

Combinación de Resonancia Magnética Nuclear y Teoría del Funcional de la Densidad electrónica para la determinación estructural de cocristales de interés farmacéutico

por

Ana Lucía Reviglio

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

Doctora en Física
de la
Universidad Nacional de Córdoba

Junio de 2021

Director: Dr. Gustavo A. Monti



Combinación de RMN y DFT para la determinación estructural de cocristales de interés farmacéutico por Reviglio Ana Lucía.

Se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

A todos los que me acompañaron en este camino

*“Aunque pudiera estar
en mil sitios a la vez,
tengo claro que seguiría
agarrándome de las mismas manos
cada vez que sintiera
que estoy perdida.*

Las suyas”

Miguel Gane

Agradecimientos

Todos los días tengo algo que aprender, algo que olvidar y mucho que agradecer.

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que acompañaron e hicieron posible el desarrollo de esta tesis.

Agradecer primero a la Universidad Nacional de Córdoba, la Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación (FaMAF) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por brindarme la oportunidad de completar este trayecto formativo.

Al Tribunal Especial de tesis, por todos sus aportes a esta versión final. A la Comisión Asesora de Doctorado, por toda la experiencia y apoyo brindado a lo largo de estos cinco años. En especial agradecer a Gustavo por su dirección y a Yamila por su compañía.

Quiero extender este agradecimiento a todos los miembros del LANAIS con quienes pude compartir estos cinco años y de manera particular a los Becaries, quienes fueron un soporte imprescindible. Agradecer a quienes comparten conmigo la oficina 328, por los incontables mates, charlas y viernes de postre.

Agradecer también a todos los docentes de la FaMAF de quienes tuve la suerte de aprender muchísimo. Agradecer de manera especial a los docentes compañeros de cátedra quienes me ayudaron a ser cada día un poquito mejor docente.

A todos mis amigos de Córdoba y de Río Cuarto, que han estado presentes en cada momento y que siempre tienen sus orejas y unos buenos mates listos para escuchar. ¡Muchas Gracias!

A mi familia, mis siete locos preferidos, que, siempre, siempre acompañan mis proyectos, me apoyan y están al pie del cañón para todo. ¡Los amo!

A mi familia política, que siguió siempre bien de cerca cada pasito en este mundo.

A los amores de mi vida Manuel y Valentina. A Valentina por darme la motivación necesaria el final de este trayecto, por ser mi lucecita siempre prendida. A Manuel por todo lo que él significa en mi vida, por su apoyo incondicional, su amor inagotable, su paciencia, ¡por todo! ¡Los amo!

Resumen

En la actualidad entre un 80% y un 90% de los fármacos comercializables se encuentran en forma sólida. Un ingrediente farmacéutico activo (IFA) puede poseer una acción deseable desde el punto de vista médico, pero tener propiedades físicas indeseables, como una escasa solubilidad, lo que potencialmente limita su aplicabilidad posterior. Por lo que en las últimas décadas se dedica un gran esfuerzo a la búsqueda de nuevas formas sólidas multicomponentes que mejoren dichas propiedades. Es sabido que en estado sólido, estas propiedades están completamente definidas por la estructura y el empaquetamiento que tomen las moléculas. Por tal motivo, la caracterización estructural en estado sólido es un paso fundamental en el desarrollo de nuevos materiales farmacéuticos.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido es una técnica extremadamente sensible al entorno atómico local y a las interacciones intra e intermoleculares, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, y por lo tanto es muy adecuada para estudios de productos farmacéuticos. Un correcto análisis de los espectros de RMN permite diferenciar diversas formas sólidas de un mismo IFA e incluso extraer información estructural a nivel atómico de cada sistema estudiado.

En las últimas décadas, se ha comenzado a utilizar ampliamente el término "Cristalografía de RMN", debido a que el poder de la RMN en estado sólido para proporcionar información cristalográfica ha aumentado considerablemente. En los primeros años del siglo XXI, la comunidad cristalográfica ha aceptado la capacidad de la RMN para proporcionar información que respalda y facilita el análisis de los patrones de difracción de cristal y polvo. De hecho, en la actualidad se utiliza la RMN en combinación con otras técnicas, como XRD y cálculos computacionales para resolver detalladamente las estructuras cristalinas.

La combinación de los análisis de RMN con cálculos computacionales es sumamente necesaria para proporcionar un soporte teórico que relacione los espectros observados con las estructuras microscópicas subyacentes. Una herramienta útil para alcanzar esta sinergia, son los métodos mecánico-cuánticos de primeros principios. Dentro de este grupo, existen numerosos métodos aplicables tanto a las moléculas como a sistemas en estado sólido, sin embargo, los cálculos de parámetros de RMN utilizando DFT (Teoría del Funcional de la Densidad electrónica) han demostrado ser los más poderosos a la hora de reproducir resultados experimentales en estado sólido.

A lo largo de esta tesis se caracterizaron nuevas formas sólidas de diferentes compuestos de interés farmacéutico utilizando tanto espectroscopía de RMN como cálculos computacionales basados en DFT. Los experimentos de RMN permitieron identificar diferentes formas sólidas de cada compuesto, detallar las interacciones fundamentales en las estructuras cristalinas de los mismos, reconocer cambios conformacionales, definir un nuevo método de caracterización de compuestos eutécticos, entre otras aplicaciones. Por su parte, los cálculos DFT permitieron vincular los resultados experimentales con las estructuras subyacentes, identificar procesos de desorden dentro de las estructuras, realizar un análisis detallado de interacciones intramoleculares, correlacionar cambios estructurales con energía, corrimiento químico, densidad electrónica, por mencionar algunas de las amplias utilidades.

Abstract

Currently between 80% and 90% of marketable drugs are in solid form. An active pharmaceutical ingredient (API) may possess medically desirable action, but have undesirable physical properties, such as poor solubility, which can limited its subsequent applicability. Therefore, in the last decades a great effort has been expended to the search new solid multicomponent forms that improve API's properties. It is known that in the solid state, these properties are completely defined by the structure and packaging that the molecules take. For this reason, solid state structural characterization is a fundamental step in the development of new pharmaceutical materials.

Solid-state Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is an extremely sensitive technique to the local atomic environment and to intra- and intermolecular interactions, for example hydrogen bonding, and is therefore well suited for studies of pharmaceuticals. A correct analysis of the NMR spectra allows differentiating various solid forms of the same API and even extracting structural information at the atomic level of each system studied.

In recent decades, the term "NMR Crystallography" has come into wide use, as the power of solid-state NMR to provide crystallographic information has increased considerably. In the early years of the XXI century, the crystallographic community has accepted the ability of NMR to provide information that supports and facilitates the analysis of crystal and powder diffraction patterns. In fact, NMR is currently used in combination with other techniques such as XRD and computational calculations to resolve crystal structures in detail.

The combination of NMR analysis with computational calculations is extremely necessary to provide theoretical support that relates the observed spectra to the underlying microscopic structures. A useful tool to achieve this synergy is first principles quantum mechanical methods. Within this group, there are numerous methods applicable to both molecules and solid-state systems, however, NMR parameter calculations using DFT (Density Functional Theory) have proven to be the most powerful when it comes to reproduce experimental results in solid state.

Throughout this thesis it is characterized by new solid forms of different compounds of pharmaceutical interest using both NMR spectroscopy and computational calculations based on DFT. NMR experiments made it possible to identify different solid forms of each compound, to detail the fundamental interactions in their crystalline structures, to recognize conformational changes, and to define a new method for characterizing eutectic compounds, among other applications. On the other hand, the DFT calculations made it possible to link the experimental results with the underlying structures, identify disorder processes within the structures, carry out a detailed analysis of intramolecular interactions, correlate structural changes with energy, chemical shift, electron density, to mention some of the extensive profits.

INDICE

Agradecimientos	V
Resumen	VII
Abstract	IX
1. Introducción	1
1.1. Fármacos Sólidos.....	1
1.1.1. Nuevas Formas sólidas de fármacos	2
1.2. Caracterización en estado sólido	3
1.2.1. Caracterización experimental.....	3
1.2.2. Caracterización teórica	4
1.2.3. Combinación NMR y DFT	5
1.3. Esta tesis	5
1.4. Referencias	7
2. Fundamentos teóricos	9
2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	9
2.1.1. Modelo Mecánico Cuántico	9
2.1.2. Modelo vectorial	10
2.1.3. Relajación	13
2.1.4. Interacciones de NMR	15
2.1.4.1. Corrimiento químico	16
2.1.4.2. Interacción Dipolar	18
2.1.4.3. Interacción Cuadrupolar.....	19
2.1.4.4. Acoplamiento indirecto, J	20
2.1.5. NMR en estado sólido	20
2.2. Teoría del funcional de la densidad electrónica (DFT).....	23
2.3. Referencias	28
3. Experimentos de NMR y detalles de Cálculo	31
3.1. NMR de estado sólido.....	31
3.1.1. Medidas de relajación.....	31
3.1.2. Técnicas de desacople.....	33

3.1.3.Polarización Cruzada (CP).....	34
3.1.4.Supresión No Cuaternaria (NQS).....	35
3.1.5.Correlación Heteronuclear (HETCOR).....	36
3.1.6.Detalles experimentales	37
3.2. Detalles de cálculos DFT.....	39
3.3. Referencias	41
4. Fármacos Estudiados.....	43
4.1. Tizoxanida.....	43
4.2. Nevirapina	45
4.3. Tinidazol	46
4.4. Referencias	48
5. Combinación ssNMR y DFT para el estudio de enlaces puente hidrógeno	51
5.1. Definiciones y desafíos de los enlaces de hidrógeno	51
5.2. Metodología	53
5.2.1.Experimentos de NMR	55
5.2.2.Cálculos computacionales.....	55
5.3. Resultados y discusión	56
5.3.1.Enfoque Molecular	58
5.3.2.Enfoque de Estado Sólido	59
5.4. Conclusiones del capítulo.....	69
5.5. Referencias	71
6. Caracterización de nuevas formas sólidas de Nevirapina y Tinidazol	73
6.1. Metodología	73
6.1.1.Elección de coformadores	73
6.1.2.Caracterización por NMR en estado sólido	74
6.2. Nevirapina (NVP)	75
6.2.1.NVP:URE	75
6.2.2.NVP:SA	76
6.2.3.NVP:SAC	79
6.2.4.NVP:THE y NVP:CAF	81
6.2.5. Nuevas formas sólidas de NVP	84

6.3. Tinidazol (TNZ)	85
6.3.1. TNZ:PABA	85
6.3.2. TNZ:SA	87
6.3.3. TNZ:CA	89
6.3.4. TNZ:SUCC y TNZ:NA	91
6.3.5. Nuevas formas sólidas de TNZ	92
6.4. Conclusiones del capítulo	93
6.5. Referencias	94
7. Estudio mediante NMR y DFT del desorden molecular del cocrystal NVP:SA ..	95
7.1. Desorden en cocristales	95
7.1.1. Modelado del desorden	96
7.2. Metodología	97
7.2.1. Experimentos de NMR en estado sólido	97
7.2.2. Cálculos Computacionales	97
7.3. Resultados y discusión	98
7.4. Conclusiones del capítulo	110
7.5. Referencias	112
8. Compuestos Eutécticos de NVP. ¿Puede la NMR identificar un Eutéctico?	113
8.1. Compuestos Eutécticos	113
8.1.1. Microestructura de un eutéctico	113
8.1.2. Este trabajo	114
8.2. Resultados y discusión	116
8.3. Conclusiones del capítulo	124
8.4. Referencias	126
9. Comentarios finales	129
9.1. Referencias	132
A. APÉNDICE. Caracterización de Nuevas Formas Sólidas Multicomponentes de NVP y TNZ. Otras técnicas experimentales	133
A.1. Metodologías	133
A.1.1. Predicción de la cocrystalización	133

A.1.2. Preparación de las muestras	134
A.1.3. Difracción de rayos X en polvo (PXRD)	135
A.1.4. Difracción de rayos X de cristal único (SCXRD)	135
A.1.5. PXRD en función de la temperatura	136
A.1.6. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	136
A.1.7. Perfil de Disolución y Tasa de disolución intrínseca	137
A.1.8. Evaluación de la solubilidad	137
A.2. Nevirapina (NVP)	138
A.2.1. Predicción de la cocrystalización	138
A.2.2. NVP:URE	139
A.2.3. NVP:SA	140
A.2.4. NVP:SAC	143
A.2.5. NVP:THE y NVP:CAF	144
A.2.6. Perfil de disolución y Tasa de disolución intrínseca	146
A.3. Tinidazol (TNZ)	148
A.3.1. TNZ:PABA.....	148
A.3.2. TNZ:SA	150
A.3.3. TNZ:CA	151
A.3.4. TNZ:SUCC y TNZ:NA	152
A.3.5. Evaluación de la solubilidad acuosa	153
A.4. Referencias	155

CAPÍTULO 1

Introducción



Capítulo 1: Introducción

1.1 Fármacos Sólidos

Un medicamento es una sustancia destinada a su utilización en personas o animales con el fin de prevenir enfermedades, aliviar dolores, mejorar el estado de salud o modificar estados fisiológicos indeseados.

El uso de medicamentos es tan antiguo como la propia humanidad. Desde sus inicios el ser humano se interesó en el uso de la flora y fauna con aplicaciones medicinales; por lo que es muy difícil determinar estrictamente el comienzo de la práctica farmacéutica. Los primeros medicamentos surgieron del uso de productos animales, vegetales o minerales sin purificar, luego se recurrió a la extracción de sustancias activas, hasta llegar a la semisíntesis y más recientemente a la síntesis de principios activos¹.

En los inicios las prácticas farmacéuticas no podían separarse de las prácticas medicinales, ya que eran los mismos médicos los que preparaban los remedios. Recién en la Edad Media comienza a darse esta división entre la actividad del farmacéutico y la del médico, pero no es hasta entrada la Edad Moderna que el conocimiento farmacéutico se consolida como ciencia¹. A partir de los años 1940 las formas farmacéuticas adquirieron verdadero protagonismo con el desarrollo de la industria farmacéutica y el comienzo de la fabricación a gran escala.

El componente principal de un medicamento es el ingrediente farmacéutico activo (IFA), es decir la molécula bioactiva destinada a ejercer la acción farmacológica, inmunológica o metabólica deseada. Al inicio del diseño de nuevos medicamentos, dicha molécula es conocida y por lo general el comportamiento de la misma de manera aislada también. Cabe destacar que entre un 80% y un 90% de los materiales farmacéuticos disponibles en el mercado se encuentran en forma sólida²⁻⁴. Es decir, que la molécula se encuentra formando parte de un empaquetamiento con fuertes interacciones entre las componentes.

Un fármaco sólido puede encontrarse como un cristal, un líquido cristalino o como una sustancia amorfa. Dado que los sistemas cristalinos han presentado una mayor estabilidad termodinámica, son los que se han distribuido y estudiado más ampliamente. La naturaleza de la estructura cristalina adoptada por un compuesto dado ejerce un profundo efecto sobre las propiedades de ese sistema. Pequeñas variaciones en la disposición molecular dentro de dicha estructura cristalina pueden traducirse en diferencias significativas en las propiedades de importancia farmacéutica, como solubilidad, estabilidad y capacidad de fabricación.⁵ La caracterización de las estructuras sólidas subyacentes a cada nuevo medicamento es de vital importancia tanto para comprender sus propiedades, como para estudiar cómo éstas se relacionan con las funciones biológicas.

Un ejemplo claro de cómo la falta de comprensión global de la estructura sólida puede conducir a costosos y desafiantes problemas⁶ de reformulación es el caso del Ritonavir⁷. Este medicamento debió ser retirado del mercado ya que durante el proceso de fabricación se encontró una forma cristalina adicional a la descrita en los ensayos

diferir las estructuras cristalinas, los polimorfos de una misma molécula presentan propiedades físico-químicas diferentes. La forma más conocida de un polimorfismo (pero a nivel atómico, no molecular) es el carbono, el cual presenta 5 polimorfos sólidos con propiedades muy diferentes entre sí (diamante, nanotubos, grafito, grafeno y fullerenos).

Dentro de los sistemas multicomponentes podemos distinguir entre compuestos monofásicos y multifásicos, que a la vez se subdividen en otros grupos:

- **Monofásicos:** cuando poseen una única fase observable. Los cristales de este grupo muestran propiedades físico-químicas diferentes de las propiedades de los compuestos puros con que fueron realizados. Entre los cristales monofásicos podemos distinguir:
 - Los **solvatos**, la molécula huésped del IFA es un solvente (por ej. etanol, acetato de etilo o incluso agua)¹⁵. Si el cristal aloja agua como solvente, el compuesto se denomina hidrato, mientras que los compuestos sin agua en cristalización se denominan anhidratos.
 - Las **sales cristalinas**, la molécula que cristaliza junto con el IFA es una molécula ionizada, por lo que es necesario que el IFA posea grupos ionizables.
 - Los **cocristales**, el IFA cristaliza con una molécula neutra en una estequiometría bien establecida.^{4,16}
- **Multifásicos:** cuando poseen más de una fase observable, es decir pueden distinguirse las componentes individuales del cristal. Podemos diferenciar entre:
 - Las **mezclas físicas**, no se obtiene un nuevo cristal, sino que se obtiene una mezcla desordenada de las partes individuales. Las propiedades físico-químicas de esta mezcla mantienen las propiedades de los precursores por separado.
 - Los compuestos **eutéticos**, no se obtiene un nuevo cristal, sino que se obtiene una mezcla ordenada de las partes individuales. La característica principal de este tipo de compuestos es que presentan un punto de fusión más bajo que el de los sistemas puros. Las propiedades físico-químicas de estos compuestos pueden diferir de las propiedades de los precursores por separado.¹⁷

1.2 Caracterización en estado sólido

Debido a las posibles diferencias entre las formas sólidas de un mismo IFA, es necesaria una caracterización completa para conocer sus propiedades físicas, químicas, de estabilidad termodinámica, etc. previo a cualquier etapa de diseño, desarrollo o investigación clínica.

1.2.1 Caracterización experimental

Existen numerosas técnicas que pueden ser aplicadas para la diferenciación de las formas sólidas de un compuesto, las cuales se basan en la medición de propiedades

físicas, como la difracción de rayos X en polvo, PXRD (por su sigla en inglés, *Powder X-ray Diffraction*), los métodos térmicos de análisis, las técnicas espectroscópicas, gravimétricas y químicas. En principio, los experimentos de difracción de cristales únicos, SCD (por su sigla en inglés, *Single Crystal Diffraction*) 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 los análisis SCD no siempre son posibles, por lo que, la mejor estrategia para el estudio de compuestos en estado sólido involucra la combinación de varias técnicas analíticas complementarias.

Tradicionalmente, la caracterización física de los fármacos se basaba en la PXRD, métodos térmicos como la calorimetría diferencial de barrido, DSC (por su sigla en inglés, *Differential Scanning Calorimetry*) y la termogravimetría (TGA) y espectroscopía infrarroja (IR). Sin embargo, la resonancia magnética nuclear, NMR (por su sigla en inglés, *Nuclear Magnetic Resonance*), con el desarrollo de la espectroscopía de alta resolución en sólidos, pasó a ser una técnica fundamental en la caracterización de fármacos en estado sólido.

La espectroscopía de NMR de estado sólido, ssNMR (por su sigla en inglés, *solid-state Nuclear Magnetic Resonance*) desempeña un papel importante en la caracterización de sólidos farmacéuticos, particularmente en las últimas etapas del desarrollo de fármacos. Las autoridades reguladoras como la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) mencionan específicamente la NMR de estado sólido como una técnica recomendada para monitorear la formación de nuevas formas sólidas de sustancias farmacológicas^{18,19}, debido a su sensibilidad a la estructura local²⁰. Además, se ha vuelto relativamente común que los investigadores extraigan información estructural a nivel atómico, como la conformación y las proximidades nucleares a partir de los espectros de NMR.

Recientemente el término "NMR crystallography" se ha vuelto de uso común, e incluso causa asombro en algunas partes de la comunidad de difracción. El poder de la ssNMR para proporcionar información cristalográfica ha aumentado considerablemente desde que se combinaron por primera vez las técnicas de rotación al ángulo mágico, MAS (por su sigla en inglés, *Magic Angle Spinning*), polarización cruzada, CP (por su sigla en inglés, *Cross Polarization*) y desacople de protones de alta potencia en 1976. En los primeros años del siglo XXI, la capacidad de la NMR para proporcionar información para respaldar y facilitar el análisis de los patrones de difracción de cristal y polvo se han aceptado ampliamente. De hecho, la NMR se utiliza actualmente en combinación con otras técnicas, como XRD y cálculos computacionales para resolver detalladamente las estructuras cristalinas.

1.2.2 Caracterización teórica

Los desarrollos tecnológicos y los avances en los métodos numéricos han convertido a las simulaciones computacionales en una herramienta fundamental de la ciencia básica. Las mejoras tecnológicas de las computadoras, en cuanto a poder de cómputo, han hecho posible el desarrollo de estudios teóricos más complejos y

precisos. Por tal motivo, las simulaciones computacionales se aplican actualmente no sólo en diversas áreas de las ciencias básicas, sino que también presentan un auge como herramienta descriptiva y deductiva en la industria.

La ciencia e industria farmacéutica no están exentas de la aplicación de estos métodos. Los métodos teóricos se suelen utilizar no sólo para predecir las propiedades físico-químicas y estructurales de los IFA, sino también para explicar los resultados obtenidos experimentalmente o para vaticinar las condiciones necesarias para obtener las nuevas formas sólidas de compuestos farmacéuticos. Además, las propiedades calculadas, como las constantes de apantallamiento de NMR, pueden facilitar enormemente el análisis de estado sólido e incluso ayudar en el refinamiento de las estructuras cristalinas²¹.

1.2.3 Combinación de NMR y DFT

Desde sus inicios, la concepción teórica de la NMR la postuló como una nueva técnica analítica con un potencial superador. El posterior diseño técnico, en cuanto a equipamientos, acompañado del desarrollo de métodos de medición y análisis le permitió alcanzar una precisión y aplicabilidad que hoy la sitúa entre las principales técnicas analíticas en diversos ámbitos. La NMR permite la distinción de átomos y moléculas individuales en varios medios, tanto en solución como en estado sólido. Es una técnica no destructiva y proporciona una respuesta que posibilita dilucidar y cuantificar la estructura molecular simultáneamente. Una de las ventajas prácticas de la NMR es la habilidad de estudiar sistemas que no pueden ser analizados por XRD. Las formas amorfas, que por ejemplo no son posibles de describir por XRD, generalmente dan muy buenos resultados en NMR. La NMR también es muy útil para detectar desorden estructural²². Otra ventaja es la posibilidad de realizar experimentos en función de la temperatura, en el rango de -150°C a 200°C. Los estudios realizados con NMR tanto en física, química como medicina han sido de tal magnitud que a lo largo de los años fueron distinguidos en cinco ocasiones con el Premio Nobel.²³

La cristalografía de NMR ha surgido como una herramienta importante para evaluar la calidad de las estructuras cristalinas debido a las relaciones inherentes entre las estructuras de nivel molecular y los parámetros determinados por la espectroscopía de NMR de estado sólido^{24,25}. Dada esta relación entre la estructura y los parámetros de NMR, las investigaciones cristalográficas de NMR a menudo van acompañadas de un modelado computacional de las estructuras propuestas utilizando la teoría del funcional de la densidad electrónica, DFT (por su sigla en inglés, *Density Functional Theory*). La combinación de espectroscopía de NMR de estado sólido y cálculos de DFT puede usarse para complementar, o incluso reemplazar²⁵⁻²⁷, la evaluación de estructuras a través de consideraciones termodinámicas.

1.3 Esta tesis

En este trabajo de tesis, se estudiaron mediante NMR de estado sólido y cálculos computacionales basados en DFT diferentes compuestos de interés

farmacéutico. Los mismos fueron sintetizados por los grupos de la Dra. Silvia L. Cuffini de la Universidad Federal de San Pablo, Brasil y de la Dra. Norma R. Sperandeo del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba. Se estudiaron 3 compuestos diferentes: Tizoxanida, Nevirapina y Tinidazol. La descripción completa de todos los compuestos se encuentra en el Capítulo 4. Los compuestos obtenidos con Nevirapina y Tinidazol fueron desarrollados como parte de las Tesis Doctorales de Rogeria Nunes Costa y Octavio Fandiño respectivamente.

A partir de la combinación de los resultados experimentales de NMR de estado sólido y de los cálculos computacionales sobre Tizoxanida, se realizó un refinamiento de su estructura cristalina. En particular dicha combinación permitió una completa descripción de un enlace hidrógeno intramolecular particular, el cual es un elemento clave en el ordenamiento de las moléculas dentro de la celda unidad del cristal. La descripción y análisis de este compuesto se encuentra en el Capítulo 5.

Tanto Nevirapina como Tinidazol son compuestos farmacológicos de baja solubilidad en agua, por lo que se sometieron a procesos de cristalización junto con otras moléculas en busca de nuevas formas sólidas que mejoren sus propiedades de solubilidad. En este sentido, la espectroscopía de NMR de estado sólido fue una herramienta fundamental para la diferenciación e identificación de las diferentes formas sólidas obtenidas. Además, un análisis detallado de los resultados experimentales permitió la identificación de las regiones moleculares donde ocurren cambios conformacionales. La caracterización de cada uno de estos compuestos se detalla en el Capítulo 6.

La combinación de los resultados experimentales de NMR de estado sólido y de SCXRD permitió identificar la presencia de desorden en un cocrystal de Nevirapina. Este comportamiento fue estudiado mediante cálculos computacionales y nuevos análisis experimentales. La conjunción de todos los datos obtenidos hizo posible la completa caracterización del desorden dentro de la estructura cristalina. Los datos y análisis de este comportamiento se encuentran detallados en el Capítulo 7.

Si bien los datos de NMR de estado sólido y de XRD identificaron ciertas muestras de compuestos multicomponentes de Nevirapina como mezclas físicas, los análisis térmicos mostraron un comportamiento característico de sistemas eutécticos. Esta aparente contradicción se debe principalmente a que el comportamiento macroscópico de los sistemas eutécticos es coincidente con el de una mezcla física. Las técnicas térmicas que permiten identificar un comportamiento eutéctico son técnicas destructivas, y en particular pueden favorecer a que una mezcla física se convierta en un compuesto eutéctico durante el proceso de medición. Por tal motivo, se realizaron nuevos experimentos de NMR que analizan la dinámica de estos compuestos, buscando una estrategia no invasiva que permita la identificación de compuestos eutécticos. Estos estudios se muestran en detalle en el Capítulo 8.

1.4 Referencias

1. Errecalde JO. La evolución del medicamento en la historia. In: *Anales de La ANAV*. La Plata; 2009:327-342.
2. Byrn SR, Pfeiffer RR, Stowell JG. *Solid-State Chemistry of Drugs*. 2nd ed. New York: West Lafayette; 1999.
3. Brittain HG. *Characterization of Pharmaceutical Compounds in the Solid State*. Vol 10. 2nd ed. New Jersey, USA: Elsevier Inc.; 2011. doi:10.1016/B978-0-12-375680-0.00002-4
4. Couillaud BM, Espeau P, Mignet N, Corvis Y. State of the Art of Pharmaceutical Solid Forms: from Crystal Property Issues to Nanocrystals Formulation. *ChemMedChem*. 2019;14(1):8-23. doi:10.1002/cmdc.201800612
5. Tan D, Loots L, Frišćić T. Towards medicinal mechanochemistry: Evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Chem Commun*. 2016;52(50):7760-7781. doi:10.1039/c6cc02015a
6. Datta S, Grant DJW. Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(1):42-57. doi:10.1038/nrd1280
7. Chemburkar SR, Bauer J, Deming K, et al. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Org Process Res Dev*. 2000;4(5):413-417. doi:10.1021/op000023y
8. Martín Islán Á, Molina Montes E. Polimorfismo farmacéutico. *OFFARM*. 2006;25:94.
9. Sánchez González EG, Hernández-Aba V, Jung C. H, Yépez M. L. Polymorphism relevance in pharmaceuticals. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2007;38(2):58.
10. Karagianni A, Malamataris M, Kachrimanis K. Pharmaceutical cocrystals: New solid phase modification approaches for the formulation of APIs. *Pharmaceutics*. 2018;10(1):1-30. doi:10.3390/pharmaceutics10010018
11. Martins Santos OM, Jacon Freitas JT, Bitencourt M, Martins FT, Doriguetto AC. Three new orbifloxacin multicomponent crystal forms towards pharmaceutical improvement†. *J Mol Struct*. 2020;1217. doi:10.1016/j.molstruc.2020.128371
12. Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies : review of recent advances and business prospects. 2015;5(5):442-453. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.003
13. Thakur TS, Thakuria R. Crystalline multicomponent solids: An alternative for addressing the hygroscopicity issue in pharmaceutical materials. *Cryst Growth Des*. 2020;20(9):6245-6265. doi:10.1021/acs.cgd.0c00654
14. Rama Rao B, Ramana Rao G, Avadhanulu AB. Polymorphism in Drugs and Its Significance in Therapeutics. *J Sci Ind Res (India)*. 1987;46(10):450-455.
15. Healy AM, Worku ZA, Kumar D, Madi AM. Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;117:25-46. doi:10.1016/j.addr.2017.03.002
16. Kumar S, Nanda A. Pharmaceutical Cocrystals: An Overview. *Indian J Pharm Sci*. 2017;79(6). doi:10.4172/pharmaceutical-sciences.1000302
17. Cherukuvada S, Nangia A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem Commun*. 2014;50(8):906-923. doi:10.1039/C3CC47521B
18. Byrn S, Pfeiffer R, Ganey M, Hoiberg C, Poochikian G. Pharmaceutical Solids: A Strategic Approach to Regulatory Considerations. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci*. 1995;12(7):945-954. doi:10.1023/A:1016241927429
19. Administration F and D. *Q6A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances*. Vol 62.; 1997.
20. Tishmack PA, Bugay DE, Byrn SR. Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy - Pharmaceutical applications. *J Pharm Sci*. 2003;92(3):441-474. doi:10.1002/jps.10307
21. Mazurek AH, Szeleszczuk Ł, Pisklak DM. Periodic DFT calculations – Review of applications in the pharmaceutical sciences. *Pharmaceutics*. 2020;12(5). doi:10.3390/pharmaceutics12050415
22. Hodgkinson P. NMR crystallography of molecular organics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2020;118-119:10-53. doi:10.1016/j.pnmrs.2020.03.001

23. Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Vol 53. 1st ed. Oxford: Elsevier; 2008. doi:10.1016/B978-0-444-53173-5.X0001-7
24. Harris RK, Wasylishen RE, Duer MJ. *NMR Crystallography*. First. (Harris RK, Wasylishen RE, Duer MJ, eds.). Wiley; 2009.
25. Holmes ST, Vojvodin CS, Schurko RW. Dispersion-Corrected DFT Methods for Applications in Nuclear Magnetic Resonance Crystallography. *J Phys Chem A*. 2020. doi:10.1021/acs.jpca.0c06372
26. Harper JK, Grant DM. Enhancing crystal-structure prediction with NMR tensor data. *Cryst Growth Des*. 2006;6(10):2315-2321. doi:10.1021/cg060244g
27. Kalakewich K, Iulicci R, Harper JK. Establishing accurate high-resolution crystal structures in the absence of diffraction data and single crystals - An NMR approach. *Cryst Growth Des*. 2013;13(12):5391-5396. doi:10.1021/cg401294k

CAPÍTULO 2

Fundamentos teóricos



Capítulo 2: Fundamentos teóricos

En este capítulo se presentan las bases teóricas de las técnicas utilizadas a lo largo del desarrollo de esta tesis. En primer lugar, se presentarán las bases de la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), y algunas especificaciones propias de la NMR en Sólidos. A continuación, se describe la Teoría del Funcional de la Densidad Electrónica (DFT) y las aproximaciones utilizadas para el cálculo de propiedades de NMR.

2.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

2.1.1 Modelo Mecánico Cuántico

La Resonancia Magnética Nuclear (NMR) se basa en una propiedad cuántica de los núcleos denominada *espín*. Éste es el momento angular intrínseco (\vec{I}) del núcleo y está determinado por el número de partículas fundamentales que lo conforman. Cada núcleo con \vec{I} distinto de cero, posee un momento magnético nuclear ($\vec{\mu}$), el cual está dado por:

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

donde γ es la razón giromagnética característica de cada núcleo y \hbar la constante de Planck. La magnitud del momento angular \vec{I} determina la cantidad de estados de espín posibles, los cuales se denotan mediante el número cuántico m , y puede tomar $2I + 1$ valores entre $-I$ e I .

Un núcleo con espín \vec{I} aislado tiene los $2I + 1$ estados degenerados¹. Si se coloca este núcleo en un campo magnético estático y uniforme esta degeneración se rompe. El Hamiltoniano de interacción entre un espín nuclear y un campo magnético externo es el denominado Hamiltoniano Zeeman ($\hat{\mathcal{H}}_Z$) y está dado por:

$$\hat{\mathcal{H}}_Z = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (2.2)$$

donde \vec{B}_0 es el campo magnético externo aplicado. Por convención, se toma la dirección $+z$ como la dirección del campo magnético \vec{B}_0 . Por lo que es posible reescribir el momento magnético $\vec{\mu}$ en función de la componente z del momento angular \vec{I} , y el Hamiltoniano $\hat{\mathcal{H}}_Z$ toma la forma:

$$\hat{\mathcal{H}}_Z = -\gamma \hbar I_z B_0 \quad (2.3)$$

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

mismas se escriben como $|I, m\rangle$, con I y m los números cuánticos de espín y magnético, respectivamente. Entonces, los autovalores de $\hat{\mathcal{H}}_Z$ son las energías asociadas a los diferentes estados de espín posibles y están dadas por²:

$$E_{I,m} = -m\hbar\gamma B_0 \quad (2.4)$$

Para un núcleo de espín $I = \frac{1}{2}$, el número m tomará valores $m = \pm \frac{1}{2}$, por lo que existen dos autoestados posibles con energías $E_{\frac{1}{2}, \pm \frac{1}{2}} = \mp \frac{1}{2} \hbar\gamma B_0$, como se ilustra en la Figura 2.1. La diferencia de energía ΔE entre estos dos estados, puede asociarse a una frecuencia característica del núcleo, denominada frecuencia de Larmor ω_0 . Esta es la frecuencia de resonancia de un espín bajo un campo magnético dado y está dada por:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (2.5)$$

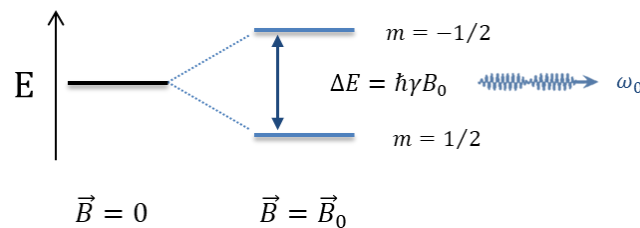


Figura 2.1 Diagrama esquemático de los estados de energía de ^1H . Donde γ es la razón giromagnética de ^1H .

La naturaleza de los autoestados y sus poblaciones respectivas determinan todas las propiedades del conjunto de espines en una muestra. Sin embargo, para poder acceder a esa información es necesario interactuar con el sistema. Para ello, en los experimentos de NMR se aplican campos de radiofrecuencia (RF) \vec{B}_1 perpendiculares a la dirección del campo externo \vec{B}_0 que producen transiciones de algún estado inicial a otro final.

2.1.2 Modelo vectorial

A continuación, se presenta un modelo vectorial que permite estudiar al fenómeno de la NMR de manera semi-clásica.

Como ya se presentó, todo núcleo posee un momento angular de espín característico y un momento magnético asociado. Cuando un núcleo se coloca en presencia de un campo magnético externo \vec{B}_0 , su momento magnético $\vec{\mu}$ precesa alrededor de la dirección del campo con una frecuencia ω_0 (frecuencia de Larmor dada por la ecuación (2.5), como se ilustra en la Figura 2.2, donde el sentido de giro está determinado por el signo de la constante γ .

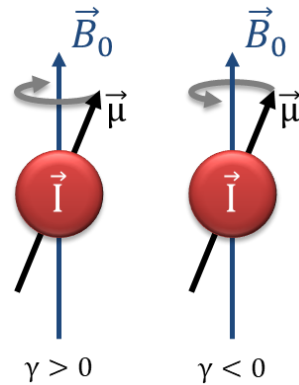


Figura 2.2 Diagrama de la precesión del momento magnético en un campo externo \vec{B}_0 . La razón giromagnética del núcleo determina el sentido de precesión.

Si se considera un conjunto de núcleos (una muestra), en lugar de un núcleo singular, la magnetización neta de la muestra se define como la suma vectorial de los momentos magnéticos individuales asociados a cada núcleo.

$$\vec{M} = \sum_i \vec{\mu}_i \tag{2.6}$$

En ausencia de un campo magnético externo, los momentos magnéticos de la muestra, se distribuyen aleatoriamente en el espacio, haciendo que la magnetización neta sea nula, como puede observarse en la Figura 2.3 a. Si la muestra es colocada en un campo magnético externo \vec{B}_0 los momentos magnéticos individuales precesarán alrededor de la dirección del campo externo a la frecuencia de Larmor. Aunque la distribución isotrópica de los espines hará que la magnetización neta siga siendo cero. Sin embargo, el movimiento molecular conduce a una distribución anisotrópica estable de espines, denominado equilibrio térmico. La distribución neta de las orientaciones de espín, con momentos magnéticos en la dirección del campo externo es ligeramente más probable que las orientaciones con momentos magnéticos opuestos a la dirección del mismo. La distribución anisotrópica de los momentos magnéticos en equilibrio térmico conduce a que la muestra adquiera una magnetización neta, \vec{M} , a lo largo del campo, como se esquematiza en la Figura 2.3.

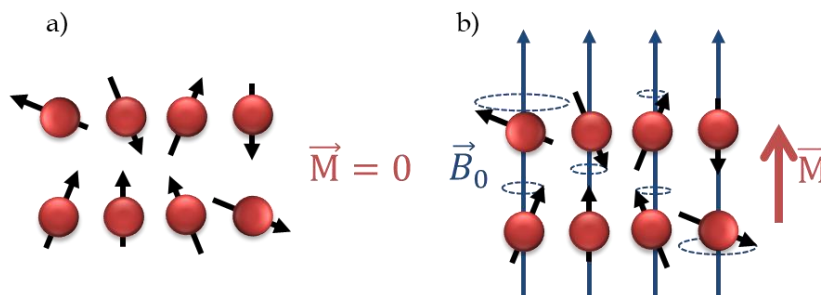


Figura 2.3 Magnetización de un conjunto de espines, a) sin campo magnético, b) en presencia de un campo externo \vec{B}_0

Durante los experimentos de NMR, la magnetización \vec{M} es perturbada mediante la aplicación de pulsos de radio frecuencia (RF). Estos pulsos son campos

electromagnéticos que se aplican perpendiculares a \vec{B}_0 y se describen como ondas dependientes del tiempo de frecuencia ω_{RF} . Por conveniencia, para describir los efectos de los pulsos de RF en experimentos de NMR se realiza un cambio de coordenadas, y se pasa del sistema de laboratorio a un sistema de referencia rotante (no inercial) cuya frecuencia de rotación es ω_{RF} en torno a \vec{B}_0 . Los ejes z y z' de los sistemas de referencia de laboratorio y rotante, respectivamente, coinciden. Esto simplifica convenientemente el análisis de los efectos de los campos electromagnéticos involucrados.

Cuando la frecuencia del campo \vec{B}_1 coincide con la frecuencia de Larmor ($\omega_{RF} = \omega_0$), se dice que el pulso está en resonancia. En este caso, el campo aplicado \vec{B}_1 luce como un campo estático a lo largo de un eje en el plano $x'y'$ del sistema rotante. Entonces, la magnetización \vec{M} interactúa con \vec{B}_1 y precesa a una frecuencia denominada frecuencia de nutación ($\omega_1 = \gamma B_1$) y la acción del campo magnético externo \vec{B}_0 se elimina de manera efectiva. Cuando la onda de RF no tiene exactamente la misma frecuencia que la de Larmor ($\omega_{RF} \neq \omega_0$), es decir está fuera de resonancia, el campo \vec{B}_0 no se elimina completamente y la magnetización neta interactúa con un campo efectivo \vec{B}_{eff} dado por:

$$\vec{B}_{eff} = \left(B_0 - \frac{\omega_{RF}}{\gamma} \right) \hat{k} + \vec{B}_1 \quad (2.7)$$

El campo RF se aplica, generalmente, en forma de pulsos cortos. Un pulso se caracteriza por un ángulo θ_{RF} y una fase ϕ_{RF} , donde la fase se define como el ángulo que forma \vec{B}_1 con el eje x del sistema rotante (ϕ_{RF} puede ser 0 o 90° , si el pulso se aplica en x o en y respectivamente); y el ángulo θ_{RF} es el ángulo que girará la magnetización \vec{M} durante el tiempo de pulso. La relación entre el ángulo del pulso y el tiempo del mismo está dada por³:

$$\theta_{rf} = \omega_1 \tau_{rf} \quad (2.8)$$

En la Figura 2.4 se muestra el efecto de un pulso con ángulo $\theta_{RF} = 90^\circ$ y fase $\phi_{RF} = 90^\circ$. La magnetización en la dirección z' es rotada en 90° alrededor del eje y' , dando como resultado una magnetización en la dirección x' .

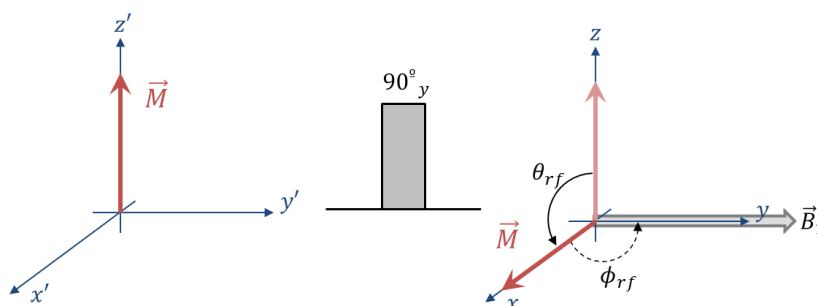


Figura 2.4 Representación del efecto de un pulso de 90°_y

Un momento magnético girando genera un campo magnético oscilante; y un campo magnético oscilante tiene asociado, por Maxwell, un campo eléctrico. Este

efecto lleva a que la componente de \vec{M} , transversal al campo \vec{B}_0 , precesando alrededor de \vec{B}_0 genera un campo eléctrico. Si se coloca una bobina de alambre cerca de la muestra, el campo eléctrico asociado generará una corriente de RF inducida en la bobina. Esta corriente eléctrica oscilante se denomina señal de NMR o decaimiento libre de la señal inducida, FID (por su sigla en inglés, *free induction decay*); y la transformada de Fourier (FT) de esta señal convierte los FID en los espectros de NMR familiares.

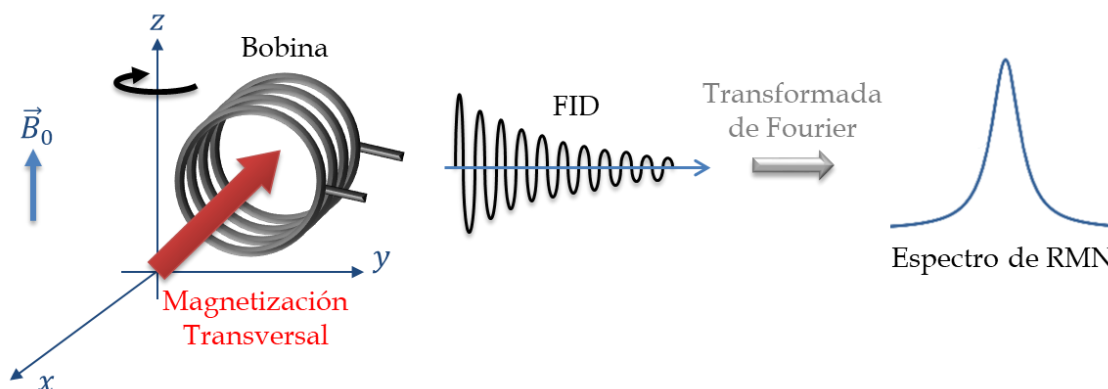


Figura 2.5 Generación de un espectro de RMN.

2.1.3 Relajación

Cuando un sistema es perturbado llevándolo fuera de su estado de equilibrio éste retornará a su estado inicial a través de procesos de relajación. En un experimento de NMR, los pulsos RF se utilizan para perturbar el estado de equilibrio de la magnetización. Cuando se apaga dicho pulso, \vec{M} vuelve al equilibrio mediante dos procesos: relajación *longitudinal* (que tiene un tiempo T_1 asociado) y relajación *transversal* (que tiene un tiempo T_2 asociado). Existen otros procesos de relajación, dependiendo de cuáles son las interacciones dominantes, entre los más relevantes debemos mencionar la relajación asociada a la aplicación de un campo constante de RF, conocido como relajación en la *terna rotante* (que tiene un tiempo $T_{1\rho}$ asociado).

La relajación *longitudinal*, o *espín-red*, describe el retorno al equilibrio de la población de los estados de espín, es decir, el retorno del vector \vec{M} al eje \vec{B}_0 (ecuación (2.9)). En este caso, las interacciones entre espines resultan en la transferencia de energía a la red circundante, por lo que la relajación se ve afectada por la dinámica local en el sistema. La constante de tiempo para este proceso se conoce como T_1 , y en sistemas sólidos, es del orden de varios segundos. La ecuación (2.9) describe el comportamiento de la componente longitudinal de la magnetización con el tiempo:

$$M_z(t) = M_{eq} \left(1 - e^{\left(\frac{-t}{T_1}\right)} \right) \quad (2.9)$$

donde M_{eq} es la magnetización en el equilibrio térmico. El tiempo de relajación T_1 de un sistema determina qué tan rápido pueden aplicarse pulsos de RF sucesivos, ya que,

si la magnetización no ha vuelto al estado inicial antes del siguiente pulso, el pulso RF afectará sólo a la parte relajada de \vec{M} . Para que ocurra la relajación total de \vec{M} , el tiempo entre los pulsos debe ser de al menos 5 veces T_1 , en cuyo punto la magnetización se ha relajado en un 99%².

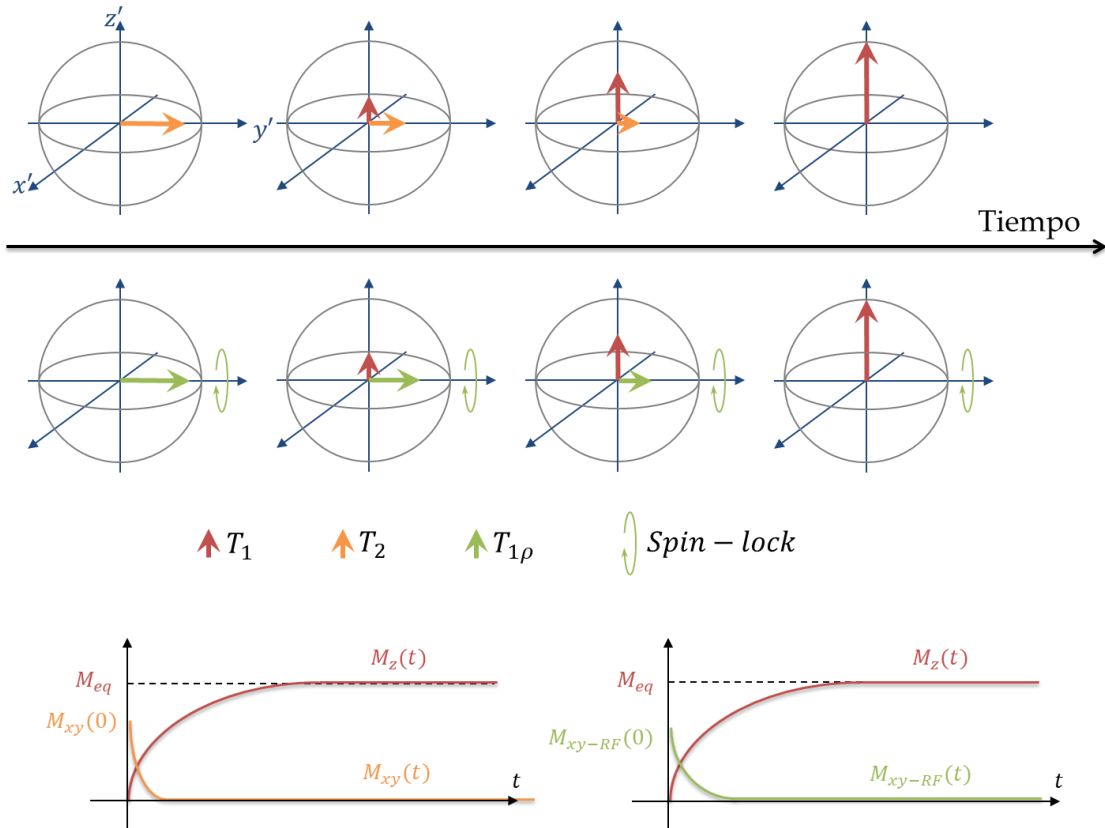


Figura 2.6 Arriba: Relajación del vector magnetización después de un pulso de $\frac{\pi}{2}$. Relajación T_1 a lo largo del eje z' en rojo, relajación T_2 en el plano $x'y'$ en naranja y $T_{1\rho}$ con spin-lock en el plano $x'y'$ en verde. Abajo: Comportamiento de la intensidad de las componentes de la magnetización en función del tiempo.

La relajación *transversal*, también conocida como *espín-espín*, describe el decaimiento de la componente transversal de la magnetización (M_{xy} , ecuación (2.10)). Esta componente se encuentra directamente relacionada con la pérdida de coherencia de los espines en el plano perpendicular al campo \vec{B}_0 . Este mecanismo implica la interacción de espines entre sí sin transferir energía a la red circundante. La constante de tiempo asociada con este proceso se denomina T_2 y generalmente se encuentra en la escala de los milisegundos. La ecuación (2.10) muestra la expresión matemática para la relajación de la componente M_{xy} .

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0)e^{\left(\frac{-t}{T_2}\right)} \quad (2.10)$$

Existe otro tipo de relajación denominado $T_{1\rho}$, o relajación en la *terna rotante*, que sigue el mismo principio que el tiempo T_1 , excepto que la magnetización se equilibra a una temperatura de espín dada por la amplitud del campo de RF aplicado.

El tiempo $T_{1\rho}$ es sensible a los movimientos moleculares en escalas de tiempo de los milisegundos, a diferencia de T_1 , que es sensible a los movimientos del orden de los microsegundos².

$$M_{xy-RF}(t) = M_{xy-RF}(0)e^{\left(\frac{-t}{T_{1\rho}}\right)} \quad (2.11)$$

En la Figura 2.6 se muestra el comportamiento del vector magnetización cuando está afectado por cada uno de los procesos de relajación.

2.1.4 Interacciones de NMR

Hasta este momento se han analizado los efectos de la aplicación de campos magnéticos externos sobre un conjunto de espines. Sin embargo, existen fuentes de campos magnéticos en el interior de la muestra que también afectan al sistema de espines. Sin la presencia de estos campos magnéticos internos, todos los núcleos de una misma especie resonarían a una misma frecuencia y el espectro de NMR resultaría en una única señal. Sin embargo, las interacciones existentes dentro de una muestra, provocan cambios sustanciales en las señales de resonancia y son las que permiten obtener información sobre la misma, es decir dan sentido al análisis espectroscópico de NMR.

El Hamiltoniano de interacción total de un espín nuclear \hat{I} está dado por:

$$\hat{\mathcal{H}}_T = \hat{\mathcal{H}}_Z + \hat{\mathcal{H}}_{RF} + \hat{\mathcal{H}}_{CS} + \hat{\mathcal{H}}_D + \hat{\mathcal{H}}_J + \hat{\mathcal{H}}_Q \quad (2.12)$$

donde cada término identifica una interacción diferente. Las principales interacciones son:

- $\hat{\mathcal{H}}_Z$, el Hamiltoniano Zeeman: describe la interacción de los espines con el campo magnético externo \vec{B}_0 , el cual es constante.
- $\hat{\mathcal{H}}_{RF}$, el Hamiltoniano de RF: describe la interacción de los espines con el campo magnético externo \vec{B}_1 y es dependiente del tiempo.
- $\hat{\mathcal{H}}_{CS}$, el Hamiltoniano de Corrimiento Químico (CS por su sigla en inglés, *Chemical Shift*): describe el efecto de apantallamiento del campo \vec{B}_0 debido a los electrones presentes alrededor del núcleo.
- $\hat{\mathcal{H}}_D$, el Hamiltoniano de acoplamiento Dipolar: describe la interacción *espín-espín* entre núcleos a través del espacio.
- $\hat{\mathcal{H}}_J$, el Hamiltoniano de acoplamiento J o acoplamiento indirecto: describe la interacción magnética indirecta entre los espines nucleares mediada por la presencia de electrones.
- $\hat{\mathcal{H}}_Q$, el Hamiltoniano de acoplamiento Cuadrupolar (Q por su nombre en inglés): describe el efecto la interacción de los núcleos que poseen espín nuclear mayor a $1/2$ con el gradiente de campo eléctrico.

A continuación, se describen brevemente estas interacciones.

2.1.4.1 Corrimiento químico

Los núcleos están rodeados por una nube de electrones y, en presencia de un campo \vec{B}_0 , esta densidad de electrones induce un pequeño campo magnético que se opone al campo aplicado. Esto produce que el núcleo en lugar de “sentir” un campo aplicado \vec{B}_0 , “sienta” un campo efectivo reducido \vec{B}_{nuc} , según se muestra en la ecuación (2.13) donde σ es el tensor de apantallamiento químico.

$$\vec{B}_{nuc} = (1 - \sigma)\vec{B}_0 \quad (2.13)$$

De esta manera, las energías de los estados del sistema de espines se verán afectadas por el apantallamiento magnético, por lo que la frecuencia de resonancia de cada núcleo variará en función de σ , el tensor de apantallamiento magnético. Es decir, en función de la distribución de electrones alrededor del núcleo y de la orientación de estos respecto del campo externo \vec{B}_0 . El tensor σ es un tensor de rango 2 que puede representarse como:

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & \sigma_{xz} \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & \sigma_{yz} \\ \sigma_{zx} & \sigma_{zy} & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (2.14)$$

Este tensor suele escribirse en un sistema de coordenadas, denominado Sistema de Ejes Principales (SEP) en el cual es diagonal. 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. Si se considera al tensor como un elipsoide fijo en la molécula y centrado en el núcleo, los ejes principales de la elipse coinciden con los ejes del SEP, y la longitud de cada eje principal del elipsoide es proporcional al valor principal del tensor asociado con ese eje principal. En la Figura 2.7 se muestra ilustración de la representación del tensor de apantallamiento como un elipsoide, y la definición de los ángulos polares que definen la orientación del campo externo \vec{B}_0 en el SEP.

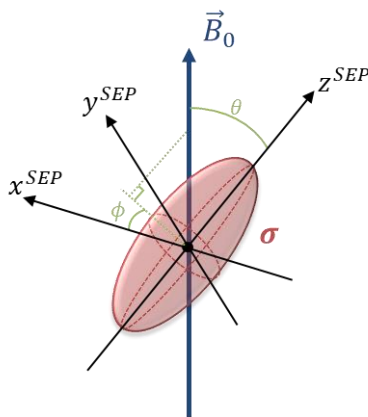


Figura 2.7 Representación del tensor de apantallamiento químico como elipsoide y definición de los ángulos polares para la orientación del campo \vec{B}_0 en el Sistema de Ejes Principales.

Los tres valores principales del tensor de apantallamiento químico $\sigma_{\alpha\alpha}^{SEP}$ generalmente se expresan como un valor isotrópico σ_{iso} , uno anisotrópico Δ y uno asimétrico η . Estas cantidades están definidas como:

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3} (\sigma_{xx}^{SEP} + \sigma_{yy}^{SEP} + \sigma_{zz}^{SEP}) \quad (2.15)$$

$$\Delta = \sigma_{zz}^{SEP} - \sigma_{iso} \quad (2.16)$$

$$\eta = \frac{\sigma_{xx}^{SEP} - \sigma_{yy}^{SEP}}{\sigma_{zz}^{SEP}} \quad (2.17)$$

En función de estas componentes, la frecuencia de corrimiento químico se expresa como:

$$\omega_{CS}(\theta, \phi) = -\omega_0 \sigma_{iso} - \frac{1}{2} \omega_0 \Delta \left(3 \cos^2(\theta) - 1 + \frac{1}{2} \eta \sin^2(\theta) \cos(2\phi) \right) \quad (2.18)$$

donde θ y ϕ definen la orientación del campo aplicado \vec{B}_0 en el SEP, como se muestra en la Figura 2.7. El primer término de la ecuación (2.18) corresponde al corrimiento químico isotrópico y en un espectro de NMR se observa como un cambio en la frecuencia de resonancia típica del núcleo; donde una frecuencia más baja significa que el núcleo está más apantallado, es decir “siente” un menor campo magnético. Dado que es muy difícil medir el apantallamiento magnético de manera directa⁴, en su lugar se miden los corrimientos químicos δ , en unidades de partes por millón (ppm). Estos, en una buena aproximación, son linealmente dependientes del campo¹, y generalmente se informan con relación a un compuesto de referencia tal como tetrametilsilano (TMS, $C_4H_{12}Si$) para el caso de H, C y Si. Este corrimiento se calcula como:

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{ref}}{\omega_{ref}} \times 10^6 \quad (2.19)$$

donde ω y ω_{ref} son las frecuencias de NMR, medidas en el mismo campo aplicado, del compuesto de interés y la muestra de referencia, respectivamente.

El segundo término de la ecuación (2.18) está asociado a la anisotropía y a la asimetría, se conoce como anisotropía de corrimiento químico, CSA (por su sigla en inglés, *Chemical Shift Anisotropy*) y es altamente dependiente de la orientación de cada molécula respecto a \vec{B}_0 . En una muestra de polvo, están presentes todas las orientaciones moleculares, lo que significa que todos los valores del ángulo θ y ϕ son posibles. Cada orientación molecular diferente implica un corrimiento químico diferente, y, por lo tanto, el espectro presentará líneas de las diferentes orientaciones moleculares superpuestas.

