UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Caracterização do estado sólido de ganciclovir

Roxana Lili Roque Flores

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos

São Paulo - Brasil

2017

Roxana Lili Roque Flores

Caracterização do estado sólido de ganciclovir

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ 2017.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

R786c Roque Flores, Roxana Lili
Caracterização do estado sólido de ganciclovir /
Roxana Lili Roque Flores. - São Paulo, 2017.
119 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.

Orientador: Matos, Jivaldo do Rosario

1. Ganciclovir. 2. Estado sólido. 3.
Polimorfismo. 4. Cristalização. 5. Estrutura
Cristalina. I. T. II. Matos, Jivaldo do Rosario,
orientador.

¡A Dios todo poderoso por esta gran oportunidad! Por la fuerza infinita en los momentos difíciles, y sobre todo por ser mi guía en este trabajo de investigación.

“Lo que es imposible para los hombres, es posible para Dios” (Lucas 18:27).

A mi madre, Maria Gegroria, ¡mi gran ejemplo de superación! A usted por su amor incondicional y sabias palabras. Gracias por todas las enseñanzas y por los estudios que me distes. Hoy ellos son parte de mí.

A mi padre, Pedro, por su amor y cariño incondicional, por sus valiosos consejos, motivación y sus buenos deseos. A mi hermano, Juan Eduardo por su cariño incondicional, comprensión y sobre todo por cuidar de nuestra madre durante mi ausencia.

A mis amigos y colegas, para aquellos que amamos nuestra profesión y trabajamos con perseverancia, tolerancia y amor. Para aquellos que somos pacientes y seguimos nuestro camino con firmeza ante las dificultades. Para aquellos que agradecemos por todas nuestras experiencias vividas como parte de un gran aprendizaje personal y profesional.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e à Coordenação de Ciência sem Fronteiras pela bolsa concedida. Muito obrigada pelos meus estudos de Pós-graduação e por dar-me a oportunidade de realizar parte do meu doutorado no exterior.

Ao Emérito Prof. Dr. Joel Bernstein pela oportunidade e por compartilhar seus ensinamentos no curso em São Carlos - SP (2013), onde começou meu interesse pelo estudo da química do estado sólido de fármacos.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos pela oportunidade, amizade, pelos ensinamentos compartilhados de Análise Térmica e, sobretudo, por ter me dado a liberdade de ir à procura de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Lian Yu pela oportunidade, por seu exemplo de pesquisa, ética e profissionalismo e, sobretudo, pelo apoio mesmo estando longe. Aos seus alunos, em especial ao Men Zhu.

Ao Prof. Dr. Ilia Guzei pela oportunidade e pela sua participação na resolução da estrutura cristalina.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e à School of Pharmacy - University of Wisconsin-Madison pela estrutura e oportunidade.

Aos Professores que tive a oportunidade de conhecer no Brasil e nos Estados Unidos, aqueles que me acolheram e, que de alguma maneira, compartilharam seus ensinamentos comigo.

À Profa. Dra. Luci Diva Brocardo Machado do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - CTR, e ao Dr. Flavio Machado de Souza Carvalho do Instituto de Geociências - USP pela disposição na utilização de equipamentos de TG/DSC e DRX quando foi necessário.

Ao meu amigo Matheus Costa e à Industria Farmacêutica Eurofarma por disponibilizar gentilmente o Hot Stage Microscopy para dar continuidade ao meu estudo.

Ao Prof. Dr. Gabriel Lima Barros de Araújo pelo incentivo e motivação.

Aos meus amigos Rene Ramos, Marcia Nied, Monica Silva e Tatiana Balogh. Muito obrigada Rene pela sua ajuda incondicional em Madison! A você minha querida Marcia, obrigada pelas suas valiosas palavras de motivação, pelo seu carinho incondicional e, sobretudo, pela nossa amizade! À Monica pela companhia que me fez mesmo estando longe! E à minha querida amiga Tatiana pela nossa grande amizade desde a época do mestrado. Muito obrigada a vocês!

Aos colegas e amigos do grupo em especial a Simone, Cibeles, Luciana e Renato pela acolhida e pelos bons momentos compartilhados. Ao André pela nossa amizade e a Juliana Oliveira pelas valiosas discussões.

