



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



DOUGLAS MARTELLI E SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PSEUDO-POLIMORFOS DE
DOXICICLINA**

Alfenas/MG

2011

DOUGLAS MARTELLI E SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PSEUDO-POLIMORFOS DE
DOXICICLINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Farmácia pelo programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto

Co-Orientador: Prof. Dr. Person Pereira Neves

Alfenas/MG

2011

Silva, Douglas Martelli e.

Obtenção e caracterização de pseu-polimorfos de doxiciclina . /
Douglas Martelli e Silva . - 2011.
99 f. -

Orientador: Antônio Carlos Doriguetto.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

1. Doxiciclina. 2. Polimorfismo (Cristalografia). 3. Dissolução. I.
Doriguetto, Antônio Carlos. II. Título.

CDD: 615

DOUGLAS MARTELLI E SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PSEUDO-POLIMORFOS DE
DOXICICLINA**

A banca-examinadora abaixo assinada aprova a presente dissertação apresentada como parte dos requisitos para a conclusão do curso de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos

Aprovado em: 11 de agosto de 2011.

Prof.Dr. Antônio Carlos Doriguetto

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan

Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Prof^a. Dr^a. Renata Diniz

Instituição: UFJF – MG

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e a minha família e namorada pelo apoio e paciência.

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade que me foi concedida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto, pelo apoio, ensinamentos, coragem e por aceitar orientar um farmacêutico nesta nobre e complexa área de polimorfismo de fármacos.

Ao Prof. Dr. Person Pereira Neves, pela amizade, colaboração e Co-orientação

Ao Prof. Dr. Alexandre Legendre pela colaboração, em toda parte experimental, pelos conselhos, humildade, amizade e presteza que foram essenciais.

À amiga e colega de trabalho Lilian C. Azarias que esteve presente na obtenção e caracterização das amostras, sempre colaborando e trabalhando precisamente.

Aos professores: Luiz Alberto Beijo, Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, Geraldo Alves da Silva, Ihosvany Camps Rodríguez, Fábio Luiz Pissetti, Marcelo Henrique dos Santos, Eduardo Tonon de Almeida, Magali Benjamin de Araújo, Isarita Martins Sakakibara, Paulo Cesar Mendes Villis, Elivelton Alves Ferreira, Roberto Bertholdo, Carlos Basílio Pinheiro e outros que colaboraram indiretamente durante minha formação e durante o trabalho.

Aos professores membros da comissão avaliadora, Dra. Renata Diniz, Dr. Marcello Garcia Trevisan, Dra. Gislaine Ribeiro Pereira e Dr. Jackson Antônio L. C. Resende por aceitarem o convite e pela colaboração prestada com observações e questionamentos imprescindíveis para melhorar e fortalecer o trabalho realizado.

Aos amigos e colegas do Grupo de Química do Estado Sólido e Cristalografia, os quais foram fundamentais, pois deram importantes colaborações profissionais e pessoais e aos amigos e colegas pela ajuda e convivência.

Ao Laboratório de Cristalografia da UFMG (LabCri) pelas medidas de XRD, especialmente a aluna e colega Iara Maria Landre Rosa.

Ao laboratório de Controle Qualidade da Unifal, especialmente a funcionária e mestranda Olímpia Maria Martins Santos.

Aos funcionários da Unifal-MG, de diversos setores, que sempre foram cordiais e muito prestativos.

Às instituições de fomento a pesquisa CNPq, FAPEMIG, CAPES e FINEP.

E a todos que estiveram envolvidos durante minha passagem pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

O ingrediente farmacêutico ativo (API) doxiciclina (DOX), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, 2-naphthacencarboxamide, nome IUPAC 4(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-, [4S-(4 α , 4a α , 5 α , 5a α , 6 α ,12a α)], é um antibiótico de largo espectro usado no tratamento de infecções respiratórias e do trato urinário e, a exemplo de outros medicamentos, pode ter a eficácia afetada pelo fenômeno do polimorfismo em sólidos farmacêuticos. Até o presente momento, só é conhecida a estrutura cristalina do hidrato de doxiciclina (DOX•HIC), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, HCl, $\frac{1}{2}$ C_2H_6O (etanol), $\frac{1}{2}$ H_2O , 512,9 g/mol, o qual é o nome genérico da forma pseudo-polimórfica da DOX usada como API de medicamentos de referência como DORYX®, PERIOSTAT®, ATRIDOX® e VIBRAMYCIN®. Parte desse trabalho apresenta, pela primeira vez, a caracterização estrutural por meio de difração de raios X por monocristal (MXRD), de outra forma pseudo-polimórfica comercial da DOX conhecida como doxiciclina mono-hidratada (DOX•H₂O), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, H_2O , 462,45 g/mol, o qual é o nome genérico do insumo usado na fabricação de medicamentos de referência como MONODOX® e ORACEA®. Além de reportar pela primeira vez a estrutura da DOX•H₂O, nesse trabalho foram sintetizadas e cristalizadas duas novas formas pseudo-polimórficas da DOX: 1) A doxiciclina dihidratada co-cristalizada/solvatada com ácido acético (DOX•HAc), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, 2 H_2O , $C_2H_4O_2$ (ácido acético), 512,93 g/mol; e 2) o nitrato de doxiciclina hemi-hidratado (DOX•NIT), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, HNO_3 , $\frac{1}{2}H_2O$, 516,46 g/mol. As estruturas cristalinas das duas formas inéditas também foram determinadas inambiguamente por MXRD. As estruturas das três formas pseudo-polimorfos inéditas da DOX foram comparadas à estrutura do DOX•HIC e analisadas em termos de suas geometrias intra e intermoleculares. Todas as formas cristalizam-se como “zwitterions” da DOX no qual o grupo dimetilamina está protonado e uma hidroxila está desprotonada. Dois confômeros foram observados para a DOX•NIT, a exemplo do que foi observado previamente para o DOX•HIC, o que significa que o grupo amina está próximo do enolato de um dos confômeros (T1) e próximo à carbonila no outro (T2). Em outras palavras, ocorre uma rotação de 180° em torno da ligação C-C do grupo amida que direciona o oxigênio do grupo amida para a direção do grupo dimetilamina, no caso de um dos confômeros (T1) presente no estado sólido, enquanto na outra molécula de DOX, independente por simetria (T2), o átomo de

nitrogênio da amida está do mesmo lado da amina. Outra importante similaridade entre o DOX•HIC e o DOX•NIT é que em ambas a DOX possui duas cargas positivas e uma negativa e é portanto um cátion, diferentemente da DOX•H₂O e da DOX•HAc, para as quais o “zwitterion” gera uma carga positiva e uma negativa, sendo a molécula neutra. Apesar da DOX•H₂O e da DOX•HAc serem neutras e apresentarem apenas uma moléculas de DOX na unidade assimétrica, as duas estruturas diferem significativamente em outros aspectos estruturais. Na DOX•HAc é o átomo de nitrogênio do grupo amida que está voltado para o grupo dimetilamina, enquanto na DOX•H₂O é o átomo de oxigênio da amida que está voltado para o grupo dimetilamina. Portanto, a DOX•HAc sólido exibe a forma tautomérica e a conformação da amida observada no DOX•HYC T2, enquanto a DOX•H₂O sólida exibe a forma tautomérica do DOX•HYC T2 e a conformação da amida do DOX•HYC T1. Em termos gerais, desde que a doxiciclina é uma molécula robusta do ponto de vista conformacional (poucos ângulos diedros), sua geometria intramolecular apresenta poucas distorções como resultado de forças intermoleculares. Contudo, a presença de solventes, águas e íons na rede cristalina parece afetar a rotação da ligação C-C da amida levando aos confômeros e, ou tautômeros T1 e T2. O empacotamento cristalino das formas pseudo-polimórficas da DOX estudadas nesse trabalho são estabilizadas por várias ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas e não-clássicas envolvendo interações DOX-DOX, DOX-água, DOX-solvente, DOX-íon, água-água, solvente-solvente, íon-íon, água-solvente, íon-solvente e íon-água. Essas diferenças nas interações intermoleculares tem como consequência comportamentos diferenciados na solubilidade e no perfil de dissolução do DOX•HIC, da DOX•H₂O, da DOX•HAc e do DOX•NIT. Apesar disso, os testes de dissolução e solubilidade mostraram que todas as formas pseudo-polimórficas apresentam biodisponibilidade equivalente aos API comercializados. Todas as formas pseudo-polimórficas foram também caracterizadas por difração de raios X por pó e espectroscopia na região do infravermelho.

Palavras-Chave: Doxiciclina. Polimorfismo (Cristalografia) / pseudo-polimorfismo de sólidos farmacêuticos. Dissolução

ABSTRACT

The active pharmaceutical ingredient (API) doxycycline (DOX), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, 2-naphthacene-carboxamide, IUPAC name 4(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-, [4S-(4 α , 4a α , 5 α , 5a α , 6 α , 12a α)], is a broad-spectrum antibiotic mainly used in the treatment of respiratory and urinary tract infections and, like many drugs, its efficacy may be affected by the polymorphism phenomenon. Up to now, only the crystal structure of doxycycline hydrochloride (DOX•HCl), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, HCl, $\frac{1}{2}$ C_2H_6O (ethanol), $\frac{1}{2}$ H_2O , 512,9 g/mol, which is the generic name of a DOX pseudo-polymorphic form used as API in brand names such as DORYX®, PERIOSTAT®, ATRIDOX®, and VIBRAMYCIN®, has been reported. Part of this study presents the monocystal X-ray diffractometry (MXRD) structural characterization of another DOX commercial pseudo-polymorphic form, namely, doxycycline monohydrate (DOX•H₂O), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, H_2O , 462,45 g/mol, which is the generic name of brand names such as MONODOX® and ORACEA®. Beyond to report for the first time the crystal structure of DOX•H₂O, others two new pseudo-polymorphic forms of the DOX were synthesized and crystallized in the present study: 1) doxycycline dihydrate co-crystallized/solvated with acetic acid (DOX•HAc), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, 2H₂O, C₂H₄O₂ (acetic acid), 512,93 g/mol; and 2) doxycycline nitrate hemihydrate (DOX•NIT), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, HNO₃, $\frac{1}{2}$ H₂O, 516,46 g/mol. The crystal structure of DOX•HAc and DOX•NIT were also unambiguously determined by MXRD methods. The three new pseudo-polymorphic forms of DOX were compared with the known one, DOX•HCl, and analyzed in terms of intra and intermolecular geometries. All forms crystallize as zwitterions in which the dimethylamine group is protonated and one hydroxyl group is deprotonated. Two conformers were observed in the DOX•NIT as previously reported for DOX•HCl, i.e., the amine group is next to the enolate in one of them (T1) and beside the carbonyl in the other one (T2). In other words, occurs a rotation around the C–C bond of the amide group, directing the oxygen toward the amine group in one (T1) of the two conformers present in these solid state phases, while in the other crystallographically independent molecule (T2), the amide nitrogen atom is at the same side of the amine. Another important similarity of DOX•HCl and DOX•NIT is that in both structure the DOX appears as a cation, differently of DOX•H₂O and DOX•HAc for which the DOX is neutral. In spite of being both neutral and present just one DOX molecule in

the asymmetric unit, DOX•H₂O and DOX•HAc differ themselves. While DOX•HIC and DOX•NIT present two tautomers, T1 and T2, the conformer T1 and tautomerism observed for T2 was found in DOX•HAc and either conformer or tautomer of T2 was found in DOX•H₂O. In general, since doxycycline is a conformationally robust molecule, its framework adopts only small distortions due to variable intermolecular hydrogen bonding patterns. Nevertheless, the presence of crystallization solvent, water and/or ions in the lattice affects the rotation around the C–C bond of the amide group, directing the NH₂ portion toward the amine in one (T2) of the two crystallographically independent molecules, while in the another one (T1), the amide oxygen atom is next to amine.. The crystal packing of DOX forms studied here are stabilized by several intermolecular hydrogen bonds (classical and non-classical), involving interactions DOX-DOX, DOX-water, DOX-solvent, DOX-ion water-water, solvent-solvent, ion-ion, water-solvent, ion-solvent, ion-water. The differences of these supramolecular interactions when the pseudo-polymorphic forms are compared result in significant differences in the solubility and in the dissolution profile of the DOX•HIC, DOX•H₂O, DOX•HAc, and DOX•NIT also performed in this work. However, all forms do not show significant differences in the bioavailability of the API DOX. The four DOX pseudo-polymorphic forms were also characterized by powder X-ray diffraction and infrared spectroscopy.

Key-words: Doxycycline. Polymorphism (Crystallography) / pseudo-polymorphism in pharmaceutical solids. Dissolution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura molecular da DOX.....	18
Figura 2 -	Substituição do grupo 6-hidroxi (Oxitetraciclina) pelo grupo metila (Doxiciclina). Procedimento que confere ao composto maior estabilidade e ação prolongada.....	18
Figura 3 -	Representação do empacotamento cristalino da DOX·HIC ao longo do plano [110].....	19
Figura 4 -	Representação da técnica de lenta evaporação do solvente.	36
Figura 5 -	Representação da técnica de saturação de vapor.....	37
Figura 6 -	Representação da técnica cristalização em gel.....	37
Figura 7 -	Representação Ortep da DOX·HIC T1 (a) e DOX·HIC T2 (b). Presentes na unidade assimétrica da DOX·HIC.....	42
Figura 8 -	Diagrama químico da DOX·HIC T1 (a) e DOX·HIC T2 (b).....	43
Figura 9 -	Representação ORTEP da unidade assimétrica da DOX·H ₂ O.....	45
Figura 10 -	Representação ORTEP das interações intramoleculares na DOX·H ₂ O.....	46
Figura 11 -	Diagrama ORTEP do anel da doxiciclina ao qual o grupo amida está ligado na DOX·H ₂ O.....	48
Figura 12 -	Ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de doxiciclina e água.....	49
Figura 13 -	Padrão intermolecular $R_2^2(9)$ formado entre unidades DOX adjacentes.....	50
Figura 14 -	Cadeia em zig-zag observada na estrutura cristalina da DOX·H ₂ O.....	50
Figura 15 -	Representação esquemática da rede bidimensional formada pelas interações supramoleculares entre moléculas de água e de doxiciclina.....	51
Figura 16 -	Diagrama ORTEP das ligações de hidrogênio entre o tautômero DOX·HIC T2 e a molécula de etanol de cristalização. Legendas análogas à DOX·H ₂ O.....	52

Figura 17 -	Sobreposição das unidades de doxiciclina em DOX·H ₂ O.....	52
Figura 18 -	Representação ORTEP da unidade assimétrica da DOX·HAc.....	55
Figura 19 -	Representação ORTEP comparando as interações intra e intermoleculares na a) DOX·H ₂ O e b) na DOX·HAc.....	55
Figura 20 -	Ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de DOX e água.....	56
Figura 21 -	Padrão intermolecular entre as unidades de DOX e ácido acético.....	57
Figura 22 -	Padrão intermolecular de ligações de hidrogênio ao longo da direção [100].....	57
Figura 23 -	Empacotamento cristalino da DOX·HAc vista perpendicular ao plano [011].....	58
Figura 24 -	Empacotamento cristalino da DOX·HAc vista perpendicular ao plano [101].....	58
Figura 25 -	Representação ORTEP da DOX·NIT T1 (a) e DOX·NIT T2 (b) presentes na unidade assimétrica da DOX·NIT.....	62
Figura 26 -	Padrão intermolecular entre as unidades de DOX, água e nitrato ordenado.....	64
Figura 27 -	Padrão intermolecular entre as unidades de DOX, água e nitrato desordenado.....	64
Figura 28 -	Empacotamento cristalino da DOX·NIT vista perpendicular ao longo do plano [1 1 -1].....	66
Figura 29 -	Empacotamento cristalino da DOX·NIT vista perpendicular ao plano [01-1].....	67
Figura 30 -	Empacotamento cristalino da DOX·NIT vista perpendicular ao plano [10-1].....	67
Figura 31 -	Empacotamento cristalino da DOX·NIT vista perpendicular ao plano [110].....	68
Figura 32 -	Difratograma de raios X por pó experimental do DOX·HIC....	69
Figura 33 -	Difratograma de raios X por pó experimental do DOX·H ₂ O....	70
Figura 34 -	Difratograma de raios X por pó experimental do DOX·HAc...	70
Figura 35 -	Difratograma de raios X por pó experimental do DOX·NIT....	70

Figura 36 -	Espectro vibracional na região do infravermelho da DOX·HYC, da DOX·H ₂ O, da DOX·HAc e do DOX·NIT.....	71
Figura 37 -	Espectro vibracional comparado na região de 600 a 1500 cm ⁻¹ das diferentes formas pseudo-polimórficas da DOX.....	73
Figura 38 -	Análise de varredura (UV-VIS) entre 200 a 450 nm das diferentes formas pseudo-polimórficas da DOX.....	78
Figura 39 -	Curva de calibração do DOX·HIC.....	79
Figura 40 -	Curva de calibração do DOX·H ₂ O.....	80
Figura 41 -	Curva de calibração do DOX·HAc.....	80
Figura 42 -	Curva de calibração do DOX·NIT.....	81
Figura 43 -	Perfil de dissolução comparativo entre DOX·HIC, DOX·H ₂ O, DOX·HAc e DOX·NIT.....	83
Figura 44 -	Perfil de dissolução comparativo entre DOX·HIC, DOX·H ₂ O, DOX·HAc e DOX·NIT.....	84
Figura 45 -	Perfil de dissolução comparativo entre DOX·HIC, DOX·H ₂ O, DOX·HAc e DOX·NIT.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físicas afetadas por diferentes polimorfos.....	21
Tabela 2 - Classificação biofarmacêutica para fármacos.....	30
Tabela 3 - Ponto de Fusão e Análise de Variância (ANOVA).....	40
Tabela 4 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura para da DOX•HIC.....	41
Tabela 5 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura da DOX•H ₂ O.....	44
Tabela 6 - Valores de distâncias de ligação (Å) para DOX•H ₂ O, análise intramolecular do MOGUL (média) e correspondentes em DOX•HIC.....	46
Tabela 7 - Distâncias e ângulos das ligações inter e intramoleculares presentes na estrutura cristalina da DOX•H ₂ O.....	51
Tabela 8 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura para da DOX•HAc.....	54
Tabela 9 - Distâncias e ângulos das ligações inter e intramoleculares presentes na estrutura cristalina da DOX•H ₂ O.....	59
Tabela 10 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura do DOX•NIT.....	60
Tabela 11 - Distâncias e ângulos das ligações inter- e intramoleculares presentes na estrutura cristalina da DOX•NIT.....	65
Tabela 12 - Posição de picos (cm ⁻¹) nos espectros de infravermelho da DOX•HYC, da DOX•H ₂ O, da DOX•HAc e do DOX•NIT.....	72
Tabela 13 - Classificação da solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira IV.....	74
Tabela 14 - Condições usadas para o teste de dissolução para Doxiciclina.	76
Tabela 15 - Solubilidade Segundo a Farmacopeia Brasileira IV.....	81
Tabela 16 - Solubilidade Intrínseca mg/mL	82
Tabela 17 - Valores individuais de dissolução e eficiencia de dissolução em água.....	84
Tabela 18 - Valores individuais de eficiência de dissolução do DOX•HIC, DOX•H ₂ O, DOX•HAc e DOX•NIT.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

- % Calc.:** Porcentagem calculada
% Enc.: Porcentagem encontrada
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API: Insumo Farmacêutico Ativo
Cu K α : Radiação cobre
CV: Coeficiente de variação
DOX•H₂O: Doxíciclina monohidratada
DOX•HAc: Doxíciclina Ácido Acético
DOX•HIC: Hiclato de doxíciclina
DOX•NIT: Nitrato de Doxíciclina
DP: Desvio Padrão
INPI: Instituto Nacional de Propriedade Industrial
MXRD: Difração de raios-x por monocristal
PXRD: Difração de raios-x por policristais (pó)
DSC: calorimetria exploratória diferencial
ED: Eficiência de dissolução
FDA: Administração de alimentos e medicamentos
IV: Espectroscopia na região do infravermelho
M: Média
MEV: microscopia eletrônica de varredura
Mo K α : Radiação molibdênio
R1: Fator de discordância
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
RE: Resolução Específica
SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutica
T1: Tautômero 1
T2: Tautômero 2
TG: Termogravimétrica
UV-Vis: Espectrofotometria de absorção região do ultravioleta e visível
wR2: Fator de discordância ponderado
 λ_{max} : comprimento de onda/Máxima de absorção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	POLIMORFISMO EM SÓLIDOS FARMACÊUTICOS.....	15
1.2	O API ESTUDADO NESTE TRABALHO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	DOXICICLINA.....	18
2.2	POLIMORFISMO EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS.....	20
2.3	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS.....	22
2.4	TÉCNICAS E MÉTODOS EMPREGADOS NA OBTENÇÃO DE NOVOS POLIMORFOS.....	25
2.4.1	Sublimação.....	26
2.4.2	Evaporação.....	27
2.4.3	Fusão/Cristalização.....	27
2.4.4	Aditivos.....	27
2.4.5	Mecanoquímica.....	28
2.5	ANÁLISES DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA – TÉCNICA DE DISSOLUÇÃO.....	28
2.5.1	Fatores que podem influenciar os resultados do teste de perfis de dissoluções.....	30
2.5.1.1	Fatores relacionados com o fármaco e a sua forma farmacêutica...	30
2.5.1.2	Fatores relacionados com equipamento de dissolução.....	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
CAPÍTULO I – OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO		35
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	SÍNTESE E CRISTALIZAÇÃO.....	35
5.1.1	Síntese dos pseudo-polimorfos de doxiciclina.....	35
5.1.1.1	Síntese e cristalização da doxiciclina mono-hidratada, DOX•H ₂ O...	35
5.1.1.2	Síntese e cristalização do acetato de doxiciclina, DOX•HAc.....	35
5.1.1.3	Síntese e cristalização do nitrato de doxiciclina, DOX•NIT.....	35
5.1.2	Formação dos cristais dos pseudo-polimorfos de DOX.....	36

5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS.....	38
5.2.1	Difração de raios x de monocristal (MXRD).....	38
5.2.2	Ponto de fusão.....	38
5.2.3	Difração de raios x de pó (PXR)	39
5.2.4	Espectroscopia na região do infravermelho.....	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	PONTO DE FUSÃO.....	40
6.2	DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR MONOCRSITAL: MXRD.....	40
6.2.1	Estrutura da DOX•HIC.....	40
6.2.2	Estrutura da DOX•H ₂ O.....	43
6.2.3	Estrutura da DOX•HAc.....	53
6.2.4	Estrutura da DOX•NIT.....	59
6.3	DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR POLICRISTAIS: PXR.....	68
6.4	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	71
	CAPÍTULO II – SOLUBILIDADE E PERFIL DE DISSOLUÇÃO	74
7	MATERIAIS E MÉTODOS	74
7.1	SOLUBILIDADE.....	74
7.1.1	Solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira.....	74
7.1.2	Solubilidade Intrínseca.....	74
7.2	PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	75
8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
8.1	SOLUBILIDADE E PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	78
8.1.1	TESTE DE SOLUBILIDADE SEGUNDO A FARMACOPEIA BRASILEIRA.....	81
8.1.2	TESTE DE SOLUBILIDADE INTRÍNSECA.....	82
8.1.3	PERFIL DE DISSOLUÇÃO.....	82
9	CONCLUSÕES	87
10	PERSPECTIVAS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 POLIMORFISMO EM SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

Muitos sólidos farmacêuticos exibem polimorfismo (do grego *poli* = vários e *morfos* = forma), o que é, normalmente, definido como a habilidade de uma substância, no estado sólido, existir em duas ou mais fases cristalinas, com diferentes arranjos e, ou, conformações das moléculas ou átomos que a constitui⁽¹⁾. A existência do polimorfismo foi constatada, em 1788, pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth que identificou duas formas cristalinas diferentes do carbonato de cálcio: a calcita e a aragonita.

O modo como os compostos químicos organizam-se nos diferentes estados físicos da matéria é determinante para suas propriedades físico-químicas. Portanto os sólidos polimórficos, mesmo se tratando de uma mesma molécula (estrutura intramolecular), podem apresentar diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas quando essas estiverem relacionadas à forma como a molécula se empacota no estado sólido^(1, 2, 3).

Na área de ciências farmacêuticas os polimorfos, hidratos, solvatos, sais, co-cristais e amorfos de um determinado insumo farmacêutico ativo (API) são normalmente chamados genericamente de polimorfos. Contudo, a literatura atual considera polimorfos “verdadeiros” apenas os casos em que as diferentes formas sólidas forem constituída por uma única molécula neutra⁽⁴⁾. Os solvatos, sais, hidratos e co-cristais podem ser definidos como os diferentes arranjos de uma substância com mais de um tipo de molécula, fenômeno conhecido como pseudo-polimorfismo. Apesar da diferença conceitual, polimorfos e pseudo-polimorfos de um determinado API podem ter mudanças drásticas de comportamentos farmacêuticos de interesse, como a sua biodisponibilidade e farmacocinética. No viés da oportunidade, o fenômeno do polimorfismo em sólidos farmacêuticos pode ser explorado por pesquisadores e indústrias farmacêuticas de forma a obter o polimorfo que ofereça o melhor desempenho ao medicamento, tanto em termos de eficiência terapêutica como processabilidade^(4, 5).

Por outro, este dilema das formas sólidas também oferece desafios. Recentemente, este tema vem merecendo destaque e atenção, pois a existência de polimorfismo pode gerar problemas durante a produção e, até, na utilização de

fármacos ⁽²⁾. Isso se deve ao fato de diferentes formas polimórficas terem diferentes velocidades de dissolução e diferentes solubilidades ⁽³⁾, sendo que, normalmente, a absorção de um fármaco depende desses dois parâmetros ^(6, 7). Assim, a inadvertida produção de uma forma polimórfica errada ou qualquer transformação de uma forma numa outra durante o processamento (secagem, moagem, granulação, compressão etc.) e estocagem, durante o tempo de validade do medicamento, pode resultar em dosagens farmacêuticas ineficazes ou até mesmo tóxicas. Portanto, dos pontos de vista comercial, terapêutico e regulatório, é imperativo que se possa identificar e caracterizar, de maneira adequada, a presença de polimorfos e sua cristalinidade, de forma que se dê segurança que a indústria está utilizando o API em sua forma cristalina correta durante a manufatura do medicamento e que essa forma cristalina seja estável durante todo o tempo de sua validade. Diante do exposto, a identificação das diferentes formas sólidas de um medicamento, determinação de suas propriedades físico-químicas, estabilidade termodinâmica e condições cinéticas de dissolução/solubilidade são essenciais para assegurar o comportamento reprodutível dos fármacos e sua segurança.

1.2 O API ESTUDADO NESTE TRABALHO

Em 1947, Benedict e Langlykke⁽⁸⁾ conceituaram antibiótico como um composto químico derivado de organismo vivo ou sintetizado que seja capaz, em concentrações baixas, de inibir os processos vitais de microrganismos. Uma das principais classificações dos antibióticos baseia-se na estrutura química dessas substâncias e subdivide o grupo em classes, como exemplo, a classe das penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, tetraciclina, sulfas, polipeptídicos, nucleosídicos etc. Os antibióticos são amplamente utilizados e empregados com diversas finalidades, como por exemplo: combate a infecções sistêmicas, circulatórias, respiratórias, ósseas, tópicas, profiláticas e, até mesmo, para fins de diagnósticos de enfermidades como neoplasias ⁽⁸⁾. Não há dúvidas sobre a importância desse grupo de medicamentos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sancionou a resolução da diretoria colegiada, RDC nº 44 em 2010⁽⁹⁾, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos (antibióticos). Isso devido aos níveis de intoxicações causadas pelo uso indiscriminado e, também, ao crescente e alarmante

fenômeno de resistência bacteriana, o qual esta se intensificando não só no Brasil, mas no mundo como um todo⁽¹⁰⁾.

Os medicamentos antibióticos para exercerem sua ação devem ser absorvidos e apresentarem uma concentração inibitória mínima durante todo o período de tratamento para serem efetivos. Concentrações inferiores prejudicam o tratamento e podem gerar resistência bacteriana. Sabendo da influência do polimorfismo em fármacos e sabendo-se das várias características que podem ser alteradas por esse fenômeno, como bioequivalência e biodisponibilidade, torna-se imprescindível a realização de pesquisas relacionadas ao estudo, obtenção e controle de polimorfos. Neste trabalho foi estudado o fenômeno de polimorfismo no API doxiciclina (DOX), $C_{22}H_{24}N_2O_8$, 2-Naphthacenecarboxamide, nome IUPAC 4(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-, [4S-(4 α , 4a α , 5 α , 5a α , 6 α ,12a α)].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOXICICLINA

A DOX representada na Figura 1 é um antibiótico bacteriostático de amplo espectro da classe das tetraciclinas derivada da oxitetraciclina. As tetraciclinas constituem um importante grupo de antimicrobianos⁽¹¹⁾. A DOX apresenta maior estabilidade e ação prolongada comparada a outras tetraciclinas, isso ocorre devido à substituição do grupo 6-hidroxi por um grupo metila (FIGURA 2).

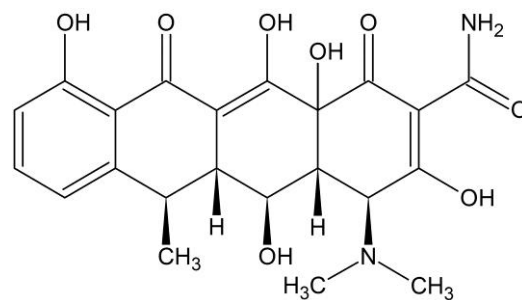


Figura 1- Estrutura molecular da DOX. Fonte: Modificada, USP 2007⁽¹²⁾.

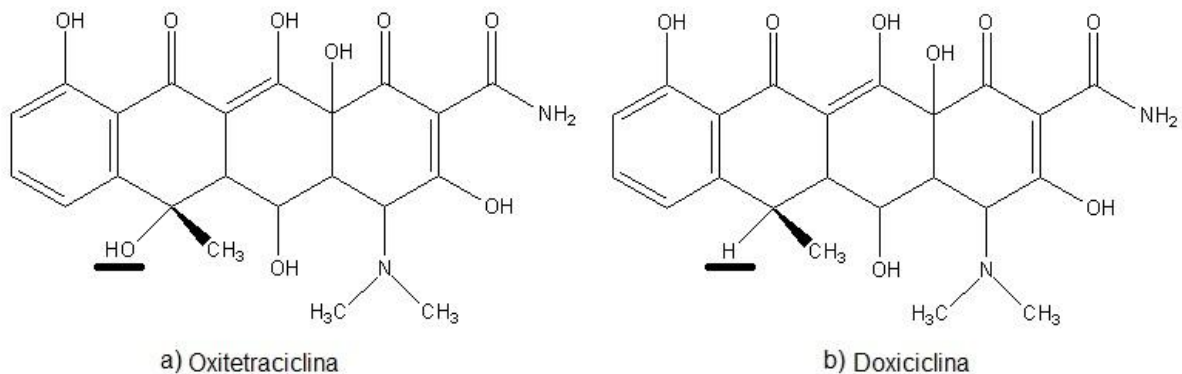


Figura 2 - Substituição do grupo 6-hidroxi. Procedimento que confere ao composto maior estabilidade e ação prolongada^(8, 12). Fonte: Modificada, USP 2007⁽¹²⁾.

A DOX sofre absorção mais completa e excreção mais lenta em relação às demais tetraciclinas, esta propriedade torna-se interessante, pois permite um tratamento com doses menores e menos frequentes, tornando o antibiótico recomendável para pacientes com insuficiência renal⁽⁸⁾.

