando as riparinas isoladas da *Aniba riparia* como drogas-testes. Esses estudos tinham como intuito investigar seus efeitos biológicos.

A maioria dos estudos realizados são referentes à utilização das alcamidas da *Aniba riparia* sobre o Sistema Nervoso Central, mais especificamente sobre a possível atividade antidepressiva e ansiolítica dessas substâncias em camundongos. O interesse nas riparinas, que levou à realização de testes neurocomportamentais, está relacionado à estrutura química dessas moléculas, que possuem em sua composição a tiramina, molécula reconhecida por sua atividade central. Dessa forma, as riparinas I, II e III tiveram sua atividade antidepressiva e ansiolítica demonstrada através de modelos experimentais animais, crônicos e agudos, realizados pelo Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Federal do Ceará (DE SOUSA *et al.*, 2004, 2005, 2007).

Estudos realizados por Castelo-Branco *et al.* (1992) demonstraram que as riparinas I e III apresentaram efeito relaxante sobre a musculatura lisa, sendo a riparina I mais potente que a III (CASTELO-BRANCO, 1992). Em 2005, Catão *et al.*, demonstrou que as riparinas I e III, individualmente, podiam apresentar um potencial efeito antimicobriano contra cepas de microorganismos multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (CATÃO *et al.*, 2005).

O efeito anti-inflamatório também foi atribuído às riparinas I, II e IV através de estudos realizados também pelo Laboratório de Neurofarmacologia da UFC (ARAÚJO *et al.*, 2012; CARVALHO, 2011; DIAS, 2011).

2.3 A importância do estudo das formas sólidas

A primeira fase da pré-formulação de novos fármacos tem início quando fármacos recém-sintetizados ou recém-descobertos, demonstram atividade biológica em testes pré-clínicos em modelos animais, com possível ação terapêutica no ser humano. Assim como, o estudo toxicológico das substâncias testes devem ser realizados. Os estudos da fase de pré-formulação devem considerar as propriedades físico-químicas que são passíveis de afetar o desempenho adequado da futura forma farmacêutica (LACHMAN, 2001).

As características físico-químicas e biológicas de princípios ativos são fatores determinantes para garantir a segurança, a eficácia e a qualidade da formulação farmacêutica. Esses fatores devem ser amplamente estudados durante a fase de desenvolvimento de novos fármacos, a fim de se obter uma formulação com biodisponibilidade adequada, para que haja uma ação farmacológica desejada com o mínimo de efeitos indesejáveis ou tóxicos (STORPIRTIS, 2011).

As formas sólidas são as formas mais comercializadas e aceitas pelos pacientes adultos, exceto por aqueles que são impossibilitados de receber medicamentos por via oral. O grande número de formas farmacêuticas no estado sólido deve-se a sua alta estabilidade, facilidade de manuseio e distribuição (DATTA, 2004).

Quando se trata de fármacos no estado sólido, deve-se ressaltar que a disposição dos átomos e moléculas determina suas propriedades químicas e físicas, podendo afetar sua performance, como tamanho de partículas, densidade, perfil de solubilidade, perfil de dissolução e perfil de estabilidade (DATTA, 2004). Além disso, fármacos e substâncias que se encontram nesse estado, podem ter fluidez e compactação de comprimidos afetados. Por estas razões, o estudo das formas sólidas é tão relevante (LACHMAN, 2001; FLORENCE, 2011).

Os fármacos no estado sólido podem ser constituídos por estrutura cristalina ordenada ou apresentar desordem à nível molecular. Portanto, esses fármacos devem ser estudados com mais atenção, pois as formas cristalinas podem sofrer alterações durante a fase de desenvolvimento, ocorrendo o aparecimento de formas polimórficas, bem como solvatos,

hidratos e amorfos, que também podem afetar propriedades físico-químicas, como estabilidade, ponto de fusão, absorção e solubilidade.

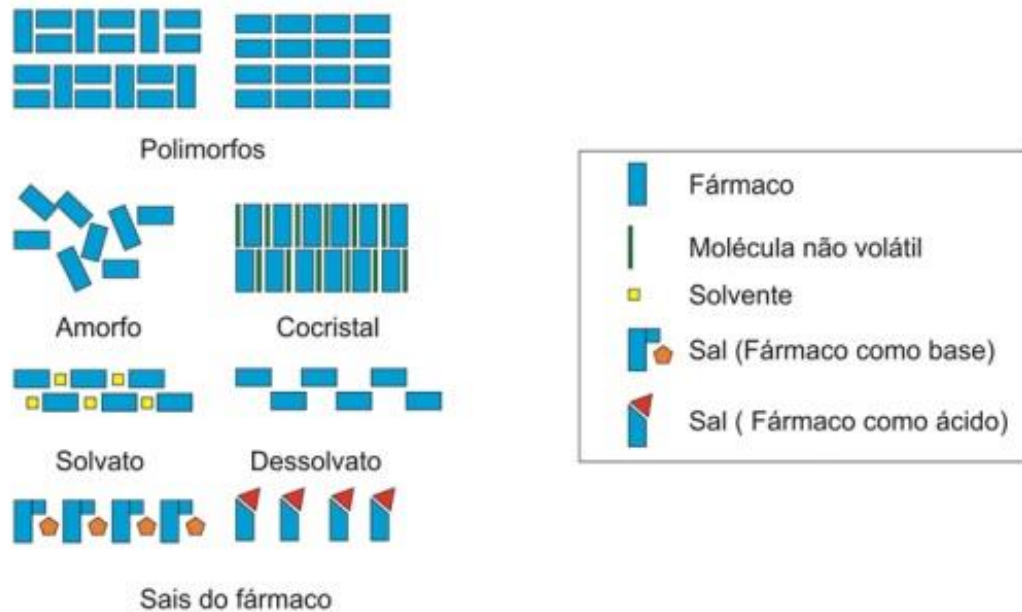
Além disso, como mencionado previamente, a eficácia terapêutica de uma substância está estritamente ligada às suas características físico-químicas no estado sólido. Dessa forma, entende-se que a caracterização e o estudo físico-químico dessas substâncias é de extrema importância no processo de desenvolvimento de um novo fármaco (NEWMAN, 2008).

2.4 Formas cristalinas de fármacos

No estado sólido, quando os fármacos possuem arranjos de moléculas e átomos altamente ordenados, unidos por interações não covalentes, denomina-se de cristais, que são definidos como sólidos que possuem ordem translacional de longo alcance (FLORENCE, 2011; TILLEY, 2014). São formados por celas unitárias, que são definidas como a menor unidade de um cristal. No seu interior, cada cela unitária possui o mesmo tamanho e contém o mesmo número de átomos, arranjados da mesma maneira, repetindo-se em três dimensões, formando assim o cristal (FLORENCE, 2011).

Os fármacos no estado sólido, que são classificados como cristalinos, podem possuir mais de uma forma e diferentes classificações, como mostrado na Figura 3. Podem ser classificados como sólidos monocomponentes ou sólidos multicomponentes (STORPIRTIS, 2011). Além disso, um mesmo fármaco pode ter o arranjo das suas moléculas em duas ou mais formas diferentes no cristal, e a isso dá-se o nome de polimorfismo.

Figura 3 - Esquema de classificação de formas sólidas



Fonte: Adaptado de Hilfiker, 2006.

Os sólidos monocomponentes são aqueles que possuem apenas uma substância na sua estrutura cristalina. Por sua vez, os sólidos multicomponentes são definidos por fármacos que possuem mais de uma substância na sua estrutura cristalina, como solvatos, sais e cocristais (STORPIRTIS, 2011).

2.4.1 Polimorfo

Quando uma substância apresenta o fenômeno do polimorfismo, as moléculas se arranjam em duas ou mais formas diferentes no cristal. O polimorfismo pode ou não mudar o hábito cristalino da substância, ou seja, não se pode identificar o polimorfismo pela morfologia do cristal. As mudanças no arranjo das moléculas podem acontecer de duas formas: as moléculas podem se empacotar de forma diferente no retículo cristalino, ou então, podem sofrer variações na orientação ou conformação das moléculas nos sítios do retículo. Essas variações causam alterações nos padrões de difração de raios-X, sendo então, essa técnica a mais indicada para detecção de polimorfo (FLORENCE, 2011).

O polimorfismo pode alterar inúmeras propriedades farmacêuticas, como solubilidade e ponto de fusão. Portanto, analisar, identificar e estudar o polimorfismo durante o desenvolvimento de novos fármacos é de extrema importância. Como exemplo, pode ser

citado que 70% dos barbitúricos, 60% das sulfonamidas e 23% dos esteroides possuem polimorfos (STORPIRTIS, 2011).

O polimorfismo está ligado diretamente à eficácia terapêutica, e com a finalidade de exemplificar essa influência sobre as propriedades físico-químicas, será citado aqui o palmitato de cloranfenicol, que possui dois polimorfos reportados na literatura, denominados A e B. Esses dois polimorfos possuem diferenças significativas na biodisponibilidade, sendo a forma B a que possui uma atividade terapêutica mais acentuada do que a forma A. Estudos foram realizados à fim de impedir a comercialização da forma A, assim sendo, a Farmacopeia Americana implementou um teste para quantificar o polimorfo A, não podendo exceder 10% em sua quantidade (STORPIRTIS, 2011).