RESUMO

(Roque Flores, R.L.) **Caracterização do estado sólido de ganciclovir**. 2017. 119 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do estado sólido do ganciclovir (GCV) e suas diferentes formas polimórficas. O GCV é um fármaco antiviral útil no tratamento de infecções por citomegalovírus (CMV). Embora seja um fármaco amplamente usado, poucos estudos têm sido realizados sobre seu estado sólido. Atualmente, o GCV é conhecido por apresentar quatro formas cristalinas, duas anidras (Forma I e II) e duas hidratadas (III e IV). Neste trabalho, nós reportamos a solução da estrutura cristalográfica da Forma I do GCV, que foi encontrado durante o *screening* de cristalização do fármaco, em que nove ensaios de cristalização (GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H) foram realizados e os materiais resultantes foram caracterizados por Difractometria de raios X (DRX), análise térmica (DTA/TG) e *Hot Stage Microscopy*. De todas as cristalizações realizadas foram obtidas quatro formas sólidas, denominadas como Forma I (GCV-1, GCV-B e GCV-H), Forma III (GCV-C, GCV-D, GCV-F e GCV-G), Forma IV (GCV-A) e Forma V (GCV-E). Esta última está sendo descrita pela primeira vez na literatura e indica a presença de outra forma hidratada de GCV. As Formas I, III e IV corresponderam a forma anidra e as duas formas hidratadas do fármaco, respectivamente. Além disso, foi evidenciado por experimentos de conversão de *slurry* e análise térmica que o cristalizado de GCV-1 (Forma I) foi o mais estável entre os materiais obtidos, e este deu origem ao monocristal da Forma I de GCV, estrutura cristalina anidra do fármaco. Neste trabalho, pela primeira vez, a estrutura cristalina deste composto foi definida por cristalografia de raios X de monocristal. A análise estrutural mostrou que a Forma I do fármaco cristaliza no grupo espacial monoclinico $P2_1/c$ e está composta por quatro moléculas de GCV na sua unidade assimétrica. Cada molécula está unida intermolecularmente por ligações de hidrogênio, que dão lugar à formação de cadeias infinitas e estas por sua vez se arranjam de maneira a formar uma estrutura tridimensional.

Palavras-chave: Polimorfismo. Estado sólido. Caracterização estrutural. Ganciclovir.

ABSTRACT

(Roque Flores, R.L.) **Solid state characterization of ganciclovir**. 2017. 119 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

This presented work aims to study the solid state of ganciclovir (GCV) and its different polymorphic forms. GCV is an antiviral drug useful in the treatment of cytomegalovirus (CMV) infections. Although it is a widely-used drug, few studies have been conducted on its solid state. Currently, GCV is known to have four crystalline forms, two anhydrous (Form I and II) and two hydrates (III and IV). In this investigation, we report a successful preparation of GCV Form I and its crystallographic structure, which was found during the crystallization of the drug, in which nine crystallization tests (GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV- D, GCV-E, GCV-F, GCV-G and GCV-H) were performed and the resulting materials were characterized by X-ray diffractometry (XRD), thermal analysis (DTA/TG) and Hot Stage Microscopy. Of all the crystallizations performed, four solid forms were obtained, denoted as Form I (GCV-1, GCV-B and GCV- H), Form III (GCV-C, GCV-D, GCV-F and GCV-G), Form IV (GCV-A) and Form V (GCV-E). The latter is being described for the first time in the literature and indicates the presence of another hydrated form of GCV. Forms I, III and IV corresponded to the anhydrous form and the two hydrated forms of the drug, respectively. In addition, it was evident by both the slurry conversion and the thermal analysis methods that the GCV-1 crystallized (Form I) was indeed the most stable amongst the materials obtained. This gave rise to GCV Form I monocrystal, anhydrous crystalline structure of the drug. The compound was characterized by monocrystal X-ray crystallography. The structural analysis showed that Form I of the drug crystallized in the monoclinic system space group P21/c is composed of four molecules of GCV in its asymmetric unit. Each molecule is linked intermolecularly by hydrogen bonds, which give rise to the formation of infinite chains arranged in a way that form a three-dimensional structure.