2.1.4.2 Interacción Dipolar

Así como dos imanes clásicos interactúan entre sí a través del espacio, también lo hacen los espines nucleares a través de la denominada interacción dipolar. Clásicamente, la energía de interacción entre dos dipolos magnéticos $\vec{\mu}_1$ y $\vec{\mu}_2$ separados por \vec{r} es:

$$U = \left\{ \frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} \right\} \frac{\mu_0}{4\pi} \quad (2.20)$$

Sustituyendo los dipolos magnéticos por la definición cuántica del operador momento magnético $\hat{\mu}$ para un espín I (ver ecuación (2.1)), se obtiene el hamiltoniano de acoplamiento dipolar entre dos espines I y S :

$$\hat{H}_D = -\frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_I \gamma_S \hbar^2 \left\{ \frac{\hat{I} \cdot \hat{S}}{r^3} - 3 \frac{(\hat{I} \cdot \vec{r})(\hat{S} \cdot \vec{r})}{r^5} \right\} \quad (2.21)$$

Reescribiéndolo en coordenadas esféricas:

$$\hat{H}_D = -\frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar^2}{r^3} (A + B + C + D + E + F) \quad (2.22)$$

donde

$$\begin{aligned} A &= \hat{I}_z \hat{S}_z (3 \cos^2 \theta - 1) \\ B &= -\frac{1}{4} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) (3 \cos^2 \theta - 1) \\ C &= -\frac{3}{2} (\hat{I}_z \hat{S}_+ + \hat{I}_+ \hat{S}_z) (\sin \theta \cos \theta e^{-i\phi}) \\ D &= -\frac{3}{2} (\hat{I}_z \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_z) (\sin \theta \cos \theta e^{+i\phi}) \\ E &= -\frac{3}{4} \hat{I}_+ \hat{S}_+ \sin^2 \theta e^{-2i\phi} \\ F &= -\frac{3}{4} \hat{I}_- \hat{S}_- \sin^2 \theta e^{+2i\phi} \end{aligned} \quad (2.23)$$

los ángulos θ y ϕ son los ángulos polar y azimutal, respectivamente, que forma el vector internuclear \vec{r}_{IS} con el campo \vec{B}_0 . Vale destacar que la intensidad de esta interacción es mucho más chica que la interacción Zeeman, por lo que puede considerarse como una perturbación a ésta última. El hamiltoniano dipolar puede escribirse entonces como un hamiltoniano secular, \hat{H}_D^0 , respecto del hamiltoniano Zeeman.

Para el caso de interacciones entre espines iguales (I, I) deben conservarse tanto el término A como el B de (2.23), quedando:

$$\hat{H}_{II}^0 = -\frac{1}{2} \frac{\mu_0 \gamma_I^2 \hbar^2}{4\pi r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \left(2\hat{I}_Z \hat{I}_Z - \frac{1}{2} (\hat{I}_+ \hat{I}_- + \hat{I}_- \hat{I}_+) \right) \quad (2.24)$$

Mientras que el caso heteronuclear sólo se conserva el término A:

$$\hat{H}_{IS}^0 = -\frac{\mu_0 \gamma_I^2 \hbar^2}{4\pi r^3} (3 \cos^2 \theta - 1) \hat{I}_Z \hat{I}_Z \quad (2.25)$$

La constante de acople dipolar contiene información acerca de la distancia internuclear, r , y el término $(3 \cos^2 \theta - 1)$ contiene información acerca de la orientación con respecto al campo estático \vec{B}_0 . La interacción dipolar brinda 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.

2.1.4.3 Interacción Cuadrupolar

Los núcleos cuadrupolares constituyen más del 74% de la tabla periódica⁵ y poseen un espín nuclear $I > 1/2$. Esto significa que la distribución de carga en el núcleo no es uniforme, por lo que puede interactuar con el gradiente de campo eléctrico local (EFG) que resulta de la densidad de electrones cercana. La interacción cuadrupolar es, por lo tanto, una interacción eléctrica en lugar de una interacción magnética y, por lo general, es varios órdenes de magnitud más pequeña que la interacción Zeeman. El EFG se describe a través de un tensor $e\mathbf{q}$ de traza nula que no posee componente isotrópica. Al igual que en el caso del tensor de corrimiento químico, las componentes principales del tensor $e\mathbf{q}$ se expresan en su SEP. A partir de estas componentes se definen la constante de acoplamiento cuadrupolar χ , y la asimetría η como:

$$\chi = \frac{e^2 q_{zz}^{SEP} Q}{\hbar} \quad (2.26)$$

$$\eta = \frac{q_{xx}^{SEP} - q_{yy}^{SEP}}{q_{zz}^{SEP}} \quad (2.27)$$

donde eQ es el momento cuadrupolar del núcleo estudiado.

En función de estas cantidades, el Hamiltoniano de interacción cuadrupolar está dado por:

$$\hat{H}_Q = \frac{3\chi}{8I(2I+1)} \left(3 \cos^2(\theta) - 1 + \frac{1}{2} \eta \sin^2(\theta) \cos(2\phi) \right) (3\hat{I}_z - \hat{I}^2) \quad (2.28)$$

donde θ y ϕ definen la orientación del campo aplicado \vec{B}_0 en el SEP de manera análoga

a la presenta en la Figura 2.7. A partir de la ecuación (2.28) se pueden encontrar las frecuencias de transición esperadas para un núcleo cuadrupolar en un campo magnético fuerte. En caso de no poseer asimetría ($\eta = 0$), estas frecuencias estarán dadas por:

$$\omega_Q(\theta) = \omega_0 - \frac{3}{8} \left(\frac{2m-1}{I(2I-1)} \right) \chi (3 \cos^2(\theta) - 1) \quad (2.29)$$

donde ω_0 es la frecuencia de Larmor en ausencia de acoplamiento cuadrupolar y m es el número cuántico magnético; el segundo término describe la modulación de la frecuencia debido al acoplamiento cuadrupolar. La forma de línea resultante entonces depende fuertemente del núcleo bajo estudio y de la orientación del campo externo. La dependencia $(3 \cos^2(\theta) - 1)$ de las frecuencias de transición lleva a que cada transición de lugar a una forma de línea similar a la que se observa en anisotropía por corrimiento químico y en el acoplamiento dipolar.

2.1.4.4 Acoplamiento indirecto, J

La densidad de electrones que rodea los núcleos permite que los espines vecinos interactúen entre sí. Esta interacción se denomina acoplamiento indirecto espín-espín o acoplamiento J . Este es exclusivamente una interacción intramolecular y permite una correlación directa entre la NMR y la química. El acoplamiento en J es anisotrópico debido a la naturaleza asimétrica de la densidad electrónica, pero la magnitud es pequeña en comparación con otras interacciones presentes en estado sólido, por lo que generalmente no afecta la apariencia de los espectros. Sin embargo, un análisis detallado permite explorar su relación con la conectividad intramolecular².

2.1.5 NMR en estado sólido

El estudio de las interacciones nucleares a través de los espectros de NMR puede proporcionar información útil sobre el sistema en estudio. Sin embargo, las interacciones descritas anteriormente son todas dependientes de la orientación con respecto a \vec{B}_0 . Como resultado de esto, el espectro de NMR de una muestra de polvo contiene líneas anchas (característicos de los patrones de polvo) que ocultan información sobre los sitios nucleares individuales que pueda contener el espectro. Esto lleva a que en NMR de estado sólido sea necesario aplicar técnicas particulares que permitan sortear estos efectos y obtener alta resolución en los espectros.

En la década de 1950 se descubrió que girar mecánicamente una muestra sólida dentro de la sonda de NMR en un ángulo de $54,74^\circ$ con respecto al campo \vec{B}_0 da como resultado un notable estrechamiento de las líneas espectrales, mejorando así la resolución experimental^{6,7}. Esto se debe a que todas las interacciones de NMR contienen un término dependiente de la orientación de la forma $(3 \cos^2(\theta) - 1)$.

Cuando $\theta = 54,74^\circ$, denominado el ángulo mágico, este término se convierte en cero simulando así el movimiento isotrópico que ocurre en la solución. Los sistemas con rotación al ángulo mágico (MAS por su sigla en inglés, *Magic Angle Spinning*) han abierto nuevas áreas de manipulación de señales, permitiendo cada vez mejores experimentos en NMR de estado sólido.

La interacción dipolar en sólidos orgánicos es típicamente moderada, de alrededor de 2 kHz para el acoplamiento ^{13}C - ^{13}C ⁸, por lo que bajas velocidades MAS (2-10 kHz) son suficientes para promediar dicha interacción. Sin embargo, la magnitud del acoplamiento dipolar que involucra protones en estado sólido es particularmente grande²: de aproximadamente 25 kHz para el acoplamiento ^1H - ^{13}C y mucho más grande para el acoplamiento ^1H - ^1H . Esto significa que los espectros de ^1H requieren velocidades de rotación característicamente altas para estrechar las líneas espectrales⁹. Dado el desafío mecánico que significa rotar a tan altas velocidades, se utilizan además secuencias multipulsos para disminuir el acoplamiento dipolar efectivo. Estas secuencias, conocidas como secuencias de desacople, se aplican en conjunto con MAS para obtener espectros de mayor resolución. En el Capítulo 3 se presentan con más detalle las secuencias de desacople utilizadas durante esta tesis.

Por otro lado, las contribuciones del corrimiento químico (CSA) pueden alcanzar hasta unos 15 kHz para ^{13}C , lo que requiere velocidades MAS de al menos 25 kHz para promediarlas totalmente. Cuando se utilizan velocidades más bajas, el patrón de polvo se desdobra en varias bandas rotacionales, que aparecen a cada lado del desplazamiento isotrópico separadas por la frecuencia de rotación. Estas bandas rotacionales son el resultado de ecos de rotación: la orientación de la muestra cambia con respecto a \vec{B}_0 durante la rotación MAS, por lo que ω_1 y el apantallamiento químico también cambian, volviendo a sus valores originales cuando el rotor vuelve a su posición original con respecto a \vec{B}_0 . La señal, por lo tanto, consiste en una serie de ecos rotacionales asociados con esta evolución³. En presencia de un CSA grande y velocidades de rotación bajas, el pico isotrópico no es necesariamente el más intenso, Figura 2.8, y las bandas rotacionales pueden ser aún más intensas si la contribución dipolar también es grande. El CSA escala con la frecuencia de Larmor (ver ecuación (2.18)), por lo que se requiere rotaciones más rápidas en campos magnéticos más altos². De manera similar, la interacción cuadrupolar es demasiado grande para promediarla por completo, lo que resulta en múltiples bandas rotacionales al usar MAS.

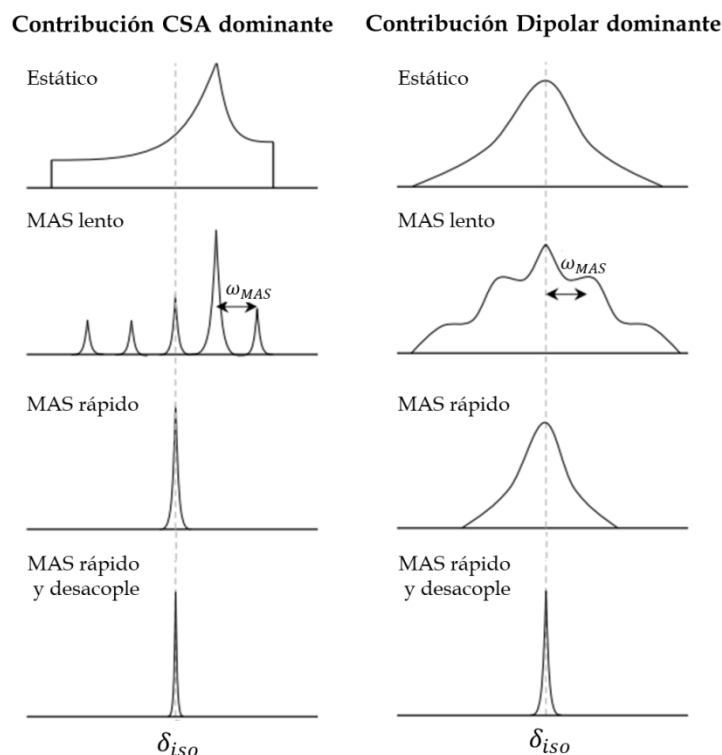


Figura 2.8 Efecto de la MAS y el desacoplamiento en espectros esquemáticos de dos sistemas, uno dominado por CSA y el otro dominado por acoplamiento dipolar.

Los primeros experimentos⁶ MAS se realizaron rotando a aproximadamente 0,8kHz, mientras que en la actualidad¹⁰ existen sondas capaces de rotar a 150kHz. A pesar de los grandes avances en el diseño de sondas MAS, aún son necesarios mayores desarrollos mecánicos que permitan alcanzar mayores velocidades de rotación. En 2015 Böckmann et al.¹¹ estimaron que se necesitan velocidades de rotación de unos 250kHz para poder promediar de manera efectiva acoplamientos dipolares homonucleares en proteínas. De esta manera podrían obtenerse espectros de NMR en estado sólido con resoluciones comparables a los espectros en solución¹¹.

Una limitación importante en la NMR es la baja abundancia natural de algunos isótopos sensibles a la técnica e importantes en el área de cristales moleculares orgánicos como por ejemplo ^{13}C y ^{15}N , los cuales tienen una abundancia natural de 1,1% y 0,37%, respectivamente. La poca abundancia natural del núcleo implica que la relación señal ruido sea inevitablemente pobre. Además, los tiempos de relajación de estos núcleos con poca abundancia natural suelen ser muy largos, dada la ausencia de interacción dipolar homonuclear fuerte, que pueda estimular la relajación espín red. Los largos tiempos de relajación hacen que el tiempo mínimo entre experimentos sea muy largo y la poca abundancia hace que se necesiten un gran número de repeticiones para obtener un espectro de calidad. En la búsqueda de sortear estas desventajas los espectroscopistas han desarrollado secuencias de doble resonancia, como la Polarización Cruzada (CP por su sigla en inglés, *Cross Polarization*). En el Capítulo 3 se presentan una explicación de las secuencias utilizadas en esta tesis.

2.2 Teoría del Funcional de la Densidad Electrónica

La aplicación de la Teoría del Funcional de la Densidad electrónica (DFT, por sus siglas en inglés, *Density Functional Theory*) permite el estudio de una gran variedad de propiedades de los materiales en base a un procedimiento variacional alternativo a la resolución de la ecuación de Schrödinger. Desde los últimos años, la DFT es considerada como un método de mecánica cuántica satisfactoriamente metódico y competente para ser empleado en estudios farmacéuticos¹². Los sistemas moleculares biológicamente importantes se pueden describir con precisión utilizando DFT a un costo computacional menor que otros métodos computacionales, lo que la convierte en una técnica altamente utilizada. La combinación de NMR y DFT para el estudio cristalográfico de materiales ha aumentado significativamente en las últimas décadas⁸, de la mano del desarrollo del cálculo computacional. En la Figura 2.9 puede verse el notorio aumento de las publicaciones que combinan estas dos técnicas en los últimos 30 años. A continuación, se analizan brevemente los fundamentos de esta teoría.

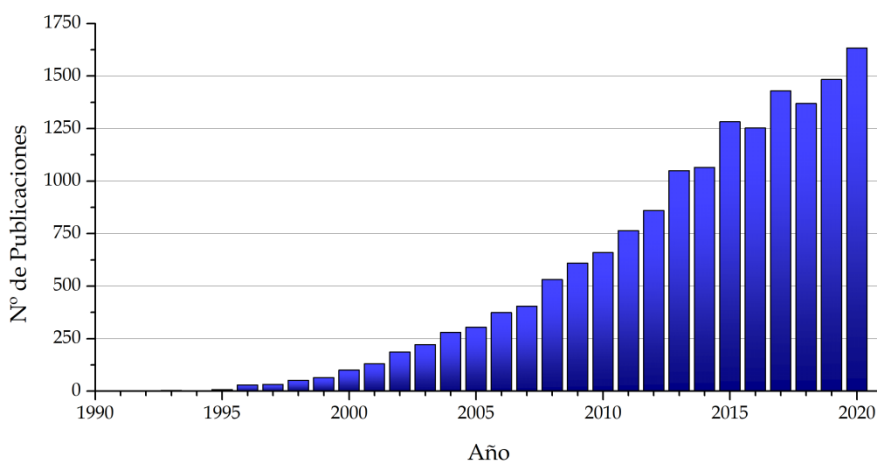


Figura 2.9 Número de publicaciones por año que contienen las palabras *DFT* y *NMR* en los últimos 30 años. Datos obtenidos de SCOPUS.

El comportamiento de una colección de átomos (núcleos y electrones) se puede describir resolviendo la ecuación de Schrödinger del sistema:

$$\hat{H}|\Psi\rangle = E|\Psi\rangle \quad (2.30)$$

donde el hamiltoniano \hat{H} contiene las diversas interacciones entre las partículas que conforman el sistema en estudio. Es posible llegar a la resolución analítica exacta de esta ecuación para un átomo de hidrógeno (H), mientras que para la molécula de hidrógeno (H₂) ya son necesarias aproximaciones y soluciones numéricas debido al gran número de variables a considerar. Por lo que una aplicación directa de esta ecuación en materiales reales resulta imposible. Por ejemplo, si se quisiera aplicar la ecuación (2.30) a una única molécula de agua (la cual contiene 3 núcleos y 10 electrones), la función de onda completa es una función de 39 dimensiones (3

dimensiones espaciales por cada núcleo y electrón) que deben resolverse en forma simultánea debido a las interacciones entre ellas.

Se puede hacer una simplificación importante al señalar que la masa de los núcleos es mucho mayor que la masa del electrón, lo cual conduce a la aproximación de Born-Oppenheimer¹³, en la que los grados de libertad, electrónicos y nucleares, pueden separarse. En el caso del cálculo de una molécula de agua pasaríamos a tener 30 dimensiones para los electrones. Entonces, incluso con esta simplificación, sigue siendo poco práctico resolver la ecuación (2.30) para cualquier otro sistema que no sea el más trivial.

La DFT fue desarrollada por Hohenberg y Kohn¹⁴ en 1964, quienes replantearon la ecuación de Schrödinger para definir a la energía como un funcional universal de la densidad electrónica que permite la obtención de todas las propiedades del sistema. Si bien esta teoría no plantea la forma de dicho funcional, demuestra la existencia del mismo y plantea que este funcional minimiza la energía para la densidad del estado fundamental. El enfoque DFT reduce teóricamente el problema de las $3N$ dimensiones en cualquier sistema de N electrones a sólo 3 dimensiones (las espaciales de la densidad electrónica). En base a esta teoría no es necesario encontrar la función de onda asociada a cada electrón, dado que toda la información se puede obtener a partir de una única densidad electrónica colectiva del sistema.

La formulación de Kohn-Sham reescribe las ecuaciones de la DFT para posibilitar su aplicación práctica. Esta formulación mapea exactamente la ecuación de Schrödinger de muchos cuerpos (2.30) en un conjunto de N ecuaciones (N el número de electrones del sistema) que involucran funciones de onda de una sola partícula (función de onda de Kohn-Sham)

$$-\frac{\hbar^2}{2m_e}\nabla^2\Psi_i(\vec{r}) + v_{eff}(\vec{r})\Psi_i(\vec{r}) = \varepsilon\Psi_i(\vec{r}) \quad (2.31)$$

donde el potencial de Kohn-Sham, $v_{eff}(\vec{r})$ contiene términos que surgen de la interacción con las cargas iónicas $V_{ion}(\vec{r})$, la energía de interacción de Coulomb de la densidad de carga que interactúa consigo misma y un potencial V_{XC} , que describe los efectos de correlación e intercambio entre los electrones:

$$v_{eff}(\vec{r}) = V_{ion}(\vec{r}) + \int d\vec{r}' \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} + V_{XC}[\rho(\vec{r})] \quad (2.32)$$

En la Figura 2.10 se muestra un diagrama de flujo de la resolución de las ecuaciones de Kohn-Sham, mediante cálculo autoconsistente, utilizado en las simulaciones DFT.

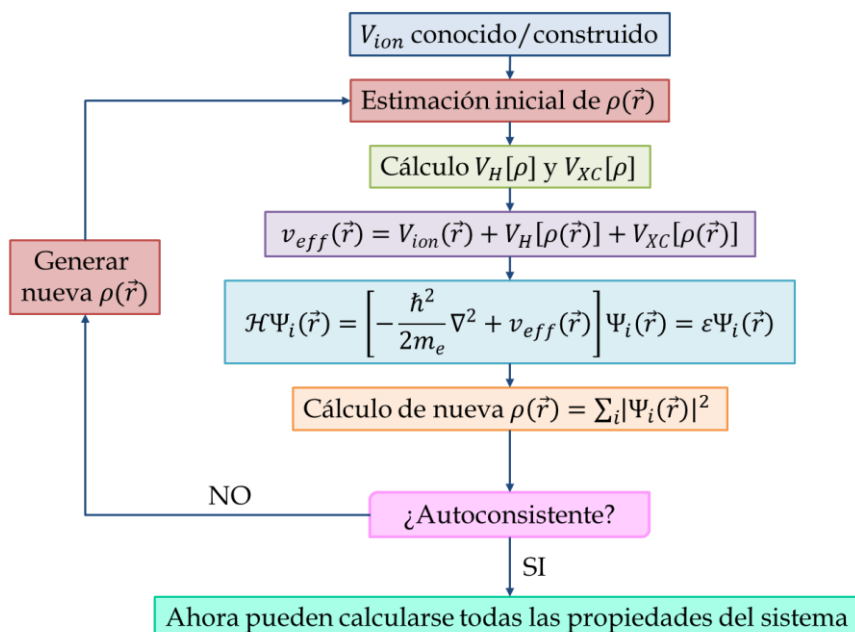


Figura 2.10 Diagrama de flujo de la resolución de las ecuaciones de Kohn-Sham, mediante cálculo autoconsistente, utilizado en las simulaciones DFT.

El conjunto de ecuaciones (2.31) y (2.32), para electrones no interactuantes, es un sistema resoluble, pero al precio de que se desconoce la forma exacta del funcional V_{XC} . Sin embargo, diferentes aproximaciones a dicho funcional han demostrado la capacidad de describir satisfactoriamente muchos sistemas. Se han propuesto numerosos funcionales V_{XC} , entre los cuales el funcional con aproximación del gradiente generalizado de la densidad electrónica (GGA) de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE)¹⁵ se ha utilizado ampliamente para cálculos de parámetros de NMR en estado sólido¹⁶, y es el que se utilizó para los cálculos realizados en esta tesis.

Para resolver numéricamente el problema de autovalores de la ecuación (2.31), los autoestados deben estar representados en algún conjunto de bases. Si bien hay muchas opciones posibles, el programa Quantum Espresso utilizado durante esta tesis, hace uso de una base de ondas planas. El uso de este conjunto base tiene muchas ventajas: las ondas planas forman una base matemáticamente simple, naturalmente incorporan condiciones de contorno periódicas y, quizás lo más importante, los cálculos de ondas planas se pueden llevar sistemáticamente a la convergencia en función del tamaño de la base. El número de ondas planas utilizadas, es decir, el tamaño del conjunto base, es uno de los parámetros de cálculo más importantes y se controla mediante la energía de corte E_{cut} . Por otro lado, dado que el enfoque de ondas planas utiliza el Teorema de Bloch para explotar la simetría traslacional de los sistemas cristalinos, las propiedades físicas se calculan como un promedio sobre un número determinado de puntos k en la primer Zona de Brillouin del espacio recíproco¹⁷. El espaciado de puntos k determina qué tan definido es el muestreo de la Zona de Brillouin; cuanto más fino sea el muestreo, más recursos computacionales se requieren, pero los valores predichos serán más confiables. Ambos parámetros se ajustan en los

cálculos para tener una descripción correcta del sistema y sus propiedades, sin emplear más recursos computacionales de los necesarios. Este ajuste depende de cada sistema en particular, el detalle de los mismos se encuentra en el Capítulo 3.

Los electrones de un átomo se pueden dividir en dos tipos: electrones de carozo y electrones de valencia. Los electrones de carozo (o core) son los que están estrechamente unidos al núcleo y no juegan ningún papel en las interacciones entre átomos. Los electrones de valencia, en cambio, dictan la mayoría de las propiedades del material ya que son quienes participan de los enlaces químicos. Dada esta distinción entre los electrones de un átomo, es común utilizar la aproximación de pseudopotenciales para representar las interacciones entre los estados de core y de valencia. En esta aproximación sólo los electrones de valencia se consideran explícitamente, mientras que los efectos de los electrones de carozo y el núcleo se integran dentro de un potencial iónico equivalente. La ventaja de esta aproximación es que reduce el número de grados de libertad y además reduce el costo computacional de considerar la ortogonalidad de las funciones de onda entre los electrones de core y de valencia. Se han desarrollado numerosos esquemas para producir pseudopotenciales óptimos, entre las opciones más utilizadas se encuentran los pseudopotenciales que conservan la norma desarrollados por Troullier y Martins¹⁸ y el esquema ultrasoft de Vanderbilt¹⁹.

La predicción mediante métodos ab initio (que parten de las ecuaciones fundamentales de la física cuántica) de corrimientos químicos se ha aplicado durante mucho tiempo en moléculas aisladas relativamente pequeñas^{20,21}. El creciente interés por la implementación de espectroscopía de alta resolución por NMR de sistemas extensos (cristales ordenados, sólidos amorfos, incluso biomoléculas grandes), demanda un soporte teórico para apoyar el experimento. Dada la periodicidad de los cristales moleculares los enfoques que utilizan DFT con bases de ondas planas son la primera opción para el cálculo de parámetros de NMR. Sin embargo, el hecho de que las propiedades de NMR sean altamente sensibles a la estructura electrónica, incluidos los electrones de core, hace que la información “excluida” en la aproximación de pseudopotenciales deba recuperarse para realizar dichos cálculos. Por esta razón, en 2001 Pickard y Mauri²² desarrollaron un método numérico mediante el cual las propiedades de los electrones de core son reconsideradas en la aproximación de pseudopotencial atómico: el método del *proyector de onda aumentada con indicador incluido* (GIPAW por su sigla en inglés, *Gauge Including Projector Aumented Wave*). Este método es una extensión de la teoría del *proyector de onda aumentada* (PAW por su sigla en inglés, *Projector Aumented Wave*) desarrollada por van de Walle y Blöchl²³. El método PAW es un método que demostró ser apropiado para sistemas aislados en un campo magnético externo, pero no así para sistemas periódicos. El método GIPAW se ha convertido, desde su desarrollo, en el método más utilizado por la comunidad de cristalografía de NMR tanto para el estudio de materiales orgánicos como inorgánicos.

En la actualidad existen numerosos códigos computacionales que permiten la realización de cálculos de DFT con gran eficiencia, tanto de distribución gratuita como bajo licencia. En esta tesis se utilizó el código libre Quantum Espresso²⁴, el cual tiene

una amplia aplicación en la descripción de propiedades de materiales y es uno de los códigos de mayor uso en el área. Además, el código dispone de un paquete adicional que permite realizar un post-procesamiento de datos para obtener los parámetros de NMR mediante el método GIPAW. En el presente trabajo de tesis se realizaron cálculos DFT para el estudio de diferentes sistemas cristalinos desarrollados en los Capítulos 5 y 7. Debido a la complejidad de estos sistemas es necesario un gran poder de cómputo, por lo que los cálculos se realizaron utilizando recursos computacionales del CCAD de la Universidad Nacional de Córdoba, que forman parte del SNCAD del MinCyT. En el Capítulo 3 se detallan los parámetros de cada uno de los cálculos realizados

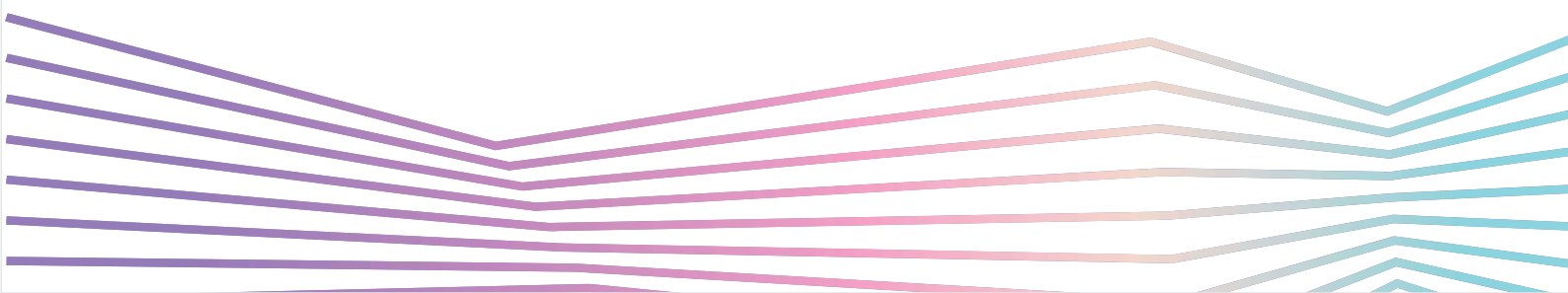
2.3 Referencias

1. Levitt MH. Spin Dynamics Basics of Nuclear Magnetic Resonance. doi:10.1002/cmr.a.20130
2. Apperley D, Harris R, Hodgkinson P. *Solid-State NMR: Basic Principles & Practice*. Momentum Press; 2012. doi:10.5643/9781606503522
3. J Duer M. *Solid-State NMR Spectroscopy: Principles and Applications.*; 2002. doi:10.1201/b16621-13
4. Jackowski K, Jaszuński M, Wilczek M. Alternative Approach to the Standardization of NMR Spectra. Direct Measurement of Nuclear Magnetic Shielding in Molecules. *J Phys Chem A*. 2010;114(7):2471-2475. doi:10.1021/jp9096056
5. Ashbrook SE, Sneddon S. New Methods and Applications in Solid-State NMR Spectroscopy of Quadrupolar Nuclei. *J Am Chem Soc*. 2014;136(44):15440-15456. doi:10.1021/ja504734p
6. Andrew ER, Bradbury A, Eades RG. Nuclear Magnetic Resonance Spectra from a Crystal rotated at High Speed. *Nature*. 1958;182(4650):1659-1659. doi:10.1038/1821659a0
7. Lowe IJ. Free Induction Decays of Rotating Solids. *Phys Rev Lett*. 1959;2(7):285-287. doi:10.1103/PhysRevLett.2.285
8. Hodgkinson P. NMR crystallography of molecular organics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2020;118-119:10-53. doi:10.1016/j.pnmrs.2020.03.001
9. Zorin VE, Brown SP, Hodgkinson P. Origins of linewidth in H1 magic-angle spinning NMR. *J Chem Phys*. 2006;125(14):144508. doi:10.1063/1.2357602
10. Schledorn M, Malär AA, Torosyan A, et al. Protein NMR Spectroscopy at 150 kHz Magic-Angle Spinning Continues To Improve Resolution and Mass Sensitivity. *ChemBioChem*. 2020;21(17):2540-2548. doi:10.1002/cbic.202000341
11. Böckmann A, Ernst M, Meier BH. Spinning proteins, the faster, the better? *J Magn Reson*. 2015;253:71-79. doi:10.1016/j.jmr.2015.01.012
12. Tandon H, Chakraborty T, Suhag V. A Brief Review on Importance of DFT In Drug Design C CRIMSON PUBLISHERS Wings to the Research. 2019;(February):791-795. doi:10.31031/RMES.2019.07.00068
13. Woolley RG, Sutcliffe BT. Molecular structure and the born–Oppenheimer approximation. *Chem Phys Lett*. 1977;45(2):393-398. doi:10.1016/0009-2614(77)80298-4
14. Kohn W, Sham LJ. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys Rev*. 1965;140(4A):A1133-A1138. doi:10.1103/PhysRev.140.A1133
15. Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys Rev Lett*. 1996;77(18):3865-3868.
16. Harris RK, Wasylishen RE, Duer MJ. *NMR Crystallography*. First. (Harris RK, Wasylishen RE, Duer MJ, eds.). Wiley; 2009.
17. Bonhomme C, Gervais C, Babonneau F, et al. First-Principles Calculation of NMR Parameters Using the Gauge Including Projector Augmented Wave Method: A Chemist's Point of View. *Chem Rev*. 2012;112(11):5733-5779. doi:10.1021/cr300108a
18. Troullier N, Martins JL. Efficient pseudopotentials for plane-wave calculations. *Phys Rev B*. 1991;43(3):1993-2006. doi:10.1103/PhysRevB.43.1993
19. Vanderbilt D. Soft self-consistent pseudopotentials in a generalized eigenvalue formalism. *Phys Rev B*. 1990;41(11):7892-7895. doi:10.1103/PhysRevB.41.7892
20. Helgaker T, Jaszuński M, Ruud K. Ab Initio Methods for the Calculation of NMR Shielding and Indirect Spin – Spin Coupling Constants. *Chem Rev*. 1999;99:293-352. doi:10.1021/cr960017t
21. Gauss J, Stanton JF. Electron-Correlated Approaches for the Calculation of NMR Chemical Shifts. In: Prigogine I, Rice SA, eds. *Advance in Chemical Physics*. ; 2003:355-422. doi:10.1002/0471231509.ch6
22. Pickard CJ, Mauri F. All-electron magnetic response with pseudopotentials: NMR chemical shifts. *Phys Rev B*. 2001;63(24):245101. doi:10.1103/PhysRevB.63.245101
23. Van de Walle CG, Blöchl PE. First-principles calculations of hyperfine parameters. *Phys Rev B*. 1993;47(8):4244-4255. doi:10.1103/PhysRevB.47.4244

24. Giannozzi P et al. QUANTUM ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *J Phys Condens Matter*. 2009;21(39):5502.

CAPÍTULO 3

Experimentos de NMR y detalles de Cálculo



Capítulo 3: Experimentos de NMR y detalles de Cálculo

En la presente tesis se realizó una combinación de experimentos de NMR en estado sólido y cálculos computacionales basados en la DFT. En el capítulo anterior se presentaron los fundamentos teóricos de ambas técnicas y en este capítulo se presentarán los detalles técnicos, experimentales y de cálculo.

3.1 NMR de estado sólido

Como se presentó en el Capítulo 2, las interacciones entre los espines definen las formas de las líneas espectrales de un experimento de NMR en estado sólido. Por tal motivo es necesaria la implementación de diferentes procedimientos experimentales que permitan obtener espectros de alta resolución, como la rotación al ángulo mágico (MAS), técnicas de desacople y otras secuencias de pulsos que se describirán a continuación.

3.1.1 Medidas de relajación

Tiempo de relajación longitudinal, T_1

El tiempo total que conlleva un experimento de NMR está determinado por el tiempo de relajación longitudinal (y por el número de adquisiciones) del núcleo observado en cada sistema bajo estudio. Por lo que es necesario como primer paso determinar el tiempo de relajación T_1 . Existen diversos métodos para su medición^{1,2}. En esta tesis se utilizó la secuencia Inversión-Recuperación, la cual se esquematiza en la Figura 3.1.

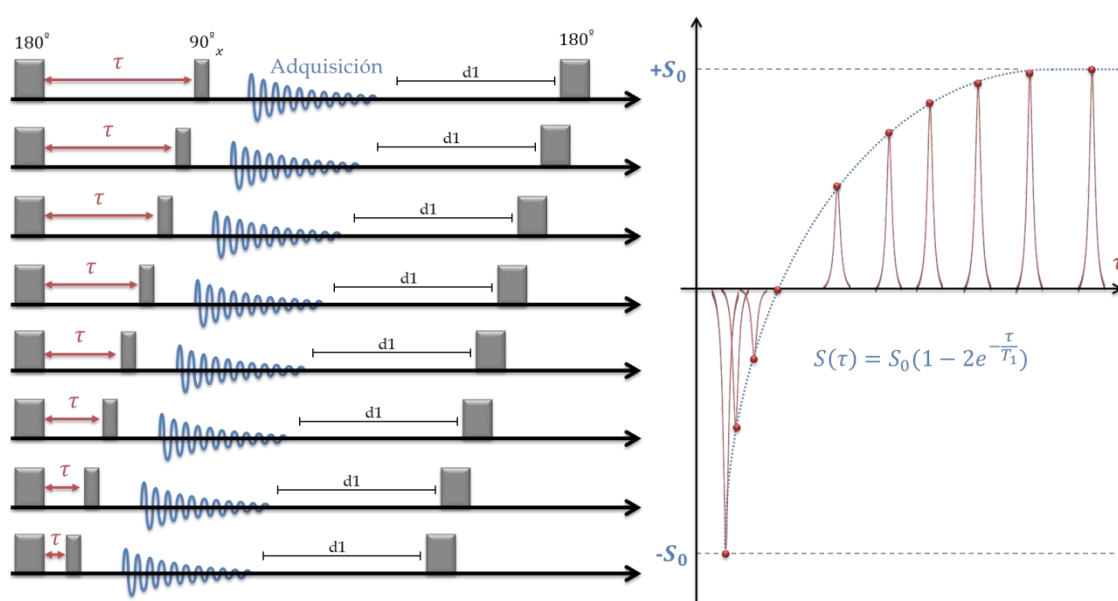


Figura 3.1 Medición de T_1 de ^1H mediante Inversión-Recuperación

Esta secuencia de pulsos invierte la magnetización a al eje $-z$ y luego se espera un tiempo τ , el retardo de recuperación, antes de aplicar un pulso de 90° para detectar el componente z de la magnetización. Esto se lleva a cabo sobre una lista de tiempos τ , y la recuperación de la intensidad de la señal resultante se ajusta mediante la ecuación que se muestra en la Figura 3.1, donde S_0 es la intensidad de la señal cuando $\tau = 0$. La recuperación de la inversión tiene la ventaja de tener una amplia gama de posibles intensidades, de $-S_0$ a $+S_0$, pero debe escogerse un tiempo de recuperación, $d1$, muy largo, de modo de asegurar que éste sea 4 o 5 veces T_1 para que el sistema haya vuelto al equilibrio entre adquisiciones sucesivas.

Tiempo de relajación transversal en el sistema rotante, $T_{1\rho}$

Los procesos de relajación en NMR de estado sólido pueden proveer información muy importante sobre la dinámica de los sistemas en estudio. La relajación transversal en la terna rotante es sensible a movimientos moleculares de la escala de los kHz, por lo que brinda información sobre compuestos esencialmente no homogéneos³⁻⁵. El tiempo $T_{1\rho}$ es un parámetro de estudio muy útil para sondear dichos movimientos. En esta tesis se utilizó la secuencia de pulsos que se esquematiza en la Figura 3.2, en la misma se aplica un pulso de 90° en la dirección x , de modo de llevar la magnetización al plano, y luego se aplica un campo de spin-lock, en la dirección y , durante un tiempo τ que mantiene la magnetización en el plano. Durante ese tiempo τ se produce la relajación de la magnetización en el sistema rotante, por lo que se realizan sucesivas mediciones variando el tiempo τ . A medida que el tiempo τ aumenta, la intensidad de la señal adquirida disminuye. El decaimiento de la señal se ajusta a un decaimiento exponencial (ver Figura 3.2), de donde se obtiene el tiempo característico $T_{1\rho}$.

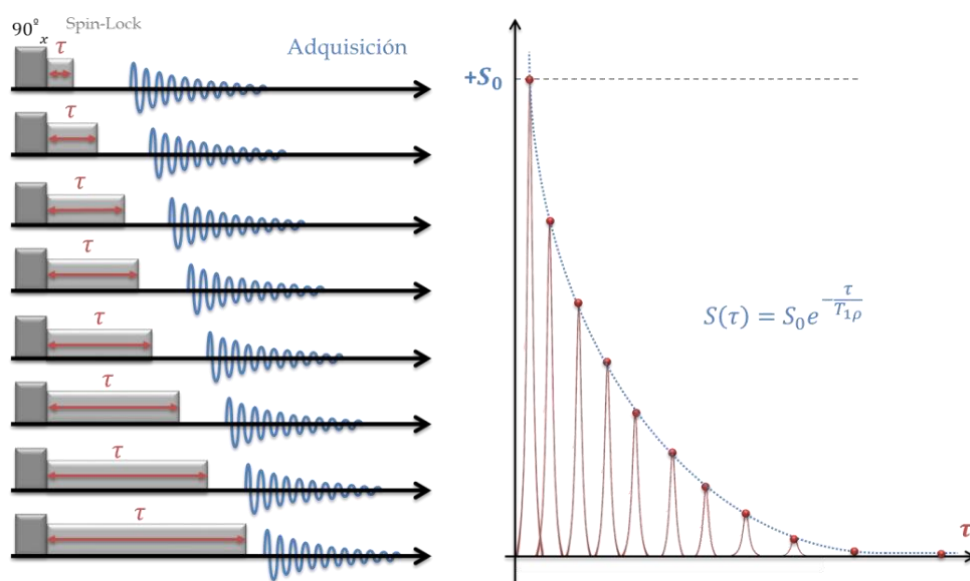


Figura 3.2 Medición de $T_{1\rho}$ de ^1H .

3.1.2 Técnicas de 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 de 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 NMR de estado sólido es necesario eliminar estas interacciones de acoplamiento, particularmente las de carácter dipolar. Como se comentó en el capítulo anterior, esto no siempre puede alcanzarse con MAS, por lo que se utilizan secuencias de desacople.

Desacople Heteronuclear

El ^{13}C es un núcleo diluido, ya que la abundancia natural de este isótopo es del 1,1%. Entonces, los acoples dipolares entre ellos mismos son muy débiles y pueden eliminarse con MAS a velocidades relativamente bajas. Sin embargo, suele ocurrir que los sistemas que contienen ^{13}C poseen un gran número de átomos de hidrógeno, y como los ^1H tienen abundancia natural muy alta y una constante γ grande, la interacción dipolar ^1H - ^{13}C es de una magnitud importante. Una constante de acoplamiento típica para un par ^1H - ^{13}C (a una distancia de 1 Å) es de aproximadamente 30 kHz, la cual no se elimina utilizando MAS.

El ejemplo más simple de una secuencia de desacople heteronuclear es la secuencia de onda continua (CW, por su sigla en inglés)⁶, que consiste en la aplicación de un pulso RF continuo y de fase fija durante el tiempo de adquisición de la FID. También existen secuencias multipulsos más sofisticadas y ampliamente utilizadas. En este trabajo de tesis se utilizó una secuencia llamada SPINAL-64 (*Small Phase Incremental Alternation*, alternancia incremental de pequeñas fases)⁷, la cual es una secuencia TPPM⁸ (*Two Pulse Phase Modulation*, dos pulsos con fases moduladas) superciclada. Donde el desacople se consigue con un tren de pulsos con fases y ángulos diferentes. El tren de pulsos de la secuencia SPINAL-64 se construye combinando dos elementos básicos que se denominarán Q y \bar{Q} , los cuales se construyen como:

$$Q = 165(10^\circ)165(-10^\circ)165(15^\circ)1658(-15^\circ) \\ \times 165(20^\circ)165(-20^\circ)165(15^\circ)1658(-15^\circ)$$

$$\bar{Q} = 165(-10^\circ)165(10^\circ)165(-15^\circ)1658(15^\circ) \\ \times 165(-20^\circ)165(20^\circ)165(-15^\circ)1658(15^\circ)$$

Estos elementos se combinan en superciclos de la siguiente manera:

$$SPINAL - 64: Q\bar{Q}\bar{Q}Q\bar{Q}Q\bar{Q}$$

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 varios cientos de kHz. Este hecho se ve acentuado debido a la gran cantidad de protones que por lo general están presentes en los compuestos orgánicos dando

como resultado una red de espines fuertemente acoplados. Es por ello que es necesario aplicar secuencias multipulsos que permitan desacoplar estos núcleos. Una de las secuencias de desacople homonuclear más utilizada es la desarrollada por Lee y Goldburg⁹ (LG) en 1965. Esta secuencia rota el hamiltoniano de interacción alrededor de un campo efectivo, alineado al ángulo mágico $\theta = 54,74^\circ$ respecto de \vec{B}_0 en el sistema rotante. Cuando los espines precesan alrededor de este campo efectivo se cancelan los dos primeros términos del hamiltoniano dipolar, obteniéndose entonces el mismo resultado que rotar la muestra físicamente en un experimento MAS.

3.1.3 Polarización Cruzada (CP)

Los espectros de núcleos con gran abundancia natural y una alta razón giromagnética, como los ^1H , pueden ser adquiridos mediante una secuencia de excitación directa (DE), donde se aplica un pulso de 90° y la corriente oscilante resultante es detectada. Sólo unas pocas FID necesitan ser adquiridas para obtener una medida de ^1H con buena relación señal/ruido. Otros núcleos, como ^{13}C y ^{15}N , tienen una abundancia natural mucho más baja por lo que usualmente no es posible adquirir, en una cantidad práctica de tiempo, “buenas” señales usando excitación directa, a menos que los tiempos T_1 sean muy cortos.

El método estándar para adquirir espectros de núcleos diluidos es la Polarización Cruzada (CP por su sigla en inglés, *Cross Polarization*). Este método involucra la excitación de un espín abundante, usualmente ^1H , y luego la transferencia de magnetización de los ^1H a los núcleos de interés. Para que la transferencia de magnetización sea efectiva debe cumplirse la condición de Hartmann-Hahn¹⁰ dada en la ecuación (3.1): la tasa de nutación de los dos núcleos debe ser la misma,

$$\gamma^{1\text{H}} B_1^{1\text{H}} = \gamma^X B_1^X \quad (3.1)$$

Equivalentemente

$$\omega_1^{1\text{H}} = \omega_1^X \quad (3.2)$$

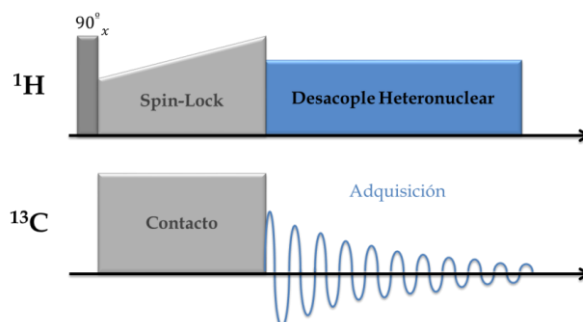


Figura 3.3 Esquema de la secuencia de pulsos empleada para los experimentos CP-MAS. En este caso particular la magnetización se transfiere de los ^1H a los ^{13}C .

La Figura 3.3 muestra un esquema de la secuencia de pulsos CP. Los ^1H son inicialmente excitados mediante un pulso de 90° , el segundo pulso de 90° está corrido en fase respecto del primero y se lo denomina *spin-lock*. Éste mantiene la magnetización de ^1H a lo largo del campo \vec{B}_1 y la relajación es lenta y depende de $T_{1\rho}$ más que de T_2 .

Usualmente se utiliza un pulso de *spin-lock* en forma de rampa en el canal de ^1H para sortear los efectos de bandas rotacionales causados por una fuerte condición de Hartmann-Hahn^{11,12}. De manera simultánea al pulso de *spin-lock*, se aplica un pulso en el canal del núcleo X. El tiempo durante el que estos dos pulsos son aplicados se denomina tiempo de contacto, y es típicamente de unos pocos ms para CP entre ^1H - ^{13}C .

La técnica de CP presenta dos beneficios de medición simultáneos. Por un lado, la sensibilidad de los experimentos está determinada principalmente por el cociente $\gamma^{1\text{H}}/\gamma^{\text{X}}$, por lo que se obtiene una mayor relación señal/ruido. Por otro lado, el tiempo entre las sucesivas adquisiciones de las FID está determinado por el tiempo de relajación T_1 del espín abundante. En sólidos el tiempo T_1 de ^1H es significativamente más corto que el de los otros núcleos, por lo que, en un mismo tiempo de experimento, es posible adquirir un número mucho mayor de FID que en una excitación directa.

Una limitación de la CP es que es un experimento no cuantitativo, es decir, la intensidad de las señales no es necesariamente proporcional al número de espines que contribuyen a la misma, como si lo es la excitación directa. Si bien el tiempo de relajación $T_{1\rho}$ de ^1H es uniforme si la muestra es homogénea, el tiempo de contacto de la secuencia CP tiene una fuerte dependencia local. Es decir, la intensidad de la señal de un ^{13}C particular de la muestra depende fuertemente de la vecindad de protones de cada núcleo y no tanto de su abundancia real. Así un ^{13}C en un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) recibirá más magnetización de la red que un carbono cuaternario ($-\text{C}-$) y por lo tanto presentará una mayor señal.

3.1.4 Supresión No Cuaternaria (NQS)

Un espectro de ^{13}C de un cristal molecular orgánico, generalmente presenta un gran número de resonancias, cada una asociada a distintos núcleos ^{13}C dentro de la muestra¹³. La presencia de tantas señales suele entorpecer la asignación de las mismas a cada núcleo del sistema. En 1979 Opella y Frey¹⁴ desarrollaron una secuencia de pulsos capaz de seleccionar señales provenientes de carbonos sin protonar (que no están unidos a un H) en espectros de NMR en sólidos. Esta secuencia de pulsos se conoce como Supresión No Cuaternaria (NQS por su sigla en inglés, *Non Quaternary Suppression*) y es altamente utilizada por la comunidad de NMR en estado sólido. El resultado de aplicar esta secuencia es un espectro donde las resonancias de los grupos metino (CH) y metileno (CH_2) son sustancialmente suprimidos. De esta manera, es posible identificar las señales provenientes de carbonos cuaternarios (C) y los grupos metilos (CH_3) de la muestra.

En la Figura 3.4 se muestra el esquema de la secuencia NQS utilizada en esta tesis. Luego de la CP, se apagan los campos de RF durante un tiempo τ antes de comenzar la adquisición. Este tiempo de espera τ permite que la magnetización de los núcleos de carbono decaiga debido al acople dipolar ^1H - ^{13}C y es del orden de $40\mu\text{s}$. El pulso de 180° que se aplica sobre los ^{13}C a un tiempo igual a $\frac{\tau}{2}$ tiene como objetivo refocalizar el corrimiento químico de los mismos.

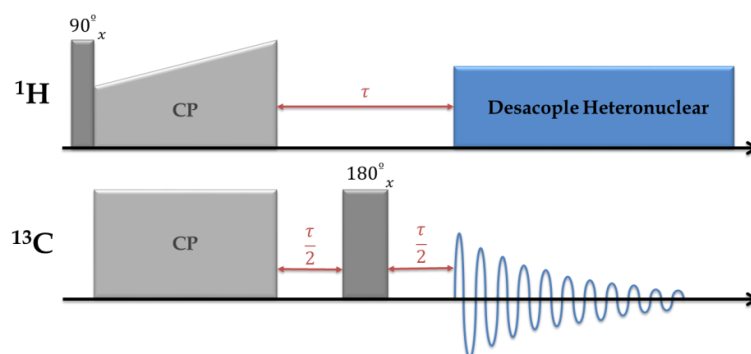


Figura 3.4 Secuencia de pulsos empleada para los experimentos NQS.

3.1.5 Correlación Heteronuclear (HETCOR)

Es posible utilizar la llamada NMR bidimensional para correlacionar los corrimientos químicos de diferentes núcleos, como por ejemplo ^1H - ^1H , ^{13}C - ^1H o ^{15}N - ^1H . Los métodos de correlación son de gran importancia en la determinación del patrón de enlaces químicos, y, por lo tanto, de la conformación de los compuestos bajo estudio. Cuando el experimento relaciona núcleos de diferentes especies se lo denomina correlación heteronuclear, HETCOR (del inglés *HE*Teronuclear *COR*relation)¹⁵. Este experimento registra correlaciones entre espines ^1H y espines X vecinos y está mediado por el acoplamiento dipolar. La Figura 3.5 muestra un esquema de la secuencia de pulsos para el experimento HETCOR utilizado en este trabajo, que se basa en la secuencia CP estándar, pero con un período de evolución, t_1 , que se incrementa para la adquisición 2D. El desacople homonuclear es necesario durante t_1 para obtener una resolución útil en la dimensión ^1H , en este trabajo utilizamos FSLG¹⁶. La duración del tiempo de contacto en el período de mezcla determina la distancia entre los espines ^1H y X sobre los que se puede transferir la magnetización. Por lo general, se utiliza un tiempo de contacto corto de $50\ \mu\text{s}$ a $200\ \mu\text{s}$ para permitir que sólo sean visibles las correlaciones ^1H y X directamente enlazadas. Los tiempos de contacto más largos permiten que se produzca la transferencia de magnetización en distancias más largas, de hasta $3\ \text{Å}$.

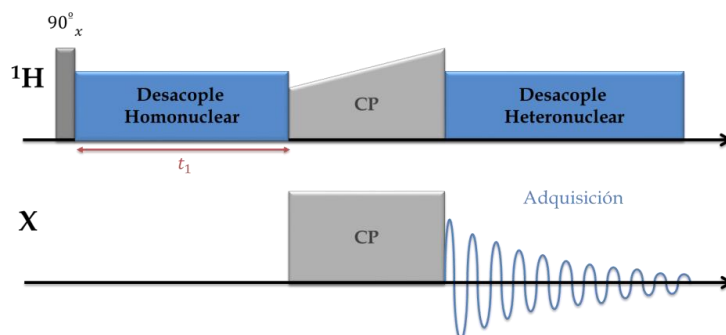


Figura 3.5 Representación esquemática de la secuencia de pulsos empleada para la obtención de espectros 2D de correlación heteronuclear.

3.1.6 Detalles experimentales

Los experimentos CP-MAS, NQS de ^{13}C y ^{15}N , HETCOR ^{13}C - ^1H y determinación de T_1 y $T_{1\rho}$ de ^1H , de los compuestos estudiados a lo largo de esta tesis se realizaron, a temperatura ambiente, en un espectrómetro Bruker Avance II en el cual la frecuencia de Larmor para ^1H es de 300,13 MHz, para ^{13}C de 75,46 MHz, y para ^{15}N de 30,4 MHz. El mismo está equipado con un cabezal de triple resonancia con MAS de 4mm y todas las muestras fueron rotadas a 10 kHz. Para los experimentos con CP se empleó un tiempo de contacto de 2 ms. Se utilizó una secuencia SPINAL-64 para el desacople heteronuclear durante la adquisición con un campo en protones de $\frac{\omega_{1H}}{2\pi} = 65,8 \text{ kHz}$. Se utilizó Glicina como referencia externa para los corrimientos químicos de ^{13}C y ^{15}N (45,6 ppm y 176,46 ppm para ^{13}C y -349,6 ppm para ^{15}N). El tiempo de recuperación y la cantidad de adquisiciones de cada experimento fueron elegidos en función de cada muestra en particular; en la Tabla 3.2 se resumen estos valores para todas las muestras estudiadas, donde $d1$ es el tiempo de recuperación (ver Figura 3.6) y ns el número de adquisiciones. Los campos de spin-lock utilizados durante las mediciones de $T_{1\rho}$ fueron calibrados en Adamantano y se muestran en la Tabla 3.1, donde p14 es la intensidad del pulso y p1 la duración del mismo. Para las mediciones de $T_{1\rho}$ se definió el tiempo de recuperación de 350 s y se usó una lista de tiempos de 15 puntos entre 0,5 μs y 60 ms.

Los espectros de alta resolución de ^1H se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance III HD donde la frecuencia de resonancia de Larmor para los ^1H es de 499,7 MHz. Se utilizó un cabezal de doble resonancia con MAS de 1,3 mm y la excitación se consiguió mediante un pulso de $\pi/2$ de 3 μs . Los tiempos de recuperación y el número de adquisiciones utilizado en cada muestra se encuentran en la Tabla 3.2.

Por último se obtuvo un espectro de ^{13}C por CP-MAS a baja temperatura en un espectrómetro Bruker Avance III DNP de 600 MHz con una velocidad MAS de 10 kHz para la muestra de NVP:SA. El tiempo de contacto para la CP fue de 2 ms, se recolectaron 128 adquisiciones con un tiempo de recuperación de 55 s. Se utilizó una secuencia SWf-TTPPM superciclada para el desacople heteronuclear durante la adquisición con un campo en protones de $\frac{\omega_{1H}}{2\pi} = 83,3 \text{ kHz}$.

Vale aclarar, nuevamente, que el tiempo de relajación T_1 depende del campo al cual se esté realizando el experimento. Es por ello que los tiempos $d1$ que se utilizaron en los diferentes espectrómetros de NMR (Bruker Avance II de 300,13 MHz, Bruker Avance III HD de 499,7 MHz y Bruker Avance III DNP de 600 MHz) varían según la intensidad del campo del equipo.

Tabla 3.1 Calibración del pulso de spin-lock para la medición de $T_{1\rho}$

B_1 (kHz)	p14 (dB)	p1 (μs)
17,12	18	14,6
22,12	16	11,3
27,78	14	9,0
35,71	12	7,0
46,30	10	5,4
58,14	8	4,3
73,53	6	3,4

Tabla 3.2 Valores del tiempo de recuperación $d1$ y el número de adquisiciones ns de los diferentes experimentos sobre cada muestra estudiada.

Muestra	^{13}C CP-MAS		^1H DE		^{15}N CP-MAS	
	$d1$ (s)	ns	$d1$ (s)	ns	$d1$ (s)	ns
TIZOXANIDA (TIZ)	20	2048	300	16	50	4096
NEVIRAPINA (NVP)	350	64	300	8	10	6144
Ácido Salicílico (SA)	500	32	100	8	-	-
NVP:SA	300	192	300	8	10	8192
MF NVP - SA	300	192	-	-	-	-
Sacarina (SAC)	15	936	400	8	-	-
NVP:SAC	350	160	300	8	-	-
MF NVP - SAC	350	160	-	-	-	-
Cafeína (CAF)	350	132	150	8	-	-
NVP:CAF	350	132	300	8	-	-
MF NVP - CAF	150	160	-	-	-	-
Teofilina (THE)	350	192	300	8	-	-
NVP:THE	300	216	400	8	-	-
MF NVP - THE	300	64	-	-	-	-
Urea (URE)	5	10240	-	-	-	-
NVP:URE	265	248	-	-	-	-
MF NVP - URE	265	248	-	-	-	-
TINIDAZOL (TNZ)	60	96	-	-	-	-
Ácido p-aminobenzoico (PABA)	200	184	-	-	-	-
TNZ:PABA _{LAG}	20	240	-	-	-	-
TNZ:PABA _{CRYST}	20	240	-	-	-	-
MF TNZ - PABA	60	96	-	-	-	-
Ácido Salicílico (SA)	500	32	-	-	-	-
TNZ:SA _{LAG}	35	216	-	-	-	-
TNZ:SA _{CRYST}	35	128	-	-	-	-
MF TNZ - SA	35	344	-	-	-	-
Ácido Cítrico (CA)	400	216	-	-	-	-
TNZ:CA	400	136	-	-	-	-
MF TNZ:CA	400	64	-	-	-	-
Nicotinamida (NA)	400	208	-	-	-	-
TNZ:NA	400	192	-	-	-	-
MF TNZ NA	250	32	-	-	-	-
Ácido Succínico (SUCC)	500	128	-	-	-	-
TNZ:SUCC	60	128	-	-	-	-
MF TNZ - SUCC	60	128	-	-	-	-

3.2 Detalles de cálculos DFT

La técnica de DFT fue aplicada mediante el código Quantum Espresso¹⁷ para el estudio de diferentes muestras analizadas en los capítulos 5 y 7. Como se presentó en el Capítulo 2, para cada cálculo es importante determinar los valores de las energías de corte de las ondas planas, la cantidad de puntos k con que se muestrea el espacio recíproco, los funcionales de correlación intercambio y los pseudopotenciales utilizados, además de los parámetros de convergencia para la energía y las fuerzas. A continuación, se detallan todos estos parámetros de cada uno de los cálculos realizados en esta tesis.