2.4.2 Solvatos/Hidratos

Durante o processo de cristalização de um ativo qualquer, utilizando um determinado solvente, quando as moléculas desse ativo capturam as moléculas desse determinado solvente, incorporando na estrutura cristalina, denomina-se de solvato, ou seja, isso ocorre quando as moléculas do solvente empacotam-se e cristalizam-se juntamente com as moléculas do ativo. Essas moléculas do solvente podem associar-se ao sólido através de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals ou dipolo-dipolo. Quando este solvente é água, a forma sólida é chamada de hidrato.

2.4.3 Sais

Durante o processo de cristalização, quando ocorre reação ácido-base com transferência de cargas, há formação de sais, ou seja, isso ocorre quando sólidos contêm o fármaco protonado e o seu correspondente contraíon incorporados na estrutura cristalina (STORPIRTIS, 2011). Os sais são desejáveis quando os fármacos possuem problemas de cristalização, solubilidade, pontos de fusão baixos e alta presença de polimorfismo.

2.4.4 Co-cristais e amorfos

Os co-cristais são definidos como os sólidos que possuem moléculas de fármacos e coformadores ou outros fármacos incorporados à estrutura cristalina do fármaco original. Em

contrapartida e diferente dos demais sólidos, os amorfos acontecem quando o fármaco ou ativo não possui uma estrutura cristalina ordenada, ou seja, possui desordem a nível molecular.

Os amorfos possuem propriedades físico-químicas interessantes, como alta solubilidade, baixo ponto de fusão, maior velocidade de dissolução, porém apresentam uma menor estabilidade termodinâmica, o que acarreta no seu pouco uso durante a produção de cristais farmacêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar o estudo físico-químico das riparinas I e II.

3.2 Objetivos específicos

Elucidar a estrutura cristalina da riparina II.

Caracterizar as riparinas através de técnicas estruturais e espectroscópicas, microscopia e de análise térmica.

Identificar possíveis polimorfos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria prima

Riparina I e II foram fornecidas pela Universidade Federal da Paraíba.

4.2 Microscopia óptica

Os cristais foram examinados com um microscópio óptico Leica (Modelo DM, 2500P), tornando possível verificar o hábito cristalino.

4.3 Espectroscopia Vibracional

Uma das técnicas empregadas no estudo do estado sólido refere-se à espectroscopia vibracional. Neste estudo foram utilizadas as espectroscopias Raman e de absorção na região do infravermelho para determinar as vibrações moleculares das riparinas I e II.

4.3.1 Espectroscopia vibracional Raman

Espectroscopia refere-se às técnicas que estudam a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria, sendo a determinação dos níveis energéticos de átomos e moléculas, o objetivo principal dessas técnicas. Uma dessas técnicas refere-se à espectroscopia Raman.

Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) acoplado ao equipamento da Bruker Optics, modelo Módulo RAM II, com um laser Nd :YAG (1064 nm).

4.3.2 Espectroscopia vibracional de infravermelho

As análises de infravermelho apresentadas neste trabalho foram realizadas em um espectrômetro de transformada de Fourier VERTEX 70 da Bruker Optics, com detector DTGS para região do infravermelho médio (MIR), através de um acessório de Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR), sobre um cristal de ZnSe.

4.4 Difração de raios-X em pó

Em meados do século XX, descobriu-se que os raios-X podem ser difratados pelos cristais de modo que o arranjo atômico ordenado pode ser definido. Essa radiação incidente é difratada de forma única para cada configuração estrutural, sendo assim, conhecida como padrão de difração. De acordo com o arranjo dos átomos, a posição e a intensidade dos feixes difratados podem ser alterados (TILLEY, 2014).

A difração de raio-X em pó (DRXP) é a técnica mais empregada na área farmacêutica e de polímeros, devido a sua simplicidade em relação ao DRXM, fornecendo informações sobre o grau de cristalinidade e identidade da amostra através da comparação de difratogramas (DA CUNHA, 2007). Entretanto, a técnica mais utilizada para determinação da estrutura cristalina de uma substância é a difração de raio-X de monocristal (DRXM), devido a sua capacidade de permitir maior número de dados coletados de um maior número de planos cristalinos obtendo assim mais dados cristalinos.

Os difratogramas apresentados neste trabalho foram obtidos utilizando-se o método de difração de raios-X em pó (DRXP) em um instrumento convencional D8 Advanced da Bruker AXS, equipado com um goniômetro theta/theta, acoplado na geometria de transmissão, com porta-amostra fixo e fonte de radiação Cu K α (0,15419 nm). Este equipamento permite que sejam realizadas medidas com variação de temperatura através do uso de uma câmara Anton Paar, modelo TCU 110. As medidas foram realizadas sob uma tensão de aceleração de 40 kV e corrente de 40 mA, na geometria de Bragg Brentano.

4.5 Difração de raios-X de Monocristal

Diferente da difração de raios-X em pó, no qual a estrutura cristalina só pode ser definida através do Método de Rietveld, a difração de raio-X de monocristal necessita apenas de um simples cristal para determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a substância e a posição relativa de todas as moléculas na cela unitária, obtendo assim a estrutura cristalina (SILVA, 2016).

Os cristais utilizados para análise de difração de raios-X em monocristais foram selecionados utilizando-se um microscópio óptico, sendo a estrutura cristalina da Riparina II resolvida em colaboração com o Cryssmat-Lab da Universidade de la Republica Montevideo, na qual as intensidades de difração de raios-X foram coletadas utilizando um difratometro

Bruker SMART X2S usando grafite-monocromada de radiação $\text{CuK}\alpha$ (1.54178 Å) em temperatura ambiente.

4.6 Análise Térmica

Análise térmica refere-se a um grupo de técnicas que possuem a característica de medir a resposta de um material a um aquecimento ou resfriamento de forma controlada, sendo o objetivo principal dessas técnicas estabelecer a relação entre a temperatura e as propriedades físicas de um material (MENCZEL e PRIME, 2009). Cada uma dessas técnicas é capaz de avaliar uma propriedade física diferente, como mostrado na tabela a seguir:

Tabela 1 - Principais técnicas utilizadas na análise térmica.

Técnica utilizada	Propriedade medida
Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	Entalpia
Termogravimetria (TG)	Massa
Termogravimetria diferencial (DTG)	Variação de massa
Análise termodiferencial (DTA)	Temperatura
Análise termo-mecânica (dilatometria)	Comprimento ou volume

Fonte: Adaptado de MENCZEL e PRIME, 2009.

As técnicas utilizadas neste estudo foram termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

4.6.1 Termogravimetria (TG)

Termogravimetria refere-se a uma técnica, na qual a massa é medida em função do tempo ou da temperatura, sob uma programação controlada de temperatura em uma atmosfera controlada (MENCZEL e PRIME, 2009). A variação na massa avaliada na termogravimetria pode ser devido às transformações químicas, como degradação ou decomposição, ou às transformações físicas, como sublimação, evaporação ou condensação (MOTHÉ, 2009).

Alguns fatores podem influenciar nas curvas de TG, sendo eles divididos em dois grandes grupos: fatores instrumentais e fatores ligados às características das amostras (IONASHIRO, 2004).

Taxa de aquecimento, atmosfera na qual a amostra está inserida, geometria do suporte de amostras e do forno são os fatores relacionados ao equipamento. Já a quantidade de amostra durante o procedimento experimental, tamanho de partícula, compactação dentro do aparato utilizado no equipamento, solubilidade dos gases liberados durante o aquecimento, calor de reação e condutividade térmica da amostra são fatores ligados às características da amostra (IONASHIRO, 2004).

4.6.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica, na qual as informações calorimétricas quantitativas podem ser obtidas sob uma programação controlada de temperatura, sendo possível medir a diferença taxa de fluxo de calor de uma substância em relação a uma de referência em função da temperatura (MENCZEL e PRIME, 2009).

Com uso de análises feitas por meio do DSC é possível obter informações sobre temperatura de fusão, existência de transições vítreas, capacidade calorífica e entalpia de transições, bem como cristalização ou recristalização de materiais. Além disso, através do uso da técnica DSC também é possível determinar a pureza e diagramas de fases (MENCZEL e PRIME, 2009; MOTHE, 2009).

Análises de termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas em um equipamento Netzsch STA449. As medidas foram realizadas desde a temperatura ambiente até 350° C, a uma taxa de 5 K.min⁻¹, em atmosfera de nitrogênio, utilizando um cadinho de alumínio selado com furo central, tanto para amostra como para referência. Para realização dessas medidas foi utilizado cerca de 3 mg de amostra em cada análise. Os sensores e os cadinhos foram mantidos sob um fluxo constante de nitrogênio (70mL/min) durante o experimento. Além disso, curvas DSC foram registradas no equipamento Maia 200 F3 com uma variação de temperatura de 30° C até 150° C à uma taxa de 5K.min⁻¹.

