



Universitatea “Babeş-Bolyai”, Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

&

Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Ştiinţe

**Studiul structurii și proprietăților unor noi forme
solide ale 5-fluorouracilului cu piperazină**

Rezumatul tezei de doctorat

Doctorand: Cristina Moiescu-Goia

Coordonator științific: Prof. dr. Viorica Simon

CUPRINS

Rezumat	4
CAP. I Introducere și motivație	
I.1. Polimorfi, săruri și co-cristale.....	6
I.2. 5-Fluorouracil și Piperazina.....	8
Bibliografie 1.....	12
CAP. II Metode de preparare și analiză	
II.1. Metode de preparare : sare și co-cristal.....	17
II.1.1. Amestecarea mecanică cu solvent (SDG).....	17
II.1.2. Tehnica suspensiei cu antisolvent (SL).....	18
II.2. Metode de analiză.....	18
II.2.1. Difrakția de raze X (XPRD).....	18
II.2.2. Analiza termică diferențială și termogravimetrică (DTA/TGA).....	19
II.2.3. Spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR).....	21
II.2.4 Spectroscopia fotoelectronică de raze X (XPS).....	23
II.3. Expunerea la radiații gama.....	25
Bibliografie 2.....	27
CAP. III Rezultate experimentale	
III.1. Studiul solubilității compusului neoplazic 5-Fluorouracil.....	29
III.2. Sinteza și caracterizarea co-cristalului de 5-Fluorouracil cu Piperazina.....	33
III.2.1. Preparare.....	33
III.2.2. Analiza prin difracție de raze X.....	33

III.2.3. Analiza termică diferențială și termogravimetrică.....	35
III.2.4. Analiza prin spectroscopie cu infraroșu cu transformata Fourier.....	37
III.2.5. Analiza prin spectroscopie fotoelectronică cu raze X.....	40
III.2.6. Determinarea vitezei de dizolvare și a solubilității în apă.....	51
III.3 Sinteza și caracterizarea sării de 5-Fluorouracil cu Piperazina (5-FU/Pip.S)...	53
III.3.1. Preparare.....	53
III.3.2. Analiza prin difracție de raze X.....	53
III.3.3. Analiza termică diferențială și termogravimetrică.....	55
III.3.4. Analiza prin spectroscopie cu infraroșu cu transformata Fourier.....	57
III.3.5. Analiza prin spectroscopie fotoelectronică cu raze X.....	59
III.3.6. Determinarea vitezei de dizolvare și a solubilității în apă.....	66
III.4. Testarea comportamentului după iradiere gama.....	68
Bibliografie 3.....	74

CAP.IV Concluzii generale și perspective

IV.1. Concluzii generale.....	76
IV.2. Perspective.....	76
Articole publicate.....	77
Participare la conferințe naționale și internaționale.....	77

Cuvinte cheie : 5-fluorouracil, piperazina, forme solide, solubilitate, polimorfi, co-cristale, sare, XRD; FTIR, difracție de raze X, XPS

Obiectivul principal al acestei lucrări de doctorat a fost identificarea și investigarea de forme solide noi – polimorfi, săruri sau co-cristale – a unui compus farmaceutic activ utilizat în diverse tratamente de cancer, și anume 5-fluorouracil. Teza cuprinde patru capitole în care au fost descrise scopul, metodele de preparare și de analiză a probelor și rezultatele originale obținute în studiile efectuate.

CAPITOLUL I : Introducere și motivație

I.1. Polimorfi, Săruri, Co-cristale

Polimorfii sunt forme solide ale unui compus, cu aceeași compoziție chimică dar cu o aranjare diferită în structura cristalină și cu caracteristici fizico-chimice diferite de cele pe care le prezintă compusul din care s-a obținut. [Davidovich M *et al.* 2004]

Sărurile se pot forma ca urmare a unei reacții între un compus farmaceutic activ (API) și o substanță acidă sau bazică, printr-un transfer de proton de la molecula cu pK_a mai mic, la molecula cu un pK_a mai mare. [Sekhon BS, 2009]

Co-cristalele sunt materiale cristaline și omogene din punct de vedere structural, care conțin două sau mai multe molecule în cantități stoichiometrice clar definite și sunt structuri moleculare care nu implică formarea unor legături covalente sau transfer de proton de la compusul activ.

I.2. 5-Fluorouracil și Piperazina

În cadrul studiilor efectuate în această teză, am ales compusul farmaceutic **5-fluorouracil** (2,4-Dihydroxy-5-fluoropyrimidine sau 5-Fluoropyrimidine-2,4-dione), utilizat în terapia antineoplazică în diverse tipuri de cancer sau tumori. [Grem JL, 2000] Acest compus farmaceutic aparține medicamentelor din clasa de pirimidină numite antimetaboliți, cu activități antivirale și anticanceroase [Sharma V *et al.* 2014].

Formula structurală pentru 5-fluorouracil ($C_4H_3FN_2O_2$) este prezentată în Figura I1.

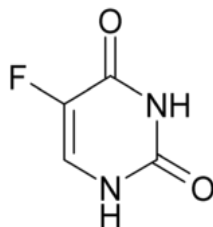


Figura I1. Formula structurală pentru 5-fluorouracil

Molecula de 5-fluorouracil este capabilă să formeze legături de hidrogen cu alte molecule, deoarece conține grupări de donori și acceptori (N-H și C=O), care conduc la obținerea de noi forme solide (săruri sau co-cristale) cu alte molecule. S-a dovedit că aceste forme solide noi prezintă proprietăți îmbunătățite în ceea ce privește solubilitatea, biodisponibilitatea și viteza de dizolvare, comparativ cu proprietățile compusului activ din medicament.

Piperazina este un medicament antihelmintic eficient împotriva nematozilor intestinali și se absoarbe foarte ușor în tractul gastrointestinal. A fost selectată această moleculă pentru acest studiu deoarece are masa molară mai mică decât la 5-fluorouracil, este un compus organic ciclic care posedă doi atomi de azot în poziții opuse, într-un inel heterociclic cu 6 membri, care servește ca o coloană vertebrală pentru derivații de piperazină și acționează ca agonist al receptorului acidului gama-amino-butaric în nematode, cu activitate helmintică.

Formula chimică pentru piperazină este $C_4H_{10}N_2$. Formula structurală a piperazinei este prezentată în Figura I.2.

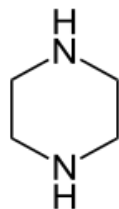


Figura I.2. Formula structurală pentru piperazină

Scopul acestei teze este obținerea de forme solide noi din compusului antineoplazic 5-fluorouracil cu piperazina, care să prezinte proprietăți fizico-chimice îmbunătățite. Aceste forme solide noi obținute vor fi caracterizate din punct de vedere structural, și se va studia comportamentul acestora privind solubilitatea lor și expunerea la radiații gama.

CAPITOLUL II : Metode de preparare și analiză

II.1. Metode de preparare: sare și co-cristal

II.1.1 Amestecare mecanică cu solvent (solvent drop grinding - notata SDG)

Această tehnică se aplică în general în scopul reducerii granulometrice a unui material sau pentru amestecul omogen a două substanțe sub formă de pulbere. Metoda de amestecare se poate realiza manual folosind un mojar cu pistil, sau mecanic folosind o moară cu bile. Mojararea se poate

realiza fără solvent sau cu o cantitate minimă de solvent astfel încât amestecul să fie umectat și să creeze o punte de legătură între cele două substanțe. La finalul procesului de mojarare se pot obține forme cristaline complexe, care pot fi săruri sau co-cristale.

II.1.2 Tehnica suspensiei cu antisolvent (slurring technique - notată SL)

Această tehnică presupune prepararea unei suspensii din două sau mai multe materiale solide active, care este agitată magnetic pe o plită electrică pentru o perioadă de timp prestabilită, - la temperatura ambiantă sau încălzită - în scopul formării de noi faze cristaline. Acest proces este urmat de evaporarea solventului până la obținerea unei pulberi uscate.

II.2. Metode de analiză

II.2.1. Difracția de raze X (XRD)

Difracția de raze X este o metodă de investigare a materialelor din punct de vedere structural, și are la bază efectele interacțiunii radiației electromagnetice X cu atomii materialului expus la această radiație electromagnetică, cu o lungime de undă apropiată de cea a dimensiunilor atomice. Prin analiza cu difracție de raze X se vor identifica noile forme solide obținute prin compararea difractogramelor compușilor de start cu probele preparate.

II.2.2. Analiza termică diferențială și termo-gravimetrică (DTA/TGA)

Din analiza termogramelor (DTA) se vor evidenția diferențele dintre variațiile mărimilor fizice care apar între o probă de analizat și o probă etalon, atunci când temperatura lor se modifică în condiții identice. Pierderile sau absorbțiile de căldură pot produce tranziții de fază care se evidențiază prin semnale endoterme (deshidratare, descompunere, sublimare, fierbere, vaporizare), sau semnale exoterme (cristalizare, degradare).

Din analiza curbelor (TGA) se va determina variația masei unei probe pe parcursul unui program de temperatură bine stabilit, într-o atmosferă controlată. [Vyazovkin S *et al.* 2014]

II.2.3. Spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR)

Spectroscopia în infraroșu (IR) permite identificarea moleculelor prin analiza stărilor vibraționale caracteristice. Spectrele IR reprezintă absorbția energiei radiante din domeniul infraroșu de către molecule, în funcție de lungimea de undă/de frecvența radiației. [Smith BS, 2011], [Derrick MR *et al.* 1999], [Siebert F *et Hildebrandt P*, 2007], [Stuart B, 2004]

Analiza spectrelor rezultate din măsurătorile prin spectroscopie FT-IR pe materiale se realizează în scopul identificării vibrațiilor grupărilor funcționale, fiecare vibrație prezentând în benzile de absorbție un anumit număr de undă. Spectrul IR este reprezentat grafic ca intensitate a benzilor de absorbție în funcție de numărul de undă a radiației electromagnetice IR absorbite.

