

Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear de
nuevos compuestos farmacéuticos sólidos

por

Yamila Garro Linck

Presentado ante la Facultad de Matemática, Astronomía y Física como
parte de los requerimientos para la obtención del grado de

Doctor en Física
de la

Universidad Nacional de Córdoba

febrero de 2011

©FaMAF- UNC 2011

Director: Dr. Gustavo A. Monti

Resumen

En este trabajo de Tesis, se estudiaron nuevos compuestos de interés farmacéutico sintetizados por el grupo del Dr. Rubén H. Manzo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Nacional de Córdoba. Estos compuestos son derivados de las fluoroquinolonas, una familia de agentes antibacterianos sintéticos de amplia utilización en clínica [1]-[2]. Uno de estos compuestos presentó polimorfismo y fue exhaustivamente estudiado por varias técnicas de estado sólido.

Para los sistemas estudiados aquí, el núcleo de ^{13}C será la primera opción para los experimentos de CPMAS. Sin embargo, otros núcleos también fueron relevantes, en particular para el estudio de polimorfismo. En particular, los sistemas estudiados contienen nitrógeno y realizar CPMAS de ^{15}N en abundancia natural es interesante para el análisis de las drogas, a pesar de requerir de muchas acumulaciones debido a la baja receptividad de este núcleo.

Los derivados fluoroquinolónicos contienen flúor, y el ^{19}F es un excelente núcleo para RMN. A pesar de que en las etapas tempranas de la CPMAS para sistemas orgánicos había problemas tecnológicos para lograr el desacople de protones en experimentos que involucraban ^{19}F debido a la cercanía en las frecuencias de resonancia de ^{19}F y ^1H , actualmente este problema está resuelto, lo que nos permitió estudiar los compuestos utilizando también este núcleo. Hay muy pocos ejemplos en la literatura de ^{19}F aplicada al estudio de polimorfismo, entre ellos los trabajos del grupo de Robin K. Harris [3]-[4] y del grupo de R. M. Wenslow [5].

Hasta el momento no mencionamos la RMN de ^1H , que si bien es muy importante en la RMN de estado líquido, en la RMN de estado sólido presenta problemas a la hora de obtener espectros de alta resolución debido a la fuerte interacción dipolar entre estos núcleos que es muy difícil de remover. El primer uso de ^1H de alta resolución para el estudio de polimorfismo orgánico fue para el ácido aminobenzoico [6]. En esta tesis hicimos uso de los avances tecnológicos en esta área y logramos realizar experimentos de alta resolución en ^1H a muy altas velocidades de rotación que nos permitieron entender aspectos cristalográficos importantes de los polimorfos estudiados.

Agradecimientos

Es increíble cómo pasa el tiempo, parece un dicho de viejo pero es cierto, que rápido se pasan los años!

Hoy, después de 11 años, termino una etapa y es tiempo de cambios, grande cambios. Y cuando miro hacia atrás, no puedo dejar de recordar y agradecer a todas las personas que pasaron por mi vida.

Me gustaría empezar agradeciendo a mi jefe, por transmitirme sus conocimientos, sus ideas, y también por mostrarme una forma de trabajar. Por la paciencia infinita.

A Hernán, que es uno de los pilares de mi vida desde hace 10 años. Que estuvo conmigo siempre, que me conoce y que me ayudó en los momentos más difíciles dándome seguridad, amor y la confianza que a mí me faltaba. Gracias mi amor! Te amo!

La gente que me conoce sabe que lo importante que son para mí las relaciones personales y cómo las valoro. Es por eso, que más allá de las personas que me ayudaron a nivel académico quiero agradecer a los que me hicieron compañía en el día a día. A toda la gente del LANAIS, al flaco por los criollos, galletitas, caramelos, chocolates, etc. Mariano, Clyde, Pablo y Elba por los almuerzos y los cafés. A mamucha por los mates, las charlas y las risas. A la K, por el trabajo y los momentos compartidos. A Rodi, Patricia, Horacio, Luis. Seguro que me olvido de alguien, pero agradezco a todos los que hicieron que quiera tanto este lugar. A los chicos nuevos del grupo, Lucas, Pablo, Emi.

También quisiera agradecer a mis amigos de la facu, aquellos con los que empecé hace 10 años, y los que se fueron sumando en el camino. Voy a tratar de mencionarlos a todos, espero no olvidarme de nadie. A los 4 Fedes, Cristian (que obviamente se recibió después que yo), Any, Eze, Fer, Jose, Pancho, Jorge, March, Juanpi, Axel, Santi, Vero, Yami y por supuesto la Belu, que me sufrió bastante por haber estado en el mismo grupo y que en este último tiempo me escuchó y aconsejó. Gracias por compartir estos años, y espero que sigamos compartiendo a pesar de estar en distintos lugares!

A mi familia el agradecimiento es infinito. Siempre soportaron y debo decir que bastante bien, mis malos humores y problemas y que también vivieron conmigo las alegrías de todo este tiempo. A mi vieja, no tengo palabras para agradecerle a mi vieja. El amor incondicional que siempre sentí, sus consejos y su apoyo, que me ayudó a seguir muchas veces. A mi sobrino, por la alegría que me genera el simple hecho de verlo, te adoro peque!. A mis hermanos y a mi viejo, gracias!

A la flia. política, a Eli, que estuvieron a mi lado, brindando apoyo y dando fuerza en todo momento. A la flia. grande, mis tías, primos, abuelos.

A mis amigas de siempre, que prestan el oído y tratan de que los problemas se hagan más livianos al compartirlos. También por alegrarse por las cosas buenas que me pasan. Por las juntadas, las mateadas, las quiero!

Nuevamente, gracias a todos por estar y haber formado parte de mi vida.

Índice general

Resumen	III
Agradecimientos	v
1. Introducción	1
1.1. Un poco de historia	1
1.2. Nuestro Trabajo	7
2. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	9
2.1. Elementos Básicos	9
2.2. Interacciones de Espín	16
2.2.1. Corrimiento Químico	17
2.2.2. Interacción Dipolar	20
2.2.3. Interacción Cuadrupolar	22
2.2.4. Interacción Dipolar Residual	24
2.3. Operador densidad y Coherencias	27
3. Experimentos Básicos de RMN	31
3.1. El equipo de RMN	31
3.2. Fenómeno de relajación	32
3.3. Experimento de un pulso	34
3.4. Rotación al Ángulo Mágico (Magic Angle Spinning (MAS))	35
3.5. Desacople	37
3.5.1. Desacople Heteronuclear	37
3.5.2. Desacople Homonuclear	38
3.6. Polarización Cruzada (Cross Polarization (CP))	39
3.6.1. Supresión No Cuaternaria (NQS)	43
3.7. Tiempo de relajación en la terna rotante $T_{1\rho}$	44
4. RMN bidimensional y Técnicas de Reacople	45
4.1. Correlación Heteronuclear	45
4.1.1. HETCOR-FSLG	46
4.1.2. REPT-HSQC	48
4.2. Correlación Homonuclear para espines $\frac{1}{2}$	51

4.2.1. Secuencia Back-to-Back (BaBa)	51
4.3. CODEX (Centerband Only Detection of Exchange)	54
5. Otras Técnicas de Análisis	59
5.1. Difracción de Rayos-X de Polvo (DRXP)	59
5.2. Métodos Térmicos de Análisis	60
5.2.1. Análisis Termogravimétrico (TGA)	60
5.2.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	61
5.3. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	61
6. Derivados Fluoroquinolónicos	63
6.1. Fluoroquinolonas	63
6.1.1. Complejos Fluoroquinolónicos con Aluminio	65
6.1.2. Sacarinatos Fluoroquinolónicos	66
7. Complejos de Fluoroquinolonas con ^{27}Al	69
7.1. Caracterización de los complejos - Análisis de Espectros de ^{13}C	69
7.2. Análisis de Homogeneidad	75
7.2.1. Tiempo de relajación en la terna rotante $T_{1\rho^{13}\text{C}}$	75
7.2.2. Patrones de DRXP	76
7.3. Coordinación de ^{27}Al	77
7.3.1. Espectros de ^{27}Al	77
7.4. Espectroscopía Infrarroja (IR)	81
7.4.1. Serie de NOR	81
7.4.2. Serie de CIP	82
7.5. Discusión y conclusiones	84
8. Sacarinatos Fluoroquinolónicos	85
8.1. Caracterización de los Sacarinatos	86
8.1.1. Espectros de CPMAS de ^{13}C	86
8.1.2. Difracción de Rayos-X de Polvo	93
8.1.3. Métodos Térmicos de Análisis	93
8.1.4. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	94
8.2. Espectroscopía de Correlación en Estado Sólido	97
8.3. Estudio del Carácter Zwitteriónico de CIP	101
8.4. Discusión y conclusiones	101
9. Polimorfismo en SAC-CIP	103
9.1. Análisis Espectral de los Polimorfos	104
9.1.1. Análisis de Espectros de CPMAS de ^{13}C	104
9.1.2. Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido	106
9.1.3. Estudio de Espectros de CPMAS de ^{15}N	110
9.1.4. Análisis de espectros de RMN de ^{19}F	111
9.2. RMN bidimensional	112

9.2.1. Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C en estado sólido	112
9.2.2. Correlación Homonuclear en estado sólido (DQMAS (BaBa))	114
9.3. CODEX	117
9.4. Difracción de Rayos-X de monocristal	119
9.5. Métodos Térmicos de Análisis	121
9.6. FTIR	122
9.7. Discusión y conclusiones	125
10. Conclusiones	127
A. Apéndice	131
A.1. Algunas definiciones	131
A.2. Detalles Experimentales	133
A.2.1. Espectros de RMN de ^{13}C	133
A.2.2. Espectros de RMN de ^{27}Al	133
A.2.3. Espectros de RMN de ^{19}F	133
A.2.4. Espectros de RMN de ^{15}N	133
A.2.5. Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido	134
A.2.6. Experimentos de tiempos de relajación	134
A.2.7. HETCOR-LG	134
A.2.8. REPT-HSQC	134
A.2.9. BaBa	135
A.2.10. CODEX	135
A.2.11. Difracción de Rayos-X de polvo	135
A.2.12. Difracción de Rayos-X de monocristal	135
A.2.13. Métodos Térmicos de Análisis (DSC y TGA)	136
A.2.14. Espectroscopía Infrarroja (IR)	136
Bibliografía	141

Índice de figuras

1.1. Distintas formas sólidas en que puede ser obtenido un compuesto de interés farmacéutico.	3
1.2. Diferentes morfologías observadas a través de microscopia electrónica de rastreo (SEM), correspondientes a los tres polimorfos del antibiótico Norfloxacin obtenidos por cristalización.	4
2.1. Modelo clásico de la formación de la magnetización neta en una muestra.	10
2.2. Movimiento de precesión.	11
2.3. Representación de un pulso de $(\frac{\pi}{2})_y$	12
2.4. Niveles de energía para un espín con $I = \frac{1}{2}$	13
2.5. Mecanismo que produce el corrimiento químico.	17
2.6. Ensanchamiento del espectro de RMN en polvo.	19
2.7. Representación de la variación de la posición de la línea de resonancia en un monocristal, en función de la orientación de las moléculas respecto al campo B_0	21
2.8. Niveles de energía para un espín I con $I = \frac{1}{2}$ y un espín S con $I = 1$ considerando sólo interacción Zeeman.	25
2.9. Niveles de energía para un espín I con $I = \frac{1}{2}$ y un espín S con $I = 1$ considerando interacción Zeeman e interacción Dipolar.	26
2.10. Niveles de energía para un espín I con $I = \frac{1}{2}$ y un espín S con $I = 1$ considerando interacción Zeeman, interacción Dipolar e interacción Cuadrupolar.	27
2.11. Coherencias.	29
3.1. Esquema de un imán de RMN superconductor.	32
3.2. Diagrama en bloques de un espectrómetro tradicional de RMN.	33
3.3. (a) Imán superconductor de 7.02 T, equivalente a una frecuencia de 300 MHz para protones. (b) Cabezal de CPMAS, en la figura insertada se muestran el portamuestra (o rotor) de 7 mm, la bobina y el estator.	33
3.4. Experimento de un pulso.	35
3.5. FID	35
3.6. Esquema ilustrando el dispositivo experimental para realizar rotación al ángulo mágico (MAS).	37

3.7.	Esquema de la secuencia de pulsos empleada para los experimentos de CPMAS.	39
3.8.	Explicación del experimento de Polarización cruzada (CP).	40
3.9.	Secuencia de pulsos empleada para la adquisición de espectros de edición de ^{13}C	43
3.10.	Secuencia de pulsos empleada para la medición de tiempos de relajación en la terna rotante $T_{1\rho}$	43
4.1.	Representación esquemática de la secuencia de pulsos empleada para la obtención de experimentos de correlación heteronuclear bidimensionales utilizando FSLG durante t_1	47
4.2.	Representación esquemática de la secuencia de pulsos utilizada para el experimento bidimensional REPT-HSQC.	49
4.3.	Secuencia de pulsos (BaBa) para la obtención de espectros bidimensionales mediante la excitación de Coherencias Cuánticas Dobles.	52
4.4.	Representación esquemática de un espectro 2D de DQMAS.	53
4.5.	Secuencia de pulsos empleada para el experimento CODEX.	55
5.1.	Curva típica de un experimento de Termogravimetría.	60
5.2.	Curva típica de un experimento de DSC.	61
5.3.	Regiones de absorción aproximadas para varios tipos de ligaduras comunes.	62
6.1.	Estructura química de las Fluoroquinonas, mostrando la numeración empleada para las asignaciones de los espectros de RMN de ^{13}C , ^1H , ^{19}F y ^{15}N	64
6.2.	Estructura química de los Sacarinos Fluoroquinolónicos, mostrando la numeración empleada para las asignaciones de los espectros de ^{13}C , ^1H , ^{19}F y ^{15}N	66
7.1.	Espectros de CPMAS de ^{13}C de CIP y sus complejos.	70
7.2.	Espectros de CPMAS de ^{13}C de NOR y sus complejos.	72
7.3.	Edición de carbonos cuaternarios de CIP, NOR y sus complejos.	73
7.4.	Magnetización de ^{13}C en función del tiempo de <i>spin-lock</i> τ para algunos carbonos seleccionados en el experimento de $T_{1\rho}$	76
7.5.	Patrones de Difracción de Rayos X de polvo para (a)(HCl.CIP), (b) (HCl.CIP) $_3$ Al Método I y (c)(HCl.CIP) $_3$ Al Método II.	77
7.6.	Patrones de Difracción de Rayos X de polvo para (a)(HCl.NOR), (b) (HCl.NOR) $_3$ Al Método I y (c)(HCl.NOR) $_3$ Al Método II.	78
7.7.	Espectros de RMN de ^{27}Al adquiridos en un campo magnético externo de 300 MHz de los complejos (HCl.CIP) $_3$ Al y (HCl.NOR) $_3$ Al obtenidos por los Métodos I y II.	79
7.8.	Espectros de RMN de estado sólido de ^{27}Al adquiridos en un campo magnético externo de 850 MHz de los complejos.	79
7.9.	Espectro bidimensional de MQMAS de ^{27}Al para NOR-Al Método II.	80

7.10. Espectro de FTIR de la serie de NOR.	82
7.11. (1) Espectro de FTIR de la serie de CIP y (2) Espectro de IR de la serie de NOR.	83
8.1. (a) Espectro de CPMAS de ^{13}C de SAC y (b) Espectro de Supresión No Cuaternaria de SAC.	88
8.2. Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) CIP, (b) SAC-CIP. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) CIP y (d) SAC-CIP.	89
8.3. Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) NOR, (b) SAC-NOR. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) NOR y (d) SAC-NOR.	90
8.4. Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) OFL, (b) SAC-OFL. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) OFL y (d) SAC-OFL.	91
8.5. Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) ENR, (b) SAC-ENR. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) ENR y (d) SAC-ENR.	92
8.6. Patrones de difracción de rayos X de polvo de OFL, ENR y sus sacarinos.	93
8.7. Curvas de DSC y TG para (a) DSC para OFL (violeta), SAC-OFL (lila) y SAC (negro), (b) TG para OFL (violeta), SAC-OFL (lila) y SAC (negro), (c) DSC para ENR (verde oscuro), SAC-ENR (verde claro) y SAC (negro) y (d) TG para ENR (verde oscuro), SAC-ENR (verde claro) y SAC (negro).	94
8.8. Espectro de FTIR de SAC.	95
8.9. Espectros de FTIR de: (a) OFL, (b) SAC-OFL, (c) ENR y (d) SAC-ENR.	95
8.10. Espectros de FTIR de: (a) CIP, (b) SAC-CIP, (c) NOR y (d) SAC-NOR.	96
8.11. Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de SAC.	97
8.12. Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de CIP y SAC-CIP.	98
8.13. Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de NOR y SAC-NOR.	98
8.14. Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de OFL y SAC-OFL.	100
8.15. Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de ENR y SAC-ENR.	100
9.1. Microfotografía de cristales de SAC-CIP (II).	103
9.2. Espectro de CPMAS de ^{13}C de (a) CIP, (b) SAC-CIP (I) y (c) SAC-CIP (II).	104
9.3. Espectro de ^{13}C NQS de (a) CIP, (b) SAC-CIP (I) y (c) SAC-CIP (II).	105
9.4. Espectros de alta resolución ^1H a diferentes velocidades de MAS.	107
9.5. Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido de (a) CIP, (b) CIP-SAC (I) y (c) CIP-SAC (II).	108
9.6. Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido a diferentes temperaturas.	109
9.7. Espectros de CPMAS de ^{15}N de (a) CIP, (b) CIP-SAC (I) y (c) CIP-SAC (II).	110
9.8. Espectros de edición de ^{15}N de (a) CIP y (b) CIP-SAC (II).	111
9.9. Espectros de ^{19}F de (a) CIP, (b) CIP-SAC (I) y (c) CIP-SAC (II).	112
9.10. Espectro de Correlación Heteronuclear (HETCOR-FSLG) ^1H - ^{13}C de SAC-CIP (II).	113

9.11. Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de SAC-CIP (II).	114
9.12. Espectro de Correlación Homonuclear ^1H - ^1H de: (a) CIP, (b) SAC-CIP (I) y (c) SAC-CIP (II).	115
9.13. Codex en SAC-CIP (II) y CIP.	118
9.14. Codex en SAC-CIP (I).	120
9.15. Patrones de difracción de rayos X de polvo de (a) SAC-CIP (I) y (b) SAC- CIP (II).	121
9.16. Celda unidad asimétrica de SAC-CIP (II).	123
9.17. Ajuste por cuadrados mínimos de la unidad de CIP en SAC-CIP (II) con respecto a la unidad de CIP en Ciprofloxacina hexahidato.	124
9.18. DSC (línea de punto) y TG (línea sólida) para (a) SAC-CIP (I) y (b) SAC-CIP (II).	125

Capítulo 1

Introducción

Oh! Siempre llegarás a alguna parte, si caminas lo bastante.

Lewis Carroll

1.1. Un poco de historia

El origen de la palabra farmacia es generalmente atribuido a la palabra griega *pharmakon* ("remedio"). Desde hace más de 80.000 años, en la era paleolítica, las personas ya estaban interesados en la flora que los rodeaba y es muy difícil determinar el comienzo de la práctica farmacéutica, ya que esta existe en el mundo rudimentario desde antes de que existiera la misma palabra.

Desde las más antiguas civilizaciones el hombre ha utilizado como forma de alcanzar mejoría en distintas enfermedades productos de origen vegetal, mineral, animal o en los últimos tiempos sintéticos. En un comienzo, combinar diferentes compuestos era considerado un arte practicado sólo por los sacerdotes y los doctores. Los primeros procesos químicos conocidos fueron llevados a cabo por estos artesanos en la Mesopotamia, Egipto y China. Muchos de ellos eran empleados en templos y palacios. En los templos los sacerdotes tenían tiempo especialmente para especular acerca del origen de los cambios que veían en el mundo que los rodeaba. Sus teorías generalmente involucraban la magia, pero también desarrollaron ideas de astronomía, matemática y cosmología que utilizaron para tratar de explicar algunos cambios que ahora son considerados químicos.

La primera cultura en considerar estas ideas de manera científica fue la cultura griega. Desde los tiempos de Thales, alrededor del año 600 a.c., los filósofos griegos hacían especulaciones lógicas acerca del mundo físico en lugar de depender de los mitos para explicar los fenómenos observados.

En la cultura romana existían numerosas formas de administrar las sustancias utilizadas para curar enfermedades. Así, se utilizaban los electuarios como una mezcla de varios polvos de hierbas y raíces medicinales a los que se les añadía una porción de miel fresca. La miel además de ser la sustancia que serviría como vehículo de los principios activos, daba mejor sabor al preparado. En ocasiones se usaba azúcar. También se utilizaba

un jarabe, el cual ya contenía azúcar disuelta, en vez de agua y el conjunto se preparaba formando una masa pastosa.

Es precisamente en la Edad Media donde comienza la actividad del farmacéutico separado del médico. En su botica realiza sus preparaciones magistrales, entendidas éstas como preparaciones individualizadas de los remedios prescritos para cada paciente. En el Renacimiento se va produciendo una separación más clara de la actividad farmacéutica frente a médicos, cirujanos y especieros, mientras que se va produciendo una revolución en el conocimiento farmacéutico que se consolida como ciencia en la Edad Moderna. La formulación magistral es la base de la actividad farmacéutica conjuntamente con la formulación oficial, debido al nacimiento y proliferación de farmacopeas y formularios, y esta situación continúa hasta la segunda mitad del siglo XIX.

La industrialización tuvo un gran impacto en todos los aspectos de la actividad farmacéutica. Primero, llevó a la creación de nuevos compuestos que los farmacéuticos no podían realizar por sus propios medios de manera individual. Segundo, muchos fármacos que los farmacéuticos podían elaborar, ahora se podían realizar en la industria de manera menos costosa y de mejor calidad. Tercero, la industria asumió la responsabilidad que tradicionalmente se volcaba sobre el farmacéutico, por la calidad del medicamento.

A partir de este momento empiezan a aparecer los específicos, que consistían en medicamentos preparados industrialmente por laboratorios farmacéuticos.

Los cambios que trajeron al mundo la revolución industrial encontraron rápidamente una aplicación en la industria de compuestos farmacéuticos, especialmente debido a los desarrollos científicos del siglo XIX. La manufactura a gran escala produjo un gran impacto en la sociedad.

En la actualidad, las regulaciones y los análisis que deben realizarse en cada etapa del diseño y elaboración de los fármacos y medicamentos son cada vez mayores.

Cuando se desarrolla un nuevo compuesto de interés farmacéutico, la estructura molecular del mismo es generalmente conocida antes de comenzar con los experimentos para su determinación en solución. Sin embargo, es usual que la forma de dosificación final con que se comercializa el medicamento no sea en estado líquido, sino en estado sólido. El 80 % de los medicamentos actualmente disponibles en el mercado se presentan como formas de dosificación sólidas con fármacos en estado sólido.

Por mucho tiempo se ha sabido que los compuestos pueden existir en más de una forma polimórfica [7]. La definición clásica de polimorfismo es la habilidad de una sustancia para existir como dos o más formas cristalinas que tienen diferentes arreglos y/o conformaciones de las moléculas en la red cristalina [8] (dando como resultado el mismo compuesto en solución). El concepto de polimorfismo se ilustra de manera clásica con el bien conocido caso del carbono, que presenta 4 polimorfos sólidos con propiedades muy diferentes entre sí (diamante, nanotubos, grafito y fullereno).

En el caso de los sólidos farmacéuticos, Borka y Haleblan (1990) publicaron un lista de compuestos farmacéuticos que incluía a 614 principios activos y 23 excipientes con capacidad polimórfica. Algunos de esos fármacos, como el paracetamol, son líderes en el mercado, y otros presentan una alta tendencia a formar polimorfos, como es el caso de los esteroides (67 %), sulfamidas (40 %) y barbitúricos (63 %).

Actualmente, la definición de polimorfo abarca a los sólidos libres de solventes, a los solvatos y a los amorfos (ver Fig.1.1).

Los sólidos amorfos consisten en arreglos desordenados de moléculas y no poseen una estructura cristalina distinguible [9]. Si bien los sólidos amorfos poseen propiedades interesantes desde un punto de vista farmacéutico, como por ejemplo una mayor solubilidad, no acostumban a ser comercializados debido a su inferior estabilidad química, su mayor higroscopicidad y su tendencia a cristalizar. Sin embargo, existen principios activos comercializados en forma amorfa debido a su mayor biodisponibilidad. Tal es el caso de la Novobiocina [10]. En su forma cristalina, es poco absorbida por el organismo y llega a alcanzar niveles en sangre insuficientes, en claro contraste con la elevada velocidad de absorción de la forma amorfa.

Existe una tercera posibilidad en la que un principio activo puede ser obtenido (ver figura 1.1). Los "solvatos" son fases sólidas en las que moléculas de disolvente ocupan posiciones regulares dentro de la estructura cristalina. Algunas familias de fármacos como los esteroides y sulfonamidas son especialmente proclives a formar solvatos [11].

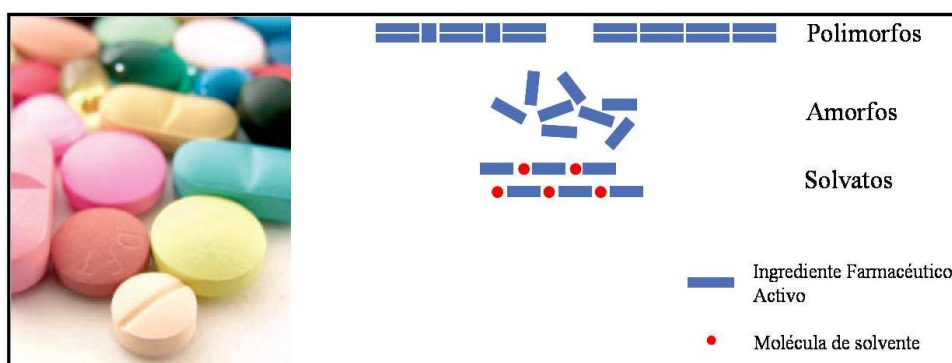


Figura 1.1: *Distintas formas sólidas en que puede ser obtenido un compuesto de interés farmacéutico.*

El polimorfismo es un fenómeno interesante. Las formas polimórficas de un ingrediente farmacéutico activo (IFA) pueden tener diferentes propiedades físicas y químicas, como punto de fusión, reactividad química, solubilidad aparente tasa de disolución, propiedades ópticas y mecánicas. Estas propiedades pueden tener efectos directos en la estabilidad de los compuestos, su disolución y biodisponibilidad. De esta manera, el polimorfismo puede afectar la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos. En la figura 1.2 se muestra las diferentes morfologías de tres polimorfos del antibiótico Norfloxacin [12]. Los polimorfos difieren, en principio, en todas sus propiedades. De allí que sea de gran importancia producir el polimorfo deseado. La aparición de diferentes polimorfos es muy sensible a las condiciones de elaboración, y se han registrado casos de desaparición de polimorfos [13] así como también de irreproducibilidad de los mismos. Los problemas con el cambio polimórfico pueden ocurrir durante el proceso de elaboración, empaquetamiento

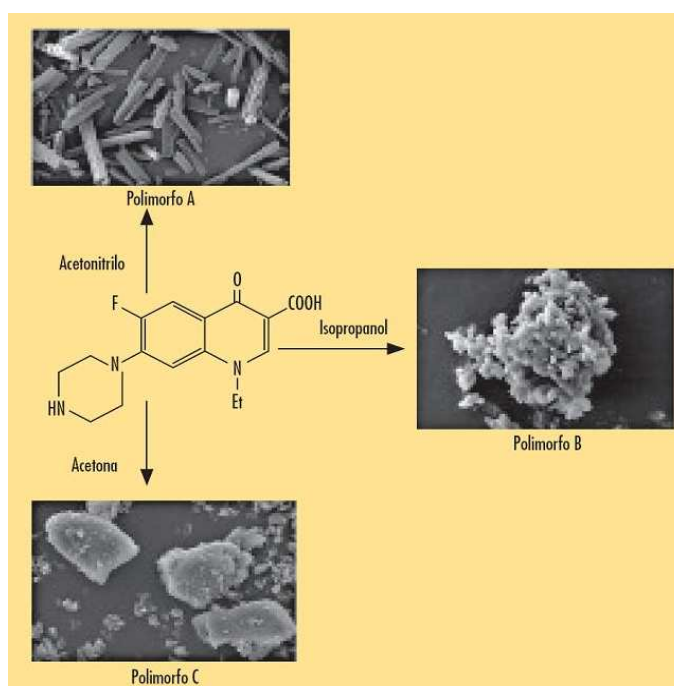


Figura 1.2: *Diferentes morfologías observadas a través de microscopía electrónica de rastreo (SEM), correspondientes a los tres polimorfos del antibiótico Norfloxacina obtenidos por cristalización.*

o almacenamiento.

Un caso paradigmático que ilustra este concepto es el de Ritonavir, un fármaco para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) [14]. Éste había sido producido y comercializado durante 18 meses, hasta que se detectó, durante la producción, un nuevo polimorfo más estable y la mitad de soluble que el anterior. El laboratorio se vio forzado a retirar el medicamento del mercado, puesto que su menor biodisponibilidad hacía que las dosis prescritas fueran insuficientes desde un punto de vista terapéutico. Naturalmente, las pérdidas económicas fueron muy cuantiosas, y el fabricante se vio obligado a cambiar la formulación, teniendo que suministrar el medicamento como una cápsula con el principio activo predisuelto.

El polimorfismo en los compuestos de interés farmacéutico no es un hecho aislado, se sabe que el 90 % de los compuestos tienen múltiples formas, el 48 % tiene polimorfos, el 38 % tiene formas hidratadas y el 30 % solvatos [15]. Por lo tanto, son necesarias técnicas analíticas en estado sólido para la caracterización de las nuevas entidades químicas en las etapas de desarrollo y comercialización.

El aumento en los requerimientos de las autoridades regulatorias y los problemas de patentes revolucionaron las actitudes de las compañías farmacéuticas desde comienzos de los años 90. Desde entonces, se han desarrollado muchas herramientas para enfrentar el

desafío de investigar la estructura química y cristalográfica de diversos compuestos en estado sólido. En principio, los experimentos de difracción de cristales simples producen mapas detallados de las posiciones atómicas en la celda unidad asimétrica y esos trabajos son considerados de gran valor en la caracterización de estado sólido. Sin embargo, la mejor estrategia para el estudio de compuestos en estado sólido claramente involucra la combinación de varias técnicas analíticas complementarias.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica que mide la energía asociada con la reorientación de los núcleos en presencia de un campo magnético ([16],[17]). El uso de la espectroscopía de RMN en la investigación farmacéutica tiene una historia larga y exitosa, mayormente en la etapa de desarrollo del compuesto farmacéutico.

En 1958, Lauterbur publicó el primer espectro de RMN de ^{13}C de CaCO_3 [18]. Sin embargo, la técnica no fue muy utilizada debido a la baja sensibilidad del núcleo y al gran ensanchamiento de las líneas de resonancia a causa de la interacción dipolar heteronuclear.

El comienzo de la alta resolución en los espectros de RMN de ^{13}C y otros núcleos comienza en 1976, cuando Schaefer y Stejskal [19] mostraron por primera vez la potencialidad de la combinación de las técnicas de Rotación al Ángulo Mágico (MAS), Polarización Cruzada (CP) y Desacople de alta potencia de protones. En las dos décadas siguientes a la aparición de ese artículo, el uso de esta combinación de técnicas (CPMAS) fue mayormente aplicada a polímeros sintéticos y a materiales relacionados con zeolitas y, aunque algunos trabajos fueron realizados en compuestos farmacéuticos orgánicos, fue recién en los últimos 15 años que el poder de la RMN de estado sólido en ésta área fue ampliamente reconocido. Esta combinación de métodos es necesaria para aumentar la sensibilidad de RMN en estado sólido y también para superar problemas asociados con el hecho de que la movilidad molecular es relativamente baja. De esta manera, propiedades como la interacción dipolar, que es dependiente de la orientación, son promediadas de forma tal que no tengan gran influencia en las frecuencias de resonancia (proceso que ocurre de manera natural en estado líquido debido a los movimientos moleculares).

La RMN de alta resolución de estado sólido es una herramienta analítica complementaria a la cristalografía de rayos X, y provee información estructural muy útil para estudiar la estructura molecular.

La primera publicación mencionando la realización de un espectro de CPMAS de ^{13}C para una transición de fase orgánica fue la de Becker, Suwelack y Mehring [20] en 1978, mientras que el primer informe de un espectro de CPMAS de ^{13}C para un polimorfo orgánico a temperatura ambiente parece ser el de Ripmeester [21] en 1980.

La técnica de CPMAS es actualmente aplicada rutinariamente, pero los experimentos de RMN se han expandido hasta dar lugar a un gran número de experimentos sofisticados, que comprenden una gran variedad de secuencias de pulsos para responder a diferentes preguntas, acerca de la movilidad molecular, las transformaciones de fase y hasta sobre la estructura molecular.

Tradicionalmente, la caracterización física de los fármacos se basaba en la difracción de rayos X en polvo (DRXP) y en los métodos térmicos como la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la termogravimetría (TG). En los años 40, la espectroscopía IR se convirtió en otra técnica muy empleada. Sin embargo, ahora se puede argumentar que la

técnica de RMN de estado sólido es la técnica por excelencia para la caracterización de fármacos en estados sólido.

La primera comparación de dos polimorfos de interés farmacéutico mediante la técnica de RMN se publicó en 1980 [22] para el compuesto nolvadex. A partir de allí se publicaron algunos trabajos sobre dicha técnica en la década de los años 80, especialmente de los grupos de Stephen R. Byrn y Robin K. Harris, pero las empresas farmacéuticas seguían sin apreciar el potencial de la RMN en estado sólido.

En el año 1989, Etter y Vojta publicaron un trabajo sobre el uso de la espectroscopía de RMN en estado sólido junto con la cristalografía de rayos X para estudiar la estructura de sólidos farmacéuticos. Así, fenómenos tales como el polimorfismo, múltiples moléculas por celda unidad asimétrica, desorden, interacciones puente hidrógeno inter e intra moleculares, tautomerismo y solvatación fueron estudiados por espectroscopía de RMN en estado sólido. Su trabajo demostró que el análisis estructural y conformacional de sólidos farmacéuticos por técnicas espectroscópicas y de difracción proveían información complementaria. Por lo tanto, una caracterización completa de los compuestos debe incluir ambas técnicas.

Una de las ventajas de la RMN es la habilidad de estudiar sistemas que no pueden analizadas por difracción de Rayos X. Las formas amorfas, por ejemplo, por lo general dan muy buenos resultados en RMN. La RMN también es muy útil para detectar desorden estructural [23],[24]. Otra ventaja es la posibilidad de realizar experimentos en función de la temperatura, en el rango de -150°C a 200°C .

La cristalografía de RMN es una disciplina emergente para agregar a las reconocidas áreas de cristalografía de rayos X, de neutrones y electrónica. Su poder reside en parte, en su naturaleza complementaria a los métodos de difracción, y al resolver problemas estructurales en estado sólido va a ser necesario usar dos técnicas a la vez.

Mencionemos algunas de las debilidades de DRX. Es una técnica que se basa en orden de largo alcance, es por ello que se necesitan cristales de un tamaño razonable. El factor determinante de los experimentos es la densidad electrónica y no la posición de los núcleos. Los átomos de ^1H no pueden ser bien localizados, especialmente en presencia de átomos pesados. El desorden en los compuestos puede traer problemas, por ejemplo, no se puede obtener información estructural para los sólidos amorfos, ni se pueden estudiar materiales heterogéneos.

Es por esto que la RMN de estado sólido nos permite estudiar varios aspectos que no se pueden analizar mediante DRX. Los espectros de RMN dependen del entorno local del núcleo estudiado. Así, es posible obtener información inmediata acerca de la unidad asimétrica. Se pueden medir distancias internucleares a través de las constantes de acople dipolar. Permite estudiar desorden espacial y dinámico y es posible analizar materiales heterogéneos.

Uno de los atributos más poderosos de la RMN como herramienta para investigar la estructura química es la posibilidad de acceder a diferentes núcleos y por lo tanto estudiar un amplio rango de elementos. De hecho, todos los elementos con isótopos no radiactivos tienen al menos un nucleido magnético excepto el Argón y el Cerio. Además, la RMN es muy específica, es decir, cada nucleido tiene su rango de resonancia en un campo

magnético dado y se superponen en casos muy raros. Entonces, los diferentes elementos que forman un dado compuesto pueden ser estudiados por RMN, los espectros de cada uno de estos núcleos proveen información complementaria.

Es importante notar que la RMN es una técnica multinuclear no destructiva que puede mostrar el entorno químico de determinados núcleos dentro de la molécula. Además, es una técnica cuantitativa que debe usarse junto a otras técnicas de estado sólido como la TG, DSC, Microscopía Óptica y técnicas de difracción de rayos X (de polvo y de monocristal), para la investigación de fármacos.

El análisis de diferentes compuestos de interés farmacéutico por RMN en estado sólido puede proveer información crucial que generalmente dirime información contradictoria brindada por otras técnicas analíticas tales como la espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), la difracción de rayos X y métodos térmicos de análisis.

1.2. Nuestro Trabajo

En este trabajo de Tesis, se estudió nuevos compuestos de interés farmacéutico sintetizados por el grupo del Dr. Rubén H. Manzo del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Nacional de Córdoba. Estos compuestos son derivados de las fluoroquinolonas, una familia de agentes antibacterianos sintéticos de amplia utilización en clínica [1]-[2]. Uno de estos compuestos presentó polimorfismo y fue exhaustivamente estudiado por varias técnicas de estado sólido.

Para los sistemas estudiados aquí, el núcleo de ^{13}C será la primera opción para los experimentos de CPMAS. Sin embargo, otros núcleos también fueron relevantes, en particular para el estudio de polimorfismo. En particular, los sistemas estudiados contienen nitrógeno y realizar CPMAS de ^{15}N en abundancia natural es interesante para el análisis de las drogas, a pesar de requerir de muchas acumulaciones debido a la baja receptividad de este núcleo.

Los derivados fluoroquinolónicos contienen flúor, y el ^{19}F es un excelente núcleo para RMN. A pesar de que en las etapas tempranas de la CPMAS para sistemas orgánicos había problemas tecnológicos para lograr el desacople de protones en experimentos que involucraban ^{19}F debido a la cercanía en las frecuencias de resonancia de ^{19}F y ^1H , actualmente este problema está resuelto, lo que nos permitió estudiar los compuestos utilizando también este núcleo. Hay muy pocos ejemplos en la literatura de ^{19}F aplicada al estudio de polimorfismo, entre ellos los trabajos del grupo de Robin K. Harris [3]-[4] y del grupo de R. M. Wenslow [5].

Hasta el momento no mencionamos la RMN de ^1H , que si bien es muy importante en la RMN de estado líquido, en la RMN de estado sólido presenta problemas a la hora de obtener espectros de alta resolución debido a la fuerte interacción dipolar entre estos núcleos que es muy difícil de remover. El primer uso de ^1H de alta resolución para el estudio de polimorfismo orgánico fue para el ácido aminobenzoico [6]. En esta tesis hicimos uso de los avances tecnológicos en esta área y logramos realizar experimentos de alta resolución en ^1H a muy altas velocidades de rotación que nos permitieron entender

aspectos cristalográficos importantes de los polimorfos estudiados.

Capítulo 2

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Basta un poco de espíritu aventurero para estar siempre satisfechos, pues en esta vida, nada sucede como deseábamos, como suponíamos, ni como teníamos previsto.

Noel Clarasó

2.1. Elementos Básicos

Muchos núcleos atómicos en su estado fundamental tienen un momento angular de espín, \vec{J} , distinto de cero y un momento magnético asociado a este momento angular de espín que está dado por

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{J} \quad (2.1)$$

Donde γ es el factor giromagnético y es una constante característica de cada tipo de núcleo. Con pocas excepciones, el orden de magnitud de estos momentos magnéticos está entre 10^{-3} y 10^{-4} magnetones de Bohr. Son estos momentos los que dan lugar al magnetismo nuclear [17].

Para fijar ideas, pensemos inicialmente en un modelo vectorial. La magnetización neta \vec{M} , proveniente de los núcleos en una muestra en presencia de un campo magnético aplicado \vec{B}_0 es la suma vectorial de los momentos magnéticos individuales asociados a cada núcleo (ver figura 2.1) [25].

$$\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i \quad (2.2)$$

en donde $\vec{\mu}_i$ es el momento magnético asociado con el i -ésimo núcleo ($\vec{\mu}_i = \gamma \vec{J}_i$).

Entonces, podemos escribir la magnetización neta de la muestra como

$$\vec{M} = \gamma \vec{J} \quad (2.3)$$

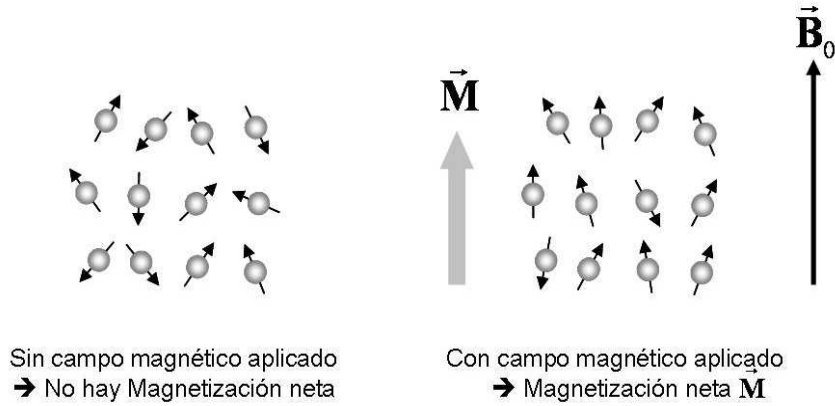


Figura 2.1: Modelo clásico de la formación de la magnetización neta en una muestra.

En la ecuación anterior, \vec{J} es la suma de los momentos angulares de espín de cada núcleo.

Si la muestra es colocada en un campo magnético uniforme \vec{B}_0 se produce un torque \vec{T} sobre el vector magnetización,

$$\vec{T} = \frac{d}{dt} \vec{J} \quad (2.4)$$

y en este caso tenemos

$$\vec{T} = \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad (2.5)$$

Combinando las ecuaciones 2.3-2.5 podemos escribir

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad (2.6)$$

que describe el movimiento del vector magnetización \vec{M} en el campo \vec{B}_0 . La magnetización va a precesar en torno a \vec{B}_0 manteniendo un ángulo constante con el campo magnético como se muestra en la figura 2.2. A la frecuencia de precesión se le llama frecuencia de Larmor. En la RMN el campo magnético aplicado es generalmente llamado \vec{B}_0 y se lo considera en la dirección z ($B_0 \hat{k}$), de esta manera la frecuencia de Larmor queda definida como

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (2.7)$$

La frecuencia de precesión tiene un signo definido y su sentido está determinado por el signo del factor giromagnético γ .

Pensemos ahora en el efecto que tendrá sobre los núcleos la aplicación de ondas de radiofrecuencia (rf). Las ondas de rf tienen asociadas a ellas un campo magnético oscilante (\vec{B}_1) que será el que actúe, junto al campo estático, en un experimento de RMN.

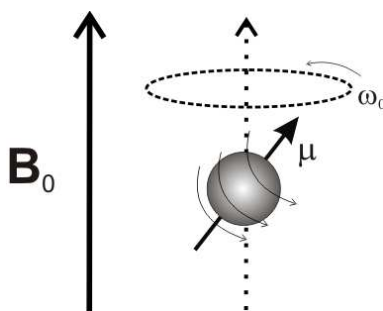


Figura 2.2: *Movimiento de precesión.*

El campo de radio frecuencia (rf) es una de las herramientas más importantes en RMN y se aplica perpendicular a \vec{B}_0 . Convencionalmente se representa al campo \vec{B}_1 como la suma de dos componentes circularmente polarizadas, cada una de amplitud B_1 y frecuencia ω_{rf} . Una de estas componentes rotará en el mismo sentido que la precesión de los espines y será la responsable del fenómeno de resonancia cuando $\omega_{rf} = \omega_0$. La otra componente puede ignorarse ya que $B_1 \ll B_0$. Si realizamos una transformación de coordenadas a una terna que rote con frecuencia ω_{rf} en torno a \vec{B}_0 logramos que el campo \vec{B}_1 parezca estacionario, a esta terna se la llama *terna rotante*.

Resumiendo, en presencia de un campo \vec{B}_0 , el vector magnetización va a precesar con una frecuencia ω_0 . Al aplicar un campo \vec{B}_1 con frecuencia ω_{rf} , y en el caso en que $\omega_0 = \omega_{rf}$, el vector magnetización aparece estacionario en la terna rotante. En efecto, el campo \vec{B}_0 es removido en esta terna y el campo efectivo estático paralelo a z es cero. Entonces, en presencia de un pulso de rf, el único campo que permanece en la terna rotante es el campo \vec{B}_1 y el vector magnetización precesará en torno al campo resultante, que este caso es \vec{B}_1 , con una frecuencia que denominaremos frecuencia de nutación $\omega_1 = \gamma B_1$. La dirección del campo magnético producido por el pulso de rf puede estar en cualquier lugar en el plano xy . La fase de un pulso, ϕ_{rf} , está definida como el ángulo que hace \vec{B}_1 con el eje x en la terna rotante.

En una terna que rota a ω_{rf} con respecto a \vec{B}_0 , en ausencia de un pulso, la frecuencia de precesión de Larmor es reducida de ω_0 a $\omega_0 - \omega_{rf}$ alrededor de \vec{B}_0 . Entonces, cuando $\omega \neq \omega_0$ el campo efectivo longitudinal en la terna rotante ya no es cero, y toma el valor $(B_0 - \frac{\omega}{\gamma})$. De esta manera, definimos un campo magnético efectivo \vec{B}_{ef}

$$\vec{B}_{ef} = \left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \hat{k} + \vec{B}_1 \quad (2.8)$$

Y bajo esas circunstancias la magnetización precesa en torno de B_{ef} en la terna rotante con frecuencia

$$\Omega = \gamma B_{ef} \quad (2.9)$$

En los experimentos de RMN, generalmente decimos que los pulsos de rf voltean la magnetización. El ángulo de volteo θ_{rf} es el ángulo que va a rotar la magnetización durante el tiempo τ_{rf} que dure la aplicación del pulso. De esta manera

$$\theta_{rf} = \omega_1 \tau_{rf} \quad (2.10)$$

Entonces, el pulso está caracterizado por un ángulo de volteo θ_{rf} y una fase ϕ_{rf} . La fase indica el ángulo entre el eje x y el eje alrededor del cual rota la magnetización. En la figura 2.3 se muestra el efecto de un pulso con $\theta_{rf} = \frac{\pi}{2}$ y $\phi_{rf} = \frac{\pi}{2}$. La magnetización en la dirección z es rotada en 90° alrededor del eje y dando una magnetización en la dirección x .

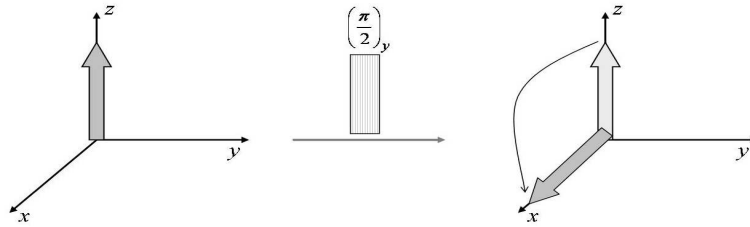


Figura 2.3: Representación de un pulso de $(\frac{\pi}{2})_y$

Analicemos ahora la misma situación, pero desde un punto de vista Mecánico Cuántico. Pensemos en un sistema simple, por ejemplo, un espín aislado en el campo magnético estático y uniforme de un experimento de RMN sin otras interacciones presentes. El Hamiltoniano ($\hat{\mathcal{H}}$) para un espín nuclear en un campo estático es

$$\hat{\mathcal{H}} = -\hat{\mu} \cdot \vec{\mathbf{B}}_0 \quad (2.11)$$

donde $\hat{\mu}$ es el operador momento magnético nuclear y $\vec{\mathbf{B}}_0$ el campo magnético aplicado. Este Hamiltoniano es generalmente conocido como *Hamiltoniano Zeeman*. Podemos definir el operador momento angular adimensional $\hat{\mathbf{I}}$, tal que $\hat{\mathbf{J}} = \hbar \hat{\mathbf{I}}$. De esta manera, el operador $\hat{\mu}$ puede escribirse en términos del operador de espín nuclear adimensional,

$$\hat{\mu} = \gamma \hbar \hat{\mathbf{I}} \quad (2.12)$$

Como en la sección anterior, consideramos a $\vec{\mathbf{B}}_0$ en la dirección z y de esta manera se obtiene

$$\hat{\mathcal{H}} = -\gamma \hbar \hat{I}_z B_0 \quad (2.13)$$

Las autofunciones de $\hat{\mathcal{H}}$ son las funciones de onda que describen los posibles estados del sistema de espín en el campo $\vec{\mathbf{B}}_0$. Como $\hat{\mathcal{H}}$ es proporcional a \hat{I}_z en este caso, las

autofunciones de $\hat{\mathcal{H}}$ son las autofunciones de \hat{I}_z , y se escriben $|I, m\rangle$, donde I es el número cuántico de espín nuclear. El número cuántico magnético m puede tomar $2I + 1$ valores: $I, I - 1, I - 2, \dots, -I$. Los autovalores de $\hat{\mathcal{H}}$ son las energías asociadas con los diferentes estados posibles del espín. Estas energías son

$$E_{I,m} = -\gamma\hbar B_0 m \quad (2.14)$$

Para un núcleo con $I = \frac{1}{2}$, $m = \pm\frac{1}{2}$, hay dos autoestados posibles con energías $E_{\frac{1}{2}, \pm\frac{1}{2}} = \mp\frac{1}{2}\gamma\hbar B_0$ (ver figura 2.4). Estos estados se conocen como estados Zeeman. La energía de transición ΔE entre los estados de espín es $\gamma\hbar B_0$. En unidades de frecuencia, esto corresponde a ω_0 , la frecuencia de Larmor en el modelo vectorial.

