

CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS FÁRMACOS POR RMN EN ESTADO SÓLIDO

Yamila Garro Linck

Director: Gustavo A. Monti

LaNAIS de RMS – FaMAF - UNC



ESQUEMA DE LA CHARLA

- Objetivos
- Mínima Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear
- Parte I (Complejos)
- Conclusiones (Parte I)
- Parte II (Sacarinatos y Polimorfos)
- Conclusiones (parte II)



Objetivos

Contribuir a la caracterización de nuevos fármacos y su asociación a vehículos que permitan una liberación controlada, a través de la técnica de RMN en Sólidos.

Realizar aportes para lograr un mejor diseño y control del comportamiento de la droga.

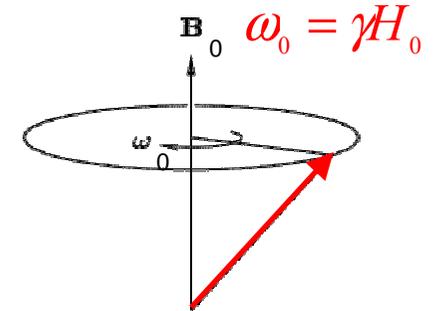
Estudio de polimorfismos y pseudopolimorfismos

Caracterización de la asociación del principio activo a materiales transportadores tales como polielectrolitos, surfactantes, emulsificantes, etc.

Resonancia Magnética Nuclear

Los núcleos atómicos poseen momento magnético μ , en presencia de un campo magnético, precesará alrededor de él con frecuencia ω_0 .

$$\mathcal{H}_z = -\mu \cdot H_0 = -h\gamma H_0 I_z$$



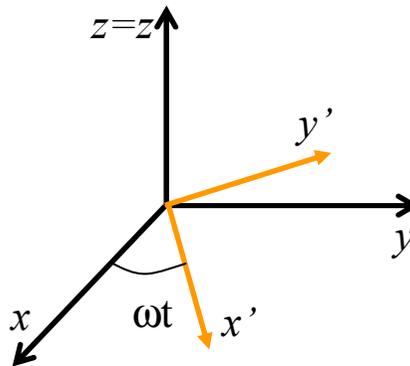
Si se aplica un campo magnético dependiente del tiempo de la forma

$$H_1 = 2H_1 \cos(\omega t) i$$

En la terna de laboratorio \longrightarrow

$$\mathcal{H}_{Lab} = -\gamma h H_0 I_z - \gamma h H_1 \cos(\omega t) I_x$$

Definiendo la terna rotante como



$$\mathcal{H}_{rot} = -\gamma h \left(H_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) I_z - \gamma h H_1 I_x$$

En esta representación H_1 es constante y los espines precesan alrededor de un campo efectivo H_{ef}

$$\Omega \equiv \gamma H_{ef} = \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2}$$

Pulsos de radio frecuencia

Si estamos en condición de resonancia

$$\omega_0 = \omega$$

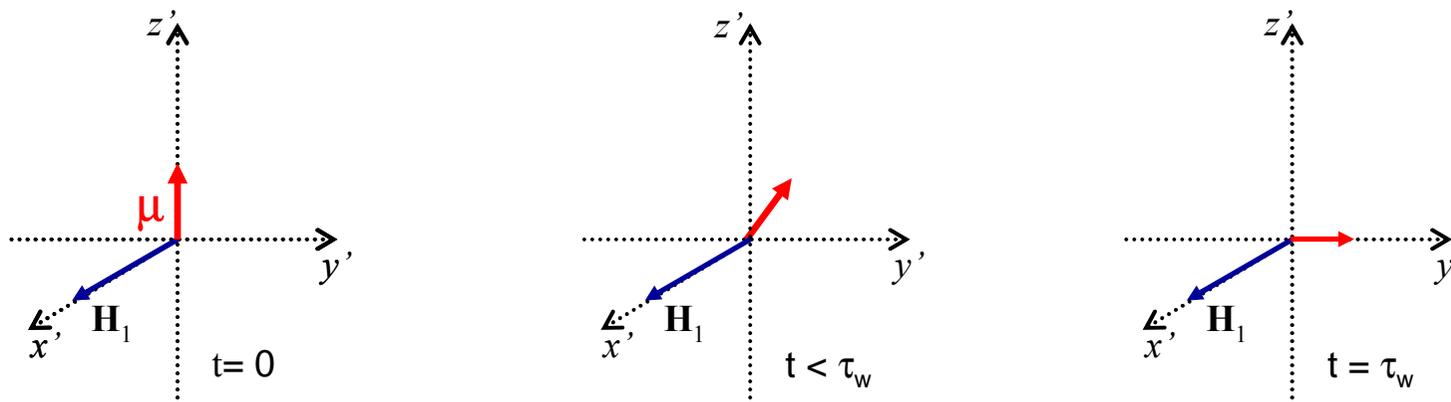
El momento magnético, inicialmente en la dirección z' , precesa en el plano z - y en torno a H_1

$$H_{ef} = H_1 \hat{i}$$

Si aplicamos el campo H_1 por un tiempo corto τ_w el momento girará un ángulo de volteo θ medido desde z' dado por

$$\theta = \omega_1 \tau_w \text{ donde } \omega_1 = \gamma H_1$$

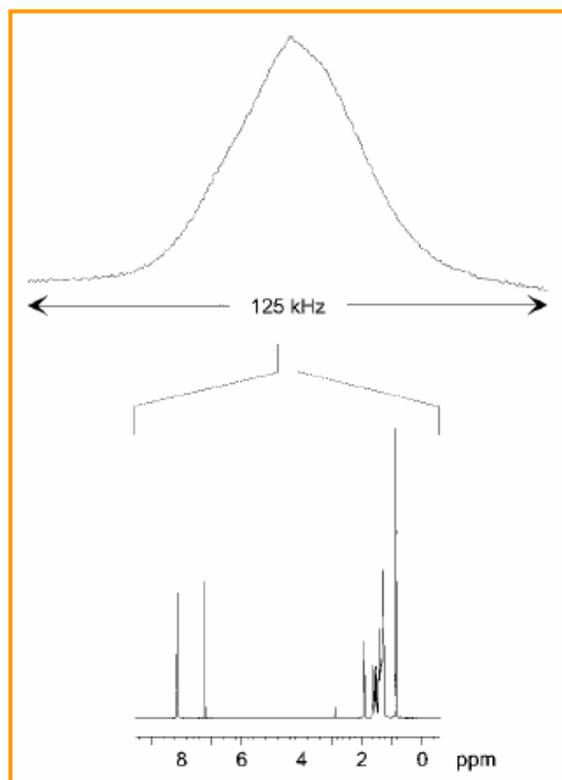
De esta manera se da un pulso de θ alrededor del eje x'
Para el caso particular de un pulso de $\pi/2$



Sólidos vs. Líquidos

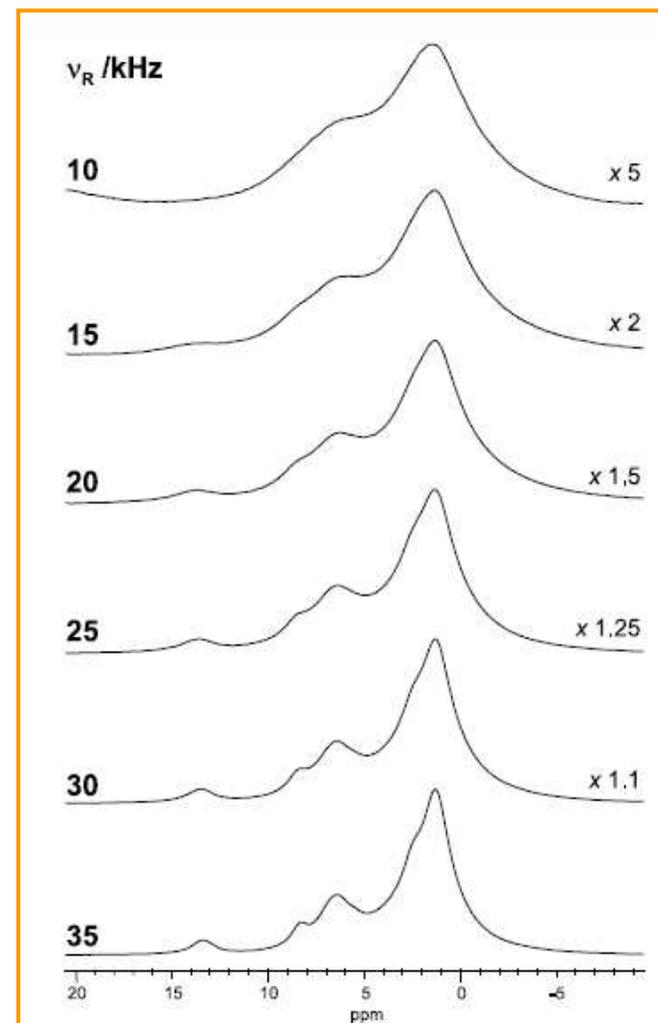
Interacción dipolar
Corrimiento Químico
Interacción Cuadrupolar

$$3 \cos^2 \theta - 1$$



Rotación de la muestra
alrededor de un eje
inclinado a un ángulo
 $\theta=54.7^\circ$ (Ángulo Mágico)

