

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

OLIMPIA MARIA MARTINS SANTOS VIANA

**FORMAS SÓLIDAS NO MELHORAMENTO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS DE FÁRMACOS DE BAIXA SOLUBILIDADE AQUOSA:
DOXICICLINA, ORBIFLOXACINO E CARVEDILOL**

Alfenas/MG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

OLIMPIA MARIA MARTINS SANTOS VIANA

**FORMAS SÓLIDAS NO MELHORAMENTO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS DE FÁRMACOS DE BAIXA SOLUBILIDADE AQUOSA:
DOXICICLINA, ORBIFLOXACINO E CARVEDILOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas como requisito para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Magali B. Araújo.

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Viana, Olimpia Maria Martins Santos.

Formas sólidas no melhoramento das propriedades físico-químicas de fármacos de baixa solubilidade aquosa: doxiciclina, orbifloxacino e carvedilol / Olimpia Maria Martins Santos Viana. -- Alfenas/MG, 2016.
152 f.

Orientador: Antonio Carlos Doriguetto.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

Bibliografia.

1. Formas sólidas. 2. Solubilidade. 3. Estabilidade. 4. Doxiciclina.
5. Orbifloxacino. 6. Carvedilol. I. Doriguetto, Antonio Carlos. II. Título.

CDD-548

OLIMPIA MARIA MARTINS SANTOS VIANA

**FORMAS SÓLIDAS NO MELHORAMENTO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS DE FÁRMACOS DE BAIXA SOLUBILIDADE AQUOSA:
DOXICICLINA, ORBIFLOXACINO E CARVEDILOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de Alfenas
como requisito para obtenção do título de Doutora
em Química, área de concentração: Físico
Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto.

Co-orientadora: Profa. Dra. Magali B. Araújo.

Aprovada em 3 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. **Antônio Carlos Doriguetto.**

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.

Assinatura: _____

Dr. **André Luis Morais Rucla.**

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.

Assinatura: _____

Prof. Dr. **Fábio Furlan Ferreira.**

Instituição: Universidade Federal do ABC, UFABC-SP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. **Humberto Gomes Ferraz.**

Instituição: Universidade de São Paulo, USP-SP.

Assinatura: _____

Prof. Dr. **Marcello Garcia Trevisan.**

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG.

Assinatura: _____

Dedico a Deus pela força e coragem que
me deu para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto, grande mestre, por ter me aceito em sua equipe de trabalho, me ensinar com paciência, dedicação e ser um exemplo a ser seguido.

À minha chefe e co-orientadora, Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo, pela confiança depositada e incentivo.

Aos professores e colegas Dr. Rudy Bonfilio, Dr. Felipe Terra Martins e Dr. Alexandre Legendre pelas colaborações e discussões realizadas durante o desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas Deiverson e Albert pelas análises de DRXP e TG, respectivamente. Aos colegas Douglas Martelli e Silva (mestrado) e Lilian Azarias (iniciação científica) pela oportunidade de continuar o trabalho que eles iniciaram com a doxiciclina.

Ao André Luiz Machado Viana, amor da minha vida, pelo seu amor, compreensão, incentivo e companheirismo durante todos esses anos.

Aos colegas de trabalho do laboratório Núcleo Controle de Qualidade da Universidade Federal de Alfenas pela amizade. Aos Laboratórios: LABCRI-UFMG, LABIQ-UNIFAL-MG e LACFar-UNIFAL-MG.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro.

As amigas: Amanda Nascimento dos Reis, Daniela Mayra de Oliveira, Mariane Gonçalves Santos e Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho por terem me acompanhado ao longo de minha vida acadêmica sempre com palavras de ânimo, força e coragem.

Aos amigos conquistados durante este doutorado: Mônica Esselin de Souza Lino, Leonardo Turchi, Thais Ashcar Lima Doriguetto, Vanessa Bruno, Edeílson Gonzaga, Edvana, pelos bons momentos compartilhados.

Ao professor de línguas Fábio Savina, pela amizade e auxílio nas correções gramaticais de inglês nos resumos apresentados em congressos.

À minha grande amiga Jennifer Tavares Jacon Freitas pelos momentos bons e ruins divididos no laboratório e na vida pessoal.

À amiga e colega da 1ª turma do programa de Pós-Graduação em Química da UNIFAL-MG, Iara Maria Landre Rosa pelos conhecimentos transmitidos e pelas companhias nos congressos.

Aos meus pais, principalmente minha mãe Maria do Carmo, minha irmã Águeda Cristina e meu avô Geraldo Pio Martins pelas orações e torcida.

RESUMO

Vários Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) (do inglês: *Active Pharmaceutical Ingredients*) descritos na Farmacopeia Americana são de baixa solubilidade aquosa ou insolúveis em água. Além disso, a maioria dos medicamentos é disponibilizada na forma sólida (cristalina), principalmente comprimidos, por razões de maior estabilidade e menores custos. Entretanto, para que um medicamento possa exercer sua ação terapêutica é necessário que o IFA seja liberado da formulação farmacêutica e se dissolva em quantidade e velocidade adequadas nos fluidos gastrointestinais para ser absorvido. Assim, fármacos de baixa solubilidade podem apresentar problemas com sua biodisponibilidade. Neste sentido, um dos maiores desafios da indústria farmacêutica nos últimos anos, consiste em melhorar a dissolução de fármacos pouco solúveis, para que possam ser biodisponíveis e, com isso, mais eficazes. Este trabalho possui como objetivos a obtenção de novas formas sólidas dos IFAs de baixa solubilidade aquosa e avaliação das propriedades físico-químicas, principalmente solubilidade e estabilidade. Os IFAs escolhidos para esse estudo foram: doxiciclina, orbifloxacino e carvedilol. Novas formas cristalinas dessas três IFAs foram obtidas e caracterizadas por espectroscopia vibracional da região do infravermelho, análise térmica e difração de raios X por policristais. Duas estruturas cristalinas inéditas foram determinadas a partir de dados de difração de raios X por monocristais: Uma para a doxiciclina e uma para o orbifloxacino. Outras quatro fases cristalinas inéditas, sendo uma para o orbifloxacino e outras três para o carvedilol foram identificadas pelas técnicas físicas de caracterização utilizadas nesse estudo. Suas estruturas serão posteriormente determinadas a partir de estudos de difração de raios X. Estudos de solubilidade, estabilidade e dissolução das formas sólidas inéditas obtidas foram comparados com as formas sólidas preconizadas e, ou, conhecidas dos respectivos IFAs abordados nesse estudo.

Palavras-chave: Formas sólidas. Solubilidade. Estabilidade. Doxiciclina. Orbifloxacino. Carvedilol.

ABSTRACT

More than one third of the Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) described in the US Pharmacopoeia have a poorly-water solubility or are insoluble in water. Moreover, most of the drugs are available in their solid (crystalline) form, particularly tablets, due to a major stability and lower costs. However, in order for a drug product to exercise its therapeutic action it is necessary that the API can be released from the pharmaceutical formulation and that this ingredient has to be dissolved in an adequate quantity and rate on the gastrointestinal fluids to be absorbed. Thus, these poorly soluble drugs in these fluids present problems with bioavailability. In this sense, one of the biggest challenges of the pharmaceutical industry in the recent years is to improve the dissolution of poorly soluble drugs, so that in turn they can be bioavailable and thus, more effective. This work has as objective to obtain new solid forms of low aqueous solubility APIs and evaluate their physicochemical properties, especially solubility and stability. The APIs chosen for this study were doxycycline, orbifloxacin and carvedilol. New crystalline forms of these three APIs were determined by single crystal X-ray diffraction (SCXRD) and characterized by vibrational spectroscopy in the infrared, by thermal analysis and by X-ray diffraction by polycrystals. The two new crystal structures determined from SCXRD data were: one for doxycycline and one for orbifloxacin. Other four novel crystalline phases, (1 for the orbifloxacin and 3 for the carvedilol), were identify by the techniques of physical characterization and their structures will be determined from studies of X-ray diffraction posteriorly. The solubility, stability and dissolution of these novel solid forms were carried out and compared with those recommended and, or known solid forms for each API.

Key words: Solid forms. Solubility. Stability. Doxycycline. Orbifloxacin. Carvedilol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR-	Reflectância Total Atenuada
CTD-	Clortalidona
DOX	Doxiciclina
DRXM-	Difração de Raios X por Monocristal
DRXP-	Difração de Raios X por Policristais ou Pó
DSC-	Calorimetria Diferencial Exploratória Diferencial
FDA-	Food and Drug Administration
FT-	Transformada de Fourier
ICH-	International Conference on Harmonisation
d.m.q	Desvio médio quadrático
IFA -	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IR-	Infravermelho
nm-	Nanômetros
ORBI	Orbifloxacino
PABA -	Ácido Paraminobenzóico
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
TDI-	Taxa de Dissolução Intrínseca
TG-	Análise Termogravimétrica
UV-	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema das formas sólidas que podem existir para um IFA.....	24
Figura 2 -	Difratogramas da mistura física do IFA lovastatina e PABA (1:1, mol/mol) (vermelho + azul) e tentativa de obtenção de cocrystal lovastatina: PABA (1:1; mol/mol) (verde)	26
Figura 3 -	Picos de Bragg da clortalidona formas I e II calculados e experimentais do padrão de referência USP e de matérias-primas.....	27
Figura 4 -	Representação esquemática das formas sólidas da clortalidona (CTD).....	28
Figura 5 -	Exemplo de modelos de difratômetros de raios X: a) e b) Difratômetro para monocristais (marca Agilent®); c) e d) Difratômetro para policristais (marca Rigaku®)	30
Figura 6 -	Representação esquemática da Lei de Bragg.....	31
Figura 7 -	Representação de uma cela unitária e seus parâmetros.....	33
Figura 8 -	Esquema sumarizado de identificação e não identificação de fase cristalina por DRXP.....	34
Figura 9 -	Espectrofotômetro FTIR-ATR.....	36
Figura 10 -	Termobalanças: a) Para análise de DSC (Marca: SII Nano Technologies®); b) para análise de TG/DTA (Marca: TA Instruments®)	37
Figura 11 -	Aparelho de dissolução: a) dissolutor (marca Eletrolab ®); b) Aparato 1 (pá) e c) Aparato 2 (cesta)	41
Figura 12 -	Estrutura química do antimicrobiano doxíciclina (DOX)	44
Figura 13 -	Estrutura química do antimicrobiano orbifloxacino.....	46
Figura 14 -	Estrutura química do anti-hipertensivo carvedilol.....	48
Figura 15 -	Varredura espectral na faixa de 200 nm a 400 nm das formas sólidas de DOX em água.....	56
Figura 16 -	Diagrama químico da porção ceto-enólica ligada à amida para as formas de DOX conhecidas e as reportadas neste estudo.....	71
Figura 17 -	Difratogramas de raios X por policristais experimentais e calculados para DOX·HAc·2H ₂ O, DOX·HNO ₃ ·0.5H ₂ O e DOX·HCl·2H ₂ O.....	73

Figura 18 -	Curvas de TG (a) e de DSC (b) para DOX.HYC, DOX.H ₂ O, DOX.HAc.2H ₂ O, DOX.HNO ₃ .0.5H ₂ O e DOX.HCl.2H ₂ O.....	74
Figura 19 -	Espectros FTIR-ATR para DOX.HYC, DOX.H ₂ O, DOX.HCl.2H ₂ O, DOX.HAc.2H ₂ O e DOX.HNO ₃ .0.5H ₂ O.....	76
Figura 20 -	Valores de solubilidade em equilíbrio para as formas de DOX à 25°C.....	79
Figura 21 -	Difratogramas de raios X por policristais para DOX.H ₂ O calculado (preto) e experimentais do pó remanescente do ensaio de solubilidade em equilíbrio da DOX.H ₂ O em cada meio testado.....	80
Figura 22 -	Difratogramas de raios X por policristais calculados para DOX.HYC (preto) e DOX.2HCl.2H ₂ O (rosa) e experimentais do pó remanescente do ensaio de solubilidade em equilíbrio do DOX.HYC em casa meio testado.....	81
Figura 23 -	Padrão de ligação de H que ocorre em DOX.HAc.2H ₂ O e em DOX.H ₂ O.....	82
Figura 24 -	Vista do empacotamento de DOX.HAc.2H ₂ O (a) e DOX.H ₂ O (b) no plano <i>bc</i>	83
Figura 25 -	Difratogramas de raios X por policristais do ensaio de fotoestabilidade para as formas de DOX protegidas da radiação UV (P) e expostas à radiação UV (E)	85
Figura 26 -	Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estresse neutro.....	86
Figura 27 -	Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estresse ácido.....	86
Figura 28 -	Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estresse básico.....	87
Figura 29 -	Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após peroxidação.....	87
Figura 30 -	Perfis de dissolução das formas sólidas de DOX em cápsulas.....	88
Figura 31 -	Vista ORTEP-3 da forma hemidratada de ORBI apresentando os átomos com o deslocamento dos elipsóides a um nível de probabilidade de 50%.....	92
Figura 32 -	Mapas de densidade residual das porções: (a) carboxílica e, (b)	

	pirazínica, obtido por síntese de Fourier de diferença do ORBI hemidratado.....	93
Figura 33 -	Representação gráfica do tetrâmero de ORBI estabilizado por ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas), vista normal ao eixo cristalográfico <i>a</i> da cela unitária.....	95
Figura 34 -	Empacotamento parcial da forma de hemidratada do ORBI projetado perpendicular aos planos (a) (100), (b), (001), e (c) (010), os quais mostram a formação de uma camada normal ao eixo <i>a</i> da célula unitária.....	97
Figura 35 -	Vista ORTEP-3 dos contatos intermoleculares inter-camadas estabilizados por ligações de H não-clássicas e interações π -aryl- π -aryl (linhas pontilhadas)	99
Figura 36 -	Difratogramas de raios X experimentais do padrão Sigma (preto) e da matéria-prima do ORBI (vermelho) comparados com o calculado (azul) a partir da estrutura do ORBI hemihidratado.....	100
Figura 37 -	Curvas de TG (preto) e DTA (azul) obtidas na faixa de 40 a 400 °C iniciando com o ORBI hemihidratado.....	101
Figura 38 -	Espectros FTIR-ATR do ORBI anidro (vermelho) e hemidratado (preto)	102
Figura 39 -	Curvas TG: (a) ORBI padrão Sigma como recebido (hemidratada); (b) ORBI padrão Sigma após aquecimento a 200 °C por 1h (anidra) e (c) ORBI padrão Sigma após aquecimento a 200 °C por 1h seguido por tratamento durante 1h em câmara climática à 40 °C com 75 % de umidade relativa (reidratada)	103
Figura 40 -	Dados de DRXP do ORBI: (a) hemidratada calculada (Os índices de Miller que identificam os picos de Bragg foram incluídos); (b) experimental do padrão Sigma como recebido (forma hemidratada); (c) experimental do padrão Sigma após aquecimento a 200 °C durante 1h (forma anidra); (d) experimental do padrão Sigma após aquecimento a 200 °C (por 1h seguido por tratamento em câmara climática à 40 °C com 75% de umidade relativa também por 1 h (forma reidratada).....	105
Figura 41 -	Padrões de DRXP experimentais dos excipientes (em azul) e dos	

	comprimidos ORBAX® (em vermelho) com dosagem declarada de 22,7 mg de ORBI.....	108
Figura 42 -	Distribuição das espécies ácido-base pH-dependentes do ORBI.....	110
Figura 43 -	Valores de solubilidade em equilíbrio para as formas anidra e hemidratada.....	111
Figura 44 -	Padrões experimentais de DRXP dos materiais sólidos residuais em equilíbrio com as soluções preparadas a partir das formas hemidratada e anidra do ORBI em água e nos meios tampões pH 6,8 e 7,5.....	113
Figura 45 -	Padrões de DRXP de ORBI após o teste de solubilidade em equilíbrio: (a) experimental do ORBI hemidratado; (b) ORBI hemidratado em HCl 0,1 mol. L ⁻¹ ; (c) ORBI anidro em HCl 0,01 mol. L ⁻¹	115
Figura 46 -	Padrões de DRXP após o teste de solubilidade em equilíbrio: (a) ORBI hemidratado calculado; (b) ORBI hemidratado experimental em tampão acetato pH 4,5; (c) ORBI anidro experimental em tampão acetato pH 4,5; (d) ORBI anidro experimental em tampão fosfato pH 5,8; (e) ORBI hemidratado experimental em tampão fosfato pH 5,8.....	116
Figura 47 -	Padrões de DRXP: a) Forma II calculada (azul), ácido fumárico (vermelho) e da amostra obtida por recristalização da mistura carvedilol: ácido fumárico (1:1, mol/mol) em metanol: água (50:50, v/v) (preto); b) Carvedilol hemidrato calculado (preto) e amostra obtida após a recristalização nas mesmas condições anteriores na ausência do ácido fumárico (vermelho)	118
Figura 48 -	Difratogramas da forma II calculada (vermelho), nicotinamida (preto) e da amostra obtida por recristalização da mistura carvedilol: nicotinamida (1:1; mol/mol) em acetonitrila: metanol: água (35:35:30, v/v/v) (azul)	119
Figura 49 -	Difratogramas calculados e experimentais das formas II, III e hemidratada.....	120
Figura 50 -	Espectro de FTIR-ATR do carvedilol forma II (azul), forma III (preto) e hemidrato (vermelho)	121

Figura 51 -	Análise térmica da Forma II (a), Forma III (b) e hemidratada do carvedilol (c).....	122
Figura 52 -	Difratogramas do cloreto de carvedilol: a) Adaptado da patente de HILDESHEIM et al., 2006; b) Experimental.....	123
Figura 53 -	Espectros de FTIR-ATR do cloreto de carvedilol monohidratado (preto) e da forma II (vermelho)	124
Figura 54 -	Análise térmica do cloreto de carvedilol monohidratado.....	124
Figura 55 -	Difratogramas calculado (CIF: XOZJOM01) e experimental do fosfato de carvedilol.....	125
Figura 56 -	Espectro na região do infravermelho do fosfato de carvedilol.....	126
Figura 57 -	Análise térmica do fosfato de carvedilol hemidratado.....	126
Figura 58 -	Difratograma experimental obtido com a recristalização do carvedilol em ácido sulfúrico 0,5 mol. L ⁻¹	127
Figura 59 -	Espectro na região do infravermelho do sulfato de carvedilol: a) Fonte: Brook et al., 2005; b) Experimental.....	128
Figura 60 -	Análise térmica obtido com a amostra policristalina do carvedilol em ácido sulfúrico 0,5 mol. L ⁻¹	129
Figura 61 -	Difratogramas experimentais de policristais do solvato metiletilcetona do carvedilol.....	130
Figura 62 -	Espectro FTIR-ATR do solvato metiletilcetona de carvedilol (vermelho) e forma II (preto)	131
Figura 63 -	Análise térmica do solvato metiletilcetona de carvedilol.....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados cristalográficos das formas sólidas conhecidas para o IFA carvedilol.....	50
Tabela 2 -	Dados cristalográficos e parâmetros de determinação de estrutura das formas cristalinas de DOX.....	69
Tabela 3 -	Equações da reta obtidas através de uma curva de calibração espectrofotométrica para cada forma de DOX e seus coeficientes de correlação.....	78
Tabela 4 -	Equações da reta obtidas através de curvas de calibração cromatográficas para cada forma de DOX e seus coeficientes de correlação.....	84
Tabela 5 -	Quantidade resultante de DOX (em %) após os estudos de degradação .	85
Tabela 6 -	Fator de similaridade obtido da comparação entre perfis de dissolução de cada par de formas de DOX em cápsulas.....	89
Tabela 7 -	Principais dados cristalográficos do ORBI hemidratado determinado neste estudo.....	91
Tabela 8 -	As ligações de hidrogênio para o ORBI hemidratado (\AA e $^{\circ}$), onde D = doador e A = acceptor	96
Tabela 9 -	Solubilidade, classe farmacopeica e pH final das soluções em equilíbrio após 48 horas.....	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	INTRODUÇÃO ÀS FORMAS SÓLIDAS DE IFAs.....	18
2.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS.....	28
2.2.1	Difração de raios X.....	29
2.2.2	Espectroscopia na região do infravermelho.....	35
2.2.3	Análise térmica.....	37
2.3	ANÁLISES PARA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO- QUÍMICAS.....	39
2.3.1	Solubilidade em equilíbrio.....	39
2.3.2	Teste de dissolução.....	40
2.3.3	Testes de estabilidade.....	43
2.4	FÁRMACOS ESTUDADOS.....	44
2.4.1	Doxiciclina.....	44
2.4.2	Orbifloxacino.....	45
2.4.3	Carvedilol.....	48
3	OBJETIVOS.....	51
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	DOXICICLINA.....	52
4.1.2	Obtenção dos cristais das diferentes formas sólidas da doxiciclina.....	52
4.1.3	Determinação estrutural por difração de raios X por monocristal (DRXM)	53
4.1.4	Difração de raios X por policristais (DRXP)	54
4.1.5	Análise térmica.....	54
4.1.6	Análise na região do infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR).....	55
4.1.7	Solubilidade em equilíbrio.....	55
<i>4.1.7.1</i>	<i>Quantificação de DOX nos ensaios de solubilidade e perfil de dissolução....</i>	<i>56</i>

4.1.8	Estudos de estabilidade das formas sólidas de DOX.....	57
4.1.8.1	<i>Quantificação de DOX nos ensaios de estabilidade.....</i>	57
4.1.8.2	<i>Estudo de oxidação, degradação ácida, básica e neutra da DOX nas formas sólidas.....</i>	57
4.1.8.3	<i>Fotoestabilidade das formas sólidas da DOX.....</i>	58
4.1.9	Formulação das cápsulas de DOX.....	58
4.1.10	Perfis de dissolução.....	59
4.2	ORBIFLOXACINO.....	60
4.2.1	Obtenção das amostras.....	60
4.2.3	Experimento de difração de raios X por policristais (DRXP)	62
4.2.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)	62
4.2.5	Análise térmica.....	62
4.2.6	Estudo de interconversão entre as formas anidra e hemidratada de ORBI.....	62
4.2.7	Quantificação de ORBI.....	63
4.2.8	Estudos de solubilidade de ORBI.....	64
4.3	CARVEDILOL.....	64
4.3.1	Obtenção de novas formas de carvedilol.....	65
4.3.2	Experimento de Difração de raios X por policristais (DRXP)	66
4.3.4	Análise térmica.....	66
4.3.5	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	DOXICICLINA.....	67
5.1.1	Determinação estrutural por DRXM, padrão de protonação, tautomerismo e conformerismo das formas cristalinas da DOX.....	67
5.1.2	Análise de difração de raios X por policristais.....	72
5.1.3	Análise térmica.....	73
5.1.4	Análise na região do infravermelho.....	76
5.1.5	Solubilidade em equilíbrio.....	77
5.1.6	Estudo de estabilidade.....	84
5.1.7	Perfis de dissolução.....	88

5.2	ORBIFLOXACINO.....	90
5.2.1	Determinação estrutural por difração de raios X por monocristal.....	91
5.2.2	Difração de raios X por policristais (DRXP)	99
5.2.3	Análise térmica.....	100
5.2.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR)	101
5.2.5	Estudo de interconversão entre as formas anidra e hemidratada do ORBI.....	103
5.2.6	Caracterização dos comprimidos de ORBI.....	107
5.2.7	Estudos de solubilidade das formas hemidratada e anidra de ORBI.....	109
5.2.8	Conclusões parciais.....	117
5.3	OBTENÇÃO DAS FORMAS SÓLIDAS DE CARVEDIOL.....	117
5.3.1	Caracterização das formas.....	118
5.4	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	132
6	CONCLUSÃO.....	133
	REFERÊNCIAS.....	134

1 INTRODUÇÃO

Mais de um terço dos Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) (do inglês: *Active Pharmaceutical Ingredients*) descritos na Farmacopeia Americana e 75% dos compostos sob desenvolvimento são de baixa solubilidade aquosa ou insolúveis em água (RODRIGUEZ-ALLER et al., 2015). Além disso, a maioria dos IFAs estão em sua forma cristalina e são disponibilizados em formas farmacêuticas sólidas, como comprimidos, por razões de maior estabilidade e menores custos (NUNN; WILLIAMS, 2005; PAUL; TUNG; MIDLER, 2005).

Nestas condições, para que um medicamento sólido administrado por via oral possa exercer sua ação terapêutica é necessário que o IFA seja liberado da forma farmacêutica e se dissolva em quantidade e velocidade adequadas nos fluidos gastrointestinais para ser absorvido (AULTON, 2005). Assim, fármacos de baixa solubilidade podem apresentar problemas com sua biodisponibilidade.

Atualmente, a indústria farmacêutica vem enfrentando elevados custos na área de pesquisa e desenvolvimento apesar da sua baixa produtividade no desenvolvimento de novos fármacos (KHANNA, 2012). Neste sentido, um dos maiores desafios da indústria farmacêutica nos últimos anos é melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis. Esta propriedade é uma das mais importantes para se alcançar concentrações desejáveis do IFA na corrente sanguínea (tornar-se biodisponível). A eficácia de um IFA pode ser limitada pela sua baixa solubilidade aquosa e apresentar efeitos colaterais decorrentes dessa propriedade (CHAUDHARY et al., 2012).

Várias técnicas têm sido utilizadas para melhorar a solubilidade aquosa de IFAs tais como redução do tamanho de partícula, uso de dispersões sólidas, uso de surfactantes, complexação, uso da engenharia de cristais, entre outras (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANNI, 2012).

O grupo de cristalografia da Universidade Federal de Alfenas trabalha na área de difração de raios X de monocristal e policristais aplicados a pequenas moléculas utilizando a Engenharia de Cristais. Este trabalho possui como objetivos a obtenção de novas formas sólidas dos IFAs de baixa solubilidade aquosa (doxiciclina, orbifloxacino e carvedilol) e avaliação das propriedades físico-químicas (principalmente solubilidade e estabilidade química).

Nesta tese é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre as formas sólidas de um IFA, as técnicas utilizadas para sua identificação e caracterização, além dos testes para avaliação das suas propriedades físico-químicas, principalmente solubilidade e estabilidade (química). Na última parte é apresentada a obtenção de algumas novas formas sólidas bem como as discussões dos resultados obtidos para cada IFA estudado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi dividida em subitens para sua melhor apresentação.

2.1 INTRODUÇÃO ÀS FORMAS SÓLIDAS DE IFAs

A maioria dos medicamentos é formulada com excipientes e fármacos ou Ingrediente Farmacêutico Ativos (IFAs -do inglês: *Active Pharmaceutical Ingredients*) no estado sólido cristalino, que são preferidos em relação às soluções farmacêuticas por razões de estabilidade e facilidades no processo de fabricação (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BERNSTEIN, 2002, MORISSETTE et al., 2004; NUNN; WILLIAMS, 2005; SHAN; ZAWOROTKO, 2008; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Mais de 80% dos IFAs são comercializados na forma farmacêutica de comprimidos e em cerca de 40%, apresentam baixa solubilidade (BABU; NANGIA, 2011). Fármacos com baixa solubilidade aquosa têm se tornado altamente prevalentes, o que representa um grande obstáculo no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas devido à dificuldade de solubilização no trato gastrointestinal (BLAGDEN et al., 2007; ALLESØ et al., 2008; AALTONEN; RADES, 2009). No setor de pesquisa e desenvolvimento, os candidatos a fármacos que exibem baixa solubilidade aquosa chegam a somar 90%, o que eleva muito a possibilidade de problemas com biodisponibilidade (THAYER, 2010).

Em relação à solubilidade dos fármacos, o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) desenvolvido por Amidon e colaboradores em 1995, traz sua definição, a qual correlaciona a dissolução dos fármacos *in vitro* com a absorção *in vivo*. Nesse sistema os

fármacos são subdivididos em quatro categorias: classe I: fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade; classe II: fármacos de baixa solubilidade e alta permeabilidade; classe III: fármacos de alta solubilidade e baixa permeabilidade e classe IV: fármacos de baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995). Como a solubilidade depende do arranjo supramolecular das moléculas do IFA no estado sólido, suas estruturas cristalinas podem ser correlacionadas com sua classificação biofarmacêutica. Assim, é importante conhecer a estrutura cristalina preconizada para um IFA e avaliar a ocorrência de polimorfismo.

Polimorfismo em fármacos é definido como a capacidade de um IFA existir em mais de uma forma no estado sólido, com diferentes arranjos e, ou, conformações das moléculas, ou átomos que a constitui (BRITTAIN, 2009). Polimorfos são compostos com a mesma composição química, porém com moléculas arranjadas de pelo menos dois diferentes modos no estado cristalino (VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; DESIRAJU, 2008).

A nomenclatura dada aos polimorfos não possui regras estabelecidas. Normalmente, diferentes polimorfos de uma mesma molécula são denominadas por sequências numéricas (1, 2, 3... ou I, II, III...), ou alfabéticas (A, B, C... ou α , β , γ ...) ou por meio do nível de hidratação ou solvatação. Usualmente seguem a data em que foram reportados pela primeira vez (CARSTENSEN, 2001).

Na área farmacêutica, o termo polimorfismo é mais genérico, sendo utilizado para designar a maioria das formas sólidas tais como cristalina, amorfa, hidratada, solvatada ou cocrystalizada (AALTONEN; RADES, 2009).

Fármacos de baixa solubilidade (classes II e IV do SCB) incorporados em medicamentos sólidos administrados por via oral (em que a taxa de absorção é limitada pela sua dissolução) podem ter sua biodisponibilidade alterada quando existem diferenças significativas na solubilidade entre as formas cristalinas de um mesmo IFA (SNIDER; ADDICKS; OWENS, 2004; AALTONEN; RADES, 2009; THAYER, 2010). Mais especificamente, pode aparecer inadvertidamente uma forma com maior solubilidade, como observado para o IFA clortalidona, que em uma análise das matérias-primas, foi identificada a forma II, muito mais solúvel do que a forma comercial (forma I) ou também pode aparecer uma forma menos solúvel, como no caso do ritonavir (BONFILIO et al., 2014; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Melhoras nas propriedades físico-químicas de um fármaco podem ser obtidas pela alteração em sua forma sólida e, considerando que o fenômeno do polimorfismo é inevitável,

deve-se escolher a melhor forma, de preferência durante o seu desenvolvimento (LEE, 2014). Para tanto, utilizam-se técnicas de cristalização ou engenharia de cristais.

A engenharia de cristais é uma área multidisciplinar a qual engloba a ciência dos materiais, química supramolecular, reconhecimento molecular, Biologia, Ciências Farmacêuticas entre outras (DESIRAJU, 1995). Entretanto, sua relevância para a área farmacêutica é relativamente moderna (BOND, 2012; HICKEY; ALMARSSON; PETERSON, 2012).

Os desafios das propriedades físico-químicas dos fármacos de baixa solubilidade providenciam uma perfeita situação para a aplicação de técnicas de engenharia de cristais. Essas técnicas utilizam a química supramolecular como ferramenta, também denominada de química da ligação intermolecular, para melhorar as propriedades físico-químicas tais como a solubilidade e conseqüentemente a biodisponibilidade, além de poder desenvolver produtos farmacêuticos mais estáveis (BLAGDEN et al., 2007). São objetivos da engenharia de cristais: formação de sais, co-cristais, amorfos, coamorfos, além da busca por novos polimorfos que apresentem maiores vantagens em relação às já disponíveis comercialmente.

IFAs são gerados por moléculas, ou íons, que por sua vez, são constituídas de átomos, ligados por ligações intramoleculares, já os cristais desses IFAs são formados por moléculas e/ou íons conectadas através interações intermoleculares ou supramoleculares (BLAGDEN et al., 2007). E, de acordo com Dunitz 1991, um cristal é uma supermolécula “por excelência”, um agrupamento de milhões de moléculas arranjadas por reconhecimento mútuo em um “incrível nível de precisão” (DUNITZ, 1991).

Diferenças nas interações intermoleculares dos IFAs explicam o polimorfismo e os efeitos gerados nas formas sólidas, estudadas pela química supramolecular, definida como a química da ligação não-covalente ou química além da molécula (ISAACS, 2012; REINHOUDT, 2013). Como exemplos dessas interações estão: ligações de hidrogênio, Van der Waals, ligações π - π e interações eletrostáticas, as quais determinam o arranjo das moléculas na rede cristalina (ETTER; MACDONALD; BERNSTEIN, 1990; DESIRAJU, 1995; DESIRAJU, 2001; MOULTON; ZAWOROTKO, 2001; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009).

Variações no padrão de arranjo das moléculas resultam em formas polimórficas diferentes e modificações de suas propriedades físicas e químicas, uma vez que as características dos materiais sólidos estão intimamente ligadas à sua forma cristalina (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; DATTA; GRANT, 2004; VON RAUMER; DANNAPPEL;

HILFIKER, 2006; SAIFEE et al., 2009; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Um dos primeiros relatos sobre a influência das formas sólidas em IFAs foi reportado em 1967, quando Aguiar e colaboradores avaliaram a biodisponibilidade em humanos de suspensões contendo distintas formas sólidas do palmitato de cloranfenicol. Neste trabalho, concluiu-se que as formas A e B geraram não apenas velocidades de dissolução diferentes, como diferentes concentrações plasmáticas (AGUIAR et al., 1967).

Apesar dos efeitos gerados pelo polimorfismo em fármacos, conhecidos desde a década de 60, foi apenas com o caso do Norvir® (ritonavir), utilizado para controle da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), que a indústria farmacêutica começou a dar importância a esse fenômeno (AALTONEN et al., 2009). Em 1998, vários lotes de cápsulas não passaram no teste de dissolução devido ao aparecimento de um polimorfo (denominado de forma II) mais estável e muito pouco solúvel, o qual se formou durante seu processo de fabricação (CHEMBURKAR et al., 2000; BAUER et al., 2001). Assim, o medicamento foi retirado do mercado devido a indústria não ser capaz de produzir o polimorfo inicial (estudado) (forma I) (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011). Para solucionar este caso, a empresa Abbott gastou centenas de milhões de dólares, além de ter acumulado uma perda estimada de 250 milhões de dólares nas vendas apenas no ano de 1998 (GOLDBEK; PIDCOK; GROOM, 2011).

Entre as propriedades dos IFAs que podem variar, conforme as formas sólidas presentes, estão: a) químicas: reatividade química e fotoquímica e estabilidade; b) cinética: velocidade de dissolução, cinéticas de reações do estado sólido, taxa de crescimento do cristal e estabilidade; c) mecânicas: compressibilidade e compactabilidade, dureza, fluidez do pó e friabilidade; d) físicas: condutividade, densidade, higroscopicidade, índice de refração, cor, morfologia da partícula; e) superfície: tensões interfaciais, área de superfície e energia livre de superfície; f) termodinâmicas: potencial químico, energia livre e solubilidade; entalpia e entropia; capacidade térmica; temperatura de fusão e sublimação; pressão de vapor (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Ao contrário de um sólido cristalino, um amorfo não tem ordem ao longo do seu empacotamento ou conformação molecular bem definida, se apresentam em um maior estado de energia e com isso, possuem maior mobilidade molecular (YU, 2001).

Um sólido amorfo apresenta como características de interesse farmacêutico: maior solubilidade, taxa de dissolução e, às vezes também melhores propriedades de compressão em

relação aos IFAs cristalinos correspondentes. Porém são menos estáveis física e quimicamente e tendem a cristalizar nas condições normais de estocagem (HANCOCK; PARKS, 2000; YU, 2001).

Formas cristalinas e amorfas podem apresentar-se como anidras ou solvatadas (FDA, 2007; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2009; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011). Uma forma anidra é aquela que não apresenta um solvente em sua estrutura. Já os solvatos ocorrem quando um solvente está presente na estrutura da forma sólida. Quando o solvente incorporado é a água, este é denominado hidrato (KHANKARI; GRANT, 1995; BRITTAIN, 2012).

A ocorrência de fármacos hidratados é muito comum, pois a presença de água é frequente no ambiente e também em misturas de solventes utilizados no processo de cristalização. Somando-se a isso, tem-se o fato de a molécula de água ser pequena e poder estabelecer ligações de hidrogênio, sendo facilmente incorporada na rede cristalina dos fármacos tanto no preenchimento de espaços quanto na estabilização de estrutura, cuja saída pode levar ao colapso da estrutura cristalina (MORRIS; RODRIGUEZ-HORNEDO, 1993; GILLON et al., 2003).

Na década de 90, foi realizado um levantamento com os fármacos descritos em monografias da Farmacopeia Europeia que revelou que um terço dos 808 fármacos constantes nesse compêndio são hidratados (GRIESSER, 2006).

Além dos cristais moleculares, anidros ou solvatados/hidratados de fármacos, ocorrem também os sais e cocrystalos. Os sais são cristais formados por multicomponentes iônicos, podendo esta interação ocorrer entre um IFA e um componente aceitável farmacologicamente (excipiente ou contraíon) ou outro IFA como no caso do sal sulfametoxazol:trimetoprima (1:1 mol/mol) (CAIRA, 2007).

Geralmente os IFAs em seu estado neutro apresentam baixa solubilidade aquosa. Assim, para compostos ionizáveis a formação de sais utilizando ácidos e bases farmacologicamente aceitáveis é uma estratégia comum. Cerca de 50% dos fármacos são comercializados na forma de sais (KUMAR; AMIN; BANSAL, 2008). Além disso, a maioria dos IFAs possuem caráter de ácido fraco ou base fraca, o que facilita seu desenvolvimento na forma de sais, pois a limitação para a obtenção desta forma sólida é a presença de grupos ionizáveis na molécula (VON RAUMER; DANNAPPEL; HILFIKER, 2006; BLAGDEN et al., 2007). Os sais são formados quando um composto ionizado em solução formam fortes ligações iônicas com um contraíon de carga oposta e que mantém essa interação através da

cristalização resultando em moléculas sólidas carregadas (BHATTACHAR; DESCHENES; WESLEY, 2006). A atração coulômbica entre a molécula do fármaco e o contraíon muda a energia potencial do estado sólido e conduz a interações mais fortes entre o IFA carregado e os solventes polares aquosos tornando os sais farmacêuticamente atrativos. Isto leva à entrega do IFA ser mais eficiente *in vivo* por resultar em taxas de dissolução melhoradas e maior solubilidade aparente em escalas de tempo fisiologicamente relevantes (BHATTACHAR; DESCHENES; WESLEY, 2006).

Já os cocrystalis farmacêuticos são uma excelente alternativa onde qualquer IFA independentemente de grupos ácidos, básicos ou ionizáveis pode se cocrystalizar e isso os tornam uma emergente classe de formas cristalinas. Podem ser definidos como materiais cristalinos compostos por: pelo menos um IFA (não ionizado) e um ou mais formadores de cocrystalis (não ionizado) que devem ser sólidos a temperatura ambiente, mantidos juntos através de ligações não covalentes, livremente reversíveis, principalmente ligações de hidrogênio (AAKERÖY; SALMON, 2005; TRASK; MOTHERWELL; JONES, 2006; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

Os cocrystalis são atrativos devido ao grande número de cocrystalizantes existentes para um dado IFA e podem levar a melhoras físico-químicas de grande relevância clínica (SHAN; ZAWOROTKO, 2008). Eles alteram as propriedades físico-químicas dos IFAs sem comprometer sua estrutura e, portanto, sua atividade farmacológica (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009).

Para a formação de um cocrystal devem ser avaliadas algumas características em um IFA, tais como: número de grupos doadores e aceptores de ligações de hidrogênio; flexibilidade conformacional e molecular; tendência à formação de sal e solubilidade em uma variedade de solventes e mistura deles (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009; SCHULTHEISS; HENCK, 2012).

Portanto, a técnica de cocrystalização pode reintroduzir moléculas que possuem perfis farmacêuticos limitados em relação a seus grupos não ionizáveis (SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009; SCHULTHEISS; HENCK, 2012). No mercado brasileiro, já se encontra comercialmente esta forma cristalina como, por exemplo, o cocrystal lamivudina:zidovudina (1:1, mol/mol) produzido pela Indústria Química de Goiás (IQUEGO).

Todas essas definições de formas sólidas têm gerado muitas discussões entre a comunidade científica, industrial e órgãos regulatórios (BOND, 2007; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009; FDA, 2011; BERNSTEIN, 2011; AITIPAMULA et al., 2012). A proposta

mais aceita após uma grande discussão entre mais de 40 pesquisadores renomados da área de Engenharia de Cristais é a de que os IFAs devem ser abordados como sólidos monocomponente (quando constituído por uma única molécula) ou multicomponente (quando constituído por mais de um componente) (AITIPAMULA et al., 2012), como apresentado na Figura 1.

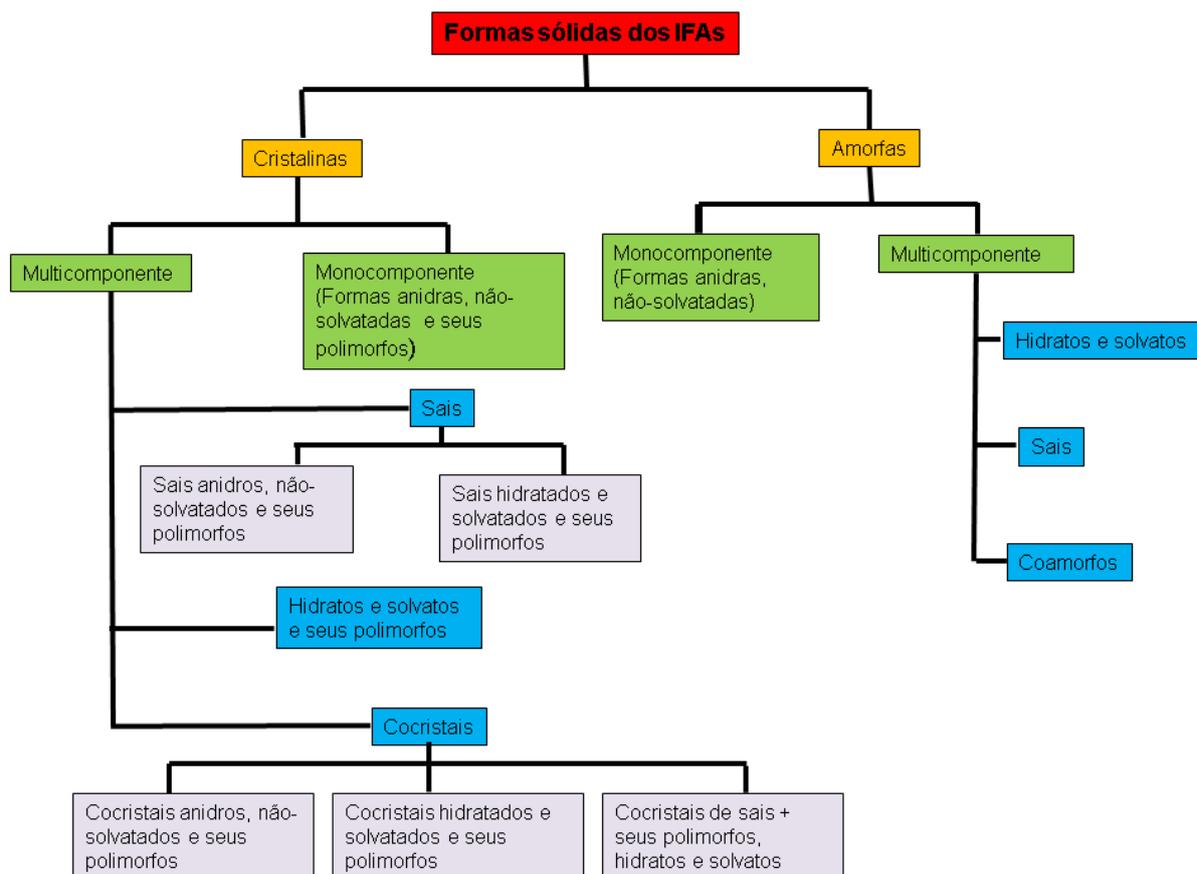


Figura 1- Esquema das formas sólidas que podem existir para um IFA.

Nota: Não estão incluídas formas não estequiométricas como dispersões poliméricas amorfas e complexos de inclusão.

Fonte: Adaptação de AITIPAMULA et al., 2012.

É importante destacar que essa divisão em monocomponente (uma única molécula ou componente, como um polimorfo anidro não-solvatado) ou multicomponente (mais de uma molécula ou componente), como os polimorfos hidratados e/ou solvatados, sais (anidros, solvatados e hidratados), cocristais (anidros, solvatados e hidratados), cocristais de sais (anidros, solvatados e hidratados) levam em consideração a composição química de um grão monocristalino ou policristalino, e não a composição química do *bulk* de um material

policristalino, que pode ser monofásico, ou uma mistura física de vários grãos policristalinos ou partículas (que pode conter vários grãos) de fases cristalinas distintas. Em um *bulk* de material policristalino pode-se ter: i) um único componente químico em mais de uma fase cristalina, quando ocorrer o fenômeno do polimorfismo; ii) mais de um componente químico em uma única fase cristalina na forma de hidratos/solvatos/sais/cocristais; e iii) finalmente duas ou mais fases cristalinas muito parecidas, mas constituídas por compostos químicos diferentes, quando ocorrer o fenômeno de isomorfismo.

Assim, ao se tratar da composição química do *bulk* de um material policristalino, ou composição cristalográfica, utilizamos os termos monofásicos (uma fase cristalina) e polifásicos (mais de uma fase cristalina).

A fase cristalina (cristalográfica) presente em um *bulk* de material policristalino monofásico pode ser constituída por uma única molécula e/ou componente (monocomponente) ou duas ou mais moléculas e/ou componentes (multicomponente). Ou seja, pode conter a forma anidra (monocomponente) de uma molécula, ou suas formas multicomponentes como um hidrato (molécula + água(s)), ou seu solvato, ou seu sal (anidro ou hidratado/solvatado) ou seu cocristal (anidro ou hidratado/solvatado).

Já um material policristalino polifásico é aquele que possui uma mistura física de duas ou mais fases cristalinas. As formas cristalinas que integram a mistura física podem ser produtos de cristalização de espécies químicas distintas (diferentes moléculas cristalizadas em suas respectivas fases cristalinas) ou de uma mesma espécie química (uma mesma molécula que cristaliza em duas fases diferentes).

Na Figura 2 é apresentado um exemplo de uma mistura física de diferentes espécies químicas, a lovastatina e o ácido paraaminobenzóico (PABA), que demonstra uma frustrada tentativa de obtenção de um cocristal de lovastatina:PABA 1:1(mol/mol) em acetonitrila, pois podemos observar que o difratograma obtido (verde) é a soma dos picos da mistura física (vermelho+azul), e não um difratograma com diferentes posições de picos, o que indicaria uma fase cristalina diferente.

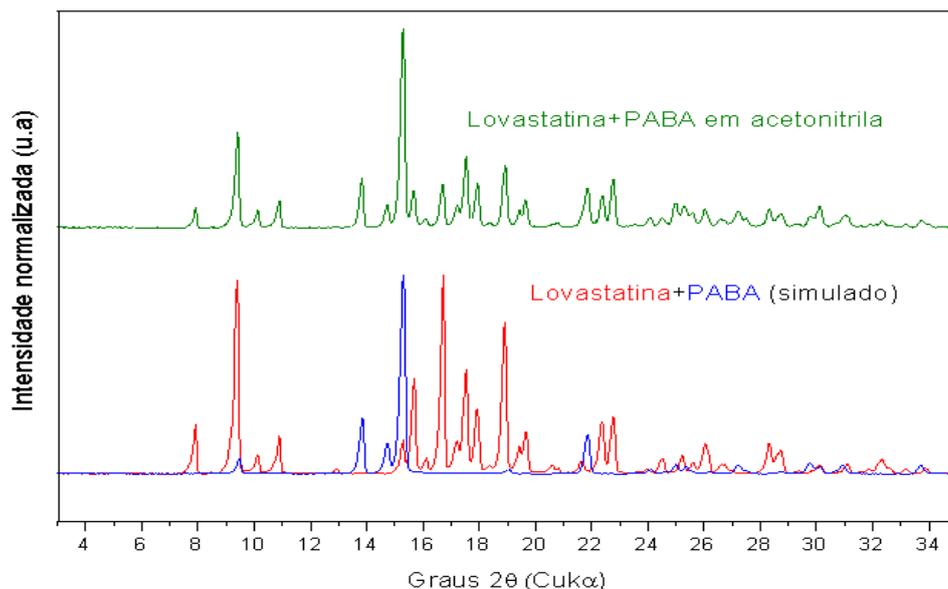


Figura 2- Difratomogramas da mistura física do IFA lovastatina e PABA (1:1, mol/mol) (vermelho + azul) e tentativa de obtenção de cocrystal lovastatina:PABA (1:1; mol/mol) (verde).
Fonte: Da autora.

