

## CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANALÍTICA DO GANCICLOVIR

Roxana Lili Roque Flores<sup>1</sup> (PG)\*, Simone Garcia de Ávila<sup>2</sup> (PG), Juliana Ferreira de Oliveira<sup>2</sup> (PG), Flavio Machado de Souza Carvalho<sup>3</sup>, Gabriel Lima Barros de Araujo<sup>1</sup>, Jivaldo do Rosário Matos<sup>2</sup> (PQ).

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Geociências, USP, São Paulo, Brasil

\*roxli\_9@hotmail.com

### Resumo

A caracterização do estado sólido é um dos parâmetros mais importantes na etapa de desenvolvimento de um fármaco, uma vez que fornece dados fundamentais sobre as propriedades físico-químicas do fármaco. O ganciclovir é um fármaco antiviral utilizado no tratamento da retinite por citomegalovírus. Recentes estudos de caracterização indicaram a existência de diferentes formas cristalinas do GCV, tais como anidro e hidrato, além de outras estruturas cristalinas ainda não determinadas nem quantificadas. O objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo termoanalítico e espectroscópico do GCV e investigar a presença de polimorfos em amostras comerciais do fármaco. Utilizaram-se, técnicas termoanalíticas (TG/DTG e DSC) associadas a outras técnicas de caracterização como Difratometria de raios X (DRX), Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Electronica de Varrededura (MEV) e análise elementar. Foi observado na curva DSC um evento exotérmico em torno de 190°C, que foi atribuído a alguma transição cristalina, uma vez que esse evento não esteve associado à perda de massa na curva TG. Além disso, picos de difração ao redor de 7° e 8° (20) foram evidenciados e podem ser indicativos da presença do polimorfo III do fármaco. Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas permitiram caracterizar a amostra de GCV. Além disso, foi possível identificar a presença de outra forma cristalina do fármaco.

### Abstract

The characterization of solid state is one of the most important parameters in the development of a drug, since it provides basic information about the physicochemical properties of the drug. Ganciclovir is an antiviral drug used in the treatment of retinitis caused by CMV. Recent characterization studies indicated the existence of different crystalline forms of GCV, such as anhydrous and hydrate, besides other crystal structures not yet determined nor quantified. The aim of this work was to perform the study thermoanalytical and spectroscopic GCV and investigate the presence of polymorphs in commercial samples of the drug. Thermoanalytical techniques (TG / DTG and DSC) combined with other characterization techniques such as diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and elemental analysis were used. It was observed in the DSC curve an exothermic event about 190°C, which was attributed to a crystalline transition since this event was not associated with weight loss in the TG curve. In addition, diffraction peaks around 7° and 8° (20) were evidenced and may be indicative of the presence of polymorph III drug. The results obtained by the different techniques allowed characterizing the sample of GCV. Moreover, it was possible to identify the presence of another crystalline form of the drug.

### 1. INTRODUÇÃO

A retinite por citomegalovírus (CMV) é a infecção ocular oportunista mais comum e a maior causa de perda visual em pacientes com AIDS (GROSS *et al.*, 1990). A infecção é causada por um membro do grupo do herpes vírus, mais conhecido como herpes vírus humano - 5 (HHV-5 ou CMV). A maioria das pessoas está exposta ao CMV, entretanto, a doença só se manifesta em indivíduos imunossuprimidos, como no caso dos pacientes infectados por HIV, os que sofreram transplante de medula óssea, e aqueles que estão em tratamento quimioterápico ou sob ação de fármacos que inibem o sistema imunológico (GROSS *et al.*, 1990).

O ganciclovir (GCV) é o antiviral mais amplamente estudado na prevenção e no tratamento da retinite por CMV. Sua designação química é 9 - (1,3-diidroxi-2-propoximetyl) guanina. O GCV ( $C_9H_{13}N_5O_4$ ), estrutura molecular ilustrada na FIGURA 1, é um nucleósideo sintético análogo à guanina e estruturalmente semelhante ao aciclovir. Apresenta-se, comercialmente, na forma injetável de 500 mg/10 mL e cápsulas de 250 mg KOROKOLVAS; FRANÇA, 2009; MERCK INDEX, 2006.