↓
Promedia a cero las
Interacciones anisotrópicas

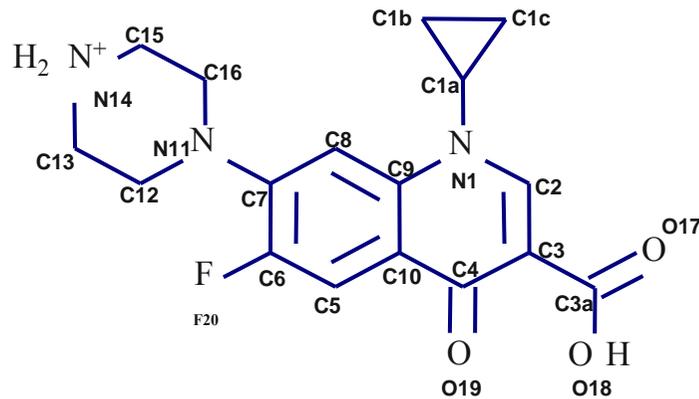




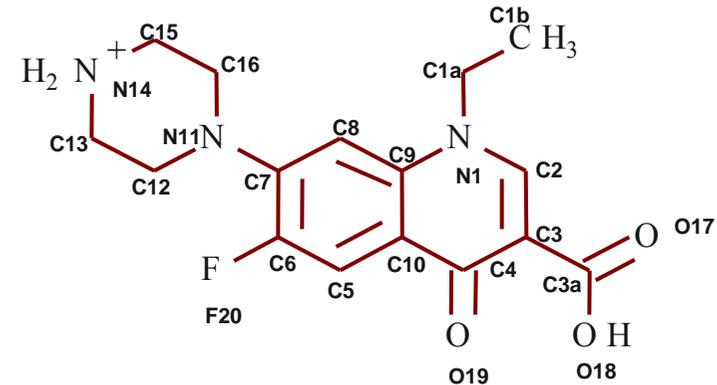
Parte I

Complejos

CIPROFLOXACINO



NORFLOXACINO



Norfloxacin (NOR)
Ciprofloxacin (CIP)
(Antibioticos)

Infecciones Urinarias
Formulaciones Oftálmicas
Formulaciones Óticas

Irritación intestinal
Baja solubilidad a Ph neutro

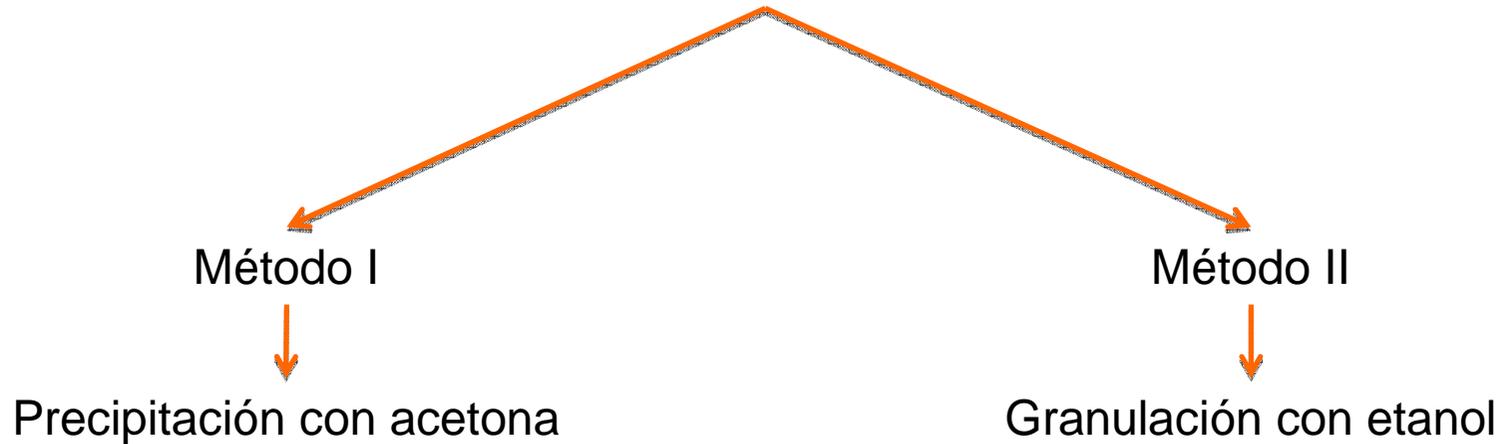


Solución: acomplejamiento con Aluminio
Aumenta la solubilidad acuosa.
Se preservan las propiedades biológicas

Complejos con Aluminio

El motivo del acomplejamiento de estos antibióticos con Aluminio es aumentar la solubilidad acuosa preservando las propiedades biológicas

Métodos de elaboración

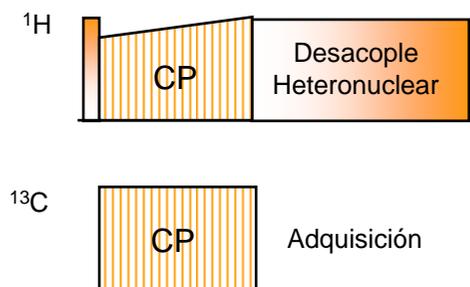


Estos nuevos compuestos son sólidos estables con relación estequiométrica 3:1

Estudios preliminares de difracción de rayos X muestran que ambos métodos tienen un alto porcentaje de material amorfo

Técnicas empleadas

CPMAS (Cross Polarization Magic Angle Spinning)



Transferencia de polarización de los espines abundantes (^1H) a los espines diluidos (^{13}C)

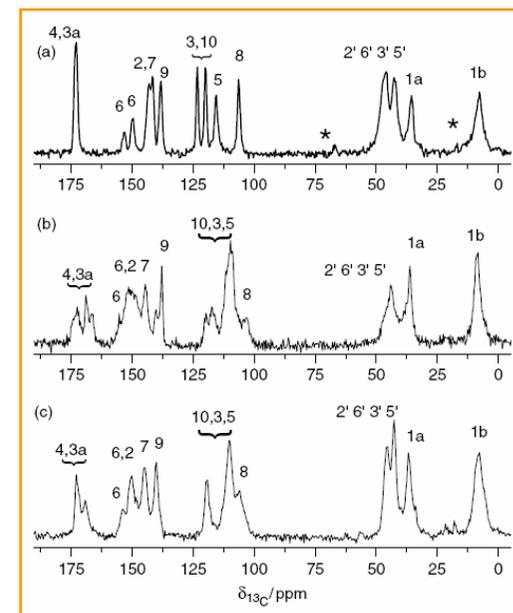
Condición de Hartman-Hahn $\longrightarrow \gamma_C B_C = \gamma_H B_H$

MAS \longrightarrow Rotación al ángulo mágico (54.7°)

Interacción Dipolar

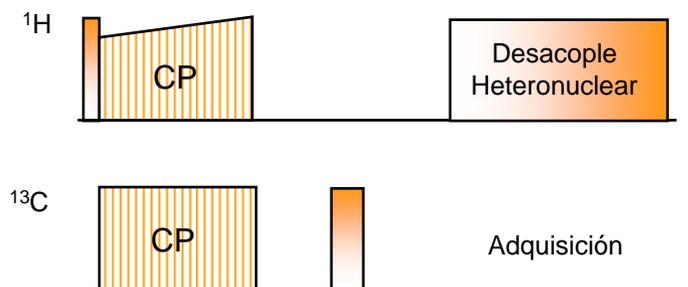
Corrimiento Químico Anisotrópico

$$3 \cos^2 \theta - 1$$

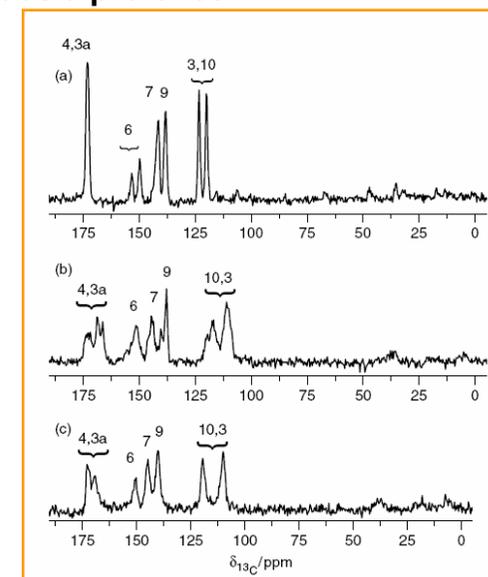


Supresión No Cuaternaria (NQS)

Objetivo: simplificar el espectro removiendo las señales de los núcleos directamente ligados a protones

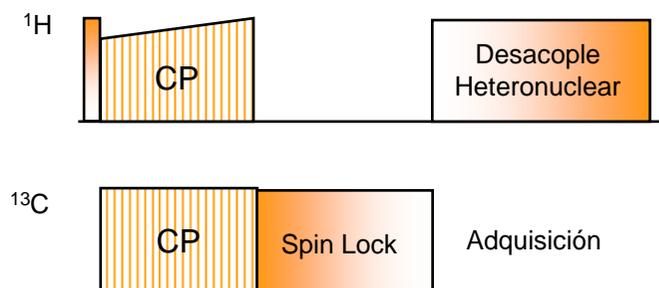


Durante el delay entre la CP y la adquisición, la magnetización de ^{13}C decae debido a las interacciones $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$, lo que lleva a un espectro donde los carbonos de los grupos metinos y metilenos están ausentes.