A DOX é utilizada, principalmente, no tratamento de infecções bacterianas. Mas, pode ser utilizada no tratamento de clamídias, rickettsias, micoplasma⁽⁸⁾, malária⁽¹³⁾, vírus maiores^(8, 14), HIV^(15, 16) e melanona⁽¹⁷⁾. Também é necessário

salientar que existem tratamentos mais específicos para o HIV e a utilização de antibióticos no tratamento de vírus deve ser combinada com antirretrovirais⁽¹⁸⁾.

Normalmente a DOX é comercializada na forma de monohidrato (DOX•H₂O), C₂₂H₂₄N₂O₈•H₂O, 462,45 g/mol ou na forma de hidrato (DOX•HIC), C₂₂H₂₄N₂O₈, HCl, ½ C₂H₆O (etanol), ½ H₂O, 512,9 g/mol. A DOX•H₂O é um hidrato, portanto um pseudo-polimorfo da DOX e a DOX•HIC é um pseudo-polimorfo classificado como um sal da DOX, embora possua no cristal solvente (etanol) e água.

Embora a DOX seja comercializada em duas formas pseudo-polimorfas, a DOX•H₂O e a DOX•HIC, apenas a estrutura da DOX•HIC está reportada na literatura⁽¹⁹⁾. A DOX•HIC cristaliza-se no grupo especial monoclinico P2₁ com os seguintes parâmetros de cela: $a = 18,203(2) \text{ \AA}$, $b = 16,045(1) \text{ \AA}$, $c = 8,004(1) \text{ \AA}$ e $\beta = 94,11(1)^\circ$. A estrutura possui duas moléculas de DOX, independentes por simetria, na cela unitária. Será mostrado mais adiante que essas duas moléculas tratam-se de diferentes tautômeros da DOX em um mesmo cristal, chamados por T1 e T2. A Figura 3 mostra a representação da estrutura da DOX•HIC.

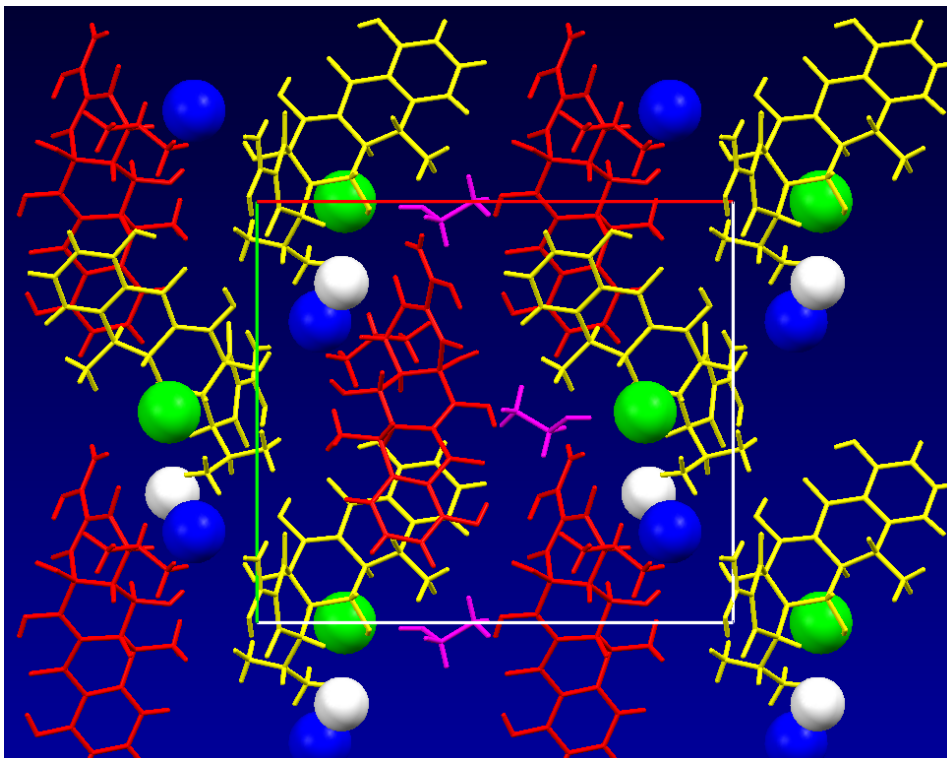


Figura 3- Representação do empacotamento cristalino da DOX•HIC ao longo do plano [110]. Os cátions de DOX em amarelo (T1) e vermelho (T2), os íons cloreto em azul e verde, a água em branco e etanol em roxo. Fonte: Autor

2.2 POLIMORFISMO EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

O polimorfismo pode ser definido como a capacidade de cristalização de uma espécie química, sob determinadas condições, em mais de uma forma cristalina⁽¹⁾. A existência de polimorfismo pode influenciar a biodisponibilidade, estabilidade química e física do fármaco e ter implicações no desenvolvimento e estabilidade da forma farmacêutica, levando-se em consideração as alterações ocorridas nas características dos cristais⁽²⁾.

A ocorrência do fenômeno de polimorfismo em sólidos farmacêuticos pode levar a diferenças significativas nas propriedades físico-químicas de APIs, como, solubilidade, taxa de dissolução, ponto de fusão, densidade, dureza, hábito (forma externa do cristal), propriedades ópticas, elétricas e pressão de vapor⁽¹⁾. Na Tabela 1 são listadas algumas das propriedades físicas e químicas que são influenciadas pelo polimorfismo em sólidos.

Em consequência da correlação estrutura-atividade, medicamentos administrados via oral na forma sólida (comprimidos, drágeas, capsulas) podem apresentar variações significativas no perfil de dissolução caso contenha um polimorfo, ainda que em quantidades parciais, diferente daquele para o qual foram realizados os testes pré-clínicos e clínicos durante o desenvolvimento do medicamento. Tendo em vista que a velocidade de dissolução de um fármaco é um fator limitante da sua absorção pelos pacientes, se uma forma polimórfica espúria ocorrer inadvertidamente em um medicamento poderá resultar em alterações em sua biodisponibilidade e farmacocinética, comprometendo sua eficácia no tratamento da doença^(1, 3).

Outro ponto crítico em relação ao fenômeno de polimorfismo é que os polimorfos originam-se de diferentes arranjos das moléculas ou íons no retículo cristalino e apresentam diferentes energias de interação no estado sólido, e, em alguns casos, sob um dado conjunto de condições, podem ocorrer transições de fase polimórficas, ou seja, a forma polimórfica de maior energia tende a se transformar na forma de menor energia. Considerando essa possibilidade, a estabilidade de um polimorfo deve ser verificada durante os estudos de pré-formulação, fase em que devem ser identificadas e determinadas as possíveis transições polimórficas que podem ocorrer em função do tempo e da temperatura de armazenamento, do tipo de processo de compressão e da redução do tamanho de

partículas, que podem interferir na eficácia e segurança do produto final. O palmitato de cloranfenicol, por exemplo, uma forma metaestável originalmente, pode se transformar na forma mais estável com perda de atividade ^(20, 21).

Tabela 1 - Propriedades físicas afetadas por diferentes polimorfos ⁽¹⁾

1. Propriedades estruturais
- Densidade e volume molar
- Índice de refração
- Condutividade elétrica e térmica
2. Propriedades termodinâmicas
- Temperaturas de fusão e sublimação
- Energia interna e entropia
- Capacidade calorífica
- Energia livre e potencial químico
- Atividade termodinâmica
- Pressão de vapor e solubilidade
3. Propriedades espectroscópicas
- Transições eletrônicas, vibracionais, rotacionais e spin nuclear
4. Propriedades cinéticas
- Taxa de dissolução e estabilidade
- Taxas de reação de estado sólido
5. Propriedades de superfície
- Energia livre de superfície
- Tensões interfaciais e forma
6. Propriedades mecânicas
- Dureza, compactação e conformação
- Escoamento, resistência à tração e maleabilidade

Fonte: BRITTAIN, H.G., 2000.

Além disso, o polimorfismo pode acarretar inúmeros problemas de formulação, como o crescimento de cristais e perda de estabilidade física em suspensões, modificações no estado cristalino por processos tecnológicos e problemas de estabilidade química ⁽¹⁾.

Surpreendentemente, um grande número de fármacos exhibe o fenômeno do polimorfismo. Por exemplo, 70% dos barbitúricos (sedativos), 60% dos sulfonamidas (antibióticos) e 23% dos esteroides (anti-inflamatórios) apresentam polimorfismo ⁽²²⁾.

Estudos detalhados de muitos sistemas levaram à descoberta de um grande número de polimorfos^(22, 23).

Esse é um dado bastante preocupante, pois se por um lado o polimorfismo tem contribuído, significativamente, para a variabilidade em produtos com desempenho na indústria farmacêutica, química e de alimentos, por outro o dilema das formas sólidas ainda continua sendo um desafio para os cientistas da área ao produzir fármacos de qualidade consistente. É possível que um fármaco responsável pela atividade desejada quando em sua forma polimórfica adequada, apresente, quando cristalizado em outra forma polimórfica, menor atividade, ou até mesmo ausência de atividade devido a sua menor solubilidade, ou ainda possa ser tóxico, devido à solubilidade de o polimorfo específico estar acima do especificado para o polimorfo adequado. Fica evidente no âmbito da questão regulatória e controle de qualidade, a necessidade do estudo de polimorfismo em sólidos farmacêuticos, bem como o estudo das propriedades físicas referentes a cada polimorfo apresentado por um fármaco^(4, 24, 25).

Por outro lado, no âmbito das oportunidades, pesquisadores da área de Ciências Farmacêuticas, Química do Estado Sólido e Cristalografia, têm mostrado grande interesse na possibilidade de modular propriedades de fármacos por meio da engenharia de cristais. Fármacos pouco solúveis podem alcançar valores maiores de solubilidade quando obtidos na forma de cristais multicomponentes, bem como, propriedades mecânicas, como fluidez, podem ser desenhadas com o objetivo de melhorar a processabilidade dos medicamentos e APIs, o que acarretaria custos menores de produção^(26, 27).

2.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE SÓLIDOS FARMACÊUTICOS

Quanto à caracterização do polimorfismo em sólidos farmacêuticos, existem alguns métodos que são frequentemente empregados, como as técnicas de difração de raios X (XRD, sigla inglesa *X-ray diffraction*), microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresenta a morfologia e hábito do cristal, análise termogravimétrica (TG), análise térmica diferencial (DTA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia no infravermelho (IV) e Raman e ressonância magnética nuclear (NMR)^(1, 28).

Dentre todas as técnicas citadas, a mais robusta e a mais utilizada para a diferenciação das formas polimórficas é a técnica de XRD, tanto pelo método do pó (PXRD, sigla inglesa para *powder X-ray diffraction*) quanto de monocristal (MXRD, sigla inglesa para *single crystal X-ray diffraction*). A análise dos dados obtidos nos experimentos de XRD permite distinguir, com exatidão, os diferentes arranjos dos átomos nos sólidos. Por meio da MXRD é possível determinar analítica e inequivocamente a estrutura de átomos e moléculas quando estes estiverem organizados periodicamente em uma rede cristalina. Como a técnica permite também ter acesso à estrutura intermolecular, ou seja, a maneira com que as moléculas se arranjam no estado sólido torna-se também uma sonda de polimorfos, uma vez que o critério que define a existência do polimorfismo é a demonstração de uma estrutura não equivalente à estrutura cristalina de uma forma pré-existente. Contudo, um fator limitante intrínseco dessa técnica é a necessidade de se analisar a amostra quando essa for monocristalina, sendo o cristal de qualidade (baixa mosaicidade, não geminado, idealmente imperfeito) e tamanho (0,02 a 0,2 mm) adequados ao método, o que, nem sempre é fácil de ser conseguido^(29, 30). A PXRD é outro poderoso método apropriado para distinguir diferentes estruturas cristalinas, poliméricas (mesma substância com diferente estrutura) ou não (estrutura e substância diferente) em que, diferentemente da MXRD, a amostra deve estar na forma de pó (policristais pulverizados) o que é mais fácil de ser conseguido do ponto de vista prático. Outra vantagem da PXRD em relação à MXRD é o custo da técnica. Por outro lado, as informações que se obtém de um difratograma obtido por meio de PXRD são limitadas, quando comparadas com os provenientes da MXRD. No passado a PXRD limitava ao estudo de identificação e quantificação de fases, enquanto a MXRD era a única técnica que permitia determinar a posição relativa de átomos dentro de uma cela unitária, ou seja, determinar a estrutura. Atualmente, com o grande avanço de hardware e software, da resolução instrumental dos equipamentos, e da intensidade de fontes de raios X, incluindo o proveniente de radiação síncrotron, vem se tornado cada vez mais rotineiro a determinação de parâmetros da unidade de cela e grupo espacial, bem como a determinação (espaço real - *ab initio*) da estrutura cristalina por meio de PXRD⁽³⁰⁾. A PXRD também pode ser usada para determinação do grau de cristalinidade, análise quantitativa das fases nos sólidos polimórficos e cinética das reações do estado sólido⁽³¹⁾.

A espectroscopia vibracional infravermelho (IV) e Raman têm-se tornado cada vez mais importante e parte integrante das técnicas físicas de caracterização de sólidos farmacêuticos^(1, 32, 33). As espectroscopias de IV e Raman são técnicas que fornecem espectros, os quais têm sua estrutura fundamentada nos modos vibracionais das moléculas. Estes espectros são impressões digitais das formas polimórficas, principalmente na diferenciação de formas anidras e hidratadas de um mesmo fármaco. Ambas as técnicas oferecem informações sobre a estrutura e, a espectroscopia Raman pode fornecer a conformação molecular do sólido. Exemplos que podem ser citados são a nabumetona, em que há um deslocamento no valor da banda no estiramento da carbonila de suas formas I e II, indicando uma grande diferença nas interações intermoleculares⁽³⁴⁾ e, a clorpropamida, onde a orientação relativa do anel aromático e da alquila terminal permitem a diferenciação das formas II, III e IV⁽³²⁾.

As técnicas de análise térmica, como análise termogravimétrica (TG), análise térmica diferencial (DTA), distinguem polimorfos com base nas transições de fase que sofrem durante o aquecimento e podem ser usadas para se obter informações adicionais com respeito às transições de fase, como a do ponto de fusão, desidratação, dessolvatação, cristalização e transição vítrea. A calorimetria diferencial de varredura (DSC) mede a quantidade de energia absorvida ou liberada pela amostra quando aquecida, resfriada ou mantida em temperatura constante. As curvas de DSC obtidas para as diferentes formas polimórficas da carbamazepina, por exemplo, indicam as diferenças no comportamento térmico de suas fases, podendo ser usadas para distingui-las. As curvas também indicam que as formas II, III e IV se transformam na I com o aquecimento⁽³⁵⁾. A determinação da pureza absoluta de um fármaco é de extrema importância na sua caracterização⁽³⁶⁾. Determinações de ponto de fusão têm sido, há muito tempo, utilizadas como método de medição de pureza. Quanto mais alargado o aspecto do pico apresentado na curva DSC, mais impuro o composto. Um método de DSC que quantifica efetivamente este procedimento é baseado na equação de Van 't Hoff⁽³⁵⁾.

2.4 TÉCNICAS E MÉTODOS EMPREGADOS NA OBTENÇÃO DE NOVOS POLIMORFOS

O termo engenharia de cristais é definido como a modelagem, desenho, síntese de sólidos cristalinos, como uma predefinição desejada do aglomerado de moléculas e íons que formariam o sólido. Assim, as propriedades do material podem ser modeladas, ampliando suas possibilidades de aplicação. O alvo principal da engenharia de cristais é desenhar e sintetizar cristais em que arranjos de seus constituintes, átomos e, ou, moléculas, são controlados de modo a produzir uma ou mais propriedades funcionais desejadas da forma cristalina⁽³⁷⁾.

Sólidos cristalinos podem ser imaginados como a expressão de um auto reconhecimento e organização de moléculas por meio de interações intermoleculares preferenciais. O “self-assembly” de moléculas para formar os cristais confere distintas propriedades físicas e químicas para o cristal, quando comparado com as moléculas individuais que o constituem. Cristais moleculares podem então ser vistos como supermoléculas ou supramoléculas com características físicas e químicas próprias. Um requisito fundamental para modelar cristais é compreender as interações moleculares envolvidas na formação do cristal e utilizá-lo para desenhar um novo sólido com as propriedades desejadas. Embora a natureza das forças que atuam entre as moléculas de um cristal orgânico seja conhecida, ainda assim, é difícil saber sobre sua complexa distribuição no espaço^(34, 38, 39).

Substâncias ativas farmacêuticas que existem em diferentes formas polimórficas podem apresentar vantagens distintas em uma particular aplicação. Uma forma metaestável pode ser preferível quando se busca melhorar a taxa de dissolução de um medicamento⁽³⁾. Por outro lado, a estabilidade da forma mais estável, a qual confere à substância uma baixa suscetibilidade à decomposição química, é importante principalmente quando a fármaco é utilizada em suspensões. Fatores relacionados ao processamento, como características de fluidez do pó, compressibilidade, capacidade de absorver vapor de água, facilidade de síntese e reprodutibilidade são aspectos que podem decidir sobre a escolha ou uso de um polimorfo em detrimento de outro⁽¹⁾.

Ao se isolar um polimorfo por uma determinada rota de síntese e, ou, cristalização, é fundamental conhecer sua estabilidade termodinâmica antes de

conduzir os testes pré-clínicos e clínicos. Uma forma metaestável pode converter-se na forma mais estável durante o processo de estocagem e comprometer sua eficiência terapêutica ^(40, 41). No entanto, existem os incentivos para isolar e caracterizar novas formas polimórficas que forneçam determinadas vantagens e possibilidade de patente ou publicação de conhecimento novo. No Brasil as leis não permitem patentes de novas formas polimórficas sem que estas apresentem um segundo uso terapêutico, ou uma inovação tecnológica ⁽⁴²⁾. Novas discussões sobre o assunto foram debatidas em 2007 pela diretoria de patentes do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) sobre a obtenção de patentes de novas formas polimórficas, sendo que ainda não foi atingido um consenso sobre o assunto ⁽⁴³⁾.

As condições termodinâmicas e cinéticas que envolvem a nucleação de uma fase cristalina podem ser manipuladas de modo a induzir a formação de um polimorfo desejado. Além do que, essas condições sobre as quais a forma cristalina é obtida fornecem informações e pistas valiosas para a compreensão dos mecanismos que possibilitam e mantêm uma forma cristalina estável ou existem em uma forma metaestável ⁽¹⁾.

Tomando-se como base a afirmação de Mcrone⁽⁴⁴⁾, de que toda substância ou composto tem diferentes formas polimórficas, e que, em geral, o número de formas conhecidas para um dado composto é proporcional ao tempo e dinheiro gasto em pesquisas com o composto ou substância, tem-se um amplo leque de possibilidades em relação à manipulação de procedimentos de síntese e engenharia de cristais para a obtenção e entendimento dos diferentes polimorfos formados ⁽⁴⁴⁾.

2.4.1 Sublimação

A sublimação é uma das técnicas que pode ser empregada para a obtenção de polimorfos. Um simples experimento pode ser montado com uma chapa de aquecimento elétrico, uma chapa de vidro e um vidro de relógio: coloca-se uma pequena quantidade do material que se deseja recristalizar sobre a superfície do vidro plano com o vidro de relógio por cima, de modo a cobrir a amostra. O sistema pode ser aquecido se estiver montado sobre o aquecedor elétrico, fazendo com que a amostra sublime e condense, resultando na deposição de material cristalino ou amorfo na superfície do vidro de relógio. O controle da temperatura da chapa e do vidro de relógio pode ser manipulado de modo a modificar as condições

termodinâmicas e, ou, cinéticas que favorecem ou não a cristalização de um ou outro polimorfo⁽¹⁾.

2.4.2 Evaporação

A evaporação lenta de solventes em soluções, nas quais o soluto é a substância ativa do fármaco que se deseja recristalizar é outra rota que pode ser utilizada na tentativa de preparar uma nova forma cristalina. Pode-se usar apenas um solvente ou a combinação de solventes. Fatores, como concentração da solução, velocidade de evaporação do solvente, solubilidade das formas polimórficas no solvente, tipo de solvente (polar ou apolar) e as condições em que os solventes são misturados são algumas das principais variáveis a serem trabalhadas. A supersaturação da solução com a evaporação do solvente propiciará condições para a nucleação e crescimento de cristais na solução. O resfriamento de uma solução supersaturada em uma temperatura mais elevada também possibilita a formação de núcleos cristalinos, é uma outra rota possível com a utilização de solventes. Os hidratos e solvatos também são obtidos a partir de recristalizações com solventes⁽¹⁾.

2.4.3 Fusão/Cristalização

Tratamentos térmicos e cristalização a partir da substância fundida também permitem cristalização de diferentes formas polimórficas. Um determinado polimorfo submetido a tratamento térmico pode converter-se em outro. O tratamento promove uma transição de fase estrutural. Ao se resfriar uma substância fundida, além da cristalização, ainda é possível que o estado amorfo tome lugar no processo. Taxas de resfriamento elevadas, em geral, levam à formação de formas amorfas, e o resfriamento lento favorece a cristalização da forma mais estável⁽¹⁾.

2.4.4 Aditivos

O emprego de aditivos é um método que se mostra bastante eficaz como estratégia para cristalizar um polimorfo desejado. Os aditivos exercem influência nas condições de nucleação e crescimento dos cristais, e, portanto, são capazes de induzir a formação de cristais com diferentes formas cristalinas ou hábitos (forma

externa do cristal). Escolher o aditivo adequado ao fim que se deseja é uma das principais variáveis a serem manipuladas neste método^(1, 45).

2.4.5 Mecanoquímica

Um processo de moagem mecânica (esforço mecânico) pode resultar em uma transformação entre fases polimórficas de um composto ou mesmo levar ao estado amorfo^(1, 45).

Ainda existem outros métodos e técnicas que podem ser usados, e, assim como os citados acima, oferecem uma grande quantidade de parâmetros e condições experimentais que podem ser manipuladas.

2.5 ANÁLISES DE EQUIVALÊNCIA FARMACÊUTICA – TÉCNICA DE DISSOLUÇÃO

Dissolução é o processo pelo qual um fármaco é liberado da sua forma farmacêutica e se torna disponível para ser absorvido pelo organismo. As formas farmacêuticas sólidas devem passar por um processo de dissolução pelos líquidos biológicos para que o fármaco possa ser absorvido e passe para a circulação sistêmica e exerça sua ação. O ensaio de dissolução é um teste físico, no qual o fármaco passa por processos semelhantes ao realizado pelo organismo para que este seja absorvido.

A dissolução de uma substância a partir de uma forma farmacêutica em que esta insolúvel envolve duas etapas: liberação da substância a partir de sua matriz (desintegração), seguido pela sua dissolução no meio em que se encontra (solubilização)⁽⁴⁶⁾.

Testes de dissolução *in vitro* é uma importante ferramenta de controle de qualidade em diferentes estágios de ciclo de vida de um medicamento. Nos primeiros estágios do desenvolvimento farmacotécnico são úteis para identificar variáveis críticas na produção, escolher entre diferentes formulações, aperfeiçoá-las e fazer avaliações de riscos, como no caso das formas de liberação controlada^(46, 47, 48, 49).

Durante a fase de produção são importantes para liberação dos lotes e testes de estabilidade, uma vez que, dentro de certos limites, as características de

dissolução de um produto devem manter-se constantes durante todo o período de validade do mesmo. Também é importante avaliar o impacto que certas mudanças, tais como equipamentos ou locais de fabricação, podem ter sobre a forma do produto^(46, 47, 48, 49).

Outra aplicação dos estudos de dissolução muito utilizada é a isenção de estudo de biodisponibilidade relativa e bioequivalência para algumas dosagens de um mesmo produto. Os estudos de bioequivalência são necessários para o registro de medicamentos genéricos e quando se comprova que todas as dosagens de um determinado produto apresentam perfis de dissolução semelhantes, e existe um estudo de bioequivalência que a comprova em relação a um produto de referência para uma das dosagens, geralmente a mais alta, as demais podem ser registradas também sem que haja realização de novos estudos *in vivo*^(50, 51).

Com os avanços da tecnologia e das pesquisas envolvendo a liberação de fármacos, modernização dos testes e mais ênfase na previsibilidade de efeitos terapêuticos por meio de testes *in vitro*, os testes de dissolução têm ganhado cada vez mais popularidade e, apesar de terem sido introduzidos como uma forma de caracterizar o perfil de liberação de fármacos pouco solúveis, atualmente os testes de dissolução fazem parte das monografias de quase todas as formas farmacêuticas sólidas⁽⁵²⁾.

No Brasil os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos juntamente com a introdução de medicamentos genéricos em 1999. Os ensaios de dissolução devem ser desenvolvidos de forma a serem reprodutíveis, mas é desejável que a seleção das condições de ensaio vise também testes discriminativos. Variações na matéria prima do ativo ou na formulação que potencialmente influenciem na biodisponibilidade da substância devem ser detectados por meio do teste de dissolução. Quando se determina correlação *in vitro/vivo* pode-se prever o comportamento do fármaco durante a liberação nos fluidos biológicos e, assim, reduzir o número de estudos clínicos requeridos⁽⁵³⁾.

O sistema de classificação biofarmacêutico (SCB) classifica os fármacos em função de sua solubilidade e permeabilidade gastrointestinal e é uma classificação reconhecida pela ANVISA e FDA (TABELA 2). De acordo com essa classificação, fármacos pouco solúveis podem apresentar a solubilização do ativo como etapa limitante na absorção, então nesses casos são necessários desenvolvimentos de métodos de dissolução^(6, 54).

Tabela 2 – Classificação biofarmacêutica para fármacos⁽⁶⁾

	Elevada solubilidade	Baixa solubilidade
Elevada permeabilidade	Classe I	Classe II
Baixa permeabilidade	Classe III	Classe IV

Fonte: AMIDON, G. et al., 1995

2.5.1 Fatores que podem influenciar os resultados do teste de perfis de dissoluções

Existem muitas variáveis que podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução. Todas devem ser observadas, mas algumas são de grande importância para a aquisição de resultados confiáveis. Fatores relacionados com o fármaco, forma farmacêutica (formulação) e equipamento de dissolução, entre os quais solubilidade, tamanho de partícula, natureza química, forma farmacêutica, excipientes, fabricação, aparato, geometria do sistema de dissolução, vibrações, posição das hastes, nível de volume do meio, pH, bolhas de gases, viscosidade e temperatura podem alterar drasticamente os resultados^(55, 56, 57).

2.5.1.1 Fatores relacionados com o fármaco e a sua forma farmacêutica

Entre os fatores relacionados ao fármaco a solubilidade é um dos fatores que mais afetam a dissolução^(56, 57). A solubilidade é um parâmetro termodinâmico que apresenta a concentração da solução de um fármaco em equilíbrio com o soluto^(52, 53). Pode ser determinada por meio da adição de um excesso de fármaco ao meio, seguido de agitação, filtração e quantificação do fármaco dissolvido^(45, 55). O Tamanho da partícula também influencia a solubilidade e a absorção de fármacos. Um fármaco dissolverá mais rápido quanto maior for a sua área de superfície, ou seja, quanto menor for o tamanho de suas partículas. Por esta razão, muitos fármacos se encontram micronizados, de forma a facilitar a sua dissolução e absorção. Outro fator que influencia na área de superfície e a forma da partícula é sua densidade⁽⁵⁶⁾.

A natureza química esta relacionado com o estado amorfo, cristalino e com a existência de polimorfismo. Geralmente, substâncias amorfas são mais solúveis que as cristalinas, assim como substâncias anidras são mais solúveis que as hidratadas do mesmo fármaco^(51, 54). A formação de sais é um recurso muito utilizado para se

aumentar a solubilidade de um ácido fraco. O mesmo acontece com sais ácidos de bases fracas, mas também é possível a formação de um sal pouco solúvel⁽⁵¹⁾. Outro fator a se considerar é a presença de impurezas⁽⁵⁷⁾.

Com relação a formas farmacêuticas e excipientes, capsulas de gelatina geralmente rompem-se rapidamente expondo seu conteúdo aos meios de dissolução e do organismo, mas a tecnologia de fabricação e os diluentes presentes na formulação podem fazer com que a dissolução não ocorra rapidamente. A dissolução de comprimidos depende da desintegração dos mesmos. Comprimidos revestidos devem ter o revestimento rompido antes que possam sofrer desintegração e posterior dissolução⁽⁵¹⁾. Praticamente todos os excipientes envolvidos na formulação exercem influência na dissolução, seja negativa ou positiva. Lubrificantes insolúveis, por exemplo, retardam a dissolução, já o uso de amida tende a facilitar a dissolução^(56, 59). Outro fator a ser considerado é a adsorção de água no fármaco e, também, em componentes da formulação⁽⁶⁰⁾.

Também, a tecnologia utilizada para a fabricação de medicamentos, como o tipo de granulação utilizada, via seca ou via úmida tem impacto significativo na dissolução. A técnica de spray-drying, por exemplo, pode aumentar a solubilidade de compostos pouco solúveis⁽⁶¹⁾. De modo geral, a granulação úmida favorece a dissolução de fármacos por conferir a eles características mais hidrofílicas⁽⁵⁶⁾. A força de compressão é uma variável complexa e também pode afetar a dissolução⁽⁶²⁾, de uma maneira geral quanto mais força for utilizada na compressão menor será a dissolução.

2.5.1.2 Fatores relacionados com equipamento de dissolução

É reconhecido que os aparatos oferecem condições de trabalho diferentes dependendo do seu mecanismo. Parâmetros como velocidade de agitação e nível do meio de dissolução diferem de aparato para aparato^(55, 60). Na geometria do sistema, os eixos dos elementos de rotação das cestas ou das pás devem coincidir em todos os pontos com o eixo central da cuba, sendo permitido no máximo um desvio de ± 2 mm, desde que isso não afete a velocidade de agitação⁽⁶³⁾. No geral desvios maiores aumentam a taxa de dissolução⁽⁶⁰⁾.

Os aparelhos de dissolução devem ser posicionados em bancadas niveladas e livres de vibração oriundas de outros aparelhos. O ideal é que não haja nenhum

tipo de vibração do sistema, pois isso pode aumentar a energia dinâmica do sistema aumentando a taxa de dissolução⁽⁶⁴⁾.

Outros fatores como posição da haste, método de amostragem e aqueles relacionados ao meio de dissolução como volume, presença de gases (bolhas), pH e temperatura, também podem alterar o processo de dissolução^(55, 56, 57).

3 JUSTIFICATIVA

Um tema que vem merecendo destaque atualmente é o problema na produção de fármacos, causado pela presença de polimorfismo^(1, 2). Um estudo preliminar indicou que, dos dez medicamentos mais comuns indicados a pacientes nos Estados Unidos, oito exibem polimorfismo ou pseudopolimorfismo, como hidratos e solvatos⁽⁶⁵⁾. Esse é um dado alarmante, pois se sabe que diferentes formas polimórficas têm diferentes velocidades de dissolução e diferentes solubilidades, sendo que, normalmente, a absorção de um fármaco depende desses dois parâmetros⁽⁶⁾.

Para se alcançar velocidades adequadas de dissolução de fármacos pouco solúveis em água faz-se uso de compostos ativos na forma amorfa ou na forma cristalina metaestável^(66, 67). Como ambas são termodinamicamente instáveis, em alguns casos, essas formas tendem a se converter para a forma cristalina mais estável durante o processo de fabricação ou durante a estocagem. Portanto, o controle na qualidade da forma sólida deve ser acompanhado durante a fabricação e toda a vida útil do medicamento.

