



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DE IMPERATRIZ – CCIM
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LIANDRA DE LIMA ALMIRANTE

INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PRECURSOR DE NUCLEOTÍDEOS CITOSINA
COM O COMPOSTO BIOATIVO ETAMBUTOL

IMPERATRIZ

2023

LIANDRA DE LIMA ALMIRANTE

INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PRECURSOR DE NUCLEOTÍDEOS CITOSINA
COM O COMPOSTO BIOATIVO ETAMBUTOL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal do Maranhão – UFMA,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
Ribeiro.

IMPERATRIZ –MA

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

ALMIRANTE, Liandra de Lima.

INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PRECURSOR DE NUCLEOTÍDEOS
CITOSINA COM O COMPOSTO BIOATIVO ETAMBUTOL / Liandra de
Lima ALMIRANTE. - 2023.

34 p.

Orientador(a): Paulo Roberto da Silva RIBEIRO.

Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal
do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz-
MA, 2023.

1. Citosina. 2. Cloridrato de Etambutol. 3.
Dispersão Sólida. 4. Nucleotídeo. I. RIBEIRO, Paulo
Roberto da Silva. II. Título.

LIANDRA DE LIMA ALMIRANTE

INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PRECURSOR DE NUCLEOTÍDEOS CITOSINA
COM O COMPOSTO BIOATIVO ETAMBUTOL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal do Maranhão – UFMA,
como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
Ribeiro.

Aprovado em: 01/12/2023

Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva Ribeiro (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Mateus Ribeiro Lage
(Avaliador Interno)
Universidade Federal do Maranhão – Campus Balsas

Prof. Dr. Anivaldo Pereira Duarte Junior
(Avaliador Externo)
Universidade Ceuma – Campus Imperatriz

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado em cada passo, pela força, coragem, por não me deixar desistir, por me proteger nessa caminhada.

A Universidade Federal do Maranhão e ao curso de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade, pela minha capacitação e formação.

A minha família, pelo apoio, incentivo, por toda ajuda, pela compreensão, por não permitirem que algo me faltasse. Em especial, à minha mãe Raquel que sempre acreditou em mim.

Aos meus amigos que conheci na Universidade, em especial Abraão, Ariene, Brenda, Cintia, Edson, Evelyn Ravena, Hadassa, Hudson, Jad, Maria Eduarda, Marcos, Tiago e Wilanira, por me ajudarem, me apoiarem em momentos felizes e difíceis. Agradeço à essas pessoas que foram essenciais na minha vida, que estiveram comigo ao longo da minha jornada, Alexandre, Eliane, Fabiane, Milena, Talita e Vinicius por todo bem que me fazem desde sempre.

Ao professor Dr. Paulo Roberto da Silva Ribeiro, pela paciência, confiança e excelente orientação durante o projeto. Cujas orientações foram essenciais para o resultado final deste trabalho.

A todos do grupo de pesquisa NUPFARQ, em especial Raychimam Douglas pelos seus ensinamentos e por sempre me ajudar.

A todos os professores do Curso de Engenharia de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica. Em especial, a professora Virlane Kelly e a coordenadora do curso Francineide pelos seus conselhos, ensinamentos, incentivos, criatividade e dedicação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Materiais.....	12
2.2 Modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT), através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT).....	13
2.3 Obtenção da DS de ETB.HCl-CIT (1:3) via Evaporação Lenta do Solvente (ELS) .	13
2.4 Caracterização por Difração de Raios X pelo Método do Pó (DRXP)	14
2.5 Caracterização por Termogravimetria, Termogravimetria Derivativa e Análise Térmica Diferencial Simultâneas (TG/DTG-DTA).....	14
2.6 Caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 Modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT) através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	15
3.2 Obtenção da DS de ETB.HCl-CIT (1:3) via Evaporação Lenta do Solvente (ELS) .	18
3.3 Caracterização por Difração de Raios X pelo Método do Pó (DRXP)	19
3.4 Caracterização por Termogravimetria, Termogravimetria Derivativa e Análise Térmica Diferencial Simultâneas (TG/DTG-DTA).....	21
3.5 Caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	24
4 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PRECURSOR DE NUCLEOTÍDEOS CITOSINA COM O COMPOSTO BIOATIVO ETAMBUTOL

Liandra de Lima Almirante^a, Paulo Roberto da Silva Ribeiro^{a*}

^aNúcleo de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas e Química Analítica Aplicada (NUPFARQ)
– Curso de Engenharia de Alimentos (CEA), Centro de Ciências de Imperatriz (CCIM) -
Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Imperatriz – MA – Brasil.

E-mails: liandra.lima@discente.ufma.br paulo.rsr@ufma.br

*Autor correspondente: Paulo Roberto da Silva Ribeiro, Núcleo de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas e Química Analítica Aplicada (NUPFARQ) – Curso de Engenharia de Alimentos (CEA), Centro de Ciências de Imperatriz (CCIM) - Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Av. da Universidade, s/n, Bairro Dom Felipe Gregory – Imperatriz – MA, CEP: 65915-060, Fone (99) 35296068 / (99) 98112-0886, e-mail: paulo.rsr@ufma.br. O experimento foi conduzido pelo primeiro autor na Universidade Federal do Maranhão.

RESUMO

A obtenção de dispersões sólidas a partir da interação de fármacos com coformadores tem sido benéfica para a melhoria da solubilidade aquosa de fármaco. Esse trabalho objetivou a obtenção de uma nova dispersão sólida do ETB.HCl a partir da sua interação com a CIT. Inicialmente, foi realizada a modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT) a partir da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), utilizando o funcional $\omega B97X-D$ com conjunto de funções de base $6-311++G(d,p)$, empregando o modelo de solvatação IEFPCM considerando metanol como solvente para a obtenção dos seus índices de reatividade. Em seguida, as amostras (misturas binárias de ETB.HCl-CIT nas razões molares de 1:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4) foram obtidas pelo método de evaporação lenta de solvente (ELS) e caracterizadas por difração de Raios X pelo método do pó (DRXP), termogravimetria, termogravimetria derivativa e análise térmica diferencial simultâneas (TG/DTG-DTA) e por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Com base nos resultados do estudo DFT; observou-se a possibilidade da ocorrência de interações intermoleculares por ligações de hidrogênio ($-C=O \cdots H-O$) entre a região nucleofílica da CIT ($-C=O$) e a regiões eletrofílicas do ETB.HCl ($-OH$). Os resultados de DRXP obtidos a partir da análise das misturas binárias de ETB.HCl-CIT nas razões molares investigadas evidenciaram a ocorrência de interações intermoleculares entre estes compostos na razão molar de 1:3, resultando na formação de uma nova dispersão sólida de ETB.HCl. As curvas de DTA e DSC do ETB.HCl-CIT (1:3) apresentaram a interação entre estes compostos, evidenciando a fusão da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT (1:3) em temperatura inferior às temperaturas de fusão do ETB.HCl e da CIT. Portanto, esta dispersão sólida aumentará a hidrossolubilidade do ETB.HCl melhorando suas propriedades físico-químicas, taxa de dissolução e biodisponibilidade. Logo, aumentando a sua eficácia terapêutica reduzirá os seus efeitos colaterais corroborando para a

produção de medicamentos mais eficazes no tratamento da tuberculose. O caráter inédito e inovador deste material permitiu o depósito do pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Proteção Intelectual (INPI) sob o registro de número BR1020220144745.

Palavras-chaves: Nucleotídeo, Cloridrato de Etambutol; Citosina; Dispersão Sólida.

SUMMARY

Solid dispersions from the interaction of drugs with coformers have been beneficial for improving aqueous drug solubility. This work aimed to obtain a new solid dispersion of ETB.HCl from its interaction with CIT. Initially, molecular modeling of the starting compounds (ETB.HCl and CIT) was carried out using Density Functional Theory (DFT), using the ω B97X-D functional with base function set $6-311++G(d,p)$, employing the IEFPCM solvation model considering methanol as solvent to obtain its reactivity indices. Then, the samples (binary mixtures of ETB.HCl-CIT in molar ratios of 1:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4) were obtained by the method of slow solvent evaporation (ELS) and characterized by X-ray diffraction using the powder method (DRXP), thermogravimetry, derivative thermogravimetry and simultaneous differential thermal analysis (TG/DTG-DTA) and by differential scanning calorimetry (DSC). Based on the results of the DFT study; the possibility of the occurrence of intermolecular interactions through hydrogen bonds (-C=O...H-O) between the nucleophilic region of CIT (-C=O) and the electrophilic regions of ETB.HCl (-OH) was observed. The XRD results obtained from the analysis of binary mixtures of ETB.HCl-CIT in the molar ratios investigated showed the occurrence of intermolecular interactions between these compounds in the molar ratio of 1:3, resulting in the formation of a new solid dispersion of ETB.HCl. The DTA and DSC curves of ETB.HCl-CIT (1:3) showed the interaction between these compounds, showing the melting of the solid dispersion of ETB.HCl-CIT (1:3) at a temperature lower than the melting temperatures of ETB.HCl and CIT. Therefore, this solid dispersion will increase the water solubility of ETB.HCl, improving its physicochemical properties, dissolution rate and bioavailability. Therefore, increasing its therapeutic efficacy will reduce its side effects, contributing to the production of more effective medicines in the treatment of tuberculosis. The unprecedented and innovative nature of this material allowed the filing of the patent application with the National Institute of Intellectual Protection (INPI) under registration number BR1020220144745.

Keywords: Nucleotide, Ethambutol Hydrochloride; Cytosine; Solid Dispersion.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os avanços da ciência nutricional permitem entender melhor o papel de cada nutriente no organismo; além de demonstrar que algumas substâncias como compostos bioativos são comumente encontradas nos alimentos. Segundo ZEISEL (1999), os nutracêuticos como suplementos alimentares contendo compostos bioativos em forma concentrada são benéficos à saúde (COZZOLINO, 2012).

Os nucleotídeos presentes nos alimentos conhecidos como nucleoproteínas, são hidrolisados após a ingestão para serem absorvidos no intestino (MATEO *et al.*, 2004). Os nucleotídeos consistem em componentes intracelulares de baixo peso molecular que fazem parte de processos metabólicos essenciais para as células. Os nucleotídeos possuem bases nitrogenadas denominadas purina ou pirimidina, trata-se de uma pentose ligada a um ou mais grupos fosfatos (LEHNINGER *et al.*, 1995). As bases nitrogenadas pirimidinas são compostas por citosina (2-oxi-4-aminopirimidina), o uracil (2,4-dioxipirimidina), a timina (2, 4-dioxi-5-metilpirimidina) e o ácido orótico (2, 4-dioxi-6- carboxipirimidina). Assim, no DNA e o RNA pode-se encontrar a purina sempre formando par com uma pirimidina específica através de ligações de hidrogênio, onde são quebradas em meio aquoso (BRUNO, 2009).