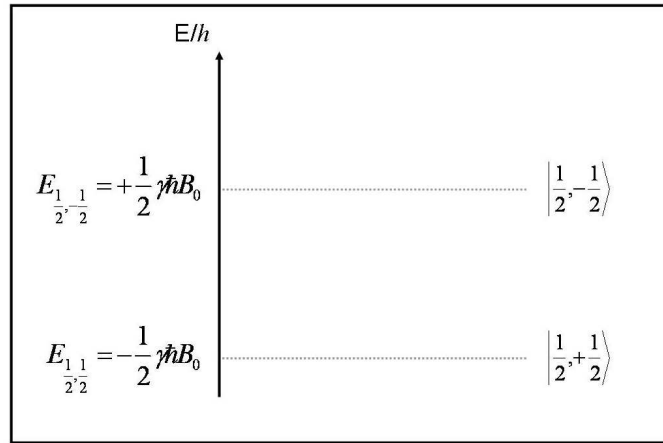


Figura 2.4: Niveles de energía para un espín con $I = \frac{1}{2}$.

Entonces, en una muestra de núcleos no interactuantes de espín $\frac{1}{2}$, cada sistema de espín puede estar en uno de los dos autoestados. En equilibrio, hay una distribución de Boltzmann de los espines nucleares en estos dos estados posibles, la población p_ψ de cada autoestado ψ , está dada por

$$p_\psi = \frac{e^{(-E_\psi/k_B T)}}{\sum_\psi e^{(-E_\psi/k_B T)}} \quad (2.15)$$

donde E_ψ es la energía del autoestado ψ . Para un espín $\frac{1}{2}$ a Temperatura ambiente ($T_{amb} \approx 300$ °K), tenemos que $\sum_{m=\pm\frac{1}{2}} e^{(-E_{I,m}/k_B T_{amb})} \approx 2$

La magnetización neta de una muestra que contiene N espines, será entonces

$$M = N\gamma\hbar \frac{\sum_{m=-I}^I m e^{(\frac{\gamma\hbar m B_0}{k_B T})}}{\sum_{m=-I}^I e^{(\frac{\gamma\hbar m B_0}{k_B T})}} \quad (2.16)$$

El cociente $\frac{\gamma \hbar m B_0}{k_B T}$ es por lo general un número muy pequeño a Temperatura ambiente, esto permite hacer un desarrollo lineal de la forma exponencial de Boltzmann, de esta forma obtenemos

$$M = \frac{N \gamma^2 \hbar^2 B_0 \sum_{m=-I}^I m^2}{k_B T} = \frac{N \gamma^2 \hbar^2 I(I+1)}{3 k_B T} B_0 = \chi_0 B_0 \quad (2.17)$$

donde χ_0 es la susceptibilidad nuclear estática. La proporcionalidad de χ_0 con $\frac{1}{T}$ es la bien conocida Ley de Curie. Calculando las diferencias de poblaciones para ^1H , ^{13}C y ^{15}N en presencia de un campo de 7.04 T como el que se encuentra en nuestro laboratorio obtenemos los siguientes valores para la magnetización

$$\begin{aligned} M_{1H} &= 2,04 \cdot 10^{-5} J/T \\ M_{13C} &= 1,42 \cdot 10^{-8} J/T \\ M_{15N} &= 7,70 \cdot 10^{-10} J/T \end{aligned} \quad (2.18)$$

considerando $N=1$ mol, $T=300^\circ\text{K}$ y teniendo en cuenta la abundancia natural de cada uno de los núcleos.

La naturaleza de los autoestados y sus poblaciones respectivas determinan todas las propiedades del conjunto de sistemas de espines en la muestra y por lo tanto determina el resultado de cualquier experimento de RMN. Por ejemplo, el valor de expectación de la magnetización z , está dado por la suma de todas las contribuciones provenientes de cada autoestado, escaleado por la población de cada uno de ellos. A este valor lo llamamos *promedio de ensamble de la magnetización z* , y lo denotamos poniendo una barra sobre la cantidad promediada

$$\overline{\langle \hat{\mu}_z \rangle} = \gamma \hbar \overline{\langle \hat{I}_z \rangle} = \gamma \hbar \sum_{\psi} p_{\psi} \langle \psi | \hat{I}_z | \psi \rangle \quad (2.19)$$

donde $\gamma \hbar \langle \psi | \hat{I}_z | \psi \rangle$ es el valor de expectación de la magnetización en z para un espín en el autoestado ψ . Para un sistema de dos niveles, correspondiente a un espín $\frac{1}{2}$ aislado en un campo \vec{B}_0 , tenemos

$$\begin{aligned} \overline{\langle \hat{\mu}_z \rangle} &= \gamma \hbar (p_{\frac{1}{2}} \langle \frac{1}{2}, \frac{1}{2} | \hat{I}_z | \frac{1}{2}, \frac{1}{2} \rangle + p_{-\frac{1}{2}} \langle \frac{1}{2}, -\frac{1}{2} | \hat{I}_z | \frac{1}{2}, -\frac{1}{2} \rangle) \\ &= \gamma \hbar (\frac{1}{2} p_{\frac{1}{2}} - \frac{1}{2} p_{-\frac{1}{2}}) \\ &= \frac{1}{2} \gamma \hbar (p_{\frac{1}{2}} - p_{-\frac{1}{2}}) \end{aligned} \quad (2.20)$$

donde $p_{\pm\frac{1}{2}}$ son las poblaciones de los respectivos estados de espín. En otras palabras, la magnetización z corresponde a la diferencia de población entre los dos sistemas de espines.

Como mencionamos en la sección anterior, un pulso de rf introduce un campo magnético oscilante $\vec{\mathbf{B}}_1(t)$ en el sistema de espines. Veremos que los autoestados del Hamiltoniano que describe este sistema son dependientes del tiempo y además son combinaciones lineales de los estados Zeeman encontrados previamente. Es por esto que diremos que el campo oscilante $\vec{\mathbf{B}}_1(t)$ mezcla los estados Zeeman.

Escribamos el Hamiltoniano que describe al sistema de un espín en presencia de un campo magnético externo y estático $\vec{\mathbf{B}}_0$ en la dirección z y un campo magnético oscilante dependiente del tiempo $\vec{\mathbf{B}}_1(t)$ que vamos a considerar en la dirección x . de esta manera, el campo total experimentado por el núcleo será

$$\vec{\mathbf{B}}_{total} = \hat{\mathbf{i}}B_1\cos(\omega_{rf}t) + \hat{\mathbf{k}}B_0 \quad (2.21)$$

El Hamiltoniano que describe la interacción de un espín $\vec{\mathbf{I}}$ con un campo magnético $\vec{\mathbf{B}}$ esta dado por

$$\hat{\mathcal{H}} = -\hat{\boldsymbol{\mu}} \cdot \vec{\mathbf{B}} = -\gamma\hbar\hat{\mathbf{I}} \cdot \vec{\mathbf{B}} \quad (2.22)$$

y en este caso tenemos

$$\hat{\mathcal{H}} = -\gamma\hbar(\hat{I}_zB_0 + \hat{I}_xB_1\cos(\omega_{rf}t)) \quad (2.23)$$

Haciendo la transformación a la terna rotante obtenemos

$$\hat{\mathcal{H}}' = -\hbar((\gamma B_0 - \omega_{rf})\hat{I}_z + \gamma B_1\hat{I}_x) \quad (2.24)$$

Resolviendo la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, para un sistema compuesto por un espín $\frac{1}{2}$ se obtiene

$$\Psi'(t) = c_{\frac{1}{2}}(t) \left| \frac{1}{2} \right\rangle + c_{-\frac{1}{2}}(t) \left| -\frac{1}{2} \right\rangle \quad (2.25)$$

donde

$$\begin{aligned} c_{\frac{1}{2}}(t) &= c_{\frac{1}{2}}(0)\cos(\frac{1}{2}\omega_1t) - ic_{-\frac{1}{2}}(0)\sen(\frac{1}{2}\omega_1t) \\ c_{-\frac{1}{2}}(t) &= c_{-\frac{1}{2}}(0)\cos(\frac{1}{2}\omega_1t) + ic_{\frac{1}{2}}(0)\sen(\frac{1}{2}\omega_1t) \end{aligned} \quad (2.26)$$

Si calculamos el valor de expectación de la magnetización y en la terna rotante luego de la aplicación de un pulso en la dirección x se obtiene

$$\langle \hat{\mu}_y(t) \rangle = -\frac{1}{2}\gamma\hbar(p_{\frac{1}{2}}(0) - p_{-\frac{1}{2}}(0))\sen(\omega_1t) \quad (2.27)$$

Vemos que el resultado es la magnetización inicial que teníamos en el eje z multiplicada por $\sen(\omega_1t)$, el mismo resultado que se obtiene en el modelo vectorial.

2.2. Interacciones de Espín

Hasta ahora, las interacciones que hemos considerado sobre el sistema de espines han sido aquellas interacciones con campos magnéticos aplicados externamente. La interacción con el campo estático y uniforme $\vec{\mathbf{B}}_0$ en un experimento de RMN y la interacción debida a los pulsos de rf, $\vec{\mathbf{B}}_1$. Sin embargo, hay fuentes de campos magnéticos en el interior de la muestra que también afectan al sistema de espines y en muestras sólidas pueden provocar un gran ensanchamiento de las líneas de resonancia.

Para un sistema de espines, el Hamiltoniano total del sistema ($\hat{\mathcal{H}}_T$) puede escribirse como

$$\hat{\mathcal{H}}_T = \hat{\mathcal{H}}_Z + \hat{\mathcal{H}}_{rf} + \hat{\mathcal{H}}_{CS} + \hat{\mathcal{H}}_D + \hat{\mathcal{H}}_J + \hat{\mathcal{H}}_Q \quad (2.28)$$

Donde las principales interacciones son

- $\hat{\mathcal{H}}_Z$, el Hamiltoniano Zeeman que describe la interacción de los espines nucleares con el campo magnético externo $\vec{\mathbf{B}}_0$.
- $\hat{\mathcal{H}}_{rf}$, el Hamiltoniano de rf. Este es un Hamiltoniano dependiente del tiempo que describe la interacción de los espines con el campo externo dependiente del tiempo, $\vec{\mathbf{B}}_1$.
- $\hat{\mathcal{H}}_{CS}$, el Hamiltoniano de Corrimiento Químico (CS por sus siglas en inglés, Chemical Shift) que describe el efecto del apantallamiento electrónico de $\vec{\mathbf{B}}_0$ sobre los espines nucleares.
- $\hat{\mathcal{H}}_D$, el Hamiltoniano de acople dipolar que describe la interacción espín-espín a través del espacio.
- $\hat{\mathcal{H}}_J$, el Hamiltoniano de acople J o Hamiltoniano de acople escalar, describe la interacción magnética indirecta entre los espines nucleares mediada por la presencia de electrones.
- $\hat{\mathcal{H}}_Q$, el Hamiltoniano de acople cuadrupolar. Este es un Hamiltoniano que describe la interacción de los núcleos que poseen $I > \frac{1}{2}$ con el gradiente de campo eléctrico.

En un experimento de RMN, el campo $\vec{\mathbf{B}}_0$ es, en general, varios órdenes de magnitud más grande que cualquier campo local originado en el interior de la muestra. De esta manera, muchos de estos campos locales tienen efectos despreciables sobre el sistema de espines (en equilibrio). Las únicas componentes de los campos locales que tendrán efecto sobre el sistema serán

- las componentes paralelas o antiparalelas al campo aplicado $\vec{\mathbf{B}}_0$ y
- las componentes que precesan en el plano perpendicular al campo aplicado $\vec{\mathbf{B}}_0$ a la frecuencia de Larmor o con alguna frecuencia cercana a ella.

Las componentes paralelas (o antiparalelas) al campo \vec{B}_0 se suman (o restan) a \vec{B}_0 y por lo tanto alteran las energías de los estados de espín que están determinadas por el campo total paralelo a \vec{B}_0 . Las componentes perpendiculares a \vec{B}_0 que precesan cercanas a la frecuencia de Larmor están relacionadas a los pulsos de rf. Como ya hemos visto, tales campos mezclan los estados Zeeman.

A continuación, describiremos las interacciones más importantes para nuestro trabajo de Tesis y consideraremos brevemente el efecto de cada una de ellas sobre el espectro de RMN.

2.2.1. Corrimiento Químico

El corrimiento químico es probablemente una de las interacciones más importante en RMN. Como es muy sensible al entorno local, ayuda a distinguir espines que se encuentran dentro de diferentes grupos químicos, por ejemplo los núcleos de ^{13}C de los grupos aromáticos, CH_3 -, CH_2 - y COOH tienen corrimientos químicos lo suficientemente diferentes como para distinguirlos.

Los núcleos en una muestra están rodeados por electrones. En presencia del fuerte campo magnético estático \vec{B}_0 , los electrones cercanos al núcleo crean un campo magnético inducido, \vec{B}_{ind} , por lo tanto el espín nuclear experimenta un campo local \vec{B}_{loc} , que está dado por

$$\vec{B}_{loc} = \vec{B}_0 + \vec{B}_{ind} \quad (2.29)$$

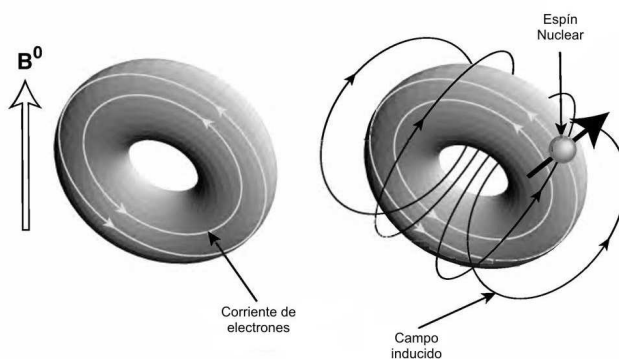


Figura 2.5: Mecanismo que produce el corrimiento químico. Figura obtenida de ref. [26], ©2008 John Wiley & Sons Ltd.

Este campo secundario contribuye al campo total sentido por el núcleo y por lo tanto tiene la capacidad de modificar la frecuencia de resonancia del mismo. La interacción del campo secundario producido por los electrones con el núcleo es la interacción de apantallamiento químico. El corrimiento en frecuencia que provoca esta interacción en un espectro de RMN es el corrimiento químico (CS).

El Hamiltoniano de apantallamiento químico actuando sobre un espín $\vec{\mathbf{I}}$ es

$$\mathcal{H}_{CS} = -\gamma\hbar\vec{\mathbf{I}} \cdot \sigma \cdot \vec{\mathbf{B}}_0 \quad (2.30)$$

En general, la distribución electrónica alrededor de un núcleo en una molécula no es esféricamente simétrica. Por lo tanto, el tamaño de la corriente electrónica alrededor del campo, y como consecuencia, el tamaño del apantallamiento, va a depender de la orientación de la molécula dentro del campo aplicado $\vec{\mathbf{B}}_0$. El tensor de apantallamiento químico σ es un tensor reducible de rango 2 y puede representarse como

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.31)$$

Es útil descomponer al tensor de apantallamiento químico en dos componentes, una simétrica (σ^s) y otra antisimétrica (σ^{as})

$$\sigma^s = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \frac{1}{2}(\sigma_{xy} + \sigma_{yx}) & \frac{1}{2}(\sigma_{xz} + \sigma_{zx}) \\ \frac{1}{2}(\sigma_{xy} + \sigma_{yx}) & \sigma_{yy} & \frac{1}{2}(\sigma_{yz} + \sigma_{zy}) \\ \frac{1}{2}(\sigma_{xz} + \sigma_{zx}) & \frac{1}{2}(\sigma_{yz} + \sigma_{zy}) & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.32)$$

$$\sigma^{as} = \begin{pmatrix} 0 & \frac{1}{2}(\sigma_{xy} - \sigma_{yx}) & \frac{1}{2}(\sigma_{xz} - \sigma_{zx}) \\ \frac{1}{2}(\sigma_{xy} - \sigma_{yx}) & 0 & \frac{1}{2}(\sigma_{yz} - \sigma_{zy}) \\ \frac{1}{2}(\sigma_{xz} - \sigma_{zx}) & \frac{1}{2}(\sigma_{yz} - \sigma_{zy}) & 0 \end{pmatrix} \quad (2.33)$$

La razón de descomponer el tensor de esta manera, es que sólo la componente simétrica va a afectar al espectro de RMN, como ya veremos más adelante. Por lo tanto, a partir de ahora cuando mencionemos σ nos estaremos refiriendo a la parte simétrica del mismo.

Podemos escribir el tensor σ en un sistema de coordenadas en el cual sea diagonal. Este eje de coordenadas se denomina Sistema de Ejes Principales (x^{SEP} , y^{SEP} , z^{SEP}). La orientación del SEP está determinada por la estructura electrónica de la molécula que contiene al núcleo estudiado y está fijo con respecto a la molécula. Podemos imaginarnos al tensor como un elipsoide fijo en la molécula y centrado en el núcleo. Los ejes principales de la elipse coinciden con los ejes principales del SEP del tensor y la longitud de cada eje principal del elipsoide es proporcional al valor principal del tensor asociado con ese eje principal. Los tres valores principales del tensor de apantallamiento químico $\sigma_{\alpha\alpha}^{SEP}$ son expresados generalmente como el valor isotrópico σ_{iso} , la anisotropía Δ y la asimetría η . Estas cantidades están definidas como

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(\sigma_{xx}^{SEP} + \sigma_{yy}^{SEP} + \sigma_{zz}^{SEP}) \quad (2.34)$$

$$\Delta = \sigma_{zz}^{SEP} - \sigma_{iso} \quad (2.35)$$

$$\sigma_{iso} = \frac{\sigma_{xx}^{SEP} - \sigma_{yy}^{SEP}}{\sigma_{zz}^{SEP}} \quad (2.36)$$

Veamos ahora cómo afecta el tensor de apantallamiento químico a nuestras muestras. En una muestra sólida en polvo, todas las orientaciones moleculares están presentes. Cada orientación molecular implica una orientación diferente de los ejes principales del tensor de apantallamiento químico con respecto al campo \vec{B}_0 y por lo tanto tiene un corrimiento químico diferente asociado a él. De esta manera, el espectro de RMN va a tener la forma de un patrón de polvo con líneas provenientes de las diferentes orientaciones moleculares cubriendo un rango de frecuencias. Las líneas de cada orientación se superponen formando una línea continua.

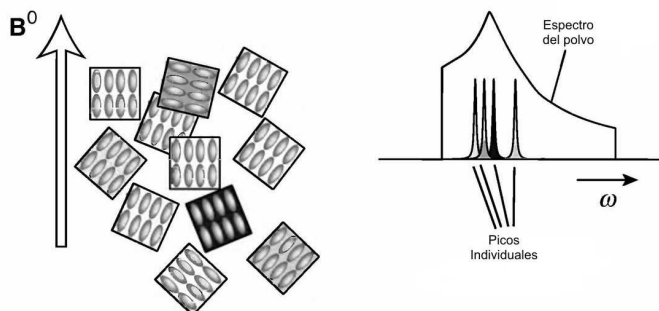


Figura 2.6: *Ensanchamiento del espectro de RMN en polvo. Figura obtenida de ref. [26], ©2008 John Wiley & Sons Ltd.*

La frecuencia espectral total en unidades absolutas es la frecuencia de Larmor más la contribución del corrimiento químico

$$\omega = \omega_0 + \omega_{cs} \quad (2.37)$$

Sin embargo, cuando se realiza un experimento de RMN no se miden necesariamente frecuencias absolutas; se utiliza una sustancia de referencia y la frecuencia de las líneas de la muestra son medidas relativas a una línea específica en el espectro de la sustancia empleada como referencia. El corrimiento químico δ_{iso} se define como

$$\delta_{iso} = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (2.38)$$

Donde ν es la frecuencia espectral de la señal para el espín de interés y ν_{ref} es la frecuencia de resonancia del mismo espín en algún compuesto de referencia. El tensor de corrimiento químico correspondiente tiene los siguientes elementos

$$\delta_{\alpha\beta} = \frac{\sigma_{\alpha\beta}(ref) - \sigma_{\alpha\beta}}{1 - \sigma_{\alpha\beta}} \quad (2.39)$$

donde $\sigma_{\alpha\beta}$ es el elemento $\alpha\beta$ del tensor de apantallamiento para el espín de interés en algún sistema de coordenadas, y $\delta_{\alpha\beta}$ es el elemento correspondiente del tensor de corrimiento químico en algún sistema de coordenadas. La anisotropía de corrimiento químico y la asimetría se definen de la misma manera que para el apantallamiento químico. Los valores principales del tensor de corrimiento químico se denominan δ_{11}^{SEP} , δ_{22}^{SEP} y δ_{33}^{SEP} . La anisotropía de corrimiento químico (Δ_{cs}), la asimetría (η_{cs}) y el corrimiento químico isotrópico quedan definidos como

$$\Delta_{cs} = \delta_{11}^{SEP} - \delta_{iso} \quad (2.40)$$

$$\eta_{cs} = \frac{\delta_{33}^{SEP} - \delta_{22}^{SEP}}{\delta_{11}^{SEP}} \quad (2.41)$$

$$\delta_{iso} = \frac{1}{3}(\delta_{11}^{SEP} + \delta_{22}^{SEP} + \delta_{33}^{SEP}) \quad (2.42)$$

Los corrimientos químicos observados están relacionados con el tensor de corrimiento químico mediante la relación

$$\delta = \delta_{iso} + \frac{1}{2}\Delta_{cs}(3\cos^2\theta - 1 + \eta_{cs}\sin^2\theta\cos 2\phi) \quad (2.43)$$

donde θ y ϕ son los ángulos polares que determinan la dirección del campo \mathbf{B}_0 en el sistema de coordenadas de los ejes principales.

El corrimiento químico es predominante a nivel intramolecular, pero también tiene aportes muy significativos a nivel intermolecular. Por ejemplo, los corrimientos químicos son diferentes en diferentes solventes y para la misma molécula en un líquido o en un sólido también lo son. Incluso, los corrimientos químicos pueden ser distintos para moléculas idénticas en el mismo cristal si la celda unidad del mismo contiene más de una molécula, como usualmente ocurre. Estas diferencias van a ser muy importantes para este trabajo de Tesis, como veremos más adelante.

2.2.2. Interacción Dipolar

La interacción dipolar es una interacción que involucra a pares de espines [26]. El espín I_j genera un campo magnético que interactúa con el espín vecino I_k , y viceversa. El acople dipolar actúa a través del espacio y es apreciable entre núcleos que se encuentran próximos geoméricamente. El Hamiltoniano para esta interacción puede escribirse en coordenadas esféricas como

$$\hat{\mathcal{H}}_D = b_{jk}(A_D + B_D + C_D + D_D + E_D + F_D) \quad (2.44)$$

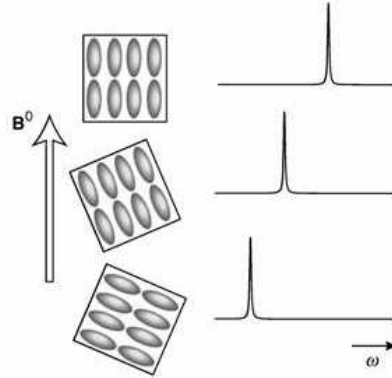


Figura 2.7: Representación de la variación de la posición de la línea de resonancia en un monocristal, en función de la orientación de las moléculas respecto al campo \vec{B}_0 . Figura obtenida de ref. [26], ©2008 John Wiley & Sons Ltd.

Donde,

$$\begin{aligned}
 A_D &= I_z^j I_z^k (1 - 3 \cos^2 \theta_{jk}) \\
 B_D &= -\frac{1}{4} (I_+^j I_-^k + I_-^j I_+^k) (1 - 3 \cos^2 \theta_{jk}) \\
 C_D &= -\frac{3}{2} (I_+^j I_z^k + I_z^j I_+^k) (\sin \theta_{jk} \cos \theta_{jk} e^{i\phi_{jk}}) \\
 D_D &= -\frac{3}{2} (I_-^j I_z^k + I_z^j I_-^k) (\sin \theta_{jk} \cos \theta_{jk} e^{-i\phi_{jk}}) \\
 E_D &= -\frac{3}{4} I_+^j I_+^k \sin^2 \theta_{jk} e^{-2i\phi_{jk}} \\
 F_D &= -\frac{3}{4} I_-^j I_-^k \sin^2 \theta_{jk} e^{2i\phi_{jk}},
 \end{aligned} \tag{2.45}$$

los ángulos θ_{jk} y ϕ_{jk} son los ángulos polar y azimutal, respectivamente, que forma el vector internuclear \mathbf{r}_{jk} con el campo \vec{B}_0 . Destacamos que $\frac{\gamma_1 \gamma_2 \hbar^2}{r^3}$ corresponde a la interacción con un campo local $B_{loc} \approx 1$ Gauss. Mientras que el Hamiltoniano Zeeman

$$\mathcal{H}_z = -\hbar B_0 \sum_i \gamma_i I_i^z$$

corresponde a la interacción con un campo del orden de 10^5 Gauss. De esto se deduce que es posible tratar al Hamiltoniano dipolar como una perturbación respecto de la interacción Zeeman. Aún más, si analizamos los términos (2.46) que conforman el Hamiltoniano dipolar vemos que B, C, D, E, F son términos no diagonales y por lo tanto, son los que van a producir transiciones entre los autoestados del Hamiltoniano Zeeman.

Debe tenerse en cuenta que si los espines son iguales ($\gamma_1 = \gamma_2$) los niveles mezclados por el término B son degenerados. En este caso el término B debe ser conservado, ya que es el que determina la forma correcta de los autoestados de orden cero.

Con estas consideraciones se obtiene el Hamiltoniano dipolar truncado o Hamiltoniano Secular, \mathcal{H}_D^0 , respecto del Hamiltoniano Zeeman.

Para espines iguales tenemos

$$\hat{\mathcal{H}}_{II}^0 = \sum_{j>k}^N \sum_k^N d_{jk} \left(2I_j^z I_k^z - \frac{1}{2} (I_j^+ I_k^- + I_j^- I_k^+) \right) \quad (2.46)$$

con

$$d_{jk} = \frac{1}{2} \frac{\gamma_I^2 \hbar^2}{r_{jk}^3} (1 - 3 \cos^2 \theta_{jk}) \quad (2.47)$$

Mientras que para el caso heteronuclear (llamamos $\vec{\mathbf{I}}$ al momento angular del espín de un núcleo y $\vec{\mathbf{S}}$ al del otro), escribimos

$$\mathcal{H}_{IS}^0 = 2b_{IS} I^z S^z \quad (2.48)$$

Donde,

$$b_{IS} = \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar^2}{r_{IS}^3} \frac{1}{2} (1 - 3 \cos^2 \theta_{IS}) \quad (2.49)$$

En este caso, la diferencia entre ω_{0I} y ω_{0S} siempre es mucho mayor que el término B , aún cuando $\vec{\mathbf{I}}$ y $\vec{\mathbf{S}}$ pueden corresponder a la misma especie nuclear (ej. ^{13}C)

La constante de acople dipolar contiene información acerca de la distancia internuclear. El término entre paréntesis en la ecuación 2.49 contiene información acerca de la orientación con respecto al campo estático $\vec{\mathbf{B}}_0$. La interacción dipolar nos da información muy útil, por ejemplo, distancias internucleares (inter moleculares e intra moleculares), grado de orden en el sistema, etc. Esta interacción, al depender del ángulo θ , sólo sobrevive en medios anisotrópicos como cristales líquidos o sólidos. Sin embargo, en RMN de alta resolución de estado sólido esta interacción es generalmente indeseada debido a que las líneas resultantes son muy anchas, lo que lleva a tener poca resolución espectral. En este caso, la interacción dipolar es removida utilizando algunas técnicas experimentales que serán mencionadas más adelante.

2.2.3. Interacción Cuadrupolar

Alrededor del 74% de los núcleos activos para la RMN tienen espín mayor a $\frac{1}{2}$. A diferencia de los núcleos con espín $\frac{1}{2}$, la distribución de carga eléctrica de los núcleos con espín $I_j \geq 1$ no es esféricamente simétrica. Por lo tanto, la energía de interacción de estos núcleos cuadrupolares con los gradientes de campo eléctrico de los electrones que lo rodean depende de la orientación del núcleo. El Hamiltoniano cuadrupolar puede escribirse como

$$\hat{\mathcal{H}}_Q = \frac{\chi}{4} (A_Q + B_Q + C_Q + D_Q + E_Q + F_Q) \quad (2.50)$$

donde

$$A_Q = 3I_z^2 \cos^2 \theta - I^2 \quad (2.51)$$

$$B_Q = \frac{3}{2} (I_+ I_- + I_- I_+) \text{sen}^2 \theta \quad (2.52)$$

$$C_Q = \frac{3}{2} (I_+ I_z + I_z I_+) \text{sen} \theta \cos \theta e^{(-i\phi)} \quad (2.53)$$

$$D_Q = \frac{3}{2} (I_- I_z + I_z I_-) \text{sen} \theta \cos \theta e^{(i\phi)} \quad (2.54)$$

$$E_Q = \frac{3}{4} I_+^2 \text{sen}^2 \theta e^{(-2i\phi)} \quad (2.55)$$

$$F_Q = \frac{3}{4} I_-^2 \text{sen}^2 \theta e^{(2i\phi)} \quad (2.56)$$

Los ángulos θ y ϕ son los ángulos polares que describen la orientación del eje z de la terna de laboratorio en el SEP del gradiente de campo eléctrico, y χ es la constante de acople cuadrupolar que está definida como

$$\chi = \frac{e^2 q_{zz}^{SEP} Q}{h} \quad (2.57)$$

En esta ecuación, e es la carga del protón, Q es el momento cuadrupolar eléctrico del núcleo y q_{zz} es la componente zz del tensor de rango 2 que describe el gradiente de campo eléctrico.

De la misma manera que la interacción de CS, la interacción cuadrupolar puede ser descrita por su anisotropía η_Q

$$\eta_Q = \frac{q_{xx}^{SEP} - q_{yy}^{SEP}}{q_{zz}^{SEP}} \quad (2.58)$$

Recordemos que el Hamiltoniano Zeeman está dado por

$$\hat{\mathcal{H}}_Z = -\omega_0 \hat{\mathbf{I}}_z \quad (2.59)$$

Si la interacción Zeeman es el término dominante en el Hamiltoniano del sistema de espines, luego, sólo las partes seculares de $\hat{\mathcal{H}}_Q$ afectarán a las energías de los estados del sistema de espines. La parte no secular de la matriz de $\hat{\mathcal{H}}_Q$ (en este caso los términos no diagonales de la matriz en la base Zeeman) son pequeños comparados con los términos provenientes del término Zeeman en el Hamiltoniano total. Por lo tanto, tienen muy poco efecto sobre los autovalores de la matriz diagonalizada del Hamiltoniano completo para el sistema de espín $\hat{\mathcal{H}}_Z + \hat{\mathcal{H}}_Q$.

En estas circunstancias, las energías aproximadas del sistema de espín se encuentran recurriendo a la Teoría de Perturbaciones. Las correcciones a segundo orden son generalmente suficientes para interacciones cuadrupolares que causan desdoblamientos menores a

$\approx 1/10$ del desdoblamiento Zeeman en el campo particular empleado para los experimentos de RMN. Las correcciones a primer y segundo orden a los niveles de energía Zeeman debido al acople cuadrupolar son

$$E_m^{(1)} = \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} (I(I+1) - 3m^2) \left[\frac{1}{2} (3\cos^2\theta - 1) - \eta_Q \cos 2\phi (\cos^2\theta - 1) \right] \quad (2.60)$$

$$\begin{aligned} E_m^{(2)} = & - \left(\frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} \right)^2 \frac{m}{\omega_0} \left[-\frac{1}{5} (I(I+1) - 3m^2) (3 + \eta_Q^2) \right. \\ & + \frac{1}{28} (8I(I+1) - 12m^2 - 3) [(\eta_Q^2 - 3)(3\cos^2\theta - 1) + 6\eta_Q \sin^2\theta \cos 2\phi] \\ & + \frac{1}{8} (18I(I+1) - 34m^2 - 5) \left[\frac{1}{140} (18 + \eta_Q^2) (35\cos^4\theta - 30\cos^2\theta + 3) \right. \\ & \left. \left. + \frac{3}{7} \eta_Q \sin^2\theta (7\cos^2\theta - 1) \cos 2\phi + \frac{1}{4} \eta_Q^2 \sin^4\theta \cos 4\phi \right] \right] \end{aligned} \quad (2.61)$$

donde m denota el número cuántico magnético asociado con el nivel Zeeman particular.

De estas ecuaciones es posible notar lo siguiente

- El primer término de la ecuación 2.61 para la corrección a segundo orden de la energía no depende de la orientación del SEP; es un término isotrópico. Este hecho es muy importante ya que significa que el corrimiento isotrópico que se observa en cualquier espectro de un núcleo cuadrupolar tiene una contribución del acople cuadrupolar, así como del corrimiento químico usual.
- El término de segundo orden es inversamente proporcional a la frecuencia de Larmor ω_0 . De esta manera, la importancia de este término disminuye a medida que se aumenta el campo externo aplicado.

2.2.4. Interacción Dipolar Residual

Desde el descubrimiento de que en compuestos que contenían ^{14}N las señales de los carbonos ligados a estos núcleos presentaban desdoblamientos en el espectro de RMN en estado sólido, se detectaron muchos fenómenos similares en los espectros de RMN de estado sólido de ^{13}C y de otros núcleos con espín $\frac{1}{2}$, cuando se encuentran cerca de núcleos cuadrupolares [27]. Este efecto involucra la transmisión de efectos cuadrupolares (la existencia de una constante de acople cuadrupolar χ en el núcleo cuadrupolar) al núcleo de espín $\frac{1}{2}$ que está siendo observado. Estos efectos se transmiten a través de la interacción dipolar magnética entre ambos núcleos, que a su vez depende de la distancia internuclear.

Analicemos con más detalle esta situación. Comencemos pensando que sólo existe interacción Zeeman para un par de espines I y S, donde I tiene espín $\frac{1}{2}$ y vamos a considerar que S tiene espín $I = 1$, de esta manera tenemos

$$\hat{\mathcal{H}}_Z = \hat{\mathcal{H}}_Z^I + \hat{\mathcal{H}}_Z^S \quad (2.62)$$

Para este Hamiltoniano tendremos el esquema para los niveles de energía que se muestra en la figura 2.8. Las transiciones que van a afectar al núcleo I serán $1 \rightarrow 4$, $2 \rightarrow 5$ y $3 \rightarrow 6$.

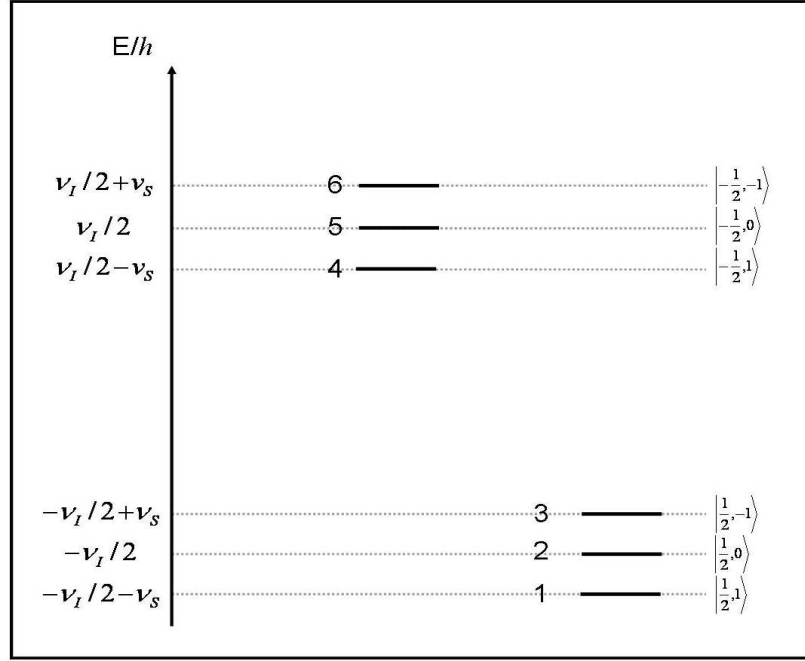


Figura 2.8: Niveles de energía para un espín I con $I = \frac{1}{2}$ y un espín S con $I = 1$ considerando sólo interacción Zeeman.

Si ahora tenemos en cuenta la interacción dipolar entre I y S , tendremos el siguiente Hamiltoniano para el sistema de espines

$$\hat{\mathcal{H}}_{Z,D} = \hat{\mathcal{H}}_Z^I + \hat{\mathcal{H}}_Z^S + \hat{\mathcal{H}}_D^{IS} \quad (2.63)$$

y observaremos una modificación en las frecuencias de transición, como se muestra en la figura 2.9. Considerando $\hat{\mathcal{H}}_D^{IS}$ como una perturbación al Hamiltoniano Zeeman, obtenemos que las frecuencias de transición en este caso son

$$\begin{aligned} \nu_{1 \rightarrow 4} &= \nu_I - b_{IS}(1 - 3\cos^2\theta) \\ \nu_{2 \rightarrow 5} &= \nu_I \\ \nu_{3 \rightarrow 6} &= \nu_I - b_{IS}(1 - 3\cos^2\theta) \end{aligned} \quad (2.64)$$

donde el ángulo θ es el ángulo polar que forma el vector internuclear \mathbf{r}_{IS} con el campo aplicado.

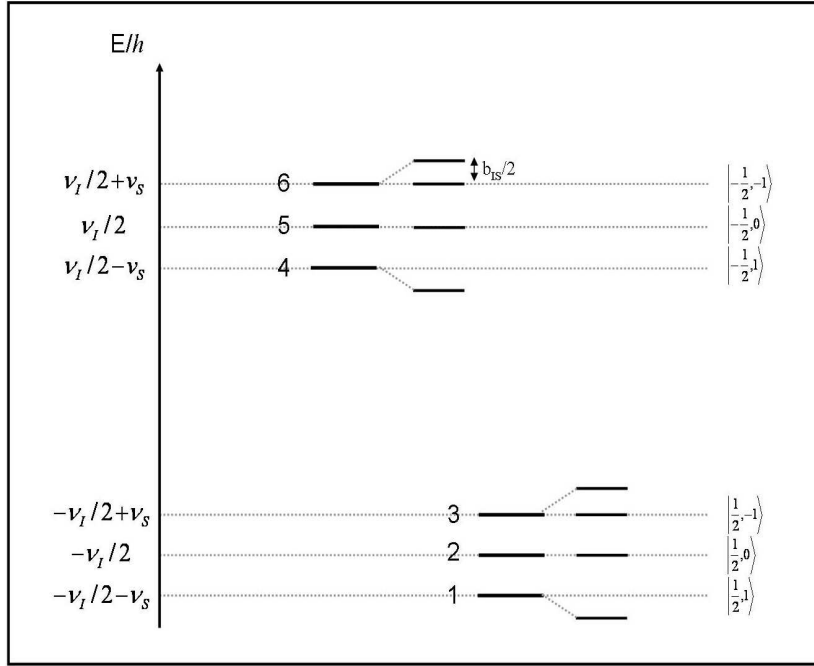


Figura 2.9: Niveles de energía para un espín I con $I = \frac{1}{2}$ y un espín S con $I = 1$ considerando interacción Zeeman e interacción Dipolar.

Veamos ahora qué ocurre con los niveles de energía al introducir el efecto de la interacción cuadrupolar. En este caso, tenemos el diagrama de energías que se muestra en la figura 2.10 y el siguiente Hamiltoniano para el sistema de espines

$$\hat{\mathcal{H}}_Z = \hat{\mathcal{H}}_Z^I + \hat{\mathcal{H}}_Z^S + \hat{\mathcal{H}}_D^{IS} + \hat{\mathcal{H}}_Q \quad (2.65)$$

Aplicando la Teoría de Perturbaciones y tomando $\hat{\mathcal{H}}_D^{IS}$ y $\hat{\mathcal{H}}_Q$ como perturbaciones al Hamiltoniano Zeeman, podemos ver que las frecuencias de transición son

$$\begin{aligned} \nu_{1 \rightarrow 4} &= \nu_I - \frac{9}{4} \frac{b_{IS}\chi}{\nu_S} \\ \nu_{2 \rightarrow 5} &= \nu_I + \frac{9}{2} \frac{b_{IS}\chi}{\nu_S} \\ \nu_{3 \rightarrow 6} &= \nu_I - \frac{9}{4} \frac{b_{IS}\chi}{\nu_S} \end{aligned} \quad (2.66)$$

Los términos que contienen el producto $b_{IS}\chi$ provienen de una contribución del Hamiltoniano Dipolar combinado con contribuciones cuadrupolares. Esta contribución está dada por la llamada Interacción Dipolar Residual.

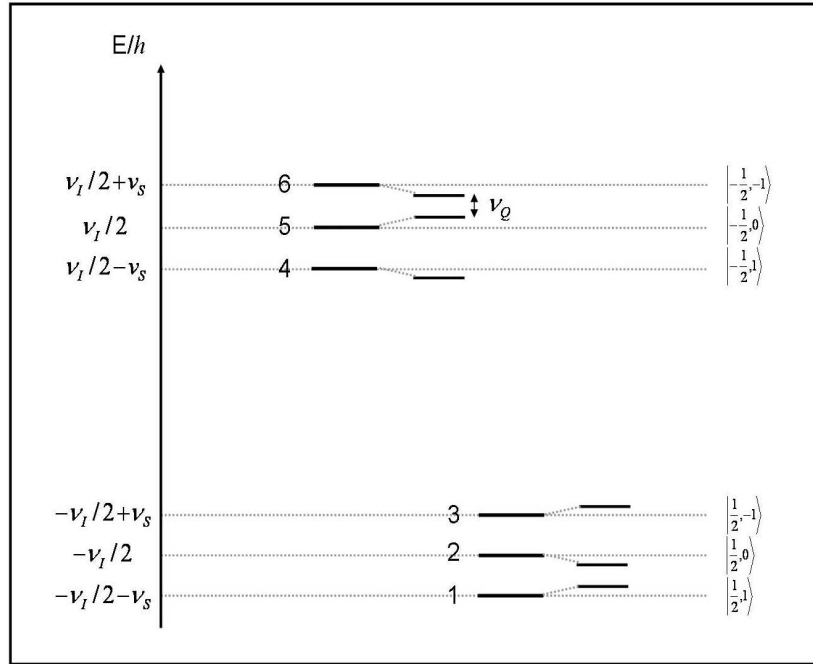


Figura 2.10: Niveles de energía para un espín I con $I = \frac{1}{2}$ y un espín S con $I = 1$ considerando interacción Zeeman, interacción Dipolar e interacción Cuadrupolar.

2.3. Operador densidad y Coherencias

Podemos definir el operador densidad como

$$\rho(t) = \sum_k p_k |\Psi_k\rangle \langle \Psi_k| \quad (2.67)$$

Para cualquier observable, el valor medio sobre el ensamble estará dado por

$$\langle A \rangle_N = Tr(\rho A) \quad (2.68)$$

A partir de la ecuación de Schrödinger, se puede deducir la ecuación que satisface el operador densidad

$$\frac{d}{dt}\rho(t) = -\frac{i}{\hbar} [\mathcal{H}, \rho] \quad (2.69)$$

A la ecuación anterior se la conoce como ecuación de Liouville-Von Neumann y su solución formal viene dada por

$$\rho(t) = U(t)\rho(0)U(t)^{-1} \quad (2.70)$$

con $U(t) = \text{Exp} - i \int_0^t \mathcal{H}(\hat{t}') dt'$. T es el operador de Dyson de ordenamiento temporal, que define el orden a seguir en los casos en que el Hamiltoniano no conmuta a diferentes tiempos.

Cuando el sistema se encuentra en equilibrio térmico con la red, las probabilidades p_k están dadas por la distribución de Boltzmann, entonces el sistema de espines puede ser descrito por

$$\rho_B = \frac{e^{(-\frac{\hat{\mathcal{H}}}{kT})}}{\text{Tr}e^{(-\frac{\hat{\mathcal{H}}}{kT})}} \quad (2.71)$$

Si consideramos la aproximación secular, sólo debemos tener en cuenta la contribución de la interacción Zeeman ($\hat{\mathcal{H}} = -\gamma\hbar\hat{I}_z B_0$), de esta manera el operador densidad queda

$$\rho_B = \frac{e^{(-\frac{\gamma\hbar\hat{I}_z B_0}{kT})}}{\text{Tr}e^{(-\frac{\gamma\hbar\hat{I}_z B_0}{kT})}} \quad (2.72)$$

Luego de hacer una expansión en serie de Taylor y truncando a primer orden obtenemos el operador densidad de equilibrio

$$\rho_{eq} \approx \hat{\mathbb{I}} + \frac{\gamma\hbar B_0}{kT} \hat{I}_z \quad (2.73)$$

El operador unidad, \mathbb{I} , no evoluciona en el tiempo, ya que conmuta con cualquier otro operador que describe interacciones internas, y puede ser despreciado. Entonces, el estado inicial de equilibrio en un campo magnético estático orientado en la dirección z está dado por la suma de los operadores de momento angular individuales en z .

La definición de coherencia está basada en el desarrollo de la función de onda temporal $|\Psi(t)\rangle$ del sistema en términos de una base estacionaria $|i\rangle$.

$$|\Psi(t)\rangle = \sum_{i=1}^n c_i(t) |i\rangle \quad (2.74)$$

Una coherencia entre el estado $|r\rangle$ y $|s\rangle$ existe cuando el promedio sobre el ensamble del producto de los coeficientes $\rho_{rs}(t) = c_r(t)c_s^*(t)$ no se anula. Los elementos $\rho_{rs}(t)$ forman la matriz densidad. Debe notarse que un estado coherente no es un autoestado del operador Hamiltoniano y es dependiente del tiempo.

Como vimos anteriormente, la interacción Zeeman produce un desdoblamiento de los niveles de energía de acuerdo a la dirección de campo y la diferencia entre números cuánticos magnéticos $\Delta m_{rs} = m_r - m_s$ define el orden de la coherencia. En general, un elemento de matriz $\rho_{rs}(t)$ representa una coherencia de orden p ($p = m_r - m_s$).

Un caso especial de coherencia es la coherencia cuántica simple (SQ), o coherencia de orden uno ($\Delta m_{rs} = \pm 1$), que corresponde a un observable de la magnetización transversal. Tal coherencia corresponde a una señal de RMN inducida en la bobina de detección que puede ser directamente observada. Esto puede verse representado por las transiciones entre dos niveles de energía $|\frac{1}{2}\rangle$ y $|\frac{-1}{2}\rangle$ para un espín aislado $I = \frac{1}{2}$. Consideremos

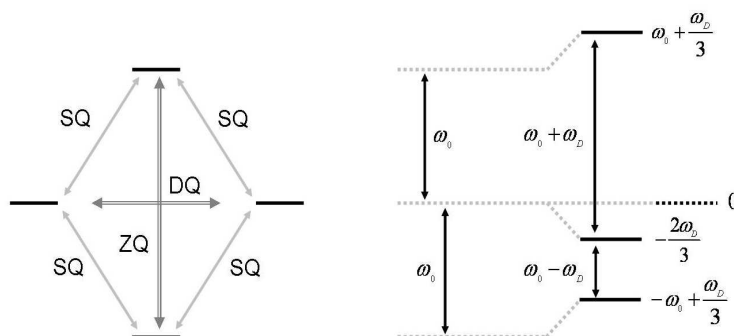


Figura 2.11: *Coherencias.*

ahora un par de espines $\frac{1}{2}$, con cuatro niveles de energía Zeeman correspondientes a los cuatro estados posibles, que denotaremos $|\frac{1}{2}\frac{1}{2}\rangle$, $|\frac{1}{2}-\frac{1}{2}\rangle$, $|\frac{1}{2}\frac{1}{2}\rangle$ y $|\frac{1}{2}-\frac{1}{2}\rangle$. En el caso de espines homonucleares los niveles de energía correspondientes a $|\frac{1}{2}-\frac{1}{2}\rangle$ y $|\frac{1}{2}\frac{1}{2}\rangle$ están degenerados y se tienen tres niveles de energía igualmente espaciados (Figura 2.11). Entonces, el espectro de RMN para las transiciones SQ permitidas va a ser una sola línea de resonancia. Este sería el resultado si no se tuviera en cuenta el acople entre ellos. Si consideramos ahora la interacción dipolar, vemos que ésta desdobla los niveles de energía, El Hamiltoniano dipolar describe ese desdoblamiento. Este desdoblamiento es tal, que ahora las dos transiciones SQ permitidas tienen diferentes frecuencias. Por lo tanto se ve un desdoblamiento de la línea que depende de la magnitud del acople. La coherencia entre los estados $|\frac{1}{2}\frac{1}{2}\rangle$ y $|\frac{1}{2}-\frac{1}{2}\rangle$, llamadas coherencias cuánticas dobles (DQ), y entre $|\frac{1}{2}-\frac{1}{2}\rangle$ y $|\frac{1}{2}\frac{1}{2}\rangle$, llamadas coherencias cuánticas de orden cero (ZQ), está 'prohibida', esto significa que no puede ser detectada directamente. Cuando estas consideraciones se extienden a sistemas de más de dos espines se habla de coherencias cuánticas múltiples (MQ).