II.2.4. Spectroscopie fotoelectronică de raze X (XPS)

Spectroscopia fotoelectronică de raze X este o metodă care se aplică în scopul determinării compoziției elementale și a vecinătăților/disunerilor atomice la suprafața materialelor. Spectrele XPS se obțin prin înregistrarea energiei cinetice și a numărului de electroni emiși de la suprafața materialului, atunci când este supus radiației X. Măsurătorile XPS se realizează în vid ultra înalt, iar înregistrările XPS detectează fotoelectronii emiși de la o adâncime de până la 10 nm. Din analiza spectrelor de înaltă rezoluție, pe baza pozițiilor și a formei liniilor spectrale, se vor identifica stările chimice ale elementelor detectate.

II.3. Expunerea la radiații gama

Radiația gama (γ) este frecvent utilizată în medicină pentru sterilizarea de produse farmaceutice, sau în terapia pacienților cu afecțiuni oncologice. [Rodriguez-Benot A *et al.* 2002]

Scopul expunerii la radiația gama este verificarea stabilității structurale ale substanțelor după intrarea lor în corpul uman prin tratamentul chimioterapic. Se încearcă detectarea eventualelor modificări în structura compușilor, în urma iradierii gama.

CAPITOLUL III : Rezultate experimentale

III.1 Studiul solubilității compusului antineoplazic 5-Fluorouracil

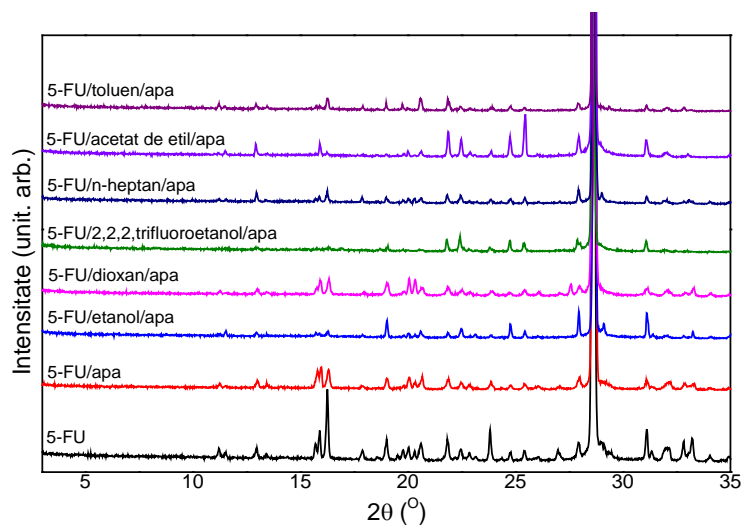
Solubilitatea agentului chimioterapeutic cu 5-fluorouracil (5-FU) a fost testată în 14 solvenți: apă, dioxan, toluen, acetat de etil, n-heptan, etanol, 2,2,2trifluoroetanol, diclorometan, acetonitril, tetrahidrofuran, butanonă, etoxietanol, metanol și 2-butanonă. Prin încălzirea la 40 ° C, o cantitate de aproximativ 20 mg FU poate fi rezolvată în 1,2 ml apă sau în soluții apoase obținute prin adăugarea de 0,2-0,5 ml apă la 1 ml solvent, cu excepția n-heptanului, toluenului, 3-dimetil-2butanonei și diclormetanului, în care, în aceste condiții de testare a solubilității, au apărut suspensii.

Tabelul III.1 Solubilitatea pentru 5-FU în diverși solvenți

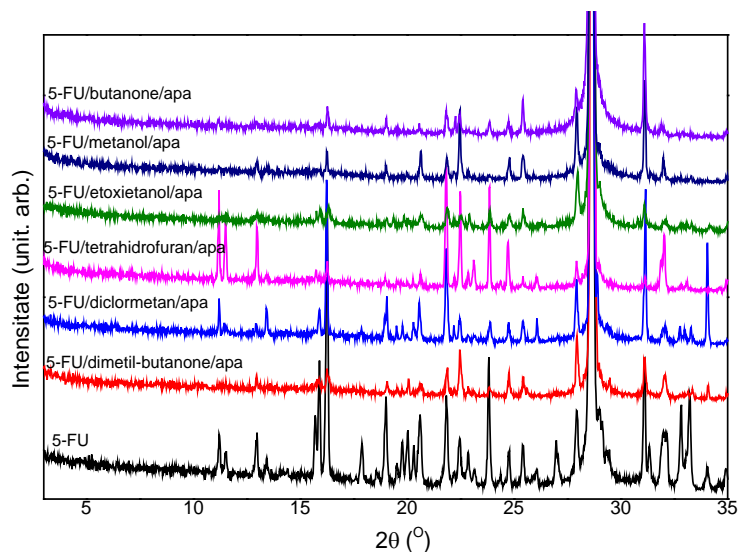
Nr. crt.	5-FU mg	Solvent 1000 μ l	Apă μ l	Observație la 40°C	Solubilitate mg/ml
1	20.8	apa	200	solutie	17.3
2	19.9	etanol	400	solutie	14.2
3	19.8	dioxan	400	solutie	14.1
4	20.4	acetonitril	200	solutie	17
5	19.7	2,2,2 trifluoroetanol	500	solutie	13.1
6	19.6	n-heptan	400	suspensie	<14
7	20.0	acetat de etil	400	solutie	14.3
8	19.5	toluen	400	suspensie	<13.9
9	20.7	3dimetil-2butanonă	400	suspensie	<14.8
10	20.2	diclometan	500	suspensie	<13.5
11	20.6	tetrahidrofuran	500	solutie	13.7
12	19.8	etoxietanol	500	solutie	13.2
13	20.3	metanol	500	solutie	13.5
14	20.1	2-butanonă	500	solutie	13.4

Analiza difractogramelor de raze X, evidențiază că 5-FU este stabil în amestecurile de solvent cu apă (Figura III.1a,b), cu excepția recristalizării acestuia în acetonitril unde se obține un polimorf al acestui compus. (Figura III.2)

La forma cristalină rezultată din soluție apoasă cu acetonitril (Figura III.2) s-a obținut o difractogramă diferită de celelalte, ceea ce indică formarea unui polimorf de 5-FU, care prezintă o structură cristalină diferită de cea a compusului 5-FU înainte de recristalizare.



(a)



(b)

Figura III.1 Difractogramele de raze X pentru 5-FU și pentru probele recristalizate în amestec de apă cu diverși solvenți (a) dioxan, toluen, acetat de etil, n-heptan, etanol și 2,2,2-trifluoroetanol, (b) diclorometan, tetrahidrofuran, 3-dimetil-2-butanonă, etoxietanol, metanol și 2-butanonă

III.2 Sinteza și caracterizarea co-cristalului de 5-Fluorouracil cu Piperazina (5-FU/Pip_C)

III.2.1 Preparare

Prin aplicarea metodei de amestecare mecanică cu solvent (SDG) descrisă în Cap. II.2.1, a fost preparată o probă de 5-fluorouracil (5-FU) cu piperazină (Pip), notată cu 5-FU/Pip_C. Au fost cântărite cantități echivalente egale de 5-fluorouracil și de piperazină (0.23 mmol) la care s-a adăugat 40 μL dintr-un amestec de solvenți din tetrahidrofuran și apă în raport volumetric de (1:1). Amestecul a fost pus într-o incintă de agat și a fost supus mojarării mecanice cu o bilă de agat, timp de 60 minute, la o frecvență de vibrație de 30 Hz. Proba a fost lăsată apoi la temperatura ambiantă pentru ca pulberea obținută să se usuce.

În scopul identificării eventualelor modificări care pot să apară după procesul de mojarare al amestecului de 5-FU cu Pip, proba obținută și notată cu 5-FU/Pip_C a fost analizată prin difracție de raze X, spectroscopie în infraroșu, analize termice și spectroscopie fotoelectronică de raze X. În cele ce urmează vor fi prezentate în detaliu rezultatele acestor analize.

III.2.2 Analiza prin difracție de raze X

Probele de 5-fluorouracil, piperazină și proba 5-FU/Pip_C obținută prin metoda SDG, au fost analizate prin difracție de raze X pe fiecare esantion. Din compararea difractogramelor de raze X obținute pentru fiecare probă (Figura III.3) rezultă diferențe structurale între materialele de start (5-FU și Pip) și forma solidă nouă 5-FU/Pip_C.

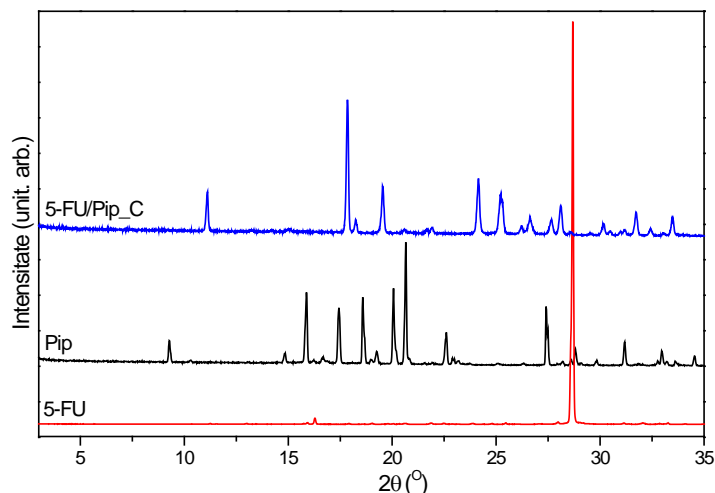


Figura III.3 Difractogramele de raze X pentru 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C

Comparativ cu cele două difractograme obținute pentru compuşii de start, în difractograma obținută pentru proba nouă 5-FU/Pip_C, liniile de difracție înregistrate pentru 5-FU și Pip lipsesc, sau sunt deplasate. Datorită faptului că linia de difracție caracteristică pentru 5-FU apare la 28.7° , iar în proba 5-FU/Pip_C difracția cea mai intensă apare la unghiul $2\theta=17,8^\circ$, se poate concluziona că prin aplicarea metodei SDG la un amestec de 5-FU cu Pip, s-a obținut o formă solidă nouă care poate fi o sare sau un co-cristal. Pentru a afla cu certitudine ce tip de formă solidă s-a format, este necesar ca probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C să fie analizate din punct de vedere al comportamentului termic DTA/TGA și prin metode spectroscopice (FT-IR și XPS).

III.2.3 Analiza termică diferențială și termogravimetrică

Din probele de 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C au fost cântărite eșantioane cu masa cuprinsă între 8-10 mg și supuse fiecare analizei diferențiale termice și termogravimetrice. Curbele analizei simultane DTA/TGA obținute, sunt prezentate în Figura III.4.