O etambutol (ETB) é um agente quimioterápico antimicobacteriano conhecido quimicamente como (S,S')-2,2'-(etilenodiimino) di-1-butanol (SREEVATSAN *et al.*, 1997; HAUSLER *et al.*, 2001). O ETB apresenta boa solubilidade aquosa (1000 mg/mL) e baixa permeabilidade membranar; portanto, este composto pertence à Classe III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) (PINTO, 2010). O ETB atua inibindo a síntese da parede celular da *Mycobacterium tuberculosis* e caracteriza-se como um pó branco, cristalino, inodoro, sabor amargo, higroscópico que apresenta ponto de fusão acima de 88,0 °C, $pK_{a1} = 6,35$ e $pK_{a2} = 9,35$ (DINIZ *et al.*, 2017). O ETB apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{24}N_2O_2$ e massa molar de $204,31 \text{ g mol}^{-1}$ (SREEVATSAN *et al.*, 1997; SUMMER *et al.*, 1961; LIMA *et al.*, 2015).

O ETB é comercializado na forma de cloridrato de etambutol (ETB.HCl) (Figura 1), sendo quimicamente conhecido como cloridrato de (2S,2'S)-2,2'-(1,2-etanodiildiimino) bis-1-butanol (LAVOR; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O ETB.HCl apresenta estrutura molecular $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$, massa molar de $277,23 \text{ g mol}^{-1}$. Ele é um composto pertencente à Classe III do SCB, possuindo boa solubilidade em água e baixa permeabilidade membranar. Além disso, ele é solúvel em solventes orgânicos etanol e metanol, pouco solúvel em

clorofórmio e insolúvel em éter etílico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; DELMORAL-SANCHEZ *et al.*, 2019).

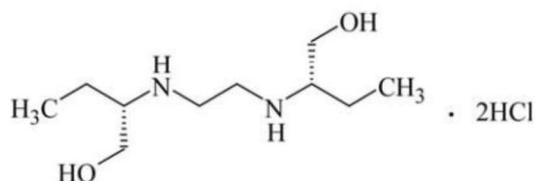


Figura 1 - Estrutura química do ETB.HCl (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O ETB.HCl caracteriza-se como um pó branco, cristalino, inodoro, sabor amargo, higroscópico, possuindo faixa de fusão entre 199 °C a 204 °C (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O ETB.HCl pertence ao sistema ortorrômbico, grupo espacial $P2_12_12$ e parâmetros de rede: $a = 23,183 (22) \text{ \AA}$, $b = 6,555 (5) \text{ \AA}$, $c = 5,176 (5) \text{ \AA}$ e $V = 787 (1) \text{ \AA}^3$ (HAMALAINEN *et al.*, 1985).

O ETB.HCl é um composto que possui dois pKas, o $pK_{a1} = 6,30$ que corresponde as duas hidroxilas e o $pK_{a2} = 9,50$ relacionado às aminas secundárias (BECKER *et al.*, 2008). Foram relatadas quatro formas polimórficas, sendo elas: Forma I, Forma II, Forma III e Forma IV. Porém, apenas a Forma II é usada em formulações de fármacos por ser estável à temperatura ambiente; enquanto que as outras formas polimórficas são metaestáveis e não tiveram suas células unitárias resolvidas (RUBIN-PREMIINGER *et al.*, 2004). A Figura 2 (a) apresenta a célula unitária do ETB.HCl na Forma II e a Figura 2 (b) apresenta o seu perfil difratométrico.

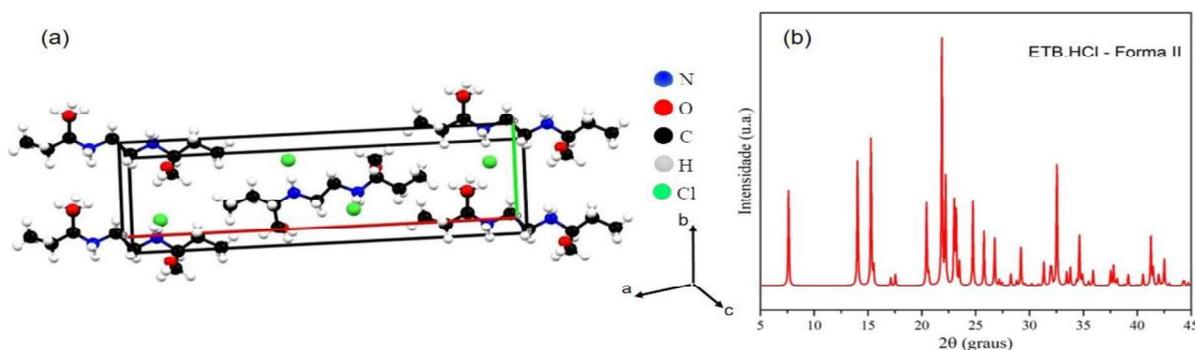


Figura 2 – (a) Célula unitária do ETB.HCl e (b) seu perfil difratométrico (RUBIN-PREMIINGER *et al.*, 2004).

A citosina (CIT) (Figura 3) é uma base nitrogenada encontrada no ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), responsável pelo armazenamento e transporte de informações genéticas dentro de uma célula nos ácidos nucleicos (SRIDHAR *et*

al., 2015). Está pertence à classe I no SCB e possui boa hidrossolubilidade (7,69 mg/mL) e boa permeabilidade membranar. A CIT caracteriza-se como um pó cristalino de coloração branca, solúvel em água e em solventes orgânicos; assim, apresenta ponto de fusão em 320 e 325 °C, $pK_{a1} = 4,60$ (amina primária) e $pK_{a2} = 12,16$ (amina secundária) (SHEIKHI *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2020; GANGULY e KUNDU, 1994).

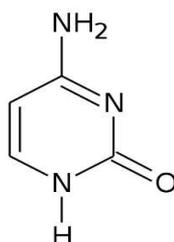


Figura 3 - Estrutura Química da CIT (TENORIO *et al.*, 2013).

A CIT é uma molécula pequena com uma massa molar de 111,1 g/mol e contém grupos funcionais que ajudam a definir sua estrutura cristalina como oxigênio de carbono, nitrogênio da amina primária, nitrogênio do anel da amina secundária e nitrogênio do anel de ligação dupla (ABDELAZIZ *et al.*, 2017).

A CIT apresenta estrutura molecular $C_4H_5N_3O$, além disso, o polimorfo (Ia) da CIT cristaliza no grupo espacial ortorrômbico $P2_12_12_1$ e polimorfo (Ib) da CIT cristaliza na forma ortorrômbica grupo espacial $Pccn$; além de um solvato de citosina monohidratada (SRIDHAR *et al.*, 2015; MCCLURE e CRAVEN, 1973; KINOSHITA e JEFFREY, 1963). O polimorfo (Ib) possui duas moléculas independentes e o polimorfo (Ia) possui apenas uma molécula. Assim, os polimorfos (Ia) e (Ib) apresentam semelhantes interações de ligações de hidrogênio, porém são diferentes nos arranjos moleculares em suas estruturas cristalinas (SRIDHAR *et al.*, 2015). A Figura 4 (a) apresenta a célula unitária da CIT na Forma Ia e a Figura 4 (b) apresenta o seu perfil difratométrico.

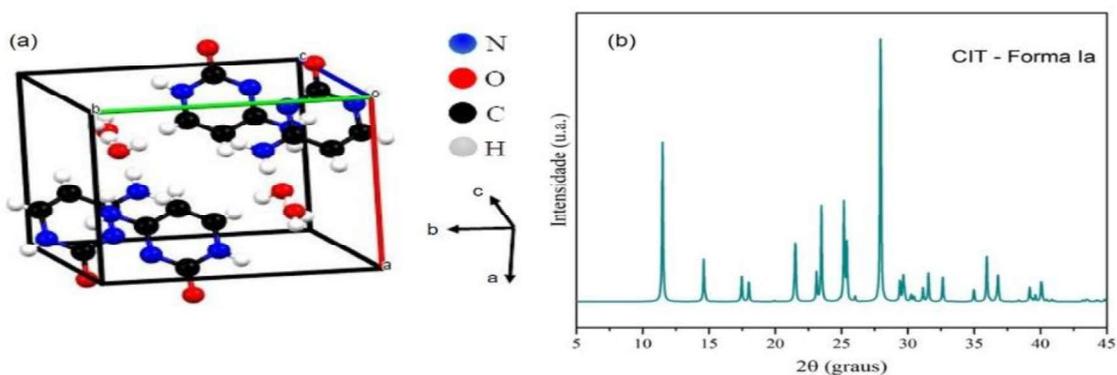


Figura 4 – (a) Célula unitária da CIT na Forma Ia e (b) seu perfil difratométrico.

Uma dispersão sólida (DS) é a dispersão de uma ou mais substâncias ativas num transportador ou matriz sólida inerte. As dispersões sólidas de fármacos (DSFs) podem melhorar a solubilidade, taxa de dissolução, biodisponibilidade, higroscopicidade, ponto de fusão, compressibilidade dos fármacos. A obtenção de DSFs a partir da interação ETB.HCl-CIT é muito promissora no campo farmacêutico apresentando muitas vantagens; tais como, melhorar as propriedades físico-químicas do fármaco a partir da combinação com um coformador e viabilizar a fabricação da forma farmacêutica como estabilidade do fármaco (AALTONEN *et al.*, 2009; LU, 2012; MOHAC *et al.*, 2020).

As DSFs podem ser do tipo: coamorfos, polimorfos, solvatos, hidratos, sais ou cocrystalais. Até o momento poucos estudos foram desenvolvidos visando a obtenção de dispersão sólida de ETB.HCl, tais como sais sólidos com ácido fumárico e ácido adípico (CHERUKUVADA e NANGIA, 2013). Eutético de ETB.HCl utilizando ácido fumárico e ácido succínico (CHERUKUVADA e NANGIA, 2014). Sobre a CIT há relatos da obtenção de sal, solvatos, híbrido de sal-cocrystal e hidrato de sal utilizando epalrestat (NANGIA e SWAPNA, 2017). Hidrato de sal de CIT utilizando a pirazinamida (PRASAD *et al.*, 2015).

Portanto, esse trabalho objetivou realizar a investigação da interação do precursor de nucleotídeos CIT com o composto bioativo ETB.HCl, a partir da evaporação lenta do solvente (ELS) visando a obtenção da DS deste fármaco. Assim, foi realizada a modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT) utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT). Em seguida, foi realizado a caracterização desse material por difração de Raios X pelo método do pó (DRXP), termogravimetria, termogravimetria derivada e análise térmica diferencial simultâneas (TG/DTG-DTA) e por calorimetria exploratória diferencial (DSC).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Nesse tópico são apresentados os reagentes e solvente utilizados nesta pesquisa como o cloridrato de etambutol – ETB.HCl (Figura 1, MM = 277,23 g/mol, pureza $\geq 99,0\%$, *Sigma-Aldrich*), citosina – CIT (Figura 3, MM = 111,10 g/mol, pureza $\geq 99,0\%$, *Sigma-Aldrich*) e metanol – MeOH (MM = 32,04 g/mol, pureza 95,0%, *Sigma-Aldrich*).