O fármaco é um componente hidrofílico polar, com coeficiente de partição octanol/água de 0,022, é pouco solúvel em água à temperatura ambiente (2,6 mg/mL) (CYTOVENE®-IV, 2010). Entretanto, sua solubilidade pode aumentar notavelmente ( $>100$ mg/mL) em sistemas com valores de pH altos (TANG *et al.*, 2012;). Devido à baixa solubilidade, o fármaco é pouco absorvido, apresentando uma biodisponibilidade de 5% a 9% (KOROKOLVAS; FRANÇA, 2009; YANG; MANITPISITKUL; SAWCHUK, 2006).

Estudos de caracterização do estado sólido do GCV realizados pela United States Pharmacopeia (USP) não demonstraram a existência de formas polimórficas. Entretanto, trabalhos recentemente publicados por Kawamura e Hirayama (2009) e Sarbajna *et al.*, (2011) indicaram a existência de diferentes formas cristalinas do GCV, tais como anidro e hidrato, além de outras estruturas cristalinas ainda não determinadas nem quantificadas.

Apesar da existência de documentos que relatam a presença de formas polimórficas do GCV, poucos dados foram encontrados na literatura quanto às características físico-químicas e ao estudo termoanalítico desta espécie, existindo, portanto, uma lacuna para o estabelecimento de um padrão e controle de qualidade de um medicamento importante comercializado no Brasil. Dessa forma, é necessária a realização de mais estudos de caráter investigativo e científico para compreender o comportamento desta espécie e de suas possíveis formas polimórficas.

## 2. OBJETIVO

O presente trabalho teve por finalidade realizar o estudo termoanalítico e espectroscópico do GCV e investigar a presença de polimorfos em amostras comerciais do fármaco. Para isto foram utilizadas técnicas termoanalíticas (TG/DTG e DSC) associadas a outras técnicas de caracterização.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Material

Utilizou-se uma amostra codificada como GCV, obtida de uma indústria farmacêutica brasileira.

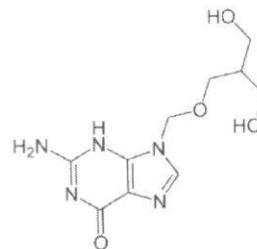


FIGURA 1. Estrutura molécula do GCV

### 3.2. Métodos

**3.2.1. Difratometria de raios X.** Os difratogramas de raios X foram obtidos no difratômetro Siemens-Bruker D5000, com tubo de geração de Cu-K $\alpha$ . A varredura, em modo contínuo, foi feita com tempo de exposição de 2 s por passo médio ( $\sim 0,05^\circ$  em 2 $\theta$ ) na faixa entre  $3^\circ$  e  $50^\circ$  (2 $\theta$ ).

**3.2.2. Termogravimetria.** As curvas TG/DTG foram obtidas a partir da termobalança TGA-51 (Shimadzu), no intervalo de temperatura de 25 a 900°C com razão de aquecimento ( $\beta$ ) de 10°C.min $^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 50 mL.min $^{-1}$ ), utilizando cadinho de Pt contendo cerca de 15 mg de amostra.

**3.2.3. Calorimetria exploratória diferencial.** As curvas DSC foram obtidas a partir da célula calorimétrica DSC-50 (Shimadzu), no intervalo de temperatura de 25 a 500°C com  $\beta_s$  de 10°C.min $^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de N $_2$  (100 mL.min $^{-1}$ ), em cadinho de Al aberto contendo cerca de 2 mg de amostra.

**3.2.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier:** espectrofotômetro FTIR MB100 (Bomen), com faixa de operação de 4000 a 350 cm $^{-1}$  em pastilha de KBr.

**3.2.5. Análise elementar de C/H/N:** Os teores dos elementos C, N e H da amostra de GCV foram obtidos utilizando o equipamento Elemental Analyzer, modelo 2400 CHN (Perkin Elmer, San Diego, USA).