5 RESULTADOS

5.1 RIPARINA I

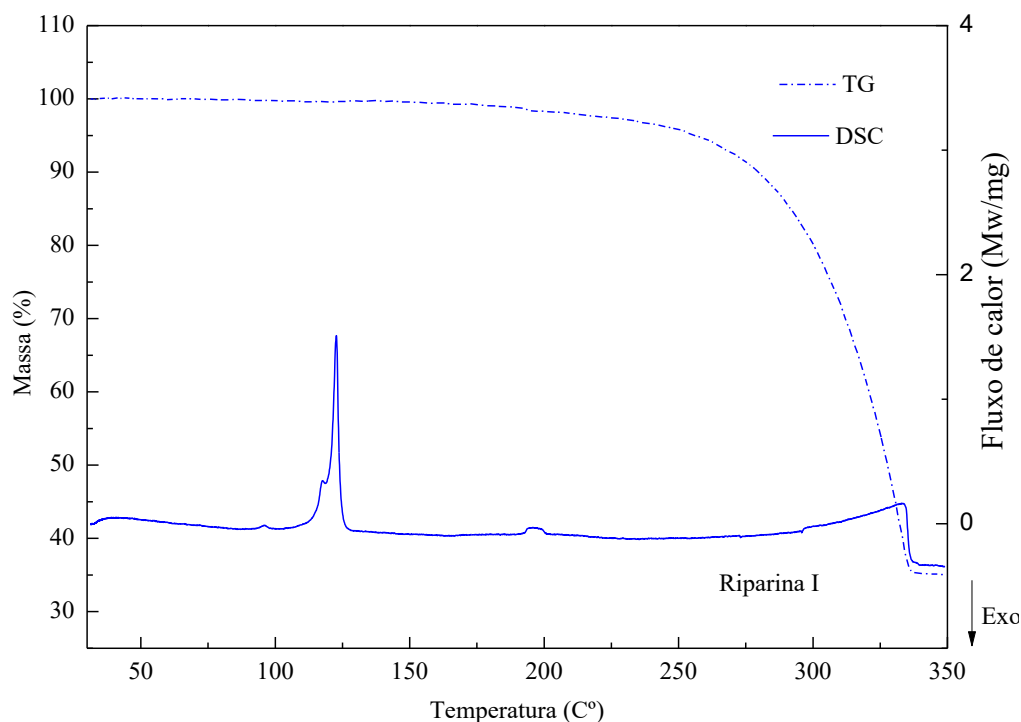
5.1.1 *Análise Térmica*

A riparina I possui sua estrutura cristalina reportada na literatura, bem como o estudo de espectroscopia de absorção na região do infravermelho, dessa forma, este trabalho não teve como foco a elucidação e caracterização já existentes, mas concentrou-se no comportamento térmico da substância, uma vez que não existem estudos prévios sobre essa análise, que é uma importante ferramenta para entender como a substância se comporta sob aquecimento. A análise foi realizada no equipamento Netzsch STA449, onde foram executadas simultaneamente as técnicas de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

5.1.1.1 *Termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

A curva de TG/DSC, demonstrando o perfil térmico da riparina I, está ilustrada na Figura 4 foi feita uma medida da temperatura ambiente até 350° C, em uma taxa de aquecimento de 5 K.min⁻¹.

Figura 4 - Curva DSC/TG da riparina I.



Fonte: Elaborada pelo autor.

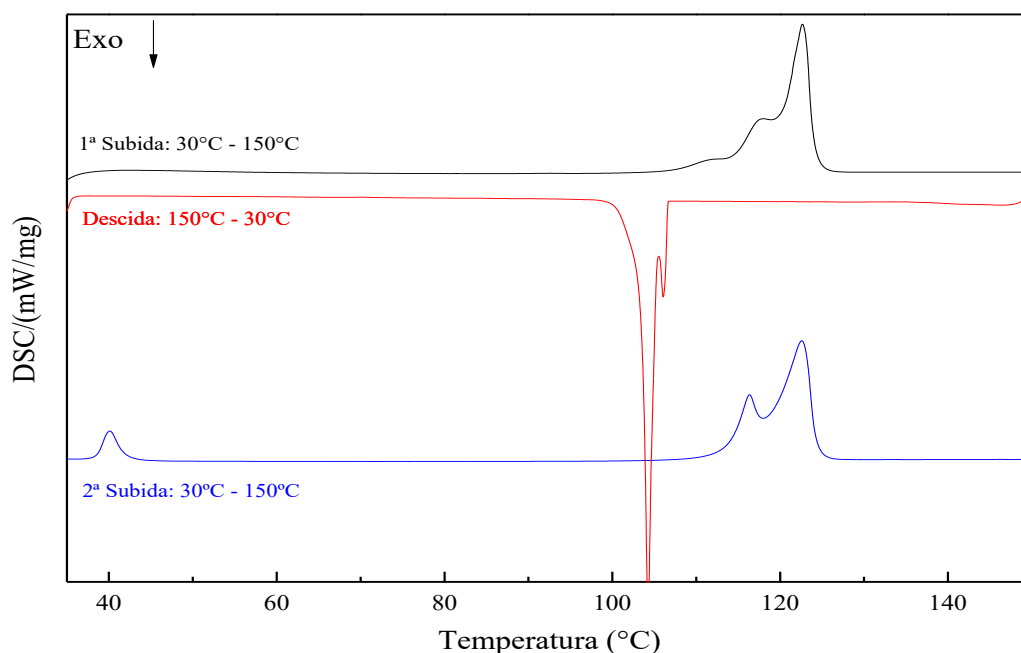
A curva de TG da riparina I apresentou apenas um evento de perda de massa, estando este evento relacionado com a decomposição da amostra, que possui início em aproximadamente em 220° C e pode estar associado à hidrólise, visto a presença de um grupo amida na molécula da riparina I.

A curva de DSC apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro com início em 88° C, e o segundo evento com início em 120° C, que pode estar associado a fatores instrumentais ou a fatores associados às características da substância, como abordado anteriormente. O primeiro evento pode ter ocorrido devido à quantidade de amostra utilizada, ou então devido à compactação desta no cadinho. Para se ter certeza sobre o primeiro pico endotérmico, utilizou-se o equipamento DSC Maia para obter curvas de DSC mais detalhadas.

As curvas de DSC obtidas a partir do equipamento DSC Maia estão evidenciadas na Figura 5. A análise foi feita sob atmosfera controlada de nitrogênio, com subida de 30° C até 150° C, descida de 150° C até 30° C e uma nova subida desde a temperatura ambiente até 150° C.

Essa faixa de temperatura foi utilizada com o intuito de confirmar, que o primeiro evento endotérmico não está relacionado com fatores instrumentais ou fatores associados à amostra. Teve também como finalidade evitar a decomposição da amostra, evitando sua perda.

Figura 5 - Curvas de DSC da riparina I.



Fonte:

Elaborada pelo autor.

Ao analisar as curvas calorimétricas, observa-se a presença dos dois primeiros picos endotérmicos descritos acima, visto na análise de STA. Observa-se também um evento exotérmico durante a descida da medida e posteriormente, durante a segunda subida, um terceiro evento endotérmico, a uma temperatura de 40° C, antes dos dois eventos endotérmicos principais.

Curvas de DSC que apresentam eventos exotérmicos, indicando uma recristalização da amostra usualmente estão associados a presença de polimorfismo, causado pela variação de temperatura. Considerando o perfil térmico da riparina I, ressalta-se a possível presença de pelo menos um polimorfo, referente ao evento exotérmico, que iremos chamar neste estudo de polimorfo α .

Dessa forma, para fins didáticos a estrutura inicial, ou seja, a matéria-prima que deu início a medida, será denominada de polimorfo β . O terceiro evento endotérmico pode ser esclarecido pela transição do polimorfo α para o polimorfo β .

Para confirmar a presença do polimorfismo foi empregado a técnica de difração de raios-X em pó.

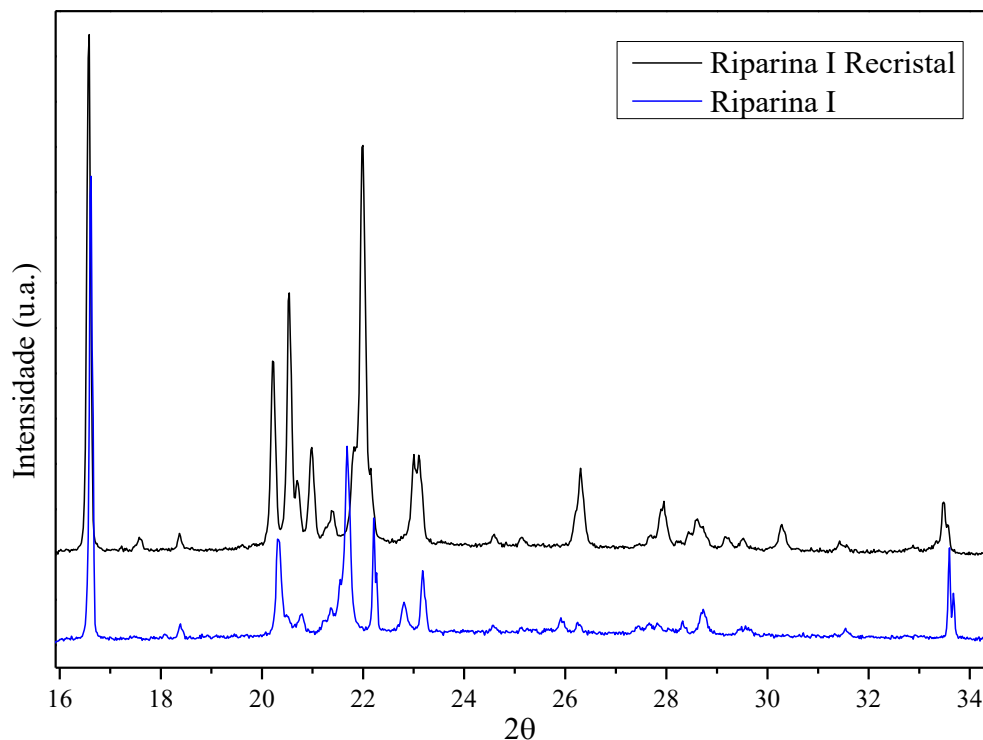
5.1.2 Difração de raios-X em pó

A difração de raios-X em pó foi realizada com a finalidade de confirmar a presença do polimorfismo. Para isso duas medidas foram realizadas. A primeira refere-se à matéria-prima (m.p.), ou seja, ao possível polimorfo β , e a segunda refere-se à amostra de riparina I após aquecimento e sequente resfriamento, que será chamada aqui de riparina I recristal, a qual foi denominada de possível polimorfo α . Ambas amostras foram submetidas às mesmas condições de medida.