2.2 Modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT), através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

Para determinar as matrizes de coordenadas cartesianas correspondentes para geração de arquivos de entrada para os cálculos computacionais, é construídas às estruturas químicas dos compostos de partida dadas *software ChemCraft* em uma visualização tridimensional (3D). A partir da teoria do funcional da densidade (DFT) fez-se a otimização de utilizando o funcional $\omega B97X-D$ com conjunto de funções de base $6-311++G(d,p)$, empregando o modelo de solvatação IEFPCM considerando metanol como solvente implementado no *software Gaussian16*. Obteve-se a geometria otimizada dos compostos confirmada a partir do cálculo de frequências vibracionais que são positivas com o mínimo de energia potencial (HOHENBERG e KOHN, 1964; KOHN e SHAM, 1965; PATRA *et al.*, 2015; TAGORE *et al.*, 2020). No *cluster* de computadores da *ComputeCanada* os cálculos foram processados. Além disso, obtêm-se as energias do orbital molecular ocupado de mais alta energia (HOMO) e orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (LUMO) com seus respectivos índices de reatividade como: *gap* de energia HOMO-LUMO (GHL), dureza (η), potencial químico (μ), maciez (S) e índice de eletrofilicidade (ω), índice de eletronegatividade (X) e energia de Gibbs (G^a) (ALMEIDA, 2016; BATISTA *et al.*, 2016).

2.3 Obtenção da DS de ETB.HCl-CIT (1:3) via Evaporação Lenta do Solvente (ELS)

Para a obtenção da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT por ELS foram pesadas as massas dos compostos de partida para obter as misturas binárias com aproximadamente 200,00 mg das proporções molares (3:1, 2:1, 1:1, 1:2; 1:3, 1:4) e da mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} (Tabela 1). A seguir, as amostras pesadas das proporções molares foram transferidas para béqueres de 50,00 mL ao que foram adicionados 30,00 mL de MeOH para solubilização dos materiais. As soluções resultantes foram cobertas com filme PVC transparente onde foram feitos pequenos furos aleatórios. As soluções foram colocadas em repouso à temperatura de $35,0 \pm 1,0$ °C até a evaporação completa (3 dias). Para garantir a evaporação completa do solvente, os materiais obtidos foram submetidos ao processo de secagem na estufa de circulação forçada de ar a $50 \pm 1,0$ °C durante 2 horas e armazenados em dessecador à temperatura ambiente à 25 °C. As amostras recristalizadas das proporções molares foram caracterizadas por DRXP e DSC. Depois de pesar as massas para a mistura

binária ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF}, os compostos foram misturados, pesados novamente e caracterizados por DRXP, TG/DTG-DTA e DSC.

Tabela 1 – Proporções molares e suas respectivas massas (fármaco:coformador) utilizadas na obtenção das misturas binárias ETB.HCl-CIT

Proporção molar	ETB.HCl (mg)	CIT (mg)
3:1	178,22	23,84
2:1	168,27	33,69
1:1	144,20	57,78
1:2	112,12	89,86
1:3	91,73	110,28
1:4	77,60	124,39

2.4 Caracterização por Difração de Raios X pelo Método do Pó (DRXP)

As amostras dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT), misturas binárias nas proporções molares 3:1, 2:1, 1:1, 1:2; 1:3, 1:4 e mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} foram analisadas por difração de Raios X pelo método do pó (DRXP). Portanto, foi utilizado o difratômetro de Raios X da marca *Rigaku*, modelo Miniflex II, operando com radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), tensão de 40 kV, corrente de 30 mA e monocromador de grafite pirolítico operando à temperatura ambiente. Os padrões de difração foram obtidos de 2° a 45° (2 θ), utilizando um detector PIXcel3D com passo de 0,02° e com o tempo de 2,0 segundos por passo. Logo, a utilização desse equipamento permite obter informações sobre a formação dos cocristais a partir da identificação de sua estrutura cristalina comparada aos compostos de partida (SILVA, 2016).

A partir do software *X'pertHighScore Plus* (versão 2.0 da marca PANalytical) foi obtido os valores de picos cristalográficos. A identificação cristalográfica dos compostos de partida foi realizada a partir da comparação dos resultados obtidos com os dados relatados no banco de dados cristalográfico CCDC *ConQuest*, versão 5.36 da *Cambridge Structural Database System*, utilizando o refinamento de estruturas cristalinas baseado no método de Rietveld (GROOM e ALLEN, 2014).

2.5 Caracterização por Termogravimetria, Termogravimetria Derivativa e Análise Térmica Diferencial Simultâneas (TG/DTG-DTA)

As curvas TG/DTG-DTA das amostras dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT), misturas binárias nas proporções molares 3:1, 2:1, 1:1, 1:2; 1:3, 1:4 e mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} foram obtidas utilizando um analisador térmico da marca *Shimadzu Instruments*, modelo DTG-60 com balança do tipo *Top plan* de guia diferencial paralela. A partir da estabilidade térmica dos compostos, foram realizados os ciclos únicos de aquecimento sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. O suporte para a amostra utilizado foi de alfa-alumina e a massa de amostra foi entre 3,0 e 6,0 mg. Utilizou-se o *software* TA-60 versão 2.1 da *Copyright Shimadzu Scientific Instruments* para interpretar as inflexões de perdas de massas e das diferenças de temperatura nas curvas.

2.6 Caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC das amostras dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT), misturas binárias nas proporções molares 3:1, 2:1, 1:1, 1:2; 1:3, 1:4 e mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} foram obtidas em um analisador térmico da marca *Shimadzu Instruments* DSC-60. Os ciclos únicos de aquecimentos dentro da faixa de temperatura estavam de acordo com a estabilidade térmica de cada composto, sob atmosfera de nitrogênio e com vazão de 50 mL min⁻¹ e uma razão de aquecimento de equilíbrio programada de 5 °C min⁻¹. Foram utilizados um cadinho de alumínio com tampa prensada como suporte e como referência, um cadinho similar, porém vazio para realização das análises. Os calculos realizados dos fatores de correção estavam de acordo com procedimento e especificação do fabricante, sendo que todas as medidas foram obtidas sob pressão atmosférica, utilizando-se massas de amostras na faixa de 2,00 a 3,00 mg. O equipamento de DSC foi previamente calibrado para a temperatura e energia utilizando como padrão o ponto e entalpia de fusão do índio metálico (156,4 °C; $\Delta H_{\text{fus}} = 28,5 \text{ J g}^{-1}$) com pureza de 99,99%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT) através da Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

O estudo da reatividade da molécula é feito a partir da análise de distribuição dos orbitais moleculares em cada uma das estruturas e do cálculo dos índices de reatividade.

Sendo assim, o orbital molecular ocupado de mais alta energia denominado HOMO e orbital molecular desocupado de mais baixa energia denominado LUMO (KIER, 2012). Os cálculos dos níveis de energia dos orbitais permitiram quantificar o valor das energias HOMO e LUMO.

$$\eta = \frac{1}{2} (\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}}) \quad (1)$$

$$\mu = \frac{1}{2} (\epsilon_{\text{HOMO}} + \epsilon_{\text{LUMO}}) \quad (2)$$

$$S = 1/\eta \quad (3)$$

$$\chi = -\mu \quad (4)$$

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (5)$$

De acordo com o Teorema de Koopmans a energia de HOMO está associada a energia de ionização e a energia de LUMO está associado a afinidade eletrônica. O HOMO caracteriza a propensão da molécula interagir com receptores de elétrons e o LUMO com doadores de elétrons. A diferença de energia entre os orbitais o GHL (LUMO – HOMO) é alta, significando uma maior estabilidade e uma baixa reatividade da molécula. O valor do HOMO indica que a molécula é uma doadora de elétrons. As densidades de carga para HOMO e LUMO indicam pouca acumulação de carga nos átomos de hidrogênio.

A Figura 5 (a) mostra a geometria otimizada de energia com o momento de dipolo da ETB.HCl; onde o vetor de momento dipolar está direcionado para a região com maior densidade eletrônica. Na Figura (b), observa-se o mapa de potencial eletrostático total da ETB.HCl; para esta molécula é possível identificar as regiões nucleofílicas (potencial negativo) em torno do grupo hidroxila (-OH), que podem atuar como doadores de elétrons, enquanto as regiões eletrofílicas (potencial positivo) representadas em azul, se localizam em torno dos grupamentos amina secundária 1 (C-N-C) e amina secundária 2 (C-N-C).

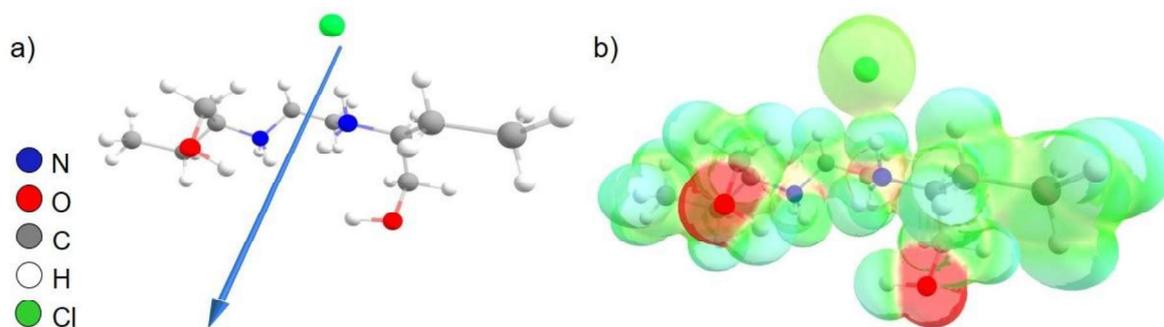


Figura 5 - (a) Estrutura química da ETB.HCl com a derivada da otimização de energia mostrando seu respectivo vetor de momento dipolar e (b) mapa de potencial eletrostático total do ETB.HCl.

A Figura 6 (a) mostra a geometria otimizada de energia com o momento de dipolo da CIT; onde o vetor de momento dipolar está direcionado para a região com maior densidade eletrônica. Na Figura 6 (b), observa-se o mapa de potencial eletrostático total da CIT, as regiões eletrofílicas (potencial positivo) estão em azul em torno dos hidrogênios ligados aos nitrogênios do anel aromático heterocíclico e do grupamento amina (-NH₂); já as regiões nucleofílicas (potencial eletrostático negativo) apresentadas em vermelho, em torno dos grupamentos amina (-NH₂), carbonila (-C=O) e dos nitrogênios do anel aromático heterocíclico.