Capítulo 3

Experimentos Básicos de RMN

Muchos años después, frente al pelotón de fusilamiento, el coronel Aureliano Buendía había de recordar aquella tarde remota en que su padre lo llevó a conocer el hielo. Macondo era entonces una aldea de 20 casas de barro y cañabrava construidas a la orilla de un río de aguas diáfanas que se precipitaban por un lecho de piedras pulidas, blancas y enormes como huevos prehistóricos. El mundo era tan reciente, que muchas cosas carecían de nombre, y para mencionarlas había que señalarlas con el dedo.

G. García Márquez

En el capítulo anterior introducimos los conceptos básicos de la RMN. Mencionamos cómo se comporta la magnetización en presencia de campos magnéticos, cuáles son las interacciones más importantes en el sistema de espines estudiado y cómo afectan al espectro de RMN.

En este capítulo, describiremos cómo es el equipo empleado para realizar los experimentos de RMN, y además mencionaremos los experimentos más simples comúnmente empleados en RMN de estado sólido que fueron aplicados a los compuestos estudiados en esta tesis.

3.1. El equipo de RMN

Los experimentos de RMN requieren de un campo magnético homogéneo. Para lograr esto, los espectrómetros de RMN utilizan imanes superconductores. En un imán superconductor el campo magnético se produce con una bobina hecha de material superconductor. Para mantener la baja temperatura necesaria en la bobina lo que se hace es sumergirla en Helio líquido.

A presión atmosférica, la temperatura de ebullición del Helio líquido es aproximadamente 4.2 °K. Para reducir al máximo las pérdidas por evaporación de He líquido en la zona de la bobina ésta debe aislarse térmicamente del exterior. El diseño de los imanes se realiza con una serie de cámaras concéntricas como se muestra en la figura 3.1. La cámara central contiene el imán a 4.2 °K y se encuentra rodeada por una cámara de muy alto

vacío. A continuación va una segunda cámara fría que contiene nitrógeno líquido y luego va una segunda cámara de alto vacío a temperatura ambiente (300 °K).

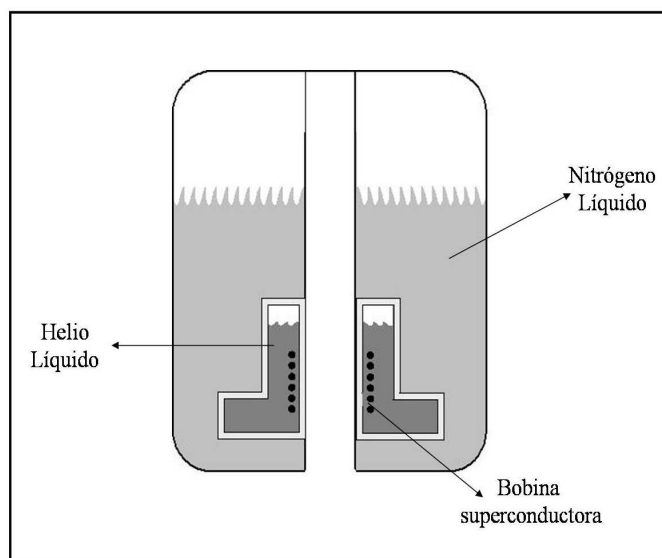


Figura 3.1: Esquema de un imán de RMN superconductor.

La Figura 3.2 muestra un diagrama en bloques para un espectrómetro tradicional de RMN. Los espectrómetros de RMN para sólidos se caracterizan además por las siguientes particularidades: poseen imanes súperconductores de 89 mm de diámetro de orificio interno (diámetro grande) para poder alojar los cabezales donde se ubica la muestra. Están equipados con cabezales MAS para obtener espectros de alta resolución. Poseen amplificadores de rf de alta potencia para irradiar líneas anchas y realizar desacople.

En las figuras 3.3 se muestra el imán con el que contamos en el laboratorio y un cabezal de MAS.

3.2. Fenómeno de relajación

Antes de comenzar con los experimentos de RMN, analizaremos el fenómeno de relajación. Por relajación entendemos a aquellos procesos que vuelven al equilibrio la magnetización cuando ésta ha sido perturbada por un pulso de rf. Debemos considerar tres tipos de procesos:

- Primer tipo: relajación espín-red o longitudinal, es la recuperación de la componente de la magnetización a lo largo del campo externo \vec{B}_0 . El tiempo característico de este proceso se denomina T_1 (Equación 3.1) y es el que gobierna la velocidad a la cual los pulsos de rf pueden ser repetidos en un experimento simple de un pulso y adquisición.

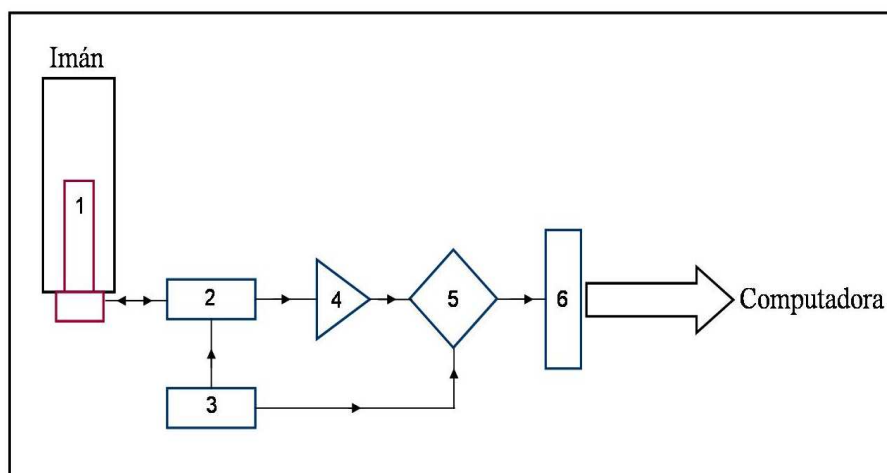


Figura 3.2: Diagrama en bloques de un espectrómetro tradicional de RMN. (1) cabezal, (2) preamplificador de señal, (3) transmisor y amplificador de potencia, (4) receptor, (5) detector y (6) convertor analógico digital.

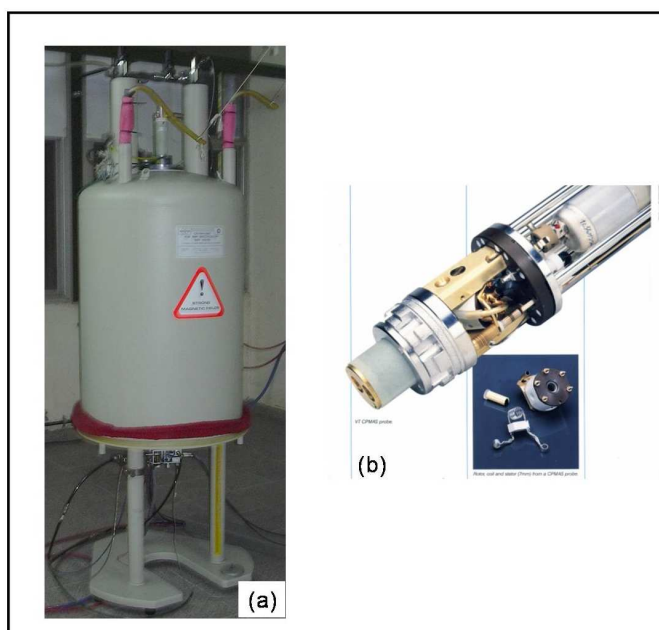


Figura 3.3: (a) Imán superconductor de 7.02 T, equivalente a una frecuencia de 300 MHz para protones. (b) Cabezal de CPMAS, en la figura insertada se muestran el portamuestra (o rotor) de 7 mm, la bobina y el estator.

$$M_0 - M_z = (M_0 - M_z(0))e^{(\frac{-t}{T_1})} \quad (3.1)$$

En la ecuación anterior M_z es la componente de la magnetización paralela al campo magnético externo \vec{B}_0 y M_0 es la magnetización de equilibrio térmico.

- Segundo tipo: relajación transversal o espín-espín. Es el decaimiento de la componente transversal de la magnetización (M_{xy}) relacionada con el "desfasaje de los espines en el plano xy" (Ecuación 3.2). El tiempo característico se denomina T_2 y está relacionado con el ancho de línea de la señal de RMN.

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{(\frac{-t}{T_2})} \quad (3.2)$$

- Tercer tipo: relajación espín red en el sistema rotante: gobierna el equilibrio de la magnetización perpendicular a \vec{B}_0 en presencia de rf. El tiempo que caracteriza este proceso se denomina $T_{1\rho}$.

$$M(t) = M_0e^{(\frac{-t}{T_{1\rho}})} \quad (3.3)$$

Para sólidos, se cumple la siguiente relación entre estos tres tiempos de relajación

$$T_2 \ll T_{1\rho} \ll T_1 \quad (3.4)$$

siendo T_2 del orden de decenas de microsegundos, $T_{1\rho}$ del orden de decenas de milisegundos y T_1 desde varios segundos hasta horas.

3.3. Experimento de un pulso

El experimento más simple que puede realizarse en RMN es el experimento de un solo pulso. El esquema de la secuencia de pulsos está representada en la figura 3.4.

Analicemos el efecto de esta secuencia sobre la magnetización del sistema. Si se aplica un pulso de $(\frac{\pi}{2})_\varphi$, la magnetización, inicialmente en equilibrio (\hat{I}_z) es volteada al plano $x - y$ donde precesa en torno al eje z . Esta precesión produce un flujo magnético en la bobina que rodea a la muestra, generando una fuerza electromotriz (fem) que puede ser detectada. Esta señal se denomina señal inducida por decaimiento libre (FID) (ver figura 3.5).

Como la magnetización transversal es un estado de no equilibrio, la FID decae con el tiempo por interferencias destructivas de varios orígenes con constante temporal T_2^* . Si se hace una Transformada de Fourier (FT) de la misma, se observa un espectro de frecuencia centrado en ω_0 cuyo ancho está relacionado con el tiempo de decaimiento de la FID. Si en la muestra hay núcleos iguales, pero con diferentes entornos este hecho se manifestará en una diferencia en el valor del campo estático local y consecuentemente en una diferencia

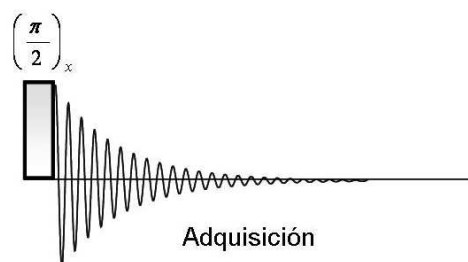


Figura 3.4: Experimento de un pulso.

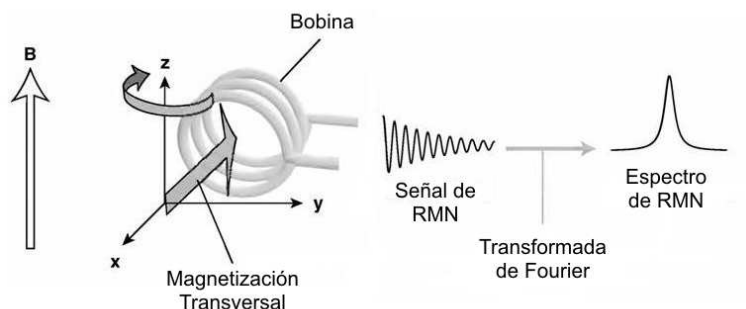


Figura 3.5: Generación de la señal de RMN

en las frecuencias de precesión. Esto da lugar a que el espectro muestre varias líneas de resonancia, una para cada sitio distinto.

En general, se deben realizar varias repeticiones consecutivas del experimento para acumular datos y conseguir una buena relación señal-ruido. El tiempo que se debe esperar entre cada experimento está determinado por T_1 y es aproximadamente $5T_1$. Observando la ecuación 3.1, vemos que la magnetización longitudinal se recupera un 99 % cuando se ha esperado $5T_1$.

3.4. Rotación al Ángulo Mágico (Magic Angle Spinning (MAS))

La diferencia entre la RMN de estado líquido y la RMN de estado sólido radica principalmente en el grado de movilidad molecular. En los líquidos, las moléculas son libres para realizar movimientos de rotación y traslación de manera isotrópica. La rotación es

particularmente importante porque promedia a cero interacciones que tienen dependencia orientacional. Por lo tanto, en líquidos, todas las interacciones anisotrópicas que dependen del término $(3\cos^2\theta - 1)$ (ver sección 2.2 para más detalles) no son observables de manera directa. Las líneas espectrales son angostas y relativamente bien resueltas.

En RMN de estado sólido la situación es diferente. Los movimientos rotacionales de las moléculas están restringidos, por lo tanto la mayoría de las interacciones anisotrópicas permanecen. Además, en el caso de muestras en polvo que consisten en un gran número de pequeños cristales, cada cristal tiene su propia orientación angular, como resultado se obtienen líneas espectrales anchas. De esta manera, para obtener una alta resolución en RMN de estado sólido se necesita imitar los procesos de promediación que se producen en un líquido.

El término rotación al ángulo mágico se refiere a una rotación física de la muestra a un ángulo de 54.7° , que llamaremos ángulo mágico, con respecto a la dirección z del campo \vec{B}_0 . En el año 1959 Andrew [28] y Lowe [29], de manera simultánea, descubrieron que al rotar la muestra alrededor de este eje se conseguía un efecto de angostamiento de las líneas espectrales. Para acercarnos a un espectro similar al que se obtendría en estado líquido, se utiliza la técnica llamada MAS (Magic Angle Spinning, Rotación al Ángulo Mágico). Para entender por qué esta técnica es tan exitosa al momento de angostar las líneas de resonancia, recordemos que la interacción de corrimiento químico, la interacción dipolar, y la interacción cuadrupolar de primer orden tienen la misma dependencia angular. Para un tensor axial simétrico, la parte espacialmente dependiente de la frecuencia de un cristal puede expresarse como $(\frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1))$, donde θ denota el ángulo entre la dirección del tensor y el campo \vec{B}_0 . Entonces, para una muestra estática, no hay corrimiento de frecuencia anisotrópico para aquellos cristales con $\theta = 54.7^\circ$

Pensemos en el dispositivo experimental que muestra la figura 3.6. Si rotamos la muestra alrededor de un eje inclinado un ángulo θ_R con respecto al campo aplicado, entonces θ , el ángulo que describe la orientación del tensor de interacción fijo a una molécula dentro de la muestra, varía con el tiempo mientras la molécula rota con la muestra. El promedio de $(3\cos^2\theta - 1)$ en este caso es

$$\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta_R - 1)(3\cos^2\beta - 1) \quad (3.5)$$

donde los ángulos θ_R y β están definidos en la figura 3.6. El ángulo β es entre el eje z de los ejes principales del tensor de interacción y el eje físico de rotación de la muestra; θ_R es el ángulo entre el campo aplicado y el eje de rotación; θ es el ángulo entre el eje principal z del tensor de interacción y el campo aplicado \vec{B}_0 . El ángulo β está fijo para un núcleo en una muestra sólida, pero al igual que θ toma todos los valores posibles en una muestra en polvo. El ángulo θ_R puede modificarse externamente. Si colocamos θ_R igual a 54.7° , luego $(3\cos^2\theta - 1) = 0$, por lo tanto el promedio $\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$ también es cero. Entonces, como la velocidad de la rotación es lo suficientemente alta como para que θ promedie rápido comparado con la anisotropía de la interacción, la anisotropía de la interacción se promedia a cero.

Esta técnica promedia la anisotropía asociada con cualquier interacción que genere

un corrimiento en las energías Zeeman del sistema de espines, tal como la anisotropía de corrimiento químico y el acople dipolar.

Si la frecuencia de rotación no es suficientemente rápida comparada con el rango de frecuencias que cubre la interacción, o sea 3 o 4 veces mayor, aparecen lo que se llama bandas rotacionales. Estas son líneas angostas que aparecen en adición a la línea de corrimiento químico isotrópico. Sus posiciones en frecuencia respecto de ésta son $\pm n\nu_R$ ($n=1, 2, \dots$), por lo que cambian con la velocidad de rotación de la muestra, no así la línea isotrópica.

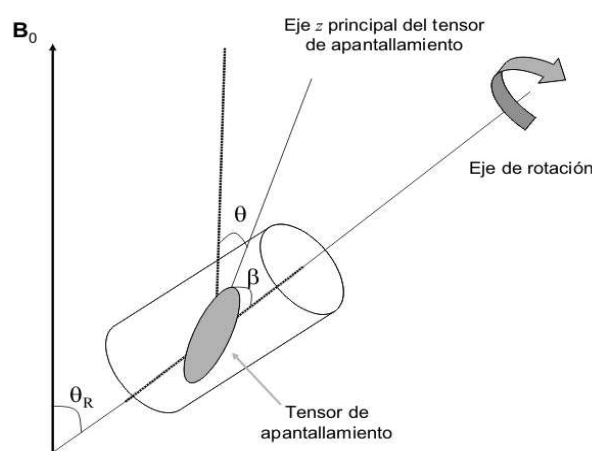


Figura 3.6: Esquema ilustrando el dispositivo experimental para realizar rotación al ángulo mágico (MAS).

3.5. Desacople

Los acoples entre los espines nucleares generan un ensanchamiento significativo de las líneas espectrales. La interacción dipolar actúa a través del espacio y puede alcanzar cientos de kHz en magnitud, mientras que el acople indirecto (acople J) es por lo general más chico y requiere que los núcleos estén ligados químicamente.

Para obtener espectros de alta resolución utilizando RMN de estado sólido es necesario eliminar estas interacciones de acople, particularmente las de carácter dipolar. En principio, esto se podría lograr con MAS; sin embargo, generalmente ocurre que no es posible alcanzar las velocidades de rotación necesarias.

3.5.1. Desacople Heteronuclear

El ^{13}C es un núcleo diluido, ya que la abundancia natural de este isótopo del ^{12}C es baja, del 1.1.%. Entonces, los acoples dipolares entre ellos mismos son muy débiles y

pueden eliminarse con MAS a velocidades relativamente bajas. Sin embargo, lo que suele ocurrir es que en los sistemas que contienen ^{13}C hay muchos átomos de hidrógeno, y como los ^1H tienen una abundancia natural muy alta, la interacción dipolar ^1H - ^{13}C es grande. Una constante de acople dipolar típica para un par ^1H - ^{13}C (a una distancia de 1 \AA) es de aproximadamente 30 kHz.

El ejemplo más simple de desacople heteronuclear es el de onda continua (Continuous Wave, CW) [30], que consiste en la aplicación de un pulso de rf continuo de fase fija por el tiempo que dure la adquisición de la FID. Utilizando la Teoría de Hamiltoniano Promedio, es posible ver que durante el período de irradiación el operador \hat{I}_z precesa de tal manera que el Hamiltoniano Dipolar se anula para un período entero de la precesión y tiende a cero para tiempos largos de irradiación.

También, hay secuencias multipulsos más sofisticadas que son ampliamente utilizadas para desacople heteronuclear en RMN de estado sólido. En este trabajo vamos a utilizar la secuencia de pulsos llamada TPPM (two-pulse phase modulated, dos pulsos con fase modulada) [31]. Esta es una de las secuencias más empleadas para realizar desacoples heteronucleares y consiste en repetir bloques de dos pulsos de 165° con fases $(+\varphi)$ y $(-\varphi)$.

Para lograr un buen desacople es posible que se necesiten potencias muy altas (por ejemplo, en sistemas CH_2 muy rígidos). El desacople de protones de alta potencia es necesario y efectivo para la observación de cualquier núcleo diluido en sistemas que contienen ^1H . La eficiencia del desacople aumenta a medida que aumenta la potencia del campo de rf. Experimentalmente, hay que ser muy cuidadoso para encontrar el nivel de potencia que optimiza el desacople sin dañar el cabezal.

3.5.2. Desacople Homonuclear

La interacción dipolar homonuclear tiene probablemente el mayor impacto en la espectroscopía de ^1H de estado sólido, ya que la magnitud de esta interacción puede alcanzar los cientos de kHz. Este hecho se ve acentuado debido a la gran cantidad de protones que por lo general están presentes en los compuestos estudiados, dando como resultado una red de espines fuertemente acoplados que son muy difíciles de desacoplar. Es por esto que los espectros de ^1H en estado sólido suelen consistir de una sola línea muy ancha, de más de 50 kHz de ancho. A pesar de que MAS ayuda a disminuir este ancho, las velocidades de rotación necesarias para eliminar totalmente la interacción dipolar homonuclear son muy difíciles de alcanzar, es por esto que se deben aplicar secuencias multipulsos para lograr este objetivo.

En este trabajo vamos a utilizar en particular la secuencia de desacople homonuclear desarrollada por Lee y Goldburg (LG). En el año 1965, Lee y Goldburg publicaron un trabajo [32] en el que mostraron que si se aplica un campo de rf off-resonance que satisfaga la relación $\Delta LG/\omega_1 = \frac{1}{2}\sqrt{2}$, se produce un campo efectivo en la terna rotante inclinado al ángulo mágico $\theta_m = \tan^{-1}(\sqrt{2})$ con respecto al campo magnético estático $\vec{\mathbf{B}}_0$. Cuando se cumple esta condición, los espines precesan rápidamente alrededor de este eje mágico, lo que resulta en una cancelación de los dos primeros términos del Alfabeto Dipolar. Lo que

se consigue entonces es el mismo resultado que se obtiene al rotar la muestra físicamente en torno a un eje que forma un ángulo de $\theta = 54,7^\circ$ con el campo magnético externo como en un experimento de MAS. De esta manera se logra obtener un espectro de los núcleos abundantes con una mejor resolución.

3.6. Polarización Cruzada (Cross Polarization (CP))

Para realizar RMN en estado sólido de núcleos diluidos de espín $I = \frac{1}{2}$, como por ejemplo ^{13}C , ^{29}Si , ^{15}N , la técnica de MAS es combinada con la de Polarización Cruzada (CPMAS).

La observación de esta clase de núcleos presenta una serie de problemas:

- La poca abundancia natural del núcleo implica que la relación señal ruido es inevitablemente pobre.
- Los tiempos de relajación de los núcleos con poca abundancia natural suelen ser muy largos. Esto se debe a que la interacción dipolar homonuclear fuerte, que puede estimular la relajación espín red, está ausente. Los largos tiempos de relajación hacen que el tiempo que hay que esperar entre adquisiciones sea mayor.

Ambos problemas se pueden resolver utilizando la secuencia de pulsos que se muestra en la figura 3.7. en donde los núcleos diluidos (^{13}C en este caso), obtienen su magnetización de la red de espines abundantes vecinos. En este caso asumimos que son ^1H , pero puede ser cualquier núcleo abundante de espín $\frac{1}{2}$.

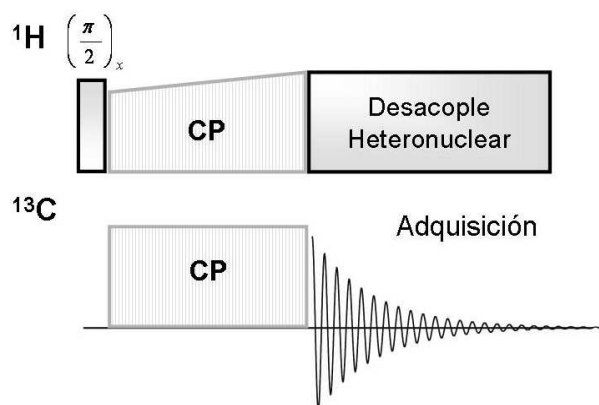


Figura 3.7: Esquema de la secuencia de pulsos empleada para los experimentos de CPMAS.

El proceso de polarización cruzada es mediada por la interacción dipolar entre los espines de ^1H y los espines del núcleo diluido S . De manera simple, la transferencia de

polarización puede explicarse de la siguiente manera [25]. Todo radica en transformar el problema a una terna rotante doble. En esta terna doble rotante los espines de los ^1H son considerados en una terna en la cual todos los campos magnéticos debido a pulsos de ^1H parecen estáticos, de la misma manera son considerados los núcleos diluidos. Un pulso inicial de 90° en ^1H crea una magnetización a lo largo del eje $-y$ en la terna rotante de ^1H , como se muestra en la figura 3.8. Luego, se aplica un pulso de contacto en ^1H en $-y$. El campo debido a este pulso (a lo largo de $-y$) es conocido como campo de spin-lock y lo llamaremos $\vec{B}_1(^1H)$.

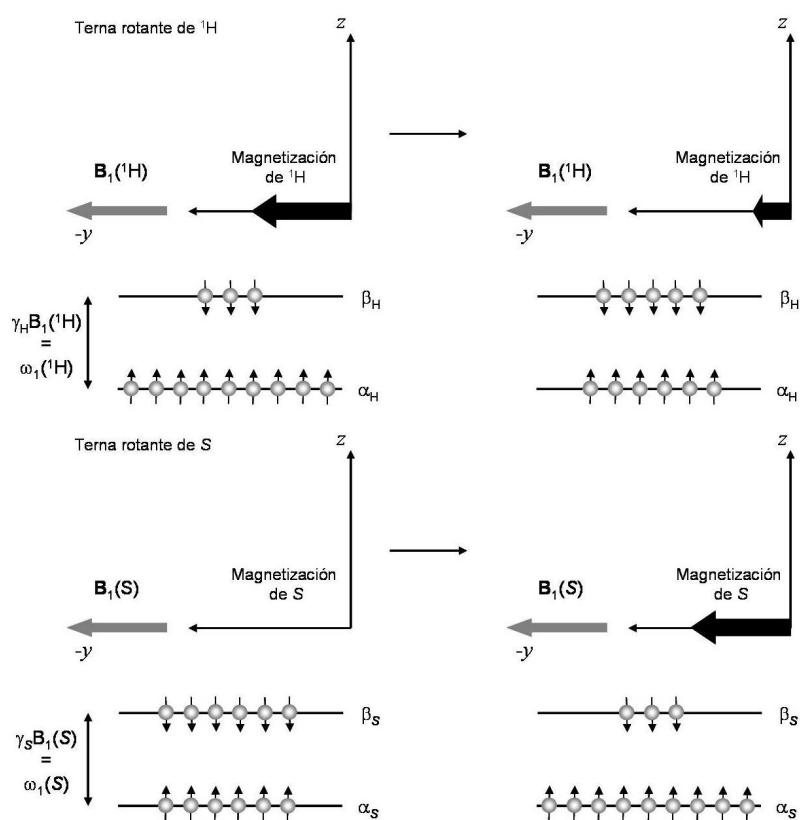


Figura 3.8: Explicación del experimento de Polarización cruzada (CP).

Este campo $\vec{B}_1(^1H)$ actúa sobre la magnetización de ^1H en la terna rotante de la misma manera en que \vec{B}_0 actúa sobre la magnetización de equilibrio de ^1H en la terna de laboratorio en ausencia de pulsos de rf. Entonces, este campo mantiene la magnetización a lo largo del eje $-y$. Este campo de spin-lock, $\vec{B}_1(^1H)$ es el único campo que actúa sobre los ^1H en la terna rotante y actúa como eje de cuantización para los espines de ^1H en la terna rotante durante el pulso de contacto. Vamos a describir los estados de los espines ^1H en la terna rotante durante la aplicación del pulso de contacto como α_H y β_H , donde α_H

corresponde a un estado con la componente de espín cuantizada paralela a $\vec{\mathbf{B}}_1(^1H)$ y β_H corresponde a un estado con la componente de espín cuantizada antiparalela a $\vec{\mathbf{B}}_1(^1H)$.

Consideramos ahora a los espines S durante el pulso de contacto con campo de spin-lock $\vec{\mathbf{B}}_1(S)$ en una terna rotante a la frecuencia del pulso de rf de S . Al igual que pasaba para 1H , el campo $\vec{\mathbf{B}}_1(S)$ provee un eje de cuantización para los espines S en la terna rotante durante el pulso de contacto S , definimos los estados de los espines S como α_S y β_S de manera análoga a los definidos para 1H .

Las amplitudes de los dos pulsos de contacto en el experimento de polarización cruzada debe ser calibrado adecuadamente de tal manera que cumplan la condición de Hartmann-Hahn [33]:

$$\gamma_{^1H}B_1(^1H) = \gamma_S B_1(S) \quad (3.6)$$

En esta aproximación simple, esto hace que la diferencia de energía entre los estados de los espines 1H y S en sus respectivas ternas rotantes sea la misma. Ahora necesitamos considerar el efecto del acople dipolar entre los espines 1H y S . Recordemos que el Hamiltoniano que describe esta interacción tiene la forma

$$\hat{\mathcal{H}}_{IS}^0 = 2b_{IS}I_zS_z \quad (3.7)$$

Donde

$$b_{IS} = \frac{\gamma_I\gamma_S\hbar^2}{r_{IS}^3} \frac{1}{2} (1 - 3\cos^2\theta_{IS}) \quad (3.8)$$

Este operador no se ve afectado por transformaciones a la doble terna rotante, ya que sólo contiene operadores en z , que no son alterados por rotaciones alrededor del eje z de la terna de laboratorio.

Ahora pensemos, en sus respectivas ternas rotantes, tanto los espines 1H como los S están cuantizados en direcciones perpendiculares a z ; de esta manera, el Hamiltoniano dipolar no afecta la energía neta del sistema de espines en la terna rotante, ya que la energía del sistema de espines está determinada por campos paralelos a los ejes de cuantización de los espines, que a su vez se encuentran en el plano xy de la terna rotante. Por una razón similar, el Hamiltoniano dipolar no puede alterar la magnetización neta (suma de las magnetizaciones de 1H y S) paralela a los ejes de cuantización. Entonces, el Hamiltoniano dipolar heteronuclear claramente acopla a los espines 1H y S y tiene que actuar de tal manera de conservar tanto la energía como el momento angular del sistema total de espines. Cuando se satisface la condición de Hartmann-Hahn, la diferencia de energía entre los estados de los espines 1H y S en su terna rotante correspondiente es la misma, de esta manera una transición que requiera energía en un espín de 1H , por ejemplo, puede ser compensada exactamente por una transición que libere energía en un espín S . Bajo estas circunstancias, el acople dipolar entre 1H y S puede permitir una redistribución de energía entre los espines 1H y S siempre que la energía total del sistema se mantenga constante. Debido a que cada transición en un espín 1H es compensada por una transición en la dirección opuesta en un espín S , la magnetización neta del sistema también es preservada. La naturaleza de la redistribución de energía en el sistema de espines está determinada por la distribución inicial de espines en los estados de las ternas

rotantes. La magnitud inicial de la magnetización de ^1H en la dirección del campo de spin-lock $\vec{B}_1(^1\text{H})$ es la misma que la que se encuentra en la terna de laboratorio paralela al campo \vec{B}_0 , ya que es producida por una rotación de 90° de la magnetización de ^1H generada por \vec{B}_0 . Es por lo tanto muy grande como para ser mantenida por el campo pequeño $\vec{B}_1(^1\text{H})$. La magnetización de ^1H se reduce por transiciones en la terna rotante de $\alpha_H \rightarrow \beta_H$, mientras que al mismo tiempo se producen transiciones de $\beta_S \rightarrow \alpha_S$ para conservar la energía. Es de esta manera que se consigue obtener una magnetización de los espines S más grande en la dirección del campo $\vec{B}_1(S)$ en la terna rotante.

La diferencia de energía entre los niveles Zeeman, y por lo tanto en la polarización de un núcleo, depende de la razón giromagnética (ver ecuación 2.14). De esta manera, los núcleos que poseen γ grande, como por ejemplo ^1H y ^{19}F son más sensibles que aquellos núcleos con γ bajo como ^{13}C y ^{15}N (en la tabla 3.1 se muestran algunas propiedades de los núcleos comúnmente empleados en RMN).

Los tiempos de contacto son del orden de los ms y el aumento en la sensibilidad de un núcleo diluido está dado por el cociente de las razones giromagnéticas, $\frac{\gamma_I}{\gamma_S}$.

La condición de Hartmann-Hahn, bajo los efectos de rotación al ángulo mágico, está dada por

$$\gamma_I B_1(I) = \gamma_S B_1(S) + n\omega_r \quad (3.9)$$

Donde $B_1(I)$ y $B_1(S)$ representan la intensidad del campo de rf aplicado sobre los núcleos I y S respectivamente, ω_r representa la frecuencia de rotación y n es un entero. Metz *et al.* descubrieron que el método se volvía más fácil de implementar bajo MAS si se empleaba una amplitud que aumentara en forma de rampa para uno de los campos de rf aplicados como se muestra en la figura 3.7.

Tabla 3.1: Propiedades de algunos de los núcleos más empleados en RMN de estado sólido.

Núcleo	I	$\gamma/10^7 \text{radT}^{-1} \text{s}^{-1}$	Abundancia Natural/ %
^1H	1/2	26.8	99.99
^2H	1	4.1	0.02
^{13}C	1/2	6.7	1.10
^{14}N	1	1.9	99.63
^{15}N	1/2	-2.7	0.37
^{17}O	5/2	-3.6	0.04
^{19}F	1/2	25.2	100.00
^{27}Al	5/2	7.0	100.00
^{29}Si	1/2	-5.3	4.67

De esta manera se logra una mayor polarización en el núcleo diluido, y por lo tanto mayor señal. Además, esto hace posible disminuir el tiempo entre experimentos, ya que la relajación espín-red de ^1H es más rápida que la de ^{13}C .

3.6.1. Supresión No Cuaternaria (NQS)

En un espectro de ^{13}C de RMN es común encontrarse con muchas señales de resonancia, correspondientes a los distintos núcleos de ^{13}C que se encuentran en la muestra [34]. Este factor hace difícil asociar las distintas señales a cada núcleo en particular. Es por ello

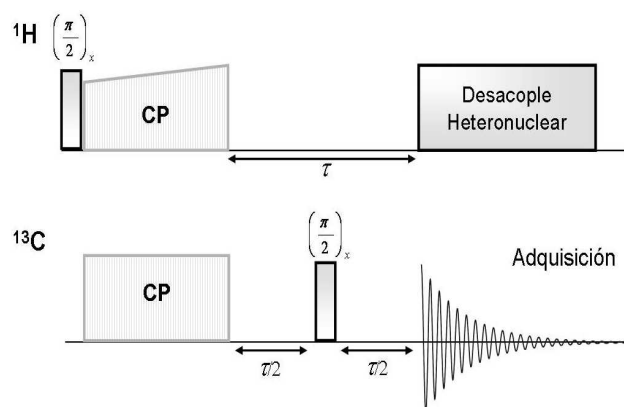


Figura 3.9: Secuencia de pulsos empleada para la adquisición de espectros de edición de ^{13}C .

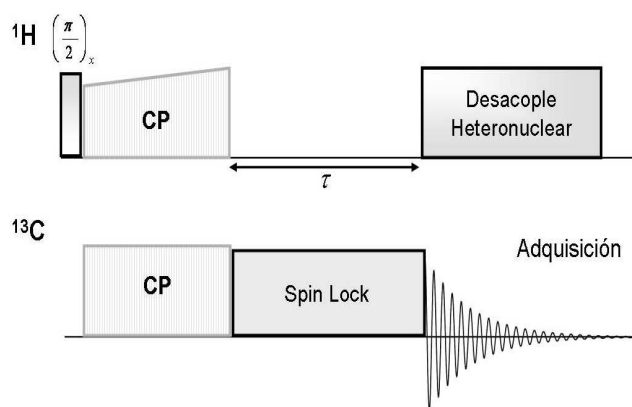


Figura 3.10: Secuencia de pulsos empleada para la medición de tiempos de relajación en la terna rotante $T_{1\rho}$.

que se utilizan diversas secuencias de pulsos que permiten "editar" el espectro de RMN, de manera tal de sólo observar las resonancias provenientes de determinados núcleos. En nuestro trabajo empleamos la secuencia que se muestra en la figura 3.9, en donde luego de la CP, los campos de rf son removidos durante un tiempo τ antes de comenzar con la adquisición. Este tiempo de espera τ permite que la magnetización de los núcleos de

carbono decaiga debido al acople dipolar ^1H - ^{13}C . Como resultado, se obtiene un espectro en donde las resonancias de los grupos metino y metileno son sustancialmente suprimidos. De esta manera, es posible identificar los carbonos cuaternarios y los grupos metilos. Los grupos metilos no son removidos ya que la interacción dipolar ^1H - ^{13}C es débil debido a las rotaciones de los protones en el grupo. El pulso de π que se aplica sobre los ^{13}C a un tiempo igual a $\frac{\tau}{2}$ tiene como objetivo refocalizar el corrimiento químico de los ^{13}C .

3.7. Tiempo de relajación en la terna rotante $T_{1\rho}$

Los procesos de relajación en RMN de estado sólido pueden proveer información muy importante sobre los movimientos moleculares. El tiempo de relajación en la terna rotante, ($T_{1\rho}$), es sensible a movimientos en la escala de los kHz., brindando información sobre compuestos espacialmente no homogéneos [9], [35]. El tiempo $T_{1\rho}$ es un parámetro de estudio muy útil. En particular para ^{13}C ya que la baja abundancia natural de este núcleo asegura una separación física dentro de sólidos no homogéneos y una difusión de espín muy baja o nula [36]. Para la medición de $T_{1\rho}$ en núcleos diluidos, se utiliza la secuencia de pulsos especificada en la figura 3.10. Luego de la CP se aplica un spin-lock a los ^{13}C durante un tiempo variable τ . Durante este tiempo τ , se produce la relajación espín-red de ^{13}C en la terna rotante.

Capítulo 4

RMN bidimensional y Técnicas de Reacople

Hay ocasiones en la vida en que debemos dejarnos llevar por la corriente de lo que sucede, como si las fuerzas para resistir nos faltasen, pero de pronto comprendemos que el río se ha puesto a nuestro favor, nadie más se ha dado cuenta de eso, sólo nosotros, quien mire creerá que estamos a punto de naufragar, y nunca nuestra navegación fue tan firme.

José Saramago

La introducción de la RMN bidimensional ha hecho que la determinación estructural mediante técnicas de RMN sea más fácil, así como también ha incrementado la complejidad de los problemas que pueden ser abordados por medio de esta técnica. La espectroscopía de correlación es rutinariamente empleada para analizar la estructura de moléculas orgánicas en solución. Tanto los experimentos de correlación homonuclear como heteronuclear son métodos invaluable para la determinación del patrón de enlaces químicos del compuesto bajo estudio, y por lo tanto de su conformación. De la misma manera, la RMN bidimensional es muy importante para la RMN de estado sólido. A continuación haremos una distinción entre los experimentos de correlación homonucleares y heteronucleares realizados en esta tesis.

4.1. Correlación Heteronuclear

Es posible utilizar la RMN bidimensional para correlacionar los corrimientos químicos de diferentes tipos de núcleos, como por ejemplo ^{13}C y ^1H , o ^{15}N y ^1H . A estos experimentos que relacionan núcleos de diferente especie se los denomina HETCOR (HET por Heteronuclear y COR por Correlation).

El grupo de R. Ernst mostró en el año 1982 un experimento HETCOR 2D entre ^1H - ^{13}C inicialmente realizado en un cristal sin MAS [37], y posteriormente en una muestra en polvo de treonina rotada a 2.6 kHz [38].

Los experimentos de correlación heteronuclear son una herramienta muy importante para obtener un aumento en la resolución de los espectros de los núcleos abundantes y además, proveen un medio para lograr una mejor asignación de las señales de ^1H .

Han sido propuestos un gran número de experimentos HETCOR, los cuales difieren en la manera en que se obtiene la transferencia de coherencia, el tipo de coherencia que se deja evolucionar y en la secuencia de desacople homonuclear empleada. Recientemente, varias alternativas de HETCOR para alta resolución aplicables a muy altas velocidades de rotación se han propuesto. Vamos a analizar en detalle dos secuencias de pulsos que fueron utilizadas en esta tesis, una propuesta por van Rossum *et al.* [39] y otra propuesta por Saalwächter *et al* [40].

4.1.1. HETCOR-FSLG

Este experimento fue propuesto por van Rossum *et al.* [39] y hace uso de los acoples dipolares heteronucleares para la transferencia de polarización. La secuencia de pulsos empleada en este experimento se muestra en la figura 4.1.

La secuencia comienza con un pulso de $(\frac{\pi}{2} + \theta_m)_y$ en protones, seguido directamente del desacople homonuclear durante t_1 . Al tiempo t_1 se lo denomina tiempo de evolución. En este caso se utiliza como desacople un tren de pulsos de Lee-Goldburg (FSLG) con cambios de fases y frecuencias [41] en el plano xz , con el objetivo de obtener líneas más angostas de ^1H a velocidades de rotación relativamente bajas. En este experimento, la magnetización transversal de ^1H está presente durante t_1 . Luego del período de evolución, se le aplica a la magnetización de protones un pulso mágico (θ_m) (ver sección 3.5.2) en $-y$, este pulso hace que cualquier componente perpendicular al pulso de LG vuelva al plano xy y que la componente que se mantenía fija a lo largo del pulso de LG vuelva a la dirección z . Luego, la magnetización de ^1H es transferida a los ^{13}C mediante un pulso de CP de corta duración y luego se detecta la magnetización durante t_2 .

Analicemos en detalle lo que ocurre cuando se aplica esta secuencia de pulsos a un sistema de un par de espines. Recordemos que el Hamiltoniano dipolar secular (ver sección 2.2.2) puede escribirse como

$$\hat{\mathcal{H}}_{II}^0 = \sum_{j>k}^N \sum_k^N d_{jk} \left(2I_j^z I_k^z - \frac{1}{2} (I_j^+ I_k^- + I_j^- I_k^+) \right) \quad (4.1)$$

con

$$d_{jk} = \frac{1}{2} \frac{\gamma_I^2 \hbar^2}{r_{jk}^3} (1 - 3 \cos^2 \theta_{jk}) \quad (4.2)$$

Si consideramos la aplicación de un campo de rf fuera de resonancia y tenemos en cuenta la dispersión de corrimiento químico, el Hamiltoniano total puede escribirse como

$$\hat{\mathcal{H}}_{tot} = \sum_j (\Delta\omega_j I_z^j - \gamma(B_0 - \frac{\omega}{\gamma}) I_z^j - \gamma B_1 I_x^j + \hat{\mathcal{H}}_{II}^0) \quad (4.3)$$

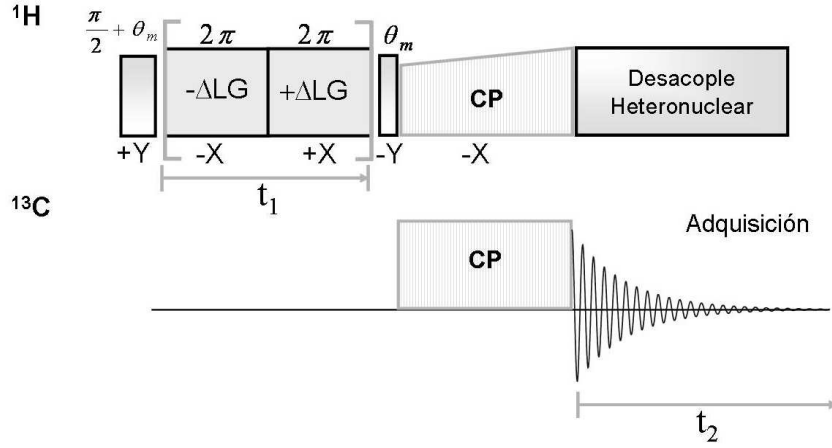


Figura 4.1: Representación esquemática de la secuencia de pulsos empleada para la obtención de experimentos de correlación heteronuclear bidimensionales utilizando FSLG durante t_1 .

Si realizamos una transformación a una terna rotante tildada con el eje z' en la dirección del campo efectivo $\vec{B}_{ef} = B_1 \hat{i} + [b_0 - (\omega/\gamma)] \hat{k}$, obtenemos

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}'_{tot} &= \sum_i (\Delta\omega_i \cos(\theta) + \omega_{ef}) I_z^i - \Delta\omega_i \sin(\theta) I_x^i \\ &+ \sum_{M=-2}^2 \lambda_M(\theta) \hat{\mathcal{H}}'_{II}{}^M \end{aligned} \quad (4.4)$$

la forma explícita para $\lambda_M(\theta) \hat{\mathcal{H}}'_{II}{}^M$ puede encontrarse en la referencia [42]. $\hat{\mathcal{H}}'_{II}{}^0$ permanece como el único término secular.

En el experimento de FSLG, ω_{ef} es entre $+\Delta LG/\cos(\theta)$ y $-\Delta LG/\cos(\theta)$. Si ahora hacemos una transformación a una terna que rota con ω_{ef} a lo largo del eje z' utilizando el propagador

$$U_{ef}(t) = \prod_i \exp(-i\omega_{ef} t I_z^i) \quad (4.5)$$

obtenemos los siguientes Hamiltonianos dependientes del tiempo

$$\hat{\mathcal{H}}'_{tot,ef}{}^{+\Delta LG}(t) = U_{ef}^{-1}(t) \hat{\mathcal{H}}'_{tot} U_{ef}(t), \quad (4.6)$$

$$\hat{\mathcal{H}}'_{tot,ef}{}^{-\Delta LG}(t) = U_{ef}(t) \hat{\mathcal{H}}'_{tot} U_{ef}^{-1}(t) \quad (4.7)$$

para $\omega_{ef} = \Delta LG / \cos(\theta)$, y

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}}'_{tot,ef}{}^{\Delta LG}(t) = & \sum_i (\Delta\omega_i \cos(\theta) \pm \omega_{ef}) I_z^i - \Delta\omega_i \sin(\theta) (I_x^i) \cos\omega_{ef}t \mp I_y^i \sin\omega_{ef}t + \lambda_0(\theta) \hat{\mathcal{H}}'_{II}{}^0 \\ & + \sum_{M=-2}^2 \exp(\pm M\omega_{ef}t) \lambda_M(\theta) \hat{\mathcal{H}}'_{II}{}^M \end{aligned} \quad (4.8)$$

Cuando la frecuencia fuera de resonancia cumple la condición de Lee-Goldburg, $\omega = \gamma(B_0 \pm \frac{1}{2}\sqrt{2}B_1)$, $\hat{\mathcal{H}}'_{II}{}^0$ se anula ya que $\lambda_0(\theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1)$.

Si calibramos $\omega_{ef}\tau = 2\pi$, ambas ternas rotantes coincidirán con la terna rotante tildada al comienzo y al final de cada período de evolución. Por lo tanto, la magnetización de protones va a evolucionar efectivamente en el plano perpendicular al eje z' de la terna tildada. Es por esto que para optimizar la sensibilidad es importante comenzar la evolución en el plano perpendicular a z' dando un pulso de $((\frac{\pi}{2} + \theta_m)_y)$, y seleccionar una componente en este plano al final del período de evolución dando un pulso θ_m .

4.1.2. REPT-HSQC

Este experimento, presentado por Saalwächter *et al.* [40], también hace uso de los acoples dipolares heteronucleares para realizar la transferencia de magnetización. A diferencia del experimento anterior (HETCOR-FSLG) donde la transferencia de polarización es efectuada mediante una CP, en el REPT-HSQC son los períodos de reacople de la interacción dipolar los responsables de la transferencia de polarización de los núcleos abundantes (^1H en nuestro caso) a los núcleos diluidos (^{13}C en este caso particular). En este experimento se emplean los acoples dipolares heteronucleares para excitar coherencias cuánticas múltiples. La secuencia de pulsos empleada para realizar este experimento se muestra en la figura 4.2.

Este experimento puede realizarse de tres maneras diferentes:

- Tomando $t_1 = 0$ en la versión unidimensional y variando la longitud del período de reacople da como resultado curvas de crecimiento de HSQC que son sensibles a la intensidad de la interacción dipolar heteronuclear.
- Incrementando t_1 en pasos iguales a un período completo de rotación en un experimento bidimensional provee un espectro de correlación heteronuclear (HETCOR), correlacionando el corrimiento químico del espín S en la dimensión directa con el corrimiento químico del espín I en la dimensión indirecta.
- Incrementando t_1 en pasos pequeños da como resultado bandas rotacionales de las que se puede extraer el valor de la constante de acople dipolar heteronuclear.

Las correlaciones heteronucleares que se exploran en este experimento están basadas en el acople dipolar entre dos tipos de espines I y S . Podemos escribir el Hamiltoniano

$$\overline{\hat{\mathcal{H}}_D^{IS}}(0, N\tau_R) = -\Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \cdot \mathbf{I}_z \mathbf{S}_z \quad (4.13)$$

donde,

$$\Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) = N \cdot \frac{D_{IS}}{\omega_R} 2\sqrt{2} \text{sen} 2\beta_{IS} \text{sen} \gamma_{IS} \quad (4.14)$$

en las ecuaciones anteriores, N denota el número de ciclos de rotor, durante los cuales los pulsos de π reacoplan la interacción dipolar.

Analicemos que ocurre con la magnetización si pensamos que comenzamos del estado de equilibrio $\hat{I}_z \hat{S}_z$. Luego del pulso de $\frac{\pi}{2}$ inicial, la magnetización transversal $-\hat{I}_y$ evoluciona con $\overline{\hat{\mathcal{H}}_D^{IS}}$ por un período $N\tau_R$, lo que deja como resultado:

$$-\hat{I}_y \cdot \cos \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) + \hat{I}_x \hat{S}_z \cdot \text{sen} \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \quad (4.15)$$

El estado mezcla $\hat{I}_x \hat{S}_z$, experimenta evolución del corrimiento químico de I durante el tiempo de evolución t_1 de acuerdo a $\hat{\mathcal{H}}_{CS}^I = \omega_{CS}^I \cdot \hat{I}_z$. Durante el tiempo t_1 se crea un estado de superposición:

$$\begin{aligned} & (\hat{I}_x \hat{S}_z \cdot \cos \omega_{CS}^I t_1 + \hat{I}_y \hat{S}_z \cdot \text{sen} \omega_{CS}^I t_1) \\ & \cdot \text{sen} \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \end{aligned} \quad (4.16)$$

Luego, se aplica un pulso de $\frac{\pi}{2}$ de fase x o y y un pulso de $\frac{\pi}{2}$ de fase y en I y S respectivamente, de esta manera se convierte el estado anterior en una superposición de estados $\hat{I}_\alpha \hat{S}_z$ con $\alpha = x, y, z$. Solo la componente longitudinal de I ($\hat{I}_z \hat{S}_x$) va a contribuir a la señal.