No caso específico dos antibióticos, que são fármacos que devem ser utilizados de maneira correta e em intervalos de tempo apropriados para que sejam seguros e efetivos durante o tratamento de infecções, o uso de uma forma polimórfica inadequada pode ocasionar resistência bacteriana e, até mesmo, a intoxicação. Pesquisas realizadas com ampicilina⁽⁶⁸⁾ e cloranfenicol^(20, 21, 69) demonstraram a ineficácia e a toxicidade das diferentes formas polimórficas.

Portanto, considerando o paradoxo do polimorfismo que oferece por um lado desafios no que tange a regulamentação para que seja assegurada a saúde da população e, por outro, oportunidades no que tange a planejar e construir novas formas sólidas de um fármaco que apresentem vantagens farmacocinéticas e mecânicas é que se justifica o presente trabalho que, em específico, se propõe a obter e estudar polimorfos e pseudo-polimorfos da doxiciclina.

4 OBJETIVOS

Cristalizar e caracterizar estruturalmente formas polimórficas e pseudo-polimorfos (sais, hidratos, solvatos e co-cristais), conhecidas e inéditas do fármaco doxiciclina.

Os trabalhos desenvolvidos nessa dissertação tiveram por objetivos específicos:

- 1) Realizar tentativas de recristalização do fármaco doxiciclina a partir de técnicas de Engenharia de Cristais, com o intuito de preparar polimorfos e, ou, pseudo-polimorfos;
- 2) Determinar a estrutura cristalina usando as técnicas de MXRD dos polimorfos e, ou, pseudo-polimorfos, inéditos, ou não, cuja a estrutura sejam desconhecidas;
- 3) A partir dos dados estruturais obtidos por MXRD criar padrões de PXRD a serem utilizados na identificação das formas polimórficas desse fármaco;
- 4) Investigar características estruturais e térmicas das formas polimórficas e, ou, pseudo-polimórficas a partir dos dados de MXRD, PXRD, espectroscopia de infravermelho e análises térmicas (TG-DTA e DSC);
- 5) Determinar propriedades físico-químicas dos polimorfos e, ou, pseudo-polimorfos da doxiciclina;
- 6) Determinar o perfil de dissolução dos diferentes polimorfos e, ou, pseudo-polimorfos da doxiciclina;
- 7) Determinar parâmetros de equivalência dos diferentes polimorfos e, ou, pseudo-polimorfos da doxiciclina;

CAPÍTULO I: OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SÍNTESE E CRISTALIZAÇÃO

5.1.1 Síntese dos pseudo-polimorfos de doxiciclina

O API utilizado como precursor de todas as sínteses foi o hclato de doxiciclina, DOX•HCl, adquiridos em farmácias e, ou, junto às indústrias de medicamento e insumos farmacêuticos. A partir da DOX•HCl foram obtidos três novas formas pseudopolimorfas da DOX.

5.1.1.1 Síntese e cristalização da doxiciclina mono-hidratada, DOX•H₂O

5g de hclato de doxiciclina foram dissolvidos em 200mL de água destilada, esta solução foi aquecida a 90° C por duas horas e em seguida neutralizada (pH = 7) por adição gota a gota de solução de NaOH 1 mol.L⁻¹.

5.1.1.2 Síntese e cristalização do acetato de doxiciclina, DOX•HAc

Em 20mL de ácido acético glacial PA adicionou-se 10mL de água destilada. Com auxílio de um agitador magnético, adicionou-se nessa solução DOX•H₂O sintetizado de acordo com 5.1.1.1 até a saturação. Em seguida o sobrenadante foi separado do excesso de DOX•H₂O por filtração.

5.1.1.3 Síntese e cristalização do nitrato de doxiciclina, DOX•NIT

Com auxílio de um agitador magnético, adicionou-se nessa solução DOX•H₂O sintetizado de acordo com 5.1.1.1 em uma solução 6 mol.L⁻¹ de HNO₃ até a saturação. Em seguida a o sobrenadante foi separado do excesso de DOX•H₂O por filtração.

5.1.2 Formação dos cristais dos pseudo-polimorfos de DOX

Técnicas de engenharia de cristais, tais como lenta evaporação do solvente, saturação de vapor e recristalização em gel foram empregadas nesse trabalho de maneira a obter monocristais dos pseudo-polimorfos sintetizados.

A técnica de lenta evaporação do solvente (FIGURA 4) refere-se ao método de solubilizar a substância de interesse em um solvente, ou mistura de solventes, vedando o cristalizador com um septo e perfurando este septo com uma agulha, a fim de que o vapor de solvente em equilíbrio com a solução contendo o soluto escape mais lentamente uma vez que a única saída se dá através da cavidade interna na agulha. Após montagem do aparato, deixa-se o cristalizador em repouso e com isso o solvente irá evaporar lentamente até atingir o ponto de saturação do sólido. Deste momento em diante ocorre a nucleação e crescimento do cristal.

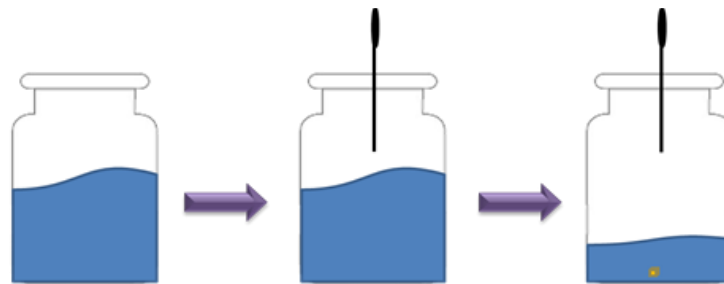


Figura 4- Representação da técnica de lenta evaporação do solvente.

Já a técnica de saturação de vapor (FIGURA 5) consiste em solubilizar a substância de interesse em um solvente ou mistura de solventes com uma determinada polaridade e inserir o cristalizador em uma cuba contendo solvente de menor polaridade. O vapor deste irá saturar o solvente mais polar, diminuindo sua polaridade e, portanto, fazendo com que o ponto de saturação do sólido seja alcançado.

A técnica de cristalização em gel (FIGURA 6) é largamente utilizada para produtos de baixa solubilidade. Nesta insere-se o metal em metassilicato de sódio e quando este se encontra em estado de gel, adiciona o ligante solubilizado em um solvente ou mistura de solventes, a fim de se formar duas fases. A reação entre metal e ligante ocorre na interface solvente-gel, e devido à velocidade de tal reação, a cristalização também ocorre.

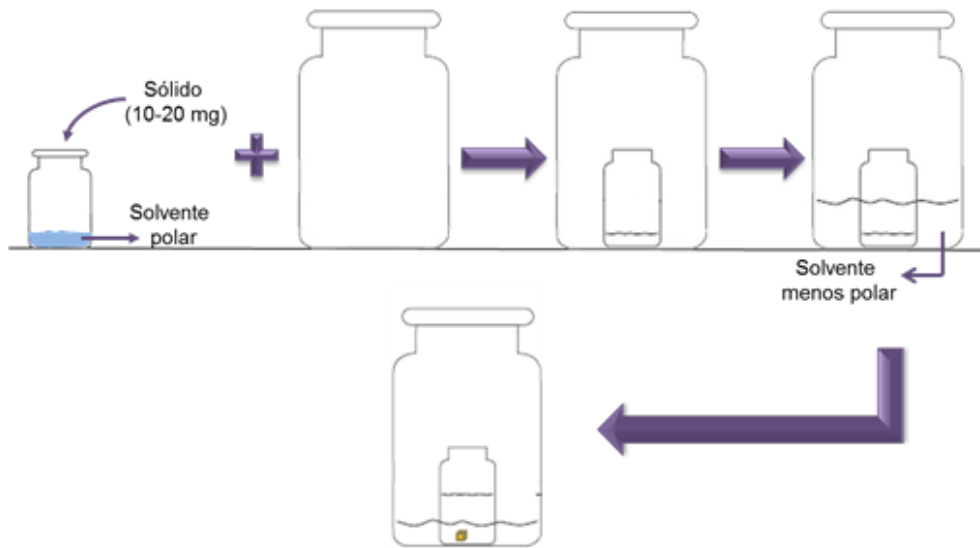


Figura 5- Representação da técnica de saturação de vapor.

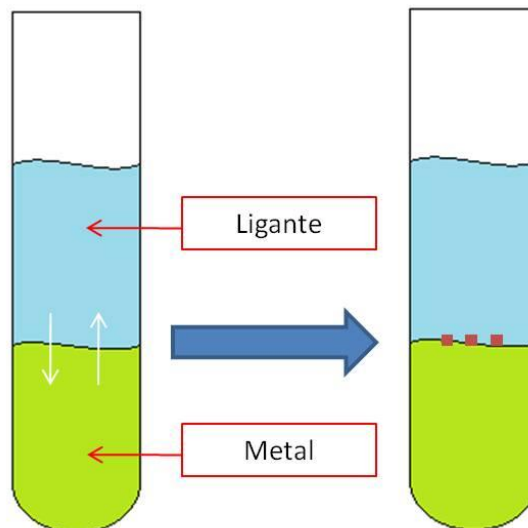


Figura 6- Representação da técnica cristalização em gel.

Tomando como primeira opção o método de evaporação lenta do solvente, utilizando a solução do próprio meio reacional, logrou-se êxito na obtenção de monocristais de DOX•HIC, DOX•H₂O, DOX•HAc, DOX•NIT. Os frascos contendo os cristalizadores foram mantidos em local ausente de luz, à temperatura do ambiente durante todo o tempo de cristalização. A formação de cristais foi acompanhada periodicamente por inspeção visual com auxílio de um microscópio estereográfico binocular com luz polarizada. Verificou-se a morfologia dos cristais avaliando se esta era apropriada para um experimento de difração de raios X por monocristal, ou seja,

arestas bem definidas, ausência de geminações e tamanho adequado (cerca de 0,02 de diâmetro mínimo e 0,2 mm de diâmetro máximo). Os cristais utilizados nas medidas de MXRD foram obtidos após 8, 8, 4 e 8 dias para o DOX•HIC, DOX•H₂O, DOX•HAc, DOX•NIT, respectivamente.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS OBTIDAS

5.2.1 Difração de raios x por monocristal (MXRD)

As medidas de difratometria de raios X por monocristal foram realizadas no Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Minas Gerais (LabCri). Este laboratório dispõe de facilidades como um difratômetro de raios X GEMINI para estudo de amostras monocristalinas, policristalinas e nanomateriais, dotado com detector CCD, acessórios para estudos em altas (<650K) e baixas temperaturas (>90K), MoK α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) e CuK α ($\lambda = 1,5418$).

Assim, todas as medidas experimentais nos monocristais obtidos na UNIFAL-MG foram realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais em cooperação com o Prof. Dr. Carlos Basílio Pinheiro, um dos professores responsáveis pelo equipamento.

As estruturas foram resolvidas usando os métodos de Patterson e, ou, diretos, com o programa SHELXS-97⁽⁷⁰⁾. Os modelos obtidos foram refinados (mínimos quadrados de matriz completa) em $|F|^2$ usando o programa SHELXL-97⁽⁷¹⁾. O programa WINGX⁽⁷²⁾, usado na análise dos dados. Os programas ORTEP-3⁽⁷³⁾, STRUPLO⁽⁷⁴⁾ e Mercury 1.1.2 (CCDC, 2001-2002) foram utilizados para analisar e elaborar representações gráficas das estruturas.

5.2.2 Ponto de fusão

Para se realizar as medidas de ponto de fusão utilizou-se o aparelho de ponto de fusão, da marca Marte[®], número de série 295234, com controlador de temperatura e aquecimento de 2 °C por minuto até próximo a temperatura de fusão e, a partir daí, 1 °C por minuto até o término do experimento. As amostras foram trituradas e acondicionadas em tubos capilares que são acoplados ao aparelho. Realizou-se o aquecimento e por observação chegou-se as temperaturas de fusão

ou decomposição das diferentes formas pseudo-polimórficas da DOX, com auxílio de um termômetro de mercúrio. As medidas das amostras foram realizadas com cinco repetições.

Sabendo-se que diferentes polimorfos apresentam diferentes propriedades físicas, antes de obterem-se os resultados de ponto de fusão, foi proposta uma análise estatística para verificar se existiriam diferenças de ponto de fusão entre as diferentes amostras. O teste de análise de variância escolhido foi o teste de Scott-Knott a 5% de significância⁽⁷⁵⁾.

5.2.3 Difração de raios x por policristais (PXRd)

Após a constatação da obtenção das formas pseudopolimorfas da doxiciclina para o experimento de MXRD, foram sintetizadas mais amostras e em escalas maiores. O processo de evaporação mais rápida precipitou uma massa sólida policristalina que foram analisados por PXRd com a finalidade de se confirmar, especificamente, se o pseudo-polimorfo planejado havia sido formado sem fases espúrias.

As medidas de difratometria de raios X por policristal foram realizadas em um difratômetro Rigaku Ultima IV pertencente ao Laboratório de Cristalografia da Universidade Federal de Alfenas. As medidas foram realizadas utilizando um comprimento de onda $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418$), geometria Bragg-Bretano e fenda dupla em um modo step-scan, entre 3° e 50° em 2θ , com passo de $0,02^\circ$ em 2θ e tempo de 0,8 passo/s. Para as medidas foi usado uma voltagem de 40KV e corrente de 30 mA.

5.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho

As medidas de infravermelho foram realizadas utilizando o equipamento da marca Shimadzu, modelo FT-IR-Prestige-21, Beam Splitter KBr (escala de varredura no IV de 4000 a 400 cm^{-1} , detector DLATGS, resolução 4 cm^{-1} , interferômetro selado de Michelson com alinhamento dinâmico. As amostras foram preparadas por trituração em almofariz de ágata com brometo de potássio e posterior pastilhamento em prensa hidráulica. A quantidade de KBr e de amostra utilizada nas análises são padronizadas pela espátula que acompanha o equipamento.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PONTO DE FUSÃO

As medidas do intervalo de fusão, para os compostos obtidos, indicaram que os mesmos estão puros, pois apresentaram temperaturas constantes durante o processo de fusão. Uma exceção ocorreu com o a DOX•HAc que em uma das repetições apresentou valores de início e fim de fusão com diferença de intervalos um pouco maior, 12° C, o que pode caracterizar a presença de impurezas no pseudo-polimorfo analisado.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados das análises de ponto de fusão e o resultado do teste estatístico aplicado para comparar os diferentes pseudo-polimorfos.

Tabela 3 - Ponto de Fusão e Análise de Variância (ANOVA)

Amostra	PF1	PF2	PF3	PF4	PF5	Média ¹	Desvio
DOX•HIC	201,0	202,0	200,5	201,0	203,0	201,6 d	0,89
DOX•H ₂ O	162,5	161,5	162,0	162,5	161,0	162,2 b	0,58
DOX•NIT	186,5	186,0	185,5	186,0	187,0	186,4 c	0,51
DOX•HAc	124,0	125,0	123,0	124,0	125,0	124,2 a	0,75

¹ Médias verticais seguidas por letras distintas diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott. ⁽⁷⁵⁾

6.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR MONOCRISTAL: MXRD

6.2.1 Estrutura da DOX•HIC

Como informado anteriormente, dos polimorfos/pseudo-polimorfos conhecidos da DOX, a DOX•HIC e a DOX•H₂O, apenas a primeira possui estrutura cristalina determinada ⁽¹⁹⁾. No trabalho publicado o DOX•HIC é reportado no grupo especial monoclinico P2₁ com os seguintes parâmetros de cela: $a = 18,203(2) \text{ \AA}$, $b = 16,045(1) \text{ \AA}$, $c = 8,004(1) \text{ \AA}$ e $\beta = 94,11(1)^\circ$. No presente trabalho o DOX•HIC foi recristalizado em uma solução H₂O:Etanol 1:1 obtendo-se monocristais que foram confirmados por MXRD como sendo de DOX•HIC reportada anteriormente ⁽¹⁹⁾. Na Tabela 4 constam os principais dados cristalográficos da estrutura redeterminada.

Tabela 4 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura para da DOX•HIC.

Fórmula Empírica	C ₄₆ H ₅₈ Cl ₂ N ₄ O ₁₈
Massa Molecular / g·mol ⁻¹	1025,86
Temperatura / K	293(2) K
Sistema Cristalino	Monoclínico
Comprimento de onda / Å	0,71073
Grupo Espacial	P2 ₁
Cela Unitária	
a / Å	18,1980(4)
b / Å	16,0654(3)
c / Å	8,0220(2)
β ° / grau	94,226(1)
Volume	2338,92(9) Å ³
Z	4
Densidade (calculada) / Mg/m ³	1,457
Coeficiente de Absorção / mm ⁻¹	0,221
F(000)	1080
Tamanho do Cristal / mm	0,70 x 0,09 x 0,08 mm
θ máximo / grau	23,82
Intervalos de Índices	-20<=h<=20, -17<=k<=18, -9<=l<=9
Reflexões Coletadas	6698
Reflexões Independentes	6698 [R(int) = 0,0000]
Completeza até θ _{máximo} / %	97,5
Dados / restrições / parâmetros	6698 / 1 / 636
Qualidade do Refinamento em F2	1,040
Índice R Final [I>2sigma(I)]	R1 = 0,0347, wR2 = 0,0874
Índice R (dado completo)	R1 = 0,0378, wR2 = 0,0925
Parâmetro de Flack	-0,04(5)
Picos e vales mais intensos / Å ⁻³	0,287 e -0,185 e

Enfatiza-se que a estrutura da DOX•HIC possui duas moléculas de DOX, independentes por simetria, na unidade assimétrica. Trata-se de dois tautômeros “zwitterionicos” da DOX em um mesmo cristal, chamados por T1 e T2 (Figura 7a e 7b). Em T1 e T2 o grupo dimetilamina está protonado e o grupo hidroxila está desprotonado: o O7 no caso de T1 (FIGURA 7a e 8a) e o O6 no caso de T2 (FIGURA 7b e 8b).

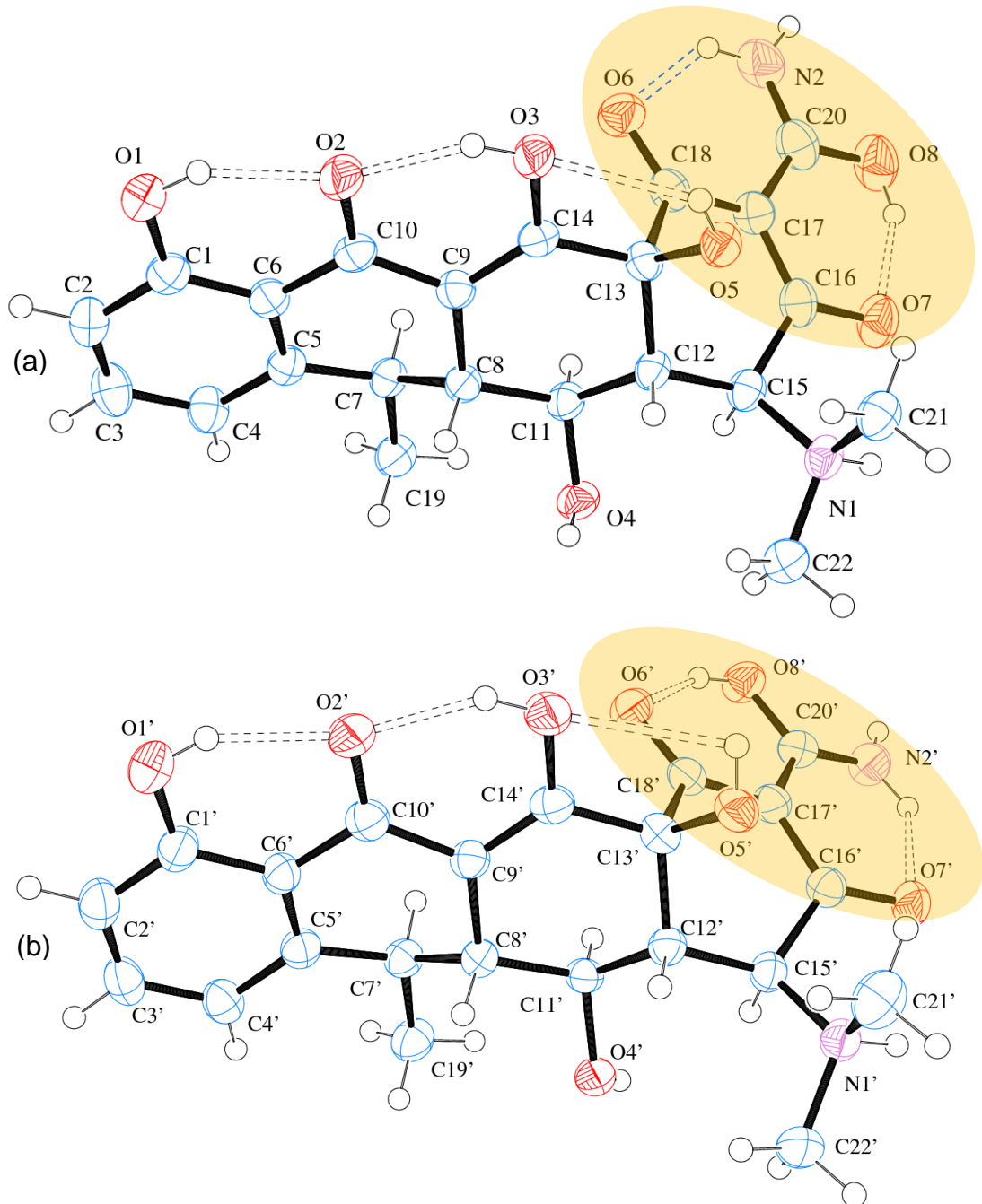


Figura 7 - Representação ORTEP da DOX·HIC T2. Presentes na unidade assimétrica da DOX·HIC. Ligações de hidrogênio intramoleculares são representadas como dupla linha tracejada. Os átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário e os elipsoides dos demais átomos estão a 50% de probabilidade. A orientação do grupo amida envolvido no conformerismo é destacada em laranja.

Além de serem considerados tautômeros, as duas moléculas de DOX do DOX·HIC são também considerados conformêros, tendo em vista a rotação de 180° em torno da ligação C17-C20 o que faz trocar as posições da carbonila e da amina do grupo carboxiamida. Além de T1 e T2, a estrutura do DOX·HIC contém também

uma molécula de etanol, uma água e dois cloretos na unidade assimétrica. Os dois átomos de cloros são os contra-íons de T1 e T2 uma vez que a protonação de O8 dá às duas moléculas de DOX uma carga positiva líquida. A representação do empacotamento cristalino da DOX·HIC ao longo do plano [110] é mostrada na Figura 3.

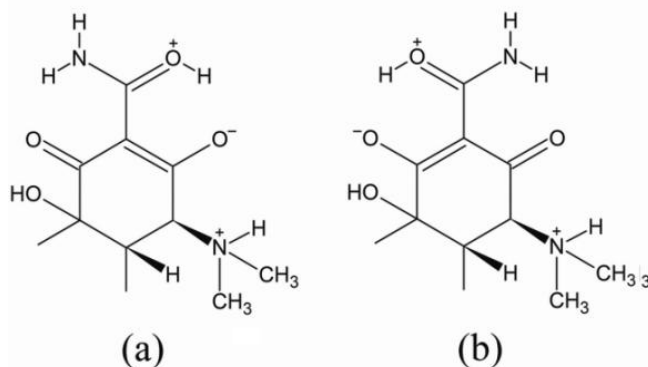


Figura 8- Diagrama químico da DOX·HIC T1 (a) e DOX·HIC T2 (b).

A configuração absoluta da DOX reportada na literatura e confirmada pelo parâmetro de Flack refinado para a estrutura redeterminada da DOX·HIC, foi utilizada em todos os refinamentos subsequentes (DOX·H₂O, DOX·HAc e DOX·NIT). Nas três estruturas inéditas reportadas a seguir, foi considerada a média dos pares de Friedel tendo em vista que os átomos presentes (C, O e N) não possuem elétrons suficientes para que o espalhamento anômalo permitisse o refinamento do parâmetro de Flack.

As geometrias intra e intermoleculares do DOX·HIC não serão discutidas em detalhes nesse trabalho por se tratar de uma estrutura já reportada por Stezowski em 1977⁽¹⁹⁾.

6.2.2 Estrutura da DOX·H₂O

Devido à baixa solubilidade da forma neutra monohidratada da doxiciclina, tanto em meio aquoso neutro como em solventes orgânicos, a estratégia adotada para se obter monocristais de tamanho adequado para o estudo cristalográfico foi partir de uma solução aquosa quente do hidrato de doxiciclina, bastante solúvel, e neutralizá-la gradativamente pela adição de solução aquosa de hidróxido de sódio. Este procedimento permitiu a obtenção de uma solução supersaturada de DOX·H₂O, a qual, após resfriamento lento, deu origem a monocristais adequados para medidas

de difração de raios X por monocristal. As informações sobre coleta dos dados e refinamento da estrutura estão sumarizadas na tabela 5 e uma representação ORTEP da unidade assimétrica da DOX·H₂O é apresentada na Figura 9.

Tabela 5 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura da DOX·H₂O

Fórmula Empírica	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₉
Massa Molecular / g·mol ⁻¹	462,45
Temperatura / K	100 (2)
Sistema Cristalino	Monoclínico
Comprimento de onda	0,71073 Å
Grupo Espacial	P2 ₁
Cela Unitária	
<i>a</i> / Å	<i>a</i> = 5,9241 (1)
<i>b</i> / Å	<i>b</i> = 9,4808 (2)
<i>c</i> / Å	<i>c</i> = 18,5568 (4)
β / grau	β = 91,192 (2)
Volume	1042,02 (4) Å ³
Z	2
Densidade (calculada) / Mg/m ³	1,474
Coeficiente de Absorção / mm ⁻¹	0,115
F(000)	488
Tamanho do Cristal / mm	0,70 x 0,09 x 0,08
θ máximo / grau	32,84
Intervalos de Índices	-8<= <i>h</i> <=9, -14<= <i>k</i> <=13, -28<= <i>l</i> <=28
Reflexões Coletadas	16517
Reflexões Independentes	3786 [R(int) = 0,0393]
Completeza até θ _{máximo} / %	99,8
Dados / restrições / parâmetros	3786 / 1 / 322
Qualidade do Refinamento em F2	1,051
Índice R Final [<i>I</i> >2σ(<i>I</i>)]	R1 = 0,0369, wR2 = 0,0918
Índice R (dado completo)	R1 = 0,0413, wR2 = 0,0945
Parâmetro de Flack	-0,4(2)
Picos e vales mais intensos / Å ⁻³	0,390 e -0,223 e

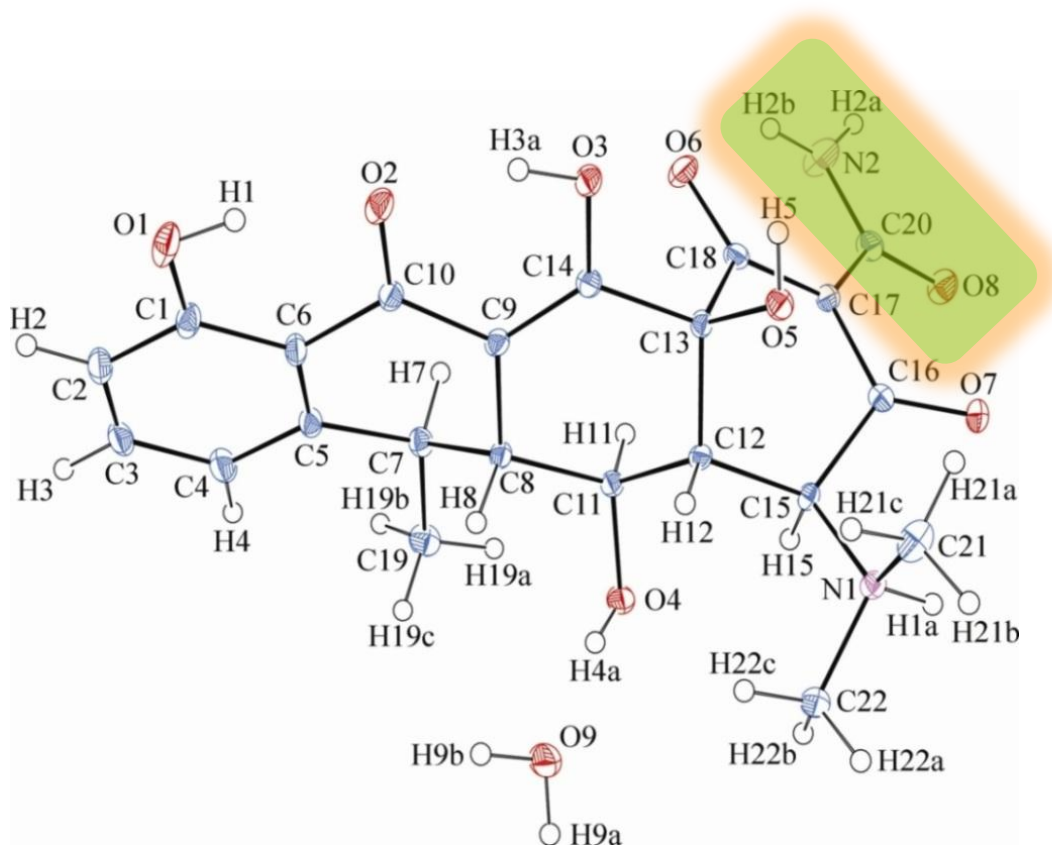


Figura 9- Representação ORTEP da unidade assimétrica da DOX·H₂O. Os átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário e os elipsoides dos demais átomos estão a 50% de probabilidade. A orientação do grupo amida envolvido no conformerismo é destacada em verde.

Diferentemente do hiclato de doxiciclina, que possui duas moléculas com diferentes formas tautoméricas e orientações distintas do grupo amida (T1 e T2) em sua estrutura cristalina ⁽¹⁹⁾, DOX·H₂O apresenta apenas uma molécula na unidade assimétrica e, conseqüentemente, somente um tautômero e uma orientação do grupo amida (conformero) ocorrem nesta forma sólida. A análise intramolecular realizada com o programa MOGUL mostrou que todas as distâncias e ângulos de ligação estão de acordo com os valores estatísticos esperados e revelou alguns aspectos interessantes com relação às distâncias encontradas em comparação com os tautômeros T1 e T2 presentes na unidade assimétrica do DOX·HIC ⁽¹⁹⁾ e com fragmentos semelhantes de outras estruturas depositadas no CSD (TABELA 6).

A ligação C10–O2 é maior do que o valor médio esperado encontrado pelo MOGUL como consequência da ligação de hidrogênio bifurcada envolvendo o átomo O2 e duas hidroxilas adjacentes, formando dois anéis intramoleculares fundidos $S_1^1(6)$, os quais, juntamente com outro anel adjacente $S_1^1(5)$, dão origem ao padrão supramolecular $S_3^2(13)$ (FIGURA 10). Uma vez que esse mesmo *synthon* ocorre no

hclato de doxiciclina, é de se esperar que desvios semelhantes de distâncias de ligação também ocorram para esta forma sólida da fármaco. Além destas interações, outro anel intramolecular $S_1^1(6)$ é formado pela interação entre os átomos O6 e H2b do nitrogênio da amida (FIGURA 10).