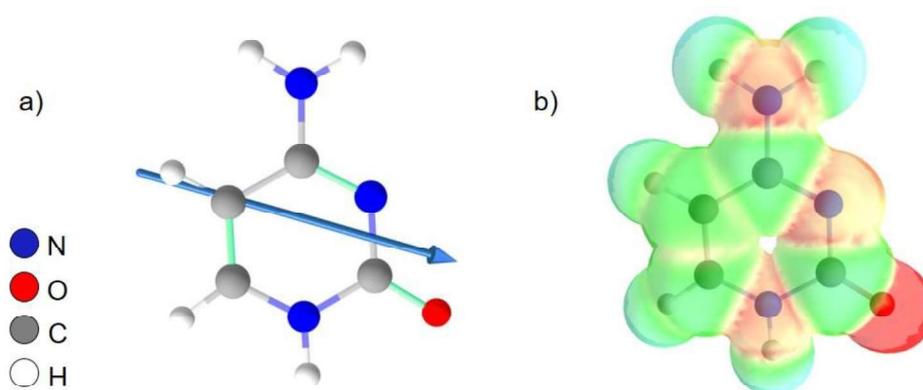


Figura 6 – (a) Estrutura química da CIT com a derivada da otimização de energia mostrando seu respectivo vetor de momento dipolar e (b) mapa de potencial eletrostático total da CIT.

Com base nos valores dos orbitais HOMO e LUMO foi possível calcular os índices de reatividade das moléculas do ETB.HCl e CIT (Tabela 2).

Tabela 2 - Propriedades eletrônicas dos índices de reatividade e energia do ETB.HCl e CIT

Compostos	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GHL (eV)	η (eV)	μ (eV)	S (eV)	ω (eV)	χ (eV)	G (10 ⁵)
ETB.HCl	-8,20	1,16	9,36	4,68	-4,68	0,21	2,34	4,68	4,11
CIT	-8,81	0,67	9,48	4,74	-4,07	0,21	4,07	1,74	2,47

HOMO = Orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO = Orbital molecular desocupado de mais baixa energia; GHL = (LUMO – HOMO); η = dureza; μ = potencial químico; S = maciez; ω = índice de eletrofilicidade. Todos os valores são descritos em eletrovolts (eV), exceto a energia de Gibbs (Kcal mol⁻¹).

A partir dos índices de reatividade podemos ver que à boa estabilidade química entre o ETB.HCl e da CIT quando isolados. Contudo, por meios das regiões eletrofílicas e nucleofílicas características de cada molécula, foi possível observar a possibilidade da ocorrência de interações intermoleculares por ligações de hidrogênio (-C=O...H-O) entre a região nucleofílica da CIT (-C=O) e a região eletrofílica do ETB.HCl (-OH), resultando na

formação de novo material, tal como dispersão sólida de ETB.HCl tendo a CIT como coformador.

3.2 Obtenção da DS de ETB.HCl-CIT (1:3) via Evaporação Lenta do Solvente (ELS)

O método evaporação lenta do solvente (ELS) consiste em realizar a mistura de dois ou mais compostos sólidos, em seguida eles são dissolvidos em um meio contendo um ou mais solventes e posterior evaporação dos mesmos (ALMEIDA, 2009). A Figura 7 (a, b, c, d, e, f, g e h) mostram os aspectos macroscópicos dos compostos de partida recristalizados (ETB.HCl_{REC} e CIT_{REC}) e suas misturas binárias ETB.HCl-CIT nas proporções molares de 3:1; 2:1; 1:1; 1:2, 1:3 e 1:4 recristalizadas obtidas pelo método de ELS.

Na Figura 7 (a), após a ELS observou-se a formação de um material de aspecto cristalino e coloração translúcida branca, tornando-se um pó branco após ser retirado do fundo do béquer. Nas proporções de ETB.HCl-CIT (3:1) Figura 7 (b) e ETB.HCl-CIT (2:1) Figura 7 (c) observou-se a formação de um material cristalino transparente e coloração branca; além de alguns pontos brancos. Em ETB.HCl-CIT (1:1) Figura 7 (d) pode-se observar material transparente, pontos e grânulos brancos; com pequenas placas pequenas transparentes. Em ETB.HCl-CIT (1:2) Figura 7 (e), ETB.HCl-CIT (1:3) Figura 7 (f) e ETB.HCl-CIT (1:4) Figura 7 (g) foram obtidos materiais cristalinos em formato de placas em maior quantidade. Na Figura 7 (h) pode-se observar que a CIT_{REC} possui placas cristalinas transparentes e alguns grânulos esbranquiçados.

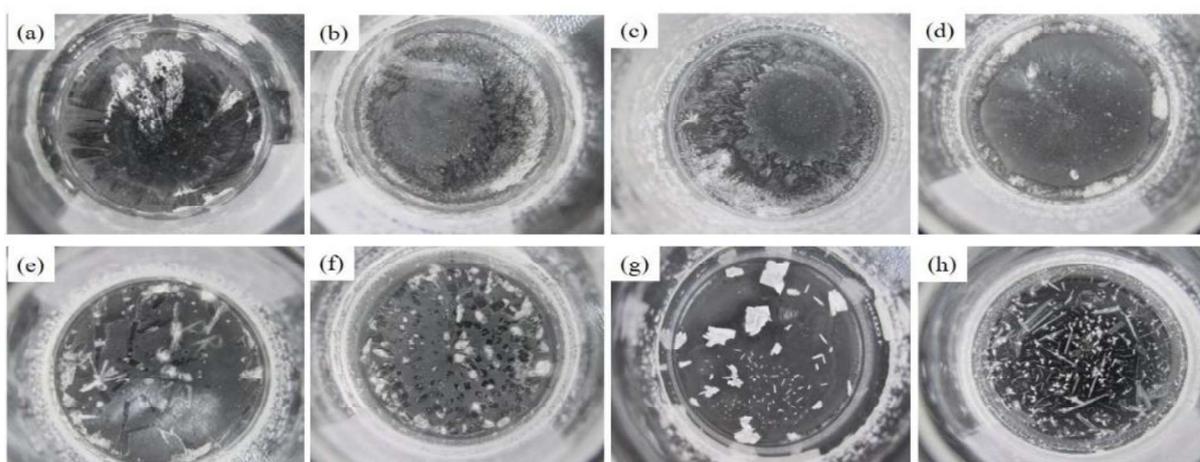


Figura 7 - Imagens digitais obtidas por uma câmera marca *PowerShot HS* e modelo *Canon*. Estas imagens são do fundo dos béqueres contendo os compostos de partida recristalizados por ELS e as misturas binárias de ETB.HCl-CIT: (a) ETB.HCl_{REC}; (b) ETB.HCl-CIT (3:1);

(c) ETB.HCl-CIT (2:1); (d) ETB.HCl-CIT (1:1); (e) ETB.HCl-CIT (1:2); (f) ETB.HCl-CIT (1:3), (g) ETB.HCl-CIT (1:4) e (h) CIT_{REC}.

3.3 Caracterização por Difração de Raios X pelo Método do Pó (DRXP)

A Figura 8 apresenta os padrões de difração de Raios X pelo método do pó (DRXP) para o ETB.HCl_{REC}, a CIT_{REC} e as misturas binárias de ETB.HCl-CIT nas proporções molares de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4, onde obtiveram alterações nos picos indicando uma nova fase mediante a interação entre ETB.HCl e CIT resultando na formação de uma dispersão sólida. A Figura 8 (a) apresenta os picos novos indicados por setas, os picos deslocados por asteriscos e os picos que sumiram indicados por pontos.

No difratograma do ETB.HCl_{REC} na Figura 8 (a) obtido pelo processo de recristalização foi possível observar que o mesmo apresenta a Forma II com parâmetros de rede: $a = 23,1832(22) \text{ \AA}$, $b = 6,555(5) \text{ \AA}$ e $c = 5,176(5) \text{ \AA}$ e $V = 786,569 \text{ \AA}^3$, apresentando estrutura cristalina referente ao sistema ortorrômbico e grupo espacial $P2_12_12$ para confirmar este resultado foi realizado o refinamento pelo método Rietveld apresentado na Figura 8 (b).

O DRXP da CIT_{REC} Figura 8 (a) mostrou a obtenção de uma mistura de fases que é constituída de 46,8% de CIT na Forma monohidratada e de 53,2% de CIT na Forma Ia. Logo, essa Forma monohidratada possui estrutura cristalina referente ao sistema monoclinico, $\alpha = \beta = 90,00^\circ$ e $\gamma = 99,70^\circ$; grupo espacial $P2_1/c$ e com parâmetros de rede: $a = 7,801(1) \text{ \AA}$, $b = 9,844(1) \text{ \AA}$ e $c = 7,683(1) \text{ \AA}$ e $V = 581,566 \text{ \AA}^3$ (KINOSHITA e JEFFREY, 1963). A Forma Ia pertence ao sistema ortorrômbico, $\alpha = \beta = \gamma = 90,00^\circ$, grupo espacial $P2_12_12_1$ com parâmetros de rede: $a = 13,044(2) \text{ \AA}$, $b = 9,496(1) \text{ \AA}$ e $c = 3,814(1) \text{ \AA}$ e $V = 472,424 \text{ \AA}^3$ (MCCLURE e CRAVEN, 1973). No refinamento da CIT_{REC} (Figura 8 (c)) indicou uma concordância onde foi obtidos valores aceitáveis dos fatores de convergência com $R_{wp} = 12,20 \%$, $R_p = 8,02 \%$ e $S = 2,96$. Portanto, a metodologia ELS gerou polimorfismo por causa da Forma Ia.