TIZOXANIDA

Los cálculos de DFT para estos sistemas se basaron en la aproximación de gradiente generalizado (GGA) empleando los funcionales de correlación e intercambio de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE)¹⁸. Se utilizaron los pseudopotenciales GIPAW¹⁹ para todos los átomos. Las energías de corte en la representación de los orbitales de Kohn-Sham y la densidad electrónica fueron 60 Ry (816 eV) y 240 Ry (3265 eV) respectivamente. La zona de Brillouin fue muestreada con una grilla irreducible de Monkhorst-Pack²⁰ de puntos k de 5x5x5, implementando el método de primer orden de Methfessel-Paxton²¹ con una extensión de 0,5 Ry. La energía total fue minimizada en cada cálculo electrónico hasta lograr el criterio de convergencia de 1×10^{-7} Ry. Las optimizaciones de las geometrías se realizaron por movimiento de las posiciones atómicas empleando el algoritmo BFGS (Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno), minimizándose las fuerzas actuantes sobre cada átomo hasta lograr valores menores que 1×10^{-2} Ry/u.a. Los parámetros de celda y las posiciones atómicas iniciales del cálculo se tomaron del trabajo de Bruno et. al.²²

Diferencia de densidad de carga (Charge Density Difference)

Para comprender la naturaleza de la interacción puente hidrógeno y su relación con la posición del átomo de hidrógeno H, se estudió la diferencia de densidad electrónica $\Delta\rho$. Ésta es la diferencia entre la densidad electrónica de la molécula de TIZ aislada (ρ_{TIZ}) y las de la molécula de TIZ sin el átomo de hidrógeno (ρ_{TIZ-H}) y del átomo de H (ρ_H) aisladas, para diferentes posiciones de H.

Así, $\Delta\rho$ viene dado por:

$$\Delta\rho = \rho_{TIZ} - \rho_{TIZ-H} - \rho_H \quad (3.3)$$

NEVIRAPINA – ÁCIDO SALICÍLICO

Para todos los sistemas analizados en este caso se utilizaron pseudopotenciales GIPAW ultrasoft y la descripción de PBE¹⁸ para el funcional de correlación e intercambio. Las energías de corte en la representación de los orbitales de Kohn-Sham y la densidad electrónica fueron de 816 eV y 3265 eV respectivamente. La zona de

Brillouin fue muestreada con una grilla irreducible de Monkhorst-Pack²⁰ de puntos k de $4 \times 4 \times 4$, implementado el método de primer orden de Methfessel-Paxton con una extensión de 0,54 eV. La energía total fue minimizada en cada cálculo electrónico hasta lograr el criterio de convergencia de 1×10^{-5} Ry. Las optimizaciones de las geometrías se realizaron por movimiento de las posiciones atómicas empleando el algoritmo BFGS, minimizándose las fuerzas actuantes sobre cada átomo hasta lograr valores menores de 1×10^{-3} Ry/u.a. Las estructuras cristalinas empleadas para iniciar el cálculo fueron obtenidas del trabajo de Costa et. al.²³

3.3 Referencias

1. Fukushima E, Roeder SBW. *Experimental Pulse NMR*. CRC Press; 2018. doi:10.1201/9780429493867
2. Apperley D, Harris R, Hodgkinson P. *Solid-State NMR: Basic Principles & Practice*. Momentum Press; 2012. doi:10.5643/9781606503522
3. J Duer M. *Solid-State NMR Spectroscopy: Principles and Applications*.; 2002. doi:10.1201/b16621-13
4. Hodgkinson P. NMR crystallography of molecular organics. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2020;118-119:10-53. doi:10.1016/j.pnmrs.2020.03.001
5. Tishmack PA, Bugay DE, Byrn SR. Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy - Pharmaceutical applications. *J Pharm Sci*. 2003;92(3):441-474. doi:10.1002/jps.10307
6. Bloch F. Theory of Line Narrowing by Double-Frequency Irradiation. *Phys Rev*. 1958;111(3):841-853. doi:10.1103/PhysRev.111.841
7. Fung BM, Khitritin AK, Ermolaev K. An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids. 2000;101:97-101. doi:10.1006/jmre.1999.1896
8. Bennett AE, Rienstra CM, Auger M, Lakshmi K V., Griffin RG. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J Chem Phys*. 1995;103(16):6951-6958. doi:10.1063/1.470372
9. Lee M, Goldburg WI. Nuclear-Magnetic-Resonance Line Narrowing by a Rotating rf Field. *Phys Rev*. 1965;140(4A):A1261-A1271. doi:10.1103/PhysRev.140.A1261
10. Hartmann SR, Hahn EL. Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys Rev*. 1962;128(5):2042-2053. doi:10.1103/PhysRev.128.2042
11. Metz G, Wu XL, Smith SO. Ramped-Amplitude Cross Polarization in Magic-Angle-Spinning NMR. *J Magn Reson Ser A*. 1994;110(2):219-227. doi:10.1006/jmra.1994.1208
12. Metz G, Ziliox M, Smith SO. Towards quantitative CP-MAS NMR. *Solid State Nucl Magn Reson*. 1996;7(3):155-160. doi:10.1016/S0926-2040(96)01257-X
13. Krätschmer W, Lamb LD, Fostiropoulos K, Huffman DR. Solid C60: a new form of carbon. *Nature*. 1990;347(6291):354-358. doi:10.1038/347354a0
14. Opella SJ, Frey MH. Selection of nonprotonated carbon resonances in solid-state nuclear magnetic resonance. *J Am Chem Soc*. 1979;101(19):5854-5856. doi:10.1021/ja00513a079
15. Caravatti P, Braunschweiler L, Ernst RR. Heteronuclear correlation spectroscopy in rotating solids. *Chem Phys Lett*. 1983;100(4):305-310. doi:10.1016/0009-2614(83)80276-0
16. van Rossum B-J, Förster H, de Groot HJM. High-Field and High-Speed CP-MAS13C NMR Heteronuclear Dipolar-Correlation Spectroscopy of Solids with Frequency-Switched Lee-Goldburg Homonuclear Decoupling. *J Magn Reson*. 1997;124(2):516-519. doi:10.1006/jmre.1996.1089
17. Giannozzi P et al. QUANTUM ESPRESSO: a modular and open-source software project for quantum simulations of materials. *J Phys Condens Matter*. 2009;21(39):5502.
18. Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys Rev Lett*. 1996;77(18):3865-3868.
19. Pickard CJ, Mauri F. All-electron magnetic response with pseudopotentials: NMR chemical shifts. *Phys Rev B*. 2001;63(24):245101. doi:10.1103/PhysRevB.63.245101
20. Monkhorst HJ, Pack JD. Special points for Brillouin-zone integrations. *Phys Rev B*. 1976;13:5188-5192.
21. Methfessel M, Paxton AT. High-precision sampling for Brillouin-zone integration in metals. 1989;40(6):3616-3621.
22. Bruno FP, Caira MR, Martin EC, Monti GA, Sperandeo NR. Characterization and structural analysis of the potent antiparasitic and antiviral agent tizoxanide. *J Mol Struct*. 2013;1036:318-325. doi:10.1016/j.molstruc.2012.12.004
23. Costa RN, Reviglio AL, Siedler S, et al. New Multicomponent Forms of the Antiretroviral Nevirapine with Improved Dissolution Performance. *Cryst Growth Des*. 2020;20(2):688-698. doi:10.1021/acs.cgd.9b01129

CAPÍTULO 4

Fármacos Estudiados



Capítulo 4: Fármacos Estudiados

A lo largo del desarrollo de esta tesis de doctorado se trabajó con diferentes compuestos de interés farmacéutico. Cada uno de ellos fue elegido por sus potencialidades. En particular se estudiaron: un poderoso agente antiparasitario y antiviral la Tizoxanida, utilizado para tratar el mal de Chagas entre otras enfermedades; un inhibidor de la transcriptasa inversa, la Nevirapina, utilizada para el tratamiento del VIH; y un potente antibiótico, el Tinidazol, utilizado para tratar un amplio espectro de enfermedades. A continuación, se realiza una breve descripción de cada uno de ellos y de su importancia en el área farmacéutica.

4.1 Tizoxanida

Las enfermedades parasitarias y virales como la hepatitis C, la leishmaniasis, y la tripanosomiasis, representan un problema grave para la salud y la economía de muchos países. En América hay un estimado anual de 50.000 casos nuevos de leishmaniasis, 40.000 de mal de Chagas y 20.000 de hepatitis virales (B y C)¹⁻³. Los agentes quimioterapéuticos comunes que se usan actualmente para tratar leishmaniasis y mal de Chagas a menudo son inadecuados, ya que requieren largos ciclos de administración y pueden tener efectos secundarios tóxicos o volverse menos efectivos debido a la aparición de cepas resistentes⁴. Por otro lado, el tratamiento estándar actual de atención para la hepatitis C es efectivo en aproximadamente la mitad de los pacientes tratados⁵. Si bien el sistema de salud de nuestro país posee programas de prevención, tratamiento y erradicación de estas enfermedades, el costo de los medicamentos actuales es muy alto. Por ejemplo, una única pastilla para tratar la hepatitis C cuesta 63 USD (>\$4.000), volviendo necesario para nuestro país el estudio y desarrollo de nuevos medicamentos, efectivos y económicos para tratar dichas enfermedades.

Los tiazolidos representan una nueva clase de medicamentos antiinfecciosos, con nitazoxanida [NTZ] como compuesto original. La NTZ se comercializa en los EE. UU. para el tratamiento de la diarrea y la enteritis causadas por *Cryptosporidium* spp. o *Giardia lamblia*⁶. Después de la administración oral, la NTZ se absorbe parcialmente y se hidroliza para formar su metabolito circulante activo, la Tizoxanida (TIZ, Figura 4.1), que es tan eficaz como el fármaco original. De hecho, tanto la NTZ como la TIZ son activos contra *trypanosoma cruzi* (el agente causante de la enfermedad de Chagas) y *Leishmania mexicana*⁴. Además, ambos compuestos son inhibidores potentes de los virus de hepatitis B (VHB) y C (VHC), y en combinación con otros agentes antivirales muestran efectos sinérgicos positivos^{6,7}. Esto lleva a considerar la TIZ como un agente antiinfeccioso prometedor que puede mejorar las terapias actuales o futuras para la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la hepatitis viral causada por el VHB o VHC.

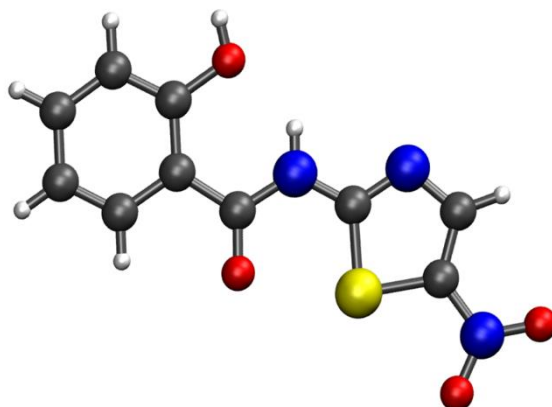
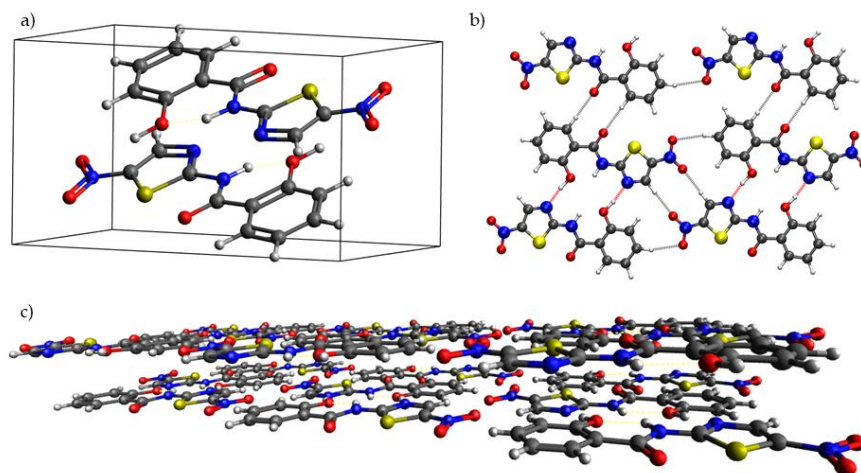


Figura 4.1 Esquema molecular de Tizoxanida. Se utiliza el siguiente código de colores: átomos de carbono en color gris, átomos de Nitrógeno en color azul, átomos de oxígeno en color rojo y átomos de azufre en color amarillo.

La primera caracterización integral la TIZ en estado sólido fue realizada en 2013⁸, combinando resultados de análisis DRX de cristal único de TIZ con resultados espectroscópicos de RMN en solución y en estado sólido, Reflectancia difusa infrarroja por transformada de Fourier (DRIFT) y FT Raman, además de resultados de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), termogravimetría (TG), así como de datos estimados de solubilidad a 25 °C. La investigación estructural de rayos X de la TIZ mostró que presenta una estructura 'grafítica' compuesta de capas de moléculas unidas por enlaces hidrógeno que se apilan una encima de la otra y se mantienen unidas por fuertes interacciones de apilamiento π entre anillos de dos moléculas de TIZ diferentes. Los espectros de RMN en solución y en estado sólido permitieron establecer las regiones moleculares en las que ocurren las interacciones que permiten la cristalización de TIZ. Los estudios DRIFT y FT-Raman indican que los espectros vibracionales de TIZ exhiben características típicas de una molécula unida por enlaces hidrógeno, lo que confirma las interacciones intra e intermoleculares. El análisis térmico (DSC y TG) permitió establecer que la TIZ sólida tiene una estabilidad térmica relativamente alta. Las estimaciones de solubilidad mostraron que TIZ presenta una baja solubilidad en agua en condiciones normales de presión y temperatura, lo cual está de acuerdo con la estructura cristalina altamente ordenada que se encontró⁸.

La estructura cristalina determinada por Bruno et. al en 2013⁸ se muestra en la Figura 4.2 a) Celda Unidad de Tizoxanida⁸; b) Plano formado por moléculas de Tizoxanida; c) Conformación grafítica de Tizoxanida. Como ya se mencionó, al cristalizar la TIZ forma una estructura grafítica (ver Figura 4.2 b y c), mediada por interacciones de apilamiento π ; para que esta estructura sea posible es necesario que las moléculas interactuantes "sean planas". Como se detalla en el Capítulo 5, los enlaces hidrógeno intramoleculares normalmente participan en los procesos de planarización de un sistema de sólido. En particular, TIZ presenta un enlace hidrógeno intramolecular en la región central de la molécula. La comprensión y correcta caracterización de dicho enlace es fundamental para comprender cómo y por qué el sistema cristaliza de dicha manera.



Las estructuras cristalinas fueron obtenidas por Mino Caira. Fuente Tesis Flavia Bruno.

Figura 4.2 a) Celda Unidad de Tizoxanida⁸; b) Plano formado por moléculas de Tizoxanida; c) Conformación gráfica de Tizoxanida

4.2 Nevirapina

Al iniciar de la década de los 80 se descubrieron los primeros casos de SIDA en Estados Unidos. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) levantaron las primeras sospechas y desataron todas las alarmas de la comunidad médica, tras la detección algunos casos raros de neumonía en hombres jóvenes⁹. Para 1983 se identificó por primera vez el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como causa directa de la infección¹⁰. Este descubrimiento provocó que años más tarde se consiguiera el primer tratamiento contra el VIH: la zidovudina (AZT). En 1986 se presentaron los primeros resultados positivos de un ensayo clínico de pacientes con SIDA que recibieron tratamiento con AZT¹¹. Su actividad, lograba inhibir una enzima conocida como “transcriptasa inversa” (TR) del VIH, lo que suponía en aquel entonces frenar la replicación del virus, pero no representa una cura para el SIDA ni garantiza la disminución de las enfermedades relacionadas con la infección. AZT imita un sustrato natural de la TR, la timidina, por lo cual es efectiva contra el virus de VIH. Sin embargo, debido a que imita un nucleósido presente naturalmente en las células, el AZT también puede interferir en la actividad de las enzimas humanas endógenas. Algunos de los efectos secundarios observados para el tratamiento con AZT se debieron a esta falta de selectividad, por lo que se hicieron necesarios inhibidores de la TR adicionales y más selectivos.

Años después, Karl D. Hargrave et al.¹² descubrieron la Nevirapina (NVP), la cual fue aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 1996 para el tratamiento de adultos seropositivos al VIH¹³. Las expectativas iniciales eran que podría usarse con éxito como agente monoterapéutico. Los estudios farmacocinéticos mostraron que el fármaco era bien absorbido, y con una vida media prolongada^{14,15}. La dosificación diaria causó una disminución rápida de la carga viral en los pacientes tratados. Sin embargo, después de algunas semanas o meses de

tratamiento, hubo un rebrote del virus a los niveles originales¹⁶. Debido al rebrote se cambió el enfoque de NVP como agente monoterapéutico para determinar su utilidad en combinación con otros agentes anti-SIDA. Los estudios *in vitro* habían proporcionado evidencia de que las combinaciones de medicamentos contra el VIH podrían ser más efectivas que los agentes individuales¹⁷. Los estudios clínicos mostraron que NVP en combinación con una variedad de otros inhibidores de nucleósidos y proteasas es efectiva para suprimir la replicación del virus por períodos prolongados de tiempo^{18,19}. En la Figura 4.3 se muestra el esquema de la molécula de NVP.

En la actualidad la NVP forma parte de los complejos de medicamentos utilizados para el tratamiento de la infección por VIH-1. Sin embargo, presenta una baja solubilidad en agua y una alta permeabilidad en el tracto gastrointestinal. La baja solubilidad acuosa es un desafío que afecta directamente a su biodisponibilidad, por lo que a menudo son necesarias dosis altas para garantizar su efectividad, aumentando los posibles efectos secundarios adversos.

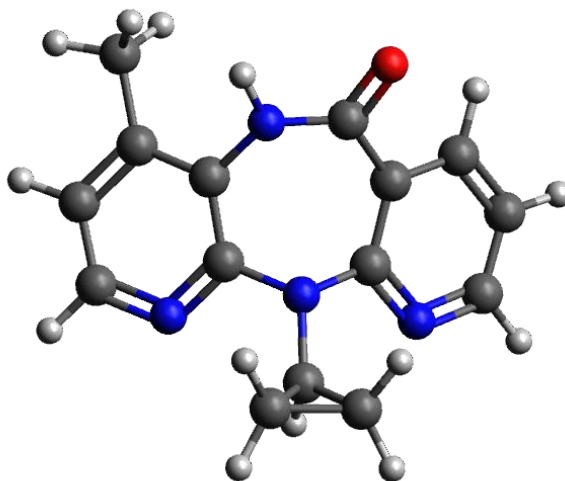


Figura 4.3 Esquema molecular de Nevirapina (NVP). Se utiliza el siguiente código de colores: átomos de carbono en color gris, átomos de Nitrógeno en color azul y átomos de oxígeno en color rojo.

4.3 Tinidazol

Los antibióticos se encuentran entre los mayores avances en medicina, pero su utilidad está constantemente amenazada por la alta adaptabilidad genética de muchos microbios, la cual les permite desarrollar resistencia a estos medicamentos. Los antibióticos más comunes pertenecen a un pequeño número de clases funcionales y estructurales que se dirigen a un conjunto limitado de procesos microbianos. A pesar de esto, se han desarrollado compuestos mejorados dentro de clases específicas de antibióticos durante varias generaciones de fármacos con potencia y rango microbianos expandidos²⁰.

Una clase de antibióticos de particular importancia son los medicamentos pertenecientes a la familia de los nitroimidazoles. El grupo de medicamentos de nitroimidazol es notable en dos aspectos²¹: primero, por su espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, protozoos e incluso tumores hipóxicos; y segundo, que a pesar de su uso durante más de 30 años, la incidencia de resistencia en anaerobios sigue siendo muy baja. Ningún otro grupo de medicamentos muestra un rango de acción tanto en medicina humana como veterinaria, ni la relativa falta de resistencia²². Estas características explican por qué la investigación continúa presentando un gran interés en dichas moléculas²³.

El Tinidazol (TNZ), es un miembro destacado de esta clase de antibióticos sintetizado en 1969²⁴, que se ha utilizado ampliamente en toda Europa y en países en desarrollo para el tratamiento de infecciones amebicas y parasitarias. Fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 2004 para el tratamiento de Tricomoniasis, Giardiasis, Amebiasis y Absceso hepático amebiano²⁵. Y en 2007 se incluyó como medicamento usado para tratar una variedad de patologías dérmicas, y de vaginosis bacteriana²⁶. Su esquema molecular se muestra en la Figura 4.4.

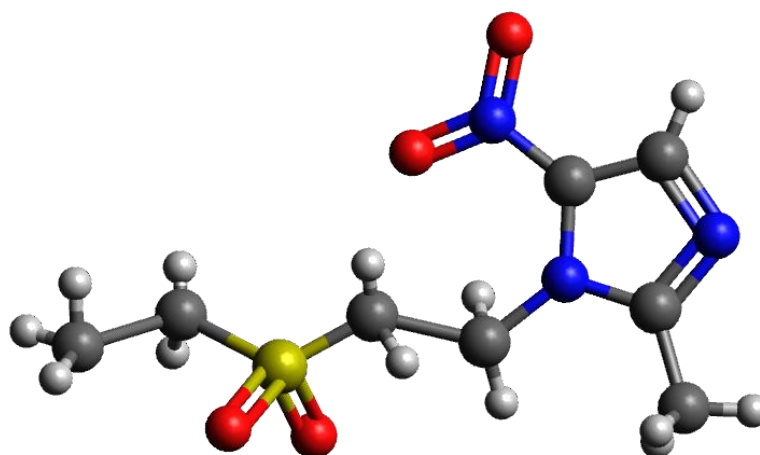


Figura 4.4 Esquema molecular de Tinidazol (TNZ). Se utiliza el siguiente código de colores: átomos de carbono en color gris, átomos de Nitrógeno en color azul, átomos de oxígeno en color rojo y átomos de azufre en color amarillo.

Aunque la utilización de TNZ como agente antiprotozoario se ha extendido a todo el mundo, este medicamento presenta dos problemas importantes: es escasamente soluble en agua, lo cual lleva asociada la administración de dosis muy altas para garantizar su efectividad; y es inestable frente a la luz, es decir es fotodegradable. Ambos problemas pueden conducir a efectos secundarios adversos en los pacientes a los que se les administra el medicamento.

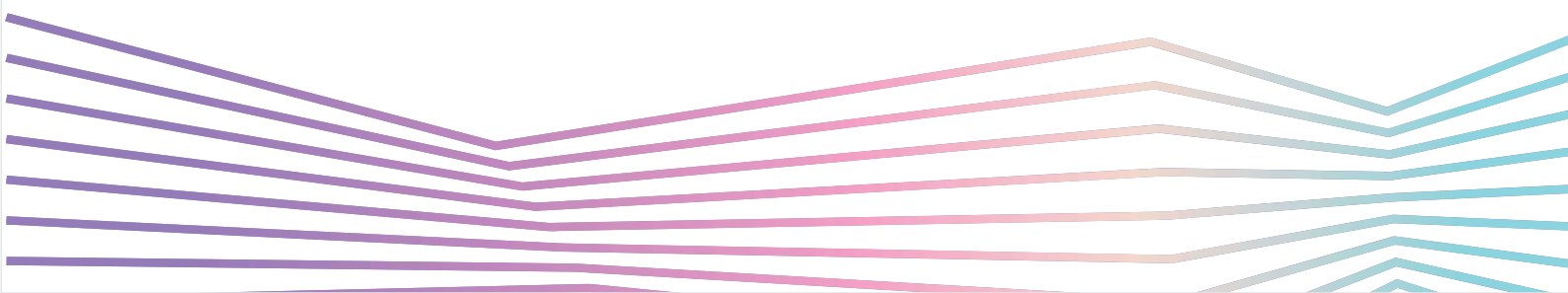
4.4 Referencias

1. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. *Curso Sobre Enfermedades Vectoriales Para Agentes Comunitarios En Ambiente y Salud. Módulo V: Chagas.*; 2015.
2. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. *Boletín Sobre Las Hepatitis Virales En La Argentina.*; 2019.
3. Organización Panamericana de la Salud. *Leishmaniasis: Informe Epidemiológico de Las Américas.*; 2019.
4. Chan-Bacab MJ, Hernández-Nuñez E, Navarrete-Vázquez G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(6):1292-1293. doi:10.1093/jac/dkp117
5. Ward RP, Kugelman M. Using Pegylated Interferon and Ribavirin to Treat Patients with Chronic Hepatitis C. *Am Fam Physician.* 2005;72(4):655-662.
6. Korba BE, Montero AB, Farrar K, et al. Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antivir Reserch.* 2008;77(1):56-63.
7. Korba BE, Elazar M, Lui P, Rossignol J-F, Glenn JS. Potential for Hepatitis C Virus Resistance to Nitazoxanide or Tizoxanide. *Anticicrobial Agents Chemother.* 2008;52(11):4069-4071.
8. Bruno FP, Caira MR, Martin EC, Monti GA, Sperandeo NR. Characterization and structural analysis of the potent antiparasitic and antiviral agent tizoxanide. *J Mol Struct.* 2013;1036:318-325. doi:10.1016/j.molstruc.2012.12.004
9. Hymes KB, Greene JB, William DC, et al. KAPOSI'S SARCOMA IN HOMOSEXUAL MEN. A REPORT OF EIGHT CASES. *Lancet.* 1981:598-600. doi:10.1016/s0140-6736(81)92740-9
10. Barre-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science (80-).* 1983;220:868-871. doi:10.1126/science.6189183
11. Public Health Service, Approval of AZT, AIDS info (1987), <https://aidsinfo.nih.gov/news/274/approval-of-azt>.
12. Hargrave KD, Proudfoot JR, Adams J, et al. 5,11-dihydro-6H-dipyrido(3,2-B:2',3'-E)(1,4)diazepines and their use in the prevention or treatment of HIV infection. 1994.
13. Food and Drug Administration, FDA Approves Nevirapine to Treat HIV, AIDS info (1996), <https://aidsinfo.nih.gov/news/290/fda-approves-nevirapine-to-treat-hiv>.
14. Pollard RB, Robinson P, Dransfield K. Safety Profile of Nevirapine , a Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor for the Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection. 1998;20(6).
15. Lamson MJ, Sabo JP, Macgregor TR, et al. Single Dose Pharmacokinetics and Bioavailability of Nevirapine in Healthy Volunteers. 1999;291(September):285-291.
16. de Jong MD, Vella S, Carr A, et al. High-Dose Nevirapine in Previously Untreated Human Immunodeficiency Virus Type 1 - Infected Persons Does Not Result in Sustained Suppression of Viral Replication. *J Infect Dis.* 1997;175:966-970.
17. Harmenberg J, Åkesson-Johansson A, Vrang L, Cox S. Synergistic Inhibition of Human Immunodeficiency Virus 3' -Azido-3' Replication In Vitro by Combinations of - Deoxythymidine and 3' -Fluoro-3' -Deoxythymidine. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1990;6(10):1197-1202.
18. Reliquet V, Ferré V, Hascoet C, Al. E. Stavudine, didanosine and nevirapine in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients. *Antivir Ther.* 1994;3:83-84.
19. D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, et al. Nevirapine, Zidovudine, and Didanosine Compared with Zidovudine and Didanosine in Patients with HIV-1 Infection A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Am Coll Physicians.* 1996;124(12):1019-1030.
20. Miyamoto Y, Korthals K, Lauwaet T, et al. Expanded therapeutic potential in activity

- space of next-generation 5-nitroimidazole antimicrobials with broad structural diversity. 2013;1-6. doi:10.1073/pnas.1302664110
21. The nitroimidazole family of drugs. *Br J Vener Dis.* 1978;54:69-71.
 22. Edwards DI. Reduction of nitroimidazoles in vitro and DNA damage. *Biochem Pharmacol.* 1986;35(1):53-58. doi:10.1016/0006-2952(86)90554-X
 23. Edwards DI. Review Nitroimidazole drugs - action and resistance mechanisms I . Mechanisms of action. 1993:9-20.
 24. Miller MW, Howes HL, English AR. Tinidazole, a potent new antiprotozoal agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 1969;9:257-260.
 25. Fung HB, Doan T, Peters JJ, Affairs V, Islandjewish L, Park NH. Drug Tinidazole: A Nitroimidazole Antiprotozoal Agent. 2005.
 26. Drug treatments for skin disease introduced in 2007. *Ski Ther Lett.* 2008;13(2):PMID: 18373042.

CAPÍTULO 5

Combinación ssNMR y DFT
para el estudio
de enlaces puente hidrógeno



Capítulo 5: Combinación ssNMR y DFT para el estudio de enlaces puente hidrógeno.

El enlace de hidrógeno es una de las interacciones específicas intra e intermoleculares más importantes. Su descripción adecuada es muy relevante en varias áreas para la caracterización de materiales, y es particularmente significativa para la explicación de procesos biológicos, y para el desarrollo farmacéutico de compuestos bioactivos. Sin embargo, dicha descripción enfrenta diversos problemas; entre ellos la dificultad experimental en obtener información detallada sobre las posiciones de los átomos de hidrógeno, como se describe más adelante. En este capítulo se presentan estudios mediante distintos enfoques, experimentales y teóricos, de un enlace de hidrógeno intramolecular. En particular se contrastan dos métodos teóricos, llamados "método de estado sólido" y "método molecular", que permiten la predicción de interacciones intra e intermoleculares, aplicadas en este caso a enlaces de hidrógeno¹.

5.1 Definiciones y desafíos de los enlaces de hidrógeno

El enlace o "puente" hidrógeno es un tipo de enlace particular que, en algunos aspectos, es similar a las interacciones dipolo-dipolo. Es decir, es un tipo específico de interacción polar que se establece entre un elemento electronegativo, generalmente O o N en moléculas orgánicas, y un átomo de H que se encuentra unido covalentemente a otro átomo electronegativo. Este tipo de interacciones son en general más débiles que los enlaces covalentes y que los enlaces iónicos, pero más fuertes que las fuerzas de van der Waals²⁻⁴.

Los puentes hidrógeno pueden ocurrir entre átomos de diferentes moléculas, enlace intermolecular, o entre átomos de una misma molécula, enlace intramolecular.^{3,4} El enlace hidrógeno intermolecular es una de las interacciones más explotadas en la ingeniería de cristales y la ubicación de los átomos de hidrógeno es esencial en la estructura del sistema. En particular, conocer la ubicación del átomo de hidrógeno dentro del enlace intermolecular permite diferenciar una sal de un cocrystal, lo cual es de gran importancia dentro de la industria farmacéutica⁵.

Por otra parte, los enlaces de hidrógeno intramoleculares desempeñan roles críticos de función y estructura en sistemas moleculares biológicos y sintéticos⁶. En muchos casos, las interacciones son lo suficientemente fuertes como para influir en la estructura molecular y supramolecular en escalas de tiempo prolongadas y en diversos entornos, solventes o de estado sólido. Un ejemplo clásico es la molécula de agua, la cual depende de este tipo de interacciones para estabilizar su estructura funcional. En otros entornos, afectan sutilmente la dinámica conformacional o la competencia energética del estado de transición. Con respecto a las estructuras electrónicas de las

moléculas, los enlaces de hidrógeno intramoleculares se utilizan en la actualidad para forzar la planarización de materiales π -conjugados⁷ y juegan un papel importante en los procesos de transferencia de protones intramoleculares en estado excitado⁸. Además, los enlaces hidrógeno intramoleculares se han utilizado con éxito para rigidizar las cadenas principales de precursores macrocíclicos, así como para promover la formación de complejos diméricos estables en solución.⁹

La curva de energía potencial de un enlace de hidrógeno representada en función de la posición del hidrógeno proporciona un criterio importante para la clasificación de este tipo de enlaces¹⁰, en la Figura 5.1 pueden observarse curvas típicas de energía potencial. Según la forma de éstas, puede predecirse dónde se encontrará el átomo de hidrógeno y por ende que tan ligado estará a cada uno de los de átomos del enlace. Las letras X e Y simbolizan a dos átomos electronegativos a los cuales se encuentra unido el hidrógeno, el eje horizontal marca la posición del H entre X e Y. Puede observarse que las curvas a) y b) de la Figura 5.1 muestran un potencial simétrico con una barrera alta, por lo que el átomo de hidrógeno puede encontrarse ligado al átomo X o al átomo Y (con la misma probabilidad), pero la probabilidad de hallarlo en la región media es nula. Las curvas de energía c) y d) ilustran casos simétricos atípicos, donde la curva tiene una barrera de potencial muy baja o un único mínimo, es decir, el átomo de hidrógeno está igualmente ligado al átomo X y al átomo Y. Se considera que el enlace hidrógeno está centrado y es probable hallar al hidrógeno en la zona media del enlace. Por último, en la curva e) se esquematiza el caso asimétrico, donde el átomo de hidrógeno está más fuertemente ligado al átomo X que al Y, y es prácticamente imposible hallar al hidrógeno cerca del átomo Y.

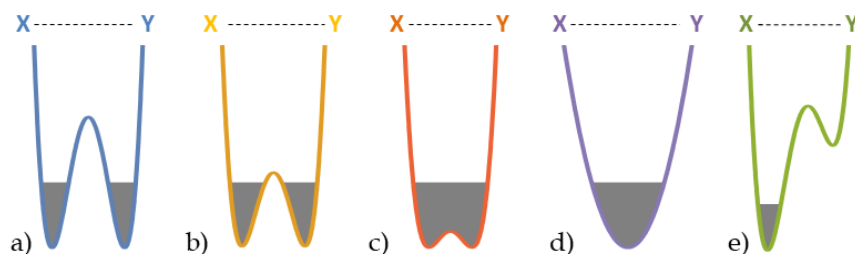


Figura 5.1 Energía potencial en función de la posición, para un átomo de hidrógeno entre dos átomos electronegativos, X e Y. El límite superior de la región marcada en gris representa la energía térmica del sistema a temperatura ambiente.

Estudiar la ubicación exacta del átomo de hidrógeno dentro del enlace es de gran importancia, ya que permite la completa caracterización del sistema y del enlace en sí mismo. Sin embargo, los átomos de hidrógeno son muy difíciles de localizar experimentalmente. La técnica por excelencia para la localización de átomos dentro de un sistema cristalino es la Dispersión de Rayos X (DRX), la misma mide la densidad electrónica asociada a cada átomo. La difracción de neutrones es una técnica que permite determinar las posiciones de los núcleos atómicos, pero requiere el uso de un reactor nuclear para crear el haz de neutrones y necesita de una muestra relativamente grande. Cuando la posición de un H se obtiene por estas dos técnicas, se obtienen

resultados diferentes, especialmente cuando el átomo de hidrógeno participa de un enlace hidrógeno. Los métodos DRX ubican a los núcleos de hidrógeno en una posición más cercana al átomo electronegativo más pesado en comparación con los resultados de difracción de neutrones. La razón de esta diferencia es la distribución de electrones asimétrica de los enlaces covalentes presentes.¹¹

La ubicación de un átomo de hidrógeno es intrínsecamente un problema de estructura local, área en la cual los métodos de NMR se destacan históricamente por aportar gran precisión. Existen diversos estudios sobre la variación del corrimiento químico de una señal de NMR en solución cuando interviene un enlace hidrógeno, respecto de la misma señal cuando no está enlazada¹²⁻¹⁴. Por otro lado, muchos trabajos estudian las distancias internucleares para detectar la presencia de enlaces hidrógeno utilizando NMR de diversos núcleos en estado sólido, realizando experimentos tanto 1D como 2D^{8,15-20}. Sin embargo, esos métodos no permiten la descripción exacta de las posiciones atómicas de átomos hidrógeno, sino que, en conjunto con estudios de estructura cristalina (XRD), sólo permiten estimarla. La descripción precisa de dicha posición se consigue cuando se realiza la conjunción de las mencionadas técnicas experimentales con el estudio teórico mediante métodos computacionales²¹⁻²⁴. Dicha conjunción de resultados permite el refinamiento estructural de la sustancia de interés y por ende la predicción de nuevas estructuras.

5.2 Metodología

La espectroscopía de NMR de estado sólido en combinación con los modelos teóricos permite obtener la descripción de enlaces hidrógeno. Hemos seleccionado como compuesto de estudio a la Tizoxanida (TIZ), que como hemos descrito en el Capítulo 4, es un potente agente antiparasitario y antiviral que cristaliza formando una estructura grafitica. En particular, TIZ presenta un enlace hidrógeno intramolecular en la región central de la molécula, que permite la planarización de la misma y, por lo tanto, el apilamiento en capas grafiticas.

Se sabe que las propiedades de NMR en estado sólido de un sistema, están directamente relacionadas con la posición de cada núcleo dentro de la estructura cristalina. Por lo que, la posición del hidrógeno dentro del enlace hidrógeno que permite la estructura de TIZ determina cómo serán los parámetros de NMR del sistema. A continuación, se presenta un estudio teórico-experimental de cómo la variación de la posición de un átomo de hidrógeno modifica los parámetros de NMR, y a partir de allí se busca hallar la mejor estimación de la posición del mismo. En la Figura 5.2 a y b se presenta la estructura molecular de TIZ y se señala el enlace hidrógeno estudiado.

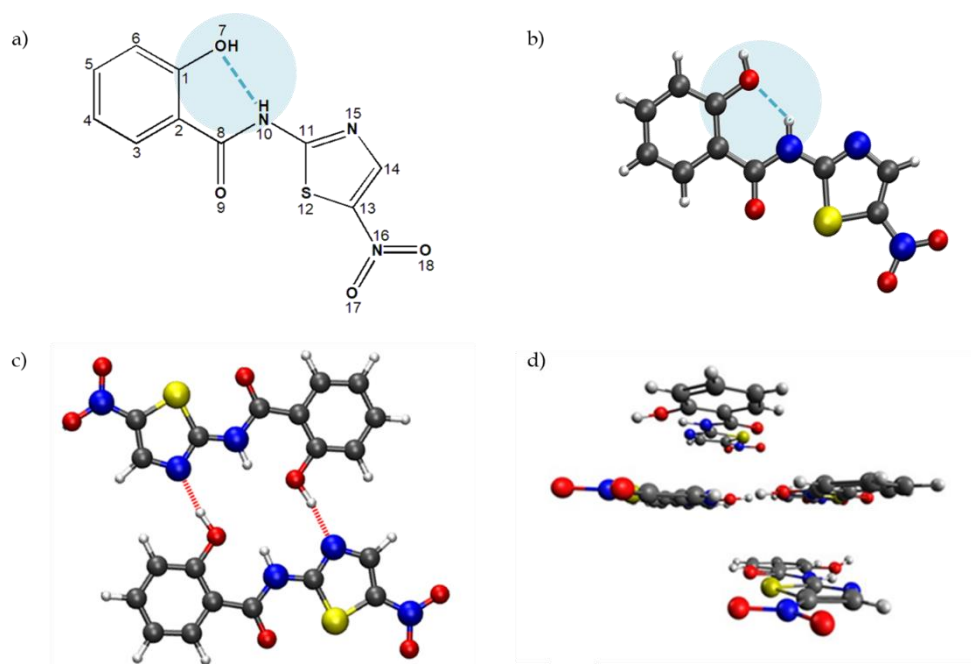


Figura 5.2 a) Estructura molecular numerada; Configuraciones del Enfoque Molecular b) monómero, c) dímero y d) tetrámero

El estudio teórico, mediante simulaciones computacionales basadas en la resolución numérica de la ecuación de Schrödinger, requiere del modelado atómico del sistema. Existen diferentes enfoques para dichos modelos y dependiendo del tipo de sistema algunos posibilitaran mayor precisión que otros. Podemos dividir los mismos en dos grandes grupos: i) enfoque molecular y ii) enfoque de estado sólido. El primero considera una o algunas moléculas aisladas y estudia las interacciones intra e intermoleculares de las mismas. Este tipo de modelado es propicio cuando se busca estudiar reacciones o interacciones que tienen lugar en un grupo reducido de moléculas, donde se pueda despreciar la interacción con el medio. El enfoque de estado sólido considera los átomos dentro de una celda unidad, la cual es repetida en forma periódica en todas las direcciones. Este segundo enfoque es adecuado para la descripción de cristales con interacciones influenciadas por la periodicidad del sistema, donde las condiciones de borde puedan ser despreciadas.

En el caso del estudio de la posición del hidrógeno dentro de la molécula de TIZ y su influencia en el espectro de NMR, la elección del enfoque es particularmente delicada. Debido a que se busca describir la posición de un único átomo dentro de una molécula, el enfoque molecular parece ser el indicado. Pero a su vez, como este átomo forma puentes hidrógeno intermoleculares que definen una estructura cristalina gráfica, es necesario también poner en consideración el enfoque de estado sólido. Se realizaron cálculos computacionales utilizando ambas descripciones y se compararon los mismos con resultados experimentales para definir cuál era el más propicio ^{1,1}

¹ Los cálculos del enfoque molecular fueron llevados a cabo por el grupo del Dr. Gustavo Aucar del Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica, IMIT CONICET-UNNE, Corrientes, Argentina.

5.2.1 Experimentos de NMR

La NMR de alta resolución de estado sólido es una herramienta analítica que provee información estructural muy útil para estudiar la estructura molecular. Los espectros de resonancia dependen del entorno local del núcleo estudiado por lo que la realización de experimentos de CPMAS permite obtener información inmediata acerca de la unidad asimétrica de un sistema, como se comentó previamente. Por tal motivo, se realizaron espectros de ^{13}C , ^{15}N y ^1H para identificar y caracterizar la TIZ^{II}. Las secuencias de pulso utilizadas para cada experimento se detallan en el Capítulo 3.

5.2.2 Cálculos Computacionales

Enfoque Molecular

Dentro del enfoque molecular utilizado se modela al compuesto de interés, TIZ, en tres configuraciones diferentes: como un monómero (molécula aislada), un dímero (dos moléculas interactuantes) o un tetrámero (4 moléculas interactuantes), como se observa en la Figura 5.2. Las configuraciones dimérica y tetramérica se estudiaron para considerar el efecto de diferentes interacciones intermoleculares. La optimización geométrica en este enfoque se realizó utilizando dos funcionales diferentes: B3LYP^{25,26} y B97D²⁷ tal como se implementan en el código DALTON 2016²⁸. Además se escogieron dos conjuntos de bases distintas: cc-pVTZ²⁹ y 6-311G++g(d,p)³⁰⁻³², para comparar diferentes niveles de teoría. Por otra parte, para cada configuración se planteó la relajación de las posiciones de diferentes átomos: para el caso de la configuración monomérica se relajaron los veinticinco átomos de TIZ o sólo el hidrógeno del enlace intranuclear H10; para el caso de las configuraciones dimérica y tetramérica, la relajación atómica se realizó considerando sólo algunos átomos (N10, O7, H10, H7 según Figura 5.2 a) que pertenecen al enlace hidrógeno de interés. En particular para estas configuraciones se tomaron dos metodologías: relajar sólo H10 (optimización del tipo 2H) o relajar tanto H10 como H7 (optimización del tipo 4H).

Enfoque de Estado Sólido

Se llevaron a cabo cálculos DFT a partir de la estructura cristalina reportada de TIZ³³, como se puede observar en la Figura 5.3, donde cada celda unidad contiene dos moléculas de TIZ apiladas. Las propiedades de NMR se calcularon después de llevar a cabo la optimización geométrica de las posiciones de todos los átomos de la estructura cristalina. El detalle de cálculo se describe en el Capítulo 3. Luego se generaron nuevas

^{II} El compuesto utilizado fue sintetizado por el grupo de la Dra. Norma Raquel Sperandeo en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

estructuras moviendo “manualmente” los protones del enlace hidrógeno a lo largo del enlace $N10-H10 \cdots O7$, editando las coordenadas cartesianas de H10 en la estructura de TIZ optimizada. Se movieron simultáneamente los dos átomos H10, pertenecientes a cada molécula de TIZ dentro de la celda unidad, manteniendo la distancia N10-H10 entre 0,78 Å y 1,78 Å. Se obtuvieron las energías y los parámetros de NMR para cada una de las nuevas estructuras. Se eligieron tres estructuras, con posiciones representativas del H10 en el enlace, y se realizaron además cálculos de diferencia de densidad electrónica.

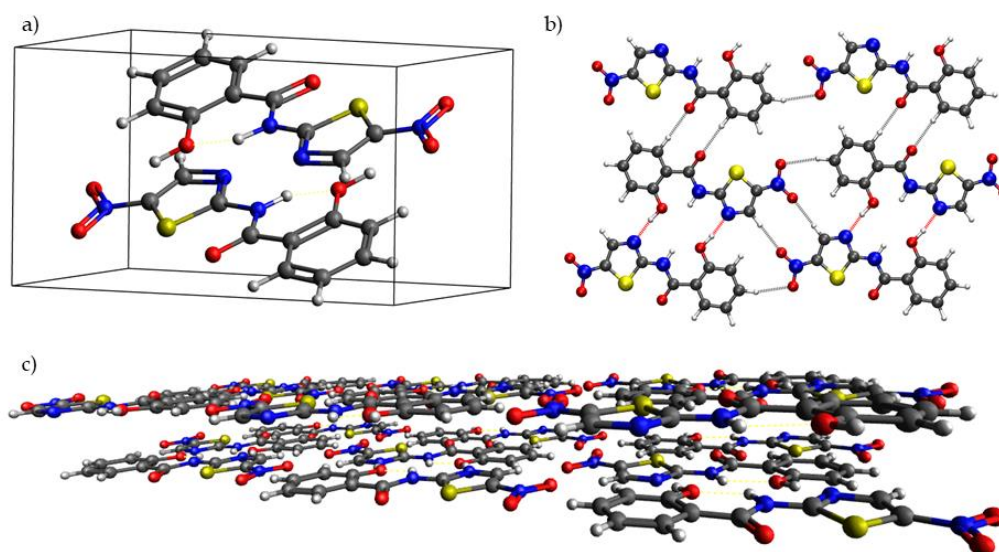


Figura 5.3 a) Celda Unidad de Tizoxanida; b) Plano formado por moléculas de Tizoxanida; c) Conformación gráfica de Tizoxanida.

5.3 Resultados y discusión

Los espectros de SSNMR medidos para TIZ se muestran en la Figura 5.4 El espectro CPMAS de ^{15}N (Figura 5.4 b) muestra una señal para cada nitrógeno de la molécula (N10, N15 y N16); y las señales fueron asignadas considerando el entorno local de cada nitrógeno en particular. El espectro de alta resolución de 1H (Figura 5.4 c) muestra tres resonancias principales, que pueden ser deconvolucionadas para obtener los desplazamientos químicos de cada uno de los protones en la molécula (H3, H4, H5, H6, H7, H10 y H14); las líneas punteadas de la Figura 5.4 c muestra dicha deconvolución, y la asignación de señales se corresponde con el máximo de cada pico deconvolucionado.

El espectro ^{13}C CPMAS en estado sólido (espectro superior de la Figura 5.4) y el espectro de ^{13}C en solución (DMSO- d_6) de TIZ, fue obtenidos previamente por el Dr. Gustavo Monti y la Dra. Norma Sperandeo en 2013³³. En la Tabla 5.1 pueden verse los corrimientos químicos hallados. Comparando los corrimientos en sólido con los de

solución de la Tabla 5.1 se observaron cambios notables para el corrimiento químico de los carbonos más cercanos del enlace hidrógeno N10-H10 \cdots O7 (resaltados en **negrita**). Este hecho sugiere una modificación en los enlaces moleculares de la región de interés, pasando de enlaces intermoleculares en solución a la presencia de enlaces intramoleculares en estado sólido, que se observaron al hallar la estructura cristalina.

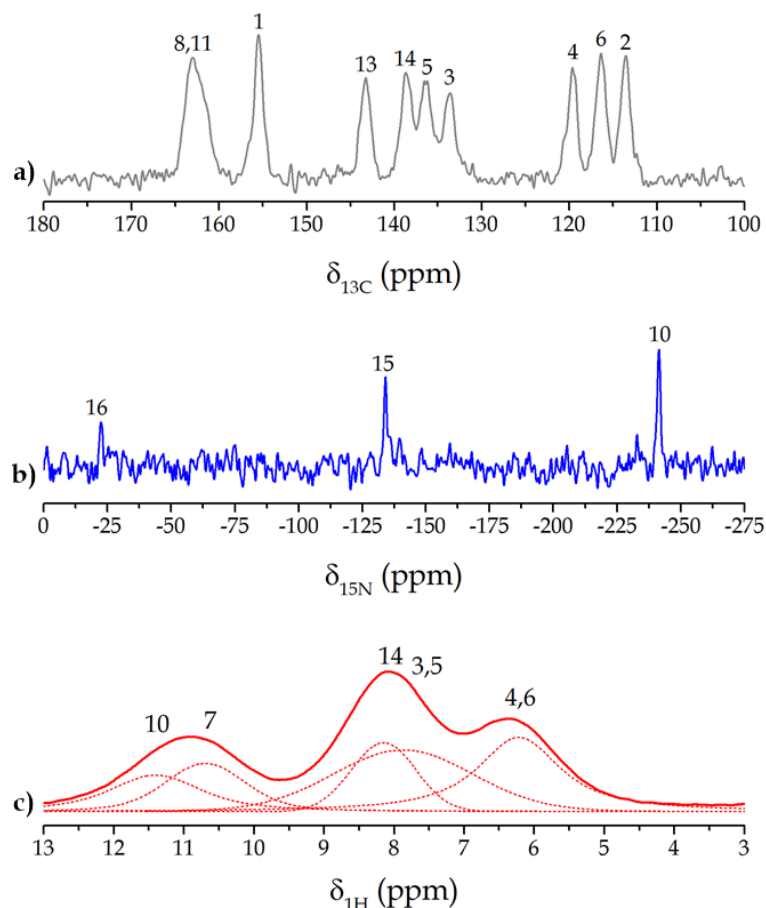


Figura 5.4 Espectros de NMR en sólido de Tizoxanida. a) ^{13}C CPMAS, b) ^{15}N CPMAS y c) ^1H . Las líneas punteadas corresponden a la deconvolución de las señales de ^1H y las asignaciones se corresponden con los máximos de dicha deconvolución.

Tabla 5.1 Comparación de corrimientos químicos de TIZ en estado sólido (CPMAS) y en solución (DMSO- d_6).

Átomo de C	CPMAS (ppm)	DMSO- d_6 (ppm)
1	155,5	157,8
2	113,3	117,1
3	133,3	130,9
4	119,6	120,3
5	136,3	135,5
6	116,4	117,6
8	163,1	166,1
11	163,1	162,1
13	143,3	142,8
14	138,6	142,4

Los corrimientos químicos fueron determinados por el Dr. Gustavo Monti. Fuente Tesis de Flavia Bruno.

5.3.1 Enfoque Molecular

El primer paso en el desarrollo de este modelo molecular teórico fue calcular la distancia de enlace N10-H10 considerando diferentes configuraciones del sistema, la molécula de TIZ aislada (monómero), dos moléculas interactuando en el mismo plano (dímero) o cuatro moléculas interactuantes (tetramero), ver Figura 5.2.

Los valores de las distancias N10-H10 obtenidas para las tres configuraciones, monómero, dímero y tetramero de TIZ, utilizando diferentes niveles de teoría y diferentes grados de optimización, se muestra en la Tabla 5.2. Cuando se mencionan diferentes niveles de teoría se hace referencia al uso de diferentes potenciales, mientras que el grado de optimización está dado por la cantidad de átomos de la molécula que se liberan en el cálculo de minimización de energía. Se observa que la distancia N10-H10 varía entre 1,01 Å y 1,02 Å para todas las configuraciones. Sin embargo, se observó que, al optimizar la geometría del dímero, la estructura plana de la TIZ se pierde debido a fuerzas de torsión entre los monómeros. Este hecho sugiere que, para obtener una estructura plana, como se observa experimentalmente, es necesario incluir otros monómeros encima y debajo de la estructura dimérica. Este resultado llevó a la consideración del tetramero, que incluye estas moléculas, como se presenta la Figura 5.2 d.

Tabla 5.2 Distancia N10-H10 para las diferentes configuraciones y diferentes niveles de teoría.

Configuración	Funcional/Base	Posiciones Relajadas	Distancia N10-H10
Monómero	B3LYP/6-311G++g(d,p)	todas	1,015
	B97D/6-311G++g(d,p)	sólo H10	1,017
	B97D/6-311G++g(d,p)	todas	1,014
	B97D/cc-pVTZ	sólo H10	1,013
Dímero	B3LYP/6-311G++g(d,p)	todas	1,020
	B97D/6-311++g(d,p)	2H ^a	1,019
	B97D/cc-pVTZ	2H	1,016
	B97D/cc-pVTZ	4H ^b	1,019
Tetramero	B97D/6-311++g(d,p)	2H	1,020
	B97D/cc-pVTZ	2H	1,017
	B97D/cc-pVTZ	4H	1,019

^a La posición de los dos átomos H10 del dímero fueron optimizados.

^b La posición de los dos átomos H10 y los dos átomos H7 del dímero fueron optimizados.

Los corrimientos químicos calculados a diferentes niveles de teoría se muestran en la Tabla 5.3. Puede verse, que los valores obtenidos para la configuración de monómero difieren notoriamente de los corrimientos químicos experimentales en sólido; mientras que los valores hallados para dímero y tetramero con optimización 4H (todos los átomos intervinientes en el enlace hidrógeno) se asemejan más a los experimentales. Sin embargo, los valores obtenidos tienen una diferencia de entre 5 ppm y 10 ppm con respecto a los resultados experimentales en estado sólido para algunos de los átomos. Esto ratifica la importancia de las interacciones intermoleculares para la descripción exacta de los parámetros de NMR, y además

resalta el rol del enlace hidrógeno estudiado en la planarización de la estructura de la TIZ.

Tabla 5.3 Corrimientos químicos (en ppm)

$\delta(X) \setminus$ Átomo	H7	H10	N10	C8	C2	C1	C6	C5	C4	C3	
Exp	Sólido	10,60	11,40	-241,5	163,1	113,6	155,5	116,4	136,3	119,6	133,3
	Solución (DMSO- d_6)	-	-	-	166,1	117,1	157,8	117,6	135,5	120,3	130,9
Monómero	Optimización total (B3LYP/cc-pVTZ)	4,01	10,41	-225,49	170,75	126,5	166,89	122,63	144,81	131,68	145,69
	Optimización total (PBE/cc-pVTZ)	4,23	10,58	-223,35	164,24	123,23	162,42	120,01	140,18	128,73	140,81
	Optimización total (PBE0/cc-pVTZ)	4,25	10,60	-231,75	165,48	120,86	160,71	117,81	140,22	126,70	140,96
	Optimización total (KT3/cc-pVTZ)	3,81	10,04	-230,61	157,86	116,01	154,93	102,20	119,27	108,91	120,92
Dímero	Geometría del cristal (PBE/cc-pVTZ)	3,96	6,91	-240,78	165,37	122,55	164,00	114,25	135,29	122,16	135,60
	Geometría del cristal (KT3/cc-pVTZ)	3,40	6,29	-249,44	157,02	114,37	155,19	106,11	126,17	113,21	126,31
	Optimización 4H (KT3/cc-pvtz)	11,54	11,21	-236,13	158,03	113,79	157,30	107,22	126,29	112,65	126,23
Tetrámero	Optimización 2H (PBE0/cc-pVTZ)	2,37	10,69	-237,22	168,11	120,64	161,51	112,8	135,01	120,65	136,76
	Optimización 2H (B97D/cc-pVTZ)	2,44	10,39	-232,63	164,86	120,38	159,86	112,00	131,61	119,31	133,16
	Optimización 4H (PBE0/cc-pVTZ)	10,65	11,01	-236,74	168,78	119,91	164,16	114,03	135,49	119,79	136,62
	Optimización 4H (B97D/cc-pVTZ)	10,42	10,69	-232,4	165,49	119,83	162,37	113,27	132,05	118,55	133,01

5.3.2 Enfoque de Estado Sólido

Debido a la necesidad de considerar todas las interacciones intermoleculares se plantea utilizar el modelo de estado sólido. El primer paso de este modelo fue la optimización geométrica de todos los átomos de la TIZ en la estructura cristalina hallada por Bruno et al.³³ El siguiente paso fue el cálculo de los parámetros de resonancia de todos los núcleos para dicha estructura optimizada, seguida de la comparación entre los resultados de corrimientos químicos calculados y experimentales. En general, los corrimientos químicos calculados están en buen acuerdo con los resultados experimentales para los tres núcleos estudiados, como se puede ver en las Figura 5.5, Figura 5.6 y Figura 5.7. En el caso de los corrimientos químicos de ^{13}C , se observa que existe una dispersión de los corrimientos alrededor de la línea $\delta_{\text{EXP}} = \delta_{\text{CALC}}$ (línea punteada en la Figura 5.5). Mientras que para los corrimientos químicos de ^{15}N , sólo el corrimiento del átomo N10 cae fuera de la recta $\delta_{\text{EXP}} = \delta_{\text{CALC}}$ como se puede ver en la Figura 5.6 (el corrimiento experimental es -241,5 ppm y el calculado es de -249,5 ppm). En la Figura 5.7 se observa que los resultados calculados para ^1H tienen un muy buen acuerdo con los valores experimentales para todos los átomos hidrógeno de la TIZ, excepto para el hidrógeno involucrado en el enlace N10-H10 (el valor experimental de dicho corrimiento es 11,4 ppm y el hallado mediante los cálculos es de 7,7 ppm).