Pentru noua formă solidă 5-FU/Pip_C (Figura III.5), analiza curbelor DTA/TGA evidențiază primul semnal endotermic în jurul valorii maxime de temperatură la aproximativ 181°C , eveniment însoțit de o pierdere de masă de aproximativ 20%. Acest semnal se datorează

procesului de descompunere și de degradare a piperazinei. Al doilea eveniment endotermic are maximumul la temperatura la 285°C și este asociat în curba TGA procesului de topire care are loc simultan cu descompunerea de 5-FU, printr-o pierdere de masă în două trepte, pierderea de masă totală fiind de aproximativ 65%.

Rezultatele măsurătorilor de difracție de raze X și DTA/TGA pe probele de start 5-FU și Pip, comparate cu rezultatele obținute pentru proba 5-FU/Pip_C, au evidențiat caracteristicile structurale și comportamentul termic al acestora, stabilind că prin metoda de preparare SDG s-a obținut o formă solidă nouă.

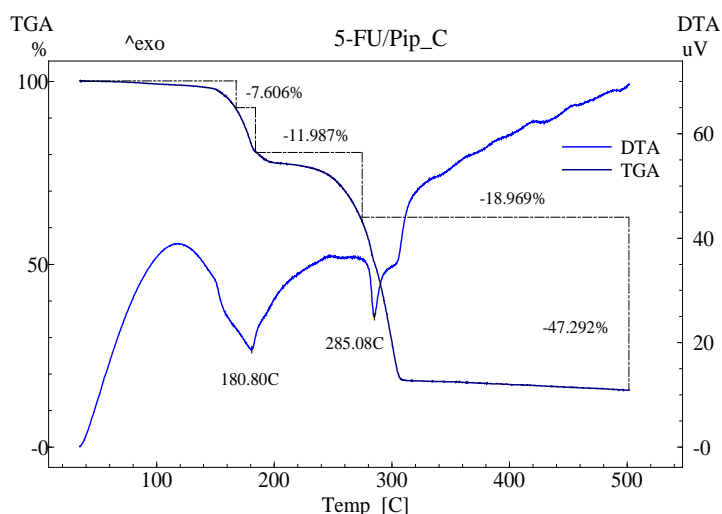


Figura III.5 Analiza DTA/TGA pentru 5-FU/Pip_C

III.2.4 Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Prin măsurătorile FT-IR, pe pastile de KBr preparate cu 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C, au fost înregistrate frecvențele de vibrație în funcție de energia absorbită iar spectrele obținute au fost analizate prin comparație între ele pentru două domenii spectrale 4000-2000 cm^{-1} , (**Figura III.6**) respectiv 2000-400 cm^{-1} . (**Figura III.7**)

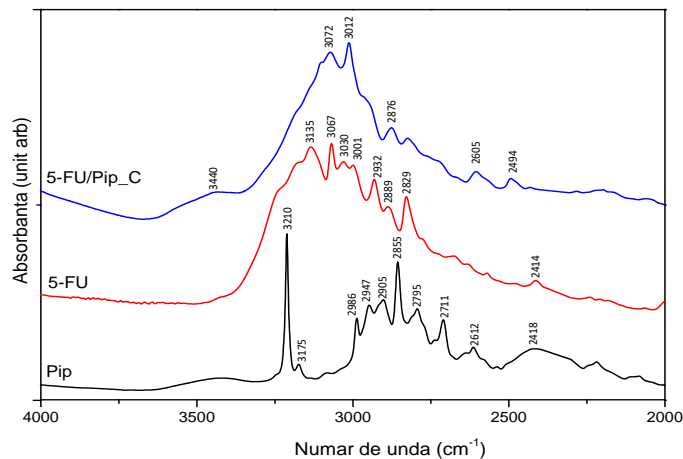


Figura III.6 Spectrele FT-IR pentru 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C în intervalul spectral 4000-2000 cm^{-1}

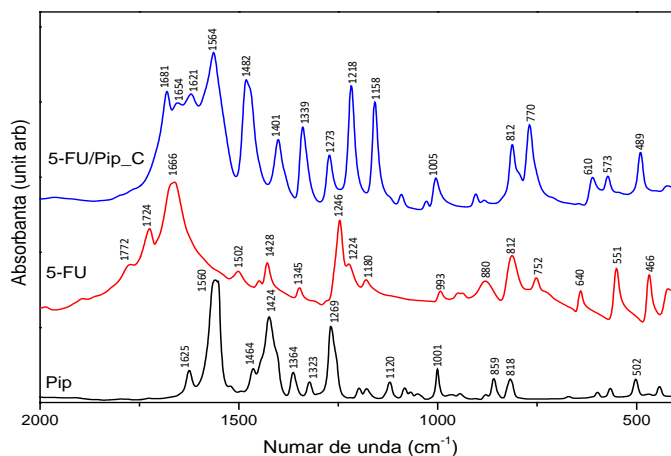


Figura III.7 Spectrele FT-IR pentru 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C în intervalul spectral 2000-400 cm^{-1}

În spectrul obținut pentru noua formă solidă 5-FU/Pip_C modurile de vibrație ale grupărilor funcționale apar la valori mai mari, fapt care justifică formarea unui co-cristal de 5-FU cu Pip. Benzile datorate vibrațiilor (N-H) și (=C-H), identificate în 5-FU la 3135 cm^{-1} și la 3067 cm^{-1} , apar în 5-FU/Pip_C la valori ale numerelor de undă deplasate înspre valori mai mici, ceea ce confirmă formarea de co-cristal de 5-FU cu Pip. [Dai X-L *et al.* 2016], [Nadzri NI *et al.* 2016]

În regiunea spectrală de frecvențe joase apare o schimbare similară, vibrația de întindere (C=O) observată în spectrul obținut pentru 5-FU la 1666 cm^{-1} , este deplasată la o valoare mai mare în 5-FU/Pip_C, la 1681 cm^{-1} , datorită interacțiunilor intermoleculare. Întreruperea legăturilor de hidrogen și reasambalarea unui compus sub formă de co-cristal, ar putea conduce la o energie mai mare în co-cristal, ceea ce ar putea spori eficiența acestuia în solubilitatea în medii apoase a noii forme solide de co-cristal obținute. [Connelly PR *et al.* 2015]

III.2.5 Analiza prin spectroscopie fotoelectronică cu raze X

Pentru toate probele analizate, spectrele panoramice (survey) au fost înregistrate în intervalul energiilor de legătură cuprinse între 0-1200 eV. Semnalele fotoelectronice caracteristice elementelor ce compun materialele studiate se observă în spectre până la 1000 eV. Au fost astfel identificate picuri corespunzătoare fotoelectronilor C 1s, N 1s, F 1s și O 1s.

Pentru probele de start 5-FU, Pip și pentru proba preparată prin metoda SDG, notată cu 5-FU/Pip_C, au fost înregistrate spectrele survey, din care au fost obținute informații despre compoziția elementală la suprafața probelor analizate (**Figura III.8**)

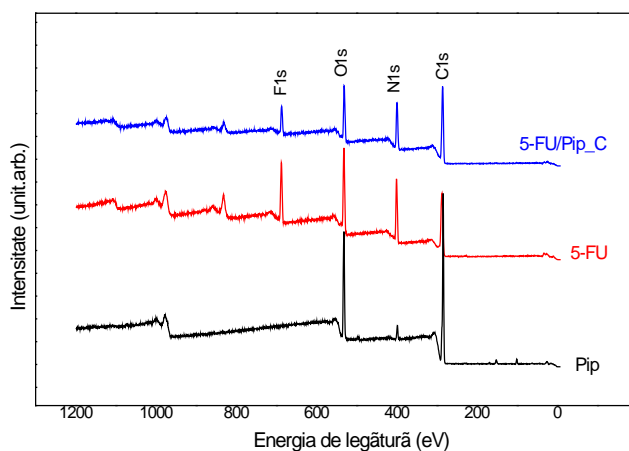


Figura III.8 Spectrul XPS survey pentru probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C

Pentru a evidenția modificările structurale care conduc la obținerea formei solide noi de 5-FU cu Pip, a fost realizată o analiză comparativă a spectrelor de înaltă rezoluție C 1s și N 1s pentru compușii de start și pentru forma solidă nouă 5-FU / Pip_C. (**Figura III.9**)

Din analiza spectrelor de înaltă rezoluție C 1s obținute pentru forma solidă 5FU/Pip_C se observă că liniile spectrale pentru această probă sunt deplasate spre energii de legătură mai mici față de valorile obținute pentru proba 5-fluorouracil, probabil datorită prezenței piperazinei. Această afirmație se bazează pe faptul că energia de legătură asociată fotoelectronilor C 1s emiși proveniți de la atomii de carbon implicați în diferite legături depinde de vecinătatea acestora, care este în strânsă legătură cu densitatea de sarcină la atomii de carbon.

Pentru deconvoluția spectrelor de înaltă rezoluție C 1s (**Figura III.10, 11, 12**) au fost folosite componente cu energiile de legătură de la 284.6, 286.2, 288.3 eV și respectiv 291 eV. Componenta energiei de legătură centrată la valoarea de 284.6 eV, a fost atribuită legăturilor (C-C, C-H) din structura compusului sau provenind de la contaminarea cu carbon. Componenta de

286.2 eV a fost atribuită grupărilor (C-N, C-O), incluzând contaminarea cu oxigen, componenta de la 288.3 eV poate fi atribuită legăturilor (C=O), iar componenta centrată la valoarea de 291 eV este atribuită legăturilor C-F [Nivetha EAK *et al.* 2015], [Huang H *et al.* 2017], [Das SK *et al.* 2012], [Stevens JS *et al.* 2013], [Yang D *et al.* 2009]. Aceste valori ale energiilor de legătură au fost evidențiate în Tabelul III.3.