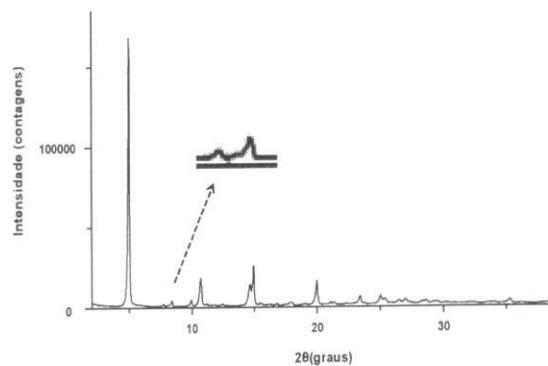
### 3.2.6. Avaliação visual do processo de fusão

A avaliação visual do comportamento do GCV foi realizada no equipamento Eletrothermal modelo 9100 até a temperatura de 300°C. As medidas foram realizadas em tubo capilar com aproximadamente 1mm de diâmetro.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na FIGURA 2 é apresentado o difratograma de raios X da amostra de GCV, observou-se que o formato do pico de difração a  $5^\circ$  da posição 2 $\theta$ , bem como a presença de picos em torno de  $10^\circ$  a  $11^\circ$ ,  $14^\circ$  a  $15^\circ$  e  $20^\circ$  (2 $\theta$ ), foram característicos do GCV hidratado (Chan; Huong, 1987). Entretanto, ao redor de  $7^\circ$  e  $8^\circ$  (2 $\theta$ ), dois picos de difração foram observados, o que pode ser indicativo da presença do polimorfo III do fármaco (Sarbajna *et al.*, 2011).

As curvas TG/DTG da amostra de GCV (FIGURA 3) evidenciaram que o fármaco apresenta quatro etapas de decomposição térmica. A primeira ocorreu entre 25 a 118°C, a segunda na faixa de 118 a 190°C, ambos corresponde à perda de massa de 2,5%, e parecem indicar a liberação de água de umidade, uma vez que a curva DSC mostrou nessa faixa de temperatura dois eventos térmicos (FIGURA 5).



**FIGURA 2.** Difratograma de raios X da amostra de GCV analisada e plotada no programa de refinamento de estruturas Tonas Academic V4.1.

A terceira etapa ocorreu entre 196 a 275°C e corresponde à perda de massa de 35,9%, equivalente à liberação de um produto gasoso com massa molar de aproximadamente 90 g.mol<sup>-1</sup>. Além disso, foi evidenciada a formação de um sólido castanho escuro, (FIGURA 4), tanto observado no aparelho de ponto de fusão, como no resíduo isolado do ensaio de TG até 319°C. Essa coloração já deve indicar que há início da carbonização da amostra. A quarta etapa de decomposição térmica ocorreu ao redor de 300 a 600°C, com perda de massa de 61,6%, correspondente à degradação do produto formado na etapa anterior e carbonização, totalizando 99,5% de perda de massa.