Os difratogramas estão representados na Figura 6, onde está indicado o difratograma da riparina I e o difratograma da riparina I recristal.

A Figura 6 representa a região de 16 a 34 2θ , por ser a região onde as diferenças no padrão de difração estão mais acentuadas. Ao analisar esta figura, pode-se observar as diferenças no padrão de difração dos raios-X, indicando assim, a presença de um polimorfo. Para corroborar com os dados da análise térmica e da difração de raios-X em pó, foi realizado medida de espectroscopia Raman, que será discutida no item 4.3.

Figura 6 - Difração de raios-X em pó da riparina I e riparina I recristal.



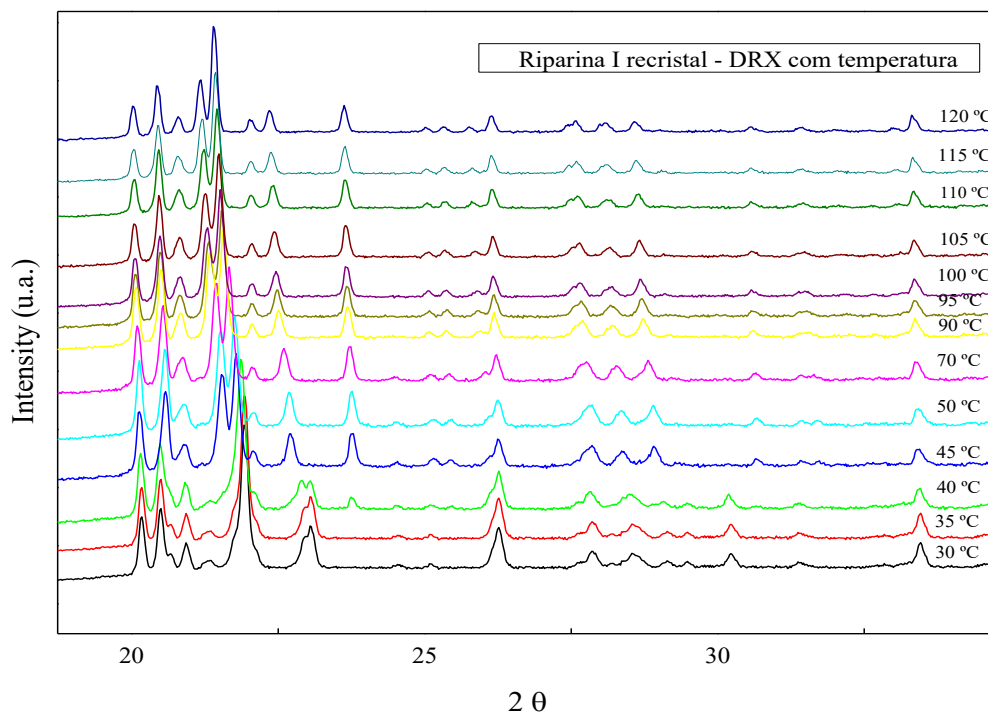
Fonte: Elabora pelo autor.

De acordo com o relatado no item 4.1.1, e demonstrando na Figura 5, durante a segunda subida, há a presença de um terceiro evento endotérmico, antes dos dois eventos endotérmicos principais. Dessa forma, uma outra análise no raio-X foi realizada para determinar a presença ou não de polimorfismo.

A análise foi feita com o polimorfo α , a qual foi submetida a uma análise de raio-X com temperatura. A faixa de medida aconteceu de 30° C até 150° C. A medida está representada na Figura 7, mostrando apenas a região, onde as diferenças entre os difratogramas foram mais acentuadas.

A partir de 45° C, a amostra começa a apresentar um padrão de difração diferente em relação ao polimorfo α . É importante ressaltar que, após 40° C, há o terceiro evento endotérmico, que pode ser analisado pelo difratograma abaixo. Nos primeiros difratogramas, a transição da amostra está clara, porém nos demais, de 45° C até 120° C é possível avaliar a evolução térmica da riparina.

Figura 7 - Difratoograma da riparina I em função da temperatura.

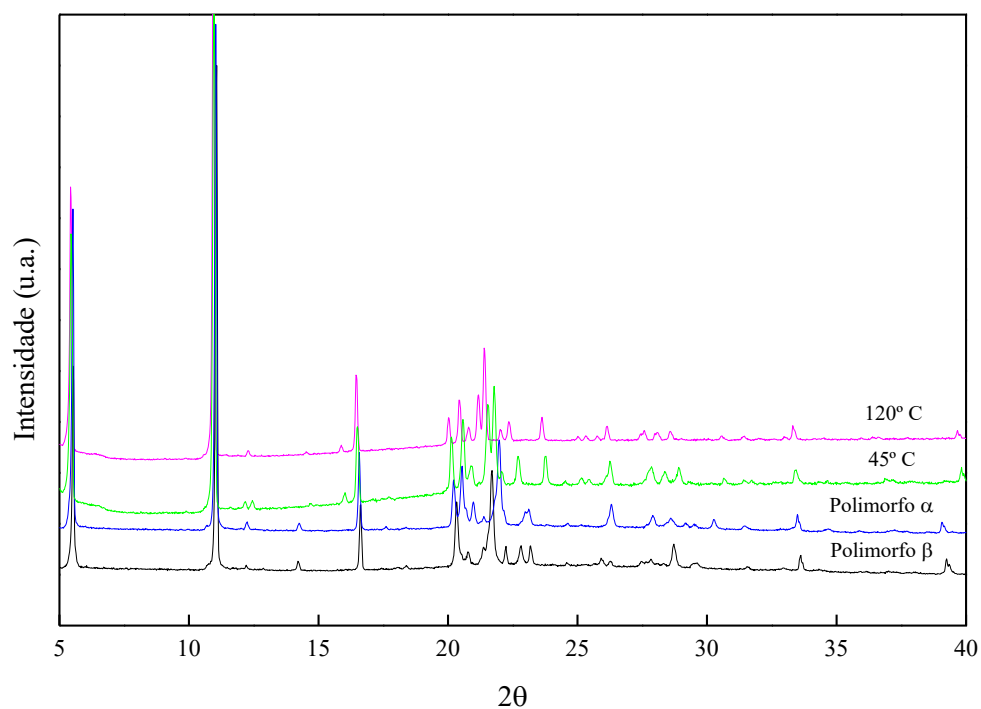


Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 8, representada logo abaixo, aponta os difratogramas dos polimorfos α e β e da análise feita em função da temperatura. Observa-se visivelmente, que o polimorfo α e β possuem padrões de difração de raio-X que não corroboram com a riparina I submetida à uma temperatura de 45° C. Ao chegar a temperatura de 120°, os difratogramas são similares, quando comparado ao de temperatura de 45° C, apesar de possuírem de forma nítida deslocamento de

picos. À vista disso, um terceiro polimorfo é identificado, possuindo um início de transição a 45° C. Ele será identificado como polimorfo δ .

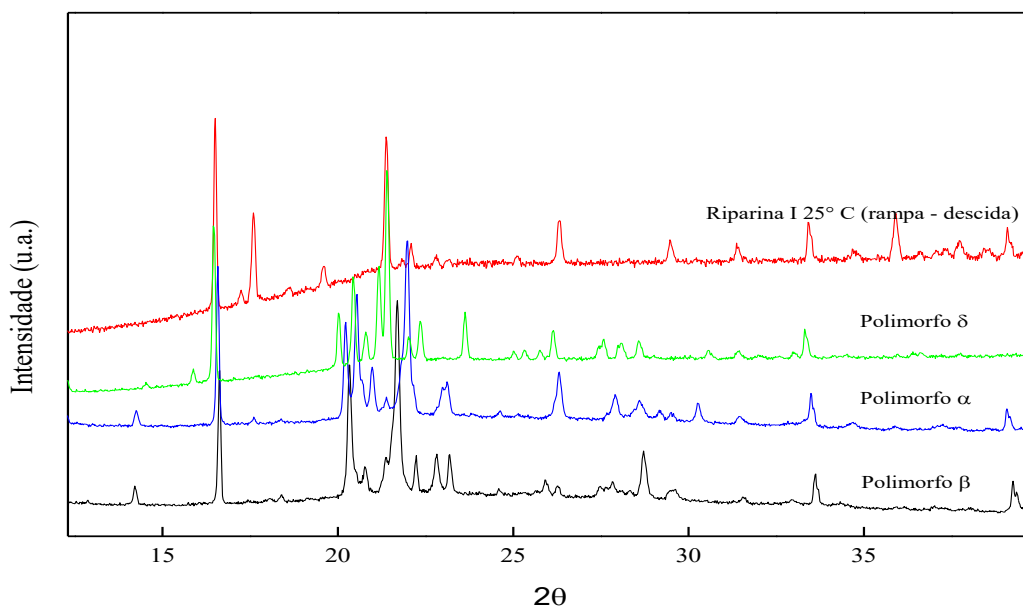
Figura 8 - Difratoograma comparando polimorfo α e β , riparina I à 45° C e 120° C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, com a presença de um terceiro polimorfo da riparina I, diferente do polimorfo α e do polimorfo β , deu-se continuidade a análise de raio-X, com uma rampa de descida, a uma temperatura de 120° C até 25° C. Os difratogramas estão representados na figura abaixo:

Figura 9 - Difratoograma comparando políformo β , α , δ e riparina I à 25 °C.