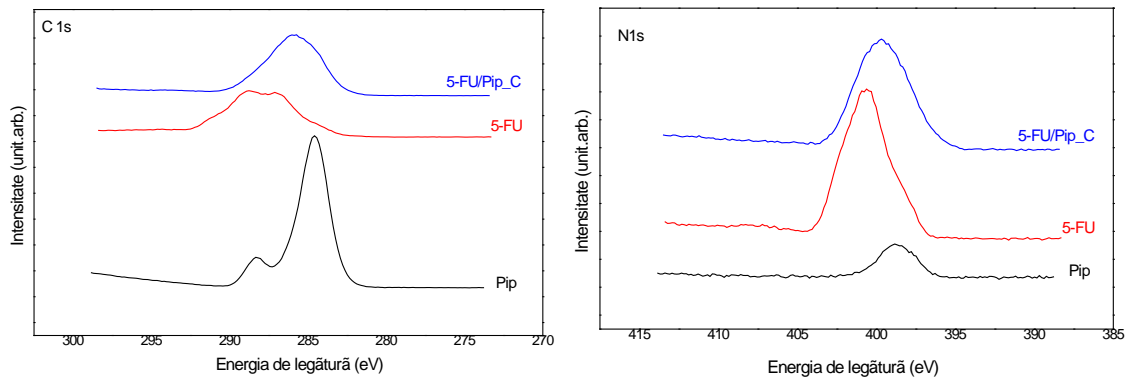


Figura III.9 Spectrele XPS de înaltă rezoluție C 1s și N 1s, pentru probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_C.

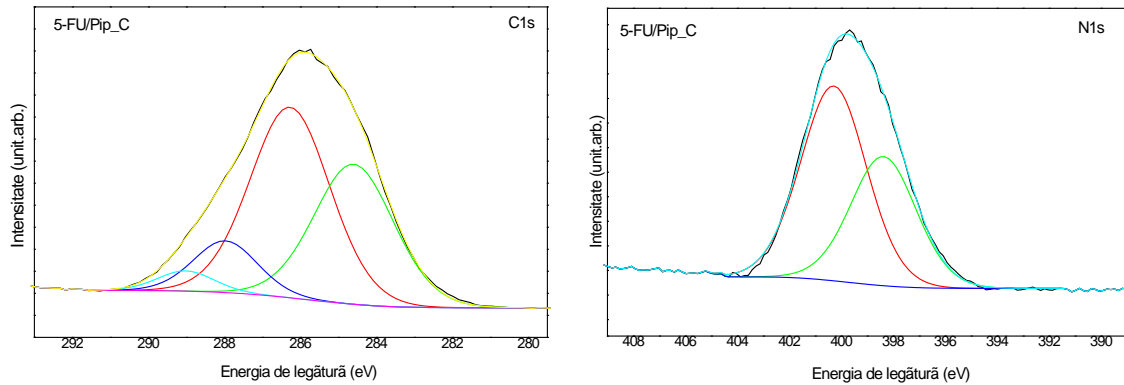


Figura III.10 Deconvoziția spectrelor XPS de înaltă rezoluție C1s și N1s pentru 5-FU/Pip_C

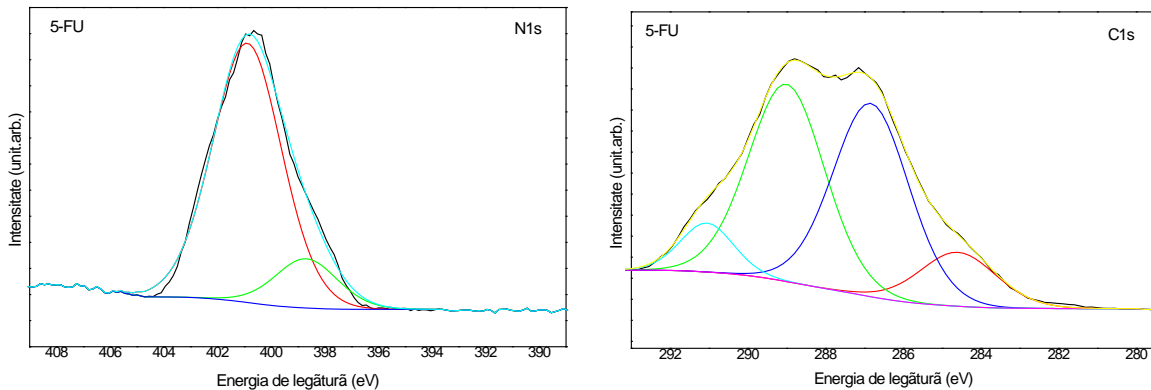


Figura III.11 Deconvoziția spectrelor XPS de înaltă rezoluție C1s și N1s pentru 5-FU

Deconvoluția spectrului de înaltă rezoluție C1s pentru piperazină (**Figura III.12**) a pus în evidență trei componente cu energii de legătură la 284,6, 286,2 și 288,3 eV, în timp ce pentru spectrul de înaltă rezoluție C 1s obținut pentru forma solidă nouă 5FU/Pip_C, (**Figura III.10**) pentru o deconvoluție bună este necesară și o a patra componentă la 291 eV care este atribuită atomilor de carbon implicați în legăturile C-F

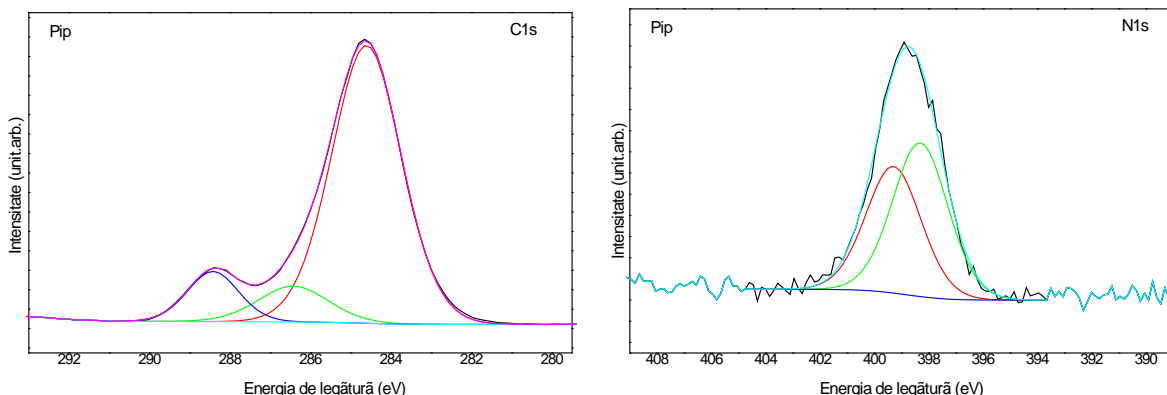


Figura III.12 Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție C1s și N1s pentru Pip

Analizând spectrele de înaltă rezoluție N1s, obținute pentru compuşii de start și pentru 5-FU/Pip_C (**Figura III.9**), se poate observa că pentru forma solidă nouă, valorile energiei de legătură se deplasează spre valori sensibil mai mici.

Deconvoluția fotopicurilor N1s obținute pentru 5-FU și Pip, precum și cel pentru forma solidă 5-FU / Pip_C, s-a făcut folosind două componente cu energiile de legătură la aproximativ 398,5 și 400 eV.

Componentele în jurul valorii de 398.5eV ar putea fi atribuite grupărilor structurale (C-NH-C) [Stevens JS *et al.* 2013] [Gonzales-Torres M *et al.* 2014], [Dong L *et al.* 2016] iar componentele de la 400 eV corespund grupărilor structurale (N-C=O) [Stevens JS *et al.* 2013] sau celor de suprafață (N-C=O, N-C-OH) apărute datorită expunerii atmosferice anterioare a tuturor probelor.

Pozițiile energiilor de legătură ale componentelor în cazul deconvoluției spectrului N1s pentru proba 5-FU / Pip_C, sunt comparabile cu pozițiile energiilor de legătură ale componentelor obținute pentru 5-FU și Pip, fapt care exclude protonarea atomilor de azot și confirmă dezvoltarea co-cristalelor. [Stevens JS *et al.* 2013]

Fotopicul O1s pentru toate probele studiate poate fi deconvoalunat cu trei componente, dupa cum urmeaza: componenta energiei de legatura din jurul valorii de 530eV poate fi atribuita atomilor de oxigen dublu legati de carbon din gruparile structurale si/sau speciilor de suprafata (C=O), (O=C-N) sau (O=C-OH) [Das SK *et al.* 2012], cea de la aproximativ 532eV poate fi atribuita legaturii simple a oxigenului cu carbonul in gruparile (O-C=O) si (C-O) [Das SK *et al.* 2012], iar a treia componenta de la 533 eV corespunde gruparilor (C-OH) si/sau apei absorbita din atmosfera. [Stevens JS *et al.* 2013], [Yang D *et al.* 2009]

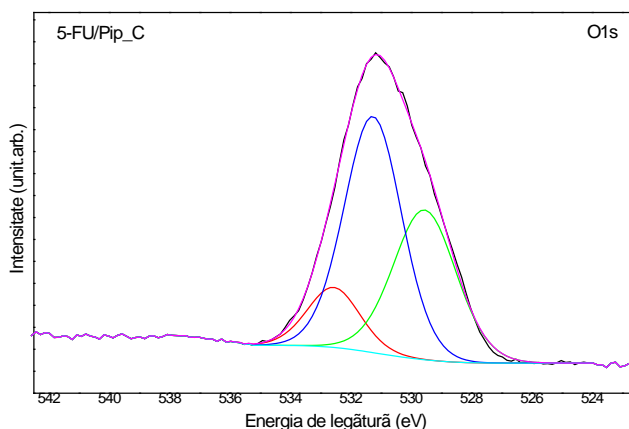


Figura III.13 Deconvoalunatia spectrelor XPS de inalta rezolutie O1s pentru proba 5-FU/Pip_C

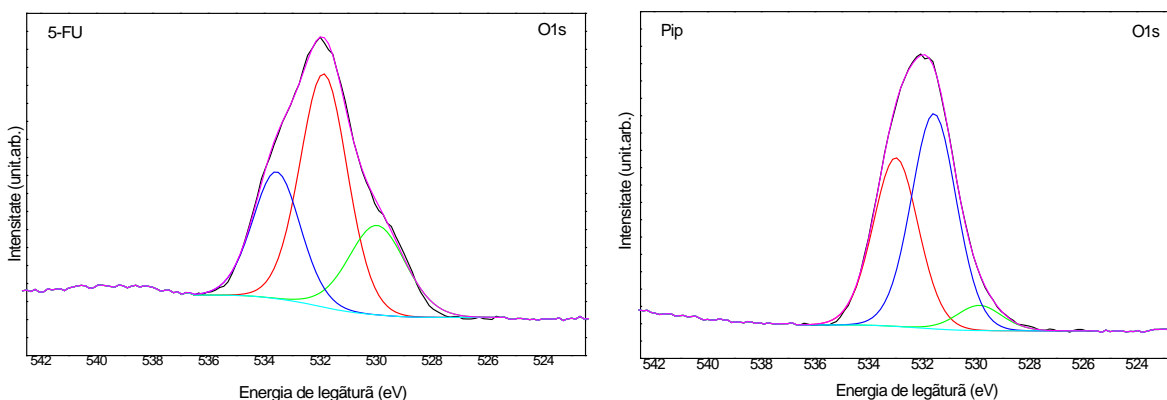


Figura III.14 Deconvoalunatia spectrelor XPS de inalta rezolutie O1s pentru proba 5-FU si Pip

Rezultatele XPS sprijina cu fermitate obtinerea de co-cristal in cazul probei 5-FU/Pip_C, justificata prin deconvoalunatia spectrelor de N1 care a permis diferentierea speciilor de azot implicate in formarea de legaturi de hidrogen in co-cristal.