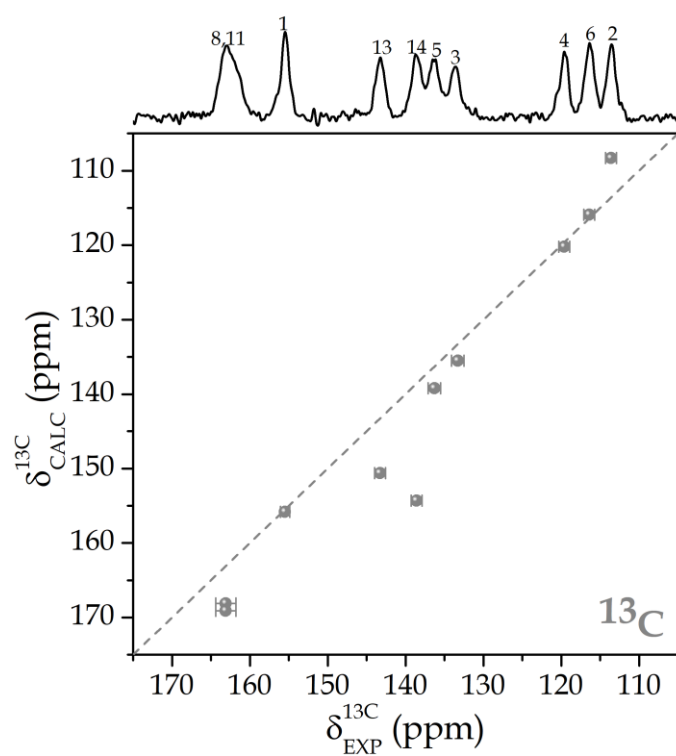


Figura 5.5 Corrimiento químico calculado en función del corrimiento experimental para ^{13}C . La línea punteada representa la recta $\delta_{\text{EXP}} = \delta_{\text{CALC}}$

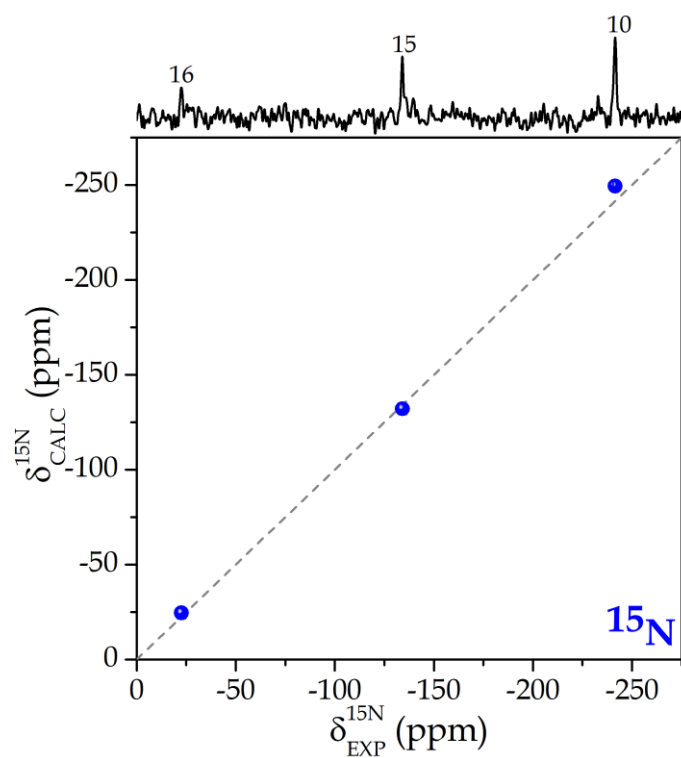


Figura 5.6 Corrimiento químico calculado en función del corrimiento experimental para ^{15}N . La línea punteada representa la recta $\delta_{\text{EXP}} = \delta_{\text{CALC}}$

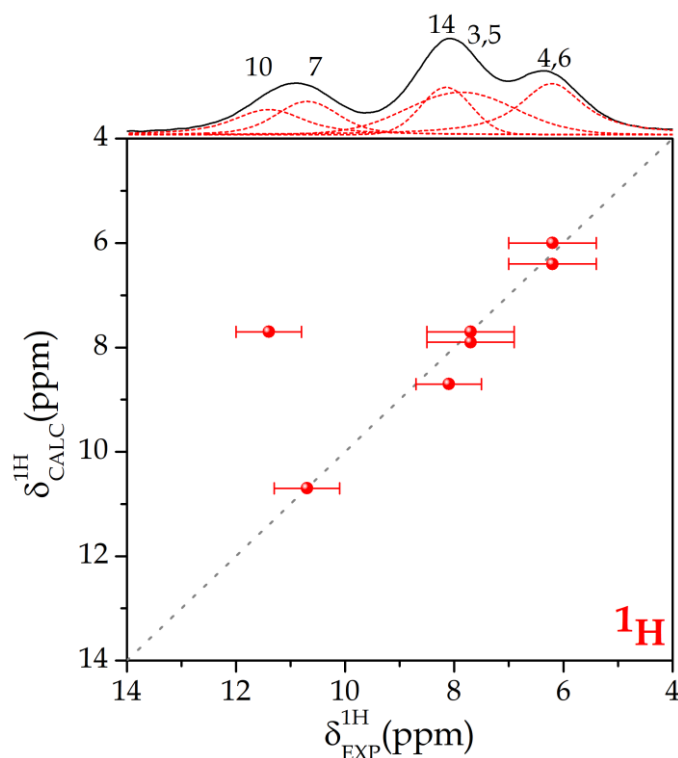


Figura 5.7 Corrimiento químico calculado en función del corrimiento experimental para ^1H . La línea punteada representa la recta $\delta_{\text{EXP}} = \delta_{\text{CALC}}$

Para cada núcleo, se calculó la desviación cuadrática media (RMS, por su sigla en inglés) de los corrimientos calculados vs los corrimientos experimentales. En el caso de ^{13}C , la RMS fue de 2,9 ppm, 2,0 ppm para ^{15}N y 0,4 ppm para ^1H . Las desviaciones entre los resultados calculados y experimentales surgen de tres fuentes de error diferentes³⁴: (i) inexactitudes de los procedimientos computacionales, (ii) errores o incertidumbres en las estructuras cristalinas obtenidas por DRX y (iii) errores en los datos de NMR experimentales. Los dos últimos errores suelen ser relativamente pequeños, a excepción de las posiciones de los hidrógenos obtenidas por DRX y problemas asociados a las comparaciones de temperatura.

Dado que, en la comparación de los corrimientos teóricos y experimentales, la mayor diferencia se observó para la región del enlace hidrógeno entre N10-H10 y O7, se realizaron nuevos cálculos donde la posición del hidrógeno H10 se varió cambiando la distancia de enlace N10-H10. Para ello se crearon nuevas estructuras cristalinas como entrada del cálculo, donde cada nueva estructura posee una distancia de enlace N10-H10 entre 0,78 Å y 1,78 Å. La distancia 0,78 Å corresponde a un fuerte enlace entre N10-H10 y la distancia 1,78 Å simboliza el caso de un enlace H10-O7 fuerte. La Figura 5.8 muestra la molécula de TIZ con las diferentes posiciones de H10 para cada nueva estructura. Para el armado de las nuevas estructuras se calcularon posiciones de H10 manteniendo fijo el ángulo y plano formado por los tres núcleos (N10, H10 y O7), en la estructura optimizada inicialmente, y se fue variando la distancia N10-H10.

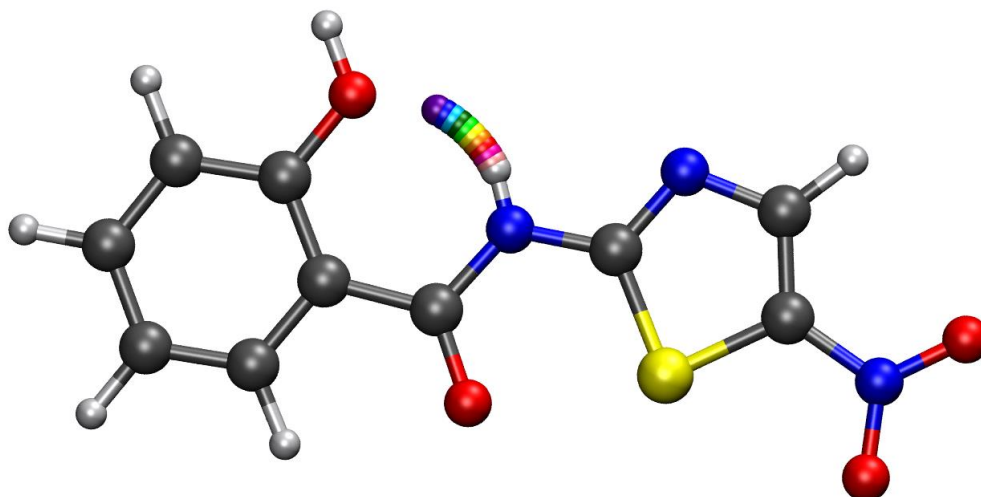


Figura 5.8 Esquema del movimiento del átomo H10 de TIZ a lo largo del enlace hidrógeno. Cada átomo de hidrógeno perteneciente a una estructura diferente se representa con un color distinto, donde la distancia de enlace N10-H10 varía entre 0,78 Å y 1,78 Å en pasos de 0,1 Å.

El estudio de la influencia de la distancia N10-H10 se llevó a cabo en dos etapas de diferente precisión, primero se crearon estructuras variando la distancia en pasos de 0,1 Å y luego sobre un rango más reducido en pasos de 0,01 Å (Figura 5.8). Para cada nueva estructura se calcularon los parámetros de NMR y se realizó la comparación con los valores experimentales mediante el cálculo de la RMS. El primer estudio permitió observar que para los átomos de ^{13}C la mejor RMS se obtiene cuando la longitud del enlace N10-H10 es mayor que 0,88 Å y menor que 0,98 Å, mientras que para ^{15}N , la mejor RMS se encuentra para distancias N1-H10 de entre 1,08 Å y 1,18 Å. Las diferentes fuentes de desviaciones entre los corrimientos químicos experimentales y calculados discutidas previamente deben ser la razón por la cual la longitud de enlace óptima para los dos núcleos no coincide.

La segunda iteración, considerando pasos de 0,01 Å, se realizó para distancias de enlace N10-H10 de entre 0,98 Å y 1,18 Å. El intervalo seleccionado contiene los valores límites para los cuales la RMS de ^1H fue mejor cuando se realizaron variaciones de 0,1 Å. En las Figura 5.9, Figura 5.10 y Figura 5.11 se muestran las comparaciones de corrimientos químicos experimentales y calculados para los tres núcleos estudiados, ^{13}C , ^{15}N y ^1H para diferentes longitudes de enlace. En el caso de ^{13}C y ^{15}N (Figura 5.9 y Figura 5.10) se muestran los resultados para pasos de 0,1 Å, mientras que para ^1H (Figura 5.11) se muestran los resultados de corrimientos químicos para pasos más cortos.

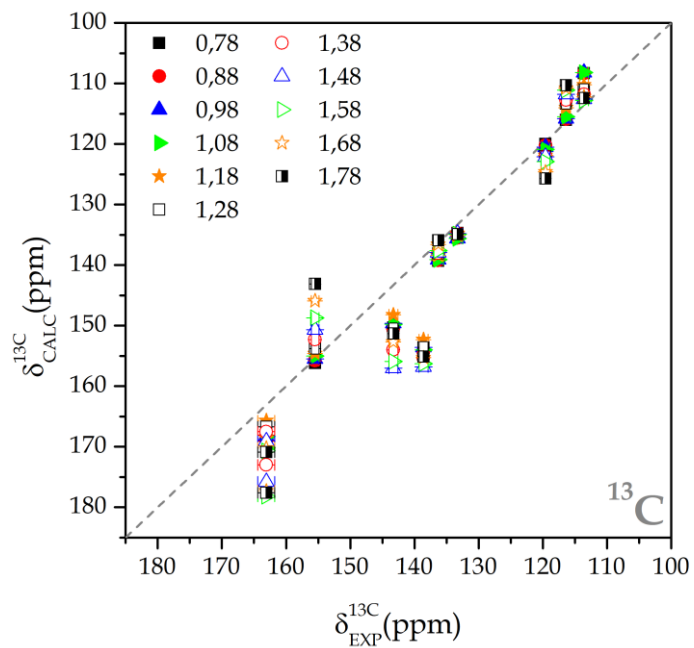


Figura 5.9 Comparación de corrimientos químicos calculados vs corrimiento químico experimental de ^{13}C para diferentes distancias de enlace N10-H10

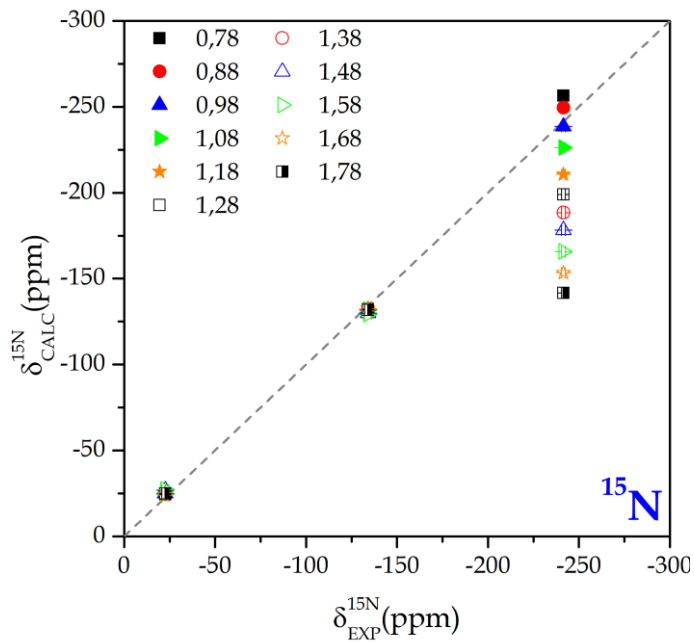


Figura 5.10 Comparación de corrimientos químicos experimentales vs calculados de ^{15}N para diferentes distancias de enlace N10-H10

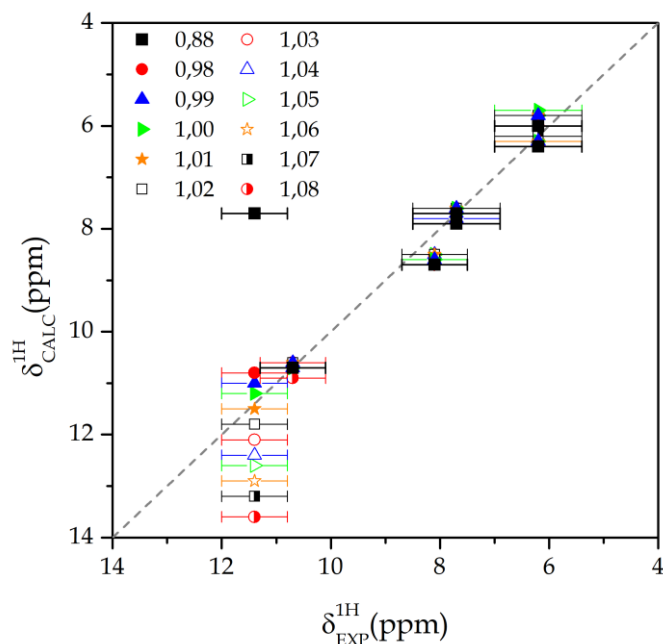


Figura 5.11 Comparación de corrimientos químicos experimentales vs calculados de ^1H para diferentes distancias de enlace N10-H10

En la primera iteración se observó que los corrimientos químicos de ^{13}C estimaban una longitud menor a la encontrada por corrimientos de ^1H , mientras que ^{15}N predice una mayor. Por este motivo en la segunda instancia de cálculos se escogió seguir los corrimientos químicos de ^1H para el refinamiento de la longitud de enlace. Se encontró que el valor para el corrimiento químico calculado para H10 es más cercano al valor experimental cuando la longitud del enlace N10-H10 está entre 1,00 Å y 1,01 Å, (triángulo relleno verde y estrella rellena naranja en la Figura 5.11, respectivamente). Para ambos casos, el valor de RMS es de 0,3 ppm y es el menor valor encontrado para todas las distancias.

A continuación, en las Figura 5.12, Figura 5.13 y Figura 5.14 se muestran los valores de los corrimientos químicos calculados, para algunos núcleos, en función de la distancia de enlace N10-H10. Se eligió en el caso de ^{13}C seguir los núcleos C1, C8, C11 y C3, los primeros tres se encuentran en un entorno cercano al enlace hidrógeno estudiado; mientras que C3 está en una región alejada. Se observó que los corrimientos de C1, C8 y C11 muestran variaciones considerables al modificar la distancia de enlace N10-H10, esto se debe a que los apantallamientos se alteran significativamente al modificar la posición de H10 (Figura 5.12). Sin embargo, el corrimiento químico para C3, como se esperaba, casi no se modifica con la distancia de enlace debido a que se encuentra alejado de la región de interés, y por ende la distribución electrónica no se modifica al mover H10. De la misma manera, la Figura 5.13 muestra que el corrimiento químico de N15 no es afectado por el movimiento de H10, mientras que para N10 varía notablemente. Esto no es sorprendente, considerando que N10 es el núcleo directamente involucrado en el enlace hidrógeno estudiado.

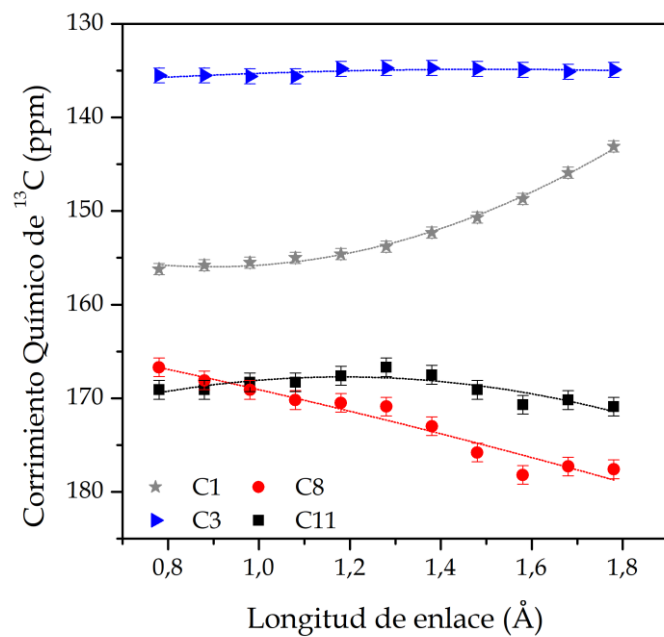


Figura 5.12 Corrimientos químicos calculados en función de la distancia de enlace N10-H10 para los distintos núcleos de ^{13}C .

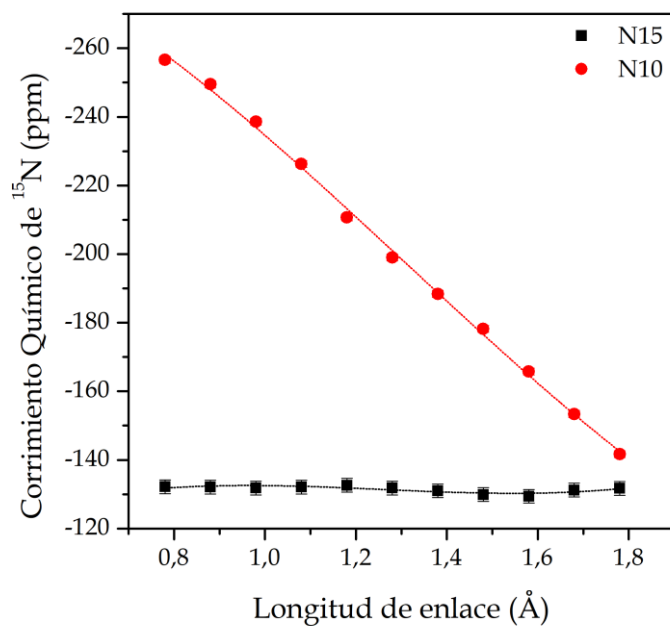


Figura 5.13 Corrimientos químicos calculados en función de la distancia de enlace N10-H10 para distintos núcleos de ^{15}N .

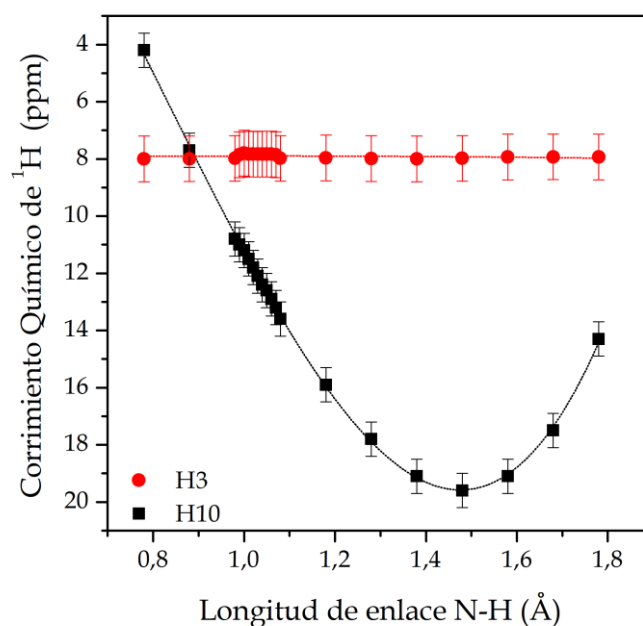


Figura 5.14 Corrimientos químicos calculados en función de la distancia de enlace N10-H10 para los distintos núcleos de ^1H .

Finalmente, la Figura 5.14 muestra cómo el corrimiento químico de H10 (el que está involucrado en el enlace hidrógeno) cambia para cada distancia y el de H4 no lo hace. A medida que la distancia de enlace N10-H10 se alarga se produce un desapantallamiento del núcleo aumentando su corrimiento químico, hasta llegar a un valor máximo correspondiente a una ubicación equidistante de N10 y O7. Como es de esperarse, cuando el átomo de hidrógeno se acerca al átomo de oxígeno (O7), distancias N10-H10 mayores a 1,4 Å, el corrimiento químico comienza a descender nuevamente debido a que el núcleo vuelve a apantallarse. Se observa que para todos los núcleos es posible ajustar el cambio de los corrimientos químicos con la distancia mediante un polinomio de orden 3, tal y como propone Harris et al.³⁵. Del ajuste polinómico para el corrimiento químico de H10 en función de la distancia, y considerando un error experimental de 0,6 ppm, se encontró que la distancia de enlace N10-H10 que reproduce el valor experimental es de $(1,00 \pm 0,02)$ Å, valor en muy buena coincidencia con el obtenido mediante el modelo molecular en las diferentes configuraciones.

Por otro lado, como se discutió al comienzo del capítulo, la curva de energía potencial de un enlace hidrógeno representada en función de la posición del átomo de hidrógeno proporciona un criterio fundamental para su clasificación y es un indicador de la fuerza de dicho enlace^{10,36-39}. En la Figura 5.15 se muestran los resultados del cálculo de energía total en función de la distancia de enlace N10-H10.

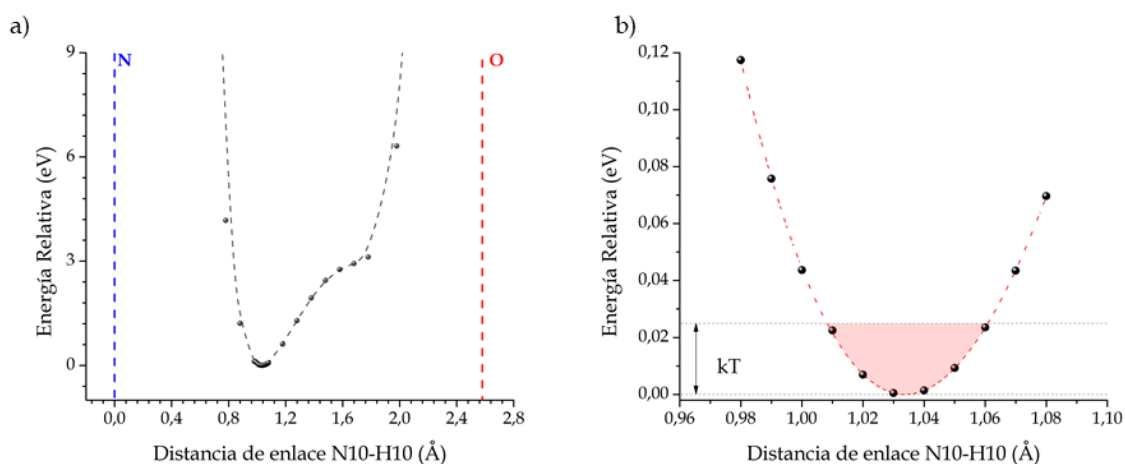


Figura 5.15 a) Variación de la energía total del sistema (relativa al mínimo) como función de la distancia de enlace N10-H10; se muestra también la posición de los dos átomos electronegativos pertenecientes al enlace. b) Ampliación en la zona del mínimo de energía, sombreada se muestra el área entre la mínima energía calculada y kT .

Como puede verse, el comportamiento de la energía del sistema coincide con el comportamiento de la energía potencial de un enlace hidrógeno asimétrico, según lo informado por White et al.¹⁰. Es decir, podemos asegurar que el átomo de hidrógeno se encuentra fuertemente enlazado al átomo N10, y no existirá intercambio con el O7. En la Figura 5.15 b) se muestra una ampliación de la región de mínima energía, que es donde se ubicará el hidrógeno. La línea punteada roja representa el ajuste de los datos de energía potencial en esta región. Para tal ajuste se utilizó un polinomio de grado tres, a partir del cual se obtuvo una longitud de enlace de 1,035 Å. Debido a que el formalismo de cálculos DFT estudia el estado fundamental (temperatura de 0 K) en la Figura 5.15 a) Variación de la energía total del sistema (relativa al mínimo) como función de la distancia de enlace N10-H10; se muestra también la posición de los dos átomos electronegativos pertenecientes al enlace. b) Ampliación en la zona del mínimo de energía, sombreada se muestra el área entre la mínima energía calculada y kT . b) se marcó en rojo la región de energías entre 0 K y T ambiente, en las cuales podría encontrarse al hidrógeno a temperatura ambiente. Considerando dicha región la longitud de enlace es de $(1,03 \pm 0,03)$ Å, estando ésta en buena concordancia con el resultado obtenido del ajuste de los corrimientos químicos de ^1H y con el hallado por el modelo molecular.

A continuación, se presenta un análisis detallado de la variación de la densidad electrónica en función de la posición de H10 y cómo la misma afecta el corrimiento químico. Los electrones que rodean un núcleo reaccionan al campo magnético externo de un experimento de NMR produciendo un campo secundario, el cual contribuye al campo total que se siente el núcleo y, por lo tanto, cambia su frecuencia de resonancia. Esta interacción del campo secundario producido por los electrones con el núcleo es lo que denominamos apantallamiento. Por lo tanto, si se modifica la posición de un átomo particular en la estructura de TIZ, se cambia la distribución electrónica de la región y esto modifica el corrimiento químico de los átomos aledaños. Para observar con más detalle el efecto del cambio en el entorno electrónico producido por la

modificación del átomo H10, se realizaron cálculos de diferencia de densidad electrónica para dos estructuras de TIZ con distintas longitudes de enlace N10-H10. Este método, llamado diferencia de densidad electrónica, se explicó en Capítulo 3 y los resultados se muestran en la Figura 5.16.

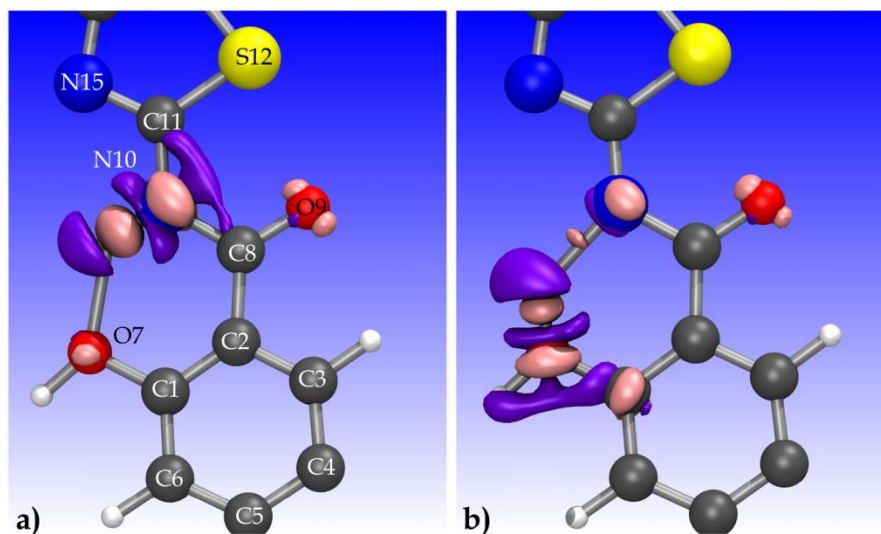


Figura 5.16 Diferencia de carga para distancias de enlace N10-H10 de a) 1,03 Å y b) 1,78 Å. Los lóbulos rosados y violetas representan la depresión y acumulación de carga, respectivamente.

Puede verse que, para 1,03 Å (Figura 5.16 a), la distribución de carga se corresponde con la distribución de un enlace covalente entre N10 y H10, y la Figura 5.16 b uno entre H10 y O7. En ambos casos también se observa un enlace (varilla gris) entre el H10 y el átomo más alejado (O7 y N10, respectivamente), el cual simboliza el enlace hidrógeno. Además, es posible notar cómo la variación de la posición de H10 afecta la distribución electrónica de los primeros vecinos del enlace, lo cual incide directamente en su corrimiento químico, como lo corroboran los resultados mostrados en las Figura 5.12, Figura 5.13 y Figura 5.14.

5.4 Conclusiones del capítulo

La adecuada descripción de los enlaces hidrógeno es de gran importancia en la caracterización de materiales, especialmente para el desarrollo farmacéutico de compuestos bioactivos. Sin embargo, la obtención experimental de posiciones de átomos livianos como el hidrógeno no es tarea fácil. Encontrar de manera precisa dichas posiciones es esencial para describir los enlaces hidrógenos. En este capítulo se estudió un enlace hidrógeno intramolecular para un compuesto farmacéutico de interés, la Tizoxanida. Para llevar a cabo dicho estudio se aplicó un procedimiento que combina resultados experimentales de NMR en estado sólido con métodos teóricos. El modelado teórico de la estructura se realizó mediante dos enfoques teóricos diferentes. El de estado sólido se basa en la periodicidad de la estructura cristalina de la TIZ para calcular su energía, densidad electrónica y los parámetros de NMR; mientras que el enfoque molecular considera moléculas aisladas de TIZ ubicadas en tres entornos diferentes, aunque locales.

La optimización de la geometría de la TIZ mediante el enfoque molecular presenta una distancia de enlace N10-H10 que varía entre 1,013 Å y 1,020 Å para las tres configuraciones estudiadas (monómero, dímero y tetramero) y para las diferentes formas de optimización geométrica. De estos valores, la distancia obtenida para la estructura tetramérica mediante la optimización 4HB es coincidente con la obtenida luego con el modelo de estado sólido. La utilización de este modelo remarca la importancia de las interacciones intermoleculares para la correcta descripción de la disposición molecular dentro de un sólido cristalino y para la obtención de parámetros de RMN confiables.

La combinación del enfoque de estado sólido y los resultados experimentales permitió, en primera instancia, obtener de manera precisa la posición del átomo de hidrógeno perteneciente al enlace de interés. En particular se encontró una distancia N10-H10 de $(1,00 \pm 0,02)$ Å al ajustar los parámetros de resonancia y $(1,03 \pm 0,03)$ Å al hallar el mínimo de energía del sistema y considerar la energía térmica, valores compatibles con el hallado mediante el enfoque molecular. Además, posibilitó un estudio minucioso de cómo la posición del hidrógeno afecta a los parámetros de resonancia de los distintos núcleos de la molécula, pudiendo distinguir regiones afectadas de aquellas que no modifican su entorno local. Por otra parte, el análisis de la diferencia de carga para diferentes distancias de enlace nos permitió entender de manera más precisa el porqué de las variaciones de los parámetros de resonancia en los átomos inmediatamente ligados al hidrógeno. Por último, se observó que la curva de energía del sistema en función de la distancia de enlace predice un enlace hidrógeno asimétrico entre el N10 y el O7, permitiéndonos asegurar que el hidrógeno está fuertemente ligado al N y que la probabilidad de transferencia de protones al O7 es muy baja.

La combinación de los modelos teóricos con los resultados experimentales se puede aplicar ampliamente para la caracterización completa de cualquier cristal molecular diferente de TIZ. De hecho, el modelo de estado sólido se aplica ampliamente para la caracterización adecuada de las propiedades de los sistemas sólidos extensos, aunque su combinación con resultados experimentales u otros métodos de cálculo no es tan habitual. Todos los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en una revista científica de alto impacto: *RSC Adv.* **11**, 7644–7652 (2021) “Accurate location of hydrogen atoms in hydrogen bonds of tizoxanide from the combination of experimental and theoretical models.” Reviglio, A. L.; Martínez, F.; Montero, M.; Garro-Link, Y.; Aucar, G. A.; Sperandio, N. R.; Monti, G. A.

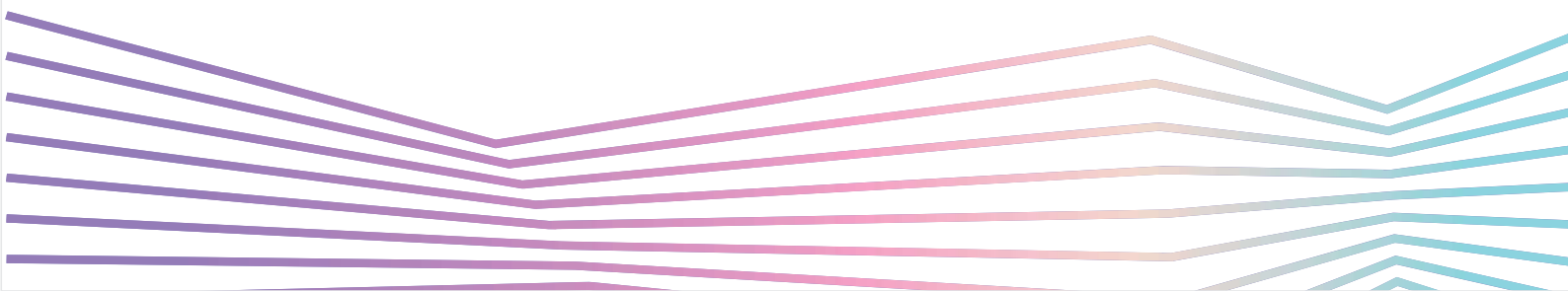
5.5 Referencias

1. Reviglio, A. L. *et al.* Accurate location of hydrogen atoms in hydrogen bonds of tizoxanide from the combination of experimental and theoretical models. *RSC Adv.* **11**, 7644–7652 (2021).
2. Pimentel, G. & McClellan, A. *The Hydrogen Bond*. (Franklin Classics, 2018).
3. Weinhold, F. & Klein, R. A. What is a hydrogen bond? Resonance covalency in the supramolecular domain. *Chem. Educ. Res. Pract.* **15**, 276–285 (2014).
4. Arunan, E. *et al.* Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011)*. *Pure Appl. Chem.* **83**, 1637–1641 (2011).
5. Hutchins, K. M. Functional materials based on molecules with hydrogen-bonding ability : applications to drug co-crystals and polymer complexes. *R. Soc. Open Sci.* **5**, 180564 (2018).
6. Sánchez, G. Introduction to ‘intramolecular Hydrogen Bonding 2018’. *Molecules* **24**, (2019).
7. Gómez, P. *et al.* Hydrogen-bonded azaphenacene: A strategy for the organization of π -conjugated materials. *J. Mater. Chem. C* **6**, 3968–3975 (2018).
8. Gobetto, R. *et al.* Hydrogen bonding and dynamic behaviour in crystals and polymorphs of dicarboxylic-diamine adducts: A comparison between NMR parameters and X-ray diffraction studies. *Chem. - A Eur. J.* **11**, 7461–7471 (2005).
9. Gómez-Castro, C. Z. *et al.* Solid state structure and solution thermodynamics of three-centered hydrogen bonds (O \cdots H \cdots O) using N-(2-benzoyl-phenyl) oxalyl derivatives as model compounds. *Molecules* **19**, 14446–14460 (2014).
10. White, P. B. & Hong, M. N and 1 H Solid-State NMR Investigation of a Canonical Low-Barrier Hydrogen-Bond Compound: 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene. *J. Phys. Chem. B* **119**, 11581–11589 (2015).
11. Kerr, H. E. *NMR Crystallography of Disordered Cocrystals*. (Durham University, 2017).
12. Kala, A. L. A., Kumara, K., Harohally, N. V. & Lokanath, N. K. Synthesis, characterization and hydrogen bonding attributes of halogen bonded O-hydroxy Schiff bases: Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and DFT studies. *J. Mol. Struct.* **1202**, 127238 (2020).
13. Ravindranath, L. & Reddy, B. V. Theoretical and experimental study of torsional potentials, molecular structure (monomer and dimer), vibrational analysis and molecular characteristics of some dimethyl bipyridines. *J. Mol. Struct.* **1200**, 127089 (2020).
14. Sobczyk, L., Chudoba, D., Tolstoy, P. M. & Filarowski, A. Some brief notes on theoretical and experimental investigations of intramolecular hydrogen bonding. *Molecules* **21**, (2016).
15. Sardo, M. *et al.* Diazole-based powdered cocrystal featuring a helical hydrogen-bonded network: Structure determination from PXRD, solid-state NMR and computer modeling. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **65**, 49–63 (2015).
16. Tatton, A. S. *et al.* Probing hydrogen bonding in cocrystals and amorphous dispersions using ^{14}N - ^1H HMQC solid-state NMR. *Mol. Pharm.* **10**, 999–1007 (2013).
17. Maruyoshi, K. *et al.* Identifying the intermolecular hydrogen-bonding supramolecular synthons in an indomethacin-nicotinamide cocrystal by solid-state NMR. *Chem. Commun.* **48**, 10844–10846 (2012).
18. Limbach, H. H. *et al.* Critical hydrogen bonds and protonation states of pyridoxal 5'-phosphate revealed by NMR. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 1426–1437 (2011).
19. Vogt, F. G. *et al.* Solid-State NMR Analysis of Organic Cocrystals and Complexes. *Cryst. Growth Des.* **9**, 921–937 (2009).
20. Chierotti, M. R. & Gobetto, R. Solid-state NMR studies of weak interactions in supramolecular systems. *Chem. Commun.* 1621–1634 (2008). doi:10.1039/b711551b
21. Guzmán-Afonso, C. *et al.* Understanding hydrogen-bonding structures of molecular crystals via electron and NMR nanocrystallography. *Nat. Commun.* **10**, 1–10 (2019).
22. Dudek, M. K. *et al.* Understanding the formation of apremilast cocrystals. *Acta*

- Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **75**, 803–814 (2019).
23. Siskos, M., Choudhary, M. & Gerothanassis, I. Hydrogen Atomic Positions of O–H···O Hydrogen Bonds in Solution and in the Solid State: The Synergy of Quantum Chemical Calculations with ¹H-NMR Chemical Shifts and X-ray Diffraction Methods. *Molecules* **22**, 415 (2017).
 24. Luedeker, D., Gossmann, R., Langer, K. & Brunklau, G. Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-crystals: ‘nMR Crystallography’ of Niclosamide Co-crystals. *Cryst. Growth Des.* **16**, 3087–3100 (2016).
 25. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry . III . The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648 (1993).
 26. Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785 (1988).
 27. Grimme, S. Semiempirical GGA-Type Density Functional Constructed with a Long-Range Dispersion Correction. *J. Comput. Chem.* **27**, 1787–1799 (2006).
 28. Aidas, K. *et al.* The Dalton quantum chemistry program system. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **4**, 269–284 (2014).
 29. Dunning, T. H. & Dunning, T. H. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations . I . The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* **90**, 1007–1023 (1989).
 30. McLean, A. D. & Chandler, G. S. Contracted Gaussian-basis sets for molecular calculations. 1. 2nd row atoms, Z=11-18. *J. Chem. Phys.* **72**, 5639–5648 (1980).
 31. Raghavachari, K., Binkley, J. S., Seeger, R. & Pople, J. A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 20. Basis set for correlated wave-functions. *J. Chem. Phys.* **72**, 650–654 (1980).
 32. Clark, T., Chandrasekhar, J., Spitznagel, G. W. & Schleyer, P. v. R. Efficient diffuse function-augmented basis-sets for anion calculations. 3. The 3-21+G basis set for 1st-row elements, Li-F. *J. Comp.Chem.* **4**, 294–301 (1983).
 33. Bruno, F. P., Caira, M. R., Martin, E. C., Monti, G. A. & Sperandio, N. R. Characterization and structural analysis of the potent antiparasitic and antiviral agent tizoxanide. *J. Mol. Struct.* **1036**, 318–325 (2013).
 34. Harris, R. K., Hodgkinson, P., Pickard, C. J., Yates, J. R. & Zorin, V. Chemical shift computations on a crystallographic basis: some reflections and comments. *Magn. Reson. Chem.* **45**, S174–S186 (2007).
 35. Harris, R. K., Ghi, P. Y., Hammond, R. B., Ma, C. & Roberts, K. J. Refinement of hydrogen atomic position in a hydrogen bond using a combination of solid-state NMR and computation. *Chem. Commun.* 2834–2835 (2003). doi:10.1039/b309302f
 36. Gregorovic, A., Apih, T. & Seliger, J. ¹⁴N NQR spectroscopy reveals the proton position in N–H...N bonds: a case study with proton sponges. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 306–313 (2019).
 37. Schutz, C. N. & Warshel, A. The Low Barrier Hydrogen Bond (LBHB) Proposal Revisited: The Case of the Asp ··· His Pair in Serine Proteases. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **55**, 711–723 (2004).
 38. Warshel, A. & Papazyan, A. Energy considerations show that low-barrier hydrogen bonds do not offer a catalytic advantage over ordinary hydrogen bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13665–13670 (1996).
 39. Warshel, A., Papazyan, A. & Kollman, P. A. On Low-Barrier Hydrogen Bonds and. *Science (80-.)*. **269**, 102–103 (1995).

CAPÍTULO 6

Caracterización de nuevas formas sólidas de Nevirapina y Tinidazol



Capítulo 6: Caracterización de nuevas formas sólidas de Nevirapina y Tinidazol

En el área farmacéutica, algunos medicamentos exhiben propiedades físico-químicas que afectan negativamente los procesos de formulación, la biodisponibilidad y la efectividad del medicamento. La Nevirapina (NVP), un medicamento antirretroviral, y el Tinidazol (TNZ), un agente antiprotozoario, presentan baja solubilidad acuosa, lo que impacta directamente en su biodisponibilidad. Entre las posibles modificaciones, los cristales sólidos multicomponentes como cocristales y compuestos eutécticos se utilizan con éxito para mejorar la solubilidad de los fármacos. En este capítulo, se estudia la formación de nuevos sistemas sólidos multicomponentes de NVP y TNZ con diferentes posibles coformadores. Cada nuevo sistema fue estudiado por Resonancia Magnética Nuclear en Estado Sólido (SSNMR) permitiendo identificar las nuevas formas sólidas de cada compuesto activo y las interacciones presentes en los nuevos cristales^{1,2}. Fue posible identificar tres formas sólidas diferentes: mezclas físicas, cocristales y mezclas eutécticas, las cuales presentan características propias observables por NMR. Las muestras de ambos IFA fueron también estudiadas por otras técnicas analíticas; los resultados de éstas se encuentran en el Apéndice de este trabajo de Tesis.

6.1 Metodología

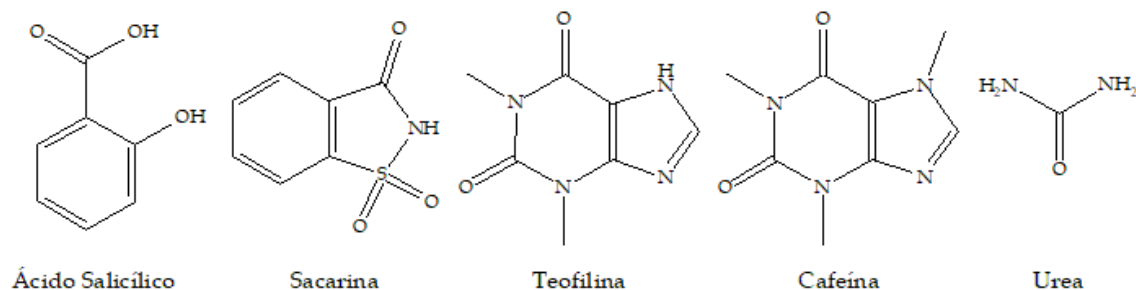
6.1.1 Elección de coformadores

Una cuidadosa búsqueda en literatura y en la Base de datos estructural de Cambridge (CSD)³ realizada por el Grupo de la Dra. Norma Sperandeo, mostró que no se habían reportado estructuras de cocristales de TNZ; aunque durante el desarrollo de su trabajo de Tesis Rogeria Nunes Costa, sí halló formas sólidas multicomponentes reportadas para NVP⁴. Por tal motivo, cada grupo de investigación escogió coformadores diferentes según las posibles interacciones IFA-coformador.

Para el caso de NVP, la selección de moléculas coformadoras fue parte del trabajo de Tesis de Rogeria Nunes Costa. Estas moléculas se seleccionaron en base a la presencia de grupos carboxilo y amida que podrían alterar el motivo del dímero amida-amida observado en la estructura pura de NVP. Además, se buscó que posean estructuras planas deslocalizadas que puedan apilarse con los fragmentos de piridina de la molécula de NVP. Los coformadores elegidos fueron: Ácido Salicílico (SA), Sacarina (SAC), Cafeína (CAF), Teofilina (TEO) y Urea (URE) (Figura 6.1).

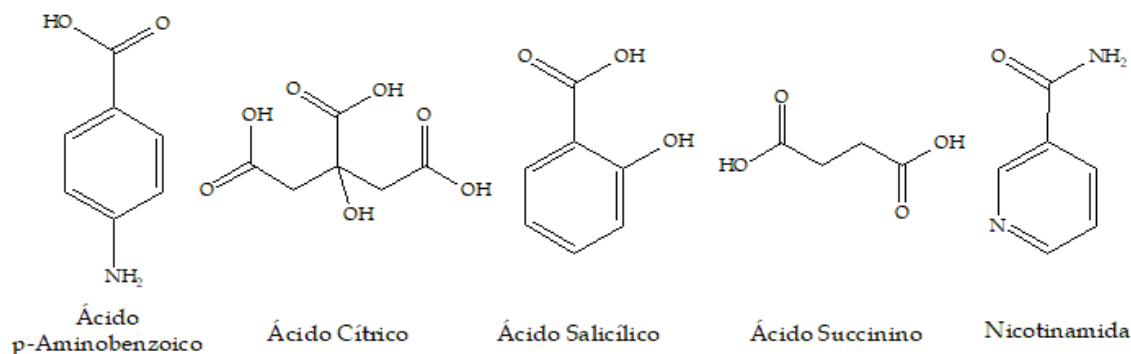
Para el caso de TNZ, las moléculas coformadores fueron seleccionadas por Octavio Fandiño como parte de su trabajo de Tesis; éstas se eligieron en base de la tasa de éxito estadístico de la formación de heterosintones supramolecular entre azoles y ácidos carboxílicos⁵. También se analizaron otros coformadores que no poseen grupo carboxílico. Los coformadores elegidos fueron: Ácido p-aminobenzoico (PABA), Ácido Salicílico (SA), Ácido Cítrico (CA), Ácido Succínico (SUC) y Nicotinamida (NA) (Figura 6.2)

Se prepararon muestras multicomponentes de ambos IFA con cada coformador. La metodología utilizada para la preparación de las muestras se explica en el Apéndice de esta tesis.



Fuente: Tesis Rogeria Nunes Costa

Figura 6.1 Representación bidimensional de los cinco coformadores utilizados para cocrystalizar NVP.



Fuente: Tesis Octavio Fandiño

Figura 6.2 Representación bidimensional de los cinco coformadores utilizados para cocrystalizar TNZ.

6.1.2 Caracterización por NMR en estado sólido

Todas las muestras obtenidas fueron caracterizadas mediante NMR en estado sólido. Se utilizaron diferentes secuencias de pulsos para obtener toda la información posible sobre cada sistema. En particular se tomaron espectros unidimensionales de ^{13}C con Polarización Cruzada y Rotación al Ángulo Mágico (CPMAS), espectros ^{13}C con Supresión de Carbonos Cuaternarios (NQS), espectros 2D de Correlación Heteronuclear (HETCOR) ^{13}C - ^1H y espectros unidimensionales de ^1H . Todas las secuencias mencionadas se describen en el Capítulo 3.

Para la asignación de señales, además de la edición espectral, se utilizaron resultados de cálculos computacionales por DFT de los parámetros de NMR para todos los compuestos puros. El detalle de dichos cálculos se explicó en el Capítulo 3.

6.2.2 NVP:SA

Los espectros ^{13}C CPMAS para NVP, SA, el compuesto NVP:SA y la mezcla física de NVP y SA, junto con los esquemas moleculares con la asignación de carbonos elegida, se muestran en la Figura 6.4.

El espectro de ^{13}C de SA no muestra multiplicidad en las líneas de resonancia, indicando así la presencia de una sola molécula por celda unidad asimétrica. En el espectro del compuesto NVP:SA pueden encontrarse cambios claros de los corrimientos químicos de las señales al compararlo con los precursores. Los valores de todos los corrimientos químicos se encuentran en la Tabla 6.1, junto con la diferencia entre los valores hallados para el compuesto NVP:SA, respecto de los precursores puros. En particular se observó un cambio notorio a ppm más altos de los corrimientos de los carbonos C2, C4, C11, C13, C20 y C21; como así también desplazamientos hacia ppm más bajos para los carbonos C5, C6, C7, C18, C19 y C23. Con cambio notorio se hace referencia a una diferencia mayor a 1 ppm respecto de la señal en el precursor. Por otro lado, el espectro de ^{13}C de la mezcla física de NVP y SA se corresponde con el espectro de la suma de los compuestos puros. Por lo tanto, es posible asegurar que existe una interacción entre las moléculas de NVP y SA tras el proceso de cocrystalización al que fueron sometidas, y que la mera mezcla de ambos no favorece a la formación del compuesto.

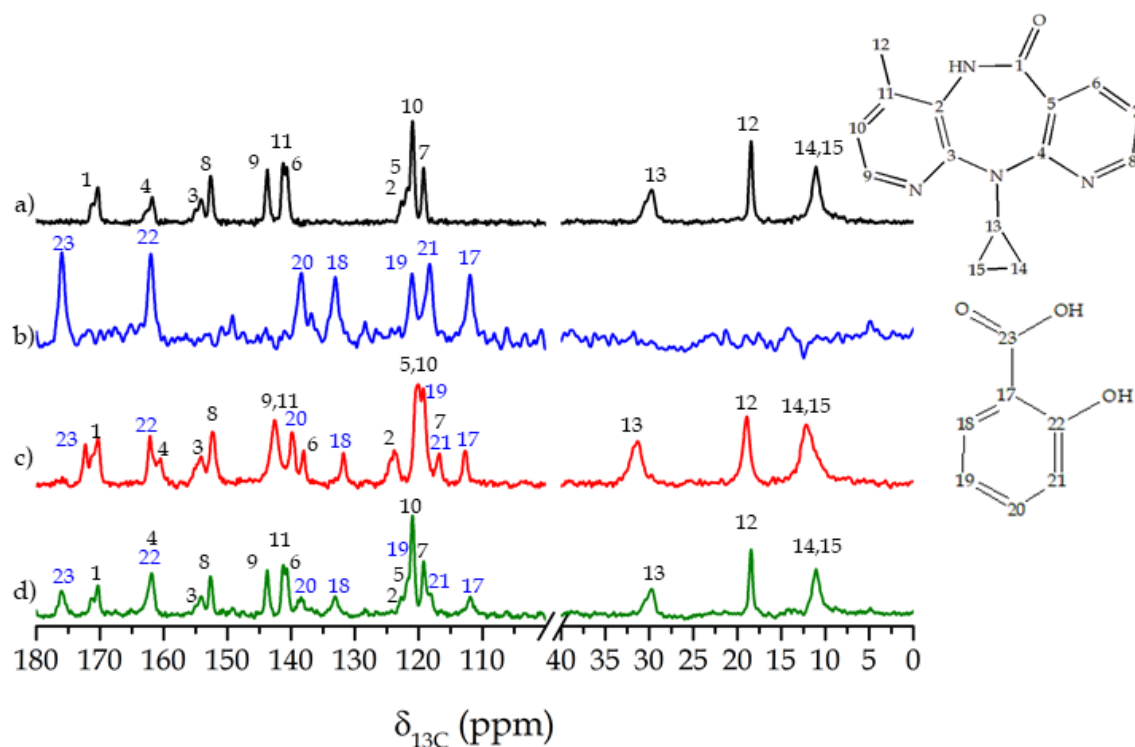


Figura 6.4 Espectros ^{13}C CPMAS de a) NVP, b) SA, c) Compuesto NVP:SA y d) Mezcla Física de NVP y SA. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

Tabla 6.1 Corrimientos químicos de ^{13}C y ^1H para NVP, SA y el compuesto NVP:SA. Diferencia entre los corrimientos químicos asociados al mismo átomo en el cocrystal y el compuesto puro. Las barras verdes y rojas representan si el cambio del corrimiento es hacia ppm más altos o más bajos respectivamente. Del mismo modo en verde o rojo se resalta la asignación de cada núcleo con el mismo criterio

$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)					$\delta^1\text{H}$ (ppm)				
	NVP	SA	NVP:SA	Δ		NVP	SA	NVP:SA	Δ
1	170,3	-	170,3	0,0	H6	7,9	-	7,2	-0,7
2	122,7	-	123,8	1,1	H7	7,0	-	7,2	0,2
3	154,2	-	154,1	-0,1	H8	8,5	-	7,2	-1,3
4	161,8	-	164,5	2,7	H9	7,0	-	6,3	-0,7
5	121,7	-	120,1	-1,6	N1	10,0	-	9,7	-0,3
6	140,6	-	138,1	-2,5	H10	3,6	-	3,4	-0,2
7	119,2	-	116,8	-2,4	H12	1,8	-	1,7	-0,1
8	152,6	-	152,4	-0,2	H13	1,8	-	3,4	1,6
9	143,7	-	142,6	-1,1	H14	0,7	-	0,4	-0,3
10	121,0	-	120,1	-0,9	H15	0,7	-	0,4	-0,3
11	141,3	-	142,6	1,3	COOH	-	12,6	14,0	1,4
12	18,4	-	18,9	0,5	OH	-	10,3	10,9	0,6
13	29,7	-	31,3	1,6	H18	-	8,3	7,2	-1,1
14	11,0	-	12,0	1,0	H19	-	8,3	6,3	-2,0
15	11,0	-	12,0	1,0	H20	-	8,3	7,2	-1,1
16	-	111,9	112,8	0,9	H21	-	7,1	6,3	-0,8
18	-	133,0	131,7	-1,3					
19	-	121,1	116,8	-4,3					
20	-	138,5	139,8	1,3					
21	-	118,2	119,3	1,1					
22	-	162,1	162,2	0,1					
23	-	176,1	172,3	-3,8					

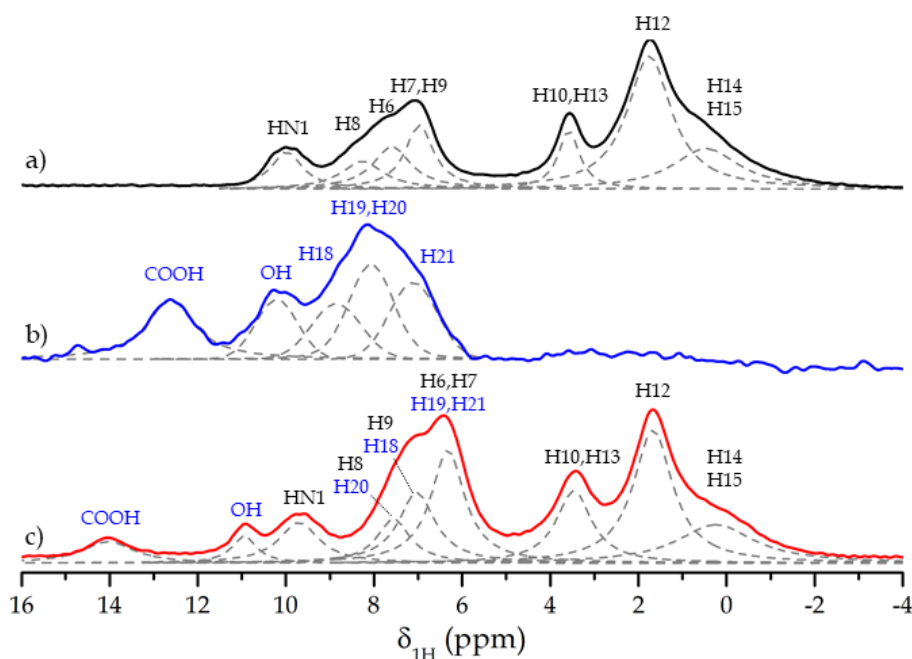


Figura 6.5 Espectros ^1H con MAS de a) NVP, b) SA y c) Compuesto NVP:SA. Las líneas punteadas corresponden a la deconvolución de las señales.

Los espectros de ^1H y la deconvolución de las señales para NVP, SA y el compuesto NVP:SA se muestran en la Figura 6.5. Al igual que para los espectros de ^{13}C , se observan cambios notorios de las señales del compuesto NVP:SA cuando se las compara con las señales de los precursores. En particular cambios mayores a 1 ppm se observan para H13 y COOH, hacia ppm más altos, y para H8, H18, H19 y H20 a ppm más bajos. Los valores de todos los corrimientos químicos se encuentran en la Tabla 6.1, junto con la diferencia entre los valores hallados para el compuesto NVP:SA, respecto de los precursores puros.

El hecho de que existan cambios en los corrimientos químicos asignados a los diferentes átomos, tanto para ^{13}C como para ^1H , aporta más información que el simple indicio de interacción entre las moléculas. Como los espectros de NMR en sólidos brindan información directa de la unidad asimétrica de los cristales estudiados, y los espectros del compuesto y los precursores son claramente diferentes, se puede asegurar que el nuevo compuesto NVP:SA posee una unidad asimétrica completamente nueva que contiene ambas moléculas. Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (USFDA) los cocrystalos son “sólidos cristalinos formados por dos o más moléculas en una misma red cristalina”, razón por la cual se puede asegurar el NVP:SA sintetizado es un cocrystal.

Para caracterizar el tipo de interacción entre las moléculas se realizó un experimento de correlación heteronuclear ^{13}C - ^1H HETCOR para el cocrystal NVP:SA, el mismo se muestra en la Figura 6.6. Este experimento no mostró correlaciones mediadas por protones entre carbonos de NVP y SA en el nuevo compuesto. Es decir, no hay carbonos de NVP interactuando con hidrógenos de SA y viceversa. Esto indica que la interacción entre NVP y SA ocurre entre alguno de los nitrógenos de NVP y protones de SA.