Tiempo de Relajación en la Terna Rotante $T_{1\rho C}$

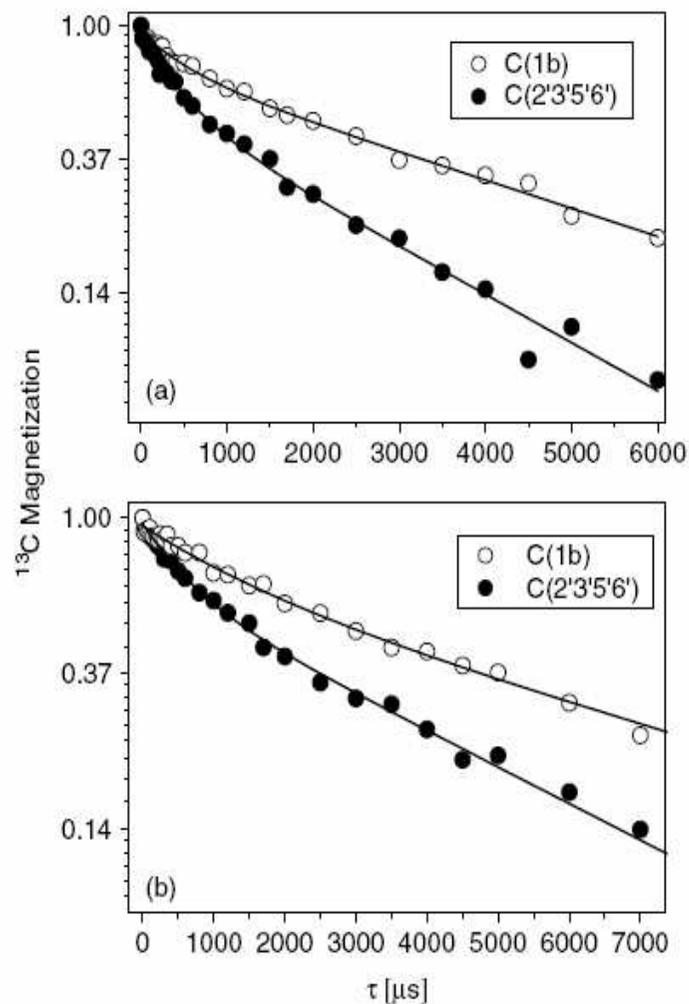
En este experimento, una CP es seguida por un spín-lock en carbono durante un tiempo variable t . Durante t se produce la relajación espín-red de ^{13}C en la terna rotante



La relajación en la terna rotante es sensible a movimientos en la escala de los kHz, dando información de compuestos espacialmente no homogéneos.

$$M_C(\tau) = A \exp(-\tau/\tau_1) + (1 - A) \exp(-\tau/\tau_2)$$

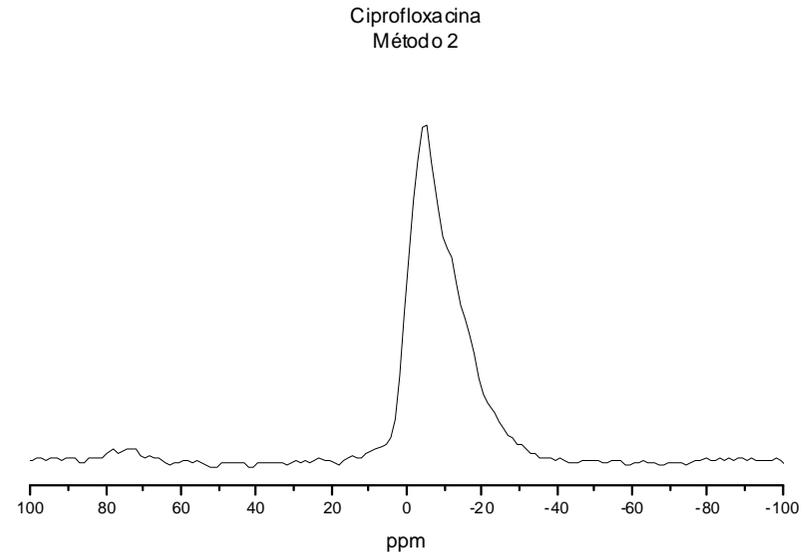
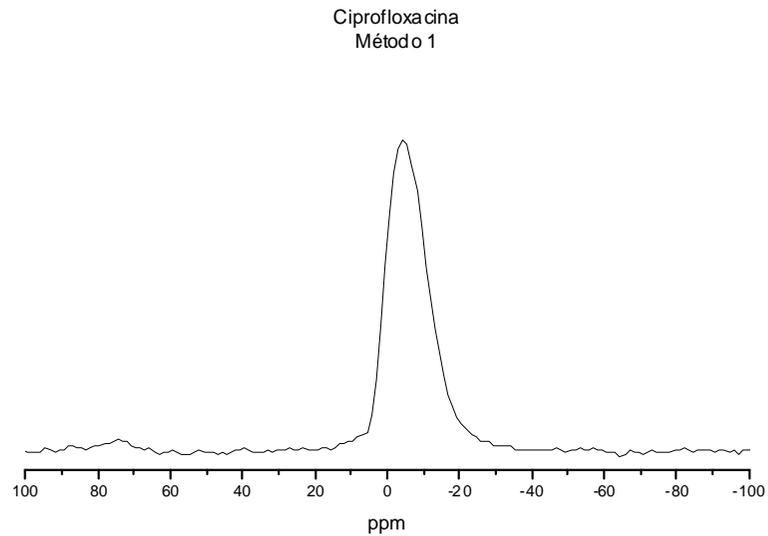
Compuestos no homogéneos con al menos dos fases con diferentes órdenes o movibilidades



Espectro de ^{27}Al

Aluminio

- Núcleo Cuadрупolar ($I=5/2$)
- Corrimiento químico relacionado con la coordinación con Oxígeno



La señal alrededor de 0 ppm nos dice que el Aluminio tiene coordinación octahédrica

Diferencias

- Segundo orden de la interacción Cuadрупolar
- Aluminio en sitios no equivalentes



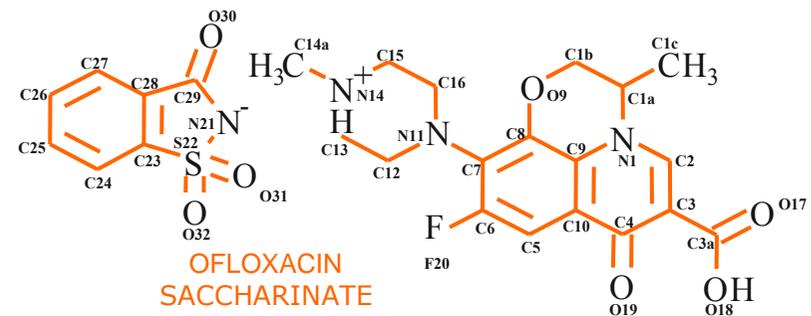
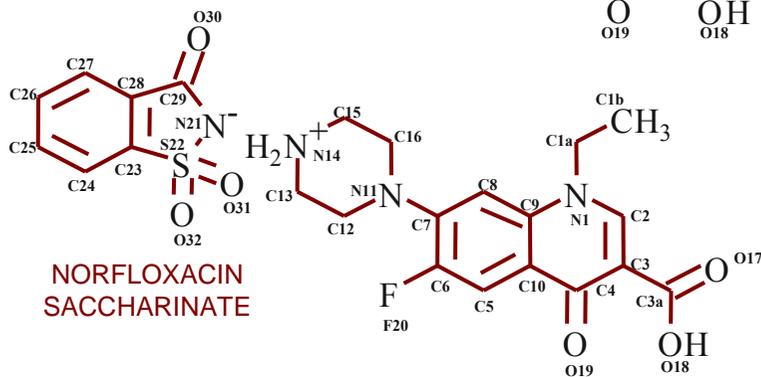
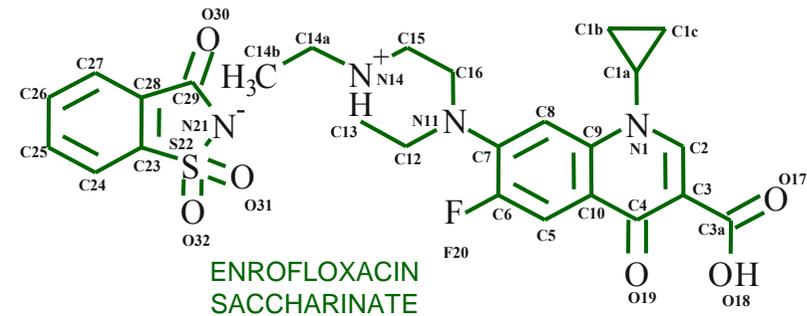
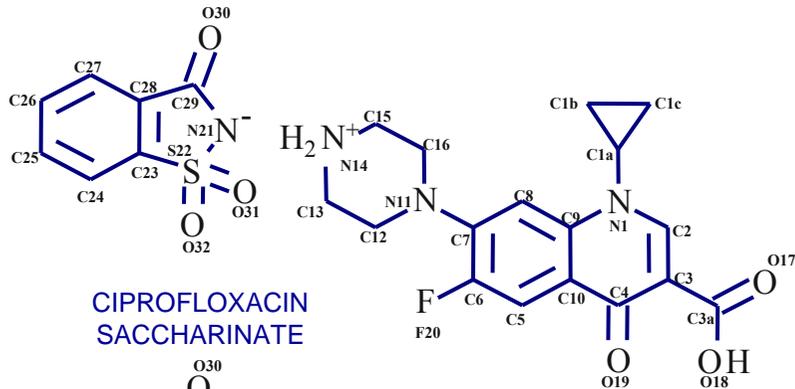
Conclusiones (Parte I)