III.2.6. Determinarea solubilității și a vitezei de dizolvare în apă

Pentru co-cristalul 5-FU/Pip_C luat în studiul prezent, a fost testată experimental solubilitatea în apă bidistilată și comparată cu rezultatele testelor de solubilitate în apă bidistilată obținute pentru 5-FU. În acest scop, au fost cântărite eșantioane din proba de start 5-FU și din proba 5-FU/Pip_C, la care s-a adăugat treptat apă peste fiecare probă, în timp ce sistemele au fost agitate pe o plită magnetică, la temperatura ambiantă. Probele au fost lăsate în agitare 90 de minute, urmărind ca probele să se dizolve și să se obțină o soluție clară.

S-a constatat că proba de 5-FU s-a dizolvat în apă complet, după aproximativ 30 de minute, o cantitate de 7.69 mg 5-FU s-a solvat în 1mL de apă bidistilată, deci prezintă o solubilitate în apă de aproximativ 8mg/mL. (Figura III.16)

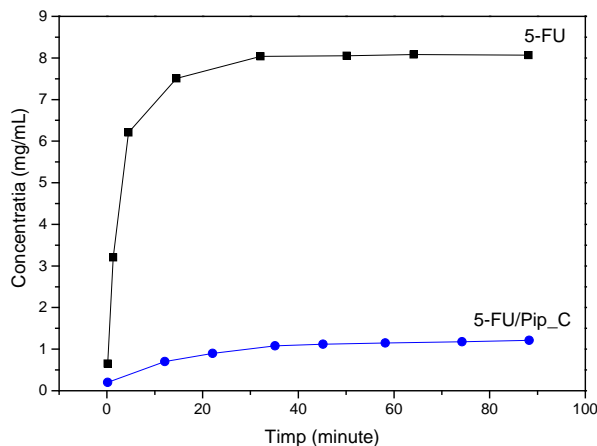


Figura III.16 Viteza de dizolvare în apă pentru 5-FU și pentru 5-FU/Pip_C

Solubilitatea calculată pentru co-cristalul 5-FU/Pip_C, egală cu aproximativ 1.21 mg/mL, este de 6.6 ori mai mică față de solubilitatea compusului pur 5-FU. Se poate concluziona în acest caz, că din punct de vedere al solubilității în apă al co-cristalului 5-FU/Pip_C, acesta nu prezintă o solubilitate îmbunătățită comparativ cu al compusului de start 5-FU.

III.3 Sinteza și caracterizarea sării de 5-Fluorouracil cu Piperazina(FU/Pip-S)

III.3.1 Preparare

Pentru prepararea probei, a fost aplicată metoda slurring, metodă descrisă în Cap.II. În acest scop, a fost preparată o soluție din cantități echimolare egale de 5-Fluorouracil (0.23 mmol) și Piperazină (0.23 mmol) și un volum de 1.2ml dintr-un amestec de alcool etilic cu apă bidistilată, în raport volumetric de (5:1), la care s-a adăugat o cantitate de 1.5ml de n-hexan. Proba obținută după uscare a fost notată cu 5-FU/Pip_S și a fost examinată prin difracție de raze X, analize

termice diferențiale și termogravimetrice, spectroscopie în infraroșu și spectroscopie fotoelectronică de raze X.

III.3.2 Analiza prin difracție de raze X

Proba obținută 5-FU/Pip_S a fost măsurată prin difracție de raze X, iar difractograma obținută a fost comparată cu difractogramele compușilor de start 5-fluorouracil și Piperazină. (**Figura III.17**) Se observă ca difractograma obținută pentru proba 5-FU/Pip_S este diferită de difractogramele compușilor de start, ceea ce denotă că s-a obținut o formă solidă diferită. Comparativ cu valorile unghiurilor 2θ la care apar liniile de difracție pentru 5-FU și respectiv pentru Pip, liniile de difracție înregistrate pentru proba 5-FU/Pip_S, sunt deplasate și apar la valori 2θ diferite. Cea mai intensă linie de difracție apare la $2\theta=24.4^\circ$, comparativ cu linia de difracție cea mai intensă în difractogramele pentru 5-FU care era la $2\theta=28.7^\circ$, respectiv pentru co-cristal era la $2\theta=17.9^\circ$. Liniile de difracție de la $2\theta: 8.6^\circ$ și 11° sunt noi, ele nu apar în nici una dintre celelalte difractograme ale probelor investigate, deci putem spune că și în cazul preparării de 5-FU cu Pip prin metoda slurring, s-a obținut o formă solidă nouă 5-FU/Pip_S.

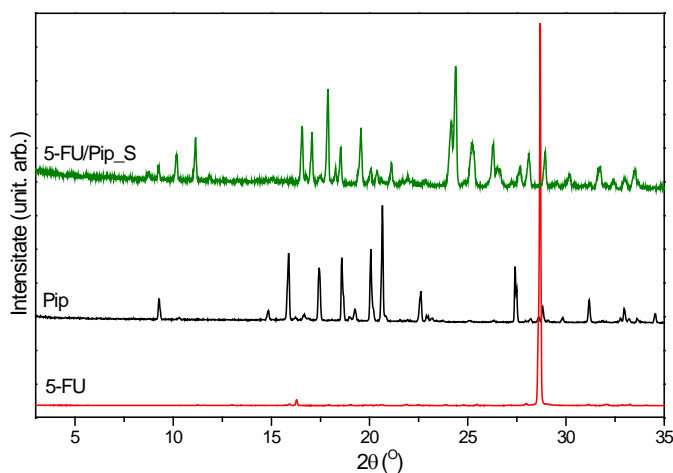


Figura III.17 Difractogramele de raze X pentru 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S

Pentru a stabili dacă această formă solidă este un co-cristal sau o sare, proba 5-FU/Pip_S va fi analizată prin metode termogravimetrice (DTA/TGA) și spectroscopice (FT-IR și XPS).

III.3.3 Analiza termică diferențială și termogravimetrică

Proba de 5-FU/Pip_S preparată prin metoda SL, a fost supusă analizei termice și termogravimetrice DTA/TGA. (**Figura III.18**) În intervalul de temperatura 30-120°C, proba este relativ stabilă, are loc o pierdere de masă foarte slabă de 5.3%, care este datorată deshidratării materialului. Între 120-280°C se identifică două semnale endotermice cu maximul la temperatura

de 134°C, respectiv la 177°C, evenimente termice asociate descompunerii compusului și eliberarea de piperazină, fenomen evidențiat în curba TGA printr-o pierdere de masă totală de ~23%.

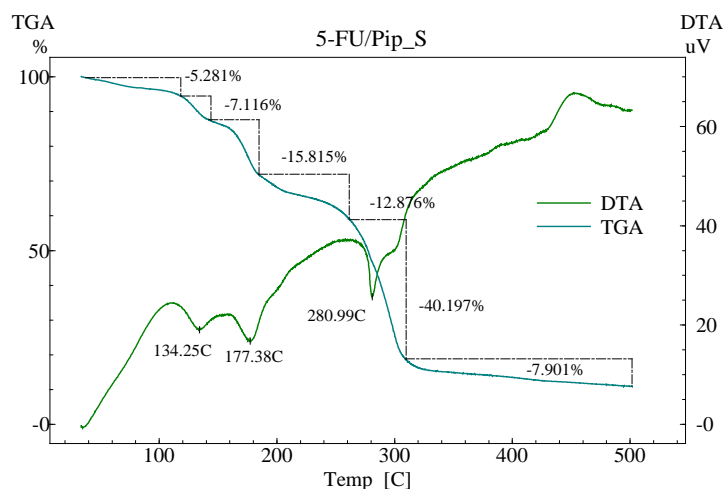


Figura III.18 Termogramele DTA/TGA obținute pentru forma solidă 5-FU/Pip_S

Între 280-300°C, se evidențiază un al treilea eveniment endotermic cu maximum de temperatură la 281°C, asociat cu topirea și descompunerea simultană a probei, care are ca efect o pierdere de masă de aproximativ 52% din masa de 5-FU.

Prin difracție de raze X pe proba 5-FU/Pip_S și analize DTA/TGA a fost evidențiat că s-a obținut o formă solidă nouă de 5-FU cu Pip, diferită de proba obținută prin metoda SDG. Dorim să stabilim dacă proba preparată prin metoda SL este un co-cristal sau o sare, de aceea în continuare vom investiga proba 5-FU/Pip_S, prin spectroscopie FT-IR și prin spectroscopie XPS.