Tabela 6 - Valores de distâncias de ligação (Å) para DOX·H₂O, análise intramolecular do MOGUL⁽⁷⁰⁾ (média) e correspondentes em DOX·HIC⁽¹⁹⁾

Ligação	DOX·H ₂ O	Valor médio MOGUL (desvio padrão)	Fragmentos no CSD	DOX·HIC T1	DOX·HIC T2
C10–O2	1,272(2)	1,22(2)	4018	1,276(3)	1,275(3)
C20–O8	1,246(2)	1,24(3)	419	1,304(4)	1,314(3)
C17–C20	1,466(2)	1,47(2)	37	1,455(4)	1,440(3)
C16–C17	1,447(2)	1,44(3)	28	1,407(4)	1,441(4)
C16–O7	1,230(2)	1,22(2)	998	1,267(3)	1,231(3)
C20–N2	1,352(2)	1,33(4)	419	1,312(5)	1,311(3)
C17–C18	1,415(2)	1,35(3)	17	1,434(4)	1,417(3)
C18–O6	1,254(2)	1,25(3)	24	1,234(4)	1,266(3)

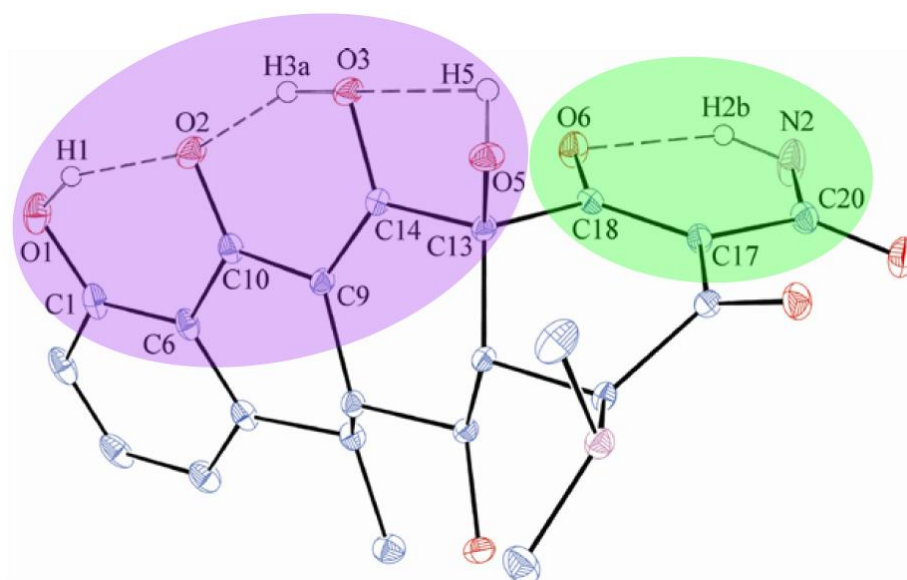


Figura 10- Representação ORTEP das interações intramoleculares na DOX·H₂O:

anel $S_3^2(13)$ (violeta) e $S_1^1(6)$ anel (verde).

É importante notar que, da mesma forma como o hclato, DOX·H₂O cristaliza-se como um “zwitterion”. A carga positiva está localizada sobre o átomo de

nitrogênio protonado N1 do grupo dimetilamino e, para manter a eletroneutralidade, a hidroxila mais próxima ao grupo amida sofre desprotonação. A ligação C16–O7 é próxima ao valor médio encontrado pela análise do MOGUL e comparável àquela encontrada no DOX·HIC T2, mas mais curta do que T1, indicando um forte caráter de dupla ligação. Já a ligação C16–O7 em DOX·HIC T1 é significativamente mais longa do que o valor médio do MOGUL, mostrando maior caráter simples (FIGURA 11). Apesar da Tabela 6 mostrar que todos os valores experimentais das ligações C18–O6 estão de acordo com o MOGUL, na DOX·H₂O esta ligação é mais longa do que em T1 e ligeiramente mais curta do que T2, de forma que a carga negativa pode ser formalmente atribuída ao átomo O6, embora ela esteja, na verdade, deslocalizada sobre o sistema π -conjugado mostrado na (FIGURA 11). Foi observado que os valores das ligações C16–C17 estão de acordo com os valores médios do MOGUL, exceto em DOX·HIC T1, no qual ela é menor, de acordo com o esperado devido ao maior caráter de dupla da ligação C–C. Por outro lado, todas as ligações C17–C18 nestas três unidades de DOX são cerca de 0,05 Å mais longas do que o valor médio encontrado pelo MOGUL, corroborando novamente a forte ressonância envolvendo a unidade O7–C16–C17–C18–O6 (FIGURA 11). Mesmo considerando a deslocalização π , nota-se que as distâncias das ligações C16–C17 e C17–C18 na DOX·H₂O são mais próximas às correspondentes em DOX·HIC T2 do que aquelas em DOX·HIC T1, apoiando os esquemas estruturais propostos nas FIGURAS 11a, b e c. A ligação C20–O8 na DOX·H₂O é mais de 0,05 Å mais curta do que em DOX·HIC (tanto T1 como T2). Portanto, o caráter duplo desta ligação é mais forte na DOX·H₂O do que em DOX·HIC, já que, no último, a protonação do átomo de oxigênio da amida causa um decréscimo na ordem da ligação C=O. Analisando os comprimentos das ligações C17–C20, pode-se observar que o valor na DOX·H₂O é muito próximo à média encontrada pelo MOGUL, mas consideravelmente maior do que as correspondentes em DOX·HIC T1 e T2. Esta característica estrutural evidencia o caráter predominantemente simples da ligação C17–C23 na DOX·H₂O, ao contrário da maior ordem esperada por conta da conjugação π . Assim, é possível afirmar que a conjugação π está limitada ao fragmento O7–C16–C17–C18–O6 na DOX·H₂O, enquanto ela se estende ao grupo amida em DOX·HIC. As ligações C20–N2 remanescentes, tanto para DOX·H₂O como para DOX·HIC (T1 e T2), estão de acordo com os valores médios encontrados pelo MOGUL. Assim, com base nas considerações acima, o diagrama estrutural que

melhor representa o anel ligado ao grupo amida na DOX·H₂O é aquele representado na FIGURA 11b.

Este fármaco pode exibir tanto tautomerismo como conformerismo no estado sólido. No DOX·HIC T1, o enolato e o oxigênio da amida estão próximos ao grupo dimetilamino, enquanto no DOX·HIC T2 é a carbonila e o nitrogênio da amida que estão nestas posições. A DOX·H₂O sólida exibe apenas a forma tautomérica do DOX·HIC T2 e somente a conformação da amida observada no DOX·HIC T1. Como pode ser inferido pela Tabela 6, no DOX·HIC ambos tautômeros possuem o átomo de oxigênio da amida protonado e, como consequência, essas ligações C–O são mais longas, apresentando um menor caráter de ligação dupla quando comparadas com a equivalente C20–O8 na DOX·H₂O. Uma forte ligação de hidrogênio intramolecular O–H···O envolvendo o oxigênio protonado da amida e o oxigênio cetônico é responsável pelo alongamento da ligação C=O no DOX·HIC T2 quando comparado com a distância O7–C16 na DOX·H₂O. As demais distâncias de ligação do arcabouço molecular são próximas aos valores da literatura e aos fragmentos de estruturas semelhantes depositadas no CSD.

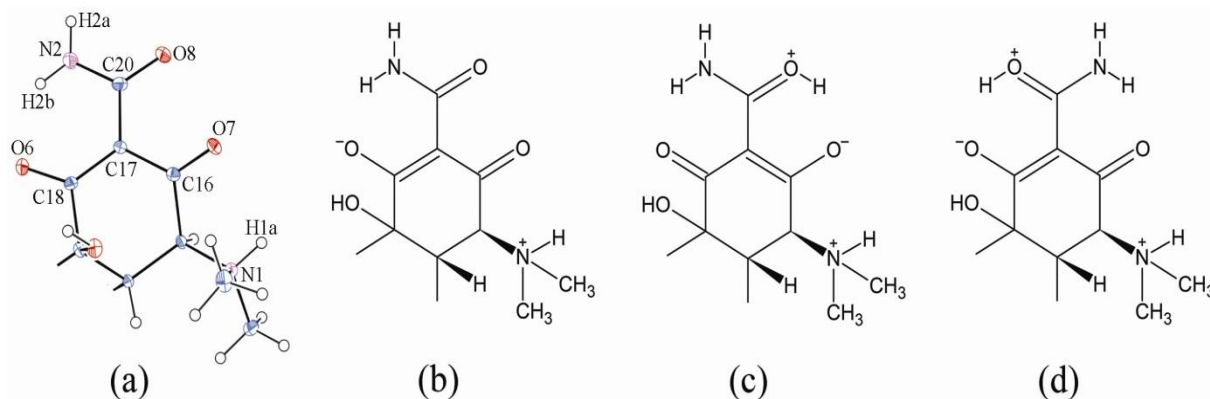


Figura 11- Diagrama ORTEP do anel da doxiciclina ao qual o grupo amida está ligado na DOX·H₂O (a) juntamente com seu diagrama químico (b) e os correspondentes a DOX·HIC T1 (c) e DOX·HIC T2 (d) para fim de comparação.

Além das ligações de hidrogênio discutidas anteriormente, a existência de diversos grupos hidroxila na doxiciclina também favorece a formação de interações intermoleculares com moléculas de DOX e de água adjacentes que estabilizam o empacotamento cristalino. Desta forma, as moléculas de água atuam como doadoras e receptoras, ligando três moléculas de DOX através de um grupo enolato e duas hidroxilas: O4–H4a···O9, O9–H9a···O6ⁱ e O9–H9b···O1ⁱⁱ (FIGURA 12). Assim,

o átomo O6 atua como um receptor bidentado de ligações hidrogênio, participando de uma ligação intramolecular e outra intermolecular (FIGURA 10 e 12).

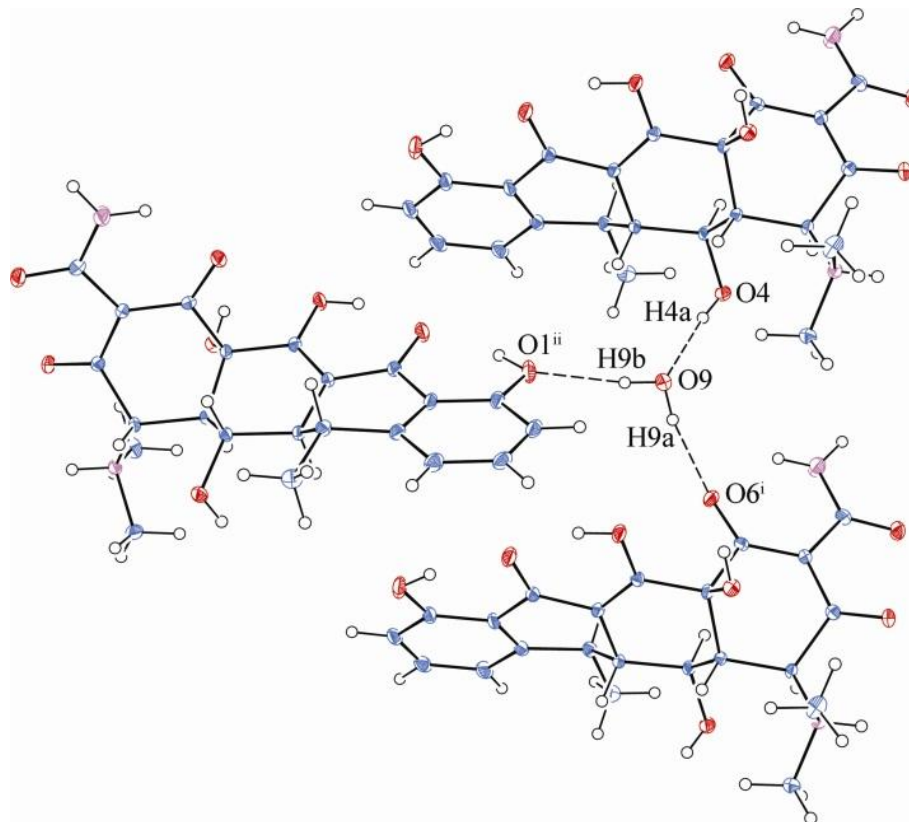


Figura 12- Ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de doxiciclina e água. Transformações de simetria usadas para gerar moléculas equivalentes: (i) $(x, y-1, z)$ e (ii) $(-x+2, y-\frac{1}{2}, -z+1)$.

Também existem interações envolvendo o átomo de oxigênio da amida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amina, $N^{iii}-H1a^{iii}\cdots O8$, e um nitrogênio da amida e o oxigênio do enolato, $O7^{iii}-H2a\cdots N2$, com a formação de anéis supramoleculares $R_2^2(9)$ (FIGURA 13). Desta forma, cada molécula de doxiciclina interage com outras duas adjacentes relacionadas por um eixo parafuso 2_1 . Esses anéis alternados, juntamente com as ligações de hidrogênio $O4-H4\cdots O9$ e $O9-H9a\cdots O6^i$ (cadeia supramolecular $C_2^2(9)$) dão origem a uma cadeia em “zig-zag” na direção $[010]$ (FIGURA14).

Sumarizando os aspectos supramoleculares da $DOX\cdot H_2O$, enquanto cadeias paralelas de moléculas do fármaco estão conectadas em um arranjo “cabeça-cabeça” por contato direto através de duas ligações de hidrogênio dependentes por simetria (FIGURA 13), o arranjo “cauda-cauda” é mediado por três ligações de

hidrogênio envolvendo uma molécula de água e três moléculas de DOX (FIGURA 12). Esta organização “cabeça-cabeça” e “cauda-cauda” se propaga ao longo das direções [001] e [010] e, combinada com as outras forças não-covalentes previamente discutidas, resulta em uma rede supramolecular bidimensional no plano [011].

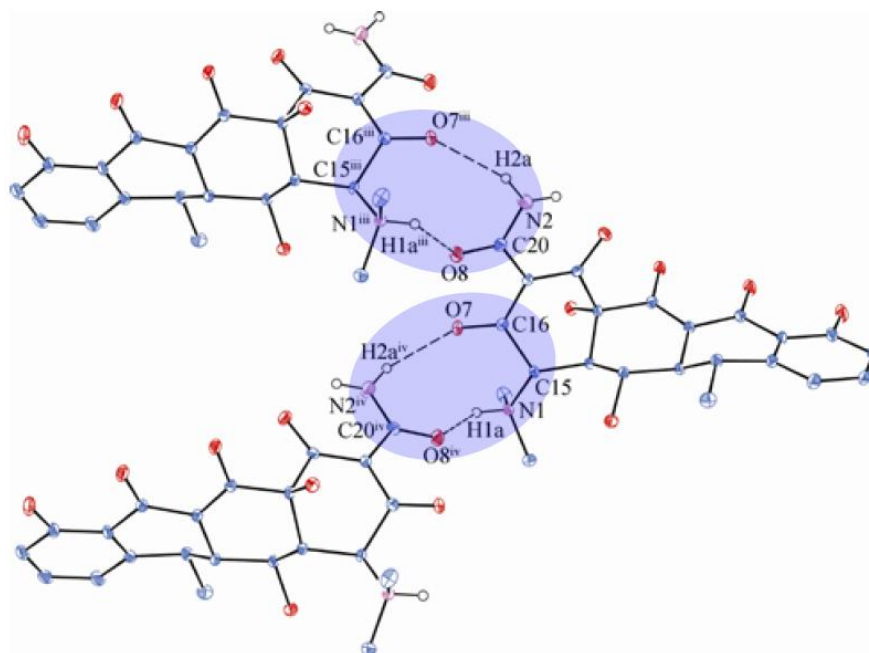


Figura 13- Padrão intermolecular $R_2^2(9)$ formado entre unidades DOX adjacentes. Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: (iii) $(-x+1, y+\frac{1}{2}, -z)$ and (iv) $(-x+1, y-\frac{1}{2}, -z)$.

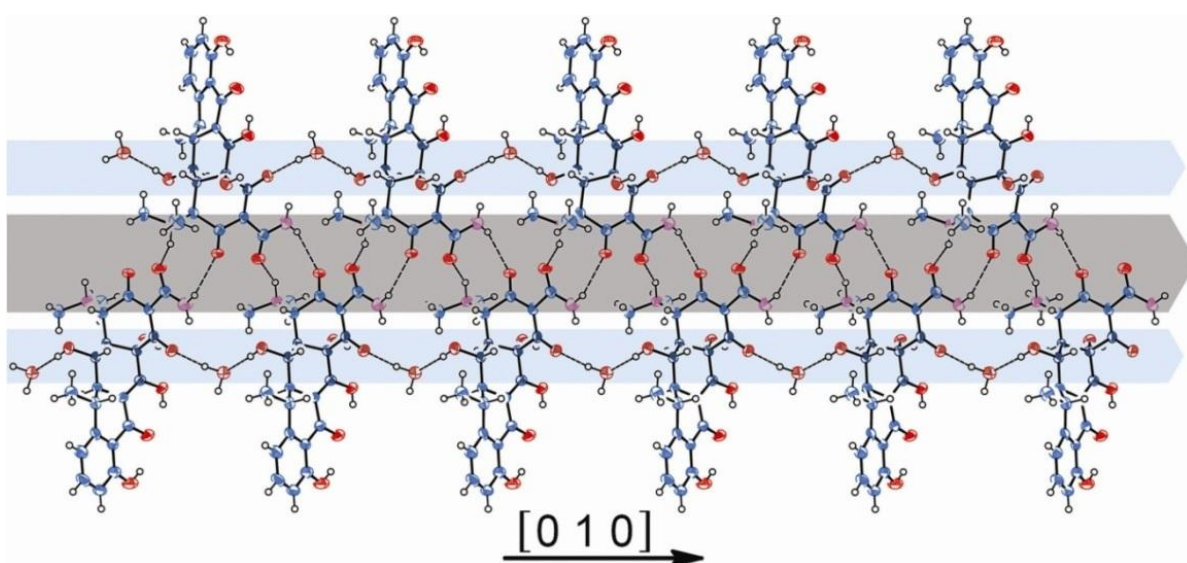


Figura 14- Cadeia em zig-zag observada na estrutura cristalina da DOX·H₂O. As interações DOX...DOX estão destacadas em cinza e as DOX...H₂O ($C_2^2(9)$) em azul.

Um esquema de como as moléculas da fármaco e de solvente são organizadas é mostrada na FIGURA 15 e a Tabela 7 sumariza todas as ligações mencionadas.

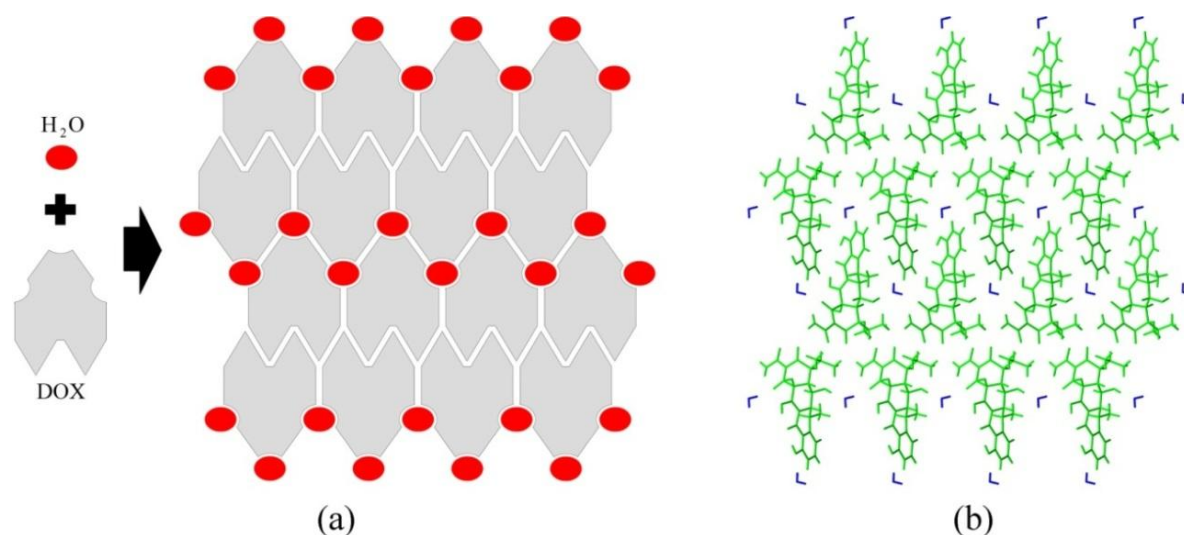


Figura 15 - Representação esquemática da rede bidimensional formada pelas interações supramoleculares entre moléculas de água e de doxiciclina (a) e diagrama Mercury do empacotamento cristalino da DOX·H₂O no plano [011] (moléculas de doxiciclina em verde e água em azul).

Tabela 7 Distâncias e ângulos das ligações inter e intramoleculares presentes na estrutura cristalina da DOX·H₂O. Os átomos doadores e receptores são denominados por “D” e “A” respectivamente

	D	H	A	D–H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D–H...A (°)
INTRA	O1	H1	O2	0,90(3)	1,75(3)	149(2)	2,566(2)
	O3	H3a	O2	0,86(3)	1,71(3)	154(3)	2,516(2)
	O5	H5	O3	0,78(4)	2,34(3)	106(2)	2,657(2)
	N2	H2b	O6	0,91(3)	1,93(3)	139(2)	2,685(2)
INTER	O4	H4a	O9	0,84(3)	1,94(3)	174(3)	2,780(2)
	O9	H9a	O6 ⁱ	0,85(3)	1,98(3)	167(3)	2,814(2)
	O9	H9b	O1 ⁱⁱ	0,83(3)	2,10(3)	167(3)	2,911(2)
	N2	H2a	O7 ⁱⁱⁱ	0,88(3)	2,21(3)	151(2)	3,012(2)
	N1	H1a	O8 ^{iv}	0,93(3)	1,85(3)	145(2)	2,662(2)

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: (i) $(x, y-1, z)$, (ii) $(-x+2, y-1/2, -z+1)$, (iii) $(-x+1, y+1/2, -z)$ and (iv) $(-x+1, y-1/2, -z)$.

Comparando DOX·H₂O e DOX·HIC sob o ponto de vista supramolecular, a despeito de ambas cristalizarem-se no grupo espacial P2₁, seus parâmetros de cela unitária (TABELAS 4 e 5) e conteúdos são bem diferentes. Conforme discutido anteriormente, DOX·H₂O apresenta somente um confômero, enquanto existem dois

no DOX·HIC. No hclato, a hidroxila do etanol interage somente com o grupo NH_2 de T2, o que evidencia que esta ligação de hidrogênio pode ser responsável pela estabilização necessária para esse confômero – com o grupo NH_2 mais próximo à dimetilamina – existir no estado sólido (FIGURA 16). Assim, os cátions da doxiciclina T1 no DOX·HIC – os quais não interagem com o etanol – bem como as moléculas do fármaco na DOX· H_2O possuem seus oxigênios da amida próximos à amina. Mesmo considerando as orientações distintas dos grupos amida, a rigidez da molécula de doxiciclina permite apenas pequenas variações nos ângulos de torção, que são causadas provavelmente por outras ligações de hidrogênio envolvendo ânions cloreto no hclato (FIGURA 17).

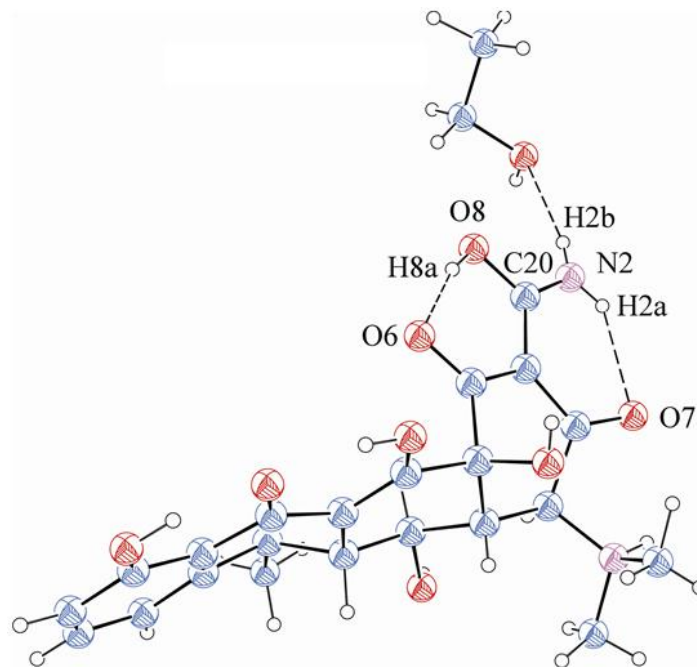


Figura 16- Diagrama ORTEP das ligações de hidrogênio entre o tautômero DOX·HIC T2 e a molécula de etanol de cristalização. Legendas análogas à DOX· H_2O .

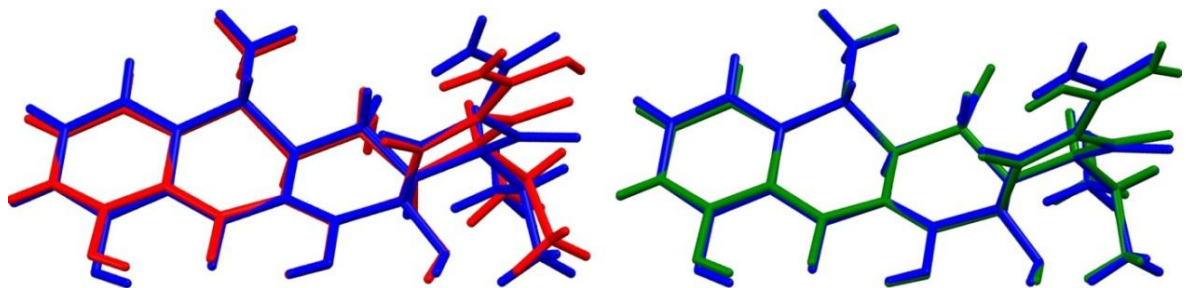


Figura 17- Sobreposição das unidades de doxiciclina em DOX· H_2O (azul) e DOX·HIC (confômeros T1 e T2 em vermelho e verde, respectivamente).

6.2.3 Estrutura da DOX•HAc

O sumário das informações sobre coleta dos dados e refinamento da estrutura da forma neutral da DOX bi-hidratada e solvatada ou co-cristalizada por ácido acético (DOX•HAc) e a representação ORTEP de sua unidade assimétrica são mostrados na Tabela 8 e na FIGURA 18, respectivamente. A Figura 18 mostra também as ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares envolvendo as águas e o ácido acético, primeiros vizinhos da DOX.

Da mesma forma como o DOX•HIC e a DOX•H₂O, a DOX•HAc cristaliza-se como um zwitterion. A carga positiva está localizada sobre o átomo de nitrogênio protonado N1 do grupo dimetilamino e, para manter a eletro-neutralidade, a hidroxila mais próxima ao grupo amida sofre desprotonação. Similar à DOX•H₂O, a DOX•HAc apresenta apenas uma molécula de DOX na unidade assimétrica. Portanto a DOX•HAc possui um único tautômero e uma única orientação do grupo amida (confômero) quando comparado ao hidrato. Contudo, o DOX•HAc difere em relação à DOX•H₂O em três importantes aspectos: 1) Como os mapas de diferença de Fourier indicaram a presença do ácido acético e não do íon acetado, a DOX•HAc apresenta a DOX na sua forma neutra e além de ser considerado um pseudo-polimorfo hidratado pode também ser classificada como um solvato; 2) Na DOX•HAc o NH₂ do grupo amida está voltada para o O7 enquanto na DOX•H₂O ele se volta para o O6 (FIGURA 19 b). Portanto, o DOX•HAc sólido exhibe a forma tautomérica e a conformação da amida observada no DOX•HIC T2, enquanto a DOX•H₂O sólida exhibe a forma tautomérica do DOX•HIC T2 e a conformação da amida do DOX•HIC T1 (FIGURAS 11, 18 e 19); 3) não se forma o anel $S_3^2(13)$ (violeta) observado para a DOX•H₂O (FIGURA 19 a) uma vez que a hidroxila O5-H5 participa de uma interação intermolecular, O5-H5...O11, no caso da DOX•HAc. (FIGURA 19 b).

A existência de diversos grupos doadores e receptores de ligação de hidrogênio na DOX, nas moléculas de água e no ácido acético presentes na estrutura desempenham importante papel na estabilização do empacotamento cristalino. De uma maneira absolutamente idêntica ao padrão de empacotamento observado para a DOX•H₂O (FIGURA 12) uma das moléculas de água atuam como doadora e receptora, ligando três moléculas de DOX através de um grupo enolado e duas hidroxilas: O4–H4a...O9, O12–H12a...O6ⁱ e O12–H12b...O1ⁱⁱ (FIGURA 20).

Salienta-se que o átomo O6 não atua como um receptor bidentado de ligações de hidrogênio, participando de uma ligação intramolecular e outra intermolecular, como observado para a DOX·H₂O (Figuras 12 e 20).

Tabela 8 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura para da DOX·HAc

Fórmula Empírica	C ₂₄ H ₃₂ N ₂ O ₁₂
Massa Molecular / g·mol ⁻¹	1025,86
Temperatura / K	293(2)
Sistema Cristalino	Monoclínico
Comprimento de onda / Å	0,71073
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cela Unitária	
a / Å	6,4753(2)
b / Å	9,0970(4)
c / Å	42,8077(16)
Volume / Å ³	2521,6(2)
Z	4
Densidade (calculada) / Mg·m ⁻³	1,424
Coeficiente de Absorção / mm ⁻¹	0,115
F(000)	1144
Tamanho do Cristal	0,70 x 0,09 x 0,08 mm ³
θ máximo°	29,49
Intervalos de Índices	-7 ≤ h ≤ 8, -12 ≤ k ≤ 10, -57 ≤ l ≤ 55
Reflexões Coletadas	24360
Reflexões Independentes	3768 [R(int) = 0,0503]
Completeza até θ _{máximo} / %	93,5
Dados / restrições / parâmetros	3768 / 0 / 356
Qualidade do Refinamento em F2	0,997
Índice R Final [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0425, wR2 = 0,1007
Índice R (dado completo)	R1 = 0,0665, wR2 = 0,1066
Parâmetro de Flack	-0,1(10)
Picos e vales mais intensos / Å ⁻³	0,196 e -0,184 e

A molécula de ácido acético também tem participação efetiva na estabilização do empacotamento cristalino do DOX·HAc. Sua hidroxila atua como doador (O9-H9... O8) de ligação de hidrogênio ligando-se a carbonila do grupo amida de uma DOX vizinha. A carbonila do ácido acético, por sua vez, é um receptor de ligação de hidrogênio que se liga bifurcadamente a um dos átomos de hidrogênio do nitrogênio

do grupo amida (N2-H2a... O10) e ao átomo de hidrogênio do grupo dimetilamina (N1^{iv}-H1a^{iv}...O10).