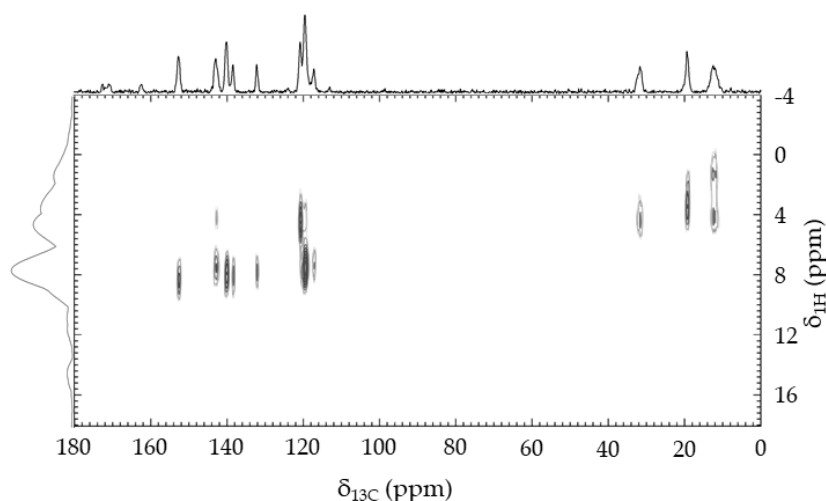


Figura 6.6 Espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C para el cocrystal NVP:SA

Un análisis detallado de la Tabla 6.1 de corrimientos químicos de ^1H y ^{13}C permite identificar que los átomos cuyo corrimiento químico se modifica en mayor medida al formarse el nuevo cocrystal, son los átomos más cercanos a los nitrógenos N3 y N4 de NVP. Este hecho permite proponer que la interacción entre NVP y SA, que

causa la formación del nuevo material, debe darse con uno de estos átomos de nitrógenos de NVP y protones de SA. Se realizaron entonces experimentos de CPMAS para ^{15}N , con el fin de corroborar esta hipótesis, los resultados se muestran en la Figura 6.7. Se observan cambios en los corrimientos químicos de las señales asignadas a los nitrógenos N3 y N4, y no así para los nitrógenos N1 y N2. Al cambiar las resonancias, es posible confirmar que los entornos, y por tanto las interacciones, de N3 y N4 se modificaron al formarse el cocrystal, confirmando la hipótesis.

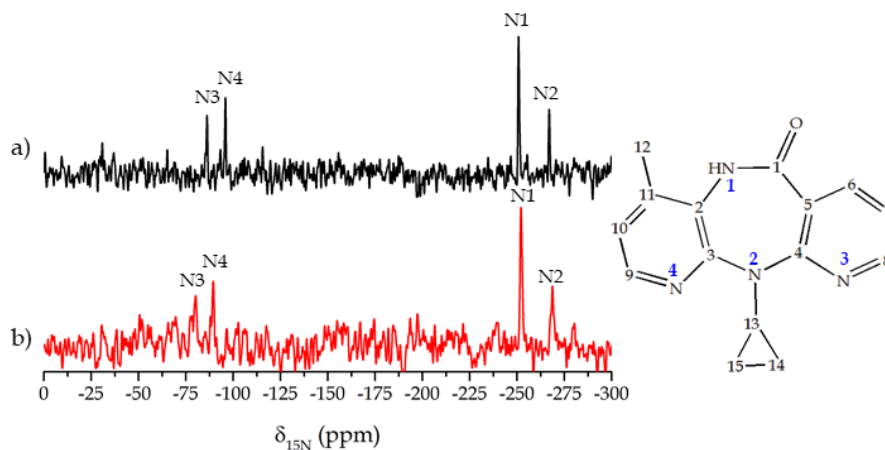


Figura 6.7 Espectros ^{15}N CPMAS de a) NVP y b) Compuesto NVP:SA. A la derecha el esquema molecular con la asignación de nitrógenos utilizada marcada en azul.

El primer reporte de un cocrystal de NVP:SA fue realizado en 2012 por Caira et al.⁴, pero empleando un método de síntesis diferente. Además, no se reportó previamente ningún estudio mediante NMR en estado sólido ni de DRX a temperatura ambiente. En el trabajo de Caira et al.⁴ se observó que las moléculas de SA se encuentran desordenadas dentro de la estructura cristalina de NVP:SA. En este trabajo de tesis un estudio detallado del cocrystal llevó a una interpretación distinta de este desorden. La presencia de dicho desorden molecular se estudiará en detalle en el Capítulo 7.

Se realizaron experimentos mediante otras técnicas analíticas¹ que se presentan en el Apéndice de esta tesis. Los mismos confirman las conclusiones obtenidas a partir del análisis de los espectros de NMR.

6.2.3 NVP:SAC

Los espectros ^{13}C CPMAS para NVP, SAC, NVP:SAC y la mezcla física de NVP y SAC se muestran en la Figura 6.8, mientras que en la Figura 6.9 se muestran los espectros de ^1H para NVP, SAC y NVP:SAC con su correspondiente deconvolución de señales.

El espectro ^{13}C CPMAS de SAC presenta cinco resonancias diferentes, para los siete átomos de carbono que componen la molécula. Los carbonos no cuaternarios C26, C29 y C27, C28 se encuentran superpuestos a 135,6 ppm y 122,1 ppm respectivamente. Los espectros ^{13}C y ^1H del compuesto NVP:SAC muestran cambios considerables en las

señales asignadas a cada átomo respecto de la misma señal en el precursor puro. Los carbonos C24, C26 y C29 se corren a ppm más bajos en el nuevo compuesto respecto a SAC puro, esto se asocia con la ruptura de los enlaces intermoleculares en el cristal de SA puro que involucran a los hidrógenos unidos a C26 y C29 o del dímero en el que participa el oxígeno ligado a C24. El mismo hecho puede confirmarse al observar el corrimiento del protón HN5 de SAC, que se corre a ppm más altos cuando se encuentra en NVP:SAC. A su vez, las señales de los carbonos C13, C14 y C15 se ensanchan y se corren, indicando cambios conformacionales en su entorno químico. Lo mismo sucede con sus protones asociados. Al igual que en el caso del compuesto NVP:SA estos espectros permiten asegurar la formación de un cocrystal¹.

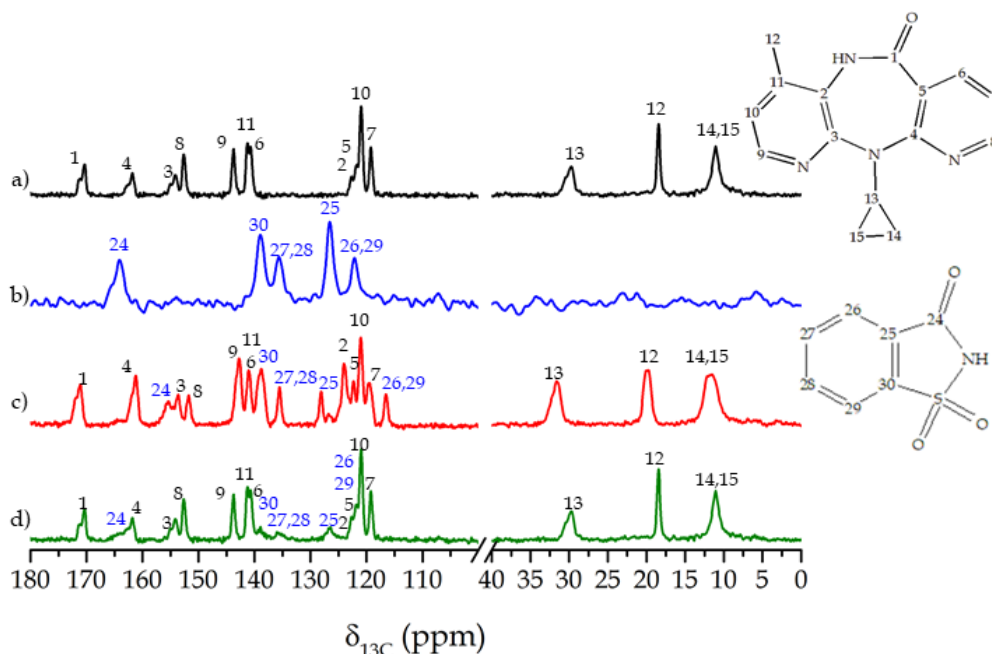


Figura 6.8 Espectros ^{13}C CPMAS de a) NVP, b) SAC, c) Compuesto NVP:SAC y d) Mezcla física de NVP y SAC. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

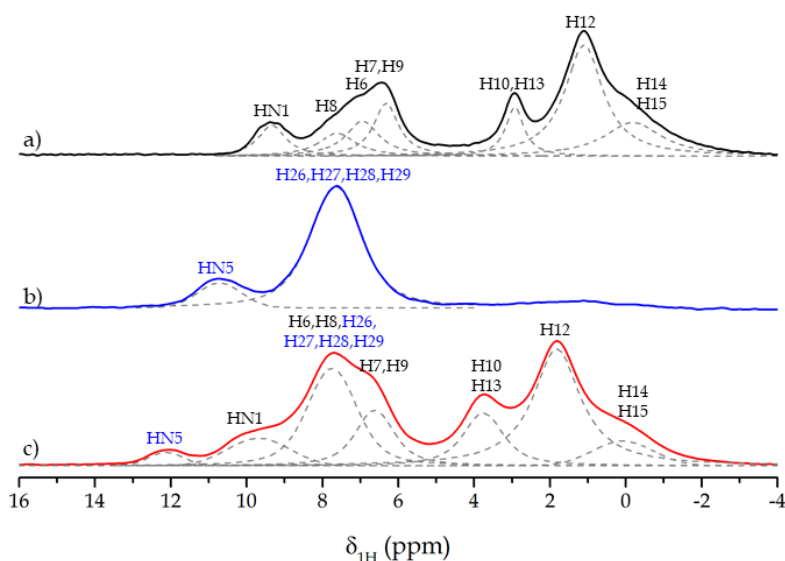


Figura 6.9 Espectros ^1H asignados de a) NVP, b) SAC y c) Compuesto NVP:SAC. La línea discontinua representa la deconvolución de las señales.

Se realizaron experimentos mediante otras técnicas analíticas¹ que se presentan en el Apéndice de esta tesis. Los mismos confirman las conclusiones sacadas a partir del análisis de los espectros de NMR. Este cocrystal fue reportado en 2012 por Caira et al.⁴ y aunque el método de síntesis difiere, la fase cristalina obtenida es la misma; sin embargo no se informaron previamente estudios mediante NMR de este compuesto.

6.2.4 NVP:THE y NVP:CAF

Los espectros ¹³C CPMAS para NVP, THE, el compuesto NVP:THE y su mezcla física y para NVP, CAF, el compuesto NVP:CAF y su mezcla física, junto con los esquemas moleculares con la asignación de carbonos elegida, se muestran en la Figura 6.10 y Figura 6.11, respectivamente.

El espectro de ¹³C de THE (Figura 6.10 b) presenta una señal por cada átomo de carbono, excepto para los carbonos C21 y C22 que poseen la misma frecuencia de resonancia a 30 ppm. Se observa que las posiciones de los picos del espectro de ¹³C obtenido para el compuesto NVP:THE (Figura 6.10 c) coinciden con las de los espectros de NVP y THE puros (Figura 6.10 a y b). Es decir, el espectro del compuesto se puede obtener mediante la suma de los espectros de NVP y THE puros. Esto indica que tras el proceso de cristalización al que se sometieron los precursores, no se produjeron cambios conformacionales en los cristales de NVP y THE. Sugiriendo que el proceso de molienda produjo una mezcla de los cristales precursores. Para corroborar este hecho se midió una mezcla física de NVP y THE en las mismas proporciones utilizadas para generar el compuesto, obteniéndose el mismo espectro de ¹³C que para el compuesto NVP:THE (Figura 6.10 d).

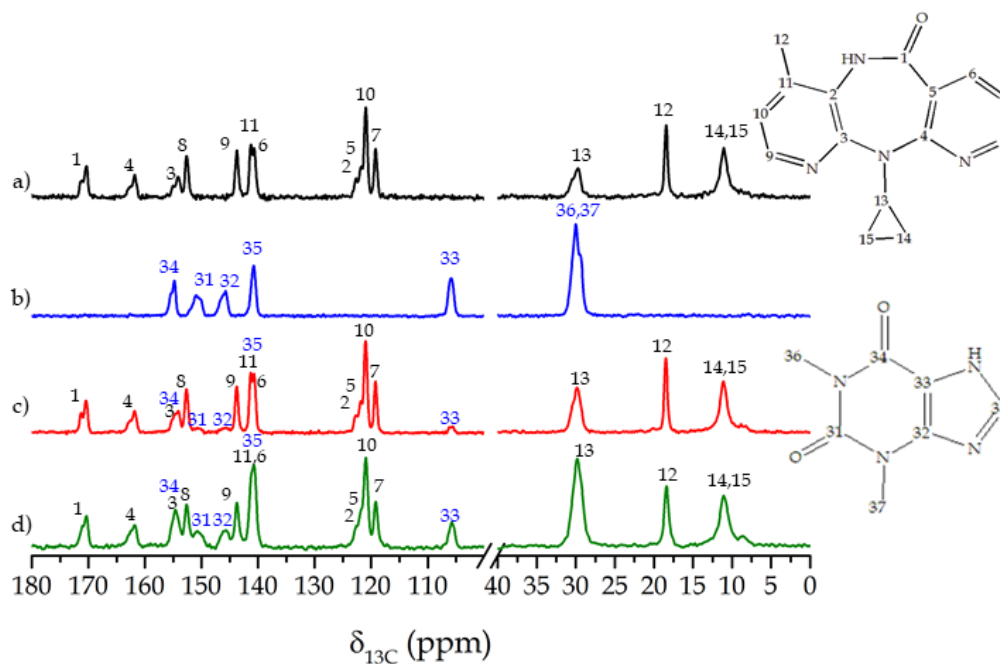


Figura 6.10 Espectros ¹³C CPMAS de a) NVP, b) THE, c) Compuesto NVP:THE y d) Mezcla física de NVP y THE. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

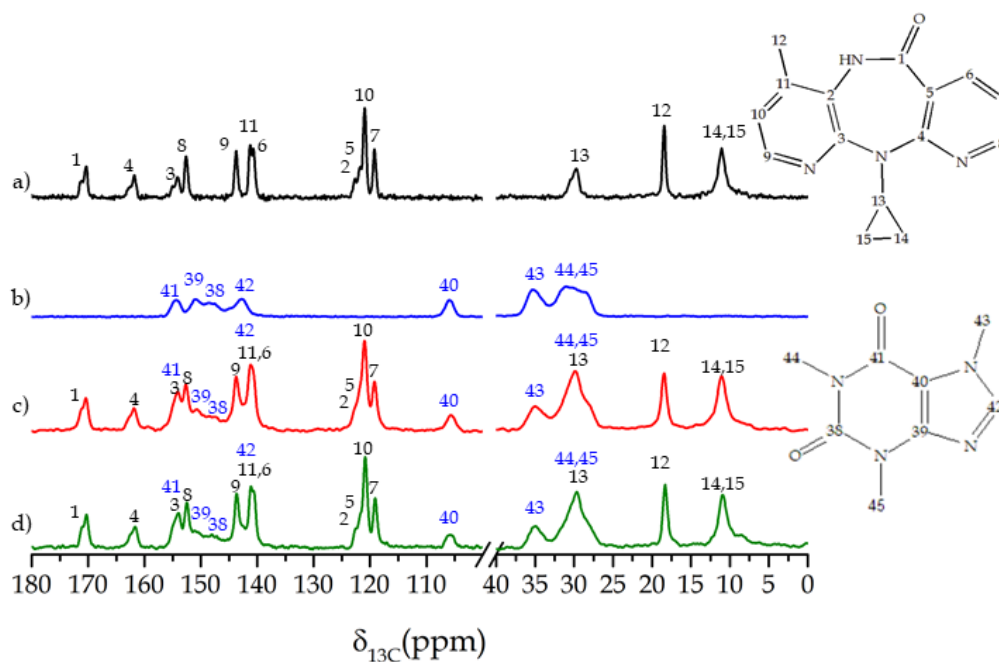


Figura 6.11 Espectros ^{13}C CPMAS de a) NVP, b) CAF, c) Compuesto NVP:CAF y d) Mezcla física de NVP y CAF. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

En el caso del espectro de ^{13}C de CAF (Figura 6.11 b) se presentan señales por cada átomo de carbono de la molécula, sin superposición entre ellas. En el espectro del compuesto NVP:CAF (Figura 6.11 c) no se observan cambios en las señales respecto de los espectros de ^{13}C de NVP y CAF puros (Figura 6.11 a y b). Indicando que, al igual que para el caso del THE, tras el proceso de LAG no se produjo ningún cambio conformacional en los cristales de NVP y CAF obteniendo una mezcla de los cristales precursores. Este hecho es confirmado al analizar que el espectro de la mezcla física (Figura 6.11 d) coincide con el del compuesto.

Los espectros ^1H y la deconvolución de las señales para los sistemas con THE y CAF se muestran en las Figura 6.12 y Figura 6.13, respectivamente. Al igual que lo observado en los espectros de ^{13}C , los espectros ^1H de NVP:THE y NVP:CAF son la superposición de los espectros de NVP y el coformador puros. La ausencia de modificación de las señales de protones es otra confirmación de que los compuestos obtenidos son mezclas de los cristales originales.

Se realizaron experimentos mediante otras técnicas analíticas¹ que se presentan en el Apéndice de esta tesis. El análisis de los patrones DRX es coincidente con el análisis de NMR, sin embargo las curvas térmicas DSC presentan un comportamiento diferente al esperado, las muestras binarias NVP:THE y NVP:CAF poseen un único punto de fusión menor a los de los correspondientes precursores. Este hecho conduce a que, aunque los análisis DRX y NMR no muestran interacción fuerte entre los precursores, existen interacciones más débiles que modifican las propiedades térmicas del compuesto. Por lo tanto, estas muestras tienen el comportamiento de una mezcla eutéctica, o simplemente eutéctica. En el Capítulo 8 se estudiarán estos compuestos desde el punto de vista de su comportamiento eutéctico.

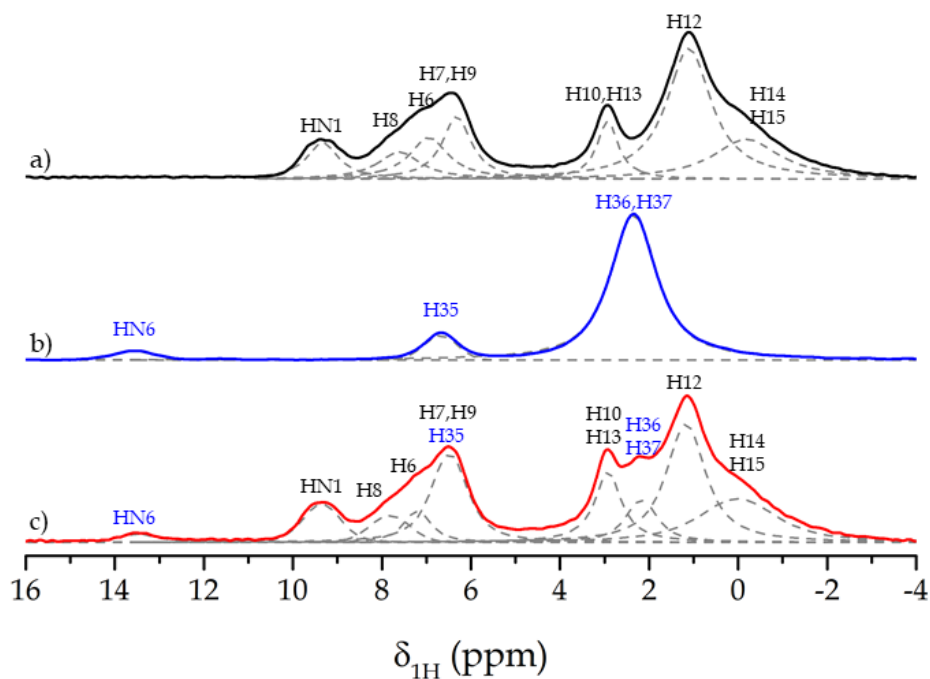


Figura 6.12 Espectros ^1H asignados de a) NVP, b) THE y c) Compuesto NVP:THE. Las líneas punteadas corresponden a la deconvolución de las señales.

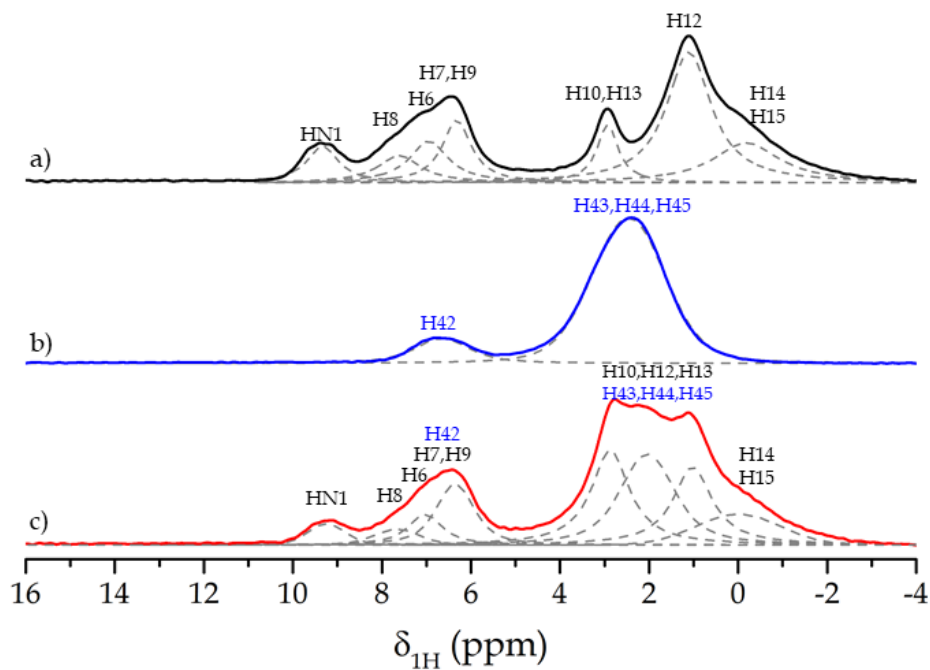


Figura 6.13 Espectros ^1H asignados de a) NVP, b) CAF y c) Compuesto NVP:CAF. Las líneas punteadas corresponden a la deconvolución de las señales.

6.2.5 Nuevas formas sólidas de NVP

El análisis de los espectros de ^{13}C y ^1H , junto con los resultados obtenidos mediante otras técnicas experimentales, permitieron identificar las nuevas formas sólidas tras realizar una molienda asistida por líquido de NVP con cinco coformadores diferentes. En la Tabla 6.3 se resumen las nuevas formas sólidas obtenidas.

Tabla 6.2 Nuevas formas sólidas de NVP

COMPUESTO	FORMA SÓLIDA
NVP:URE	Mezcla Física
NVP:SA	Cocrystal
NVP:SAC	Cocrystal
NVP:THE	Eutético
NVP:CAF	Eutético

6.3 Tinidazol (TNZ)

TNZ posee un potencial considerable para interacciones intermoleculares con moléculas cofomadoras a través de tres grupos funcionales (los grupos nitro y sulfona y el anillo de imidazol), que pueden dar lugar a enlaces hidrógeno. En el presente trabajo de tesis, se identificaron por RMN, cinco nuevas formas sólidas de TNZ con PABA, SA, CA, SUC y NA (Figura 6.2). A continuación, se muestran los resultados de espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear que permitieron identificar las diferentes formas sólidas de cada nuevo compuesto.

6.3.1 TNZ:PABA

Los espectros ^{13}C CPMAS de las muestras TNZ, PABA, TNZ:PABA_{LAG}, TNZ:PABA_{CRYST-ACE} y su mezcla física junto a las estructuras moleculares con las asignaciones de carbonos utilizadas, se representan en la Figura 6.14. Los subíndices LAG y CRYST-ACE hacen referencia a los dos métodos de preparación diferentes explicados en el apéndice.

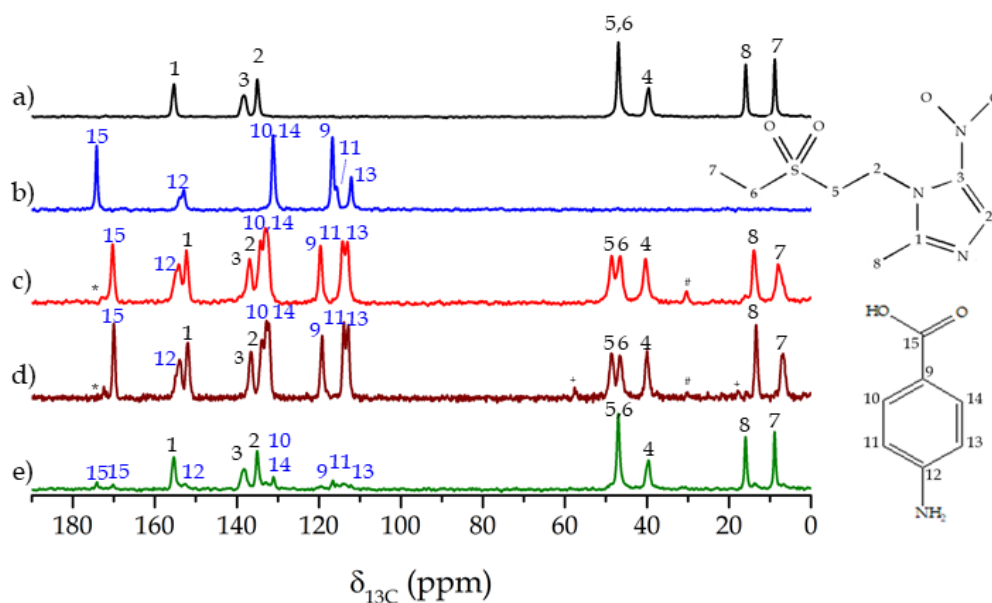


Figura 6.14 Espectros ^{13}C CPMAS de a) TNZ, b) PABA c) TNZ:PABA_{LAG}, d) TNZ:PABA_{CRYST-ACE} y e) Mezcla física de TNZ y PABA. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

El espectro de ^{13}C de TNZ (Figura 6.14 a) muestra una señal por cada carbono de la molécula, excepto para los carbonos C5 y C6 que comparten la misma resonancia. Del mismo modo, el espectro de PABA (Figura 6.14 b) muestra un único pico por cada carbono de la molécula excepto para los C10 y C14 que comparten la misma señal.

Los espectros de ^{13}C de TNZ-PABA_{LAG} (Figura 6.14 c) y TNZ-PABA_{CRYST-ACE} (Figura 6.14 d) coincidieron entre sí, lo que indica que, por ambos métodos, LAG y la cristalización, se obtuvo la misma fase cristalina. Se observan cambios notorios en las

frecuencias de resonancia de ^{13}C de TNZ:PABA respecto de los coformadores puros. De hecho, las resonancias de los átomos C1, C3 y C8 de TNZ y C11 y C15 de PABA se corren a ppm más bajos; mientras que las resonancias de C5 en TNZ y C9, C10, C12 y C14 de PABA lo hacen a ppm más altos. Estos cambios en los corrimientos químicos indican un cambio en el entorno químico de cada carbono al formarse el compuesto TNZ:PABA. Un aspecto a destacar, es que las señales de los átomos de C5 y C6 en TNZ:PABA aparecen separadas, mientras que en TNZ puro aparecen como una única resonancia, lo que indica que el entorno químico alrededor de estos carbonos es diferente en TNZ-PABA pero similar en TNZ cristalino. En particular, hay que resaltar que el C5 forma parte de las interacciones intermoleculares que permiten la estructura cristalina del TNZ puro. Por lo cual, al cambiar su corrimiento químico en 1,6 ppm (ver Tabla 6.3), se puede asegurar que dichos enlaces intermoleculares se rompen para permitir nuevos enlaces con PABA. Al igual que en el análisis hecho para los cocrystal de NVP, los cambios observados para TNZ:PABA son una evidencia clara de la formación de un cocrystal. A su vez no se observan desdoblamiento de señales en ninguno de los dos espectros (Figura 6.14 c y d), lo cual nos permite asegurar que la unidad asimétrica del nuevo cocrystal contiene una molécula de TNZ y una de PABA.

El espectro ^{13}C CPMAS de la mezcla física de TNZ y PABA se muestra en la Figura 6.14 e. No se observan cambios en las señales de TNZ, sin embargo, pueden verse señales de muy baja intensidad asociadas a PABA que presentan cambios respecto del compuesto puro. Este hecho indica que al armar la mezcla física se produce una reacción parcial entre las componentes sin llegar a formarse un sistema completamente nuevo.

Tabla 6.3 Corrimientos químicos de ^{13}C de TNZ, PABA, TNZ:PABA_{LAG}, TNZ:PABA_{CRYST-ACE} y la mezcla física de TNZ y PABA (MF). Diferencia entre el corrimiento químico entre la señal de cada carbono en el compuesto y el mismo carbono en el precursor. Las barras rojas y verdes representan corrimientos a ppm más bajo o más altos respectivamente.

Átomo de Carbono	TNZ	PABA	TNZ:PABA				
			MF	LAG	CRYST-ACE	ΔLAG	ΔCRYST
1	155,3	-	155,4	152,3	152,2	-3	-3,1
2	135	-	135,1	134,2	134,2	-0,8	-0,8
3	138,3	-	138,3	136,9	136,8	-1,4	-1,5
4	39,5	-	39,6	40,3	40,2	0,8	0,7
5	47	-	47	48,6	48,8	1,6	1,8
6	47	-	47	46,5	46,7	-0,5	-0,3
7	8,8	-	8,9	8	7	-0,8	-1,8
8	15,9	-	16	13,9	13,6	-2	-2,3
9	-	116,7	116,6	119,6	119,4	2,9	2,7
10	-	131,2	131,1	133	132,9	1,8	1,7
11	-	115,7	115,7	114,2	114	-1,5	-1,7
12	-	152,9	152,7	154,1	154,2	1,2	1,3
13	-	112,1	112,3	113,1	113,1	1	1
14	-	131,2	131,1	133	133	1,8	1,8
15	-	174,2	174,2	170,3	170,2	-3,9	-4
+	-	-	-	-	18	-	-
#	-	-	-	30,7	30,7	-	-
+	-	-	-	-	58	-	-

Otro aspecto a resaltar de los espectros de ^{13}C de $\text{TNZ:PABA}_{\text{LAG}}$ y $\text{TNZ:PABA}_{\text{CRYST-ACE}}$, es la presencia de tres nuevas señales de menor intensidad. Ambos presentan una señal a 30,7 ppm, y $\text{TNZ:PABA}_{\text{CRYST-ACE}}$ otras dos a 58 ppm y 18 ppm. La primer señal se corresponde con la frecuencia de resonancia típica de los carbonos del grupo metilo de acetona; mientras que las otras dos se asocian a los corrimientos químicos de los carbonos de etanol. La presencia de estas señales en ambos espectros, es una evidencia de que los solventes se incorporaron a la estructura del cocrystal.

Se realizaron además, mediciones de DRX y DSC² para estas muestras, que se presentan en el Apéndice de esta tesis. El análisis de los mismos es coincidente con las observaciones realizadas a partir de los espectros de NMR: TNZ:PABA es un nuevo cocrystal.

6.3.2 TNZ:SA

Los espectros ^{13}C CPMAS de las muestras TNZ , SA , $\text{TNZ:SA}_{\text{CRYST-ETH}}$, $\text{TNZ:SA}_{\text{LAG}}$ y su mezcla física junto a las estructuras moleculares con las asignaciones de carbonos utilizadas, se representan en la Figura 6.15. El espectro de SA (Figura 6.15 b) muestra una señal por cada carbono de la molécula.

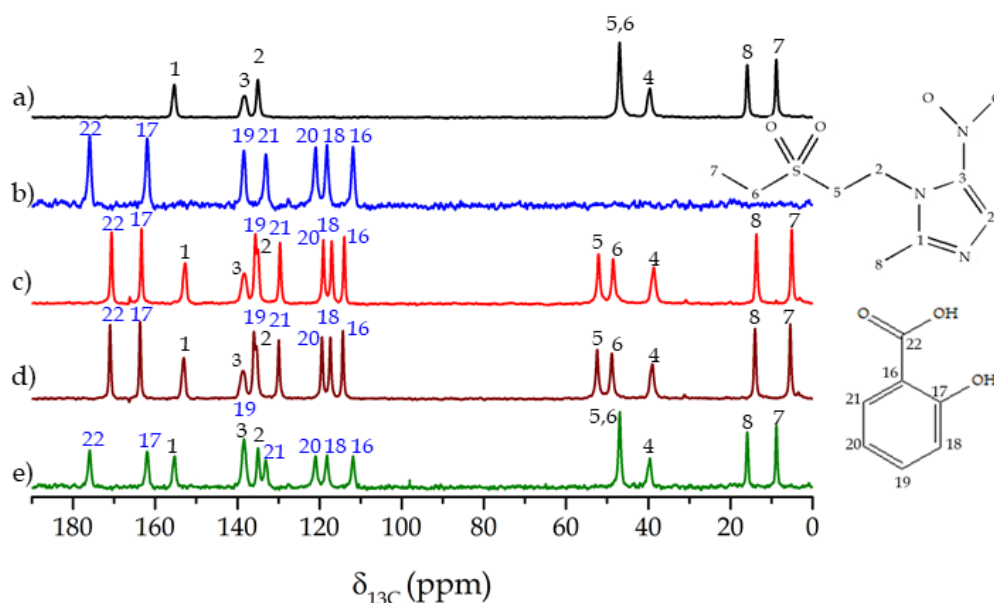


Figura 6.15 Espectros ^{13}C CPMAS de a) TNZ , b) SA c) $\text{TNZ:SA}_{\text{LAG}}$, d) $\text{TNZ:SA}_{\text{CRYST-ETH}}$ y e) Mezcla física de TNZ y SA . A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

Los espectros de ^{13}C de $\text{TNZ:SA}_{\text{LAG}}$ (Figura 6.15 c) y $\text{TNZ:SA}_{\text{CRYST-ETH}}$ (Figura 6.15 d) coincidieron entre sí indicando que, al igual que en TNZ:PABA , por ambos métodos se obtuvo la misma fase cristalina. Se observa que las señales asociadas a los átomos de C1 , C7 y C8 de TNZ y C18 , C19 , C20 , C21 y C22 de SA se desplazan a ppm

más bajos en el espectro del compuesto TNZ:SA respecto de los espectros de los precursores puros. Mientras que las señales de C5 y C6 en TNZ y C16 de SA lo hacen a ppm más altos. Del mismo modo que en TNZ:PABA, estos cambios en los corrimientos químicos indican la formación de un nuevo compuesto. Nuevamente las señales de los átomos de C5 y C6 aparecen separadas en el compuesto TNZ:SA lo cual, permite asegurar la ruptura de los enlaces intermoleculares de TNZ puro que dan lugar a nuevos enlaces con SA. Los grandes cambios en las señales de SA están directamente asociados a la ruptura de las interacciones intermoleculares entre moléculas de SA en el compuesto puro, dando lugar a interacciones con TNZ. En la estructura cristalina de SA puro, cada molécula forma un dímero mediante el grupo carboxilo con otra molécula. El corrimiento de la señal del C22 a 5,7 ppm más abajo respecto al cristal puro (ver Tabla 6.4) se asocia directamente con la ruptura de esa estructura dimerica entre moléculas de SA. Sin embargo, la señal del C17 no se modifica, lo cual permite asegurar que el enlace hidrógeno intramolecular se mantiene, por lo que la interacción con TNZ debe ocurrir con alguno de los hidrógenos del anillo o el hidrógeno del grupo carboxilo.

Tabla 6.4 Corrimientos químicos de ^{13}C de TNZ, SA, TNZ:SA_{LAG}, TNZ:SA_{CRYST-ETH} y la mezcla física de TNZ y SA (MF). Diferencia entre el corrimiento químico entre la señal de cada carbono en el compuesto y el mismo carbono en el precursor. Las barras rojas y verdes representan corrimientos a ppm más bajo o más altos respectivamente.

Átomo de Carbono	TNZ	SA	TNZ:SA			Δ_{LAG}	Δ_{CRYST}
			MF	LAG	CRYST-ETH		
1	155,3	-	155,3	152,7	152,7	-2,6	-2,6
2	135,0	-	135,0	135,0	135,0	0	0
3	138,3	-	138,3	138,3	138,3	0	0
4	39,5	-	39,5	38,6	38,6	-0,9	-0,9
5	47,0	-	47,0	52,0	52,1	5	5,1
6	47,0	-	47,0	48,5	48,5	1,5	1,5
7	8,8	-	8,8	5,0	5,0	-3,8	-3,8
8	15,9	-	15,9	13,6	13,6	-2,3	-2,3
16	-	112,2	112,2	113,9	114,0	1,7	1,8
17	-	162,3	162,3	163,3	163,3	1	1
18	-	118,5	118,5	117,0	117,0	-1,5	-1,5
19	-	138,7	138,7	135,6	135,6	-3,1	-3,1
20	-	121,3	121,3	119,0	119,0	-2,3	-2,3
21	-	133,4	133,4	129,5	129,6	-3,9	-3,8
22	-	176,3	176,3	170,6	170,6	-5,7	-5,7

Al igual que en los análisis anteriores, los cambios observados para el espectro de ^{13}C de TNZ:SA son una evidencia clara de la formación de un cocrystal, y al no observarse desdoblamientos de señales en ninguno de los dos espectros (Figura 6.15 c y d), la unidad asimétrica del nuevo cocrystal debe contener una molécula de TNZ y una de SA. El espectro de ^{13}C de la mezcla física de TNZ y SA (Figura 6.15 e) no mostró cambios en los corrimientos químicos de las señales respecto de los compuestos puros, por lo que en el proceso de mezcla no se producen interacciones entre los precursores.

Se realizaron además, mediciones mediante otras técnicas analíticas², que se presentan en el Apéndice de esta tesis. El análisis de los mismos es coincidente con las observaciones realizadas a partir de los espectros de NMR: TNZ:SA es un cocrystal.

6.3.3 TNZ:CA

Los espectros ^{13}C CPMAS de las muestras TNZ, CA, TNZ:CA_{LAG} y su mezcla física junto a las estructuras moleculares con las asignaciones de carbonos utilizadas, se representan en la Figura 6.16.

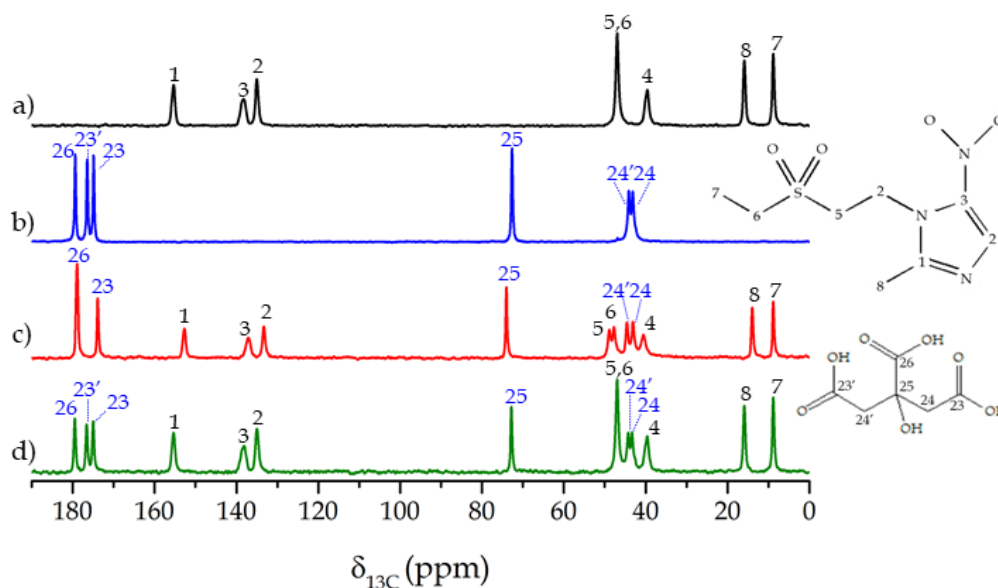


Figura 6.16 Espectros ^{13}C CPMAS de a) TNZ, b) CA c) TNZ:CA_{LAG} y d) Mezcla física de TNZ y CA. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

El espectro de ^{13}C de CA (Figura 6.16 b) muestra una señal por cada carbono de la molécula, se nombra con número primado a los carbonos equivalentes dentro de la molécula. Cabe destacar que el espectro de CA muestra señales separadas para C23 y C23', al igual que para C24 y C24'. Esto se debe a que ambos extremos de la molécula intervienen en uniones intermoleculares diferentes: el grupo carboxilo que contiene a C23 forma un dímero con otra molécula de CA mediante el mismo grupo, mientras que el grupo carboxilo que contiene a C23' forma enlaces hidrógeno con el grupo carboxilo que contiene al carbono C26 de dos moléculas de CA distintas.

El espectro de ^{13}C de TNZ-CA_{LAG} (Figura 6.16 c) muestra que las señales asociadas a los átomos de C1, C2, C3 y C8 de TNZ y C23' de CA se corren a ppm más bajos respecto de los espectros de los precursores puros. Mientras que las señales de C5 en TNZ y C25 de CA lo hacen a ppm más altos. Del mismo modo que en los compuestos ya analizados, estos cambios en los corrimientos químicos indican cambios en los entornos químicos de cada átomo, y por lo tanto la formación de un compuesto nuevo. Del mismo modo que en los dos cocrystal anteriores, las señales de los átomos

de C5 y C6 aparecen separadas en el compuesto TNZ:CA lo cual, permite asegurar la ruptura de los enlaces intermoleculares de TNZ puro. El hecho de que en el compuesto TNZ:CA la señales de C23 y C23' coincidan, da un indicio de que el entorno químico de ambos grupos terminales es ahora similar, a diferencia de lo que ocurría en CA puro. Todos estos resultados sugieren la ruptura de las estructuras cristalinas de los precursores puros y la formación de un nuevo compuesto.

Al igual que en los análisis anteriores, los cambios observados en el espectro de ^{13}C de TNZ:CA son una evidencia clara de la formación de un cocrystal, y al no observarse desdoblamiento de señales en el espectro de ^{13}C (Figura 6.16 c), la unidad asimétrica del nuevo cocrystal debe contener una molécula de TNZ y una de CA. El espectro de ^{13}C de la mezcla física de TNZ y CA (Figura 6.16 d) no mostró cambios en los corrimientos químicos de las señales respecto de los compuestos puros, denotando que el proceso de mezcla no produce interacciones entre los precursores a diferencia del caso TNZ-SA.

Son de particular interés las similitudes entre las señales de ^{13}C de TNZ:CA, asociadas los átomos de TNZ, con las de los cristales TNZ:PABA y TNZ:SA. Por ejemplo, el desplazamiento químico de la C1 de TNZ:CA es similar a la de los cocrystal TNZ:PABA y TNZ:SA (Tabla 6.5, Tabla 6.3 y Tabla 6.4), y las señales de los átomos de C5 y C6 también aparecen como dos señales separadas. Además, hay una estrecha similitud entre los corrimientos químicos de los átomos de C2, C3, C4, C5 y C6 en los cocrystal TNZ:CA y TNZ:PABA (Tabla 6.5 y Tabla 6.3), lo que sugiere que la estructura molecular y el patrón de enlaces hidrógeno del componente TNZ es muy similar en ambos productos.

Tabla 6.5 Corrimientos químicos de ^{13}C de TNZ, CA, TNZ:CA y la mezcla física de TNZ y CA (MF). Diferencia entre el corrimiento químico entre la señal de cada carbono en el compuesto y el mismo carbono en el precursor. Las barras rojas y verdes representan corrimientos a ppm más bajos o más altos respectivamente.

Átomo de Carbono	TNZ	CA	TNZ:CA		
			MF	LAG	ΔLAG
1	155,3	-	155,3	152,7	-2,6
2	135	-	135	133,3	-1,7
3	138,3	-	138,3	137,1	-1,2
4	39,5	-	39,5	40,5	1
5	47	-	47	48,9	1,9
6	47	-	47	47,7	0,7
7	8,8	-	8,8	8,8	0
8	15,9	-	15,9	14	-1,9
23	-	174,9	174,9	173,9	-1
23'	-	176,4	176,4	173,9	-2,5
24	-	43,1	43,1	43,1	0
24'	-	44,1	44,1	44,6	0,5
25	-	72,1	72,1	74	1,9
26	-	179,4	179,4	178,9	-0,5

El análisis de realizado mediante otras técnicas analíticas (descritas en el Apéndice) coincide con la conclusión de NMR: TNZ:CA es un nuevo cocrystal.

6.3.4 TNZ:SUCC y TNZ:NA

Los espectros ^{13}C CPMAS para TNZ, SUCC, NA, los compuestos TNZ:SUCC y TNZ:NA, y las mezcla física de TNZ y SUC o NA, junto con los esquemas moleculares con la asignación de carbonos elegida, se muestran en la Figura 6.17 y Figura 6.18 respectivamente.

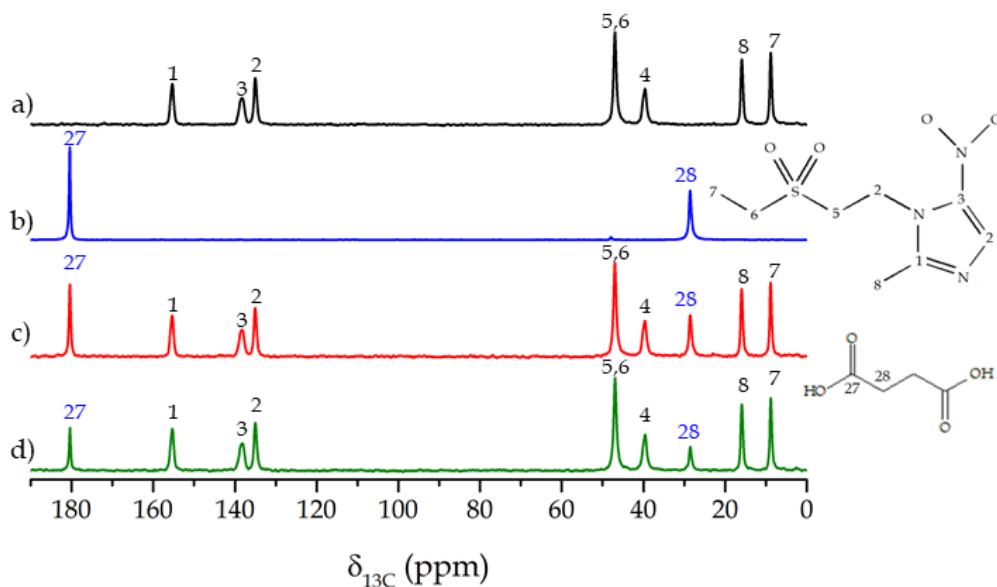


Figura 6.17 Espectros ^{13}C CPMAS de a) TNZ, b) SUCC c) TNZ:SUCC y d) Mezcla física de TNZ y SUCC. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

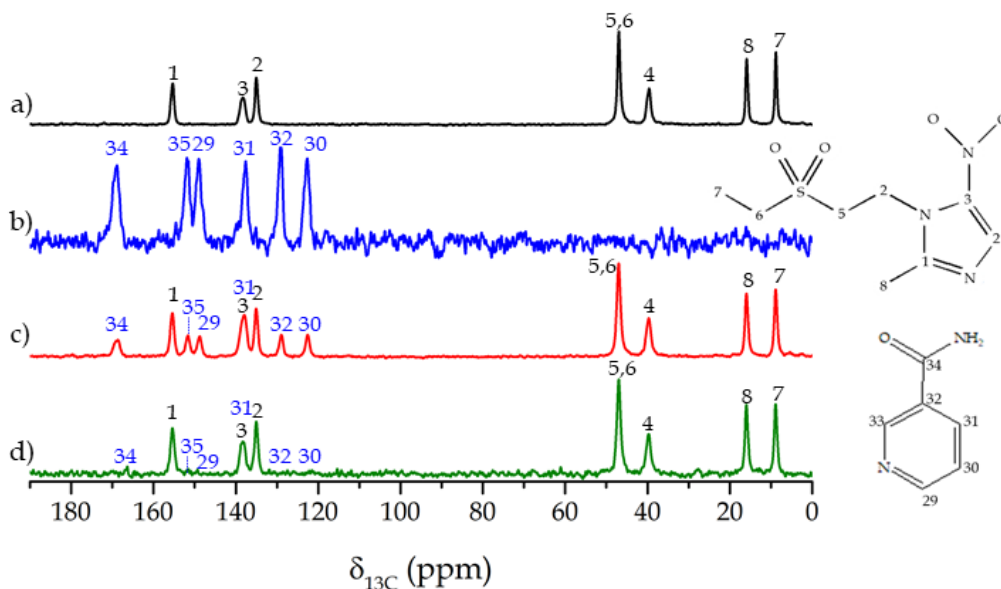


Figura 6.18 Espectros ^{13}C CPMAS de a) TNZ, b) NA c) TNZ:NA_{LAG} y d) Mezcla física de TNZ y NA. A la derecha los esquemas moleculares con la asignación de carbonos utilizada.

La molécula de SUCC posee cuatro carbonos, con dos sitios diferentes, por lo que su espectro de ^{13}C presenta dos señales, una correspondiente a cada sitio. No se observan cambios en las señales del espectro del compuesto TNZ:SUCC (Figura 6.17 c) respecto de las señales de los espectros de TNZ y SUCC puros (Figura 6.17 a y b). Esto

indica que tras el proceso de cristalización al que se sometieron los precursores, no se produjeron cambios conformacionales en los cristales de TNZ y SUCC, obteniéndose una mezcla física de los precursores. Para corroborar este hecho se midió una mezcla física de TNZ y SUCC en las mismas proporciones utilizadas para generar el compuesto (Figura 6.17 d), obteniéndose el mismo espectro de ^{13}C que para el compuesto TNZ:SUCC.

El espectro de ^{13}C de NA presenta una señal por cada carbono de la molécula. Al igual que en el caso de TNZ:SUCC, no se observan cambios en las señales del espectro del compuesto TNZ:NA (Figura 6.18 c) respecto de las señales de los espectros de TNZ y NA puros (Figura 6.18 a y b). Por lo que se puede asegurar que, tras el proceso de cristalización utilizado, se obtuvo una mezcla física de los precursores. El espectro de la mezcla física de los precursores (Figura 6.18 d) es idéntico al espectro del compuesto TNZ:NA, lo cual nos indica que no hay cambios conformacionales de los cristales de TNZ y NA.

Se realizaron además, mediciones de DRX y DSC², que se presentan en el Apéndice de esta tesis. El análisis DRX es coincidente con el análisis de NMR, sin embargo el análisis término muestra un comportamiento eutéctico para TNZ:SUCC y TNZ:NA.

6.3.5 Nuevas formas sólidas de TNZ

El análisis de los espectros de ^{13}C , junto con los resultados obtenidos mediante otras técnicas experimentales, permitieron identificar las nuevas formas sólidas de cocrystalizar TNZ con cinco coformadores diferentes. En la Tabla 6.3 se resumen las nuevas formas sólidas obtenidas.

Tabla 6.6 Nuevas formas sólidas de TNZ

COMPUESTO	FORMA SÓLIDA
TNZ:PABA	Cocrystal
TNZ:SA	Cocrystal
TNZ:CA	Cocrystal
TNZ:SUCC	Eutéctico
TNZ:NA	Eutéctico

6.4 Conclusiones del capítulo

Se investigó el comportamiento de cocrystalización de Nevirapina (NVP) y Tinidazol (TNZ) con el propósito de identificar nuevas formas sólidas de ambos ingredientes farmacéuticos activos (IFA) que podrían usarse para mejorar sus propiedades físico-químicas. Cada IFA fue cristalizado con diferentes coformadores, y cada compuesto obtenido fue caracterizado mediante Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido, para identificar a qué nueva forma sólida correspondía cada nuevo compuesto. Fue posible identificar, mediante espectroscopía de NMR en estado sólido, dos formas sólidas diferentes: mezclas físicas y cocrystalales. Aunque al incluir análisis térmico también se identificaron mezclas eutécticas.

En particular se encontró que NVP forma cocrystalales con SA y SAC. Además se identificaron las regiones moleculares donde ocurren las interacciones que permiten la formación de estos nuevos sistemas cristalinos. Si bien ambos cocrystalales hallados ya habían sido reportados, no existían precedentes de estudios mediante espectroscopía de NMR. Por otro lado se encontró que NVP:URE es una mezcla física de los compuestos puros.

En cuanto NVP:THE y NVP:CAF, el análisis de NMR no mostró interacciones que modifiquen el comportamiento cristalino individual, sin embargo los análisis térmicos mostraron un único punto de fusión menor al punto de fusión de los precursores indicando la formación de un sistema eutéctico. Por esta razón, se realizaron análisis complementarios, que se muestran en el Apéndice. En el Capítulo 8 se estudiará una metodología que utiliza NMR para intentar identificar estos compuestos.

En el caso de los compuestos de TNZ, la espectroscopía de NMR permitió identificar tres cocrystalales, con PABA, SA y CA. Además, se identificaron las regiones en que ocurren las interacciones entre TNZ y PABA y TNZ y SA, que fueron confirmadas por difracción de rayos X de cristal único (Apéndice). Por lo que es posible describir cómo es el cristal de TNZ:CA, o al menos las regiones moleculares donde ocurren las interacciones que forman la nueva estructura cristalina.

En cuanto TNZ:SUCC y TNZ:NA, el análisis de NMR no mostró interacciones que modifiquen el comportamiento cristalino individual, sin embargo los análisis térmicos mostraron un único punto de fusión menor al punto de fusión de los precursores, razón por la cual se identificó estas dos muestras como mezclas eutécticas.

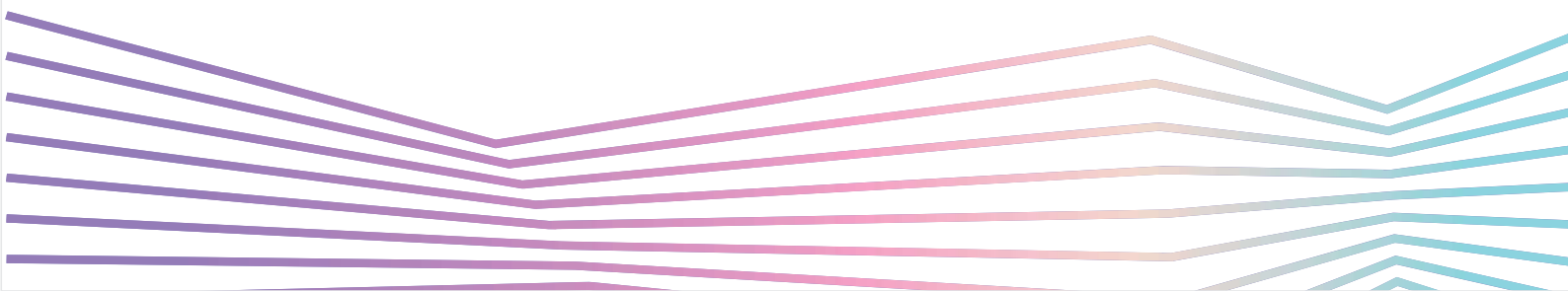
Finalmente, la espectroscopía de NMR se presenta como una potente herramienta para la caracterización e identificación de nuevas formas sólidas.

6.5 Referencias

1. Costa RN, Reviglio AL, Siedler S, et al. New Multicomponent Forms of the Antiretroviral Nevirapine with Improved Dissolution Performance. *Cryst Growth Des.* 2020;20(2):688-698. doi:10.1021/acs.cgd.9b01129
2. Fandiño OE, Reviglio L, Linck YG, et al. Novel Cocrystals and Eutectics of the Antiprotozoal Tinidazole: Mechanochemical Synthesis, Cocrystallization, and Characterization. *Cryst Growth Des.* 2020;20(5):2930-2942. doi:10.1021/acs.cgd.9b01435
3. Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC. feature articles The Cambridge Structural Database. 2016:171-179. doi:10.1107/S2052520616003954
4. Caira M, Bourne SA, Samsodien H, et al. Co-crystals of the antiretroviral nevirapine: crystal structures, thermal analysis and dissolution behaviour. *CrystEngComm.* 2012;14:2541-2551. doi:10.1039/c2ce06507j
5. Cheney ML, Weyna DR, Shan N, Hanna M, Wojtas L, Zaworotko MJ. Supramolecular Architectures of Meloxicam Carboxylic Acid Cocrystals , a Crystal Engineering Case Study. 2010;2. doi:10.1021/cg100514g

CAPÍTULO 7

Estudio mediante NMR y DFT
del desorden molecular
del cocrystal NVP:SA



Capítulo 7: Estudio mediante NMR y DFT del desorden molecular del cocrystal NVP:SA.

La suposición de una periodicidad perfecta en la red cristalina es el principio más básico de la cristalografía. Sin embargo, muchos materiales no son cristalinos, e incluso cuando lo son, la estructura atómica de los materiales reales suele no ser perfectamente periódica. Por lo general, las desviaciones de la periodicidad perfecta tienen efectos significativos en las propiedades de los materiales, por lo que, los enfoques cristalográficos deben complementarse con otros métodos que se centren en la presencia de desorden. En este capítulo, se utiliza Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) de estado sólido combinada con cálculos computacionales basados en la Teoría del Funcional de la Densidad electrónica (DFT) para lograr una comprensión detallada de la estructura de un sistema orgánico sólido que contiene desorden. El sistema estudiado es el cocrystal de Nevirapina y Ácido Salicílico presentado en el Capítulo 6.

7.1 Desorden en cocristales

Los cocristales se han presentado como una de las alternativas más elegidas en la búsqueda de nuevas formas sólidas que mejoren las propiedades físico-químicas de un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA). Esto se debe a que los cocristales han presentado mejoras sustanciales en la solubilidad de los IFA y además, en general, son más estables en el tiempo que otras conformaciones. Sin embargo estos sistemas cristalinos también pueden formar polimorfos o poseer en su estructura componentes desordenados, lo cual afecta directamente a las propiedades del sistema.