Já a coexistência de polimorfos é o exemplo de uma mesma espécie química que se cristaliza em fases diferentes, fenômeno bastante reportado para IFAs na literatura (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; CIMAROSTI et al., 2010, KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010; BONFILIO et al., 2014; QIU et al., 2015).

A Figura 3, retirada do artigo de Bonfilio e colaboradores, apresenta os difratogramas de policristais gerados por matérias-primas de clortalidona (CTD) comercializadas no Brasil. A forma utilizada no medicamento referência é a forma I. Entretanto, neste estudo foram encontradas matérias-primas contendo majoritariamente forma II (muito mais solúvel) com uma pequena contaminação pela forma I, demonstrada pelo aparecimento de pequenos picos de Bragg em 12,2, 13,3, 17,65, 25,6 e 29,8° 2θ.

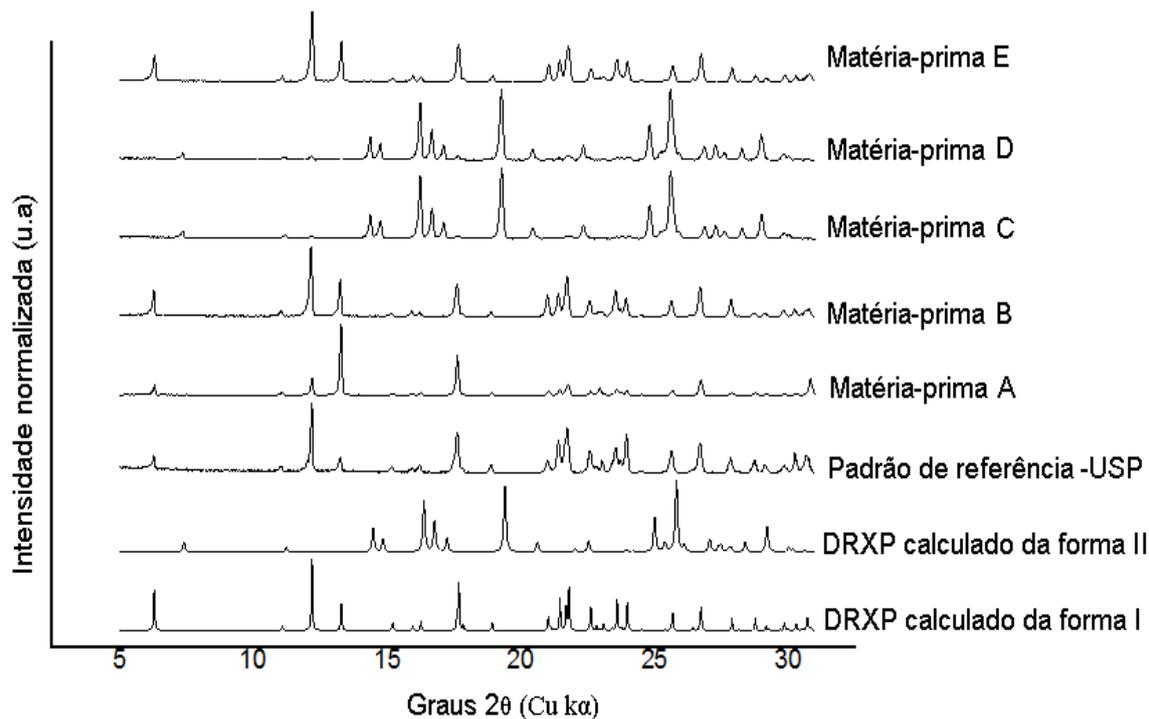


Figura 3- Picos de Bragg da clortalidona formas I e II calculados e experimentais do padrão de referência USP e de matérias-primas.

Fonte: Traduzido de BONFILIO et al., 2014.

Essas impurezas polimórficas podem ser introduzidas como resultado de uma conversão incompleta da forma metaestável para a forma estável durante o processo de cristalização na produção primária ou durante operações unitárias na produção secundária como, por exemplo, durante etapas de granulação e moagem (LI; CHOW; TAN, 2011).

Somando-se a isto, podemos ter uma fase cristalina formada por um conglomerado (enantiômeros (R e S) na mesma proporção no cristal) e mistura física de enantiômeros, além de seus solvatos/hidratos. Em ambos os casos, podemos exemplificar com o esquema da Figura 4 que apresenta as quatro formas sólidas conhecidas (denominadas I, II, III e IV) para o IFA CTD. Os blocos formados por retângulos representam a rede cristalina formada por moléculas de CTD (uma forma sólida, uma fase cristalina), sendo os retângulos azuis os enantiômeros R e os retângulos vermelhos os enantiômeros S.

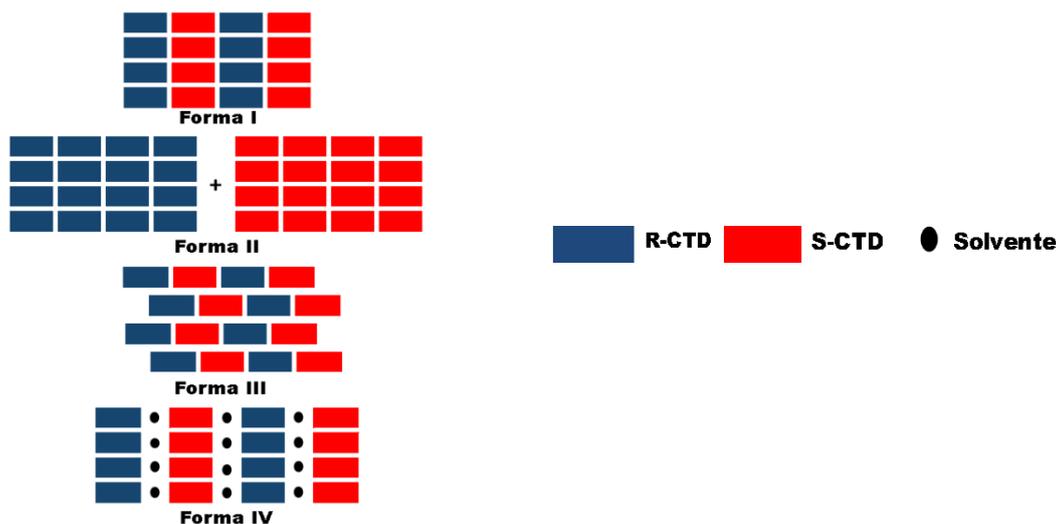


Figura 4- Representação esquemática das formas sólidas da clortalidona (CTD)

Fonte: Adaptado de BONFILIO et al., 2014.

2.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS

Como as propriedades físico-químicas dependem da forma sólida presente no IFA ou no medicamento, sua determinação estrutural, identificação e caracterização são essenciais para garantir a eficácia de uma terapia medicamentosa.

A indústria farmacêutica, além de identificar a forma cristalina no material sólido do IFA, deve garantir que a mesma esteja presente durante todo o processo de fabricação, estocagem e prazo de validade para que, assim, possa evitar diversos problemas na produção e na liberação do IFA e, com isso na ação desejada do medicamento (BYRN et al., 1995).

Várias técnicas podem ser utilizadas na identificação da forma sólida (cristalina), o que definirá o uso de uma, a ou a associação de várias técnicas é a finalidade pretendida: se é desejado ter o acesso à estrutura ou a avaliação de transformações que ocorrem durante a produção e estocagem de um IFA e/ou medicamento (NEWMAN; BYRN, 2003, AALTONEN et al., 2009).

As técnicas abordadas neste trabalho são: difração de raios X por monocristal (DRXM) e policristais (DRXP), espectroscopia na região do infravermelho (IR) e análise térmica (análise termogravimétrica (TG), análise térmica diferencial (DTA) e Calorimetria

Exploratória Diferencial (DSC)). Também serão abordadas análises de rotina para diferenciação das formas sólidas de um IFA e testes para avaliação/comparação das propriedades físico-químicas, tais como ensaios de dissolução, solubilidade e estabilidade química.

2.2.1 Difração de raios X

A difração de raios X é um fenômeno de interferência (desvio) que ocorre quando uma onda (raios X) encontra obstáculos à sua propagação tal como as bordas de uma fenda em um anteparo. Cristais funcionam como anteparos com fendas e o espalhamento dos raios X acontece quando estes raios se chocam com os elétrons dos átomos. É um dos métodos mais utilizados para se ter acesso à estrutura tridimensional de uma molécula, pois a faixa de comprimentos de onda desta radiação está na mesma dimensão dos comprimentos das ligações químicas, isto é, em angstroms (Å) (HASEGAWA, 2012).

A partir da Cristalografia, é possível distinguir os tipos de átomos, determinar a posição individual dos átomos dentro da molécula, obter os comprimentos e ângulos de ligações e ângulos de torções além de distinguir a fase cristalina de um material no estado sólido cristalino. Assim, desenvolve um papel vital em várias disciplinas como Química, Ciência dos Materiais, Farmácia e Biologia Molecular (DESCHAMPS, 2010).

Os métodos cristalográficos envolvendo raios X são divididos em difração de raios X por monocristal (DRXM) e por pó (DRXP). A Figura 5 apresenta exemplos de modelo de equipamentos utilizados em cada uma das técnicas.



Figura 5- Exemplo de modelos de difratômetros de raios X: a) e b) Difratômetro para monocristais (marca Agilent®); c) e d) Difratômetro para policristais (marca Rigaku®).
Fonte: Da autora.

Um padrão de difração único é gerado após um feixe de raios X incidir sobre um monocristal (no caso da análise de DRXM) ou sobre vários cristais micronizados de uma mesma fase cristalina (análise de DRXP). A interação dos raios X com a densidade eletrônica do composto analisado gera o padrão de difração, o qual possui uma simetria característica da organização interna dos íons e/ou moléculas na rede cristalina. Já as intensidades das reflexões trazem informações sobre a constituição química do composto.

A DRXP é a técnica mais utilizada para caracterização de produtos farmacêuticos, incluindo IFAs, excipientes, mistura de fases cristalinas, além da monitorização de transição de fase, hidratação e dessolvatação (PHADNIS; CAVATUR; SURYANARAYANAN, 1997; MAURIN et al., 2007; CRISP; DANN; BLATCHFORD, 2011; RAIJADA; CORNETT;

RANTANEN, 2012; BONFILIO et al., 2014; FANDARUFF et al., 2014; SATO; FERREIRA, 2015; QIU et al., 2015).

Para análise de DRXP, a amostra deve ser policristalina (várias partículas/grãos cristalinas micrométricas) e o fundamento consiste na satisfação das condições de Bragg ($n\lambda = 2d \sin\theta$), apresentada na Figura 6, onde λ é o comprimento de onda da radiação de raios X, e d é o espaço entre planos cristalinos paralelos individuais, gerando com isso um padrão de difração. Se as ondas refletidas pelos vários planos estiverem em fase, então ocorre um reforço do feixe ou interferência construtiva (o ângulo θ entre a radiação incidente e o conjunto de planos resulta em uma interferência construtiva quando a diferença de fase entre as ondas do raio for um número inteiro de λ). O padrão de difração de raios X por policristais é, portanto, o resultado da intensidade da difração em função dos valores 2θ (ou equivalentemente, o espaçamento (d)), que independe do comprimento de onda usado, e pode ser considerado a “impressão digital” de uma fase cristalina.

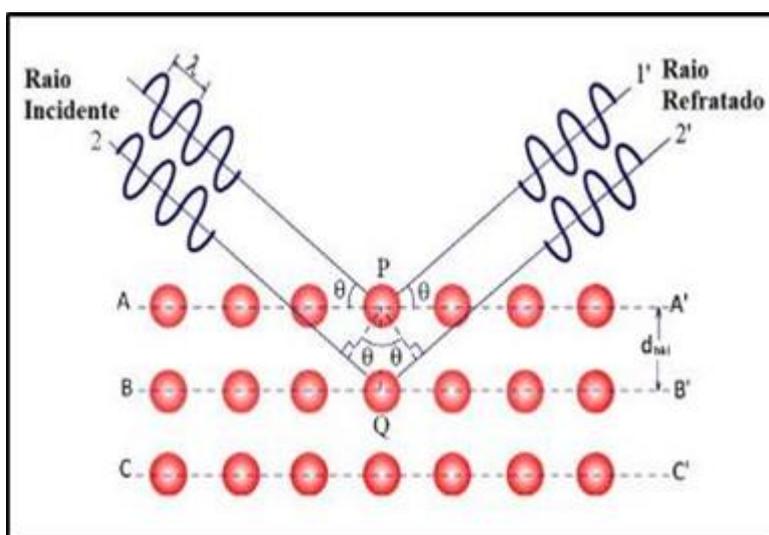


Figura 6- Representação esquemática da Lei de Bragg.
Fonte: Adaptada de EBAH, 2015.

Os valores de espaço interplanar (d) refletem as dimensões da cela unitária, definida como o menor agrupamento onde ocorre um arranjo regular e periódico de átomos ou íons. Ou seja, o número e a posição dos picos de Bragg dependem das dimensões da cela unitária e do grupo de espaço adotado. Já as intensidades são geradas de acordo com o conteúdo da cela unitária (densidade eletrônica) e a maneira com que os átomos e moléculas são arranjados dentro dela. Assim, esta técnica permite a identificação de formas sólidas de um IFA devido

às diferentes celas unitárias e ao diferente arranjo de átomos e moléculas dentro da cela, apresentando diferentes padrões de difração. Mesmo sendo cristais contendo a mesma molécula, o fato de elas se arranjam de maneira diferente no estado sólido (fases sólidas diferentes) faz com que seus respectivos padrões de DRXP sejam completamente diferentes.

Há alguns casos na DRXP, em que não é possível identificar a fase cristalina sem ambiguidade na interpretação. Essas limitações são devido à orientação preferencial, ao empacotamento cristalino e a espessura da amostra (HU et al., 2010).

A orientação preferencial ocorre quando os cristais de uma amostra policristalina não estão orientados randomicamente, isto é, a amostra não está recebendo o feixe de raios X em todos os planos de maneira equânime. Isso leva a problemas na obtenção de difratogramas de boa qualidade, reproduzíveis e representativos. Geralmente amostras com hábitos em formato de agulhas ou placas apresentam este problema que afeta o padrão de difração de pó (TENHO et al., 2007). Uma orientação randômica absoluta existe apenas em partículas esféricas. Em amostras reais a orientação preferencial está sempre presente e com isso, as intensidades medidas de difração podem apresentar diferenças. O tratamento deste problema depende da precisão das informações requeridas. Em caso de análise de rotina de identificação de fases, o problema pode ser negligenciado. Entretanto, se a análise é quantitativa e para procedimentos por refinamento de Rietveld a correção das intensidades se faz necessária (FEJDI; HOLOCSY, 2001).

Em amostras inorgânicas, o problema da orientação preferencial é normalmente resolvido com a moagem da amostra. Já em compostos orgânicos, a redução do tamanho de partícula pode tornar a amostra amorfa, solvatos podem se dessolvatar e fases metaestáveis podem se converter em uma fase termodinamicamente mais estável (STEPHENSON; FORBES; REUTZEL-EDENS, 2001).

Um modo simples de contornar este problema é substituir o porta-amostra estático do difratômetro por um rotatório (tipo capilar) e minimizar o tamanho de partícula verificando possíveis mudanças de fase (ROBERTS et al., 2002).

Considerando o empacotamento cristalino do sólido, seis parâmetros de cela (os quais determinam uma cela unitária) o descrevem: os comprimentos das arestas da célula unitária (a , b e c) e os ângulos entre as arestas (α , β e γ) (REZENDE, 2004). Na Figura 7 é demonstrado a representação de uma cela unitária e seus parâmetros de rede. Existem sete tipos fundamentais de células unitárias, as quais definem as sete classes de sistemas cristalinos: cúbico ($a = b = c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), tetragonal ($a = b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), ortorrômbico ($a \neq b$

$\neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), monoclinico ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta \neq 90^\circ$), triclinico ($a \neq b \neq c$, $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$), hexagonal ($a = b \neq c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$) e trigonal ($a = b = c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma \neq 90^\circ$) (BRITAIN, 2009).

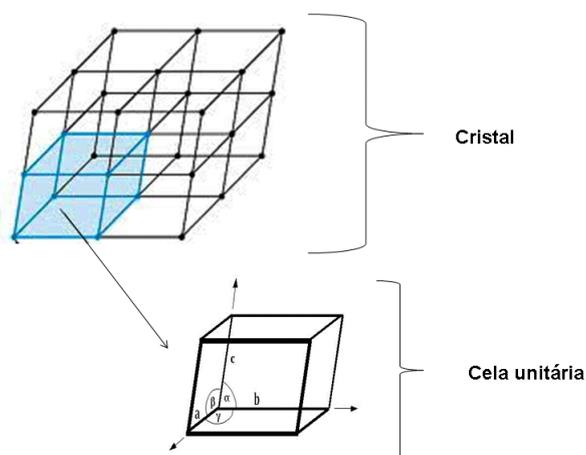


Figura 7- Representação de uma cela unitária e seus parâmetros.
Fonte: Da autora.

Alguns IFAs podem apresentar parâmetros de cela muito próximos. Solvatos dessolvatados de IFAs são compostos que sofrem dessolvatação e podem apresentar a mesma estrutura cristalina do IFA solvatado com mudanças relativamente pequenas nos parâmetros de rede e nas coordenadas atômicas. Solvatos dessolvatados tendem a ser menos ordenados que seus homólogos cristalinos. Estas formas são difíceis de caracterizar por DRXP por manterem a estrutura cristalina do IFA solvatado (BYRN et al., 1995). Essa é a mesma dificuldade encontrada para caracterizar formas cristalinas referentes a cristais isomórficos (HERBSTEIN, 2005), o que não deixa de ser o caso dos pares hidratados-anidros descritos acima.

A espessura da amostra deve ser avaliada em uma análise por DRXP, pois sua redução também pode levar sua transformação a uma fase amorfa. A técnica é excelente para a diferenciação entre um sólido cristalino e um amorfo, pois este último apresenta uma larga banda geralmente entre 2 e $20^\circ 2\theta$. Entretanto, devido à fase amorfa não possuir ordem a longo alcance, não é possível identificar a qual fase presente (BYRN, 1995).

A Figura 8 exhibe um esquema sumarizado das fases cristalinas que podem ser identificáveis ou não por DRXP.

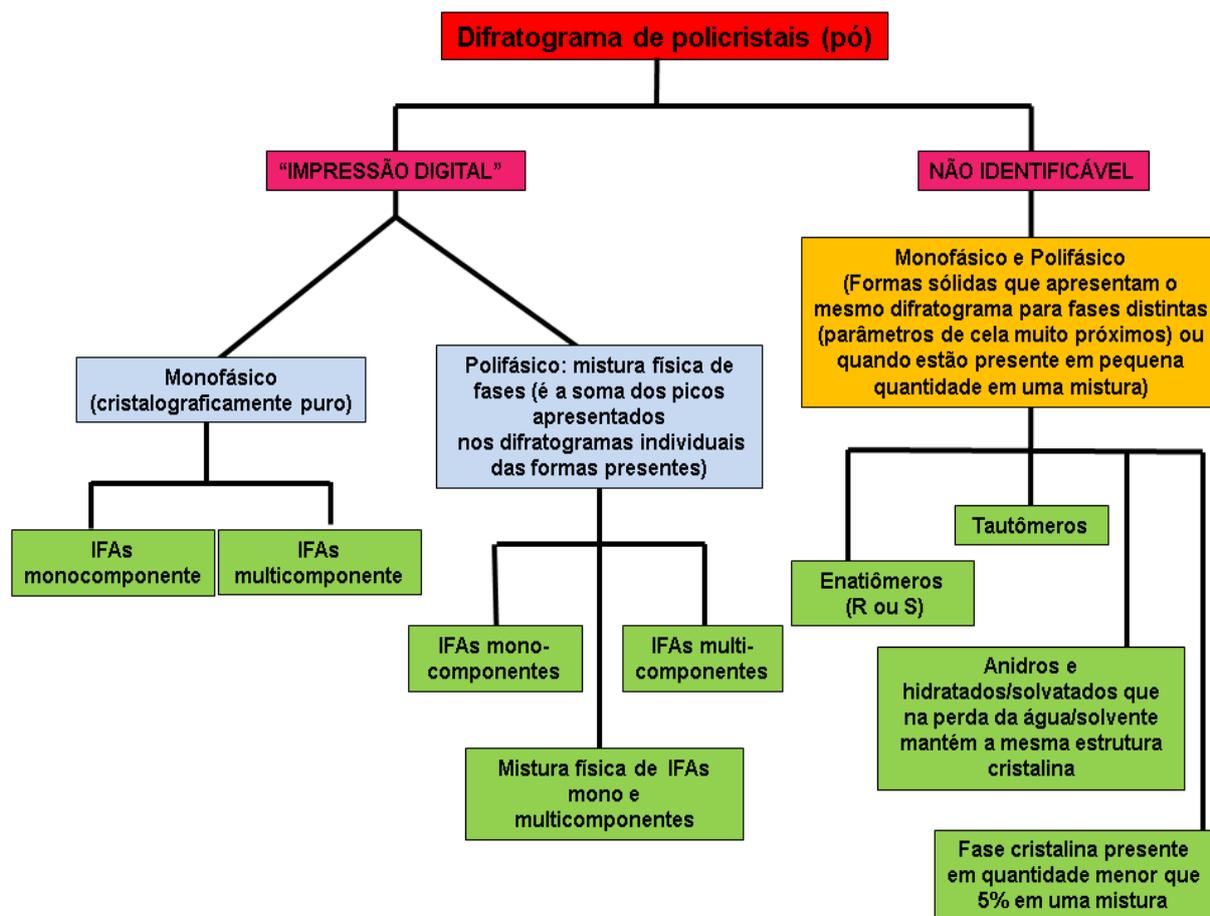


Figura 8- Esquema sumarizado de identificação e não identificação de fase cristalina por DRXP.
Fonte: Da autora.

Já a técnica de DRXM é mais empregada para determinar detalhes da estrutura cristalina e molecular de um sólido tais como comprimentos de ligações, ângulos de ligações, interações intermoleculares, etc., e é a fonte das características estruturais mais precisas (GIACOVAZZO et al., 2011).

Além do acesso às características estruturais intra e intermoleculares, os resultados da DRXM podem ser utilizados para calcular seu padrão de difração de pó, que é utilizado como um padrão de referência para identificar o material, sendo livre de impurezas e presença de outros polimorfos.

Casos não distinguíveis pela DRXP são facilmente resolvidos por DRXM visto que esta última obtém dados tridimensionais da estrutura (raios X atingem todo o cristal) enquanto a DRXP gera dados bidimensionais, uma vez que a geometria do goniômetro do equipamento não permite diferenciar no espaço recíproco as posições das reflexões equivalentes por simetria. Portanto, anidros e hidratatos/solvatos que possuem parâmetros de cela muito próximos e tautômeros são identificáveis por DRXM. Contudo, a determinação estrutural de

confômeros R e S somente é possível por DRXM se o IFA apresentar um átomo pesado em sua constituição e se cristalizar em um grupo espacial não centrossimétrico (CIANCI et al., 2005).

Em suma, as técnicas de difração de raios X possuem muitas vantagens e também algumas limitações. A grande vantagem é que são técnicas não destrutivas de amostra e geram informações geométricas precisas à níveis intra e intermoleculares. O passo mais difícil para utilização da DRXM é a obtenção da amostra monocristalina, pois necessitam de cristais não geminados e com tamanho bastante restrito (tamanho entre ~0,02 a 0,5 mm) devido a limitações instrumentais e de tratamento de dados (HASEGAWA, 2012). Assim, o que irá definir o uso da técnica de DRXP ou DRXM é o objetivo a ser alcançado. Se informações tridimensionais de uma estrutura (fase cristalina ainda desconhecida) são necessárias, a DRXM deve ser preferida, pois o processo de resolução e refinamento da estrutura são normalmente mais simples do que a DRXP. Entretanto, na identificação de IFAs cujas formas cristalinas já são conhecidas, a DRXP é mais utilizada. Em várias situações, as duas técnicas são complementares entre si e à outras técnicas como espectroscopia na região do infravermelho e análises térmicas, as quais serão, de forma resumida, descritas abaixo.

2.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) está baseada na conversão da radiação IR em vibração molecular, gerando seu espectro vibracional. A amostra é iluminada por uma fonte de luz e as moléculas absorvem radiação IR quando o momento de dipolo da molécula muda com a vibração, isto é, moléculas transitam do estado fundamental para o estado vibracional excitado. Se a molécula receber radiação eletromagnética na mesma energia de uma dessas vibrações, então a luz será absorvida. Diferentes grupos funcionais normalmente apresentam frequências de absorção bastantes características (grupo de frequências) e, assim, o espectro de FTIR é obtido de acordo com os grupos funcionais presentes na amostra (PAJANDER et al., 2013).

A região do espectro vibracional mais utilizada é a do IR médio (400 a 4000 cm^{-1}) pois os modos vibracionais desta porção representam a impressão digital do espectro vibracional da molécula em estudo (AYALA; CIESLER; CUFFINI, 2008).

Além da identificação de grupos funcionais, a técnica também é sensível a ligações intermoleculares fortes (ligação de hidrogênio) desde que apresentem efeito nas vibrações intramoleculares (AALTONEN et al., 2009). Com isso, é uma técnica bastante utilizada na diferenciação e no monitoramento de transição de fase de alguns polimorfos. Alguns exemplos dentre vários existentes são: formas I e III da carbamazepina (RUSTICHELLI et al., 2000), formas II e III do paracetamol (WANG; LIN; WEI, 2002), três formas do sulfatiazol (AALTONEN et al., 2003), formas A e B da famotidina (LIN, CHENG; WANG, 2006), formas A e C do mebendazol (AYALA; CIESLER; CUFFINI, 2008), formas I e II da clortalidona (BONFILIO et al., 2014).

As amostras sólidas para análise de sólidos por IR são possíveis com a produção de pastilhas (com brometo ou cloreto de potássio) ou a utilização de um dispositivo para refletância total atenuada (ATR). As principais vantagens do dispositivo para ATR são: as amostras não necessitam de nenhum preparo inicial; é um método não destrutivo, e, como não é utilizada nenhuma pressão sob a amostra, diferentemente da produção das pastilhas, é preferido em análises de sistemas polimórficos, pois a aplicação de pressão pode alterar a fase cristalina presente (HELMY et al., 2003; CHIENG, RADES; AALTONEN, 2011; BONFILIO e al., 2014). Na Figura 9 é apresentado um modelo de espectrofotômetro FTIR-ATR.



Figura 9- Espectrofotômetro FTIR-ATR.
Fonte: Da autora.

2.2.3 Análise térmica

O termo análise térmica refere-se a um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa de temperatura controlada (ARAÚJO et al., 2003). Essas técnicas têm sido utilizadas principalmente para identificar a faixa de fusão de diferentes formas cristalinas, transição de fase entre polimorfos induzidas por aquecimento e ter acesso a qualquer perda de massa durante o aquecimento (VARIANKAVAL; JACOB; DINH, 2000).

As mais utilizadas em Ciências Farmacêuticas para a caracterização de IFAs e excipientes são: DSC e TG/DTA. A Figura 10 apresentam modelos de equipamentos para realizar análise de DSC e TG.

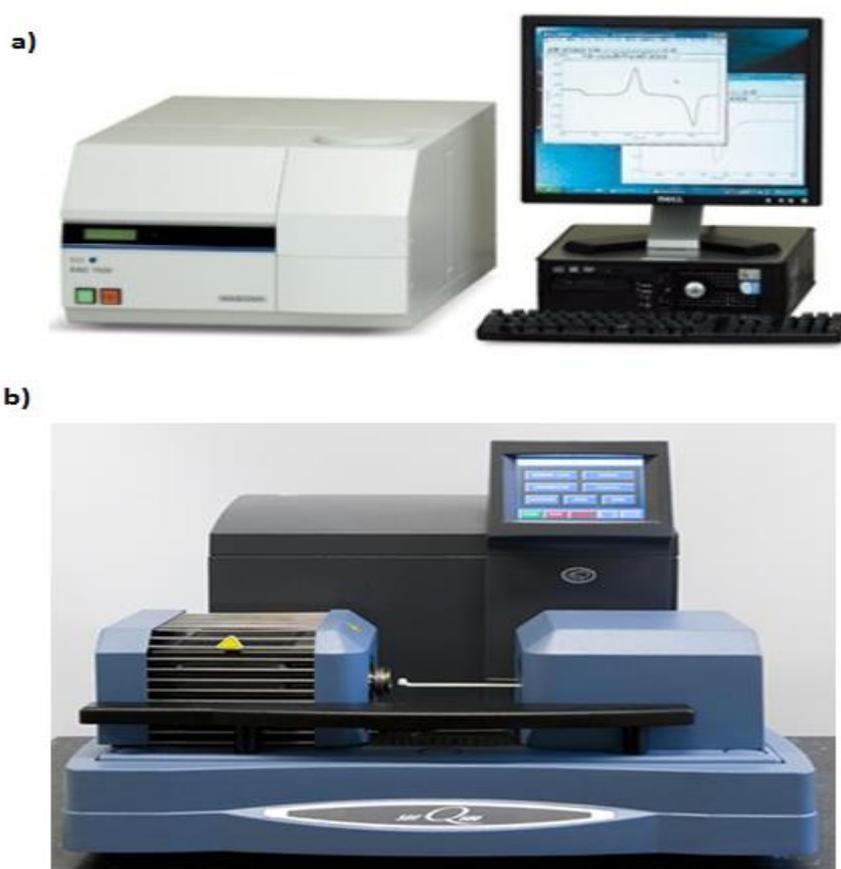


Figura 10- Termobalanças: a) Para análise de DSC (Marca: SII Nano Technologies®); b) Para análise de TG/DTA (Marca: TA Instruments®).

Fonte: Sítios eletrônicos dos fabricantes.

A técnica de DSC envolve a aplicação de aquecimento ou resfriamento para uma amostra e uma referência. Quando a amostra sofre um evento térmico, a diferença em um fluxo de aquecimento para uma amostra e para uma referência é monitorada contra o tempo ou temperatura, enquanto a temperatura é programada em uma atmosfera especificada.

Consequentemente, a temperatura e energia associada com eventos, tais como fusão, oxidação e reações de redução, transição vítrea, ebulição, sublimação, decomposição, cristalização ou transição de gel para cristal líquido podem ser avaliadas. Também podem ser analisadas possíveis interações em misturas de IFAs e excipientes em estudos de pré-formulação e de incompatibilidade física e química, quando utilizado com outras técnicas analíticas tais como IV e cromatografia líquida de alta eficiência (DANIEL et al., 2013).

Os excipientes, embora possam ser inertes no ponto de vista farmacológico, podem interagir com os IFAs em uma formulação, podendo afetar a estabilidade nos aspectos físicos (solubilidade, dissolução) ou químicos (degradação). Assim, pesquisadores da área de desenvolvimento farmacotécnico têm utilizado bastante as técnicas termoanalíticas na predição de excipientes adequados para formulação de produtos a fim de minimizar ou atenuar reações nocivas (estabilidade) que podem surgir a partir de incompatibilidades IFA-excipiente (OLIVEIRA et al., 2012; JULIO et al., 2013a; JULIO et al., 2013b; VERONEZ et al., 2014; DANIEL et al., 2013; CHADA; BANDARI, 2014).

Já a TG é uma técnica de análises térmicas na qual a mudança na massa da amostra é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a um programa de temperatura controlada. Informação adicional em relação aos efeitos de estocagem a temperaturas elevadas também pode ser obtida. Estas reações podem ou não levar à inativação do IFA na formulação (ARAÚJO et al., 2003).

Chieng, Rades e Aaltonen publicaram um artigo de revisão onde revelaram que cerca de 90% dos estudos de formas sólidas são utilizadas pelo menos duas técnicas analíticas para caracterização e estudo do estado sólido, sendo que a média foi de quatro técnicas utilizadas (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

Em suma, na pesquisa, desenvolvimento, produção e controle de qualidade de produtos farmacêuticos em geral, não faltam exemplos de como as técnicas analíticas do estado sólido têm ajudado os cientistas a melhor compreender os sólidos farmacêuticos de interesse.

2.3 ANÁLISES PARA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

As seguintes análises são realizadas para a avaliação físico-química dos IFAs e medicamentos produzidos a partir deles.

2.3.1 Solubilidade em equilíbrio

Como diferentes formas sólidas podem apresentar diferentes energias de rede (e entropia), propriedades como solubilidade e velocidades de dissolução se alteram, podendo causar grande impacto na absorção do IFA da sua forma farmacêutica (SAIFEE et al., 2009). O conceito de solubilidade implica que a solução alcançou um estado de equilíbrio quando a solução se torna saturada. A solubilidade em equilíbrio é definida como a concentração de IFA dissolvido quando há um equilíbrio entre o IFA sólido e a solução. É fator mais crítico relacionado a diferentes formas sólidas de um IFA (SNIDER; ADDICKS; OWENS, 2004).

Este teste pode ser conduzido para avaliar o efeito da estrutura cristalina, pois não é influenciado pelo tamanho de partícula nem pela “molhabilidade” (TAYLOR; ZOGRAFI, 1997). O processo de micronização aumenta a taxa de dissolução da amostra por aumentar a área superficial, entretanto ela não aumenta a solubilidade em equilíbrio (BLAGDEN et al., 2007).

O ensaio deve ser realizado em meios aquosos em uma faixa de pH de 1 a 7,5 (BRASIL, 2010). De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica, um IFA altamente solúvel é aquele que apresenta uma solubilidade maior do que a maior dose comercializada do produto farmacêutico dissolvida em 250 mL (correspondente a um copo de água) de meio aquoso contemplando toda a faixa de pH citado acima (FDA, 2000). O método mais utilizado e aceito na comunidade científica e regulatória é o de agitação em frasco (do inglês: *shake flask*) em que excesso do IFA é colocado em frascos (vials, *eppendorfs*, etc) contendo um volume fixo de meios aquosos na faixa de pH fisiológico mantidos a temperatura e agitação constantes (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008; BRASIL, 2013).

2.3.2 Teste de dissolução

O teste de dissolução é uma das ferramentas mais importantes para comparação e avaliação da performance de medicamentos, pois avalia a liberação do IFA de sua forma farmacêutica, isto é, na presença de excipientes (SANTOS et al., 2013; ISSA et al., 2013). A dissolução pode ser definida como a transferência de moléculas ou íons de um estado sólido para a solução. Os IFAs sólidos precisam ser dissolvidos para que possam ser absorvidos. Uma vez que o IFA tenha passado com êxito para o estado de solução, encontra-se disponível para ser absorvido (AULTON, 2005).

Devido à natureza crítica da liberação da forma farmacêutica e da dissolução, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo*. Com base nestas considerações, os ensaios de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata, tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações (BRASIL, 2003).

Na Figura 11 é apresentado um aparelho de dissolução (dissolutor) e os aparatos utilizados para formas farmacêuticas de liberação imediata, como comprimidos e cápsulas.

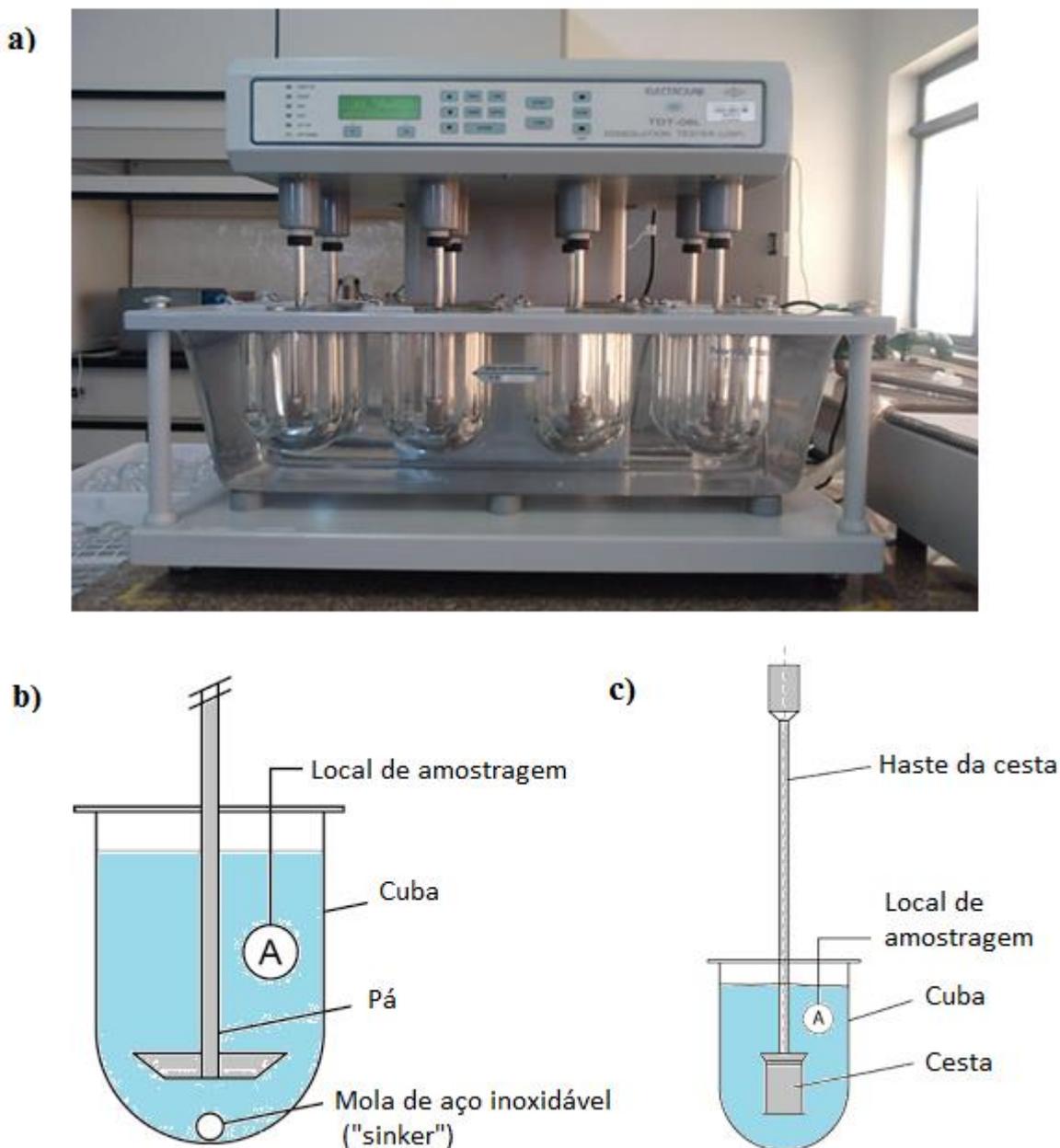


Figura 11- Aparelho de dissolução: a) dissolutor (marca Eletrolab ®); b) Aparato 1 (pá) e c) Aparato 2 (cesta).

Fonte: Da autora.

Nota: Os aparatos e as cubas não estão na mesma proporção.

Nos estudos de estabilidade, os ensaios de dissolução podem indicar mudanças que ocorrem após a fabricação de um produto farmacêutico, tais como: cristalinidade, temperatura de transição vítrea, estrutura polimérica de excipientes, polimorfismo, interação de invólucros de cápsulas e conteúdo de misturas (GRAY et al., 2009).

Para gerar um perfil de dissolução, devem-se obter, no mínimo, cinco pontos de amostragem (BRASIL, 2010). Os perfis de dissolução de produtos de liberação imediata geralmente demonstram um aumento gradual de liberação de 85 a 100% entre 30 a 45 minutos. Assim, tempos de coleta do ensaio na faixa de 15, 20, 30, 45 e 60 minutos são utilizados para a maioria dos produtos de liberação imediata. Tempos de coleta para testes farmacopeicos são, geralmente, estabelecidos com base na avaliação dos dados do perfil de dissolução (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015).

Na avaliação de efeitos de mudanças em formulações, em estudos de estabilidade, e, em estudos de equivalência farmacêutica, são construídos perfis de dissolução para posterior comparação. O método mais utilizado em comparação de perfis é o método de modelo independente, o qual compara diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida em uma unidade de tempo para os produtos teste e referência. Podem ser calculados a partir de uma simples taxa de percentual do fármaco dissolvido (tx%), a partir de uma área sob a curva (ASC) ou a partir de uma taxa de dissolução média (TDM). Porém, o mais utilizado é o método de modelo independente simples, que emprega um fator de semelhança (F2) (COSTA; LOBO, 2001). Este modelo é definido a partir da Equação 1:

$$F2 = 50 \times \log \left\{ \left[\left(1 + \frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Equação 1- Fator de semelhança (F2) para comparação de perfis de dissolução

Nota: R_t é a porcentagem do fármaco referência dissolvido em cada ponto, T_t é a porcentagem de produto teste dissolvido em cada ponto e n é o número de pontos de amostragem.

Fonte: Food and Drug Administration, 1997.

As variáveis que mostram significativa influência no ensaio de dissolução são: composição qualitativa e quantitativa dos excipientes e do(s) fármaco(s), tamanho de partícula de excipientes e do(s) fármaco(s), higroscopicidade de excipientes e do(s) fármaco(s), processo de granulação, força de compressão, polimorfismo, tipo de embalagem e condições de estoque (temperatura e umidade). Posição e método de amostragem; dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam; presença de ar ou gases; temperatura; viscosidade; filtros utilizados, surfactantes e método analítico para quantificação também podem influenciar o método (GRAY et al., 2009).

Um exemplo bastante conhecido da utilização do ensaio de dissolução para diferenciação de formas sólidas é o já mencionado caso do Norvir® (ritonavir), em que foi possível descobrir o aparecimento de um novo polimorfo (denominado forma II) mais estável

e muito pouco solúvel o qual se formou durante a fabricação (CHEMBURKAR et al., 2000; BAUER et al., 2001).

Por conseguinte, para que o ensaio seja eficiente em diferenciar as formas sólidas deve possuir poder discriminatório entre elas, isto é, o meio e as condições do ensaio devem garantir que pequenas alterações no perfil possam ser facilmente observadas (SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003).

2.3.3 Testes de estabilidade

Os testes aqui descritos, mesmo que embasados nos guias do FDA e ICH (guia Q1a (R2): STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS, 2003), são utilizados apenas com a finalidade de comparação do IFA estudado nas diferentes formas sólidas. Assim, na obtenção de uma nova forma sólida que apresente vantagens em relação à estabilidade, testes muito mais criteriosos devem ser realizados para a produção e comercialização de um medicamento com tal forma.

A estabilidade do IFA nas diferentes formas sólidas é realizada através de testes que incluem exposição à: umidade relativa, degradação forçada (para verificar a estabilidade química da molécula do IFA) e luz ultravioleta (UV), normalmente em 254 nm.

Para todos esses testes, a avaliação da estabilidade é realizada através da quantificação do IFA na forma sólida antes da exposição às condições acima descritas (tempo zero) e após a exposição (tempos definidos pelo analista). Para a quantificação das formas é necessário a utilização de um método indicador de estabilidade (normalmente por cromatografia líquida de alta eficiência) para que os resultados sejam confiáveis.

Exposição das formas sólidas de um IFA à umidade relativa é normalmente avaliada colocando uma quantidade exatamente pesada do IFA em contato com uma atmosfera de 75% de umidade relativa, que pode ser conseguida através de uma solução saturada de cloreto de sódio em um ambiente fechado à uma temperatura controlada.

O teste de degradação forçada é realizado preparando-se uma solução de cada forma sólida nas soluções de: ácido (hidrólise ácida), base (hidrólise básica), água e peróxido de hidrogênio 3% (oxidação). Essas soluções são mantidas em temperatura e agitação controladas.

A exposição à luz UV é realizada colocando uma quantidade exatamente pesada de cada forma exposta e protegida da luz em uma câmara de fotoestabilidade contendo luz UV (254 nm). Após um período determinado, amostras expostas e não expostas são quantificadas.

2.4 FÁRMACOS ESTUDADOS

Os fármacos de baixa solubilidade aquosa escolhidas para o desenvolvimento desta tese estão descritos abaixo.

2.4.1 Doxiciclina

Doxiciclina (α -6-deoxyoxytetracycline, DOX - Figura 12) é um IFA, pertencente à classe das tetraciclinas (classe IV do SCB), sendo em todo o mundo usado como antibimicrobiano de amplo espectro devido ao seu poderoso efeito contra grupos diversos de microorganismos, como por exemplo: *Legionella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, e *Borrelia Rickettsiae* (MOKABBERI; HAFTBARADARAN; RAVAKHAH, 2010).

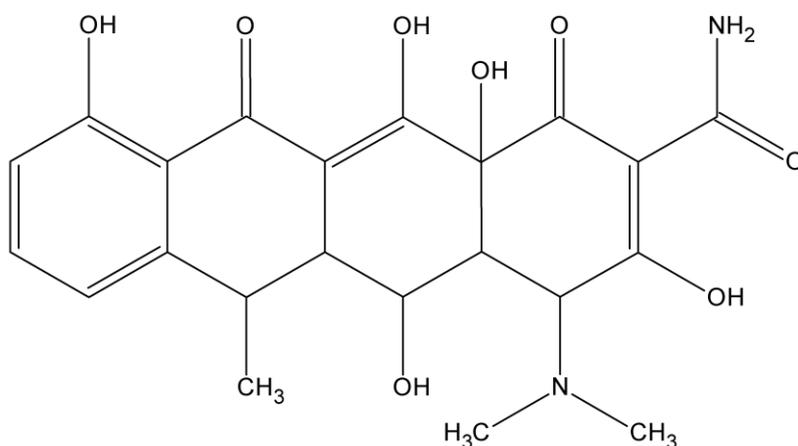


Figura 12- Estrutura química do antimicrobiano doxiciclina (DOX).
Fonte: Da autora a partir do ACD/ChemSket (Freeware)

DOX é um dos IFAs mais importantes em utilização clínica da sua classe. É empregada principalmente para o tratamento de infecções do trato respiratório e urinário, bem como na terapia de pneumonia atípica (HEIZMANN et al., 2001; MOKABBARI; HAFTBARADARAN; RAVAKHAH, 2010).

Muito embora o uso de tetraciclina tenha diminuído nas duas últimas décadas com o surgimento de novas classes de antibióticos, a importância terapêutica da DOX foi mantida devido à descoberta de novas aplicações para o tratamento de Anthrax, doença de Lyme, Plague, *P. falciparum* (malária) e da variedade de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (CUNHA, 2006).

Apesar da sua importância clínica e utilização desde 1960, apenas quatro formas cristalinas foram relatadas até o momento. O cloridrato de doxiciclina hemietanolato-hemihidrato, ou seja, hidrato de doxiciclina (DOX.HYC), e seu bromidrato isomorfo foram determinados nos anos 70 (STEZOWSKI, 1977). Mais recentemente, as estruturas cristalinas do monohidrato de doxiciclina (DOX.H₂O) e do cloridrato de doxiciclina (DOX·HCl·2H₂O) (LEGENDRE et al., 2012; HEINEMANN et al., 2013) foram relatadas. As formas cristalinas DOX.HYC e DOX.H₂O são incorporadas em formas farmacêuticas sólidas sob marcas como DORYX®, PERIOSTAT, ATRIDOX® e VIBRAMYCIN® (DOX.HYC) ou MONODOX® e ORACEA® (DOX.H₂O). Além das formas contendo a DOX, também foi determinada a estrutura do cloridrato de seu epímero anidro (β -6-deoxyoxytetracycline) (BORDNER, 1979).

É bem conhecido que as formas cristalinas de um mesmo IFA podem ter diferentes propriedades no estado sólido (BABU; NANGIA, 2011; MARTIN et al., 2013). É importante ressaltar que a estrutura cristalina do DOX.HCl.2H₂O permaneceu desconhecida até março de 2013, quando foi relatada por Heinemann e colaboradores (HEINEMANN et al., 2013).

2.4.2 Orbifloxacino

Fluorquinolonas são uma classe de antimicrobianos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária (IRKHE; PAPICH, DEMANULELLE, 1999; DUDHATRA et al., 2013). Este grupo de agentes antimicrobianos possui vantagens significativas como efeito bactericida contra uma ampla faixa de patógenos veterinários como bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, certas espécies de *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pasteurella*, *Proteus*,

Salmonella, *Pseudomonas*) e algumas bactérias Gram-positivas tais como *Staphylococcus* spp., *Chlamydia*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma* and *Ureaplasma* spp (ALBARELLOS; LANDONI, 2009; DUDHATRA et al., 2013).

Orbifloxacino (ORBI), 1-Cyclopropyl-7-[(3s,5r)-3,5-dimethylpiperazin-1-yl]-5,6,8-trifluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid, Figura 13, é uma fluorquinolona sintética de terceira geração que foi desenvolvida exclusivamente para o tratamento de infecções respiratórias e gastrointestinais em animais (IHRKE; PAPICH; DEMANULELLE, 1999; REYNOLDS, 2007; GOUDAH; ABO-EL-SOUD, 2008).