Durante el segundo período de reacople de la interacción dipolar heteronuclear, el estado mezcla $\hat{I}_z \hat{S}_x$ es convertido en magnetización transversal de los espines S , \hat{S}_x , que es detectada luego de un filtro en z . Este filtro reduce la magnetización transversal residual por desfase. De esta manera, las componentes finales de la magnetización serán

$$\begin{aligned} S_x & \propto \langle \cos(\omega_{CS}^I t_1) \cdot \text{sen} \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \cdot \text{sen} \Omega_D^{IS}(t_1, t_1 + N\tau_R) \rangle \\ S_y & \propto \langle \text{sen}(\omega_{CS}^I t_1) \cdot \text{sen} \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \cdot \text{sen} \Omega_D^{IS}(t_1, t_1 + N\tau_R) \rangle \end{aligned} \quad (4.17)$$

donde los brackets indican promedio en orientaciones.

En el experimento que realizamos en este trabajo, t_1 es incrementado de manera sincronizada con la velocidad de rotación, de esta manera logramos obtener espectros libres de bandas rotacionales en la dimensión indirecta. Entonces, en nuestro caso, la señal queda simplificada de la siguiente manera

$$\begin{aligned} S_x & \propto \langle \cos(\omega_{CS}^I t_1) \cdot \text{sen}^2 \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \rangle \\ S_y & \propto \langle \text{sen}(\omega_{CS}^I t_1) \cdot \text{sen}^2 \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \rangle \end{aligned} \quad (4.18)$$

de tal manera que el corrimiento químico de I y S están correlacionados y la intensidad de la señal está pesada por el acople dipolar heteronuclear IS .

Para tiempos de reacople cortos, las correlaciones solo aparecen para núcleos directamente ligados. De esta manera, este experimento es muy útil para asignar señales.

4.2. Correlación Homonuclear para espines $\frac{1}{2}$

La gran mayoría de los experimentos de correlación en RMN reposan en el hecho de que en sistemas acoplados dipolarmente se pueden excitar coherencias cuánticas múltiples. Hay dos clases de experimentos que pueden realizarse en sistemas de espines homonucleares para establecer correlación espacial, ambos utilizan la excitación de coherencias cuánticas múltiples entre espines acoplados dipolarmente. Generalmente, los experimentos utilizan las coherencias cuánticas dobles que pueden ser excitadas entre pares de espines $\frac{1}{2}$, pero la coherencia de orden cero también suele ser importante en algunos experimentos.

Hay mucho interés en realizar experimentos de correlación en sistemas de espines homonucleares, tanto en los casos donde la abundancia de espines es alta, como cuando sólo hay pares de espines aislados.

4.2.1. Secuencia Back-to-Back (BaBa)

Si bien el desacople es esencial para obtener una buena resolución y lograr distinguir distintas líneas de resonancia, al aplicar los métodos de desacople mencionados en la sección 3.5, estamos perdiendo información dinámica y estructural inherente a los acoples dipolares. Es por esto que se requiere de un método que permita acceder a esta información perdida. Una forma de lograrlo es mediante la espectroscopía bidimensional de coherencias cuánticas dobles (Double Quantum Coherences, DQC) entre protones ($^1\text{H}, ^1\text{H}$) bajo MAS (DQMAS por sus siglas en inglés). Este método se basa en el hecho de que la generación de coherencias dobles es posible gracias a la existencia de un acople dipolar entre los protones.

Para la excitación de DQC durante MAS, debe considerarse la interferencia con la velocidad de rotación. En particular, si una secuencia de pulsos diseñada para un experimento de coherencias cuánticas múltiples (MQC) estático se utiliza sin modificaciones, los tiempos de excitación (y reconversión) están limitados a $\frac{T_R}{2}$, ya que la modulación provocada por la rotación produce que la acción de la secuencia de pulsos durante la segunda mitad del período de rotación sea la inversa en el tiempo de la que ocurre durante la primera mitad del período de rotación. Las secuencias de pulsos que contrarrestan los efectos de MAS son llamadas secuencias de reacople.

En la figura 4.3 (a) se muestra el esquema básico para un experimento de coherencias cuánticas múltiples: primero se excita la coherencia cuántica múltiple, que evoluciona durante un tiempo que se va a ir incrementando, t_1 ; la coherencia múltiple es luego convertida en una coherencia simple (SQC) durante el período de reconversión, que puede ser observada y se la detecta durante el período de adquisición t_2 .

La secuencia de pulsos BaBa fue introducida por Feike *et al.* [43] como una técnica para excitación de coherencias cuánticas múltiples bajo rotación de la muestra al ángulo mágico. Esta secuencia está basada en el reacople del acople dipolar homonuclear. En nuestro caso, vamos a utilizar esta secuencia para la generación de coherencias cuánticas dobles.

La secuencia BaBa, que se muestra en la figura 4.3, consiste en la repetición del bloque

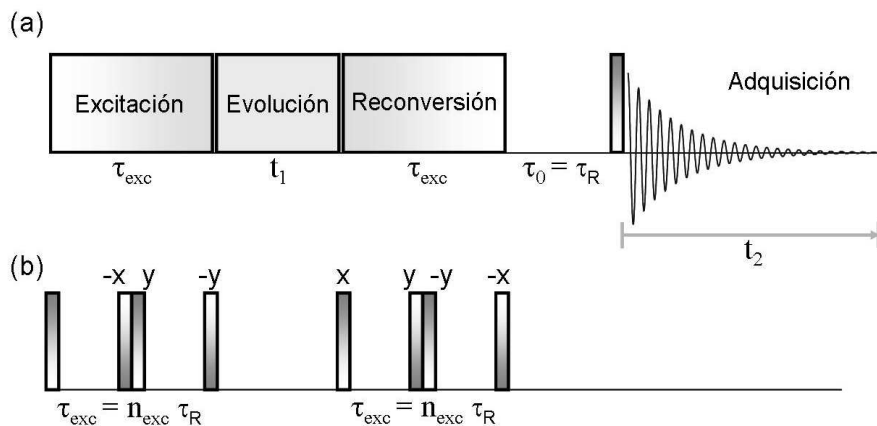


Figura 4.3: Secuencia de pulsos (BaBa) para la obtención de espectros bidimensionales mediante la excitación de Coherencias Cuánticas Dobles.

básico $((\frac{\pi}{2})_x - \frac{\tau_R}{2} - (\frac{\pi}{2})_{-x} (\frac{\pi}{2})_y - \frac{\tau_R}{2} - (\frac{\pi}{2})_{-y})$. Para períodos largos de excitación (dos, cuatro y ocho períodos de rotor) los signos de las fases de los pulsos deben calibrarse de tal manera que la secuencia compense efectos de offset e imperfecciones de pulsos. Se debe tener en cuenta que la secuencia debe tener un ciclado de fases adecuado de manera de seleccionar las coherencias deseadas.

Si se aplica la secuencia de pulsos BaBa a un sistema de un par de espines en equilibrio térmico, esto es $\rho_0^{ij} \propto (\hat{I}_z^i + \hat{I}_z^j)$, resulta en la generación de Coherencias Dobles, cuya amplitud está modulada por $\text{sen}(\Omega_{exc}^{ij})$. Durante la reconversión, una modulación en la amplitud correspondiente a $\text{sen}(\Omega_{rec}^{ij})$ es introducida. Para excitación y reconversión de N períodos de rotor, la intensidad de la señal relativa de coherencias dobles puede describirse como

$$S_{DQ}^{ij}(t_1) = \langle \text{sen}(N\Omega_{rec}^{ij}) \cdot \text{sen}(N\Omega_{exc}^{ij}) \rangle_{\beta\gamma'} \quad (4.19)$$

donde los paréntesis indican promedio en orientaciones, que se requiere en muestras en polvo.

La señal de DQ depende del tiempo de evolución t_1 . Consecuentemente, dependiendo de la elección de t_1 y del incremento en t_1 , Δt_1 , para un experimento bidimensional el experimento puede realizarse de varias maneras. En un experimento unidimensional ($t_1 = 0$) la secuencia funciona sólo como un filtro de coherencias dobles, mientras que el experimento BaBa 2D puede realizarse para obtener un espectro de DQ sincronizado con la rotación o para generar patrones de bandas rotacionales de DQ en ^1H .

Entonces, el espectro bidimensional de BaBa se obtiene al incrementar el tiempo de evolución t_1 . Dependiendo de qué tan grande sea este incremento Δt_1 , se pueden distinguir dos variantes del experimento.

Calibrando el incremento en t_1 exactamente igual a un período de rotor, $\Delta t_1 = \tau_R$, se

obtiene un espectro 2D sincronizado con la velocidad de rotación. Realizando el incremento en pequeños pasos se obtienen bandas rotacionales.

La ventaja de los espectros sincronizados con la velocidad de rotación es que con un ancho espectral en la dimensión indirecta que satisface $SW(F_1) = \frac{1}{\Delta t_1} = \frac{1}{\tau_R} = \omega_R$ no se observan bandas rotacionales. De esta manera, la posición de la línea de resonancia en la dimensión indirecta depende sólo de la evolución de las coherencias dobles excitadas durante t_1 . Es así como el experimento correlaciona la evolución de las coherencias dobles seleccionadas durante la primera dimensión espectral (t_1) con la señal de coherencias simples (SQ) detectada durante el período de adquisición final (t_2). Las DQ evolucionan durante t_1 bajo la influencia del corrimiento químico isotrópico y la interacción dipolar. La evolución de las coherencias dobles entre dos espines i y j bajo los respectivos corrimientos químicos da como resultado una modulación de la forma $\exp(i(\omega_{CS}^{(i)} + \omega_{CS}^{(j)})t_1)$

Si solo el acople entre los espines i y j que forman la coherencia doble estuviera presente, no se observaría evolución debido a la interacción dipolar durante el tiempo t_1 . La posición espectral de las señales en t_1 está gobernada puramente por la evolución del corrimiento químico isotrópico de la DQ, cuya frecuencia de resonancia es la suma de las frecuencias de resonancia de los espines involucrados. Por lo tanto, es conveniente mostrar como se vería un espectro bidimensional sincronizado con la velocidad de rotación (ver figura 4.4). El eje de frecuencia ω_1 (dimensión t_1) es escaleada un factor 2 con respecto al eje de frecuencia ω_2 (dimensión t_2).

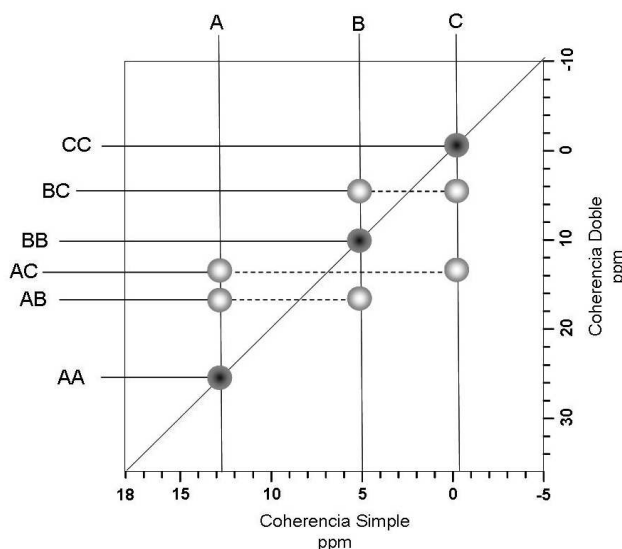


Figura 4.4: Representación esquemática de un espectro 2D de DQMAS.

Las posiciones están denotadas como (ω_2, ω_1) , donde ω_2 es la frecuencia de SQ y ω_1 es la frecuencia de DQ.

En el espectro de correlación se pueden distinguir dos clases de señales:

- Una coherencia doble entre espines iguales, por ejemplo entre los espines CC (idéntico Corrimiento químico) que genera un solo pico en la posición $(\omega_C, 2\omega_C)$ en la diagonal del espectro.
- Una coherencia doble entre espines diferentes AB (diferente corrimiento químico) genera un par de picos cruzados en las posiciones $(\omega_A, \omega_A + \omega_B)$ y $(\omega_B, \omega_A + \omega_B)$. Los dos picos idealmente tienen la misma intensidad, ya que la intensidad de los picos cruzados corresponde al número de espines involucrados. Sin embargo, no es siempre el caso, como ya veremos más adelante.

Debe notarse que es crucial elegir el tiempo de excitación adecuado para la detección de determinadas coherencias. Si la velocidad de rotación es muy alta, se pueden observar coherencias dobles para una distancia entre espines menor a 3.5 A.

4.3. CODEX (Centerband Only Detection of Exchange)

Este experimento, llamado CODEX (Centerband Only Detection of Exchange), es un medio para medir el intercambio dipolar entre espines de ^{19}F químicamente idénticos pero orientacionalmente diferentes en distintas moléculas a través de la anisotropía de corrimiento químico.

El reacople de la anisotropía de corrimiento químico (CSA) fue utilizado por primera vez en el experimento CODEX por Schmidt-Rohr *et al.* [44],[45] y su secuencia de pulsos se muestra en la figura 4.5.

En el experimento CODEX, la magnetización es guardada en $\pm z$ durante un período de mezcla $t_m = n\tau_R$, durante el cual el intercambio químico puede tomar lugar. Gracias al ciclado de fases, tanto la señal modulada por el seno como por el coseno son seleccionadas por t_1 en escanes consecutivos. Como el tiempo de mezcla es un número entero del período del rotor, la señal del CODEX está dada simplemente por

$$S \propto \langle \cos(N_{exc}\bar{\Phi}_{CSA})\cos(N_{rec}\bar{\Phi}'_{CSA}) + \text{sen}(N_{exc}\bar{\Phi}_{CSA})\text{sen}(N_{rec}\bar{\Phi}'_{CSA}) \rangle \quad (4.20)$$

La fase promedio del período de reconversión puede cambiar con respecto a $\bar{\Phi}'_{CSA}$ durante tiempos largos de mezcla debido a movimientos lentos (en la escala de los ms) de procesos de reorientación molecular, es por esto que está primada $\bar{\Phi}'_{CSA}$.

La rotación al ángulo mágico provoca que la evolución bajo el corrimiento químico anisotrópico sea refocalizada al final de cada período de rotación R . Si se aplica un pulso de 180° a $\tau = \frac{R}{2}$, se evita la refocalización de la evolución debida a la interacción de Corrimiento Químico Anisotrópico. Recientemente de Azevedo *et al.* [44] mostraron como un experimento en el que se incorporan dos períodos de reacople del CSA separados por un tiempo de mezcla m permite la detección de procesos dinámicos lentos. Este método es aplicable a velocidades de rotación altas.

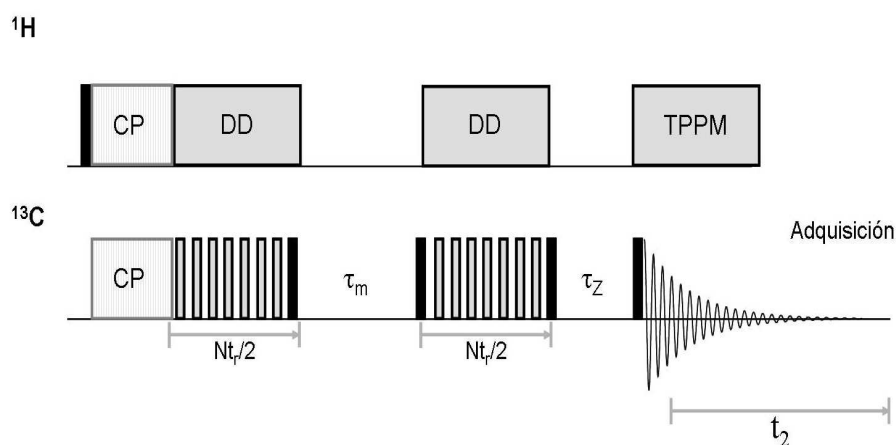


Figura 4.5: Secuencia de pulsos empleada para el experimento CODEX.

El principio de este experimento radica en que una pérdida en la intensidad de la señal es observada si la orientación del tensor de CSA para un núcleo particular cambia durante el tiempo de mezcla m . De una serie de experimentos de CODEX es posible determinar el ángulo de reorientación, el tiempo de correlación, así como también la fracción de segmentos móviles en una muestra.

Durante $\frac{N}{2}$ períodos de rotación, los espines evolucionan debido al Corrimiento Químico Anisotrópico, que es refocalizado por dos pulsos de π por período de rotación τ_R . Luego la magnetización se guarda en z , de tal manera que no precese ni se desfase durante los tiempos de mezcla largos t_m , que son múltiplos enteros de τ_R . Si no hay movimientos durante t_m , luego de un pulso de lectura y otro período de rotación $\frac{N}{2}$ bajo el CSA refocalizado, la evolución del CS es refocalizada al comienzo de la detección. Si se produce alguna reorientación durante t_m , la frecuencia dependiente de la orientación cambia y el CSA no es completamente refocalizado.

La señal dominante de sitios no móviles puede ser removida sustrayendo el espectro del CODEX de un espectro de referencia. El espectro de referencia se obtiene simplemente intercambiando t_m y Δ en la secuencia de pulsos. El espectro resultante es exclusivamente debido a sitios de intercambio, esto se denomina *pure exchange* CODEX.

Teniendo en cuenta el tamaño δ del CSA, el ángulo de reorientación puede estimarse de la dependencia de la intensidad con $N\tau_R$. El contenido de información de la intensidad de intercambio normalizada $E(t_m, \delta N\tau_R)$, obtenida como el cociente del *pure exchange* CODEX con la intensidad de referencia. Información acerca del número M de sitios con orientación equivalente que intervienen en el proceso de movimiento y la fracción f_m de segmentos móviles es obtenida de la intensidad final de intercambio $E_\infty = E(t_m \gg \tau_c, \delta N\tau_R \gg 1) = f_m(M - 1)/M$. Para $f_m = 1$, el mínimo E_∞ es $\frac{1}{2}$, obtenido para $M = 2$.

El principio de la técnica CODEX para *spin counting* es el intercambio de magnetización entre moléculas con diferente orientación. Dos trenes de pulsos de π sincronizados

con la rotación reacoplan el CSA dependiente de la orientación de los espines X bajo MAS. Entre los trenes de pulsos tiene lugar la difusión de espines mediada por ^1H entre espines X químicamente equivalentes pero orientacionalmente inequivalentes, dando como resultado un cambio en la frecuencia del CSA, que previene la refocalización completa del eco estimulado al final del segundo tren de pulsos.

Para tiempos de mezcla largos, la magnetización inicial está igualmente distribuida entre las n orientaciones posibles en la muestra, reduciendo la intensidad del eco de CODEX en $\frac{1}{n}$.

De acuerdo con la Teoría de Difusión mediada por ^1H , la tasa de intercambio de magnetización depende del acople dipolar y de la integral de superposición espectral, cuyo valor preciso es difícil de predecir de primeros principios. Lo que proponen Mei Hong *et al.* [46] es usar una aproximación empírica de calibración de esta integral de superposición usando un compuesto modelo con distancias internucleares conocidas.

La constante k_{ij} (tasa de intercambio) puede aproximarse por

$$k_{ij} = \frac{1}{2}\omega_{ij}^2 F_{ij}(0) \quad (4.21)$$

donde ω_{ij} es el acople dipolar homonuclear

$$\omega_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma^2 \hbar \frac{1}{r_{ij}^3} \frac{1 - 3\cos^2\theta_{ij}}{2} \quad (4.22)$$

y $F_{ij}(0)$ es la integral de superposición que describe la probabilidad de que ocurran transiciones SQ a la misma frecuencia para espines i y j y viene dada por:

$$F_{ij} = \int_{-\infty}^{+\infty} f_i(\omega - \omega_i) f_j(\omega - \omega_j) d\omega \quad (4.23)$$

donde $f_i(\omega - \omega_i)$ es la forma de línea a SQ del espín i en ausencia de desacople de protones y ω_i es el centro de esa forma de línea. Esta integral de superposición está relacionada con la forma de línea de ZQ normalizada a frecuencia cero.

Para la difusión de espines entre n espines X, la evolución del vector n -dimensional de la magnetización z , $\mathbf{M}(t)$ está dada por

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = -\hat{\mathbf{K}}\mathbf{M}(t) \quad (4.24)$$

donde $\hat{\mathbf{K}}$ es la matriz de intercambio n -dimensional que contiene las tasas de intercambio k_{ij} .

Entonces, ajustando la ecuación 4.21 a los datos obtenidos de un experimento realizado a un compuesto con distancias internucleares conocidas, podemos determinar el valor de $F_{ij}(0)$ a partir de la ecuación 4.21. Se ha probado [46] que pequeñas variaciones en el valor de $F_{ij}(0)$ no influye significativamente en la determinación final de las distancias internucleares.

Además, como al llegar al equilibrio, la magnetización está igualmente distribuida en los n espines que intervienen en el proceso, es posible obtener este valor del valor de equilibrio al que llegan las curvas del CODEX.

Capítulo 5

Otras Técnicas de Análisis

Díganme, al fin y al cabo, los señores, con sus luces y su experiencia: ¿dónde está la verdad, la absoluta verdad? ¿Cuál es la moraleja que se ha de extraer de esta historia, a veces libertina y poco ejemplar? ¿Está la verdad en eso que sucede todos los días, en los acontecimientos cotidianos, en la mezquindad y chatez de la vida de la inmensa mayoría de los hombres, o reside la verdad en el sueño que nos es dado para huir de nuestra triste condición? ¿Cómo se elevó el hombre en su caminata por el mundo: a través del día a día de miserias y vulgaridades, o por el libre sueño sin fronteras ni limitaciones? ¿Quién llevó a Vasco de Gama y a Colón al puente de sus carabelas? ¿Quién dirige las manos de los sabios que mueven las palancas de ese juego de los sputniks, creando nuevas estrellas y una nueva luna en el cielo de este suburbio del universo? ¿Dónde esta la verdad? Díganmelo, por favor: ¿en la pequeña realidad de cada uno o en el inmenso sueño del hombre? ¿Quién la conduce por el mundo afuera, iluminando el camino del hombre? ¿El Meritísimo juez o el paupérrimo poeta? ¿Chico Pacheco, con su integridad, o el comandante Vasco Moscoso de Aragón, capitán de altura?.

Jorge Amado

Si bien nuestro trabajo se centró en el estudio de compuestos farmacéuticos mediante técnicas de RMN en estado sólido, contamos con resultados de otros experimentos realizados sobre las muestras (DRXP, FTIR, calorimetría diferencial de barrido, etc.) que ayudaron a determinar algunos aspectos importantes de los compuestos estudiados. A continuación mencionaremos brevemente las técnicas empleadas [47], [48].

5.1. Difracción de Rayos-X de Polvo (DRXP)

Los sólidos cristalinos se caracterizan porque a nivel microscópico los átomos (o moléculas) se encuentran ordenados en arreglos periódicos tridimensionales en el espacio. Entre las múltiples aplicaciones de la DRXP se encuentran por un lado la identificación y el análisis cuantitativo de fases cristalinas y por otra parte, la determinación de estructuras cristalinas. Cualquier especie cristalina produce siempre un diagrama de difracción (DD) característico. Si la muestra está constituida por una mezcla de diferentes especies, el DD correspondiente manifestará la suma de los efectos de difracción de cada uno de ellos.

5.2.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Esta técnica mide la diferencia de energía (flujo de calor) entre una referencia (R) y la muestra (S). El resultado de un análisis de DSC es una curva, un gráfico de flujo de calor vs. temperatura. La figura 5.2 muestra una curva idealizada de un experimento de DSC. Las endotermas representan procesos en los cuales se ha absorbido calor, como por ejemplo una pérdida de solvente, una transición de fase o fusión. Las exotermas representan procesos como cristalización o reacciones químicas donde se produce calor. Además, el área bajo un pico es proporcional a la cantidad de calor involucrado en el proceso. Por lo tanto, este método puede ser utilizado para determinar las entalpías (ΔH) de procesos involucrados. También, puede utilizarse la DSC para determinar el punto de fusión y la pureza de una muestra.

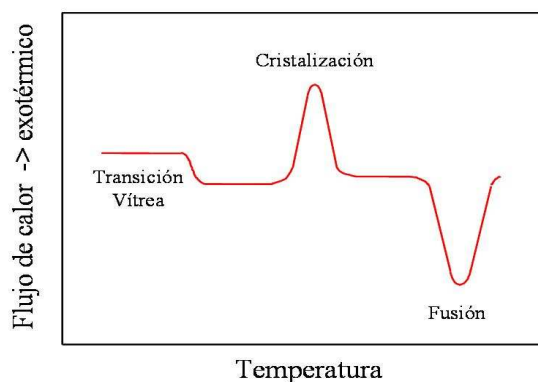


Figura 5.2: Curva típica de un experimento de DSC.

Hay dos definiciones que suelen utilizarse para describir la relación entre las energías relativas de polimorfos a diferentes temperaturas: **monotrópica** y **enantiotrópica**. En un sistema monotrópico, una forma es la termodinámicamente estable independientemente de la temperatura. En un sistema enantiotrópico, una de las formas es estable debajo de cierta temperatura de transición, pero la otra forma es estable por encima de esa temperatura.

5.3. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En general, la espectroscopía IR es muy útil para el análisis de sólidos porque los experimentos pueden realizarse sin disolver la muestra. El espectro IR es extremadamente sensible a la estructura, la conformación y el entorno químico de un compuesto y por lo

Frecuencia (cm ⁻¹)						
4000	2500	2000	1800	1650	1550	650
O-H	C-H	C≡C	Muy	C=O	C=N	C-C1
		C≡N	Pocas			C-O
N-H			bandas			C-N
		X=C=Y (C, O, N, S)			C=C	C-C
					N=O	N=O

Figura 5.3: *Regiones de absorción aproximadas para varios tipos de ligaduras comunes.*

tanto es un método muy poderoso para la caracterización e identificación de diferentes formas sólidas. El interés de la FTIR radica fundamentalmente en sus aplicaciones de tipo cualitativo. La frecuencia de cada banda del espectro IR depende de la constante de fuerza de cada enlace interatómico, de ahí que el espectro de absorción en la región infrarroja depende del conjunto de enlaces que constituyen la estructura molecular y sea distinto y característico de cada molécula. En la tabla 5.3 se muestran las regiones de absorción aproximadas para algunos enlaces típicos.

Capítulo 6

Derivados Fluoroquinolónicos

Los compuestos estudiados en esta tesis fueron sintetizados por el grupo del Dr. Rubén H. Manzo en el Departamento de Farmacia de Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Nacional de Córdoba. Los complejos fluoroquinolónicos con aluminio (sección 6.1.1) formaron parte de la tesis doctoral de la Dra. Andrea Breda bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Olivera y los Sacarinos Fluoroquinolónicos (sección 6.1.2) fueron elaborados por la Mgter. Carolina Romañuk como parte de su tesis de Maestría, también dirigida por la Dra. María Eugenia Olivera. En este capítulo mencionaré brevemente la importancia de estos compuestos y los métodos empleados para su obtención. Para un análisis detallado sobre los métodos de preparación y otros estudios realizados en estos compuestos (solubilidad, biodisponibilidad, etc.) se recomienda leer los trabajos [47] y [48].

6.1. Fluoroquinolonas

Los Antimicrobianos Fluoroquinolónicos (AMFQs) son una familia de agentes antibacterianos sintéticos derivados del Ácido Nalidíxico de amplia utilización en la práctica clínica [1]-[2].

Las Quinolonas de Segunda Generación, conocidas comúnmente como Fluoroquinolonas, incluyen a Ciprofloxacino, Norfloxacino, Ofloxacino y Enrofloxacino (ver figura 6.1) y han demostrado alta eficacia en el tratamiento de procesos bacterianos que afectan a animales [49], [50].

Las Fluoroquinolonas son más activas, tienen relativamente pocos efectos adversos, la resistencia microbiana no se desarrolla tan rápidamente, exhiben una moderada a excelente absorción oral y tienen moderada a buena biodisponibilidad. Entre los usos clínicos se incluyen el tratamiento de infecciones del tracto urinario complicadas y no complicadas, pielonefritis, enfermedades de transmisión sexual, prostatitis e infecciones de la piel y tejidos.

Estos compuestos presentan muchas ventajas que los hacen muy útiles, pero también poseen inconvenientes que hacen difícil la formulación adecuada de los mismos. Los AM-

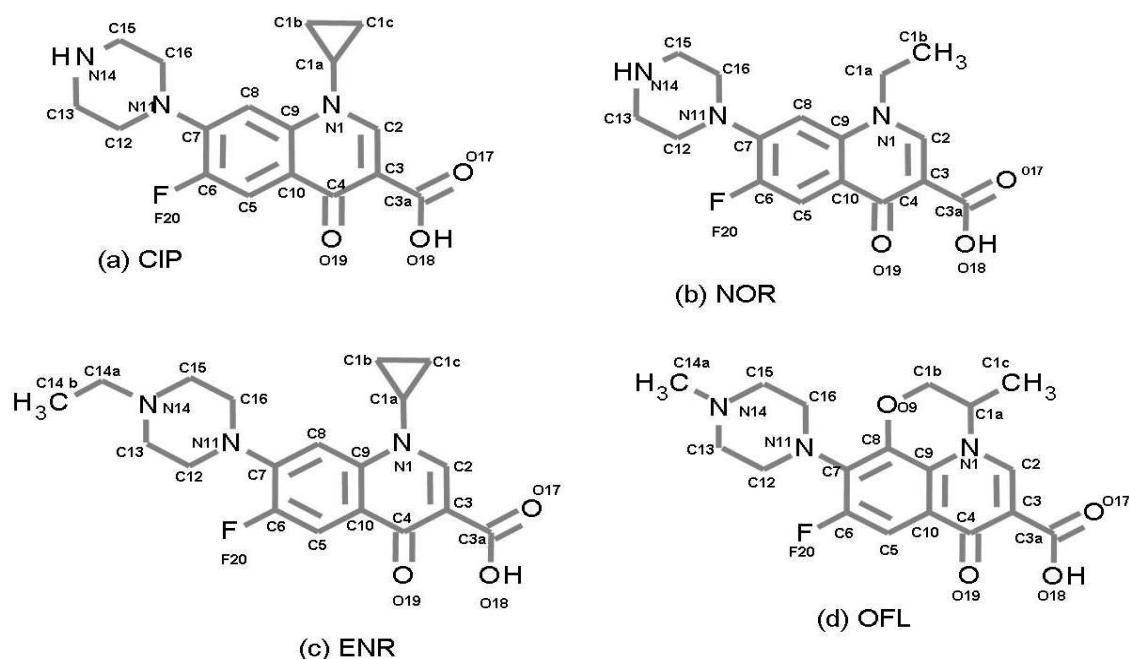


Figura 6.1: Estructura química de las Fluoroquinonas, mostrando la numeración empleada para las asignaciones de los espectros de RMN de ^{13}C , ^1H , ^{19}F y ^{15}N .

FQs son predominantemente bactericidas, muestran una destrucción dependiente de la concentración, la mayor parte de ellos tiene una excelente biodisponibilidad oral y tiempos de vida media relativamente largos lo que permite un intervalo de administración cada doce horas o una sola vez al día. Muestran excelente distribución tisular y penetración celular, lo que permite su uso contra agentes patógenos intracelulares. Además poseen un prolongado efecto luego de la administración del antibiótico lo cual evitaría el rápido desarrollo de resistencia bacteriana. Los AMFQs son tal vez los antibióticos orales más usados en el tratamiento y profilaxis en humanos y animales de cría, y son a su vez los mejor tolerados.

Entre algunos inconvenientes que presentan los AMFQs vinculados a su formulación farmacéutica, se destacan su baja solubilidad acuosa y características organolépticas desfavorables (sabor amargo). Estas características subjetivas han limitado sus posibilidades de formulación y son además causa de poca aceptación en la dieta de los animales de producción. Se han desarrollado diversas técnicas con el objetivo de enmascarar el sabor desagradable de los AMFQs para de esa manera incrementar el valor del producto y mejorar la aceptación por parte de los pacientes. Entre estas estrategias se incluyen la forma-

ción de cápsulas recubiertas con polímeros insolubles, adsorción a resinas de intercambio iónico, microencapsulación con varios polímeros, acomplejamiento con ciclodextrinas y modificaciones químicas tales como la formación de prodrogas insolubles. Es importante señalar que actualmente hay una tendencia a obtener derivados con propiedades diferentes a las del precursor desarrollando metodologías que involucren solo agua como medio de reacción en lugar de solventes orgánicos. De esta manera, modificando la naturaleza del medio de reacción, se reduciría la contaminación ambiental lo cual tendrá un impacto positivo sobre la salud y el ambiente.

6.1.1. Complejos Fluoroquinolónicos con Aluminio

El acomplejamiento de NOR y CIP con aluminio fue utilizado como una estrategia para mejorar la solubilidad acuosa de estos compuestos, lo que dio origen a los nuevos derivados $(\text{HCl.NOR})_3$ y $(\text{HCl.CIP})_3$. Estos compuestos son sólidos estables con estequiometría 3:1 y muestran alta solubilidad acuosa a pH neutros. Las propiedades biológicas de esos compuestos (permeabilidad intestinal y potencia antimicrobiana) no presentaron variaciones significativas como consecuencia del acomplejamiento. Esta estrategia permitió el diseño de formulaciones líquidas superadoras para su utilización por vía oftálmica y ototópica, y de formulaciones sólidas con favorables propiedades de disolución.

Para la preparación de estos nuevos derivados se utilizó una metodología basada en la precipitación del producto (Método I). Sin embargo, para la obtención del producto en mayor escala fue necesaria la adaptación de la metodología original. A este nuevo método de producción se lo denominó Método II.

Materiales y Métodos

Los reactivos utilizados para la preparación de los complejos fueron los siguientes: Norfloxacin, NOR (Parafarm); Ciprofloxacino, CIP (Neutralizado a partir de Clorhidrato de CIP, Parafarm); Cloruro de aluminio hexahidratado, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel de Haën); Alcohol etílico 96° (EtOH Porta); Acetona (Cicarelli). Se obtuvieron los clorhidratos de complejos de CIP y NOR con aluminio ($(\text{CIP.HCl})_3\text{Al}$ y $(\text{NOR.HCl})_3\text{Al}$) con estequiometría 3:1 a partir de dos métodos diferentes:

- **Método I:** Precipitación con acetona.

Una solución de CIP (o NOR) y $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ fue calentada suavemente bajo agitación. Posteriormente se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C y se agregó lentamente una mezcla de acetona:agua (26:1), continuando con la agitación y calentamiento a reflujo, hasta ebullición. El sólido obtenido fue filtrado y secado (a 100 °C) hasta peso constante.

- **Método II:** Granulación con alcohol etílico.

CIP (o NOR) y $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en forma sólida y manteniendo la relación 3:1 fueron mezclados hasta obtener una mezcla homogénea y se agregó EtOH mientras se

malaxaba suavemente. La pasta obtenida se dejó a temperatura ambiente aproximadamente 15 horas. Transcurrido este período de tiempo se secó en estufa hasta peso constante.

6.1.2. Sacarinos Fluoroquinolónicos

Los Sacarinos de AMFQs se prepararon con el objetivo de mejorar algunos de los aspectos desfavorables que presentan las Fluoroquinolonas. Los AMFQs que se utilizaron fueron los de uso más frecuente en terapéutica (CIP, NOR, ENR y OFL). En este contexto, se desarrollaron los Sacarinos de Antimicrobianos Fluoroquinolónicos (SAC-AMFQs) obtenidos mediante la salificación con SAC (Figura 6.2).

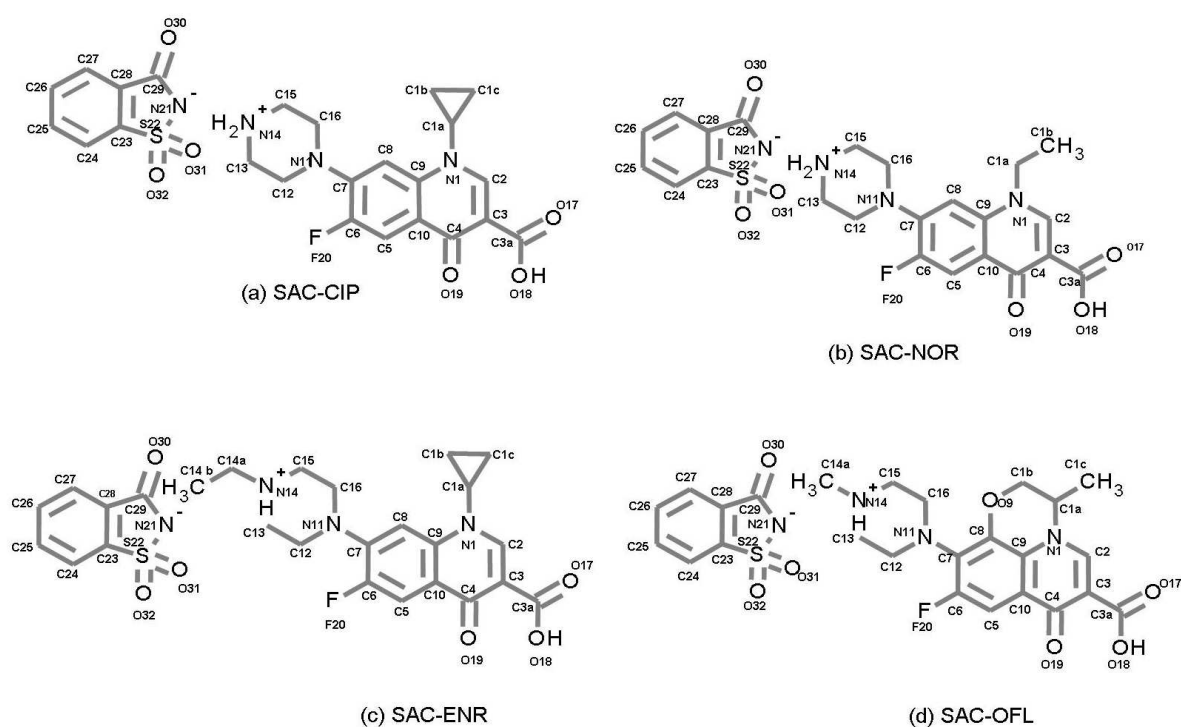


Figura 6.2: Estructura química de los Sacarinos Fluoroquinolónicos, mostrando la numeración empleada para las asignaciones de los espectros de ^{13}C , ^1H , ^{19}F y ^{15}N .

Materiales y Métodos

Se utilizó Hidróxido de Sodio grado analítico (Anedra), Ácido Clorhídrico concentrado 38 % P/V pro-análisis (Cicarelli), Sacarina Sódica dihidrato grado farmacéutico (Parafarm, China); Ciprofloxacino Clorhidrato (USP, Neuland Laboratorios Limited);

Enrofloxacino grado farmacéutico (Todo Droga), Norfloxacino (USP, Marsing & Co. Ltd. A/S. Dinamarca) y Ofloxacino grado farmacéutico (Parafarm, China). Todos los materiales fueron secados hasta peso constante bajo vacío y calor (100°C).

Para la obtención de los SAC-AMFQs, se partió de una solución acuosa de SAC a la cual se le agregó la cantidad estequiométrica del AMFQ correspondiente, esto se mantuvo con calentamiento a 90-95 °C y agitación por aproximadamente 15 minutos, al cabo de este tiempo se logró la disolución completa del AMFQ, obteniéndose una solución transparente. La solución resultante se filtró por gravedad a través de papel de filtro Whatmann N° 1, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas convenientemente protegida de la luz, se separó por filtración con vacío y se dejó secar a 40 °C en vacío hasta peso constante, luego se pulverizó en mortero y se almacenó en recipientes de cierre hermético y protegidos de la luz. Dado que los AMFQs son fotosensibles, en todas las etapas del procedimiento de preparación de las sales, el sistema fue convenientemente protegido de la luz.

Además, a partir de una solución diluida y con un enfriamiento gradual se obtuvieron monocristales de SAC-CIP.

Capítulo 7

Complejos de Fluoroquinolonas con ^{27}Al

Desde la introducción del Ácido Nalidíxico (NalH) [51] en la práctica clínica a comienzos de 1960 se ha desarrollado un gran número de agentes antibacterianos derivados del mismo [51],[52].

En particular, vamos a estudiar la familia de las Fluoroquinolonas (derivada de (NalH)) y en esta parte del trabajo centraremos nuestro estudio en CIP y NOR. CIP y NOR son dos antimicrobianos activos contra una gran variedad de bacterias gram-negativas. I. Turel presentó varios trabajos mostrando un completo análisis de estos fármacos, tanto para CIP [53] como para NOR [54].

Recordemos que una de las principales desventajas de estos compuestos es su baja solubilidad a pHs neutros. Este hecho llevó a que la interacción de las Fluoroquinolonas con iones metálicos fuera exhaustivamente estudiada debido a la posibilidad de conseguir una mejor solubilidad acuosa de los complejos en comparación con los AFIs sin acomplejar. Muchos trabajos publicados mostraron que la coordinación de las FQs con metales polivalentes efectivamente incrementaban la solubilidad acuosa de los complejos ([55],[56],[57],[58],[59]). Además, estos trabajos mostraron que la coordinación de las Fluoroquinolonas con los iones metálicos forman sólidos estables.

En esta parte del trabajo, presentamos un análisis detallado de complejos de CIP y NOR con ^{27}Al en estado sólido. El análisis en solución fue realizado previamente [48].

7.1. Caracterización de los complejos - Análisis de Espectros de ^{13}C

Con el transcurso del tiempo, la realización de experimentos de CPMAS de ^{13}C se ha convertido en una tarea de rutina cuando se trabaja con compuestos de interés farmacéutico. Es por esto que para comenzar el estudio de los complejos fluoroquinolónicos, realizamos espectros de ^{13}C para identificar y caracterizar cada uno de los mismos.

CIP y sus complejos con aluminio

Los espectros de ^{13}C para CIP y los complejos $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ obtenidos por los Métodos I y II se muestran en la figura 7.1. Las asignaciones de las señales de resonancia se corresponden con la numeración que se muestra en la figura 6.1. Los corrimientos químicos correspondientes están detallados en la tabla 7.1.

A la serie de compuestos también les realizamos experimentos de edición de carbonos cuaternarios (NQS) de ^{13}C cuyos resultados se muestran en la figura 7.3.

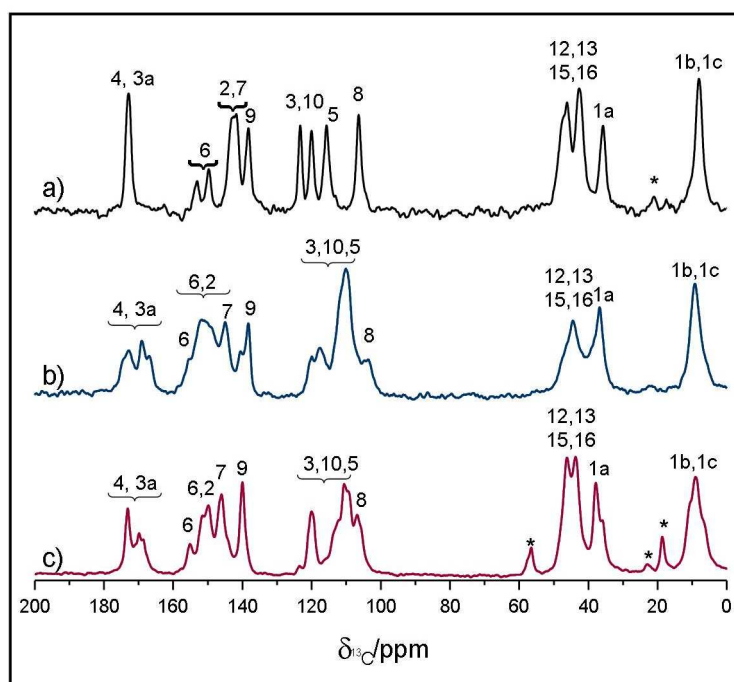


Figura 7.1: Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) CIP, (b) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método I, y (c) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método II. Los asteriscos indican bandas rotacionales.

Para comenzar el estudio de las formas sólidas de los complejos fluoroquinolónicos es necesario tener una correcta asignación de las señales de resonancia presentes en el espectro de CPMAS de ^{13}C . Para realizar las asignaciones de CIP se compararon los corrimientos químicos obtenidos mediante RMN de estado sólido con los corrimientos químicos obtenidos en solución (ver [47]) y se tuvo en cuenta además el espectro de edición de carbonos cuaternarios.

En el espectro de CPMAS de ^{13}C de CIP podemos clasificar las señales de resonancia en cinco grupos, dos grupos por debajo de los 60 ppm y tres por encima de los 100 ppm. Las señales de resonancia que se encuentran a ppm bajos corresponden a los grupos metilenos del anillo de piperazina y a las resonancias de los ^{13}C del grupo terpeno. Mientras que la parte planar de la molécula (aromáticos), como también la señal correspondiente al grupo

carboxilo, se encuentran a ppm más altos. La mayoría de las señales de ^{13}C en estado sólido tienen la misma posición relativa que las señales en solución. Sin embargo, una diferencia importante que puede notarse en estado sólido es que la señal que corresponde al carbono C(3a), que aparece a 167.2 ppm en estado líquido, en estado sólido se encuentra a 173 ppm aproximadamente. Este hecho nos está indicando el carácter zwitteriónico de la CIP [55]. La resonancia del carbono C(3) también se corre a ppm más alto con respecto al corrimiento químico en que se encuentra en solución, de 109.5 a 123.3 ppm. Como consecuencia de esto, las señales correspondientes a C(3) y C(9) se acercan en el espectro de ^{13}C , haciendo difícil la identificación de cada una de ellas. Otra característica de estos compuestos es que las señales C(4) y C(3a) aparecen superpuestas en la misma posición de resonancia en el espectro de estado sólido.

Las asignaciones de los espectros de CPMAS de ^{13}C de los complejos de $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ los realizamos comparando con el espectro de ^{13}C de CIP y tuvimos en cuenta los espectros de supresión no cuaternaria, que se muestran en la figura 7.3.

Ahora que cada señal está correctamente asociada a cada núcleo de ^{13}C presente en la molécula, es posible comenzar con el análisis y comenzar a comparar los espectros de los distintos compuestos.

En los espectros de ^{13}C de los complejos se puede observar un patrón similar en la distribución de las señales de resonancia al que se observa en CIP. En cada uno de los tres grupos que se encuentran por encima de los 100 ppm, se encuentran líneas de resonancia asociadas a carbonos cuaternarios, que pueden ser identificados utilizando los resultados de los espectros de NQS para cada compuesto.

Al observar los espectros de CPMAS de ^{13}C es evidente que las líneas de resonancia en los complejos con ^{27}Al son más anchas que las presentes en el compuesto farmacéutico sin acomplejar. Este hecho refleja el carácter desordenado de los complejos. A pesar de este hecho, en los espectros de $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ es posible identificar algunas señales de carbonos de manera muy clara, como por ejemplo C(4) y C(3a), con una multiplicidad más alta que en CIP. Este hecho puede ser atribuido a la estequiometría del complejo, el cual estaría formado por tres moléculas de CIP por átomo de aluminio, dando lugar a que algunos carbonos tengan diferentes entornos y experimenten diferentes campos locales dando lugar a pequeñas diferencias en sus frecuencias de resonancia.

Cuando se preparan este tipo de compuestos se espera que no queden restos de los precursores, por eso es muy importante contar con técnicas que permitan determinar si quedó fármaco puro sin reaccionar. Con RMN de estado sólido (mediante los espectros de ^{13}C) podemos concluir que no hay residuos de CIP. Llegamos a esta conclusión observando la señal a 123 ppm en CIP que está bajo el límite de detección en los complejos (ver figura 7.1 y 7.3). Esto nos indica que si hay IFA puro, la proporción es menor al 5%. Por lo tanto, toda la CIP ha reaccionado con el aluminio para formar los complejos, esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por FTIR (ver sección 7.4).

Hay que destacar que la resonancia que corresponde al carbono C(4) y C(3a) en el espectro de CIP se separa y se corre a ppm más bajos con el acomplejamiento. El corrimiento a ppm bajos de estas señales está de acuerdo con trabajos publicados previamente en los cuales muestran espectros de ^{13}C en solución de Fluoroquinolonas coordinadas con

aluminio y otros metales polivalentes ([55],[56],[57],[58],[59]). Como también muestran los resultados obtenidos por FTIR, este comportamiento de las señales de ^{13}C es esperable, como consecuencia de su participación en la coordinación con el ion de aluminio.

NOR y sus complejos con aluminio

Los espectros de ^{13}C para NOR y los complejos $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ obtenidos por los Métodos I y II se muestran en la figura 7.2. Las asignaciones de las señales de resonancia se corresponden con la numeración que se muestra en la figura 6.1. Los corrimientos químicos correspondientes están detallados en la tabla 7.2. Como en el caso de CIP, las

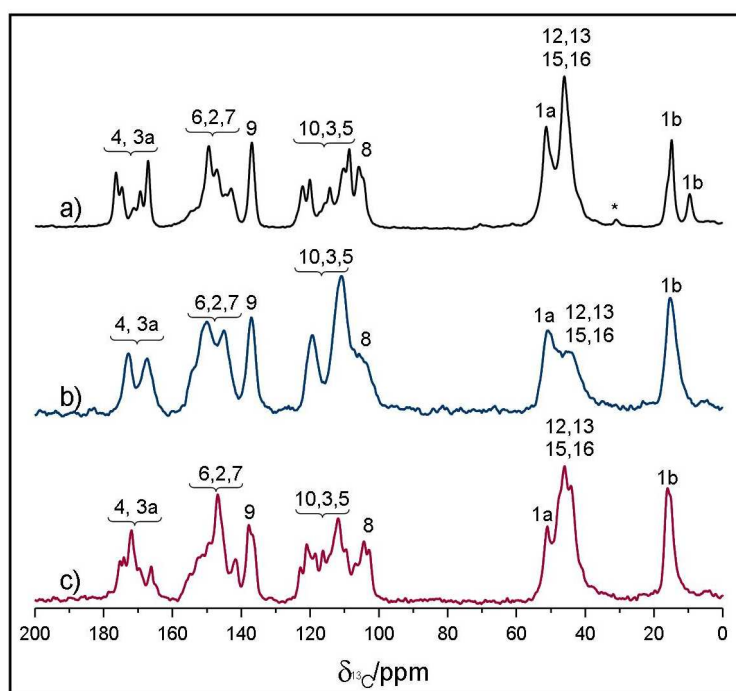


Figura 7.2: Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) NOR, (b) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método I, y (c) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II. Los asteriscos indican bandas rotacionales.

asignaciones se realizaron comparando el espectro en solución y los espectros de edición de carbonos cuaternarios.