- Asignación de las distintas señales en el espectro de ^{13}C .
- Caracterización de los compuestos obtenidos mediante los 2 métodos de elaboración.
- No se observan restos de droga pura en los complejos.
- De las mediciones de $T_{1\rho\text{C}}$ se puede determinar la coexistencia de al menos dos fases con diferentes movilidades.
- El $T_{1\rho\text{C}}$ del complejo obtenido mediante el método I es más corto que el del método II, esto puede deberse a una mayor cristalinidad de este último.



Parte II

Sacarinos y Polimorfismo



Baja solubilidad y sabor amargo \longrightarrow Solución: formación de sacarinos.

La sacarina es uno de los endulzantes mas conocidos y mas utilizados.

Los derivados de SAC muestran mejoras en la solubilidad, mejor sabor, estabilidad y biodisponibilidad



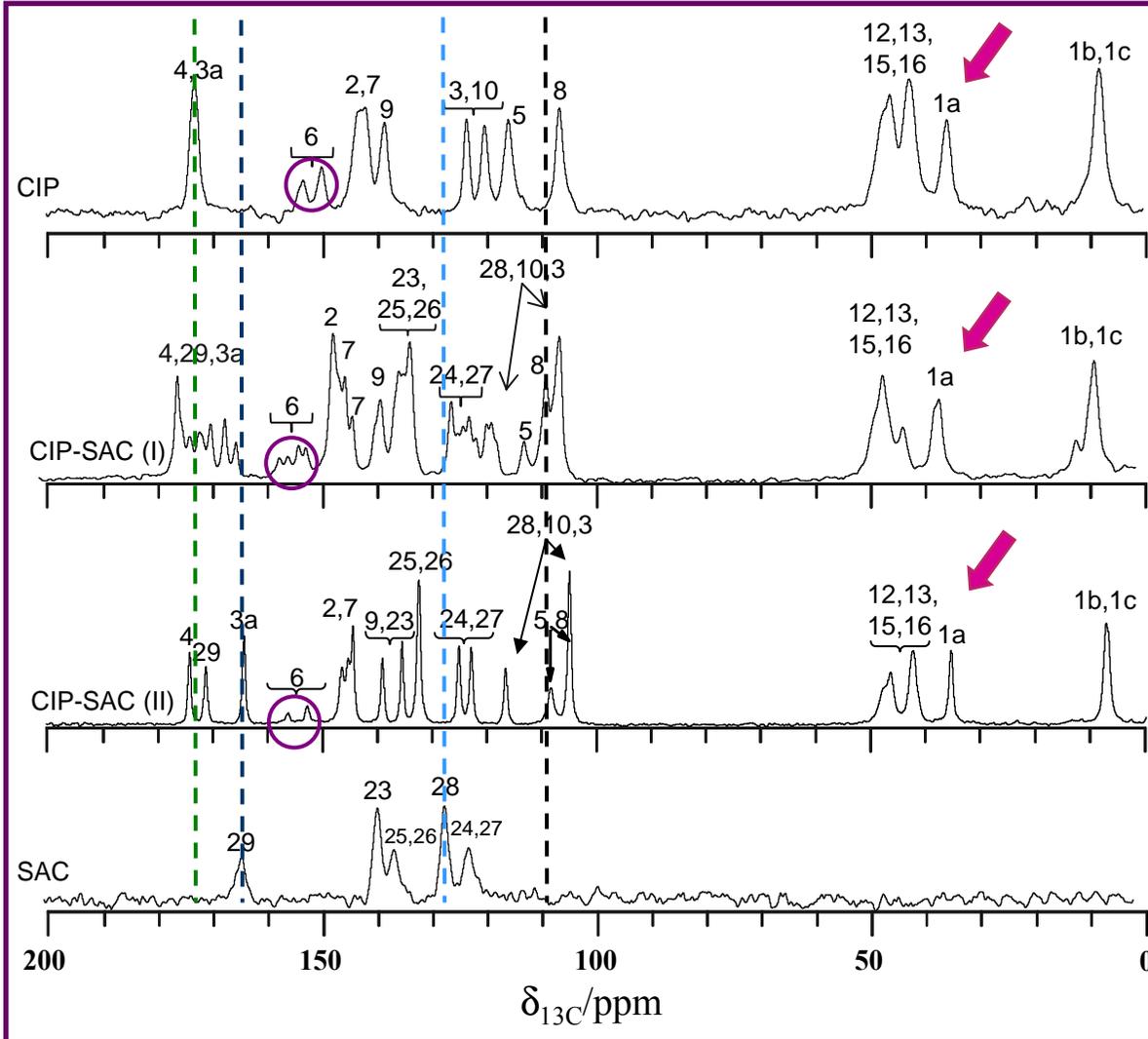
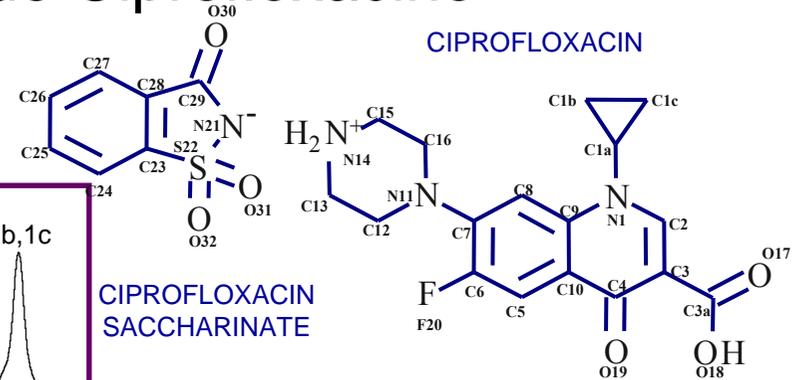
Polimorfismo: habilidad que posee una sustancia para existir como dos o mas fases cristalinas que tienen diferentes arreglos y/o conformaciones moleculares en la red cristalina

(H. G. Brittain, "Polymorphism in Pharmaceutical Solids" 1999)

Diferentes polimorfos poseen diferentes propiedades:

- **Densidad**
- **Dureza**
- **Fluidez**
- **Propiedades ópticas y eléctricas**
- **Punto de fusión**
- **Higroscopicidad**
- **Estabilidad Química**
- **Solubilidad**
- **Tasa de disolución**
- **Biodisponibilidad y Bioequivalencia**

Polimorfos de Sacarinato de Ciprofloxacino



Los polimorfos no son la mezcla física de CIP y SAC y no hay residuos de los precursores.

CIP-SAC (I) : corrimiento de C(29) a ppm mas altos luego de la formación de la sal debido a modificaciones en la interacción puente hidrógeno.

La señal correspondiente a C(28) en el sacarinato se ha movido lejos de su posición original.

C(4) y C(3a) están superpuestos a 173 ppm, mostrando el carácter zwitteriónico de CIP.

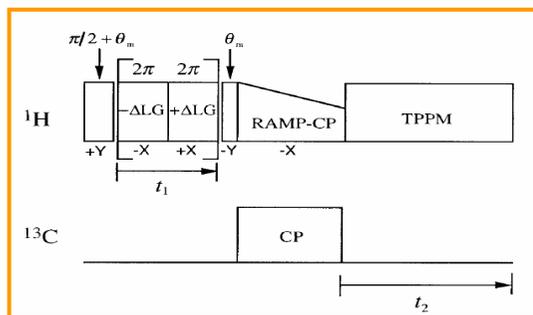
La resonancia correspondiente a C(6) está desdoblada debido a la interacción con ^{19}F .