En el contexto de esta tesis, el término "desorden" no implica una falta total de orden, como se observa en los sistemas amorfos, sino una alteración del orden local relacionado con desplazamientos atómicos del orden de algunos angstroms. Este tipo de desorden no se considera necesariamente un problema en el desarrollo de cocristales de un IFA. Por el contrario, se ha encontrado que algunos fármacos que contienen desorden en su estructura cristalina ofrecen mejoras significativas a la solubilidad y biodisponibilidad del IFA(1).

El desorden local es consecuencia de una pérdida de orden posicional, orden de orientación u orden conformacional. Resulta del hecho de que las regiones moleculares flexibles poseen muchos grados de libertad, por lo que se puede lograr un empaquetamiento tridimensional estable a través de varias conformaciones diferentes; o también puede ocurrir que una molécula no posea una orientación termodinámicamente preferencial sobre otra(2). El desorden puede ser estático, donde los fragmentos desordenados permanecen en orientaciones distintas en diferentes

partes del cristal; o dinámicos, donde el componente desordenado cambia entre posiciones discretas o sufre un movimiento continuo dentro del cristal.

Los estudios de cristalografía de NMR son particularmente adecuados para los cocrystal que contienen componentes desordenados, ya que los detalles de la estructura deben investigarse a nivel local. Inicialmente, la formación del cocrystal se puede probar mediante el análisis del cambio en los corrimientos químicos del producto en comparación con los componentes puros y las proximidades nucleares pueden ser exploradas por experimentos de NMR en 2D(3). Posteriormente, se puede determinar la naturaleza del desorden: los desórdenes estáticos y dinámicos son distinguibles ya que afectan los espectros de NMR en estado sólido de diferentes maneras. El desorden estático causa ensanchamiento de líneas no homogéneo o la aparición de múltiples resonancias para un sitio particular ya que los diferentes entornos químicos de fragmentos desordenados dan como resultado una pequeña distribución de corrimiento químico(4). En contraste, la dinámica rápida, que es más rápida que la escala de tiempo del experimento NMR, da como resultado un espectro promediado en el tiempo que se observa a menudo con líneas definidas(5). Las dinámicas más lentas darán como resultado un promedio incompleto del espectro, causando el ensanchamiento de las líneas.

7.1.1 Modelado del desorden

En general, para las estructuras cristalinas que presentan algún tipo de desorden, los estudios de difracción de rayos X (XRD) tienden a proponer una estructura promedio, ya que sondan la densidad electrónica periódica de largo alcance del material y no puede distinguir entre un desorden estático y uno dinámico. En cambio, la NMR de estado sólido sondea las estructuras desordenadas de una manera diferente ya que da una suma de todos los entornos locales y es sensible a diferentes escalas de tiempo. En consecuencia, la NMR a menudo puede revelar algunos detalles importantes de las estructuras desordenadas que la XRD tiende a omitir. Cabe resaltar que la interpretación de los espectros de NMR de materiales desordenados puede ser compleja, debido a la presencia de líneas espectrales muy anchas.

El modelado computacional cierra la brecha entre la estructura promedio de un sólido desordenado obtenida a partir de los datos de XRD y las variaciones espectrales observadas en espectroscopía de NMR en estado sólido(5). Los sistemas desordenados son un reto para modelar computacionalmente, ya que la estructura exacta está incompleta sin alguna descripción de la naturaleza del desorden. Además, los métodos DFT no tienen en cuenta los efectos térmicos, por lo que el desorden dinámico no se puede modelar explícitamente; y para considerar un desorden estático verdaderamente aleatorio debería modelarse una supercelda de tal dimensión que llevaría a un requerimiento de poder de cómputo impracticable. El método más simple para

modelar el desorden computacional es dividir la estructura desordenada en sus partes de componentes ordenadas. Las propiedades físicas se pueden calcular para cada uno de los componentes y luego los resultados se pueden comparar con los datos experimentales. Varias investigaciones exitosas se han llevado a cabo utilizando este enfoque(6-9).

7.2 Metodología

7.2.1 Experimentos de NMR en estado sólido

Las muestras de Nevirapina (NVP), Ácido Salicílico (SA) y el cocrystal NVP:SA fueron sometidas a una serie de experimentos de NMR en estado sólido. En particular se adquirieron espectros CPMAS de ^{13}C a temperatura ambiente (RT presentadas en el Capítulo 6) y a 100 K (LT). Los detalles de las secuencias utilizadas se encuentran en el Capítulo 3.

7.2.2 Cálculos Computacionales

Partiendo de las estructuras cristalinas reportadas de NVP(10), SA(11) y NVP:SA(12,13) se realizaron simulaciones computacionales basadas en DFT. Las propiedades de NMR se calcularon después de llevar a cabo la optimización geométrica de las posiciones de los átomos hidrógeno presentes en cada estructura cristalina. El detalle de los cálculos se describe en el Capítulo 3.

7.3 Resultados y discusión

En el Capítulo 6 se presentó un estudio sobre la formación de nuevas formas sólidas de Nevirapina (NVP) con diferentes coformadores. En particular la combinación de NMR en estado sólido y otras técnicas analíticas permitieron asegurar que NVP forma un cocrystal con Ácido Salicílico (SA). En la Figura 7.1 se muestran los esquemas de la estructura molecular de NVP y SA, y la numeración utilizada en el análisis de NMR. Los carbonos pertenecientes a NVP se numeraron del 1 al 15, mientras que los de SA del 16 al 22; también se encuentran numerados los nitrógenos y oxígenos.

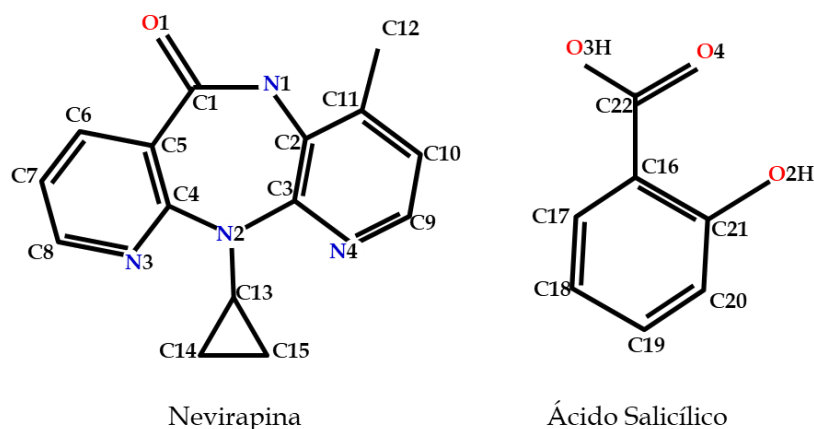
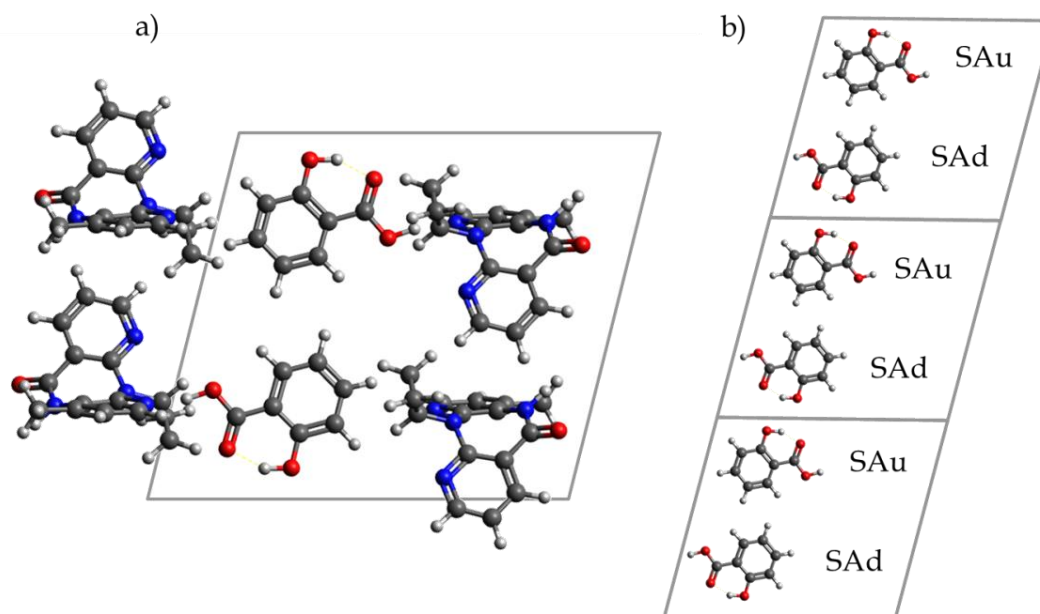


Figura 7.1 Esquema de la estructura molecular y numeración utilizada para Nevirapina (NVP) y Ácido Salicílico (SA).

Los estudios de difracción de rayos X de cristal único (SCXRD) realizados por Costa et al.(12) confirmaron que la NVP forma un cocrystal con SA en una estequiometría NVP:SA de 2:1. Dentro de este cocrystal, las moléculas de NVP se acomodan formando canales a lo largo de los cuales se alojan las moléculas de SA. Además, se observó que NVP:SA presenta dos estructuras cristalinas ligeramente diferentes a temperatura ambiente (RT) y a 100 K (LT).

Para el caso de la muestra medida a 100 K (LT) el refinamiento estructural de los datos de SCXRD da como resultado una celda unidad, que se repite a lo largo de todo el cristal, que está formada por cuatro moléculas de NVP y dos moléculas de SA. En la Figura 7.2 a se presentan las posiciones atómicas encontradas y un esquema de la celda unidad definida por SCXRD.



La estructura cristalina fue obtenida por Rogeria Nunes Costa. Fuente: Tesis Rogeria Nunes Costa

Figura 7.2 a) Esquema de la disposición de las moléculas en la celda unidad de la estructura cristalina de NVP:SA a 100K. b) Repetición periódica de las celda donde sólo se representan las moléculas de SA, se observa la disposición alternada entre una orientación con el grupo carboxilo hacia arriba (SAu) y con el grupo carboxilo hacia abajo (SAd).

Como puede verse en la Figura 7.2 a, cada molécula de SA (centrales) interactúa con dos moléculas de NVP (laterales). Las unidades moleculares NVP-SA-NVP superior e inferior poseen una interacción y estructura interna completamente equivalentes. Puede notarse que cada unidad molecular NVP-SA-NVP es equivalente a la otra salvo por una rotación de 180° a lo largo de un eje que sale de la hoja. Por lo tanto, el hecho de encontrar una celda unidad que contenga dos unidades moleculares no está asociado a diferencias estructurales dentro de dichas unidades, sino por la relación que existe entre ellas. Cabe destacar, además, que la interacción entre dos moléculas de NVP (superiores con inferiores) es equivalente de ambos lados; y si sólo se consideran las moléculas de NVP la celda unidad para el cristal completo se definiría como la mitad (superior o inferior) de la presentada en la Figura 7.2 a. Sin embargo, la presencia y disposición de las moléculas de SA rompe con esta simetría, llevando a que la celda mínima que reproduce todo el cristal de NVP:SA sea la presentada en la Figura 7.2 a. Esto se debe a que el ordenamiento de una molécula de SA respecto de sus vecinos SA se repite de a pares de moléculas de SA. Etiquetando como SAu a la molécula SA superior (en la cual el grupo carboxilo esta hacia arriba) de la Figura 7.2 a y como SAd a la molécula SA inferior (con el grupo carboxilo hacia abajo), puede notarse que al repetir la celda unidad para formar el cristal cada SAu tendrá como vecina una SAd y viceversa. La repetición de la celda se esquematiza en la Figura 7 b donde, para mayor claridad, sólo se representan las moléculas de SA. Esta periodicidad en el ordenamiento intramolecular de las SA lleva a que la celda unidad mínima que define todo el cristal contenga una unidad molecular NVP-SAu-NVP y una NVP-SAd-NVP alternadas.

Cabe aclarar que para facilitar la visualización y discusión de la Figura 7.2 a, se definieron átomos pertenecientes a la base de la celda unidad por fuera de los límites de la misma, en particular las moléculas de NVP a la izquierda de SA. En la Figura 7.3 se representa la celda de la Figura 7.2 a con sus respectivas repeticiones. Puede observarse que al repetir la celda, dentro de cada caja marcada con contorno gris hay cuatro moléculas de NVP y dos de SA, tal como lo indicaba la estequiometría. Las dos moléculas de NVP se encuentran enfrentadas y se observan como si estuvieran superpuestas, aunque los átomos no se tocan en ningún caso. Se eligió graficar un par de moléculas NVP por fuera de los límites de la celda de modo que la aparente superposición de dichas moléculas no interfiera con la comprensión del ordenamiento molecular. Realizar este procedimiento es válido, ya que aunque la base se definió de manera diferente, la distribución tridimensional periódica se mantiene, es decir el cristal que se crea de repetir ambas bases es el mismo.

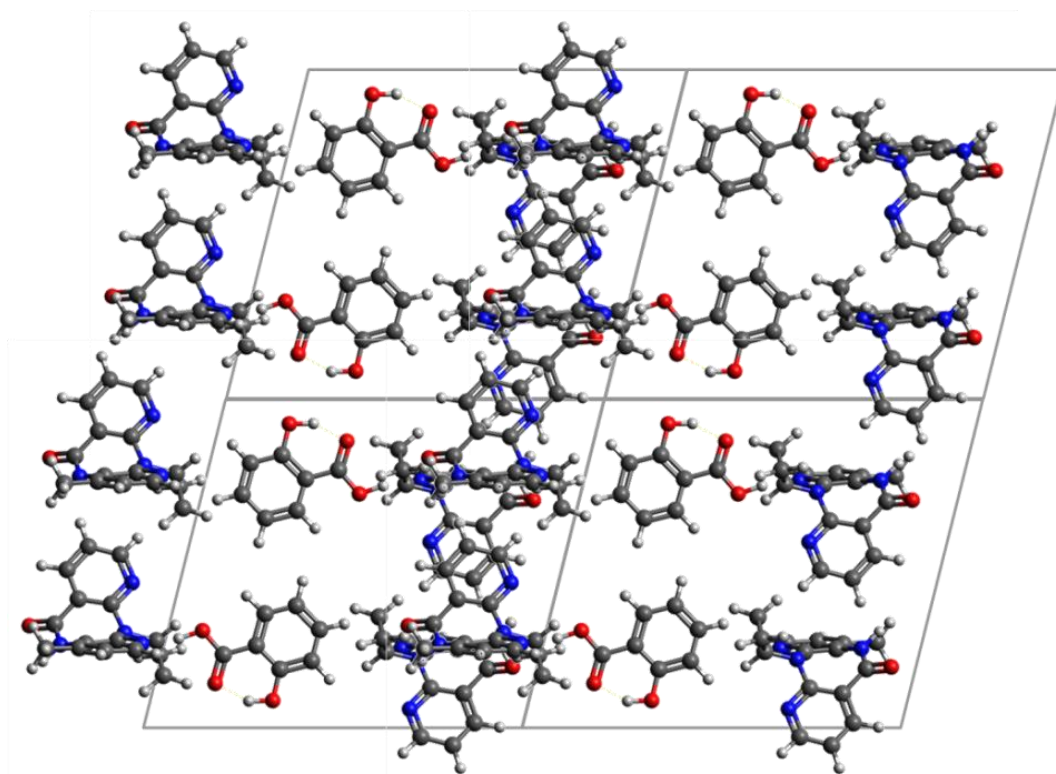


Figura 7.3 Esquema de la repetición de la celda unidad de NVP:SA a 100K.

Por otro lado, para el caso de las mediciones de RX a temperatura ambiente (RT) realizadas por Rogeria Nunes Costa, el refinamiento estructural de los datos de SCXRD definió que la celda unidad, que se repite a lo largo de todo el cristal, está formada sólo por dos moléculas de NVP y una de SA, es decir una única unidad molecular NVP-SA-NVP. Las posiciones atómicas y la celda unidad encontradas por SCXRD se presentan en la Figura 7.4.

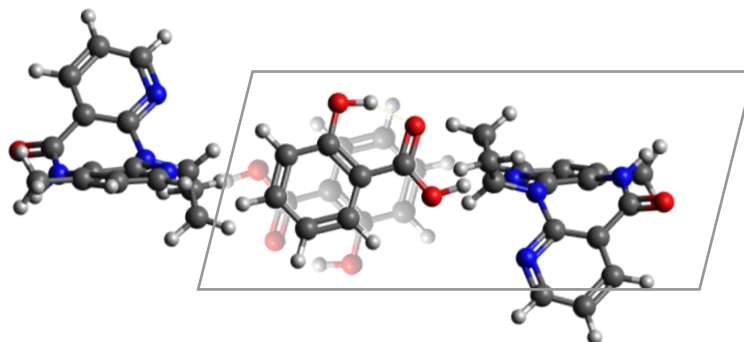


Figura 7.4 Esquema de la celda unidad de la estructura cristalina de NVP:SA a temperatura ambiente (RT). Se observan dos moléculas de SA superpuestas debido al desorden hallado por SCXRD.

Como puede observarse la unidad molecular NVP-SA-NVP es idéntica a la observada a LT, es decir las interacciones entre NVP-SA-NVP se mantienen inalteradas, lo mismo ocurre con la estructura que forman las moléculas de NVP. Sin embargo, la orientación de las moléculas de SA no puede definirse de manera unívoca, es decir pueden encontrarse tanto en la orientación SAu como SAd indistintamente. Esta diferencia en la definición de las moléculas de SA se debe a que no puede asegurarse a RT que el patrón SAu-SAd-SAu-SAd se repita de manera constante a lo largo de todo el cristal. Esto lleva a que SCXRD defina la celda mínima como la mitad de la celda obtenida a baja temperatura y las moléculas de SA se observen desordenadas sobre las dos orientaciones, SAu y SAd. La ruptura del esquema SAu-SAd-SAu-SAd puede deberse principalmente a dos factores: las moléculas de SA se intercambian entre SAu y SAd (rotan pasando de una configuración a la otra); o las moléculas se mantienen en las orientaciones SAu y SAd pero se corren de su posición de equilibrio (traslaciones o vibraciones). Si las moléculas de SA están pasando de una configuración a otra el experimento de SCXRD no puede obtener una posición definida de las mismas por lo que las ubica como desordenadas. En el caso de que las moléculas se muevan de su posición de equilibrio lleva a que la distancia entre un SA y su SA vecino sea variable en el tiempo, por lo que no se puede establecer un patrón periódico como en el caso de LT.

Dado que la estructura en forma de canales de las moléculas de NVP no se ve afectada al cambiar la temperatura, se puede asegurar que el movimiento de SA que rompe el patrón SAu-SAd debe darse dentro de esos canales. Además, como a 100 K se observan las dos orientaciones diferentes de SA y con una periodicidad determinada, es posible afirmar que el desorden que se observa a RT viene del movimiento de los SA y que dicho movimiento se detiene al bajar la temperatura.

Para comprender mejor las diferencias entre las estructuras a RT y LT se obtuvieron espectros de NMR en estado sólido de ^{13}C del cocrystal a 290 K (RT) y 100 K (LT). Los mismos se presentan en la Figura 7.5. La primera diferencia observada es que a RT NVP:SA (espectro rojo en la Figura 7.5) posee una única señal para cada núcleo ^{13}C , mientras que el espectro a LT (espectro verde en la Figura 7.5) muestra múltiples señales para algunos carbonos de NVP. Es decir, se produce un desdoblamiento de

algunas señales, como por ejemplo los carbonos C8, C9 y C12. Estos desdoblamientos de las señales de NMR muestran que hay un cambio en la unidad asimétrica del cocrystal al bajar la temperatura; y puede asegurarse que la unidad asimétrica contiene el doble de moléculas que a RT. Estas observaciones coinciden y confirman lo propuesto por Costa et al. mediante SCXRD; al bajar la temperatura se produce una duplicación de la celda unidad del cocrystal.

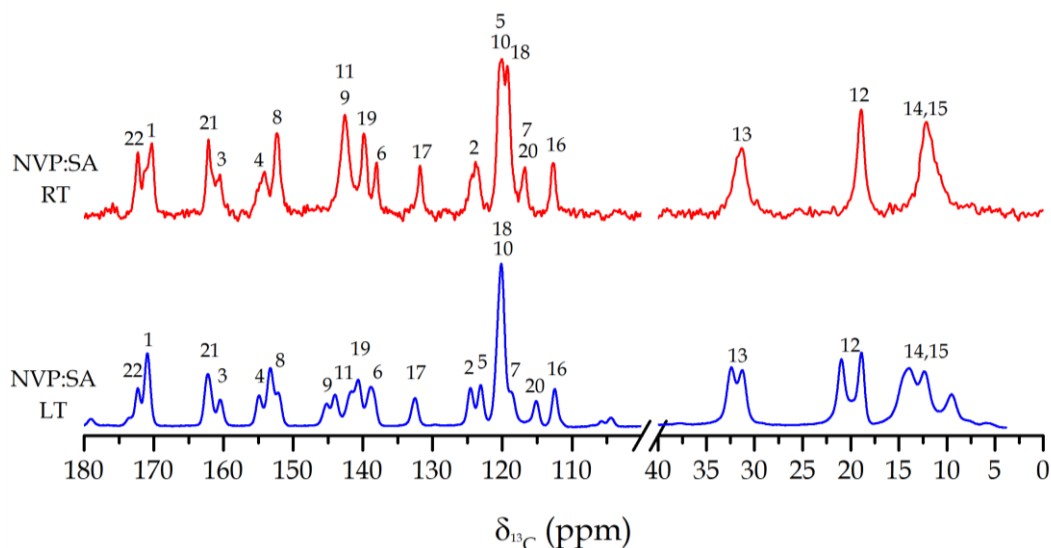


Figura 7.5 Espectros ^{13}C CPMAS del cocrystal NVP:SA a temperatura ambiente (RT) y a 100K (LT).

Para poder explicar el desorden observado a RT, se realizaron simulaciones computacionales basadas en DFT para un modelado de las estructuras del cocrystal NVP:SA a RT y LT. Como primer paso se realizaron cálculos de los parámetros de NMR de los dos precursores puros, utilizando las estructuras cristalinas reportadas como punto de partida(10,11). El acuerdo entre el cálculo y el experimento para ambos sistemas fue muy bueno, con una desviación cuadrática media (RMS) de 1 ppm para ^{13}C en ambos sistemas y en las comparaciones de ^1H 0,5 ppm para NVP y 0,2 ppm para SA. En la Figura 7.6 se muestran los gráficos de corrimientos químicos de ^{13}C calculados para cada compuesto versus los valores experimentales. Este buen acuerdo entre corrimientos calculados y experimentales para los precursores permite asegurar que los cálculos DFT para estos sistemas con los pseudopotenciales elegidos son adecuados.

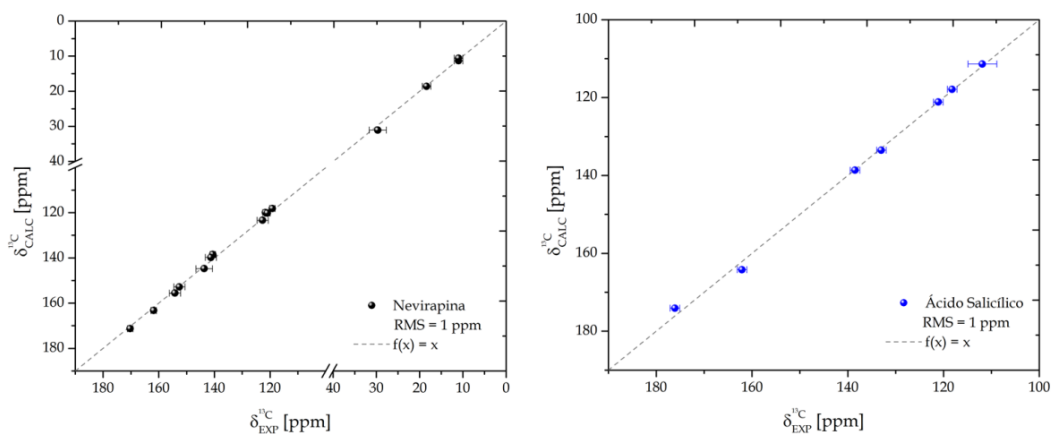


Figura 7.6 Comparación de los corrimientos químicos de ^{13}C calculados con los corrimientos químicos experimentales de Nevirapina (NVP) y Ácido Salicílico (SA) puros.

Partiendo de la estructura reportada para el cocrystal NVP:SA a LT se realizaron cálculos DFT de los parámetros de NMR. Debido a que la difracción de rayos X no permite determinar con precisión las posiciones de los átomos de H, las mismas se refinaron mediante simulaciones de relajación en toda la celda unidad de NVP:SA. Es importante mencionar que esta relajación de posiciones se realiza minimizando la energía del sistema. Al comparar los corrimientos químicos calculados con los valores experimentales se encontró una RMS de 3 ppm para ^{13}C . Posteriormente se realizó una relajación simulada de las posiciones de todos los átomos y se observó que mejoró el RMS, 1,9 ppm, entre parámetros calculados y experimentales. El resultado de la comparación de corrimientos químicos calculados y experimentales se muestra en la Figura 7.7

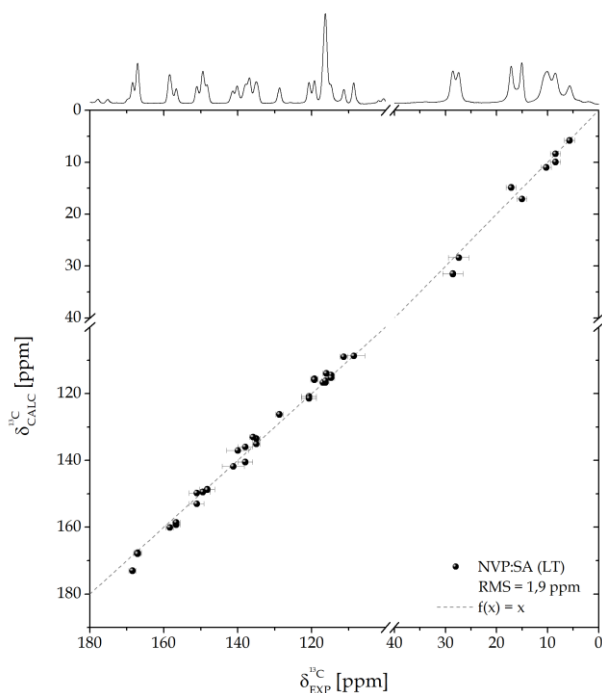


Figura 7.7 Comparación de los corrimientos químicos de ^{13}C calculados con los corrimientos experimentales para la estructura de NVP:SA a 100 K.

Puede verse que la estructura encontrada reproduce con muy buen acuerdo los corrimientos hallados experimentalmente. Se obtuvo una RMS de 1,9 ppm la cual es del orden del ancho de línea para las señales experimentales. De este modo se comprueba que la doble celda que contiene las dos orientaciones de SA permite reproducir teóricamente, mediante simulaciones DFT, el espectro experimental de NMR a baja temperatura.

Para el caso de la estructura a RT, debido a la presencia de desorden en la molécula de SA, se generaron dos celdas para los cálculos DFT. Para ello se tomó la celda resultante del análisis de SCXRD y se eliminó la molécula de SA con orientación SAu, generando una celda (denominada SA1) sin desorden y que conserva únicamente SAd. Luego se tomó nuevamente la celda original y se eliminó la molécula de SA con orientación SAd generando la estructura etiquetada como SA2. En la Figura 7.8 se presenta el esquema de ambas celdas.

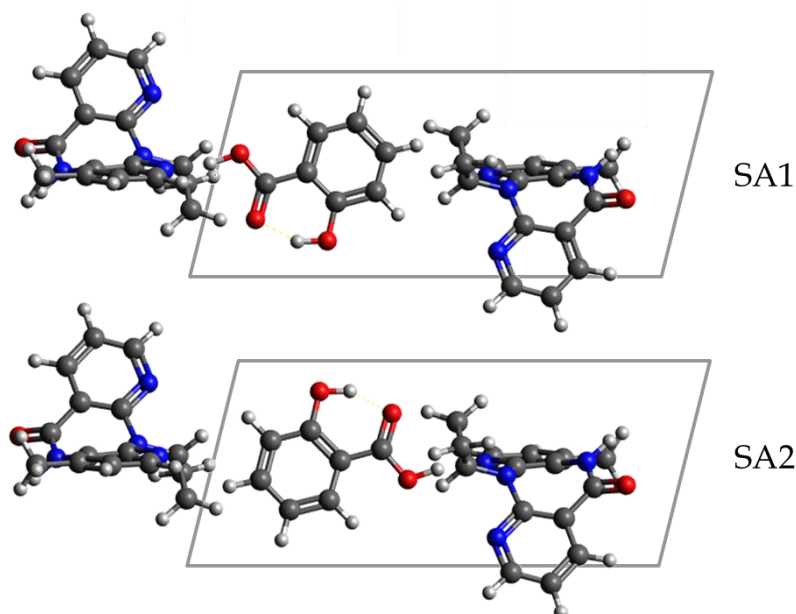


Figura 7.8 Esquema de las celdas generadas para las simulaciones computacionales de la estructura del cocrystal NVP:SA a RT.

Debido a que las posiciones de los átomos de hidrógeno determinadas por rayos X son aproximadas, se realizaron cálculos de relajación donde se determinaron las posiciones atómicas de todos los átomos de hidrógeno en cada una de las celdas propuestas. A partir de las estructuras con los H relajados se calcularon los parámetros de NMR. Los corrimientos químicos calculados se comparan con los corrimientos químicos obtenidos experimentalmente y los resultados se muestran en las Figura 7.9 (espectro de ^{13}C) y Figura 7.10 (espectro ^1H).

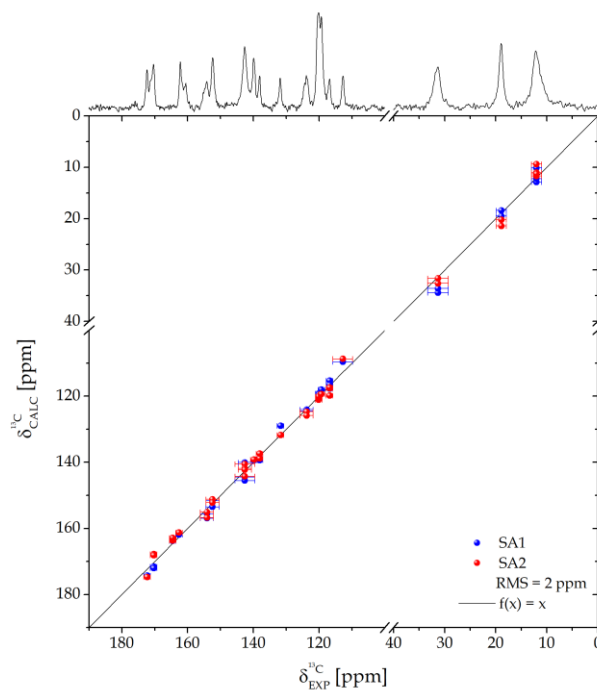


Figura 7.9 Comparación de los corrimientos químicos de ^{13}C calculados con los corrimientos químicos experimentales de las estructuras SA1 y SA2.

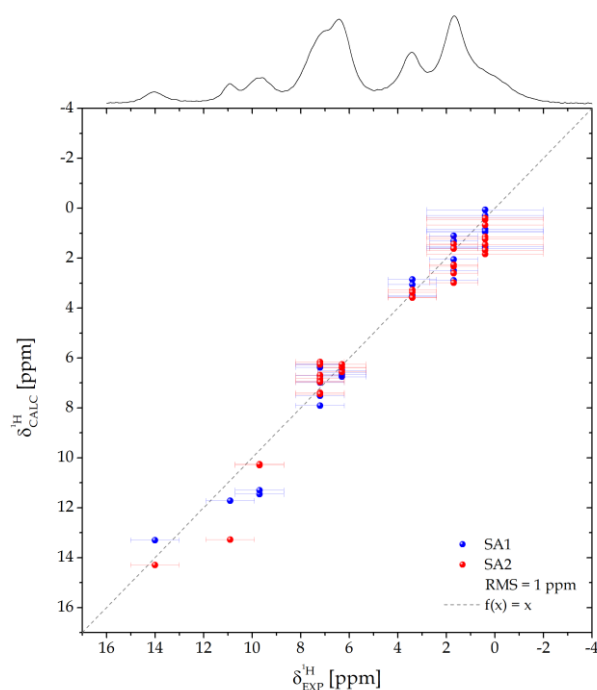


Figura 7.10 Comparación de los corrimientos químicos de ^1H calculados con los corrimientos químicos experimentales de las estructuras SA1 y SA2.

El acuerdo entre el corrimiento químico experimental y el calculado para ambas estructuras es muy bueno, con un valor de RMS de 2 ppm para ^{13}C y 1 ppm para ^1H . Sin embargo, puede observarse que algunas señales experimentales se reproducen mejor con una de las estructuras que con la otra; por ejemplo, el protón del grupo OH (señal a 10,9 ppm) de SA tiene un mejor acuerdo para la estructura SA1, mientras que el protón del grupo COOH (señal a 14 ppm) de SA tiene un mejor acuerdo en la

estructura SA2. Es decir, cada estructura reproduce mejor una parte diferente de las interacciones entre NVP y SA. Debido a esto se analizó la posibilidad de que ambas estructuras “convivan” en la estructura real en diferentes proporciones. Es decir, se estudió en qué proporción se encuentran las dos orientaciones de SA en la estructura a RT. Para ello se realizaron combinaciones lineales de los corrimientos químicos calculados, considerando diferentes porcentajes de cada una de las estructuras SA1 y SA2. En la Figura 7.11 se grafica el comportamiento de la RMS para distintas combinaciones de las contribuciones de las estructuras, se eligió graficar las proporciones en función de la cantidad de SA1 considerada.

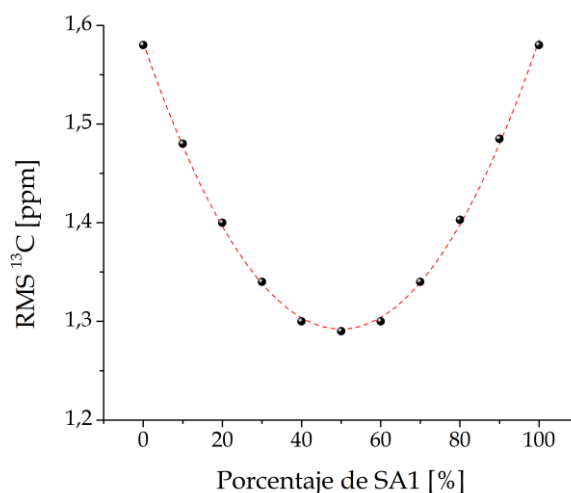


Figura 7.11 Cambio de la desviación cuadrática media (RMS) para una combinación lineal de contribuciones de las estructuras SA1 y SA2, en función del porcentaje de SA1 considerado.

Puede observarse que a medida que se “mezclan” los corrimientos químicos de las estructuras la RMS mejora. Y el mejor acuerdo se encuentra cuando se considera que ambas estructuras se encuentran en iguales proporciones. Es decir, los corrimientos experimentales son un promedio de las contribuciones de ambas orientaciones de SA. Es importante mencionar que ambas estructuras, SA1 y SA2 son energéticamente equivalentes, es decir la diferencia de energía de ambas estructuras (0,003 eV) es mucho menor a $k_B T$ (0,026 eV). Por lo que no existe una orientación de SA energéticamente preferencial. Entonces para reproducir el comportamiento de la estructura a RT es necesario considerar la presencia de ambas orientaciones de SA.

Se relajaron luego todas las posiciones atómicas de ambas celdas propuestas (SA1 y SA2). Al comparar el resultado se observó que la relajación completa lleva a ambas celdas a una misma distribución espacial, es decir ambas celdas son completamente equivalentes. Al comparar los corrimientos químicos calculados con los experimentales ambas estructuras, como era de esperar, producen los mismos corrimientos y además el acuerdo con el experimento mejora bastante. Se encontró para las estructuras completamente relajadas que la RMS de ¹³C es de 1,5 ppm y de ¹H es 0,5 ppm. El hecho de que al relajar completamente las estructuras se obtengan dos celdas equivalentes no es sorprendente, ya que como se comentó en el análisis de las

estructuras, ambas orientaciones de SA interactúan de la misma manera con NVP.

Se generó a continuación, partiendo de la celda reportada a RT una “supercelda” que surge de duplicar la celda original. Se eliminó una molécula de SA en orientación SAu y una en orientación SAd. Obteniéndose una celda basada en la estructura a RT con ambas orientaciones y con el tamaño y cantidad de moléculas de la celda hallada a LT. Se optimizaron todas las posiciones atómicas para esta supercelda y se calcularon los parámetros de NMR. Los resultados de los corrimientos químicos calculados se compararon con los corrimientos químicos experimentales a RT y a LT. La RMS encontrada al comparar con el experimento a RT es de 4 ppm, mientras que al compararlo con el experimento a LT es de 2 ppm para ^{13}C . El hecho de que la supercelda reproduzca mejor el experimento a LT que el experimento a RT no es sorprendente, pues la supercelda es semejante a la celda encontrada para 100 K donde se alternan las unidades moleculares NVP-SAu-NVP y NVP-SAu-NVP.

Sabiendo que ambas celdas propuestas a RT (SA1 y SA2) producen los mismos parámetros de NMR, pero que la estructura a RT contiene ambas orientaciones de SA (SAu y SAd), la única manera de que ambas orientaciones estén presentes y que la celda sea la mitad de la encontrada a LT, es que las moléculas de SA se estén moviendo. Como se propuso anteriormente, la ruptura a RT del patrón SAu-SAd-SAu-SAd observado a LT puede producirse de diferentes maneras. Debido a que la estructura en forma de canales de NVP no se modifica al cambiar la temperatura, el movimiento de SA debe darse dentro de dichos canales. En la Figura 7.12 se presentan los posibles movimientos dentro de un canal de NVP.

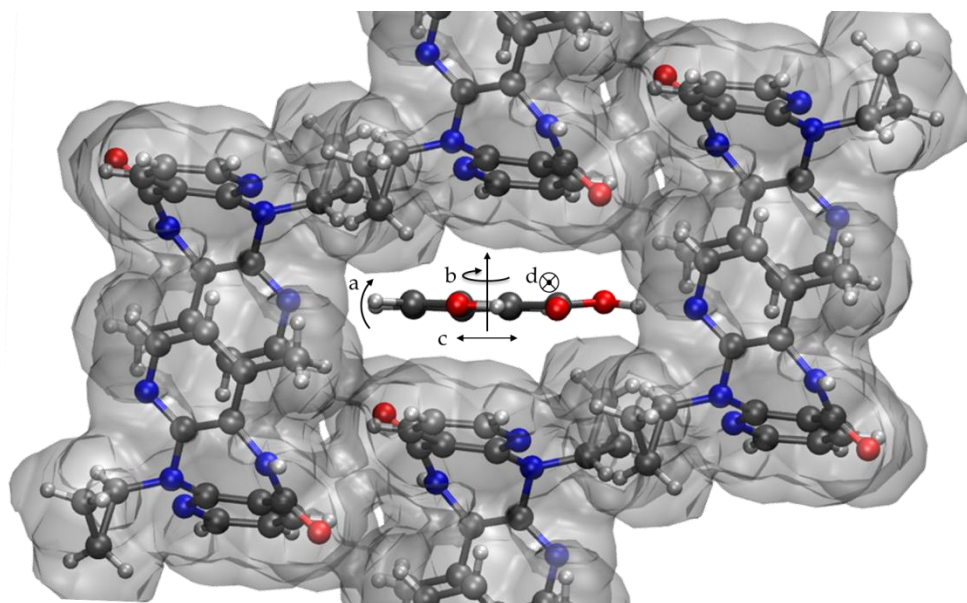


Figura 7.12 Esquema de la estructura en canales del cocrystal NVP:SA. Las letras a, b, c y d identifican posibles movimientos de SA, a y b rotaciones, c y d vibraciones.

La molécula de SA se puede estar alternando entre las dos orientaciones SAu y SAd mediante rotaciones de 180° . En la Figura 7.12 se proponen dos tipos de rotaciones: una alrededor de un eje en la dirección del canal de NVP que pasa por el

centro de simetría de SA (movimiento etiquetado como a) y otra alrededor de un eje perpendicular al canal y que también pasa por el centro de simetría (movimiento etiquetado como b). La segunda opción de movimiento es que las moléculas de SA se encuentren vibrando alrededor de su posición de equilibrio, ya sea en la dirección perpendicular al canal (movimiento c) o en la dirección paralela al canal (movimiento d). Estos posibles movimientos hacen que una molécula de SA no vea a sus dos moléculas de SA vecinas siempre a una misma distancia, por lo que no es posible generar el patrón encontrado a LT.

A continuación, se analiza cada movimiento como fuente de desorden en busca de encontrar aquel que describa mejor el sistema en estudio.

El movimiento de rotación etiquetado como a, en el que la molécula de SA salta de SAu a SAd mediante una rotación de 180° entorno a un eje en la dirección del canal no es en realidad un movimiento posible. Al analizar el tamaño de las moléculas y del canal formado por NVP, se encontró que existe un impedimento estérico por el cual las moléculas de SA no pueden estar rotando en esa dirección. En cuanto a la rotación de 180° entorno a un eje perpendicular al canal y que pasa por el centro de simetría de SA (movimiento b), puede descartarse ya que si dos moléculas de SA vecinas rotan 90° en un mismo instante quedarán alineadas en la dirección del canal e interactuarán entre ellas. Dicha interacción llevaría a que se forme una cadena de SA interactuantes que dejan de estar unidas a NVP para estar unidas entre ellas. Este tipo de interacción llevaría a importantes cambios tanto en los patrones de difracción de rayos X como en los espectros de NMR. Sin embargo no se observa ningún indicio de interacción entre moléculas de SA, pero sí enlaces SA-NVP. Con lo cual se pueden descartar los movimientos a y b.

Si bien las rotaciones 180° en torno a la posición hallada por SCXRD pueden desestimarse. Es posible que las moléculas de SA realicen pequeños movimientos rotacionales de unos pocos grados alrededor de la posición de equilibrio, al igual que pequeños movimientos vibracionales en la dirección del canal o en la dirección perpendicular a éste. Estos pequeños movimientos alrededor de la posición reportada rompen el patrón SAu-SAd-SAu-SAd observado a baja temperatura ya que las distancias relativas entre dos SA contiguas no se mantienen.

Se analizó como caso modelo de estas pequeñas variaciones en torno a la posición reportada el caso de una vibración en la dirección perpendicular al canal (movimiento c de la Figura 7.12). Para ello se realizaron cálculos DFT partiendo de la estructura SA1 generada. Se definió un plano que atraviesa la molécula de SA y un vector que va desde el C19 hasta el C22 de SA (vector VH) y que pertenece a dicho plano. Tomando como origen la posición relajada de SA se definieron pasos de $0,1 \text{ \AA}$ la dirección de VH de modo de simular pasos vibracionales alrededor de la posición de equilibrio. Se consideraron dos restricciones a la hora de realizar este movimiento de la molécula de SA, en primer lugar mantener el plano donde está ubicada, y en segundo lugar que la distancia entre el hidrógeno interactuante de SA y el N4 de NVP fuera

siempre menor a $2,2 \text{ \AA}$, la cual corresponde a la distancia promedio de un enlace hidrógeno fuerte. En la Figura 7.13 se muestra el canal de NVP, y en colores las diferentes posiciones de SA calculadas.

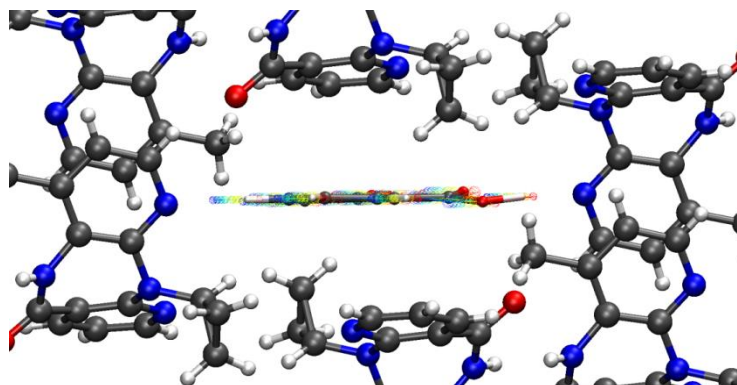


Figura 7.13 Esquema del canal de NVP con una molécula de SA alojada vista en la dirección del canal. En colores se grafican diferentes posiciones de SA, esquematizando una vibración lateral.

Se analizó en primer lugar el efecto del movimiento de SA hacia ambos lados sobre la energía del sistema en estudio. El gráfico de la energía en función de la distancia a la posición de SA informada por Costa et al. se muestra en la Figura 7.14 a. Puede verse que la posición informada corresponde al mínimo energético para la SA dentro del canal. Se analizó además la variación de la RMS de los corrimientos químicos de ^{13}C calculados respecto de los corrimientos experimentales en función de la posición de SA. Como puede verse en la Figura 7.14 b, la menor RMS se encuentra en la posición informada. El hecho de que el mínimo de ambos parámetros se encuentre en la misma posición refuerza los resultados encontrados por Costa et al. Sin embargo, cabe destacar que pequeñas variaciones en la posición, de hasta $0,2 \text{ \AA}$, no afectan significativamente la energía ni el corrimiento químico. Por lo tanto, es de esperar que la SA pueda tener pequeños movimientos respecto del mínimo debido a efectos térmicos.

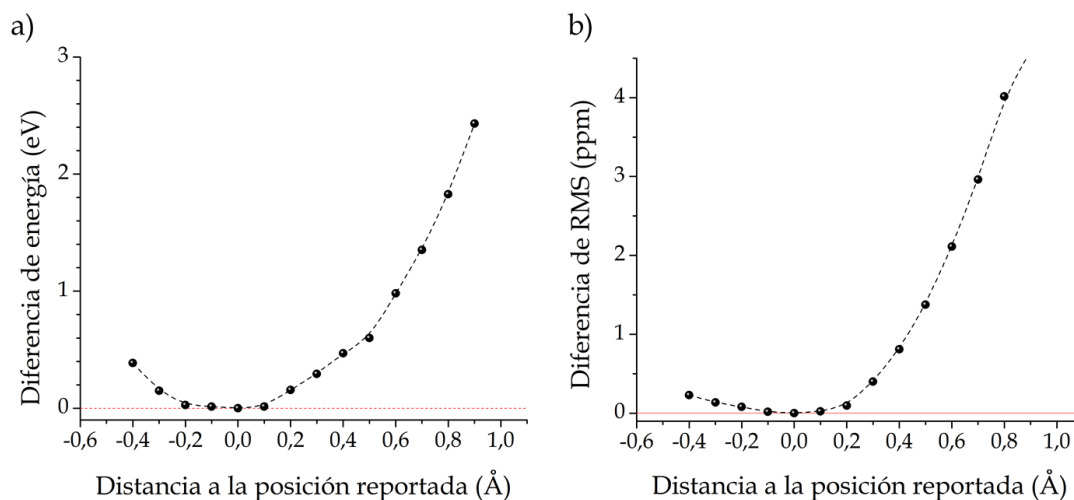


Figura 7.14 Efecto de la vibración lateral de SA dentro del canal de NVP sobre la energía del sistema (a) y sobre la RMS de los parámetros de NMR (b).

7.4 Conclusiones del capítulo

Se estudió mediante NMR de estado sólido y cálculos DFT un cocrystal formado por Nevirapina (NVP) y Ácido Salicílico (SA), reportado recientemente por Costa et. al. Este cocrystal presenta una estructura desordenada a temperatura ambiente y una estructura ordenada a 100 K. Ambas estructuras poseen una matriz sólida de moléculas de NVP, que se acomodan formando canales en los que se alojan las moléculas de SA. La celda unidad a 100 K posee 4 moléculas de NVP y 2 moléculas de SA, las cuales se ubican en dos orientaciones diferentes. Si bien las interacciones que ocurren dentro de la unidad molecular NVP-SA-NVP son idénticas, en esta estructura una molécula de SA cuyo grupo carboxilo está orientado hacia arriba (SAu), tiene siempre como vecina una molécula de SA cuyo grupo carboxilo está orientado hacia abajo (SAd). Esta periodicidad entre las orientaciones de SA no ocurre a temperatura ambiente debido a que estas moléculas están en movimiento.

Al comparar los espectros de NMR en estado sólido de ^{13}C a 100 K y a temperatura ambiente, se observa que para baja temperatura algunas señales se duplican respecto de RT. Este duplicado de señales está directamente asociado con el número de moléculas presentes en la unidad asimétrica. Por lo tanto por espectroscopía se confirma lo observado de difracción de rayos X, la celda a baja temperatura es el doble de la de alta temperatura.

Se realizaron cálculos computacionales basados en la teoría del funcional de la densidad electrónica (DFT) para poder establecer el comportamiento de SA dentro de la estructura cristalina a temperatura ambiente. En primer lugar se estudiaron los compuestos NVP y SA puros para confirmar que el método y los pseudopotenciales son adecuados para el análisis. Luego al estudiar la estructura a 100 K se observó que la estructura cristalina que contiene dos moléculas de SA y cuatro de NVP reproduce con éxito las señales de ^{13}C obtenidas experimentalmente a esta temperatura.

Debido a la presencia de desorden en la estructura a temperatura ambiente, se generaron dos celdas unidad diferentes, partiendo de la celda reportada, las cuales contienen una orientación de SA distinta. Se observó que al optimizar únicamente las posiciones de los átomos de hidrogeno, es necesario considerar una mezcla con iguales proporciones de ambas celdas para reproducir el espectro experimental a temperatura ambiente. Mientras que al realizar una relajación simulada de todas las posiciones atómicas ambas celdas pasan a ser equivalentes, y los corrimientos químicos calculados son coincidentes entre sí y con el experimento. Se generó una supercelda que consiste en la celda a RT expandida y que contiene ambas orientaciones de SA. Para esta supercelda se encontró que se obtienen los espectros de NMR a baja temperatura y no los a temperatura ambiente.

Debido a que SCXRD a temperatura ambiente encuentra las dos orientaciones de SA, y que la supercelda no reproduce el espectro de ^{13}C a esa temperatura, es posible asegurar que el desorden observado no es estático. Por lo que se proponen

diferentes movimientos que explican la presencia de desorden. En primer lugar, se propone que las moléculas de SA salten de SAu a SAd, y viceversa, rotando 180° alrededor de dos posibles ejes. Estas rotaciones completas se desestiman por problemas estéricos o porque originan interacciones no existentes. En segundo lugar, se propone que las moléculas de SA realicen pequeños movimientos alrededor de la posición encontrada por SCXRD, si estos movimientos ocurren las distancias entre dos moléculas de SA vecinas no es constante y por lo tanto no es posible determinar un patrón SAu-SAd-SAu-SAd como el observado a 100 K. Para analizar estos pequeños movimientos se analizó como caso modelo la vibración sobre el plano de la molécula de SA y en una dirección perpendicular al canal de NVP. Se encontró que el equilibrio energético y el mejor acuerdo de los parámetros de NMR se obtiene para la posición reportada. Además, se observó que variar la posición de SA en $0,2 \text{ \AA}$ no afecta significativamente a ninguno de los dos parámetros. Entonces se puede inferir que la posición reportada es la posición de equilibrio y el desorden de SA se origina por pequeñas variaciones alrededor de dicha posición por efectos térmicos.

Una vez más la técnica de NMR de estado sólido demuestra ser una herramienta útil para el estudio del desorden dinámico en compuestos orgánicos, esta vez aplicada a los IFA, y una excelente técnica de estado sólido complementaria a la difracción de rayos X. También su combinación con cálculos teóricos permitió estudiar con precisión el efecto de la temperatura en la estructura, las diferentes interacciones dentro de los componentes del cocrystal y el comportamiento de las moléculas desordenadas dentro de la estructura.

Se está desarrollando un manuscrito para su publicación internacional con todos los resultados presentados en este capítulo

7.5 Referencias

1. Hancock BC. Disordered drug delivery: destiny, dynamics and the Deborah number. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 2002 Jun;54(6):737–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1211/0022357021778989>
2. Enright GD, Terskikh V V., Brouwer DH, Ripmeester JA. The Structure of Two Anhydrous Polymorphs of Caffeine from Single-Crystal Diffraction and Ultrahigh-Field Solid-State ¹³C NMR Spectroscopy. *Cryst Growth Des* [Internet]. 2007 Aug;7(8):1406–10. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cg070291o>
3. Luedeker D, Gossmann R, Langer K, Brunklaus G. Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-crystals : “ NMR Crystallography ” of Niclosamide Co-crystals. 2016;
4. Urbanova M, Sturcova A, Brus J, Benes H, Skorepova E, Kratochvil B, et al. Characterizing Crystal Disorder of Trosipium Chloride : A Comprehensive , ¹³C CP / MAS NMR , DSC , FTIR , and XRPD Study. 2013;1–14.
5. Ashbrook SE, McKay D. Combining solid-state NMR spectroscopy with first-principles calculations – a guide to NMR crystallography. *Chem Commun* [Internet]. 2016;52(45):7186–204. Available from: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/cc/c6cc02542k>
6. Cruz-Cabeza AJ, Day GM, Jones W. Structure prediction, disorder and dynamics in a DMSO solvate of carbamazepine. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2011;13(28):12808. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c1cp20927b>
7. Ashbrook SE, Dawson DM. Exploiting Periodic First-Principles Calculations in NMR Spectroscopy of Disordered Solids. *Acc Chem Res* [Internet]. 2013 Sep 17;46(9):1964–74. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar300303w>
8. Bond AD, Cornett C, Larsen FH, Qu H, Raijada D, Rantanen J. Interpreting the Disordered Crystal Structure of Sodium Naproxen Tetrahydrate. *Cryst Growth Des* [Internet]. 2013 Aug 7;13(8):3665–71. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cg400688c>
9. Braun DE, Koztecki LH, McMahon JA, Price SL, Reutzel-Edens SM. Navigating the Waters of Unconventional Crystalline Hydrates. *Mol Pharm* [Internet]. 2015 Aug 3;12(8):3069–88. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00357>
10. Mui PW, Jacober SP, Hargrave KD, Adams J. Crystal Structure of Nevirapine, a Non-Nucleoside Inhibitor of HIV-1 Reverse Transcriptase, and Computational Alignment with a Structurally Diverse Inhibitor. *J Med Chem*. 1992;35(589):201–2.
11. Munshi P, Guru Row TN. Intra- and intermolecular interactions in small bioactive molecules: cooperative features from experimental and theoretical charge-density analysis. *Acta Crystallogr Sect B Struct Sci* [Internet]. 2006 Aug 1;62(4):612–26. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0108768106017393>
12. Costa RN, Reviglio AL, Siedler S, Cardoso SG, Linck YG, Monti GA, et al. New Multicomponent Forms of the Antiretroviral Nevirapine with Improved Dissolution Performance. *Cryst Growth Des* [Internet]. 2020 Feb 5;20(2):688–98. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.9b01129>
13. Caira M, Bourne SA, Samsodien H, Engel E, Liebenberg W, Stiegerb N, et al. Co-crystals of the antiretroviral nevirapine: crystal structures, thermal analysis and dissolution behaviour. *CrystEngComm*. 2012;14:2541–51.

CAPÍTULO 8

Compuestos Eutécticos de NVP.
¿Puede la NMR
identificar un Eutéctico?



Capítulo 8: Compuestos Eutécticos de NVP. ¿Puede la NMR identificar un Eutéctico?

8.1 Compuestos Eutécticos

Los compuestos eutécticos son una clase de sólidos multicomponente conocida desde hace mucho tiempo con aplicaciones importantes y útiles en la vida diaria¹. Este tipo de compuesto se aplica en diversas áreas, desde la refrigeración tradicional (eutéctico de cloruro de sodio y agua) y el anticongelante de vehículos (mezcla eutéctica de etilenglicol y agua)² hasta recientes dispositivos de almacenamiento de energía^{3,4}; y desde de materiales de soldadura convencionales (plomo-estaño) hasta materiales novedosos en la industria de la cerámica y el vidrio. Sin embargo, en comparación con otros sólidos cristalinos multicomponente, los compuestos eutécticos han sido menos estudiados en términos de estructuras moleculares e interacciones⁵. Los mismos están estrechamente relacionados con las soluciones sólidas¹, ya que las estructuras cristalinas de los compuestos precursores no se ve alterada. En la literatura se encuentran varias definiciones de eutécticos basadas en su composición y en el bajo punto de fusión respecto de los componentes individuales⁶⁻⁹.

8.1.1 Microestructura de un eutéctico

Tradicionalmente, los eutécticos inorgánicos se preparaban mediante la fusión de dos o más sólidos en diferentes proporciones para dar un producto que se caracterizaba por su bajo punto de fusión y por poseer un diagrama de fase sólido-líquido particular^{1,6}. En la Figura 8.1 se muestra un diagrama de fase típico de un compuesto eutéctico, el cual muestra en qué estado se encuentra la materia en función del porcentaje en peso de una de las componentes y para diversas temperaturas. Es de particular interés el punto eutéctico allí señalado, el mismo ocurre a una composición y temperatura determinada y en ese punto ambas componentes conviven en estado sólido y su punto de fusión es el más bajo posible.

Para obtener este tipo de sistemas es necesario que los cristales que se funden sean no isomórficos, es decir que no pertenezcan al mismo grupo espacial, y sus celdas unidad posean dimensiones notablemente diferente¹⁰. Esto lleva a que la solubilidad de un cristal en el otro sea limitada, debido a que las estructuras cristalinas no pueden acomodarse en una nueva red sin generar desorganización y tensión estructural. Por este motivo, los cristales se reordenan manteniendo las estructuras individuales, aunque en pequeños dominios. En la Figura 8.1, se muestra una ampliación del punto eutéctico donde pueden observarse los dominios cristalinos de las componentes individuales. La microestructura de un compuesto eutéctico se presenta como un conglomerado de estructuras cristalinas de diferentes materiales, elementos o

compuestos; este conglomerado consiste en dominios diferentes unidos por débiles interfaces a lo largo de los cuales los átomos pueden difundir y redistribuirse. En las interfaces entre dominios existe una tensión inherente debida al ordenamiento de los diferentes dominios no isomórficos. Esta tensión se maximiza debido a los arreglos atómicos imperfectos y a los enlaces deficientes entre las diferentes fases¹¹. La existencia de esta tensión entre los dominios conduce a un aumento de las funciones termodinámicas de la fase eutéctica, como la energía libre, la entalpía y la entropía^{12,13} de la fase eutéctica y, por tanto, al característico punto de fusión más bajo en relación con los componentes.