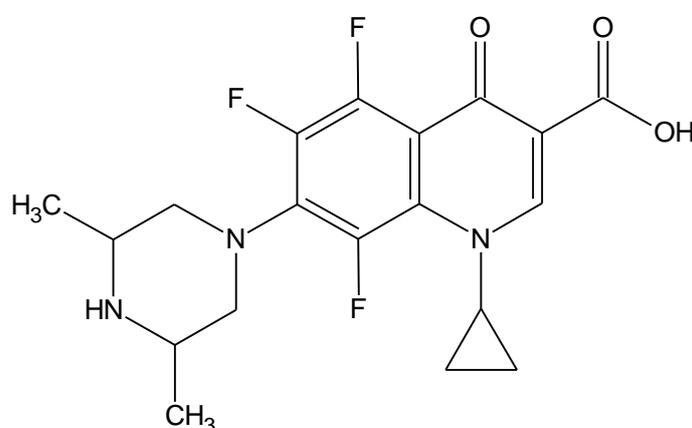


Figura 13- Estrutura química do antimicrobiano orbifloxacino.
Fonte: Da autora a partir do ACD/ChemSket (Freeware).

De acordo com o Index Merck, o ORBI é um pó cristalino levemente amarelado, facilmente solúvel em água, solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em etanol, éter, acetato de etila e clorofórmio (O'NEIL, 2006). Entretanto, nas Farmacopeias Britânicas e Americana, o ORBI aparece como cristais brancos ou pó cristalino amarelo pálido, muito pouco solúvel em água, solúvel em ácido acético glacial e praticamente insolúvel em etanol anidro (BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015).

Estes termos se referem aos dados de solubilidade obtidos nas temperaturas entre 15 e 25 °C. Livremente solúvel (Index Merck), significa que 1 grama (g) da substância é solúvel entre 1 e 10 mililitros (mL) de solvente, ou, ter solubilidade entre 0,1 e 1 miligrama (mg) por mL de solvente. Por outro lado, muito pouco solúvel significa que 1 g da substância é solúvel entre 1000 e 10000 mL de solvente, isto é, ter a solubilidade entre 0,0001 mg e 0,001 mg por mL de solvente (BRITISH PHARMACOPEIA, 2011; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2015).

Assim, estas solubilidades controversas descritas para o ORBI podem estar associadas a mudanças do estado sólido cristalino, pois em ambas as literaturas estão reportadas a existência de polimorfismo para este IFA.

Assim, essas diferentes solubilidades reportadas para o ORBI podem ter sido geradas por uma advertida análise de diferentes polimorfos, pois é bem conhecido que diferentes formas sólidas de um mesmo IFA podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas (AGUIAR et al., 1960; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011). As diferentes interações intermoleculares entre as diversas formas sólidas existentes de um IFA podem gerar diferentes propriedades físico-químicas, sendo a solubilidade a mais crítica, pois pode afetar a biodisponibilidade e comprometer a formulação de um produto bioequivalente (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

A *Food and Drug Administration* (FDA) e a *International Conference on Harmonization* (ICH) requerem que se realize uma varredura preliminar e exaustiva para identificar e caracterizar todos os polimorfos de cada fármaco para evitar esses problemas (ICH, 1999; FDA, 2007).

Portanto, devido ao fenômeno de polimorfismo ocorrer para o ORBI, é muito importante ter acesso às estruturas cristalinas de diferentes polimorfos e estudar se existem diferenças em suas solubilidades e outras propriedades. Estes estudos podem evitar problemas como toxicidade ou ineficácia terapêutica (BONFILIO et al., 2014; SANTOS et al., 2014a).

O primeiro passo é a identificação de diferentes polimorfos. As técnicas de difração de raios X de monocristais e policristais são as ferramentas comumente utilizadas para estudar e caracterizar polimorfos em sólidos farmacêuticos porque elas fornecem prova inequívoca da existência de polimorfismo (FDA, 2007). Seguindo a linha de pesquisa do grupo de Cristalografia da UNIFAL-MG em reportar estruturas cristalinas de IFAs (SANTOS et al., 2014b; MARTINS et al., 2009a; MARTINS et al., 2009b; MARTINS; DORIGUETTO; ELLENA, 2010; MARTINS et al., 2010; MARTINS et al., 2011; LEGENDRE et al., 2012; MARTINS et al., 2012; ELLENA et al., 2012; MARTINS et al., 2013), nós relatamos aqui pela primeira vez duas estruturas cristalinas de ORBI. A primeira estrutura cristalina determinada por difração de raios X por monocristal mostra que a molécula de ORBI está em uma forma zwitteriônica no estado sólido. Uma vez que o cristal é um hemihidrato, esta estrutura de ORBI foi denominada de ORBI hemihidrato, a qual foi caracterizada por meio de análise térmica (TG / DTA), espectroscopia de infravermelho e de difração de raios X por

policristais. Uma segunda forma cristalina, a forma anidra de ORBI obtida a partir da forma hemihidratada por meio de aquecimento, também foi relatada. As transformações de fase no estado sólido entre as formas ORBI anidro e hemihidrato, perante à umidade e aquecimento, foram apresentadas. A solubilidade de equilíbrio das formas anidras e hemihidratada de ORBI foram comparadas após 48 horas (a 150 rpm e 25 ° C), em uma faixa de pH fisiológico (~ 1 a 7,5), para avaliar o impacto das diferenças em suas estruturas cristalinas na solubilidade.

2.4.3 Carvedilol

O Carvedilol (\pm 1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-[[2(2 -methoxyphenoxy)ethyl] amino]-2-propanol), fórmula química $C_{24}H_{26}N_2O_4$ (Figura 14) é um IFA bloqueador não seletivo dos receptores β adrenérgicos (β_1 e β_2), que antagoniza competitivamente as respostas a catecolaminas, com atividade também no bloqueio do receptor α_1 (KAYE et al., 2001). É utilizado como anti-hipertensivo e no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, demonstrando uma maior eficiência que β -bloqueadores seletivos, tais como o metoprolol, na sobrevida de pacientes com falência cardíaca (BOZKURT et al., 2012).

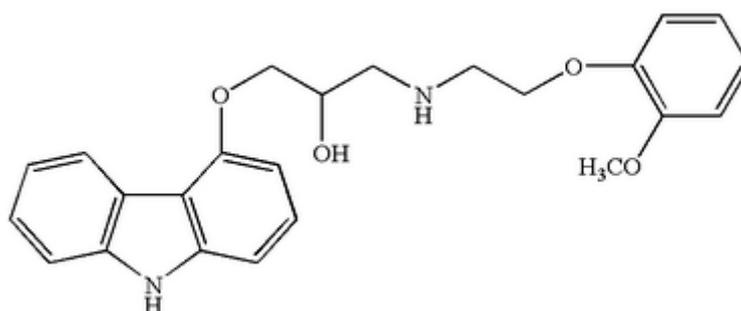


Figura 14- Estrutura química do anti-hipertensivo carvedilol.

Fonte: Da autora a partir de ACD/ChemSket (Freeware).

Nota: A maioria dos hidrogênios foi omitida da figura para melhor visualização.

A propriedade anti-hipertensiva do carvedilol é acrescida pela vasodilatação endotélio-dependente devido à supressão de endotelina pelo aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) circulante (AFONSO et al., 2006).

Esse IFA apresenta um centro quiral possuindo dois estereoisômeros, sendo a atividade β -adrenérgica não seletiva presente no enantiômero S(-), e a atividade α -bloqueadora presente em ambos os R(+) e S(-) enantiômeros, com igual potência. O medicamento referência (COREG[®]) é comercializado na forma racêmica (HILDESHEIM et al., 2006; SHAH et al., 2011).

Existem várias formas sólidas conhecidas do carvedilol, inclusive com depósitos de estruturas no CSD, sendo três anidras (Formas I, II e III) uma hidratada, um sal hidratado (fosfato de carvedilol hemidratado) e um sal solvatado (fosfato de carvedilol isopropanol solvato). Os principais dados cristalográficos reportados para essas fases são apresentados na Tabela 1.

Trata-se de um IFA da classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (baixa solubilidade e alta permeabilidade), em que a taxa de absorção é limitada pela sua dissolução (HAMED et al., 2015). Portanto, a presença inadvertida de uma forma sólida diferente da preconizada em função dos ensaios farmacocinéticos realizados durante o desenvolvimento do medicamento, pode resultar em diferenças de solubilidade e velocidade de dissolução, o que provavelmente afetaria sua biodisponibilidade. Assim, esta parte do trabalho de doutorado teve como objetivo a obtenção de novas formas sólidas do carvedilol, para futura avaliação de suas propriedades físico-químicas a fim de verificar se é possível melhorar sua solubilidade.

Tabela 1- Dados cristalográficos das formas sólidas conhecidas para o IFA carvedilol

Forma sólida	Forma I ^a	Forma II ^b	Forma III ^{c*}	Hemidrato ^d	Fosfato hidratado (Racêmico) ^e	Fosfato hidratado (R) ^f	Fosfato isopropanol solvato ^g
Fórmula molecular	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₄ .0.5H ₂ O	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₄ ⁺ , H ₂ O ₄ P ⁻ , 0.5(H ₂ O)	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₄ ⁺ , H ₂ O ₄ P ⁻ , 0.5(H ₂ O)	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₄ ⁺ , C ₃ H ₈ O, H ₂ O ₄ P ⁻
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico
Código CSD	GIVJUQ	GIVJUQ01	-	UVOHET	XOZJOM01	QUPSAW	PUJTOE
Grupo espacial	<i>P2₁/c</i>	<i>P2₁/c</i>	<i>P2₁/n</i>	<i>P2₁/n</i>	<i>C2/c</i>	<i>C2</i>	<i>P1</i> a= 11,552(1)
Parâmetros de cela unitária (a,b,c=Å)	a= 9,094(1) b=12,754(1)	a= 15,541(1) b= 15,205(1)	a= 11,2908(3) b= 12,2293(3)	a= 13,550(3) b= 16,780(3)	a= 26,662(<1) b= 12,221(<1)	a= 26,768(<1) b= 12,243(<1)	b= 16,652(1) c=7,864(<1)
(α,β,γ= °)	c= 18,330(2) β= 97,36	c= 9,117 (<1) β= 100,73	c= 14,9933(4) β= 91,389	c= 19,150(4) β=94,160	c= 16,318(<1) β= 107,62	c=16,279(<1) β= 108,15	α= 95,40(1) β= 94,64(1) γ=71,25(1)
Fator R (%)	3,68	4,03	4,20	5,39	10,39	3,53	5,1
Volume da cela (Å³)	2108,486	2116,835	2069,65	4341,516	5067,736	5069,327	1424,057
Z	4	4	4	4	8	8	2

Fonte: ^aChen et al., 1998; ^bYathirajan et al., 2007; ^cPrado et al., 2014, *dados ainda não disponíveis no CSD; ^dDiaz et al., 2011; ^{ef}Vogt, et al., 2010; ^gChernyshev; Kukushkin; Velikodny, 2010.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de novas formas sólidas dos IFAs de baixa solubilidade aquosa: doxiciclina, orbifloxacino e carvedilol, bem como a avaliação de suas propriedades físico-químicas. A partir dos resultados obtidos, foram propostas novas formas sólidas (cristalinas) que apresentem vantagens em relação às já existentes ou propor técnicas e parâmetros que devem ser utilizados na identificação das formas cristalinas que apresentam propriedades não desejáveis, evitando-se assim, que possam ocorrer problemas com a biodisponibilidade dos IFAs estudados.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para o fármaco doxiciclina (DOX) os objetivos foram: i) obter material cristalino monofásico de cinco de suas formas sólidas, a saber, o hclato de DOX (STEZOWSKI, 1977), a DOX mohidratada (LEGENDRE et al., 2012), o cloridrato de DOX dihidratado (HEINEMANN et al., 2013), o nitrato de DOX hemihidratado (MARTELLI-SILVA, 2011) e o acetato de DOX dihidratado (MARTELLI-SILVA, 2011) em quantidade suficiente para a realização dos ensaios propostos; ii) determinar para as cinco formas, suas solubilidades aquosa, perfis de dissolução e outras análises físico-químicas visando compará-las com as suas estruturas cristalinas. É importante enfatizar que, para a DOX, também era objetivo desse trabalho, determinar a estrutura do seu sal cloridrato, cuja estrutura era inédita no momento da concepção do projeto. Contudo, a originalidade desse objetivo específico foi perdida no decurso desse trabalho de doutorado iniciado em 2012, com a publicação dessa estrutura em 2013 por Heinemann e colaboradores (HEINEMANN et al., 2013).

Já para o fármaco orbifloxacino (ORBI) os objetivos foram: i) determinar a estrutura cristalina da forma comercial desse IFA, uma vez que nenhuma forma cristalina do mesmo era conhecida até o presente momento, e de outras formas que pudessem eventualmente ser cristalinas no decurso desse trabalho; ii) determinar a solubilidade, o perfil de dissolução e estabilidade das formas obtidas e correlaciona-las com as estruturas determinadas; iii)

verificar se a controversa entre as farmacopeias (Britânica e Americana) e o Index Merck é decorrente do fenômeno de polimorfismo para esse IFA.

E por último, com o fármaco carvedilol, buscou-se obter e caracterizar novos sais para, realizar a comparação de suas propriedades com as formas já descritas na literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos foram elencados de acordo com os fármacos estudados para melhor entendimento.

4.1 DOXICICLINA

Sugere-se como leitura alternativa e, ou, complementar aos subitens de 4.1, o artigo publicado, a partir dos resultados aqui apresentados, intitulado *Protonation Pattern, Tautomerism, Conformerism, and Physicochemical Analysis in New Crystal Forms of the Antibiotic Doxycycline*: Cryst. Growth Des. 2014, 14, 3711–3726. DOI: [dx.doi.org/10.1021/cg500877z](https://doi.org/10.1021/cg500877z).

4.1.2 Obtenção dos cristais das diferentes formas sólidas da doxiciclina

A matéria-prima hiclato de doxiciclina (DOX.HYC) foi comprada da Fagron (SM Empreendimentos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, SP), fabricada por Kunshan Chemical and Pharmaceutical Co. Ltda, Jiangsu, China, Lote: 1204083#2, validade: 03/2016, teor 99,9%.

O material cristalino de DOX.HYC usado nos estudos comparativos foi o da matéria-prima da Fagron (como recebido). O material cristalino da DOX mohidratada (DOX.H₂O) foi preparado de acordo com o procedimento segundo Legendre et al. (2012): 5g de DOX.HYC foram dissolvidos em água destilada (200 ml) e a solução foi neutralizada por adição gota a gota com uma solução aquosa de hidróxido de sódio à 1 mol.L⁻¹. Para preparar as novas

formas cristalinas descritas neste estudo, uma quantidade de DOX.H₂O foi adicionada, à temperatura ambiente, até a observação de excedente de material sólido não dissolvido (saturação), em soluções aquosas de ácido clorídrico ou ácido nítrico, ambos 6 mol.L⁻¹. Tal procedimento levou à imediata precipitação dos sais hidratados de DOX com os ânions nitrato (DOX. HNO₃.0,5H₂O) e cloreto (DOX.HCl.2H₂O). Já para a obtenção do DOX.HAc.2H₂O, uma solução saturada de DOX.H₂O foi preparada sob agitação magnética em uma solução de água:ácido acético glacial (1:1,v/v). Em seguida, a suspensão foi filtrada através de um filtro de 0,45 µm (Millipore) e o filtrado foi deixado em repouso no escuro durante 4 dias.

Monocristais de dimensões adequadas do DOX.HCl.2H₂O foram selecionados para a análise de difração de raios X por monocristal, realizada no LABCRI-UFMG. Os cristais remanescentes, incluindo aqueles obtidos para DOX. HNO₃.0,5H₂O, DOX.HAc.2H₂O, DOX.H₂O e DOX.HYC, foram tamisados através de uma malha de aço inoxidável e a fração de tamanho entre 106 µm (malha 150) e 75 µm (200 mesh) foi selecionada para os estudos posteriores de caracterização, solubilidade e estabilidade.

4.1.3 Determinação estrutural por difração de raios X por monocristal (DRXM)

Um monocristal do DOX.HCl.2H₂O adequado para uma medida de DRXM foi selecionado. A coleta de dados foi realizada à temperatura ambiente em um difratômetro de monocristal Gemini A-Ultra equipado com um detector Atlas CCD usando radiação monocromática (K α) do (Cu). Foram utilizados os programas CrysAlis CCD e CrysAlis Red para coleta de dados, refinamento da cela e redução de dados (CRYALIS, 2006). A estrutura foi resolvida por métodos diretos usando o software SHELXS-2013 e refinada por mínimos quadrados de matriz completa em F², usando o software SHELXL-2013 (SHELDRICK, 2008). Todos os átomos não-hidrogenóides foram refinados com parâmetros térmicos anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio de água foram atribuídos a partir do mapa de densidade eletrônica residual.

O pacote de softwares WinGX foi utilizado para o tratamento dos dados cristalográficos (FARRUGIA, 1999). Os softwares ORTEP-3 e MERCURY (FARRUGIA, 1997; MACRAE et al., 2008) foram utilizados para a análise e criação das representações gráficas das estruturas cristalográficas.

As medidas experimentais para determinar a estrutura das formas DOX.HAc.2H₂O e DOX.HNO₃.0,5H₂O foram semelhantes à descrita acima para a DOX.HCl.2H₂O e são detalhadas no trabalho de mestrado precursor, desenvolvido por Martelli-Silva (2011).

Os arquivos de informação cristalográficas (CIF's) das estruturas reportadas, utilizadas para identificação das formas neste trabalho estão depositados no "Cambridge Crystallographic Data Centre" (CCDC) sob os códigos de depósito CCDC 974379, 974380 e 974381, para DOX.HAc.2H₂O, DOX.HNO₃.0,5H₂O, e DOX.HCl.2H₂O, respectivamente. Cópias desses arquivos podem ser recuperadas de forma gratuita no sítio www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures.

4.1.4 Difração de raios X por policristais (DRXP)

Os dados de DRXP foram coletados à temperatura do ambiente (293 K), utilizando um difratômetro com geometria θ -2 θ da marca Rigaku, modelo Última IV do tipo III, no Laboratório de Cristalografia da UNIFAL-MG. A radiação CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) foi gerada em tubo selado energizado a 40 kV e 30 mA. Os dados foram coletados com passo em 2 θ de 0,02° e tempo de contagem de 1° 2 θ min⁻¹ no intervalo angular de 3 a 35° 2 θ . As amostras foram finamente trituradas e montadas no porta-amostras do tipo lâmina do equipamento. Os difratogramas de raios X por policristais experimentais foram comparados com os teóricos obtidos por simulação com o software MERCURY a partir dos arquivos CIF finais das cinco fases cristalinas da DOX estudadas nesse trabalho (MACRAE et al., 2008).

4.1.5 Análise térmica

Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram efetuadas em um calorímetro DSC (modelo DSC7020, SII Nano Technologies, Japão), utilizando cadinhos de alumínio herméticos para as amostras e a referência, utilizando cerca de 3 mg de material, sob atmosfera de N₂ à 50 mL.min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. Curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em uma termobalança (modelo TG / DTA7300, SII

Nano Technologies, Japão), nas seguintes condições: cadinhos de alumínio aberto, taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, fluxo de nitrogênio à $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e cerca de 4 mg de amostra. Ambas as análises foram realizadas no LACFAR-UNIFAL-MG.

4.1.6 Análise na região do infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Espectros de FTIR-ATR foram obtidos usando um espectrofotômetro na região do infravermelho Afinity-1 por transformada de Fourier (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a um acessório de amostragem com refletância total atenuada por cristal de ZnSe (Pike TM Technologies, Madison, EUA). Os espectros foram registrados à temperatura ambiente no intervalo de $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Depois de registrar um “branco”, as amostras foram colocadas sobre o cristal. Para cada amostra, 32 varreduras foram gravadas com resolução de 4 cm^{-1} . As análises de FTIR-ATR foram realizadas no laboratório NCQ-UNIFAL-MG.

4.1.7 Solubilidade em equilíbrio

Triplicatas de cada uma das cinco formas sólidas de DOX estudadas nesse trabalho foram adicionadas em excesso em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL dos seguintes solventes: água ultrapura, ácido clorídrico $0,01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido clorídrico $0,1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão acetato $0,050\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 4,5, tampão fosfato de potássio $0,054\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5,8, tampão fosfato de potássio $0,072\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,8 e tampão fosfato de potássio $0,088\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,5. Posteriormente, os tubos foram agitados à 150 rpm à temperatura ambiente ($25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), protegido da luz sobre uma mesa shaker modelo Solab[®] SL 180 DT (São Paulo, Brasil). Após 48 h de agitação, as amostras foram filtradas em filtro de PTFE hidrofílico (13 mm de diâmetro, $0,50\text{ }\mu\text{m}$ de porosidade, Advantec[®] MSF, CA, EUA). As soluções foram diluídas em água quando necessário e os pH's finais das soluções foram aferidos. Os testes de solubilidade foram realizados no laboratório NCQ-UNIFAL-MG.

Os materiais sólidos não dissolvidos foram levados para um dessecador contendo sílica para secar e deixados por cinco dias. Após esse período os sólidos policristalinos foram

analisados por DRXP para verificar se o material resultante era o mesmo que o de partida (antes do processo de dissolução).

4.1.7.1 Quantificação de DOX nos ensaios de solubilidade e perfil de dissolução

A quantificação de DOX em cada solvente foi realizada em um espectrofotômetro UV-VIS, modelo 1800, da marca Shimadzu® (Kyoto, Japão) com o software Shimadzu UVProbe 3.9. Após uma varredura espectral de soluções das formas em água (concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) na faixa de 200 a 400 nm, os comprimentos de onda escolhidos para quantificação foram 268 nm para a DOX.H₂O e 274 nm para as demais formas (Figura 15).

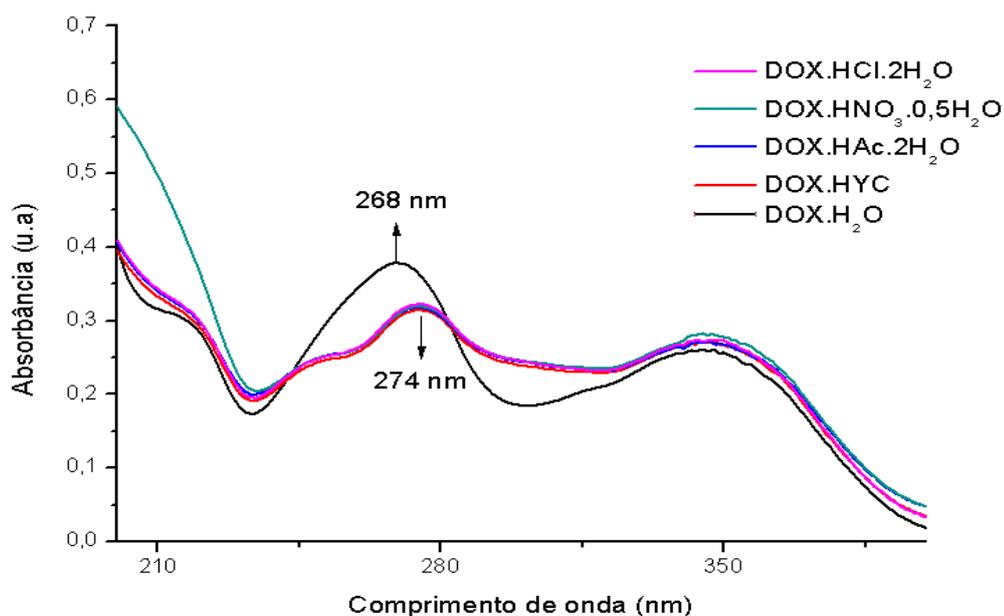


Figura 15- Varredura espectral na faixa de 200 nm a 400 nm das formas sólidas de DOX em água.
Fonte: Traduzido de SANTOS et al., 2014b.

As curvas de calibração foram preparadas a partir de uma solução estoque de cada forma de DOX em água destilada a seis níveis de concentração em cinco repetições (7, 10, 15, 20, 25 e $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A DOX.H₂O foi previamente solubilizada em HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, seguida por diluição em água destilada.

4.1.8 Estudos de estabilidade das formas sólidas de DOX

Estudos de estabilidade foram realizados para comparar a estabilidade de formas DOX de acordo com o guia da Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2003).

4.1.8.1 Quantificação de DOX nos ensaios de estabilidade

A metodologia utilizada na quantificação de todas as amostras submetidas à degradação foi um método indicador de estabilidade descrito por Skúlason, Ingólfsson e Kristmundsdóttir (SKÚLASON; INGÓLFSSON; KRISTMUNDSDÓTTIR, 2003). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando um cromatógrafo a líquido de alta eficiência, Shimadzu, modelo LC-10A (Kyoto, Japão). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Shim-pack CLC-ODS (250 mm x 4,6 mm d.i, 5,0 μm) da marca Shimadzu (Kyoto, Japão), fase móvel: água: acetonitrila: ácido perclórico (74:26: 0,25 v/v/v) com pH da fase aquosa (água: ácido perclórico) ajustado para 2,5 com NaOH 5 mol. L⁻¹, temperatura de 25°C, vazão de 1 mL.min⁻¹ e detecção por UV a 350 nm. Vinte microlitros da amostra foram injetados no cromatógrafo a líquido.

As curvas de calibração foram preparadas a partir de uma solução de estoque de cada forma de DOX em fase móvel a cinco níveis de concentração em triplicata (10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As áreas do pico de concentração *versus* dados foram analisadas por regressão linear dos mínimos quadrados. A equação de regressão foi usada para quantificação de DOX forma nos estudos de degradação forçada.

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório NCQ-UNIFAL-MG.

4.1.8.2 Estudos de oxidação, degradação ácida, básica e neutra da DOX nas formas sólidas

Todas as formas de DOX foram preparadas a uma concentração de $400,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em cada um dos seguintes meios de estresse: peróxido de hidrogênio 1%, HCl $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaOH $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e água mantidos a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa durante 12 horas. Os brancos das soluções foram feitos de forma semelhante. Estas soluções foram neutralizadas e diluídas com a fase móvel para obter uma solução com uma concentração de $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, que foram filtradas através de um filtro de membrana de PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, Bedford, EUA) antes da injeção no cromatógrafo a líquido (ver seção 4.1.8.1).

4.1.8.3 Fotoestabilidade das formas sólidas da DOX

Para os estudos de fotoestabilidade, 100 mg de cada uma das formas de DOX foram expostas à luz ultravioleta durante sete dias para avaliar os efeitos da irradiação da luz sobre a estabilidade das formas. Após o teste, 10 mg de cada forma foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL. Cerca de 20 mL da fase móvel foram adicionados e sonificados durante 5 minutos. O volume foi completado com a fase móvel e uma diluição adicional de 1 mL foi realizada a 10 mL balão volumétrico, obtendo-se uma concentração final de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções obtidas foram filtradas através de um filtro de membrana de PTFE de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, Bedford, EUA) e injetadas no cromatógrafo a líquido. Análises por DRXP das amostras foram realizadas antes e após a exposição à luz UV.

4.1.9 Formulação das cápsulas de DOX

Lotes de 30 cápsulas de cada forma de DOX foram preparados como se segue: 100 mg de cada forma de DOX foram adicionados a 50 mg de ingredientes inativos (também chamados excipientes). Estas substâncias foram misturadas por agitação vigorosa e os lotes foram obtidos enchendo-se manualmente cápsulas duras de gelatina de tamanho 4, com a mistura (IFA + excipientes). A mistura de excipientes foi obtida com os seguintes ingredientes inativos: estearato de magnésio (0,8%), dióxido de silício coloidal (0,2%), amido glicolato de sódio (4,0%), celulose microcristalina (95,0%). Esta formulação contém os

mesmos excipientes encontrados nas cápsulas comerciais de DOX.H₂O da Indústria Farmacêutica Ranbaxy[®]. Entretanto, a proporção dos excipientes foi calculada de acordo com a proporção média utilizada para cada componente na produção formas farmacêuticas sólidas (AULTON, 2005).

Os excipientes foram cedidos pelo laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UNIFAL-MG e as cápsulas foram manipuladas individualmente no laboratório NCQ-UNIFAL-MG.

4.1.10 Perfis de dissolução

Seis cápsulas de cada forma de DOX e uma contendo apenas os ingredientes inativos (como branco) foram avaliados em um dissolutor Electrolab[®], modelo TDT-08 L, multi banho (n = 8) (Mumbai, Maharashtra, Índia). As cápsulas foram colocadas em “sinkers” (mola de aço inoxidável) para evitar a flutuação da cápsula. As condições experimentais do ensaio foram: 1000 mL de tampão de fosfato pH 6,8, na concentração de 0,072 mol.L⁻¹, como meio de dissolução, pás como aparato a uma velocidade de agitação de 100 rpm, à temperatura controlada de 37,0 ± 0,5 °C. Os ensaios foram realizados de acordo com a monografia descrita na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 38, 2015) para cápsulas de hiclato de doxiciclina, mas com a substituição do meio de dissolução de água por tampão de fosfato 0,072 mol. L⁻¹ pH 6,8 para simular o pH da água e evitar alterações de pH durante o procedimento.

Foram coletados cinco mililitros após 3, 6, 9, 15, 20 e 30 min, seguido por reposição imediata do meio. As alíquotas de amostras foram diluídas com água quando necessário e analisadas pelo método de UV (o mesmo utilizado para o ensaio de solubilidade, ver seção 2.2.6). Após isso, comparações entre os perfis de dissolução foram realizados, determinadas por um fator de similaridade (F2) (Equação 1, ver item 2.3.2) (FDA, 1997).

4.2 ORBIFLOXACINO

ORBI padrão (pureza 99,9%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Seelze, Germany) e a matéria-prima de ORBI (pureza 99,8%) dos Laboratórios LKT, Inc. (Minnesota, EUA). Hidróxido de sódio e ácido clorídrico p.a foram adquiridos da Vetec[®] (Rio de Janeiro, Brasil) e fosfato de potássio monobásico, ácido acético glacial, fosfato de sódio e acetato de sódio da Proquímios[®] (São Paulo, Brasil). Metanol grau HPLC/espectroscopia foi comprado da J. T. Baker[®] (Xalostoc, México). Água ultrapura foi obtida por osmose reversa e filtração através de um sistema de água Direct-QTM (Millipore[®], Bedford, USA).

Comprimidos de ORBI, ORBAX[®] (Schering-Plough Animal Health Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil) com dosagem declarada de 22,7 mg de IFA foram adquiridos em farmácia local.

Os excipientes utilizados na análise por DRXP com a finalidade de facilitar a identificação do ORBI nos comprimidos ORBAX foram: lactose monohidratada (91%), povidona (1,5%), amido glicolato de sódio (6,0%), estearato de magnésio (1,0%), dióxido de silício (0,5%), os quais foram adquiridos de farmácias de manipulação locais. A massa total dos excipientes na formulação foi obtida através da determinação de peso dos comprimidos de ORBAX 22,7 mg e a quantidade de cada excipiente, exceto a lactose, foi determinada de acordo com a proporção média utilizada de cada componente na produção de comprimidos (AULTON, 2005). Já a proporção da lactose monohidratada, que tem função diluente/material de enchimento, foi calculada somando-se a proporção dos outros componentes e subtraindo essa quantidade de 100%.

4.2.1 Obtenção das amostras

Cristais de ORBI hemidratado foram obtidos com a técnica de lenta evaporação de solventes pesando-se cerca de 10 mg de ORBI e dissolvendo-o em cerca de 50 mL de uma solução de etanol: clorofórmio (1:1, v/v). Após cinco dias em temperatura ambiente (25°C), protegido da luz, monocristais brancos foram formados. Estes foram separados da solução e levados para análise por DRXM.

4.2.2 Determinação estrutural por difração de raios X por monocristal (DRXM)

A medida de DRXM foi realizada à baixa temperatura (150K) em um difratômetro modelo Gemini A - Ultra equipado com um detector Atlas CCD que utiliza feixes de raios X monocromáticos ($K\alpha$ do cobre (Cu) ou molibdênio (Mo)). Os programas utilizados para coleta de dados, refinamento de célula, redução dos dados e correção de absorção pelo método *multi-scan* foram o CrysAlis CCD e CrysAlis RED (CrysAlis Pro, 2006). A estrutura foi resolvida por métodos diretos e refinada pelo método de mínimos quadrados de matriz completa em F^2 utilizando o software SHELXL-2013 (SHELDRICK, 2008). Todos os átomos não hidrogenóides foram encontrados a partir de um mapa de densidade eletrônica construído por síntese de Fourier e refinados com parâmetros térmicos anisotrópicos. Os átomos de hidrogênio ligados a átomos de carbono foram posicionados estereoquimicamente utilizando o software SHELXL-2013 (SHELDRICK, 2008), seguindo um modelo rígido com comprimentos de ligação C-H fixos de 0,93; 0,96; 0,97 e 0,98 Å para os grupos aromáticos, metilas, metilênicos e metínicos. Os átomos de hidrogênio da molécula de água e da amina secundária foram livremente refinados após atribuição a partir de mapas de diferença de Fourier. Os parâmetros térmicos isotrópicos de todos os hidrogênios foram restringidos ao deslocamento térmico isotrópico equivalente dos átomos a que estão ligados [($U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}$ (N-amina, C-aromático, C-metilênico e C-metínico) ou $1,5 U_{eq}$ (O-água e C-metila)]. A característica zwitteriônica do ORBI no estado sólido foi inequivocamente determinada a partir de mapas de densidade eletrônica construídos por síntese de Fourier. O software WingX foi utilizado para tratar os dados cristalográficos e gerar as tabelas cristalográficas (FARRUGIA, 1999). Os programas MERCURY e ORTEP-3 foram utilizados para análise cristalográfica e criação das figuras e representações gráficas (MACRAE et al., 2008; FARRUGIA, 1997). Os dados cristalográficos da análise estrutural do ORBI foram depositados no Centro de Dados Cristalográficos da Cambridge (CCDC) com o número de depósito CCDC 1447435 (ALLEN, 2002). O dado pode ser obtido sem qualquer ônus no CCDC via www.ccdc.cam.ac.uk/getstructures.

4.2.3 Experimento de difração de raios X por policristais (DRXP)

Os dados de difração de raios X por policristais foram coletados seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.1.4. Os difratogramas experimentais foram comparados com o teórico calculado com o programa MERCURY[®] introduzindo o arquivo CIF final (CCDC 1447435) obtido do refinamento dos dados de difração de raios X por monocristal do cristal de ORBI preparado neste trabalho.

4.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Espectros de FTIR-ATR foram coletados conforme descrito no item 4.1.6.

4.2.5 Análise térmica

A análise térmica realizada foi a termogravimetria (TG) e a análise térmica diferencial (DTA). As curvas TG foram obtidas através do módulo de análise térmica simultâneo, SDT Q600, fabricado pela TA Instruments[®]. As condições experimentais foram: cadinho de alumínio aberto, uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, fluxo de nitrogênio: 100 mL.min⁻¹ na faixa de temperatura de 30-300°C, utilizando cerca de 8 mg de amostra.

4.2.6 Estudo de interconversão entre as formas anidra e hemidratada de ORBI

Aproximadamente 50 mg de ORBI hemidratado (ORBI padrão sigma) foram divididos em dois lotes: um deles foi aquecido à 105 °C e o outro lote à 200 °C, ambos por 10 horas para convertê-los em ORBI anidro. Após esse período, as amostras foram colocadas em um

dessecador contendo sílica até alcançar a temperatura ambiente. A completa perda de água das amostras foi confirmada por medidas termogravimétricas (TG), a qual não apresentou nenhuma perda de massa na faixa de temperatura observada para a forma hemidratada de ORBI.

Para verificar a estabilidade da forma anidra perante a umidade, outros 50 mg de ORBI (Sigma standard) previamente aquecido à 200 °C por 10 horas, foram colocados em uma câmara climática à 40 °C e 75% de umidade relativa por 1 hora e analisadas imediatamente por DRXP e TG.

4.2.7 Quantificação de ORBI

A quantificação do ORBI no ensaio de solubilidade comparativo entre as formas hemidratada e anidra foi realizada por um método indicador de estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência descrito por Casedey e colaboradores em 2011 (CASEDEY et al., 2011). A separação cromatográfica foi obtida usando um Cromatógrafo a líquido Shimadzu[®], modelo Prominence (Kyoto, Japan) com degasseificador DGU-20A 3R, autoamostrador SIL-20AC HT, forno para coluna CTO-20A, bombas LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20A. Foram utilizados os seguintes parâmetros cromatográficos: Coluna: Shim-pack CLC-ODS Shimadzu[®] (Kyoto, Japan) (dimensões 250mm × 4.6mm d.i, e tamanho de partícula de 5.0 µm), a uma temperatura de 25°C como fase estacionária. Como fase móvel foi utilizada uma solução de ácido acético 5% (v/v): metanol (80:20 v/v) a uma vazão de 0,7 mL.min⁻¹. A detecção por UV foi obtida no comprimento de onda de 290 nm e o volume de injeção de amostra no sistema cromatográfico foi de vinte microlitros.

4.2.7.1 Curva de calibração

Uma curva de calibração foi preparada utilizando uma solução estoque do padrão Sigma (previamente dessecado por 4 horas à 105°C em estufa) em fase móvel a 5 níveis de

concentração em triplicata (5, 10, 15, 20 e 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Os resultados obtidos foram analisados por regressão linear da área do pico *versus* concentração.

4.2.8 Estudos de solubilidade de ORBI

O teste de solubilidade foi determinado pelo método clássico de saturação “*shake-flask*” (BAKA; COMER; TAKÁCS-NOVÁK, 2008; BRASIL, 2013). ORBI hemidratado e anidro (obtido por aquecimento do hemidratado) foram adicionados em excesso em tubos tipo *ependorff* de 1,5 mL contendo 1 mL dos seguintes meios: água ultrapura, ácido clorídrico 0,01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido clorídrico 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, tampão acetato 0,05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 4,5, tampão fosfato de potássio 0,0536 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 5,8, tampão fosfato de potássio 0,0724 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 6,8 e tampão fosfato de potássio 0,0884 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,5. As amostras em cada meio foram preparadas em triplicata. Subsequentemente, os tubos foram agitados a 150 rpm a temperatura ambiente (25°C), protegidos da luz em uma mesa agitadora SOLAB modelo SL 180 DT (Piracicaba-SP, Brasil). Após 48 horas de agitação as amostras foram filtradas em filtros de PTFE modificados (13mm diâmetro, 0,50 μm de porosidade da marca Advantec® MSF, Dublin, CA, USA) e diluídas em fase móvel nas diluições necessárias. A concentração de ORBI em cada solvente foi determinada pelo método cromatográfico (descrito no item 4.2.8). O sólido remanescente do ensaio foi levado para um dessecador contendo sílica por 5 dias para secagem e posteriormente analisado por DRXP para verificar se o material resultante era o mesmo do material inicial.

4.3 CARVEDILOL

O IFA carvedilol, identificado como forma II, foi adquirido da empresa FAGRON (SM Empreendimentos Farmacêuticos, São Paulo, Brasil) de origem Shodhana Laboratories (Índia).

4.3.1 Obtenção de novas formas de carvedilol

Quantidades equimolares (1:1) de mistura binária carvedilol: cocrystalizante (cocrystalizantes: ácido 4 aminobenzoico, nicotinamida, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glutárico, sacarina sódica) foram dissolvidos até saturação com corpo de fundo em 50 mL de acetona ou isopropanol puros ou mistura de metanol: água (50:50 v/v) e acetonitrila: metanol: água (35:35:30 v/v/v) em triplicata. As soluções foram filtradas e deixadas em repouso por até três meses: na geladeira (temperatura de 5 a 8°C); temperatura ambiente (22°C) e estufa a 60°C.

Tentativas de obtenção de novos polimorfos de carvedilol através da saturação em solventes como metiletilcetona, acetona, clorofórmio e isopropanol e mantidos em repouso pelo processo de lenta evaporação dos solventes também foram realizadas.

Os ácidos utilizados na busca por formas multicomponente foram: ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido cítrico e ácido maléico. Devido à baixa solubilidade do IFA em soluções aquosas, primeiramente foi necessária sua solubilização em acetona, exceto para a recristalização conduzida em ácido clorídrico.

A seguir são descritos a metodologia de obtenção dos sais de carvedilol:

- a) *Cloreto de carvedilol*: Cerca de 5 gramas de carvedilol foi adicionado em 400 mL de ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ e levada ao banho de ultrassom por 15 minutos. A solução foi filtrada à vácuo em membrana de PTFE modificada para solventes hidrofílicos (0,45µm) (Adaptado de HILDESHEIM et al., 2006);
- b) *Fosfato de carvedilol*: Foi dissolvido cerca de 2,5 gramas de carvedilol em 45 mL de acetona sob agitação magnética. Adicionou-se 0,5 mL de ácido fosfórico p.a (85%) lentamente na solução, a qual foi mantida sob agitação por 1 hora. A solução foi filtrada deixando-se o filtrado em repouso por cerca de 5 dias. Após esse período, os cristais obtidos foram filtrados e analisados (Adaptado de BROOK, CHENG, SPOORS, 2007);
- c) *Sulfato de carvedilol*: 1,025 gramas de carvedilol foram dissolvidos em 3,8 mL de acetona e 0,6 mL de água. Uma solução turva foi inicialmente obtida, transformou-se em límpida sob agitação e aquecimento a aproximadamente 35°C. Cerca de 2,5 mL de ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹ foi lentamente adicionado, gota a gota, à solução, a qual foi posteriormente mantida em agitação por 12 horas. O

precipitado de coloração branca foi filtrado e analisado (Adaptado de BROOK et al., 2005).

4.3.2 Experimento de Difração de raios X por policristais (DRXP)

Os dados de difração de raios X por policristais foram coletados seguindo o mesmo procedimento descrito em 4.1.4. Os difratogramas experimentais foram comparados com os teóricos calculados com o programa MERCURY[®] introduzindo os arquivos CIF (do inglês: *Crystallographic Information Framework*) das estruturas conhecidas do carvedilol obtidas no CSD.

4.3.4 Análise térmica

Curvas termogravimétricas (TG) foram obtidas em uma termobalança (modelo TG / DTA7300, SII Nano Technologies, Japão), nas seguintes condições: cadinhos de alumínio aberto, taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, fluxo de nitrogênio à 50 mL.min⁻¹ e cerca de 4 mg de amostra.

4.3.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Espectros de FTIR-ATR foram coletados conforme item 4.1.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões serão discutidos do acordo com o fármaco estudado.

5.1 DOXICICLINA

Enfatiza-se que essa parte desta tese de doutorado deu continuidade ao trabalho de mestrado desenvolvido por Douglas Martelli e Silva, entre 2009-2011, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG. No trabalho precursor, os monocristais de DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX. HAc.2H₂O foram obtidos e suas estruturas determinadas.

A novidade científica deste trabalho refere-se à obtenção dos materiais policristalinos puros dos compostos inéditos (DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HAc.2H₂O) e conhecidos (DOX.HYC, DOX.H₂O e DOX.HCl.2H₂O) e análise estrutural comparativa. Somando-se a isto, foram realizadas caracterizações por DRXP, FTIR-ATR e análise térmica e estudo físico-químico envolvendo a solubilidade, estabilidade e perfil de dissolução das cinco formas supracitadas, propriedades que foram explicadas considerando suas estruturas cristalinas.

5.1.1 Determinação estrutural por DRXM, padrão de protonação, tautomerismo e conformerismo das formas cristalinas da DOX

Como descrito nos objetivos dessa tese, fazia parte dos resultados inéditos esperados, a obtenção de monocristais para a determinação da estrutura da forma DOX.HCl.2H₂O. Contudo, essa estrutura foi publicada em 2013 por Heinemann et al. (2013) no decurso desse trabalho de doutorado iniciado em 2012. Destaca-se também que as estruturas da DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX. HAc.2H₂O já tinham sido discutidas na dissertação de mestrado desenvolvida por Douglas Martelli e Silva. Por esse motivo, não se discutiu pormenorizadamente nessa tese, as estruturas do DOX.HCl.2H₂O, DOX.HNO₃.0,5H₂O e

DOX.HAc.2H₂O. Contudo, é perceptível em dos artigos oriundo dessa tese, publicado em *Cryst. Growth Des.* 2014, 14, 3711–3726, que as estruturas dessas três formas são discutidas em detalhes. A forma DOX.HCl.2H₂O foi mantida pois seus dados e a resolução de sua estrutura já haviam sido obtidos quando se tomou conhecimento de sua publicação. Decidiu-se então mantê-la na discussão do artigo por motivos de comparação com as estruturas das formas DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HAc.2H₂O. Além disso, as discussões das estruturas dessas duas últimas formas constam na discussão do artigo, pois durante sua elaboração decidiu-se pela junção dos resultados obtidos na dissertação desenvolvida por Douglas Martelli e Silva, com os resultados obtidos nessa tese de doutorado. Tendo em vista o exposto acima, esse subitem dessa tese, consta de forma bastante sucinta, sendo feita de maneira detalhada no artigo publicado. As três formas cristalinas reportadas foram resolvidas em grupos espaciais não-centrossimétricos (Tabela 2). O uso da radiação CuK α permitiu a determinação da configuração absoluta das formas DOX.HCl.2H₂O e DOX.HNO₃.0,5H₂O por meio do refinamento do parâmetro de Flack (CIANCI et al., 2005). A configuração absoluta encontrada para molécula de DOX nas formas DOX.HCl.2H₂O e DOX.HNO₃.0,5H₂O confirma aquela conhecida a partir da rota sintética da molécula e foi adotada para a DOX.HAc.2H₂O.

Tabela 2- Dados cristalográficos e parâmetros de determinação de estrutura das formas cristalinas de DOX .

Fórmulas sólidas	DOX·HCl·2H ₂ O	DOX·HAc·2H ₂ O	DOX·HNO ₃ ·0.5H ₂ O
Fórmula Empírica	C ₂₂ H ₂₉ ClN ₂ O ₁₀	C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₁₂	C ₄₄ H ₅₂ N ₆ O ₂₃
Massa molecular (g·mol ⁻¹)	516,92	540,52	516,46
Temperatura (K)	293(2)	293(2)	293(2)
Comprimento de onda (Å)	1,54180	0,71073	1,54180
Tamanho do cristal (mm ³)	0,25 x 0,20 x 0,10	0,25 x 0,15 x 0,12	0,30 x 0,19 x 0,15
Sistema cristalino	Ortorrômbico	Ortorrômbico	Triclínico
Grupo de espaço	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P1
<i>a</i> (Å)	11,0979(1)	6,4753(2)	8,0679(2)
<i>b</i> (Å)	12,7557(1)	9,0970(4)	8,9156(3)
<i>c</i> (Å)	16,8829(2)	42,8077(16)	16,6791(5)
α (°)	90	90	77,872(2)
β (°)	90	90	87,581(2)
γ (°)	90	90	74,133(3)
Volume da cela (Å ³)	2389,97(4)	2521,62(17)	1128,11(6)
Z	4	4	1
Densidade Calc.(g·cm ⁻³)	1,437	1,424	1,520
Coefficiente de absorção (mm ⁻¹)	1,945	0,115	1,065
F (000)	1088	1144	542
Faixa θ (°)	4,34-62,49	2,86-29,49	2,71-66,37
Varição dos índices de Miller	-12 ≤ h ≤ 12 -14 ≤ k ≤ 14 -19 ≤ l ≤ 19	-7 ≤ h ≤ 8 -12 ≤ k ≤ 10 -57 ≤ l ≤ 55	-8 ≤ h ≤ 9 -10 ≤ k ≤ 10 -19 ≤ l ≤ 19
Reflexões coletadas	34212	24360	21480
Reflexões independentes/ <i>R</i> _{int}	3799/ 0,0331	6303 /0,0479	7575 / 0,0283
Completeza θ_{max} (%)	88,0	99,8	95,9
Qualidade do ajuste em F ²	1,051	0,943	1,026
Data/restrições/parâmetros	3786 / 1 / 319	6303 / 0 / 356	7575 / 3 / 662
R1 / wR2 para I > 2 σ (I)	0,0282 / 0,0699	0,0432 / 0,0928	0,0332 / 0,0838
R1 / wR2 para todos os dados	0,0314 / 0,0722	0,0715 / 0, 0989	0,0369 / 0,0866
Parâmetro de Flack	-0,002(5)	-	0,03(6)
Maior diferença entre pico e vale (e·Å ³)	0,137 / -0,183	0,194 / -0,192	0,442 / -0,297

Fonte: Traduzido de SANTOS et al., 2014b.