La gran similitud entre NOR y CIP hace que sus espectros sean parecidos siendo posible observar el mismo comportamiento: cinco grupos de señales, tres por encima de 100 ppm y dos por debajo de los 60 ppm. De la misma manera que en CIP, cada uno de los grupos pertenece a zonas bien diferenciadas de la molécula. Las señales de los anillos aromáticos y del grupo carboxilo se encuentran a ppm altos mientras que las señales de

resonancia correspondientes a los grupos metilenos del anillo de piperazina y del grupo terpeno se encuentran a ppm bajos.

La multiplicidad observada en el espectro de ^{13}C de NOR muestra claramente la existencia de más de una molécula por celda unidad asimétrica. Las señales de resonancia de los carbonos que muestran desdoblamiento más marcados (C(4), C(3a), C(3), C(1b), C(9) y C(8)) son probablemente los más expuestos a las moléculas vecinas, con su apantallamiento electrónico más afectado con respecto a las moléculas en solución.

Las asignaciones para los espectros de CPMAS de ^{13}C de las sustancias de $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ se realizaron comparándolos con el espectro de ^{13}C de NOR y teniendo en cuenta los espectros de supresión no cuaternaria, que se muestran en la figura 7.3.

Al analizar los espectros de $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ también podemos identificar cinco grupos de señales como en NOR, con multiplicidades debido al acomplejamiento. En el caso de $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método I, las señales se superponen hasta formar resonancias anchas, indicando el carácter parcialmente desordenado del material. El complejo $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II presenta señales más resueltas, mostrando ser menos desordenado que el anterior.

Los espectros de ^{13}C de los complejos no muestran residuos de NOR sin acomplejar. Este hecho está basado en la resonancia a 9.1 ppm en NOR, que desaparece completamente luego del acomplejamiento. La relación señal-ruido del espectro de ^{13}C permite determinar que si hay algún residuo de NOR pura, este es menor al 4 %.

Las señales correspondientes a C(4) y C(3a) muestran claros corrimientos a ppm más bajos, evidenciando la participación de estos núcleos en la coordinación con el aluminio mediante los oxígenos.

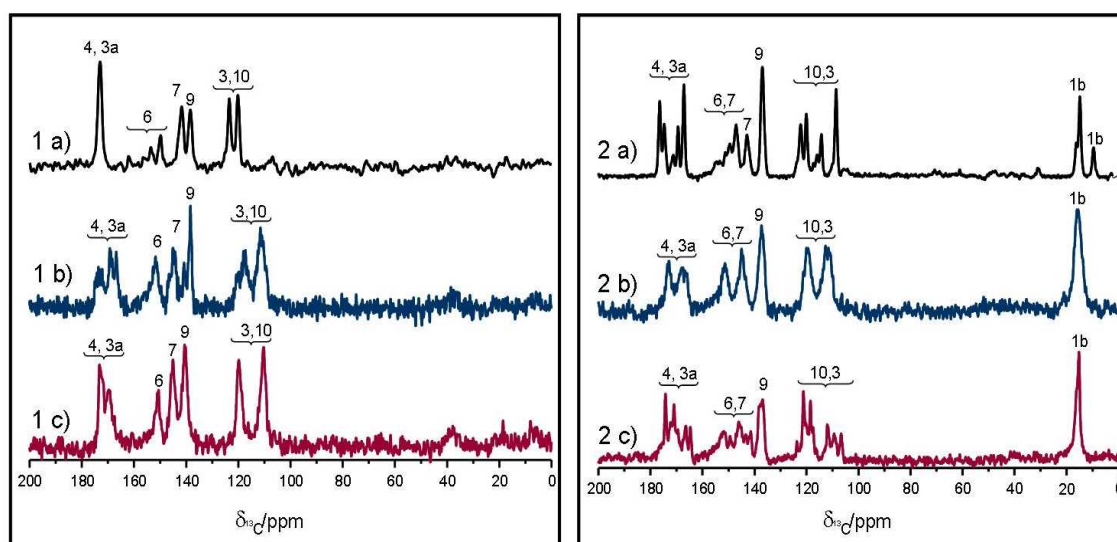


Figura 7.3: Edición de carbonos cuaternarios de:(1a) CIP, (1b) CIP-Al I, (1c) CIP-Al II, (2a) NOR, (2b) NOR-Al I y (2c) NOR-Al II .

Tabla 7.1: *Corrimientos químicos de ^{13}C (en ppm) para CIP, CIP-Al I y CIP-Al II.*

^{13}C	CIP	CIP-Al Método I	CIP-Al Método II
4, 3a	173.2	174.5 173.2 171.0 168.8	173.2 169.5
6	152.8 149.2	155.8 151.9	155.1 155.4
2	143.0	149.0	150.0
7	141.5	145.2	145.9
9	138.0	140.4 138.3	140.7
3,10	123.3 119.8	120.0 118.0 111.5	120.1 110.5
5	115.3	109.7	111.1
8	106.2	103.5	106.5
12,13 15,16	45.6 42.6	44.5	46.3 43.2
1a	35.4	36.9	37.3
1b	7.5	9.3	8.7

Tabla 7.2: *Corrimientos químicos de ^{13}C (en ppm) para NOR, NOR-Al I y NOR-Al II.*

^{13}C	NOR	NOR-Al Método I	NOR-Al Método II
4, 3a	176.6 174.9 171.0 169.1 166.8	173.1 167.6	175.6 174.5 172.3 170.0 166.5
6,7	154.6 152.6 149.0 147.2 142.9	153.9 151.2 145.2	155.3 152.6 149.7 145.8 141.9
2	149.0 144.5	150.0	149.6 147.3
9	137.0	137.5	138.1 137.1
3,10	121.8 119.7 115.4 113.8 108.1	120.0 111.8	123.3 121.3 118.7 116.5 112.0 109.7 107.0
5	110.0	111.0	113.1
8	105.5 104.0	106.0	104.3 103.0
1a	51.4	50.3	51.1
12,13 15,16	46.1	46.0 44.0	47.8 46.1 44.0 41.0
1b	14.4 9.1	15.0	16.3 15.1

7.2. Análisis de Homogeneidad

Los espectros de CPMAS de ^{13}C de los complejos mostraron un alto grado de desorden, hecho que fue respaldado por experimentos de DRXP (ver sección 7.2.2). Este hecho abrió la posibilidad de analizar nuevos aspectos de estos compuestos. Para estudiar esta característica de los complejos fluoroquinolónicos decidimos investigar los tiempos de relajación espín-red en la terna rotante $T_{1\rho^{13}\text{C}}$. Los resultados obtenidos a través de los $T_{1\rho^{13}\text{C}}$ nos dan una idea acerca de la heterogeneidad de las muestras. Los tiempos de relajación en la terna rotante cortos dan una idea de mayor movilidad, lo que está indicando un carácter más desordenado del compuesto.

7.2.1. Tiempo de relajación en la terna rotante $T_{1\rho^{13}\text{C}}$

Los valores de $T_{1\rho^{13}\text{C}}$ para los carbonos de los grupos CH_2 en los complejos de aluminio obtenidos utilizando la secuencia de pulsos especificada en la figura 3.10 se muestran en la tabla 7.3. El decaimiento de la magnetización de ^{13}C como función de τ , $M_C(\tau)$, para estos carbonos en $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ y $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ se muestran en la figura 7.4. En los

Tabla 7.3: Valores de $T_{1\rho}$ para carbonos de los grupos CH_2 .

$T_{1\rho}$	CIP-Al Método I	CIP-Al Método II	NOR-Al Método I	NOR-Al Método II
1a	-	-	340 (50 %) 2900	500 (30 %) 4800
1b	400 (28 %) 4400	1100 (23 %) 7000	-	-
12,13	450 (36 %) 2800	800 (40 %) 4300	320 (34 %) 1800	580 (35 %) 13400
15,16				

gráficos se puede observar un comportamiento bi-exponencial de la magnetización como función del tiempo de *spin-lock* (τ). Este hecho indica que los complejos son materiales heterogéneos con al menos dos fases con diferentes órdenes o movilidades. El decaimiento de la magnetización puede ajustarse con la siguiente ecuación

$$M_C(\tau) = A \exp(-\tau/T_{1\rho_1}) + (1 - A) \exp(-\tau/T_{1\rho_2}) \quad (7.1)$$

En nuestro caso, como la magnetización ha sido normalizada, los valores de A y (1-A) pueden interpretarse directamente como el porcentaje de la muestra con $T_{1\rho_1}$ y $T_{1\rho_2}$ respectivamente. Usualmente, en este tipo de compuestos sólidos, valores cortos de $T_{1\rho}$ corresponden a fases desordenadas.

Las líneas de resonancia de los carbonos pertenecientes a grupos CH o CH_3 que aparecen en el espectro de CPMAS de ^{13}C con 80 μs de tiempo de contacto no muestran un decaimiento apreciable durante el tiempo de *spin-lock*. Este hecho es esperable debido a que el mecanismo que produce la relajación involucra el acople con los campos locales fluctuantes de protones, que requieren la presencia de protones cercanos. En el caso de los

grupos metilos, la rápida rotación a lo largo del enlace C-C promedia el acople dipolar. Puede observarse que los $T_{1\rho}$ de los complejos obtenidos por el Método I son más cortos

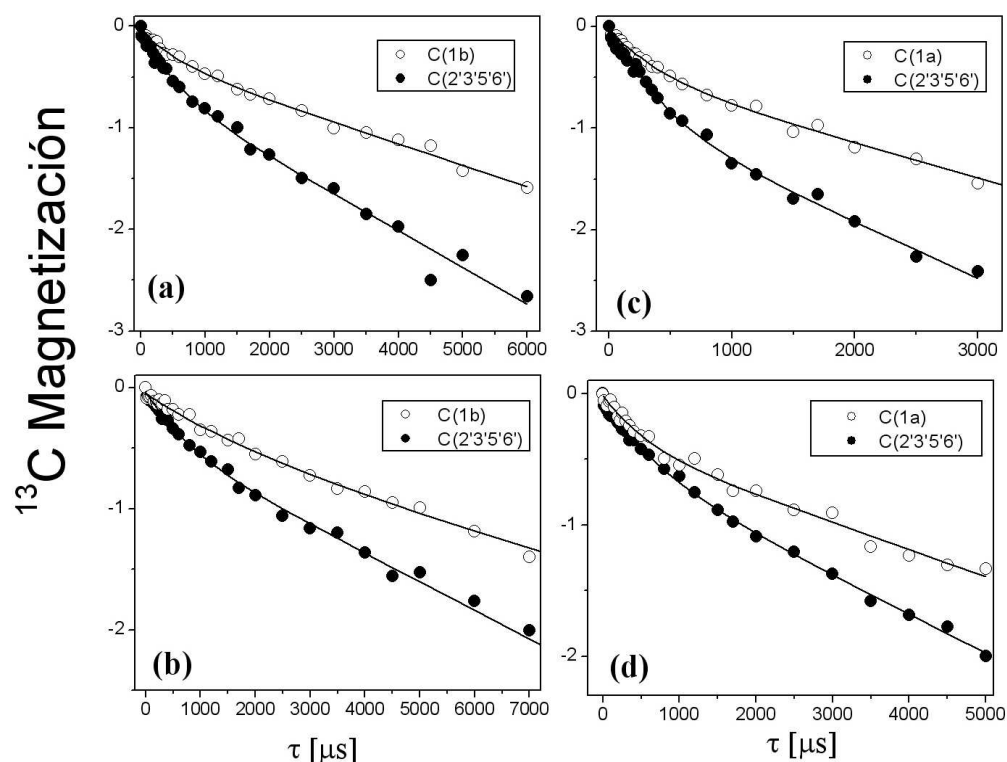


Figura 7.4: Magnetización de ^{13}C en función del tiempo de spin-lock τ para algunos carbonos seleccionados en el experimento de $T_{1\rho}$. Se muestran los ajustes de los datos experimentales de acuerdo a la ecuación 7.1. (a) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método I, (b) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método II, (c) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método I y (d) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II. Los valores obtenidos de los ajustes se muestran en la tabla 7.3.

que los correspondientes a los complejos obtenidos por el Método II. Este hecho puede ser asociado con una cristalinidad mayor en los compuestos elaborados por el Método II. Los valores que se muestran entre paréntesis en la tabla 3.10 son las fracciones correspondientes a los $T_{1\rho}$ cortos. Estos resultados indican que los complejos de NOR son más desordenados que los de CIP, especialmente el elaborado por el Método I.

7.2.2. Patrones de DRXP

Los espectros de DRXP de los complejos fluoroquinolónicos muestran el desorden presente en los compuestos elaborados por los diferentes métodos. La figura 7.5 muestra los

resultados obtenidos para CIP y sus complejos. Claramente se puede observar la diferencia en cristalinidad entre el fármaco puro y los complejos con ^{27}Al . Si bien es notable el carácter desordenado de los complejos, es posible notar rastros de cristalinidad en los complejos elaborados tanto por el Método I como por el Método II.

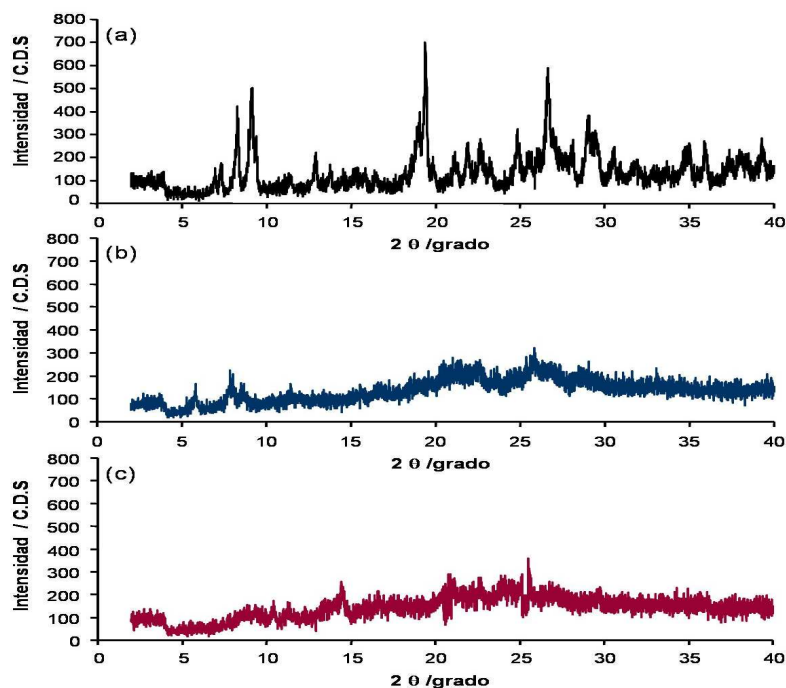


Figura 7.5: Patrones de Difracción de Rayos X de polvo para (a) (HCl.CIP) , (b) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método I y (c) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método II.

Al igual que para la serie de CIP, los resultados de DRXP para NOR y sus complejos muestran el mismo comportamiento. A pesar de esto, los patrones de los complejos (Figura 7.6) muestran menos rastros de cristalinidad que los complejos de CIP.

7.3. Coordinación de ^{27}Al

Una característica relevante para estudiar en estos compuestos es la coordinación del núcleo de ^{27}Al y analizar cómo éste se une con las moléculas del fármaco puro para formar el complejo.

7.3.1. Espectros de ^{27}Al

El núcleo de ^{27}Al es un núcleo cuadrupolar con $I = \frac{5}{2}$. La transición central observada ($\frac{1}{2} \rightarrow -\frac{1}{2}$) es independiente de la interacción cuadrupolar de primer orden; sin embargo, el

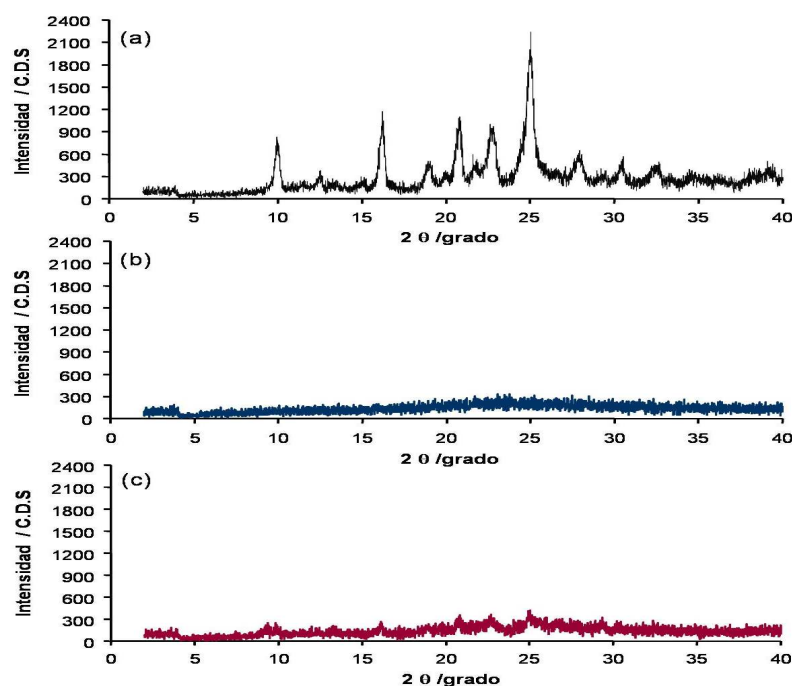


Figura 7.6: Patrones de Difracción de Rayos X de polvo para (a) (HCl.NOR) , (b) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método I y (c) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II.

espectro está sujeto a la interacción cuadrupolar de segundo orden que no es promediada a cero por MAS.

El espectro de RMN con MAS de ^{27}Al es sensible, en nuestro caso particular, a la coordinación de núcleos de aluminio con oxígenos. La mayor distinción que se puede hacer es entre la coordinación octahédrica, que da una señal de resonancia a 0 ppm, y la coordinación tetrahédrica para la cual la señal de resonancia se encuentra en el rango de 50-65 ppm [60].

Se tomaron espectros de ^{27}Al con un campo externo de 7.04 T, lo que corresponde a una frecuencia de Larmor de 78.5 MHz para aluminio y 300.13 MHz para protones. La figura 7.7 muestra los espectros de ^{27}Al para los cuatro complejos. Todos ellos muestran una intensa resonancia alrededor de los 0 ppm, evidenciando la coordinación octahédrica del aluminio. De estos resultados podemos determinar que cada ion de aluminio está coordinado con dos oxígenos de cada una de las tres moléculas de Fluoroquinolonas en todos los complejos. Aun cuando no hay dudas acerca de la coordinación del ion de aluminio, los anchos y formas de las líneas espectrales para las muestras preparadas por los distintos métodos no son idénticas. Las líneas de RMN de ^{27}Al para los complejos preparados por el Método II son claramente más asimétricas que las correspondientes al Método I. La diferencia puede estar originada por la interacción cuadrupolar de segundo orden, que no

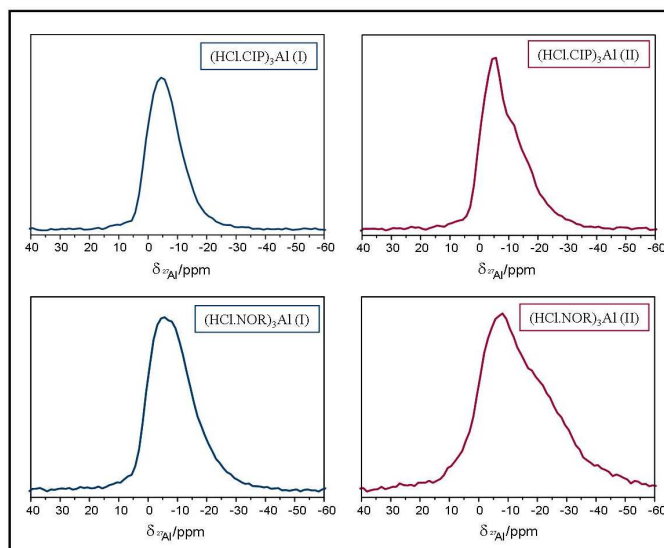


Figura 7.7: Espectros de RMN de ^{27}Al adquiridos en un campo magnético externo de 300 MHz de los complejos $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ y $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ obtenidos por los Métodos I y II.

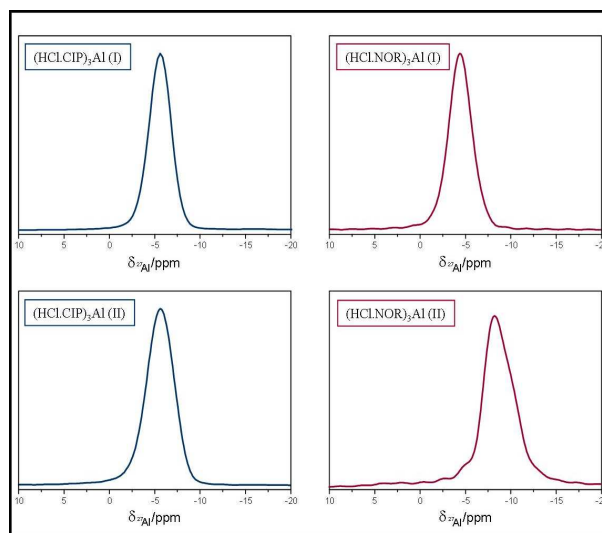


Figura 7.8: Espectros de RMN de estado sólido de ^{27}Al adquiridos en un campo magnético externo de 850 MHz de los complejos $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ y $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ elaborados por los Métodos I y II.

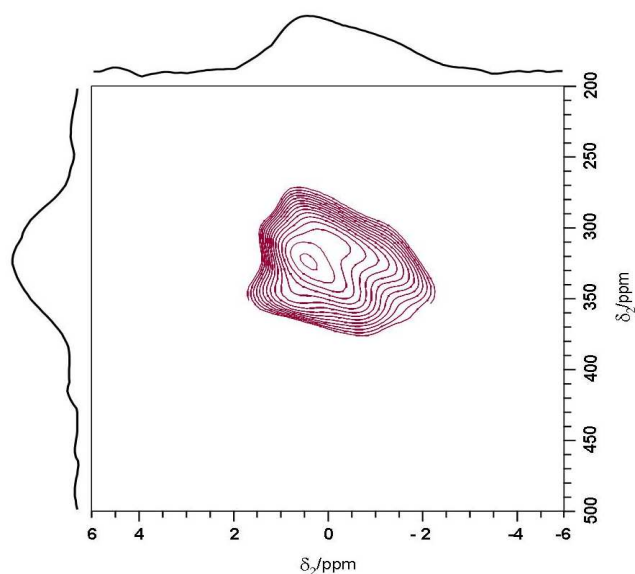


Figura 7.9: Espectro bidimensional de MQMAS de ^{27}Al para NOR-Al Método II.

es promediada a cero sólo con MAS, o por aluminios en sitios no equivalentes.

Para determinar a cual de estas dos posibilidades se debía la forma asimétrica de las líneas, se tomaron espectros a 19.06 T, lo que corresponde a una frecuencia de Larmor para ^{27}Al de 221.52 MHz y 850.13 MHz para protones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.8, donde se puede ver que la forma de las líneas es simétrica para todos los compuestos excepto para $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II. Debemos recordar que el segundo orden de la interacción cuadrupolar es proporcional a la inversa de la frecuencia de Larmor, de esta manera, a medida que aumentamos el campo magnético externo (aumentamos la frecuencia de Larmor), disminuimos la importancia del segundo orden de la interacción cuadrupolar. De esta manera podemos concluir que la forma de las líneas de resonancia obtenidas a campo más bajo es debida a la fuerte interacción cuadrupolar, que se reduce al aumentar el campo magnético externo.

Para $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II realizamos un experimento de MQMAS (Figura 7.9), este experimento permite resolver líneas provenientes de sitios con diferentes entornos para analizar el espectro asimétrico de ^{27}Al obtenido a campo alto. El resultado de dicho experimento, sin embargo, no nos permitió llegar a una conclusión definitiva. No se observan dos sitios bien resueltos, en cambio podremos decir que lo que sucede en este compuesto es que hay una distribución de corrimientos químicos, pero no dos sitios bien distinguibles.

7.4. Espectroscopía Infrarroja (IR)

Para todos los compuestos contamos con información proveniente de experimentos de FTIR [47],[61]. La información que FTIR brinda sobre el estiramiento y la deformación de los modos del ácido carboxílico, el carboxilato y los grupos carbonilos en las series de CIP y NOR es útil para comparar los complejos obtenidos por los distintos métodos y ayuda a la caracterización y determinación de la coordinación con el átomo de aluminio.

7.4.1. Serie de NOR

Varias observaciones pueden hacerse para la serie de NOR en la figura 7.10. La vibración de estiramiento del grupo carboxilo dimérico (ν_{COOH}) de NOR está alrededor de 1712 cm^{-1} , y también está presente en la mezcla física de los compuestos. La banda fuerte a 1626 cm^{-1} puede asignarse a los modos de estiramiento de los anillos aromáticos de las fluoroquinolonas C=C (ν_{CC}) y N=C (ν_{CN}). La banda a 1582 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del 4-C=O. Estas asignaciones están de acuerdo a resultados previamente reportados [62]. En el espectro de (HCl.NOR)₃Al (Método I), la banda correspondiente a la ν_{COOH} desaparece y aparecen dos nuevas bandas a 1527 cm^{-1} y a 1399 cm^{-1} . Estas bandas pueden ser asignadas a los modos de estiramiento del carboxilato antisimétrico ($\nu_{COOH-antisim}$) y simétrico ($\nu_{COOH-sim}$) respectivamente. Además, se observa un corrimiento a número de onda más bajo (de 1582 a 1556 cm^{-1}) en la banda del 4-C=O luego del acomplejamiento, sugiriendo la participación de este grupo en la coordinación con el aluminio.

De acuerdo con los espectros de RMN con MAS de ²⁷Al, dos átomos de oxígeno por molécula de fluoroquinolona están involucrados en la coordinación. Entonces, hay dos posibilidades: un carboxilato monodentado con la participación de un 4-C=O o el carboxilato bidentado sin participación del 4-C=O. El primer caso presentaría una banda $\nu_{COOH-sim}$ entre 1385 y 1402 cm^{-1} y una separación entre $\nu_{COOH-antisim}$ y $\nu_{COOH-sim}$, $\Delta\nu$, cercana a la de la sal alcalina. En el segundo caso, la banda de $\nu_{COOH-sim}$ aparecería a energías altas y la $\Delta\nu$ sería significativamente más chica que la de la sal alcalina. De acuerdo con nuestros resultados, el espectro de (HCl.NOR)₃Al (Método I) muestra una $\nu_{COOH-sim}$ de acuerdo con el carboxilato monodentado y $\Delta\nu = 128\text{ cm}^{-1}$, cercano a la de NOR-Na ($\Delta\nu = 135\text{ cm}^{-1}$), ver figura 7.10. Esto sugiere que el grupo 4-C=O y un átomo de oxígeno están coordinados directamente con el aluminio. Evidencia adicional de la participación del grupo 4-C=O puede extraerse de la región de deformación de la cetona ($1200-1350\text{ cm}^{-1}$) y de la deformación fuera del plano del carbonilo con bandas alrededor de $700-750\text{ cm}^{-1}$, ver figura 7.10.

El espectro de IR correspondiente al complejo (HCl.NOR)₃Al obtenido por el Método II no muestra diferencias con el obtenido por el Método I.

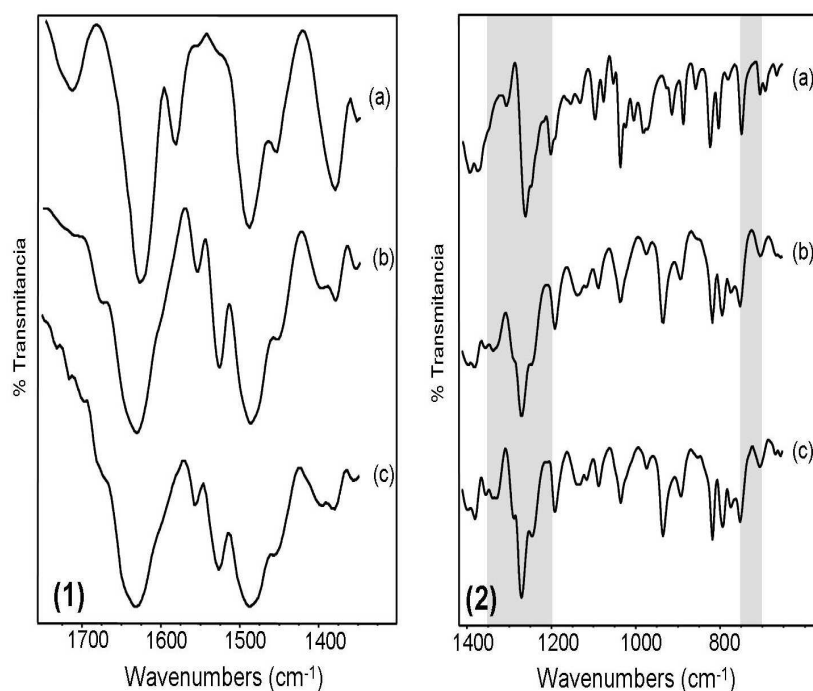


Figura 7.10: (1) Espectro de FTIR de la serie de NOR mostrando el modo de estiramiento del carboxilo en: (a) NOR, y los modos de estiramiento del carboxilato antisimétrico y simétrico en: (b) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método I, y (c) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II. (2) Espectro de IR de la serie de NOR mostrando la región de deformación del 4-CO ($1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$) y el modo de deformación fuera del plano ($700\text{-}750\text{ cm}^{-1}$) en: (a) NOR, (b) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método I, y (c) $(\text{HCl.NOR})_3\text{Al}$ Método II.

7.4.2. Serie de CIP

La CIP pura cristaliza como un zwitterión y la banda ν_{COOH} no está presente [53]. En los espectros de $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ y la mezcla física, dicha banda se observa a 1709 cm^{-1} (ver figura 7.11). La banda fuerte a 1625 cm^{-1} en (HCl.CIP) (también observada entre 1633 y 1617 cm^{-1} en el resto de la serie) puede asignarse a las vibraciones de estiramiento $\text{C}=\text{C}$ y $\text{N}=\text{C}$ de los anillos aromáticos (ν_{CC} y ν_{CN}). La banda del 4-C=O se observa como un hombro a 1611 cm^{-1} en (HCl.CIP) . Estas asignaciones están de acuerdo a resultados previamente reportados [62]. Como se observó en los complejos de aluminio de NOR, el espectro de $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ (Método I) no muestra la banda correspondiente a ν_{COOH} . En el espectro de CIP-Na, la banda $\nu_{\text{COOH-antisim}}$ es observada a 1587 cm^{-1} y $\nu_{\text{COOH-sim}}$ está presente como una banda fuerte a 1456 cm^{-1} . En la figura 7.11, el espectro del complejo $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ (Método I) muestra varias bandas en las regiones para $\nu_{\text{COOH-sim}}$ haciendo que la identificación de esta banda no sea tan sencilla. Sin embargo, la figura 7.11 muestra las modificaciones de la región de deformación de la cetona ($1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$) y

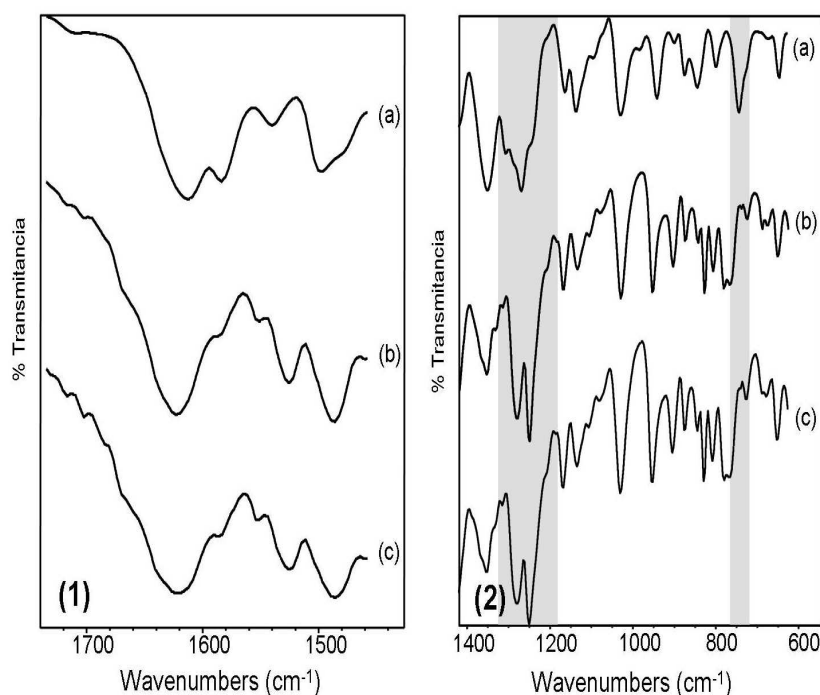


Figura 7.11: (1) Espectro de FTIR de la serie de CIP mostrando el modo de estiramiento del carboxilato antisimétrico en: (a) CIP, (b) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método I y (c) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método II. (2) Espectro de IR de la serie de NOR mostrando la región de deformación del 4-CO ($1200\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$) y el modo de deformación fuera del plano ($700\text{-}750\text{ cm}^{-1}$) en: (a) CIP, (b) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método I, y (c) $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ Método II.

de la deformación fuera del plano del carbonilo con bandas alrededor de $700\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ en $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$. Estos hechos sugieren la participación del grupo 4-C=O en la coordinación con aluminio de la misma manera que fue observado para los complejos de NOR.

Basándonos en las similitudes estructurales entre CIP y NOR y los resultados obtenidos por RMN de ^{27}Al , no se esperan diferencias en el tipo de coordinación.

El espectro correspondiente a $(\text{HCl.CIP})_3\text{Al}$ (Método II) no muestra diferencias con el obtenido para el Método I. De las figuras 7.10 y 7.11 surge que se produce una reacción parcial entre las Fluoroquinolonas (NOR y CIP) y el cloruro de aluminio cuando ambos compuestos son mezclados físicamente (NOR-MF y CIP-MF).

Es evidente que no sólo las bandas características de NOR (o CIP) se observan en la mezcla física. Por ejemplo, la banda a 1525 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento del carboxilato antisimétrico que está ausente en el fármaco puro es claramente visible en el espectro de NOR-MF. Este comportamiento puede explicarse por la alta constante de asociación y el medio de reacción provista por el agua de hidratación de la sal de aluminio.

7.5. Discusión y conclusiones

Los experimentos realizados permitieron analizar en profundidad los complejos de Fluoroquinolonas con aluminio. Los espectros de ^{13}C de estado sólido mostraron que los corrimientos químicos de los complejos preparados por los Métodos I y II tienen similitudes y muestran el mismo comportamiento.

El análisis de los tiempos de relajación espín-red en la terna rotante $T_{1\rho}$ permitió determinar que los complejos de NOR y CIP producidos por ambos métodos son sistemas físicamente heterogéneos. Los ($T_{1\rho}$) de los cuatro compuestos muestran la coexistencia de al menos dos fases con diferentes movilidades, una asociada con una fase más ordenada y la otra a una fase más desordenada. También se pudo determinar que los complejos elaborados por el Método II son más cristalinos que los elaborados con el método I.

De los experimentos de RMN y de FTIR podemos concluir que la reacción entre las FQs y el aluminio es completa. En todos los complejos, los mismos átomos son los involucrados en el acomplejamiento. En particular, de los espectros de RMN de ^{27}Al se observó una coordinación octahédrica del ion de aluminio en todos los complejos y los espectros de FTIR muestran que la coordinación del aluminio es a través del grupo 4-CO y del sistema 3-carboxílico. Estas observaciones indican que los compuestos obtenidos por el Método I y el Método II son químicamente los mismos.

Las diferencias observadas en los espectros de RMN de estado sólido de ^{13}C y ^{27}Al se deben a la diferencia en la interacción cuadrupolar de segundo orden presente en los compuestos, y también probablemente a pequeños cambios en la conformación molecular.

Capítulo 8

Sacarinatos Fluoroquinolónicos

Como mencionamos en el capítulo anterior, desde la introducción del Ácido Nalidíxico (NaH) [51] en la práctica clínica a comienzos de 1960 se han desarrollado un gran número de agentes antibacterianos derivados del mismo [51].

Como también señalamos previamente, entre los inconvenientes que presentan los AM-FQs (ver sección 6.1) vinculados a su formulación farmacéutica se destacan su baja solubilidad acuosa y propiedades organolépticas desfavorables (sabor amargo) ([63], [64], [65], [2], [66], [67]). Estas características han limitado sus posibilidades de formulación para su uso en terapéutica humana y son además causa de poca aceptación en los animales de producción, lo que limita críticamente su uso.

Cuando es necesaria la preparación de una forma de dosificación que contiene un fármaco que presenta un sabor particularmente desagradable, se recurre a diferentes estrategias para enmascarar estas características desfavorables, por ejemplo el recubrimiento con distintas sustancias la fijación en resinas de intercambio iónico, la microencapsulación y el acomplejamiento con ciclodextrinas.

En el caso de fármacos con grupos ionizables, la formación de sales es uno de los recursos mas utilizados, ya que se pueden obtener derivados con propiedades mejoradas. Entre los agentes salificantes de uso farmacéutico puede mencionarse a la sacarina (SAC), un endulzante artificial. Hay ejemplos, donde sales de sacarina con diferentes fármacos han demostrado propiedades ventajosas [68].

Se ha descrito que la coordinación química del anión sacarinato, obtenido por deprotonación del grupo NH, es muy interesante y versátil tomando en cuenta que ofrece diferentes sitios de coordinación para centros metálicos.

Varios trabajos mostraron que los derivados de SAC, ya sea como sales o co-cristales, muestran una mejor solubilidad [69]. También, se ha propuesto que estos derivados poseen propiedades organolépticas mejoradas [68].

Continuando con el estudio de compuestos de interés farmacéutico, en esta parte de la tesis centramos nuestra investigación en una nueva serie de Sacarinatos Fluoroquinolónicos (Sección 6.1.2)

8.1. Caracterización de los Sacarinos

8.1.1. Espectros de CPMAS de ^{13}C

Para la serie de Sacarinos Fluoroquinolónicos (FQ-SACs) realizamos experimentos de CPMAS de ^{13}C utilizando la secuencia de pulsos detallada en la sección 3.6 y con los parámetros especificados en la sección A.2.1.

Los corrimientos químicos de ^{13}C para SAC, las FQs y los sacarinos de FQs se muestran en la Tabla 8.1 y la numeración está de acuerdo con la figura 6.2.

Para asignar los corrimientos químicos de SAC, comparamos el espectro en estado sólido (ver figura 8.1) con el espectro en solución que se muestra en la referencia [70]. Tuvimos en cuenta además, el espectro de NQS que se muestra en la figura 8.1. Para cada una de las muestras de la serie, el proceso de asignación de las señales de ^{13}C se realizó en forma similar.

La asignación de las señales de resonancia para los espectros de CPMAS de ^{13}C de los compuestos farmacéuticos puros se realizó de la siguiente manera. Para los espectros de CIP (figura 8.2) y NOR (figura 8.3) se utilizaron las asignaciones obtenidas anteriormente (Sección 7.1). En el caso de ENR y OFL, se tuvieron en cuenta los resultados de los espectros de NQS y se compararon los espectros con los de CIP y NOR. Para corroborar las asignaciones en estos casos se utilizaron simulaciones de espectros en solución obtenidos mediante un software comercial (ACD Labs). Las asignaciones para los espectros de ^{13}C de los sacarinos se realizaron comparando con los espectros de los fármacos puros y la sacarina.

Los espectros de ^{13}C de los sacarinos muestran líneas angostas, lo cual indica un alto grado de cristalinidad, aspecto confirmado por los resultados obtenidos mediante DRXP, como veremos más adelante.

A continuación analizaremos por separado cada uno de las sustancias y luego su correspondiente sacarino.

Sacarina

En la figura 8.1 se presentan los espectros de CPMAS de ^{13}C de la sacarina. Los carbonos no cuaternarios de SAC (C(24), C(27) y C(25), C(26)) se encuentran superpuestos a 122.4 ppm y 135.6 ppm respectivamente. Sin embargo, en la mayoría de los sacarinos estas señales aparecen bien resueltas y con gran intensidad. Esto puede ser debido a la gran cristalinidad y orden que muestran estos compuestos. Además, en todas las FQ-SACs se observa un corrimiento a ppm más altos del carbono C(29) tras la formación de la sal (tabla 8.1).

Tabla 8.1: Corrimientos químicos de ^{13}C (en ppm) obtenidos de los espectros de CPMAS de SAC, las FQs y las FQ-SACs.

^{13}C	SAC	CIP	SAC-CIP	NOR	NOR-SAC	OFL	OFL-SAC	ENR	ENR-SAC
4	-	173.2	174.8 174.0 172.5 171.1 166.5 164.2	176.5	175.0	175.3	174.7	173.8	173.9
3a	-	173.2	Idem 4	167.1	167.4	166.1	166.4	163.5	165.7
6	-	152.8 149.2	151.4 152.7 154.7 156.4	155.0 151.5	154.6 151.1	160.2 156.9	157.7 154.5	156.5 153.0	155.4 151.8
2	-	143.0	146.6	149.5	149.1	146.3	146.7	146.0	147.6
7	-	141.5	144.4 143.0	147.1	144.8	133.0	133.5	146.7	143.3
9	-	138.0	138.7 138.0	136.9	136.6	124.7	124.5	138.8	138.4
10	-	123.3 119.8	117.2 105.4	120.0	117.7	122.1	119.4	115.2	118.2
3	-	Idem 10	Idem 10	108.6	106.1	106.9	105.6	105.4	104.8
5	-	115.3	111.7	110.2	109.4	104.1	103.3	108.0	110.7
8	-	106.2	108.0 105.4	106.0	104.1	144.3	145.4	104.5	106.0
12,13 15,16	-	45.6 42.6	46.2 42.5	46.1	45.4 43.3	Idem 1a	Idem 1a	Idem 14a	Idem 14a
1a	-	35.4	36.0 36.6	51.4	49.0	55.7	55.3 54.6 53.7	36.0	37.8
1b	-	7.5	11.0 7.6	15.0	14.1	68.6	69.3 67.7	8.8 7.8	8.6
1c	-	Idem 1b	Idem 1b	-	-	20.0	20.4 19.5	Idem 1b	Idem 1b
14a	-	-	-	-	-	47.3	43.4	53.1	52.8 50.9 49.5 45.8
14b	-	-	-	-	-	-	-	14.5	10.3
29	164.0	-	Idem 4	-	173.0	-	172.8	-	173.4
23	138.8	-	135.5 132.6	-	142.1	-	140.0	-	141.7
25,26	135.7	-	134.3 132.6 134.6	-	133.2 132.4	-	133.5 130.8	-	133.8
28	126.6	-	-	-	130.3	-	130.8	-	130.9
24,27	120.2	-	125.0 123.7 122.7 121.6 120.3	-	121.6	-	124.5 119.4	-	122.0 119.7

Es de destacar que, la señal perteneciente al carbono C(28) de sacarina al formar los sacarinatos se corre mucho de su posición original, lo que hace difícil la individualización de ésta señal particularmente en SAC-CIP.

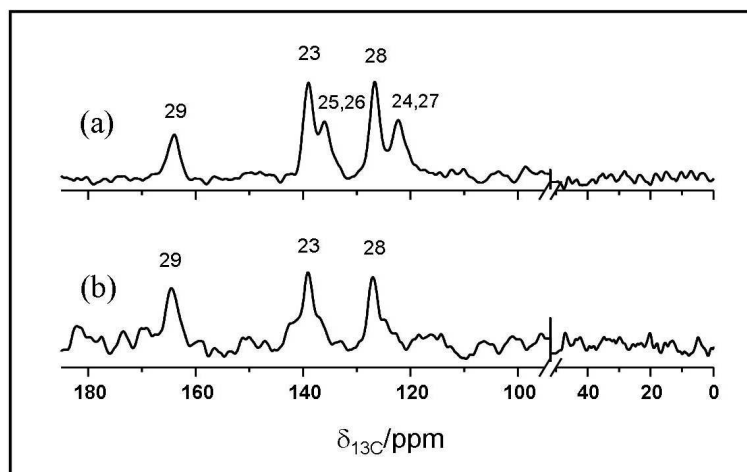


Figura 8.1: (a) Espectro de CPMAS de ^{13}C de SAC y (b) Espectro de Supresión No Cuaternaria de SAC.

Sacarinato de Ciprofloxacina (SAC-CIP)

En la figura 8.2 podemos observar los espectros de CPMAS de ^{13}C junto con los espectros de edición de carbonos cuaternarios obtenidos con la secuencia de NQS para CIP y su sacarinato (SAC-CIP).

Como rasgos distintivos podemos señalar que la resonancia correspondiente al carbono C(3) se corre a ppm más alto respecto del valor del corrimiento químico en solución, de 109.5 ppm a 123.3 ppm. Como consecuencia de esto, las señales correspondientes a C(3) y C(10) se acercan en el espectro de CPMAS y se hace difícil la asignación de las mismas.

Si analizamos el espectro de CPMAS de ^{13}C de SAC-CIP (figura 8.2 (b)), podemos ver una multiplicidad que no se observa en CIP o SAC, es por este motivo que las asignaciones se realizaron por grupos de señales. El doblete que se observa para la señal correspondiente al carbono C(6) y la resonancia ancha para C(7) están ocasionados por el acople con el núcleo de ^{19}F . La multiplicidad observada para el doblete correspondiente a C(6) nos permite afirmar que hay más de una molécula en la celda unidad asimétrica.

El espectro de SAC-CIP y su correspondiente espectro de NQS se muestra en la figura 8.2 (c) y (d). El sacarinato presenta líneas más angostas que CIP, mostrando el alto grado de cristalinidad y orden presente en este compuesto. Estos resultados están de acuerdo con los datos obtenidos mediante DRXP, como veremos en la sección 8.1.2.

Asimismo, del análisis de la Fig. 8.2 podemos determinar que el espectro de SAC-CIP no es la suma de la fluoroquinolona y la sacarina. Este hecho no es de menor importancia ya que demuestra que CIP y SAC reaccionan para formar la sal correspondiente. Esta

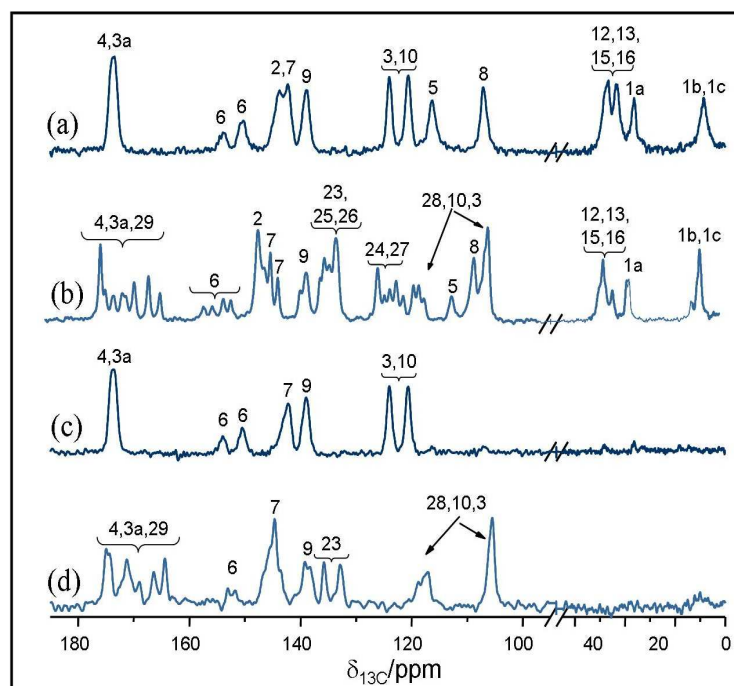


Figura 8.2: Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) CIP, (b) SAC-CIP. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) CIP y (d) SAC-CIP.

conclusión se basa en la presencia de nuevas señales a 163.9 ppm y 105.0 ppm en el sacarinato que no se observan en ninguno de los compuestos que lo originan.

Además, no se observan residuos de los precursores. Podemos realizar esta afirmación observando las resonancias que se encuentran a 173.0 ppm en CIP y a 164.4 ppm en SAC que no se observan en SAC-CIP. La relación señal-ruido del espectro de CPMAS de ^{13}C nos permite determinar que si hay algún residuo, ya sea del fármaco puro o de la sacarina, éste es menor al 4 %. de esta manera podemos afirmar que todas las moléculas de SAC reaccionaron con las de CIP para formar el sacarinato SAC-CIP.

Notemos también que las resonancias pertenecientes a los carbonos C(3a) y C(4) en CIP, se separan en SAC-CIP. La posición de C(3a) a 163.9 ppm en SAC-CIP indica que el grupo COOH no está cargado negativamente. Los corrimientos de las señales C(3) y C(10) en el sacarinato se observan claramente en el espectro de NQS. Estos corrimientos pueden deberse a cambios en las interacciones π - π que involucran a estos carbonos (ver capítulo 9).