Keywords: Polymorphism. Solid state. Structural characterization. Ganciclovir. Phase-transformation. Physicochemical properties. Solid state stability.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		21
Figura 1	Fluxograma representativo das etapas realizadas para o desenvolvimento do estudo.....	25
CAPÍTULO II		27
Figura 1	Polimorfismo orientacional ou de empacotamento: RS-EB2HCl a) Forma II, b) Forma I, e Polimorfismo conformacional: c) 4-cianofeniloxi, d) Rotigotina. Adaptado de RUBIN-PREMIINGER, <i>et al</i> 2004, CRUZ-CABEZA; BERNSTEIN, (2014) e BUČAR; LANCASTER; BERNSTEIN, (2015).....	32
Figura 2	Relação de estabilidade entre dois polimorfos (pressão constante). Adaptado de Yu, (1995).....	34
CAPÍTULO III		58
Figura 1	Estrutura molecular de GCV.....	60
Figura 2	Difratogramas de raios X da amostra de GCV e das Formas I, III e IV. Adaptado de ROQUE FLORES, <i>et al.</i> , manuscrito em preparação (Forma I) e CCDC - códigos de referência 1475570 (Forma III) e 1475571 (Forma IV).....	68
Figura 3	Curvas TG/DTG obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min ⁻¹) da amostra de GCV.....	70
Figura 4	Foto da amostra de GCV após do aquecimento a 319°C.....	70
Figura 5	Curvas de DSC e TG/DTG obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min ⁻¹) da amostra de GCV.....	71
Figura 6	Curvas de TG (atmosfera de ar) e DSC (atmosfera de N ₂) obtidas a 10°C min ⁻¹ da amostra de GCV.....	72
Figura 7	Curva DSC e os difratogramas de DRX durante a	

	decomposição do GCV, analisado por meio do sistema DRX-DSC simultâneo.....	74
Figura 8	Difratogramas de DRX durante a decomposição do GCV.....	75
Figura 9	Espectros de absorção na região do infravermelho da amostra GCV.....	76
Figura 10	Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do GCV, aumento de 100 vezes (A) e 250 vezes (B).....	76
Figura 11	Fotomicrografias de GCV analisadas no <i>Hot Stage Microscopy</i> no intervalo de temperatura de 25°C (A), 189°C (B), 225°C (C) e 249°C (D).....	78
Figura 12	Curvas TG obtidas sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min ⁻¹) da amostra de GCV.....	79
Figura 13	Gráfico de Log (β) versus 1 / T (K ⁻¹) da amostra de GCV.....	80
Figura 14	Gráficos obtido pelo método de Ozawa para a amostra de GCV.....	80
Figura 15	Curvas TG isotérmicas (T _{iso} = 220, 225, 230, 235 e 240°C) obtidas sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL.min ⁻¹) da amostra de GCV.....	82
Figura 16	Gráfico de Arrhenius obtido a partir das curvas TG _{iso} para a primeira etapa de decomposição térmica da amostra de GCV..	83
CAPÍTULO IV		87
Figura 1	Estrutura molecular de GCV.....	89
Figura 2	Difratogramas de raios X do GCV e dos recristalizados GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H.....	95
Figura 3	Difratogramas de raios X (experimental) das Formas II, III e IV de GCV. Adaptado de FERNANDES <i>et al.</i> , 2016.	97
Figura 4	Difratogramas de raios X (calculado) das Formas I, II, III e IV de GCV. Adaptado de ROQUE FLORES, <i>et al.</i> , manuscrito em preparação (Forma I) e CCDC - código de referência 714337	

	(Forma II), 1475570 (Forma III) e 1475571 (Forma IV).	98
Figura 5	Espectros de absorção na região no infravermelho dos cristalizados de GCV.....	100
Figura 6	Difratogramas de raios X das formas cristalinas de GCV. O difratograma da Forma II foi calculado a partir da estrutura monocristalina (CCDC código de referência 714337).....	102
Figura 7	Curvas TG/DTG obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) dos recristalizados de GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H.....	103
Figura 8	Curvas DTA obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) dos recristalizados de GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H.....	105
Figura 9	Difratogramas de raios X da Forma I, IV e da mistura de ambas formas de GCV.....	107
Figura 10	Fotomicrografias da Forma I de GCV fotografadas no <i>Hot Stage Microscopy</i> a 25°C (A), 225°C (B), 227°C (C) e 237°C (D).....	108
Figura 11	Curvas TG/DTA obtidas a 10°C min ⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL min ⁻¹) da Forma I de GCV.....	109
Figura 12	Difratograma de raios X de GCV. a) experimental (linha vermelha), b) calculado (linha azul).....	110
Figura 13	Célula unitária da Forma I de GCV.....	112
Figura 14	Unidade assimétrica da Forma I de GCV mostrando a numeração dos átomos e elipsóides térmicos com 50% probabilidade.	113
Figura 15	Moléculas de GCV mostrando as ligações de hidrogênio e as principais interações intermoleculares do tipo N-H...O, O-H...O e O-H...N ao longo do eixo cristalográfico b.....	114
Figura 16	Conformação molecular da Forma I e II de GCV. Ambas as	

moléculas estão em sobreposições, Forma I (P21/c) e Forma II (P21) colorida em verde.