III.3.4 Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier

Spectrele FT-IR înregistrate pentru fiecare eșantion din probele analizate sunt prezentate pentru două intervale spectrale 4000-2000 cm^{-1} (**Figura III.20**), respectiv 2000-500 cm^{-1} . (**Figura III.21**)

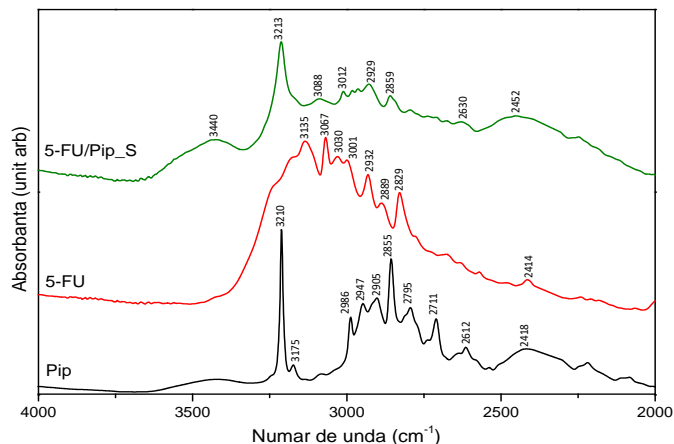


Figura III.20 Spectrele FT-IR pentru 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S în intervalul spectral 4000-2000 cm^{-1}

Din analiza spectrală a benzilor de absorbție obținute pentru proba 5-FU/Pip_S, se observă că în intervalul spectral 3450-3200 cm^{-1} (**Figura III.20**), apare vibrația de întindere a legăturilor (O-H) din moleculele de apă localizată în jurul valorii de $\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$. Vibrația de întindere a grupărilor (N-H) care în spectrul înregistrat pentru 5-FU apare la frecvența de $\sim 3135 \text{ cm}^{-1}$, nu se ragăsește în spectrul obținut pentru proba 5-FU/Pip_S, dar în schimb apare o bandă nouă situată la $\sim 3213 \text{ cm}^{-1}$. Această bandă nouă este atribuită protonării grupărilor la amina secundară (N-H) din piperazină ceea ce justifică formarea de sare cu 5-FU. [**Mureșan-Pop M et al. 2011**]

În spectrul de frecvențe joase (**Figura III.21**), vibrațiile de întindere ale grupărilor (C=O) localizate la 1666 cm^{-1} în spectrul de 5-FU, sunt deplasate în spectrul obținut pentru proba 5-FU/Pip_S, la valori ale frecvențelor mai mici respectiv la $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$. Apariția noii benzi de vibrație de la $\sim 3213 \text{ cm}^{-1}$ și deplasarea vibrațiilor de întindere la valori mai joase ale frecvențelor, justifică formarea de sare prin transfer de protoni. [**Chakraborty S et al. 2014**]

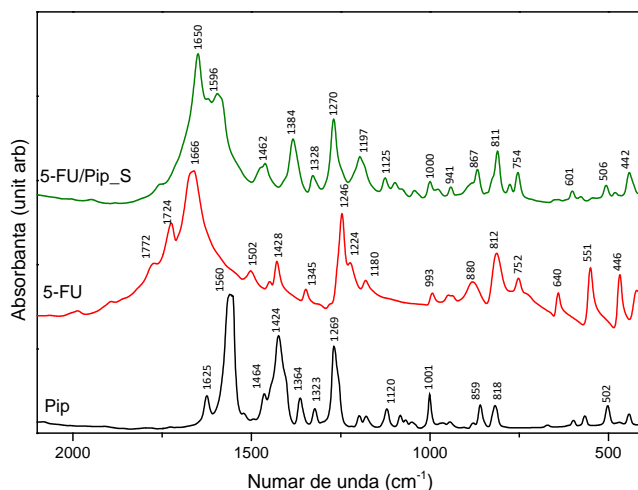


Figura III.21 Spectrele FT-IR pentru 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S în intervalul spectral 4000-500 cm^{-1}

III.3.5 Analiza prin spectroscopie fotoelectronică cu raze X

Spectrele survey pentru probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S au fost înregistrate în intervalul energiilor de legătură 0-1200 eV și sunt prezentate comparativ în **Figura III.23**

Din spectrele survey au fost obținute informații despre compoziția elementală la suprafața probelor analizate.

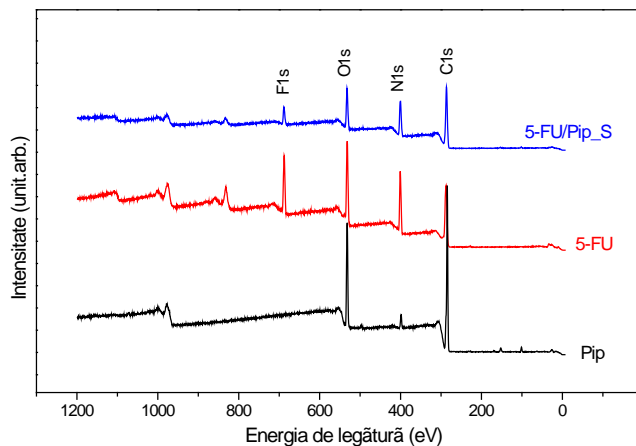


Figura III.23 Spectrul XPS survey pentru probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S

Pentru a evidenția modificările structurale care duc la obținerea formei solide noi, s-a realizat o analiză comparativă a spectrelor de înaltă rezoluție C 1s și N 1s obținute pentru compuşii de start cu spectrele obținute pentru forma solidă 5-FU / Pip_S. (**Figura III.24**) O analiză atentă a spectrelor de înaltă rezoluție C 1s obținute pentru forma solidă 5FU/Pip_S face posibilă observația că liniile spectrale pentru această probă sunt deplasate spre energii de legătură mai

mici în comparație cu valorile obținute pentru 5-fluorouracil. Această deplasare se datorează prezenței Piperazinei în proba analizată. Deconvoluția spectrelor de înaltă rezoluție C 1s (Figura 23) a fost făcută folosind componente cu energiile de legătură situate la valorile 284.6, 286.2, 288.3 eV și 291 eV. Componenta cu energia de legătură la 284.6 eV a fost atribuită legăturilor structurale (C-C) și (C-H) sau provenind de la contaminarea cu carbon. Componenta de la 286.2 eV a fost atribuită legăturilor (C-N) și (C-O) incluzând și contaminarea cu oxigen. A treia componentă de la 288.3 eV poate fi atribuită legăturilor (C=O) iar componenta centrată la aproximativ 291 eV este atribuită legăturilor (C-F). [Nivetha EAK *et al.* 2015], [Huang H *et al.* 2017], [Das SK *et al.* 2012], [Stevens JS *et al.* 2013], [Yang D *et al.* 2009]

Deconvoluția spectrului de înaltă rezoluție C1s pentru piperazină a fost discutată anterior la evidențierea co-cristalului (Figura III.15) și a pus în evidență trei componente cu energiile de legătură la valorile 284,6, 286,2 și 288,3 eV, în timp ce pentru spectrele de înaltă rezoluție C 1s obținute pentru 5-fluorouracil și pentru 5FU/Pip_S este necesară și a patra componentă la 291 eV atribuită atomilor de carbon implicați în legăturile C-F.

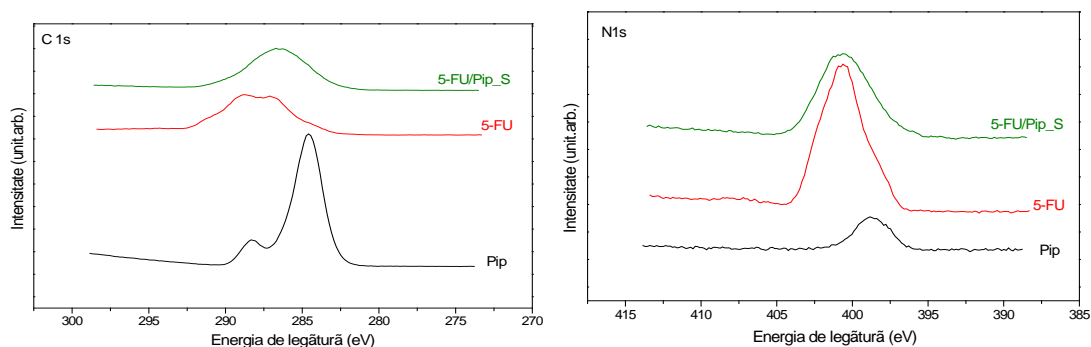


Figura III.24 Spectrele XPS de înaltă rezoluție C 1s și N 1s pentru probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S

Din spectrele de înaltă rezoluție N1s pentru proba 5-FU/Pip_S, se poate observa că valorile energiei de legătură în această probă se deplasează spre valori sensibil mai mari, comparativ cu valorile energiei de legătură obținute pentru 5-FU și Pip prezentate anterior în caracterizarea formei solide noi de co-cristal 5-FU/Pip_C (Figura III.9).

Cunoscând din literatura de specialitate valoarea energiei de legătură pentru electronii N1s asociată cu protonarea atomilor de azot, deconvoluția spectrelor de înaltă rezoluție N1s (Figura III.25) permite distingerea fără echivoc a componentelor asociate cu speciile protonate din sare [Stevens JS *et al.* 2014], [Mureșan-Pop M *et al.* 2011]

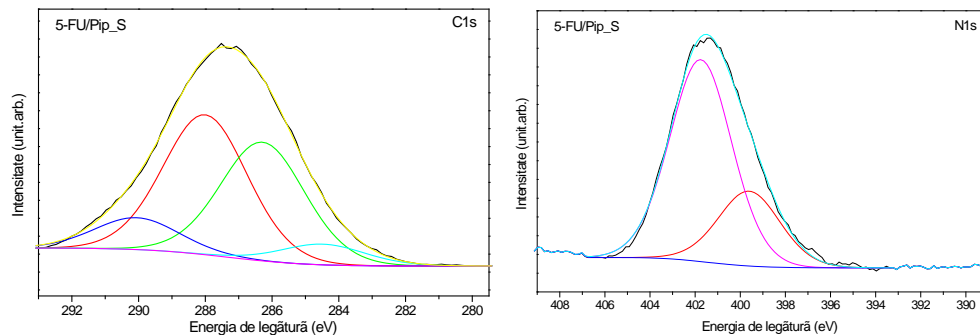


Figura III.25 Deconvoluția spectrelor de înaltă rezoluție C1s și N1s pentru 5-FU/Pip_S

Deconvoluția fotopicurilor N1s pentru 5-FU și Pip s-a realizat folosind două componente cu valorile energiilor de legătură la aproximativ 398,5 și 400 eV.

Componentele în jurul valorii de 398.5eV ar putea fi atribuite grupărilor structurale (C-NH-C). [Stevens JS *et al.* 2013], [Gonzales-Torres M *et al.* 2014], [Dong L *et al.* 2016], iar cele de la 400 eV corespund grupărilor structurale (N-C=O) [Stevens JS *et al.* 2013] sau celor de suprafață N-C=O, N-C-OH apărute datorită expunerii atmosferice anterioare a tuturor probelor.