Sacarinato de Norfloxacin (SAC-NOR)

Los espectros de CPMAS de ^{13}C y NQS de NOR y de su sacarinato se muestran en la figura 8.3. Con respecto a NOR, es remarcable el hecho de que si comparamos el obtenido en estos experimentos con el obtenido para el compuesto farmacéutico puro en la Sección

7.1 donde estudiamos los complejos con aluminio, se puede ver que este espectro actual no muestra la misma multiplicidad en las señales (Tabla 8.1). En particular, NOR puede encontrarse en diferentes formas hidratadas: dihidrato, sesquihidrato y anhidra [71]. De esta manera, las diferencias en la multiplicidad de las líneas de resonancia entre ambos espectros puede atribuirse a diferencias en el grado de hidratación de la materia prima (NOR) utilizada para la síntesis de los complejos con aluminio y la utilizada para la síntesis de los sacarinos.

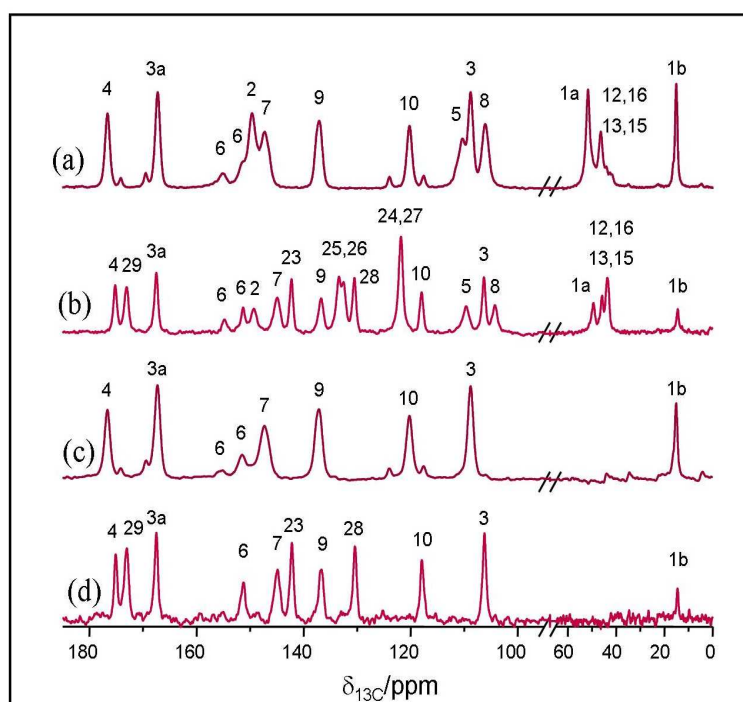


Figura 8.3: Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) NOR, (b) SAC-NOR. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) NOR y (d) SAC-NOR.

Podemos ver que tanto NOR como su sacarinato muestran un alto grado de cristalinidad y se confirma por los resultados obtenidos por DRXP (ver sección 8.1.2). Nuevamente, estamos interesados en ver si el fármaco y la sacarina reaccionan para formar de la sal correspondiente. La multiplicidad de las señales de los ^{13}C del anillo piperazina (C(12), C(13), C(15) y C(16)) en SAC-NOR indica que el producto final no es la mezcla física de SAC y NOR. También, podemos observar que en el sacarinato no se encuentran residuos de sus precursores. Por ejemplo, podemos observar que las señales a 176.5 ppm de NOR y a 164.0 ppm de SAC desaparecen en SAC-NOR. La parte de la molécula de NOR involucrada en la formación de la sal muestra modificaciones en el espectro de SAC-NOR, en especial los carbonos pertenecientes al anillo piperazina, que se encuentran mejor resueltos y presentan líneas más angostas.

Sacrinato de Ofloxacina (SAC-OFL)

Los resultados obtenidos de los experimentos de CPMAS de ^{13}C y NQS para OFL y su sacrinato se muestran en la figura 8.4.

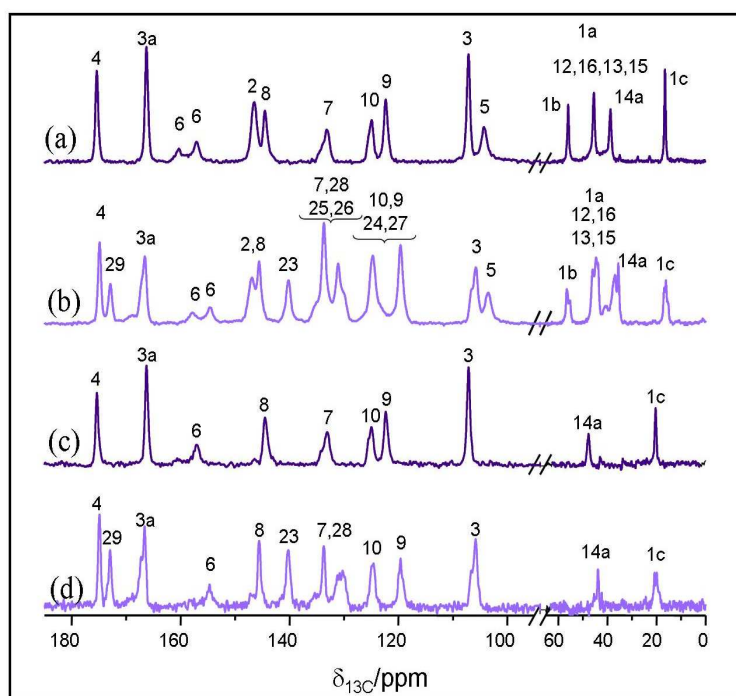


Figura 8.4: Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) OFL, (b) SAC-OFL. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) OFL y (d) SAC-OFL.

En el espectro de CPMAS de ^{13}C se aprecia, al igual que para las otras FQs, grupos de señales: un grupo por encima de 100 ppm y otro por debajo de 60 ppm.

De la multiplicidad de las señales que se encuentran por debajo de 60 ppm en el espectro del sacrinato podemos afirmar que el producto final no es la mezcla física (o la suma) de sus componentes (SAC y OFL). Además, la ausencia de los precursores puede ser determinada por las ausencias de las resonancias a 122.3 ppm de OFL y 164.0 de SAC.

La parte de la molécula que interviene en la formación de SAC-OFL, el anillo piperazina y el carbono C(14a), muestra modificaciones en el espectro del sacrinato comparado con el espectro del fármaco puro. La multiplicidad de las señales correspondientes a C(1b) y C(1c) evidencian la existencia de más de una molécula por celda asimétrica en SAC-OFL.

Sacrinato de Enrofloxacin (SAC-ENR)

Los espectros de CPMAS de ^{13}C y NQS de ENR y su sacrinato se muestran en la figura 8.5. Como en los compuestos anteriores, en este caso también es evidente el grado

de cristalinidad de los compuestos. Como se observó para OFL, la multiplicidad en las señales por debajo de 70 ppm indica que el sacarinato no es la suma de sus precursores. Podemos determinar que no hay residuos de SAC o ENR observando las señales que se encuentran a 14.6 ppm en ENR y a 128 ppm en SAC que desaparecen con la formación de la sal.

Como ocurre para NOR y OFL, ENR también muestra modificaciones en las señales de los carbonos que participan en la formación del sacarinato (el anillo piperazina, C(14a) y C(14b)). Estas señales presentan desdoblamiento y corrimientos. Una particularidad de este sacarinos es que la señal correspondiente al carbono C(3a) muestra un corrimiento a ppm más alto luego de la formación de la sal. Este hecho se debe a un cambio en la interacción puente hidrógeno que involucra al grupo carboxilo, como se deduce de los experimentos de IR (Sección IR).

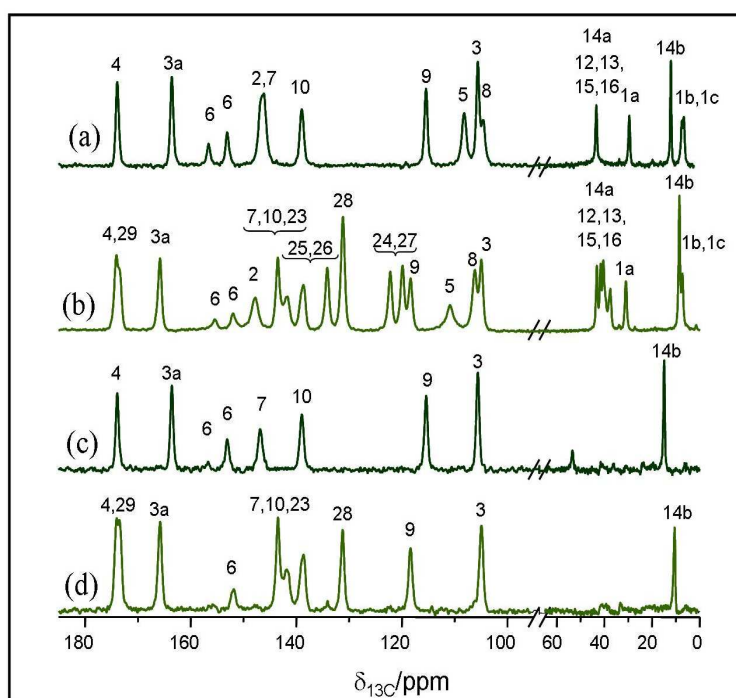


Figura 8.5: Espectros de CPMAS de ^{13}C de: (a) ENR, (b) SAC-ENR. Espectro de Supresión No Cuaternaria de: (c) ENR y (d) SAC-ENR.

Además, se aprecia claramente un corrimiento a ppm más altos del carbonilo C(29) luego de la formación de la sal en todas las FQ-SACs (ver tabla 8.1), excepto en SAC-CIP, donde el C(29) aparece como un multiplete junto a las señales C(4) y C(3a). La señal perteneciente al carbono C(28) se corre mucho de su posición original, este hecho hace difícil la individualización de esta señal (C(29)) en SAC-CIP. El corrimiento de C(29) en las FQ-SACs puede ser atribuido a la formación de la sal, de acuerdo a los resultados obtenidos por IR (Sección 8.1.4)

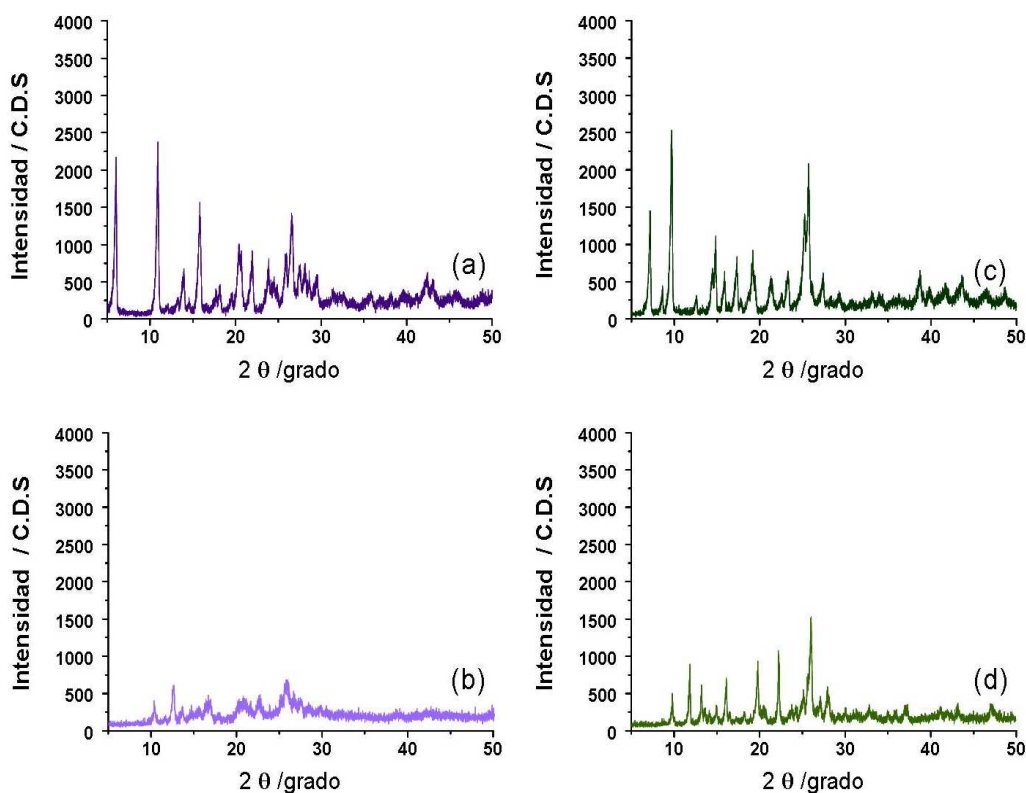


Figura 8.6: Patrones de difracción de rayos X de polvo de (a) OFL, (b) SAC-OFL, (c) ENR y (d) SAC-ENR.

8.1.2. Difracción de Rayos-X de Polvo

A fin de complementar los resultados previamente descritos, se efectuaron experimentos de DRXP ([47],[72]).

En particular, pueden observarse nuevas reflexiones, así como la ausencia de las reflexiones características de SAC y las FQs en las FQ-SACs, en cantidades detectables por esta técnica. En la figura 8.6 se muestran los resultados obtenidos de DRXP para OFL, ENR y sus correspondientes sacarinatos. Los resultados obtenidos de los experimentos de DRXP concuerdan con lo observado por RMN de estado sólido. Una discusión más detallada de los datos obtenidos por DRXP se encuentra en la referencia [47].

8.1.3. Métodos Térmicos de Análisis

El comportamiento térmico de los FQ-SACs fue estudiado mediante TGA y DSC [47],[72], en el rango de temperatura de 25-500 °C. Los termogramas para OFL, ENR y sus respectivos sacarinatos se muestran en las figuras 8.7. Analicemos el caso de SAC-CIP. SAC-CIP muestra un comportamiento diferente al de sus precursores. No se observa

pérdida de masa cuando el compuesto SAC-CIP se calienta de 25 °C hasta su fusión indicando la naturaleza anhidra del compuesto así también como la ausencia de SAC sin reaccionar, resultado que concuerda con lo observado por DRXP y por RMN de estado sólido. Comportamientos similares se observaron para el resto de los sacarinatos.

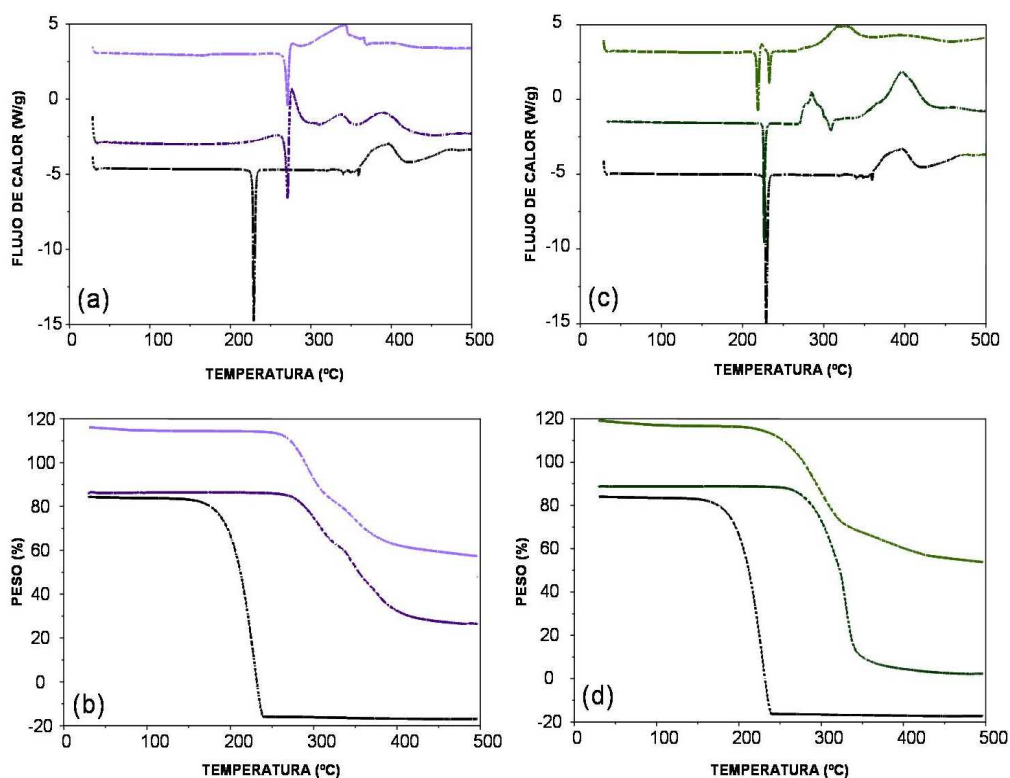


Figura 8.7: Curvas de DSC y TG para (a) DSC para OFL (violeta), SAC-OFL (lila) y SAC (negro), (b) TG para OFL (violeta), SAC-OFL (lila) y SAC (negro), (c) DSC para ENR (verde oscuro), SAC-ENR (verde claro) y SAC (negro) y (d) TG para ENR (verde oscuro), SAC-ENR (verde claro) y SAC (negro).

8.1.4. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Las señales más características de los espectros de FTIR de las FQ-SACs se muestran en la Tabla 8.2. La interacción entre SAC y cada una de las FQs se evidencia a partir de las bandas correspondientes al estiramiento N(21)-H y C(29)-O situadas a 3094 cm^{-1} y 1719 cm^{-1} . La ausencia de la banda de N(21)-H y el corrimiento batocrómico de C(29)-O confirman la formación de la sal por transferencia del protón de la amida de SAC a la FQ.

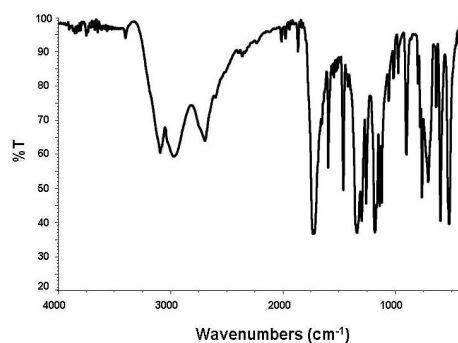


Figura 8.8: Espectro de FTIR de SAC.

Estos resultados están de acuerdo con estudios previamente publicados para compuestos similares [68].

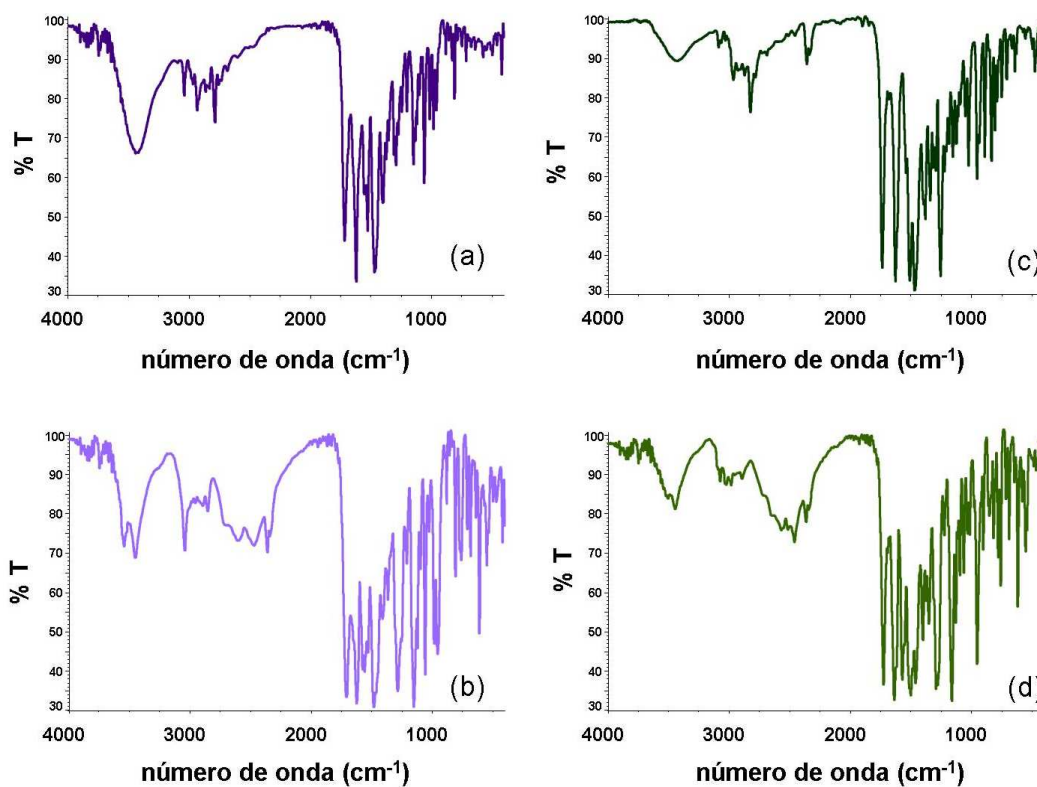


Figura 8.9: Espectros de FTIR de: (a) OFL, (b) SAC-OFL, (c) ENR y (d) SAC-ENR.

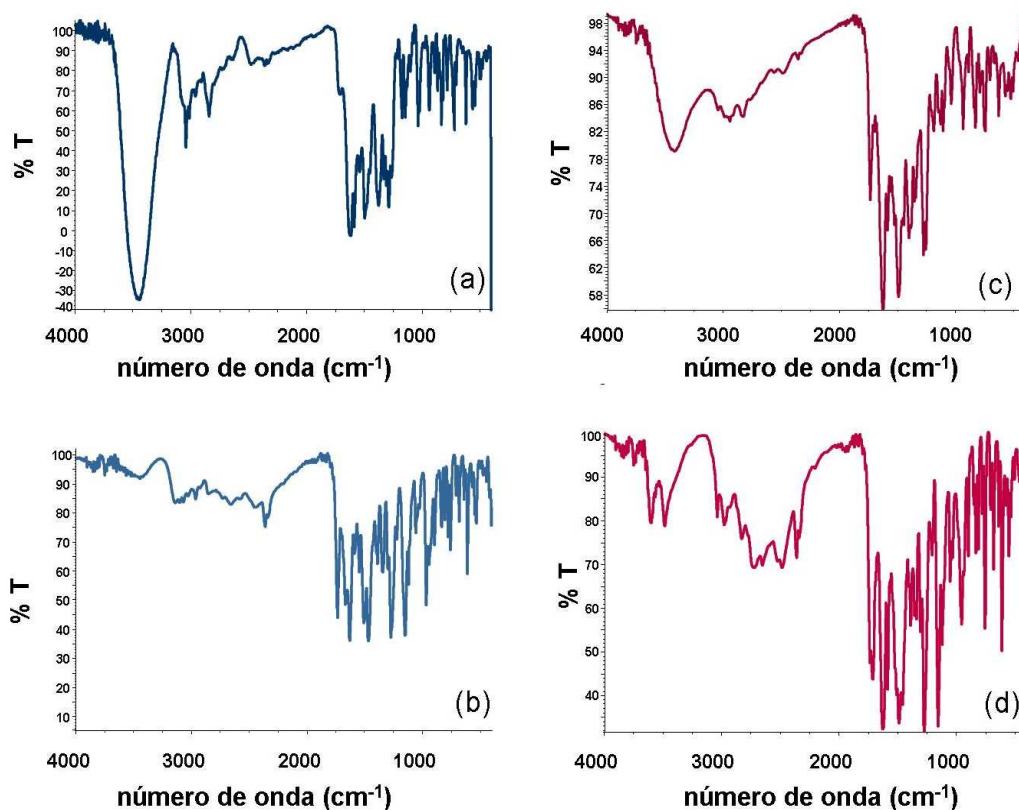


Figura 8.10: Espectros de FTIR de: (a) CIP, (b) SAC-CIP, (c) NOR y (d) SAC-NOR.

Tabla 8.2: Datos de FTIR para las FQs, SAC y las FQ-SACs. np, no presenta. * en la sal sódica

Grupo	SAC	CIP	SAC-CIP	NOR	SAC-NOR	OFL	SAC-OFL	ENR	SAC-ENR
ν C-H Olefinicos y aromáticos	-	3046	3027	3048	3038	3044	3044	3034	3022
ν C(3)=OOH	-	np	1734	1732	1732	1716	1706	1736	1720
ν C(4)=O <i>ceto</i>	-	1627	1630	1625	1625	1620	1624	1627	1629
νt C(29)=ONH	1725	-	-	-	-	-	-	-	-
νt C(29)=ON ⁻	1647*	1666	-	1711	-	1706	-	1720	-
νf CON(21)=H	3039	-	-	-	-	-	-	-	-
ν_{sym} S(22)=O	1180	-	1148	-	1153	-	1149	-	1155
ν_{sym} S(22)=O	1338	-	1338	-	1270	-	1282	-	1341

La diferencia en las interacciones de puente hidrógeno de las FQ-SACs y los reactantes cristalinos (SAC y FQs), llevan a cambios significativos en los espectros de FTIR, como se muestra en la figura 8.9. Comparando los espectros de SAC (Figura 8.8) y FQ-SACs

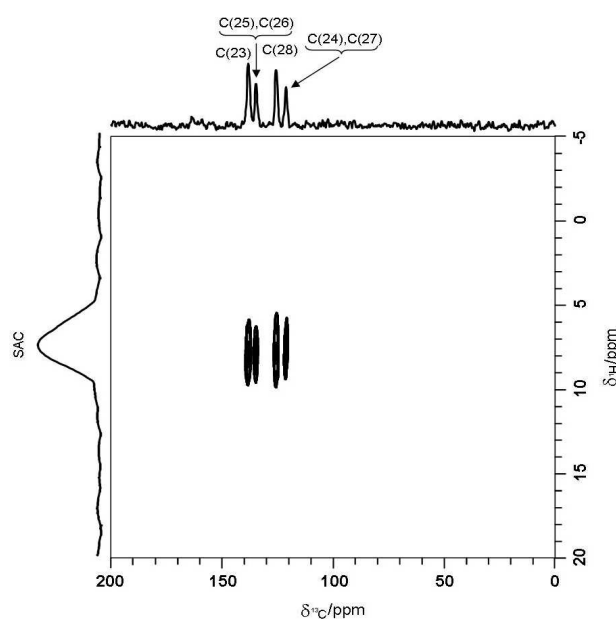


Figura 8.11: Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de SAC.

podemos ver un corrimiento batocrómico del pico de S(22)–O que relaciona la interacción puente hidrógeno en sus estructuras cristalinas.

8.2. Espectroscopía de Correlación en Estado Sólido

Los espectros de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C en estado sólido fueron realizados con el objetivo de obtener espectros de alta resolución de ^1H y además para lograr una correcta asignación de determinadas señales en los espectros de CPMAS de ^{13}C tanto de las FQs como de las FQ-SACs. Para realizar estos experimentos utilizamos la secuencia de pulsos que se muestra en la figura 4.1 con los parámetros especificados en la sección A.2.7.

En las proyecciones de los espectros de ^{13}C no se observan todas las señales que es posible observar en un espectro de CPMAS de ^{13}C convencional. Esto se debe al tiempo de contacto corto que se utiliza en este experimento. Esto hace que sólo los carbonos que poseen ^1H directamente ligados sean observados.

En general, en los compuestos estudiados, todos los espectros bidimensionales muestran correlaciones claras y bien resueltas entre los carbonos y sus protones ligados o vecinos. Estas correlaciones ^1H - ^{13}C permitieron realizar la asignación tentativa para los espectros de ^1H . La Tabla 8.3 muestra los corrimientos químicos de ^1H para SAC, las FQs y las FQ-SACs. Estos valores fueron extraídos de los niveles más altos de cada correlación en el espectro de HETCOR-FSLG bidimensional. No se han consignado los valores de los corrimientos químicos para los NH^+ ya que los mismos no son observados en estos experi-

mentos. Recordemos que los ^1H observados con aquellos asociados a carbonos. La posición

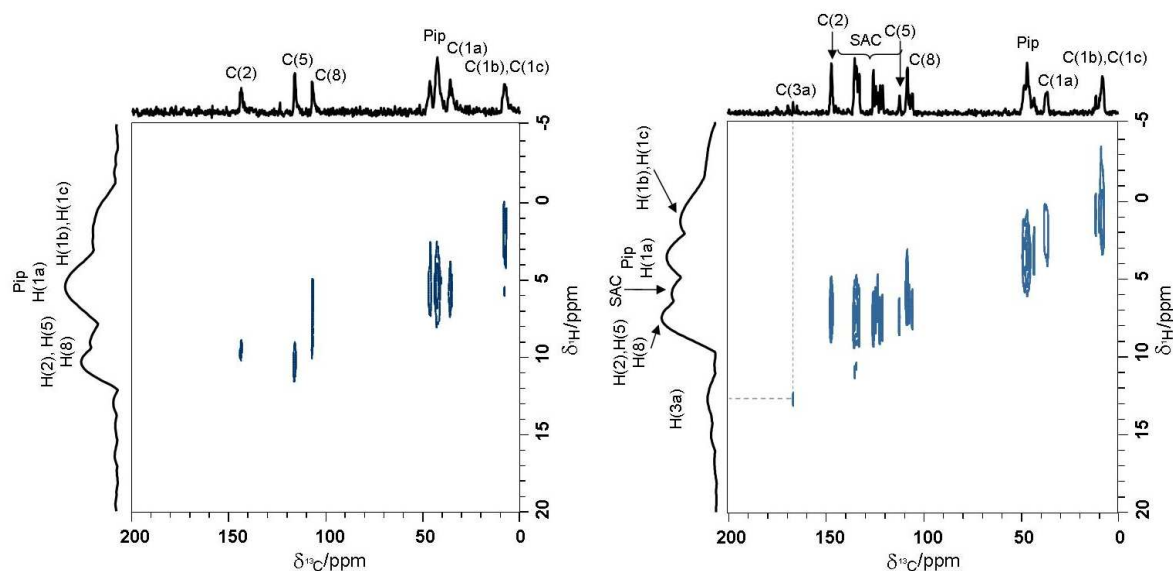


Figura 8.12: Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de CIP (azul) y SAC-CIP (celeste). Se indican las proyecciones y asignaciones para cada espectro bidimensional.

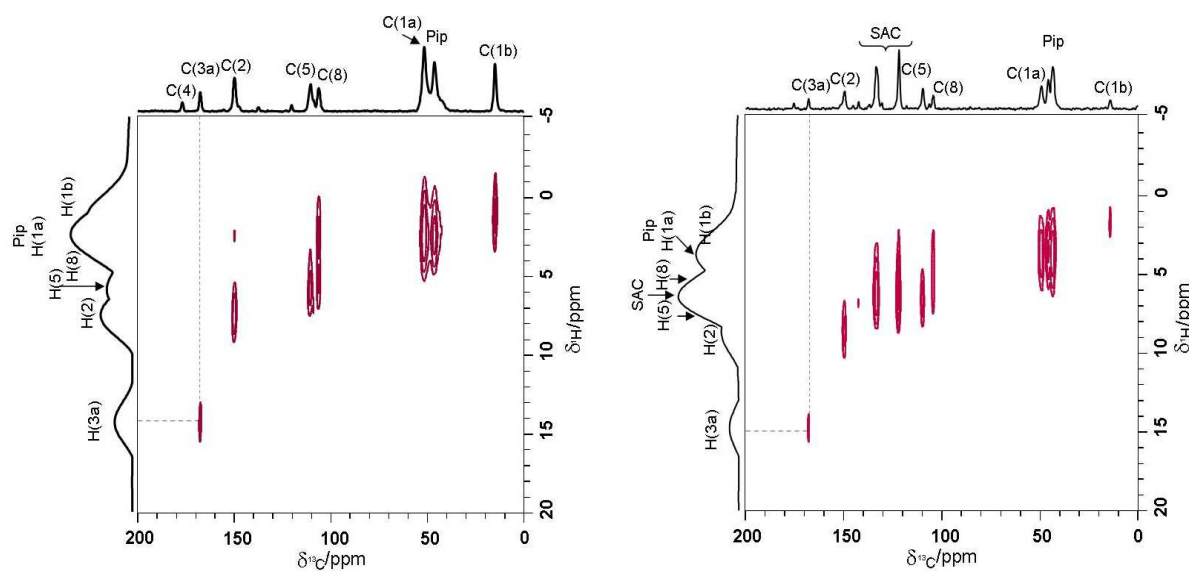


Figura 8.13: Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de NOR (rojo) y SAC-NOR (rosa). Se indican las proyecciones y asignaciones para cada espectro bidimensional.

de los protones aromáticos de SAC a 7.9 ppm (Figura 8.11) fue tomada como referen-

cia para todos los espectros de ^1H [70]. El error en la determinación de los corrimientos químicos de ^1H es 0.5 ppm. En la figura 8.12 se muestran los espectros de correlación bidimensional (^1H - ^{13}C) junto con sus proyecciones para CIP (azul) y SAC-CIP (celeste).

El entorno polar del anillo piperazina en la CIP zwitteriónica no es significativamente afectado luego de la formación de la sal. Esto está avalado por los cambios menores observados en las posiciones de estos protones en el espectro de SAC-CIP.

Los espectros de correlación heteronuclear para NOR y su sacarinato se muestra en la figura 8.13.

En el caso de NOR y su sacarinato, como así también en OFL, SAC-OFL, ENR y SAC-ENR, el protón del grupo carboxilato (H3a) aparece en los espectros de ^1H de estado sólido. Las correlaciones asociadas a este protón nos permitieron la asignación de las señales de los carbonos C(3a) en los espectros de CPMAS de ^{13}C de los sacarinos fluorquinolónicos.

Tabla 8.3: Corrimiento Químico de ^1H (en ppm) para SAC, las FQs y los FQ-SACs, tomados directamente de los espectros de correlación ^1H - ^{13}C bidimensionales.

^1H	SAC	CIP	CIP-SAC	NOR	NOR-SAC	OFL	OFL-SAC	ENR	ENR-SAC
25,26 24,27	7.9	-	7.7 7.5	-	6.3	-	10.9 10.0	-	7.2 6.8
3a	-	-	13.7	14.5	14.7	15.4	16.6	12.7	13.8
2	-	8.5	7.2	7.3	8.7	10.3	11.3	6.2	7.9
5	-	9.5	7.7	5.8	6.6	8.5	9.2	6.1	7.0
8	-	7.3	7.0 6.2	2.1 3.6	5.1	-	-	5.7	7.0
12,13 15,16	-	4.4 4.3	4.2	2.4	3.5 3.7	6.2	6.3	1.9	4.3 3.8 4.0 4.2
1a	-	4.9	2.7	3.1	3.6	6.2	6.3	2.4	3.6
1b	-	1.7	1.4	1.1	1.7	6.1	6.9	0.9	2.0
1c	-	1.7	1.4	-	-	3.7	4.7	0.9	2.0
14a	-	-	-	-	-	4.9	6.2	1.9	4.3 3.8
14b	-	-	-	-	-	-	-	0.9	2.3

En las figuras 8.14 y 8.15 se muestran los espectros de correlación de OFL y su sacarinato y ENR y su sacarinato respectivamente.

Se puede observar que los protones de los anillos aromáticos (H(2), H(5) y H(8)) muestran corrimientos en todas las FQ-SACs, sugiriendo la aparición de nuevas interacciones. Un comportamiento similar fue observado por otros grupos de investigación y atribuidos a cambios en las interacciones puente hidrógenos [73].

Observando la Tabla 8.3, podemos ver cambios generales en los espectros de ^1H , comparando las FQs con sus correspondientes FQ-SACs. En general, en los espectros de las

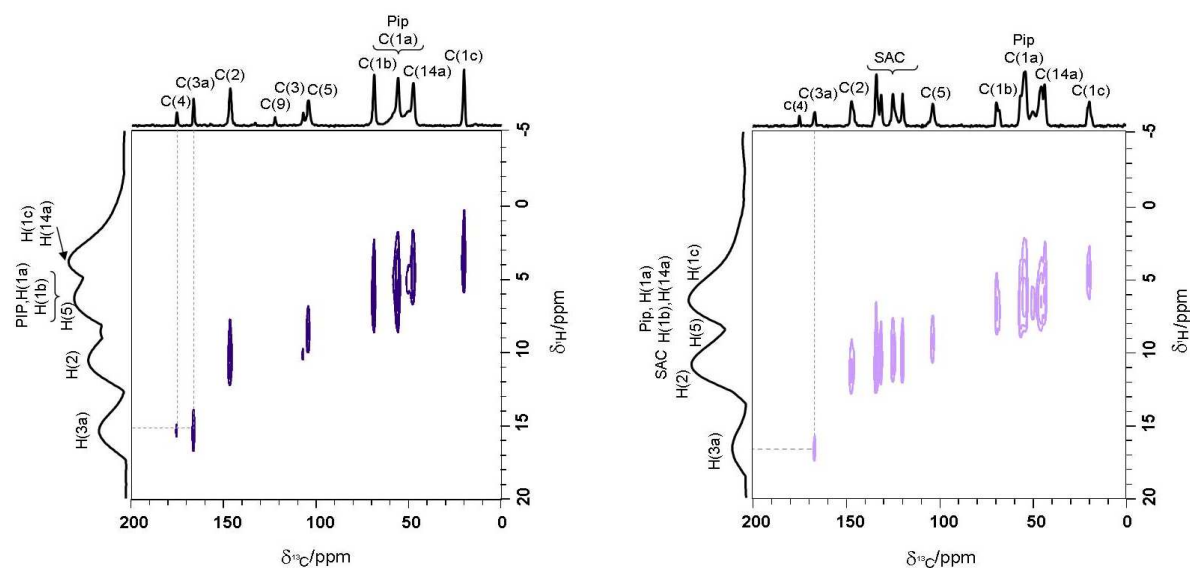


Figura 8.14: Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de OFL (violeta) y SAC-OFL (lila). Se indican las proyecciones y asignaciones para cada espectro bidimensional.

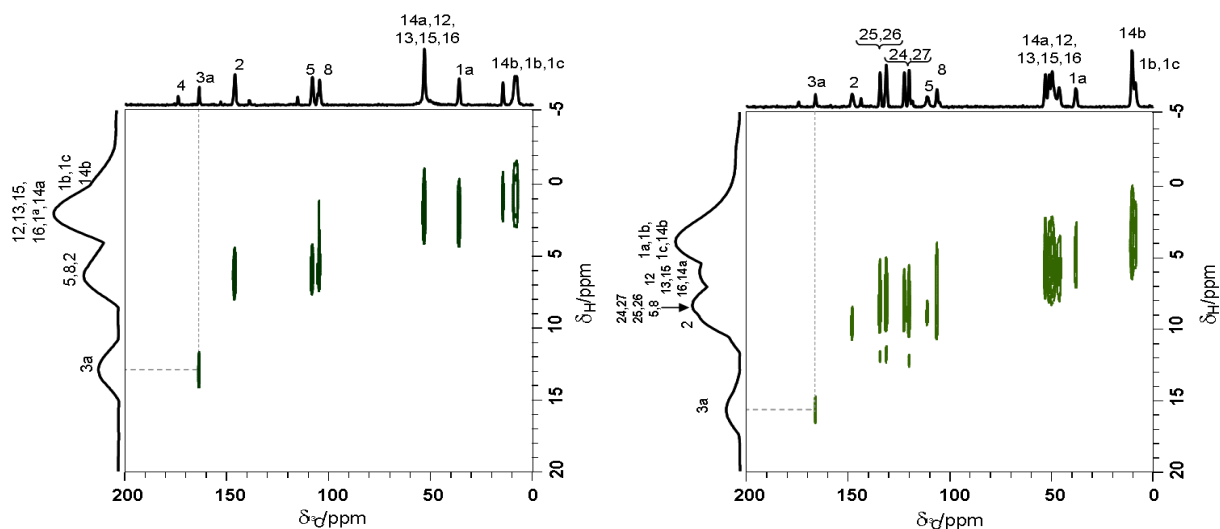


Figura 8.15: Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de ENR (verde oscuro) y SAC-ENR (verde claro). Se indican las proyecciones y asignaciones para cada espectro bidimensional.

FQ-SACs las señales de los protones del anillo piperazina están corridas a ppm más altos (1-2 ppm) con respecto a sus posiciones en los espectros de ^1H de las FQs puras.

8.3. Estudio del Carácter Zwitteriónico de CIP

Un zwitterión (del alemán zwitter híbrido, hermafrodita) es un compuesto químico que es eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. Los zwitteriones son especies polares y usualmente presentan solubilidad alta en agua y baja en disolventes orgánicos de carácter apolar.

Del análisis del espectro de ^{13}C en estado sólido de CIP podemos ver que las señales de los carbonos C(4) y C(3a) aparecen superpuestas en la misma posición de resonancia a 173.0 ppm. Este hecho marca una diferencia entre esta FQ y las otras estudiadas en este trabajo de tesis, ya que en las mismas las señales de C(4) y C(3a) aparecen como señales individuales bien resueltas. Esto indica que CIP es un compuesto zwitteriónico [61],[62],[74]. El carácter zwitteriónico de CIP también se pudo confirmar mediante los resultados obtenidos por FTIR.

La banda de absorción IR del grupo C(3a)–OOH está presente en todos las FQ-SACs y las FQs a frecuencias similares a la de otras sales de estas FQs, excepto para CIP, en cuyo caso la banda C(3a)–OOH está ausente. Sin embargo, la interacción con SAC hace visible la banda C(3a)–OOH en SAC-CIP. Este comportamiento es esperado si CIP es un zwitterión y es convertido a la forma catiónica por transferencia protónica desde SAC. El carácter zwitteriónico de CIP es más dominante que los zwitteriones de las otras FQs, pero las razones de este fenómeno aún no están explicadas y requieren mayor estudio.

Una de las regiones más interesantes de analizar en CIP es la del anillo piperazina, ya que debería ser uno de los más activos al momento de la formación de la sal. Si observamos las señales que corresponden a este grupo (C(12), C(13), C(15) y C(16)) vemos que no sufren modificaciones significativas luego de la formación del sacarinato. Esto puede entenderse basándonos en el carácter zwitteriónico de CIP, que lleva a tener un N(14) cargado positivamente. Recordemos que el sacarinato se forma mediante una transferencia protónica de la amida de SAC a CIP, de esta manera, cuando el sacarinato está formado, el N(14) queda cargado positivamente, es por esto que no observamos grandes modificaciones en esta parte del espectro.

El carácter zwitteriónico de CIP hace que el protón perteneciente al grupo carboxilo no esté presente en el espectro de ^1H . Claramente podemos observar que esta señal no se encuentra en el espectro bidimensional de CIP, como se esperaba. Podemos ver también, que en el espectro 2D del sacarinato de CIP la señal del protón del grupo carboxilo está presente (Figura 8.12) confirmando que el carácter zwitteriónico de CIP es revertido con la formación de la sal.

8.4. Discusión y conclusiones

Varias conclusiones pueden extraerse de los experimentos realizados en la serie de sacarinos fluorquinolónicos. Por un lado, se confirmó la utilidad de SAC como un agente formador de sales. Los nuevos derivados Fluoroquinolónicos fueron obtenidos por métodos de síntesis que no requieren solventes, lo cual es importante desde el punto de

vista del proceso de desarrollo y química verde. Además, la serie de productos mostraron mejores propiedades con respecto a la solubilidad en agua. Basado en el sabor dulce y la solubilidad en agua más alta de estos compuestos, las FQ-SACs podrían ser una buena manera para mejorar las propiedades desfavorables asociadas con las FQs.

Los sacarinos fueron adecuadamente caracterizados en estado sólido. Del análisis de los resultados de DRXP se puede concluir que las FQ-SACs son sólidos cristalinos, hecho también confirmado por los resultados obtenidos por los espectros de RMN de estado sólido. La presencia de nuevas reflexiones en los patrones de DRXP y nuevas resonancias en los espectros de CPMAS de ^{13}C indican la formación de nuevos compuestos, diferentes a sus precursores. Este hecho también puede observarse de los puntos de fusión de las FQ-SACs. Los experimentos de TGA dan evidencia acerca de la ausencia de SAC sin reaccionar, así como de su naturaleza anhidra.

Los espectros de FTIR muestran una composición multicomponente de las FQ-SACs. Por otro lado, estos espectros dan clara evidencia de la formación de la sal por transferencia protónica de la amida SAC a las FQs.

Los espectros 1D y 2D obtenidos por RMN de las FQ-SACs muestran claros cambios en la multiplicidad y corrimientos químicos en las resonancias de las regiones de las Fluoroquinolonas cercanas a la zona de ligadura con la SAC.

A excepción de CIP, que muestra un comportamiento diferente al de las otras FQs, pero de esto ya nos ocuparemos con más detalle en el siguiente capítulo.

De los espectros de FTIR y los espectros de RMN podemos determinar que el carácter zwitteriónico de CIP es revertido luego de la formación de la sal.

Capítulo 9

Polimorfismo en SAC-CIP

Como mencionamos en la sección 6.1.2, a partir de una solución diluida y con un enfriamiento gradual se obtuvieron monocristales de SAC-CIP. En la figura 9.1 se exhibe una foto de un agregado de monocristales representativo del compuesto SAC-CIP (II).

Este hecho fue muy importante ya que permitió estudiar el polimorfismo de SAC-CIP. En este capítulo vamos a llamar SAC-CIP (I), al sacarinato policristalino estudiado en el capítulo anterior y SAC-CIP (II) al sacarinato de CIP obtenido como monocristal.



Figura 9.1: *Microfotografía de cristales de SAC-CIP (II).*

9.1. Análisis Espectral de los Polimorfos

9.1.1. Análisis de Espectros de CPMAS de ^{13}C

Los espectros de ^{13}C de SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II) se muestran en la figura 9.2 y sus corrimientos químicos se detallan en la tabla 9.1.

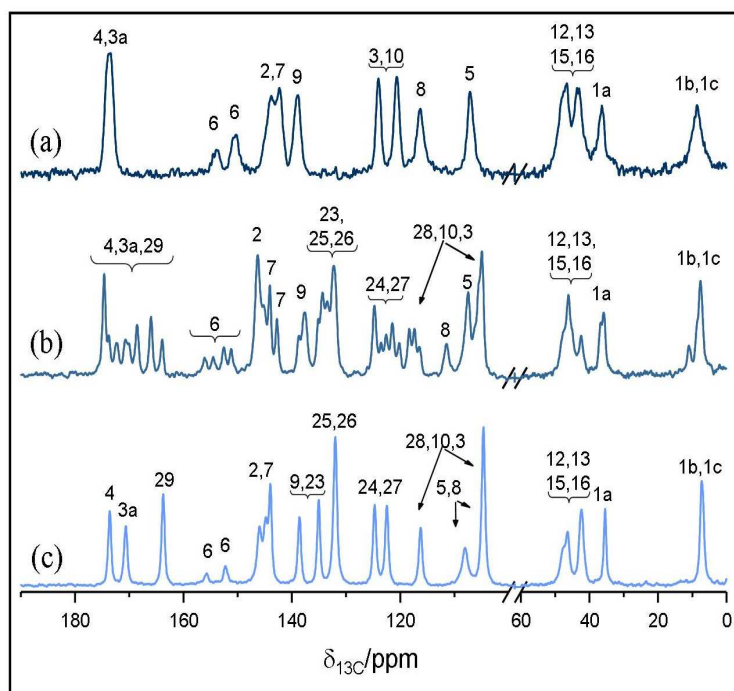


Figura 9.2: Espectro de CPMAS de ^{13}C de (a) CIP, (b) SAC-CIP (I) y (c) SAC-CIP (II).

Para un análisis más detallado, realizamos también experimentos de edición de carbonos cuaternarios que se muestran en la figura 9.3. Los espectros de CPMAS de ^{13}C se asignaron como ya mencionamos anteriormente en la sección 8.1.1.

Con respecto a los espectros de SAC-CIP (I y II), ambos muestran líneas angostas, demostrando el grado de cristalinidad y orden presente en estas muestras. El espectro de ^{13}C de SAC-CIP (II) confirma lo que muestran los datos cristalográficos, que indican la existencia de sólo una molécula por celda asimétrica, a diferencia de lo que ocurre en SAC-CIP (I), donde se observan multiplicidades para las señales de ^{13}C indicando la presencia de más de una molécula por celda unidad, lo que introduce la mayor evidencia del polimorfismo en SAC-CIP.

En el capítulo anterior mostramos que CIP existe en estado sólido como zwitterión, lo que lleva a que el N(14) esté cargado positivamente. Comparando los espectros de ^{13}C de CIP y de las dos formas sólidas de su sacarinato, no se observan modificaciones apreciables en las señales correspondientes a los ^{13}C pertenecientes al anillo piperazina de CIP (C(12), C(13), C(15) y C(16)). Esto está de acuerdo con el hecho de que, si

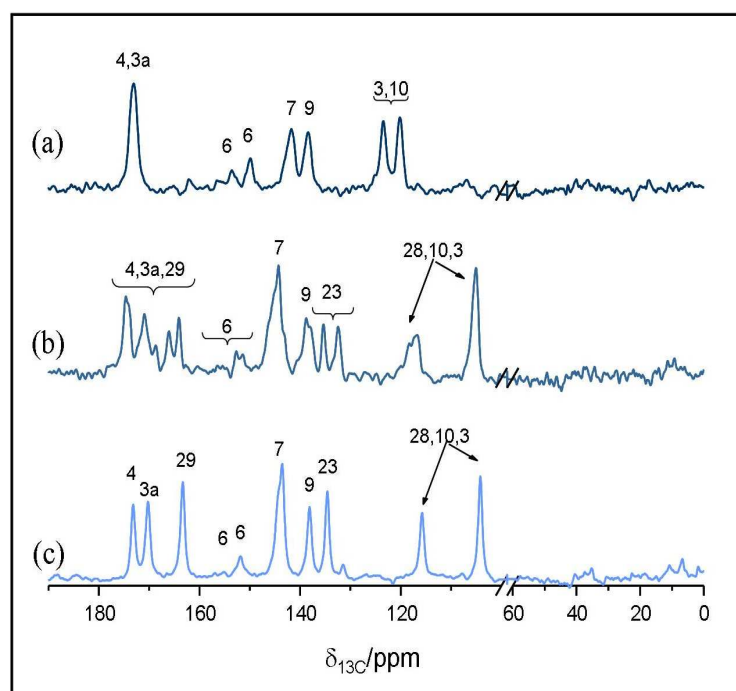


Figura 9.3: Espectro de ^{13}C NQS de (a) CIP, (b) SAC-CIP (I) y (c) SAC-CIP (II).

bien el N(14) está cargado positivamente en CIP, también lo está en los sacarinatos. Podemos notar que las resonancias pertenecientes a los carbonos C(4) y C(3a), que en CIP aparecen superpuestas a 173.2 ppm, se separan en ambos sacarinatos. La posición de C(3a) a 164.0 ppm en SAC-CIP (II) indica que el grupo COOH no está cargado negativamente. Se observa en la figura 9.2 un corrimiento importante a ppm más bajos sufrido por C(3) y C(10) en ambos polimorfos de SAC-CIP, originalmente a 123.3-119,8 en el fármaco puro. Las señales correspondientes a C(24) y C(27) en la molécula de sacarina aparecen resueltos y con gran intensidad en SAC-CIP (II). Lo mismo puede observarse para C(25) y C(26). Esto puede deberse a la pureza del sacarinato. En la sacarina pura, las moléculas presentan una interacción puente hidrógeno entre ellas. Esta interacción puente hidrógeno homomolecular, pasa a ser heteromolecular luego de la formación del sacarinato. Esto significa que la interacción puente hidrógeno es ahora entre la molécula de SAC y la molécula de CIP. Esto produce un corrimiento del carbonilo C(29), que en SAC aparece a 164.0 ppm e en los sacarinatos se observa ppm más altos.