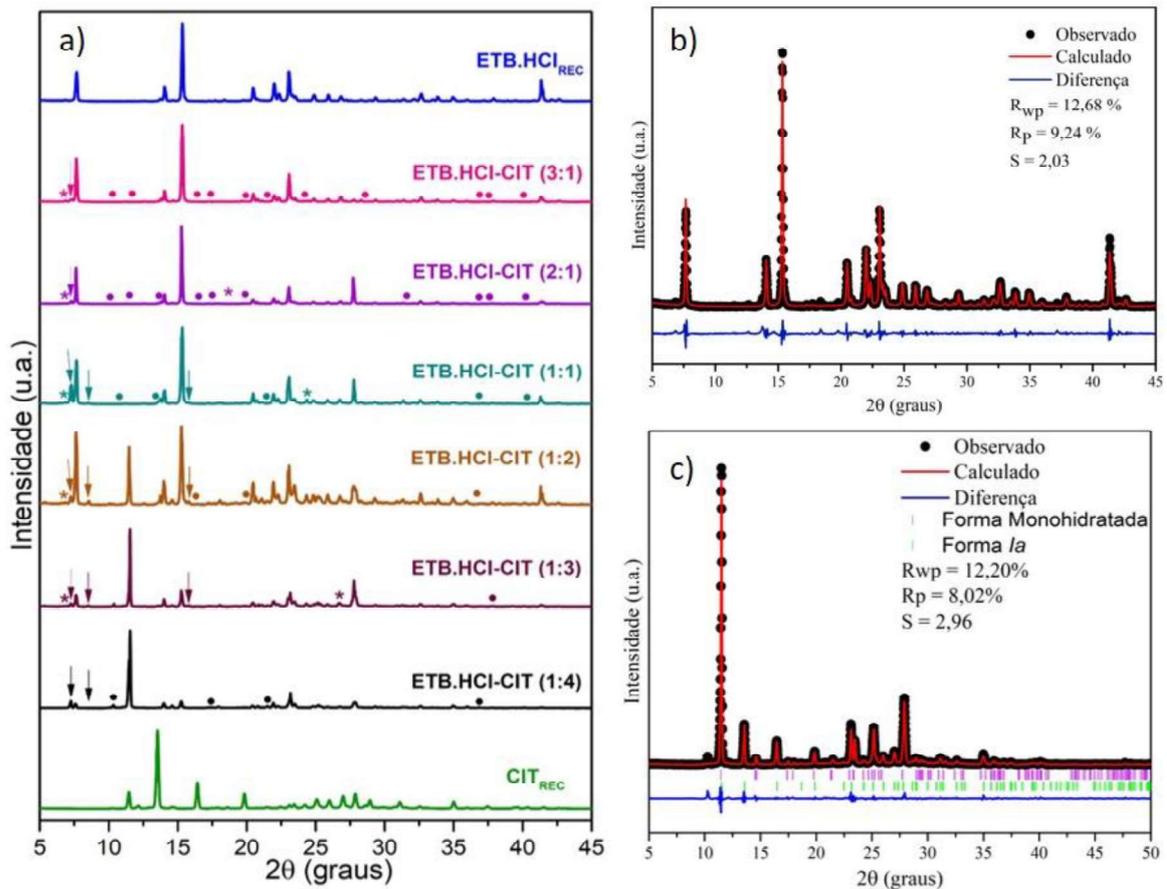


Figura 8 – (a) Difratomogramas obtidos por DRXP para ETB.HCl_{REC}, CIT_{REC} e as proporções investigadas. Refinamento pelo método Rietveld para (b) ETB.HCl_{REC} e (c) CIT_{REC}.

Observou-se em ETB.HCl-CIT (3:1) um pico deslocado em aproximadamente $6,91^\circ$ $2(\theta)$, pico novo de baixo ângulo em aproximadamente $7,27^\circ$ $2(\theta)$ e os picos que sumiram em $10,22^\circ$, $11,52^\circ$, $16,43^\circ$, $17,40^\circ$, $19,97^\circ$, $21,50^\circ$, $24,20^\circ$, $28,60^\circ$, $36,92^\circ$, $37,58^\circ$, $40,00^\circ$ $2(\theta)$. Temos em ETB.HCl-CIT (2:1) picos deslocados em aproximadamente $6,91^\circ$ e $18,68^\circ$ $2(\theta)$, pico novo em aproximadamente $7,27^\circ$ $2(\theta)$ e os picos que sumiram em $10,20^\circ$, $11,55^\circ$, $13,57^\circ$, $16,41^\circ$, $17,58^\circ$, $19,82^\circ$, $31,66^\circ$, $36,87^\circ$, $37,58^\circ$, $40,10^\circ$ $2(\theta)$. Já em ETB.HCl-CIT (1:1), picos deslocados em aproximadamente $6,79^\circ$ e $24,40^\circ$ $2(\theta)$, picos novos em aproximadamente $7,27^\circ$, $8,50^\circ$ e $15,79^\circ$ $2(\theta)$ e os picos que sumiram em $10,59^\circ$, $13,54^\circ$, $21,50^\circ$, $36,22^\circ$, $36,89^\circ$, $40,14^\circ$ $2(\theta)$. Em ETB.HCl-CIT (1:2), pico deslocado em aproximadamente $6,79^\circ$ $2(\theta)$, picos novos em aproximadamente $7,23^\circ$, $8,57^\circ$ e $15,83^\circ$ $2(\theta)$ e os picos que sumiram em $16,43^\circ$, $19,88^\circ$, $36,58^\circ$ $2(\theta)$.

Em ETB.HCl-CIT (1:3) estas alterações foram mais evidentes e caracterizadas por picos deslocados em aproximadamente $6,95^\circ$ e $26,77^\circ$ $2(\theta)$, pela presença de novos picos em

torno de $7,27^\circ$, $8,53^\circ$ e $15,79^\circ$ $2(\theta)$ e pela ausência de pico em $37,76^\circ$ $2(\theta)$. Tal fato sugere que a fração molar de 1:3 seja a razão molar estequiométrica para a obtenção da referida dispersão sólida. E por fim, em ETB.HCl-CIT (1:4) observou-se que não teve picos deslocados, a presença de picos novos em aproximadamente $7,25^\circ$ e $8,52^\circ$ $2(\theta)$ e os picos que sumiram em $10,31^\circ$, $17,50^\circ$, $21,51^\circ$ e $36,87^\circ$ $2(\theta)$.

A Figura 9 (a) apresenta os padrões de difração de Raios X pelo método do pó (DRXP) para ETB.HCl_{REC}, ETB.HCl-CIT (1:3), mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} e CIT_{REC}. A Figura 9 (b) apresenta o refinamento pelo método Rietveld da mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF}.

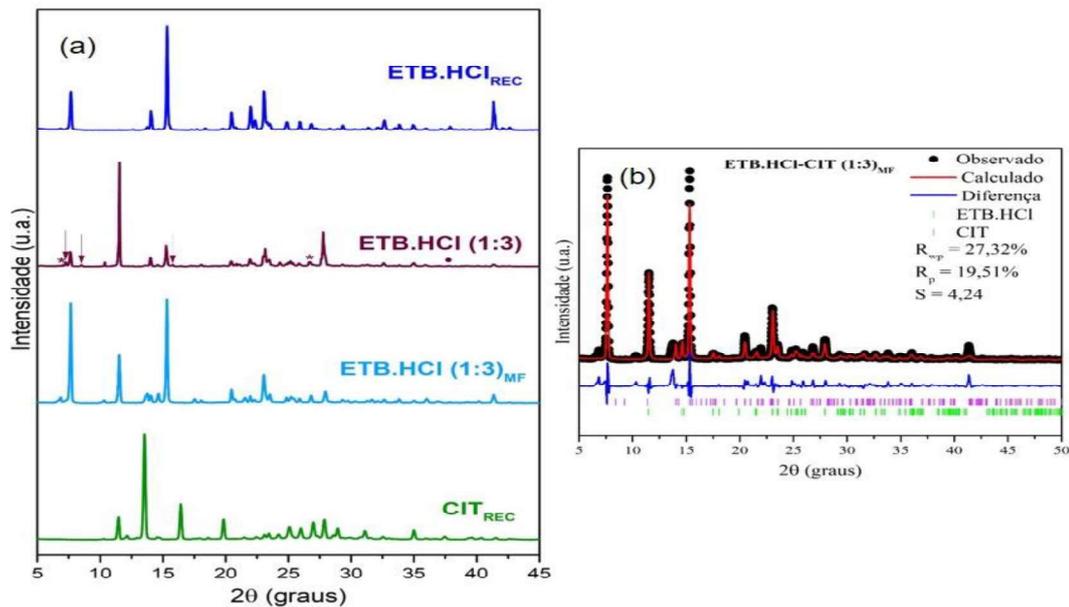


Figura 9 – (a) Difratomogramas obtidos por DRXP para o ETB.HCl_{REC}, ETB.HCl-CIT (1:3), mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} e CIT_{REC}; (b) o refinamento pelo método Rietveld da mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF}.

Na Figura 9, podemos observar que a mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} apresentou apenas a sobreposição dos picos dos compostos de partida; logo, é possível afirmar que o somatório dos picos cristalográficos mostrou que apenas o contato físico entre ETB.HCl e CIT, não indica evidência de interação capaz de levar a formação da nova dispersão sólida.

3.4 Caracterização por Termogravimetria, Termogravimetria Derivativa e Análise Térmica Diferencial Simultâneas (TG/DTG-DTA)

As amostras foram caracterizadas por termogravimetria, termogravimetria derivativa e

análise térmica diferencial simultânea (TG/DTG-DTA). A Figura 10 apresenta as curvas TG/DTG-DTA do $\text{ETB.HCl}_{\text{REC}}$, ETB.HCl-CIT (1:3) , $\text{ETB.HCl-CIT (1:3)}_{\text{MF}}$ e CIT_{REC} com os parâmetros termodinâmicos sumarizados na Tabela 3.

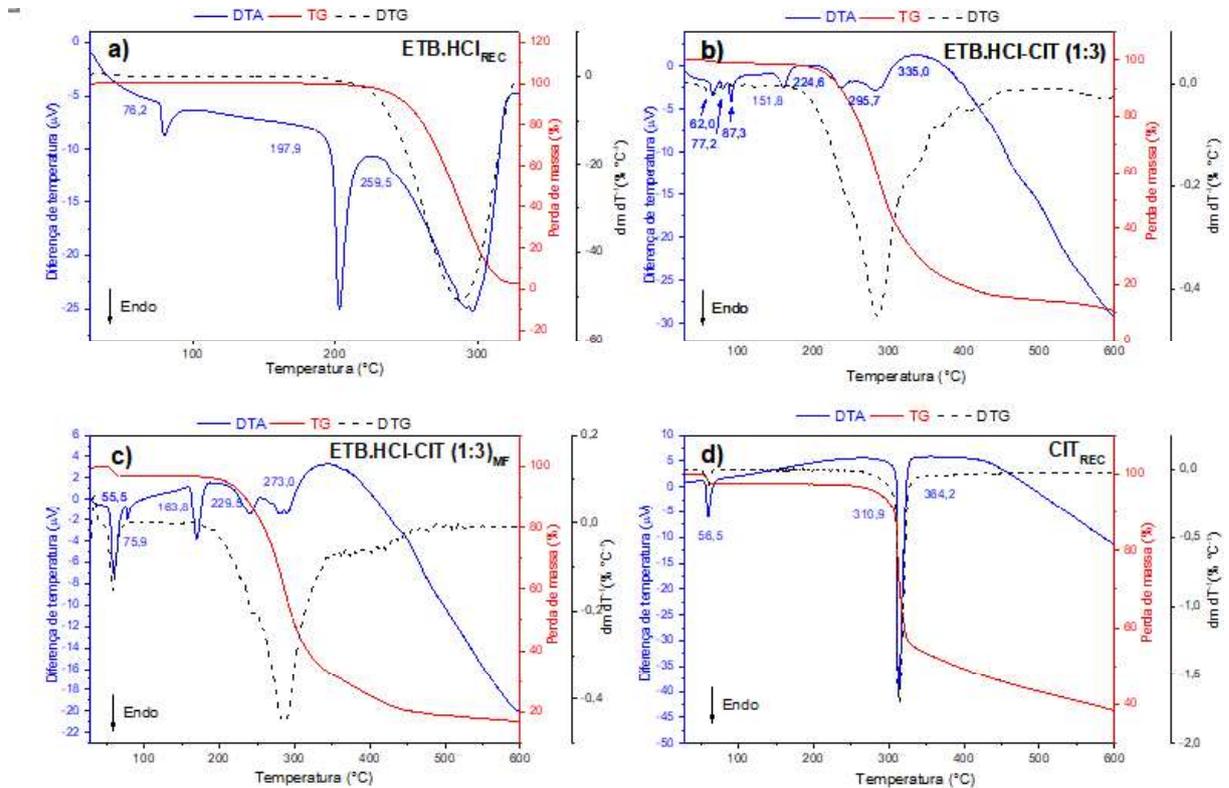


Figura 10 - Curvas TG/DTG-DTA da $\text{ETB.HCl}_{\text{REC}}$ (a), ETB.HCl-CIT (1:3) (b), $\text{ETB.HCl-CIT (1:3)}_{\text{MF}}$ (c) e CIT_{REC} (d).