En CIP se puede ver sólo un par de señales (1 sola molécula por celda unidad), lo mismo ocurre en CIP-SAC (II). En CIP-SAC (I) se observan dos pares de señales, indicando que hay al menos dos moléculas por celda.

Las señales del grupo piperazina de CIP (C(12),C(13),C(15) y C(16)) muestran pocas modificaciones en los polimorfos, esto se debe al carácter zwitteriónico de CIP.

CORRELACIÓN HETERONUCLEAR (HETCOR)

(van Rossum et al. J. Mag. Reson. 124, 516–519 (1997))



LEE GOLDBURG

Se aplica un campo de RF fuera de resonancia de acuerdo a

$$\frac{\Delta LG}{\omega_1} = \frac{1}{\sqrt{2}}$$

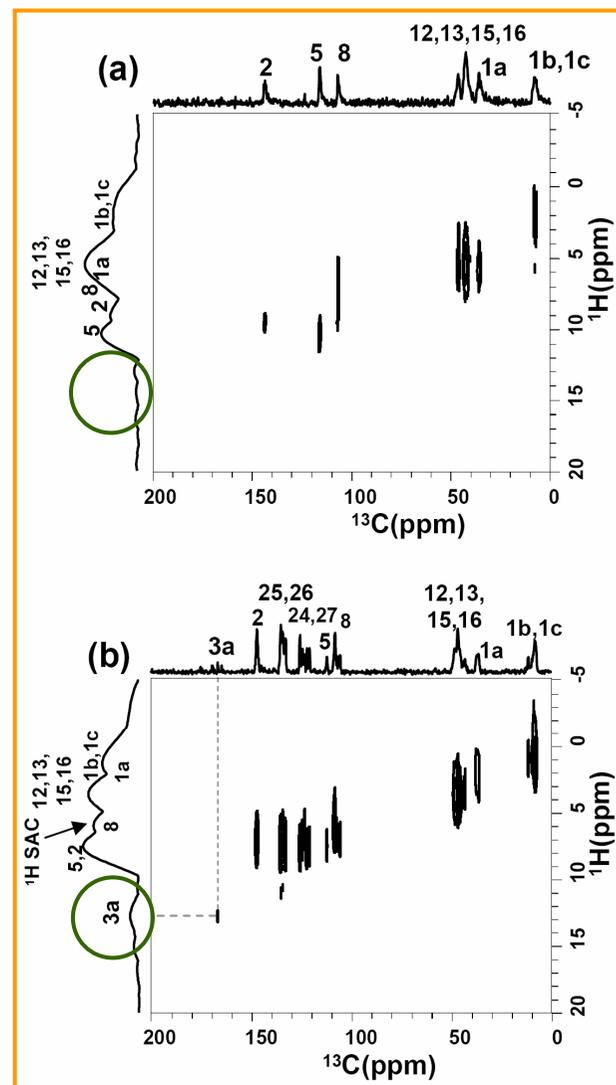
Se cancelan los términos seculares del Hamiltoniano Dipolar

En el espectro de los sacarinos la señal de protones del grupo piperazina está corrida a ppm más altos (alrededor de 1-2 ppm). Esto está de acuerdo con la interacción iónica previamente observada por IR.

El protón del grupo carboxilato H(3a), aparece en casi todos los espectro de 1H en estado sólido. Las correlaciones asociadas a estos protones hacen posible la asignación de C(3a) en los sacarinos. En el espectro de 1H correspondiente a CIP, H(3a) no esta presente, lo cual está de acuerdo con el carácter zwitteriónico del compuesto. Este proton del grupo carboxilato aparece en el espectro de CIP-SAC, confirmando que el carácter zwitteriónico es revertido luego de la formación de la sal.

Los protones de los anillos aromáticos H(2), H(5) y H(8), muestran un claro corrimiento en el sacarinato, indicando la existencia de nuevas interacciones. Estos corrimientos están asociados a cambios en interacciones puente hidrógeno o interacciones π - π .

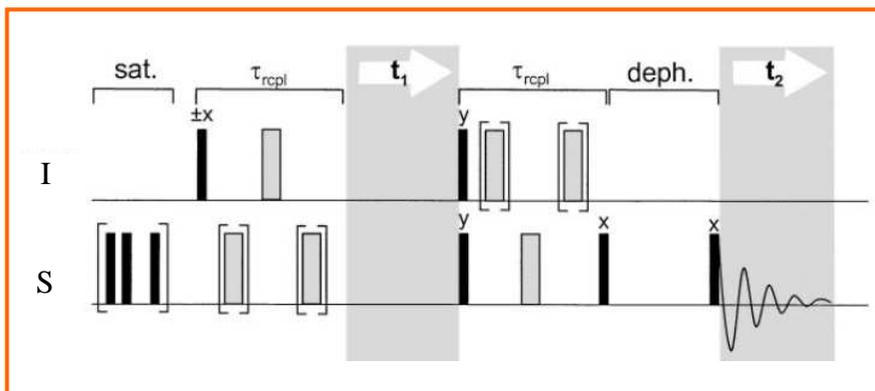
¹ H	SAC	CIP	CIP-SAC	NOR	NOR-SAC	OFL	OFL-SAC	ENR	ENR-SAC
25, 26, 24, 27	7.9	—	7.7, 7.5	—	6.3	—	10.9, 10.0	—	7.2, 6.8
3a	—	—	13.7	14.5	14.7	15.4	16.6	12.7	13.8
2	—	8.5	7.2	7.3	8.7	10.3	11.3	6.2	7.9
5	—	9.5	7.7	5.8	6.6	8.5	9.2	6.1	7.0
8	—	7.3	7.0, 6.2	2.1, 3.6	5.1	—	—	5.7	7.0
12, 13, 15, 16	—	4.4, 4.3	4.2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



REPT – HSQC (Correlación Heteronuclear)

(Kay Saalwächter, Robert Graf and Hans W. Spiess. J. Mag. Reson. **140**, 471-476 (1999))

Secuencia de Pulsos



Hamiltoniano dipolar heteronuclear

$$\mathbf{H}_D^{IS}(t) = -\omega_D^{IS}(t) \cdot 2\mathbf{I}_Z\mathbf{S}_Z$$

Los períodos de recople dipolar son los responsables de la transferencia de polarización. Luego de un pulso de $\pi/2$ en I , $-I_Y$ queda bajo el efecto de \mathbf{H}_D^{IS} por un período $N\tau_R$

$$-I_Y \xrightarrow{\mathbf{H}_D^{IS}(0, N\tau_R)} -I_Y \cdot \cos \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) + I_X\mathbf{S}_Z \cdot \sin \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R)$$

El estado mixto $I_X\mathbf{S}_Z$, experimenta la evolución del corrimiento químico de I durante t_1 de acuerdo a $\mathbf{H}_{CS}^I = \omega_{CS}^I I_Z$

$$I_X\mathbf{S}_Z \cdot \sin \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \xrightarrow{\omega_{CS}^I I_Z} [I_X\mathbf{S}_Z \cdot \cos(\omega_{CS}^I t_1) + I_Y\mathbf{S}_Z \cdot \sin(\omega_{CS}^I t_1)] \cdot \sin \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R)$$

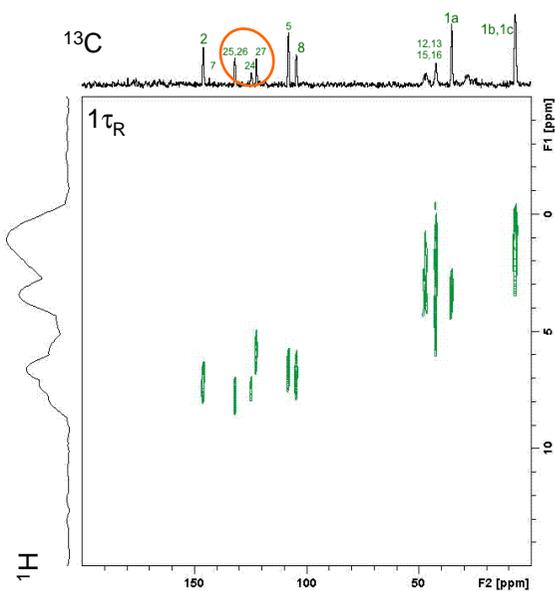
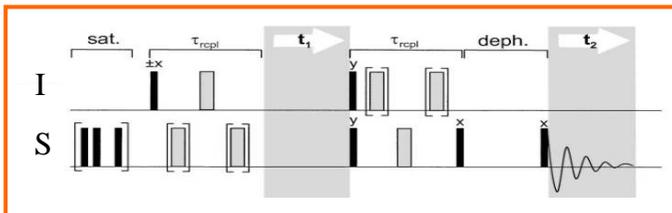
Las componentes de la señal, S_x y S_y del espectro HSQC estan dadas por

$$S_X(\mathbf{S}) \propto \langle \cos(\omega_{CS}^I t_1) \cdot \sin \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \cdot \sin \Omega_D^{IS}(t_1, t_1 + N\tau_R) \rangle$$