La señal correspondiente a C(28) es difícil de asignar ya que se encuentra superpuesta con las resonancias de C(3) y C(10). Podemos observar que el comportamiento de las señales de resonancia que presenta SAC-CIP (I), también puede ser apreciado en SAC-CIP (II), por ejemplo, los corrimientos de C(3), C(10), C(28) y C(29). De esta manera, los resultados obtenidos por RMN están indicando algún grado de similitud en las interacciones moleculares en ambos polimorfos.

Tabla 9.1: *Corrimiento Químico de ^{13}C (en ppm) para SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II).*

^{13}C	SAC-CIP (I)	SAC-CIP (II)
C(4)	174.9 174.1 172.5 170.9 170.3 168.8 166.2 164.2	173.8
C(3a)	Idem 4	164.0
C(6)	151.4 152.8 154.7 156.4	146.2
C(2)	146.6 145.4	146.2
C(7)	144.4 143.0	146.2 144.2
C(9)	138.0 138.9	138.8
C(3),C(10)	116.7 105.4 117.6 118.5	116.4 104.8
C(5)	111.7	108.2 104.8
C(8)	107.6	Idem 5
C(12),C(13) C(15),C(16)	46.2 42.5	46.5 42.4
C(1a)	35.9 36.7	35.5
C(1b),C(1c)	11.0 7.6	7.3
C(29)	Idem 4	170.9
C(23)	134.6 132.5	135.2
C(25),C(26)	135.3 133.7 134.6 132.5	132.2
C(28)	Idem 3,10	Idem 3,10
C(24),C(27)	125.0 123.8 122.8 121.7 120.4	124.9 122.6

9.1.2. Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido

Continuando con el análisis espectroscópico de los polimorfos de SAC-CIP, se realizaron espectros de alta resolución de ^1H . Cuando analizamos los espectros de ^1H en estado sólido, encontramos que el efecto de incrementar la velocidad de rotación ν_R es muy importante. Claramente podemos ver que al aumentar ν_R disminuimos el ancho de las líneas de resonancia. En la figura 9.4 mostramos el efecto que provoca el aumento de la velocidad de rotación en el espectro de MAS de ^1H .

Algunas señales de resonancia, en particular aquellas que se encuentran a frecuencias altas, aparecen resueltas sólo a 60 kHz. Esto hecho deja clara la importancia de usar velocidades de rotación bien altas en los espectros de estado sólido de compuestos de interés farmacéutico, donde la interacción dipolar de protones es realmente fuerte. La tabla 9.2 muestra el corrimiento químico de ^1H para los espectros de RMN de estado sólidos para los tres compuestos, CIP, SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II).

Las asignaciones tentativas las realizamos teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los experimentos de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C (Sección 9.2.1), los experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H y los espectros de protones en solución [47]. Los pro-

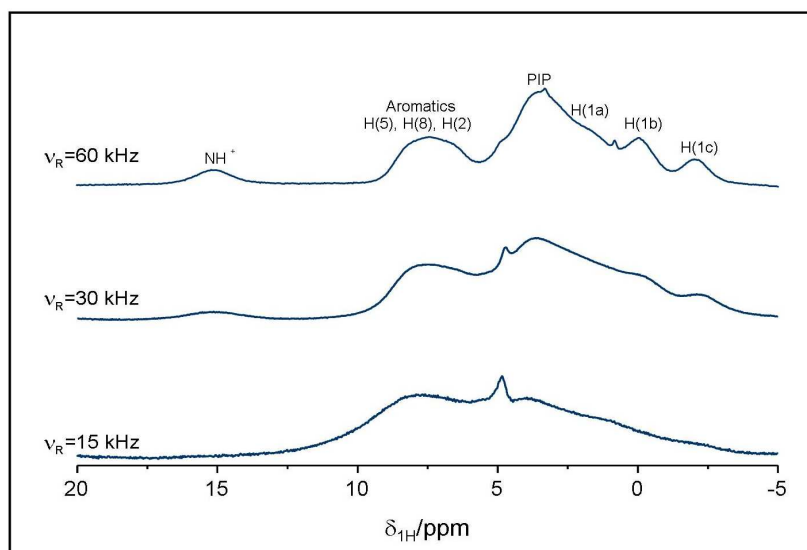


Figura 9.4: Espectros de alta resolución ^1H a diferentes velocidades de MAS.

Tabla 9.2: Corrimiento Químico de ^1H (en ppm) para CIP, SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II).

^1H	CIP	CIP-SAC (I)	CIP-SAC (II)
H(1a)	1.4	3.3	3.3
H(1c)	-2.2	-2.2 1.1	1.1
H(1b)	-0.3	-0.2 0.3 2.2	1.9
H(12),H(13) H(15),H(16)	3.3	3.3	3.3
H(2)	6.0-7.3	6.6	6.6
H(8)	6.0-7.3	6.0	6.0
H(5)	6.0-7.3	7.2	7.2
NH	15.0	11.1	11.4
COOH	-	13.1 14.3	13.0
H(25),H(26) H(24),H(27)	-	7.7	7.7

tones aromáticos (H(2), H(5) y H(8)) aparecen sin resolver en CIP, como podemos ver en el espectro obtenido para este compuesto en la figura 9.5 (a). Las señales de los grupos metilenos (H(1b) y H(1c)) están resueltas y a ppm negativos. Los valores negativos de corrimientos químicos pueden atribuirse a fuertes interacciones de los grupos metilenos con protones aromáticos [75]. Debido al carácter zwitteriónico de CIP la resonancia presente a 15 ppm es asignada a los protones $\text{NH}(14)_2^+$. Esta señal sólo aparece a altas veloci-

dades de rotación (60 kHz. ver figura 9.4 (c)) debido a la gran resolución que se obtiene al rotar a velocidades de MAS muy altas. Es importante tener en cuenta que las señales correspondientes a protones ligados a nitrógenos pueden ser muy anchas debido al acople dipolar residual [76]. Estas resonancias comienzan a angostarse cuando se aumenta la velocidad de rotación. Usualmente la señal de estos protones en los espectros en solución no está presente debido al rápido intercambio de los mismos.

En el espectro de protones en estado sólido de SAC-CIP (I) (figura 9.5 (b)) podemos observar tres señales en el rango 10 ppm-15 ppm, dos de ellas corresponden al protón del grupo carboxilo, una clara evidencia de la existencia de al menos dos moléculas por celda asimétrica en este polimorfo. Esta asignación se sustenta en los resultados de los experimentos bidimensionales en SAC-CIP (I) (ver sección 9.2.1). La señal más ancha está asignada a los protones $\text{NH}(14)_2^+$. Como ocurre en el compuesto farmacéutico puro, los protones del grupo metileno se encuentran bajo la presencia de corrientes de anillos provenientes de los grupos aromáticos, lo que lleva a resonancias a ppm negativos. También puede observarse multiplicidades para otras señales en este polimorfo, haciendo difícil una asignación definitiva de ellas, esto se ve claramente por ejemplo en los protones pertenecientes al grupo ciclopropilo.

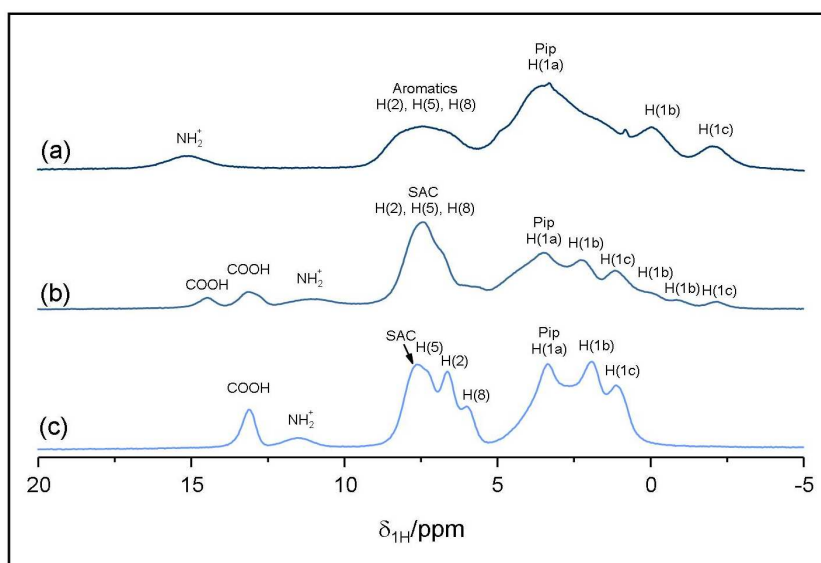


Figura 9.5: Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido de (a) CIP, (b) CIP-SAC (I) y (c) CIP-SAC (II).

SAC-CIP (II) presenta menos resonancias que SAC-CIP (I) como puede observarse en el espectro de ^1H que se muestra en la figura 9.5 (c). En el rango 10 ppm-15 ppm sólo se observan dos resonancias, una correspondiente al protón del grupo carboxilo y la otra a los protones de $\text{NH}(14)_2^+$. En este compuesto no se observan corrimientos químicos a ppm negativos, indicando diferencias en la estructura cristalina cuando se lo compara con el

otro polimorfo. Los protones aromáticos están resueltos, lo mismo ocurre con los protones del grupo ciclopropilo.

Queremos remarcar que el espectro de RMN de ^1H a muy rápidas velocidades de MAS puede ser una herramienta muy importante para distinguir e identificar entre distintas formas polimórficas [77]. El corrimiento a ppm más bajos de la señal de $\text{NH}(14)^+$ en ambos polimorfos, es indicativo de la formación de la sal. Como mencionamos anteriormente, los protones del anillo piperazina (Pip) no sufren cambios significativos con la formación de la sal debido al carácter zwitterónico de CIP, lo que significa que el grupo carboxílico de CIP esta deprotonado y el átomo de hidrógeno de este grupo se ha movido al nitrógeno en el grupo piperazina.

Cuando se realizan experimentos a velocidades de rotación muy altas, se produce un calentamiento de la muestra. Una de las dudas surgidas a partir de la observación de los espectros de ^1H a diferentes velocidades de rotación fue si el angostamiento de las señales de resonancia se debía a un aumento en la movilidad molecular producto del aumento de temperatura. Es por esto que realizamos experimentos para obtener espectros de ^1H en función de la temperatura. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9.6. De estos resultados concluimos que el angostamiento de las líneas observado en la figura 9.4 es provocada por la velocidad de rotación.

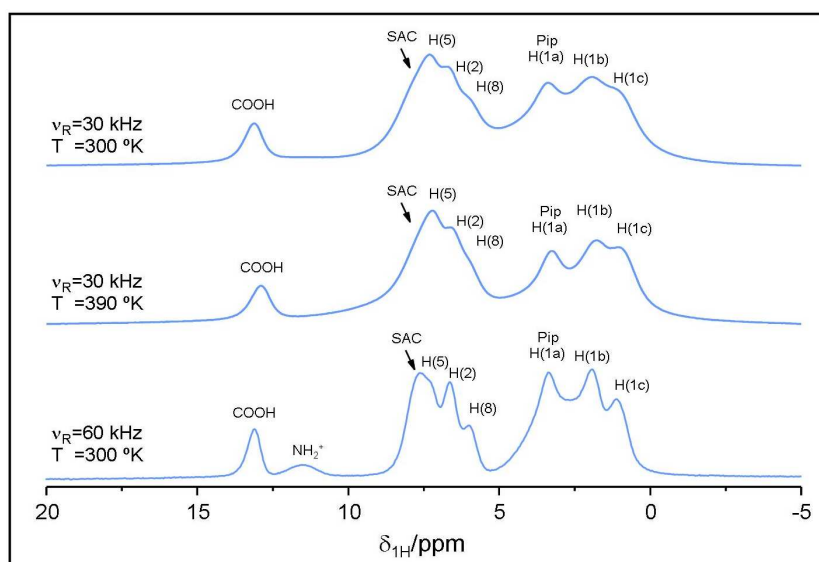


Figura 9.6: Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido a diferentes temperaturas.

9.1.3. Estudio de Espectros de CPMAS de ^{15}N

El espectro de CPMAS de ^{15}N en abundancia natural para CIP y sus sacarinos se muestra en la figura 9.7. Los resultados de los experimentos de edición de ^{15}N se muestran en la figura 9.8. CIP y sus sacarinos contienen tres y cuatro átomos de nitrógeno respectivamente. Algunos de estos nitrógenos están directamente involucrados en la interacción iónica presente entre SAC y CIP.

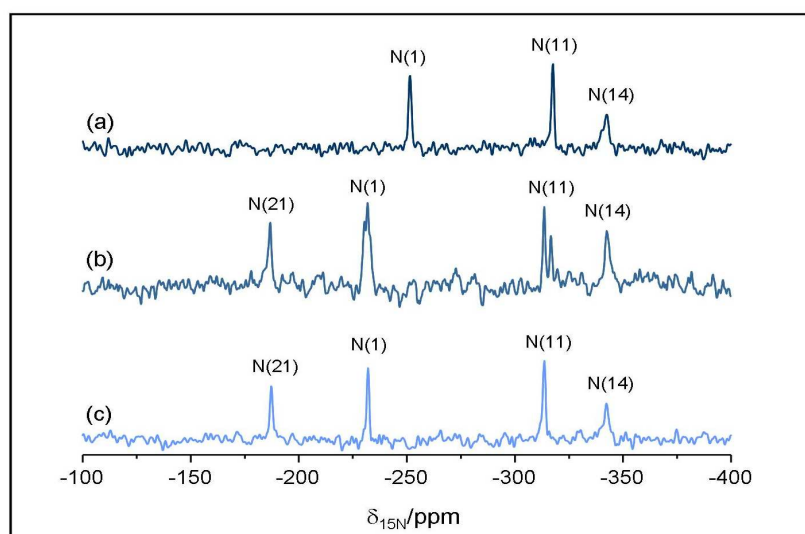


Figura 9.7: Espectros de CPMAS de ^{15}N de (a) CIP, (b) CIP-SAC (I) y (c) CIP-SAC (II).

En el espectro de CPMAS ^{15}N de CIP pueden observarse tres señales de resonancia (Figura 9.7 (a)). Las asignaciones para CIP en solución fueron reportadas en un trabajo previo [78]. Las asignaciones para CIP en estado sólido se realizaron comparando los corrimientos químicos con aquellos presentados en la referencia [78] y teniendo en cuenta los resultados de los espectros de edición. Los corrimientos químicos para CIP y los polimorfos se muestran en la tabla 9.3. La figura 9.7 (b) muestra el espectro de ^{15}N de SAC-CIP (II), cuatro resonancias pueden observarse en este caso, una de ellas correspondiente a la sacarina (N(21), ver señal a -187.1 ppm). Las asignaciones se realizaron comparando con el espectro de ^{15}N de CIP y teniendo en cuenta el espectro de edición de SAC-CIP (II). El espectro para SAC-CIP (I) (Figura 9.7 (c)) fue analizado de la misma manera que el anterior.

La señal correspondiente a N(14) no sufre corrimiento significativo en los sacarinos en comparación a su posición en el IFA puro. Esto es atribuido al carácter zwitteriónico de CIP. La señal de ^{15}N que se observa a -317.7 ppm en CIP asignada al nitrógeno N(11) muestra un pequeño corrimiento en los polimorfos, y un desdoblamiento en SAC-CIP I (-317.7 ppm en SAC-CIP (II) y -316.9 ppm en SAC-CIP (I)).

La resonancia correspondiente a N(1) muestra cambios en los dos sacarinos. En CIP,

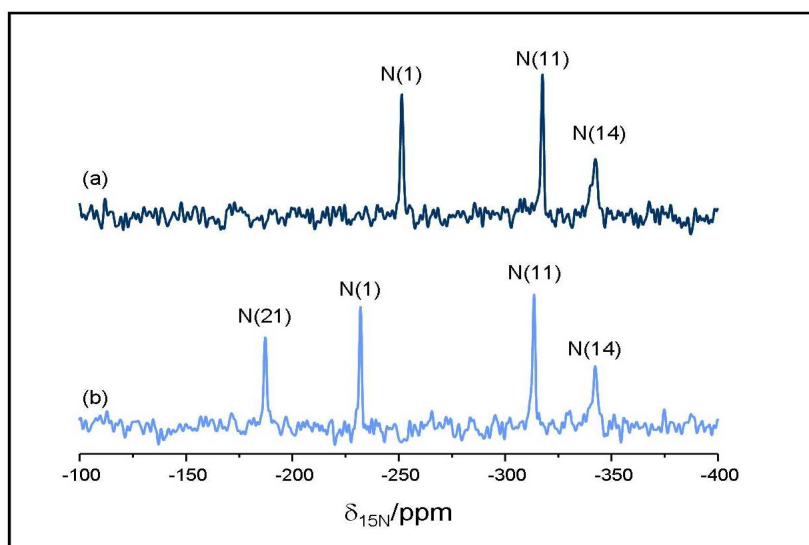


Figura 9.8: Espectros de edición de ^{15}N de (a) CIP y (b) CIP-SAC (II).

su corrimiento químico es -251.5 ppm y en SAC-CIP (II) se corrió a ppm más alto (-232.0 ppm), mientras que en SAC-CIP (I) se desdobló en dos señales a -230.4 ppm y -232.0 ppm. El desdoblamiento observado en SAC-CIP (I) confirma la existencia de al menos dos moléculas en la celda asimétrica. Los cambios observados en la señal de N(1) sugiere que ésta es la parte de la molécula más afectada por la formación de la sal.

Tabla 9.3: Corrimiento Químico de ^{15}N (en ppm) para CIP, SAC-CIP I y SAC-CIP II.

^{15}N	CIP ppm	CIP-SAC (I) ppm	CIP-SAC (II) ppm
N(1)	-251.5	-232.0 -230.4	-232.0
N(11)	-317.7	-316.9 -313.7	-313.7
N(14)	-342.3	-342.3	-342.3
N(21)	np	-186.8	-187.2

9.1.4. Análisis de espectros de RMN de ^{19}F

Como se puede ver en la tabla 3.1, el núcleo de ^{19}F es 100 % abundante. Otra ventaja es la poca cantidad de átomos de ^{19}F presentes en las muestras estudiadas. Es por esto que analizar espectros de este núcleo puede proveernos de importante información acerca de la conformación de los compuestos. En la figura 9.9 podemos ver los resultados obtenidos para el fármaco puro, SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II). Se puede ver una línea de resonancia

a -126.8 ppm presente en los tres compuestos, indicando que esta zona de la molécula no es radicalmente modificada por la formación del sacarinato. El espectro para SAC-CIP (I) muestra tres líneas de resonancias (-119.8 ppm, -126.8 ppm y -129.7 ppm), indicando la multiplicidad de moléculas en la celda asimétrica.

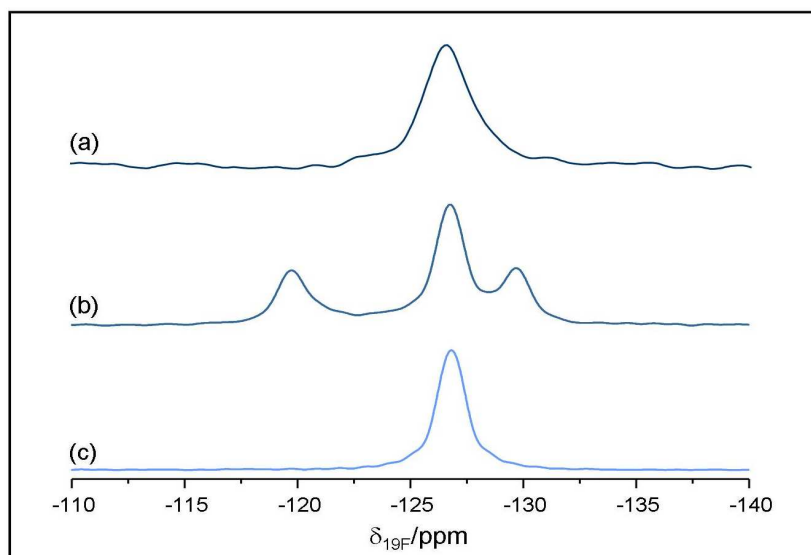


Figura 9.9: Espectros de ^{19}F de (a) CIP, (b) CIP-SAC (I) y (c) CIP-SAC (II).

9.2. RMN bidimensional

9.2.1. Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C en estado sólido

Los experimentos bidimensionales HETCOR FSLG y REPT-HSQC para SAC-CIP (II) fueron realizados para obtener correlaciones heteronucleares de corto y largo alcance.

HETCOR FSLG

Los experimentos de HETCOR FSLG para CIP y SAC-CIP (I) se mostraron en el capítulo anterior. El espectro 2D que mostramos anteriormente revelaba claras y bien resueltas correlaciones entre los carbonos y sus protones ligados.

En las proyecciones de ^1H de CIP, el protón perteneciente al grupo carboxilo no aparece, de acuerdo con el carácter zwitteriónico de este compuesto. Por otro lado, el protón del grupo carboxilo aparece en el espectro 1d de ^1H de SAC-CIP (I) y también se lo observa en la proyección de SAC-CIP (II) (ver figura 9.10), confirmando que el carácter zwitteriónico es revertido por la formación de la sal también en este polimorfo.

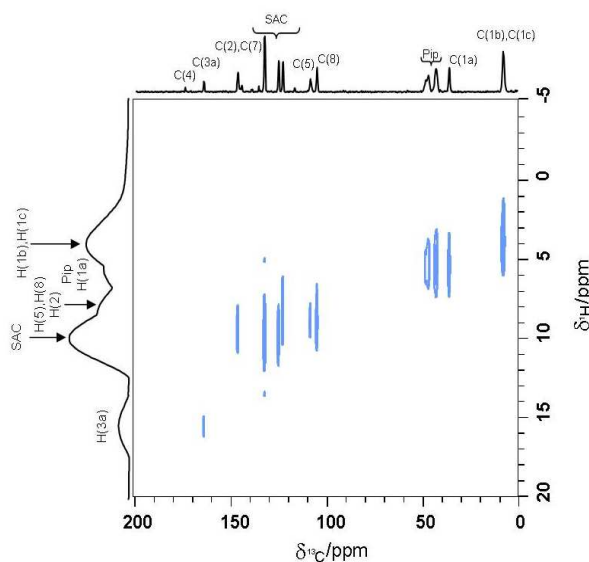


Figura 9.10: Espectro de Correlación Heteronuclear (HETCOR-FSLG) ^1H - ^{13}C de SAC-CIP (II).

Además, en la proyección de ^1H del experimento HETCOR FSLG en SAC-CIP (I) pueden verse dos resonancias correspondientes al protón ácido confirmando las asignaciones para estas resonancias en el espectro 1d de ^1H de este compuesto. El entorno polar del anillo piperazina (pip) de la CIP zwitteriónica no es significativamente afectado luego de la formación de la sal. Este hecho está sustentado por los menores cambios observados en las posiciones de los protones en el espectro de los sacarinos. Además, los protones en el anillo aromático H(2), H(5) y H(8), muestran claros corrimientos en ambas formas sólidas sugiriendo la aparición de nuevas interacciones en los sacarinos. Un comportamiento similar fue observado por otros grupos de investigación y atribuido a cambios en las interacciones de puente hidrógeno o en las interacciones π - π [73].

REPT-HSQC

Este experimento se realizó con la secuencia de pulsos especificada en la figura 4.2. Se realizaron experimentos con tiempos de recople dipolar de uno y dos períodos de rotor, de esta manera se obtuvieron resultados que muestran correlaciones entre núcleos cercanos y lejanos respectivamente. Esto nos permitió determinar el rango de corrimientos químicos para diferentes grupos de protones en la molécula. Los protones de SAC, por ejemplo, se encuentran en el rango de 7.6 ppm a 8.0 ppm. Los protones aromáticos se pueden identificar entre los 5.6 ppm y los 7.0 ppm. Además, los protones aromáticos aparecen resueltos en la dimensión indirecta con una incerteza de ± 0.5 ppm. Algunas

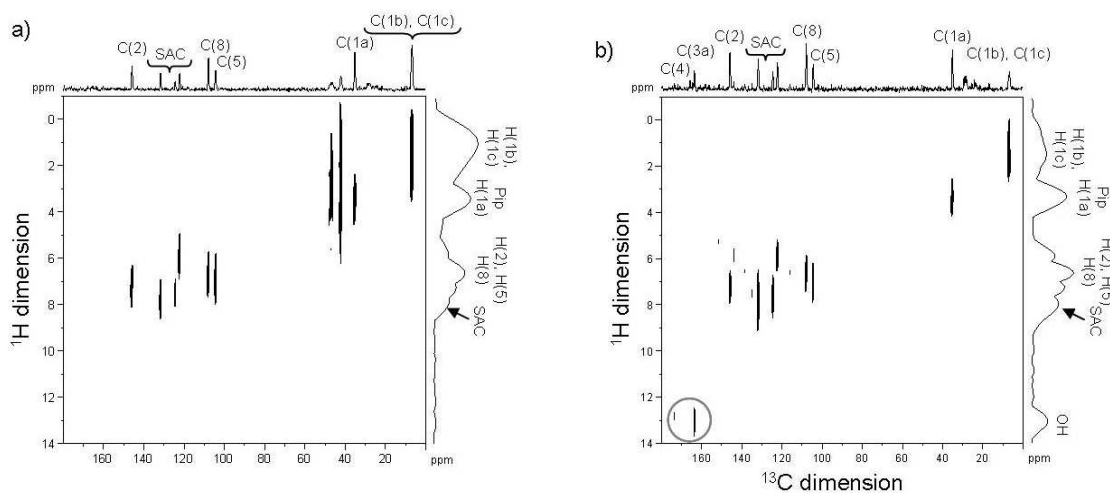


Figura 9.11: Espectro de Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C de SAC-CIP (II).

interacciones importantes son claramente observadas cuando se realizan dos períodos de rotor de reacople dipolar. Primero notemos que H(18) aparece en la dimensión del espectro de ^1H en la figura 9.11 mostrando la presencia del puente hidrógeno entre O(18) y O(19), que puede ser observado mediante la correlación entre los carbonos C(4) y C(3a), de acuerdo a los resultados obtenidos por DRX.

9.2.2. Correlación Homonuclear en estado sólido (DQMAS (Ba-Ba))

La figura 9.12(c) muestra los espectros de ^1H DQMAS para SAC-CIP (II) y la tabla 9.4 muestra las correspondientes correlaciones. En la dimensión DQ, las correlaciones están presentes a la suma de las frecuencias de SQ de los dos núcleos involucrados. Los picos en la diagonal (autocorrelaciones) son debidos a protones interactuantes con corrientes químicas similares [79]. La estructura cristalina obtenida por Rayos X de cristal está disponible para SAC-CIP (II), por lo tanto, este estudio ofrece la posibilidad de comprobar la confiabilidad de los experimentos de DQMAS en ^1H aplicado a compuestos farmacéuticos y en este caso particular, obtener mayor información referente al polimorfo SAC-CIP (I). Los datos cristalográficos se muestran en la sección 9.4. Es importante tener en cuenta que para un sólido orgánico típico, la presencia de correlaciones en un espectro de DQMAS en ^1H sugiere que la separación ^1H - ^1H es menos que 3 Å para tiempos cortos de excitación. Las correlaciones en estos experimentos también pueden dar información

acerca de la presencia de interacciones iónicas e interacciones π - π . El espectro de DQMAS

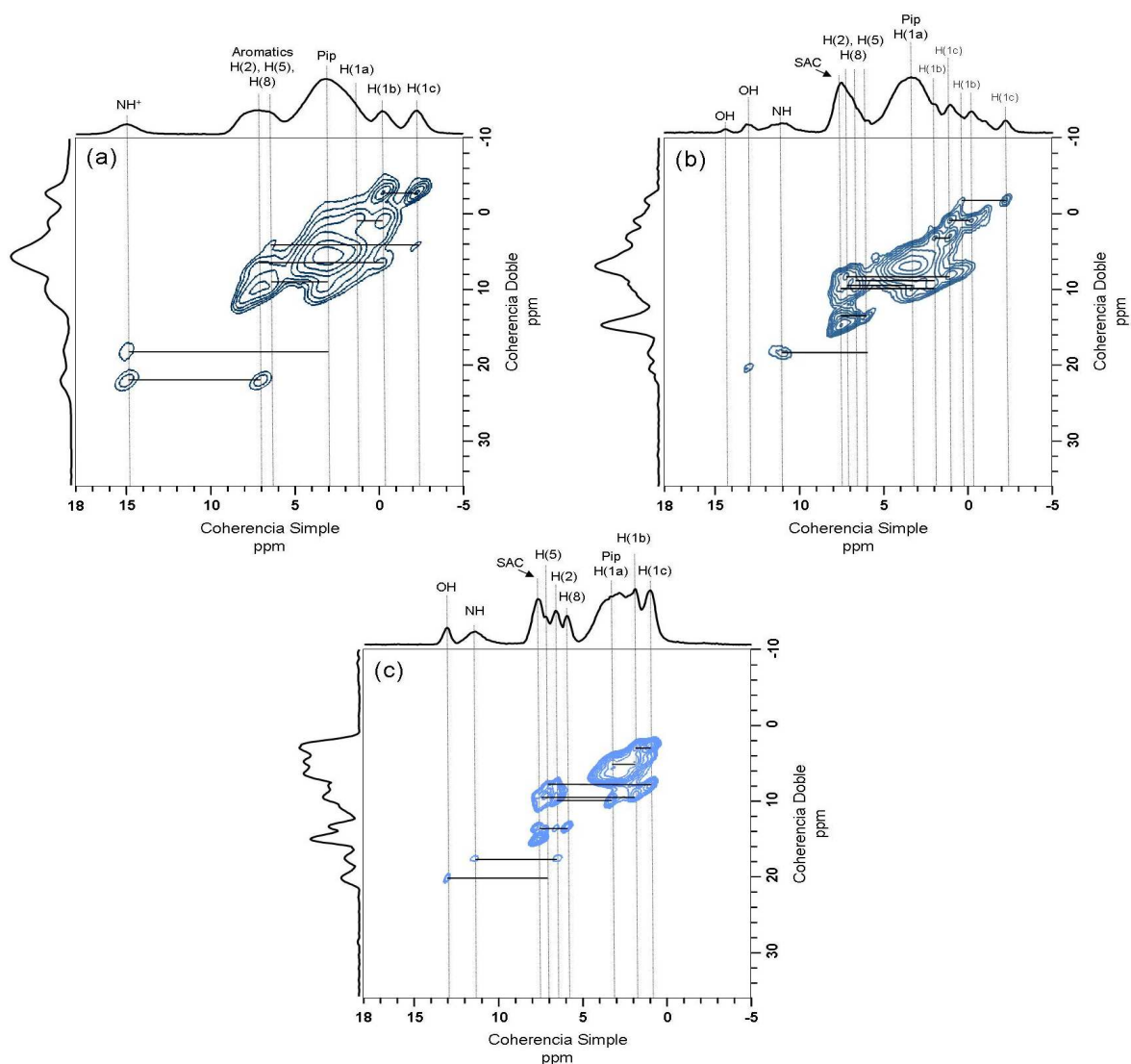


Figura 9.12: Espectro de Correlación Homonuclear ^1H - ^1H de: (a) CIP, (b) SAC-CIP (I) y (c) SAC-CIP (II).

de ^1H en SAC-CIP (II) muestra fuertes autocorrelaciones a $\text{DQ} = 3.3 + 3.3 = 6.6$ ppm y a $\text{DQ} = 7.5 + 7.5 = 15.0$ ppm, correspondientes a las interacciones Pip-Pip y SAC-SAC respectivamente. El corrimiento químico de los protones aromáticos se encuentra en el

rango de 5.9 ppm-7.3 ppm, como se ve también en los experimentos de correlación heteronuclear. Tres señales aparecen resueltas a 5.9 ppm, 6.6 ppm y 7.2 ppm. El espectro de DQ de SAC-CIP (II) muestra correlaciones a $DQ = 13.0 + 7.3 = 20.3$ ppm entre el protón perteneciente a grupo carboxilo y un protón aromático. Observando la estructura cristalina de este compuesto, podemos concluir que el protón aromático involucrado en esta correlación es el H(5). Esto muestra evidencia de un puente hidrógeno entre O(18)-H(18)...(19) llevando a la formación de un anillo extra de seis miembros que incluye O(19), C(4), C(3), C(3a), O(18)-H(18) en la estructura, confirmando los datos de RX de cristal.

Tabla 9.4: Correlaciones homonucleares en SAC-CIP (II).

SAC-CIP (II) Correlación	$\omega_A + \omega_B$ ppm
H(1b)-H(1c)	3.0
H(1b)-H(1a)	5.2
H(1c)-H(2)	7.7
H(1a)-H(2)	9.9
H(1b)-SAC	9.6
H(5)-H(2)	13.8
SAC-H(8)	13.7
NH-H(2)	18.0
OH-H(5)	20.2
Pip-Pip	6.6
SAC-SAC	15.4

Como se observó por RX de cristal [80], SAC-CIP (II) forma una estructura columnar que se acercan entre si con anillos intercalados pertenecientes a la unidad de CIP, en una interacción típica π - π [81]. Este tipo de interacciones son la parte clave de las organizaciones moleculares complejas y pueden ser observadas directamente a través de los espectros de DQ. Este hecho es evidenciado en SAC-CIP (II) por la correlación a $DQ = 13.5$ ppm. esta correlación muestra la interacción entre los protones aromáticos de dos moléculas diferentes. Podemos inferir que la correlación es entre H(5) y H(2), ya que la distancia entre ellos es de 3.39 Å. Otra correlación intermolecular presente en este compuesto es entre SAC y el grupo ciclopropilo, ésta puede verse a $DQ = 9.6$ ppm. Los protones del grupo ciclopropilo (H(1a), H(1b) y H(1c)) están cercanos unos a otros, la distancia entre ellos es de alrededor 2.5 Å. Una fuerte correlación aparece a $DQ = 2.76$ ppm y $DQ = 4.91$ ppm. Las correlaciones a $DQ = 7.9$ ppm (H(1c)-H(2)) y $DQ = 9.9$ ppm (H(1a)-H(2)) son indicativas de la proximidad de los protones del grupo ciclopropilo con los aromáticos. Esto se debe a la inclinación de este grupo en la estructura cristalina con respecto al plano de la molécula definido por los anillos aromáticos planos (ver figura 9.16).

La figura 9.12(a) muestra el espectro de DQ ^1H - ^1H de CIP. Una fuerte autocorrelación

a $DQ = 3.2 + 3.2 = 6.4$ ppm entre los protones de Pip se puede observar, permitiendo la asignación de los protones de este grupo. Los protones del grupo terpeno están resueltos y presentan correlaciones con protones en los grupos aromáticos (ver correlaciones a $DQ = 6.7$ ppm y $DQ = 4.1$ ppm y la tabla 9.5). Aún cuando CIP tiene tres átomos de nitrógeno (N(1), N(11) y N(14)), la diferencia en basicidad entre ellos provoca la protonación del N(14). Sin embargo, una segunda protonación puede ocurrir en CIP, llevando a un N(1) ligado a un protón. Este hecho es confirmado por las correlaciones entre N(14)H y el grupo Pip ($DQ = 18.2$ ppm) y N(1)H-Aromáticos ($DQ = 21.9$ ppm).

Tabla 9.5: Correlaciones homonucleares en CIP.

CIP Correlación	$\omega_A + \omega_B$ ppm
H(1b)-H(1c)	-2.5
H(1c)-Aromáticos	4.1
H(1b)-H(1a)	1.1
H(1b)-Aromáticos	6.3
Pip-Aromáticos	9.0
NH-Pip	18.2
NH-Aromáticos	22.0
Pip-Pip	6.6

La figura 9.12(b) muestra el espectro de DQ 1H - 1H de SAC-CIP (I). SAC-CIP (I) muestra un espectro de correlaciones más complejo. La multiplicidad es evidente cuando se mira las señales a frecuencias altas. Sin embargo, se puede observar una estructura similar para las correlaciones de DQ comparada con las que se observan para SAC-CIP (II) (ver tabla 9.6). Correlaciones entre los protones del grupo terpeno y los anillos aromáticos son visibles a $DQ = 8.2$ ppm, $DQ = 8.3$ ppm y $DQ = 9.3$ ppm. De la correlación intermolecular a $DQ = 9.6$ ppm podemos inferir que la distancia entre SAC y el grupo terpeno es de alrededor de 3.6 \AA , como ocurre en SAC-CIP (II).

Notemos que en el caso de SAC-CIP (II) y SAC-CIP (I) la ausencia de la correlación NH-Pip puede ser atribuido a la formación de la sal, producida por transferencia protónica de la amida SAC a CIP.

9.3. CODEX

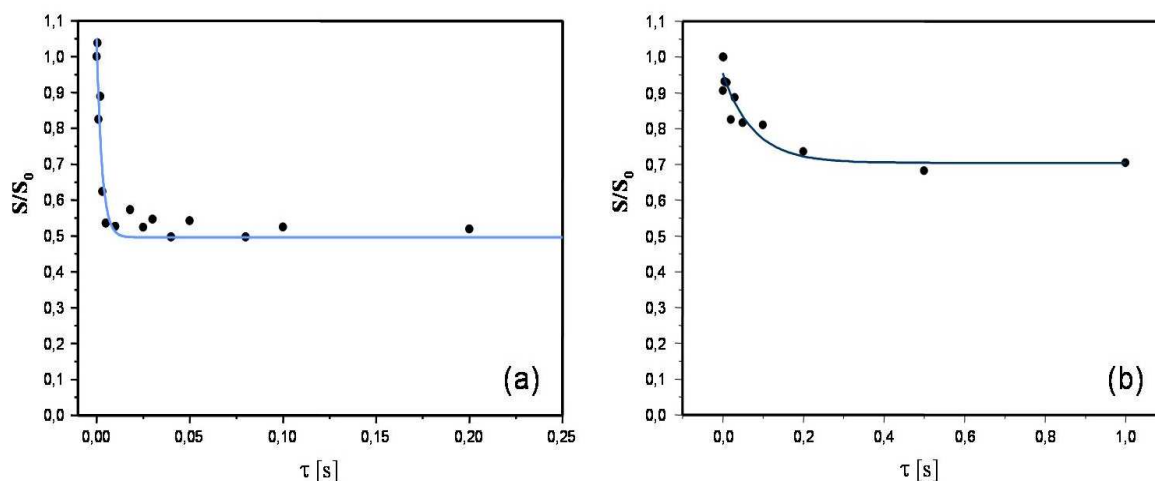
Como mencionamos anteriormente, debido a las ventajas que presenta el núcleo de ^{19}F , decidimos realizar un experimento de reacople de CSA para determinar distancias internucleares. De las distancias entre distintos núcleos de ^{19}F en la estructura cristalina determinada por DRX de monocristal pudimos determinar el valor para $F_{ij}(0)$ (ver sección 4.3) que posteriormente empleamos para determinar las distancias entre núcleos de ^{19}F de CIP y SAC-CIP (I).

Tabla 9.6: Correlaciones homonucleares en SAC-CIP (I).

SAC-CIP (I) Correlación	$\omega_A + \omega_B$ ppm
H(1b)-H(1c)	-1.9 0.9 3.3
H(1c)-Aromáticos	8.3
H(1b)-Aromáticos	8.8
H(1a)-Aromáticos	9.3
H(1b)-SAC	9.9
SAC-Aromáticos	13.5
NH-Aromáticos	18.2
Pip-Pip	6.6
SAC-SAC	15.4

Los gráficos 9.13 y 9.14 muestran los resultados para los distintos compuestos. Para SAC-CIP (I) cada una de las líneas fue analizada de manera individual, de esa manera obtuvimos las distancias correspondientes a cada núcleo de flúor de cada una de las moléculas presentes en la celda asimétrica.

Los resultados se ajustaron de acuerdo a la ecuación 4.21.

**Figura 9.13:** Codex en (a) SAC-CIP (II) y (b) CIP.

La distancia que obtuvimos de la estructura cristalina de SAC-CIP (II) es de 3.0 Å. Para CIP encontramos una distancia internuclear de 5.0 Å. Para los tres sitios diferentes

de SAC-CIP (I) encontramos distintas distancias. Para la línea de resonancia que se encuentra a -119.8 ppm encontramos una distancia de 4.5 Å. Para la línea central (-126.8 ppm) encontramos una distancia internuclear de 3.2 Å y finalmente, para la señal a -129.7 ppm podemos determinar una distancia de 4.6 Å. El error en las determinaciones experimentales es de ± 0.5 Å.

Como podemos notar, una de las distancias en SAC-CIP (I) se asemeja a la distancia presente en el monocristal. Las otras dos son similares a la que encontramos para CIP. Esto nos está confirmando la existencia de una mezcla de estructuras cristalinas en SAC-CIP (I), una de las estructuras similar a la de SAC-CIP (II) y la otra muy similar a CIP.

9.4. Difracción de Rayos-X de monocristal

Los patrones de difracción de RX en polvo para los polimorfos (I) y (II) muestran claras diferencias (ver figura 9.15), confirmando que son diferentes formas cristalinas. La tabla 9.7 presenta los datos cristalográficos y los resultados refinados de SAC-CIP (II), mientras que la figura 9.16 muestra una vista de la celda asimétrica, así como la interacción puente hidrógeno que define los dos círculos cerrados S11 (6) obstaculizando algunos grados de libertad torsionales (Bernstein et al., 1995).

Las distancias de ligadura y los ángulos presentes en la molécula son normales, la geometría general no se desvía significativamente de las estructuras previamente reportadas, como muestra el ajuste por cuadrados mínimos de la unidad de CIP en el sacarinato SAC-CIP (II) (figura 9.17).

La mayor diferencia con las estructuras relacionadas de CIP reside en las interacciones de empaquetamiento, que en el caso de SAC-CIP (II) están definidas por puentes hidrógenos convencionales (O-H...O, N-H...O y N-H...N) y no convencionales (C-H...O), así también como por interacciones π - π (ver tabla 9.8, tabla 9.9 y figura 9.16). La más fuerte de todas estas son los puente hidrógeno convencionales (primeras 4 entradas en la tabla 9.8). La primera O18-H18...O19 es intramolecular, teniendo al oxígeno del carbonilo como aceptor y definiendo uno de los dos círculos S11 (6) en la estructura (el otro está definido por el puente hidrógeno C12-H12B...F20).

La segunda, N14-H14A...N21 conecta las dos moléculas de referencia en una única unidad (figura 9.16). Las dos interacciones remanentes involucran al átomo de nitrógeno positivamente cargado del grupo Pip en CIP y los oxígenos del grupo S(22)=O en el ión de SAC, para definir la estructura columnar construida en torno a una familia de centros de simetría a $x = 0.25$, $z = 0.25$ (en negrita en la figura 9.16).

Estas estructuras columnares se acercan unas a otras con los anillos aromáticos intercalados de la unidad de CIP en una interacción π - π típica definiendo estructuras 2d paralelas a (001). Ligaduras débiles y no convencionales C-H...O conectan estas estructuras a lo largo de c .

Con respecto a las interacciones en el sacarinato, el fuerte puente hidrógeno que involucra al grupo S(22)=O como aceptor y que tiene al N(14) protonado del grupo Pip

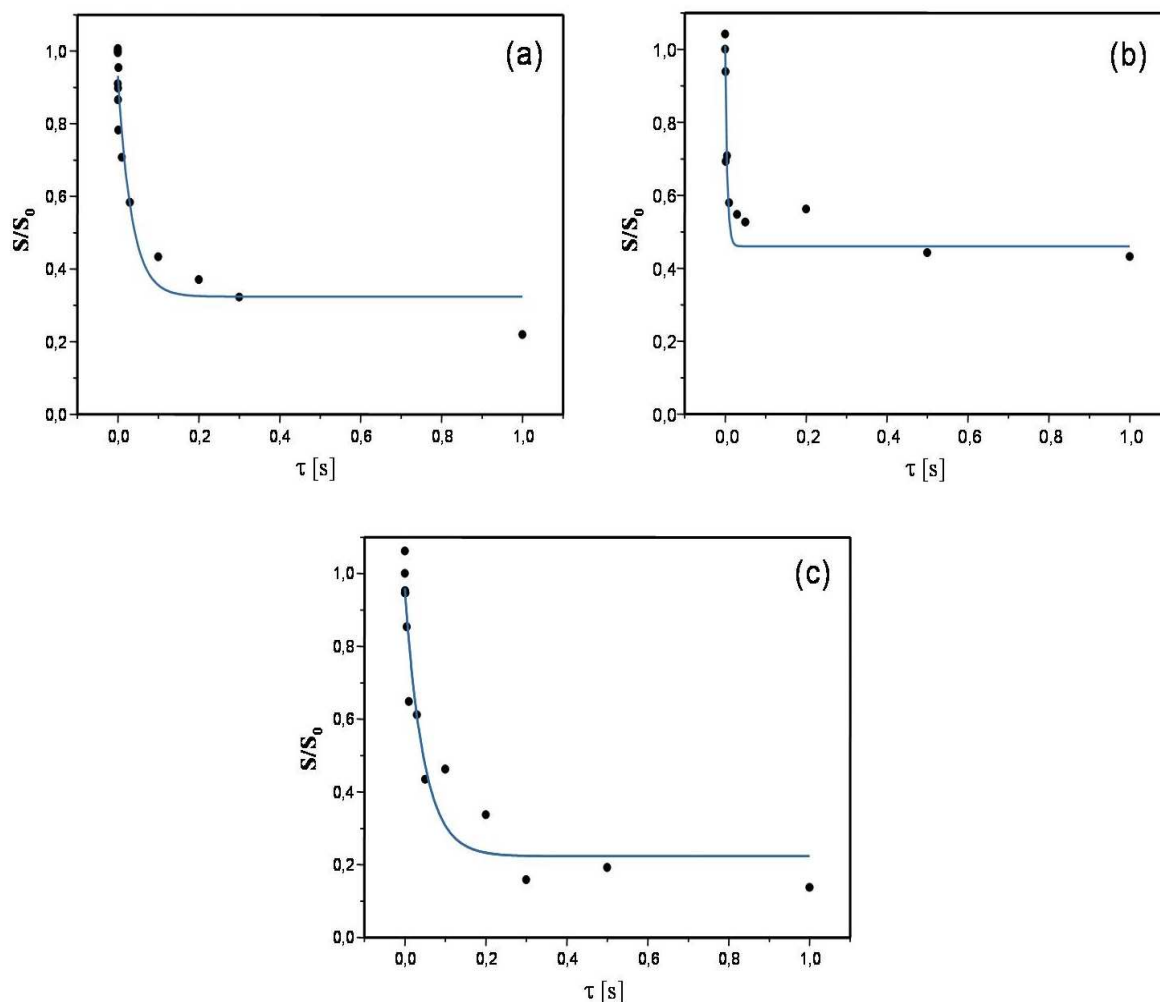


Figura 9.14: *Codex en SAC-CIP (I): (a) Señal a -119.8 ppm, (b) Señal a -126.8 ppm y (c) Señal a -129.7 ppm.*

como donador ha sido informado previamente en otras sales de sacarinatos (Bhatt et al., 2005). Este comportamiento contrasta con el de la SAC pura, en donde la interacción intermolecular que involucra los oxígenos del grupo $S(22)=O$ son significativamente débiles (Wardell et al., 2005). Además, $C(29)$ está involucrado en un puente hidrógeno con uno de los protones del $N(14)$ como se muestra en la figura 9.16 mientras que en la SAC pura esta interacción es con los protones aromáticos de las moléculas vecinas de SAC (Wardell et al., 2005).

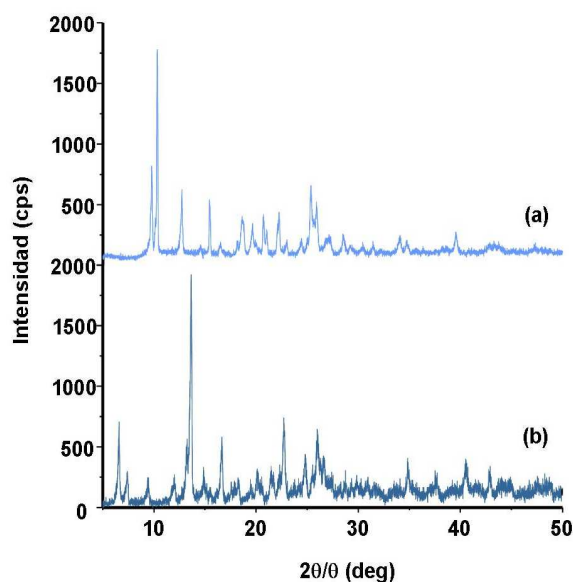


Figura 9.15: Patrones de difracción de rayos X de polvo de (a) SAC-CIP (I) y (b) SAC-CIP (II).