116

Figura 17

Interações de ligação de hidrogênio para os polimorfos I e II de GCV. A) Forma I apresentando ligações de H intermoleculares; B) Forma II exibindo as ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular.

116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I		21
CAPÍTULO II		27
Tabela 1	As catorze redes de Bravais, agrupadas em sete sistemas cristalinos.....	39
CAPÍTULO III		58
Tabela 1	Resultado da análise elementar de GCV.....	67
Tabela 2	Parâmetros cinéticos obtidos por meio do Método de Ozawa para o GCV.....	81
Tabela 3	Valores de $1/T$ e $\ln t$ para a construção do Gráfico de Arrhenius.....	82
Tabela 4	Previsão para $\Delta m = 5\%$ nas temperaturas de 25 e 40°C da amostra de GCV.....	83
CAPÍTULO IV		87
Tabela 1	Materiais utilizados para a cristalização do GCV e siglas e formas de identificação dos produtos cristalizados.....	96
Tabela 2	Valores das principais bandas de absorção das formas cristalinas de GCV.....	99
Tabela 3	Valores 2θ característicos das Formas sólidas do GCV e do componente reportado pelo CCDC código de referência 714337 (Forma II).....	101
Tabela 4	Resultado da análise elementar dos recristalizados de GCV....	106
Tabela 5	Dados estruturais da Forma I e da Forma II de GCV.....	111
Tabela 6	Distâncias e ângulos para as ligações de hidrogênio para a Forma I de GCV.....	113

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
AE	Análise Elementar C, H e N
Calc	Calculado
CCDC	<i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CIF	<i>Crystallographic Information File</i>
DI	Dissolução Intrínseca
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
DTA	Análise Térmica Diferencial
DRX	Difratometria de raios X
Ea	Energia de Ativação
Exp	Experimental
FTIR	Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCV	Ganciclovir
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Infravermelho
LATIG	Laboratório de Análise Térmica “Prof. Ivo Giolito”
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R	Constante dos gases
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TG	Termogravimetria
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
VDI	Velocidade de Dissolução Intrínseca

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
β	Razão de aquecimento
C	Carbono (elemento químico)
°C	Graus Celsius
ΔH_{fus}	Entalpia de fusão
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação da entropia
Δm	Variação de massa
H	Hidrogênio (elemento químico)
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kj	Quilojoule
K	Kelvin
ln	Logaritmo neperiano
λ	Comprimento de onda
m	Massa
mW	Miliwatt
mL	Mililitro
mg	Miligrama
N	Nitrogênio (elemento químico)

N_2	Gás nitrogênio
O	Oxigênio (elemento químico)
Pt	Platina (elemento químico)
t	Tempo
T	Temperatura
T_{pico}	Temperatura de pico
T_f	Temperatura de fusão
T_t	Temperatura de transição
T_{tv}	Temperatura de transição virtual

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
CAPÍTULO I: Introdução e objetivos.....	21
1. Introdução.....	22
2. Objetivos.....	24
2.1. Objetivos gerais.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. Referências bibliográficas.....	25
CAPÍTULO II: Importância do polimorfismo no desenvolvimento de fármacos.....	27
Resumo.....	28
1. Introdução.....	29
1.1. Fármacos.....	29
2. Polimorfismo.....	30
2.1. Pseudopolimorfismo.....	34
3. Estruturas cristalinas e características.....	36
4. Impacto do polimorfismo sobre a biodisponibilidade e estabilidade de fármacos.....	40
5. Técnicas de caracterização.....	44
5.1. Difractometria de raios X.....	44
5.2. Técnicas termoanalíticas.....	46
5.3. Outras técnicas de caracterização.....	49
6. Conclusão.....	51
7. Referências bibliográficas.....	52
CAPÍTULO III: Caracterização físico-química e analítica do ganciclovir.....	58
Resumo.....	59
1. Introdução.....	60
2. Objetivos.....	63