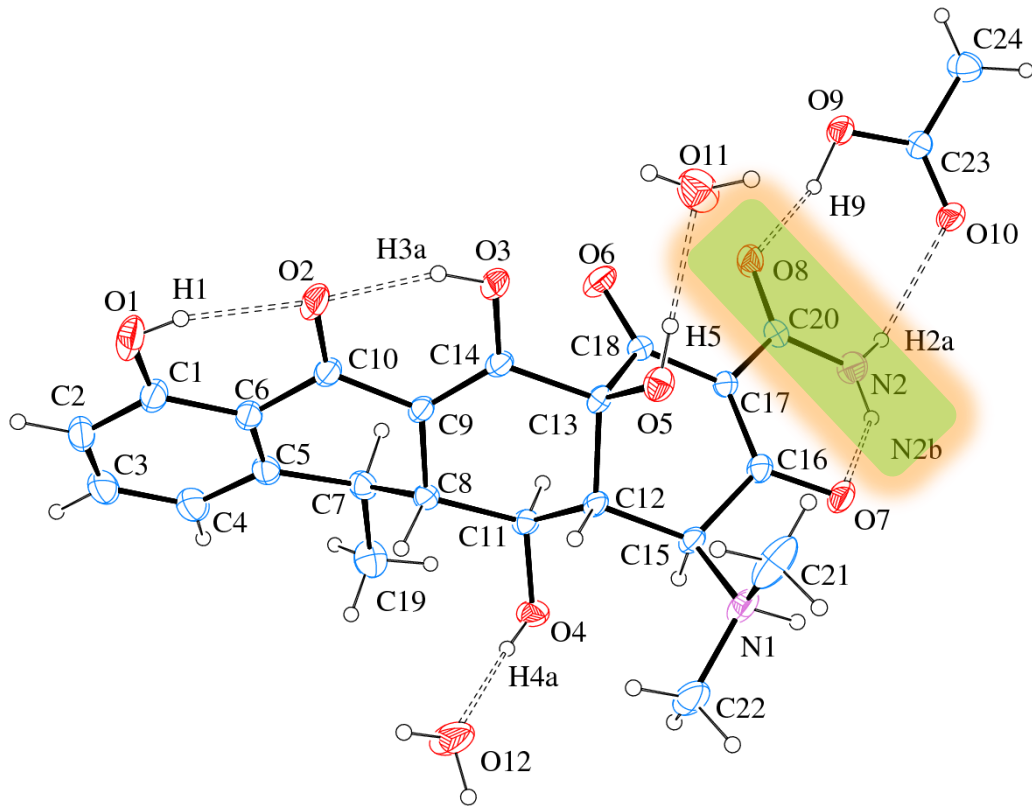


Figura 18- Representação ORTEP da unidade assimétrica da DOX·HAc. Os átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário e os elipsoides dos demais átomos estão a 25% de probabilidade. Ligações de hidrogênio são representadas como dupla linha tracejada. A orientação do grupo amida envolvido no conformerismo é destaca em verde.

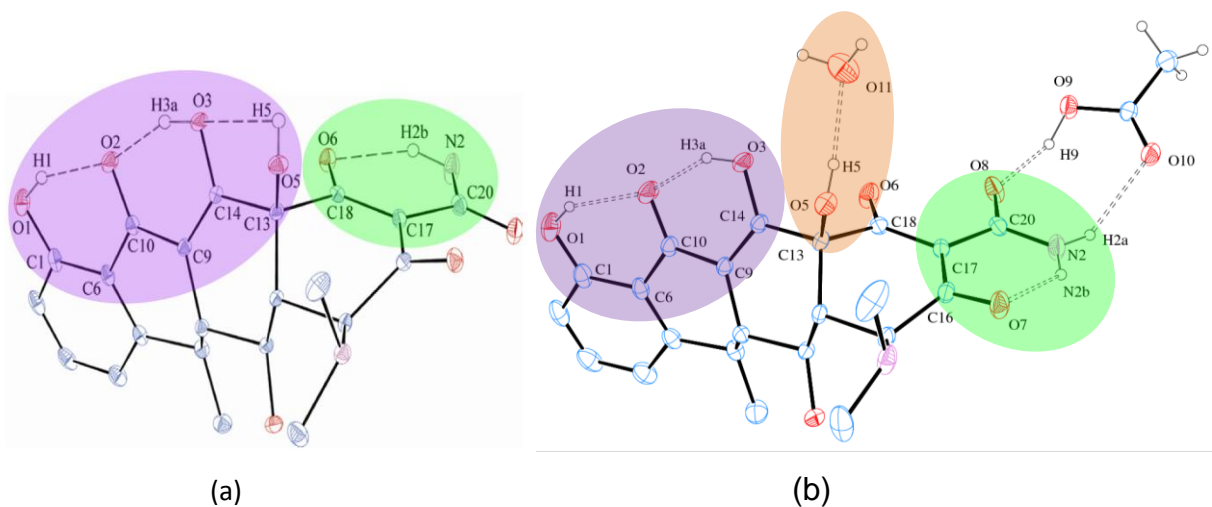


Figura 19- Representação ORTEP comparando as interações intra e intermoleculares na a) DOX·H₂O e b) na DOX·HAc.

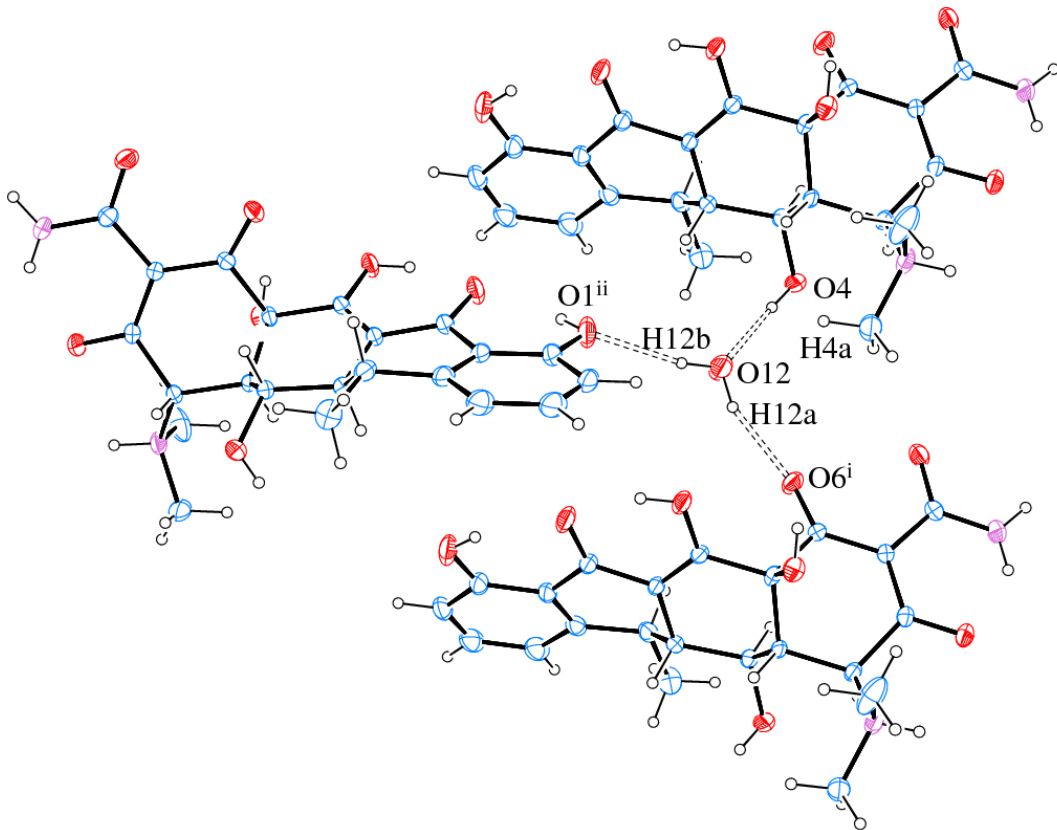


Figura 20- Ligações de hidrogênio envolvendo moléculas de DOX e água. Transformações de simetria usadas para gerar moléculas equivalentes: $i = x, y+1, z$; $ii = -x+1, y+1/2, -z+1/2$.

A participação do ácido acético na estabilização do empacotamento conta ainda com uma ligação de hidrogênio não-clássica (C24-H24a... O7ⁱⁱⁱ) envolvendo um hidrogênio metílico do ácido acético e o O7 de uma terceira molécula de DOX. Portanto, o O7 também é um receptor bifurcado de ligação de hidrogênio. Diferentemente da DOX·H₂O onde cada molécula de doxiciclina interagem-se diretamente (FIGURA 21), na DOX·HAc o ácido acético se intercala entre três moléculas de DOX não havendo nenhuma ligação de hidrogênio clássica por meio de interação direta DOX-DOX. A estabilização do empacotamento é completada pela participação da segunda água de cristalização que se liga às moléculas de DOX ao longo da direção [100]. Na Figura 22 observa-se que a água atua com uma receptora de ligação de hidrogênio intermolecular (O5-H5... O11) e um de seus átomos de hidrogênio liga-se bifurcadamente a duas carbonilas de uma mesma molécula de DOX (O11-H11b...O6^v e O11-H11b...O8^v). As geometrias de todas as ligações de hidrogênio são mostradas na Tabela 9. As Figuras 23 e 24 trazem a

ilustração do empacotamento cristalino com vista perpendicular aos planos [011] e [101] da célula unitária, respectivamente.

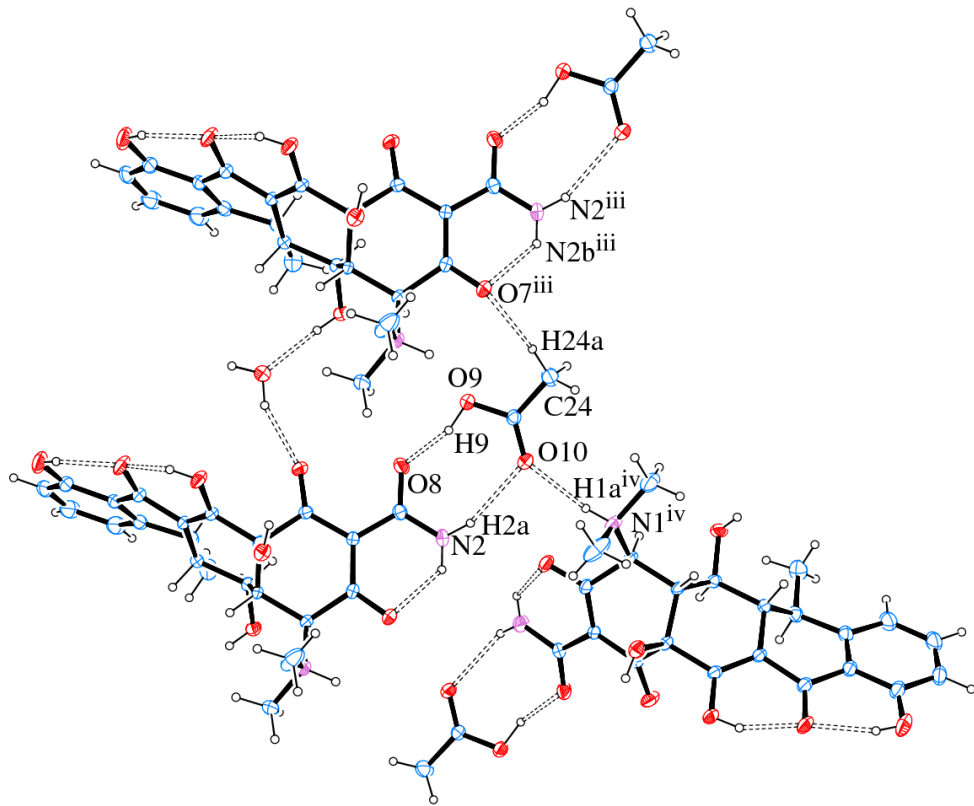


Figura 21- Padrão intermolecular entre as unidades de DOX e ácido acético. Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: ⁱⁱⁱ = $x, y-1, z$ e ^{iv} = $x-1/2, -y+1/2, -z+1$.

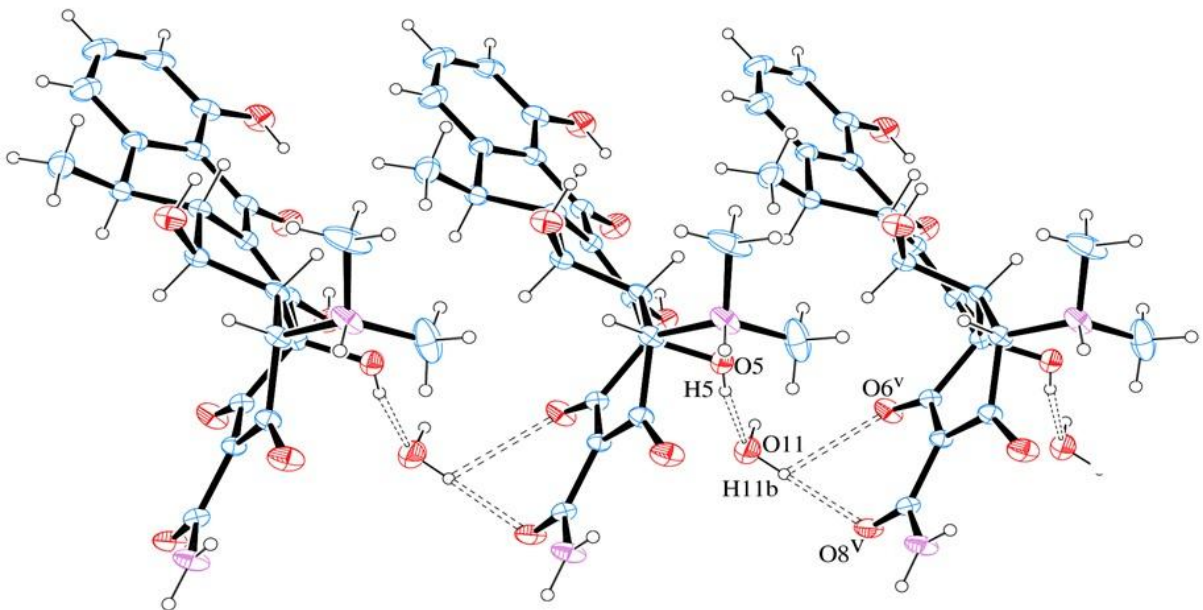


Figura 22- Padrão intermolecular de ligações de hidrogênio ao longo da direção [100]. Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: ^v = $x+1, y, z$.

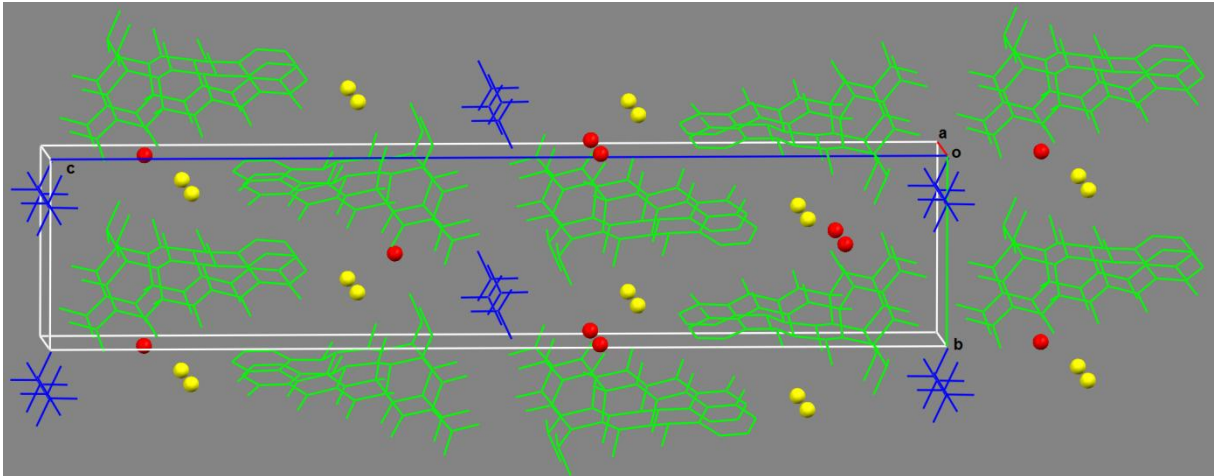


Figura 23- Empacotamento cristalino da DOX·HAc vista perpendicular ao plano [011]. DOX em verde, águas em amarelo e vermelho e ácido acético em azul.

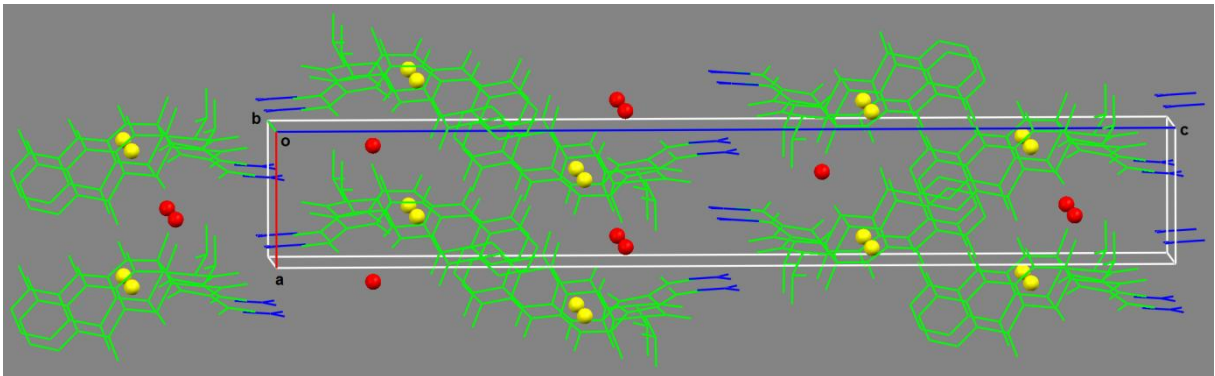


Figura 24- Empacotamento cristalino da DOX·HAc vista perpendicular ao plano [101]. DOX em verde, águas em amarelo e vermelho e ácido acético em azul.

Tabela 9 Distâncias e ângulos das ligações inter- e intramoleculares presentes na estrutura cristalina da DOX•HAc. Os átomos doadores e receptores são denominados por “D” e “A” respectivamente

	D	H	A	D–H (Å)	H•••A (Å)	D•••A (Å)	D–H•••A (°)
INTRA	O1	H1	O2	0,8200	1,8700	2,578(3)	144,00
	O3	H3a	O2	0,8200	1,7900	2,504(2)	145,00
	O5	H5	O3	0,8200	2,4950	2,653(3)	92,00
	N2	H2b	O7	0,8600	1,9800	2,648(3)	134,00
INTER	O4	H4a	O12	0,8200	1,9200	2,738(4)	176,00
	O5	H5	O11	0,8200	1,9200	2,736(3)	171,00
	O9	H9a	O8	0,97(4)	1,63(4)	2,552(3)	159(3)
	N2	H2a	O10	0,8600	2,2800	3,050(3)	149,00
	O12	H12a	O6 ⁱ	0,8500	1,9800	2,764(3)	154,00
	O12	H12b	O1 ⁱⁱ	0,8500	2,0700	2,906(4)	168,00
	N1 ^{iv}	H1a ^{iv}	O10	0,9100	2,0800	2,874(3)	145,00
	C24	H24a	O7 ⁱⁱⁱ	0,9600	2,3200	3,273(3)	171,00
	O11	H11b	O6 ^v	0,8500	2,5000	2,901(3)	110,00
	O11	H11b	O8 ^v	0,8500	1,9900	2,833(3)	169,00

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: ⁱ = x, y+1, z; ⁱⁱ = -x+1, y+½, -z+½; ⁱⁱⁱ = x, y-1, z; ^{iv} = x-1/2, -y+1/2, -z+1; ^v = x+1, y, z.

6.2.4 Estrutura da DOX•NIT

A Tabela 10 traz o sumário das informações sobre coleta dos dados e refinamento da estrutura do nitrato de DOX hidratado (DOX•NIT). A Figura 25 mostra a representação ORTEP dos dois cátions de DOX, independente por simetria, presentes na unidade assimétrica da cela unitária triclinica P1 da DOX•NIT. A Figura 25 mostra também as ligações de hidrogênio intramoleculares e algumas das ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo a água de cristalização e os dois contra-íons nitrato dos cátions de DOX⁺. Ou seja, diferentemente da DOX•H₂O e da DOX•HAc, nos quais as moléculas de DOX são neutras, e, portanto, classificados como pseudo-polimorfos do tipo hidrato e, ou, solvato, a DOX•NIT, similar ao DOX•HIC, é classificado como um sal hidratado da DOX. A DOX•NIT apresenta ainda o mesmo padrão tautomérico/conformacional mostrado pelo DOX•HIC. Ou seja, possui dois tautômeros zwitterionicos da DOX em um mesmo cristal.

Tabela 10 - Dados Cristalinos e Refinamento da Estrutura do DOX•NIT

Fórmula Empírica	C ₄₄ H ₅₂ N ₆ O ₂₃
Massa Molecular / g·mol ⁻¹	1032,92
Temperatura	293(2) K
Comprimento de Onda Å	1,54180
Sistema Cristalino	Triclínico
Grupo Espacial	P ₁
Cela Unitária	
a / Å	8,0679(2)
b / Å	8,9156(3)
c / Å	16,6791(5)
α / grau	77,872(2)
β / grau	87,581(2)
γ / grau	74,133(3)
Volume / Å ³	1128,11(6)
Z	1
Densidade (calculada) / Mg·m ⁻³	1,520
Coeficiente de Absorção / mm ⁻¹	1,065
F(000)	542
Tamanho do Cristal / mm	0,70 x 0,09 x 0,08
θ máximo / grau	66,37
Intervalos de Índices	-8<=h<=9, -10<=k<=10, -19<=l<=19
Reflexões Coletadas	21480
Reflexões Independentes	3922 [R(int) = 0,0296]
Completeza até θ _{máximo} / %	98,6
Dados / restrições / parâmetros	3922 / 3 / 662
Qualidade do Refinamento em F2	1,017
Índice R Final [I>2σ(I)]	R1 = 0,0313, wR2 = 0,0813
Índice R (dado completo)	R1 = 0,0339, wR2 = 0,0838
Parâmetro de Flack	-1,9(6)
Picos e vales mais intensos / Å ⁻³	0,449 e -0,279 e.

A Figura 25 a corresponde a T1 e a Figura 25 b a T2. O conformerismo também se mostra na DOX•NIT uma vez que se observa uma rotação de 180° em torno da ligação C17-C20 o que faz trocar as posições da carbonila e da amina do grupo carboxiamida quando se compara T1 e T2. Modelos de refinamentos e mapas de diferença de Fourier confirmaram a presença dos dois confôrmeros da DOX. Destaca-se ainda que um dos nitratos (FIGURA 25 a) apresenta uma desordem

estática cujo refinamento aponta para uma proporção 60 e 40% para os nitratos contendo N4 e N4', respectivamente. As Figuras 25 a 27 mostram as principais interações intermoleculares envolvendo ligações de hidrogênio clássicas e não-clássicas no DOX·NIT. A Figura 25 mostra que a água participa do empacotamento cristalino como um receptor de ligação de hidrogênio intermolecular N1-H1a...O12. Essa água ajuda na estabilização do empacotamento cristalino por meio de seus dois átomos de hidrogênio: O12ⁱⁱ-H12bⁱⁱ...O11 (FIGURA 26) e bifurcadamente por meio de O12^{iv}-H12a^{iv}...O15 e O12^{iv}-H12a^{iv}..O15' (FIGURA 27). A inspeção das Figuras 25, 26 e 27 mostra que a água se intercala entre a DOX·NIT T2 e os dois nitratos independentes por simetria presentes na DOX·NIT. A Figura 26 mostra as principais interações intermoleculares do nitrato não-desordenado da DOX·NIT. Esse ânion se intercala entre uma DOX·NIT T1, por meio da interação N1'ⁱⁱⁱ-H1a'ⁱⁱⁱ...O11, duas DOX·NIT T2, por meio das interações O5- H5...O10, O4ⁱ-H4aⁱ...O10, C15ⁱ- H15ⁱ...O10 e C11ⁱ- H11ⁱ...O9, e uma molécula de água, por meio da interação O12ⁱⁱⁱ- H12bⁱ...O11. Observa-se que O10 e O11 são receptores de ligação de hidrogênio trifurcado e bifurcado, respectivamente.

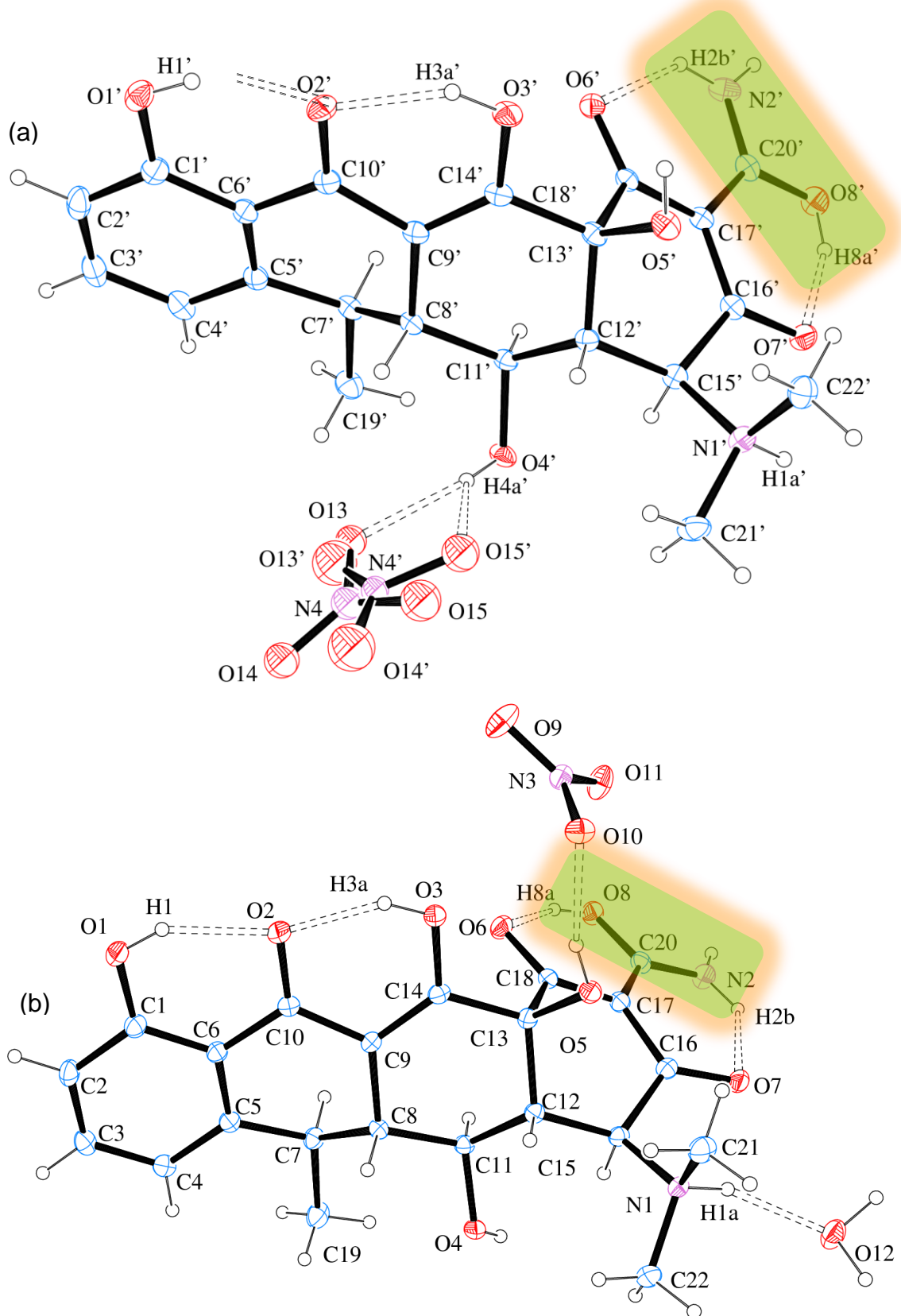


Figura 25 - Representação ORTEP da DOX·NIT T1 (a) e DOX·NIT T2 (b) presentes na unidade assimétrica da DOX·NIT. Ligações de hidrogênio intramoleculares são representadas como dupla linha tracejada. A orientação do grupo amida envolvido no conformerismo é destaca em verde. Os átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário e os elipsoides dos demais átomos estão a 50% de probabilidade.

A Figura 27 ilustra a participação do nitrato desordenado na estabilização do empacotamento cristalino. O tamanho do interstício estrutural gerado pelo empacotamento das DOX e as possibilidades de ligação de hidrogênio oferecidas pela hidroxila O4-H4a, pelo grupo amida e pela água podem ser considerados causas da desordem manifestada no DOX·NIT. Em outras palavras, infere-se que uma explicação plausível para a presença da desordem estática se deve ao fato de o nitrato não conseguir interagir fortemente, na mesma posição cristalográfica, com os grupos hidroxila e amida das DOX que geram o interstício cristalino, devido a distância desses dois grupos doadores de ligação de hidrogênio. Assim, esses dois grupos doadores de ligação de hidrogênio competem pelo nitrato durante a cristalização, o qual tende a ocupar duas posições cristalográficas distintas. A molécula de água pode também contribuir, ainda que minoritariamente, para a desordem estática desse nitrato. Os parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio mostram que o nitrato que contém o N4 apresenta ligações de hidrogênio ligeiramente mais curtas do que aquelas formadas com o nitrato que contém o N4'. Isso pode justificar a maior proporção do nitrato que contém o N4 em detrimento àquele que contém N4'. As geometrias de todas as ligações de hidrogênio mencionadas acima são mostradas na Tabela 11. As Figuras 28, 29, 30 e 31 trazem a ilustração do empacotamento cristalino com vista perpendicular aos planos [11-1], [01-1], [10-1] e [110] da cela unitária, respectivamente.

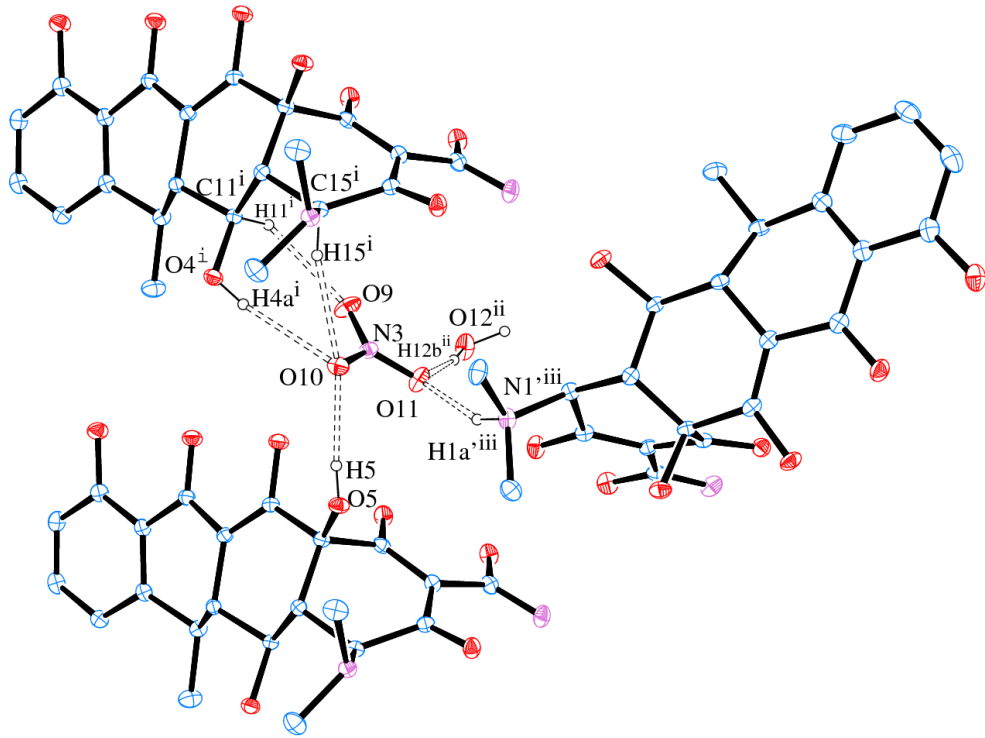


Figura 26- Padrão intermolecular entre as unidades de DOX, água e nitrato ordenado. Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: ⁱ = x, y+1, z; ⁱⁱ = x-1, y+1, z e ⁱⁱⁱ = x, y+1, z-1.