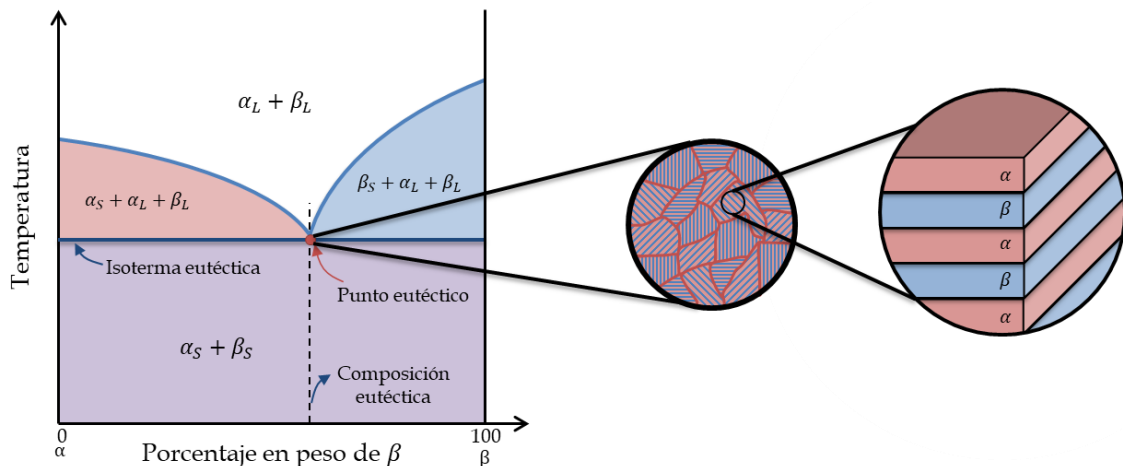


Figura 8.1 Diagrama de fase y microestructura de un compuesto de α y β , donde los subíndices S y L señalan si el compuesto se encuentra en fase sólida o líquida respectivamente.

8.1.2 Este trabajo

Los compuestos eutécticos se encuentran presentes tanto en los materiales cotidianos, como en las formulaciones farmacéuticas^{5,11}. Un ejemplo característico es el compuesto eutéctico de los anestésicos lidocaína y prilocaína (de nombre comercial EMLA) que se utiliza para mejorar la permeación transdérmica de la lidocaína¹⁴. Cuando estas drogas son administradas individualmente, tienen una menor penetración en la piel debido a que los puntos de fusión de cada uno (68 °C para la lidocaína y 38 °C para la prilocaína) son más altos que la temperatura corporal (que en condiciones normales es de 37 °C). El compuesto eutéctico de lidocaína-prilocaína en una composición estequiométrica 1:1 tiene un punto de fusión más bajo (22 °C) lo cual lleva a una permeación en la piel más rápida y por lo tanto a una mejor acción farmacológica.

Las altas funciones termodinámicas de los compuestos eutécticos^{12,13}, pueden conferir ventajas en la solubilidad y disolución de drogas escasamente solubles^{11,15-17}, de manera similar que los cocrystalos. Este hecho hace que las formulaciones eutécticas sean de gran interés para el área farmacéutica. Sin embargo, identificar este tipo de compuestos es un verdadero desafío, ya que el principal indicador de formación

eutéctica es la disminución del punto de fusión por métodos térmicos. Los métodos térmicos poseen principalmente dos problemas: en primer lugar, son técnicas destructivas, por lo que la muestra utilizada para la caracterización se pierde; en segundo lugar, la modificación adrede de la temperatura puede favorecer la formación de estructuras que no ocurriría mediante los métodos de obtención de las muestras originales, por lo que los resultados pueden no reproducir la realidad de la muestra original. La obtención de un diagrama de fases es también un análisis viable, aunque es un estudio a escala completa sobre la composición de la materia que requiere cantidades significativas de muestras y tiempo, en lugar de una medición analítica rápida. Las técnicas de análisis utilizadas habitualmente para la caracterización de sistemas sólidos multicomponentes, como Difracción de Rayos X y espectroscopía de NMR, no son suficientemente sensibles para la identificación de un compuesto eutéctico. Esto se debe a que la reorganización en dominios cristalinos no altera la disposición molecular de las redes cristalinas individuales, y en consecuencia, los patrones característicos de las componentes individuales se conservan.

Cherukuvada y Nangia⁵ sostienen que los compuestos eutécticos se forman con mayor frecuencia de lo que se cree, pero que su formación se pasa por alto ya que no existe una técnica de detección simple, rápida y no destructiva para distinguir un eutéctico de una mezcla física. Los resultados a menudo se interpretan de manera errónea como mezclas físicas, sin realizar un esfuerzo extra para identificar la fase eutéctica. Este hecho lleva a que se descarten nuevas formas sólidas con propiedades físico-químicas mejoradas.

En este capítulo se propone un análisis alternativo, simple, rápido y no invasivo para la identificación de compuestos multicomponentes eutécticos. Dado que los cambios en las propiedades físico-químicas de los compuestos originales se deben a las interfaces de los dominios de la microestructura eutéctica, se propone un estudio mediante NMR de tiempos de relajación sensibles a movimientos en dicha región. En particular se aplicará esta metodología a dos compuestos eutécticos de Nevirapina (NVP) los cuales se presentaron en el Capítulo 6 y fueron caracterizados por Costa et. al.¹⁸

8.2 Resultados y discusión

Como se comentó anteriormente, la espectroscopía de NMR no es una técnica suficientemente sensible para identificar un compuesto eutéctico. En particular para las muestras estudiadas aquí, los espectros de compuestos eutécticos de Nevirapina y Cafeína (NVP:CAF) y de Nevirapina y Teofilina (NVP:THE) son una superposición de los espectros de los compuestos puros. A modo de ilustrar este comportamiento, en las Figura 8.2 y Figura 8.3 se muestran los espectros de ^{13}C de los compuestos eutécticos y sus respectivos precursores superpuestos.

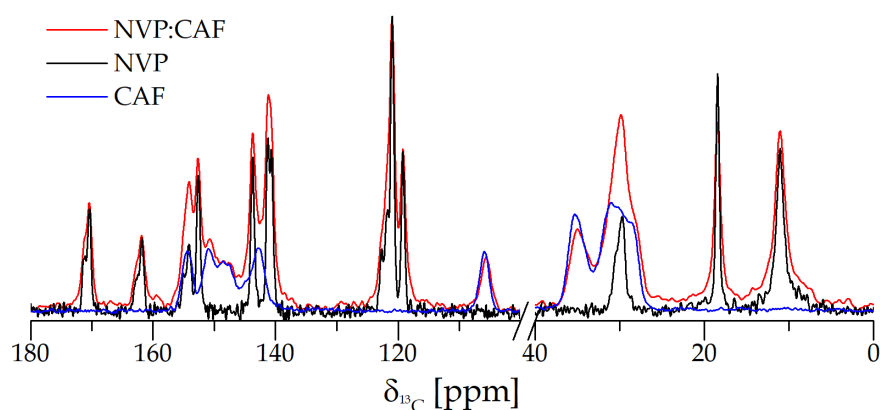


Figura 8.2 Superposición de los espectros ^{13}C CPMAS del compuesto eutéctico NVP:CAF y sus precursores NVP y CAF.

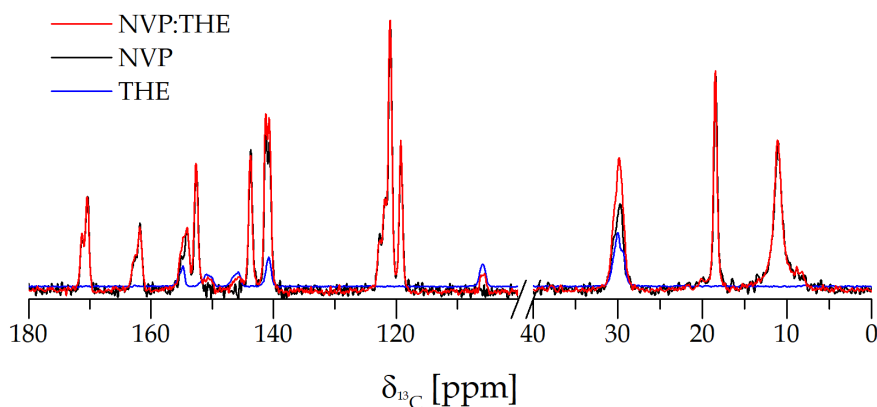


Figura 8.3 Superposición de los espectros ^{13}C CPMAS del compuesto eutéctico NVP:THE y sus precursores NVP y THE.

Se observa, en la Figura 8.2, que si se suman los espectros de las componentes puras NVP (curva negra) y CAF (curva azul) se obtiene el espectro de la muestra eutéctica NVP:CAF (curva roja). El hecho de que los corrimientos químicos no se modifiquen es un indicativo de que no existen modificaciones en las estructuras de las componentes individuales. Este mismo comportamiento puede verse en la Figura 8.3 para la muestra de NVP:THE, que resulta ser la suma de los espectros de sus precursores.

Es sabido que cuando un sistema es perturbado llevándolo fuera de su estado de equilibrio, éste retornará a su estado inicial en un proceso conocido como relajación. La relajación es una forma directa de entender los procesos dinámicos que ocurren a nivel molecular ya que los tiempos característicos con los cuales se vuelve al equilibrio dan información esencial del sistema. La relación entre los tiempos de relajación de NMR y la movilidad molecular es ampliamente conocida y se utiliza para analizar un gran número de materiales. La relajación espín-red en la terna rotante, cuyo tiempo característico se denomina $T_{1\rho}$, está directamente relacionada con los movimientos moleculares. En particular es sensible a las fluctuaciones lentas, típicamente de 100 Hz a unos pocos kHz, característica de múltiples procesos como el intercambio químico en macromoléculas. Por lo tanto, caracterizar las curvas de relajación en la terna rotante de un sistema permitiría un buen entendimiento de la dinámica molecular del sistema en estudio.

El tiempo de relajación en la terna rotante describe el decaimiento de la componente transversal de la magnetización en presencia de un campo de RF. En un experimento dicha magnetización se asocia directamente a la intensidad de la señal adquirida y se modela el decaimiento como:

$$I(t) = I_0 \text{Exp} \left[\frac{-t}{T_{1\rho}} \right] \quad (8.1)$$

donde $I(t)$ e I_0 son las intensidades de las señales en función del tiempo e inicial respectivamente, y $T_{1\rho}$ el tiempo característico. En la mayoría de las muestras en estado sólido, el tiempo de relajación puede tener más de una componente, dado que existen regiones con diferentes movilidades. Por ello se suelen ajustar las curvas de relajación con decaimientos multiexponenciales. En particular, muy frecuentemente se contemplan decaimientos biexponenciales con una componente con un tiempo de relajación corto y la otra con uno largo:

$$\frac{I(t)}{I_0} = A_{corto} \text{Exp} \left[\frac{-t}{(T_{1\rho})_{corto}} \right] + A_{largo} \text{Exp} \left[\frac{-t}{(T_{1\rho})_{largo}} \right] \quad (8.2)$$

donde A_{corto} y A_{largo} son factores de ponderación que especifican la contribución de cada componente.

Las curvas de relajación resultantes de un experimento de NMR en el dominio temporal, surgen de las contribuciones de toda la muestra colocada en el espacio activo del cabezal, por lo que si se analiza una mezcla de compuestos, la curva representa una combinación de las curvas de relajación de sus componentes individuales^{19,20}. Tal curva mostrará un decaimiento multiexponencial que puede modelarse como:

$$\left(\frac{I(t)}{I_0}\right)_{MF} = \sum_{i=1}^N p_i \left(\frac{I(t)}{I_0}\right)_i \quad (8.3)$$

donde p_i es un factor de ponderación que especifica la contribución relativa de la señal del i -ésimo componente de la mezcla, y los $\left(\frac{I(t)}{I_0}\right)_i$ son los decaimientos de cada componente de la mezcla, los cuales siguen el comportamiento de la ecuación (8.2). Cabe destacar que este modelo se utiliza ampliamente para el estudio de mezclas físicas o compuestos semicristalinos, en particular para determinar las proporciones de las componentes individuales que forman la mezcla o para determinar las proporciones de componentes cristalinas y amorfas¹⁹⁻²².

Se desea aplicar este modelo de decaimiento multiexponencial de mezclas físicas a los sistemas eutécticos estudiados en este capítulo. Para poder hacerlo se obtienen en primer lugar las curvas de relajación de ^1H en la terna rotante de los compuestos puros y se realizan los ajustes de dichas curvas siguiendo la ecuación (8.3). La Figura 8.4 muestra las curvas y los parámetros de ajuste para cada compuesto puro se presentan en la

Tabla 8.1.

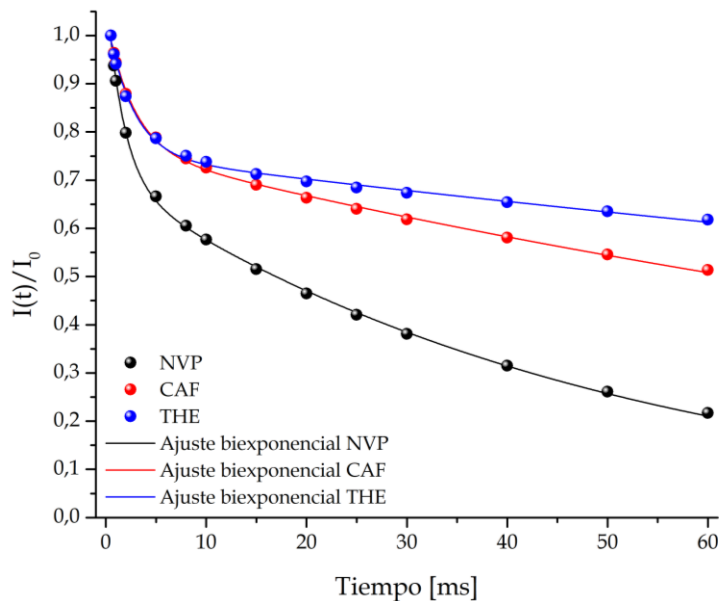


Figura 8.4 Curvas de relajación de ^1H en la terna rotante de los compuestos puros NVP (puntos negros), CAF (puntos rojos) y THE (puntos azules). Las líneas continuas corresponden a los ajustes biexponenciales del decaimiento de cada compuesto.

Tabla 8.1 Parámetros de ajuste para las curvas de relajación en la terna rotante de los compuestos puros.

	NVP	CAF	THE
A_{corto}	0,30	0,24	0,23
$(T_{1\rho})_{corto}$	$(1,7 \pm 0,1) ms$	$(2,7 \pm 0,2) ms$	$(2,6 \pm 0,2) ms$
A_{largo}	0,70	0,76	0,77
$(T_{1\rho})_{largo}$	$(49,8 \pm 0,8) ms$	$(14 \pm 5) ms$	$(294 \pm 18) ms$

Se prepararon mezclas físicas NVP-CAF en proporciones 50-50 peso en peso y 40-60 peso en peso, teniendo cuidado de no agitar ni ejercer fuerzas que puedan favorecer interacciones entre las partes. Se tomó un particular cuidado en evitar la entrega de energía a la mezcla ya que ésta favorece la formación del eutéctico NVP:CAF. Se midieron las curvas de relajación de cada mezcla y se trazó la curva modelo de mezcla física con los factores de peso correspondientes, los resultados se muestran en la Figura 8.5.

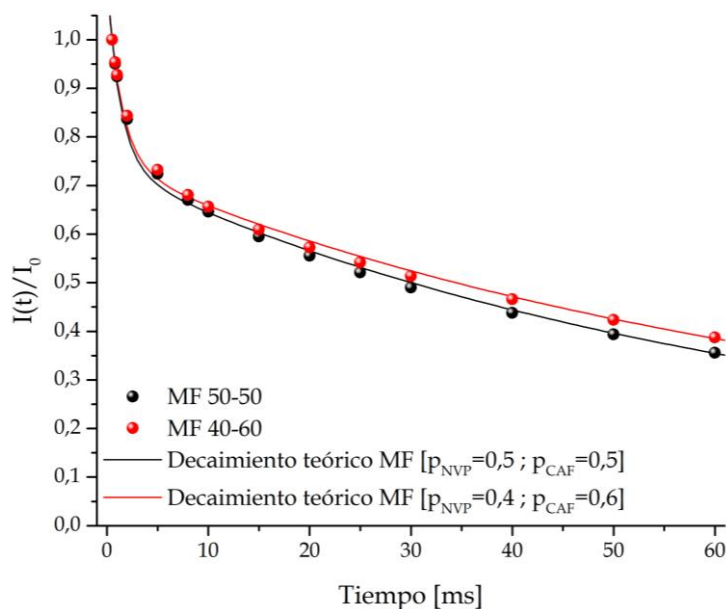


Figura 8.5 Curvas de relajación de 1H en la terna rotante para dos mezclas físicas de NVP y CAF preparadas en proporciones peso en peso de 50-50 (puntos negros) y 40-60 (puntos rojos). Las líneas son simuladas de acuerdo al modelo representado por la ecuación (8.3) con los factores de peso utilizados en la preparación de las mezclas físicas y los tiempos de relajación obtenidos de los ajustes de las curvas de la Figura 8.4.

Como puede verse, tanto el decaimiento de la mezcla física en proporciones 50-50 como en proporciones 40-60 siguen el mismo comportamiento que el modelo de

decaimiento de mezcla física de la ecuación (8.3). Donde el decaimiento de la mezcla física es la suma de los decaimientos de NVP y CAF y los factores de peso se corresponde con las proporciones peso en peso utilizadas. De esta manera se corrobora que el modelo teórico ajusta correctamente los decaimientos de las mezclas físicas. Se analiza qué sucede cuando se aplica este modelo de mezclas físicas al decaimiento de una muestra eutéctica. En la Figura 8.6 se muestra la curva de relajación del eutéctico NVP:CAF (30:70) y el decaimiento teórico para una mezcla física en las mismas proporciones.

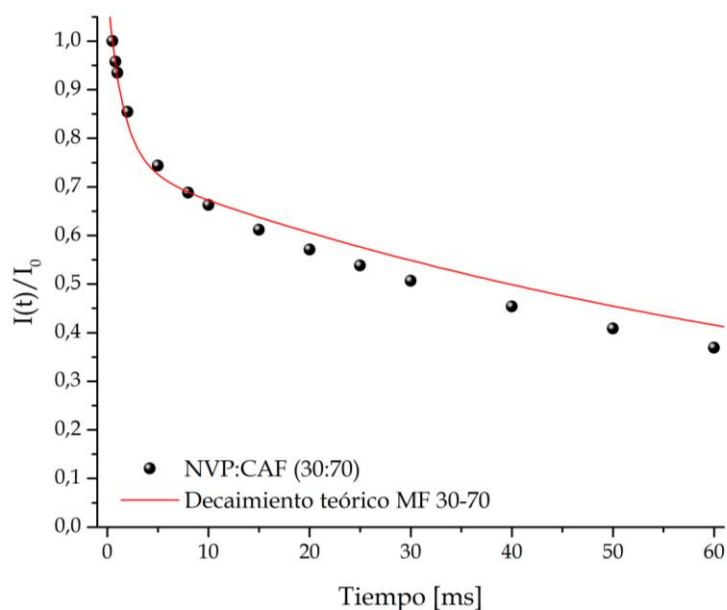


Figura 8.6 Curva de relajación de ^1H en la terna rotante para el eutéctico NVP:CAF (30:70) (puntos negros) y decaimiento teórico de una mezcla física para las mismas proporciones (línea continua roja).

La muestra NVP:CAF se caracterizó previamente como muestra eutéctica (ver Apéndice), por lo que a la hora de analizar su comportamiento se tiene certeza de su naturaleza eutéctica. Al comparar la curva de relajación experimental de la muestra con el decaimiento teórico para la muestra física, se observa que el modelo no ajusta a la muestra eutéctica como lo hace en el caso de las mezclas físicas. Si bien en este caso particular la muestra utilizada ya fue probada y caracterizada como eutéctica, la diferencia entre la relajación observada para la misma y la relajación teórica de la mezcla física de las componentes es un método válido para poder distinguir entre estos dos tipos de materiales. Es de particular interés poder diferenciar el compuesto eutéctico de una mezcla física de los componentes individuales; y superar así la caracterización obtenida por espectros de NMR y patrones DRX, que los identifican como el mismo tipo de sistema. La comparación de las curvas de relajación teórica de la mezcla física y la curva experimental del compuesto se presenta como una metodología factible para diferenciar este tipo de sistemas.

Analizando la microestructura de los compuestos eutécticos es de esperar que los dominios cristalinos de cada componente pura le confieran al sistema una combinación de las relajaciones individuales, como en el caso de las mezclas físicas. Sin

embargo, la presencia de las interfaces entre dominios, que son el origen de las propiedades físico-químicas propias de un eutéctico, se presenta como una fuente de relajación adicional. Debido a esto, se propone una modificación al modelo de mezclas físicas para incluir un término de relajación debida a la interface. Es decir, la relajación será una combinación lineal de la relajación de una mezcla (relajación de cada dominio cristalino en el compuesto) y una relajación propia de la interfaz entre dominios. Por lo que el decaimiento puede modelarse como:

$$\left(\frac{I(t)}{I_0}\right)_{EUTECTICO} = P_{MF} \left(\frac{I(t)}{I_0}\right)_{MF} + P_I \text{Exp}\left[\frac{-t}{(T_{1\rho})_I}\right] \quad (8.4)$$

donde P_{MF} y P_I representan un factor de ponderación que especifica la contribución relativa a la señal de los dominios (mezcla física) y de la interfaz, respectivamente; y $(T_{1\rho})_I$ es el tiempo de relajación propio de la interfaz eutéctica. En la Figura 8.7 se presenta la aplicación de este modelo a la curva de relajación del eutéctico NVP:CAF (30:70).

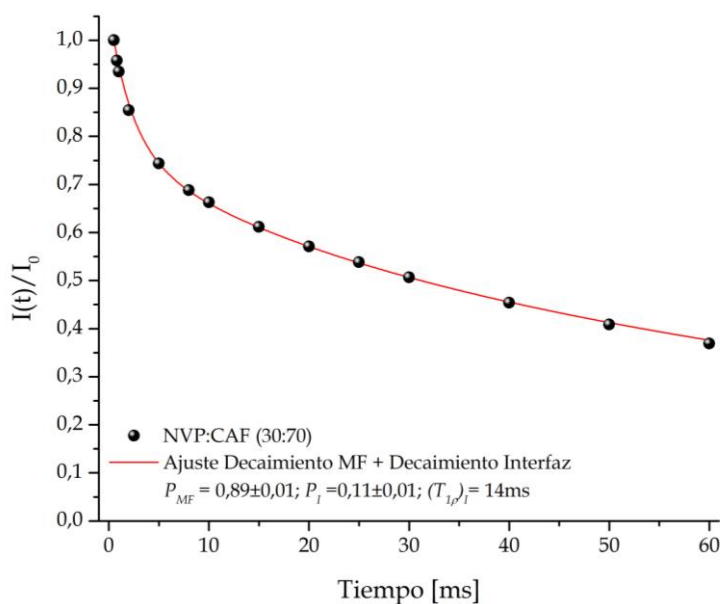


Figura 8.7 Curva de relajación de ^1H en la terna rotante para el eutéctico NVP:CAF (30:70) (puntos negros) y ajuste mediante el modelo propuesto en la ecuación (8.4) para eutécticos (línea continua roja).

Puede verse que con este modelo es posible modelar el comportamiento del compuesto eutéctico, y que además es posible identificar qué porcentaje de la mezcla corresponde a una interfaz o a los dominios individuales de cada compuesto puro. Es decir, el 10% de la muestra (P_I) corresponde a las interfaces entre dominios y es ese 10% el causante de la disminución del punto de fusión del compuesto eutéctico frente a sus coformadores puros. Si bien las interfaces representan, para este compuesto, el 10% de la muestra las interacciones presentes en esta región no son suficientemente fuertes como para producir cambios en los corrimientos químicos de las señales de NMR. Por

esta razón, no es sorprendente que el espectro de NMR de la muestra eutéctica coincida con el de una mezcla física.

Como ya se comentó, preparar la mezcla física sin favorecer externamente nuevas interacciones entre las componentes no es tarea fácil. Mucho menos cuando se trabaja en las proporciones que ya se establecieron como proporciones eutécticas. Debido a esto la comparación del eutéctico se llevó a cabo con el modelo teórico y no con una curva experimental de una mezcla física en las mismas proporciones. Evitando posibles errores asociados a la preparación y envasado de una mezcla física. Cabe destacar, que un parámetro relevante a definir para este tipo de experimentos es la amplitud del campo Spin-Lock utilizado. La elección de dicho campo permite maximizar las diferencias entre las curvas de relajación de cada muestra estudiada, facilitando un mejor análisis del sistema global. Se obtuvieron curvas de relajación para diferentes campos de Spin-Lock (17,12 kHz, 22,12 kHz, 27,78 kHz, 35,71 kHz, 46,30 kHz, 58,14 kHz y 73,53 kHz), siendo el campo de 27,78 kHz el que maximiza las diferencias entre los decaimientos de los compuestos puros. Por lo que todos los resultados presentados aquí corresponden a un campo de Spin-Lock de 27,78 kHz.

Se aplicó el mismo modelo de decaimiento probado para el eutéctico NVP:CAF, a una muestra eutéctica NVP:THE (70:30). La muestra analizada ya había sido caracterizada como eutéctica previamente (ver Apéndice). En la Figura 8.8 se muestra la curva de relajación del eutéctico y el ajuste con el modelo propuesto.

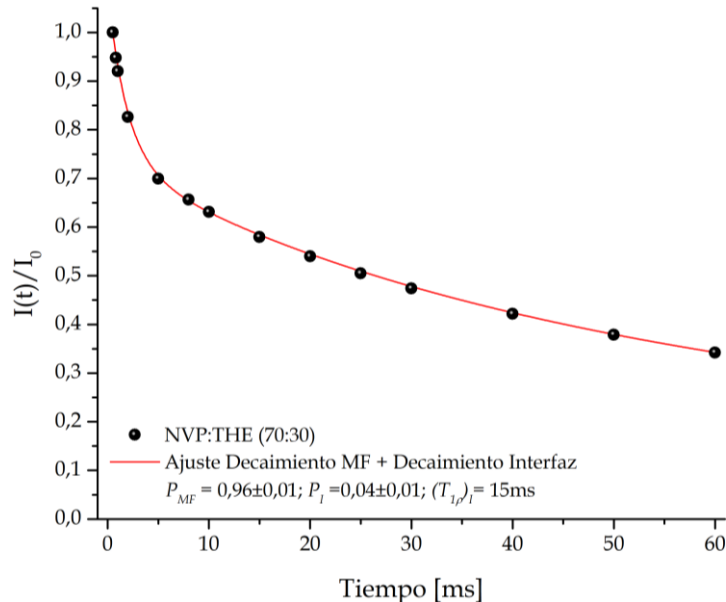


Figura 8.8 Curva de relajación de ^1H en la terna rotante para el eutéctico NVP:THE (70:30) (puntos negros) y ajuste mediante el modelo propuesto en la ecuación (8.4) para eutécticos (línea continua roja).

Se observa un muy buen acuerdo entre el ajuste propuesto y la curva de relajación experimental del eutéctico NVP:THE. El tiempo de relajación asociado a la interfaz es muy similar al encontrado para el caso del eutéctico NVP:CAF, lo cual es un indicativo de procesos dinámicos similares en dicha región. Puede verse también que

los factores de peso en este caso indican que las interfaces contribuyen en menor medida a la curva de relajación. Esto puede asociarse a dominios cristalinos de mayor tamaño, o a interfaces más delgadas. Si los dominios cristalinos de los sistemas puros son más grandes, en un mismo volumen tendré menor cantidad de interfaces, lo cual se traduce directamente en las proporciones observadas. Si en cambio las interfaces son más delgadas, la región molecular que posee una dinámica diferente a la de los dominios puros es más chica y por lo tanto contribuye en menor medida a la relajación de espines.

El método utilizado presenta varias ventajas frente a las caracterizaciones térmicas de compuestos eutécticos: es un método no destructivo, es decir toda la muestra que se analiza se recupera sin ser alterada, mientras que en los estudios térmicos la acción de la temperatura modifican irreversiblemente las muestras; requiere de poca cantidad de muestra, los portamuestras utilizados para este tipo de análisis son los rotores utilizados para la obtención de espectros de NMR en estado sólido, el volumen de los cuales depende del imán utilizado y varían entre 230 μl y 0,8 μl , en el caso de este trabajo se utilizó un rotor de 50 μl . Además, el montaje utilizado para la aplicación de este método es la misma que la utilizada para la obtención de los espectros de NMR en estado sólido. Como estos espectros se realizan de manera rutinaria cuando se analizan compuestos farmacéuticos, la implementación de este método no requiere de una demanda adicional en cuanto a equipamiento o montaje.

8.3 Conclusiones del capítulo

Aunque los compuestos eutécticos se encuentren presentes en un gran número de materiales de uso cotidiano, éstos no son sistemas fáciles de identificar. En particular, en la búsqueda de nuevos compuestos farmacéuticos con mejores propiedades físico-químicas, las limitaciones en la identificación de este tipo de sistemas llevan a desestimar un número importante de compuestos multicomponentes. Se propuso aquí un método de identificación, que a diferencia de los análisis térmicos, es no invasivo y no requiere de grandes cantidades de muestra.

El tiempo de relajación espín-red en la terna rotante, $T_{1\rho}$, es sensible a los movimientos moleculares y se ha utilizado ampliamente para identificar procesos de intercambio molecular. En este capítulo se utiliza este tiempo característico para identificar compuestos eutécticos y diferenciarlos de la mezcla física de las componentes que lo forman. El método propuesto es una modificación al modelo ampliamente utilizado para la caracterización de mezclas físicas mediante tiempos de relajación. Este modelo describe la relajación de una mezcla como la combinación lineal de las relajaciones de los componentes puros. Se probó este modelo teórico con dos mezclas físicas en diferentes proporciones, y se encontró un muy buen acuerdo con la curva experimental.

Cuando se comparan las curvas de relajación de un sistema eutéctico conocido con el modelo teórico del decaimiento de una mezcla física no se obtiene un buen acuerdo. Por tal motivo se propone una modificación al modelo. Los compuestos eutécticos están formados por dominios cristalinos de las componentes puras unidas por interfaces, las cuales confieren al sistema las características eutécticas. Dada esta estructura se propone que la curva de relajación es una combinación lineal de la relajación de los dominios cristalinos y una relajación propia de las interfaces. Es decir, el decaimiento es igual al decaimiento de una mezcla física más un decaimiento adicional debido a las interfaces entre dominios.

Al aplicar este modelo al eutéctico NVP:CAF se observa un muy buen acuerdo y es posible identificar en qué proporción contribuyen las interfaces a las curvas de relajación. Comprobando así que este método es factible no sólo para diferenciar un eutéctico de una mezcla física sino para reconocer la influencia de las interfaces en el comportamiento del mismo. Se aplicó también el modelo al eutéctico NVP:THE, obteniendo nuevamente un muy buen ajuste. El tiempo de relajación encontrado en ambos casos para la interfaz es muy similar, por lo que se asocian al mismo comportamiento dinámico. Además, en el caso de NVP:THE, la contribución a la curva de relajación de la interfaz es más chica, lo que permite inferir características del sistema como el tamaño de los dominios o de las interfaces.

La determinación de los tiempos de relajación $T_{1\rho}$ demostró ser un método de análisis óptimo para identificar y diferenciar compuestos eutécticos. Es un método no invasivo y reproducible, lo cual es muy ventajoso frente a los métodos hoy utilizados

para la identificación de este tipo de compuestos. Además, no se requiere de una gran cantidad de muestra para poder realizar esta caracterización, hecho que si es determinante en caso de utilizar los métodos térmicos.

El método aquí propuesto es el segundo paso luego de la obtención de espectros de NMR de estado sólido para la identificación de diferentes formas sólidas de un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA). Si el espectro se presenta como la superposición de las componentes individuales, pero las curvas de relajación no son la suma de las relajaciones, estamos en presencia de un compuesto con comportamiento eutético. La conjunción de la espectroscopía de NMR con la medición de los tiempos de relajación evitaría que se descarten posibles compuestos eutéticos con mejoras en las propiedades físico-químicas del IFA.

Se está desarrollando un manuscrito para su publicación internacional con todos los resultados presentados en este capítulo.

8.4 Referencias

1. Askeland DR, Fulay PP. *Essentials of Materials Science & Engineering*. 2nd ed. Cengage Learning; 2009.
2. Prasad M. *Refrigeration and Air Conditioning*. 2nd ed. New Age International Publishers; 2006.
3. Karaipekli A, Sarı A. Preparation, thermal properties and thermal reliability of eutectic mixtures of fatty acids/expanded vermiculite as novel form-stable composites for energy storage. *J Ind Eng Chem*. 2010;16(5):767-773. doi:10.1016/j.jiec.2010.07.003
4. Shilei L, Neng Z, Guohui F. Eutectic mixtures of capric acid and lauric acid applied in building wallboards for heat energy storage. *Energy Build*. 2006;38(6):708-711. doi:10.1016/j.enbuild.2005.10.006
5. Cherukuvada S, Nangia A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem Commun*. 2014;50(8):906-923. doi:10.1039/C3CC47521B
6. William F S, Javad H. *Foundations of Materials Science and Engineering*. (Education M-HH, ed.); 2006.
7. Oxford Dictionary. <https://www.lexico.com/definition/eutectic>. Accessed February 27, 2021.
8. Encyclopaedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/eutectic>. Accessed February 27, 2021.
9. Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A, eds. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC; 2009. doi:10.1351/goldbook
10. Online Dictionary of Crystallography. https://dictionary.iucr.org/Isomorphous_crystals. Accessed February 27, 2021.
11. Moore MD, Wildfong PLD. Aqueous Solubility Enhancement Through Engineering of Binary Solid Composites: Pharmaceutical Applications. *J Pharm Innov*. 2009;4(1):36-49. doi:10.1007/s12247-009-9053-7
12. Das SS, Singh NP, Agrawal T, Gupta P, Tiwari SN, Singh NB. Studies of Solidification Behavior and Molecular Interaction in Benzoic Acid-o-Chloro Benzoic Acid Eutectic System. *Mol Cryst Liq Cryst*. 2009;501(1):107-124. doi:10.1080/15421400802697350
13. Singh NB, Das SS, Singh NP, Agrawal T. Computer simulation, thermodynamic and microstructural studies of benzamide-benzoic acid eutectic system. *J Cryst Growth*. 2008;310(11):2878-2884. doi:10.1016/j.jcrysgro.2008.01.054
14. Broberg BFJ, Evers HCA. Local anesthetic mixture for topical application and method for obtaining local anesthesia. 1985;(19):3-7.
15. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discov Today*. 2007;12(23-24):1068-1075. doi:10.1016/j.drudis.2007.09.005
16. Vippagunta SR, Wang Z, Hornung S, Krill SL. Factors Affecting the Formation of Eutectic Solid Dispersions and Their Dissolution Behavior. *J Pharm Sci*. 2007;96(2):294-304. doi:10.1002/jps.20754
17. Law D, Wang W, Schmitt EA, Qiu Y, Krill SL, Fort JJ. Properties of Rapidly Dissolving Eutectic Mixtures of Poly(ethylene glycol) and Fenofibrate: The Eutectic Microstructure. *J Pharm Sci*. 2003;92(3):505-515. doi:10.1002/jps.10324
18. Costa RN, Reviglio AL, Siedler S, et al. New Multicomponent Forms of the Antiretroviral Nevirapine with Improved Dissolution Performance. *Cryst Growth Des*. 2020;20(2):688-698. doi:10.1021/acs.cgd.9b01129
19. Okada K, Hirai D, Kumada S, Kosugi A, Hayashi Y, Onuki Y. ¹H NMR Relaxation Study to Evaluate the Crystalline State of Active Pharmaceutical Ingredients Containing Solid Dosage Forms Using Time Domain NMR. *J Pharm Sci*. 2019;108(1):451-456. doi:10.1016/j.xphs.2018.09.023
20. Stueber D, Jehle S. Quantitative Component Analysis of Solid Mixtures by Analyzing Time Domain ¹H and ¹⁹F T1 Saturation Recovery Curves (qSRC). *J Pharm Sci*. 2017;106(7):1828-1838. doi:10.1016/j.xphs.2017.03.034
21. Ougi K, Okada K, Leong KH, Hayashi Y, Kumada S, Onuki Y. Effect of the molecular

- mobility of water adsorbed by disintegrants on storage-induced hydrolytic degradation of acetylsalicylic acid incorporated into tablets under humid conditions. *Eur J Pharm Sci.* 2020;154:105502. doi:10.1016/j.ejps.2020.105502
22. Babos DV, Garcia RH dos S, Colnago LA, Pereira-Filho ER. A simple, rapid, green and non-destructive ^{19}F time-domain NMR method for directly fluorine determination in powder of mineral supplements for cattle. *Microchem J.* 2020;153:104416. doi:10.1016/j.microc.2019.104416

CAPÍTULO 9

Comentarios finales



Capítulo 9: Comentarios Finales

Desde sus inicios, el ser humano se ha interesado por el uso de su entorno para aplicaciones medicinales; por lo que es muy difícil determinar cuándo se iniciaron estrictamente las prácticas farmacéuticas. Aunque inicialmente los medicamentos se obtenían directamente de extractos vegetales, animales o minerales, en la actualidad hay un gran desarrollo que permite la síntesis de nuevos compuestos con aplicaciones medicinales. Entre un 80% y un 90% de los medicamentos que se comercializan en la actualidad se encuentran en estado sólido. Sin embargo, este tipo de sistema tiende a presentar propiedades físico-químicas poco favorables para su administración, por lo que son necesarios desarrollos de nuevos materiales que mejoren dichas propiedades.

El desarrollo exitoso de nuevos materiales farmacéuticos debe ir siempre acompañado de una correcta caracterización de los sistemas de interés. En particular, cuando se trata de compuestos sólidos, la estructura y el empaquetamiento que éstos adquieran determinarán sus propiedades físico-químicas. Por este motivo, académicos e industriales del área farmacéutica dedican un gran esfuerzo a la completa caracterización de compuestos farmacéuticos sólidos. Esta caracterización no es tarea sencilla y requiere de la conjunción de un gran número de técnicas.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) en estado sólido desempeña un papel importante en la caracterización de sólidos farmacéuticos, particularmente en las últimas etapas del desarrollo de nuevos fármacos. Ésta técnica no invasiva es capaz de extraer información local de los sistemas en estudio, por lo que un correcto análisis permite conocer la estructura a nivel atómico. Además de los análisis espectroscópicos, la NMR permite estudiar la dinámica involucrada en los diversos sistemas a partir del análisis de los tiempos de relajación.

Los cálculos computacionales basados en la Teoría del Funcional de la Densidad electrónica (DFT) se han presentado en el último tiempo como una herramienta importante a la hora de diseñar y caracterizar compuestos farmacológicos. En particular presentan un soporte teórico fundamental para explicar y correlacionar espectros de NMR con estructuras cristalinas. La combinación de NMR y DFT no sólo permite correlacionar cálculos y experimentos, sino también refinar estructuras, predecir comportamientos y analizar el efecto local de pequeños cambios conformacionales.

En este trabajo de tesis se realizó una combinación de NMR en estado sólido y cálculos basados en DFT para el estudio de diferentes compuestos de interés farmacéutico: Tizoxanida (TIZ), Nevirapina (NVP) y Tinidazol (TNZ). TIZ es un agente antiparasitario utilizado para el tratamiento de Chagas, entre otras enfermedades; NVP es una droga que se utiliza en el tratamiento de VIH; y por último TNZ es un poderoso antibiótico ampliamente utilizado en diversos ámbitos. Los tres compuestos se utilizan actualmente en forma sólida, y pertenecen, según el sistema de bioclasificación farmacéutica, al grupo II, fármacos con baja solubilidad y biodisponibilidad.

La combinación de NMR en estado sólido y los cálculos DFT realizados para TIZ, permitieron el refinamiento de la estructura cristalina¹. En particular, se analizó y

caracterizó un enlace hidrógeno intramolecular que participa tanto de la planarización de la molécula dentro de la celda cristalina como de las estructuras laminares que se observan a gran escala. La modificación secuencial de dicho enlace provoca cambios de la densidad electrónica que influyen directamente en los espectros de NMR experimentales. La correlación entre el cálculo y el experimento permitió definir con precisión la posición del átomo de H perteneciente a dicho enlace, el cual no puede ser determinado de manera directa mediante las técnicas convencionales de rayos X.

Los sólidos multicomponentes se presentan como la alternativa más ampliamente utilizada en la búsqueda de nuevas formas sólidas de compuestos farmacéuticos. La caracterización e identificación de dichas formas sólidas es entonces de gran importancia durante el desarrollo de estos nuevos materiales. La espectroscopía de NMR en estado sólido cumple un rol muy importante en dicha caracterización ya que es una técnica de sensibilidad local, donde un pequeño cambio en las interacciones se traduce en un cambio en el espectro. El análisis minucioso de los espectros de NMR para las diferentes muestras multicomponentes de NVP y TNZ permitieron la identificación de las distintas formas sólidas obtenidas. En particular se identificaron tres formas sólidas diferentes de NVP: una mezcla física con Urea, dos cocrystal, uno con Sacarina y otro con Ácido Salicílico; y dos eutécticos, uno con Cafeína y otro con Teofilina². De la misma manera fue posible identificar diferentes formas sólidas de TNZ, específicamente tres cocrystal, uno con Ácido Salicílico, uno con Ácido 4-Aminobenzoico y uno con Ácido Cítrico; y dos eutécticos uno con Nicotinamida y otro con Ácido Succínico³.

Se observó que la molécula de Ácido Salicílico dentro de la estructura cristalina del cocrystal que forman con NVP a temperatura ambiente se encuentra desordenada en dos posibles orientaciones, lo cual no ocurre cuando el cristal se encuentra a bajas temperaturas (100 K). Se analizó mediante espectroscopía de NMR y cálculos DFT dichas estructuras para explicar el comportamiento desordenado de la molécula de Ácido Salicílico a temperatura ambiente. Esta combinación permitió confirmar que el desorden es un desorden dinámico, es decir debido a movimientos de la molécula de Ácido, y además asociarlo con pequeñas variaciones en las posiciones debidas a efectos térmicos, observadas mediante rayos X. Se está trabajando en el manuscrito de estos resultados para su pronta publicación como artículo científico en una revista internacional.

Los compuestos eutécticos han demostrado presentar ventajas en la solubilidad y biodisponibilidad frente a los ingredientes farmacéuticos puros. Sin embargo, cómo las técnicas de análisis rutinarias no pueden identificarlos, muchas veces son descartados debido a que se confunden con mezclas físicas. Se presenta aquí un método basado en la medición de los procesos de relajación de NMR, que permite diferenciarlos de las mezclas físicas de los precursores. Éste es, a diferencia de los métodos térmicos normalmente utilizados, un método no invasivo, reproducible y que requiere de poca cantidad de muestra. El mismo fue probado para dos compuestos eutécticos de NVP caracterizados previamente, obteniéndose un muy buen resultado. Otra ventaja del método propuesto, es que permite correlacionar los procesos de relajación con las diferentes partes de la microestructura eutéctica. Identificando los

tiempos de relajación asociados a la región que le confiere las propiedades propias de eutéctico. Se está trabajando en el manuscrito de estos resultados para su pronta publicación como artículo científico en una revista internacional.

La técnica de NMR de estado sólido demuestra ser una herramienta útil para el estudio de compuestos farmacéuticos, tanto para la identificación de nuevas formas sólidas, como para la detección de estructuras desordenadas, y una excelente técnica de estado sólido complementaria a la difracción de rayos X. También su combinación con cálculos teóricos permitió estudiar con precisión efectos debidos a la modificación local de estructuras cristalinas, efectos de la temperatura sobre dichas estructuras, interpretación de las diferentes interacciones dentro de cocristales y el comportamiento de las moléculas desordenadas dentro de las estructuras.


Los estudios de compuestos farmacéuticos son intrínsecamente multidisciplinarios debido a la complejidad del sistema. Más allá de la combinación teórico-experimental para la correcta interpretación de resultados, la gran cantidad de tópicos que se deben abarcar requiere de la suma de diversos enfoques para lograr una mirada completa. Alrededor de todo el sistema científico, la investigación en el área farmacéutica ha urgido a la colaboración entre grupos de diferentes ramas de la ciencia, donde cada uno de sus miembros aporte desde su área en particular pero requiriendo de un conocimiento del sistema como un todo. El avance de este proceso impulsa el desarrollo de un lenguaje común que permitirá una comunicación más fluida, potenciando la interacción entre investigadores provenientes de distintas disciplinas.

9.1 Referencias

1. **Reviglio AL**, Martínez FA, Montero MDA, et al. Accurate location of hydrogen atoms in hydrogen bonds of tizoxanide from the combination of experimental and theoretical models. *RSC Adv.* 2021;11(13):7644-7652. doi:10.1039/D0RA10609G
2. Costa RN, **Reviglio AL**, Siedler S, et al. New Multicomponent Forms of the Antiretroviral Nevirapine with Improved Dissolution Performance. *Cryst Growth Des.* 2020;20(2):688-698. doi:10.1021/acs.cgd.9b01129
3. Fandiño OE, **Reviglio L**, Linck YG, et al. Novel Cocrystals and Eutectics of the Antiprotozoal Tinidazole: Mechanochemical Synthesis, Cocrystallization, and Characterization. *Cryst Growth Des.* 2020;20(5):2930-2942. doi:10.1021/acs.cgd.9b01435

APÉNDICE

Caracterización de
Nuevas Formas Sólidas
Multicomponentes
de NVP y TNZ.
Otras técnicas experimentales



APÉNDICE

Caracterización de Nuevas Formas Sólidas Multicomponentes de NVP y TNZ.

Otras técnicas experimentales

El trabajo realizado durante esta tesis fue hecho en colaboración con otros grupos de investigación. En este apéndice se resumen resultados experimentales obtenidos por los grupos de la Dra. Silvia Cuffini y la Dra. Norma Sperandeo, que son complementados con los estudios realizados por RMN en esta tesis. La conjunción de RMN con las demás técnicas experimentales permitió la completa caracterización de nuevas formas sólidas de Nevirapina (NVP) y Tinidazol (TNZ). Todos los resultados se encuentran plasmados en dos publicaciones internacionales, Costa et. al.¹ y Fandiño et. al.² Se describirán inicialmente, en la Sección A.1, los detalles de las metodologías utilizadas por cada grupo de trabajo; y luego su implementación a los compuestos NVP, Sección A.2, y TNZ, Sección A.3.

A.1. Metodologías

A.1.1. Predicción de Cristalización

Los cálculos de predicción de cristalización fueron realizados por Rogeria Nunes Costa en colaboración con los grupos de investigación de la Dra. Lourdes Infantes del Instituto de Química y Física Rocasolano, España, y la Dra. Elna Pidcock del Cambridge Crystallographic Data Center.

Para predecir la propensión a la formación de cocristales de NVP con los diferentes coformadores, se utilizaron dos herramientas del CCDC (Cambridge Crystallographic Data Center): la detección por complementariedad molecular (MC)³ y la propensión a enlaces de hidrógeno (HBP)⁴. Ambas herramientas están disponibles en el software CSD.

MC es una herramienta desarrollada y validada por L. Fábían³, cuya salida es una respuesta simple de “PASA” o “FALLA” a la formación de los cocristales. Esto se basa en la premisa de que las moléculas tienden a cristalizar juntas sólo si tienen propiedades moleculares similares. Por lo tanto, se calculan algunos descriptores de forma y polaridad para el IFA y el coformador, y para pasar la prueba de MC, deben diferir en menos de un valor umbral establecido a partir de un análisis estadístico realizado en el CSD.

La herramienta HBP se desarrolló originalmente como un método basado en el conocimiento para evaluar el riesgo de polimorfismo para un compuesto dado, aunque también se puede usar para evaluar la formación de cocristales. Basado en un análisis estadístico automatizado de patrones de enlace de hidrógeno, el método HBP determina las probabilidades de interacción para todas las posibles interacciones de enlace de hidrógeno que pueden ser formados con el conjunto de grupos funcionales

presentes en el entorno químico específico analizado.

El cálculo HBP permitió evaluar la predisposición de formar enlace hidrógeno en una formación multicomponente, AB, donde A es NVP y B el coformador. Se consideran todos los posibles átomos donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno de ambas moléculas. La predisposición se calcula para todas las interacciones donor-aceptor entre A-A, B-B, A-B y B-A y se considera la propensión máxima en cada caso. Se calculó un Puntaje Multicomponente como la diferencia entre la propensión máxima a formar hetero-interacciones, AB o BA, y la propensión máxima para las homo-interacciones, AA o BB. Un puntaje multicomponente positivo y alto significa una mayor propensión a formar hetero-interacciones que a formar homo-interacciones y, en consecuencia, una mayor probabilidad de obtener sólidos multicomponentes que a mantenerse en estado puro.

A.1.2. Preparación de las muestras

El grupo de la Dra. Sperandeo utilizó el método de molienda asistida por líquido (LAG)⁵ para preparar los materiales multicomponentes. Para aquellos que contienen NVP probaron cinco coformadores diferentes: ácido salicílico (SA), sacarina (SAC), cafeína (CAF), teofilina (THE) y urea (URE). La NVP y el coformador se colocaron en un recipiente de molienda de acero inoxidable con 3 gotas de metanol como solvente. La NVP y el coformador se trituraron en proporciones estequiométricas de 1:1 y 2:1. Se añadieron bolas de acero inoxidable de 5 mm de diámetro al tubo que se colocó en un sistema de molino de rodillos. La mezcla se molió durante 24 horas. Posteriormente, los materiales se secaron a 40 °C durante 48 horas para generar muestras de polvo. Se obtuvieron cristales simples mediante saturación en cloroformo seguido de evaporación lenta del solvente. Todos los reactivos y solventes estaban en calidad analítica.

El grupo de la Dra Sperandeo, eligió como coformadores para los compuestos multicomponentes que contienen TNZ: ácido p-aminobenzoico (PABA), ácido salicílico (SA), ácido cítrico (CA), ácido succínico (SUC) y nicotinamida (NA). El TNZ y los coformadores (ambos como polvos) se mezclaron en una proporción estequiométrica 1:1 y se molieron manualmente en un mortero de ágata durante 120 min agregando unas gotas de acetona. También se realizó la cocrystalización de TNZ y los cinco coformadores mencionados en solución mediante el enfoque convencional basado en solución de evaporación lenta, pero sólo PABA y SA cocrystalizaron. Los procedimientos utilizados por el grupo de la Dra. Sperandeo fueron los siguientes:

TNZ:PABA: Se disolvieron 50,0 mg de una mezcla 1:1 de TNZ y PABA sometida a LAG en 6 mL de acetona-etanol (4:1, v/v) o t-butanol-acetona (1:1, v/v). Las soluciones filtradas se dejaron luego evaporar lentamente a 25-30°.

TNZ:SA: i) Se disolvieron 30,0 mg (0,12 mmol) de TNZ y 17,0 mg (0,12 mmol) de SA en 10 ml de etanol-agua (5:2, v/v), o ii) se disolvieron 30,0 mg de una mezcla 1:1 de TNZ y SA sometida a LAG en 10 ml de acetona-agua (1:4, v/v). Las soluciones

filtradas se dejaron luego evaporar lentamente a 25-30 °C.

De aquí en adelante, las muestras obtenidas mediante el uso de LAG y la evaporación del solvente se codificarán como TNZ:COFORMADOR_{LAG} y TNZ:COFORMADOR_{CRYST-SOLVENTE}, respectivamente. Se prepararon mezclas físicas (PM) en proporciones estequiométricas 1:1 mezclando suavemente con espátula por 3 min.

A.1.3. Difracción de Rayos X en polvo (PXRD)

Los compuestos puros de NVP, TNZ y los correspondientes coformadores, como también las nuevas muestras obtenidas para cada IFA, se caracterizaron mediante Difracción de Rayos X en Polvo (PXRD).

Los análisis de PXRD de las muestras de NVP fueron llevadas a cabo por Rogeria Nunes Costa en un difractómetro de rayos X automático de Rigaku para difracción de polvo (Ultima IV) usando una fuente de radiación Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Los datos se registraron a un voltaje 40 kV y una corriente de 30 mA. Las muestras se colocaron en geometría Bragg-Brentano (placa plana).^{6,7} El detector D/Tex Ultra funcionó en modo $2\theta/\theta$ en exploración continua a una velocidad de exploración de 20°/minuto. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, a un tamaño de paso de 0,01° en el rango angular de 5° a 35° 2θ .

Los patrones de PXRD de las muestras de TNZ fueron registraos por Octavio Fandiño también a temperatura ambiente en un difractómetro de polvo Bruker AXS D8 Advance a 40 kV, 40 mA con una fuente de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) entre 2° y 40° 2θ con un tamaño de paso de 0,05°.

A.1.4. Difracción de Rayos X de Cristal Único (SCXRD)

De los diez compuestos binarios obtenidos, pudieron aislarse tres monocristales: el monocristal NVP:SA¹, por el grupo de la Dra. Cuffini y los monocristales de TNZ:PABA y TNZ:SA², por el grupo de la Dra. Sperandeo. Sobre éstas muestras cada grupo realizó experimentos de Difracción de Rayos X de Cristal Único (SCXRD). Las estructuras obtenidas fueron reportadas en el CCDC con los códigos 1941056–1941057¹ (NVP:SA RT-100K), 1960455² (TNZ:PABA) y 1960462² (TNZ:SA)

Los experimentos SCXRD para NVP-SA fueron realizados por Rogeria Nunes Costa en un difractómetro Bruker D8 Venture (detector Photon 100 CMOS y radiación MoK α de la micro fuente Incoatec). Mientras que los datos SCXRD para TNZ:PABA y TNZ:SA fueron recopilados por Octavio Fandiño utilizando un difractómetro Bruker Apex Duo equipado con una corriente criogénica de nitrógeno, la cual se fijó en 173 K para ambos cristales.

Todos los átomos diferentes al hidrógeno se refinaron anisotrópicamente y todos los átomos de hidrógeno se colocaron en geometrías idealizadas de acuerdo con

el modelo de conducción. Se utilizaron diversas restricciones para describir el trastorno de la molécula de SA a temperatura ambiente en el compuesto NVP:SA, como también para explicar la presencia de solvente en el cristal del compuesto TNZ:PABA.

A.1.5. PXRD en función de la temperatura

Los experimentos de PXRD variando la temperatura fueron realizados, por integrantes del grupo de investigación de la Dra. Cuffini, en la línea de luz XRD1 del Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), de Brasil⁸. La línea de luz está dedicada al análisis de PXRD y está compuesta por un difractómetro de tres círculos de alta resistencia (Newport) y el sistema detector MYTHEN 24 K (Dectris). Las muestras se montaron en una geometría Debye-Scherrer utilizando capilares de borosilicato de 0,5 mm de diámetro. Esta geometría se seleccionó para evitar la orientación preferencial. Se usó un sistema de enfriamiento CryojetHT (OXFORD Instruments) para enfriar la muestra a una velocidad de enfriamiento de 2 K/min, de 300 K a 100 K. Los experimentos se realizaron a una radiación de 8 keV. La longitud de onda de la radiación se obtuvo en base a los datos del estándar de silicio (NIST SRM640D), que se recopiló al final del experimento.

A.1.6. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Los compuestos puros de NVP, TNZ y los correspondientes co-formadores, como también las nuevas muestras obtenidas, se caracterizaron mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Las curvas de DSC para las muestras de NVP fueron obtenidas en un calorímetro DSC 204 F1 Phoenix® NETZSCH por miembros del grupo de la Dra. Cuffini. Para caracterizar los materiales multicomponente, se colocaron 5 mg de cada muestra en un crisol de aluminio herméticamente cerrado y se escanearon en un rango de temperatura de 50 °C a 300 °C, utilizando una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Para la construcción de los diagramas de fase, se escanearon diferentes composiciones de sistemas eutécticos en un rango de temperatura de 50 °C a 300 °C, utilizando una tasa de calentamiento de 3 °C/min. Todas las muestras se escanearon en una atmósfera de aire y nitrógeno (70 mL/min) y se utilizó como referencia un crisol de aluminio vacío y sellado. El equipo se calibró utilizando como patrón indio, con punto de fusión (p.f.) a 156,6 °C, y zinc con p.f. a 419,6 °C. Los datos se procesaron en el software NETZSCH Proteus®.

Por su parte, las mediciones de DSC para los compuestos con TNZ fueron registradas en un analizador Discovery DSC por miembros del grupo colaborador de la Dra. Sperandeo, a una velocidad de calentamiento (β) de 10 °C/min bajo en una atmósfera de nitrógeno (con un 99,99% de pureza y una velocidad de flujo de 50 ml/min). Para las mediciones se colocaron entre 2 mg y 4 mg de muestra en bandejas de aluminio onduladas. Los ejes de temperatura se calibraron con indio (99,99% de pureza y con un p.f. a 156,598 °C). Se utilizaron como referencia recipientes

de aluminio vacíos. Los datos se trataron con el software TRIOS_Full_v4.1.1.33073 (TA Instruments Inc.).

A.1.7. Perfil de Disolución y Tasa de disolución intrínseca

Rogeria Nunes Costa, miembro del grupo colaborador de la Dra Cuffini determinó los perfiles de disolución para los compuestos NVP:THE, NVP:CAF y los precursores puros. Los mismos se obtuvieron en un sistema de disolución Distek Evolution 6100. Se utilizó un aparato USP II bajo agitación a 50 rpm. Los experimentos se llevaron a cabo en dos medios de disolución diferentes: agua y HCl 0,1 N. Se colocó un volumen de 900 ml del medio en un recipiente y se mantuvo a $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ durante todos los experimentos. Para cada muestra, se dispersaron 200 mg.

El grupo de la Dra Cuffini, calculó además la tasa de disolución intrínseca para los compuestos NVP:THE, NVP:CAF y los precursores puros. Se colocó una masa de 100 mg de cada muestra en la cavidad de 0,8 cm de diámetro del aparato. El polvo se comprimió a una presión de 1600 psi durante 60 s. El aparato que contiene el sedimento comprimido se colocó en 900ml de medio. Se utilizaron dos medios diferentes: agua y HCl 0,1 N. Se realizaron experimentos previos para confirmar que no se produjo ninguna transición de fase bajo presión ni en los diferentes medios.