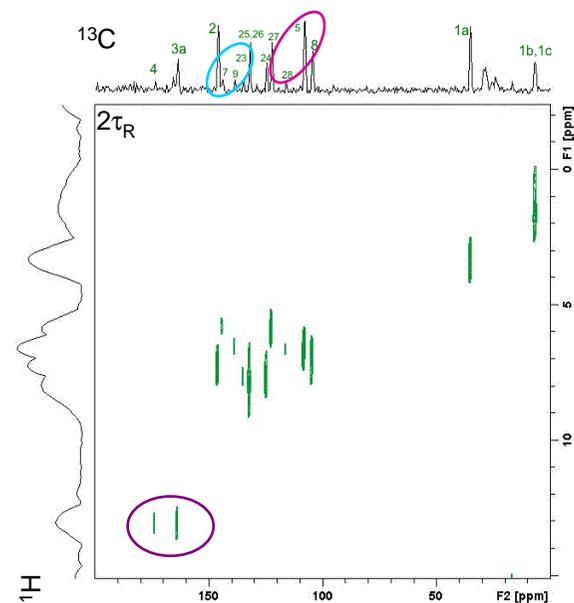
$$S_Y(\mathbf{S}) \propto \langle \sin(\omega_{CS}^I t_1) \cdot \sin \Omega_D^{IS}(0, N\tau_R) \cdot \sin \Omega_D^{IS}(t_1, t_1 + N\tau_R) \rangle$$

REPT – HSQC (Correlación Heteronuclear)

(Kay Saalwächter, Robert Graf and Hans W. Spiess. J. Mag. Reson. **140**, 471-476 (1999))



- Correlación heteronuclear basada en los acoplos dipolares entre ^1H y ^{13}C .
- Con 1 período de rotor se obtienen correlaciones entre núcleos a una ligadura de distancia.
- Espectro de protones de alta resolución
- Cambios en el CS de H(2), H(5) y H(8) indican interacciones π - π .



- Con 2 períodos de rotor se pueden identificar claramente los carbonos cuaternarios.
- Puente hidrógeno entre O(18) y O(19) es observado a través de C(4) y C(3a)
- Interacciones iónicas pueden identificarse debido a cambios en el corrimiento químico de los protones pertenecientes al grupo piperazina.

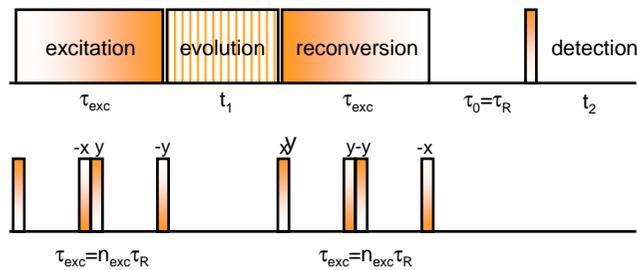
DQMAS – BABA (Correlación Homonuclear)

(M. Feike, D. E. Demco, R. Graf, J. Gottwald, S. Hafner, and H. W. Spiess. J. Mag. Reson. A **122**, 214-221 (1996))

Cómo generar Coherencias Cuánticas Dobles

Para un sistema de espines bajo MAS el Hamiltoniano es

$$\mathbf{H}(t) = -\Delta\omega\mathbf{I}_Z + \mathbf{H}_{CS}(t) + \mathbf{H}_D(t)$$



Respuesta del sistema a la secuencia de pulsos BABA

$$\rho(\tau_R) = T \exp \left\{ -i \int_{\tau_R/2}^{\tau_R} \hat{\mathbf{P}}_y \mathbf{H}(t) dt \right\} \times T \exp \left\{ -i \int_{\tau_0}^{\tau_R/2} \hat{\mathbf{P}}_x \mathbf{H}(t) dt \right\} \rho(0)$$

$$\hat{\mathbf{P}}_\mu = \exp\{i(\pi/2)\hat{\mathbf{I}}_\mu\}$$

En el regimen de altas velocidades

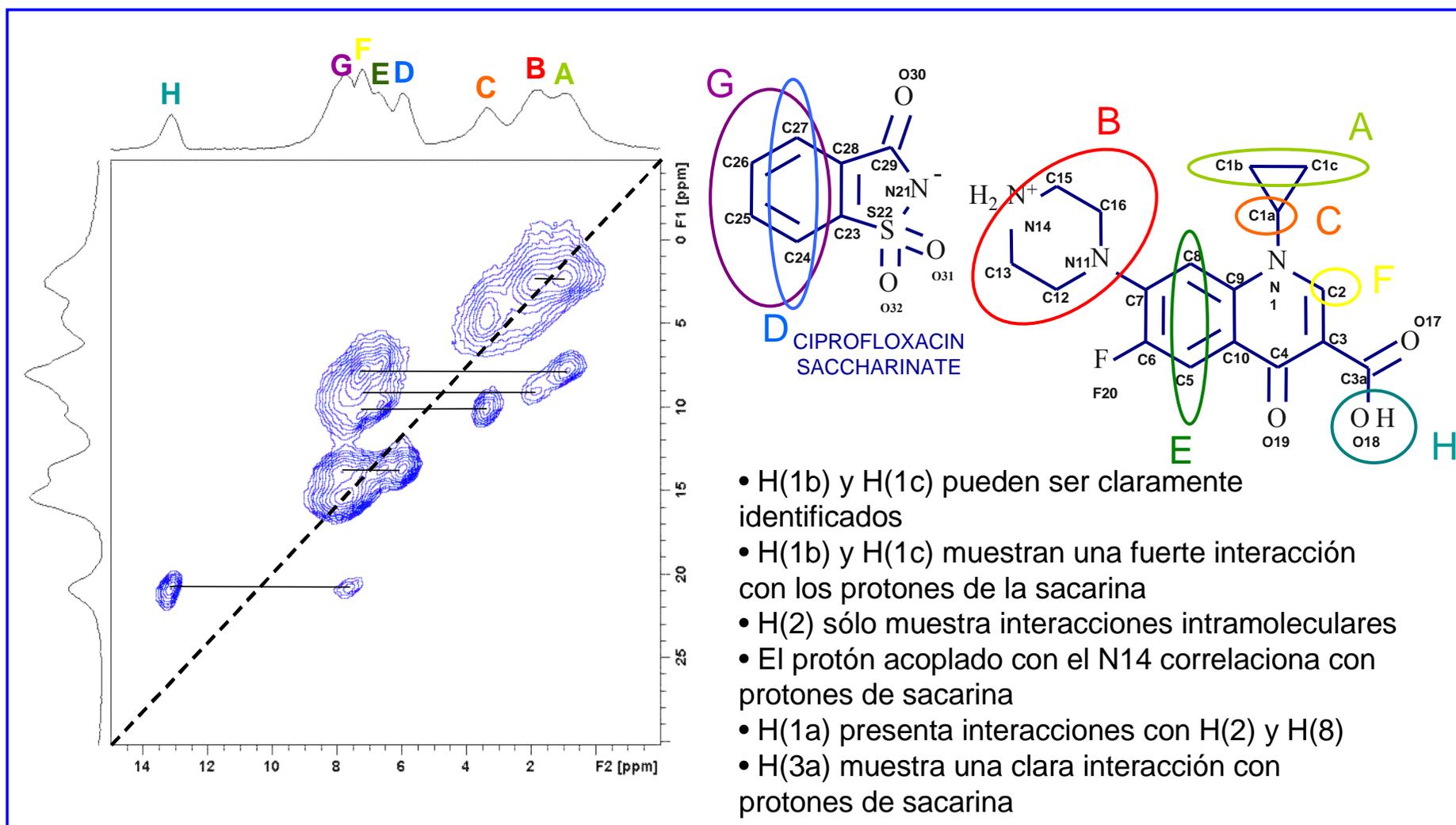
$$\rho(\tau_R) = \exp \left\{ -i\bar{\mathbf{H}}^{(0)}\tau_R \right\} \rho(0)$$

A partir de estas ecuaciones se obtiene el Hamiltoniano promedio de orden cero

$$\bar{\mathbf{H}}^{(0)} = \frac{-\Delta\omega}{2}(\mathbf{I}_x - \mathbf{I}_y) - \frac{1}{\tau_R} \left[\sigma \left(\tau_R; \frac{\tau_R}{2} \right) \mathbf{I}_x - \sigma \left(\frac{\tau_R}{2}; 0 \right) \mathbf{I}_y \right] + \mathbf{H}_{DQ}$$