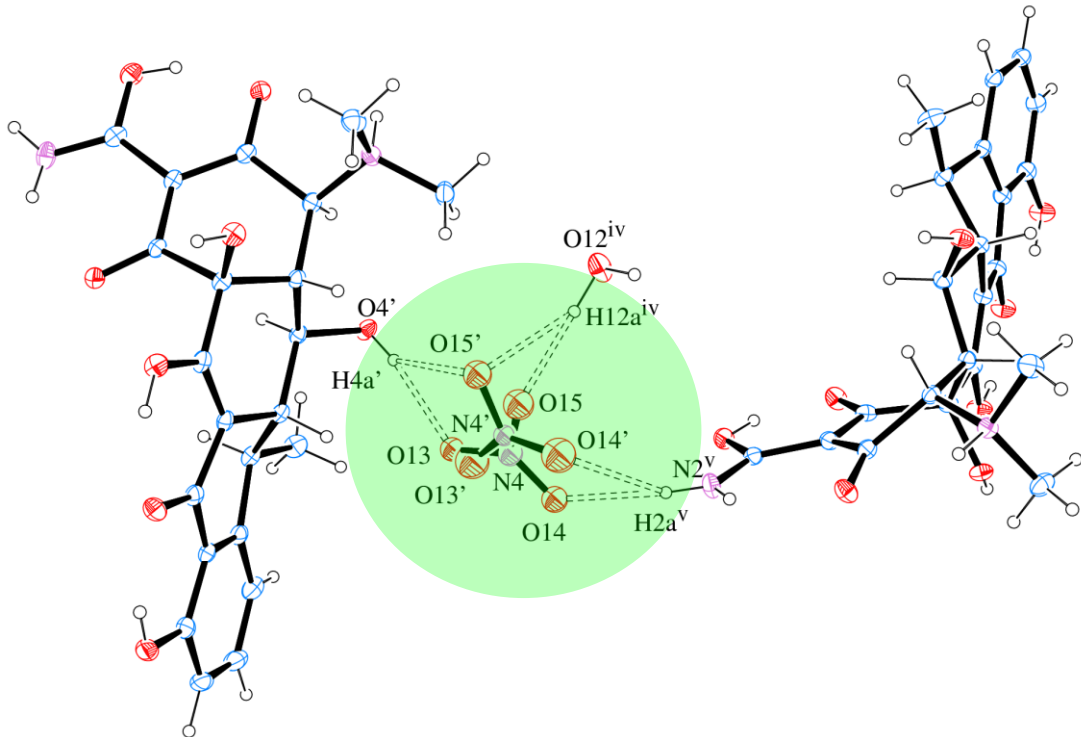


Figura 27- Padrão intermolecular entre as unidades de DOX, água e nitrato desordenado. Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: ^{iv} = x, y, z+1 e ^v = x+1, y, z+1.

Tabela 11 - Distâncias e ângulos das ligações inter- e intramoleculares presentes na estrutura cristalina da DOX•NIT. Os átomos doadores e receptores são denominados por “D” e “A” respectivamente

	D	H	A	D–H (Å)	H•••A (Å)	D•••A (Å)	D–H•••A (°)
INTRA	O1	H1	O2	0,8200	1,8420	2,563(3)	146,00
	O1'	H1'	O2'	0,8200	1,8060	2,536(3)	147,00
	O3	H3a	O2	0,8200	1,7250	2,453(2)	147,00
	O3'	H3a'	O2'	0,8200	1,8200	2,533(2)	145,00
	O5	H5	O3	0,8200	2,2580	2,688(3)	113,00
	O5'	H5'	O3'	0,8200	2,6320	2,688(3)	109,00
	O8	H8a	O6	0,8200	1,6870	2,688(3)	152,00
	O8'	H8a'	O7'	0,8200	1,7000	2,452(3)	152,00
	N2	H2b	O7	0,8600	2,1820	2,806(3)	129,00
	N2'	H2b'	O6'	0,8600	2,0920	2,724(3)	130,00
	D	H	A	D–H (Å)	H•••A (Å)	D•••A (Å)	D–H•••A (°)
INTER	O4'	H4a'	O13	0,8200	1,9990	2,795(4)	164,00
	O4'	H4a'	O15'	0,8200	2,2750	2,953(4)	140,00
	O4 ⁱ	H4a ⁱ	O10	0,8200	2,3470	3,128(4)	159,00
	O5	H5	O10	0,8200	2,0350	2,818(3)	160,00
	O12 ⁱⁱ	H12b ⁱⁱ	O11	0,9900	1,8770	2,861(3)	171,00
	O12 ^{iv}	H12a ^{iv}	O15	0,9900	1,9760	2,892(4)	171,00
	O12 ^{iv}	H12a ^{iv}	O15'	0,9900	2,0950	2,950(4)	153,00
	N1	H1a	O12	0,9100	1,8880	2,735(3)	154,00
	N1 ⁱⁱⁱ	H1a ⁱⁱⁱ	O11	0,8600	1,9680	2,816(3)	154,00
	N2 ^v	H2a ^v	O14	0,8600	2,0760	2,932(3)	174,00
	N2 ^v	H2a ^v	O14'	0,8600	2,2210	2,896(3)	135,00
	C11 ⁱ	H11 ⁱ	O9	0,9800	2,3750	3,099(4)	130,00
	C15 ⁱ	H15 ⁱ	O10	0,9800	2,3260	3,280(4)	164,00

Transformações de simetria usadas para gerar átomos equivalentes: ⁱ = x, y+1, z; ⁱⁱ = x-1, y+1, z; ⁱⁱⁱ = x, y+1, z-1; ^{iv} = x, y, z+1 e ^v = x+1, y, z+1.

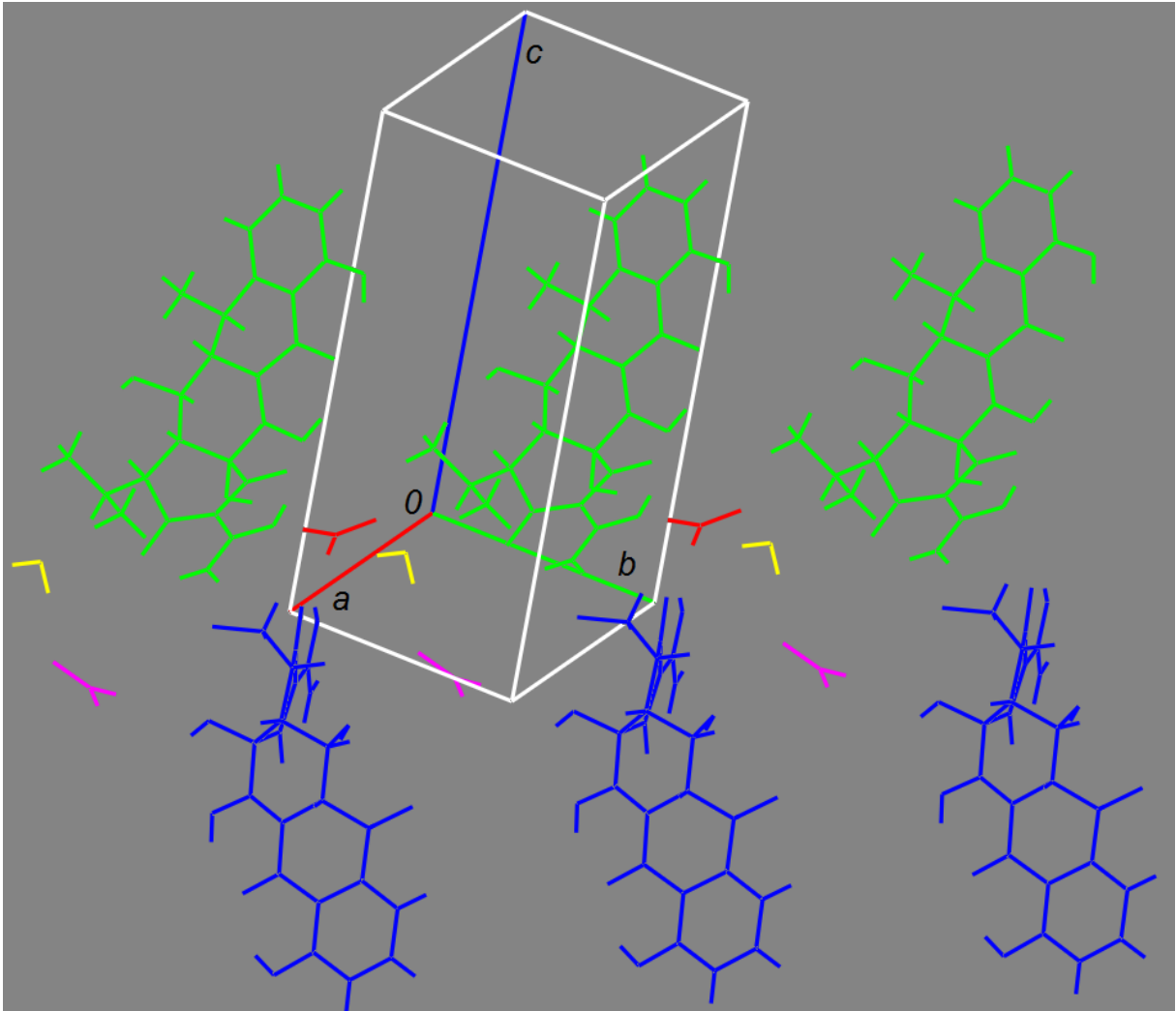


Figura 28- Empacotamento cristalino da DOX•NIT vista perpendicular ao longo do plano $[1\ 1\ -1]$. DOX's em azul (T1) e verde (T2), água em amarelo e nitratos em vermelho e rosa. A desordem apresentada por um dos nitratos (em rosa) foi omitida.

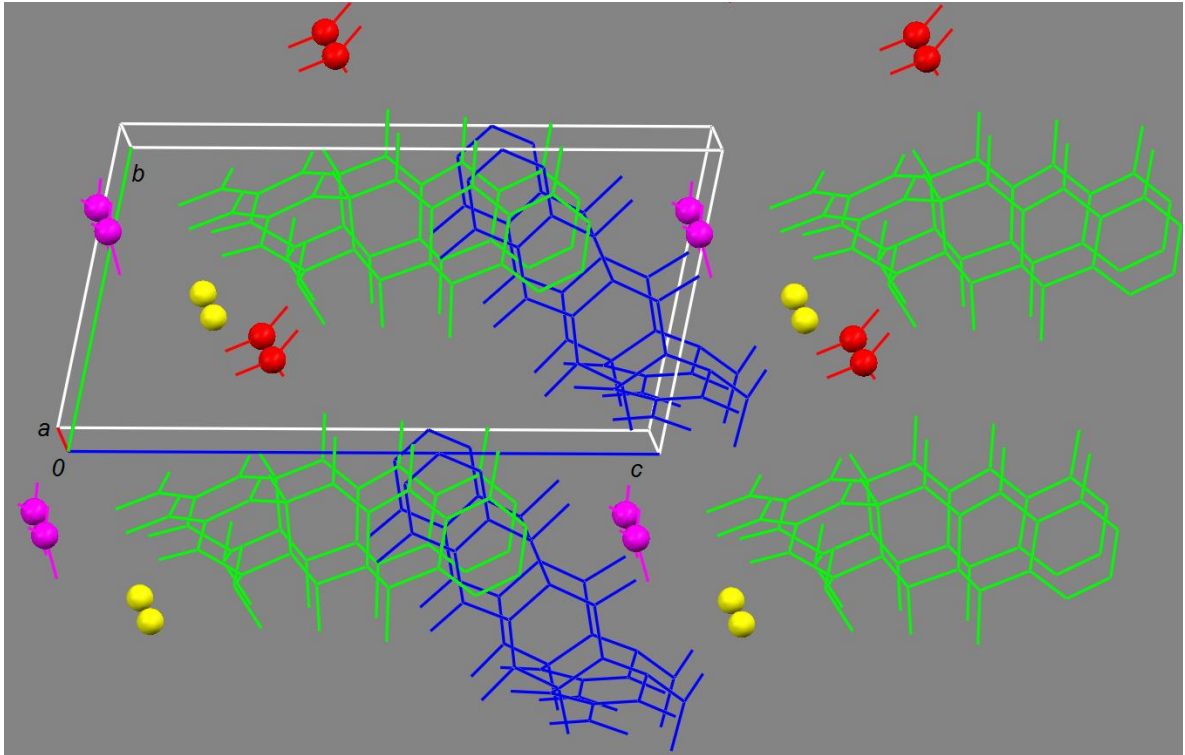


Figura 29- Empacotamento cristalino da DOX•NIT vista perpendicular ao plano $[01-1]$. DOX's em azul (T1) e verde (T2), água em amarelo e nitratos em vermelho e rosa. A desordem apresentada por um dos nitratos (em rosa) foi omitida.

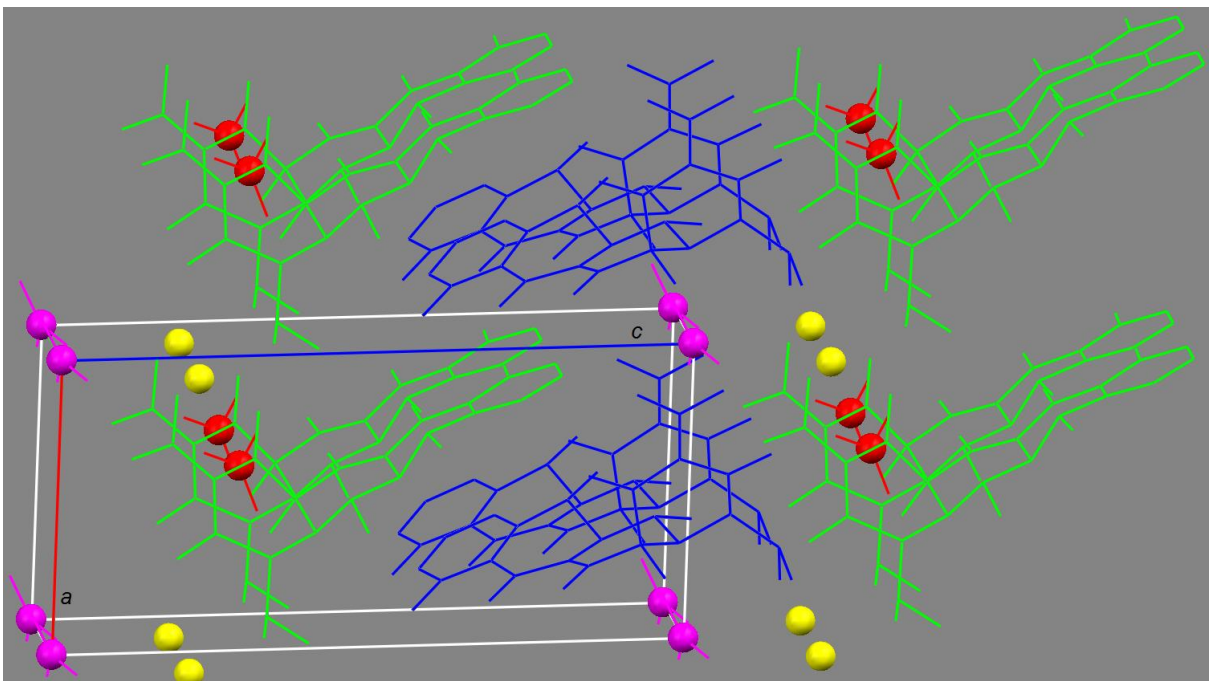


Figura 30- Empacotamento cristalino da DOX•NIT vista perpendicular ao plano $[10-1]$. DOX's em azul (T1) e verde (T2), água em amarelo e nitratos em vermelho e rosa. A desordem apresentada por um dos nitratos (em rosa) foi omitida.

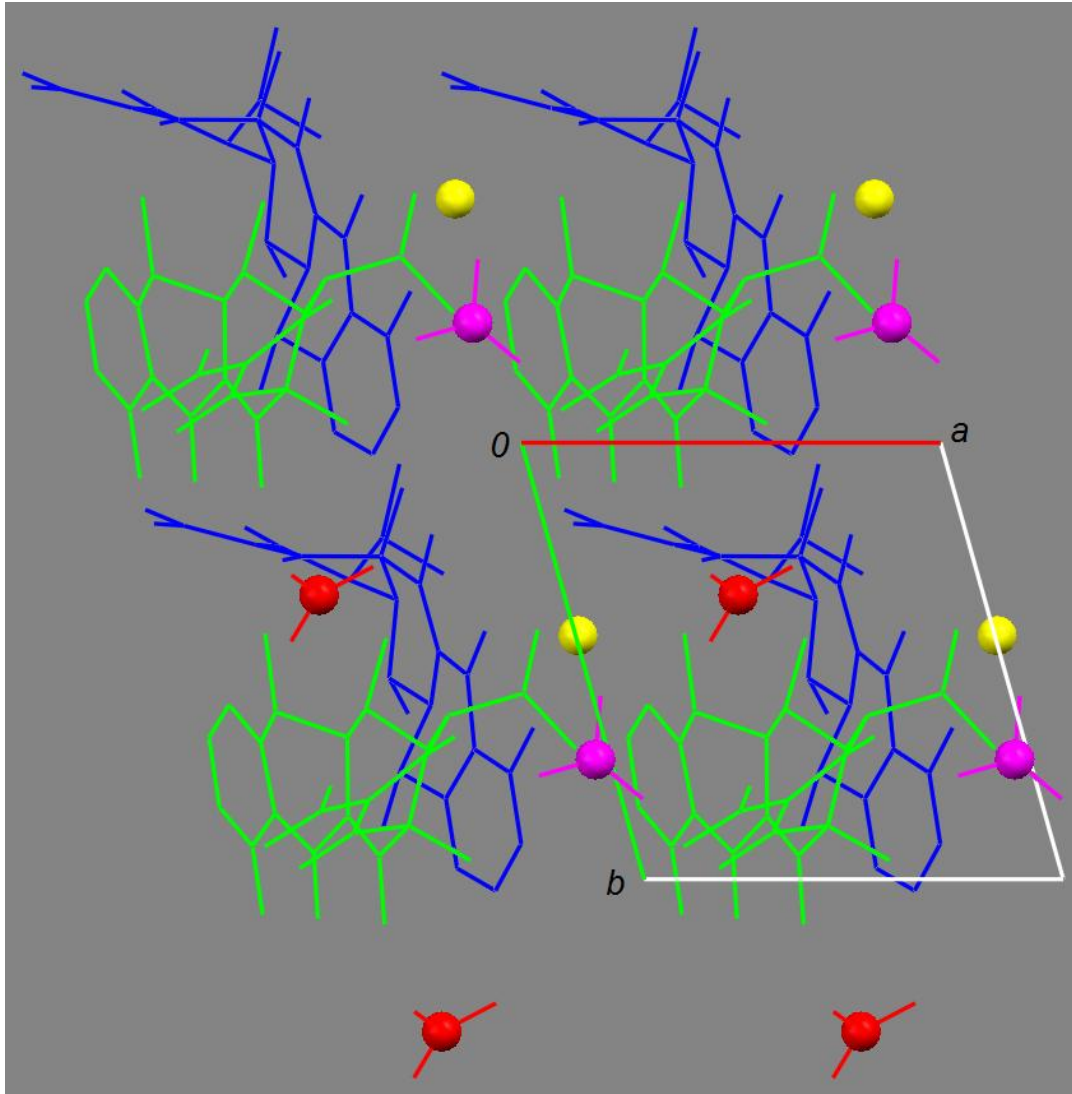


Figura 31- Empacotamento cristalino da DOX·NIT vista perpendicular ao plano [110]. DOX's em azul (T1) e verde (T2), água em amarelo e nitratos em vermelho e rosa. A desordem apresentada por um dos nitratos (em rosa) foi omitida.

6.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR POLICRISTAIS: PXRD

Tendo em vista que a difratometria de raios X por policristais ou por pó (PXRD) pode ser utilizada na identificação e quantificação de formas polimórficas de medicamentos^(70, 76, 77) os padrões de difração de pó do DOX·HYC, da DOX·H₂O, da DOX·HAc e do DOX·NIT foram simulados a partir de suas estruturas determinadas por difratometria de raios X por monocristal e comparadas com seus respectivos difratogramas de pó experimentais. Observa-se nas Figuras 32 a 35 que a linhas calculadas, geradas a partir das estruturas determinadas, se sobrepõem com boa concordância com os picos de difração experimentais das quatro formas da DOX

estudadas. Observa-se ainda, que todos os picos experimentais estão sobrepostos pelas linhas dos picos de Bragg da estrutura determinada. Isso mostra que, para todas as amostras policristalinas estudadas por PXR, o material é monofásico. É importante enfatizar, que se a amostra tiver uma cristalinidade adequada, é perfeitamente possível identificar a presença do DOX·HYC, da DOX·H₂O, da DOX·HAc e do DOX·NIT, ou a mistura delas, tanto na matéria-prima, durante a manufatura do produto, como em seus respectivos medicamentos. Na prática, por exemplo, a técnica de PXR poderia ser utilizada para identificar se em um insumo ou medicamento a forma presente é a DOX·H₂O ou a DOX·HIC tendo em vista que esses são os nomes genéricos da MONODOX® e do DORYX®, respectivamente. Embora não explorado nesse trabalho, é possível também quantificar as diferentes formas da DOX em uma amostra desconhecida por meio de PXR utilizando-se o Método de Rietveld⁽⁷⁶⁾. Isso só é possível, pois agora as estruturas da DOX·H₂O e do DOX·HIC são inequivocamente conhecidas. Em resumo, por ser um método analítico simples, rápido e relativamente de baixo custo, a PXR pode ser utilizada para fins de controle de qualidade e triagem de matéria-prima para DOX·H₂O e DOX·HYC, evitando desempenho anormal dos medicamentos. A técnica se presta ainda para qualificar e quantificar as duas novas formas pseudo-polimórficas obtidas nesse trabalho, a DOX·HAc e o DOX·NIT, caso as mesmas venham a ser utilizadas como medicamentos fonte do API DOX.

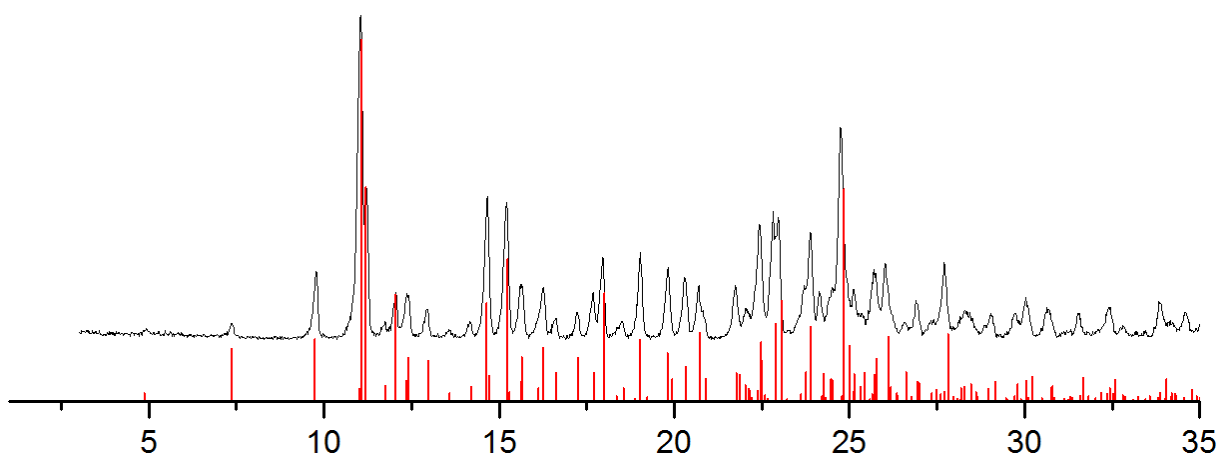


Figura 32 - Difratoograma de raios X por pó experimental do DOX·HIC (linha contínua em preto) sobreposto às reflexões de Bragg simuladas a partir da estrutura determinada por MXRD (linhas verticais em vermelho).

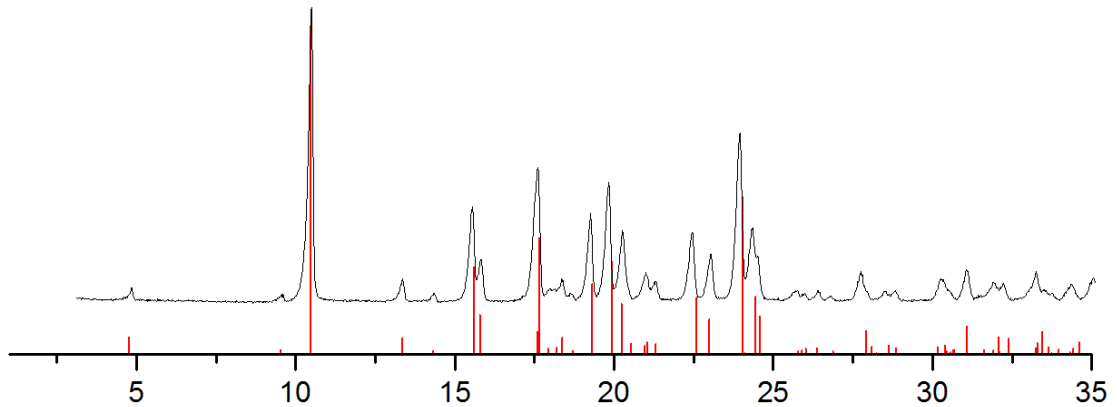


Figura 33 - Difratoograma de raios X por pó experimental do DOX·H₂O (linha contínua em preto) sobreposto às reflexões de Bragg simuladas a partir da estrutura determinada por MXRD (linhas verticais em vermelho).

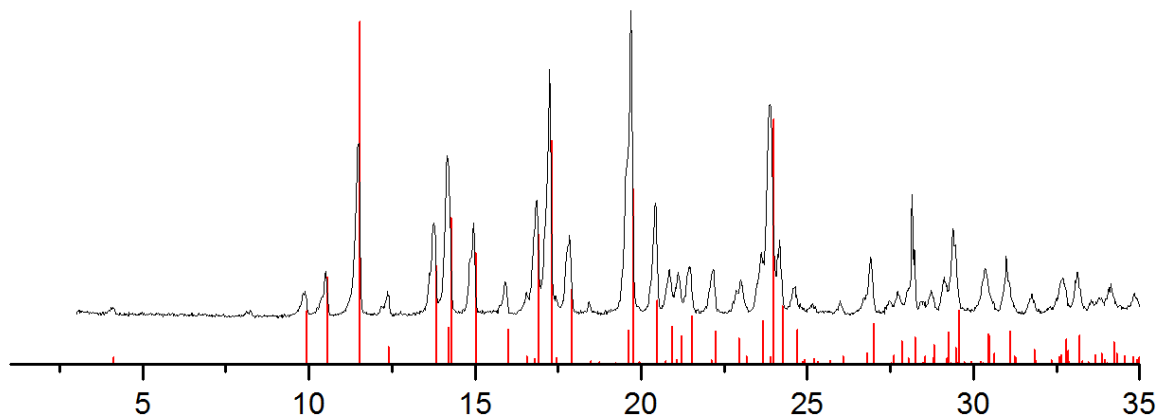


Figura 34- Difratoograma de raios X por pó experimental do DOX·HAc (linha contínua em preto) sobreposto às reflexões de Bragg simuladas a partir da estrutura determinada por MXRD (linhas verticais em vermelho).

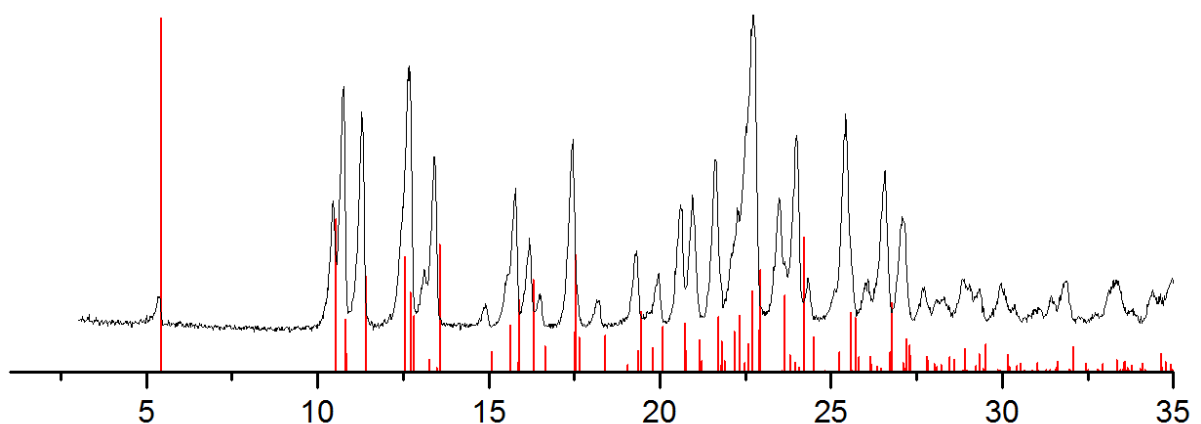


Figura 35 - Difratoograma de raios X por pó experimental do DOX·NIT (linha contínua em preto) sobreposto às reflexões de Bragg simuladas a partir da estrutura determinada por MXRD (linhas verticais em vermelho).

6.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A Figura 36 mostra os espectros vibracionais na região do infravermelho do DOX·HYC, da DOX·H₂O, da DOX·HAc e do DOX·NIT. É importante destacar que o espectro vibracional poderá ter a contribuição da molécula/cátion de DOX, da água, dos solventes (ácido acético e etanol) e contra-íons (cloreto e nitrato).

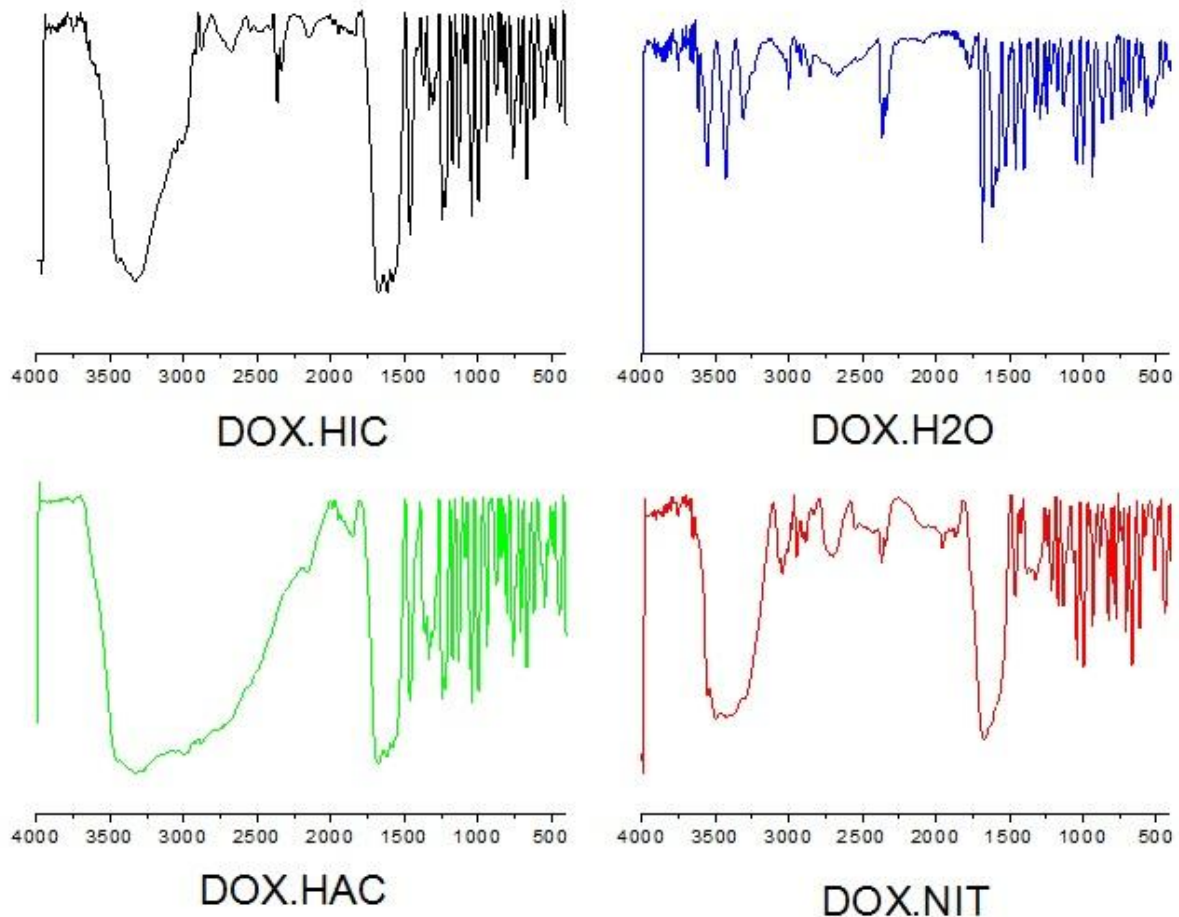


Figura 36 - Espectro vibracional na região do infravermelho do DOX·HYC, da DOX·H₂O, da DOX·HAc e do DOX·NIT.