Pentru proba 5-FU /Pip_S, cele două componente folosite pentru deconvoluția spectrului de înalta rezoluție N1s sunt centrate la valorile 399,6eV și 401,7eV. Componenta de la 399,6 eV poate fi atribuită legăturilor (N-C=O), (N-C-OH), (C=CH-N) structurale sau de suprafață în timp ce componenta de la 401,7eV, prezentă doar pentru forma solidă nouă 5-FU /Pip_S, este caracteristică speciilor de amine (C-NH₂⁺) protonate, ceea ce este o dovadă că acest compus este o sare. [Stevens JS *et al.* 2010], [Das SK *et al.* 2012]

În Figura III.26 sunt reprezentate spectrele XPS de înaltă rezoluție pentru proba 5-FU/Pip_S precum și felul în care a fost realizată deconvoluția acestor spectre.

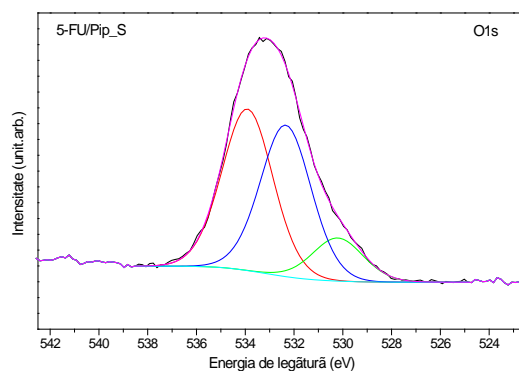


Figura III.26 Deconvoluția spectrelor XPS de înaltă rezoluție O1s pentru probele 5-FU, Pip și 5-FU/Pip_S.

Semnalul provenind de la fotoelectronii O1s poate fi deconvoluționat cu trei componente după cum urmează: componenta în jurul valorii de 530eV poate fi atribuită atomilor de oxigen dublu legați de carbon din grupările structurale și/sau speciilor de suprafață C=O, O=C-N sau O=C-OH, [Das SK *et al.* 2012], componenta de la aproximativ 532eV poate fi atribuită legăturii simple a oxigenului cu carbonul în grupările (O-C=O) și (C-O), [Das SK *et al.* 2012], iar a treia de la 533 eV corespunde grupărilor C-OH și/sau apei absorbită din atmosferă. [Stevens JS *et al.* 2013], [Yang D *et al.* 2009]

III.3.6 Determinarea solubilității și a vitezei de dizolvare în apă

În cazul probei preparate prin metoda SL, s-a demonstrat formarea de o sare din 5-FU și Pip. Pentru a evidenția că prin formarea de sare a crescut solubilitatea și rata de dizolvare, au fost realizate teste de dizolvare în apă bidistilată pentru noua formă solidă 5FU/Pip_S, iar rezultatele au fost comparate cu cele obținute pentru compusul de start, respectiv pentru forma de co-cristal. Procedura experimentală a constat în agitarea la temperatura ambiantă, a unei cantități de substanță - cântărită în prealabil- din proba de analizat 5-FU/Pip_S, la care s-a adăugat treptat apă bidistilată. Viteza de dizolvare și solubilitatea în apă bidistilată pentru forma solidă de sare 5-FU/Pip_S, au fost stabilite experimental prin comparare cu rezultatele obținute din testele realizate pentru compusul pur 5-FU. (Figura III.27)

A fost calculată solubilitatea în apă pentru proba de sare și a rezultat că are valoarea egală cu 29.23 mg/mL. În paragraful anterior III.2.6. s-a evidențiat că o cantitate de 7.69 mg 5-FU se solvă în 1mL de apă în 30 minute, deci prezintă o solubilitate în apă de aproximativ 8mg/mL.

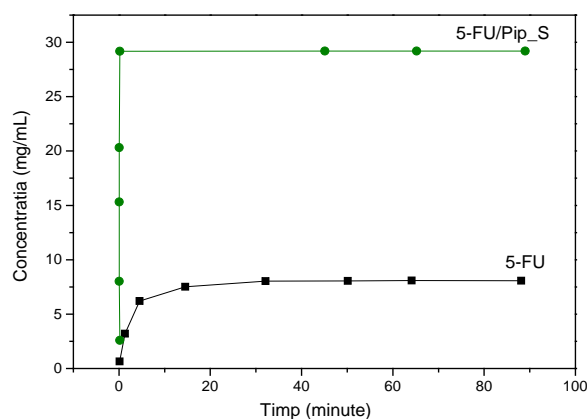


Figura III.27 Viteza de dizolvare în apă pentru 5-FU și pentru 5-FU/Pip_S

Raportată la solubilitatea compusului 5-fluorouracil pur, solubilitatea co-cristalului a fost considerabil îmbunătățită, fiind de 3.8 de ori mai mare față de a 5-Fluorouracilului

În concluzie, se poate preciza că sarea 5-FU/Pip_S prezintă o solubilitate foarte ridicată, atât față de compusul de start 5-FU cît și față de co-cristalul 5-FU/Pip_C, față de care are o solubilitate de 24.15 ori mai mare.

III.4 Testarea comportamentului după iradiere gama

Pentru a verifica dacă co-cristalul ar putea fi influențat de radiația emisă de Iod, au fost selectate eșantioane din proba de co-cristal 5-FU/Pip_C, care au fost expuse la o sursă de radiație de Iod I-131, la o activitate a sursei constantă de 117.4 mCi (4.34 GBq), și la o distanță de 1 m față de sursă, pentru o oră, trei ore, cinci ore, respectiv 24 ore. După expirarea timpului de iradiere, probele au fost analizate prin difracție de raze X și spectroscopie FT-IR, în scopul detectării eventualelor schimbări structurale datorate iradierii la timpi de expunere diferiți. Cunoscând timpul de expunere pentru fiecare probă, activitatea sursei și constanta gama pentru izotopul I-131 (0.22 mR/hr per mCi la distanța de 1 m sau 7.647E-5 mSv/hr per MBq la distanța de 1 m), a fost calculată doza absorbită de fiecare probă în parte. Valorile dozei absorbite sunt redată în tabelul următor. (**Tabelul III.9**) După iradiere probele au fost analizate prin difracție de raze X și spectroscopie în infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR) în scopul identificării eventualelor modificări structurale în probe după iradierea acestora cu radiație gama.

Tabelul III.9 Valorile dozei absorbite

Probă	Timp de expunere [h]	Debitul dozei [mSv/h]	Doza absorbită [mGy]
I_0h	0	0,332	0
I_1h	1		0,332
I_3h	3		0,996
I_5h	5		1,66
I_24h	24		7,968

Rezultatele analizelor probelor după măsurătorile XRD sunt prezentate în **Figura III.28**. Au fost analizate difractogramele de raze X obținute pentru co-cristalul de 5-FU și piperazină înainte și după iradiere gama timp de până la 24 de ore. Se observă că valorile unghiurilor 2θ la care apar liniile de difracție practic nu sunt modificate.

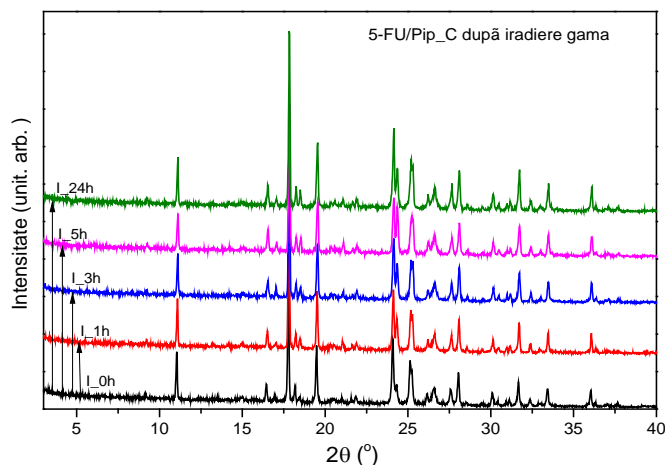


Figura III.28 Difractogramele XRD pentru 5-FU/Pip_C, înainte și după expunerea la radiație gama. Acest rezultat confirmă stabilitatea probelor la iradiere, în urma iradierii cu radiație gama, probele nu au suferit modificări structurale în ceea ce privește structura cristalină, indiferent dacă timpul de expunere la sursa de radiație a fost diferit.

Spectroscopia FT-IR a confirmat rezultatele difracției de raze X și anume că iradierea probelor cu radiație γ a nu a indus modificări în structura probelor, deoarece se obțin spectre similare, chiar dacă timpii de iradiere au fost diferiți. Din **Figura III.30**, se observă că vibrațiile identificate în probele înainte de iradierea gama, apar la valori apropiate în spectrele obținute pentru probele iradiate. Rezultate arată că poziția benzilor de absorbție în spectrele obținute pentru probele iradiate se identifică la valori apropiate cu cele obținute pentru proba neiradiată. Cu toate că se evidențiază diferențe între proba neiradiată și cele iradiate: se observă că apar două benzi noi la $\sim 3214 \text{ cm}^{-1}$ și $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ care pot să corespundă vibrațiilor de întindere la gruparea amino NH_2 , respectiv $\text{C}=\text{C}$ din inelul aromatic.