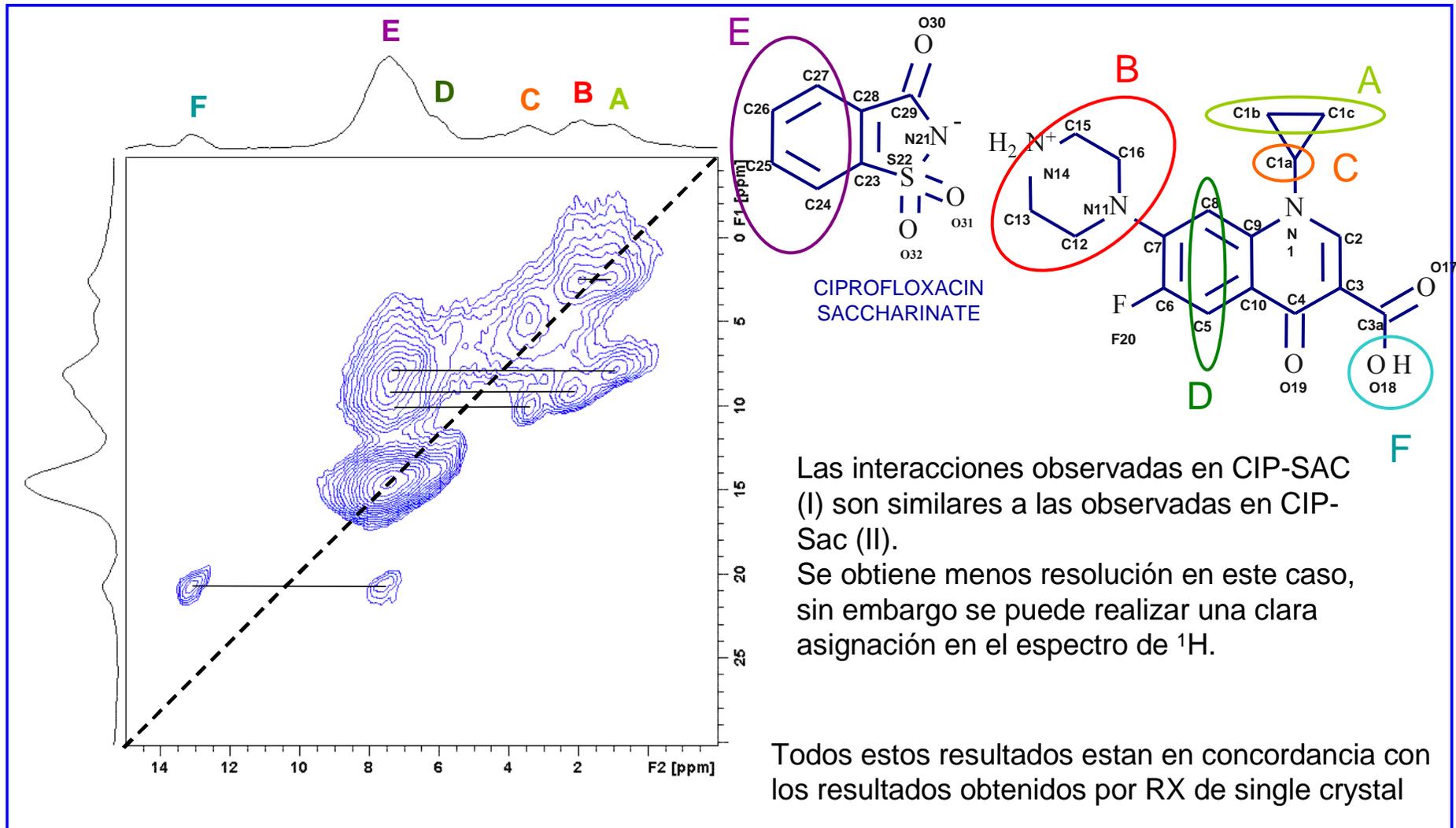
$$\mathbf{H}_{DQ} = \left(\frac{3}{\pi\sqrt{2}} \right) \sum_{i>j} D^{ij} \sin(2\beta^{ij}) \sin(\gamma^{ij}) \{T_{2,2}^{ij} + T_{2,-2}^{ij}\}$$

CIP - SAC (II)



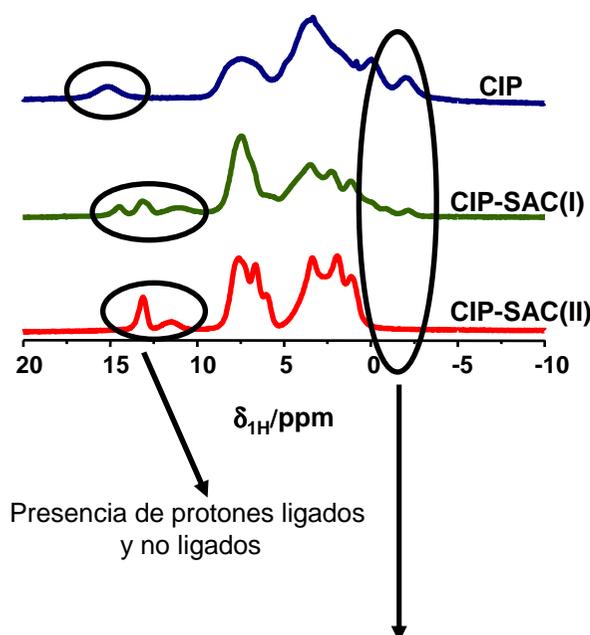
- H(1b) y H(1c) pueden ser claramente identificados
- H(1b) y H(1c) muestran una fuerte interacción con los protones de la sacarina
- H(2) sólo muestra interacciones intramoleculares
- El protón acoplado con el N14 correlaciona con protones de sacarina
- H(1a) presenta interacciones con H(2) y H(8)
- H(3a) muestra una clara interacción con protones de sacarina

CIP - SAC (I)



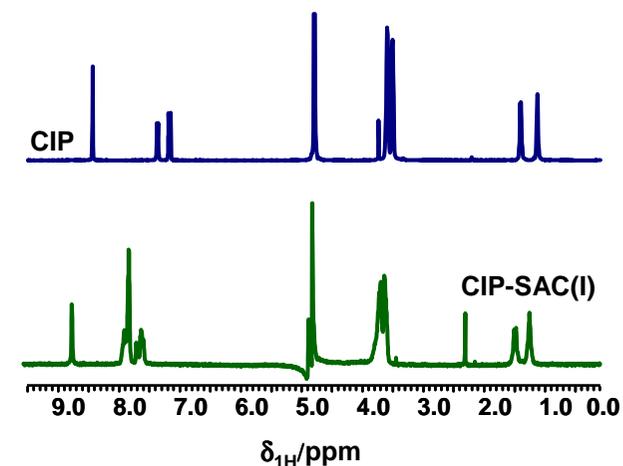
Espectros ^1H

Espectro de ^1H @ 60 kHz



Corrimientos a ppm negativos, esto indica una interacción fuerte entre protones del grupo metilo con protones de grupos aromáticos

Espectro de ^1H en Solución



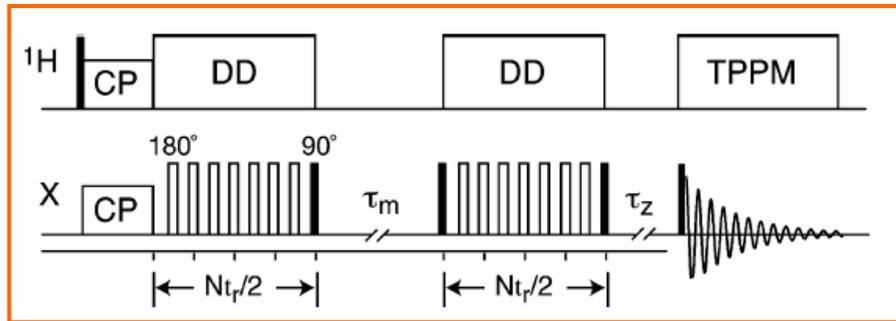
Señal	SOLUCIÓN CS (ppm)		ESTADO SÓLIDO CS (ppm)		
	CIP	CIP-SAC(I)	CIP	CIP-SAC (I)	CIP-SAC (II)
1b	1.1	1.2	1.7	0.9	0.9
1c	1.4	1.5	1.7	2.2	1.8
12,13,15,16	3.5 – 3.6	3.7	4.4 – 4.3	1.6 – 3.3	1.6 – 3.3
1a	----	----	4.9	3.4	3.4
8	7.4	7.7	7.3	7.0	7.0
5	7.2	7.6	8.5	6.6	6.6
2	8.4	8.7	9.5	7.3	7.3
3a	----	----	----	13.0	13.0
23,24,27,28	----	7.8	----	7.6 – 7.7 - 8.0	7.6 – 7.7 - 8.0
1 ?	----	----	----	11.0	11.4
2 ?	----	----	14.9	14.4	----
3 ?	----	----	-2.2	-2.2	----
4 ?	----	----	----	-0.9	----
5 ?	----	----	-0.4	----	----
6 ?	----	----	----	-0.1	----