A Figura 10 (a) apresenta as curvas TG/DTG-DTA do $\text{ETB.HCl}_{\text{REC}}$ onde foi observado três eventos térmicos. Na DTA, o primeiro evento ocorreu com temperatura de início em $77,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{onset}) referente à Transição de fases sólido-sólido da Forma II para a Forma I do ETB.HCl (RUBIN-PREMIINGER *et al.*, 2004; CHERUKUVADA e NANGIA, 2014). O segundo evento térmico foi observado a ocorrência em $198,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, que é característico da fusão deste material, conforme relatado na literatura (LAVOR *et al.*, 2012). Em seguida, é observado a decomposição térmica do material em temperaturas superiores à $250,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelas curvas TG/DTG temos uma perda de massa de aproximadamente $3,256\text{ mg}$, onde cerca de $94,37\%$ da massa foi utilizada para a análise.

A curva DTA para o ETB.HCl-CIT (1:3) , Figura 10 (b) apresentou sete eventos endotérmicos. O primeiro evento observado ocorreu em temperatura de $62,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{onset}) característico de uma desidratação, com perda de massa de $0,021\text{ mg}$ ($0,72\%$) como mostrado pelas curvas TG/DTG. O segundo evento em temperatura de $77,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, apresenta temperatura

próxima a Transição de fases sólido-sólido característico do fármaco ETB.HCl (Forma II para a Forma I) (RUBIN-PREMIINGER *et al.*, 2004; CHERUKUVADA e NANGIA, 2014). O terceiro evento observado, é referente à desidratação ocorrendo em 87,3 °C (T_{onset}), apresentando a perda de 0,171 mg (0,69%) de amostra. Em seguida, com temperatura de 151,8 °C foi observado à fusão do ETB.HCl-CIT (1:3). Além disso, em temperaturas maiores que 220,0 °C, foi observado eventos de degradação térmica que se apresenta em três etapas, com 224,6 °C, 295,7 °C e 335,0 °C (T_{onset}). O que evidencia a ocorrência desse evento é uma redução contínua e intensa da massa, conforme mostrado pelas curvas TG/DTG, resultando em uma perda de massa de 2,334 mg (66,0%) de amostra.

A amostra ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF}, Figura 10 (c) apresenta eventos semelhantes aos dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT). Na curva DTA, foi observado evento endotérmico em 55,0°C (T_{onset}) relacionado à desidratação da CIT, relacionado à perda de massa de 0,112 mg de amostra, equivalente a 3,25% da massa utilizada na análise como mostrado pelas curvas TG/DTG. O segundo evento ocorreu em 75,9 °C (T_{onset}), característico da transição de fases sólido-sólido apresentada pelo ETB.HCl. Em seguida, em 163,8°C (T_{onset}), foi observado um evento endotérmico, sem perda de massa, referente à fusão do fármaco ETB.HCl. Já em 229,5 °C (T_{onset}), ocorreu um evento endotérmico com perda de massa de 0,482 mg (14,02%), relacionado à fusão da CIT. Por fim, em temperaturas maiores que 273,0 °C, temos a decomposição térmica da mistura física, onde foi observado o pico máximo de degradação térmica ocorrendo a 355,7 °C (T_{peak}). Portanto, não há evidências da interação do ETB.HCl e da CIT pelo simples contato físico entre estes compostos, tendo em vista que os eventos térmicos observados foram característicos dos compostos quando analisados em separados após a recristalização do material.

Na curva DTA para a CIT_{REC}, Figura 10 (d) foi observado o evento endotérmico de desidratação em 56,5 °C na curva DTA onde apresenta perda de massa de 0,080 mg (2,29%) conforme observado nas curvas TG/DTG. O segundo evento em 310,9 °C (T_{onset}), atribuído à fusão da CIT, este evento ocorre em concomitância a perda de massa de 1,106 mg de amostra (34,81%) registrado pelas curvas TG/DTG. O terceiro evento é caracterizado pela sua decomposição térmica em temperaturas superiores a 364,2 °C, que é referente a perda de massa de 0,703 mg de amostra (22, 12%) (BRAUN *et al.*, 2017).

Tabela 3 – Eventos térmicos (perdas de massa) observados nas curvas TG/DTG-DTA dos compostos ETB.HCl_{REC}, ETB.HCl-CIT (1:3), ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} e da CIT_{REC}.

Amostras	Eventos observados	Intervalo (°C)			Δm		Calor (KJ.mol ⁻¹)	
		Onset	Peak	Endset	mg	%		
ETB.HCl _{REC}	Transição de fases	76,2	78,3	82,3	-	-	47,00	
	Fusão	197,9	201,3	205,5	0,043	1,26	272,67	
	Decomposição	259,5	273,5	307,0	3,135	92,13	147,20	
ETB.HCl-CIT (1:3)	Desidratação	62,0	66,0	71,6	0,021	0,72	-79,37	
	Transição de fases	77,2	79,5	83,0	-	-	-24,42	
	Desidratação	87,3	90,3	94,2	0,171	0,69	-85,47	
	Fusão	151,8	160,4	169,9	-	-	-189,26	
	Decomposição		224,6	236,3	245,9	0,410	14,05	-128,21
			295,7	281,2	333,6	1,411	48,37	-317,48
			335,0	344,0	599,0	0,513	17,58	-258,96
ETB.HCl-CIT (1:3) _{MF}	Desidratação	55,0	59,7	67,9	0,112	3,25	-440,86	
	Transição de fases	75,9	77,9	82,1	-	-	-42,81	
	Fusão ETB.HCl	163,8	169,9	179,7	-	-	-404,79	
	Fusão CIT	229,5	239,8	251,5	0,482	14,02	-274,53	
	Decomposição	273,0	282,8	305,0	1,463	42,57	-578,86	
CIT _{REC}	Desidratação	56,5	59,7	65,1	0,08	2,29	-60,4	
	Fusão	310,9	313,2	321,6	1,049	33,02	-425,51	
	Decomposição	364,2	427,8	600,0	0,703	22,13	-513,32	

3.5 Caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Figura 11 (a) mostra as curvas de DSC do ETB.HCl_{REC}, CIT_{REC} e das misturas binárias de ETB.HCl-CIT (3:1); (2:1); (1:1); (1:2), (1:3) e (1:4). A Figura 11 (b) apresenta as curvas de DSC do ETB.HCl_{REC}, da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT (1:3), da mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF} e da CIT_{REC}. Nestas curvas são descritas as temperaturas de início (T_{onset}) de cada evento endotérmico. A Tabela 4 mostra os parâmetros termodinâmicos observados nas curvas de DSC das amostras analisadas.

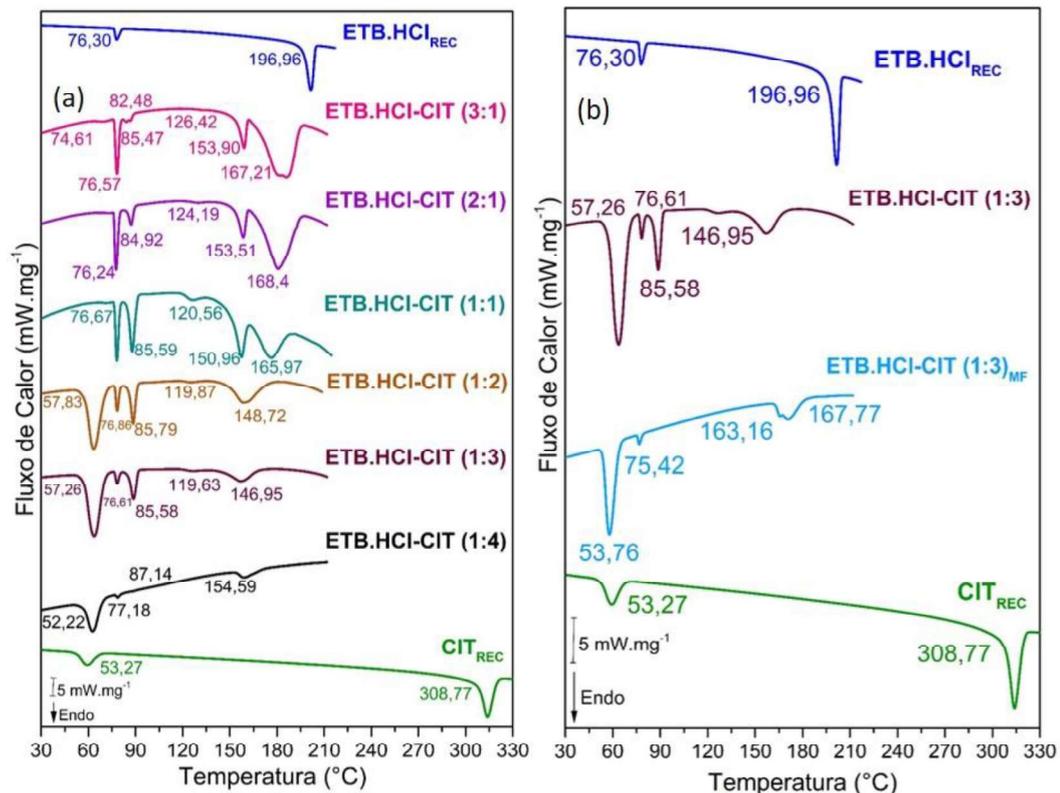


Figura 11 – Curvas de DSC obtidas para (a) $\text{ETB.HCl}_{\text{REC}}$, CIT_{REC} , proporções molares investigadas e (b) mistura física $\text{ETB.HCl-CIT (1:3)}_{\text{MF}}$.