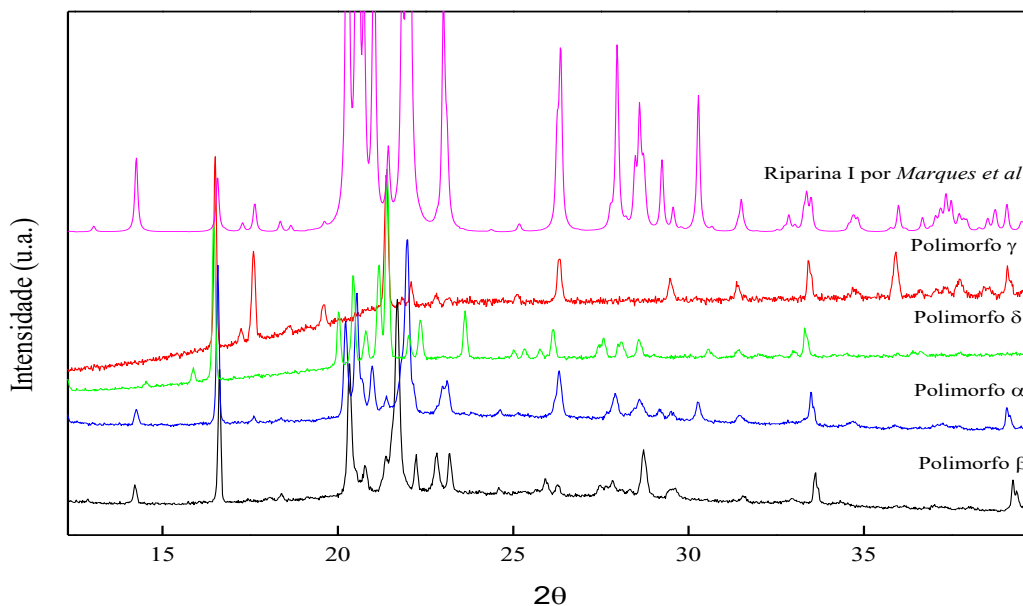


Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando os três difratogramas, torna-se evidente diferenças entre os picos. Por consequente, pode-se afirmar a existência de um quarto polímorfo, que será denominado de polímorfo γ .

Visto os quatro polímeros encontrados, de acordo com a difração de raios-X em pó, a comparação entre a riparina I reportada na literatura, elucidada por *Marques et al.* (2005) e os polímeros descritos neste presente estudo, se tornou necessária. Dessa forma, a Figura 10 exhibe estes difratogramas.

Figura 10 - Difrátogramas da riparina I por *Marques et al.* (2005) e os polimorfos descritos nesta monografia.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a figura acima (Figura 10), observa-se que a riparina I elucidada por *Marques et al.* (2005) corresponde ao polimorfo α , identificado neste trabalho.

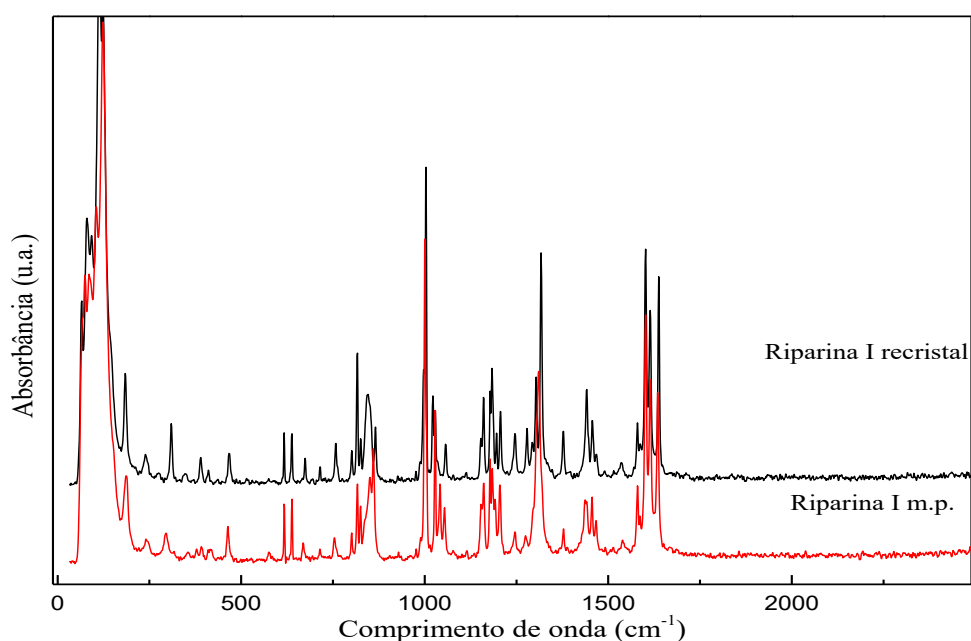
As mudanças de fase indicam que a riparina I trata-se de um composto que possui uma baixa estabilidade térmica, apresentando mudança estrutural a uma temperatura de 40 °C. Esta temperatura é próxima a temperatura ambiente, sendo então, de extrema importância a compreensão do seu perfil térmico, pois simples operações realizadas durante a fase de pré-formulação de fármacos utilizam temperaturas próximas a 40 °C, podendo ocasionar mudanças estruturais durante os ensaios da pré-formulação.

Dessa forma, as demasiadas mudanças estruturais, originando os polimorfos, da riparina I em função da temperatura, precisam ser estudadas com mais afincio e terem suas estruturas cristalinas elucidadas, com a finalidade de padronizar as riparinas que são utilizadas nos estudos pré-clínicos em modelos comportamentais animais em neurociência, visando garantir a segurança e eficácia na administração destas substâncias, evitando polimorfos menos estáveis e menos seguros.

5.1.3 Espectroscopia vibracional Raman

A medida na espectroscopia vibracional Raman foi realizada com o intuito de obter dados que corroborem com os dados obtidos do polimorfo β e α na difração de raios-X em pó. Entretanto, os espectros raman dos polimorfos foram similares.

Figura 11 - Espectro Raman dos polimorfo β e α .



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros apresentam apenas uma pequena diferença na região de vibração em $\sim 412 \text{ cm}^{-1}$. Isso pode ter ocorrido devido ao fato das substâncias, apesar de diferentes estruturalmente, possuírem vibrações moleculares semelhantes.

5.1.4 Classificação dos polimorfos

Os polimorfos podem ser classificados de duas maneiras distintas: sistemas enantiotrópicos ou monotrópicos. Os polimorfos enantiotrópicos referem-se àqueles que possuem uma transição reversível da estrutura cristalina, ou seja, eles possuem a capacidade de voltarem a sua estrutura inicial. Em contrapartida, os polimorfos monotrópicos são aqueles que não possuem a transição da estrutura cristalina para outra de forma reversível (BERNSTEIN, 2002).

Para sistemas enantiotrópicos, a transição reversível ocorre a uma temperatura definida, antes da temperatura de fusão. O mesmo não ocorre para sistemas monotrópicos, os quais não há esse tipo de transição. As transições sempre advêm de um polimorfo menos estável para um polimorfo mais estável, que normalmente não é o mais interessante para indústria farmacêutica, visto que os polimorfos mais estáveis são aqueles que possuem uma menor solubilidade e, conseqüentemente, uma menor biodisponibilidade. Os polimorfos mais estáveis são aqueles que apresentam uma menor energia livre de Gibbs, em determinada condição de temperatura e pressão (BERNSTEIN, 2002).

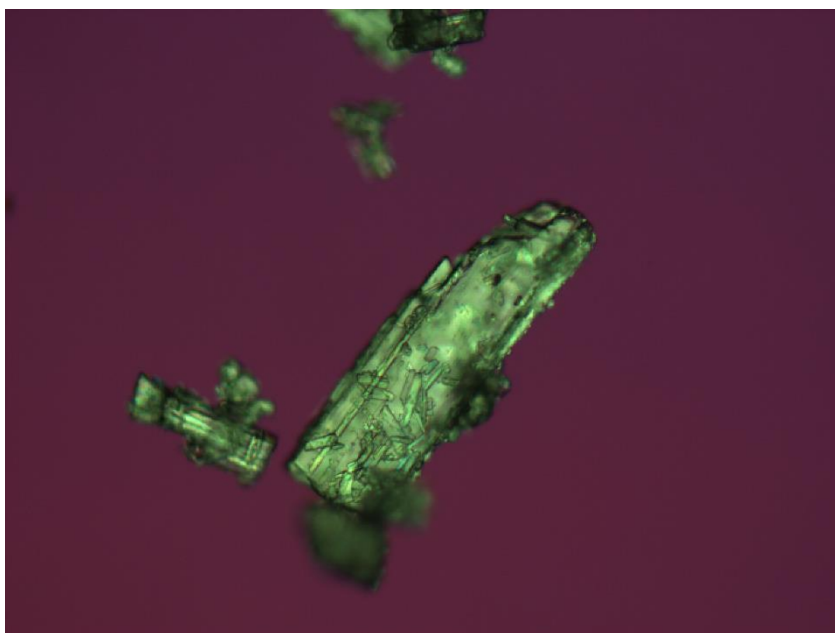
Dessa forma, é sensato afirmar que os polimorfos da riparina I tratam-se de polimorfos monotrópicos, ou seja, polimorfos que não dispõem de uma transição reversível das estruturas cristalinas.