Quanto ao padrão de protonação, ao contrário das formas DOX.HCl.2H₂O, DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HYC, nas quais a molécula de DOX apresenta-se como espécie zwitteriônica e catiônica (dois grupos protonado e um desprotonado), as formas DOX.HAc.2H₂O e DOX.H₂O apresentam-se como uma espécie zwitteriônica neutra (um grupo protonado e um desprotonado) (Figura 16). Ou seja, no caso das formas DOX.HAc.2H₂O e DOX.H₂O, carbonila do grupo acetamida da molécula de DOX não está protonada como nas demais formas. Consequentemente, no caso do DOX.HAc.2H₂O, o

hidrogênio permanece ligado ao ácido acético no cristal. Os diferentes padrões de protonação são representados na Figura 16 pelos círculos sobre a carbonila do grupo acetamida.

Observam-se ainda dois tipos de tautômeros ceto-enolato para as formas estudadas. O tautômero (T1) tem a hidroxila desprotonada do anel ciclo-hexênico em posição *sin* a dimetilamina protonada (ambas do lado direito da Figura 16). No tautômero (T2) esses mesmos grupos estão dispostos na posição *anti* (hidroxila desprotonada à esquerda e dimetilamina protonada à direita). Os dois tautômeros têm também diferentes posições da dupla ligação do anel ciclo-hexênico. Os dois tautômeros são diferenciados por retângulos de diferentes cores na Figura 16, mostrando que o DOX.HCl.2H₂O e o DOX.HAc.2H₂O adotam o tautômero (T1) e o DOX.H₂O adota o tautômero (T2). Já o DOX.HNO₃.0,5H₂O e o DOX.HyC, que possuem duas moléculas de DOX independentes por simetria na unidade assimétrica da estrutura, têm cada uma dessas moléculas adotando um dos tautômeros supracitados.

Finalmente, são observados dois conformêros distintos para as formas estudadas da DOX, as quais são representadas na Figura 16 por setas curvas de diferentes cores sobre o grupamento acetamida dos esquemas químicos. Um dos conformêros (C1) tem a amina do grupo acetamida em posição *anti* em relação a dimetilamina protonada (amina a esquerda e dimetilamina protonada a direita). No outro conformêro (C2) esses mesmos grupos estão dispostos na posição *sin* (ambas do lado direito da Figura 16). Observa-se que o DOX.HCl.2H₂O e o DOX.H₂O adotam a conformação (C1) e o DOX.HAc.2H₂O a conformação (C2). É importante destacar que as formas que possuem duas moléculas de DOX na unidade assimétrica, DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HyC, mostram os dois conformêros em suas estruturas (C1 e C2), um para cada molécula da unidade assimétrica.

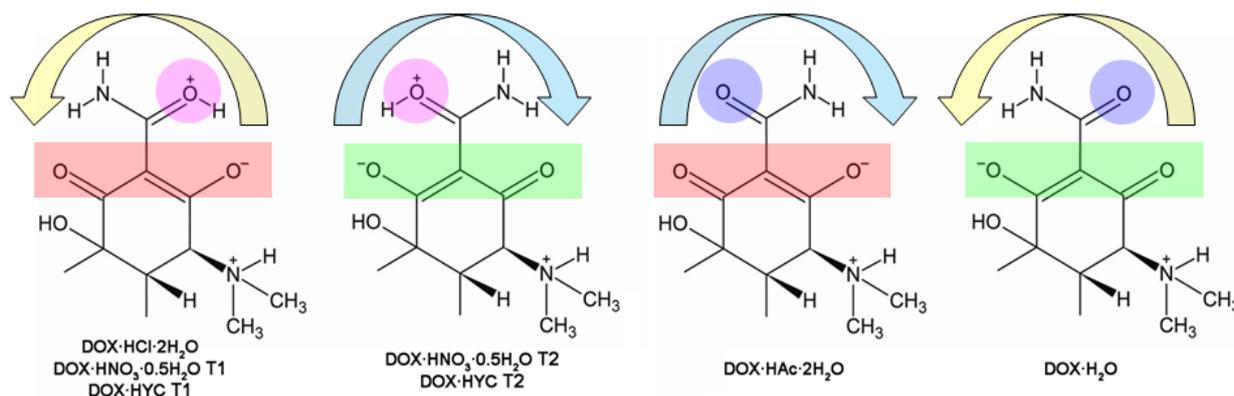
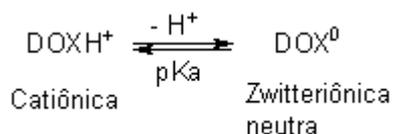


Figura 16- Diagrama químico da porção ceto-enólica ligada à amida para as formas de DOX conhecidas e as reportadas neste estudo.

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2014b.

Em resumo, para as cinco formas estudadas, observam-se quatro combinações de padrão de protonação, tautomerismo e conformerismo: 1) **cátion+T1+C1** (DOX.HCl.2H₂O, T1 do DOX.HNO₃.0,5H₂O e T1 do DOX.HYC); 2) **cátion+T2+C2** (T2 do DOX.HNO₃.0,5H₂O e T2 do DOX.HYC); 3) **neutra+T1+C2** (DOX.HAc.2H₂O); 4) **neutra+T2+C1** (DOX.H₂O).

Além das possibilidades observadas para a DOX no estado sólido, o equilíbrio de protonação-desprotonação da DOX na faixa de pH em que foram recristalizadas possibilita a existência de duas espécies em solução, uma em pH ácido e outra em pH neutro (Esquema 1).



Esquema 1

O pKa para a protonação da DOX ($\text{DOX}^\pm + \text{H}^+ \rightarrow \text{DOXH}^{2\pm}$) é de 3,09 ($\mu = 1$ e 25°C) (BORGADUS; BLACKWOOD, 1979). Como mostrado acima, as formas protonada e desprotonada da DOX, também podem ocorrer no estado sólido cristalino.

De acordo com a regra do pKa, a formação de sal é esperada para as formas DOX.HCl.2H₂O, DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HYC pois seus respectivos ΔpKa (pKa da base protonada – pKa do ácido) são maiores que 4 ($\Delta\text{pKa}_{\text{DOX.HCl.2H}_2\text{O}} = \Delta\text{pKa}_{\text{DOX.HYC}} = \text{pKa}_{\text{DOX}} - \text{pKa}_{\text{HCl}} = 3.09 - (-7) = 10,09$; $\Delta\text{pKa}_{\text{DOX.HNO}_3.0,5\text{H}_2\text{O}} = \text{pKa}'_{\text{DOX}} - \text{pKa}_{\text{HNO}_3} = 3.09 - (-1,34) =$

4,43). Essas três formas estão na Zona 3 de ΔpK_a , na qual são quase exclusivamente observadas estruturas cristalinas contendo pares ionizado A^-B^+ (CRUZ-CABEZA, 2012).

Por outro lado, no DOX.HAC.2H₂O, o ΔpK_a ($pK_a'_{DOX} - pK_{aHAC} = 3,09 - 4,76 = -1,67$) está na zona 1 de ΔpK_a ($\Delta pK_a < -1$), onde as estruturas cristalinas contendo pares AB não ionizados são esperadas (CRUZ-CABEZA, 2012). Isso, portanto explica o fato de não ter havido a transferência do átomo de hidrogênio do ácido acético para a DOX, que se manteve neutra (zwitteriônica) como a DOX.H₂O.

5.1.2 Análise de difração de raios X por policristais

Os padrões de DRXP obtidos experimentalmente e os simulados a partir dos dados da determinação da estrutura cristalina por monocristal apresentaram excelente concordância indicando que o material policristalino obtido para as formas sólidas do DOX.HAc.2H₂O, DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HCl.2H₂O são monofásicos (puros do ponto de vista cristalino) e correspondentes às suas respectivas estruturas determinadas. As diferenças das intensidades relativas dos picos são atribuídas a fenômeno de orientação preferencial, como, por exemplo, em 22,7 ° ($hkl = 2\ 1\ 1$) em 2θ para DOX.HNO₃.0,5H₂O e 19,7 ° ($hkl = 1\ 1\ 5$) em 2θ para DOX.HAc.2H₂O (Figura 17).

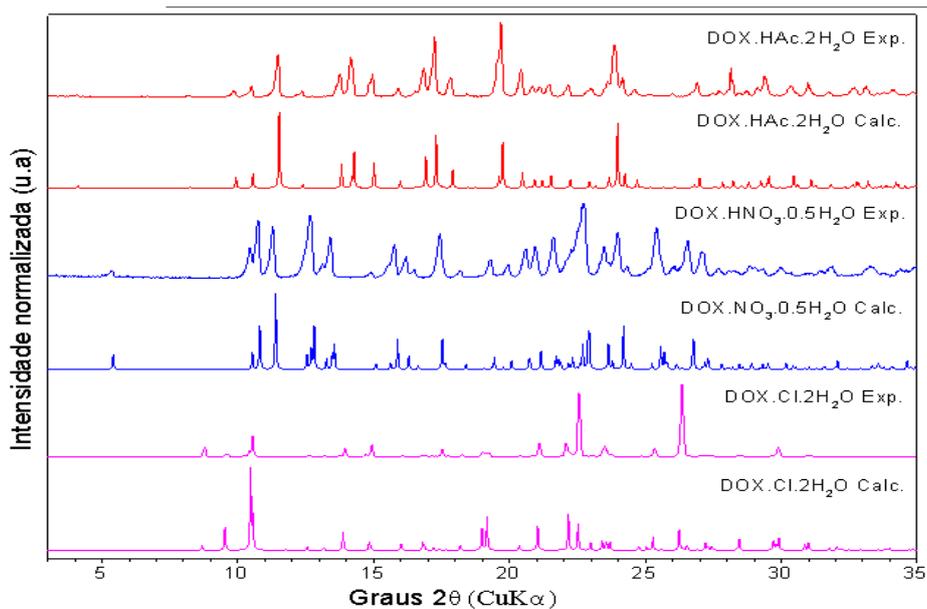


Figura 17- Difratoogramas de raios X por policristais experimentais e calculados para DOX·HAc·2H₂O, DOX·HNO₃·0.5H₂O e DOX·HCl·2H₂O.

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2014b.

5.1.3 Análise térmica

As curvas de TG e DSC das formas cristalinas de DOX estudados neste trabalho são mostradas na Figura 18.

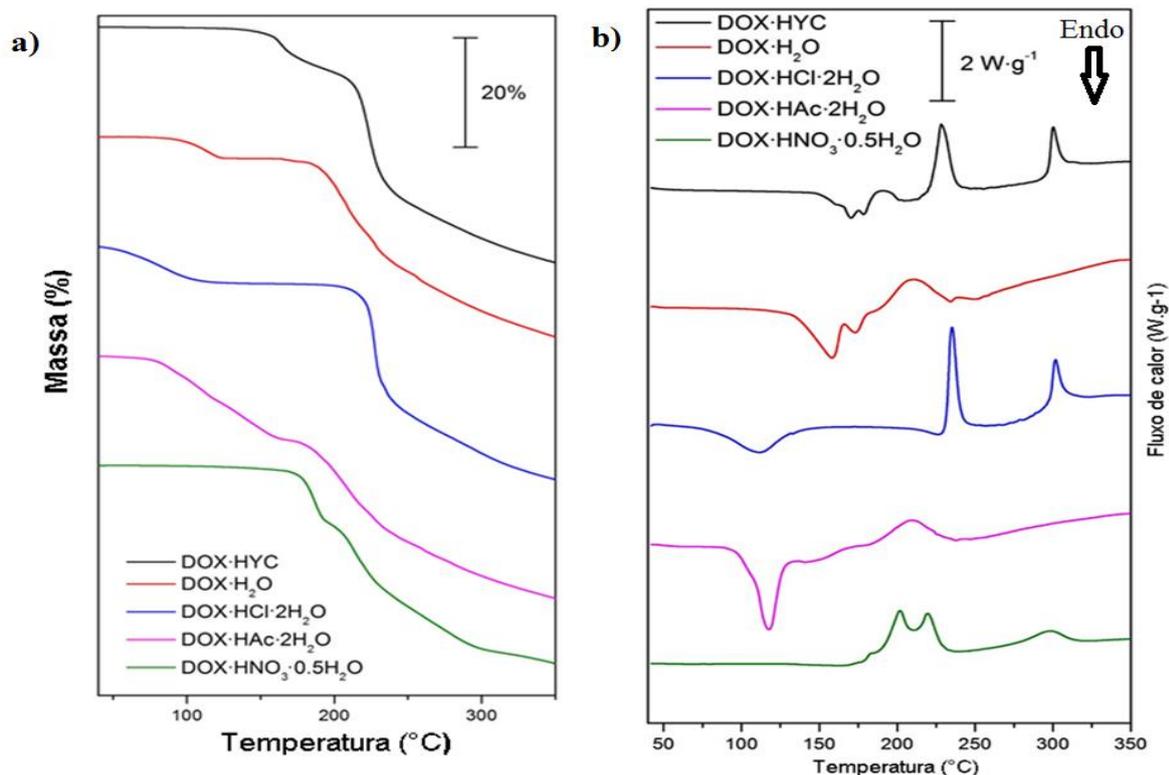


Figura 18- Curvas de TG (a) e de DSC (b) para DOX.HYC, DOX.H₂O, DOX.HAc·2H₂O, DOX.HNO₃·0.5H₂O e DOX.HCl·2H₂O.

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2014b.

Embora vários fornecedores reportem que o DOX.HYC possui ponto de fusão, sua curva TG evidencia uma perda de massa a partir das 123 °C (pico de DSC a 170 °C), indicando sua decomposição térmica (o que corrobora a Merck Index) mesmo sob atmosfera inerte. Outros experimentos foram realizados utilizando taxas de aquecimento mais baixas a fim de tentar estabelecer uma linha de base entre a primeira e segunda perda de massa, mas o perfil da curva se manteve.

Assim, nenhum intermediário termicamente estável pôde ser isolado/identificado oriundo de reações de decomposição simultânea e/ou sequencial do DOX.HYC. De acordo com as perdas de massa, essas reações não são estritamente relacionadas com a liberação de moléculas de solvente ou ácido clorídrico. Este é um dado importante, uma vez que demonstra que as moléculas de água e de etanol do DOX.HYC conferem estabilidade a sua rede cristalina. Quando as moléculas de solvente são finalmente liberadas, a temperatura atingida já é suficientemente elevada para provocar a decomposição da molécula de DOX.

Em relação à DOX.H₂O, a primeira perda de massa observado na curva TG refere-se à desidratação da amostra ($T_i = 81\text{ }^\circ\text{C}$; $T_f = 127\text{ }^\circ\text{C}$; T_{onset} no DSC a $158\text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta m_{\text{TG}} = 4,0\%$ / $\Delta m_{\text{calc.}} = 3,9\%$), seguindo uma linha de base até $162\text{ }^\circ\text{C}$, quando a decomposição térmica da amostra acontece (T_{onset} no DSC a $235\text{ }^\circ\text{C}$). Em tese, a forma anidra de DOX a partir da DOX.H₂O é produzida por aquecimento. No entanto, o padrão de DRXP e curvas TG obtidos após tratamento térmico *ex situ* a $130\text{ }^\circ\text{C}$ mostraram que imediatamente após o sólido ser resfriado as moléculas de água do ambiente provocam o retorno para a forma hidratada, o que impede a sua utilização como uma forma cristalina alternativa deste IFA.

A curva TG de DOX.HCl.2H₂O exibe perda de duas moléculas de água na primeira etapa ($T_i = 40\text{ }^\circ\text{C}$; $T_f = 129\text{ }^\circ\text{C}$; T_{onset} no DSC a $111\text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta m_{\text{TG}} = 6,8\%$ / $\Delta m_{\text{calc.}} = 7,0\%$), sendo o composto anidro estável até $183\text{ }^\circ\text{C}$, quando inicia sua decomposição térmica. A mesma observação sobre DOX anidra obtida a partir da DOX.H₂O se aplica à DOX.HCl anidra, obtidas a partir da amostra dihidratada: a forma anidra de DOX.HCl apresenta rápida reabsorção de água o que inviabiliza sua adequada caracterização química. O padrão de DRXP obtido após aquecimento *ex situ* a $130\text{ }^\circ\text{C}$ aponta para a fase DOX.HCl.2H₂O indicando uma rápida hidratação da fase DOX.HCl anidro.

Outra possibilidade é que as duas estruturas, anidra e dihidratada, não apresentem diferenças significativas (parâmetro de cela, grupo espacial e posição relativa dos átomos de DOX e cloreto) com e sem a presença da molécula de água, o que levaria a padrões de DRXP difíceis de serem diferenciados, principalmente utilizando-se dados obtidos em difratômetro equipado com tubo de raios X sem supressor de $K\alpha_2$.

A primeira etapa de decomposição do DOX.HAc.2H₂O ($T_i = 73\text{ }^\circ\text{C}$; $T_f = 160\text{ }^\circ\text{C}$; T_{onset} no DSC a $118\text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta m_{\text{TG}} = 15,6\%$ / $\Delta m_{\text{calc.}} = 17,8\%$) é atribuída a saída simultânea de ácido acético e água da estrutura. Contudo, a massa experimental perdida é inferior a massa teórica esperada de $1\text{HAc} + 2\text{H}_2\text{O}$. Uma possível explicação para tal resultado é o arraste do ácido acético pelo gás de purga antes de se iniciar a rampa de aquecimento. O composto começa a decompor a $176\text{ }^\circ\text{C}$, quase imediatamente após a perda de água e ácido acético.

Diferentemente das formas anteriores, a DOX.HNO₃.0,5H₂O perde água muito lentamente ($T_i = 48\text{ }^\circ\text{C}$; $T_f = 138\text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta m_{\text{TG}} = 0,5\%$ / $\Delta m_{\text{calc.}} = 1,8\%$), de forma que nenhum pico endotérmico foi observado no DSC curva. A forma anidra é estável até $163\text{ }^\circ\text{C}$ e, em seguida, sofre decomposição. O primeiro pico na curva de DSC de DOX.HNO₃.0,5H₂O, em contraste com suas outras formas, é exotérmico, o que se deve à natureza oxidante do íon nitrato.

Considerando-se as cinco formas de DOX estudadas, a seguinte ordem de estabilidade térmica pode ser estabelecida: $\text{DOX}\cdot\text{HYC} < \text{DOX}\cdot\text{H}_2\text{O} \cong \text{DOX}\cdot\text{HNO}_3\cdot 0,5\text{H}_2\text{O} < \text{DOX}\cdot\text{HAc}\cdot 2\text{H}_2\text{O} < \text{DOX}\cdot\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Em geral, quando polimorfos de uma mesma molécula orgânica são comparados (cristais moleculares), é esperado que a fase cristalina de menor temperatura de fusão e, em tese, maior energia livre de rede, possua uma maior solubilidade de equilíbrio e taxa de dissolução mais rápida (KHANKARI; GRANT, 1995). Contudo, estas previsões são frustradas quando formas multicomponentes de uma molécula são consideradas, a exemplo do observado para $\text{DOX}\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $\text{DOX}\cdot\text{HYC}$ (LEGENDRE et al., 2012).

5.1.4 Análise na região do Infravermelho

Os espectros de infravermelhos (FTIR-ATR) obtidos para cada forma de DOX em estudo são apresentados na Figura 19.

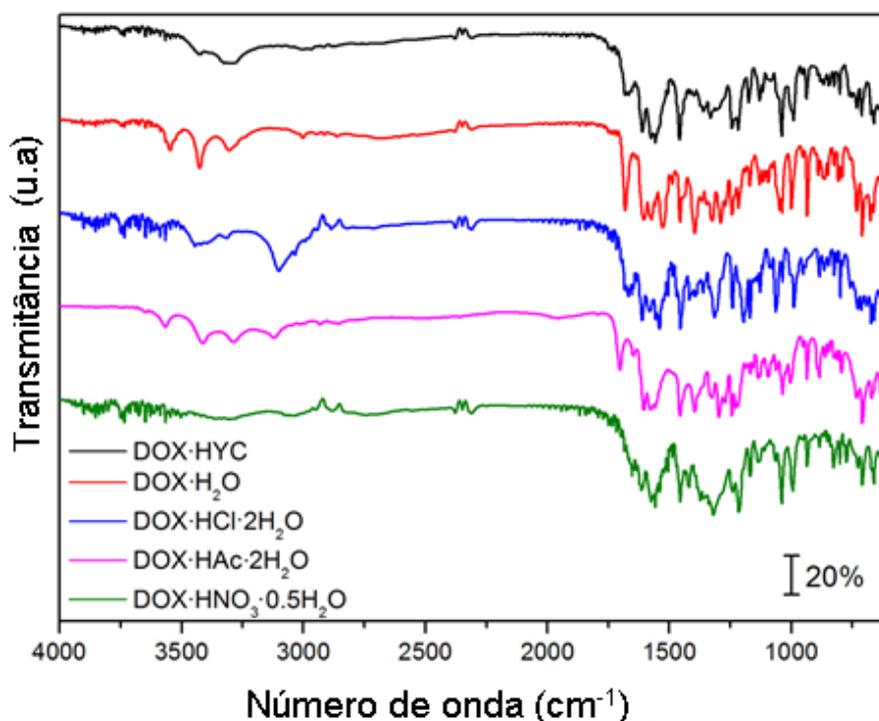


Figura 19- Espectros FTIR-ATR para $\text{DOX}\cdot\text{HYC}$, $\text{DOX}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{DOX}\cdot\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{DOX}\cdot\text{HAc}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{DOX}\cdot\text{HNO}_3\cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2014b.

Uma vez que o núcleo estrutural para todas as formas é essencialmente o mesmo (DOX), diferenças significativas não puderam ser identificadas nos seus espectros, na região de impressão digital. Várias bandas apresentaram ombros ou são assimétricas devido à sobreposição de grupos com frequências vibracionais de absorção próximas e/ou como consequência das inúmeras ligações de hidrogênio. As bandas correspondentes às moléculas de água de cristalização aparecem em torno de 3550 ($\nu_{\text{H}_2\text{O}}$) e 1600 cm^{-1} ($\delta_{\text{H}_2\text{O}}$). Esta última banda está na mesma região da vibração da deformação angular (tesoura) do NH_2 na amida (δ_{NH_2}).

O estiramento das OH dos grupamentos álcool, enol e fenol consistem de bandas largas e ombros entre 3500 e 3350 cm^{-1} e sua diminuição na energia reflete na ocorrência de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, confirmado pelos dados de difração de monocristal. As bandas de estiramento assimétrico (ν_{NH_2} amida) do grupo amida estão entre 3320 e 3280 cm^{-1} , seguidas por aquelas de $\nu_{\text{CH}_{\text{anel}}}$ ($\sim 3050 \text{ cm}^{-1}$), ν_{CH_3} ($\sim 2,950 \text{ cm}^{-1}$) e ν_{sCH_3} ($\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$). As bandas resultantes da carbonila ($\nu_{\text{C=O}}$) e das ligações aromáticas C-C ($\nu_{\text{CC}_{\text{anel}}}$) encontram-se na região de 1700-1650 cm^{-1} . A intensa deslocalização eletrônica compreende vários átomos próximos à amida, cetona e enol, bem como a grande quantidade de ligações de hidrogênio envolvendo estes grupos de bandas alargadas $\nu_{\text{C=O}}$ (em todos os espectros são alargadas e assimétricas).

Portanto, os dados de IR não podem, neste caso, ser satisfatoriamente utilizados para identificar ou diferenciar tautômeros ceto-enol. As bandas $\nu_{\text{C-C}_{\text{anel}}}$ estão em 1570 e 1450 cm^{-1} , enquanto as bandas ν_{sCH_3} aparecem por volta de 1550 cm^{-1} e $\delta_{\text{CH}_{\text{anel}}}$ em 1290 e 1240 cm^{-1} . Finalmente, as vibrações $\nu_{\text{C-O}}$ surgem em torno de 1170 cm^{-1} . A região de impressão digital abaixo de 1200 cm^{-1} é quase idêntica para todas as formas de DOX. Já na região de identificação dos grupos funcionais (4000 a 2500 cm^{-1}), as diferenças observadas se devem às diferentes quantidades de moléculas água presente na forma sólida analisada e aos diferentes contraíons de cada forma estudada.

5.1.5 Solubilidade em equilíbrio

As curvas de calibração estabelecidas nas concentrações de 7 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($n=5$) para a quantificação da molécula de DOX em solução por espectrofotometria na região do UV estão

apresentadas na Tabela 3. Foi estabelecida uma curva para cada uma das cinco formas de DOX.

Tabela 3- Equações da reta obtidas através de uma curva de calibração espectrofotométrica para cada forma sólida de DOX e seus coeficientes de correlação.

Forma sólida	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
DOX.H ₂ O	$y = 0,0398x - 0,0108$	0,9998
DOX.HYC	$y = 0,0308x - 0,0065$	0,9998
DOX.HCl.2H ₂ O	$y = 0,030x + 0,003$	0,9999
DOX.HNO ₃ .0,5H ₂ O	$y = 0,0314x - 0,0089$	0,9998
DOX.HAc.2H ₂ O	$y = 0,028x + 0,001$	0,9999

Fonte: Da autora.

Nota: Comprimentos de onda utilizado 268 nm para DOX.H₂O e 274 nm para as demais formas.

A solubilidade e taxas de dissolução de DOX para formas conhecidas DOX.HCl.2H₂O, DOX.HYC e DOX.H₂O foram estudadas por Bogardus e Blackwood no final dos anos 1970's (BORGARDUS, BLACKWOOD, 1979). Suas principais conclusões quanto a solubilidade da DOX foi resumida a seguir:

i) $pK_a' = 3,09$ ($\mu = 1$ e $25^\circ C$) para a protonação da DOX ($DOXH^{2\pm} \leftrightarrow DOX^\pm + H^+$);

ii) O perfil de solubilidade (pH dependente) de DOX atinge um máximo de 50 g.L^{-1} a um pH_{max} de 2,16, o qual é um resultado do equilíbrio simultâneo da $DOXH^{2\pm}$ e DOX^\pm em água. As formas DOX.HCl.2H₂O e DOX.H₂O são as respectivas fases sólidas em equilíbrio com a solução em pH abaixo e acima do pH_{max} . A solubilidade da DOX.H₂O aumenta até atingir o pH_{max} devido à protonação da DOX em solução.

iii) Adição de íons cloreto suprime fortemente a solubilidade da forma DOX.HCl.2H₂O em água devido ao efeito de íon comum.

iv) Por outro lado, a solubilidade da forma DOX.H₂O foi melhorada pelos íons nitrato e cloreto, comparados a solubilidade em água pura, o que foi atribuído à natureza zwitteriônica da DOX em água.

v) Soluções preparadas com a forma DOX.HYC em ácido clorídrico aquoso tem como forma cristalina em equilíbrio com a solução final a DOX.HCl.2H₂O.

Levando estas características em consideração, a solubilidade de equilíbrio das duas novas formas de DOX, DOX.HNO₃.0,5H₂O e DOX.HAc.2H₂O, foi avaliada em água e em soluções aquosas com pH na faixa de 1 a 7,5 e comparada com as formas conhecidas: DOX.HCl.2H₂O, DOX.HYC, e DOX.H₂O.

A Figura 20 apresenta os valores de solubilidade em equilíbrio encontrado para cada forma de DOX.

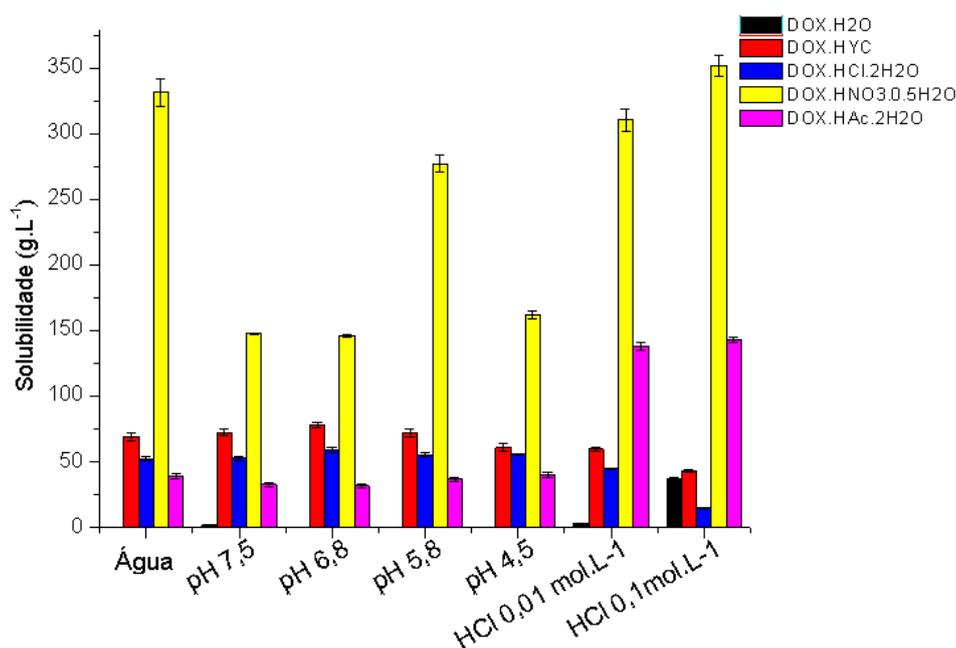


Figura 20- Valores de solubilidade em equilíbrio para as formas de DOX à 25°C.

Fonte: Traduzido de SANTOS et al., 2014b.

Nota: Barras de erro representam o desvio padrão (n=3)

É importante salientar que o material sólido em equilíbrio com as soluções utilizadas para determinar a solubilidade em equilíbrio de DOX foi posteriormente seco e analisado por DRXP. Para os experimentos com as formas DOX.H₂O, DOX.HCl.2H₂O e DOX.HNO₃.0,5H₂O não houve mudança de fase cristalina em nenhum meio testado. Por outro lado, em todos os meios avaliados, DOX.HYC converteu-se em DOX.HCl.2H₂O, enquanto DOX.HAc.2H₂O converteu-se em DOX.H₂O.

A DOX.H₂O apresentou os menores valores de solubilidade em água (0,64 g.L⁻¹, pH final ~5) e nos meios tamponados (0,61-1,99 g.L⁻¹, pHs 4-7) comparada as outras formas. Os valores encontrados foram muito similares aos encontrados na literatura (0,75 g.L⁻¹ em

tampão pH 4) (BORGADUS; BLACKWOOD, 1979). Também de acordo com resultados previamente publicados, a solubilidade em equilíbrio de DOX.H₂O em ácido clorídrico aquoso aumentou significativamente para 3,48 g .L⁻¹ em HCl 0,01 mol.L⁻¹ e 37,7 g .L⁻¹ em HCl 0,1 mol.L⁻¹ (ambos com pH final ~2). Esses valores são maiores que para DOX.HCl.2H₂O (14,9 g .L⁻¹, pH final ~ 1) e comparáveis àqueles para DOX.HYC (43 g.L⁻¹, pH final ~ 1).

O mesmo pH final foi observado para as duas soluções de HCl (0,01 e 0,1 mol.L⁻¹) contendo DOX.H₂O. Isto é explicado pelo maior concentração de cloreto em HCl 0,1 mol.L⁻¹, o que aumenta a solubilidade DOX.H₂O devido à protonação de DOX em solução seguida por um aumento do pH. Também não houve nenhuma interconversão da DOX.H₂O para DOX.HCl.2H₂O durante o experimento (Figura 21).

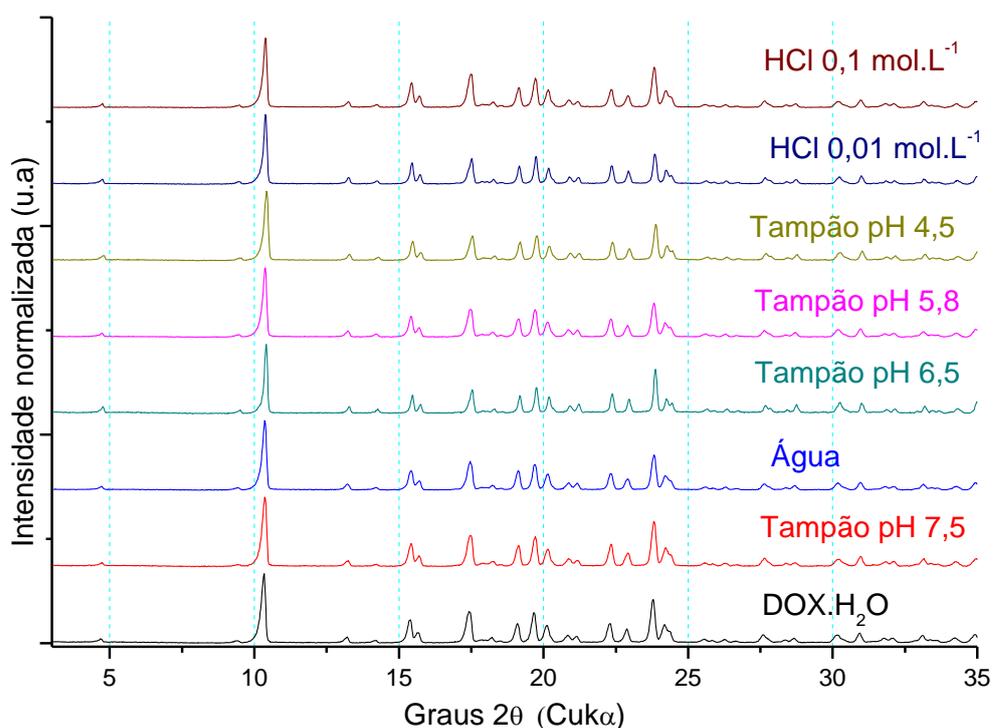


Figura 21- Difractogramas de raios X por policristais para DOX.H₂O calculado (preto) e experimentais do pó remanescente do ensaio de solubilidade em equilíbrio da DOX.H₂O em cada meio testado.

Fonte: Traduzida do material suplementar de Santos et al., 2014b.

Os valores de solubilidade em equilíbrio de DOX.HYC não podem ser considerados reais, pois através da análise por DRXP observou-se a conversão de DOX.HYC para a forma termodinamicamente mais estável DOX.HCl.2H₂O em todos os meios testados (Figura 22).

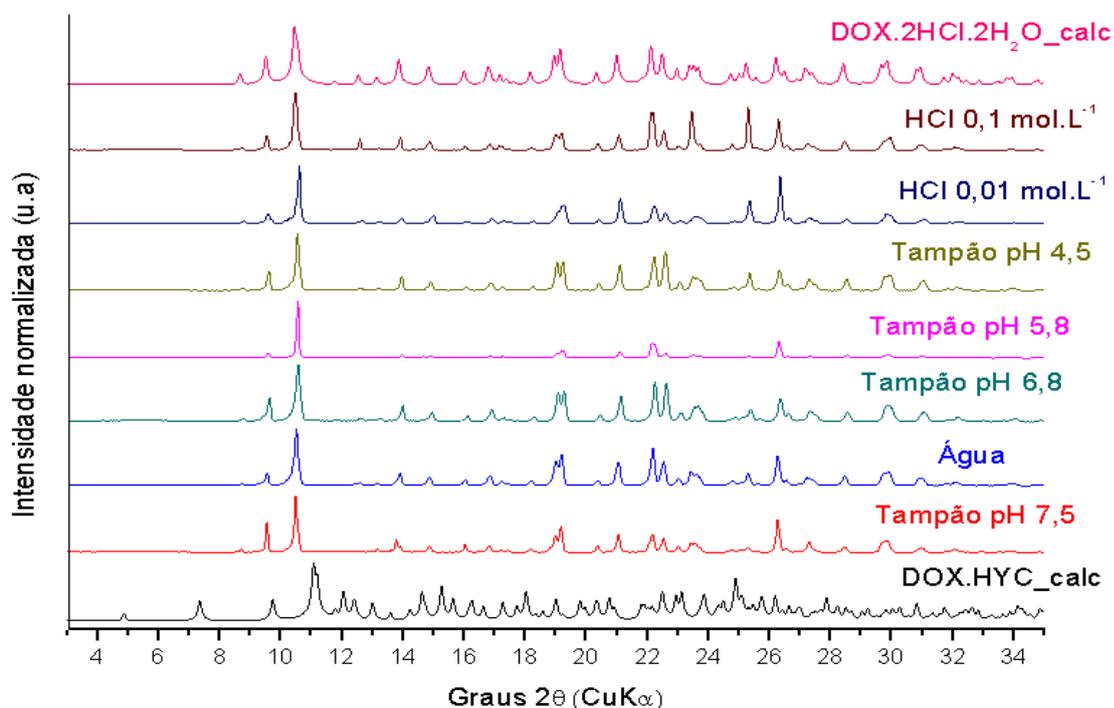


Figura 22- Difratoformas de raios X por policristais calculados para DOX.HYC (preto) e DOX.2HCl.2H₂O (rosa) e experimentais do pó remanescente do ensaio de solubilidade em equilíbrio do DOX.HYC em casa meio testado.

Fonte: Traduzida do material suplementar de Santos et al., 2014b.

Apesar da interconversão observada, a concentração de DOX em equilíbrio em todos os meios preparados a partir de DOX.HYC foi significativamente maior (~30% em água e nos meios tamponados) comparada à DOX.HCl.2H₂O. É bem conhecido que uma solução de DOX.HYC pode ser facilmente supersaturada várias vezes em relação a solubilidade do DOX.HCl.2H₂O como consequência da lenta nucleação e/ou crescimento de cristais durante o processo de interconversão de DOX.HYC para DOX.HCl.2H₂O em meio aquoso (BORGADUS; BLACKWOOD, 1979). A grande diferença de valores de solubilidade (43 g.L⁻¹ para DOX.HYC e 14,9 g.L⁻¹ para DOX.HCl.2H₂O) em HCl 0,1mol.L⁻¹ foi causada pela presença do íon comum Cl⁻, que atuou mais na solubilidade do DOX.HCl.2H₂O.

Os valores de solubilidade de equilíbrio para DOX.HCl.2H₂O foram muito semelhantes em água e nos meios tamponados. O valor médio de 55 g.L⁻¹ observado nestas

soluções concordam com o valor de 50 g.L^{-1} em água, pH 6,8-7,0, relatado na literatura (BORGADUS; BLACKWOOD, 1979). A hidrólise ácida de $\text{DOX.HCl.2H}_2\text{O}$ diminuiu o pH final (pH~2-3) mesmo em soluções tamponadas.

O $\text{DOX.HNO}_3.0.5\text{H}_2\text{O}$ demonstrou valores de solubilidade em equilíbrio de 2-3 vezes maior que as outras formas de DOX avaliadas neste trabalho (331 g.L^{-1} , pH final ~3), confirmando a alta solubilidade dos nitratos em consequência da baixa entalpia de hidratação e da alta entropia do íon nitrato em água (SILVA; MARTINS; ANDRADE, 2004).

$\text{DOX.HAc.2H}_2\text{O}$ sofreu conversão de fase (para $\text{DOX.H}_2\text{O}$) durante o estudo de solubilidade. A interconversão de $\text{DOX.HAc.2H}_2\text{O}$ para $\text{DOX.H}_2\text{O}$ ao invés de $\text{DOX.HCl.2H}_2\text{O}$ em HCL 0,01 e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi, em princípio, um resultado inesperado, devido à presença de cloreto em pH baixo o que poderia favorecer a formação de $\text{DOX.HCl.2H}_2\text{O}$. Uma possível explicação é que tenha havido uma conversão de fases via estado sólido concomitante ao processo de dissolução. Tal efeito pode ser favorecido pela disposição em camadas do empacotamento cristalino do $\text{DOX.HAc.2H}_2\text{O}$, que favorece a liberação de ácido acético acompanhada do rearranjo do forte “synton” supramolecular contendo três moléculas de DOX rodeando cada molécula de água (Figura 23). Essa explicação é reforçada pelo fato desse “synton” ser comum as duas estruturas, $\text{DOX.H}_2\text{O}$ e $\text{DOX.HAc.2H}_2\text{O}$, o qual é destacado em azul na Figura 24.

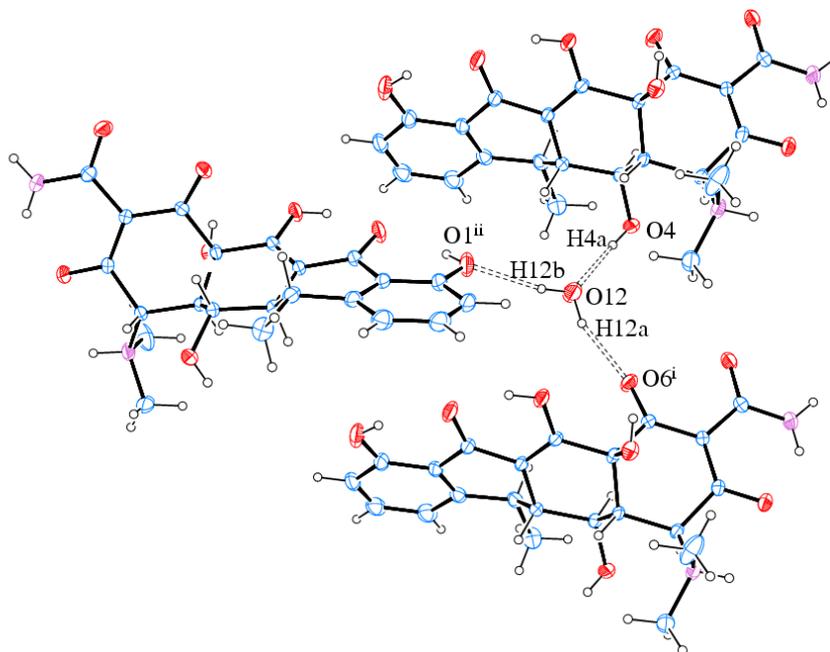


Figura 23- Padrão de ligação de H que ocorre em $\text{DOX.HAc.2H}_2\text{O}$ e em $\text{DOX.H}_2\text{O}$.
Fonte: SANTOS et al., 2014b.

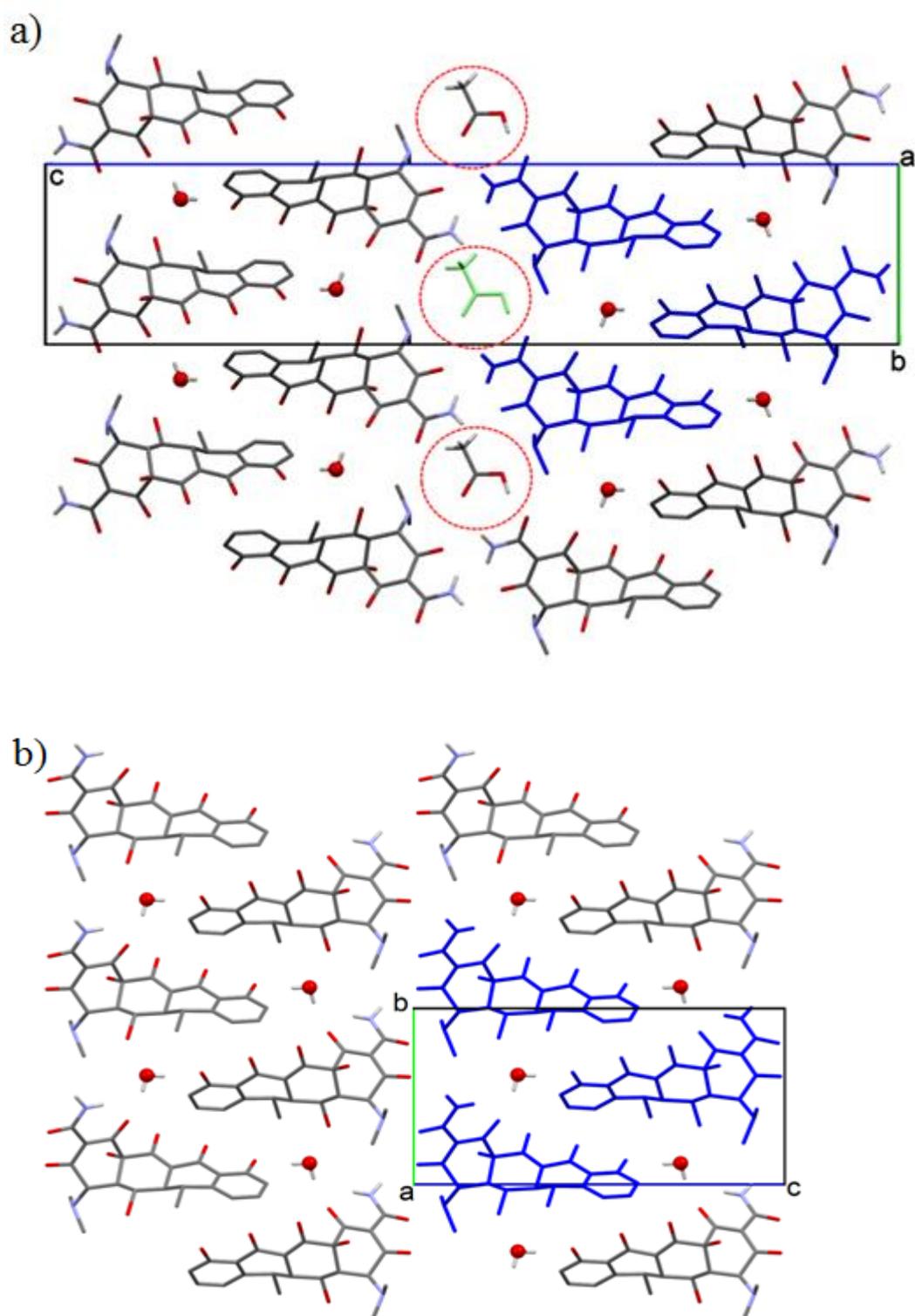


Figura 24- Vista do empacotamento de DOX·HAc·2H₂O (a) e DOX·H₂O (b) no plano *bc*.

Fonte: SANTOS et al.,2014b.

Nota: Alguns hidrogênios foram omitidos para melhor visualização. As moléculas de DOX em azul destacam o “synton” comum definido pela ligação de hidrogênio intermolecular. As moléculas de ácido acético dispostas entre as cadeias formadas pelos “synthons” ao longo do eixo a [010] estão destacadas em círculos vermelhos pontilhados.

Considerando a solubilidade em equilíbrio do DOX.HAc.2H₂O, observa-se que em água, a solubilidade (39(2) g.L⁻¹, pH final de ~ 3) é cerca de 65 vezes maior comparada à DOX.H₂O (0,63(1) g.L⁻¹, pH final de ~ 5). Valores similares foram encontrados para os meios tamponados. Portanto, a exemplo do que já tinha sido observado para o DOX.HYC, mesmo havendo conversão da fase sólida final em equilíbrio com a solução, o processo de dissolução é mais rápido levando a uma maior solubilidade. Além disso, a dissolução de DOX.HAc.2H₂O aumenta abruptamente para ~140 g.L⁻¹ em ambas as concentrações de soluções de HCl aqui testadas. Nestes dois eletrólitos, o DOX.HAc.2H₂O é apenas menos solúvel (cerca de metade) do que DOX.HNO₃.0,5H₂O.

5.1.6 Estudos de estabilidade

As equações de regressão obtidas para as curvas de calibração por cromatografia líquida de alta eficiência (ver ítem 4.1.8.1) e seus coeficientes de correlação, que foram utilizadas para a quantificação de cada forma sólida de DOX no ensaio de estabilidade, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4- Equações da reta obtidas através de curvas de calibração cromatográficas para cada forma de DOX e seus coeficientes de correlação.

Formas sólidas	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
DOX.H ₂ O	$y = 21461x - 20806$	0,9977
DOX.HYC	$y = 19465x - 56176$	0,9989
DOX.HCl.2H ₂ O	$y = 19193x - 51172$	0,9993
DOX.HNO ₃ .0,5H ₂ O	$y = 19263x - 63336$	0,9977
DOX.HAc.2H ₂ O	$y = 20705x - 99613$	0,9990

Fonte: Da autora.

Nota: Comprimento de onda 350 nm.

Já na Tabela 5 é demonstrado que a DOX presente nas novas formas (DOX.HAc.2H₂O e DOX.HNO₃.0,5H₂O) foram mais estáveis do que no DOX.HYC contra a oxidação. A DOX presente nas novas formas também foi mais estável do que na DOX.H₂O contra as hidrólises ácida e básica e também, quando expostas à luz, de acordo com estudos de fotodegradação. Os padrões de DRXP das amostras medidas após o estudo de fotoestabilidade não apontaram nenhuma transição de fase (Figura 25).

Tabela 5- Quantidade resultante de DOX (em %) após os estudos de degradação.

Formas de DOX	DOX·H ₂ O	DOX·HYC	DOX·HCl·2H ₂ O	DOX·HNO ₃ ·0,5H ₂ O	DOX·HAc·2H ₂ O
Oxidação	38,8%	16,4%	41,4%	35,8%	39,4%
Ácida	96,3%	98,8%	100,5%	98,6%	99,9%
Básica	4,6%	10,1%	10,3%	10,6%	15,0%
Neutra	96,5%	100,3%	99,8%	99,8%	96,9%
Foto-estabilidade	97,8%	103,9%	101,4%	100,7%	99,2%

Fonte: Traduzido de SANTOS et al., 2014b.