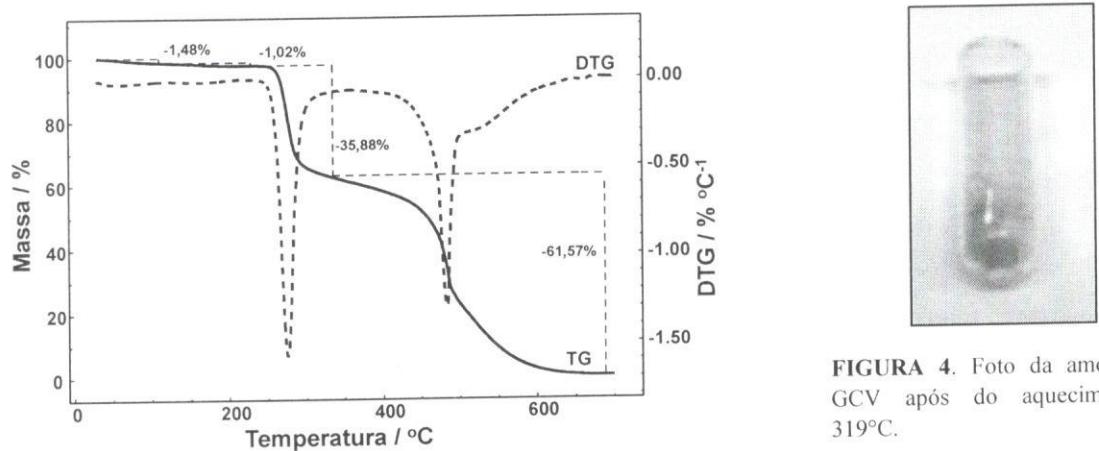


FIGURA 4. Foto da amostra de GCV após do aquecimento a 319°C.

FIGURA 3. Curvas TG/DTG do GCV obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min).

A FIGURA 5 ilustra a sobreposição das curvas DSC e TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de ar. A curva DSC apresenta oito eventos térmicos com as seguintes  $T_{pico}$ : 50; 150; 190; 249,6; 370; 412,5; 478 e 509°C. Os dois primeiros eventos em 50 e 150°C são endotérmicos e ocorreram numa faixa de temperatura em que as curvas TG/DTG indicaram uma leve perda de massa.

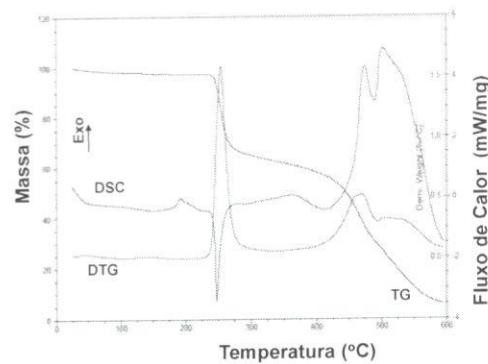
O terceiro evento em 190°C é exotérmico e ocorreu numa faixa de temperatura em que as curvas TG/DTG não indicaram perda de massa, portanto, é de origem física e pode ser atribuído a alguma transição cristalina, que ocorreu após processo de desidratação do GCV hidratado (Chan; Huong, 1987).

O quarto evento, 249,6°C (endotérmico) foi correlacionado com a primeira perda de massa da curva TG/DTG (FIGURA 3), uma vez que se observou claramente que nessa faixa de temperatura houve degradação do fármaco. Além disso, o aquecimento lento da amostra em aparelho convencional de medição de ponto de fusão evidenciou visualmente o escurecimento do material, confirmando o inicio da decomposição do GCV sem a ocorrência da fusão, na curva DSC, (FIGURA 5). Os quatro últimos eventos térmicos foram relacionados com a segunda perda de massa da curva TG/DTG (FIGURA 3), e se referem à decomposição do produto formado na etapa anterior com carbonização. As informações obtidas a partir das curvas de DSC e TG/DTG (FIGURA 5) confirmaram os resultados de DRX, uma vez que o fármaco apresentou comportamento característico do GCV

hidratado (Chan; Huong, 1987). Além disso, o aparecimento do pico de difração em torno de 7° e 8° (20) corroboram a existência do polimorfo III do fármaco na amostra (Sarbjana *et al.*, 2011). A TABELA 1 lista os resultados de análise elementar para a amostra de GCV de fórmula molecular  $C_9H_{13}N_5O_4$ .