A curva de DSC do $\text{ETB.HCl}_{\text{REC}}$ apresentou dois eventos endotérmicos, o primeiro evento ($T_{\text{onset}} = 76,30 \text{ }^\circ\text{C}$) que corresponde à transição de fases sólido-sólido da Forma I para a Forma II. O segundo evento ($T_{\text{onset}} = 196,96 \text{ }^\circ\text{C}$) é referente à sua fusão (LAVOR *et al.*, 2012). Na curva de DSC da CIT_{REC} observou-se que o primeiro evento ($T_{\text{onset}} = 53,27 \text{ }^\circ\text{C}$) é de desidratação e o segundo ($T_{\text{onset}} = 308,77 \text{ }^\circ\text{C}$) corresponde à fusão da CIT (ABDELAZIZ *et al.*, 2017).

As curvas de DSC das misturas binárias ETB.HCl-CIT (3:1) , $(2:1)$ e $(1:1)$ apresentaram quatro eventos endotérmicos. O primeiro evento é relativo à referida transição de fases sólido-sólido do ETB.HCl e foi observado em torno de $76,00 \text{ }^\circ\text{C}$ (T_{onset}). O segundo evento é referente à desidratação ocorrida próximo de $85,00 \text{ }^\circ\text{C}$ (T_{onset}). O terceiro evento observado em torno de $153,00 \text{ }^\circ\text{C}$ (T_{onset}) é devido à fusão da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT . O quarto evento, em torno de $165,00 \text{ }^\circ\text{C}$ (T_{onset}) é referente à fusão do ETB.HCl (em excesso nestas misturas binárias).

A curva de DSC para o ETB.HCl-CIT (1:2) apresentou quatro eventos térmicos. O primeiro evento ($T_{\text{onset}} = 57,83 \text{ }^\circ\text{C}$) foi atribuído à perda de água solvatada (desidratação). O segundo evento ($T_{\text{onset}} = 76,86 \text{ }^\circ\text{C}$) está relacionado com a citada transição de fases sólido-

sólido do ETB.HCl. O terceiro evento ($T_{onset} = 85,79$ °C) equivale à perda de água de cristalização (desidratação). O quarto evento ($T_{onset} = 148,72$ °C) corresponde à fusões sucessivas da DS e do ETB.HCl (em excesso nesta mistura binária).

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos observados nas curvas DSC do ETB.HCl_{REC}, CIT_{REC}, proporções molares investigadas e mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF}

Amostras	Eventos Observados	Temperatura (°C)			ΔH_f (KJ/mol)
		T_{Onset}	T_{Peak}	T_{Endset}	
ETB.HCl _{REC}	Transição de fases	76,30	77,94	81,00	-10,13
	Fusão	196,96	201,42	204,17	-71,46
ETB.HCl-CIT (3:1)	Transição de fases	76,57	78,14	80,12	-4,86
	Desidratação	85,47	86,62	88,64	-0,15
	Fusão	153,90	159,13	161,06	-4,85
	Fusão	167,21	185,96	194,12	-36,11
ETB.HCl-CIT (2:1)	Transição de fases	76,24	77,54	79,56	-4,71
	Desidratação	84,92	87,17	89,28	-1,90
	Fusão	153,51	158,53	160,91	-5,16
	Fusão	168,41	180,76	194,28	-31,78
ETB.HCl-CIT (1:1)	Transição de fases	76,67	78,05	79,97	-3,79
	Desidratação	85,59	87,85	91,37	-6,29
	Fusão	150,96	157,41	160,59	-6,42
ETB.HCl-CIT (1:2)	Fusão	165,97	176,65	185,61	-10,34
	Desidratação	57,83	63,43	70,82	-24,53
	Transição de fases	76,86	78,31	80,02	-2,51
	Desidratação	85,79	88,44	91,00	-6,53
	Fusão	148,72	159,07	173,00	-16,97
ETB.HCl-CIT (1:3)	Desidratação	57,26	63,64	70,26	-60,30
	Transição de fases	76,61	78,27	80,16	-2,84
	Desidratação	85,58	88,65	91,51	-12,46
	Fusão	146,95	156,91	166,98	-17,21
ETB.HCl-CIT (1:3) _{MF}	Desidratação	53,76	57,88	63,54	-69,72
	Transição de fases	75,42	76,73	78,83	-2,52
	Fusão	163,16	165,82	167,16	-1,39
ETB.HCl-CIT (1:4)	Fusão	167,77	170,98	179,31	-6,78
	Desidratação	57,22	62,67	68,55	-45,22
	Transição de fases	77,18	78,59	80,34	-1,00
CIT _{REC}	Fusão	154,59	158,89	166,42	-9,92
	Desidratação	53,27	59,42	65,64	-31,78
	Fusão	308,77	313,92	319,25	-77,33

A curva de DSC da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT (1:3) também apresentou quatro endotérmicos. O primeiro evento observado em torno de 57,00 °C (T_{onset}) é atribuído à

desidratação por dessolvatação. O segundo evento equivaleu à transição de fases sólido-sólido apresentada pelo ETB.HCl em torno de 76,00 °C. O terceiro evento observado em torno de 85,00 °C (T_{onset}) ocorreu devido à desidratação do material. O quarto evento 146,95 °C (T_{onset}) foi relativo à fusão da dispersão sólida. Nesta razão molar não foi observado o excesso dos compostos de partida, indicando ser a razão molar estequiométrica para a obtenção desta dispersão. Além disso, esta temperatura de fusão foi inferior às temperaturas de fusão do ETB.HCl e da CIT, indicando o aumento da hidrossolubidade do fármaco ETB.HCl quando disperso no coformador CIT.

A curva de DSC da mistura física ETB.HCl-CIT (1:3)_{MF}, apresentou quatro eventos endotérmicos, a saber: desidratação por dessolvatação ($T_{onset} = 53,76$ °C), transição de fases sólido-sólido do ETB.HCl ($T_{onset} = 75,42$ °C), fusão do ETB.HCl ($T_{onset} = 163,16$ °C) e fusão da CIT ($T_{onset} = 167,77$ °C). Logo, o simples contato físico entre os compostos de partida não é suficiente para a formação da dispersão sólida, sendo necessária para este fim a utilização da ELS.

A curva DSC da mistura binária de ETB.HCl-CIT (1:4) apresentou três eventos endotérmicos, caracterizados por: desidratação por dessolvatação ($T_{onset} = 57,22$ °C), transição de fases sólido-sólido do ETB.HCl ($T_{onset} = 77,18$ °C), fusão do novo material e do excesso de CIT em excesso ($T_{onset} = 154,59$ °C). Logo, a razão molar desta mistura binária também não foi estequiométrica para a obtenção da dispersão sólida.

Os dados de temperatura de fusão obtidos a partir das curvas de DSC dos compostos de partida e das misturas binárias ETB.HCl-CIT (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4) foram usados para obter o diagrama de fases binário (Figura 12), visando confirmar a razão molar estequiométrica para a obtenção da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT. O ponto mínimo representa esta razão molar como sendo a fração molar de 0,25 de ETB.HCl, correspondente à razão molar de 1:3.

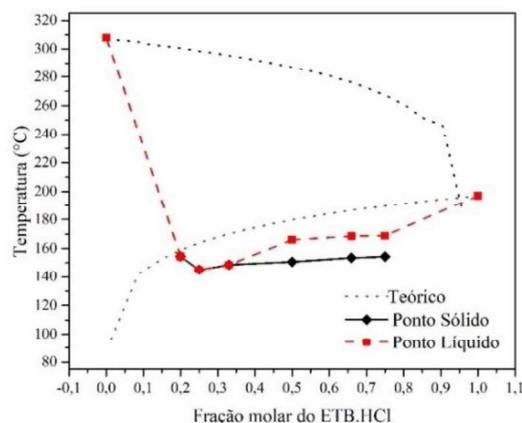


Figura 12 – Diagrama de fases binário.

A partir das curvas DSC das proporções molares de ETB.HCl-CIT obteve-se os dados de temperatura e entalpia de fusão que foram usados para traçar o triângulo de Tamman (Figura 13).

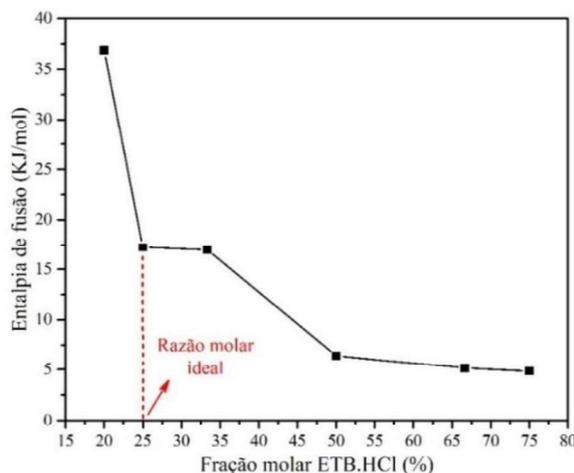


Figura 13 – Triângulo de Tamman.

O triângulo de Tamman confirmou o ponto de formação da DS (Figura 13). Há uma redução da entalpia de fusão a medida em que se aumenta a porcentagem de ETB.HCl, estando a entalpia de fusão da razão ideal, porcentagem de 25% de ETB.HCl (razão molar 1:3), assumindo valor intermediária de entalpia apontado pela seta.

4 CONCLUSÃO

Nesse estudo, foi obtida uma nova dispersão sólida de ETB.HCl-CIT na razão molar de 1:3, utilizando a evaporação lenta do solvente (ELS). A partir da modelagem molecular dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT) realizada por DFT foi possível observar possíveis interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio ($-C=O \cdots HO$) entre as regiões nucleofílicas da CIT e as regiões eletrofílicas do ETB.HCl.

A caracterização por DRXP das misturas binárias ETB.HCl-CIT investigadas mostraram a presença de novos picos cristalográficos em todas as amostras analisadas, indicando a ocorrência de interações intermoleculares entre os compostos de partida. Entretanto, as alterações mais significativas foram observadas na mistura binária ETB.HCl-CIT (1:3), indicando que esta seja a razão molar estequiométrica; que foi confirmada a partir das análises por DSC das misturas binárias investigadas e pela construção do diagrama de

fases binário. As curvas de DTA e DSC apresentaram um único evento de fusão entre 146,0 °C e 152,0 °C (T_{onset}) relacionado a dispersão sólida ETB.HCl-CIT (1:3), que foi inferior às temperaturas de fusão dos compostos de partida, indicando o aumento da hidrossolubilidade do ETB.HCl quando disperso no coformador CIT.