5.2 RIPARINA II

5.2.1 Descrição da estrutura cristalina

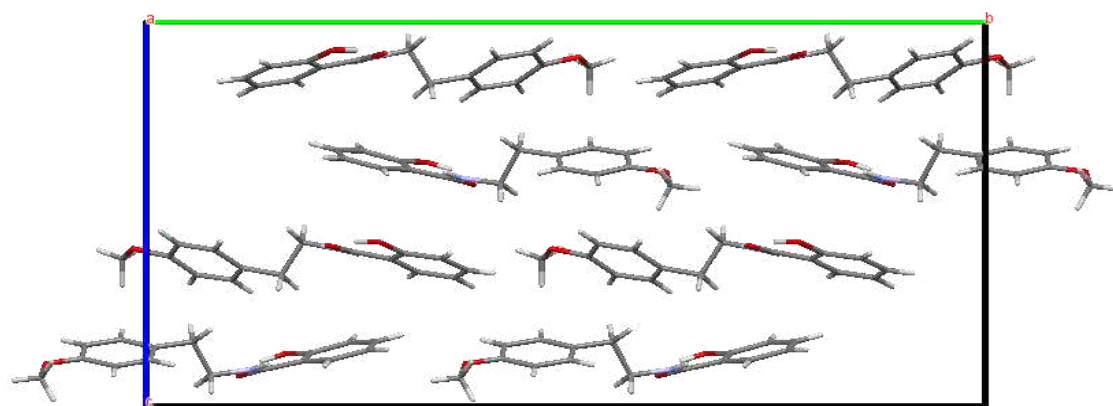
A riparina II cristaliza em um hábito cristalino colunar, visualizado na Figura 12, e um sistema cristalino monoclinico, pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$. Apresenta duas moléculas por unidade assimétrica e oito por cela unitária, conforme ilustrado na Figura 13.

Figura 12 - Cristal da riparina II.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 - Projeção do eixo a da cela unitária da riparina II.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Possui os seguintes parâmetros de cela: $a = 6.4596 \text{ \AA}$; $b = 29.3377 \text{ \AA}$; $c = 14.8989 \text{ \AA}$; $\beta = 97.116^\circ$, estando os demais dados cristalográficos ilustrados na tabela abaixo:

Tabela 2 - Dados cristalográficos da riparina II.

Fórmula empírica	$C_{16}H_{17}NO_3$
Peso molecular	271.30
Temperatura	293(2)
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$
$a/\text{\AA}$	6.4596(4)
$b/\text{\AA}$	29.3377(18)
$c/\text{\AA}$	14.8989(9)
$\beta/^\circ$	97.116(2)
Volume (\AA^3)	2801.74
R-fator (%)	3.21
Z/Z'	8/2
μ/mm^{-1}	0.724
Radiação	CuK α
Tamanho do cristal/ mm^3	0.366 x 0.259 x 0.196

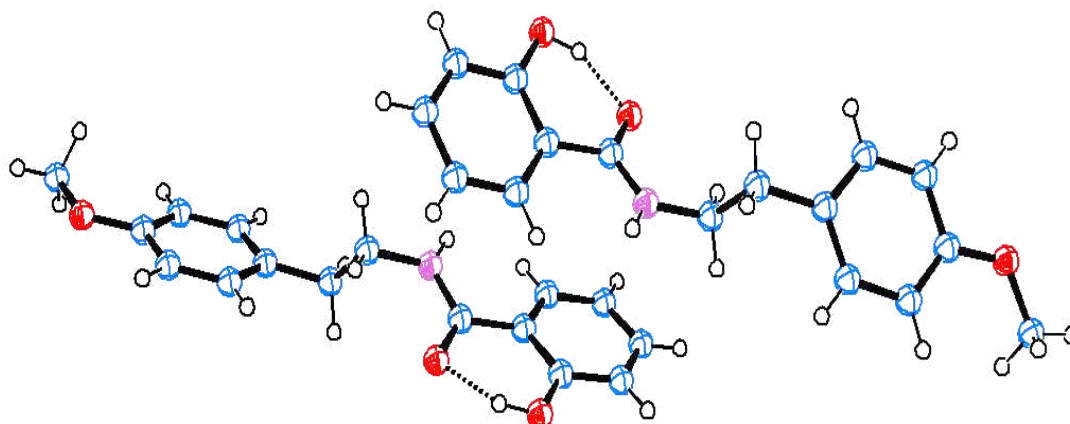
Fonte: Elaborada pelo autor.

A unidade assimétrica da riparina II, ilustrada na Figura 14, é constituída por duas moléculas que não se sobrepõem. Por fins didáticos, a primeira molécula irá ser chamada de molécula A e a segunda de molécula B.

A configuração molecular é definida por três planos, sendo o primeiro composto pelo grupo metil-amida, o segundo plano composto pelo primeiro anel aromático, que será

denominado de R1 e o terceiro plano composto pelo segundo anel aromático, denominado de R2.

Figura 14 - Unidade assimétrica da riparina II.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A riparina I, que possui sua estrutura cristalina elucidada por *Marques et al.* (2005), dispõe apenas de uma molécula por unidade assimétrica e duas por cela unitária. Como mencionado previamente, a única diferença entre a riparina I e II é a substituição da hidroxila no primeiro anel aromático. Quando comparado os ângulos entre os átomos C2A e H2A...O7A na riparina I e II, têm-se os respectivos ângulos: 96,09° e 91,28°. Essa diferença nos ângulos pode-se ser explicada pela ligação intramolecular O7A...H2A—O2A formada na riparina II devido à presença da hidroxila no primeiro anel aromático, ausente na riparina I.

Essa ligação causa uma torsão, aproximando o O7A do R1, causando uma torsão de 6,08, enquanto na riparina I essa torsão é de 15,96. Dessa forma, corroborando com os dados obtidos no espectro de infravermelho, nos quais há uma diferença na banda de vibração na região do N-H. Além disso, a ausência da interação intramolecular na riparina I e uma maior torsão podem causar uma desordem na molécula, o que pode explicar seu fator R de 7.36%.

As duas moléculas presentes na unidade assimétrica estão unidas através da ligação intermolecular H6B—C6B...C7A, crescendo ao longo do eixo a, contudo, para que isso ocorra, a ligação intermolecular C8B'...H8B'1—O4A' deve acontecer. Ambas ligações são responsáveis pela união das duas moléculas ao longo do eixo a. A estrutura cristalina cresce ao longo do eixo B devido às duas ligações intermoleculares: N8A'—H8A'3...O2A e N8B'—H8B'3...O2B, sendo também responsáveis pelo crescimento ao longo do eixo c. Bem como as ligações intermoleculares C2B'—H2B'...O7B e C8B'—H8B'1...O4A' são responsáveis pelo desenvolvimento do eixo c.

As ligações de hidrogênio presentes entre as duas moléculas de riparina II, que formam a unidade assimétrica, estão resumidas na Tabela 3. A tabela traz as distâncias entre os doadores (D) e os hidrogênios (H), e as distâncias entre os hidrogênios e os aceptores (A) e por fim, as distâncias entre os doadores e aceptores. A Tabela 3 também ilustra os ângulos entre as ligações D—H...A.

Tabela 3 - Ligações intermoleculares na riparina II.

Tipos de ligação	D—H...A	D—H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D—H...A (°)
Intramolecular	O2A—H2A...O7A	0,90	1,66	2.504	156
Intramolecular	O2B—H2B...O7B	0,92	1,65	2.502	153
Intermolecular	N8A'—H8A'3...O2A	0,86	2.14	2.906	148
Intermolecular	N8B'—H8B'3...O2B	0,86	2.11	2.909	155
Intermolecular	C8B'—H8B'1...O4A'	0,70	2,669	3.626	147
Intermolecular	C2B'—H2B'...O7B	0,93	2,53	3,446	171

Legenda: D= doador; H= hidrogênio; A= aceptor

Fonte: Elaborada pelo autor.