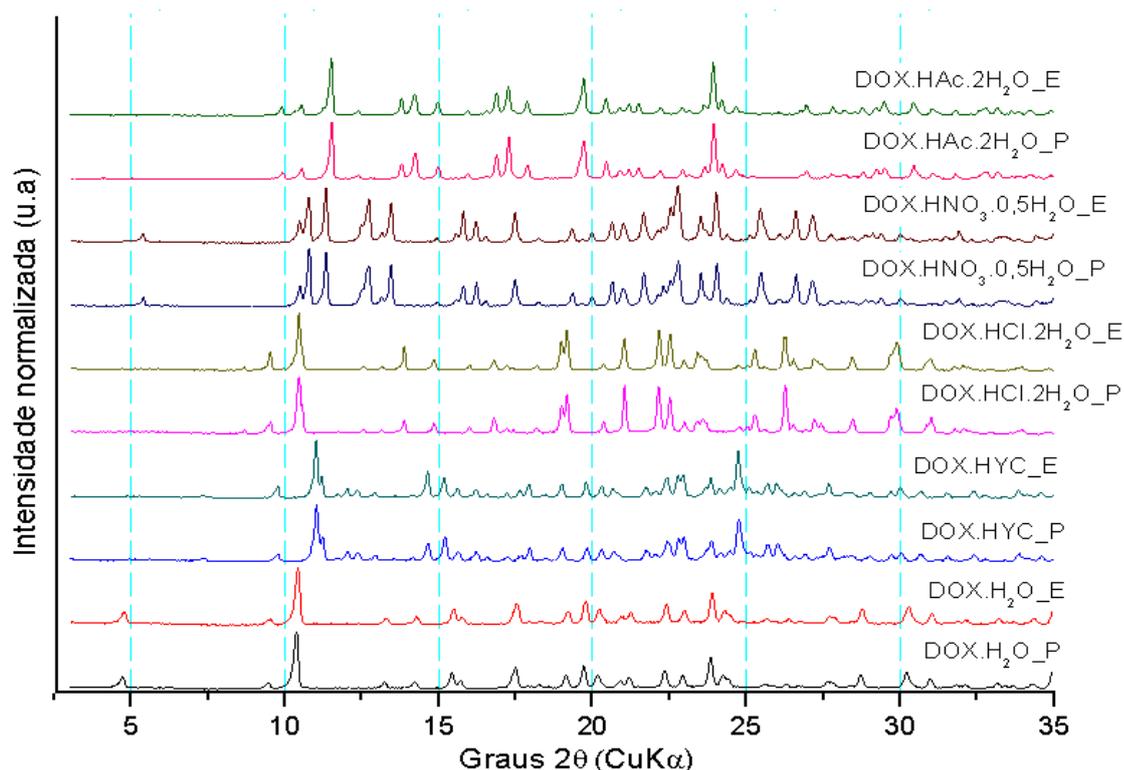


Figura 25- Difractogramas de raios X por policristais do ensaio de fotoestabilidade para as formas de DOX protegidas da radiação UV (P) e expostas à radiação UV (E).

Fonte: Traduzida do material suplementar de Santos et al., 2014b.

As Figuras 26 à 29 apresentam exemplos de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estudo de estabilidade (estresse neutro, ácido, básico e peroxidação respectivamente). As intensidades dos picos de DOX e suas impurezas (produtos de degradação) encontradas nos cromatogramas corroboram com os resultados de quantificação apresentados na Tabela 5.

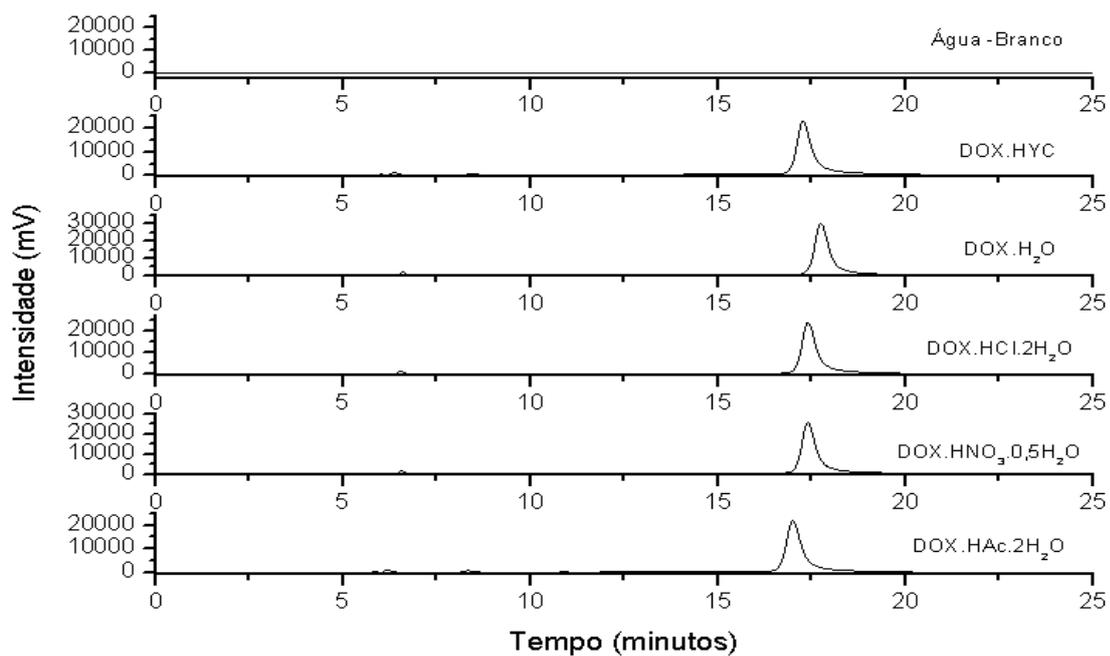


Figura 26- Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estresse neutro. Fonte: Traduzida do material suplementar de Santos et al., 2014b.

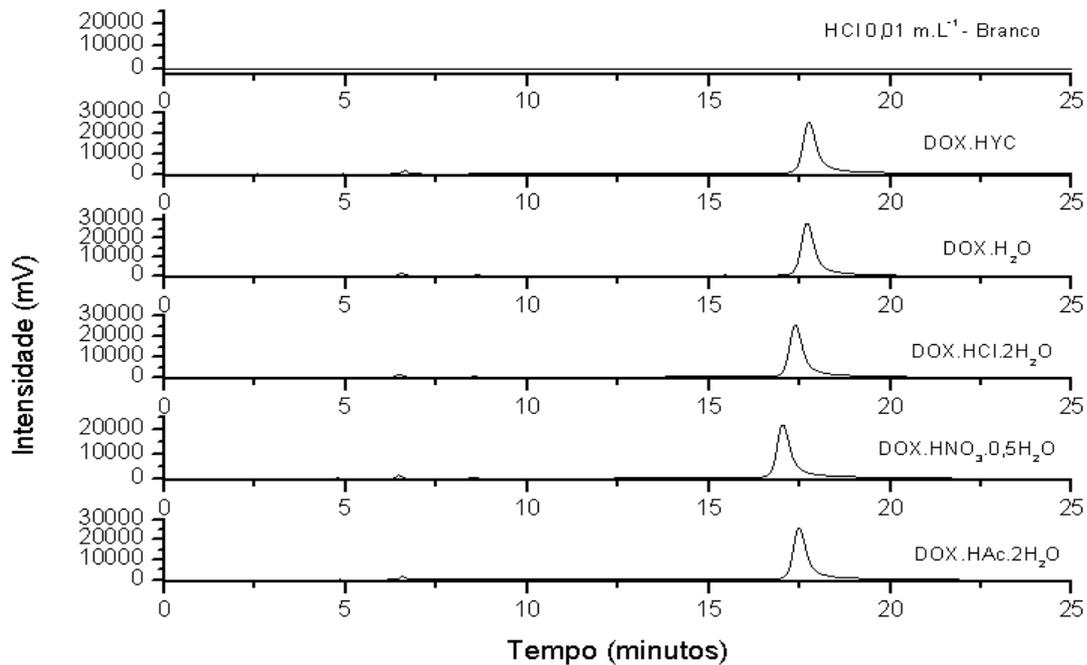


Figura 27- Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estresse ácido. Fonte: Da autora.

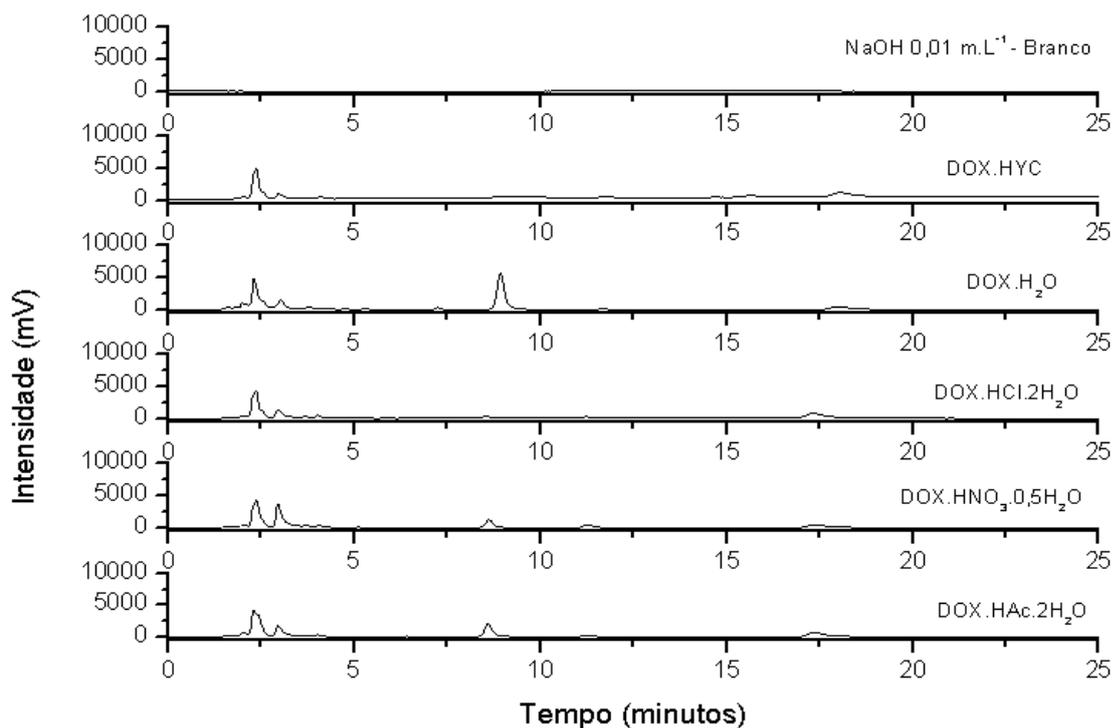


Figura 28- Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após estresse básico.
Fonte: Da autora.

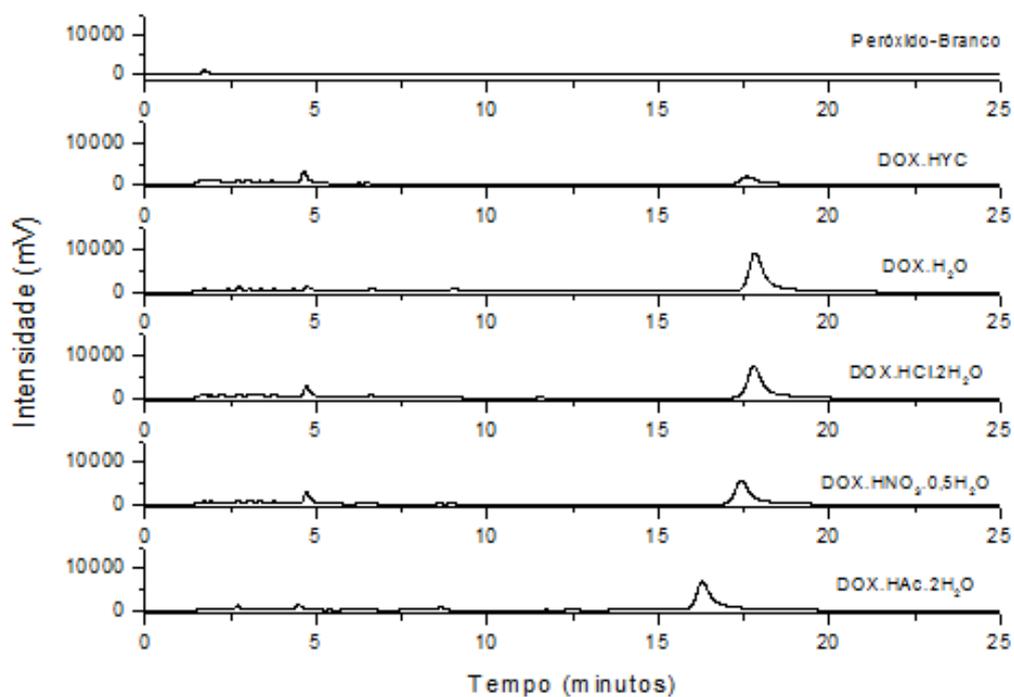


Figura 29- Exemplo de cromatogramas obtidos com as formas sólidas de DOX após peroxidação.
Fonte: Da autora.

5.1.7 Perfis de dissolução

Os perfis de dissolução das cápsulas (Figura 30) foram quantificados tomando-se com referencia, as equações das retas apresentadas na Tabela 3. Os resultados foram expressos como porcentagem de libertação do IFA em função do tempo (min).

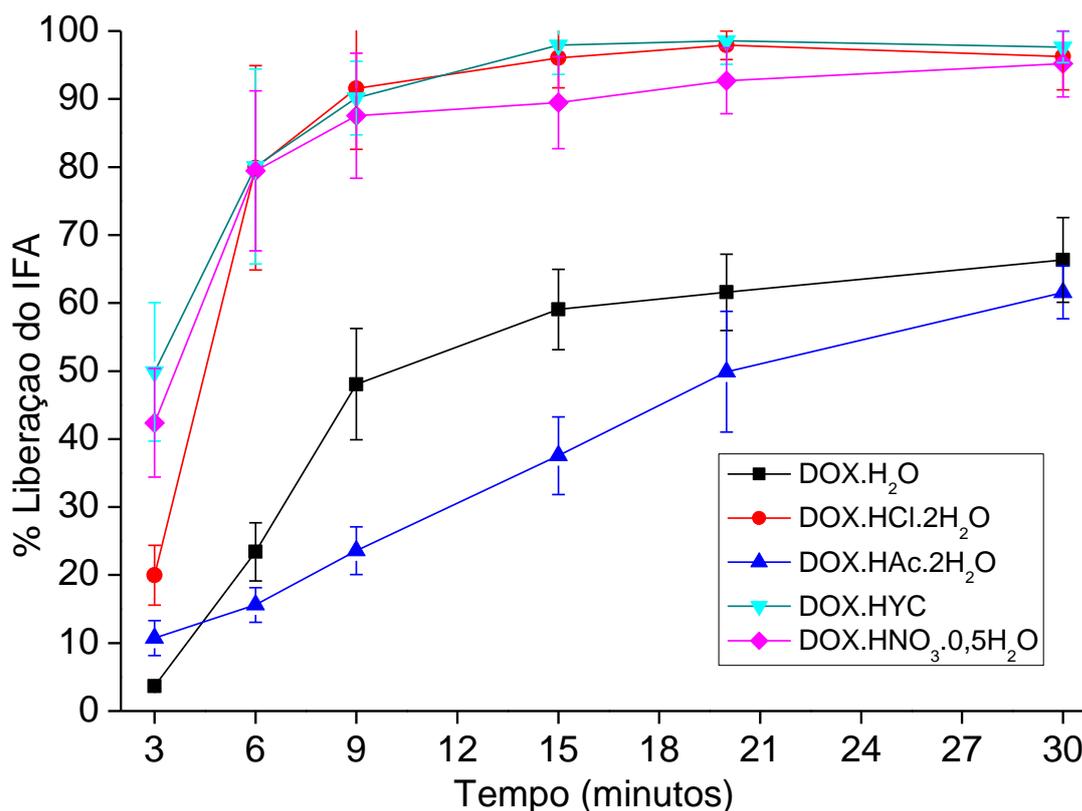


Figura 30- Perfis de dissolução das formas sólidas de DOX em cápsulas.

Fonte: Traduzido de SANTOS et al., 2014b.

Nota: As barras de erro representam os desvios padrões (n=6).

A comparação do fator de semelhança (similaridade) (F2) (item 4.1.10- Equação 1) é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6- Fator de similaridade obtido da comparação entre perfis de dissolução de cada par de formas de DOX em cápsulas.

Perfis de dissolução de formas sólidas de DOX avaliadas	Fator de similaridade (F2)
DOX·H ₂ O vs DOX·HYC	18,4
DOX·H ₂ O vs DOX·HCl·2H ₂ O	20,7
DOX·H ₂ O vs DOX·HAc·2H ₂ O	41,3
DOX·H ₂ O vs DOX·HNO ₃ ·0,5H ₂ O	20,9
DOX·HYC vs DOX·HCl·2H₂O	79,0
DOX·HYC vs DOX·HAc·2H ₂ O	12,8
DOX·HYC vs DOX·HNO₃·0,5H₂O	63,0
DOX·HCl·2H ₂ O vs DOX·HAc·2H ₂ O	14,5
DOX·HCl·2H₂O vs DOX·HNO₃·0,5H₂O	50,2
DOX·HNO ₃ ·0,5H ₂ O vs DOX·HAc·2H ₂ O	15,2

Fonte: Traduzido de SANTOS et al., 2014b.

Observa-se que a DOX.HCl.2H₂O e DOX.HNO₃.0,5H₂O têm perfis de dissolução semelhantes (F₂> 50) entre si e com o DOX.HYC comercial. Com este resultado pode-se dizer que são equivalentes farmacêuticos. Assim, sugere-se a possibilidade de comercialização do nitrato de doxiciclina, considerando o aumento do interesse médico pelo oxianion de nitrogênio (BUTLER; FEELISCH, 2008). Como a dose diária máxima recomendada de doxiciclina é de 200 mg, se a mesma fosse administrada na forma de DOX.HNO₃.0,5H₂O a dose de nitrato diária consumida seria de 28,34 mg. Considerando que os valores de ingestão diária aceitável (IDA) de nitrato estabelecida pela Organização Mundial de Saúde que é até 3,7 mg. kg⁻¹ de peso corpóreo (HAMBRIDGE, 2014) e que a doxiciclina é um antibacteriano indicado para adultos e crianças acima de oito anos (peso médio de 45 kg), o que corresponde a uma ingestão diária máxima de 166,5 mg de nitrato, as 200 mg de DOX diárias do medicamento (na forma de DOX.HNO₃.0,5H₂O) seria responsável por apenas 17,2 % (100*28,34 mg/166,5 mg) da ingestão diária aceitável de nitrato em crianças.

5.1.8 Conclusões parciais

Duas formas cristalinas inéditas de DOX (DOX.HNO₃.0,5H₂O e o DOX.HAc.2H₂O) foram obtidas e caracterizadas por DRXM, DRXP, TG, DSC e IV neste estudo. As suas estruturas cristalinas intra e intermoleculares foram comparadas às três formas cristalinas conhecidas, o DOX.HYC, o DOX.HCl.2H₂O e o DOX.H₂O. Seus diferentes padrões de protonação, tautomerismo e conformerismo foram estudados mostrando haver quatro possibilidades de combinações desses três parâmetros estruturais.

A ordem de solubilidade em equilíbrio meio aquoso avaliada nesse estudo foi: DOX.HNO₃.0.5H₂O >>> DOX.HYC (forma comercial) > DOX.HCl.2H₂O > DOX.HAc.2H₂O >>> DOX.H₂O (forma comercial). Além de ser a forma mais solúvel dentro todas as formas, o DOX.HNO₃.0.5H₂O também mostrou ser tão estável quanto as duas formas comerciais e possuir perfil de dissolução semelhante ao da DOX.HYC. Portanto DOX.HNO₃.0.5H₂O é um IFA potencial para ser incorporado em medicamentos contendo DOX.

5.2 ORBIFLOXACINO

Sugere-se como leitura alternativa e, ou, complementar aos subitens de 5.2, o artigo publicado na revista *Molecules*, 21, 2016, que discute os resultados apresentados nessa tese, intitulado: *Structure, solubility and stability of orbifloxacin crystal forms: hemihydrate versus anhydrate* (SANTOS et al., 2016). No artigo e nos subitens de 5.2 dessa tese, é discutida uma estrutura cristalina inédita do ORBI, a qual também é a primeira a ser reportada para esse IFA e, portanto, poderia ser denominada como forma I do ORBI. Contudo, a resolução e o refinamento estrutural mostraram, inequivocamente, que a estrutura determinada se tratava de uma forma hemidratada e zwitteriônica do ORBI. Portanto, por se tratar de uma forma cristalina multicomponente do tipo IFA+H₂O (hidrato) a fase cristalina apresentada nesse trabalho será denominada como ORBI hemidratado ou forma hemidratada do ORBI. O ORBI hemidratado foi também caracterizado por análises térmicas, FTIR-ATR e DRXP. Esses resultados mostraram que uma forma anidra do ORBI pôde ser obtida sob aquecimento a

partir de sua forma hemihidratada. Assim, o produto de desidratação do ORBI hemidratado foi denominado ORBI anidro ou forma anidra do ORBI. Além da obtenção dos cristais/policristais das formas hemidratada e anidra do ORBI, da caracterização de ambas, e da determinação da estrutura da forma hemidratada, são também apresentados nessa tese de doutorado, os resultados da comparação da solubilidade em equilíbrio das duas formas em diferentes meios contemplando a faixa de pH fisiológico.

5.2.1 Determinação estrutural por difração de raios X por monocristal

Os principais dados cristalográficos referentes à determinação da estrutura do ORBI hemidratado estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Principais dados cristalográficos do ORBI hemidratado.

Forma sólida	Orbifloxacino hemidratado
Fórmula empírica	$C_{19}H_{20}F_3N_3O_3 \cdot 1/2H_2O$
Massa molecular (g. mol⁻¹)	404,4
Temperatura (K)	150 (2)
Comprimento de onda (Å)	0,7173
Sistema cristalino	Ortorrômbico
Grupo de espaço	C222 ₁
Parâmetros de cela	a = 8,471 Å; b = 20,046 Å; c = 21,455 Å $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 90^\circ$
Volume (Å³)	3643,3
Z, Densidade calculada (mg/m³)	4, 1,410
Coefficiente de absorção (mm⁻¹)	0,300
F(000)	1620
Tamanho do cristal (mm³)	0,25 x 0,15 x 0,10
Faixa teta para a coleção de dados (°)	1,90 a 29,49
Varição dos índices de Miller	-11 ≤ h ≤ 11; -27 ≤ k ≤ 25; -29 ≤ l ≤ 28
Reflexões coletadas/únicas	22842 / 4627 [R(int) = 0.0281]
Grau de completude até o teta máximo (25,242)	100 %
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa em F ²
Dados/ restrições/ parâmetros	4627 / 0 / 267
Qualidade do ajuste em F²	1,038
Índices R finais [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0357, wR2 = 0.0885
Índices R (todos os dados)	R1 = 0.0428, wR2 = 0.0940
Parâmetro de Flack	0,0(2)
Maior diferença pico e vale (Å³)	0,281 e -0,206 e.

Fonte: da autora

A Figura 31 mostra a representação ORTEP-3 da unidade assimétrica da estrutura determinada para o ORBI hemidratado.

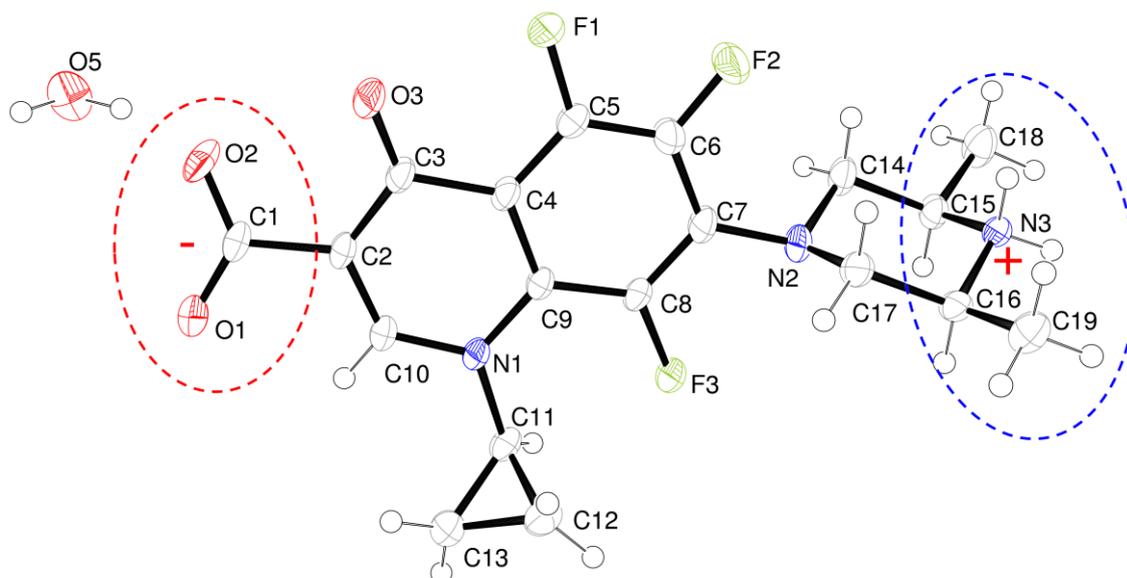


Figura 31- Vista ORTEP-3 da forma hemidratada de ORBI apresentando os átomos com o deslocamento dos elipsóides a um nível de probabilidade de 50%.

Fonte: Da autora a partir do software ORTEP-3.

Nota: Átomos não hidrogenóides foram arbitrariamente rotulados e os átomos de hidrogênio estão mostrados como esferas de raios arbitrários. Os fragmentos protonados e desprotonados da estrutura são destacados por círculos pontilhados em azul e vermelho, respectivamente.

Três aspectos estruturais importantes devem ser destacados antes de se analisar as geometrias intra e intermolecular da estrutura determinada:

a) A estrutura é um hemidrato (meia molécula de água para cada ORBI), pois o oxigênio da molécula de água está em posição especial (cortado pelo eixo de ordem 2 paralelo ao eixo *a*) do Grupo Espacial $C222_1$.

b) A molécula é um zwitteriôn na fase cristalina, tendo o hidrogênio do grupamento carboxílico (desprotonação) transferido para o nitrogênio pirazínico (protonação). A transferência do hidrogênio é inequivocamente comprovada pelos mapas de diferença de Fourier gerados após um refinamento teste sem atribuir hidrogênios tanto aos oxigênios carboxílicos quanto ao nitrogênio pirazínico. Os mapas mostraram a ausência de densidade eletrônica residual próxima aos oxigênios do grupo carboxílico e presença de dois grandes picos próximos ao nitrogênio pirazínico, revelando claramente a presença dos dois hidrogênios ligados ao nitrogênio (Figura 32). Além disso, comprimentos equivalentes das ligações C1-O1 (1,250(3) Å) e C1-O2 (1,251(2) Å), indicam a formação do íon carboxilato (a carga negativa resultante da desprotonação está deslocalizada entre os dois átomos de oxigênio: O1 e O2).

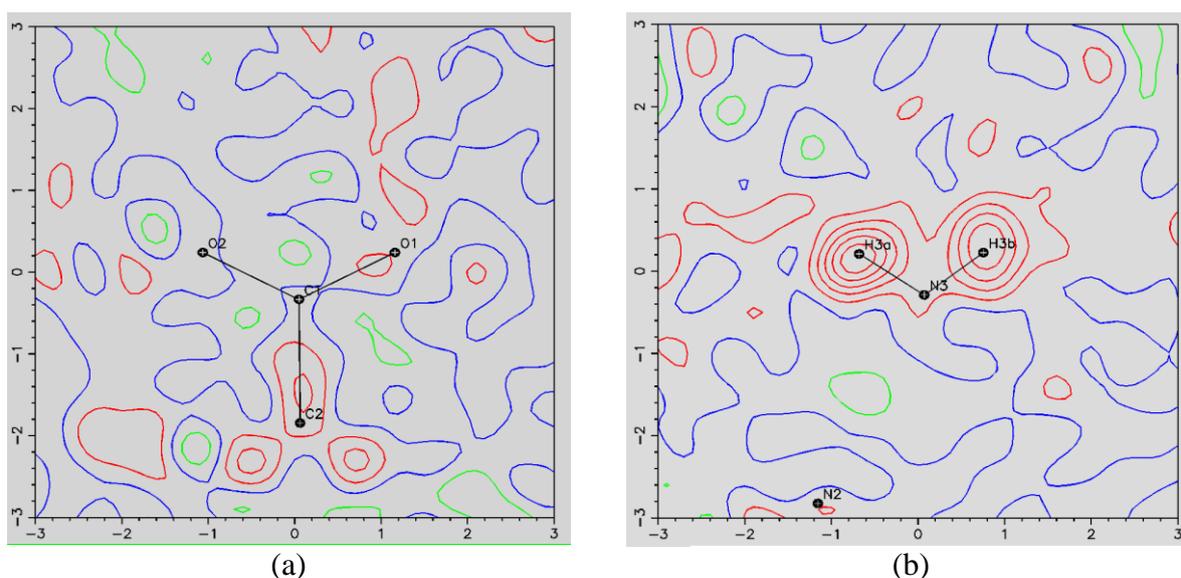


Figura 32- Mapas de densidade residual das porções: (a) carboxílica e, (b) pirazínica, obtido por síntese de Fourier de diferença do ORBI hemidratado.

Fonte: Da autora.

Nota: As cores vermelhas, verdes e azuis mostram os níveis de contorno positivos, negativos e zero, respectivamente. Níveis de contorno correspondem ao intervalo $0,1 \text{ e } \text{Å}^{-3}$.

c) A estrutura cristalina foi resolvida em um grupo espacial não-centrossimétrico ($C222_1$) (Tabela 7). Devido ao ORBI apresentar dois estereocentros (C15 e C16) e estar cristalizado em um grupo especial quiral contendo apenas uma molécula na unidade assimétrica, é esperado que sua estrutura cristalina contivesse apenas um de seus enantiômeros (FLACK, 2003). Entretanto, este não é o caso da estrutura em questão uma vez que o anel pirazínico contendo os dois estereocentros possui um plano espelho interno (através dos átomos N2, N3 e os hidrogênios ligados à N3) que bifurca/corta esta porção em duas metades sobreponíveis. A natureza simétrica surge da presença de dois centros estereogênicos com idêntica substituição, mas com configuração oposta. Portanto, o ORBI é classificado como um *meso*-composto. Como destacado por Hoffmann, os hipotéticos diastereoisômeros de *meso*-compostos podem alcançar a mesma conformação quando operados pela simetria especular ou de inversão (HOFFMAN, 2003). Em outras palavras, as configurações C15(R)/C16(S) e C15(S)/C16(R) do ORBI são equivalentes (sobreponíveis em sua imagem especular interna), considerando a porção pirazínica e portanto não geram isômeros diferentes. Adicionalmente, devido aos anéis quinolina e pirazínico poderem rotacionar entre si em torno da ligação C7-N2, a molécula de ORBI como um todo também não é capaz de gerar isômeros diferentes em função das duas possibilidades estereoquímicas

de C15 e C16. O ORBI é, portanto, opticamente inativo uma vez que a contribuição do efeito *Cotton* dos dois centros estereogênicos anulam-se entre si (HOFMMANN, 2003). Portanto, os átomos C15 e C16 com configuração R e S, respectivamente, apresentados na Figura 31, foram escolhidos arbitrariamente. Passando-se agora para a discussão da geometria intramolecular do ORBI na estrutura determinada, observa-se que seu anel quinolônico é, como esperado, muito planar. O desvio médio quadrático (d.m.q) do plano que passa através dos átomos dos anéis aromáticos fundidos é 0,0623. Os maiores desvios do plano calculado por mínimos quadrados, considerando além dos átomos dos anéis também os seus primeiros vizinhos, ocorrem para O3 (-0,289(3) Å) e C1 (0,295(3) Å). Os oxigênios do carboxilato também desviam significativamente do anel quinolônico (0,167(3) e 0,638(3) Å para O1 e O2, respectivamente).

Apesar de no geral os anéis fundidos terem característica planar, observa-se que há uma dobra no plano dos dois anéis considerando a linha imaginária passando por N1 e C3. O plano calculado através do fragmento contendo C2, C3, C10 e N1 (d.m.q = 0,0062) faz um ângulo de 10,30 (7)° com o plano calculado (d.m.q. – 0,0090) através dos anéis fundidos, incluindo C3 e N1.

O anel pirazínico apresenta conformação em cadeira o que foi confirmado pela análise conformacional realizando o modelo de Evans e Boeyens (BOEYENS; EVANS, 1989). As ligações N2-C7, C15-C18, C16-C19, C14-H14b, N3-H3b e C17-H17a estão em posição equatorial e as demais em posição axial.

A conformação molecular foi analisada usando o MOGUL (BRUNO et al., 2004), uma base de conhecimento derivada da Cambridge Structural Database, CSD (ALLEN, 2002), que fornece rápido acesso a informações sobre valores preferenciais de comprimento, ângulo e torção de ligações químicas nas estruturas. Esse estudo comparativo da geometria intramolecular de estruturas cristalinas de pequenas moléculas inéditas, com a geometria de estruturas similares reportadas no CSD é útil para verificar se há erros de refinamento ou para sondar geometrias incomuns (BRUNO et al., 2004). No caso do ORBI, o estudo mostrou que todos os comprimentos de ligação, ângulo de ligação e ângulos de torção estão de acordo com os valores esperados.

Considerando a geometria supramolecular, um tetrâmero estabilizado por ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo moléculas relacionadas pela simetria de inversão e pelo eixo de simetria de ordem 2 é o bloco de construção (*synthon*) para a forma hemidratada do ORBI (Figura 33). Este *synthon* supramolecular envolve quatro moléculas de ORBI

orientadas diametricamente com um par de moléculas com a extremidade pirazínica e outro par com carboxilato voltados para a parte central do tetrâmero (Figura 33).

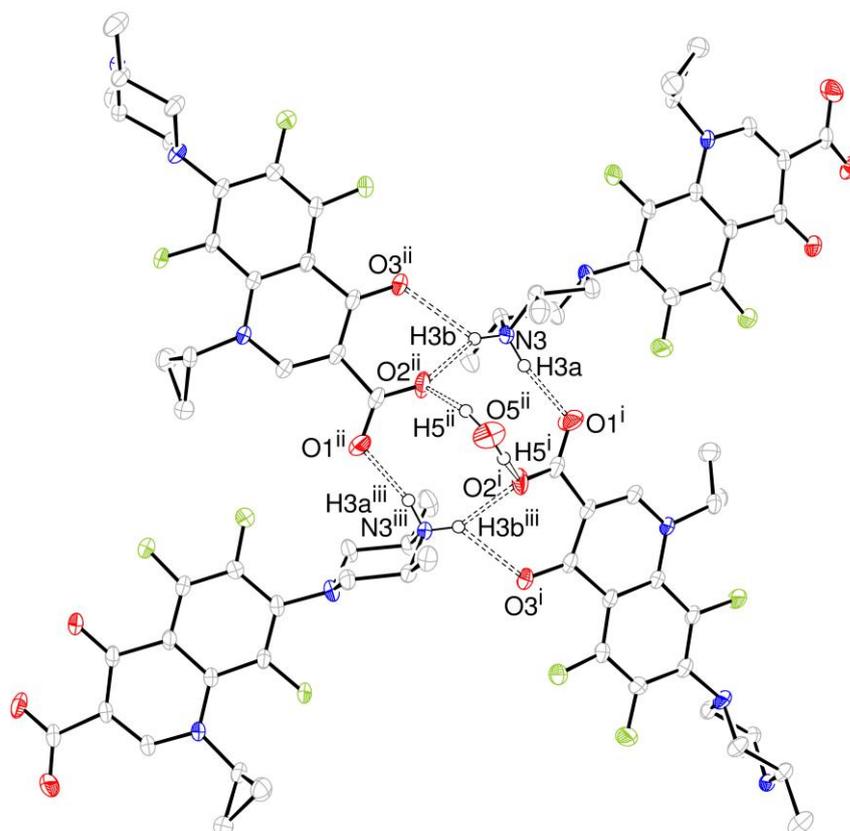


Figura 33- Representação gráfica do tetrâmero de ORBI estabilizado por ligações de hidrogênio (linhas pontilhadas), vista normal ao eixo cristalográfico *a* da célula unitária.

Fonte: Da autora a partir do software ORTEP-3.

Notas: Códigos de simetria: ⁱ $-x+1/2, y-1/2, -z+3/2$; ⁱⁱ $-x+1/2, -y+1/2, z+1/2$; ⁱⁱⁱ $x, -y, -z+2$. Os hidrogênios não envolvidos das ligações de hidrogênio ilustradas foram omitidos para maior clareza da figura.

O nitrogênio pirazínico (N3) atua como doador de ligação de hidrogênio para O1, por meio de H3a, e bifurcadamente para O2 e O3, por meio de H3b. Os dois átomos de hidrogênio da água estão ligados a duas moléculas de ORBI por meio de seus respectivos carboxilatos (O2). Por outro lado, o oxigênio da água não atua como aceptor de ligação de hidrogênio clássica para nenhum átomo nessa estrutura.

Além de ser um aceptor de ligação de hidrogênio clássica ao nitrogênio pirazínico, O1 é também um aceptor de ligação de hidrogênio não-clássica de três carbonos pirazínicos (C14, C17 e C18). As geometrias das ligações de hidrogênio envolvidas no empacotamento estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8- As ligações de hidrogênio para o ORBI hemidratado (Å e °), onde D = doador e A = acceptor.

Ligação de hidrogênio	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(D-H-A)
O5 ⁱⁱ -H5 ⁱⁱ ...O2 ⁱⁱ	0,92(8)	1,98(8)	2,854(3)	159(7)
N3-H3a...O1 ⁱ	0,88(3)	1,86(3)	2,720(2)	164(2)
N3- H3b...O2 ⁱⁱ	0,86(3)	1,94(3)	2,714(2)	150(2)
N3- H3b ...O3 ⁱⁱ	0,86(3)	2,35(3)	2,955(2)	128(2)
C11-H11...O2 ^{iv}	0,98	2,42	3,382 (3)	168,6

Fonte: Da autora.

Nota: d = distância; <(D-H-A) = ângulo. Códigos de simetria como nas Figuras 29 and 32: ⁱ -x+1/2, y-1/2, -z+3/2; ⁱⁱ -x+1/2, -y+1/2, z+1/2; ⁱⁱⁱ x, -y, -z+2, ^{iv} -x, y, -z+3/2.

Considerando o empacotamento como um todo, cada tetrâmero está rodeado por outros quatro, compartilhando as moléculas de ORBI, formando uma rede 2D infinita (camada) paralela ao plano (100) (Figura 34(a)). As esferas vermelhas representando as moléculas de água na Figura 34 coincidem com os pontos de interconexão dos tetrâmeros. Todos pontos de interconexão dos tetrâmeros têm em comum as ligações hidrogênio mostradas na Figura 33. É interessante notar, que as moléculas de água, aparentemente emparedadas pelo tetrâmero (Figura 34(a)), estão na verdade deslocadas para cima ou para baixo ao longo da [100] direção, quando o empacotamento é visto normal ao eixo *b* (Figura 34(c)) ou *c* (Figura 34(b)) da célula unitária.

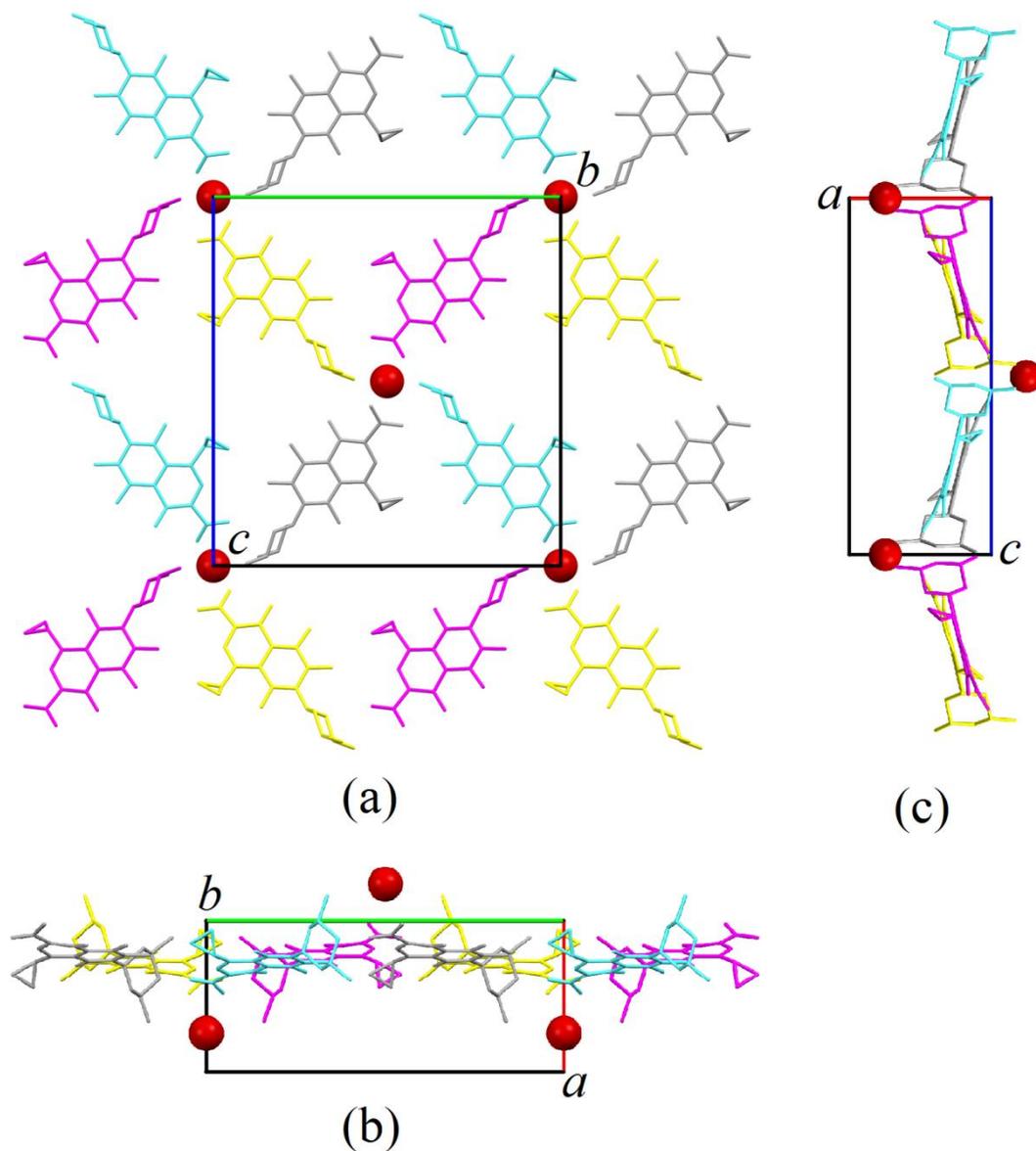


Figura 34- Empacotamento parcial da forma de hemidratada do ORBI projetado perpendicular aos planos (a) (100), (b), (001), e (c) (010), os quais mostram a formação de uma camada normal ao eixo a da célula unitária.

Fonte: Da autora.

Notas: A camada foi gerada a partir da unidade assimétrica aplicando as operações de simetria incluídas na legenda da Figura 33. O esquema de cores refere-se a quatro das oito posições equivalentes por de simetria do grupo espacial $C222_1$. Átomos de oxigênio da água são representados como esferas vermelhas.

Apesar das mudanças observadas, as moléculas de água permanecem ligadas à camada pela ligação de hidrogénio que envolve o oxigênio carboxilato (O2) (ver Figura 33). O empilhamento das camadas é governado pelo eixo parafuso 2_1 paralelo ao eixo c da célula unitária. Portanto, as camadas empilhadas ao longo das direções [100] alternam translações de $c/2$, uma em relação a outra. Assim, o centro do tetrâmero localizado nas posições $(x, 0, 0)$,

$(x, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$, $(x, 1, 0)$, $(x, 0, 1)$ e $(x, 1, 1)$ na camada mostrada na Figura 34 é deslocada para as posições $(x, 0, \frac{1}{2})$, $(x, \frac{1}{2}, 0)$, $(x, 1, \frac{1}{2})$, e $(x, \frac{1}{2}, 1)$ nas camadas empilhadas abaixo ou acima da mesma.

Observa-se claramente que as águas de cristalização ocupam os canais paralelos ao eixo a da célula unitária coincidindo com as posições dos centros do tetrâmero (que também são seus pontos de interconexão). Devido ao oxigênio da água estar em uma posição cristalográfica especial do grupo de espaço $C222_1$ (frações coordenadas $x, \frac{1}{2}, \frac{1}{2}$), os canais coincidem com a posição dos eixos de ordem 2 paralelo ao eixo a da célula unitária. Logo abaixo será discutido que a forte estrutura supramolecular em camadas é mantida mesmo sem a presença de água no canal (quando o ORBI anidro é obtido a partir do hidratado sob aquecimento) e, portanto, a matriz estrutural do ORBI hemidratado tem comportamento semelhante às de zeólitas.

O empilhamento das camadas é estabilizado por ligações de hidrogênio não-clássicas envolvendo a molécula de ORBI inter-camadas. O hidrogênio metínico do ciclo propil funciona como um doador de ligação de hidrogênio para O2 (Figura 35). Portanto, O2 é um acceptor de ligação de hidrogênio trifurcado uma vez que também é um acceptor para o oxigênio da água e para o nitrogênio pirazínico (Figura 33). As interações π -aril- π -aril com centróides ($Ct1 \dots Ct1^{iv}$, $IV = -x, y, z + 3/2$) separadas por 3.580 Å também participam da estabilização inter-camadas.

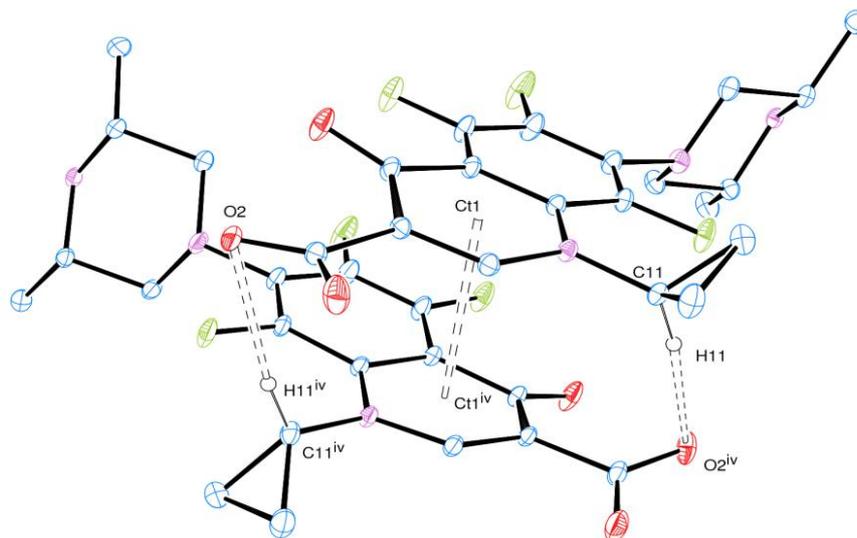


Figura 35- Vista ORTEP-3 dos contatos intermoleculares inter-camadas estabilizados por ligações de H não-clássicas e interações π -aryl- π -aryl (linhas pontilhadas).

Fonte: Da autora.

Notas: Ct é o centróide calculado do anel aromático. Os átomos de hidrogênio não envolvidos nas ligações de hidrogênio destacadas foram omitidos para maior clareza. Código de simetria: ^{iv} -x, y, -z+3/2.

5.2.2 Difração de Raios X por policristais (DRXP)

O padrão de DRXP calculado do ORBI hemidratado utilizado nos estudos comparativos realizados foi gerado a partir da estrutura cristalina resolvida neste trabalho a partir dos dados de DRXM. A complementaridade entre estes dois métodos de difração é bem conhecida sendo crucial para estudar polimorfos ou formas diferentes de IFAs (BONFILIO et al., 2014; PHADNIS; CAVATUR; SURYANARAYANAN, 1997; MAURIN et al., 2007; CRISP; DANN; BLATCHFORD, 2011). A utilização combinada destes dois métodos torna-se ainda mais importante dada a ausência de uma estrutura de ORBI depositada no banco de dados Cambridge (CSD). Portanto, a estrutura cristalina aqui determinada foi considerada um pré-requisito para a condução dos estudos subsequentes apresentados nessa tese de doutorado.