3. Material e métodos.....	63
3.1. Material.....	63
3.1.1. Substâncias químicas de referência.....	63
3.2. Métodos.....	63
3.2.1. Equipamentos.....	63
3.3. Difratometria de raios X.....	64
3.4. Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG).....	64
3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	65
3.6. DRX-DSC Combinado.....	65
3.7. Medidas de ponto de fusão.....	66
3.8. Análise elementar.....	66
3.9. Espectroscopia de absorção na região no infravermelho.....	66
3.10. Microscopia eletrônica de varredura.....	66
3.11. Microscopia de placa quente (<i>Hot Stage Microscopy</i>).....	66
6. Resultados e discussão.....	67
7. Conclusão.....	84
8. Referências bibliográficas.....	84
CAPÍTULO IV: Polimorfos de ganciclovir.....	87
Resumo.....	88
1. Introdução.....	89
2. Objetivo.....	91
2.1. Objetivos específicos.....	91
3. Material e Métodos.....	92
3.1. Material.....	92
3.2. Métodos.....	92
3.2.1. Cristalização.....	92
3.2.2. Difratometria de raios X.....	93
3.2.3. Difratometria de raios X por Monocristal.....	93
3.2.4. Termogravimetria/Análise térmica diferencial (TG/DTA).....	93
3.2.5. Análise elementar.....	94

3.2.6. Espectroscopia de absorção na região no infravermelho.....	94
3.2.7. Microscopia de placa quente (<i>Hot stage microscopy</i>).....	94
3.2.8. Conversão de <i>slurry</i>	94
4. Resultados e discussão.....	94
5. Conclusão.....	117
6. Referências bibliográficas.....	117

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Neste Capítulo são apresentadas as justificativas e os aspectos gerais que levaram a escolha do ganciclovir como fármaco de estudo, destacando os principais objetivos deste trabalho. Apresentam-se, também, a maneira como o estudo foi estruturado, indicando as etapas do desenvolvimento da pesquisa.

1. Introdução

O ganciclovir (GCV) é um nucleósido sintético análogo da guanina e estruturalmente similar ao aciclovir (UNITED ..., 2009; MERCK ..., 2006). É um fármaco antiviral, amplamente utilizado no tratamento de infecções por citomegalovírus (CMV) em pacientes com imunidade celular alterada, sobretudo, em indivíduos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) mal controlados ou avançados, pacientes que receberam transplante de medula óssea, ou aqueles que estão sob tratamento quimioterápico ou sob ação de fármacos que inibem o sistema imunológico (GROSS *et al.*, 1990).

O fármaco é eficaz no tratamento e supressão crônica da retinite por CMV, infecção ocular oportunista mais comum e a maior causa da perda da visão em pacientes com AIDS (GROSS *et al.*, 1990). A septicemia é causada por um membro do grupo do herpes vírus, mais conhecido como herpes vírus humano - 5 (HHV-5 ou CMV). A maioria das pessoas está exposta ao CMV, entretanto, a doença só se manifesta em indivíduos imunossuprimidos (GROSS *et al.*, 1990).

O GCV é um composto hidrofílico polar com solubilidade de $2,6 \text{ mg mL}^{-1}$ (água a 25°C) (CYTOVENE-IV, 2010). O fármaco apresenta baixa permeabilidade, portanto é pouco absorvido, reportando uma biodisponibilidade de aproximadamente 5% (BIRON, 2006). Desta forma é considerado pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como fármaco de classe III (SHEN *et al.*, 2011; CUSTODIO; WU; BENET, 2008). Essa baixa biodisponibilidade é creditada à baixa permeabilidade, entretanto, existem poucos trabalhos de investigação sobre a solubilidade do GCV, característica importante relacionada à propriedade do estado sólido (polimorfismo). Sendo, portanto, necessárias mais pesquisas sobre o polimorfismo do fármaco com a finalidade de explicar suas propriedades biofarmacêuticas.