A.1.8. Evaluación de la solubilidad

Las solubilidades de la materia prima TNZ y sus mezclas binarias fueron determinadas por Octavio Fandiño, miembro del grupo colaborador de la Dra. Sperandeo, mediante el método del matraz de agitación⁹ a $37 ^\circ\text{C}$ en agua. Se introdujeron cantidades excesivas de muestras sólidas ($n=3$) en viales con tapón de rosca que contenían 5 mL de agua Milli-Q ($\text{pH}=5,5$) y se agitaron en un baño de agua con agitación durante 24 h (tiempo para alcanzar la saturación). Se filtraron alícuotas de sobrenadantes ($0,45 \mu\text{m}$) y luego se analizó el contenido de TNZ mediante HPLC-UV (cromatógrafo de líquidos AGILENT S1100, inyector de circuito fijo de $20 \mu\text{L}$, detector UV-visible variable y auto muestreador) usando un método informado¹⁰ que usa un modo isocrático, tampón de dihidrogenofosfato de potasio 0,05 M ($\text{pH}=3,25$, ajustado con ácido ortofosfórico) y acetonitrilo (82:18, v/v). La fase móvil se filtró ($0,45 \mu\text{m}$) y se desgasificó al vacío; Columna Synergi-4 μ -Fusion RP-80 C18 (Phenomenex, 250 mm \times 4,6 mm, $4,5 \mu\text{m}$), temperatura de $40 ^\circ\text{C}$; caudal de 1,5 mL/min y detección a 210 y 300 nm. Se construyó una curva de calibración lineal que abarca un rango de concentración de 100-1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con $R_2=0,999$. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Después de la recolección de alícuotas, se filtraron las suspensiones y se midió el pH de los filtrados usando un medidor de pH Altronix EZDO-PC (S.A.E.N. S.R.L.).

A.2. Nevirapina

Como se presentó en el Capítulo 6, los métodos de cocrystalización representan una potencial ruta para obtener nuevas formas sólidas de Nevirapina (NVP) que mejoren sus propiedades físicoquímicas y biofarmacéuticas desfavorables como la baja solubilidad acuosa^{11,12}. A continuación se resumen algunos resultados de la obtención y caracterización de nuevas formas sólidas de NVP realizado por el grupo colaborador de la Dra. Silvia Cuffini.

A.2.1. Predicción de Cocrystalización de compuestos de NVP

Para predecir la predisposición para la formación de cocrystalos de NVP, se utilizaron las herramientas MC³ y HBP⁴. En la Tabla A.1, se muestran los resultados de la prueba MC para la cocrystalización entre NVP y los coformadores elegidos.

Tabla A.1 Resultados de Complementariedad Molecular (MC), para el mapeo de cocrystalos de Nevirapina.

Coformador	Resultado MC
Urea (URE)	FALLA
Sacarina (SAC)	PASA
Ácido Salicílico (SA)	PASA
Teofilina (THE)	PASA
Cafeína (CAF)	PASA

Los valores fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Los resultados indican que es probable que la mayoría de los coformadores seleccionados formen cocrystalos multicomponentes con NVP, excepto URE. Esto se debe principalmente a que URE contiene una fracción de átomos que no son hidrógenos (N y O) tres veces mayor a la que posee NVP.

A continuación, se evaluó la predisposición a formar enlaces hidrógeno mediante HBP, y los resultados se resumen en la Tabla A.2. Allí pueden verse los valores de hallados, cuál es la máxima interacción posible y cuál el puntaje multicomponente que resulta del análisis de los datos de HBP.

Tabla A.2 Resultado HBP de la predisposición para formar enlace hidrógeno en una formación multicomponente, AB. Donde el componente A es NVP.

Componente B	Máxima interacción	Predisposición máxima			Puntaje Multicomponente
		A:B o B:A	A:A	B:B	
URE	B:B	0.94	0.45	0.95	-0.01
SAC	B:B	0.50	0.42	0.57	-0.07
SA	B:A	0.69	0.52	0.33	0.17
THE	B:A	0.63	0.44	0.56	0.07
CAF	A:A	0.25	0.41	--	-0.16

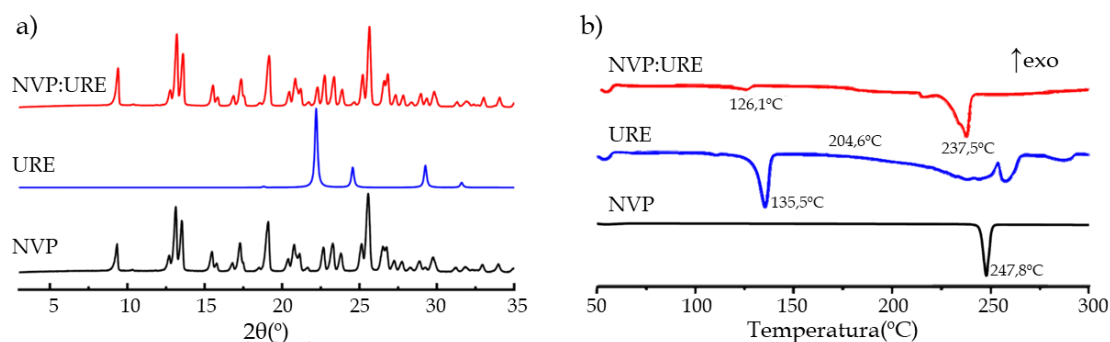
Los valores fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Los puntajes multicomponentes se muestran en la Tabla A.2 usando una analogía de semáforo. SA, en verde, es la molécula con mayor probabilidad de formar un sólido multicomponente con NVP mediado por interacciones con hidrógeno. Por otro lado, CAF exhibe la puntuación negativa más alta, esto se debe principalmente a que la molécula de CAF no tiene grupos donores de enlaces H, lo que afecta los resultados de este tipo de cálculos. Finalmente, THE, SAC y URE, en amarillo, exhiben valores intermedios de puntaje multicomponente.

Puede verse que la herramienta MC predice posibles cristalizaciones multicomponentes entre todos los coformadores y NVP, excepto para URE. Mediante HBP se pudieron establecer probabilidades de cocrystalización mediada por enlaces hidrógeno en el caso de SA (probabilidad más alta), THE y SAC (probabilidad más baja). Para URE esta herramienta predice una alta probabilidad de interacciones hidrógeno entre URE:URE, y un muy bajo puntaje multicomponente, por lo que permitiría descartar URE como posible coformador.

A.2.2. NVP:URE

Los patrones PXRD y las curvas DSC para NVP, Urea (URE) y el compuesto NVP:URE se muestran en la Figura A.1. Aunque en bibliografía Nalte et al.¹³ describieron al compuesto NVP:URE como un cocrystal, con un punto de fusión diferente al de los compuestos precursores, los resultados de DSC indican que esta muestra consiste en una mezcla física. Al mismo tiempo, los datos de PXRD confirman esta observación, ya que el patrón PXRD de NVP:URE es igual a la suma de los patrones de los compuestos NVP y URE. Estas observaciones son coincidentes con las obtenidas mediante RMN.

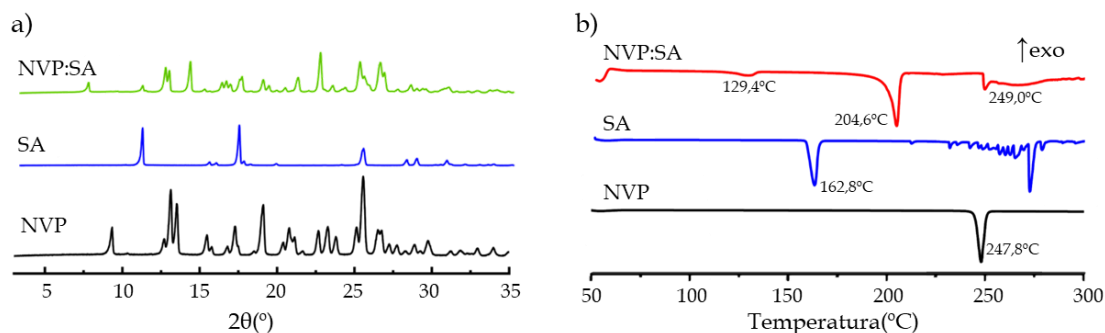


Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.1 a) Patrón PXRD, b) Curvas DSC para las muestras NVP, URE y el compuesto NVP:URE.

A.2.3. NVP:SA

Se analizaron los resultados experimentales obtenidos para las muestras preparadas a partir de NVP y Ácido Salicílico (SA). La Figura A.2 muestra los patrones de difracción (a) y las curvas DSC (b) obtenidas tanto para los compuestos NVP y SA puros, como para el material formado a partir de ellos.



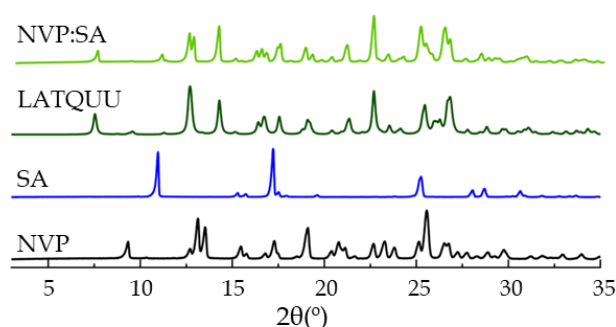
Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.2 a) Patrones PXRD y b) Curvas DSC de las muestras NVP, SA y el compuesto NVP:SA.

La fase observada por difracción y los eventos térmicos vistos por DSC confirman las conclusiones obtenidas mediante espectroscopía de RMN: la muestra NVP:SA es un cocrystal. Al igual que el cocrystal de NVP:SAC, éste ya había sido reportado por Caira et. al.¹⁴ por lo que se realizó una comparación de los patrones de difracción obtenidos, con el patrón de difracción de la estructura reportada (código de referencia CSD: LATQUU). Cabe destacar que la estructura de Caira fue determinada a 100K, mientras que los datos de PXRD se recolectaron a temperatura ambiente. Se observaron algunas diferencias entre los patrones de ambos cocrystal, principalmente a aproximadamente 12,5 ° y en la región entre 15 ° y 20 ° que podría ser evidencia de cambios estructurales con la temperatura (

Los patrones de difracción fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.3).



Los patrones de difracción fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.3 Patrones PXRD para la muestra de NVP:SA en comparación con los materiales precursores y la estructura reportada para el cocrystal de NVP y SA (LATQUU)¹⁴.

Se obtuvieron monocristales de NVP:SA mediante experimentos de evaporación lenta, los cuales se utilizaron para determinar su estructura cristalina mediante difracción de rayos X de monocristal (SCXRD). Los parámetros cristalográficos se resumen en la Tabla A.3.

Las estructuras del nuevo compuesto multicomponente de NVP:SA a temperatura ambiente (RT) y 100 K (LT) presentan el mismo Grupo espacial, P-1; y la misma estequiometría 2:1 NVP:SA. Sin embargo, la celda unidad a baja temperatura tiene el doble de volumen que la celda a temperatura ambiente. Por otro lado, el número de moléculas independientes de la simetría en la estructura cristalina (Z') cambia al cambiar la temperatura. NVP-SA a RT posee un Z' igual a 1, mientras que la estructura a LT tiene Z' igual a 2. (Figura A.4 a y b). Se observa de las estructuras halladas que las moléculas de NVP cristalizan formando canales, donde se alojan las moléculas de SA. En la Figura A.4 c se ilustra esta disposición para una molécula de SA (izquierda) y para una sección mayor del cocrystal (derecha). Dentro de esos canales, las moléculas de SA a RT se encuentran desordenadas en dos posibles orientaciones, mientras que a LT esto no ocurre.

Tabla A.3 Información cristalográfica de NVP:SA a Temperatura Ambiente (RT) y 100K (LT), y de la estructura reportada LATQUU¹⁴.

	NVP:SA (RT)	NVP:SA (LT)	LATQUU
Fórmula Empírica	2(C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O).(C ₇ H ₆ O ₃)	2(C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O).(C ₇ H ₆ O ₃)	2(C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O).(C ₇ H ₆ O ₃)
Peso Fórmula	670,72	670,72	670,72
Temperatura[K]	290	100	100(2)
Sistema cristalino	Triclinico	Triclinico	Triclinico
Grupo espacial	P-1	P-1	P $\bar{1}$ (2)
a [Å]	7,1767(4)	11,1691(11)	11,155(1)
b [Å]	9,6278(5)	12,5867(13)	12,619(2)
c [Å]	11,9235(6)	13,3946(14)	13,464(2)
α [°]	96,865(2)	113,295(3)	113,374(2)
β [°]	93,039(2)	99,352(3)	99,133(2)
γ [°]	98,126(2)	107,282(3)	107,324(2)
Volúmen [Å ³]	807,69(7)	1565,0(3)	1575,8(3)
Z'	1	2	2
ρ_{calc} [g/cm ³]	1,379	1,423	1,414

Las estructuras cristalinas fueron obtenidas por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Con el fin de establecer a qué temperatura ocurre el duplicado de la unidad asimétrica, se diseñó un experimento para recolectar patrones de PXRD a diferentes temperaturas. El experimento permitió la recolección de un patrón PXRD cada 1,2 K en el rango de 300 K y 100 K. Se obtuvo un gráfico de contorno de todos los patrones de difracción que se muestra en la Figura A.5. Este gráfico permite visualizar la variación de intensidad en las reflexiones 2θ a través del rango de temperatura.

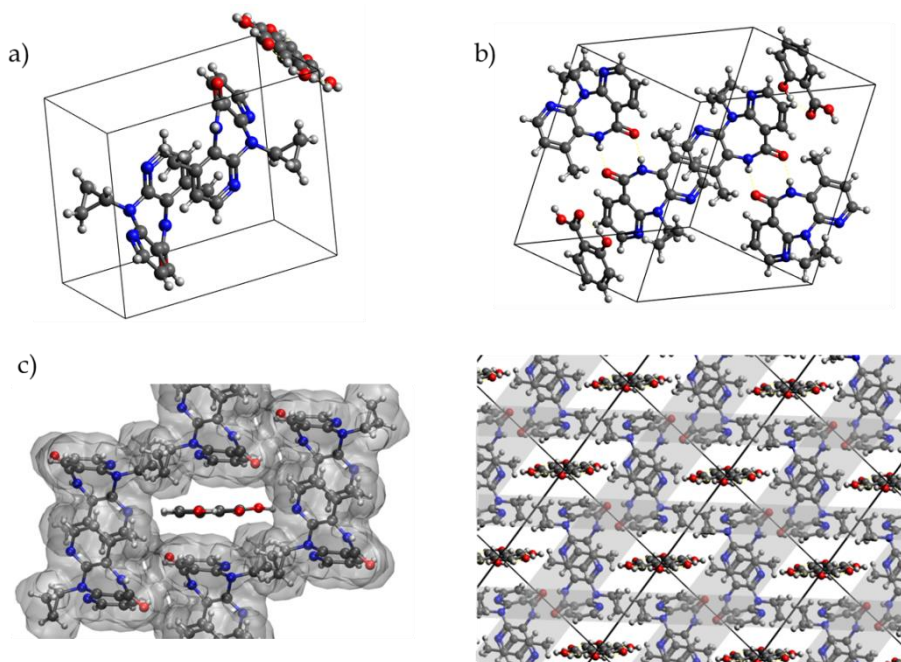
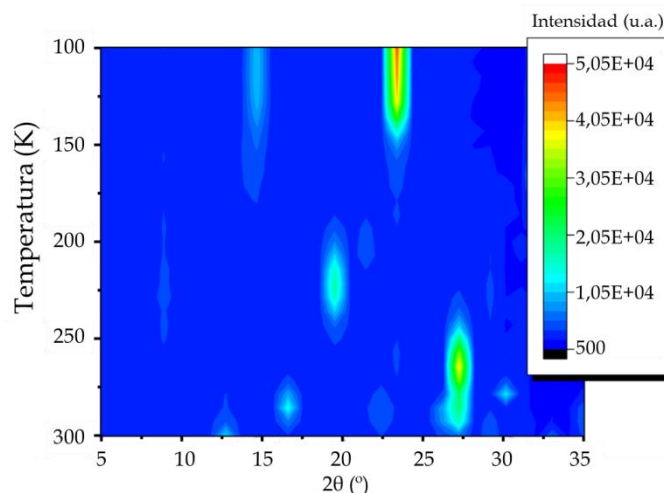


Figura A.4 Representación de la celda unidad del cocrystal NVP:SA a a) Temperatura Ambiente y b) 100 K. c) Representación del cristal NVP:SA donde se marcan los canales que forma NVP.



Los patrones de difracción fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.5 Gráfico de contorno obtenido de patrones PXRD a diferentes temperaturas en el rango entre 300 K y 100 K.

Es posible ver que las reflexiones comienzan a variar alrededor de los 285 K, pero se pueden ver dos patrones claramente diferentes antes y después de 175 K. A medida que la temperatura disminuye, pueden surgir o desaparecer reflexiones. A los 23° , por ejemplo, se observa una reflexión intensa después de los 170 K, que no se observaba a temperaturas más altas. Del mismo modo, puede verse que las reflexiones a $21,5^\circ$ y a $25,5^\circ$ desaparecen. En otros casos, se observa sólo corrimiento de las señales debido a los cambios de temperatura. Es entonces posible decir, que se produce una transición estructural donde a partir de los 180 K se obtiene una fase completamente diferente a la fase a RT.

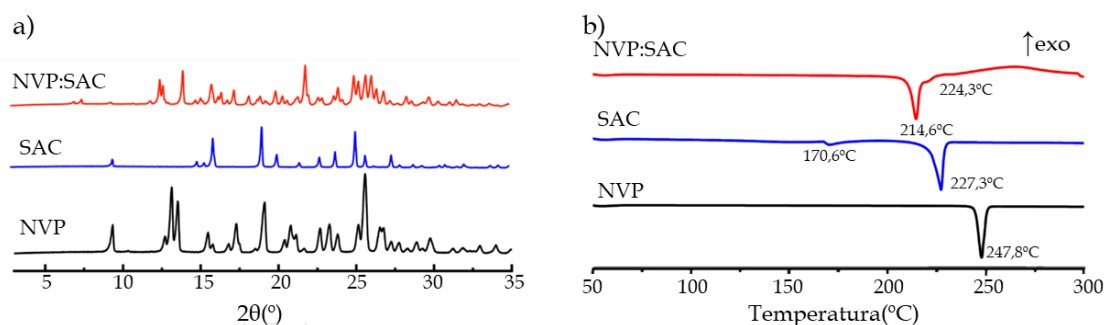
Finalmente, se comparó la estructura cristalinas de NVP:SA obtenida por SCXRD a 100 K con la estructura LATQUU reportada por Caira¹⁴. Se observa que ambas presentan la misma celda unitaria y grupo espacial aunque la disposición de las moléculas de SA dentro del canal no es la misma. En la estructura LATQUU las moléculas de SA se encuentran desordenadas, mientras que en la estructura NVP:SA LT no. Esto puede deberse a que, aunque ambas estructuras se recopilaban a 100 K; los experimentos se llevaron a cabo de manera diferente. En los experimentos realizados por el grupo de la Dra. Silvia Cuffini, se mantuvo el cristal montado en el goniómetro durante el enfriamiento, mientras que en LATQUU, el cristal se congeló instantáneamente. Esta variación del proceso de enfriamiento puede marcar la diferencia observada en los patrones; cabe destacar además que el desorden observado en LATQUU no coincide con el observado a RT por lo tanto no se produjo un simple congelamiento sin reacomodo de la estructura inicial. Se puede concluir entonces, que el cocrystal NVP:SA posee la misma fase cristalina que el LATQUU aunque con diferencias en el desorden de las moléculas de SA.

A.2.4. NVP:SAC

Se llevó a cabo el análisis de los resultados de las diferentes técnicas experimentales para identificar las fases cristalinas obtenidas después de la preparación de las muestras utilizando NVP y Sacarina (SAC). En la

Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.6 se muestran los patrones de difracción (a) y las curvas DSC (b) de los compuestos NVP y SAC puros, y del compuesto obtenido a partir de ellos.

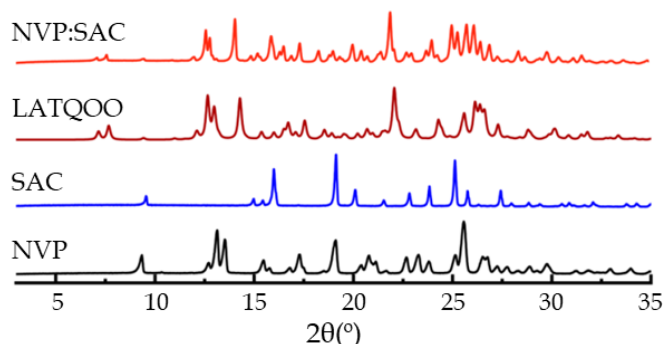


Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.6 a) Patrón PXRD, b) Curvas DSC para las muestras NVP, SAC y el compuesto NVP:SAC.

Los patrones de difracción de NVP:SAC, forman una única fase cristalina diferente a la de los cristales precursores, sugiriendo la formación de un cocrystal. Los eventos observados en las curvas DSC de este compuesto confirma dicha hipótesis. Este resultado es coincidente con las conclusiones a las que se llegó con el análisis de los espectros de RMN.

El cocrystal NVP:SAC, fue reportado previamente por Caira et. al.¹⁴, por lo que se realizó una comparación de los patrones de difracción obtenidos aquí con los de las estructuras informadas en el CSD. Se muestra dicha comparación en la Figura A.7. Al comparar NVP:SAC con la estructura reportada (código de referencia CSD: LATQOO), se observó que, aunque los métodos de preparación de la muestra difieren, se obtuvo la misma fase cristalográfica registrada por Caira et al¹⁴.

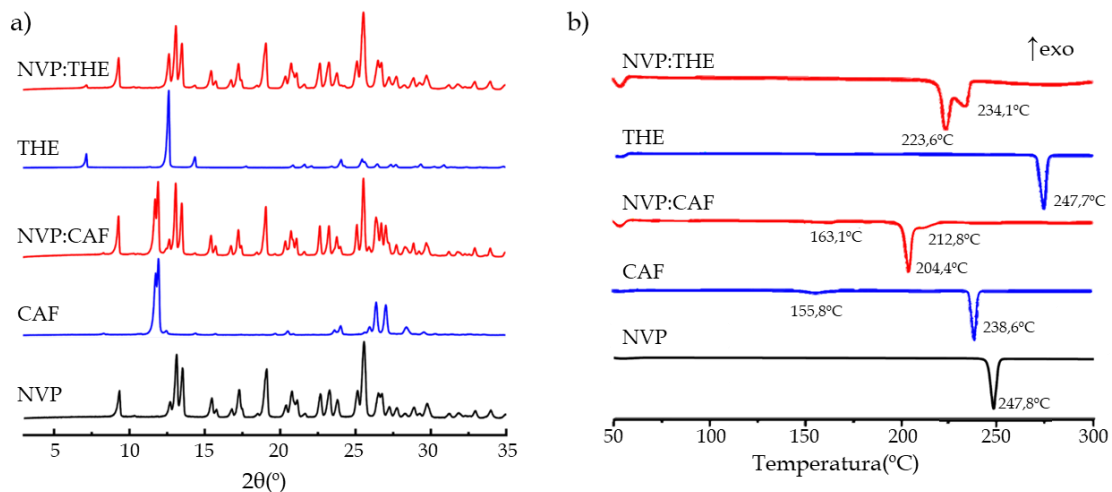


Los patrones de difracción fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.7 Patrones de difracción de NVP:SAC en comparación con los materiales precursores y la estructura reportada en el CSD (LATQOO)¹⁴.

A.2.5. NVP:THE y NVP:CAF

Los patrones PXRD y las curvas DSC para NVP, Teofilina (THE), Cafeína (CAF) y los compuestos NVP:THE y NVP:CAF se muestran en la Figura A.8. Al comparar los patrones de difracción de los compuestos NVP:THE y NVP:CAF con los de NVP y THE o CAF, respectivamente, se observó que los mismos corresponden a una superposición de los patrones de los precursores, del mismo modo que ocurría con NVP:URE. Además, la misma observación se había realizado a partir de las mediciones de RMN. Sin embargo, las curvas DSC mostraron un comportamiento térmico interesante; en ambos casos la endoterma correspondiente al compuesto muestra un punto de fusión menor a los puntos de fusión de los precursores. Dado que un compuesto eutéctico corresponde a sistemas multicomponentes multifásicos es de esperarse que la espectroscopía de RMN y PXRD muestren fases separadas de las componentes. Sin embargo, la presencia de un punto de fusión a menor de los compuestos indica que estos sistemas podrían ser compuestos eutécticos.

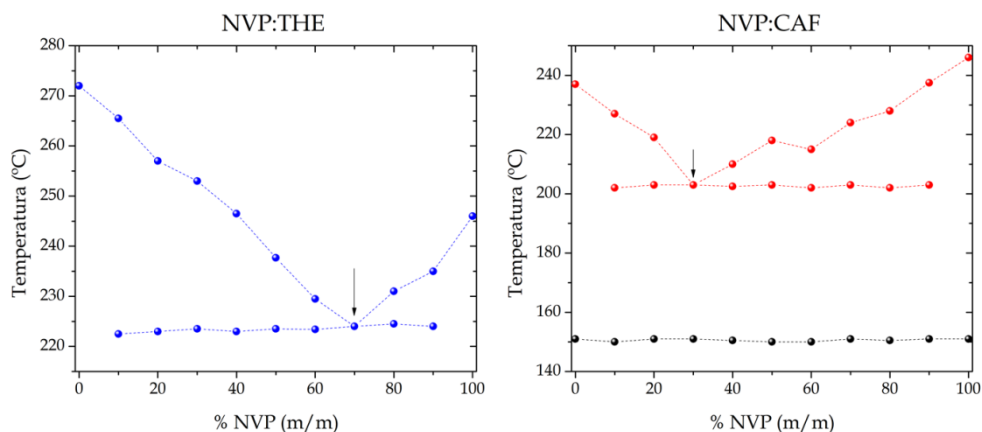


Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.8 a) Patrones PXRD y b) Curvas DSC para las muestras NVP, THE, CAF y los compuestos NVP:THE y NVP:CAF.

Para investigar los sistemas eutécticos, se analizaron diferentes composiciones de NVP:THE y NVP:CAF mediante DSC. Se obtuvieron once curvas para cada sistema, correspondientes a NVP puro, coformador puro (THE o CAF) y muestras en proporciones de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 y 9:1 (m/m). Ambos sistemas, NVP:THEO y NVP:CAF, presentaron comportamientos similares. Para cada conjunto de una mezcla, existe una curva donde solo aparece un evento y corresponde a la composición eutéctica del sistema. En todas las demás curvas se observó un evento correspondiente al derretimiento del eutéctico, seguido de un segundo evento. Este segundo evento corresponde al exceso de NVP o co-formador, que tiene un punto de fusión variable según la composición.

A partir de las curvas térmicas obtenidas a diferentes composiciones, se generaron diagramas de fase para ambos sistemas (Figura A.9). En el caso de NVP:THE, se pueden distinguir claramente las líneas líquido y sólido. La línea sólida correspondiente a la curva constante a aproximadamente 222 °C. Esta línea marca la temperatura donde la mezcla eutéctica comienza a derretirse, es decir, la temperatura eutéctica. En el caso de NVP:CAF, una temperatura eutéctica alrededor de 202 °C está presente en todas las composiciones, marcando la línea sólida de este diagrama y, en consecuencia, la temperatura eutéctica. Además, se aprecia una línea en torno a los 153 °C que corresponde a la transición de fase de CAF. La intersección de las líneas líquido y sólido en cada diagrama permite obtener la composición eutéctica en cada sistema. Usando el ajuste lineal, fue posible determinar la composición eutéctica de 70:30 (% m/m) para NVP:THE y 36:64 (% m/m) para NVP:CAF.



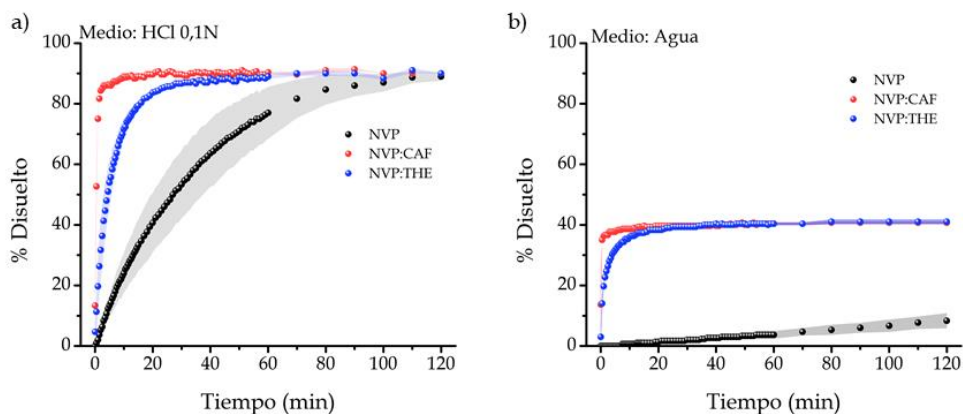
Los diagramas de fase fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.9 Diagramas de fase para los sistemas NVP:THE y NVP:CAF. Las flechas indican los puntos eutécticos de cada sistema. Los puntos negros del diagrama de fase NVP:CAF, corresponden a la transición de fase propia de CAF.

A.2.6. Perfil de Disolución y Tasa de disolución intrínseca

Como se discutió en el Capítulo 1, las nuevas formas sólidas en compuestos farmacéuticos representan la oportunidad de mejorar las propiedades fisicoquímicas de los IFA. En particular, se ha demostrado que los cocrystalos presentan mejoras en la disolución del IFA respecto del compuesto puro. Para los cocrystalos aquí estudiados, Caira et. al.¹⁴ y Samsodien et. al.¹⁵ reportaron mejoras en los perfiles de disolución de NVP:SAC y NVP:SA respecto de NVP pura, de un 30% y un 50% respectivamente. Resultados que muestran la ventaja de los cocrystalos frente al fármaco puro en cuanto a la cinética de disolución.

Se realizaron estudios de los perfiles de disolución de NVP, NVP:THE y NVP:CAF, ya que se ha demostrado que los sistemas eutécticos pueden presentar mejoras en las características de disolución¹⁶ respecto de los componentes activos puros. Los perfiles de disolución se realizaron tanto en agua como en HCl 0,1N (Figura A.10).



Los perfiles de disolución fueron obtenidos por Rogeria Nunes Costa. Fuente Tesis de Rogeria Nunes Costa.

Figura A.10 Perfiles de disolución de NVP, NVP:THE y NVP:CAF en a) HCl 0,1N y b) agua.

Como se observa en la Figura A.10Figura A.10 a, en el medio HCl 0,1N, NVP:THE tarda menos de 20 minutos en disolver el 80% de su cantidad inicial y NVP:CAF menos de 5 minutos, mientras que NVP puro tarda más de 80 minutos en disolver la misma cantidad¹. En el caso de los perfiles de disolución en agua (Figura A.10 b), la ventaja observada es aún mayor. Mientras que menos del 10% de NVP puro se disuelve en 2 horas, los nuevos materiales alcanzan el 40% del material disuelto en menos de 20 minutos para NVP:THEO y en menos de 5 minutos para NVP:CAF¹.

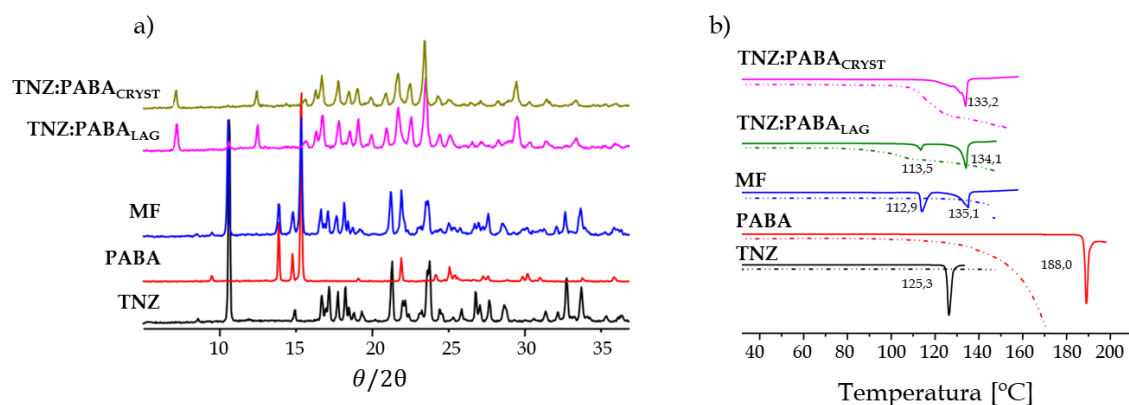
Estos resultados favorables respecto a la cinética de disolución, están en concordancia con la hipótesis de que ambos compuestos, NVP:THE y NVP:CAF son sistemas eutécticos. Esto lleva a que éstos sistemas pueden presentar mejoras en las características de disolución respecto de los componentes activos puros¹⁶.

A.3. Tinidazol

Del mismo modo que para los compuestos de NVP, los métodos de cocrystalización representan una herramienta viable para la obtención de nuevas formas sólidas de Tinidazol (TNZ), tal como se presentó en el Capítulo 6. A continuación se resumen algunos resultados de la obtención y caracterización de nuevas formas sólidas de TNZ realizado por el grupo colaborador de la Dra. Norma R. Sperandeo.

A.3.1. TNZ:PABA

Se registraron patrones PXRD y curvas DSC en TNZ, Ácido p-Aminobenzoico (PABA), su mezcla física (MF) y el compuesto binario TNZ:PABA obtenido por LAG y evaporación lenta (CRYST), los mismos se presentan en la Figura A.11.



Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Octavio Fandiño. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

Figura A.11 a) Patrones PXRD y b) Curvas DSC de las muestras TNZ, PABA, MF, TNZ:PABA_{LAG} y TNZ:PABA_{CRYST}.

Los patrones PXRD de las muestras TNZ:PABA_{LAG} (línea rosa Figura A.11 a) y TNZ:PABA_{CRYST} (línea marrón Figura A.11 a) no se presentaron como superposiciones de los de los constituyentes de partida (líneas negra y roja Figura A.11 a), como si lo fue su MF (línea azul Figura A.11 a). Estas observaciones confirman la formación de una nueva fase sólida; además como los patrones de ambas muestras coincidieron entre sí, puede asegurarse que ambas fases son isoestructurales.

Las curvas de DSC de TNZ y PABA (líneas negra y roja Figura A.11 b) mostraron endotermas de fusión nítidas únicas a 125,3°C y 188,0°C, respectivamente. En contraste, las curvas DSC de sus MF (línea azul Figura A.11 b) y los productos binarios (líneas verde y rosa Figura A.11 b) exhibieron dos endotermas. Estas diferencias en los eventos térmicos está de acuerdo con las observaciones de PXRD y RMN, sobre que los compuestos TNZ:PABA_{LAG} y TNZ:PABA_{CRYST} son nuevas fases cristalinas, por lo que estamos en condiciones de asegurar que forman un cocrystal. Por otro lado el comportamiento térmico también nos permite asegurar que los compuestos

están solvatados, es decir hay presencia de solvente en la muestra cristalina, tal como se había observado por RMN.

En la Tabla A.4 se recopilan los datos SCXRD para TNZ:PABA_{CRYST-tBu}.

Tabla A.4 Información cristalográfica para TNZ:PABA

Fórmula Empírica	(C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S).(C ₇ H ₇ NO ₂).0,4(C ₄ H ₁₀ O)
Peso Fórmula [g/mol]	414,06
Temperatura[K]	173
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n (N ^o 14)
a [Å]	5,8529(4)
b [Å]	14,2198(11)
c [Å]	24,304(2)
β [°]	90,179(2)
Volúmen [Å ³]	2022,8(3)
Z	4
ρ _{calc} [g/cm ³]	1,360

La estructura cristalina fue obtenida por Mino Caira. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

Tal como se predijo a partir de los datos de RMN, la unidad asimétrica del cocrystal TNZ:PABA, contiene una molécula de TNZ y una de PABA, como puede verse en la Figura A.12 a. Además, la presencia de solvente en la estructura observada por RMN también fue confirmada, Figura A.12 b. Así, los resultados de SCXRD confirman que la estructura de TNZ:PABA es un cocrystal solvatado.

Por otro lado, a partir de los corrimientos químicos de TNZ y PABA se predijo que la región de interacción entre ambas moléculas debía darse a entre los hidrógenos unidos a C8 o el N3 del anillo de TNZ y el grupo carboxil de SA. Esto puede observarse en la Figura A.15 a, donde la interacción TNZ...PABA se da en N3...H-O-C15.

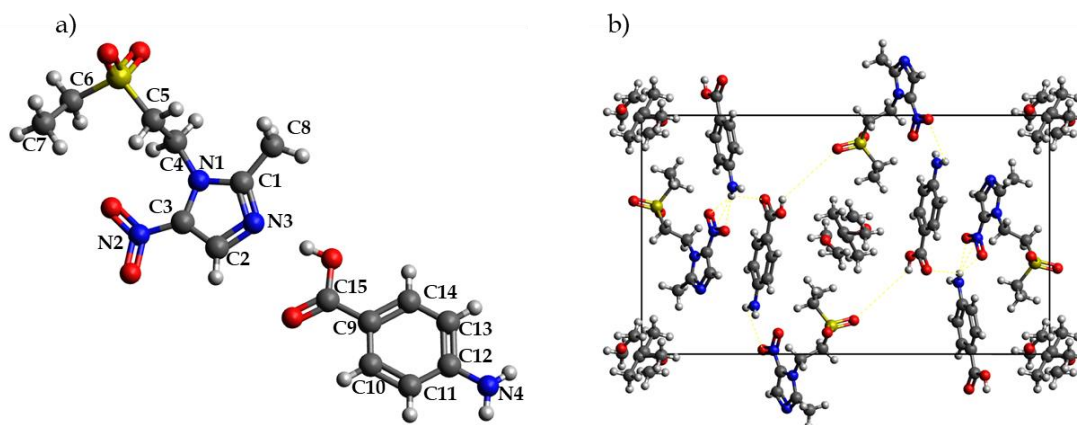
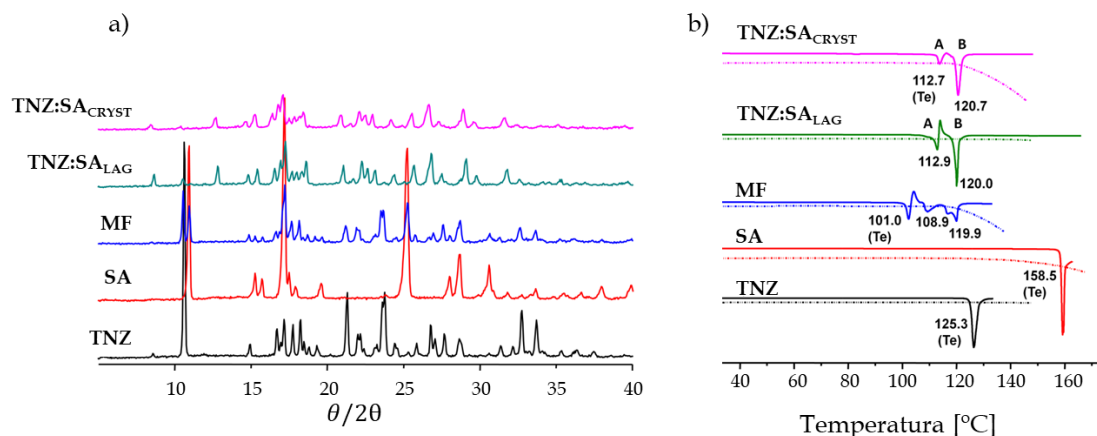


Figura A.12 a) Unidad asimétrica del cocrystal en la estructura de TNZ:PABA_{CRYST}. El solvente se omite para mayor claridad. b) Proyección de la estructura cristalina TNZ:PABA. Se muestran las componentes superpuestas del desorden de la molécula.

A.3.2. TNZ:SA

Las mediciones de los patrones PXRD y las curvas DSC para TNZ, SA, su MF y los dos productos binarios TNZ:SA se presentan en la Figura A.13. La comparación de dichos patrones revela que ambas muestras de TNZ:SA (líneas rosa y verde en Figura A.13 a), presentan diferencias respecto de los compuestos precursores (líneas negra y roja Figura A.13 a) y de su MF (línea azul Figura A.13 a). Además están en estrecha correspondencia entre sí, lo que indica que se obtuvo, una nueva fase cristalina y que los dos métodos, LAG y evaporación de solvente (CRYST), producen la misma estructura.



Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Octavio Fandiño. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

Figura A.13 a) Patrones PXRD y b) Curvas DSC de las muestras TNZ, SA, MF, TNZ:SA_{LAG} y TNZ:SA_{CRYST}.

Las curvas DSC de TNZ:SA_{LAG} y TNZ:SA_{CRYST} (líneas rosa y verde Figura A.13 b) muestran dos endotermas, señaladas con las letras A y B, y un exoefecto. Las endotermas aparecieron alrededor de 113°C y 120°C, y el exoefecto alrededor de 115°C. Por lo tanto, los tres eventos ocurrieron a temperaturas por debajo de las temperaturas DSC medidas para TNZ (125,3 °C) y SA (158,5 °C). Este comportamiento término confirma la nueva fase cristalina, coincidiendo con lo observado por RMN y PXRD.

Se aislaron monocristales de TNZ:SA_{CRYST}, lo que permitió la caracterización mediante SCXD. En la Tabla A.5 se recopilan los datos obtenidos.

Tabla A.5 Información cristalográfica para TNZ:SA

Fórmula Empírica	(C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S).(C ₇ H ₆ O ₃)
Peso Fórmula [g/mol]	385,39
Temperatura[K]	173
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c (N° 14)
a [Å]	5,7785(2)
b [Å]	14,5717(6)
c [Å]	20,6134(8)
β [°]	92,3510(10)
Volúmen [Å ³]	1734,24(12)
Z	4
ρ_{calc} [g/cm ³]	1,476

La estructura cristalina fue obtenida por Mino Caira. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

La Figura A.14 muestra la unidad asimétrica de la estructura TNZ:SA, la cual consta de una molécula de TNZ y una molécula de ácido (SA) que están unidas por un fuerte enlace hidrógeno entre C22OH \cdots N3, confirmando la naturaleza de cocrystal de este producto. Tal como se predijo mediante espectroscopía de RMN, la interacción TNZ \cdots SA se da mediante el grupo carboxil de SA.

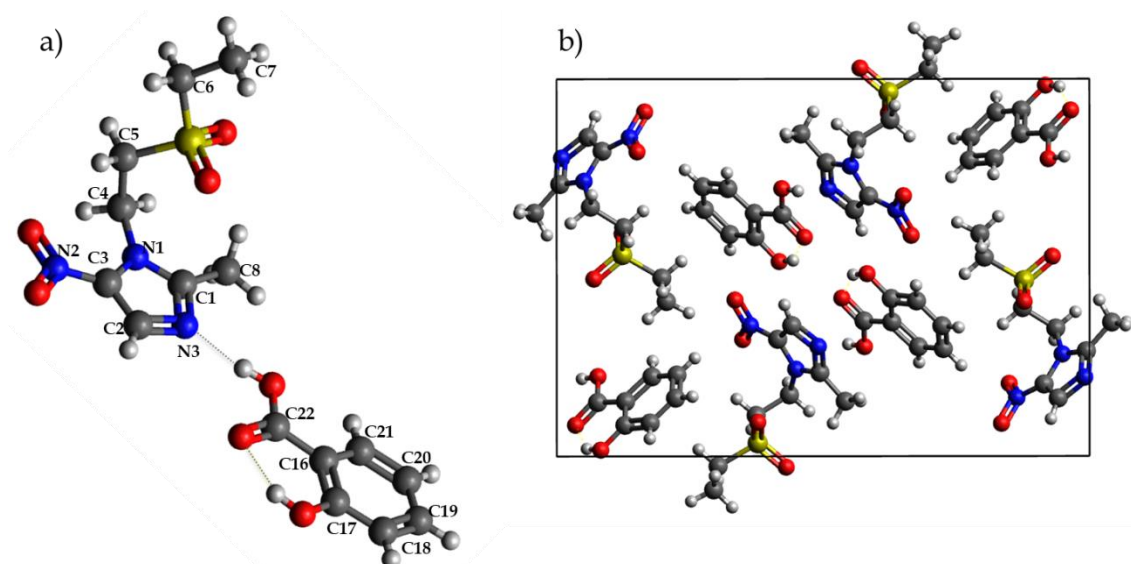


Figura A.14 a) Unidad asimétrica y b) Celda unidad del cocrystal TNZ:SA.

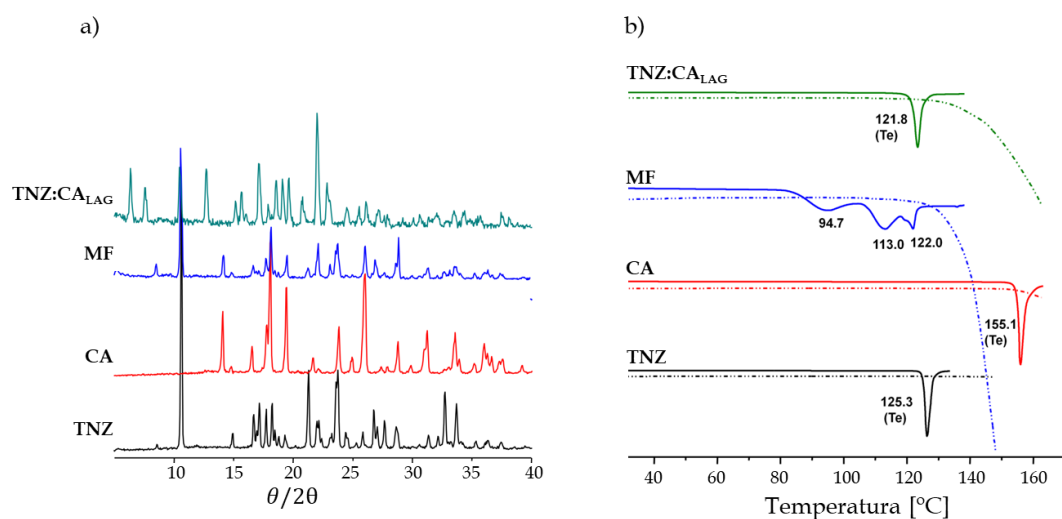
Se observó además que la formación de ambos cocrystal en TNZ:PABA y TNZ:SA se obtienen por interacción de los mismos grupos funcionales (Figura A.13 a y Figura A.14 a), aunque la cadena 2-etilsulfoniletilo de TNZ adopta conformaciones significativamente diferentes en cada estructura. Además, las estructuras supramoleculares (Figura A.13 b y Figura A.14 b) de estos cocrystal son totalmente diferentes debido a la presencia del grupo amina en PABA y la limitada funcionalidad grupos en SA.

A.3.3. TNZ:CA

Los patrones de PXRD y las curvas DSC de TNZ:CA_{LAG}, sus componentes individuales y su MF se muestran en la Figura A.15.

Es evidente que el patrón de polvo de TNZ:CA_{LAG} (línea verde en Figura A.15 a) no es la suma de los patrones de TNZ (línea negra en Figura A.15 a) y CA (línea roja en Figura A.15 a), ni es como el de su MF (línea azul en Figura A.15 a), revelando así la formación de una nueva fase cristalina que no es una mezcla eutéctica. Por su parte, la curva DSC de TNZ:CA_{LAG} (línea verde en Figura A.15 b) exhibe una única endoterma aguda a 121,8°C. Aunque este pico de fusión se produce a una temperatura inferior a la de TNZ, no representa una fusión eutéctica ya que los datos de PXRD y de RMN habían indicado que TNZ:CA_{LAG} es una nueva fase cristalina. En conclusión, se obtuvo una nueva fase cristalina, con un punto de fusión diferente al de los precursores, es

decir se obtuvo un cocrystal de TNZ y CA.



Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Octavio Fandiño. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

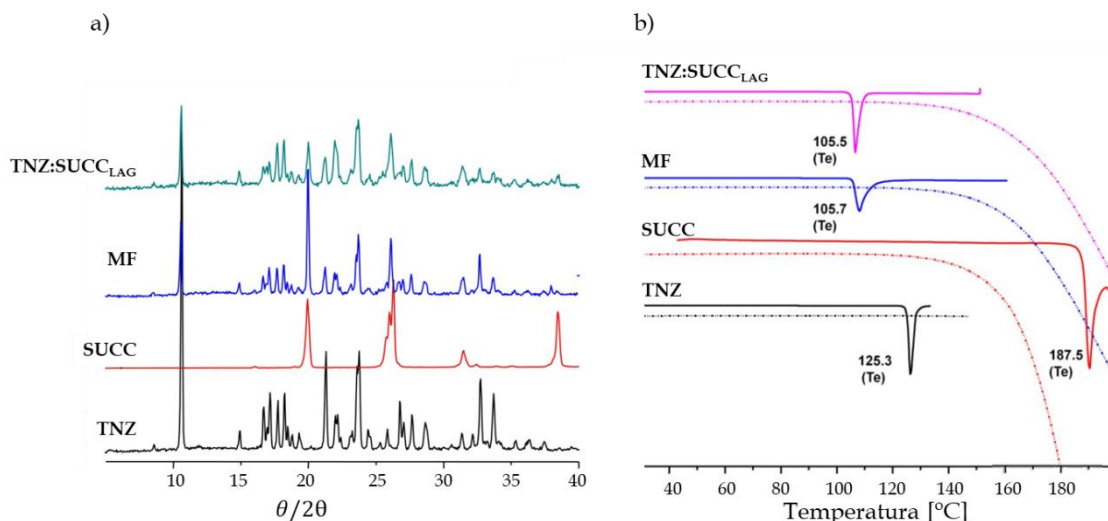
Figura A.15 a) Patrones PXRD y b) Curvas DSC de las muestras TNZ, CA, MF y TNZ:CA_{LAG}.

A.3.4. TNZ:SUCC y TNZ:NA

Los patrones de PXRD y las curvas DSC de TNZ:SUCC_{LAG}, TNZ:NA_{LAG}, sus componentes individuales y su MF se muestran en las Figura A.16 y Figura A.17, respectivamente.

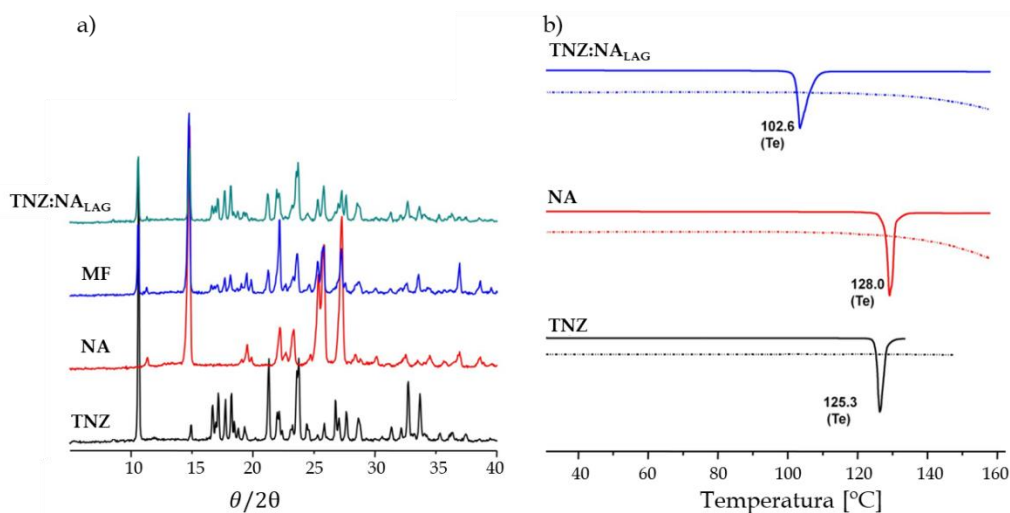
Los patrones PXRD de TNZ:SUCC_{LAG} (línea verde Figura A.16 a) y TNZ:NA_{LAG} (línea verde Figura A.17 a) son la superposición de los de los respectivos materiales de partida, y son coincidentes con sus respectivas MF, lo que indica que no existe interacción fuerte entre las componentes de los compuestos binarios.

Las curvas DSC de TNZ:SUCC_{LAG} (línea verde Figura A.16 b) y TNZ:NA_{LAG} (línea azul Figura A.17 b) mostraron, endotermias simples a 105,5°C y 102,6°C, respectivamente. Teniendo en cuenta que estos endotermias ocurren a temperaturas inferiores de las temperaturas observadas para TNZ y cada coformador, y que RMN y PXRD indicaron que no existe interacción entre el IFA y los coformadores, estas muestras representan mezclas eutécticas.



Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Octavio Fandiño. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

Figura A.16 a) Patrones PXRD y b) curvas DSC de las muestras TNZ, SUCC, MF y TNZ:SUCC_{LAG}.



Los patrones de difracción y curvas de DSC fueron obtenidos por Octavio Fandiño. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

Figura A.17 a) Patrones PXRD y b) curvas DSC de las muestras TNZ, NA, MF y TNZ:NA_{LAG}.

A.3.5. Evaluación de la solubilidad acuosa

Las solubilidades acuosas (SW por su nombre en inglés) experimentales a 37°C de TNZ, y los cinco nuevos productos obtenidos, se enumeran en la Tabla A.6. Se muestra además el cociente de solubilidades para evaluar su ventaja frente a TNZ puro.

La SW de TNZ es de 9,6mg/ml frente a la de los tres cocrisales hallados, TNZ:PABA, TNZ:SA y TNZ:CA, que son de 7,2mg/ml, 3,8mg/ml y 12,3mg/ml, respectivamente. Por su parte, se encontró que los valores de SW de TNZ:SUCC y TNZ:NA, son similares a los de TNZ². Estos resultados indican que sólo TNZ:CA exhibe una SW ligeramente más alta que TNZ, con una ventaja de solubilidad de 1,3

(SW_C/SW_{TNZ}).

Tabla A.6 Solubilidad acuosa de los compuestos obtenidos, TNZ y los cinco coformadores

MUESTRA	SW (mg/ml)	SW_C/SW_{TNZ}
TNZ:PABA _{LAG}	7,2 ± 0,1 ^a	0,8
TNZ:SA _{LAG}	3,81 ± 0,05 ^a	0,4
TNZ:CA	12,3 ± 0,3 ^a	1,3
TNZ:SUCC	9,8 ± 0,4 ^a	1,0
TNZ:NA	10,9 ± 0,2 ^a	1,1
TNZ	9,6 ± 0,2 ^a	1,0
PABA	8,28 ^b	0,9
SA	2,62 ^b	0,3
CA	615 ^b	64,1
SUCC	106 ^b	11,0
NA	500 ^b	52,1

^a $n = 3 \pm$ desviación estándar; ^b Reportado por Yalkowski et al.¹⁷

Las solubilidades fueron obtenidas por Octavio Fandiño. Fuente Tesis de Octavio Fandiño.

Estos resultados no muestran una ventaja frente a TNZ puro, a excepción de TNZ:CA que muestra tener una solubilidad acuosa 1,3 veces mayor que TNZ. Si bien no se observaron ventajas notorias de los compuestos obtenidos frente al IFA, este estudio abre el camino para la búsqueda de nuevos materiales que puedan mostrar una mejor solubilidad, al usar un conjunto más variado de coformadores que aquellos explorados aquí.

A.4. Referencias

1. Costa RN, Reviglio AL, Siedler S, et al. New Multicomponent Forms of the Antiretroviral Nevirapine with Improved Dissolution Performance. *Cryst Growth Des.* 2020;20(2):688-698. doi:10.1021/acs.cgd.9b01129
2. Fandiño OE, Reviglio L, Linck YG, et al. Novel Cocrystals and Eutectics of the Antiprotozoal Tinidazole: Mechanochemical Synthesis, Cocrystallization, and Characterization. *Cryst Growth Des.* 2020;20(5):2930-2942. doi:10.1021/acs.cgd.9b01435
3. Fábíán L. Cambridge Structural Database Analysis of Molecular Complementarity in Cocrystals. *Cryst Growth Des.* 2009;9(3):1436-1443. doi:10.1021/cg800861m
4. Galek PTA, Fábíán L, Motherwell WDS, Allen FH, Feeder N. Knowledge-based model of hydrogen-bonding propensity in organic crystals. *Acta Crystallogr Sect B Struct Sci.* 2007;63(5):768-782. doi:10.1107/S0108768107030996
5. Friščić T, Childs SL, Rizvi SAA, Jones W. The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *CrystEngComm.* 2009;11(3):418-426. doi:10.1039/B815174A
6. Cullity BD, Stock SR. *Elements of X-Ray Diffraction, Third Edition.* New York: Prentice-Hall; 2001.
7. Dinnebier RE, Billinge SJL. *Powder Diffraction Theory and Practice.* (Dinnebier RE, Billinge SJL, eds.). Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2008.
8. Carvalho AMG, Araujo DHC, Canova HF, et al. beamlines X-ray powder diffraction at the XRD1 beamline at LNLS. 2016;1-6. doi:10.1107/S1600577516012686
9. Tong W-Q (Tony). Practical Aspects of Solubility Determination in Pharmaceutical Preformulation. In: *Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceuticals and Biopharmaceutics.* New York, NY: Springer New York; :137-149. doi:10.1007/978-0-387-69154-1_5
10. Meshram DB, Bagade SB, Tajne MR. Simple HPLC Method for Simultaneous Estimation of Fluconazole and Tinidazole in Combined Dose Tablet. *J Chromatogr Sci.* 2009;47(10):885-888. doi:10.1093/chromsci/47.10.885
11. Savjani JK. Co - crystallization : An approach to improve the performance characteristics of active. 2015;(September):147-151. doi:10.4103/0973-8398.160309
12. Dai X-L, Chen J-M, Lu T-B. Pharmaceutical cocrystallization: an effective approach to modulate the physicochemical properties of solid-state drugs. *Cryst Eng Comm.* 2018;20:5292-5316. doi:10.1039/C8CE00707A
13. Nalte, Yogesh K. Arsul, Vilas A. Shep, Santosh G. Bothara SB. Solubility enhancement of nevirapine by cocrystallisation technique. *J Pharm Res.* 2015;9(8):556-561.
14. Caira M, Bourne SA, Samsodien H, et al. Co-crystals of the antiretroviral nevirapine: crystal structures, thermal analysis and dissolution behaviour. *CrystEngComm.* 2012;14:2541-2551. doi:10.1039/c2ce06507j
15. Samsodien H, Bapoo M, TI D, et al. Pharmaceutica Analytica Acta FTIR , Dissolution and Anti-viral Activity of Nevirapine Co-crystals. 2017;8(9). doi:10.4172/2153-2435.1000561
16. Cherukuvada S, Nangia A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem Commun.* 2014;50(8):906-923. doi:10.1039/C3CC47521B
17. Yalkowsky SH, He Y, Jain P. *Handbook of Aqueous Solubility Data.* CRC Press; 2016. doi:10.1201/EBK1439802458