A Figura 36 mostra que os padrões de DRXP experimentais do padrão Sigma e da matéria-prima ORBI são sobreponíveis, indicando que as duas amostras cristalizam com a mesma fase cristalográfica. Além disso, ambos os padrões coincidem com o DRXP calculado da forma hemidratada do ORBI. Devido a ausência de halos alargados, indicativos de fases

amorphas e de picos extras não indexados pela fase do ORBI hemidratado, é possível dizer que o padrão Sigma e a matéria-prima do ORBI são monofásicos.

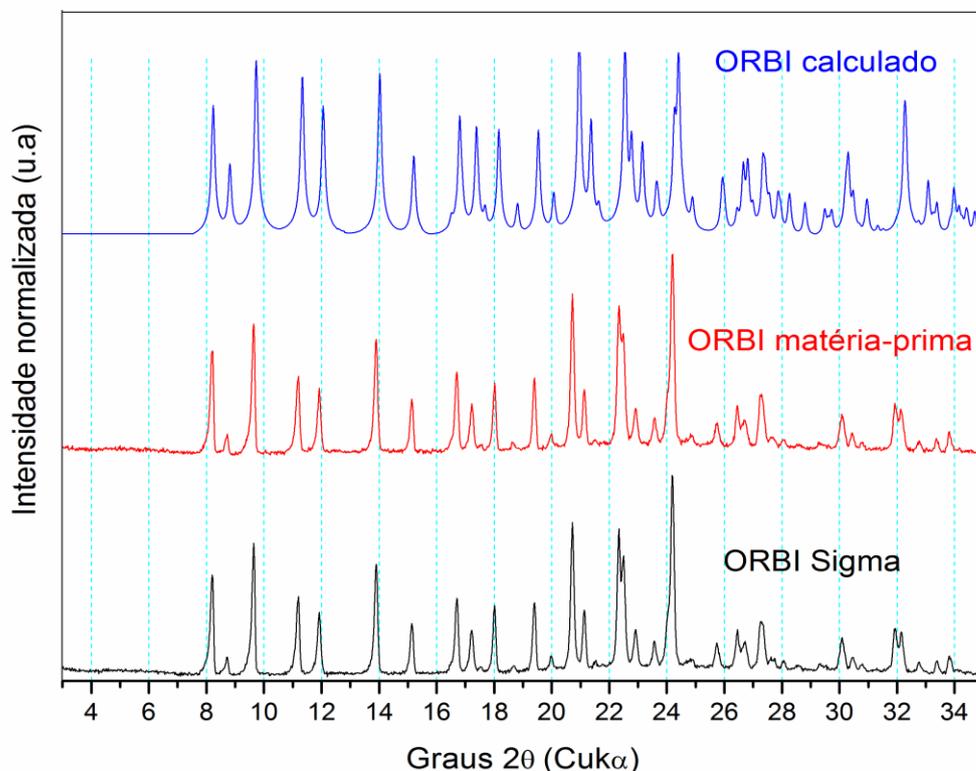


Figura 36- Difratomogramas de raios X experimentais do padrão Sigma (preto) e da matéria-prima do ORBI (vermelho) comparados com o calculado (azul) a partir da estrutura do ORBI hemihidratado.

Fonte: Da autora a partir do software MERCURY.

Nota: O padrão DRXP calculado, foi gerado a partir da estrutura cristalina determinada a 150 K (Tabela 7) por isso seus picos de Bragg estão ligeiramente deslocados para a direção a direita em relação aos picos dos difratogramas experimentais, obtidos à temperatura do ambiente (298 K).

5.2.3 Análise térmica

As curvas TG/DTA obtidas para o padrão Sigma do ORBI mostraram, como esperado, uma perda de massa inicial correspondente à desidratação da amostra (0,5 mol de água por mol de ORBI: $T_i = 75\text{ °C}$; $T_f = 104\text{ °C}$; $\Delta m_{TG} = 2,1\%$ / $\Delta m_{calc} = 2,23\%$) (Figura 37). Portanto, os resultados de TG/DTA corroboram os resultados de DRXP, indicando que a fase cristalina presente nas duas amostras é o ORBI hemihidratado. O produto desidratado (ORBI

anidro) é estável até ~ 260 ° C, temperatura a partir da qual começa a sua decomposição térmica (pico DTA em 269 ° C).

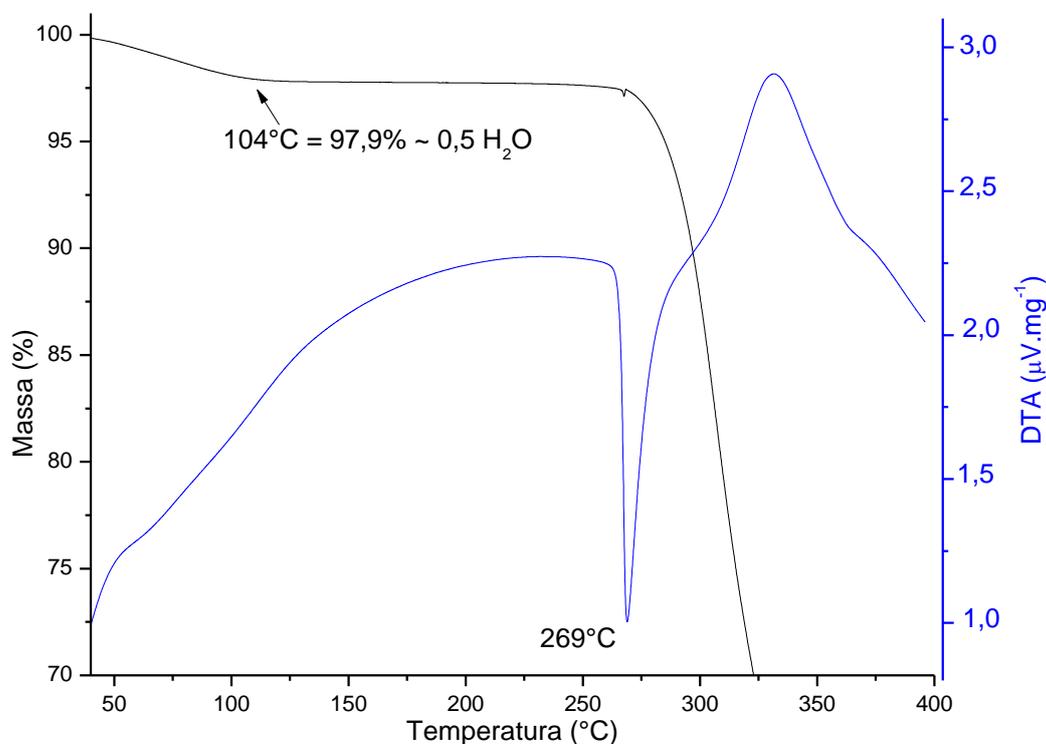


Figura 37- Curvas de TG (preto) e DTA (azul) obtidas na faixa de 40 a 400 °C iniciando com o ORBI hemihidratado.

Fonte: Da autora.

Nota: A seta mostra a temperatura da completa perda de água da estrutura.

5.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Considerando que os resultados de TG/DTA indicaram duas fases sólidas distintas para o ORBI (hemidratada e anidra), dados de FTIR-ATR foram obtidos para amostras de padrão Sigma do ORBI sem (como recebido) e com o tratamento térmico *ex-situ* (após aquecimento de 10 mg do padrão Sigma do ORBI por 2h a 105 °C). Os espectros de FTIR-ATR das amostras, antes e depois do aquecimento, são apresentados na Figura 38.

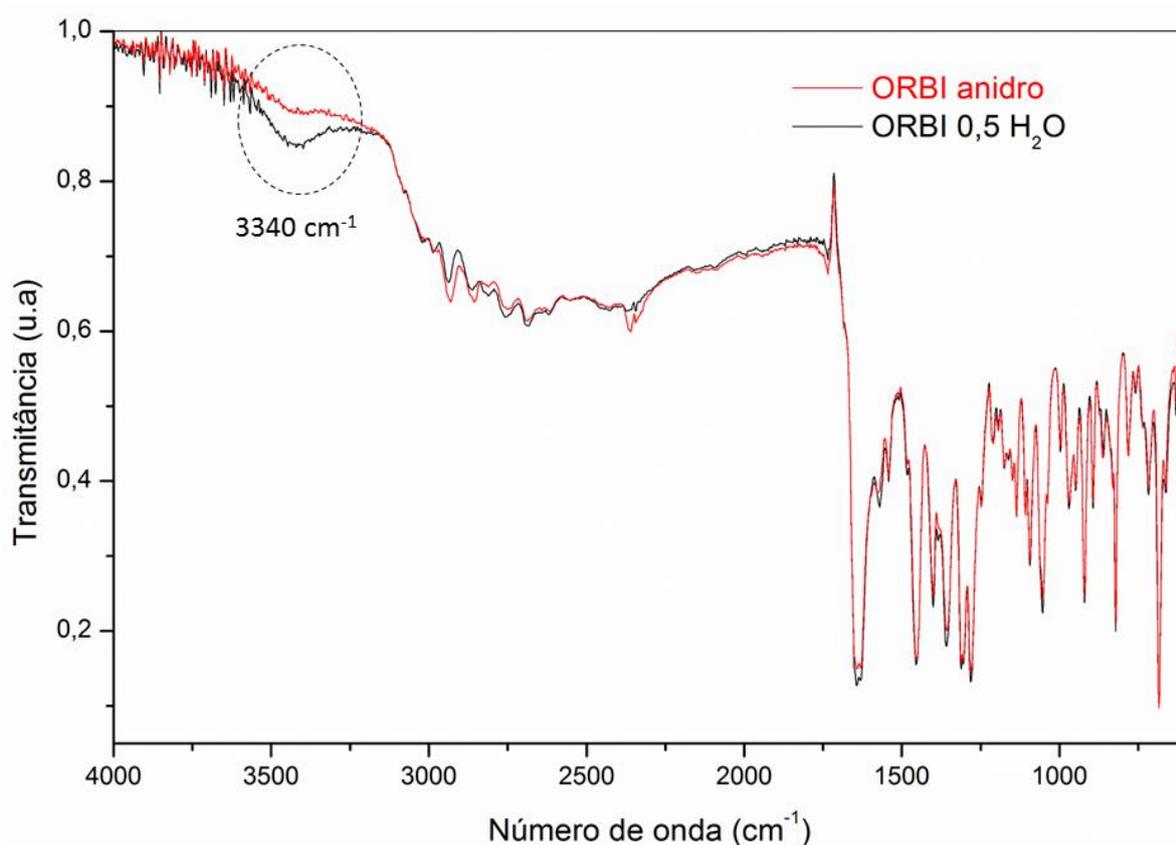


Figura 38- Espectros FTIR-ATR do ORBI anidro (vermelho) e hemidratado (preto).

Fonte: Da autora.

Nota: A banda relacionada à molécula de água presente na estrutura da fase hemihidratada, observada em 3340 cm^{-1} , está destacada pelo círculo pontilhado.

As bandas características da molécula de ORBI foram atribuídas com base no trabalho de Sahoo e colaboradores (SAHOO et al., 2011). A banda na região de 3446 cm^{-1} refere-se às vibrações -OH do radical carboxila, enquanto as bandas entre 3018 e 2763 cm^{-1} podem ser atribuídas às deformações axiais da ligação C-N da piridina. A banda de forte intensidade na região de 1700 cm^{-1} é referente ao radical C=O do ácido carboxílico. Na região de 1050 à 1000 cm^{-1} aparecem as deformações axiais dos grupos C-F e abaixo de 1000 cm^{-1} as deformações angulares fora do plano de $\text{-CH}_{\text{aromático}}$.

A diferença significativa entre os dois espectros está em 3340 cm^{-1} , região de deformação axial da molécula de água. Como esperado, ocorre uma atenuação desta banda larga presente no ORBI hemidratado no espectro do ORBI anidro.

5.2.5 Estudo de interconversão entre as formas anidra e hemidratada do ORBI

A Figura 39 compara as curvas TG do padrão Sigma do ORBI como recebido (forma hemidratada), após o aquecimento (forma anidra), e após aquecimento seguido de tratamento durante 1h em câmara climática a 40 °C e 75% de umidade relativa (forma reidratada), como descrito em 4.2.7. A curva TG da amostra aquecida *ex-situ* a 200 °C não mostra a perda de massa na faixa observada para a forma hemidratada do ORBI. Portanto, a forma anidra de ORBI pôde ser obtida aquecendo-se a forma hemidratada na faixa de temperatura de 104-269 °C. É interessante notar que a curva TG de uma amostra reidratada não apresenta diferença em relação a curva do padrão Sigma do ORBI analisado como recebido (forma hemidratada). Portanto, a forma anidra do ORBI pode facilmente retornar à fase hemidratada se exposta em ambientes de altas temperaturas e umidade.

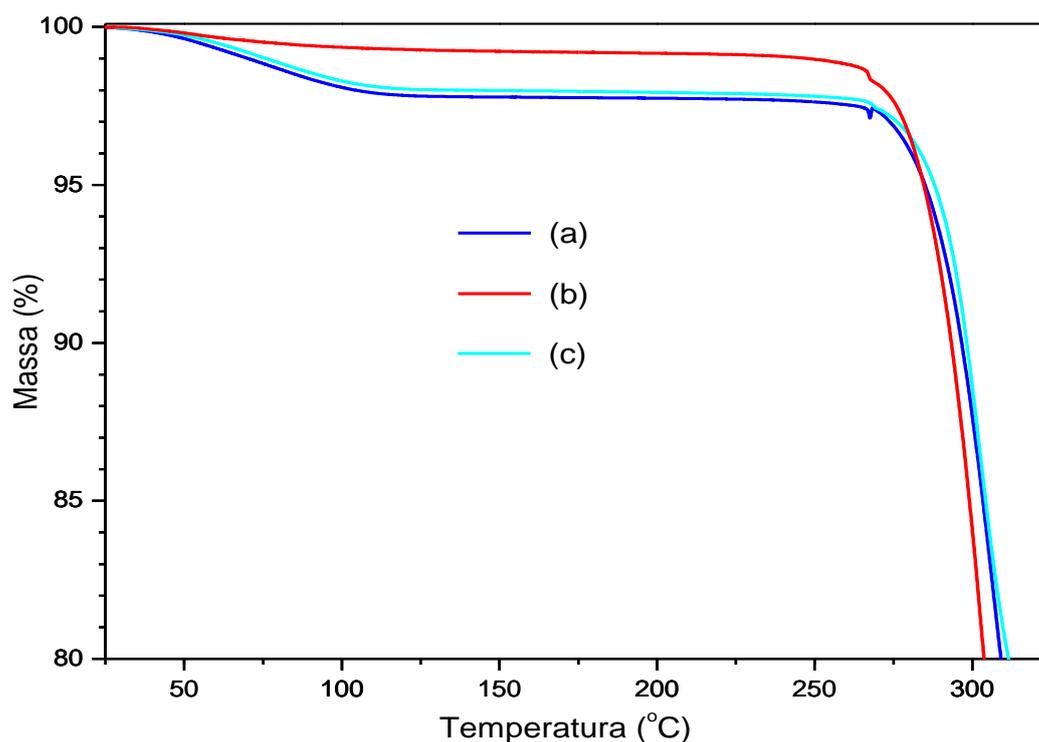


Figura 39- Curvas TG: (a) ORBI padrão Sigma como recebido (hemidratada); (b) ORBI padrão Sigma após aquecimento a 200°C por 1h (anidra) e (c) ORBI padrão Sigma após aquecimento a 200 °C por 1h seguido por tratamento durante 1h em câmara climática à 40°C com 75% de umidade relativa (reidratada).

Fonte: Da autora.

Apesar da interconversão de fases anidro-hidrato do ORBI mostrada pelos resultados de infravermelho e análises térmicas, o padrão experimental de DRXP da amostra aquecida *ex-situ* a 200 °C mantém todos os picos de Bragg presentes no padrão calculado a partir da estrutura da forma hemidratada do ORBI (Figura 40(c)). Este resultado aponta para a não ocorrência de transição cristalográfica durante a transição de fase anidro-hidrato. Ou seja, a matriz estrutural observada para a estrutura do ORBI hemihidratado discutida no item 5.2.1 é a mesma com ou sem a presença da água na estrutura. Assim, as formas hemihidratada e anidra do ORBI podem ser consideradas cristais isomórficos (HOFFMANN, 2003). Apesar de não provocar uma transição cristalográfica, a liberação da água causa ligeiras distorções estruturais. Tal afirmação é sustentada pela observação do alargamento de alguns picos de Bragg no difratograma experimental do ORBI anidro. Especificamente, os picos de Bragg com $h \neq 0$ apresentam-se mais alargados do que os 0kl, sugerindo que a desidratação do ORBI hemihidratado é seguido por uma pequena perda anisotrópica de cristalinidade ao longo do eixo *a* da célula unitária.

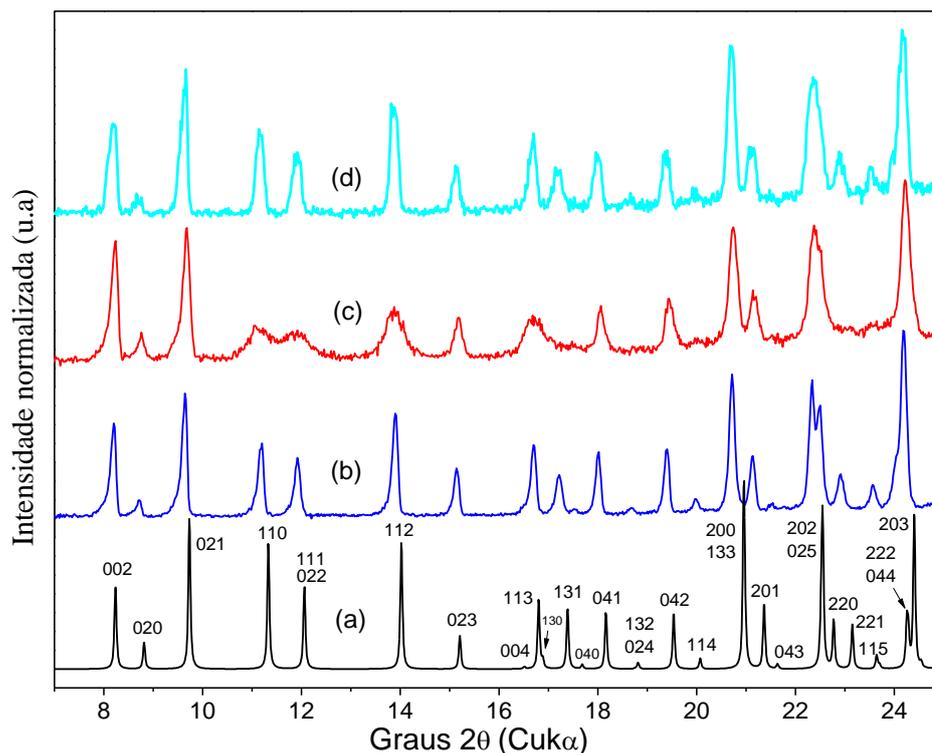


Figura 40- Dados de DRXP do ORBI: (a) hemidratada calculada (Os índices de Miller que identificam os picos de Bragg foram incluídos); (b) experimental do padrão Sigma como recebido (forma hemidratada); (c) experimental do padrão Sigma após aquecimento a 200 °C durante 1h (forma anidra); (d) experimental do padrão Sigma após aquecimento a 200 °C (por 1h seguido por tratamento em câmara climática à 40 °C com 75% de umidade relativa também por 1 h (forma reidratada).

Fonte: Da autora.

Nota: O padrão de DRXP calculado, gerado a partir da estrutura cristalina determinada a 150 K apresenta, como esperado, seus picos de Bragg ligeiramente deslocados para a direita em relação aos picos correspondentes dos difratogramas experimentais, obtidos à temperatura ambiente (298 K).

O fato do processo de desidratação ocorrer sem haver mudanças cristalográficas significativas da matriz estrutural determinada para o ORBI hemihidratado, pode ser explicado, em termos do seu empacotamento cristalino discutido no item 5.2.1. Deve-se resgatar o fato de as moléculas de água do ORBI hemidratado situarem-se nos canais gerados pelos tetrâmeros de moléculas de ORBI, e que elas estão ligadas às moléculas de ORBI apenas como doadores de ligação de hidrogênio. Além disso, a estrutura do tipo camada formada pelos tetrâmeros supramoleculares de moléculas de ORBI são relativamente estáveis devido às ligações de hidrogênio presentes. Essas duas características, são provavelmente responsáveis pelo processo de dessorção da água ORBI não perturbar a estrutura da matriz de moléculas de ORBI. Além disso, a estabilidade intra-camada pode explicar o pequeno alargamento dos picos de Bragg com índices de Miller $0kl$, em comparação aos de $h \neq 0$,

observado no padrão de DRXP experimental da forma anidra de ORBI. A presença de água parece ser mais importante para a estabilidade inter-camada, funcionando como uma molécula de intercalação na estrutura hospedeira de camadas, da matriz estrutural de moléculas de ORBI. Isso explica o alargamento preferencial dos picos de Bragg que depende do eixo a da célula unitária (índices hkl com $h \neq 0$).

As análises por DRXP corroboraram a reidratação da forma anidra de ORBI após ser inserida dentro da câmara climática e seu retorno a fase da forma hemidratada do ORBI. Essa afirmação baseia-se no fato de os picos largos (índices hkl com $h \neq 0$) observados no padrão de DRXP da amostra anidra (Figura 40(c)) voltaram a serem estreitos como os do ORBI hemidratado (Figura 40(b)), no padrão de DRXP da amostra reidratada (Figura 40(d)). Assim, a estrutura porosa (canais ao longo do eixo a) da matriz de moléculas de ORBI favorece também o processo inverso de adsorção de água, sem, mais uma vez, perturbar a estrutura cristalina. Portanto, a estrutura cristalina do ORBI pode ser considerada um IFA nanoporoso com características de fácil adsorção/dessorção de água. Este fato também pode ser explicado pelo tamanho do volume do poro do ORBI hemidratado sem a molécula de água que é 1,7% do volume total (calculado pelo programa Mercury), pois canais de solvatos com volumes menores que 10% tendem a não se colapsarem durante a remoção do solvente (NESTERENKO; BONDAR; ERSHOV, 1994).

É importante salientar que a adsorção/dessorção de água de um material cristalino pode ser de três tipos: i) a estrutura cristalográfica pode sofrer pouca ou nenhuma mudança, ii) uma mudança reversível, iii) ou uma mudança irreversível. Adsorção/dessorção de água sem mudanças na estrutura cristalina é bem relatada para materiais zeolíticos (SIMONOT-GRANGE, 1979). Da mesma forma, IFAs solvatados e dessolvatados podem ter a mesma estrutura cristalina com variações relativamente pequenas nos parâmetros da rede e coordenadas atômicas (BYRN et al., 1995). Quando a estrutura é mantida durante os processos de adsorção/dessorção de água, é geralmente mais difícil distinguir entre as formas hidratadas e anidras por DRXP (BYRN et al., 1995). Felizmente, as formas hidratadas e anidras de ORBI puderam ser distinguidas por DRXP por meio da comparação das larguras dos seus picos de Bragg (hkl com índices $h \neq 0$).

5.2.6 Caracterização dos comprimidos de ORBI

Comprimidos de ORBI (ORBAX®) foram triturados e analisados por DRXP (Figura 41). É importante destacar que a quantidade de excipientes (em massa) é maior do que a do IFA nos comprimidos (o peso médio ($n = 20$ comprimidos) igual a 296,7 mg, isto é, 22,7 mg de orbifloxacino e 274 mg de excipientes). Além disso, os comprimidos contêm outros compostos cristalinos, tais como lactose monohidratada, que podem complicar a identificação do IFA (Figura 41). Apesar das duas dificuldades apontadas, foi possível identificar os picos de Bragg presentes no DRXP calculado do ORBI hemihidratado no difratograma experimental do ORBAX (comparação feita no canto superior esquerdo da Figura 41). Embora os índices com $h \neq 0$ notoriamente tenham largura compatível com a forma hemidratada do ORBI, a presença das fases cristalinas correspondentes aos excipientes impede ser conclusivo em relação a fase cristalina do IFA no ORBAX. Ou seja, se ela é hemihidratada, anidra ou a mistura delas.

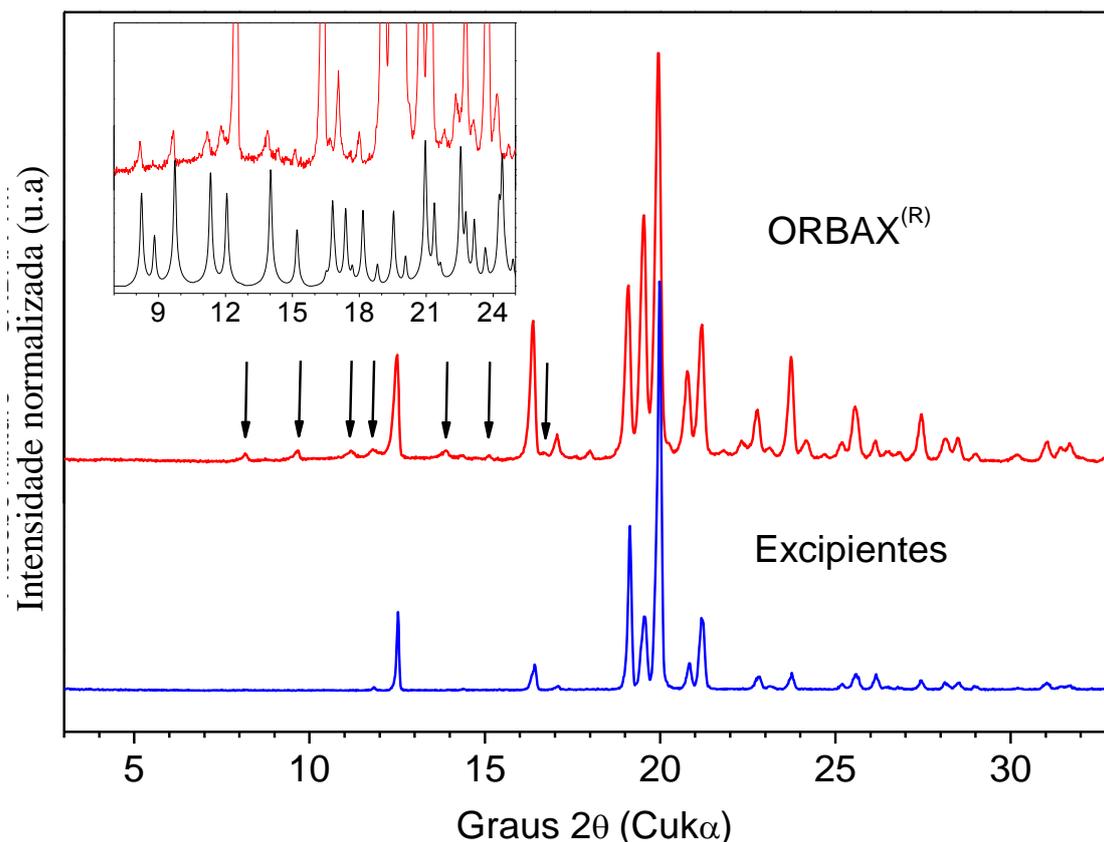


Figura 41- Padrões de DRXP experimentais dos excipientes (em azul) e dos comprimidos ORBAX® (em vermelho) com dosagem declarada de 22,7 mg de ORBI.

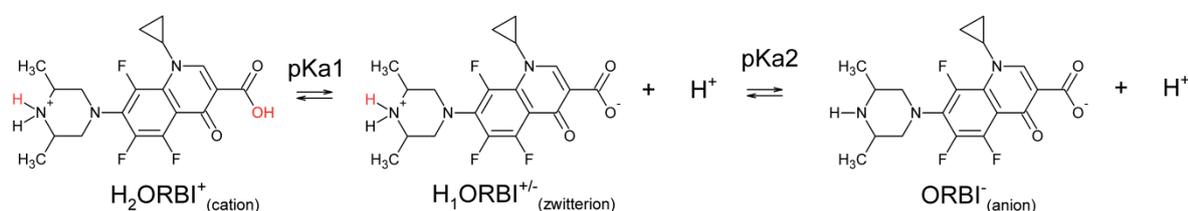
Fonte: Da autora.

Nota: O difratograma inserido no canto superior esquerdo é um zoom na faixa de 8-25 °2θ comparando o padrão de DRXP experimental do ORBAX® com o calculado para a forma hemidratada do ORBI.

Infelizmente, os resultados análise térmica e espectroscopia na região do infravermelho que se mostraram úteis para comprovar que o padrão Sigma e a matéria-prima do ORBI era a sua forma hemihidratada, não se mostraram úteis no caso dos comprimidos (ORBAX®). Essa limitação deveu-se à quantidade relativa de ORBI em comparação com os excipientes e a presença de componentes cristalinos hidratados nos excipientes (por exemplo, lactose monohidratada). A percentagem calculada de perda de água a partir do ORBI nos comprimidos (excipientes + IFA) é de apenas 0,16%, o que está baixo da margem de erro da técnica de termogravimetria.

5.2.7 Estudos de solubilidade das formas hemidratada e anidra de ORBI

A molécula de ORBI possui duas constantes de dissociação ácida: $pK_{A1} = 5,6$ para o grupo 3-carboxílico, e $pK_{A2} = 8,9$ para o grupo 3,5-dimetilpiperazinil, conforme ilustrado no Esquema 2 (O'Neil, 2006). Como tal, três espécies ácido-base pH dependentes são possíveis em meios aquosos. Assim, dependendo do pH, o ORBI pode ser cristalizado como uma forma zwitteriônica neutra ou como sais aniônicos ou catiônicos.



Esquema 2- Constantes de dissociação ácida para o ORBI.
 Fonte: Da autora

É importante ressaltar que a molécula ORBI é zwitteriônica nas duas formas do estado sólido descritas neste trabalho (hemihidratada e anidra). Além disso, considerando a distribuição das espécies ácido-base de ORBI, dependentes do pH, a zwitteriônica ($\text{H}_1\text{ORBI}^{+/-}$), é esperada ser predominante na faixa pH entre o pK_{A1} e pK_{A2} (Figura 42).

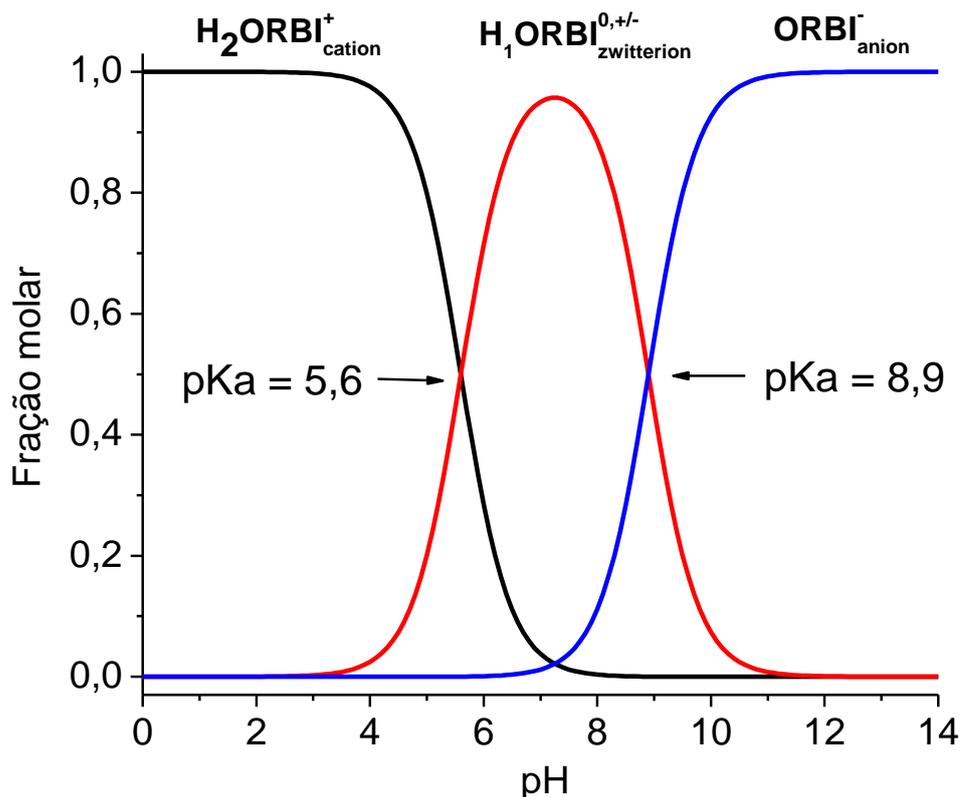


Figura 42- Distribuição das espécies ácido-base pH-dependentes do ORBI.

Fonte: Da autora.

Nota: A fração molar (α) de cada espécie foi calculada como segue:

$$\alpha_2 = \frac{[H_2ORBI^+_{(cation)}]}{C} = \left[1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2} \right]^{-1}; \quad \alpha_1 = \frac{[H_1ORBI^{+/-}_{(zwitterion)}]}{C} = \alpha_2 \frac{K_1}{[H^+]};$$

$$\alpha_0 = \frac{[ORBI^-_{(anion)}]}{C} = \alpha_2 \frac{K_1K_2}{[H^+]^2}; \quad \text{onde } \alpha_0 + \alpha_1 + \alpha_2 = 1 \text{ e } C = [H_2ORBI^+_{(cation)}] + [H_1ORBI^{+/-}_{(zwitterion)}] + [ORBI^-_{(anion)}]. \text{ Curvas passo de pH de } 0,1.$$

Por conseguinte, é esperado que a solubilidade do ORBI na faixa de pH neutro (prevalência de zwitterions) seja menor do que faixa de pHs ácidos ou alcalinos (prevalência das formas catiônicas ou aniônicas). De acordo com estas expectativas, para ambas as formas (hemihidratada e anidra), os menores valores de solubilidade em equilíbrio foram observados em meios neutros, incluindo a água (pH = 7) e os tampões pH 5,8, 6,8, e 7,5 (Tabela 8 e Figura 43). Também como esperado, considerando a distribuição, em solução, das espécies ácido-base de ORBI, os valores de solubilidade em equilíbrio do ORBI (para ambas as formas sólidas) aumentaram significativamente tanto nos meios contendo ácido clorídrico quanto no meio tampão pH 4,8. Atingiu-se um valor de solubilidade em HCl $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH final = 2) quase 20 vezes maior do que em água (Tabela 9 e Figura 43).

Tabela 9- Solubilidade, classe farmacopeica e pH final das soluções em equilíbrio após 48 horas.

Meio	Hemi- dratado (g.L ⁻¹)	D.P (g.L ⁻¹)	Classe*	Anidra (g.L ⁻¹)	DP (g.L ⁻¹)	Classe*	Anidra/ hemidratada (%)	pH Final [†]
Água	1,32	0,0678	PS	1,38	0,06634	PS	4,38	7,0
pH 7,5	1,58	0,0644	PS	1,64	0,05327	PS	3,80	7,5
pH 6,8	1,52	0,039	PS	1,59	0,07758	PS	4,60	7,0
pH 5,8	1,73	0,0601	PS	1,98	0,07915	PS	14,45	6,0
HCl 0,01 mol.L ⁻¹	6,30	0,1739	PS	10,33	0,29854	LS	63,97	6,0
pH 4,5	10,41	0,5007	LS	14,24	0,5539	LS	36,79	4,5
HCl 0,1 mol.L ⁻¹	22,24	0,7506	LS	26,23	1,0623	LS	17,94	2,0

Fonte: Da autora.

Notas: Solubilidade realizada à 25°C, sob agitação de 150 rpm. LS= ligeiramente solúvel; PS= pouco solúvel. †O pH final não variou considerando as duas formas sólidas de ORBI no mesmo meio testado

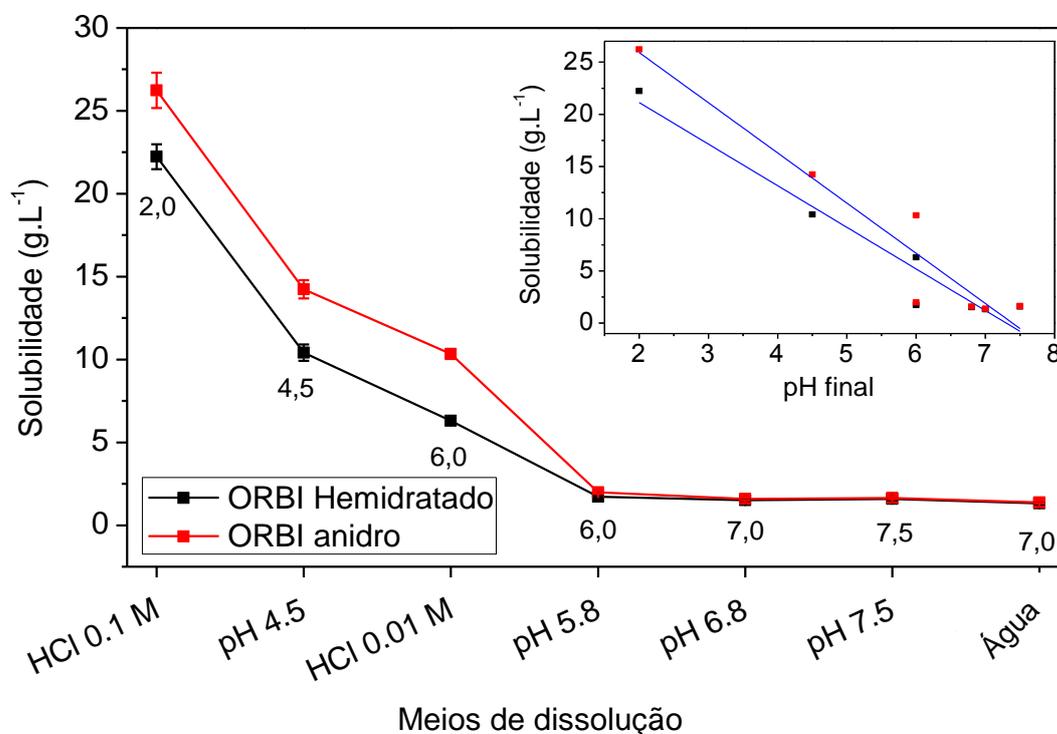


Figura 43- Valores de solubilidade em equilíbrio para as formas anidra e hemidratada.

Notas: Ensaio realizado a 25 °C, 150 rpm, 48 horas. As barras de erro representam os desvios padrão. As curvas plotadas no canto superior direito mostram a correlação entre os valores de solubilidade em equilíbrio com o pH final dos diferentes meios utilizados.

Fonte: Da autora.

Além disso, a Figura 43 mostra que existe uma correlação linear da solubilidade em equilíbrio, para ambas as formas de ORBI com o pH final do meio. A solubilidade de ambas as formas sólidas do ORBI aumenta quando pH final das soluções de equilíbrio diminui. Esse resultado é devido à protonação das moléculas de ORBI em solução ($H_1ORBI_{(zwitterionic)}^{\pm} + H^+$

→ $H_2ORBI^+_{(cation)}$) levando-a de zwitterion para cátion. Assim, quanto menor for o pH ácido, maior será a concentração relativa de $H_2ORBI^+_{(cation)}$ e, conseqüentemente, maior será solubilidade do ORBI independente do sólido de partida ser hemihidratado ou anidro.

Em todos os meios, exceto em HCl 0,01 mol·L⁻¹, no qual o pH final de equilíbrio é maior do que pKa1, ambas as formas são classificadas como ligeiramente solúvel (Tabela 9) por critérios da USP (USP 38, 2015). Isto significa que 1 g de IFA é solúvel em 100 a 1000 mL de solvente. Como discutido acima, a baixa solubilidade neste meio neutro (pH= 6,0) é devido à prevalência das espécies zwitteriônicas na solução em equilíbrio. O meio HCl 0,01 mol·L⁻¹, no qual o pH final foi aumentado para ~ 6 durante o ensaio, a forma hemidratada é classificada como pouco solúvel (1 g de IFA é solúvel em 30 a 100 ml de solvente teste), ao passo que, a forma anidra é classificada como ligeiramente solúvel. O aumento do pH final deste meio pode ser atribuído ao comportamento tampão intrínseco do ORBI envolvendo as espécies $H_2ORBI^+_{(cation)}$ e $H_1ORBI^{\pm}_{(zwitterionic)}$ liberadas das formas sólidas, as quais foram suficientes para neutralizar a solução de inicialmente HCl introduzida como meio de dissolução. Nos meios em que o pH final de equilíbrio ficou inferior ao pKa1 (tampão pH 4,5 (valor final de pH = 4,5) e HCl 0,1 mol·L⁻¹ (pH final = 2)), as duas formas do ORBI são classificadas como ligeiramente solúvel (Tabela 9).

Um resultado marcante é que a forma anidra é significativamente mais solúvel do que a hemidratada em todos os meios com pH final ≤ 6. A maior diferença percentual (64%) ocorre em HCl 0,01 mol·L⁻¹, o que faz a classificação de solubilidade mudar de ligeiramente solúvel para a forma anidra para pouco solúvel para a forma hemidratada.

Os maiores valores de solubilidade observados para a forma anidra em comparação com a hemihidrata nos meios ácidos poderiam, em princípio, serem correlacionados às características estruturais das fases comparadas. No entanto, esta comparação seria válida se não ocorresse conversão da forma sólida em equilíbrio com a solução para uma forma mais estável termodinamicamente, durante o experimento de determinação da solubilidade. É importante resgatar os resultados apresentados na seção 5.2.5 que mostraram que a forma anidra pode ser facilmente convertida na hemidratada se exposta à umidade. Levando esse fato em consideração, o material sólido em equilíbrio com as soluções utilizadas para determinar a solubilidade ORBI foi subseqüentemente seco e analisado por DRXP (Figuras 44-46).

Os padrões experimentais de DRXP dos materiais sólidos residuais em equilíbrio com as soluções preparadas a partir da forma anidra do ORBI em água e em tampões pH 6,8 e 7,5

indicam que ao final do experimento de determinação da solubilidade, a fase cristalina em equilíbrio com a solução é a hemihidratada, e não mais a anidra adicionada no início do experimento (Figura 44). Essa afirmação pode ser feita tendo em vista não existir qualquer diferença aparente em termos de largura do pico dos índices de Miller com $h \neq 0$ quando os materiais sólidos finais se partindo da forma anidra e da forma hemihidratada são comparados. Portanto, pode concluir-se que a forma anidra se converte na forma hemidratada nestes três meios de dissolução, e, conseqüentemente, os valores de solubilidade em equilíbrio obtidos para a forma anidra do ORBI não podem a rigor ser considerados verdadeiros.

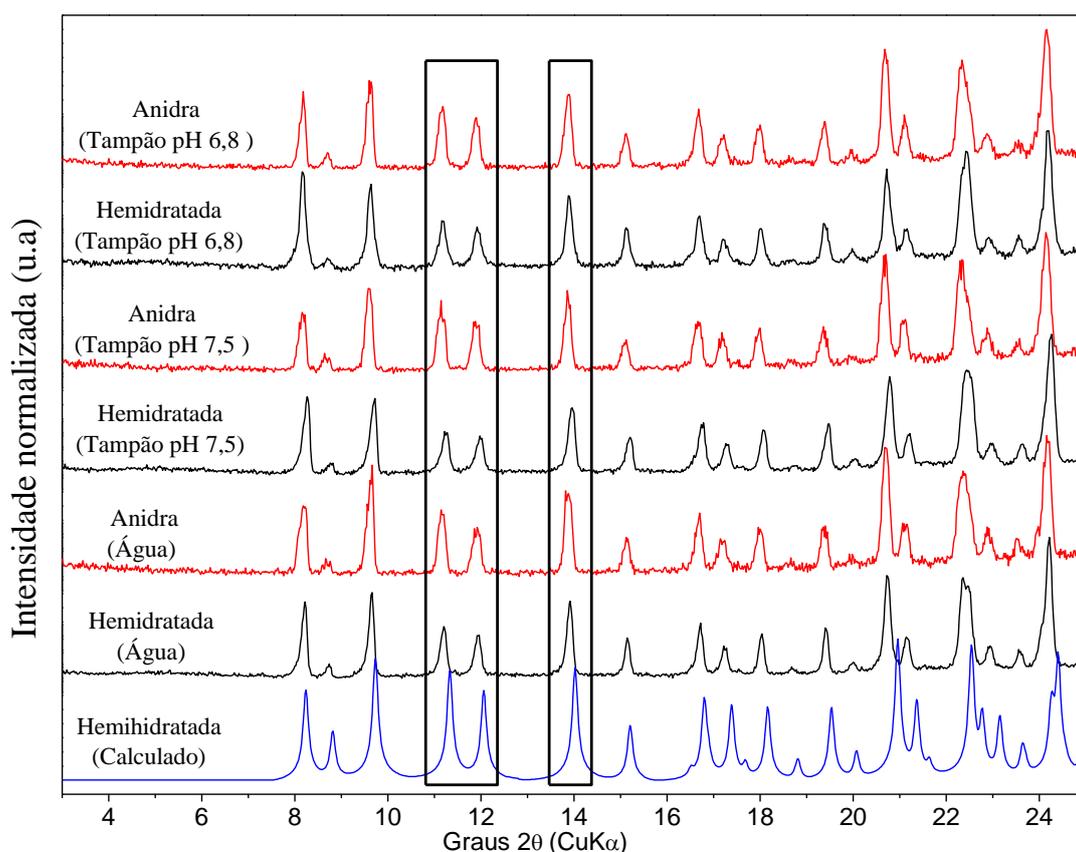


Figura 44- Padrões experimentais de DRXP dos materiais sólidos residuais em equilíbrio com as soluções preparadas a partir das formas hemidratada e anidra do ORBI em água e nos meios tampões pH 6,8 e 7,5.

Fonte: Da autora.

Nota: O padrão de DRXP do ORBI hemidratado calculado está incluído para efeito de comparação.

O padrão de DRXP experimental do material sólido separado após o experimento de solubilidade da forma anidra ORBI em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 45-(c)) não se sobrepõem aos picos previstos no difratograma calculado da forma hemidratada do ORBI (Figura 45-(a)). Esse resultado indica que a forma anidra de ORBI é convertido para a outra forma sólida

durante o ensaio de solubilidade em HCl 0,1 mol·L⁻¹, a qual, muito provavelmente, venha a ser o cloreto ou cloridrato de ORBI. Este pressuposto baseia-se no fato de que a espécie $H_2ORBI^+_{(cation)}$ é formada em solução em pH < 3 (Figura 42), o que levaria a sua precipitação/cristalização com o cloreto proveniente da solução de HCl.

Já o padrão de DRXP experimental do sólido residual da dissolução da forma hemidratada em HCl 0,1 mol·L⁻¹ (Figura 45-(b)) mostra picos de Bragg tanto da fase hemidratada do ORBI (Figura 45-(a)) quanto da possível fase do sal cloreto de ORBI (Figura 45-(c)). Portanto, o sólido residual trata-se de uma mistura dessas duas fases indicando uma conversão parcial do ORBI hemihidratado para cloreto de ORBI. Este resultado sugere que a forma hemidratada é mais resistente à conversão do que a forma anidra.

Assim, quando os padrões experimentais de DRXP dos sólidos residuais provenientes da dissolução das duas formas de ORBI em HCl 0,01 mol·L⁻¹ são comparados, observa-se, para ambas, pouco ou quase nenhuma conversão da fase inicial em cloreto de ORBI (Figuras 45-(d) e 45-(e)).

Os resultados observados no DRXP dos sólidos residuais em equilíbrio com as duas concentrações de HCl testadas nesse trabalho, permite inferir que a conversão do material inicial em sal cloreto de ORBI, pode depender de, pelo menos, duas variáveis: i) o pH do meio aquoso (quanto menor o pH maior é a conversão) e ii) da forma cristalina utilizada como material de inicial (a forma hemidratada é mais estável que a anidra). Ou seja, a conversão é maximizada utilizando-se a forma anidra como material de partida no meio mais concentrado de HCl.