Cambios observados en estado sólido

- Corrimientos a ppm más altos de protones en el grupo piperazina en CIP
- H(1b) y H(1c) muestran corrimientos a ppm más altos en CIP
- H(2), H(5) y H(8) presentan corrimientos a ppm más bajos en SAC-CIP (I) y (II)
- H(3a) puede ser claramente identificado en ambos sacarinos
- Nuevas interacciones puente hidrógeno en estado sólido

CODEX (Centerband Only Detection of Exchange)

(Wenbin Luo and Mei Hong, JACS 2006, 128, 7242 – 7251)



La constante k_{ij} que indica la transferencia de polarización entre espines X_i y X_j a velocidades de rotación menores que el acople dipolar $^1\text{H-X}$ puede aproximarse por una ecuación derivada de la caso estático:

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

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

Acople Dipolar Homonuclear

Integral de Overlap que describe la probabilidad de que se produzcan transiciones single-quantum a la misma frecuencia para espines i y j

$$F_{ij}(0) = \int_{-\infty}^{\infty} f_i(\omega - \omega_i) f_j(\omega - \omega_j) d\omega$$

La evolución temporal del vector n -dimensional de la magnetización $\vec{\mathbf{M}}(t)$, está dada por

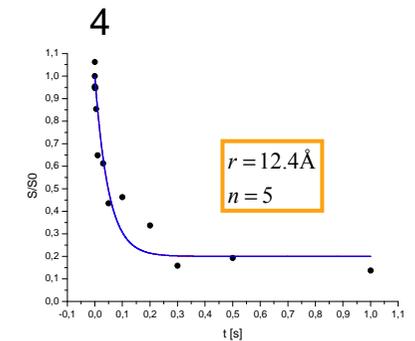
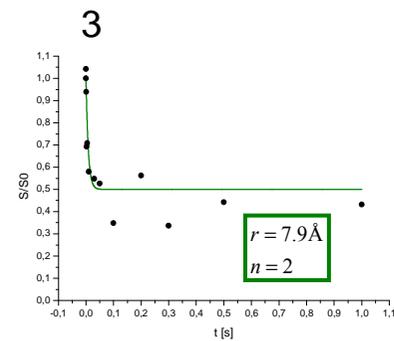
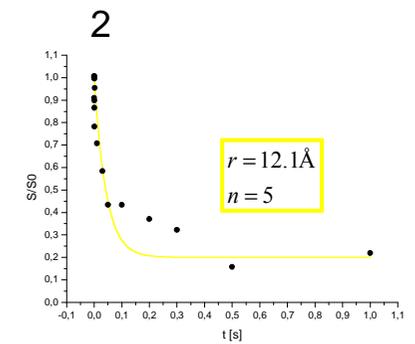
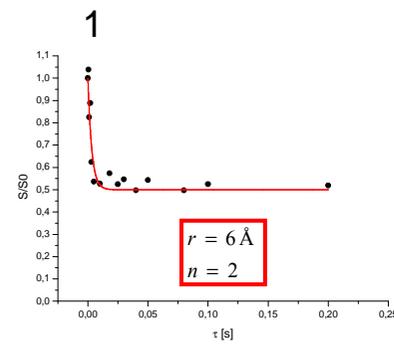
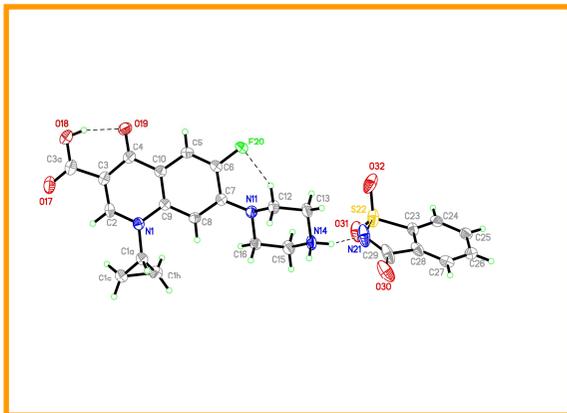
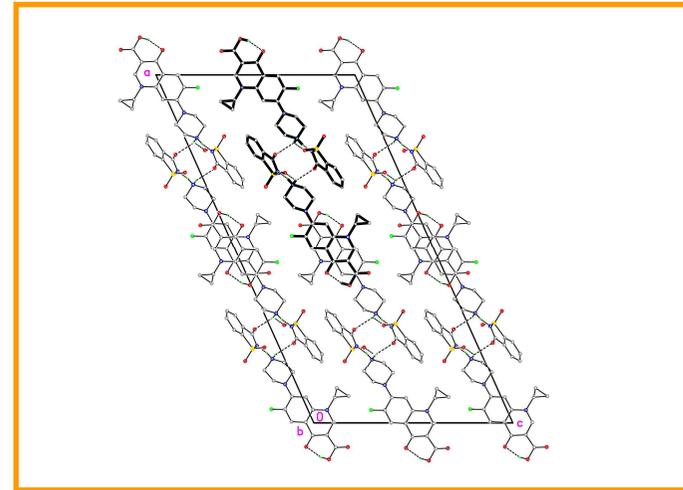
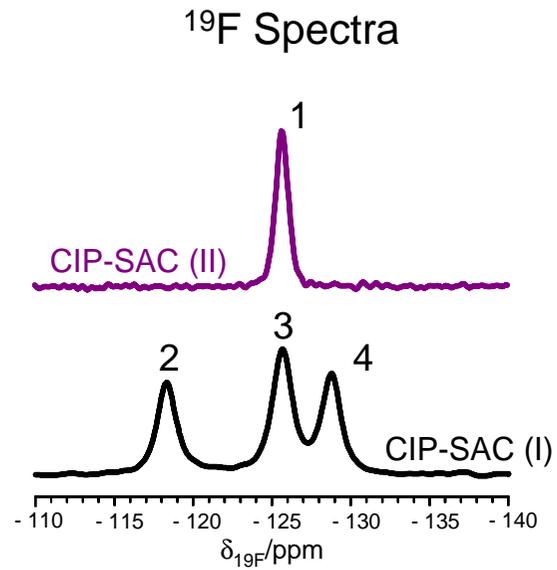
$$\frac{d\vec{\mathbf{M}}(t)}{dt} = -\hat{\mathbf{K}}\vec{\mathbf{M}}(t)$$

Matriz de intercambio n -dimensional que contiene las constantes k_{ij}

La solución formal para una dada magnetización inicial $\vec{\mathbf{M}}(0)$ es

$$\vec{\mathbf{M}}(t) = e^{-\hat{\mathbf{K}}t} \vec{\mathbf{M}}(0)$$

CODEX (^{19}F - ^{19}F)





Conclusiones (Parte II)

- CIP-SAC (II) fue estudiado y comparado con CIP-SAC(I).
- Las características generales y corrimientos en las resonancias observadas en CIP-SAC (II) pueden también ser observadas en CIP-SAC (I). Por ejemplo los corrimientos en C(3), C(10), C(28), C(29). Luego, las interacciones encontradas para CIP-SAC(II) combinando RX y RMN pueden extrapolarse a CIP-SAC(I).
- Experimentos bidimensionales (Heteronucleares y Homonucleares) nos permitieron identificar interacciones inter e intra moleculares en los tres compuestos.
- Diferencias y similitudes en las estructuras de los compuestos fueron determinadas.
- Los espectros bidimensionales ^1H - ^1H son similares para CIP-SAC (I) y CIP-SAC (II), esto nos lleva a concluir que la mayoría de las interacciones que se observan son intramoleculares.
- Se pudieron determinar distancias internucleares entre los núcleos de Flúor (r).
- En CIP-SAC (I) se observaron dos distancias entre ^{19}F una de 7.9 Å y la otra de 12.4 Å. También se observaron dos números de moléculas por celda unidad diferentes.
- El experimento CODEX y los espectros de ^{13}C CP-MAS nos permiten concluir que CIP-SAC (I) es una mezcla de dos estructuras: algunas moléculas en la celda unidad presentan orientaciones similares a las encontradas en CIP-SAC (II).



Agradecimientos



Facultad de Matemática, Astronomía y Física

Karina Chattah

Rodolfo H. Acosta

Gustavo A. Monti

Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas

Carolina Romañuk

María Eugenia Olivera

Rubén Manzo

Agencia Córdoba Ciencia. Unidad CEPROCOR, Córdoba

Silvia L. Cuffini

Max Planck Institute for Polymer Research, Mainz, Germany

Robert Graf

Hans-Wolfgang Spiess

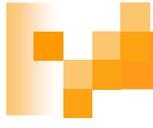
Laboratoire de RMN de la Matière Condensée, Institut Le Bel, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

Jesus Raya

Jèrôme Hirschinger

We acknowledge financial support received from Fundación Antorchas, ANPCyT, CONICET, MinCyT-Córdoba and SeCyT-UNC.

Partner Group for NMR Spectroscopy with high spin polarization MPIP-FaMAF.



GRACIAS!!!