Os porcentuais de C, H e N são muito próximos aos obtidos estequiométricamente e estão em concordância aos relatados na literatura (MERCK index, 2006). As pequenas diferenças observadas nos percentuais de carbono e nitrogênio calculado são atribuídas à presença de água de umidade, conforme os resultados de TG/DTG que indicaram perda de massa de cerca de 2,4% até a temperatura de 150°C. A FIGURA 6 ilustra o espectro no infravermelho da amostra GCV, evidenciou-se bandas de absorção em 3425 e 3311 correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico em aminas primárias. Além disso, a presença de bandas ao redor de 1658 a 1609  $cm^{-1}$  confirmaram o estiramento N-H, uma vez que corresponderam às ligações de hidrogênio da amina primária. A absorção a 3177  $cm^{-1}$  foi característica do estiramento N-H em amina secundária. A existência da banda a 1732  $cm^{-1}$  confirmou o estiramento C=O da amida terciária na molécula e as absorções em 2845 e 2923  $cm^{-1}$  foram atribuídas ao estiramento simétrico de C-H. Observaram-se, também, outras atribuições a 1609 e 1490  $cm^{-1}$  características do estiramento C=C, que junto à banda em 3099  $cm^{-1}$  (C-H) confirmaram a presença da estrutura aromática.

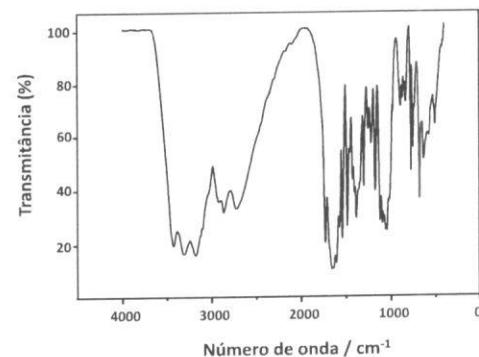
Na FIGURA 7 são exibidas as micrografias de MEV da amostra de GCV. Observou-se que o fármaco apresentou cristais retangulares irregulares bem definidos na faixa de 20 a 150  $\mu m$ , aproximadamente. A maioria das partículas mostrou-se dispersa, enquanto que outras apresentaram sobreposição de plaquetas de aspecto rugoso, aderidas densamente a cristais maiores, como observado na micrografia B. Uma avaliação mais



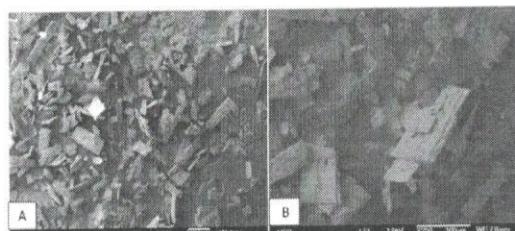
**FIGURA 5.** Curvas de DSC e TG/DTG do GCV obtidas a 10°C/min e sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL/min).

**Tabela 1: Resultado da análise elementar da amostra de GCV**

Dados	% C	% H	% N
Experimental	41,24	5,18	26,84
Calculado	42,35	5,13	27,45



**FIGURA 6.** Espectros na região do infravermelho da amostra de GCV.



**FIGURA 7.** Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do GCV, aumento de 100X.

detalhada indica, também, a existência de partículas finas unidas na superfície, contribuindo com a aparência rugosa dos cristais.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por DRX, DSC, TG/DTG, FTIR, MEV e análise elementar, permitiram caracterizar a amostra de GCV. Além disso, foi possível identificar dentre a amostra a presença de outra forma cristalina do fármaco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GROSS, J.B.; BOZZETE, S.A.; MATHEWS, W.C.; SPECTOR, S.A.; ABRAMSON, I.S.; McCUTCHAN, J.A.; MENDEZ, T.; MUNGIA, D.; FREEMAN, W.R. Longitudinal study of cytomegalovirus retinitis in acquired immune deficiency syndrome. **Ophthalmology**. 1990;97:681-86.

KAWAMURA, T.; HIRAYAMA, N. Crystal structure of ganciclovir. **X-ray Structure Analysis Online**. 2009;25:51-2.

SARBAJNA, R.M.; PREETAN, A.; DEVI, A.S.; SURYANARAYANA, M.V.; SETHI, M.; DUTTA, D. Studies on crystal modifications of ganciclovir. **Mol Cryst Liq Cryst**. 2011;537:103-07.

UNITED States Pharmacopeia. 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

TANG, F.; ZHANG, Y.; LIN, S.; GUO, Z. Solubility and micronization of ganciclovir. **Adv Mat Res**. 2012;393-395:1421-26.