A ocorrência da transição de fase observada no experimento de determinação solubilidade do ORBI nas duas concentrações de HCl utilizadas como meio de dissolução, impede que se atribua como verdadeiras, as solubilidades apresentadas na Tabela 9 e na Figura 43 para as formas anidra e hidratada do ORBI nesses meios. Contudo, as diferenças observadas podem ser indiretamente relacionadas com a estabilidade das duas formas cristalinas do ORBI. Em outras palavras, a forma anidra é mais instável e, conseqüentemente, mais susceptível à dissolução ou concomitante dissolução + conversão para cloreto de ORBI do que a forma hemidratada. A maior reatividade da forma anidra pode ser explicada pela perda de cristalinidade ao longo do eixo *a* da célula unitária (como discutido na Seção 5.2.5) e, ou, pela sua supersaturação da solução preparada a partir da forma anidra, em comparação a forma hemidratada. Esse último fenômeno, é explicado pela nucleação e, ou, crescimento de

cristais durante a interconversão em um meio aquoso (SANTOS et al., 2014b; BOGARDUS; BLACKWOOD, 1979).

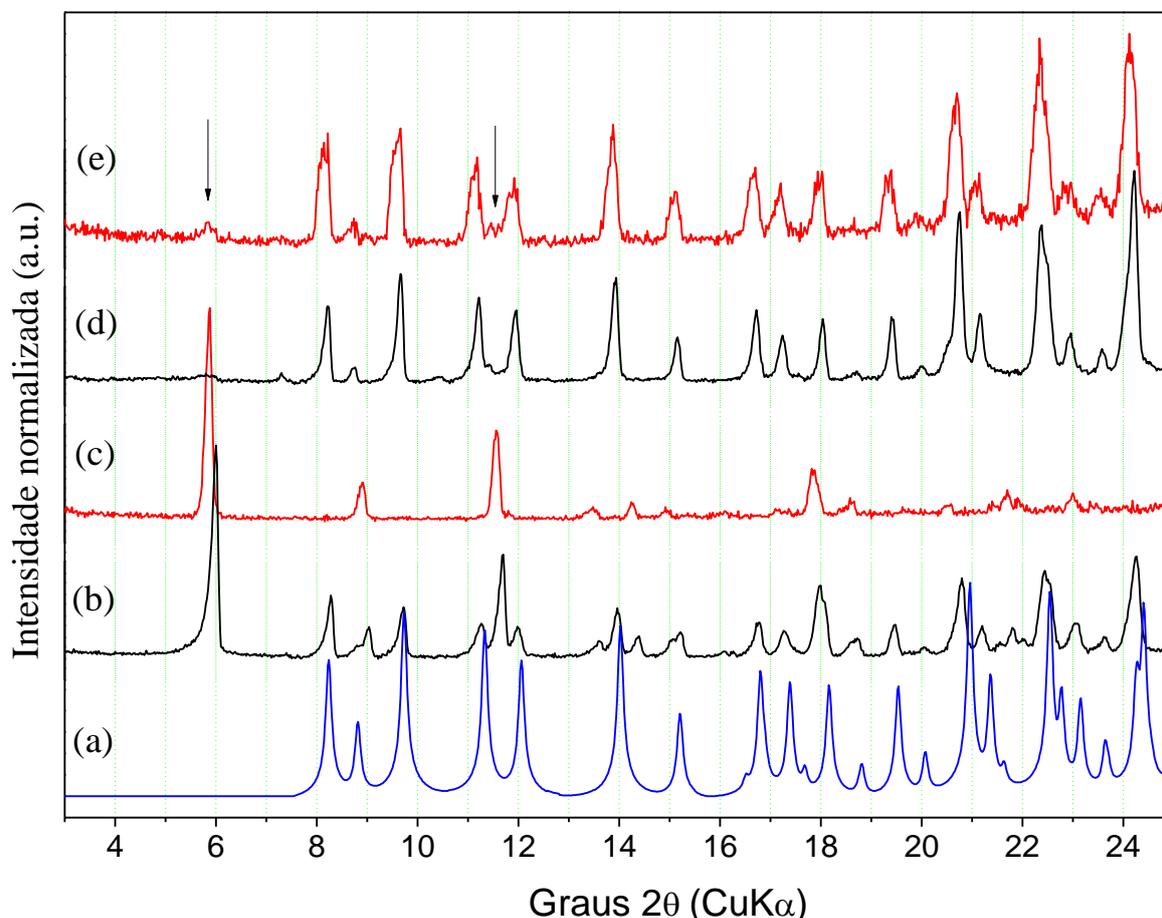


Figura 45- Padrões de DRXP de ORBI após o teste de solubilidade em equilíbrio: (a) experimental do ORBI hemidratado; (b) ORBI hemidratado em HCl 0,1 mol.L⁻¹; (c) ORBI anidro em HCl 0,1 mol.L⁻¹; (d) ORBI hemidratado em HCl 0,01 mol.L⁻¹; (e) ORBI anidro em HCl 0,01 mol.L⁻¹.

Fonte: Da autora.

Nota: Os picos de Bragg extras estão apontados por setas.

Os padrões de DRXP do material residual do experimento de solubilidade das formas de ORBI nos tampões acetato pH 4,5 e fosfato pH 5,8 mostram a presença dos picos de Bragg do DRXP calculado para a forma hemihidratada do ORBI (Figura 46). Não se observa o alargamento dos picos com $h \neq 0$ nos resíduos oriundos da forma anidra do ORBI (Figuras 46(c) e 46(e)), o que leva a concluir que ocorreu sua conversão na forma hemihidratada durante o experimento. Além disso, todos os difratogramas mostraram picos extras não indexados pelos da fase hemihidratada do ORBI. Esse resultado sugere a presença de fases espúrias cristalizadas durante o experimento de determinação da solubilidade. Observa-se que

as posições dos picos extras presentes nos resíduos em equilíbrio com o tampão fosfato são diferentes daqueles presentes no tampão acetato. Uma provável explicação seria a presença dos sais acetato de ORBI e fosfato de ORBI.

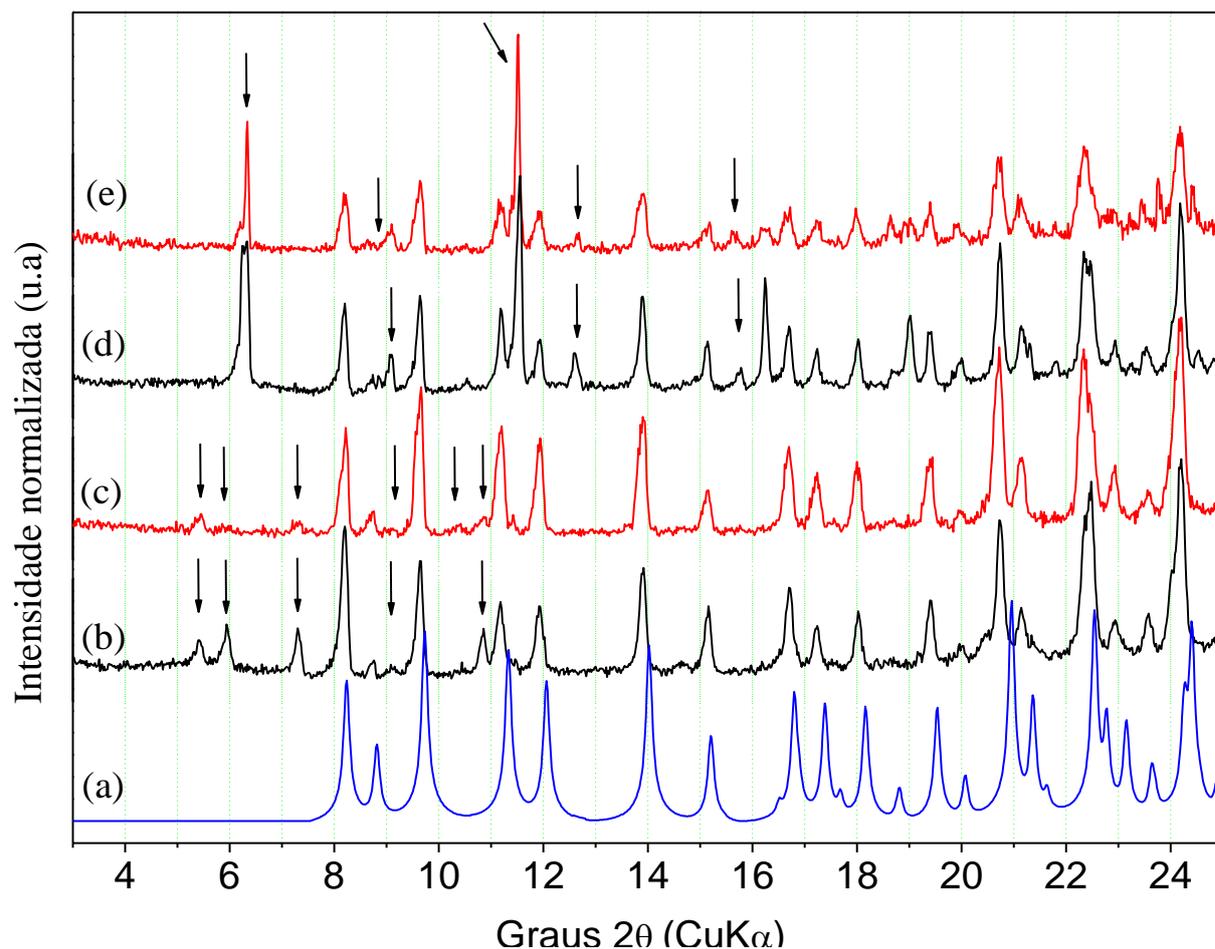


Figura 46- Padrões de DRXP após o teste de solubilidade em equilíbrio: (a) ORBI hidratado calculado; (b) ORBI hidratado experimental em tampão acetato pH 4,5; (c) ORBI anidro experimental em tampão acetato pH 4,5; (d) ORBI anidro experimental em tampão fosfato pH 5,8; (e) ORBI hidratado experimental em tampão fosfato pH 5,8.

Fonte: Da autora.

Nota: Os picos de Bragg extras estão apontados por setas.

5.2.8 Conclusões parciais

Foi determinada pela primeira vez uma estrutura cristalina do IFA antimicrobiano orbifloxacino. Esta primeira forma é zwitteriônica e hemidratada. Uma segunda forma (anidra) foi obtida a partir da hemidratada, por aquecimento. A transição de fase ocorre à 104 °C e a forma anidra é estável até 269 °C. A forma anidra retorna para a forma hemidratada rapidamente sob condições de umidade. A estrutura cristalina determinada não colapsa na remoção de água. Portanto, as formas anidras e hemidratadas de ORBI são cristais isomorfos. Apesar de sua isoestruturalidade, a forma anidra é mais porosa e menos estável (menor energia de rede) e, conseqüentemente mais solúvel que a hemidratada.

Com os resultados obtidos aqui, infere-se que a forma hemidratada de ORBI seja a descrita nas farmacopeias Britânica (2011) e USP (2015), embora nestes compêndios, o ORBI está descrito como uma forma anidra. Este trabalho contribuiu para o controle de qualidade do IFA orbifloxacino. Entretanto, mais estudos devem ser realizados, e uma triagem de polimorfos mais detalhada deve ser realizada para identificar outras formas sólidas possíveis de orbifloxacino para que os problemas das diferentes propriedades físico-químicas, relatados nos compêndios oficiais sejam resolvidos.

5.3 OBTENÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS DE CARVEDILOL

Após todas as tentativas foram obtidas as seguintes formas sólidas policristalinas do IFA carvedilol: forma III, forma hemidratada, fosfato de carvedilol, cloreto de carvedilol, sulfato de carvedilol e uma forma solvatada de metiletilcetona de carvedilol, além da forma II (comercial) encontrada na matéria-prima adquirida. Amostras monocristalinas foram obtidas para as formas cloreto de carvedilol e sulfato (ainda não determinadas).

Das formas obtidas, o cloreto e o sulfato de carvedilol, e a forma solvatada de metiletilcetona não apresentam estrutura cristalina reportada.

5.3.1 Caracterização das formas

O padrão experimental de DRXP do material resultante da mistura carvedilol:ácido fumárico (1:1, mol/mol) em metanol:água (50:50, v/v) apresentou picos de Bragg do ácido fumárico e picos que não sobrepuseram aos da forma II do IFA. A partir deste resultado foi realizada uma recristalização de carvedilol puro em metanol:água (50:50 v/v). Os resultados deste experimento estão apresentados na Figura 47. Foi possível verificar que a amostra se tratava da forma hemidratada descrita em 2011, obtida a partir da cristalização em clorofórmio (DIAZ et al., 2011).

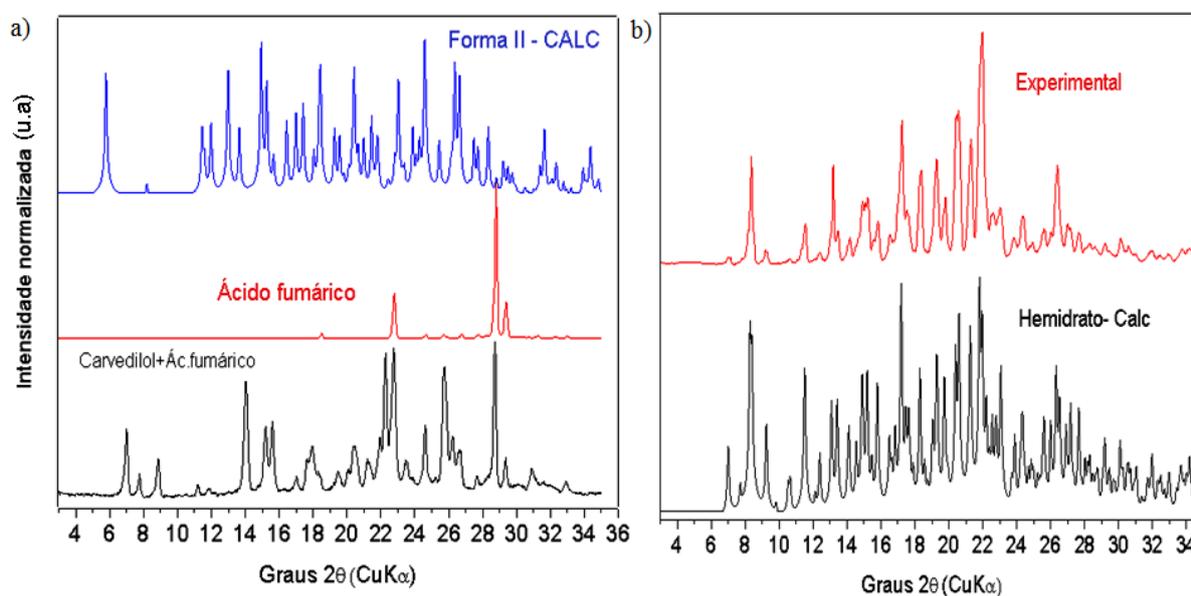


Figura 47- Padrões de DRXP: a) Forma II calculada (azul), ácido fumárico (vermelho) e da amostra obtida por recristalização da mistura carvedilol:ácido fumárico (1:1, mol/mol) em metanol:água (50:50, v/v) (preto); b) Carvedilol hemidrato calculado (preto) e amostra obtida após a recristalização nas mesmas condições anteriores na ausência do ácido fumárico (vermelho).

Fonte: Da autora.

Já a partir da mistura carvedilol: nicotinamida (1:1; mol/mol) em acetonitrila:metanol:água (35:35:30 v/v/v) foi obtido o difratograma mostrado na Figura 48.

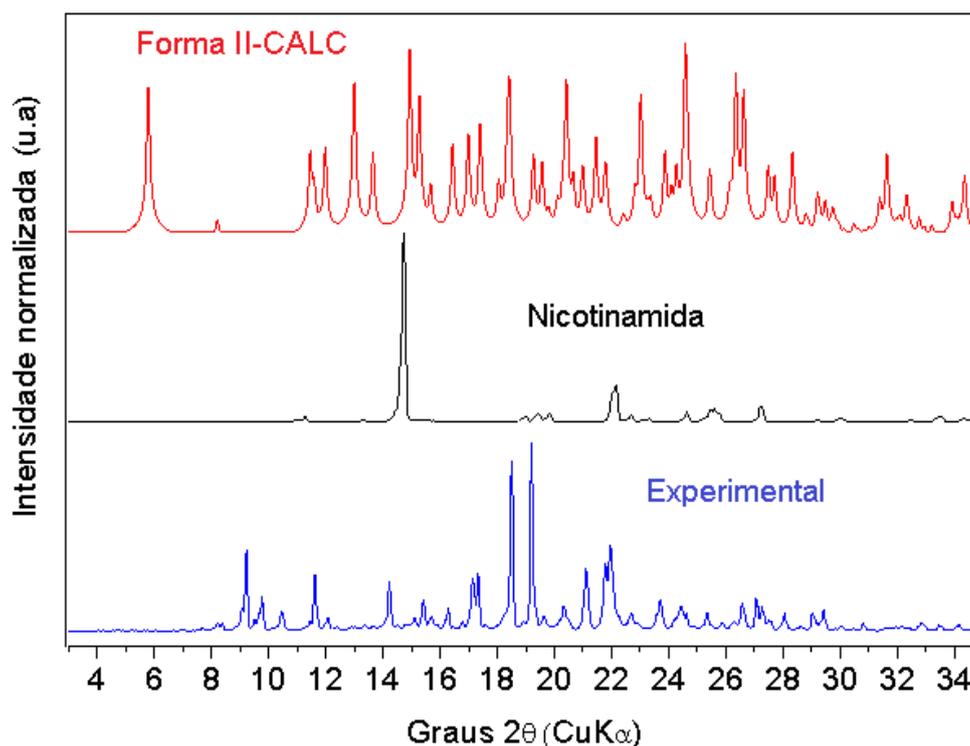


Figura 48- Difrátogramas da forma II calculada (vermelho), nicotinamida (preto) e da amostra obtida por recristalização da mistura carvedilol:nicotinamida (1:1; mol/mol) em acetonitrila:metanol:água (35:35:30, v/v/v) (azul).

Fonte: Da autora.

Após esse resultado, o procedimento de recristalização foi repetido, mas na ausência do cocristalizante, para verificar se na recristalização anterior, havia se formado um cocristal carvedilol:nicotinamida (1:1, mol/mol) ou um novo polimorfo do carvedilol. O pó resultante foi analisado por DRXP e o difratograma apresentou o mesmo padrão de difração do experimental apresentado na Figura 47. Esse resultado descartou a formação do cocristal e apontou para a formação de uma forma inédita do carvedilol. Assim, cristais de tamanho ideal (entre 0,01 a 0,2 mm) foram separados para a resolução de sua estrutura por difração de raios-X por monocristal (DRXM).

Medidas de DRXM foram realizadas em fevereiro de 2014 confirmando se tratar, naquele momento, de uma fase cristalina inédita do carvedilol. Contudo, ao mesmo tempo, verificou-se a publicação dessa nova forma na literatura por Prado et al. (2014), deixando o mesmo, de ser um resultado inédito desse trabalho de doutorado.

Formas II, III e hidrato:

As formas cristalinas puras II e III e a forma hemidratada de carvedilol foram comparadas com seus respectivos padrões de DRXP calculados (Figura 49).

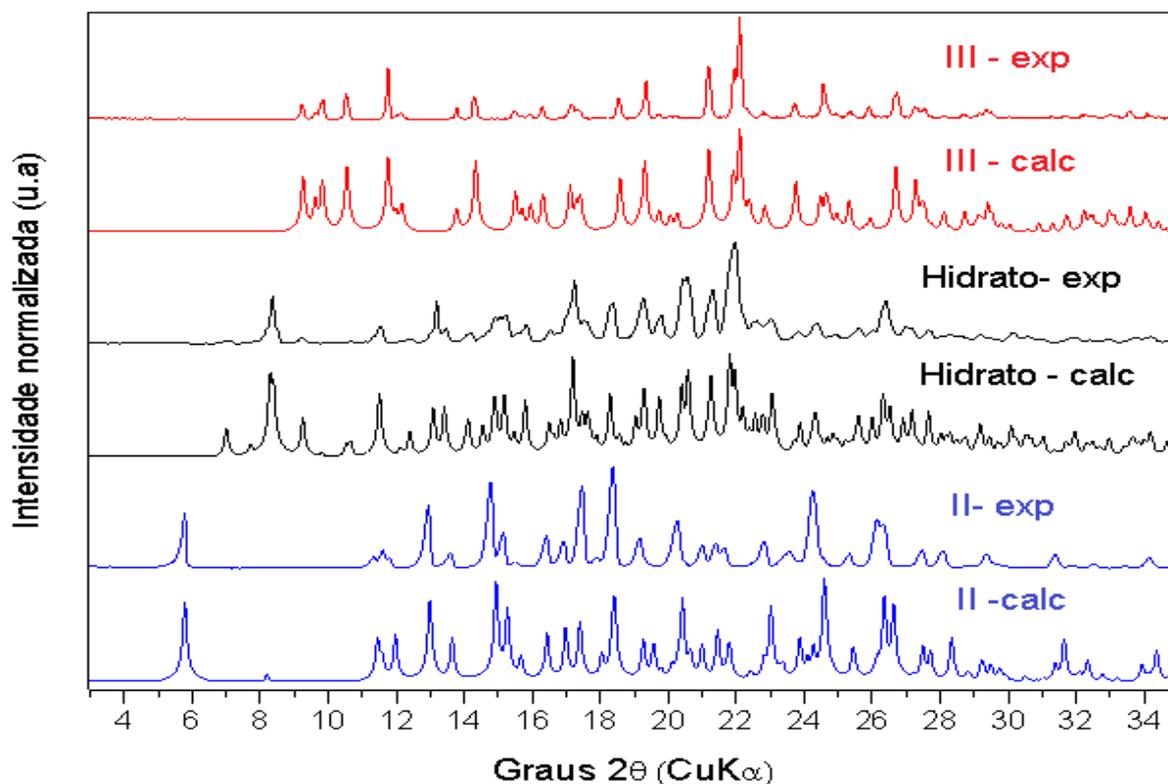


Figura 49- Difractogramas calculados e experimentais das formas II, III e hemidratada.
Fonte: Da autora.

Como observado, as recristalizações foram bem-sucedidas para essas formas, pois os picos de Bragg experimentais se sobrepõem aos calculados. Observam-se algumas diferenças de intensidade que são atribuídas à orientação preferencial dos cristais presentes no material policristalino.

Já na Figura 50, os espectros de FTIR-ATR das formas II, III e hemidratada foram sobrepostos e verificou-se diferentes perfis de vibrações para os polimorfos, principalmente na região das ligações de hidrogênio ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$).

A forma II apresenta vibrações moleculares sobrepostas em 3342 cm^{-1} com banda alargada devido às interações de hidrogênio referentes ao estiramento da amina secundária (ν_{NH}) e ao estiramento da hidroxila (ν_{OH}). Estiramentos da ligação de C-H (ν_{sim} e ν_{ass} de CH_3 , CH_2 e CH_{arom} e alif.) estão sobrepostos entre 3074 e 2833 cm^{-1} .

Já a forma III apresentou vibrações com bandas alargadas em 3444 e 3398 cm^{-1} referentes ao grupamento amina (νNH) e hidroxila. Outra banda alargada em 3269 cm^{-1} aparece devido as diferentes interações entre os grupos amina, hidroxila com as ligações C-C e C-H da cadeia carbônica.

Para a forma hemidratada o espectro apresentou bandas características de amina secundária em 3496 cm^{-1} seguida da banda de estiramento de hidroxila (νOH) em 3399 cm^{-1} a qual sofreu um deslocamento em relação ao νOH da molécula da forma II devido à presença de moléculas de água.

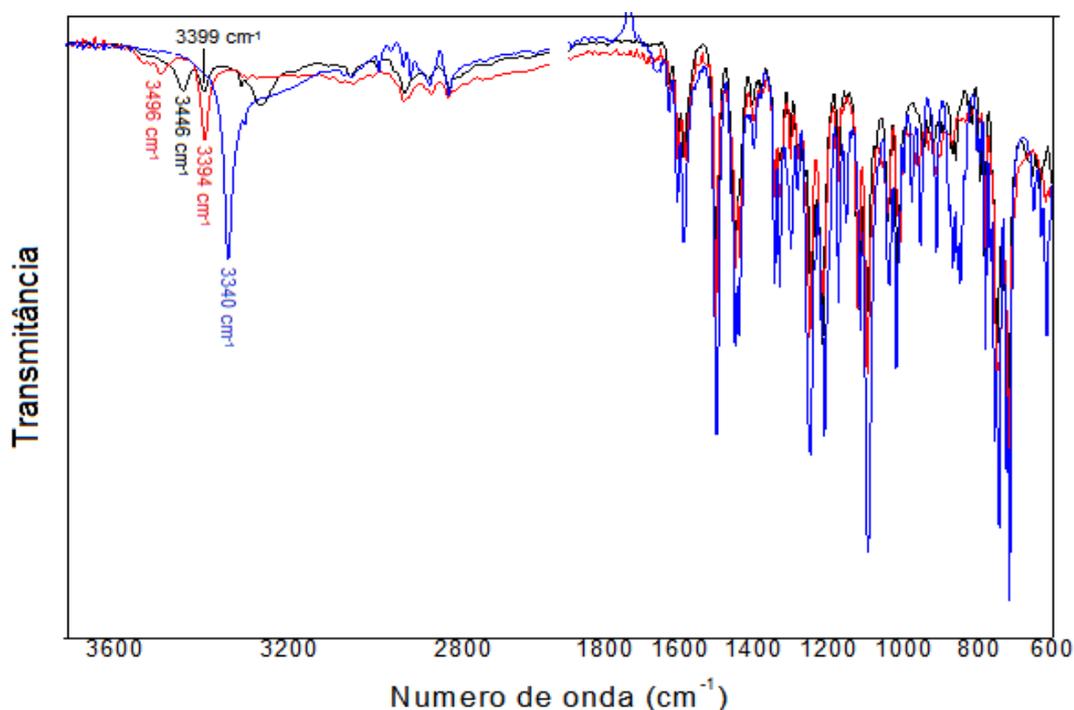


Figura 50- Espectro de FTIR-ATR do carvedilol forma II (azul), forma III (preto) e hemidrato (vermelho).

Fonte: Da autora.

As análises térmicas realizadas para as formas II, III e hemidratada de carvedilol estão apresentadas na Figura 51. Observa-se que a forma II do carvedilol funde sem perda de massa em 118°C e em 272°C tem-se o início da decomposição (Figura 51A). A forma III também funde sem perda de massa (Figura 51B), mas na temperatura de 119,2°C, e sua decomposição começa em 305°C. Já a forma hemidratada apresenta o evento relativo à perda de meio mol de molécula de água (Δ massa calculada: 2,17%; Δ massa obtida: 2,2%) e a fusão concomitantemente em 108°C, com início de sua decomposição em 250,5°C (Figura 51C).

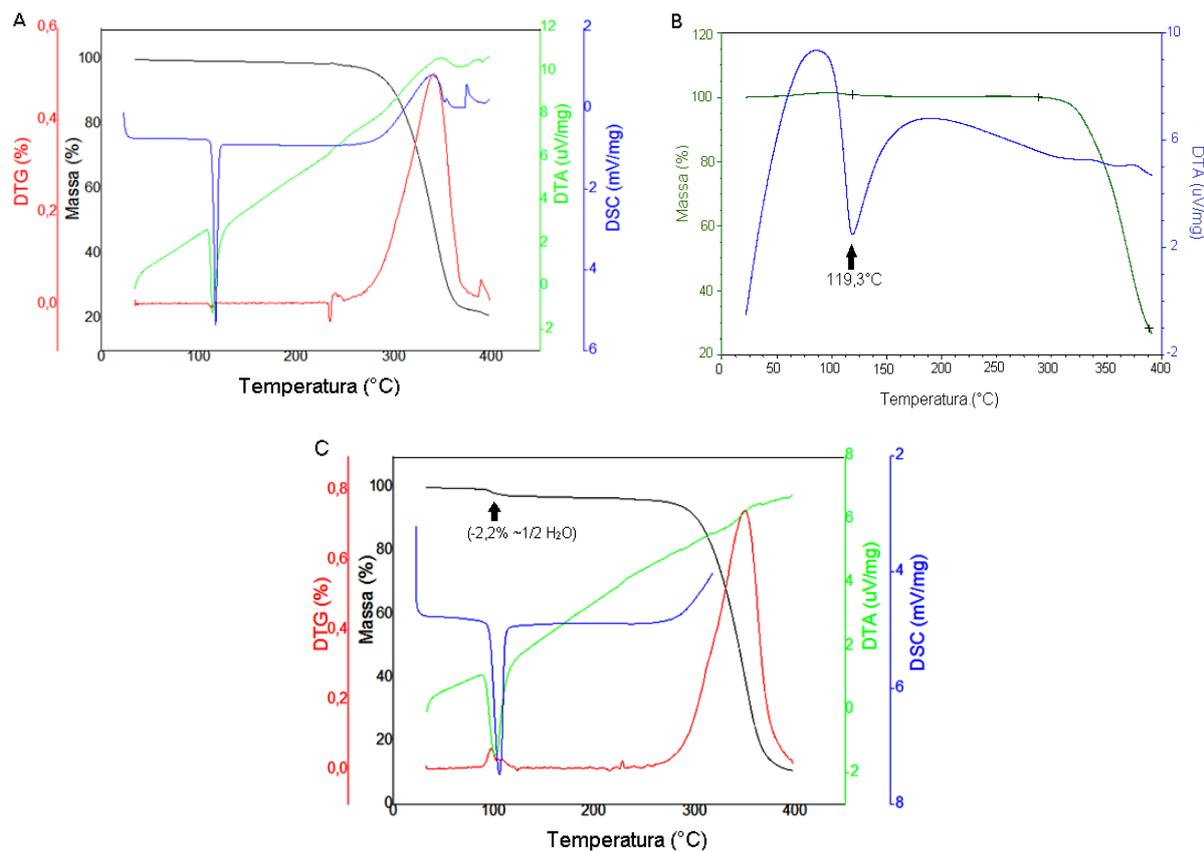


Figura 51- Análise térmica da Forma II (a), Forma III (b) e hemidratada do carvedilol (c).
Fonte: Da autora.

Cloreto de carvedilol monohidratado

O padrão de DRXP experimental do material policristalino obtido por meio de recristalização do carvedilol em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ foi comparada ao reportado na patente do cloreto de carvedilol monohidratado (Figura 52). A concordância entre os difratogramas permite concluir que houve êxito na síntese de um material policristalino puro de cloreto de carvedilol monohidratado com o experimento realizado nesse trabalho.

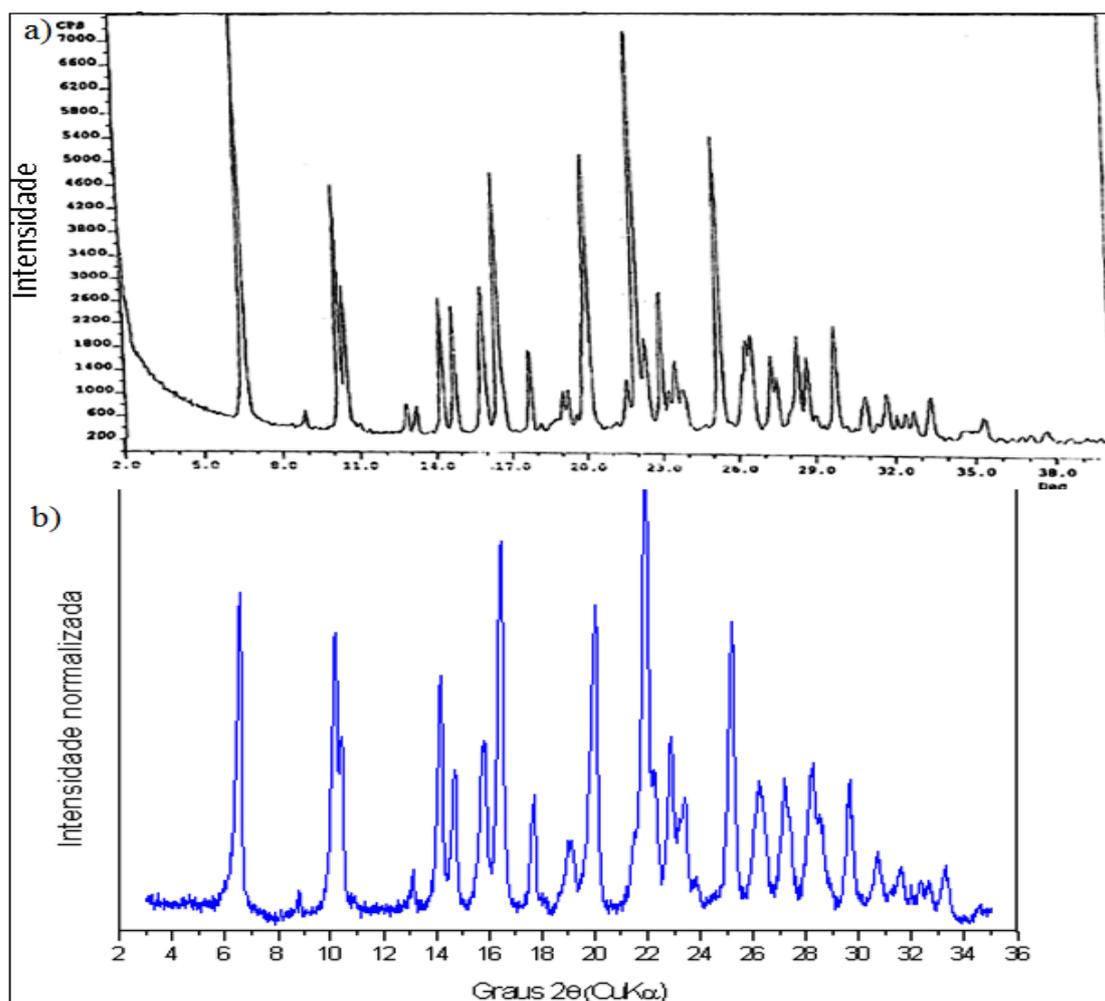


Figura 52- Difractogramas do cloreto de carvedilol: a) Adaptado da patente de HILDESHEIM et al., 2006; b) Experimental.

Fonte: a) Adaptado de HILDESHEIM et al., 2006 e b) da autora

O espectro de FTIR-ATR experimental do cloreto de carvedilol monohidratado (Figura 53), confirma a presença de água na estrutura cristalina pela presença de bandas alargadas em 3250 cm^{-1} . A interação do cloreto com o NH da cadeia alifática do carvedilol desloca as bandas de NH para maiores frequências, de 3342 cm^{-1} para 3529 cm^{-1} .

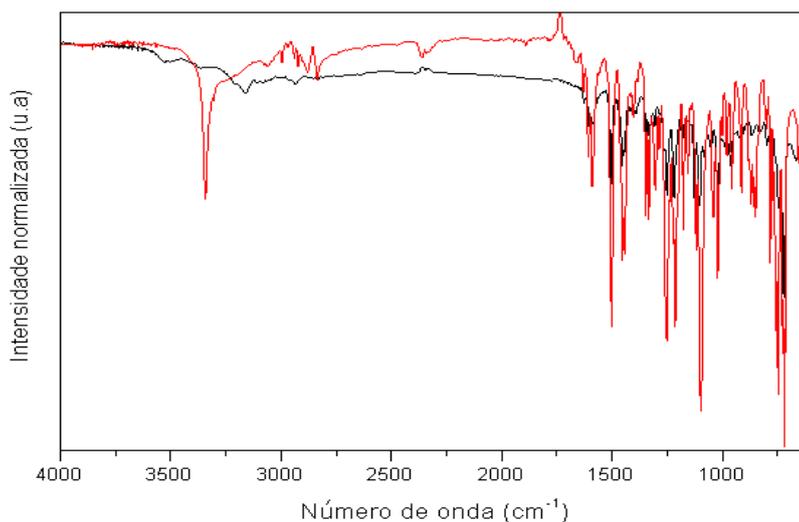


Figura 53- Espectros de FTIR-ATR do cloreto de carvedilol monohidratado (preto) e da forma II (vermelho).

Fonte: Da autora.

Na Figura 54, são apresentados os resultados obtidos com a análise térmica do cloreto de carvedilol. O primeiro evento (T_i 30 °C à T_f 103 °C) apresenta uma perda de 4,0 % (18,4 g. mol⁻¹) da massa total do composto (460,9 g. mol⁻¹) equivalente a perda de um mol de molécula de água (massa calculada= 3,9 %). E, a partir de 167 °C, tem-se o início do evento referente à fusão do carvedilol. Corroborando com os resultados de que a forma sólida é monohidratada.

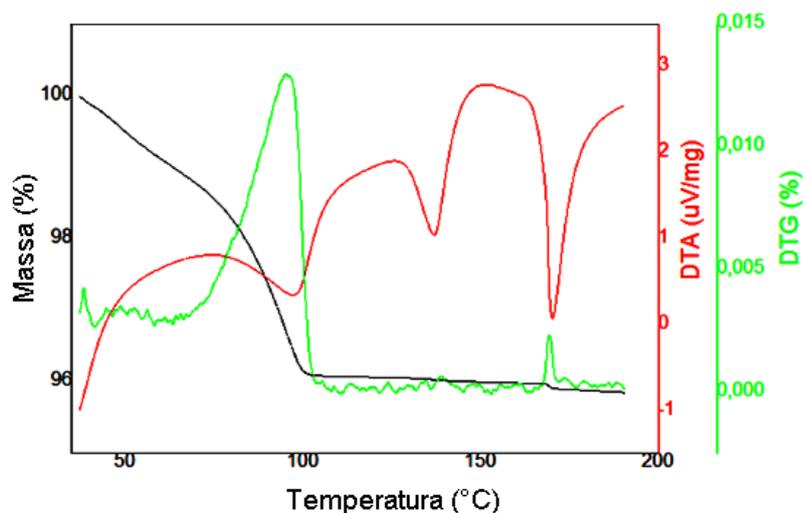


Figura 54- Análise térmica do cloreto de carvedilol monohidratado.

Fonte: Da autora.

Fosfato de carvedilol hemidratado:

Na caracterização do sal de fosfato de carvedilol, observa-se que o padrão de DRXP experimental da amostra obtida (Figura 55) coincide com o simulado a partir da estrutura reportada na literatura (VOGT et al., 2010), indicando a reprodutibilidade e pureza na obtenção dessa forma sólida do carvedilol.

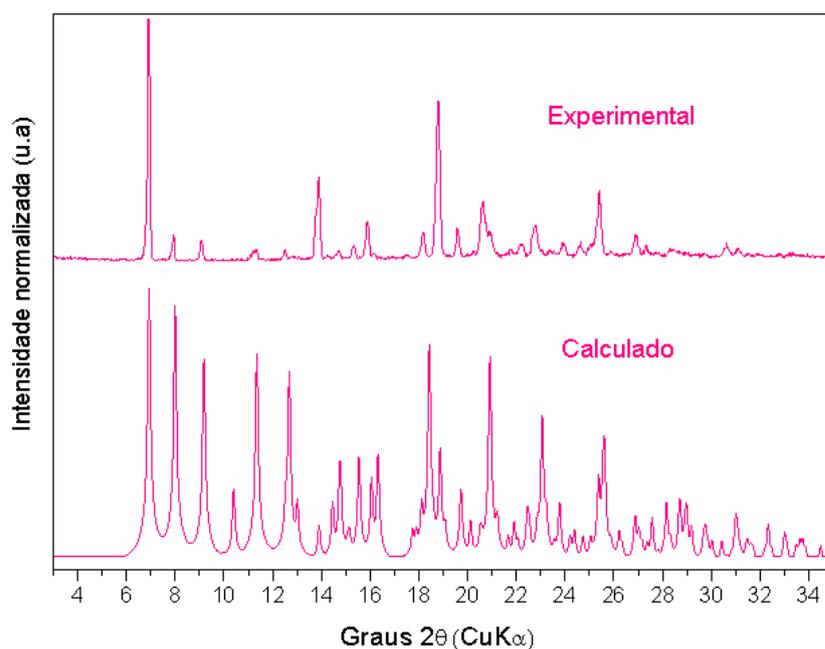


Figura 55- Difratogramas calculado (CIF:XOZJOM01) e experimental do fosfato de carvedilol hemidratado.

Fonte: Adaptado de Vogt et al., 2010 e da autora.

Já a Figura 56 apresenta o espectro na região do IR do fosfato de carvedilol hemidratado. As bandas assinaladas se sobrepõem às bandas atribuídas ao fosfato de carvedilol hemidratado descrita na patente US 8.344.59 B2 de Gorantla e colaboradores em 2013 (GORANTLA et al., 2013). A figura apresentada na patente não foi mostrada neste trabalho devido sua baixa resolução.

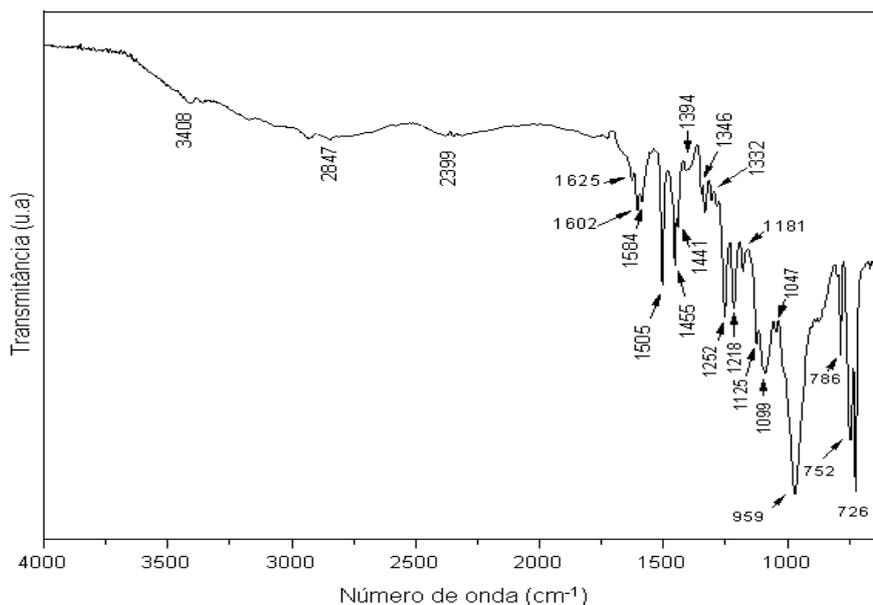


Figura 56- Espectro na região do infravermelho do fosfato de carvedilol.
Fonte: Da autora.

A análise TG/DTA do fosfato de carvedilol (Figura 57), (massa total = 513,474 g. mol⁻¹), mostra a perda de massa equivalente a meio mol de molécula de água (massa calculada= 1,8%; massa perdida= 2,3%), confirmando que a estrutura é um hemidrato. O evento mostrado em 155°C refere-se a fusão, seguido pela decomposição.

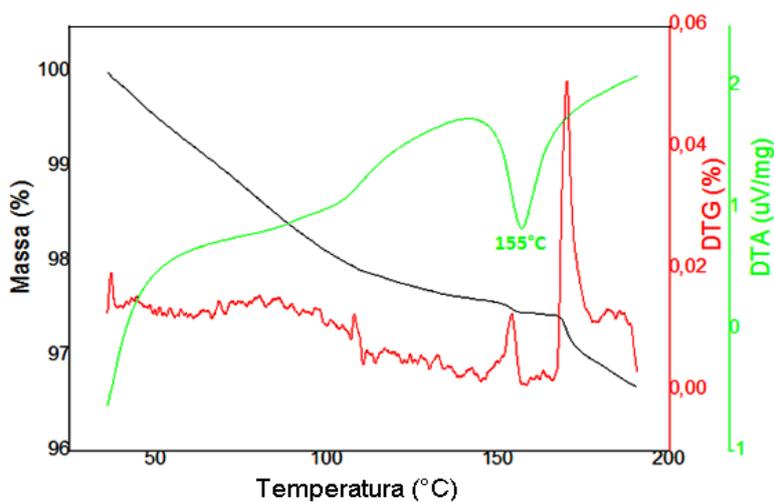


Figura 57- Análise térmica do fosfato de carvedilol hemidratado.
Fonte: Da autora.

Sulfato de carvedilol dihidratado:

Como o sal sulfato de carvedilol não possui estrutura cristalina reportada até o momento, e a patente que descreve sua obtenção não apresenta um difratograma experimental, não foi possível realizar sua caracterização por DRXP; entretanto o difratograma obtido foi apresentado na Figura 58.

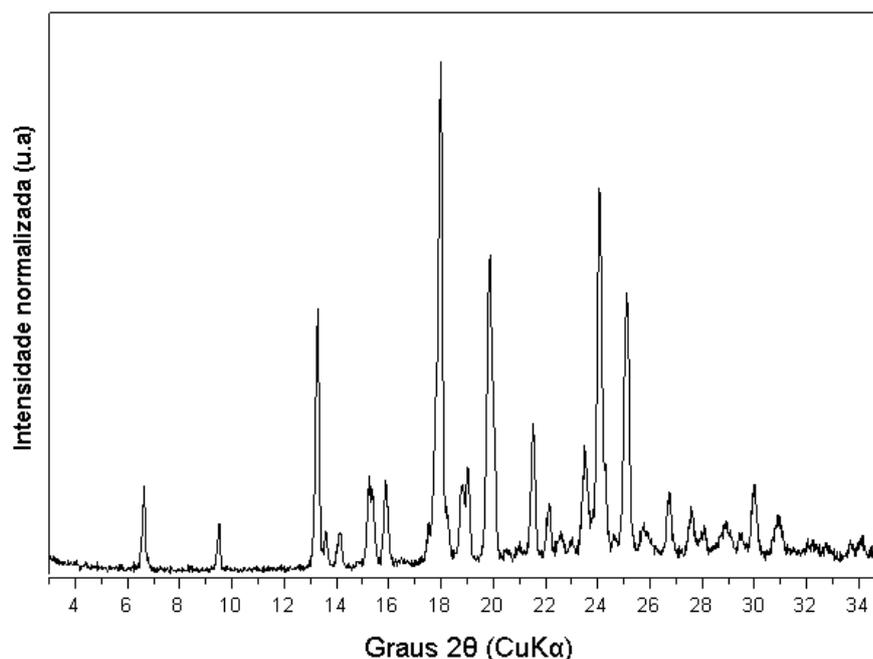


Figura 58- Difratograma experimental obtido com a recristalização do carvedilol em ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹.

Fonte: Da autora.

Para identificar que o material policristalino apresentava o íon sulfato foram realizados os seguintes testes de identificação de tal íon de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010):

- a) Solução do material com cloreto de bário= formação de um precipitado branco (BaSO₄) insolúvel em ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹ e em ácido nítrico 1 mol.L⁻¹;
- b) Solução do material com ácido clorídrico= não houve formação de precipitado, o que distingue o íon sulfato do íon tiosulfato.

Para melhor comparação com os dados reportados na literatura, o espectro FTIR-ATR experimental de sulfato de carvedilol foi plotado no modo de absorbância (Figura 59).

Observa-se grande concordância do espectro da amostra obtida com o repostado na literatura que aponta para o sucesso na síntese do sulfato de carvedilol dihidratado. Ambos os espectros apresentam bandas alargadas devido à presença de água na estrutura cristalina (~ 3000 a 3500 cm^{-1}).