9.5. Métodos Térmicos de Análisis

La figura 9.18 muestra los resultados de los experimentos de DSC y TGA para SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II). Para SAC-CIP (II), podemos ver que el DSC muestra una endoterma a 305.50°C, correspondiente a su punto de fusión (onset 301.29 °C), seguido de una exoterma a 310.06 °C atribuido a la descomposición del fármaco. La entalpía de fusión es 372.9 J/g. SAC-CIP (I) muestra un perfil similar, pero con un punto de fusión ligeramente más bajo 300.87 °C, onset 298.60 °C), y una entalpía de fusión de 191.7 J/g. Ambos hechos sugieren una interacción molecular más débil en (I) que en (II). Este hecho concuerda con los resultados de las distancias internucleares de ^{19}F obtenidos utilizando el experimento CODEX, en donde se observan distancias internucleares mayores para SAC-CIP (I), indicando interacciones más débiles. También podemos llegar a esta conclusión observando las correlaciones homonucleares de los espectros bidimensionales de DQMAS ^1H - ^1H , en ellos podemos notar un patrón de interacciones más definidas en SAC-CIP (II), indicando mayor proximidad entre los núcleos involucrados en la correlación.

No se observa pérdida de masa en ninguno de los perfiles cuando los compuestos son calentados desde los 30 °C hasta fusión, mostrando su naturaleza anhidra, como así también la ausencia de SAC y CIP sin reaccionar.

Tabla 9.7: Datos cristalográficos para SAC-CIP (II).

Fórmula empírica	$(C_{17}H_{19}FN_3O_3)^+(C_7H_4NO_3S)^-$
Fórmula wt	514.52
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	C2/c
a (Å)	37.416(2)
b (Å)	6.9051(4)
c (Å)	19.5718(12)
α (°)	90
β (°)	114.5161(10)
γ (°)	90
V(Å³)	4600.7(5)
Z	8
ρ_{calcd} (gcm ⁻³)	1.486
μ (cm ⁻¹)	0.199
F₀₀₀	2144
Index range (h, k, l)	$-48 \leq h \leq 47, -9 \leq k \leq 8$ $-25 \leq l \leq 25$
Reflexiones	18341, 5092(0.0327), 3610
R1^a, wR2^b F² > 2σ(F²)	R1 = 0.0657, wR2 = 0.1679

Tabla 9.8: Puentes hidrógeno para SAC-CIP II (Å y °). Transformaciones de simetría utilizadas para generar los átomos equivalentes: #1 $-x+1/2, -y+3/2, -z+1$; #2 $x, y+1, z$; #3 $x, 1-y, 1/2+z$; #4 $-x, 1-y, 1-z$; #5 $-x, y, 3/2-z$.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
0(18)-H(18)...O(19)	0.83(3)	1.74(3)	2.554(3)	158(4)
N(14)-H(14)A...N(21)	0.90	1.94	2.784(3)	155
N(14)-H(14)B...O(30)#1	0.90	2.26	2.974(4)	136
N(14)-H(14)B...O(31)#2	0.90	2.20	2.881(4)	132
C(12)-H(12)B...F(20)	0.97	2.24	2.890(4)	124
C(1b)-H(1b)A...O(32)#3	0.97	2.46	3.293(4)	144
C(1b)-H(1b)B...O(19)#4	0.97	2.27	3.232(4)	171
C(1c)-H(1c)B...O(17)#5	0.97	2.45	3.104(4)	124

9.6. FTIR

La tabla 9.10 muestra los patrones de FTIR para SAC-CIP (I) y (II), junto a los de CIP y SAC. Las bandas de absorción características de SAC y CIP pueden observarse

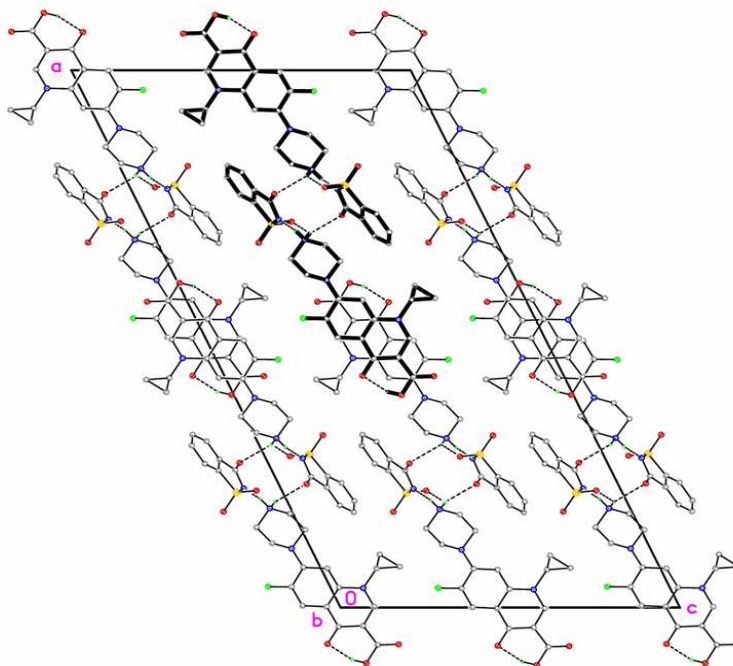


Figura 9.16: Celda unidad asimétrica de SAC-CIP (II). Se muestra una típica interacción π - π definiendo estructuras paralelas bidimensionales paralelas a (001). En negrita, una estructura columnar construida en torno a una familia de centros de simetría a $x = 0.25$, $z = 0.25$.

Tabla 9.9: Interacciones π - π para SAC-CIP (II) (\AA y $^\circ$). *icd*: distancia intercentroide, *da*: ángulo dihedral, *ipd*: distancia interplanar. *Cg1*: N1,C2,C3,C4,C10,C9; *Cg2*: C5,C6,C7,C8,C9,C10. #1 = $-x, 1-y, 1-z$; #2 = $-x, 2-y, 1-z$.

<i>Cg</i> ... <i>Cg</i>	<i>icd</i> (\AA)	<i>da</i> ($^\circ$)	<i>ipd</i> (\AA)
<i>Cg1</i> ... <i>Cg1</i> #1	3.7736(14)	0.00	3.515
<i>Cg1</i> ... <i>Cg1</i> #2	3.5271(14)	0.00	3.375
<i>Cg1</i> ... <i>Cg2</i> #1	3.7639(15)	0.17	3.511
<i>Cg1</i> ... <i>Cg2</i> #2	3.8210(15)	0.17	3.379

claramente. No se observan diferencias significativas entre los patrones de FTIR de las dos formas polimórficas.

En ambos casos, se obtiene evidencia de la interacción iónica siguiendo los picos correspondientes a los estiramientos de CON(21)-H y C(29)=ONH de la amida secundaria a 3093 cm^{-1} y 1725 cm^{-1} respectivamente. La ausencia de la banda de CON(21)-H y el corrimiento batocrómico de C(29)=ONH son evidencias de la formación de la sal por

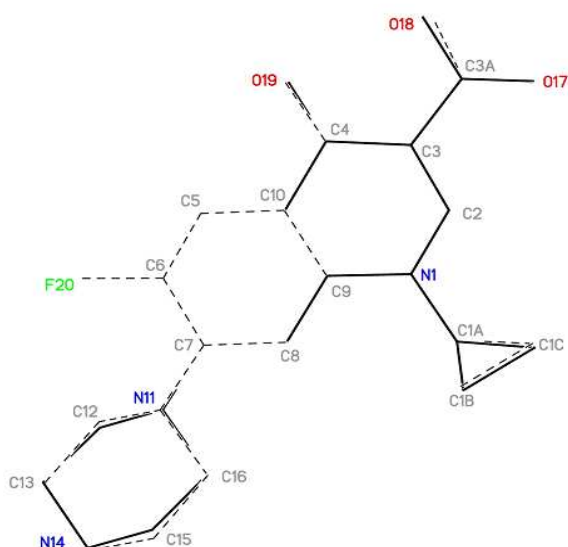


Figura 9.17: Ajuste por cuadrados mínimos de la unidad de CIP en SAC-CIP (II) con respecto a la unidad de CIP en Ciprofloxacina hexahidato.

Tabla 9.10: Datos de FTIR para SAC, CIP y ambos sacarinatos. np, no presenta. * en la sal sódica.

grupo	SAC	CIP	SAC-CIP (I)	SAC-CIP (II)
ν C-H Olefinicos y aromáticos	-	3046	3027	3025
ν C(3)=OOH	-	np	1734	1732
ν C(4)=O <i>ceto</i>	-	1627	1630	1630
νt C(29)=ONH	1725	-	-	-
νt C(29)=ON ⁻	1647*	-	1666	1662
νf CON(21)=H	3039	-	np	np
ν_{sym} S(22)=O	1180	-	1148	1145
ν_{asym} S(22)=O	1338	-	1338	1338

transferencia protónica de la amida SAC a CIP. Estos resultados están de acuerdo con reportes realizados por otros autores y coinciden con el patrón observado en estos grupos funcionales en SAC sódica (Binev et al., 1996; Yilmaz et al., 2001). Comparada con la SAC libre, el corrimiento batocrómico del pico de S22=O mencionado anteriormente para SAC-CIP (I), asociado a la interacción puente hidrógeno en la estructura cristalina de la sal, también se observa en SAC-CIP (II). La banda C3a=OOH que no está presente en CIP debido a su carácter zwitteriónico puede ser observado en SAC-CIP (I) y SAC-

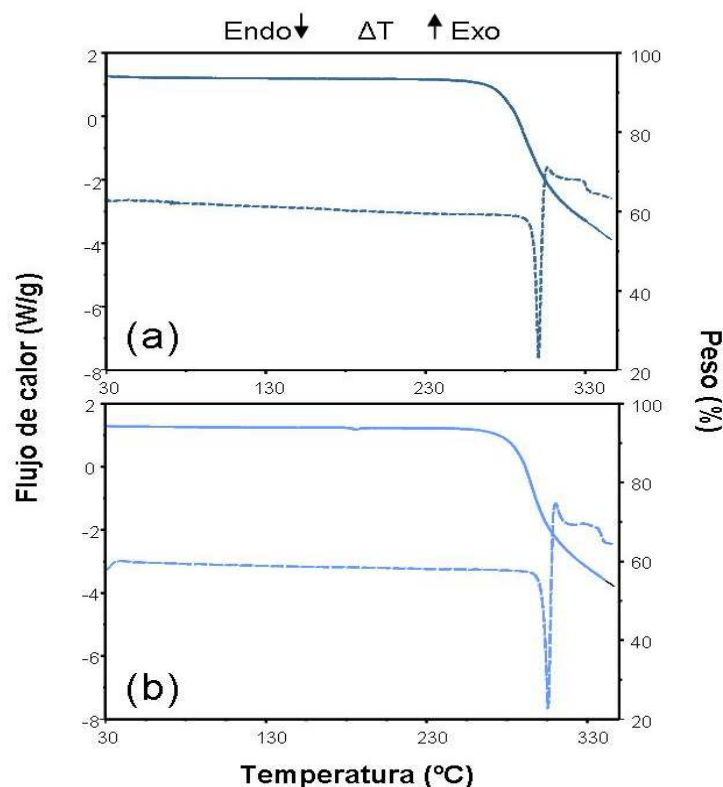


Figura 9.18: DSC (línea de punto) y TG (línea sólida) para (a) SAC-CIP (I) y (b) SAC-CIP (II).

CIP (II) a la misma frecuencia, sugiriendo que la naturaleza de CIP es revertida con la formación de la sal en ambos polimorfos por transferencia protónica de SAC.

9.7. Discusión y conclusiones

El polimorfo del sacarinato de ciprofloxacina (SAC-CIP (II)) fue caracterizado por varias técnicas de estado sólido. Su estructura cristalográfica fue determinada por DRX de cristal. La combinación de las técnicas de estado sólidas empleadas (RMN, FTIR, DSC, TG, DRXP) junto con los datos cristalográficos permitieron identificar cada una de las formas sólidas del sacarinato. Los datos mostraron que el nuevo polimorfo es una sal anhidra estable con interacciones inter e intra moleculares típicas desde el punto de vista cristalográfico.

Los resultados de DRXP nos permitieron determinar que los sólidos son cristalinos, hecho confirmado también por los espectros de ^{13}C de RMN en estado sólido.

El análisis térmico demostró la ausencia de SAC sin reaccionar y la naturaleza anhidra

del compuesto.

En SAC-CIP (II), así como habíamos visto en el capítulo anterior para SAC-CIP (I), se obtuvo evidencia de la interacción iónica entre SAC y CIP mostrando que la formación de la sal se produce por transferencia protónica de la amida SAC a CIP.

También pudimos ver que en este caso, de la misma manera que para SAC-CIP (I), el carácter zwitteriónico de CIP es revertido luego de la formación de la sal.

Las similitudes en las características generales, como por ejemplo en los espectros de FTIR y los corrimientos químicos observado en los espectros de ^{13}C de estado sólido sugiere que el esquema de interacciones encontrado para SAC-CIP (II) puede aplicarse también para SAC-CIP (I).

Los espectros de ^1H y ^{15}N demostraron ser herramientas muy útiles para identificar las dos formas polimórficas, como así también para detectar la cantidad de moléculas por celda unidad asimétrica.

La interacción iónica entre la molécula de CIP y SAC también pudo ser observada en los espectros de ^1H de alta resolución (corrimiento del protón NH), y en la ausencia de la correlación entre NH y los protones de Pip en los espectros de DQMAS de los sacarinos. Notamos también que los protones y el nitrógeno del grupo piperazina no se ven afectados por la interacción iónica debido al carácter zwitteriónico de CIP.

Las predicciones realizadas por DRX de cristal para SAC-CIP (II) fueron observadas en las correlaciones ^1H - ^1H y en los experimentos de correlación heteronuclear REPT-HSQC. En particular, los puentes hidrógeno intramoleculares, las proximidades intermoleculares y las interacciones π - π .

Analizando los espectros de DQMAS, vemos que CIP presenta otro patrón de correlaciones cuando se lo compara con SAC-CIP (II). SAC-CIP (I) muestra características de ambas estructuras, así también como nuevas correlaciones.

Los resultados obtenidos por métodos térmicos de análisis no detectan la coexistencia de dos formas polimórficas. Sin embargo, esto no es extraño, ya que si las dos componentes que forman el compuesto tienen estructuras cristalinas similares, no se aprecian modificaciones, por ejemplo, en su temperatura de fusión, ya que la diferencia entre estas temperaturas es muy pequeña, y se encuentra dentro del error experimental.

Todo lo dicho previamente nos permite decir que SAC-CIP (I) es una mezcla de polimorfos, pero no es simplemente la mezcla de CIP y SAC-CIP (II). Por ejemplo, la señal asignada a N(1), que se observa a -251.5 ppm en CIP, no está presente en SAC-CIP (I). El corrimiento de las señales de los protones del grupo ciclopropilo hacia ppm negativos es también una muestra del cambio en el empaquetamiento local en esta región de la molécula.

De esta manera, concluimos que SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II) muestran similitud en la conformación molecular. El empaquetamiento cristalino desconocido de SAC-CIP (I) muestra que posee una componente con la estructura cristalina de SAC-CIP (II) y una componente con un empaquetamiento similar al de CIP.

Capítulo 10

Conclusiones

El objetivo de esta tesis fue el análisis y la caracterización de nuevos compuestos de interés farmacéutico mediante técnicas avanzadas de RMN en estado sólido.

Además de los resultados obtenidos mediante esta poderosa técnica, contamos con datos provenientes de otros estudios realizados sobre los nuevos compuestos sólidos, Difracción de rayos X de polvo y de monocristal, Análisis Térmico (DSC y TG) y FTIR.

Este trabajo estuvo dividido en tres partes, no sólo porque estudiamos tres conjuntos de fármacos diferentes sino también para mostrar en forma cronológica el avance de la investigación.

Complejos Fluoroquinolónicos con ^{27}Al

Se realizaron varios experimentos de RMN en estado sólido sobre estos nuevos complejos. Los espectros de CPMAS de ^{13}C mostraron que los corrimientos químicos de los complejos preparados por los Métodos I y II tienen similitudes y muestran el mismo comportamiento.

Los complejos Fluoroquinolónicos mostraron ensanchamientos de las líneas de resonancia, debido a la estequiometría de los mismos (3 moléculas de Ciprofloxacina por átomo de aluminio) y al carácter amorfo de los nuevos compuestos, hecho que fue confirmado por los difractogramas de DRXP.

Un resultado importante obtenido mediante RMN de estado sólido fue que en ningún caso quedó IFA puro sin reaccionar.

Pudimos determinar la naturaleza amorfa y físicamente heterogénea de los complejos con ^{27}Al , tanto de CIP como de NOR, mediante mediciones de tiempos de relajación en la terna rotante $T_{1\rho}$. Los resultados mostraron la coexistencia de al menos dos fases con diferentes movilidades, una asociada con una fase cristalina y la otra a una fase amorfa. Pudimos observar que los $T_{1\rho}$ de los complejos obtenidos por el Método I son más cortos que los correspondientes a los complejos obtenidos por el Método II. Este hecho es asociado a una cristalinidad mayor en los compuestos elaborados por el Método II.

De los experimentos de RMN y de FTIR pudimos determinar que la reacción entre las FQs y el aluminio es completa. En todos los complejos, los mismos átomos son los

involucrados en el acomplejamiento. En particular, de los espectros de RMN de ^{27}Al observamos una coordinación octahédrica del ion de aluminio en todos los complejos y los espectros de FTIR mostraron que la coordinación del aluminio es a través del grupo 4-CO y del 3-COOH. Estas observaciones permitieron concluir que los compuestos obtenidos por el Método I y el II son químicamente los mismos.

Las diferencias observadas en los espectros de RMN de estado sólido de ^{27}Al se deben a la diferencia en la interacción cuadrupolar de segundo orden presente en los compuestos y también probablemente a pequeños cambios en la conformación molecular.

Sacarinatos Fluoroquinolónicos

Comenzamos el estudio de esta serie de sales fluoroquinolónicas mediante técnicas de RMN en estado sólido realizando espectros de CPMAS de ^{13}C . De los mismos podemos extraer muchas conclusiones. Por un lado, se confirmó la utilidad de SAC como un agente formador de sales. Además, se puede concluir que las FQ-SACs son sólidos cristalinos, hecho también confirmado por los resultados obtenidos del análisis de los resultados de DRXP.

La presencia de nuevas reflexiones en los patrones de DRXP y de nuevas resonancias en los espectros de CPMAS de ^{13}C nos indican la formación de nuevos compuestos, diferentes a sus precursores. Este hecho también pudo observarse de los puntos de fusión de las FQ-SACs. Los experimentos de TGA dieron evidencia acerca de la ausencia de SAC sin reaccionar, así como de la naturaleza anhidra de los sacarinos.

En todos los compuestos estudiados pudimos observar, mediante cambios en los corrimientos químicos de los sacarinos, que las sales no son la mezcla física de sus precursores. Los espectros de CPMAS de ^{13}C nos permitieron afirmar que no quedaron restos ni de fármaco puro ni de sacarina sin reaccionar.

Los espectros de FTIR mostraron una composición multicomponente de las FQ-SACs. Por otro lado, estos espectros dieron clara evidencia de la formación de la sal por transferencia protónica de la amida SAC a las FQs.

Los espectros 1D y 2D obtenidos por RMN de las FQ-SACs muestran claros cambios en la multiplicidad y los corrimientos químicos en las resonancias de las regiones de las Fluoroquinolonas cercanas a la zona de ligadura con la SAC. A excepción de CIP, que muestra un comportamiento diferente al de las otras FQs.

Ciprofloxacina mostró un comportamiento diferente al resto de las Fluoroquinolonas, tanto es su espectro de CPMAS de ^{13}C , como en el espectro de correlación heteronuclear.

En los sacarinos, la zona de la molécula involucrada en la formación de la sal muestra importantes modificaciones, en especial los carbonos pertenecientes al anillo piperazina. En el sacarinato de Ciprofloxacina no se observa este comportamiento. Este hecho, sumado al hecho de que las señales de los carbonos C(4) y C(3a) aparecen superpuestas en la misma posición de resonancia no hizo pensar que CIP posea un carácter zwitteriónico. Esta idea se vio confirmada por los espectros de correlación heteronuclear bidimensionales, en donde claramente se nota la ausencia del protón del grupo carboxilo, presente en los demás compuestos puros.

Los espectros de FTIR y los espectros de RMN nos permitieron determinar que el carácter zwitteriónico de CIP es revertido luego de la formación de la sal.

Polimorfismo en SAC-CIP

Caracterizamos un polimorfo del sacarinato de Ciprofloxacina (SAC-CIP (II)) por varias técnicas de estado sólido. Pudimos obtener su estructura cristalina mediante DRX de monocristal.

La combinación de las técnicas de estado sólidas empleadas (RMN, FTIR, DSC, TG, DRXP) junto con los datos cristalográficos nos permitieron identificar claramente cada una de las formas sólidas del sacarinato.

Los resultados de DRXP nos permitieron determinar que los sólidos son cristalinos, hecho confirmado también por los espectros de ^{13}C de RMN en estado sólido.

El análisis térmico demostró la ausencia de SAC sin reaccionar y la naturaleza anhidra del nuevo compuesto.

En SAC-CIP (II), así como habíamos visto en el capítulo anterior para SAC-CIP (I), se obtuvo evidencia de la interacción iónica entre SAC y CIP mostrando que la formación de la sal se produce por transferencia protónica de la amida SAC a CIP.

También pudimos ver que en este caso, de la misma manera que para SAC-CIP (I), el carácter zwitteriónico de CIP es revertido luego de la formación de la sal.

Continuando con el análisis del polimorfismo, realizamos experimentos para obtener espectros de CPMAS ^{15}N . El número de líneas de resonancia de ^{15}N nos dio una evidencia directa de la presencia de más de una molécula por celda unidad asimétrica en SAC-CIP (I), o la cristalización en dos redes cristalinas diferentes. El hecho de que el corrimiento químico asignado al sitio N(14) no sea alterado luego de la formación de la sal es otro indicativo del carácter zwitteriónico de CIP.

Obtuvimos espectros de alta resolución de ^1H en estado sólido a muy altas velocidades de rotación. En los mismos pudimos observar la interacción iónica entre la molécula de CIP y SAC (corrimiento del protón NH). Notamos también que los protones y el nitrógeno del anillo piperazina no se ven afectados por la interacción iónica debido al carácter zwitteriónico de CIP. En el espectro de ^1H de SAC-CIP (I) se observa un corrimiento a ppm negativos de los protones pertenecientes al grupo ciclopropilo debido a la proximidad espacial con los grupos aromáticos que generan corrientes de anillos que perturban los corrimientos químicos de estos protones. Este comportamiento no se observa en SAC-CIP (II), indicando una diferencia sustancial en la estructura cristalina de los compuestos.

Las predicciones realizadas por DRX de monocristal para SAC-CIP (II) fueron observadas en las correlaciones ^1H - ^1H y en los experimentos de correlación heteronuclear REPT-HSQC. En particular, los puentes hidrógeno intramoleculares, las proximidades intermoleculares y las interacciones π - π .

Analizando los espectros de DQMAS, vemos que CIP presenta otro patrón de correlaciones cuando se lo compara con SAC-CIP (II). SAC-CIP (I) muestra características de ambas estructuras, así también como nuevas correlaciones.

Los resultados obtenidos de los espectros de RMN de ^{19}F nos permitieron determinar

distancias internucleares en los distintos compuestos. La distancia que obtuvimos de la estructura cristalina de SAC-CIP (II) fue de 3.0 Å. Del experimento de reacople de CSA obtuvimos para CIP una distancia internuclear de 5.0 Å. El espectro de ^{19}F de SAC-CIP (I) mostró tres líneas de resonancia. Cada una de estas líneas fue analizada por separado y encontramos distancias de 4.5 Å, 3.2 Å y 4.6 Å.

Todo lo dicho previamente nos permite decir que SAC-CIP (I) es una mezcla de polimorfos, pero no es simplemente la mezcla de CIP y SAC-CIP (II). Por ejemplo, la señal asignada a N(1), que se observa a -251.5 ppm en CIP, no está presente en SAC-CIP (I).

El corrimiento de las señales de los protones del grupo ciclopropilo hacia ppm negativos es también una muestra del cambio en el empaquetamiento local en esta región de la molécula.

De esta manera, concluimos que SAC-CIP (I) y SAC-CIP (II) muestran similitud en la conformación molecular. El empaquetamiento cristalino desconocido de SAC-CIP (I) muestra que posee una componente con la estructura cristalina de SAC-CIP (II) y una componente con un empaquetamiento similar al de CIP.

Sin embargo, as similitudes en las características generales, como por ejemplo en los espectros de FTIR y los corrimientos químicos observado en los espectros de ^{13}C de estado sólido sugiere que el esquema de interacciones encontrado para SAC-CIP (II) puede aplicarse también para SAC-CIP (I).

En resumen, estudiamos diversos sistemas de interés farmacéutico. Determinamos el carácter amorfo de los complejos fluoroquinolónicos con aluminio y pudimos realizar un análisis completo de los mismos.

Hemos visto que los corrimientos químicos de los compuestos en estado sólido pueden proveer mucha información cristalográfica, complementaria a los resultados que se pueden obtener mediante técnicas de difracción. Pudimos no sólo identificar distintos polimorfos, sino también realizar una caracterización detallada de los mismos, llegando a identificar la naturaleza heterogénea de uno de los compuestos y extrayendo información sobre su estructura cristalina e interacciones.

A lo largo de esta tesis, hemos mostrado la importancia de la RMN de estado sólido para el análisis de compuestos farmacéuticos en estado sólido.

Apéndice A

Apéndice

A.1. Algunas definiciones

En esta parte del apéndice vamos a definir algunos de los términos empleados a lo largo de esta tesis.

Ácidos Carboxílicos

Los ácidos carboxílicos se caracterizan por la presencia de al menos un grupo carboxilo. La fórmula general de un ácido carboxílico es $R\text{-COOH}$, donde R es algún grupo funcional monovalente. Un carboxilo es un grupo funcional que consiste en un carbonilo y un hidroxilo, que tiene la fórmula -C(=O)OH , usualmente escrito como -COOH o $\text{-CO}_2\text{H}$.

Amida

Compuesto orgánico cuyo grupo funcional es del tipo $R\text{CONRR}$, siendo CO un carbonilo, N un átomo de nitrógeno, y R , R y R radicales orgánicos o átomos de hidrógeno. Se puede considerar como un derivado de un ácido carboxílico por sustitución del grupo -OH del ácido por un grupo -NH_2 , -NHR o -NRR (llamado grupo amino).

Anillo Piperazina

Compuesto orgánico que consiste en un anillo de seis miembros que contiene dos átomos de nitrógeno opuestos.

Cetona

Compuesto con estructura $R\text{C(=O)R'}$, donde R y R' pueden ser una gran variedad de átomos y grupos de átomos.

Denticidad

Se refiere al número de átomos en una ligadura simple que se une a un átomo central en un complejo de coordinación. En muchos casos, sólo un átomo en el ligando se une al metal, de esa manera la denticidad es igual a uno, y se dice que el ligando es monodentado. Ligandos con más de un átomo ligado son llamados polidentados o multidentados.

Interacciones π - π

En química supramolecular, una interacción aromática (o interacción π - π) es una interacción no covalente entre compuestos orgánicos que contienen entidades aromáticas. Las interacciones π - π son causadas por la superposición de los orbitales π en los sistemas conjugados π , así que se hacen más fuertes conforme el número de electrones π se incrementa. Otras interacciones no covalentes incluyen al enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones de transferencia de carga, e interacciones dipolo-dipolo.

Por otra parte, en química supramolecular, también se habla de apilamiento y este se refiere a un ordenamiento en pila, frecuentemente de moléculas aromáticas, que es adoptado debido a interacciones interatómicas. El ejemplo más común de un sistema apilado se encuentra en los pares de bases consecutivos de ADN. El apilamiento también se encuentra frecuentemente en proteínas, donde dos anillos relativamente no polares se ubican uno sobre otro.

El apilamiento es referido frecuentemente como una interacción π - π , aunque los efectos debido a la presencia de un orbital π son sólo una fuente de tales interacciones, y en muchos casos no parece ser el contribuyente dominante.

Quelato

Compuesto químico en la forma de un anillo heterocíclico, conteniendo un metal iónico adjuntado por ligaduras de coordinación en al menos dos iones no metálicos. Quelación es la formación o la presencia de dos o más uniones separadas entre un ligando polidentado y un átomo central simple. Usualmente, estos ligandos son compuestos orgánicos.

Zwitterión

Un zwitterión (del alemán zwitter híbrido, hermafrodita) es un compuesto químico que es eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes. Los zwitteriones son especies polares y usualmente presentan una elevada solubilidad en agua y bastante baja en muchos disolventes orgánicos de carácter apolar.

En química, un compuesto dipolar es un compuesto que existe en al menos una forma estable, el zwitterión, con una carga positiva y una carga negativa formal en diferentes átomos y la carga neta total del compuesto es cero.

A.2. Detalles Experimentales

A.2.1. Espectros de RMN de ^{13}C

Las mediciones de los espectros de ^{13}C se obtuvieron con la secuencia de pulsos de CPMAS con rampa y desacople de protones durante la adquisición (ver figura 3.6). Estos experimentos se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance II, donde los núcleos de ^1H resuenan a 300 MHz, y los ^{13}C a 74.5 MHz. (lo que corresponde a un campo magnético de 7.02 T) equipado con un cabezal de MAS de 4mm. Para la referencia externa de ^{13}C y la calibración de la condición de Hartmann-Hahn se utilizó adamantano. La velocidad de rotación empleada en estos experimentos fue de 10 kHz. El tiempo de contacto para la CP fue de 2 ms. Para las distintas muestras estudiadas se realizaron diferentes números de promediaciones, en el rango de 1500-6000. La secuencia empleada para el desacople heteronuclear fue la TPPM, el campo de rf aplicado a protones fue de 60 kHz.

Los espectros de edición de carbonos cuaternarios fueron obtenidos con la secuencia de pulsos que se muestra en la figura 3.9. Los parámetros empleados son los mismos que los utilizados para obtener el espectro completo de ^{13}C , pero el tiempo de contacto en este caso fue de 500 μs . El tiempo previo a la adquisición cuando los campos de rf están apagados fue de 40 μs .

A.2.2. Espectros de RMN de ^{27}Al

Las mediciones de los espectros de ^{27}Al que se llevaron a cabo a lo largo de este trabajo fueron realizadas en un espectrómetro Bruker Avance II, donde los núcleos de ^1H resuenan a 300 MHz, y el ^{27}Al a 78.2 MHz., lo que corresponde a un campo magnético de 7.02 T. Las muestras fueron rotadas a 6 kHz y a 4 kHz para reconocer las bandas rotacionales. Se utilizó un pulso de $\frac{\pi}{2}$ de 2 μs ., 4 s. de tiempo de reciclado y 600 promedios.

A.2.3. Espectros de RMN de ^{19}F

Los experimentos RMN de ^{19}F fueron realizados en el Institute Le Bel, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France. Estos experimentos se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance II, donde los núcleos de ^1H resuenan a 500 MHz, y los ^{19}F a 470.59 MHz equipado con un cabezal de MAS de 2.5 mm. La velocidad de rotación empleada en estos experimentos fue de 18 kHz. Para las distintas muestras se realizaron 8 promediaciones, con un tiempo de espera de 50s. Se utilizó un pulso de $\frac{\pi}{2}$ de 2.37 μs .

A.2.4. Espectros de RMN de ^{15}N

Los espectros unidimensionales de ^{15}N fueron realizados utilizando CPMAS de ^1H - ^{15}N en un Bruker Avance II operando a 300 MHz para ^1H y equipado con un cabezal de 4mm. La frecuencia de Larmor de ^{15}N es de 30.42 MHz. Como referencia externa se

utilizó Cloruro de Amonio y para la calibración de la condición de Hartmann-Hahn se empleó glicina. La velocidad de rotación fue de 10 kHz. Diferentes números de promediaciones fueron realizadas, de manera de obtener una buena relación señal-ruido. El tiempo entre experimentos fue de 15 s. y el tiempo de contacto para la CP de 6 ms. La secuencia de desacople heteronuclear TPPM fue utilizada durante la adquisición con un campo de rf aplicado a protones de 50 kHz.

A.2.5. Espectros de RMN de alta resolución de ^1H en estado sólido

Los experimentos de alta resolución en ^1H se realizaron en el Max Planck Institute for Polymer Research, en Mainz, Alemania. En un Avance II+, con una frecuencia de resonancia para ^1H de 850 MHz.

Los experimentos unidimensionales se realizaron a una velocidad de rotación de 30 kHz utilizando un cabezal de doble resonancia de 2.5 mm. El pulso de $\frac{\pi}{2}$ fue de 2.5 μs , y el tiempo entre experimentos de 10 s. Se tomaron 8 promediaciones para cada espectro.

Los espectros unidimensionales de ^1H realizados a una velocidad de rotación de 60 kHz se realizaron en un cabezal de doble resonancia con rotores de 1.3 mm. de diámetro. El pulso de $\frac{\pi}{2}$ fue de 1.2 μs , y el tiempo entre experimentos de 20 s. Se tomaron 4 promediaciones para cada espectro.

A.2.6. Experimentos de tiempos de relajación

Los espectros fueron realizados con los parámetros especificados para la secuencia de CPMAS de ^{13}C a una velocidad de rotación de 10 kHz. El campo de spin-lock de carbono fue realizado a $\frac{\omega_{1\text{C}}}{2\pi}=53$ kHz. El tiempo τ fue variado desde 20 μs a 15 ms. El tiempo de contacto entre ^1H y ^{13}C fue de 80 μs , lo suficientemente corto como para evitar la difusión de espín entre protones.

A.2.7. HETCOR-LG

En nuestros experimentos la duración τ se optimizó a 7.68 μs . El tiempo de contacto para la CP fue de 200 ms para evitar procesos difusivos durante la CP. La longitud del pulso de ángulo mágico fue de 2.55 μs . Para obtener los espectros de ^1H en la dimensión F1 se recolectaron 64 puntos con un tiempo entre puntos de 35.5 μs . El tiempo de adquisición fue de 1.14 ms.

A.2.8. REPT-HSQC

Los experimentos de REPT-HSQC fueron realizados en el Max Planck Institute for Polymer Research, en Mainz, Alemania. Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance III donde la frecuencia de protones es de 850 MHz. Se utilizó un cabezal de doble resonancia de 2.5 mm. El pulso de $\frac{\pi}{2}$ utilizado fue de 2.5 μs en ambos núcleos y la misma potencia de

campo de rf para el desacople dipolar. En todos los experimentos se utilizó la secuencia TPPM para el desacople heteronuclear, utilizando pulsos de aproximadamente 160° y un ángulo para la modulación de fases de 30° . Las muestras fueron rotadas a 25 kHz.

A.2.9. BaBa

Los espectros bidimensionales de DQMAS de ^1H fueron adquiridos utilizando la secuencia de pulsos mostrada en la figura 4.3 con tiempos de excitación y reconversión de un período de rotor (a una velocidad de MAS de 59524 Hz, $\tau_R=16.8 \mu\text{s}$). Los experimentos bidimensionales de DQ sensibles a las fases se adquirieron con 128 incrementos de t_1 sincronizados con la velocidad de rotación utilizando el método de States-TPI.

A.2.10. CODEX

Los experimentos de recople de CSA en ^{19}F fueron realizados en el Institute Le Bel, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Estos experimentos se realizaron a temperatura ambiente en un espectrómetro Bruker Avance II, donde los núcleos de ^1H resuenan a 500 MHz, y los ^{19}F a 470.59 MHz equipado con un cabezal de MAS de 2.5 mm. La velocidad de rotación empleada en estos experimentos fue de 18 kHz. Para las distintas muestras se realizaron 8 promediaciones, con un tiempo de espera de 50s. Se utilizó un pulso de $\frac{\pi}{2}$ de $2,37 \mu\text{s}$ y π de $4.72 \mu\text{s}$ para ^{19}F . En tiempo de contacto fue de $145 \mu\text{s}$. La velocidad de rotación fue de 18 kHz y los períodos de excitación y reconversión fueron calibrados como $\tau_R/4$.

A.2.11. Difracción de Rayos-X de polvo

Los patrones de difracción para las distintas muestras fueron tomados a temperatura ambiente en un Difractómetro de Rayos X (RIGAKU Miniflex, Japón) usando radiación Cu K_α ($\lambda=1,54 \text{ \AA}$), un tubo de voltaje de 30 kV y un tubo con una corriente de 15 mA. Las muestras fueron colocadas en el portamuestras del equipo y los DD se tomaron en un rango angular de 5° a 50° para 2θ en pasos de $0,01^\circ 2\theta$ en un minuto.

A.2.12. Difracción de Rayos-X de monocristal

El patrón de difracción se tomó en un Difractómetro Bruker CCD área detector diffractometer. Corrección de la Absorción: multi-scan SADABS (Sheldrick, 2001). Para la determinación de la estructura se utilizó el programa Data collection: SMART-NT (Bruker, 2001); Refinamiento de celda: SAINTNT (Bruker, 2001); reducción de datos: SAINT-NT; programa utilizado para resolver la estructura: SHELXS97 (Sheldrick, 1997).

A.2.13. Métodos Térmicos de Análisis (DSC y TGA)

Las muestras se calentaron en un rango de temperaturas de 25°C a 500 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C / min. Para determinar las curvas DSC se utilizó el analizador MDSC 2920, TA Instruments. El eje de temperaturas y la constante de celda del DSC se calibraron con Indio (24 mg, 99,99 % de pureza, pico máximo a 158,44 °C y calor de fusión 28,4 J/g). Las muestras (0,4-1,2 mg) fueron calentadas en portamuestras de aluminio, cerrados, no herméticos, en una atmósfera dinámica de nitrógeno con una velocidad de flujo de 60 ml/min. Las áreas de los picos endotérmicos fueron determinadas graficando una línea desde el punto donde la curva se desvía de la línea de base (onset) hasta el punto donde la retoma (recovery). Para la termogravimetría se utilizó el Analizador TA HI-RES 2950, TA Instruments acoplado a una estación de datos. Las muestras (0,4- 1,8 mg) se colocaron en portamuestras abiertos y se calentaron bajo las mismas condiciones usadas en su respectivo análisis DSC.

A.2.14. Espectroscopía Infrarroja (IR)

Para la obtención de los espectros FTIR (Avatar 360, ESP NICOLET) se prepararon pastillas de Bromuro de Potasio (KBr, grado espectroscópico, Merck), conteniendo cada una de los compuestos en una concentración del 1 %. Previo a la preparación de las pastillas, el KBr se secó durante 1 hora a 100 °C. Las pastillas se secaron bajo vacío en atmósfera de P₂O₅ a temperatura ambiente durante al menos 2 horas previo a la toma del espectro.

Bibliografía

- [1] N. A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo, H. Lennernas, A. S. Hussain, H. E. Junginger, S. A. Stavchansky, K. K. Midha, V. P. Shah, and G. L. Amidon. *Mol. Pharmaceutics.*, 1:85, 2002.
- [2] M. Martinez, P. Mc Dermott, and R. Walker. *The Veterinary Journal*, 172:10, 2006.
- [3] S. A. Carss, R. K. Harris, P. Holstein, B. J. Say, and R. A. Fletton. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, page 2407, 1994.
- [4] S. C. Campbell, R. K. Harris, M. J. Hardy, D. C. Lee, and D. J. Busby. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, page 1913, 1997.
- [5] R. M. Wenslow. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28:555, 2002.
- [6] R. K. Harris and P. Jackson. *J. Phys. Chem. Solids*, 48:813, 1987.
- [7] A. Burger and R. Ramberger. *Mikrochim Acta*, 72:259, 1979.
- [8] D. J. W. Grant and H. G. Brittain. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. Marcel Becker, New York, 1999.
- [9] S. R. Byrn, R. R. Pfeiffer, and J. G. Stowell. *Solid State Chemistry of Drugs*. West-Lafayette Indiana, 1999.
- [10] J. D. Mullins and T. J. Macek. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, 49:245, 1960.
- [11] M. Kuhnert-Brandstätter. *Nueva York: Pergamon Press*, 1971.
- [12] R. Barbas, R. Prohens, and C. Puigjaner. *Cryst. Growth Des.*, 6:463, 2006.
- [13] J. D. Dunitz and J. Bernstein. *Acc. Chem. Res.*, 28:193, 1995.
- [14] S. R. Chemburkar. *Org. Process Res. Dev.*, 4:413, 2000.
- [15] Solid State Chemical Information. Solid state chemical information data base.
- [16] C.P. Slichter. *Principles of magnetic resonance*. Springer-Verlag, 3rd edition, 1990.

- [17] A. Abragam. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. Oxford University Press, USA, 1983.
- [18] S. Meejoo, B. M. Kariuki, S. J. Kitchin, E. Y. Cheung, D. Albesa-Jove, and K. D. M. Harris. *Phys. Rev. Lett.*, 1:343, 1958.
- [19] J. Schaefer and E. O. Stejskal. *J. Am. Chem. Soc.*, 98:1031, 1976.
- [20] S. R. Chemburkar, J. Bauer, K. Deming, H. Spiwek, K. Patel, J. Morris, R. Henry, S. Spanton, W. Dziki, W. Porter, J. Quick, P. Bauer, J. Donaubauer, B. A. Narayanan, M. Soldani, D. Riley, and K. McFarland. *Org. Process Res. Dev.*, 4:413, 2000.
- [21] J. A. Ripmeester. *Chem. Phys. Lett.*, 74:536, 1980.
- [22] G. E. Balimann, C. J. Groombridge, R. K. Harris, K. J. Packer, B. J. Say, and S. F. Tanner. *Philos. Trans. R. Soc. London A*, 299:643, 1981.
- [23] G. McGeorge, R. K. Harris, A. M. Chippendale, and J. F. Bullock. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2.
- [24] S. Meejoo, B. M. Kariuki, S. J. Kitchin, E. Y. Cheung, D. Albesa-Jove, and K. D. M. Harris. *Helv. Chim. Acta*, 86:1467, 2003.
- [25] M. J. Duer. *Solid State NMR Spectroscopy*. Springer-Verlag, 3rd edition, 1990.
- [26] M. Levitt. John Wiley & Sons, 2001.
- [27] P. Grondona and S. C. Olivieri. *Concepts in Magnetic Resonance*, 5:319, 1993.
- [28] E. R. Andrew, A. Bradbury, and R. G. Eades. *Nature*, 182:1659, 1958.
- [29] I. Lowe. *Phys. Rev. Lett.*, 2:285, 1959.
- [30] F. Bloch. *Phys. Rev.*, 111:841, 1958.
- [31] A.E. Bennet, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, and R. G. Griffin. *J. Chem. Phys.*, 103:6951–, 1995.
- [32] M. Lee and W. I. Goldberg. *Physical Review.*, 140:A1261–A1271, 1965.
- [33] S. R. Hartmann and E. L. Hahn. *Phys. Rev.*, 128:2042, 1962.
- [34] W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, and D. R. Huffman. *Nature*, 347:354–358, 1990.
- [35] P. A. Tishmack, D. E. Bugay, and S. R. Byrn. *J. Pharm. Sci.*, 92:441, 2003.

- [36] W. Gabriëlse, H. Angad Gaur, F. C. Feyen, and W. S. Veeman. *Macromolecules*, 27:5811, 1994.
- [37] P. Caravatti, G. Bodenhausen, and R.R. Ernst. *Chem. Phys. Lett.*, 89:363, 1982.
- [38] P. Caravatti, L. Braunschweiler, and R.R. Ernst. *Chem. Phys. Lett.*, 100:305, 1982.
- [39] B.J. van Rossum and H. Förster, , and H. J. M. De Groot. *J. Magn. Res.*, 124:516, 1997.
- [40] K. Saalwächter, R. Graf, and H. W. Spiess. *J. Magn. Res.*, 140:471, 1999.
- [41] A. Bielecki, A. C. Kolbert, and M. H. Levitt. *Chem. Phys. Lett.*, 155:341–346, 1989.
- [42] M. Lee and W. I. Goldberg. *Phys. Rev. A*, 140:1261, 1965.
- [43] M. Feike, D. E. Demco, R. Graf, J. Gottwald, S. Hafner, and H. W. Spiess. *J. Magn. Res. A*, 122:214, 1996.
- [44] E. R. deAzevedo, W.-G. Hu, T. J. Bonagamba, and K. Schmidt-Rohr. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:8411, 1999.
- [45] E. R. deAzevedo, W.-G. Hu, T. J. Bonagamba, and K. Schmidt-Rohr. *J. Chem. Phys.*, 112:8988, 2000.
- [46] W. Luo and M. Hong. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:7242, 2006.
- [47] C. Romañuk. *Caracterización Biofarmacéutica y Farmacotécnica de Derivados Farmacéuticos de Antimicrobianos Fluoroquinolónicos*. 2007.
- [48] A. Breda. *Investigacion y desarrollo de nuevos medicamentos, derivados farmaceuticos y sistemas de liberacion de farmacos: evaluacion de su seguridad y eficacia*. 2010.
- [49] World Health Organization. Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability.
- [50] H. H. Blume and B. S. Schug. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 9:117, 1999.
- [51] D. T. W. chu and P. B. Frenandes. *Advances in Drug Research*, volume 21. B. Testa (eds), London, Academic Press.
- [52] J. E. F. Reynolds. *The Extra Pharmacopeia*. The Pharmaceutical Press, London., 30th edition, 1993.
- [53] I. Turel, P. Bukovec, and M. Quiros. *Int. J. Pharm.*, 152:59, 1997.

- [54] I. Turel, K. Gruber, I. Leban, and N. Bukovec. The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Jour. Inorg. Biochem.*, 61:197, 1996.
- [55] I. Turel. *Coord. Chem. Rev.*, 232:27, 2002.
- [56] C. M. Riley, D. L. Ross, D. V. Velde, and F. Takusagawa. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11:49, 1993.
- [57] M. Sakai, A. Hara, S. Anjo, and M. Nakamura. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18:1057, 1999.
- [58] Y. Okabayashi, F. Hayashi, Y. Terui, and T. Kitagawa. *Chem. Pharm. Bull.*, 40:692, 1992.
- [59] G. Mendoza-Díaz and J. Ireta-Moreno. *J. Inorg. Biochem.*, 54:235, 1994.
- [60] P. Granger and R. K. Harris (eds). *Multinuclear Magnetic Resonance in Liquids and Solids-Chemical Applications*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1st edition, 1990.
- [61] A. K. Chattah, Y. Garro Linck, G. A. Monti, P. R. Levstein, S. A. Breda, R. H. Manzo, and M. E. Olivera. *Magn. Reson. Chem.*, 45:850, 2007.
- [62] U. Neugebauer, A. Szeghalmi, M. Schdmitt, W. Kieffer, J. Popp, and U. Holzgrabe. *Spectrochim. Acta, Part A*, 61:1505, 2005.
- [63] E. H. Kim and H. K. Choi. *Drug Delivery*, 11:365, 2004.
- [64] S. A. Brown. *J. of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19:1, 1996.
- [65] G. Mengozzi, L. Intorre, and G. Soldani. *American Journal of Veterinary Research*, 57:1040, 1996.
- [66] C. S. Fallati, A. A. Ahumada, and R. H. Manzo. *STP Pharma Sciences*, 3.
- [67] A. A. Ahumada, J. Seek, D. A. Allemandi, and R. H. Manzo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 13.
- [68] R. Banerjee, P. M. Bhatt, N. V. Ravindra, and G. R. Desiraju. *Cryst. Growth Des.*, 5.
- [69] A. Jayasankar, A. Somwangthanaroj, J. Z. Shao, and N. Rodriguez-Hornedo. *Pharm. Res.*, 23.
- [70] Z. MU and H. MMA. volume 13. UK: London Academic Press.
- [71] C. Mazuel. *Norfloxacin in Analytical profiles of drugs substances*, volume 20. UK: London Academic Press.

- [72] C. B. Romañuk, Y. Garro Linck, R.H. Manzo, A. K. Chattah, G. A. Monti, and M. E. Olivera. *Jour. Pharm. Sci.*, 2009.
- [73] A. C. Uldry, J. M. Griffin, J. R. Yates, M. Pérez-Torralba, M. D. Santa María, A. L. Webber, M. L. L. Beaumont, A. Samoson, R. M. Claramunt, C. J. Pickard, and S. P. Brown. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:945, 2008.
- [74] M. E. Olivera, M. V. Ramirez Rigo, A. K. Chattah, P. R. Levstein, M. Baschini, and R. H. Manzo. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 18:337, 2003.
- [75] R.M. Gomila, D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, and P.M. Deya. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 531, 2000.
- [76] R. K. Harris and A. C. Olivieri. *Prog. in NMR Spectroscopy*, 24:435, 1992.
- [77] J. M. Griffin, D. R. Martin, and S. P. Brown. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46:8036, 2007.
- [78] A. Zieba, A. Maslankiewicz, and J. Sitkowski. *Magn. Reson. Chem.*, 42:903, 2004.
- [79] I. Schnell, S. P. Brown, H. Y. Low, and H. Ishida and H. W. Spiess. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:11784, 1998.
- [80] C.B. Romañuk, Y. Garro Linck, A.K. Chattah, G.A Monti, S.L. Cuffini, M.T. Garland, R. Baggio, R.H. Manzo, and M.E. Olivera. *Int. J. Pharm.*, 391:197, 2010.
- [81] S. Pisal, R. Zainnuddin, P. Nalawade, K. Mahadik, and S. Kadam. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5:64, 2006.