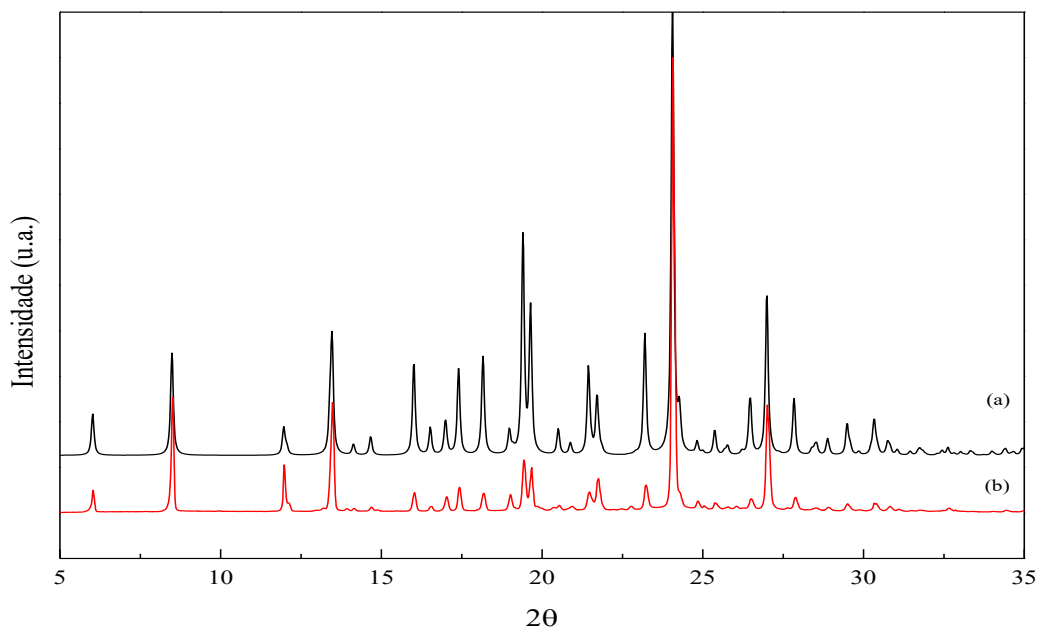
Diferente da riparina II, a riparina I possui apenas duas principais ligações intermoleculares e nenhuma ligação intramolecular. A ausência de uma forte ligação intramolecular e de distintas ligações intermoleculares pode também explicar o ponto de fusão mais baixo em relação da riparina II, que será discutido no item 6.4.

5.2.2 Difração de raios-X em pó

A difração de raios-X em pó foi realizada com a finalidade de comprovar que o cristal analisado no raio-X de monocristal, para determinação da estrutura cristalina da riparina II, é representativo de toda a amostra.

Dessa forma, o padrão de difração calculado e experimental estão demonstrados na figura a seguir:

Figura 15 - Padrão experimental (a) e padrão calculado (b) da riparina II.



Fonte: Elaborada pelo autor.

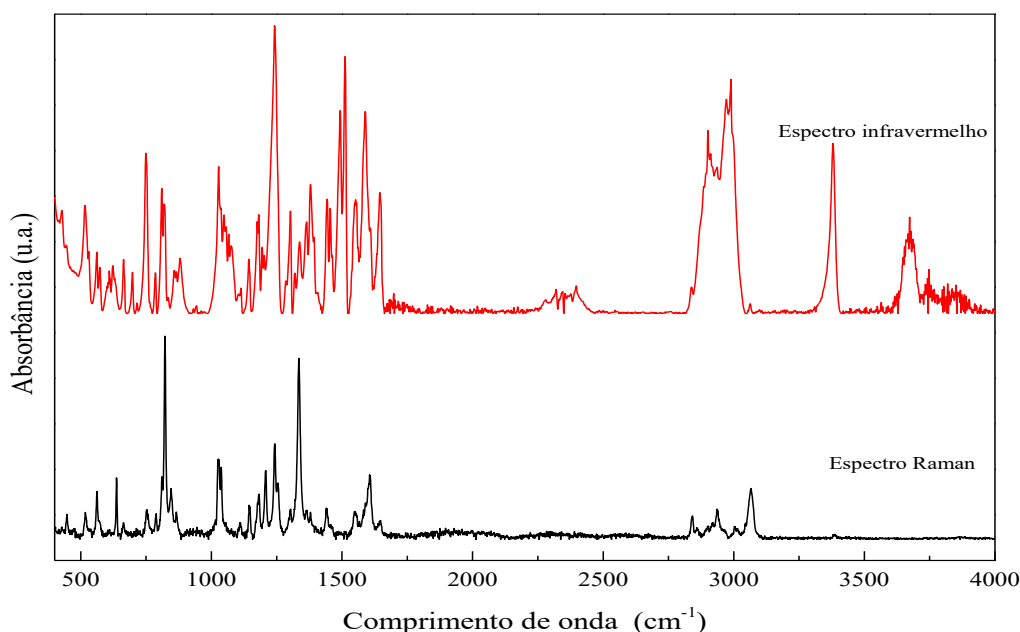
Os dois difratogramas são similares, não apresentando nenhuma diferença entre seus padrões de difração, concluindo-se assim, que a amostra elucidada através do uso do raio-X de monocristal é representativa do todo.

5.2.3 Espectroscopia vibracional

Análises no Raman e infravermelho foram realizadas com a finalidade de determinar as vibrações moleculares da riparina II, e comparar com o espectro de infravermelho reportado na literatura da riparina I.

O espectro de infravermelho da riparina I foi publicado por *Marques et al.* (2005), o qual ele discute as bandas de vibração, as relacionando com cada grupo funcional presente na sua estrutura química. Os espectros de Raman e infravermelho da riparina II estão ilustrados na Figura 16.

Figura 16 - Espectro infravermelho e Raman da riparina II.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros de infravermelho e Raman apresentam significantes números de picos, contudo, apenas as vibrações moleculares dos principais grupos funcionais foram analisadas. De acordo com o que foi reportado na literatura a frequência de $1680\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ representa a banda de vibração de C=O em amidas secundárias. A riparina II apresentou uma banda de vibração em $\sim 1644\text{ cm}^{-1}$.

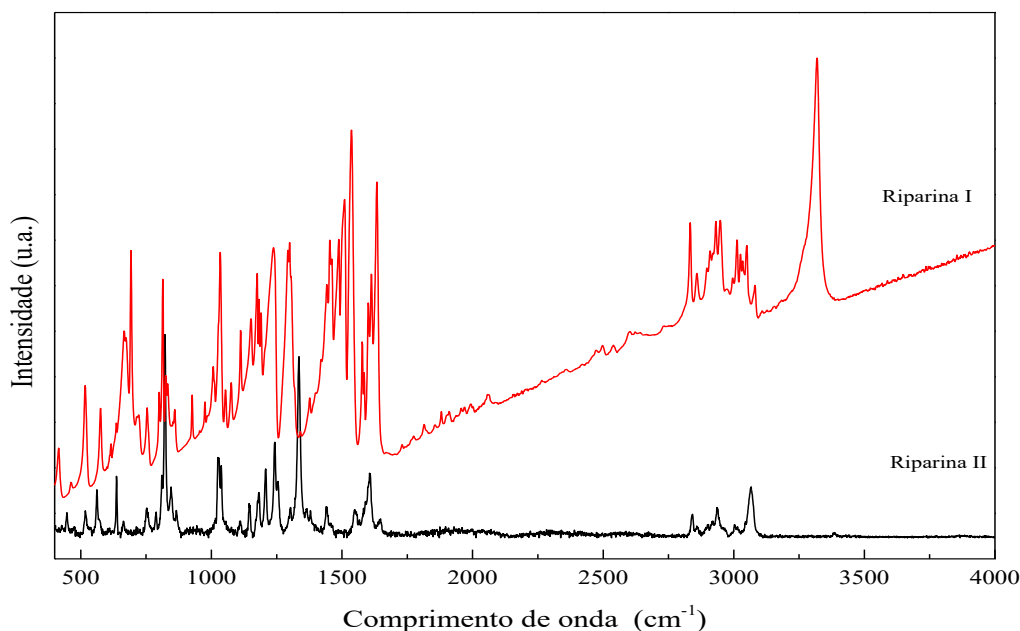
Essa banda de vibração corroborada com o que foi reportado por *Marques et al.* (2005), que indica o modo de vibração para amida secundária da riparina I em $\sim 1638\text{ cm}^{-1}$.

A frequência em $1566\text{--}1474\text{ cm}^{-1}$ representa bandas de vibração de N-H em amidas secundárias. Na riparina II, a amida secundária é responsável por três ligações de hidrogênio intermoleculares, e possui um modo de vibração em $\sim 1511\text{ cm}^{-1}$. Em contrapartida, *Marques et al.* (2005) indica para riparina I uma vibração de $\sim 3325\text{ cm}^{-1}$. Essa diferença nos modos de vibração do N-H para ambas riparinas pode ser explicada pela deformação causada devido à forte ligação de hidrogênio intramolecular em $\text{O2A}\cdots\text{H2A}\cdots\text{O7A}$ para riparina II.

Marques et al. (2005) analisou as bandas de vibração da riparina III, nas quais ele afirma que o modo de vibração em $\sim 3463\text{ cm}^{-1}$ corresponde a região do OH decorrente da ligação de hidrogênio com o C=O, que não está representado na riparina I, por não possuir esse substituinte. De forma similar, a riparina II apresenta uma frequência de vibração em 2991 cm^{-1} .

O espectro Raman da riparina II está ilustrado na Figura 17, simultaneamente com o da riparina I.

Figura 17 - Espectro Raman da riparina I e II.