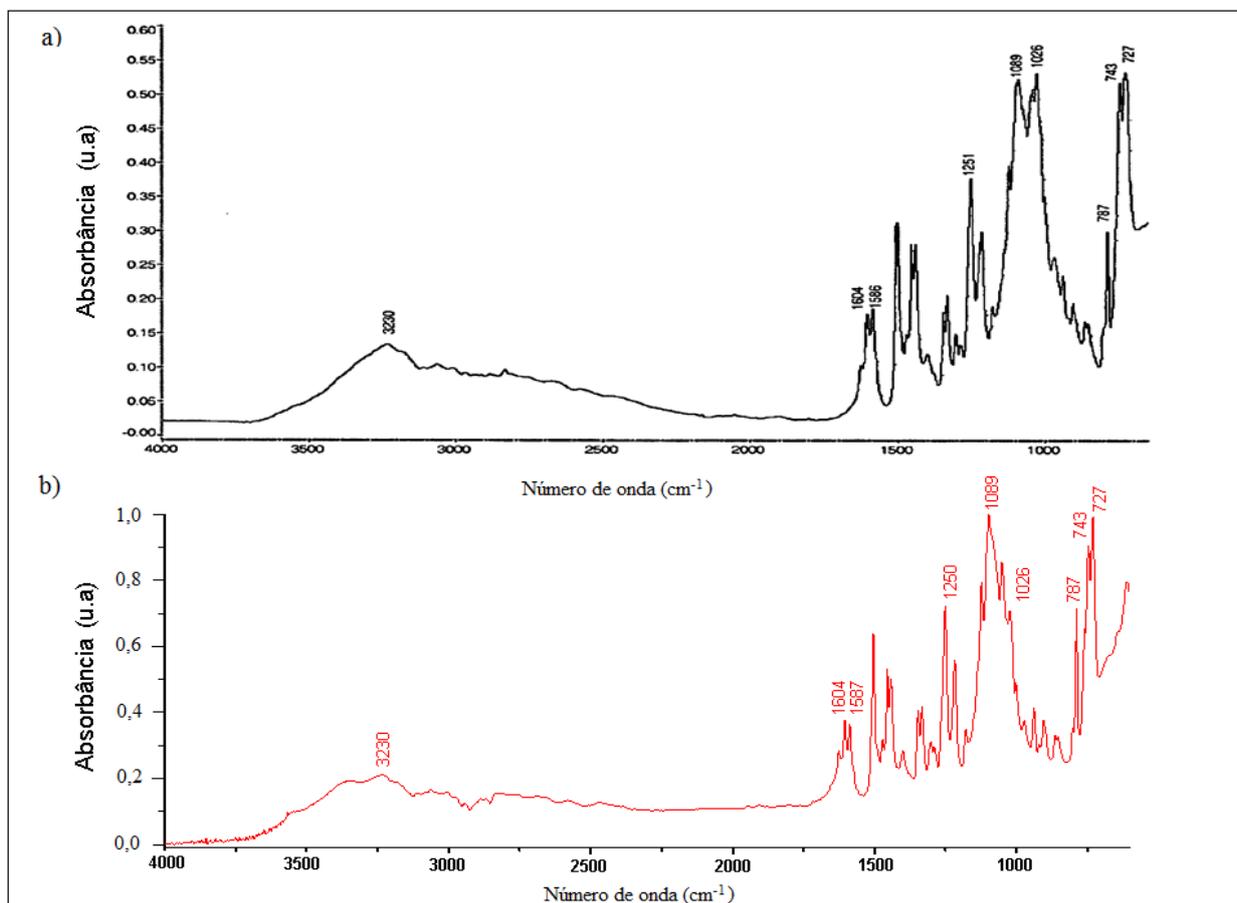


Figura 59- Espectro na região do infravermelho do sulfato de carvedilol: a) Fonte: Brook et al., 2005; b) Experimental.

Fonte: a) Adaptado de Brook et al., 2005 e b) Da autora.

A Figura 60 apresenta os resultados das análises térmicas para o sulfato de carvedilol. Observa-se que o sal apresenta três eventos seguidos que correspondem à perda total de 7,3 % em massa no intervalo de 32°C a 110°C , massa equivalente à duas moléculas de água (massa calculada = 7,2 %). Já em 150°C observa-se o evento referente à fusão do sulfato de carvedilol sem perda de massa. A partir desse resultado podemos inferir que o sal sulfato de carvedilol seja um dihidrato (massa total = $543,474$ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

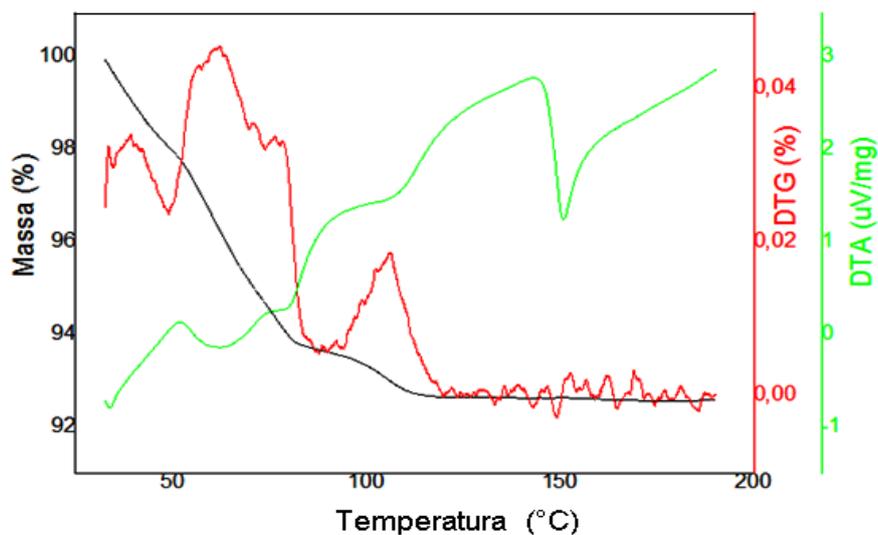


Figura 60- Análise térmica obtido com a amostra policristalina do carvedilol em ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹.

Fonte: Da autora.

Solvato metiletilcetona de carvedilol

A Figura 61 compara o padrão de DRXP experimental da amostra policristalina obtida no experimento de recristalização do carvedilol em metiletilcetona (MEC), com o padrão experimental apresentado na Patente US 6699997 B2 de autoria de Hildesheim e colaboradores (HILDESHEIM et al., 2004). Observa-se que todos os picos de Bragg dos dois difratogramas são equivalentes, o que permite afirmar que se trata da mesma substância cristalina sem a presença de fases espúrias.

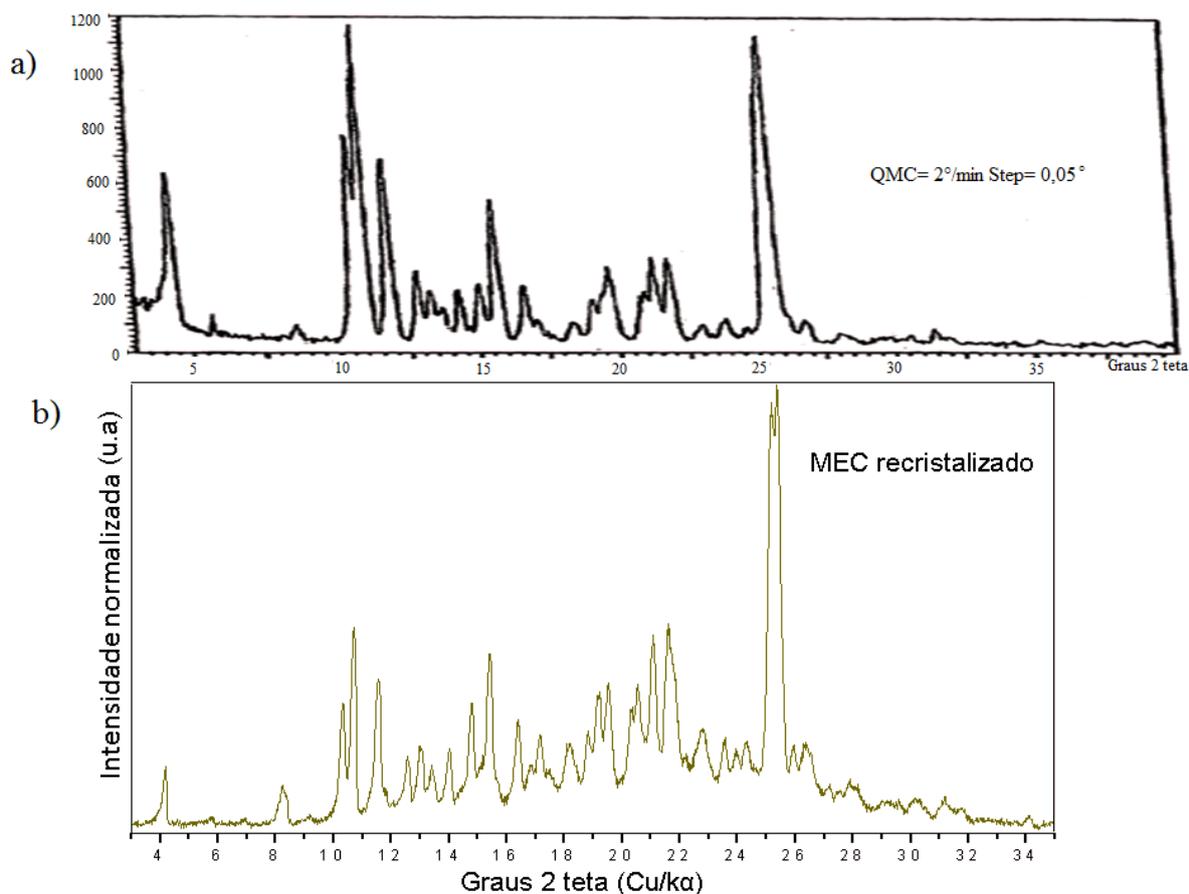


Figura 61- Difractogramas experimentais de policristais do solvato metiletilcetona do carvedilol. Fonte: a) Adaptado de Hildesheim et al., 2004; b) Da autora.

O espectro de FTIR-ATR da amostra obtida é apresentado na Figura 62, juntamente com o espectro da forma II utilizado na recristalização. As vibrações referentes aos grupos metil e etil estão sobrepostas aos estiramentos de C-H aromático e alifático da molécula de carvedilol. Já o estiramento da carbonila do grupo cetona (da MEC) aparece como uma vibração de forte intensidade em 1708 cm^{-1}

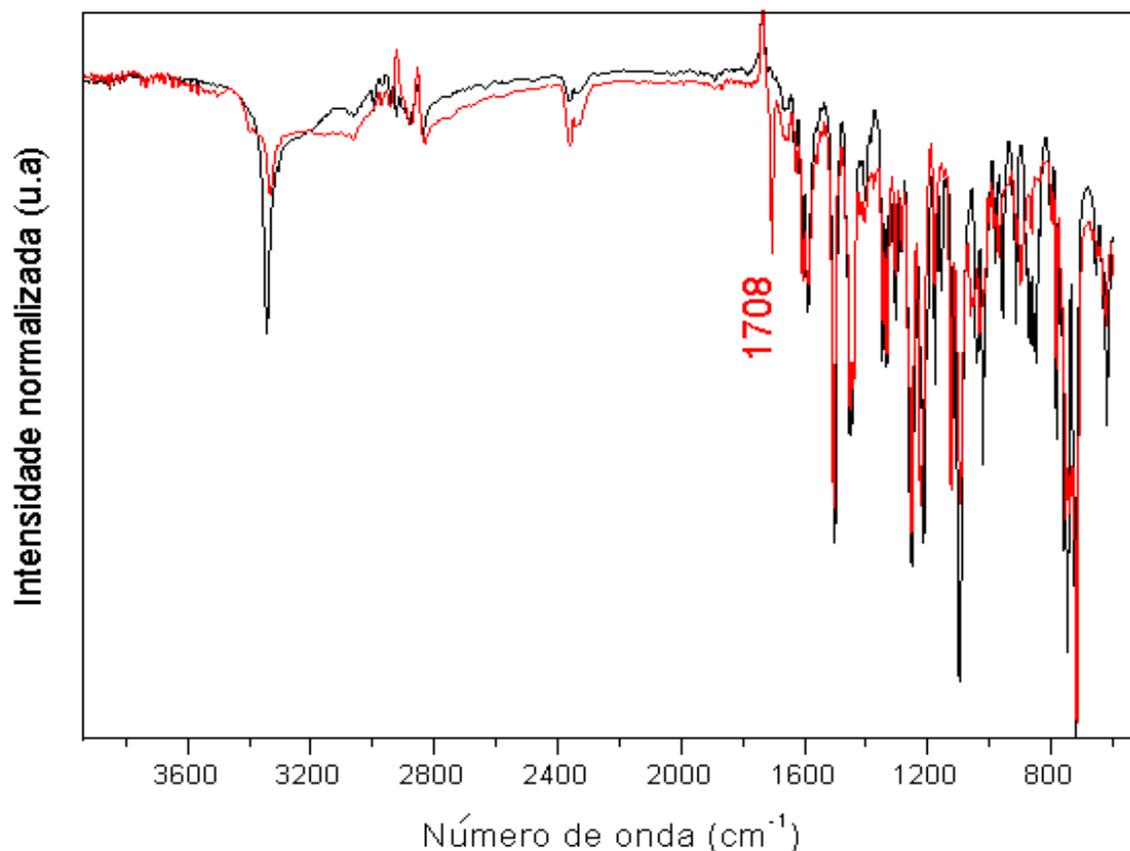


Figura 62- Espectro FTIR-ATR do solvato metiletilcetona de carvedilol (vermelho) e forma II (preto).

Fonte: Da autora.

Na Figura 63, é apresentada a análise térmica do MEC de carvedilol. Observa-se um evento ($T_i = 54^\circ\text{C}$ e $T_f \sim 80^\circ\text{C}$) correspondente a perda do radical metilcetona do solvato de metiletilcetona (- 8%) e o segundo evento deve-se a perda do radical etil ($T_i = 80,7^\circ\text{C}$ e $T_f = 163^\circ\text{C}$) (- 6,8% em massa); (total 14,8% (8% + 6,8%) equivalente a uma molécula de MEC (calculado=15%).

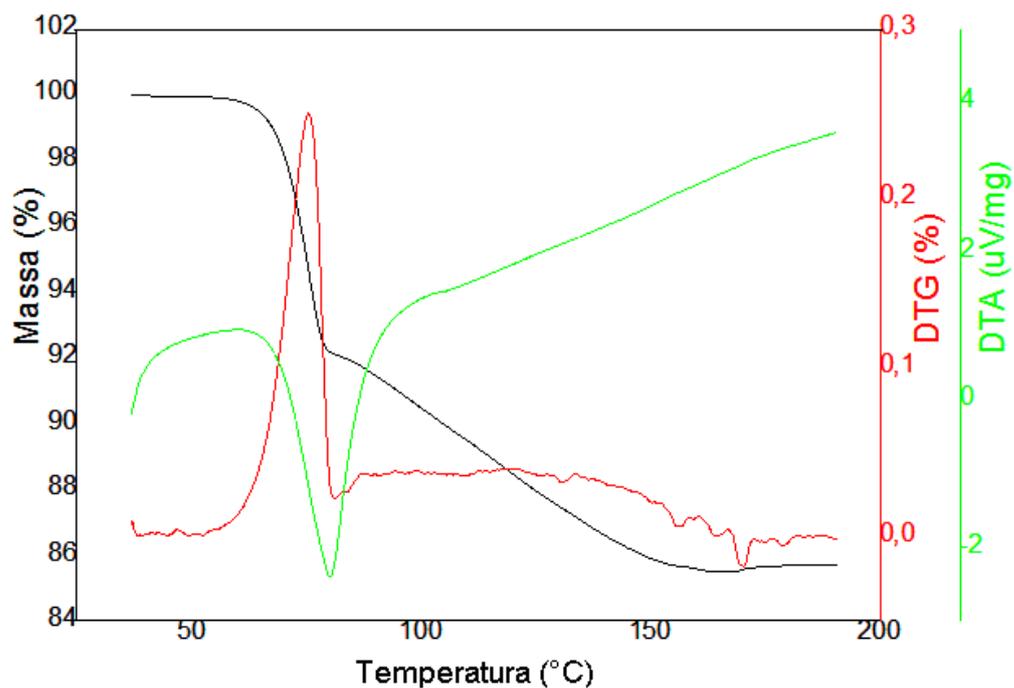


Figura 63- Análise térmica do solvato metiletilcetona de carvedilol.
Fonte: Da autora.

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste trabalho foram obtidas as formas II, III, hemidratada, os sais cloreto, fosfato e sulfato e o solvato metiletilcetona de carvedilol. A caracterização destas formas foi realizada por DRXP, FTIR-ATR e TG/DTA. As formas cloreto, sulfato e MEC de carvedilol ainda não apresentam estruturas determinadas. Como continuação desta tese será realizada a determinação estrutural destas formas, avaliação das solubilidades e estabilidades comparativas e a produção de comprimidos contendo 25 mg de carvedilol com cada forma para a realização de seus perfis de dissolução.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho de doutorado foram desenvolvidas novas formas sólidas dos fármacos de baixa solubilidade aquosa: doxiciclina, orbifloxacino e carvedilol. Além disso, foram realizadas suas caracterizações pelas técnicas de DRXM, DRXP, FTIR-ATR e TG/DTA. As análises de solubilidade e estabilidade das novas formas aqui apresentadas em comparação com as formas existentes foram avaliadas e discutidas.

Os resultados obtidos atingiram as duas vertentes das formas sólidas, a vertente das oportunidades que consiste no desenvolvimento de novas formas para verificar a possibilidade de melhorar as propriedades físico-químicas de fármacos já existentes no mercado e a segunda vertente, a dos desafios, a qual inclui apresentar ensaios de caracterização das formas cristalinas para auxiliar no controle de qualidade desses IFAs a fim de se evitar problemas como toxicidade e/ou ineficácia terapêutica.

REFERÊNCIAS

- AAKERÖY, C. B.; SALMON, D. J. Building *co-crystals* with molecular sense and supramolecular sensibility. **Cryst. Eng. Comm.**, v. 7, n. 72, p. 439-448, 2005.
- AALTONEN, J. et al. Polymorph Screening Using Near-Infrared Spectroscopy. **Anal. Chem.**, v.75, n.19, p.5267- 5273, 2003.
- AALTONEN, J. et al. Solid form screening – a review. **Eur J Pharm Biopharm.** v. 71, n. 1, p. 23-37, 2009.
- AALTONEN, J.; RADES, T. Towards Physico-Relevant Dissolution Testing: The Importance of Solid-State Analysis in Dissolution. **Dissolut. Technol.**, v. 16, n. 2, p. 47-54, 2009.
- AFONSO, R. A. et al. Carvedilol Action Is Dependent on Endogenous Production of Nitric Oxide. **Am. J. Hypertens.**, v. 19, n. 4, p. 419-425, 2006.
- AGUIAR, J. A. et al. Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. **J. Pharm. Sci.**, v. 56, n. 7, p. 847-853, 1967.
- AITIPAMULA, S. et al. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Cryst. Growth Des.**, v. 12, n. 5, p. 2147-52, 2012.
- ALBARELLOS, G. A.; LANDONI, M. F. Current concepts on the use of antimicrobials in cats. **Vet. J.**, v. 180, p. 304–316, 2009.
- ALLEN, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. **Acta Cryst. (Sec.B: Structural Science)**, v. B58, p. 380-388, 2002.
- ALLESØ, M. et al. Solvent diversity in polymorph screening. **J. Pharm. Sci.**, v.97, p.2145-59, 2008.
- AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, n. 3, p. 413–20, 1995.

ARAÚJO et al. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **Int. J. Pharm.**, v. 260, n. 2, p. 303–314, 2003.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Local: Rio de Janeiro. Artmed, 2005. 678p.

AYALA, A. P.; SIESLER, W. H.; CUFFINI, S. L. Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole: a vibrational spectroscopy investigation. **J. Raman Spectrosc.**, v. 39, p. 1150–1157, 2008.

BAKA, E.; COMER, J.E.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 46, n. 2, p. 335-341, 2008.

BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. **Cryst. Growth Des.**, v. 11, p. 2662- 2679, 2011.

BAUER, J. et al. Ritonavir: An extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmaceut Res**, v. 18, n. 6, p. 859-66, 2001.

BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**.3.ed. Local: New York. Oxford University, 2002. 428p.

BERNSTEIN, J. Polymorphism - A Perspective. **Cryst. Growth Des.**, v. 11, n. 3, p. 632-650, 2011.

BHATTACHAR, S. N., DESCHENES, L. A., WESLEY, J. A. Solubility: it's not just for physical chemists. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 21-22, p. 1012–1018, 2006.

BLAGDEN, N. et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 59, n. 7, p. 617-30, 2007.

BOEYENS, J. C. A.; EVANS, D. G. Conformational analysis of ring pucker. **Acta Cryst. (Section B: Structural Science)**, v. B45, n. 6, p. 581-590, 1989.

BOND, A. Fundamental Aspects of Salts and Co-crystals. In: **PHARMACEUTICAL Salts and Co-crystals**, Londres: Royal Society of Chemistry, 2012. cap. 2, p. 9- 28.

BOND, A. What is a co-crystal? **Crystal Engineering Communications**, v. 9, p. 833-843, 2007.

BONFILIO, R. et al. Analysis of chlorthalidone polymorphs in raw materials and tablets and the effect of forms I and II on the dissolution properties of drug products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 88, p. 562-570, 2014.

BORDNER, J. Structure of β -6-deoxyoxytetracycline hydrochloride. **Acta Crystallogr.** (Section B), v. B35, p. 219-222, 1979.

BORGADUS, J. B.; BLACKWOOD, R. B., Jr. Solubility of doxycycline in aqueous solution. **J. Pharm. Sci.**, v. 68, p. 188, 1979.

BOZKURT, B. et al. New insights into mechanisms of action of carvedilol treatment in chronic heart failure patients--a matter of time for contractility. **J Card Fail.**, v. 18, n. 3, p.183-193, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RE n° 899, de 29 de maio de 2003**, determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de jun. de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RESOLUÇÃO-RDC N° 31, DE 11 DE AGOSTO DE 2010**, dispõe sobre a realização dos “Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, n° 154,12 de agosto de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nota técnica n° 003/2013/CEFAR/GTFAR/GGMED/ANVISA**, dispõe sobre a avaliação da solubilidade de fármacos e o desenvolvimento de métodos de dissolução para estudos de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução comparativo, e dá outras providências. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/medicamentos!/ut/p/c4/04_SB8K8xLLM9MSSzPy8xBz9CP0os3hnd0cPE3MfAwMDMydnA093Uz8z00B_A_cgQ_2CbEdFADg hJT0!/?1dmy&urile=wcm%3Apath%3A/anvisa+portal/anvisa/inicio/medicamentos/publicacao+medicamentos/avaliacao+da+solubilidade+de+farmacos+e+o+desenvolvimento+de+metodos+de+dissolucao+para+estudos+de+equivalencia+farmaceutica+e+perfil+de+dissolucao+comparativo+nota+tecnica+n+003. Acesso em: 02 de janeiro de 2016.

- BRION, J. D.; LOPPINET, V.; PLAT, M. **Quinolones**. In: Association Française des enseignants de chimie thérapeutique. Traité de chimie thérapeutique. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1992. v.2: Médicaments antibiotiques.
- BRITISH Pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery Office, v.1, 2011. p. 88–90.
- BRITTAIN, H. G. Polymorphism and solvatomorphism 2010. **J. Pharm. Sci.**, v. 101, n. 2, p. 464–484, 2012.
- BRITTAIN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. 2.ed. New York: Informa Healthcare, 2009.
- BROG, J-P. et al. Polymorphism, what it is and how to identify it: a systematic review. **RSC Adv.**, v.3, p.16905-16931, 2013.
- BROOK, C. S.; CHEN, W.; SPOORS, P. G. Patente: **US 7,268,156 B2**. Carvedilol phosphate salts and/or solvates thereof, corresponding compositions and/or methods of treatment, 2007.
- BRUNO, I. J. et al. Retrieval of Crystallographically-Derived Molecular Geometry Information. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 44, n. 6, p. 2133–2144, 2004.
- BUTLER, A. R., FEELISCH, M. Therapeutic uses of inorganic nitrite and nitrate: from the past to the future. **Circulation**, v. 117, n. 16, p. 2151-2159, 2008.
- BYRN, S. et al. Pharmaceutical Solids: A Strategic Approach to Regulatory Considerations. **Pharm. Res.**, v. 12, n. 7, p. 945–954, 1995.
- BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; STOWELL, J. G. **Solid-state chemistry of drugs**. West Lafayette: SSCI, 1999. 2.ed. 574 p.
- CAIRA, M. R. Sulfa Drugs as Model Cocrystal Formers. **Molecular Pharmaceut.**, v. 4, n. 3, p. 310-316, 2007.
- CARTENSEN, J. T. One-Component Systems. **Advanced Pharmaceutical Solids**. EUA: Marcel Dekker, Inc., 2001. Cap. 1, p. 1–11.

CAZEDEY, E. C. L.; OTHMAN, A.; GARG, S.; SALGADO, H. R. N. A Validated Stability-Indicating LC Method for Orbifloxacin in the Presence of Degradation Products. **Current Pharm. Anal.**, v. 7, p. 176-181, 2011.

CHADA, R.; BANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 87, p. 82– 97, 2014.

CHAUDHARY, A. et al. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v. 2, n. 1, p. 32-67, 2012.

CHEMBURKAR, S. R. et al. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. **Org. Proc. Res. Dev.** v. 4, n. 5, p. 413-17, 2000.

CHEN, W. M et al. Jiegou Huaxue. **Chin.J.Struct.Chem.**, v. 17, p. 325-328, 1998.

CHERNYSHEV, V. V.; KUKUSHKIN, S. Y.; VELIKODNY, Y. A. Carvedilol Dihydrogen Phosphate Hemhydrate: a powder study **Acta Crystallogr., Sect.E:Struct.Rep.Online**, v. 66, p. o613, 2010.

CHIENG, N. et al. Physical characterization and stability of amorphous indomethacin and ranitidine hydrochloride binary systems prepared by mechanical activation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 71, n. 1, p. 47-54, 2009.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis pharmaceutical polymorphs. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, p. 618-644, 2011.

CIANCI, M. et al. Anomalous scattering in structural chemistry and biology. **Crystallogr. Rev.**, v. 11, n. 4, p. 245-335, 2005.

CIMAROSTI et al. Development of Drug Substances as Mixture of Polymorphs: Studies to Control Form 3 in Casopitant Mesylate. **Org. Process Res. Dev.**, v. 14, n. 6, p. 1337–1346, 2010.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modelling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.

CRYSTALIS PRO, version 1.7. Oxford Diffraction Ltd: Abingdon: England, 2006.

CRISP, J. L.; DANN, S. E.; BLATCHFORD, C. G. Antisolvent crystallization of pharmaceutical excipients from aqueous solutions and the use of preferred orientation in phase identification by powder X-ray diffraction. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 42, p. 568–577, 2011.

CRUZ-CABEZA, A. Acid-base crystalline complexes and pKa rule. **CrystEngComm**, v. 14, p. 6362, 2012.

CUNHA, B. A. New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. **Med. Clin. North. Am.**, v. 90, n. 6, p. 1089-1107, 2006.

DANIEL, J. S. P. et al. Risperidone–Solid-state characterization and pharmaceutical compatibility using thermal and non-thermal techniques. **Thermochim. Acta**, v. 568, p. 148-155, 2013.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 42–57, 2004.

DESCHAMPS, J. R. X-ray crystallography of chemical compounds. **Life Sci.**, v. 86, p. 585-589, 2010.

DESIRAJU, G. R. Polymorphism: the same and not quite the same. **Cryst. Growth & Des.**, v. 8, n. 1, p. 3-5, 2008.

DESIRAJU, G. R. Chemistry beyond the molecule. **Nature**, v. 412, n. 6845, p. 397-400, 2001.

DESIRAJU, G. R. Supramolecular synthons in crystal engineering — a new organic synthesis. **Angew. Chem., Int. Ed. Engl.**, v. 34, n. 21, p. 2311-2327, 1995.

DIAZ, F. et al. 1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-{[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino} propan-2-ol hemihydrate: a carvedilol solvatomorph. **Acta Crystallogr., Sect.C: Cryst.Struct.Commun.**, v. 67, p. o222- o225, 2011.

DUDHATRA, G.B. et al. Determination of orbifloxacin in sheep plasma by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection after intravenous and intramuscular administration. **J Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 67, n. 1, p. 50-53, 2013.

DUNITZ, J. D. Phase transitions in molecular crystals from a chemical viewpoint. **Pure & Appl. Chem.**, v. 63, n. 2, p. 177-185, 1991.

DRUGS.COM. Orbax Tablets. Disponível em: <http://www.drugs.com/vet/orbax-tablets.html>. Acesso em 25 set. 2014.

EBAH. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgtEMAB/ensaio-dureza?part=3#>. Acesso em 20 set. 2015.

ELLENA, J. et al. Base-Paired and Base-Stacked Structures of the Anti-HIV Drug Lamivudine: A Nucleoside DNA-Mimicry with Unprecedented Topology. **Cryst Growth Des**, v. 12, p. 5138-5147, 2012.

ETTER, M. C.; MACDONALD, J. C.; BERNSTEIN, J. Graph-set analysis of hydrogen-bond patterns in organic crystals. **Acta Crystallogr. B**, v. 46, p. 256-62, 1990.

EUROPEAN Pharmacopoeia. France: Directorate for Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, 2009, 6. ed.

EV, L.S. **Estudo da estabilidade do ofloxacino em forma farmacêutica solução injetável**. 1997. Tese (Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). UFRGS, Porto Alegre, 1997.

FANDARUFF et. al. Polymorphism of Anti-HIV Drug Efavirenz: Investigations on Thermodynamic and Dissolution Properties. **Cryst. Growth Des.**, v. 14, n. 10, p. 4968-4975, 2014.

Farmacopeia BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FARRUGIA, L. J. ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI). **J. Appl. Crystallogr.**, v. 30, p. 565, 1997.

FARRUGIA, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 32, p. 837, 1999.

FLACK, H. D. Chiral and Achiral Crystal Structures. **Helv. Chim. Acta**, v. 86, p. 905-921, 2003.

FEJDI, P; HOLOCSY, A. Relationship between crystal morphology and preferred orientation in polycrystalline specimens for diffraction experiments. **Materials Structure**, v. 8, n. 1, p.22-24, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: **Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms**; Guidance for Industry; U.S. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry, ANDAs: **Pharmaceutical Solid Polymorphism. Chemistry, Manufacturing, and Controls Information**. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Washington, DC, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: **Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-release, Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System Food and Drug Administration**, Center for Drug Evaluation and Research, 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Guidance for Industry: **Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-crystals; Food and Drug Administration**: Silver Spring, MD, December 2011.

GIACOVAZZO, C. et al. **Fundamentals of Crystallography**. EUA: International Union of Crystallography: Oxford Science Piublication, 2011. 3. ed., 872p.

GILLON, A.L.; FEEDER, N.; DAVEY, R.J.; STOREY, R. Hydration in molecular crystals - a Cambridge structural database analysis. **Cryst. Growth Des.**, v.3, N.5, P.663-673, 2003.

GOLDBEK, G.; PIDCOK, E.; GROOM, C. Solid form informatics for pharmaceuticals and agrochemicals: knowledge-based substance development and risk assessment. **Cambridge Crystallographic Data Centre**, p.1-8, 2011. Disponível em: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/Lists/ResourceFileList/Solid%20Form%20Informatics%20.pdf>. Acesso em 20 out. 2014.

GORANTLA, S. R. et al. Carvedilol Phosphate Sesquihydrate. **Patente: US 8,344,159 B2**, 1 jan. 2013.

GOUDAH, A.; ABO-EL-SOUD, K. Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous and intramuscular injections to dromedary lactating camels (*Camelus dromedaries*). **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 31, p. 276–280, 2008.

GRAY et al. The Science of USP 1 and 2 Dissolution: Present Challenges and Future Relevance. **Pharm. Res.**, v. 26, n. 6, p. 1289-1302, 2009.

GRIESSER, U.J. The importance of solvates. In: HILFIKER, R. (Ed.). **Polymorphism in pharmaceutical industry**. Weinheim: Wiley –VCH, 2006. cap. 8, p.211-230.

HAMBRIDGE, T. Who Food Additives Series: 50- **Nitrate and Nitrite**. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm>. Acesso em abril, 2014.

HAMED, R. pH-Dependent Solubility and Dissolution Behavior of Carvedilol-Case Example of a Weakly Basic BCS Class II Drug. **AAPS PharmSciTech**, v. 1, p. 1-9, 2015.

HANCOCK, B. C.; PARKS, M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? **Pharmacol Res.**, v. 17, n. 4, p. 397-404, 2000.

HASEGAWA, K. Introduction to single crystal X-ray analysis. **The Rigaku Journal**, v.28, n. 1, p. 14-18, 2012.

HELMY, R. et al. Characterization and Quantitation of Aprepitant Drug Substance Polymorphs by Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 3, p. 605-611, 2003.

HEINEMANN, F. W. et al. X-ray crystallography of tetracycline, doxycycline and sancycline. **J. Chem. Crystallogr.** v. 43, n. 4, p. 213- 222, 2013.

HEIZMANN, W. R. Doxycycline-the forgotten antibiotic. **Med. Klin.**, v. 96, n. 3, p. 181, 2000.

HENDRIKSEN, B. A.; WILLIAMS, J. D. Characterization of calcium fenoprofen 2. Dissolution from formulated tablets and compressed rotating discs. **Int. J. Pharm.** v. 69, n. 2, p. 175–180, 1991.

HERBSTEIN, F. H. Crystalline Molecular Complexes and Compounds: structures and principles. **IUCr monographs on crystallography**. Oxford University Press, v. 1, 2005.

HICKEY, M. B.; ALMARSSON, Ö; PETERSON, M. L. Crystal engineering and crystallography in the pharmaceutical industry. **Cryst.Eng.Comm.**, v. 14, n. 7, p. 2349-2349, 2012.

HILDESHEIM, J. et al. Carvedilol. **Patente: US 6699997 B2**, 2 mar. 2004.

HILDESHEIM, J. et al. Carvedilol. **Patente: US 7,056,942 B2**, 6 jun. 2006.

HOFFMANN, R.W. Meso Compounds: Stepchildren or Favored Children of Stereoselective Synthesis? **Angew Chem Int**, v. 42, p. 1096 -1109, 2003.

HU, Y. et al. Quantitative analysis of sulfathiazole polymorphs in ternary mixtures by attenuated total reflectance infrared, near-infrared and Raman spectroscopy. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 53, n. 3, p. 412–420, 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Guide Q6A:Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and New drug products: chemical substances, 1999**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Acesso em 27 de março de 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2), 2003**. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Acesso em 25 de março de 2015.

IHRKE, P. J.; PAPICH, M. G.; DEMANUELLE, T. C. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. **Vet. Dermatol.**, v. 10, p. 193–204, 1999.

ISAACS, L. Approaches to drug delivery based on the principles of supramolecular chemistry. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 64, n. 9, p. 763, 2012.

ISSA, G. M. et al. Development of a dissolution test method for enrofloxacin tablets using factorial design. **Int. J. Experimental Design and Process Optimisation**, v. 3, n. 4, p. 435, 2013.

JULIO, T. A. et al. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC–UV. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 111, n. 3, p. 2037-2044, 2013a.

JULIO, T. A. et al. Compatibility and stability of valsartan in a solid pharmaceutical formulation. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 49, n. 4, p. 645-651, 2013b.

KACHRIMANIS, K.; RONTOGIANNI, M.; MALAMATARIS, S. Simultaneous quantitative analysis of mebendazole polymorphs A–C in powder mixtures by DRIFTS spectroscopy and ANN modeling. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 51, n. 3, p. 512–520, 2010.

KAYE, D. M. et al. Mechanisms of Carvedilol Action in Human Congestive Heart Failure. *Hypertension*, v. 37, p. 1216-1221, 2001.

KHANNA, I. Drug Discovery in Pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19/20, p. 1088- 1102, 2012.

KHANKARI, R. K.; GRANT, D. J. W. Pharmaceutical hydrates. **Thermochim. Acta**, v. 248, n. 2, p. 61-79, 1995.

KUMAR, L; AMIN, A.; BANSAL, A. K. Preparation and characterization of salts forms. **Pharm. Develop. Technol.**, v. 13, p. 345-357, 2008.

LÁNG, P. et al. Polymorph screening of an active material. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 84., p. 177-183, 2013.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annu Rev Chem Biomol Eng.**, v. 2, p. 259-280, 2011.

LEE, E. H. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. **Asian J Pharm Sci**, v. 9, p. 163-175, 2014.

LEGENDRE, A. O. et al. Solid state chemistry of the antibiotic doxycycline: structure of the neutral monohydrate and insights into its poor water solubility. **Cryst. Eng. Comm.**, v. 14, n. 7, p. 2532-2540, 2012.

- LI, Y.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Quantification of polymorphic impurity in an enantiotropic polymorph system using differential scanning calorimetry, X-ray powder diffraction and Raman Spectroscopy. **Int. J. Pharm.**, v. 415, p. 110-118, 2011.
- LIN, S. Y.; CHENG, W. T.; WANG, S. L. Thermodynamic and kinetic characterization of polymorphic transformation of famotidine during grinding. **Int. J. Pharm.**, v. 318, p. 86–91, 2006.
- LÖBMANN, K. et al. Coamorphous drug systems: enhanced physical stability and dissolution rate of indomethacin and naproxen. **Mol. Pharm.**, v. 8, p. 1919-1928, 2011.
- LOFTOSSON, T. et al. Carvedilol: Solubilization and Cyclodextrin Complexation: A Technical Note. **AAPS PharmSciTech.**, v. 9, n. 2, p. 425–430, 2008.
- MACRAE, C. F. et al. Mercury CSD 2.0 - new features for the visualization and investigation of crystal structures. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 41, p. 466-470, 2008.
- MARTELLI-SILVA, D. Obtenção e caracterização de pseudo-polimorfos de doxiciclina. **Dissertação (Mestrado em Mestrado Em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Federal de Alfenas, 2011.
- MARTIN, F. A. et al. Ketoconazole salt and co-crystals with enhanced aqueous solubility. **Cryst. Growth Des.**, v. 13, n. 10, p. 4295- 4304, 2013.
- MARTINS, F. T. et al. Conformational Polymorphism in Racemic Crystals of the Diuretic Drug Chlortalidone. **Cryst. Growth Des.**, v. 9, p. 3235-3244, 2009a.
- MARTINS, F. T. et al. Crystal Engineering of an Anti-HIV Drug Based on the Recognition of Assembling Molecular Frameworks. **Cryst. Growth Des.**, v. 9, p. 5283-5292, 2009b.
- MARTINS, F. T.; DORIGUETTO, A. C.; ELLENA, J. From Rational Design of Drug Crystals to Understanding of Nucleic Acid Structures: Lamivudine Duplex. **Cryst. Growth Des.**, v. 10, p. 676-684, 2010.
- MARTINS, F. T. et al. Solvothermal Preparation of Drug Crystals: Didanosine. **Cryst Growth Des.**, v. 10, p. 1885-1891, 2010.

MARTINS, F. T. et al. Increasing the symmetry of drug crystals: a monoclinic conformational polymorph of the platelet antiaggregating agent ticlopidine hydrochloride. **Cryst Eng Comm**, v. 13, p. 5737-5743, 2011.

MARTINS, F. T. et al. Form III-like conformation and Form I-like packing in a chloroform channel solvate of the diuretic drug chlortalidone. **Cryst Eng Comm**, v. 14, p. 6173-6177, 2012.

MARTINS, F. T. et al. The form II of the antihypertensive drug chlortalidone. **Cryst Eng Comm**, v.15, p. 3767-3771, 2013.

MARTÍNEZ, P.B.; NAVARRO, M.G. **Dissoluciones**. In: Vila Jato JL, editor. *Tecnología Farmacêutica: Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacêuticos y Operaciones básicas*. Madri:Síntesis; 2001. p. 6-142.

MAURIN, J. K. et al., The usefulness of simple X-ray powder diffraction analysis for counterfeit control: the Viagra example. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 43, n. 4, p. 1514-1518, 2007.

MOHAMED, S.; TOCHER, D. A.; VICKERS, M.; KARAMERTZANIS, P. G. Salt or Cocrystal? A new series of crystal structures formed from simple pyridines and carboxylic acids. **Cryst. Growth Des.**, v. 9, n. 6, p. 2881-2889, 2009.

MOKABBERI, R.; HAFTBARADARAN, A.; RAVAKHAH, K. Doxycycline vs. levofloxacin in the treatment of community-acquired pneumonia. **J. Clin. Pharm. Ther.**, v. 35, n. 2, p. 195- 200, 2010.

MORISSETTE, S. L. et al. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Adv. Drug Deliver Rev.**, v. 56, n. 3, p. 275-300, 2004.

MORRIS, K.R.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. **Hydrates**. In Swarbrick, J. & Boylan, J., eds. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker, 1993.

MOULTON, B.; ZAWOROTKO, M. J. From molecules to crystal engineering: supramolecular isomerism and polymorphism in network solids. **Chem. Rev.**, v. 101, n. 33, p.1629-1658, 2001.

NESTERENKO, V. F.; BONDAR, M. P.; ERSHOV, V. Instability of plastic flow at dynamic pore collapse. **AIP Conf. Proc.**, v. 309, p. 1173-1176, 1994.

NEWMAN, A. W.; BYRN, S. R. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. **Drug Discov. Today**, v. 8, n. 19, p. 898-905, 2003.

NUNN, T.; WILLIAMS, J. Formulation of medicines for children. **Brit. J. Clin. Pharmacol.**, v. 59, n. 6, p.674–676, 2005.

OLIVEIRA et al. Analysis of phase transition and dehydration processes of nevirapine. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 108, n. 1, p. 53-57, 2012.

O'NEIL, M. J. (Ed.). **The Merck Index**: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station (NJ): Merck & Co., 2006, 14. ed., p.1182.

PAJANDER, J. et al. Foreign matter identification from solid dosage forms. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 80, p. 116–125, 2013.

PAUL, E. L.; TUNG, H. H.; MIDLER, M. Organic crystallization processes. **Powder Technology** , v.150, p. 133– 143, 2005.

PHADNIS, N. V.; CAVATUR, R. K.; SURYANARAYANAN, R. Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.15, p. 929-943, 1997.

POOLE-WILSON, P. A. et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol or Metoprolol European Trial (COMET). **Lancet**, v. 362, p. 7–13, 2003.

PRADO et al. An insight into carvedilol solid forms: effect of supramolecular interactions on the dissolution profiles. **Cryst. Eng. Comm.**, v. 16, p. 3168-3179, 2014.

PUROHIT, R.; VENUGOPALAN, P. Polymorphism: An Overview. **Reson.**, v.14, n.9, p.882-93, 2009.

QIU, J. et al. Quantification of febuxostat polymorphs using powder X-ray diffraction technique. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 107, p. 298-303, 2015.

RAIJADA, D.; CORNETT, C.; RANTANEN, J. A high throughput platform for understanding the influence of excipients on physical and chemical stability. **Int J Pharm.**, v. 453, n. 1, p. 285-292, 2013.

RÄSÄNEN, E.; SANDLER, N. Near infrared spectroscopy in the development of solid dosage forms. **J.Pharm.Pharmacol.**,v. 59, p. 147–159, 2007.

REINHOUDT, D. N. Supramolecular Chemistry and Heterocycles. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095472053968#>. Acesso em: 13 set. 2014.

REYNOLDS, J.E.F. (Ed). **Martindale the extra pharmacopoeia**. 35.ed. London: Pharmaceutical Press, 2007, p.278.

REZENDE, S.M. **Materiais e dispositivos eletrônicos**. 2.ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2004.

ROBERTS, S.N.C. et al. Quantitative analysis of mannitol polymorphs. X-ray powder diffractometry—exploring preferred orientation effects. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, n. 6, p. 1149–1159, 2002.

RODRIGUEZ-ALLER, M. et al. Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs. **J. Drug Deliv. Sci. Tec.** , v. 30, p. 342- 351, 2015.

ROSA, M. F.; VILHENA, R. O. Dissolução intrínseca: conceito e aplicações na indústria farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IX, n. 1, p. 49 - 61, 2012.

RUSTICHELLI et al. Solid-state study of polymorphic drugs: carbamazepine. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, n. 1, p. 41–54, 2000.

SAHOO, S. et al. FTIR and XRD investigations of some fluoroquinolones. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, n. 3, p. 165-170, 2011.

SAIFEE, M. et al. Drug Polymorphism: A Review. **Int. J.Health Res.**, v. 2, n. 4, p. 291- 306, 2009.

SANTOS, O.M.M. et al. A Dissolution Test for Finasteride in Immediate-Release Capsules. **Dissolut. Technol.**, v. 2, p. 25- 33, 2013.

SANTOS, O. M. M. et al. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 50, n. 1, p. 1-24, 2014a.

SANTOS, O. M. M. et al. Protonation Pattern, Tautomerism, Conformerism, and Physicochemical Analysis in New Crystal Forms of the Antibiotic Doxycycline. **Cryst Growth Des.**, v. 14, p. 3711–3726, 2014b.

SANTOS, O. M. M. et al. Structure, Solubility and Stability of Orbifloxacin Crystal Forms: Hemihydrate *versus* Anhydrate. **Molecules**, v. 21, p. 328-347, 2016.

SATO, J. A. P.; FERREIRA, F. F. Caracterização em estado sólido de medicamentos genérico, similar e referência do cloridrato de propranolol. **Braz. J. of Therm. Anal.**, v. 4., n. 4, p. 62-69, 2015.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. **International Scholarly Research Network ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1 -10, 2012.

SIMONOT-GRANGE, M. H. Thermodynamic and structural features of water sorption in zeolites. **Clays Clay Miner**, v. 27, p. 423-428, 1979.

SCHULTHEISS, N.; HENCK, J. O. Role of cocrystals in the pharmaceutical development continuum. In: **PHARMACEUTICAL Salts and Cocrystals**. Londres:RSC Publishing, 2012. Cap. 6. p. 110-127.

SCHULTHEISS, N.; NEWMAN, A. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. **Cryst. Growth Des.**, v. 9, n. 6, p. 2950-2967, 2009.

ŠEHIĆ, S. et al. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. **Int. J. Pharm.**, v. 386, p. 77-90, 2010.

SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 59, n. 7, p. 603-616, 2007.

SHAH, D. R. et al. Process for manufacture of racemic Carvedilol **US Patent 7875730 B2**, 2011.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. **Drug Discov. Today**, v. 13, n. 9-10, p. 440-446, 2008.

SHELDRICK, G. M. A short history of SHELX. **Acta Crystallogr. Section A**, v. A64, p.112-122, 2008.

SILVA, L. A; MARTINS, C. R.; de ANDRADE, J. B. Por que todos os nitratos são solúveis? **Quim. Nova**, v. 27, p. 1016- 1020, 2004.

SKÚLASON, S.; INGÓLFSSON, E.; KRISTMUNDSÓTTIR, T. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 33, n. 4, p. 667-672, 2003.

SNIDER, D. A.; ADDICKS, W.; OWENS, W. Polymorphism in generic drug product development. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 56, n.3, p. 391-395, 2004.

SOUZA, J.; FREITAS, Z. M. F.; STORPIRTIS, S. In vitro models for the determination of drug absorption and a prediction of dissolution/absorption relationships. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, p. 515-527, 2007.

STEPHENSON, G. A.; FORBES, R. A.; REUTZEL-EDENS, S. M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 48, n. 1, p. 67-90, 2001.

STEZOWSKI, J. J. Chemical-structural properties of tetracycline antibiotics. 4. Ring A tautomerism involving the protonated amide substituent as observed in the crystal structure of α -6-deoxyoxyte- tracycline hydrohalides. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 99, n. 4, p. 1122- 1129, 1977.

SWANEPOEL, E; LIEBENBERG, W; DE VILLIERS, M. M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 55, n. 3, p. 345-349, 2003.

TAYLOR, L. S.; ZOGRAFI, G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. **Pharmaceut. Res.**, v.14, p.1691-1698, 1997.

TENHO, M. et al. Does the preferred orientation of crystallites in tablets affect the intrinsic dissolution? **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 1315-1323, 2007.

THAYER, A. M. Finding solutions: custom manufacturers take on drug solubility issues to help pharmaceutical firms move products through development. **Chem. Eng. News**, v. 88, n. 22, p. 13-18, 2010.

TRASK, A. V.; MOTHERWELL, W. D.; JONES, W. Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization. **Int J Pharm**, v. 320, n. 1-2, p. 114-23, 2006.

UNITED STATES PHARMACOPEIA - National Formulary (USP38- NF33). 38ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015, 3000 p.

VARIANKAVAL, N. E; JACOB, K. I; DINH, S. M. Characterization of crystal forms of β -estradiol- Thermal analysis, Raman microscopy, X-ray analysis and solid-state NMR. **J. Cryst. Growth**, n. 217, p. 320-331, 2000.

VERONEZ, I. P. et al. Characterization and compatibility study of desloratadine. **J. Therm. Anal. Calorim.**, v. 115, n. 3, p. 2407-2414, 2014.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, n. 48, p. 3-26, 2001.

VOGT, F. G. et al. Isomorphism, Disorder, and Hydration in the Crystal Structures of Racemic and Single-Enantiomer Carvedilol Phosphate. **Cryst.Growth Des.**, v. 10, n. 6, p. 2713-2733, 2010.

VON RAUMER, M.; DANNAPPEL, J.; HILFIKER, R. Polymorphism, salts, and crystallization. The relevance of solid-state development. **Chim. Oggi**, v. 24, n. 1, p. 41-44, 2006.

WANG, S. L; LIN, S. Y; WEI, Y. S. Transformation of Metastable Forms of Acetaminophen Studied by Thermal Fourier Transform Infrared (FT-IR) Microspectroscopy. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n.2, p. 153-156, 2002.

YATHIRAJAN, H. S. et al. A second polymorph of carvedilol. **Acta Crystallogr., Sect.E: Struct.Rep.Online**, v. 63, p. o542, 2007.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Adv Drug Deliver Rev.**, v. 48, n. 1, p. 27-42, 2001.

YU, L. X. et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 270, p. 221-227, 2004.

ZAKERI-MILANI, P. et al., Biopharmaceutical classification of drugs using intrinsic dissolution rate (IDR) and rat intestinal permeability. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 73, n. 1, p. 102-106, 2009.