Na Figura 36 é possível observar bandas características dos diferentes pseudo-polimorfos, como a banda larga entre 3280 a 3450 cm^{-1} , correspondente ao alongamento da ligação OH do etanol e deformação angular de moléculas de água, que cristalizam-se com a DOX no DOX·HIC. Esse alargamento ocorre devido a ligação C-OH mais longa do etanol e a ocorrência de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares entre essas moléculas ⁽⁷⁸⁾. No espectro da DOX·HAc observa-se uma banda muito larga (3400-2400 cm^{-1}) devido à ligações de hidrogênio

envolvendo ácidos carboxílicos (alongamento ν OH). Neste também há deformação angular de moléculas de água. Essa banda impede a leitura de outros eventos vibracionais que se encontram nessa região ⁽⁷⁸⁾. No DOX•NIT, as bandas correspondente ao estiramento das ligações N-O são observadas em 1762 cm^{-1} e 1384 cm^{-1} . Na DOX•H₂O, pode-se observar as bandas relacionadas a hidratos em moléculas orgânicas ⁽⁷⁸⁾ nas posições 3614 cm^{-1} , 3550 cm^{-1} e 1622 cm^{-1} .

É possível verificar que nas diferentes formas existem pequenos deslocamentos de bandas, que seriam melhor evidenciados pela espectroscopia Raman. A Tabela 12 apresenta uma compilação dos principais eventos vibracionais e a atribuição dos mesmos aos respectivos grupos funcionais.

Tabela 12 - Posição das bandas (cm^{-1}) nos espectros de infravermelho ⁽⁷⁸⁾ da DOX•HYC, da DOX•H₂O, da DOX•HAc e do DOX•NIT

Grupo Funcional	DOX•HIC	DOX•H ₂ O	DOX•HAc	DOX•NIT
ν ANEL (C-H)	709	709	709	707
ν ANEL (C=C)	802	804	800	800
ν ANEL (C=C)	875	867	873	825
δ ETILA (C-H)	761	762	763	775
ν OH	935	935	937	933
ν OH	995	999	995	995
ν (O-H)	3332	3307	3317	3302
C-OH	1041	1041	1041	1041
ν (C-OH)	1130	1130	1130	1134
ν C-N	1172	1170	1172	1168; 1213
ν C-N	1242	1244	1242	1244
ν C=O	1335	1325	1330	1321
ν AMIDA (C=O)	1570-1680	1683	1560-1700	1666
δ AMINA N-H	1460	1458	1462	1462;
				3300-3550
ν (N-O)				1382; 1355;
				1762
δ H ₂ O	1620	1622; 3550; 3614	1616	1624; 3552; 3612
ν Ác. Carboxílico			2670-3470	

Podemos observar pelos espectros vibracionais dos diferentes pseudo-polimorfos que ocorrem poucos deslocamentos de bandas e existem picos que ocorrem especificamente devido à presença de diferentes solventes que cristalizaram juntamente com a molécula de DOX. Na Figura 37 podem-se observar alguns deslocamentos causados pelas diferentes interações químicas presentes nas diferentes amostras contendo a DOX.

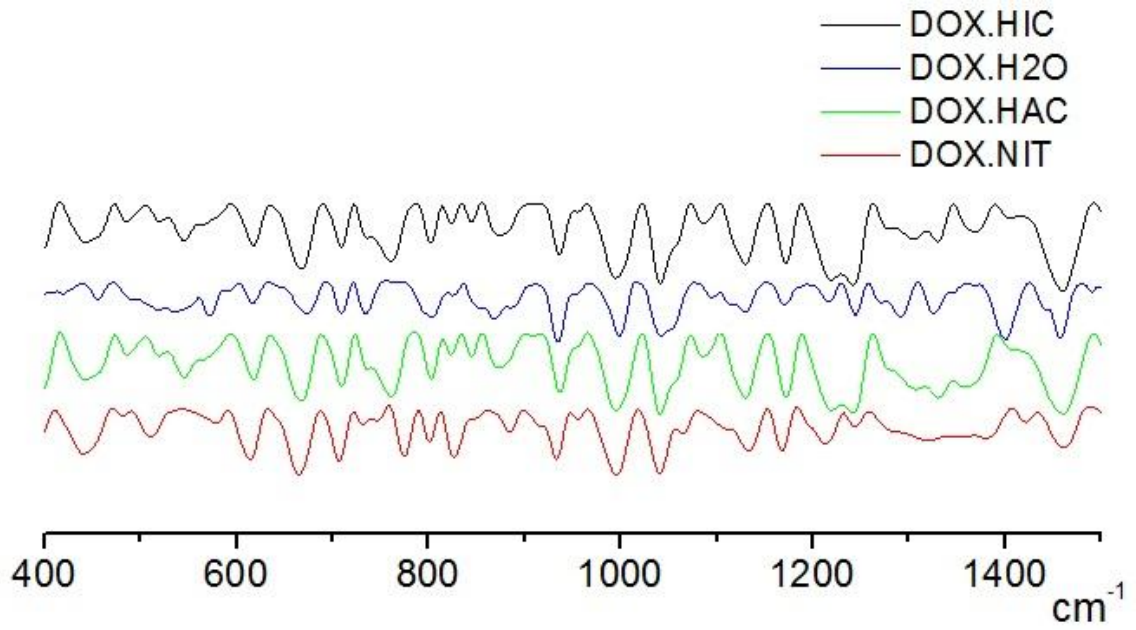


Figura 37 - Espectro vibracional comparado na região de 600 a 1500 cm^{-1} das diferentes formas pseudo-polimórficas da DOX.

CAPÍTULO II – SOLUBILIDADE E PERFIL DE DISSOLUÇÃO

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 SOLUBILIDADE

A solubilidade foi avaliada por dois métodos diferentes, o método da farmacopeia brasileira⁽⁷⁹⁾ e o método descrito por Manadas e colaboradores⁽⁴⁶⁾ e Prista e colaboradores⁽⁸⁰⁾ e, conhecido como solubilidade intrínseca.

7.1.1 Solubilidade segundo a Farmacopéia Brasileira

O método descrito pela farmacopeia brasileira⁽⁷⁹⁾ foi verificado pesando-se 10mg de amostra e transferindo-se para tubos de ensaio. A agitação para a solubilização da amostra é realizada de maneira manual. O ensaio foi realizado com temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Utilizou-se a Tabela 13 para classificar os diferentes pseudo-polimorfos quanto sua solubilidade . Os solventes utilizados foram água, etanol, ácido clorídrico $0,01\text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1\text{ mol.L}^{-1}$.

Tabela 13 - Classificação da solubilidade

Classificação	Quantidade de Solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira IV⁽⁷⁹⁾

7.1.2 Solubilidade Intrínseca

Para realização dos testes de solubilidade intrínseca e quantificação do API (DOX) utilizou-se o Espectrofotômetro UV/VIS – Shimadzu 1601 PC, Tóquio, Japão, selecionando-se o comprimento de onda especificado pela farmacopeia dos Estados

Unidos (USP)⁽⁸¹⁾, 276 nm, conforme método validado. Foram realizadas determinações de parâmetros como limite de quantificação, linearidade, especificidade e exatidão. A validação desses procedimentos baseou-se em critérios estabelecidos pela USP⁽⁸¹⁾. A solubilidade intrínseca foi realizada apenas com o solvente água e em temperatura próxima aos 25 ± 2 °C. A agitação e aquecimento do sistema foi realizada com auxílio de agitador magnético com aquecimento. Usou-se 800 RPM para solubilizar as amostras. Para determinação da solubilidade foram preparadas soluções de 10mL saturadas e com pequeno excesso de fármaco. Estas soluções foram filtradas e do filtrado retirou-se alíquotas de 1mL. Essas alíquotas foram diluídas em diferentes proporções e analisadas por espectroscopia UV/VIS em triplicata no comprimento de onda especificado pela USP⁽⁸¹⁾. Foi delineado um teste estatístico para observar diferenças entre as solubilidades dos pseudopolimorfos. O teste de análise de variância escolhido foi o teste de Scott-Knott a 5% de significância⁽⁷⁵⁾.

7.2 PERFIL DE DISSOLUÇÃO

Foram elaboradas seis cápsulas contendo o equivalente a 100mg de doxiciclina para cada pseudo-polimorfo. Foram utilizadas cápsulas transparentes de gelatina obtidas na Farmácia Escola da Unifal-MG. Para garantir a homogeneidade do tamanho das partículas foram utilizados tamis “mesh” 16 (malha). As cápsulas foram preenchidas em encapsuladora manual sem utilização de excipientes.

Para realização da quantificação durante os testes de perfil de dissolução do API (DOX) utilizou-se o Espectrofotômetro UV/VIS – Shimadzu 1601 PC, Tóquio, Japão, selecionando-se o comprimento de onda especificado pela farmacopeia dos Estados Unidos (USP)⁽⁸¹⁾, 276 nm, conforme método validado. Foram realizadas determinações de parâmetros como limite de quantificação, linearidade, especificidade e exatidão. A validação desses procedimentos baseou-se em critérios estabelecidos pela USP⁽⁸¹⁾ e resolução específica, RE nº 899⁽⁸²⁾. A especificidade do método foi detectada através da análise do espectro de absorção da amostra e de placebos (cápsulas vazias) e com outros solventes (ácido clorídrico e metanol) observando-se a existência, ou não, de interferência com o espectro de absorção da doxiciclina no comprimento de onda correspondente. Este procedimento também foi feito misturando-se os diferentes sais de doxiciclina obtidos e o único tipo de

interferência encontrada foi o aumento da absorvância na região correspondente. Este procedimento mostrou que o ponto para a realização das leituras não sofre interferência dos fatores testados neste trabalho. O limite de quantificação foi determinado através de repetidas análises de soluções contendo doxiciclina em diferentes concentrações. Também foi observado se o aparelho apresentava algum tipo de ruído que pudesse comprometer as análises. A linearidade foi constituída através da construção de curvas de calibração com soluções padrões de doxiciclina e dos pseudo-polimorfos encontrados. Essas curvas foram confeccionadas em triplicata e utilizando-se o solvente apropriado para cada amostra⁽⁸¹⁾. Seguindo a recomendação da USP utilizou-se a água como solvente para o DOX•HIC e ácido clorídrico 0,01 mol.L⁻¹ para a DOX.H₂O. Para as outras formas utilizou-se água como solvente uma vez que os mesmos apresentaram boa solubilidade nesse solvente.

Para os testes de dissolução foram utilizados o dissolutor da marca Eletrolab® modelo TDT 08L, bomba Eletrolab® temperature controller, um aparato de pá com sinker. Amostras contendo os pseudo-polimorfos foram submetidas ao teste de dissolução segundo métodos descritos na USP⁽⁸¹⁾ e conforme descrito na Tabela 14.

Tabela 14 – Condições usadas para o teste de dissolução para Doxiciclina

	DOX•HIC/DOX•HAc/DOX•NIT	DOX•H ₂ O
Sistema de agitação	Aparato 2 (pá)	Aparato 2 (pá)
Rotações por minuto (RPM)	75 RPM	75 RPM
Meio de dissolução / Volume	H ₂ O / 900mL	HCl 0,01 mol•L ⁻¹ / 900mL
Meio de detecção	UV 276 nm	UV 276 nm
Tempo de Amostragem 1	60 minutos	60 minutos
Pontos de Coletas	5'; 10'; 15'; 30'; 60'	5'; 10'; 15'; 30'; 60'
Tempo de Amostragem 2	30 minutos	30 minutos
Pontos de Coletas	3'; 6'; 9'; 15'; 20'; 30'	3'; 6'; 9'; 15'; 20'; 30'

Os perfis de dissolução das amostras foram construídos observando-se a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo em minutos. Calculou-se a eficiência de dissolução (ED) a partir das curvas de porcentagem de fármaco dissolvido *versus* tempo. A comparação entre as eficiências foi calculado utilizando-se a razão entre a área abaixo da curva e a área total do gráfico⁽⁵²⁾ e comparada pelo teste de Scott-Knott⁽⁷⁵⁾. A investigação por modelo independente também foi

comparado pelo mesmo teste estatístico. A tolerância estabelecida para os testes de dissolução foram de mais de 80% (Q) de doxiciclina em 30 minutos⁽⁸¹⁾.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 SOLUBILIDADE E PERFIL DE DISSOLUÇÃO

A Figura 38 mostra a varredura entre 200 a 450 nm das diferentes formas pseudo-polimórficas da DOX. A doxiciclina é um hidronaftaceno⁽⁸³⁾ e possui um sistema de anéis cromóforos⁽⁸⁴⁾, assim como as outras tetraciclinas. Foram realizadas varreduras para se observar o comportamento dos espectros de absorção das diferentes formas pseudo-polimórficas. Visou também verificar a possível presença de interferências causadas por solventes⁽⁸⁵⁾ e, ou, possíveis formações de complexos em solução, que poderiam eventualmente alterar o comportamento das análises, por exemplo, por meio de deslocamento do comprimento de onda da região de maior absorção da DOX⁽⁸⁶⁾.

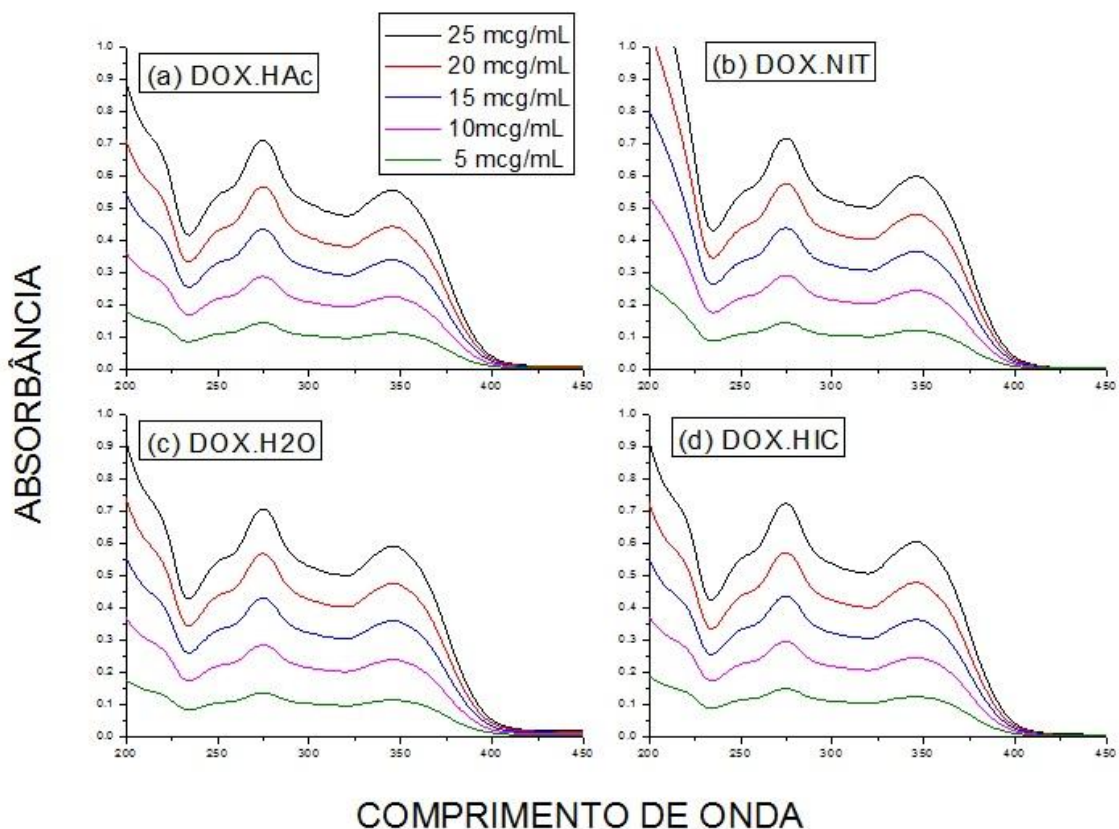


Figura 38 – Análise de varredura (UV-VIS) entre 200 a 450nm das diferentes formas pseudo-polimórficas da DOX: a) DOX•HAc, b) DOX•NIT, c) DOX.H₂O e d) DOX•HIC.

Verificou-se (Figura 38) um padrão similar entre os diferentes pseudo-polimorfos nas análises de varredura e a observação do comprimento de onda de maior absorção em 276nm, conforme sugerido em trabalhos anteriores⁽⁸⁷⁾, e em concordância com o método validado pela farmacopeia dos Estados Unidos⁽⁷⁶⁾. Assim, como o método proposto e validado na literatura não apresentou interferência do tipo de solvente ou íons presentes nos diferentes pseudo-polimorfos da DOX, o comprimento de onda utilizado nas leituras foi o de 276nm⁽⁷⁶⁾ e a curva de calibração no intervalo de concentração de 1,0 a 30µg/mL para o qual o método validado mostra ter linearidade⁽⁸⁷⁾.

As curvas de calibração a 276nm com diferentes concentrações conhecidas de DOX são apresentadas nas Figuras 39 a 42. Elas foram utilizadas para se determinar a concentração das diferentes amostras nos testes de dissolução e solubilidade intrínseca.

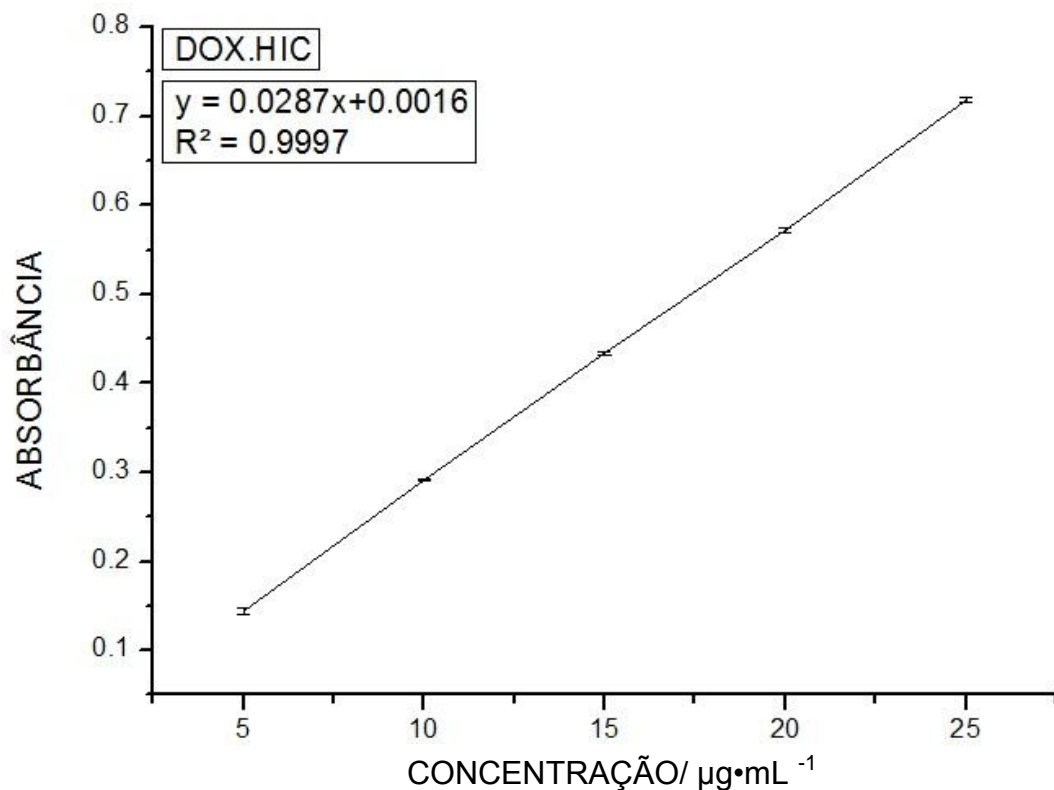


Figura 39 – Curva de calibração da DOX.HIC.

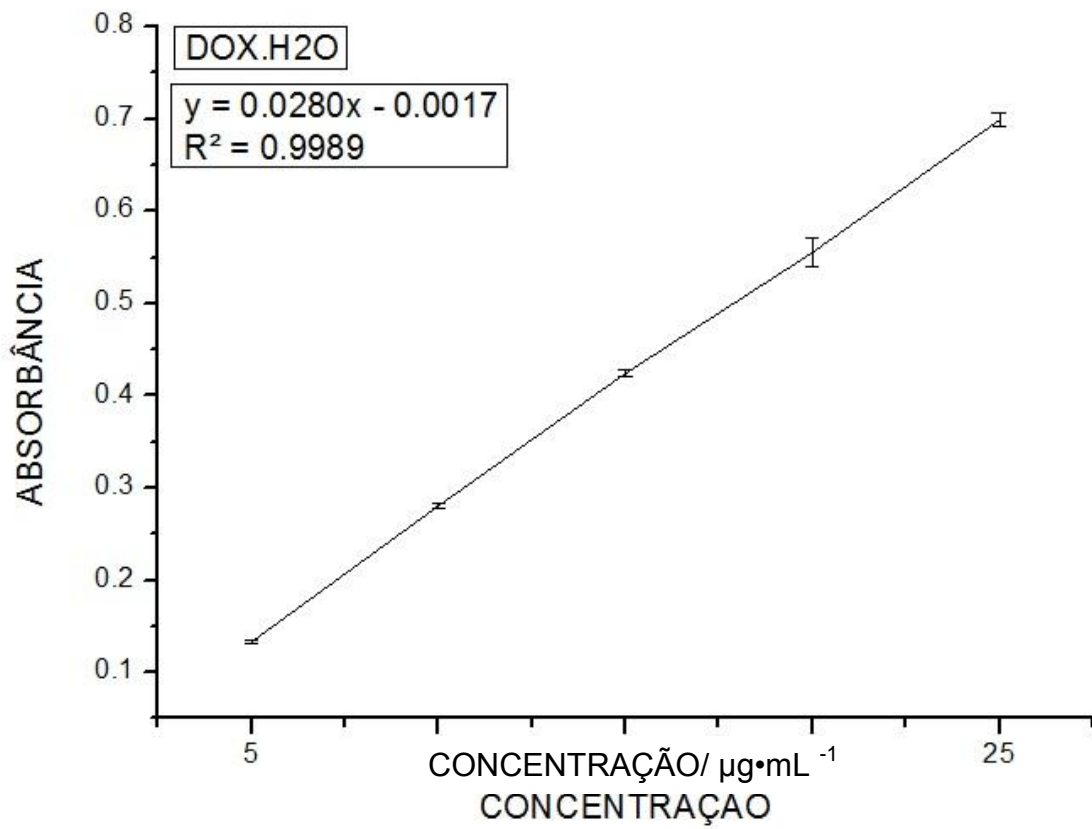
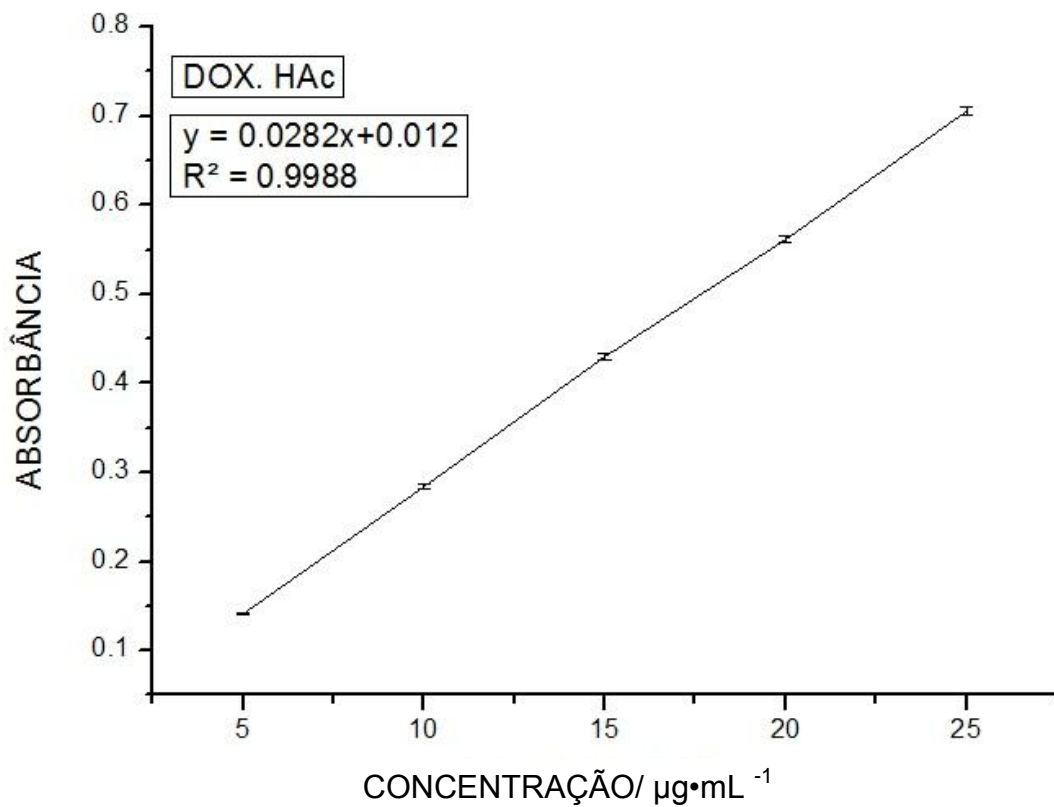
Figura 40– Curva de Calibração da DOX•H₂O.

Figura 41– Curva de calibração da DOX•HAc.

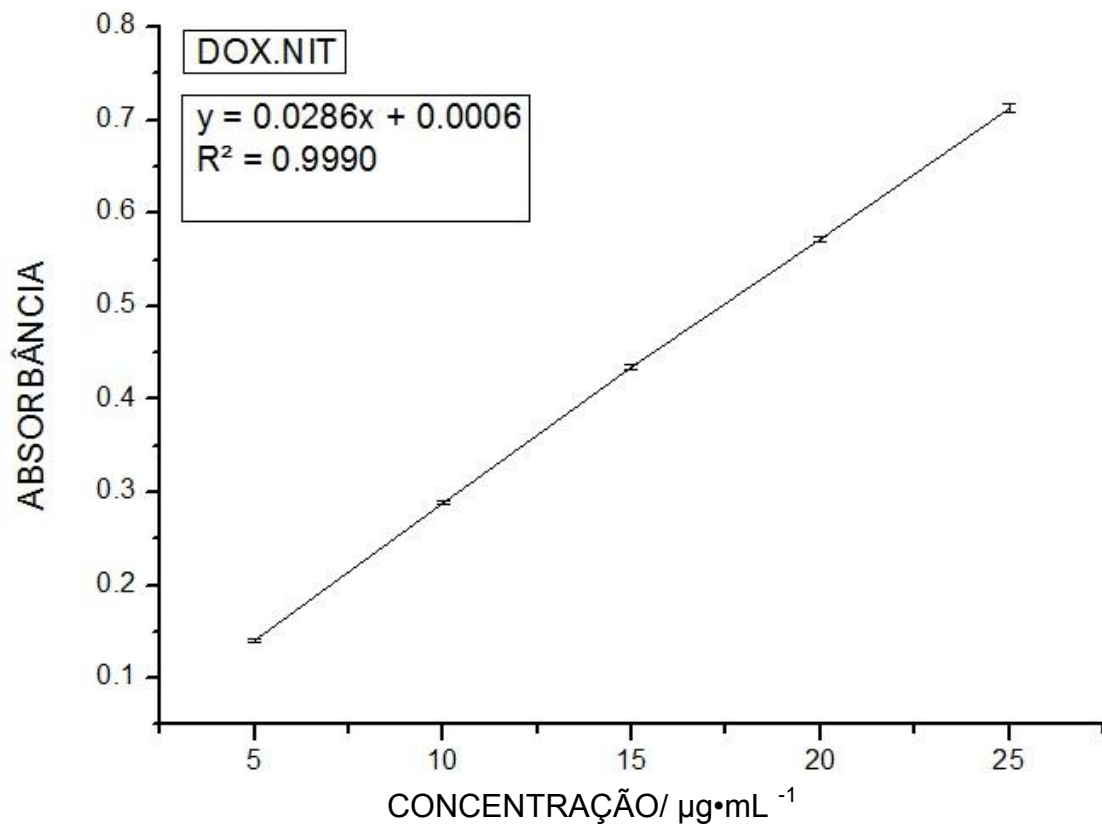


Figura 42– Curva de Calibração da DOX•NIT.

8.1.1 Teste de solubilidade segundo a Farmacopeia Brasileira

Segundo parâmetros e métodos estabelecidos pela farmacopeia brasileira⁽⁷⁸⁾ foi possível classificar a solubilidade dos diferentes pseudo-polimorfos do fármaco doxiciclina (TABELA 15).

Tabela 15 – Solubilidade Segundo a Farmacopeia Brasileira IV

	Água	Metanol	HCl 0,01 mol·L ⁻¹	HCl 0,1 mol·L ⁻¹
DOX•HIC	Facilmente Solúvel	Facilmente Solúvel	Facilmente Solúvel	Facilmente Solúvel
DOX•H ₂ O	Pouco Solúvel	Pouco Solúvel	Solúvel	Solúvel
DOX•NIT	Solúvel	Solúvel	Facilmente Solúvel	Facilmente Solúvel
DOX•HAC	Solúvel	Solúvel	Solúvel	Facilmente Solúvel

8.1.2 Teste de Solubilidade Intrínseca

Na Tabela 16 encontram-se os resultados dos testes de solubilidade intrínseca ^(46, 79). Pode-se verificar diferenças significativas em termos estatísticos entre as solubilidades dos quatro pseudo-polimorfos da DOX em água. O DOX•HIC é o mais solúvel ao passo que a DOX•H₂O é forma menos solúvel. Um dado interessante é que o DOX•NIT e o DOX•HAc possuem solubilidades intermediárias as do DOX•HIC e da DOX•H₂O que são as duas formas usadas como API da DOX em medicamentos. É possível que a solubilidade intermediária das duas novas formas sintetizadas nesse trabalho possa oferecer, de alguma forma, melhorias na processabilidade e farmacocinética da DOX.