O polimorfismo do GCV foi reportado pela primeira vez por Sarbajna *et al.*, (2011), que indicaram a existência de duas formas anidras (Forma I e II) e duas

hidratadas (Forma III e IV). Entretanto, o *Cambridge Crystallographic Data Center* (CCDC) somente exibia até o momento uma forma anidra do composto, que foi determinada por Kawamura e Hirayama no 2009. Atualmente, tem-se determinado a estrutura cristalográfica de mais duas formas hidratadas denominadas como Forma III e IV (FERNANDES *et al.*, 2016). De acordo com as informações relatadas e dada a importância do polimorfismo e suas implicações no desenvolvimento de formas farmacêuticas, tornam-se necessárias mais pesquisas de investigação que exibam estudos detalhados sobre o comportamento do estado sólido do GCV, medicamento importante no combate das infecções por CMV e que é comercializado mundialmente.

O presente trabalho aborda inicialmente os aspectos gerais da importância do polimorfismo no desenvolvimento de fármacos (CAPÍTULO II), ressaltando o estudo químico do estado sólido, bem como as principais técnicas de caracterização. Na revisão da literatura desse capítulo, também, são citados alguns exemplos de Ingredientes Farmacêuticos Ativos, que marcaram história no fenômeno do polimorfismo.

A parte experimental do trabalho foi dividida em duas etapas (CAPÍTULO III e IV). A primeira etapa (CAPÍTULO III) envolve a caracterização físico-química e analítica do GCV. Esta etapa do estudo foi realizada no Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito (LATIG), localizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A segunda etapa (CAPÍTULO IV) aborda o *screening* do fármaco e a preparação bem-sucedida da Forma I do GCV, identificada como o padrão da *United States Pharmacopoeia* (USP) (SARBAJNA *et al.*, 2011) e a solução de sua estrutura cristalográfica descrita pela primeira vez. Esta etapa do trabalho foi realizada no *Yu Laboratory* localizado no *School of Pharmacy – University of Wisconsin-Madison*.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Caracterizar e explorar o polimorfismo do GCV por meio de um sistema de *screening* pelo método de evaporação lenta de solvente, de modo a auxiliar no desenvolvimento das formas farmacêuticas do fármaco.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterização físico-química e analítica do ganciclovir por meio de difração de raios X, Análise térmica (TG/DTG e DSC), FTIR, análise elementar e microscopia eletrônica de varredura.
- Estudo das transições polimórficas do ganciclovir.
- Estudo cinético da decomposição térmica de fármaco por meio do método isotérmico e não-isotérmico.
- Obtenção das formas polimórficas de ganciclovir a partir de métodos de cristalização.
- Caracterização das formas polimórficas por difração de raios X, Análise térmica (TG/DTG e DSC), FTIR, análise elementar e *Hot Stage Microscopy*.

Figura 1. Fluxograma representativo das etapas realizadas para o desenvolvimento do estudo.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIRON, K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. **Antiviral Research**, v.71, p.154-163, 2006.

CYTOVENE-IV: ganciclovir sodium for intravenous infusion only. Roche Laboratories, 2010. [Package insert].

CUSTODIO, J.M.; WU, C.-Y.; BENET, L.Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews** v.60, p.717-733, 2008.

FERNANDES, J.A.; GALLI, S.; PALMISANO, G.; VOLANTE, P.; MENDES, R.F.; ALMEIDA PAZ, F.A.; MASCIOCCHI, N. Reviewing the manifold aspects of ganciclovir crystal forms. **Crystal Growth & Design**, v.16, p.4108-4118, 2016.

GROSS, J.B.; BOZZETE, S.A.; MATHEWS, W.C.; SPECTOR, S.A.; ABRAMSON, I.S.; McCUTCHAN, J.A.; MENDEZ, T.; MUNGIA, D.; FREEMAN, W.R. Longitudinal study of cytomegalovirus retinitis in acquired immune deficiency syndrome. **Ophthalmology**, v.97, p.681-686, 1990.

KAWAMURA, T.; HIRAYAMA, N. Crystal structure of ganciclovir. **X-ray structure analysis online**, v.25, p.51-52, 2009.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. p.750.

SARBAJNA, R.M.; PREETAN, A.; DEVI, A.S.; SURYANARAYANA, M.V.; SETHI, M.; DUTTA, D. Studies on crystal modifications of ganciclovir. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v.537, p.103-107, 2011.

SHEN, Y.; LU, Y.; JV, M.; HU, J.; LI, Q.; TU, J. Enhancing effect of labrasol on the intestinal absorption of ganciclovir in rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, n.12, p.1415-1421, 2011.