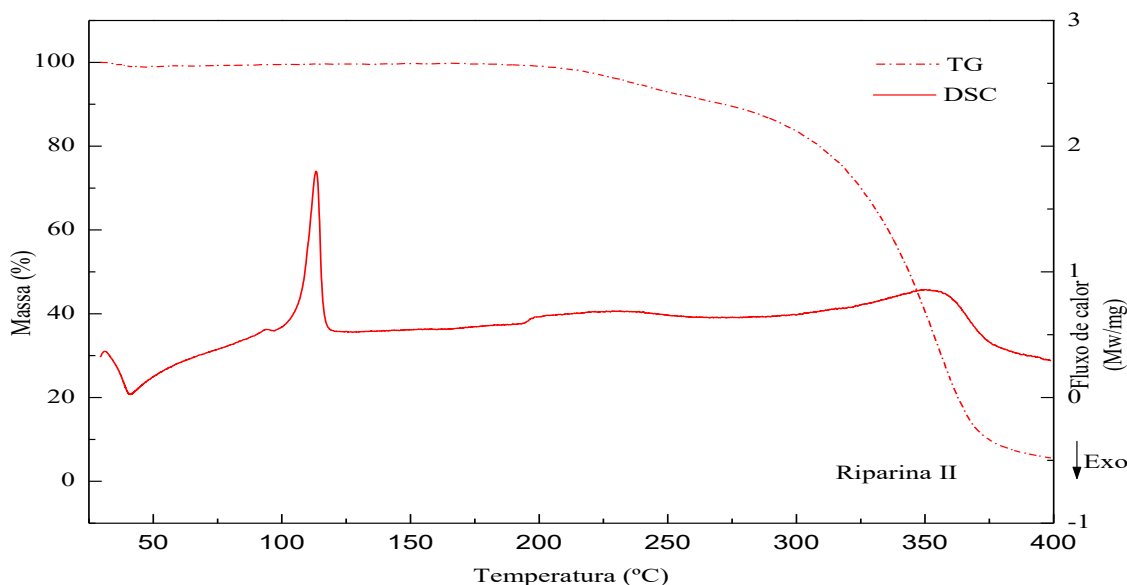
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros Raman da riparina I e II são bastante similares, possuindo as bandas de vibrações correspondentes para cada grupo funcional principal. Possuem, entretanto, uma diferença principal, que está relacionada ao modo de vibração em $\sim 3319 \text{ cm}^{-1}$ presente no espectro da riparina I e referente a frequência de vibração do NH. Devido à torsão presente na molécula da riparina II, o seu espectro Raman não possui essa banda de vibração.

5.2.4 Análise térmica

A Figura 18 apresenta a curva de DSC/TG da riparina II, realizada no equipamento STA sob uma programação de temperatura controlada e atmosfera controlada nitrogênio.

Figura 18 - Curva de DSC/TG da riparina II.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A curva de DSC da riparina II apresentou apenas um evento, no qual se trata de um evento endotérmico referente à fusão da amostra. Tem início em 107,3°C e término em 116°C. Ressalta-se que a riparina I apresenta uma temperatura inicial de fusão a 88°C. Assim como a ligação intramolecular O2A—H2 ••• O7A, presente na riparina II e ausente na I, é a causadora principal de algumas diferenças físicas e químicas entre as duas substâncias, o mesmo acontece na análise térmica. Dessa forma, o ponto de fusão maior da riparina II em relação a riparina I, pode ser explicado por esta ligação intramolecular O2A—H2 ••• O7A, que necessita de uma maior energia para que o processo de fusão ocorra.

Bem como, a riparina I, a riparina II se decompõe depois de 200°C, podendo estar associado a hidrólise, visto se tratar de uma amida secundária.

6 CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo avaliar físico-quimicamente as riparinas I e II e para tal fim diversas técnicas foram utilizadas.

Foi possível determinar o perfil térmico da riparina I, através do DSC e STA e da difração de raios-X em pó. Quatro diferentes difratogramas foram obtidos e analisados, determinando, assim, quatro diferentes polimorfos, sendo eles polimorfo β , α , δ e γ . A riparina I elucidada por *Marques et al.* (2005) foi comparada aos polimorfos identificados por este trabalho, concluindo que amostra reportada na literatura se trata do polimorfo α .

As temperaturas de fusão da riparina I e II foram determinadas, bem como, a temperatura de suas decomposições, estando associada à hidrólise das amostras, visto se tratarem de duas amidas secundárias.

A estrutura cristalina da riparina II foi determinada, possuindo um sistema cristalino monoclinico, pertencente ao grupo espacial $P2_1/c$. Possui uma ligação intramolecular O7A ... H2A—O2A devido à substituição de uma hidroxila no primeiro anel aromático, ausente na riparina I, que lhe conferiu um modo de vibração, nos espectros de infravermelho e Raman, distintos quando comparado aos espectros da riparina I. O ponto de fusão relativamente mais alto da riparina II também pode ser explicado pela presença da ligação intramolecular, que causa maior estabilidade nesta substância.

Difração de raios-X em pó da riparina II foi realizado e analisado, comparando-se ao difratograma obtido pelo raio-X de monocristal. Os dois difratogramas foram similares, logo, concluindo-se que a amostra usada para determinação da estrutura cristalina da riparina II é representativa de toda a amostra.

Os dados obtidos tiveram qualidade adequada e a discussão em cima desses resultados abrangeu todos os pontos importantes para o entendimento deste estudo. Portanto, conclui-se que todos os objetivos deste trabalho foram alcançados com êxito.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO F. L. O., MELO C. T. V., ROCHA N. F. M, MOURA B. A., LEITE C. P., AMARAL J. F., BARBOSA-FILHO J.M., GUTIERREZ S. J. C., VASCONCELOS, S. M. M., VIANA, G. S. B, SOUSA F. C. F. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmacologie**, v. 380, pp. 337-344. 2012.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.P.; BARBOSA, R.C.S.B.C.; GIESBRECHT, A.M.; YOUNG, C.M. **Benzoyl Esters and Amides, Styrylpyrones and Neolignans from the fruits of *Aniba riparia***. *Phytochemistry*. v. 26, pp. 2615-2617, 1987.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; YOSHIDA, M; GOTTLIEB, O.R. **The tyramines of *Aniba riparia*: transformation into models of natural products**. *Ver. Latinoamr. Quim.*, v. 21, p. 5-7, 1990.
- BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. New York: Oxford University Press, 2002, 410p.
- CARVALHO, A. M. R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (O-Metil-N-2-Hidroxi-Benzoil Tiramina) em modelos experimentais**. 91 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2011.
- CASTELO-BRANCO, U.J.V. **Estudos Farmacológicos do Éter Metílico de N-(2,6-dihydroxybenzoyl)-tyramine**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1992.
- CATÃO, R.M.R; BARBOSA-FILHO, J.M; GUTIERREZ, S.J.C; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V; ARRUDA, T.A./ ANTUNES, R.M.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multiresistentes**. *RABC*, v. 34 (4), pp. 247-249, 2005.
- DA CUNHA, F.; MARCÍLIO SERGIO SOARES SÁ-BARRETO, L. C L. **Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico**. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* v. 28, n.1, p.1-9, 2007.
- DATTA, S.; GRANT, D.J.W. **Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering**. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.3, n. 1, p. 42-57, 2004.
- DE SOUSA F.C.F, Monteiro A.P., Melo C.T.V et al. **Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice**. *Phytother. Res.* v. 19 1005-1008, 2005.
- DE SOUSA F.C.F., LEITE C.P., MELO C.T.V., ARAÚJO F.L.O., GUTIERREZ S.J.C, BARBOSA-FILHO J.M., FONTELES M.M.F., VASCONCELOS S.M.M., VIANA G.S.B. **Evaluation of Effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in Anxiety Models in Mice**. *Biol Pharm Bull.* v. 30, pp. 1212-1216, 2007.

DE SOUSA, F.C.F.; MELLO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M.; GUTIERREZ, S.J.C; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; VIANA, G.S.B. **Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in mice.** Pharmacol Biochem Be. v. 78, pp. 27-33, 2004.

DIAS, M.L. **Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

FLORENCE, Alexander T.; ATTWOOD, David. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia.** 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

IONASHIRO, M. **GIOLITO: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratório Diferencial.** São Paulo: Giz Editorial, 2004, 82p.

LACHMAN, Leon; LIEBERMAN, Herbert A.; KANIG, Joseph L.. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1517 p.

MARQUES, A. D. S.; LIN, C. T.; TAKAHATA, Y.; BARBOSA-FILHO, M.; GUTIERREZ, S. J. C. **Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III.** Journal of Molecular Structure, v. 753, pp. 13-21, 2005.

MENCZEL, J.D.; PRIME, R.B. **Thermal analysis of polymers. Fundamentals and applications.** Canadá: John Wiley & Sons, 2009. 699 p.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais.** São Paulo: Artliber, 2009, 324 p.

NEWMAN, A. W. et al. **Characterization of the “hygroscopic” properties of active pharmaceutical ingredients.** Journal of Pharmaceutical Sciences [S.I], v. 97, n. 3, pp. 1047-1059, Mar. 2008.

SILVA, K. F. **Estudo do polimorfismo e desenho de cocristais dos anti-helmínticos Ricobendazol e Albendazol.** Dissertação (Mestrado em Física) – Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

STORPIRTIS, Sílvia et al. **Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TILLEY, Richard J. D.. **Cristalografia: cristais e estruturas cristalinas.** São Paulo: Oficina de Textos, 2014.