Tabela 16 – Solubilidade Intrínseca mg/mL em água

Amostra	Solubilidade	Solubilidade	Solubilidade	Média ¹	Desvio
DOX•HIC	50	47	51	49,33 d	1,70
DOX•H ₂ O	18	15	20	17,67 a	2,05
DOX•NIT	34	37	31	34,00 b	2,45
DOX•HAc	42	39	38	39,67 c	1,70

¹ Médias verticais seguidas por letras distintas diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott. ⁽⁷⁵⁾

8.1.3 Perfil de dissolução

O perfil de dissolução é útil para a realização de comparações entre formas farmacêuticas sólidas, estudos de equivalência farmacêutica e, também, na comparação entre performances *in vitro* de fármacos e com isso identificar formulações que possam apresentar risco potencial com relação à biodisponibilidade e bioequivalência. Além disso, este processo pode auxiliar na escolha de uma determinada formulação durante o processo de desenvolvimento de medicamentos, pois com esta análise é possível selecionar a forma farmacêutica que apresenta o melhor desempenho para liberação do fármaco ^(46, 57, 59).

A Figura 43 mostra o comportamento da dissolução das quatro formas de DOX estudadas em água com um tempo total de dissolução de 60 minutos. O teste de perfil de dissolução até 60 minutos foi realizado para se ter informações preliminares do comportamento do API. Acompanhado os resultados de solubilidade e solubilidade intrínseca, para os quais a DOX•H₂O mostrou-se ser pouco solúvel em água e a forma de menor solubilidade intrínseca em água (17,67 mg/mL), no teste

de perfil de dissolução observa-se que a DOX•H₂O após 30 minutos não libera 80% do seu conteúdo. Também de acordo com o teste de solubilidade intrínseca que mostrou que a DOX•HIC é a forma mais solúvel em água, observa-se no teste de perfil de dissolução que essa forma libera praticamente 100% de seu conteúdo com menos de 10 minutos. As formas DOX•HAc e DOX•NIT, que apresentaram valores de solubilidade intrínseca muito próximos, mostraram também curvas de perfil de dissolução praticamente iguais. Antes de 15 minutos, as curvas de perfil de dissolução da DOX•HAc e do DOX•NIT mostram valores de quantidade de DOX liberada intermediários aos do DOX•HIC e da DOX•H₂O. Depois de 15 minutos as curvas do DOX•HIC, da DOX•HAc e do DOX•NIT se sobrepõem indicando que mais de 90% do seu conteúdo foi dissolvido. Na Tabela 17 são apresentados os valores percentuais individuais de cada pseudo-polimorfo analisado nesta primeira análise.

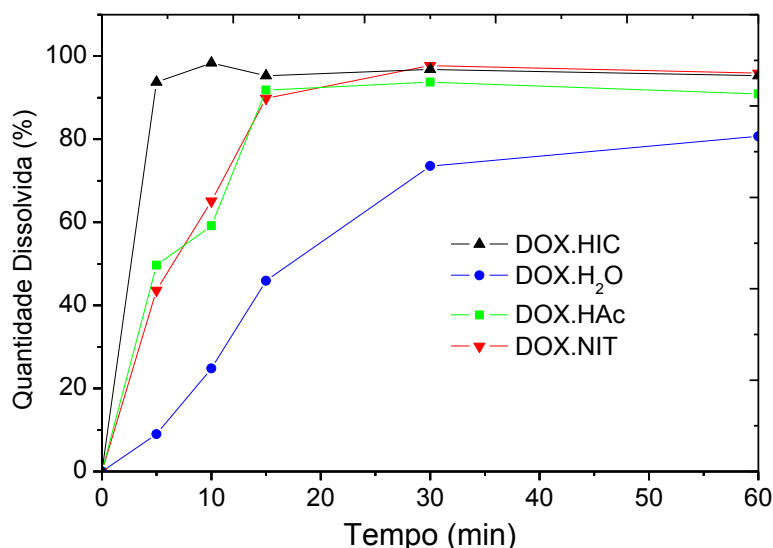


Figura 43– Perfil de dissolução comparativo entre DOX•HIC, DOX•H₂O, DOX•HAc e DOX•NIT. Porcentagem média liberada em função do tempo até 60 minutos. O meio de dissolução de todas as amostras foi a água.

Tendo em vista a baixa solubilidade intrínseca da DOX.H₂O em água e uma eficiência de dissolução de apenas 60,66% no teste de perfil de dissolução em água, uma cuba foi preparada para se testar o perfil de dissolução da DOX.H₂O em HCl 0,01M. Na Figura 44 são rerepresentados os perfis de dissolução em água do DOX•HIC, da DOX•HAc e do DOX•NIT juntamente com o perfil de dissolução da DOX.H₂O em HCl 0,01M. Nesse novo teste, observa-se que mais de 80% da

amostra de DOX.H₂O foi liberada após 15 minutos de ensaio observando-se ao final uma eficiência de dissolução de 88,60%.

Tabela 17 - Valores individuais de dissolução e eficiência de dissolução em água

TEMPO	DOX•HIC	DOX•H ₂ O	DOX•HAc	DOX•NIT
5	93,73	9,00	49,65	43,66
10	98,38	24,83	59,14	65,14
15	95,28	45,93	91,86	89,86
30	96,83	73,55	93,73	97,63
60	95,28	80,69	90,93	95,93
ED	89,95	60,66	85,68	88,20

ED = Eficiência de Dissolução

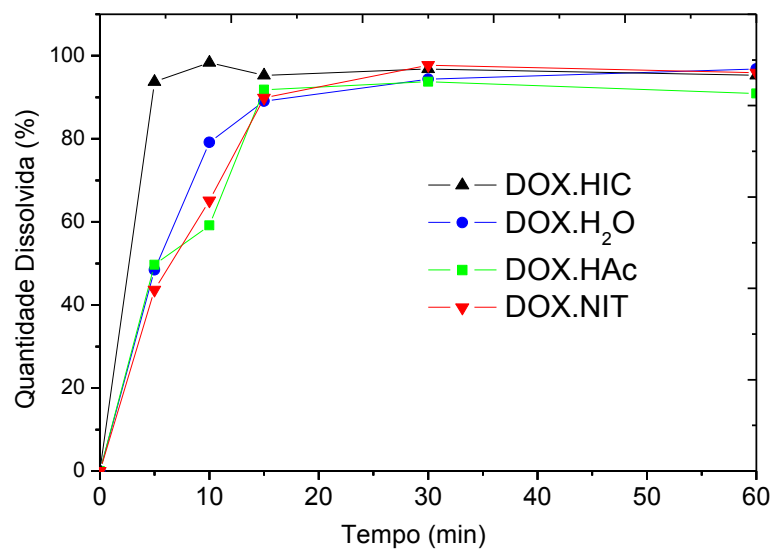


Figura 44– Perfil de dissolução comparativo entre DOX•HIC, DOX•H₂O, DOX•HAc e DOX•NIT. Porcentagem média liberada em função do tempo até 60 minutos. O meio de dissolução da DOX•H₂O foi o HCl 0,01M e os demais em água.

Após a execução dos testes preliminares executou-se os testes definitivos de perfil de dissolução. Esses testes foram feitos em triplicada e com tempo máximo de dissolução de até 30 minutos, tendo em vista que até esse tempo observou-se nos testes preliminares que mais de 90% das quantidades de DOX se dissolveram. A Figura 45 mostra o perfil de dissolução das diferentes amostras sendo que nas curvas constam as barras de erros relativas ao desvio padrão de cada pseudo-polimorfo, oriundo da média das três capsulas formuladas para cada forma da DOX.

Os tempos em que a concentração da DOX foi medida na solução do dissolutor foram 3, 6, 9, 15, 20 e 30 minutos. Na Tabela 18, estão os resultados das eficiências de dissolução, suas respectivas médias e desvio padrão encontrados para cada forma da DOX estudada.

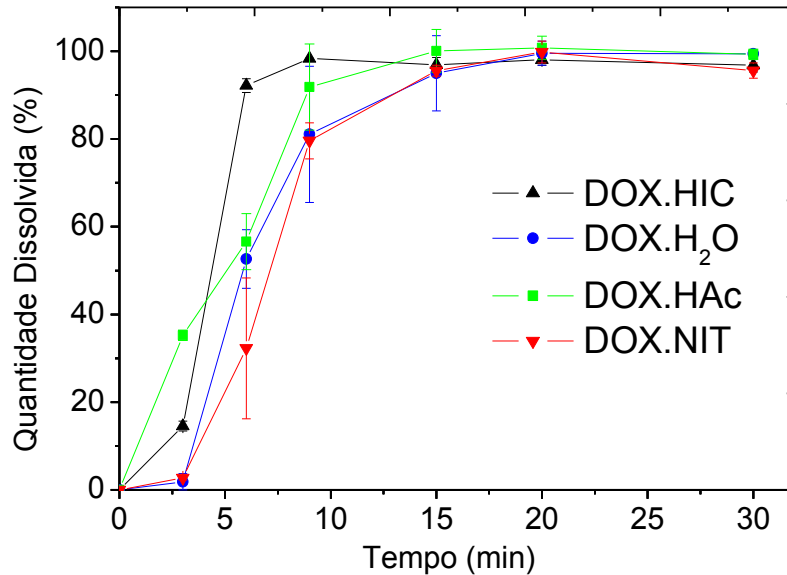


Figura 45 – Perfil de dissolução comparativo entre DOX.HIC, DOX.H₂O, DOX.HAc e DOX.NIT. Porcentagem média liberada em função do tempo. As barras verticais correspondem ao desvio padrão. O meio de dissolução da DOX.H₂O foi o HCl 0,01M e os demais em água.

Tabela 18 – Valores individuais de eficiência de dissolução do DOX.HIC, DOX.H₂O, DOX.HAc e DOX.NIT

DOX	Capsula			Média
	1	2	3	
DOX.HIC	90,85	88,88	88,25	89,32 ± 3,44
DOX.H ₂ O	88,60	85,94	88,06	87,53 ± 5,86
DOX.HAc	85,68	87,43	86,13	86,41 ± 0,74
DOX.NIT	88,20	86,88	84,57	86,55 ± 4,98

Na medida de concentração feita no tempo 1 (3 minutos) observa-se que a DOX.H₂O e o DOX.NIT praticamente não se dissolveram, o DOX.H₂O dissolveu ~35% e o DOX.HIC dissolveu ~15%. No tempo 2 (6 minutos) observa-se que não há diferença significativa entre os níveis de dissolução da DOX.H₂O e da DOX.HAc que dissolveram mais de 50%; a quantidade de DOX.NIT dissolvida é um pouco menor que a da DOX.H₂O e DOX.HAc; e mais de 90% do DOX.HIC já se dissolveu. No tempo 3 (9 minutos) observa-se que não há diferença estatística entre os perfis de

dissolução do DOX•HAc e do DOX•HIC que já dissolveram mais de 90% de sua quantidade nas capsulas preparadas, as quais são acompanhadas de perto pela DOX.H₂O e DOX•NIT que tiveram dissolvida ~80% da DOX presente nas capsulas. No tempo 4 (15 minutos) pode-se observar que todas as amostras liberaram mais que 90% de seus fármacos não havendo diferença estatísticas entre as formas da DOX. Portanto, todas as formas estão de acordo com os padrões de qualidade estabelecidos pela farmacopeia dos Estados Unidos⁽⁷⁶⁾ e resolução específica 899⁽⁷⁷⁾ que determinam que pelo menos 80% do fármaco seja liberado com menos de 30 minutos tanto para o hiclato, quanto para a forma monohidratada que já são utilizados como insumos de medicamentos comercializados como fonte do API DOX. Outro fator importante é a eficiência da dissolução que também apresentou níveis superiores a 80% para todas as formas da DOX. Contudo, as farmacopeias não estabelecem valores máximo e mínimo para esse parâmetro, o qual é utilizado para se fazer comparação entre os medicamentos diferentes com o mesmo fármaco (genéricos) e, neste caso, entre os diferentes pseudo-polimorfos testados.

É importante destacar que em um estudo de bioequivalência e biodisponibilidade reportado na literatura utilizando-se a doxiciclina monohidratada e o hiclato de doxiciclina, foi mostrado que as duas formulações, apesar das suas diferenças estruturais e de solubilidade em água, são bioequivalentes⁽⁸⁸⁾. Nesse trabalho foram levados em consideração fatores farmacocinéticos como: Taxa de absorção, tempo de meia vida no organismo, níveis plasmáticos médios e eliminação⁽⁸⁸⁾. Essa é uma informação importante e promissora em relação aos outros pseudo-polimorfos gerados nesse trabalho, a DOX•HAc e o DOX•NIT, pois além de terem o mesmo perfil de dissolução do DOX•HIC e da DOX.H₂O, podem apresentar vantagens em relação as formas comerciais existentes como por exemplo melhor compressibilidade, umectância e outros fatores farmacotécnicos que, se implicarem em diminuição de custos de produção do medicamento final, podem despertar o interesse das indústrias farmacêuticas. Vislumbra-se, portanto, uma possível aplicação tecnológica dos resultados aqui obtidos.

9 CONCLUSÕES

- I. A estrutura da forma pseudo-polimórfica DOX•H₂O foi determinada pela primeira vez;
- II. Duas novas formas pseudo-polimórficas da DOX, a DOX•HAc e o DOX•NIT foram sintetizadas, cristalizadas e caracterizadas estruturalmente por MXRD, PXRD e IR;
- III. Todas as formas cristalizaram em grupo espacial centro-simétrico e portanto são enantiomericamente puras;
- IV. A síntese e a obtenção de cristais de todas as formas da DOX são reproduzíveis tanto no sentido de se obterem monocristais como para se obter maiores quantidades policristalinas;
- V. Padrões de PXRD experimentais e teóricos, gerados a partir da estrutura de monocristal determinada, das formas pseudo-polimórficas do DOX•HIC, da DOX•H₂O, da DOX•HAc e do DOX•NIT foram estabelecidos;
- VI. Com o conhecimento da estrutura das formas pseudo-polimórficas da DOX pode-se agora utilizar a técnica de PXRD na caracterização polimórfica, qualitativa e quantitativa, de insumos e medicamentos contendo o API DOX;
- VII. Os espectros de IR também podem ser utilizados na diferenciação das formas pseudo-polimórficas da DOX se as mesmas se apresentarem puras, uma vez que os espectros apresentaram características distintas;
- VIII. Todas as formas da DOX estudadas nesse trabalho cristalizam-se como zwitterions no qual o grupo dimetilamina está protonado e uma hidroxila está desprotonada;
- IX. Além da carga negativa e positiva zwitterionica, o DOX•HIC e o DOX•NIT detém também o próton oriundo dos ácidos clorídrico e nítrico presentes, respectivamente, nas suas redes cristalinas e, portanto, possuem uma carga positiva líquida caracterizando a estrutura como um sal;
- X. A DOX•H₂O é neutra e classificada como um hidrato da DOX;
- XI. No caso da DOX•HAc, apesar da presença do ácido acético no meio reacional, a resolução da estrutura mostrou que não houve transferência do próton para a molécula de DOX e, portanto, essa forma pseudo-polimórfica pode ser classificada como um solvato ou um co-cristal hidratado da DOX;
- XII. As moléculas de DOX podem apresentar tautomerismo e conformerismo;

- XIII. Dois confômeros da molécula de DOX, chamados de T1 e T2, foram encontrados no mesmo cristal para o DOX•HIC e o DOX•NIT;
- XIV. A DOX•HAc exibe o tautômero e o confômero T2, enquanto a DOX•H₂O exibe o tautômero de T2 e confômero de T1;
- XV. Com exceção do grupo amida da DOX, a geometria intramolecular das diferentes formas pseudo-polimórfica das quatro formas estudadas apresentaram pequenas variações;
- XVI. A presença de solventes, águas e íons na rede cristalina determina a rotação da ligação C-C da amida levando aos confômeros e, ou, tautômeros T1 e T2. Contudo mais estudos são necessários para se fazer alguma proposta de mecanismo supramolecular que possa estar induzindo a geometria intramolecular que leva a T1 ou T2 ou ambos;
- XVII. O empacotamento cristalino das formas pseudo-polimórficas da DOX estudadas nesse trabalho são estabilizadas por várias ligações de hidrogênio intermoleculares clássicas e não-clássicas, envolvendo interações DOX-DOX, DOX-água, DOX-solvente, DOX-íon, água-água, solvente-solvente, íon-íon, água-solvente, íon-solvente e íon-água;
- XVIII. Essas diferenças nas interações intermoleculares tem como consequência comportamentos diferenciados na solubilidade e no perfil de dissolução da DOX•HIC, DOX•H₂O, DOX•HAc e DOX•NIT;
- XIX. A solubilidade em água das formas estudadas apresentaram a seguinte ordem DOX•HIC, > DOX•HAc ≥ DOX•NIT > DOX•H₂O;
- XX. Apesar disso, os testes de dissolução e solubilidade mostraram que todas as formas pseudo-polimórficas têm biodisponibilidade equivalente aos API comercializados da DOX;
- XXI. Devido a sua baixa solubilidade em água, os testes de perfil de dissolução da DOX•H₂O tiveram que ser realizados em HCl 0,01M;
- XXII. O estudo do perfil de dissolução demonstrou que para todas as formas pseudo-polimórficas da DOX há liberação de mais de 80% dos fármacos em 30 minutos, o que está de acordo com a recomendação das agências regulatórias de saúde e farmacopeias brasileiras e norte-americanas;

10 PERSPECTIVAS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- I. Caracterizar o DOX•HIC, a DOX•H₂O, a DOX•HAc e o DOX•NIT por meio e análises térmicas e espectroscopia Raman;
- II. Realizar ensaios farmacotécnicos com as duas formas inéditas da DOX, a DOX•HAc e o DOX•NIT, vislumbrando-se uma possível utilização dos mesmos como fontes do API DOX a exemplo do que já corre com o DOX•HIC e a DOX•H₂O;
- III. Realizar testes biológicos e de bio-equivalencia com a DOX•HAc e o DOX•NIT;
- IV. Obter novas formas pseudo-polimórficas da DOX;
- V. Realizar refinamentos pelo método de Rietveld valendo-se dos dados de difração de raios X por pó e monocristal obtidos nesse trabalho das amostras puras e em misturas simuladas para testar a eficiência do método na quantificação das formas de DOX em insumos e medicamentos.

REFERÊNCIAS

- (1) BRITTAIN, H.G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker, v. 9, 2000.
- (2) BRITTAIN, H.G. **Physical characterization of pharmaceutical solids**. New York Marcel Dekker, 1995.
- (3) DEBNATH, S.; SURYANARAYANAN, R. Influence of processing-induced phase transformations on the dissolution of theophylline tablets. **AAPS PharmSciTech**. n. 1, v. 5, 2004. Disponível em:
<<http://www.aapspharmsciotech.org/view.asp?art=pt050108&pdf=yes>> Acesso em 01 fev. 2011.
- (4) MORISSETTE, S. L. et al. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 275– 300, 2004
- (5) MORISSETTE, S.L.; et al. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. **PNAS**, n. 5, v. 100, p. 2180-2184, 2003.
- (6) AMIDON G.L.; et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharm. Res.** n.12, v. 413, 1995
- (7) GUIDANCE for Industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. US department of health and human services, food and drug administration, center for drug evaluation and research (**CDER**): Washington, DC, 2000. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>> Acesso em: 06 Jan. 2011.
- (8) KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 783 p.
- (9) BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC n. 44** de 26 de outubro de 2010. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c13443804478bef68eefcf7d15359461/resolucao+antibioticos.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 01 fev. 2011.

(10) HAMBRAEUS, A. Lowbury Lecture 2005: Infection control from a global perspective. **The Journal of Hospital Infection**. n. 3, v.64, p.217-223, 2006.

(11) GRIFFIN, M. O.; et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am. J. Physiol Cell. Physiol**. n. 3, v. 299, p. 539-548, 2010.

(12) USP NF UNITED States Pharmacopeia: 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

(13) DAHL E. L. et al. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite plasmodium falciparum. **American Society for Microbiology**, n. 9, v. 50, p. 3124-3131, 2006.

(14) CASTELO, A. F.; et al. Clinical use of tetracyclines. **Med. Cult.** n. 1, v. 39, p. 41-43, 1984.

(15) KISELYEVA, Y. et al. Depletion of CD4 T lymphocytes in human lymphoid tissue infected ex vivo with doxycycline-dependent HIV-1. **Virology**, n. 10, v. 328, p.1-6, 2004.

(16) BACHRACH, E. Effects of virion surface gp120 density on infection by HIV-1 and viral production by infected cells. **Virology**. n. 2, v.332, p. 418-429, 2005.

(17) TAO, S. et al. Doxycycline inhibits the adhesion and migration of melanoma cells by inhibiting the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) **Cancer Letters**, n. 2, v. 285, 141-150, 2009.

(18) SMITH, K.; LEYDEN, J. J. Safety of Doxycycline and Minocycline: A Systematic Review. **Clinical Therapeutics**. n. 9, v. 27, p. 1329-1342, 2005.

(19) 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 .alpha.-6-deoxyoxytetracycline hydrohalides. **J. Am. Chem. Soc.** n. 4, v.99, p. 1122-1129, 1977.

(20) CSAKURDA-HARMATHY, Z.; KONKOLY, T. Chloramphenicol palmitate from therapeuticaijy inactive polymorph a to active polymorph b identification and determination of modification a in modification b by dsc. **Journal of Thermal Analysis**, v. 50 p. 867-87, 1997.

- (21) AGUIAR, A J.; ZELMER, J. E. Dissolution behavior of polymorphs of chloramphenicol palmitate and mefenamic acid. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v.58, n.8, p.983-987, 1969.
- (22) CHAWLA, G.; BANSAL, K. A. Challenges in polymorphism of pharmaceuticals **CRIPS**, n. 1, v. 5, p. 12-15, 2004.
- (23) VIPPAGUNTA, R. S.; BRITTAİN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48 p. 3–26, 2001.
- (24) HUANG, L.F., TONG, W.Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 3, v. 56, p. 321-334, 2004.
- (25) SNIJDER, D.A.; ADDICKS W.; OWENS W. Polymorphism in generic drug product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 3 v. 56, p. 391-395, 2004.
- (26) PATIL, A. O.; CURTIN, D. Y.; PAUL, I. C. Interconversion by hydrogen transfer of unsymmetrically substituted quinhydrones in the solid state. Crystal structure of the 1 :2 Complex of 2,5-dimethylbenzoquinone with hydroquinone **J. Am. Chem. Soc**, n. 14, v.106, p. 4010-4015, 1984.
- (27) BLAGDEN, N.; et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 59, p. 617–630, 2007.
- (28) BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 43–65, 2001.
- (29) 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. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>> Acesso em: 1 jun. 2011.
- (30) STEPHENSON, G. A. Structure determination from conventional powder diffraction data: Application to hydrates, hydrochloride salts, and metastable polymorphs. **J. Pharm. Sci**, n. 7, v. 89, p. 958-966, 2000.

(31) LAWRENCE, X. Y. et al. Scientific Considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 20, n. 4, p. 531-536, 2003.

(32) AYALA, A. P. Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering. **Vibrational Spectroscopy**, v. 45 p.112–116, 2007

(33) KALINKOV, G. Infrared spectroscopy in pharmacy. **Vibrational Spectroscopy**, v.19, n.307, 1999.

(34) RODRÍGUEZ-SPONG, B. et al. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56 p.241– 274. 2004.

(35) CHARLESLEY, E. L.; WARRINGTON, S. B. **Thermal analysis: Techniques and applications**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1992.

(36) HAINES, P. J. **Thermal methods of analysis**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995.

(37) DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 3 p. 42-57, 2004.

(38) DAVEY, R. J. et al. Colloids, crystals and interfaces group. Crystal polymorphism as a probe for molecular self-assembly during nucleation from solutions: The Case of 2,6-Dihydroxybenzoic Acid. **Crystal Growth & Design**. n. 1, v. 1, p. 59–65, 2001.

(39) PETERSON, M. L. et al. Expanding the scope of crystal form evaluation in pharmaceutical science. **J Pharm Pharmaceut Sci**, n. 3, v. 9, p. 317-326, 2006.

(40) STRACHAM, C. J., et al. Quantitative analysis of polymorphic mixtures of carbamazepine by Raman spectroscopy and principal components analysis. **J. Raman Spectrosc**, n. 5, v. 35, p. 347-352, 2004

(41) STRACHAM, C. J., et al. A theoretical and spectroscopic study of carbamazepine polymorphs **J. Raman Spectrosc**, n. 5, v. 35, p. 401-408, 2004.

(42) BRASIL. **Lei da propriedade industrial nº 9.279/96**, Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, 15 de maio de 1997. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/pasta_legislacao> Acesso em 15 ago. 2011.

(43) BRASIL. **3ª Reunião do grupo de estudos sobre polimorfismo**. Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/discussoes-tecnicas/polimorfismo/3a-reuniao-do-grupo-de-estudos-sobre-polimorfismo>> Acesso em 15 ago. 2011.

(44) MCCRONE Jr, W. C., **Fusion methods in chemical microscopy**, Interscience, New York, 1957. 307p.

(45) TOMISLAV F.; JONES, W. Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding. **Crystal Growth & Design**, n. 3, v. 9, p. 1621-1637, 2009

(46) MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Ver. Bras. Cien. Farm.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.

(47) ABUZARUR-ALOUL, R. et al. Critical dissolution test of oral systems based on statistically designed experiments. I. screening of critical fluids and *in vitro/in vivo* modelling of extended release coated spheres. **Drug Dev. Ind. Pharm**, New York, v.23, n. 8, p. 749-760, 1997.

(48) MURTHY, K. S.; GHEBRE-SELLASSIE, I. Current perspectives on the dissolution stability of solid oral dosage forms. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 82, n.2, p. 113-126, 1993.

(49) BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada. RDC n 893 de 29 maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

(50) BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria colegiada. RDC n 901 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003.

(51) GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. 406p.

(52) KHAN, M. Z. I. Dissolution testing for sustained or controlled release oral dosage forms and correlation with *in vivo* data: challenges and opportunities. **Int. J. Pharm.** Amsterdam, v.140, p. 131-143, 1996.

(53) BRASIL. **Lei n. 9787**, de 10 de fevereiro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 fev. 1999. Seção 1, p. 1.

(54) BROWN, C. K. et al. Acceptable analytical practices for dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**. v.28, p. 56-65, 2004.

(55) MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. 117p.

(56) ABDU, H. M. **Dissolution, bioavailability and bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989. 554p.

(57) STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo: [s.n.], 1999. 78p.

(58) YATES, T. **II Pruebas de disolución in vitro y biodisponibilidad consideraciones generales sobre solubilidad y disolución de medicamentos**. Disponível em:
<http://mazingar.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/arancibiaa02/02.html> Acesso em: 6 Fev. 2011.

(59) WOOD, J. H. *In vitro* evaluation of physiological availability of compressed tablets. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 42, n. 3, p. 120-151, 1967.

(60) BANAKAR, U. V. **Pharmaceutical dissolution testing**. New York, Marcel Dekker Inc, 1992. 437p.

(61) TAKEUCHI, H.; HANDA, T.; KAWASHIMA, Y. Enhancement of the dissolution rate of a poorly water-soluble drug (tolbutamide) by a spray-drying solvent deposition method and disintegrates. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 39, p. 769-773, 1987.

(62) SMITH, H. L.; BAKER, C. A.; WOOD, J. H. Interpretation of dissolution rate maxima: dependence upon tablet compression force. **J. Pharm. Pharmacol.** London, v. 23, p. 536-538, 1971.

(63) PEZOA, R.; CONCHA, A. M.; GAETE, G. Disolución de formas farmacêuticas sólidas. **Revista del Colegio Químico Farmacéutico**, Santiago, v.46, n. 2, p. 43-51, 1990.

(64) VANKEL TECHNOLOGY GROUP. **Advanced dissolution**, [s.l: s.n.]. 1999. Manual.

(65) RxList: **the top 300 prescriptions for 2004 by number of US prescriptions dispensed**. NDC Health: Washington, DC, 2005. Disponível em: <<http://www.rxlist.com/top200a.htm>> Acesso em: 22 set. 2009

(66) HANCOCK, B.C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. **Journal. Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 1, p. 1, 1997.

(67) CARSTENSEN, J. T.; YONEZAWA, Y. Dissolution profiles in column dissolution. **J. Pharm. Sci**, Washington, v. 75, n. 8, p. 764-768, 1986.

(68) AGUIAR, M. R. M. P.; GEMAL, A. L.; SAN GIL, R. A. S. Caracterização de polimorfismo em fármacos por ressonância magnética nuclear no estado sólido. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 22, n. 4, 1999.

(69) CAMERONI, R.; GAMBERINI, G.; FORNI, F. et al. Polymorphism of chloramphenicol stearate. **Farmaco Edizione Pratica**, n. 10 v. 33, p. 447-454, 1978.

(70) SHELDRIK, G. M. **SHELXL-97**. Program for crystal structures analysis. Germany: Göttingen, 1997.

(71) SHELDRIK, G. M. **SHELXS-97**. Program for crystal structure resolution. Germany: Göttingen, 1997.

(72) FARRUGIA, L. J. Wing - X. **J. Appl. Cryst**, n. 32, p. 837, 1999.

(73) FARRUGIA, L. J. Ortep 3 for windows. **J. Appl. Cryst.**, n. 30, p. 565, 1997.

(74) FISCHER, R. X. A fortran plot program for crystal structure illustrations in polyhedral representation. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 18, p. 258-262, 1985.

(75) FERREIRA, D. F. **SISVAR: Sistema de Análise de Variância V5.1**. Lavras: UFLA, 1999

(76) RIETVELD, H. M. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **J.Appl.Cryst**, v. 10, n. 2 p. 65-71,1969.

(77) YOUNG, R. A. et al. ; **Users guide to program DBWS9411 for Rietveld analysis of X ray and neutron powder diffraction patterns**; School of Physics, Georgia Institute of Technology, Atlanta,1995.

(78) HILFIKER R. **Polymorphism: in the pharmaceutical industry**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2006. 403p.

(79) FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996.pt.II. fasc. 1. cap. V.1.6.

(80) PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO,R. **Tecnologia farmacêutica** . 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1995. 786p.

(81) USP NF UNITED States Pharmacopeia: 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005.

(82) BRASIL. Resolução **RE n.899**, de 29 de maio de 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova guia para validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2003b. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 abr. 2010.

(83) PALENIK, G. J.; MATHEW, M.; RESTIVO, R. Structural studies of tetracyclines. crystal and molecular structures of anhydrotetracycline hydrobromide monohydrate and 6-demethyl-7-chlorotetracycline hydrochloride trihydratel. **J. Am. Chem. SOC.** n. 14, v. 100 , p. 4458-4464, 1978.

(84) PREWO, R.; STEZOWSKI, J. J.; KIRCHLECHNERT, R. Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. 10. The 6-Thiatetracyclines. **J. Am. Chem. Soc.**, n. 23, v. 102, p. 7021-7026, 1980.

(85) PREWO, R.; STEZOWSKI, J. J. Chemical-structural properties of tetracycline derivatives. 9. 7-Chlorotetracycline derivatives with modified stereochemistry. **J. Am. Chem. Soc.**, n.23, v. 102, p. 7015-7020, 1980

(86) WESSELS, J. M.; FORD, W. E.; SZYMCZAK, W. et al. The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg^{2+} and Ca^{2+} : A spectroscopic study. **J. Phys. Chem. B**, n. 46, v. 102, p. 9323-9331, 1998.

(87) AGUIAR, G. et al. Avaliação biofarmacotécnica *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 4, p.451-458, out./dez. 2005

(88) RITZES-COHEN, R. et al. Bioequivalence study of two formulations of doxycycline. **Current Therapeutic Research**, v.59, n. 5, p. 315-323, 1998.