Portanto, o material obtido neste estudo é inédito e muito promissor para a melhoria da biodisponibilidade e da eficácia terapêutica do composto bioativo ETB.HCl, bem como para a redução dos seus efeitos colaterais, contribuindo para a produção de medicamentos mais eficazes e para o aumento da adesão dos pacientes à terapia medicamentosa da tuberculose. Vale ressaltar, que o nucleotídeo CIT encontrado em alimentos possuem propriedades funcionais que são benéficas para o corpo humano. Devido ao caráter inédito e inovador da dispersão sólida de ETB.HCl-CIT (1:3), foi realizado o pedido de depósito da patente deste material junto ao Instituto Nacional de Proteção Intelectual (INPI) sob o registro de número BR1020220144745.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, J. et al. Solid form screening—a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v, 71, n. 1, p. 23-37, 2009. [10.1016/j.ejpb.2008.07.014](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.07.014).
- ABDELAZIZ, A. et al. Melting temperature and heat of fusion of cytosine revealed from fast scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*. v. 657, p. 47-55, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tca.2017.09.013>.
- ALMEIDA, A. L. et al. Chemical Reactivity Indices of the Caffeine Molecule. *Revista Virtual de Química*. v. 8, n. 2, p. 483-492, mar/abr, 2016.
- ALMEIDA, H. E. P. P. J. *Preparação e caracterização de dispersões sólidas e micropartículas lipídicas contendo Ibuprofeno*. 2009. Dissertação (Mestrado) Controle de Qualidade Especialidade Fármacos e Plantas Medicinais.
- BARKER, D. L.; MARSH, R. E. The crystal structure of cytosine. *Acta Cryst*. v. 17, 1964.
- BATISTA, V. H. S. C.; GRANATO, A. C.; ANGELOTTI, W. F. D. Comparison of Density Functional in the Study of Electronic Properties of Artemisinin Derivatives. *Química Nova*. v. 39, n. 3, p. 298-304, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160040>.
- BECKER, C. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ethambutol dihydrochloride. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*. v. 97, n. 4, p. 1350-1360, abr, 2008.
- BRAUN, D. E et al. Experimental and computational hydrate screening: cytosine, 5-flucytosine, and their solid solution. *Crystal growth & design*. v. 17, n. 8, p. 4347-4364, 2017.

BRUNO, João Batista Canevari. *Efeito dos diferentes níveis de nucleotídeos em frangos de corte alimentados com probióticos*. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHERUKUVADA, S.; NANGIA, A. Salts and Ionic Liquid of The Antituberculosis Drug S,S-Ethambutol. *Crystal Growth & Design*. v. 13, n. 4, 8 mar, 2013. 10.1021/cg400071d.

CHERUKUVADA, S.; NANGIA, A. Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chem. Commun.* v. 50, p. 906-923, 2014. 10.1039/c3cc47521b.

COZZOLINO, Silvia. *Nutracêuticos: o que Significa. ABESO (Associação Brasileira para o estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica)*. Ed, v. 55, p. 5-7, 2012.

DELMORAL-SANCHEZ, J. M. et al. Classification of WHO Essential Oral Medicines for Children Applying a Provisional Pediatric Biopharmaceutics Classification System. *Pharmaceutics*. v. 11, n. 567, 2019. doi:10.3390/pharmaceutics11110567.

DINIZ, L. F. et al. Reducing the Hygroscopicity of the Anti-Tuberculosis Drug (S,S)-Ethambutol Using Multicomponent Crystal Forms. *Crystal Growth e Design*, v. 17, p. 2622–2630, 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5^a ed. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Brasília: Anvisa, 2010. 904p., 2v/il.

GANGULY, S.; KUNDU. K. Protonation/deprotonation energetics of uracil, thymine, and cytosine in water from e.m.f./spectrophotometric measurements. *Can. J. Chem.* v. 72, 19 mar, 1994. 189.90.39.189 on 09/10/21.

GROOM, C. R.; ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database in retrospect and prospect. *Angew Chem Int Ed Engl.* v. 52, n. 3, p. 662-71, 2014 : 10.1002/anie.201306438.

GUO, D. et al. A novel imidazolium bonding stationary phase derived from N-(3-aminopropyl)-imidazole for hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461331>.

HAMALAINEN, R.; LEHTINEN, M.; AHLGRÉN, M. Crystal and Molecular Structure of N,N-Bis(1-hydroxy-2butyl)ethylenediamine Dihydrochloride. *Arch. Pharm.* v. 318, p. 26-30, 1985.

HAUSLER, H. et al. Ethambutol Analogues as Potential Antimycobacterial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 11, p. 1679–1681, 2001.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*. v. 136, n. 3B, p. B864-B871, nov, 1964.

KIER, L. B. Molecular orbital studies in chemical pharmacology. *Springer Science & Business Media*. 2012.

KINOSHITA, Y.; JEFFREY, G. A. The Crystal Structure of Cytosine Monohydrate. *Acta Cryst.* v. 16. 1963.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review. Physical Review*. v. 140, n. 4A, p. A1133-A1138, nov, 1965.

LAVOR, E. P. *Estudo de pré-formulação para dose fixa combinada dos tuberculostáticos – rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (4 em 1)*. 2010. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

LAVOR, E. P. et al. Application of thermal analysis to the study of anti-tuberculosis drug compatibility. Part 1. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 108, n. 1, p. 207-212, 2012. 10.1007/s10973-011-1770-8.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Nucleotídeos e ácidos nucleicos*. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995. cap. 12, p. 242-268.

LIMA, P. C.; ALBERT, A. L. M.; LEANDRO, K. C. Determinação simultânea de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol em comprimidos com doses fixas combinadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. v. 74, n. 3, p. 190-9, 11 set, 2015.

LU, J. Crystallization and transformation of pharmaceutical solid forms. *African Journal Of Pharmacy And Pharmacology*. v. 6, n. 9, p. 581-891, 8 mar, 2012. 10.5897/AJPP12.044.

MATEO, C. D. et al. Nucleotides and young animal health: can we enhance intestinal tract development and immune function. *Nutritional biotechnology in the feed and food industries*, p. 20th, 2004.

MCCLURE, R. J.; CRAVEN, B. M. New Investigations of Cytosine and Its Monohydrate. *Acta Cryst*. 1973.

MOHAC, L. M. et al. Multicomponent solid dispersion a new generation of solid dispersion produced by spray-drying. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. v. 57, 12 abr, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101750>.

NANGIA, A.; SWAPNA, B. Epalrestat-Cytosine Cocrystal and Salt Structures: Attempt to Control E,Z --> Z,Z Isomerization. *Crystal Growth Design*. mar, 2017.

PATRA, T.; AHAMAD, S.; UPADHYAYULA, S. Highly efficient alkylation of phenol with tert-butyl alcohol using environmentally benign Bronsted acidic ionic liquids. *Applied Catalysis A: General*. 2015. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.apcata.2015.08.031>.

PINTO, L. S. R. *Síntese, atividade antibacteriana e farmacocinética pré-clínica de pró-fármaco do etambutol terapêutico para meningite tuberculosa*. 2010. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista de Araraquara, São Paulo.

PRASAD, K. D. et al. Differential Cocrystallization Behavior of Isomeric Pyridine Carboxamides toward Antitubercular Drug Pyrazinoic Acid. *Crystal Growth & Design*. v. 15, n. 2, p. 858-866, 2015. 10.1021/cg501642m.

RIEGELMAN, W. L.; CHIOU, S. Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems. *Journal of Pharmaceutical sciences*. v. 60, n. 9, set, 1971.

RUBIN-PREMIER, J. M. et. al. [R, S]-ethambutol dihydrochloride: Variable-temperature studies of a dimorphic system with very similar packing. *Crystal Growth e Design*. v. 4, n. 3, p. 431-439, 2004. 10.1021/cg0341959.

SILVA, F. C. *Síntese e caracterização de um novo cocrystal de gliclazida com trometamina*. 2016. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz.

SHEIKHI, M. et. al. Theoretical Model for Surface Forces between Cytosine and CNT(6,6-6) Nanotube: Geometry Optimization, Molecular Structure, Intermolecular Hydrogen Bond, Spectroscopic (NMR, UV/Vis, Excited State), FMO, MEP, and HOMO–LUMO Investigations. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. v. 93, n. 12, p. 2429-2443, abr, 2019.

SREEVATSAN, S. et. al. Ethambutol Resistance in Mycobacterium tuberculosis: Critical Role of embB Mutations. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. v. 41, n. 8, p. 1677–1681, ago, 1997. 0066-4804/97/\$04.00≤0.

SRIDHAR, B.; NANUBOLU, J. B.; RAVIKUMAR, K. The first polymorph in the family of nucleobases: a second form of cytosine. *Acta Crystallogr C Struct Chem*. v. 71, n. 2, p. 128–135, jan, 2015. 10.1107/S2053229615000492.

SUMMER, L. H. et. al. Stereospecificity In A New Type Of Synthetic Antituberculous Agent. *College Of Chemistry And Physics The Pennsylvania State University Park, PA*, v. 83, 30 mar, 1961.

TAGORE, S. S. et al. Molecular, vibrational (FT-IR and FT-Raman), NMR and UV spectral analysis of imidazo[1,2-b]pyridazine using experimental and DFT calculations. *Chemical Physics Letters*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.136943>.

TENORIO, J. C. et al. NH \cdots Br, Br \cdots π and $\pi\cdots\pi$ interactions toward self-assembly of the cytosine hydrobromide: Crystal structure, infrared spectroscopy and thermal behavior. *Journal of Molecular Structure*. v. 1048, p. 274-281, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2013.05.047>.

ZEISEL, Steven H. Regulation of " nutraceuticals". *Science*, v. 285, n. 5435, p. 1853-1855, 1999.

APÊNDICE A – Pedido de Depósito de Patente junto ao INPI

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 014474 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 06279103000119**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65080-805**País:** Brasil**Telefone:** (98) 32728710**Fax:****Email:** ageufma.cprp@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DISPERSÃO SÓLIDA DE ETAMBUTOL PARA A PRODUÇÃO DE MEDICAMENTO UTILIZADO NO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE

Resumo: Esta invenção refere-se à obtenção de uma dispersão sólida do tipo sal a partir da interação entre o Composto I (Cloridrato de Etambutol – ETB.HCl) e o Composto II (Citosina – CIT) na razão molar de 1:3 utilizando a técnica de Evaporação Lenta do Solvente (ELS). Os materiais deste estudo foram caracterizados por Difração de Raios X pelo Método do Pó (DRXP) e por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os resultados obtidos por DRXP confirmaram a interação do Composto I com o Composto II na razão molar de 1:3, resultando na formação deste sal. A curva de DSC deste material também evidenciou a interação entre estes compostos e a obtenção desta DS, cujo ponto de fusão mostrou-se inferior aos pontos de fusão dos compostos de partida (ETB.HCl e CIT). Tal fato contribuirá para o aumento da hidrossolubilidade do ETB.HCl. Esse material poderá contribuir para maior biodisponibilidade e maior eficácia terapêutica deste fármaco, bem para a redução dos seus efeitos colaterais. Assim, esta DS poderá ser utilizada na produção de medicamentos para a melhoria do tratamento da tuberculose.

Figura a publicar: 01