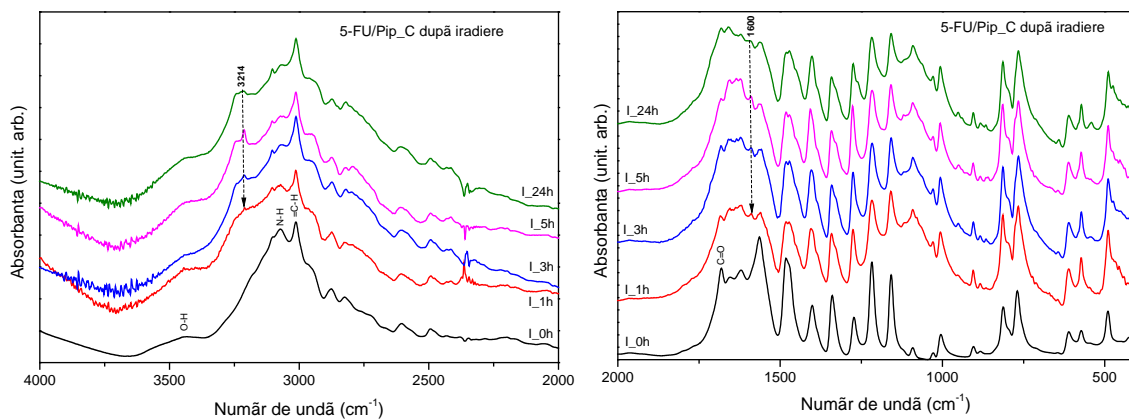


Figura III.30 Spectrele FT-IR pentru co-cristalul de 5-FU/Pip înainte și după expunerea la radiație gama

Aceste modificări minore în spetrele probelor iradiate pot să apară datorită deformării rețelei cristaline sub acțiunea radiației gama, când dimensiunile cristalitelor scad, ceea ce nu pot să influențeze proprietățile substanțelor.

Rezultatele obținute prin difracție de raze X și spectroscopie FT-IR relevă faptul că nu s-au produs modificări de structură în co-cristalul obținut, susținând stabilitatea acestei forme noi obținute la expunerea la radiația gama la diferite doze absorbite.

CAPITOLUL IV : Concluzii generale și perspective

IV.1. Concluzii generale

Având ca obiectiv obținerea, identificarea și investigarea de forme solide noi – polimorfi, săruri sau co-cristale – a 5-Fluorouracilului, care este un compus farmaceutic activ utilizat în diverse tratamente de cancer, din cercetările efectuate se desprind următoarele concluzii:

- Au fost sintetizate forme solide noi între 5-fluorouracil (5-FU) și piperazină (Pip) care, înaintea cercetărilor efectuate în prezenta teză, nu au fost studiate asociat.
- Solubilitatea 5-FU a fost testată în 14 soluții apoase; în 10 cazuri s-au obținut soluții, iar în 4 au rezultat suspensii. Probele solide obținute sub formă de pulbere după evaporarea lentă a solventului au recristalizat în aceeași structură, exceptând cazul soluție apoase cu acetonitril.
- 5-FU solubilizat în soluție apoasă de acetonitril recristalizează într-un polimorf.
- Noile forme solide de 5-FU cu Pip s-au obținut prin metoda mixării/măcinării mecanice cu solvent (solvent drop grinding - SDG) și prin metoda suspensiei cu adăugare de antisolvent (slurring - SL).
- Analizele prin difracție de raze X, corelate cu analizele spectroscopice prin FTIR și XPS arată că prin metoda SDG rezultă un co-cristal, iar prin metoda SL rezultă o sare.
- Testele de dizolvare în apă indică o solubilitate mai mare în cazul formei noi de sare.
- Pentru noile forme solide de 5-FU cu Pip iradiate gama la doze medicale mari (până la 8 mGy) nu sunt puse în evidență modificări structurale.

IV.2. Perspective

În vederea unor posibile aplicații, rezultatelor obținute motivează continuarea cercetărilor asupra:

- stabilității celor două forme solide noi în medii cu temperatură și umiditate controlată;

- solubilității co-cristalului și a sării de 5-FU/Pip în medii apoase cu diferite valori pH;
- obținerea celor două forme solide noi sub formă de monocristale, în scopul determinării structurii cristaline pentru co-cristal și sare.

Bibliografie selectivă

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/piperazine>

[Aluaș M et Simon S, 2012] Aluaș M, Simon S, *Metode experimentale avansate pentru studiul și analiza bio-nano-sistemelor*, Cartea Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2012, 134-394.

[Bristow RG et al. 1997] Bristow RG, Tannock I.F, Hill RP, *Molecular and Cellular Basis of Radiotherapy in The Basic Science of Oncology*, editors : Tannock I.F, Hill RP, mcgraw-Hill N.Y., San Francisco, 1997, 295-321.

[Chakraborty S. et al. 2014] Chakraborty S, Ganguly S, Desiraju GR, *Synthon transferability probed with IR spectroscopy: cytosine salts as models for salts of lamivudine*, *crystengcomm* 16, 2014, 4732- 4741.

[Connelly PR et al. 2015] Connelly PR, Snyder PW, Zhang Y, mcclain B, Quinn BP, Johnston S, Medek A, tanouryj, Griffith J, Walters WP, Dokou E, Knezic D, Bransford P, *The potencyeinsolubility conundrum in pharmaceuticals: mechanism and solution for hepatitis C protease inhibitors*, *Biophysics Chem*, 196, 2015, 100–108.

[Dai X-L et al. 2016] Dai X-L, Li S, Chen J-M, Lu T-B, *Improving the membrane permeability of 5- fluorouracil via cocrystallization*, *Cryst Growth Des*, 16, 2016, 4430-4438.

[Das SK et al. 2012] Das SK, Dickinson C, Lafir F, Brougham DF, Marsili E, *Synthesis, Characterization and Catalytic Activity of Gold Nanoparticles Biosynthesized with Rhizopus oryzae Protein Extract*, *Green Chemistry*, 14, 2012, 1322-1334.

[Davidovich M et al. 2004] Davidovich M, Gougoutas JZ, Scaringe RP, Vitez I., Yin S, *Detection of polymorphism by powder X-ray diffraction: Interference by preferred orientation*, *Am. Pharm. Rev*,7, 2004, 10-16.

[Derrick MR et al. 1999] Derrick MR, Stulik D, Landry JM, *Infrared Spectroscopy in Conservation Science*, J. Paul Getty Trust, ISBN 0-89236, 1999, 1-82.

[Gonzales-Torres M et al. 2014] Gonzalez-Torres M, Olayo MG, Cruz GJ, Gomez LM, Sanchez-Mendieta V, Gonzalez-Salgado F, *XPS study of the chemical structure of plasma biocopolymers of pyrrole and ethylene glycol*, *Advances in Chemistry Volume 2014*, Article ID 965920.

[Grem JL, 2000] Grem JL, *5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development*, *Investigational New Drugs* 18, 2000, 299–313.

[**Huang H et al. 2017**] Huang H, Shu X, Liu S, Zhao J, *Preparation and properties of a novel graphene fluoroxide/polyimide nanocomposite film with a low dielectric constant*, Chen X, RSC Adv, 7, 2017, 1956–1965.

[**Mureşan-Pop M et al. 2011**] Mureşan-Pop M, Kacsó I, Filip X, Vanea E, Borodi G, Leopold N, Bratu I, Simon S, *Spectroscopic and physical–chemical characterization of ambazone–glutamate salt*, Spectroscopy 26, 2011, 115–128.

[**Nadzri NI et al. 2016**] Nadzri NI, Sabri NH, Lee VS, Abdul Halim SN, *5-Fluorouracil Co-crystals and Their Potential Anti-cancer Activities Calculated by Molecular Docking Studies*, J Chem Crystallogr, 46, 2016, 144–154.

[**Nivetha EAK et al. 2015**] Nivetha EAK, Dhanavel S, Narayanan V, Vasuc CA, Stephen A, *An in vitro cytotoxicity study of 5-fluorouracil encapsulated chitosan/gold nanocomposites towards MCF-7 cells*, RSC Adv, 5, 2015, 1024–1032.

[**Rodriguez-Benot A et al. 2002**] Rodriguez-Benot A, Santamaria R, Martin-Malo A, Aljama P, *Sterilization procedures and biocompatibility*, Ronco C, La Greca G (eds): Hemodialysis Technology, Contrib Nephrol. Basel, Karger, 137, 2002, 138–145.

[**Sharma V et al. 2014**] Sharma V, Chitranshi N, Agarwal AK, *Significance and Biological Importance of Pyrimidine in the Microbial World* (2014) Int J Med Chem, International Journal of Medicinal Chemistry Volume 2014, 2014, Article ID 202784, 31 pages.

[**Sekhon BS, 2009**] Sekhon BS, *Pharmaceutical co-crystals - a review*, Ars Pharm, 50, 2009, 99-117.

[**Siebert F et Hildebrandt P, 2007**] Siebert F, Hildebrandt P, *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, Wiley-VCH verlay gmbh & Co. Kгаа, ISBN 978-3-527-40506-0, 2007.

[**Smith BS, 2011**] Smith BS, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN 978-1-4200-6930-3, 2011.

[**Stevens JS et al. 2010**] Stevens JS, Byard SJ, Schroeder SLM, *Salt or Co-Crystal? Determination of Protonation State by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)*, J Pharm Sci, 99, 2010, 4453–4457.

[**Stevens JS et al. 2013**] Stevens AC, de Luca M Pelendritis, Terenghi G, Downes S, Schroeder SLM, *Quantitative analysis of complex amino acids and RGD peptides by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)*, Surface and Interface Analysis, 45, 8, 2013, 1238-1246.

[**Stevens JS et al. 2014**] Stevens JS, Byard SJ, Seaton CC, Sadiq G, Davey RJ, Schroeder SLM, *Proton transfer and hydrogen bonding in the organic solid state: a combined XRD/XPS/ssnmr study of 17 organic acid–base complexes*, Phys Chem Chem Phys, 16, 2014, 1150-1160.

[**Stevens JS et al. 2015**] Stevens JS, Newton LK, Jaye C, Muryn CA, Fischer DA, Schroeder SLM, *Proton transfer, hydrogen bonding, and disorder: Nitrogen near-edge X-*

ray absorption fine structure and X-ray photoelectron spectroscopy of bipyridine-acid salts and co-crystals, Cryst Growth Des, 15, 2015, 1776–1783.

[Stuart B, 2004] Stuart B, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Ltd, ISBN 0-470-85427-8, 2004.

[Vyazovkin S et al. 2014] Vyazovkin S, Chrissa K, Di Lorenzo ML, Koga N, Pijolat M, Roduit B, Sbirrazzuoli N, Suñol JJ, *ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations*, Thermochim Acta, 590, 2014, 1–23.

[Yang D et al. 2009] Yang D, Velamakanni A, Bozoklu G, Park S, Stoller M, Piner RD, Stankovich S, Jung I, Field DA, Ventrice CA Jr, Ruoff RS, *Chemical analysis of graphene oxide films after heat and chemical treatments by X-ray photoelectron and Micro-Raman spectroscopy*, Carbon, 47, 2009, 145-152.