UNITED States Pharmacopeia: USP32. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

CAPÍTULO II

IMPORTÂNCIA DO POLIMORFISMO NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

RESUMO

O presente capítulo teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre a importância do polimorfismo e seu impacto no desenvolvimento de fármacos, com enfoque, sobretudo, nos aspectos relacionados à sua caracterização. O polimorfismo é a capacidade de um material sólido cristalino existir em, no mínimo, duas estruturas cristalinas diferentes com propriedades físico-químicas distintas. De acordo com as condições de produção, dois tipos de polimorfismo podem ser originados, *polimorfismo orientacional* ou de *empacotamento* e *polimorfismo conformacional*. Segundo a relação termodinâmica, os polimorfos podem ser classificados em monotrópico e enantiotrópico. Diversas técnicas podem ser utilizadas na identificação do estado sólido, sendo a difratometria de raios X (DRX) a técnica padrão para sua caracterização, uma vez que permite o estudo da estrutura cristalina. Dentro desta técnica, destacam-se dois métodos, a DRX pelo método do pó e o método do monocristal. Esta última caracteriza-se por proporcionar dados precisos, isto é, identifica os comprimentos das ligações intra e intermoleculares da estrutura cristalina. A calorimetria exploratória diferencial (DSC), técnica de análise térmica, permite a obtenção de dados termodinâmicos, úteis para o estudo da estabilidade relativa dos polimorfos. A partir das informações da literatura, pôde-se concluir que o polimorfismo continua sendo um aspecto relevante para o desenvolvimento de fármacos, pois pode influenciar na biodisponibilidade. E as técnicas físico-químicas e analíticas fundamentais para sua caracterização são DRX pelo método do pó e o método do monocristal. No entanto, o uso individual destas técnicas pode limitar algumas informações, portanto a utilização de outras ferramentas como: a microscopia de placa quente, análise térmica (TG, DTA e DSC), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido (RMN), solubilidade, dissolução intrínseca (DI), entre outras devem ser associadas para maiores informações.

Palavra-chave: Estado sólido. Polimorfismo. Estrutura cristalina. DRX. Análise térmica.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FÁRMACOS

Os fármacos ou ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs do inglês *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) são substâncias químicas, com atividade farmacológica, utilizadas no desenvolvimento de medicamentos. Produtos farmacêuticos que são produzidos, normalmente, sob formas farmacêuticas sólidas como comprimidos, cápsulas, pós, entre outros. Formulações sólidas são preferidas devido a sua maior resistência a ataques mecânicos, químicos e ambientais, devido à precisão de dose na administração ao paciente, e são suficientemente versáteis para a liberação e absorção do fármaco (CUI, 2007; GAVEZZOTTI, 2007; VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001).

O conhecimento das propriedades físicas dos IFAs é de fundamental importância para garantir o sucesso no desenvolvimento de um medicamento, uma vez que foi amplamente demonstrado que muitas substâncias medicamentosas podem existir em mais de uma forma cristalina, ou seja, polimorfos. Fármacos com a mesma composição química, porém com diferente estrutura cristalina (BERNSTEIN, 2002).

Como se sabe, a maioria dos medicamentos são produzidos sob formas farmacêuticas sólidas (SHEKUNOV; YORK, 2000), compostos que podem apresentar diferenças grandes de solubilidade podendo ocorrer alterações na biodisponibilidade do fármaco quando as propriedades físicas do mesmo estão comprometidas (SINGHAL; CURATOLO, 2004). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, os medicamentos de origem sintética estão divididos em três categorias: Os de referência (novos), similares e genéricos.

O primeiro, de referência, são produtos inovadores, que possuem eficácia terapêutica, segurança e qualidade comprovada cientificamente no momento do registro, ou seja, a eficácia e segurança são comprovadas através de estudos clínicos. Desta forma, são utilizados como modelo para os demais medicamentos (similares e genéricos). Estes últimos podem ser inseridos de forma segura no mercado, desde que se comprove a eficácia terapêutica, por meio da equivalência farmacêutica e

biodisponibilidade semelhante ao medicamento de referência, ou seja, devem apresentar mesmo IFA, forma de dosagem, via de administração e bioequivalência ao de referência. No momento do registro ou renovação, estes produtos farmacêuticos devem informar se seus princípios ativos apresentam polimorfismo. No caso de evidenciar o fenômeno, deve-se indicar o método analítico adotado e os resultados dos ensaios preliminares, que determinarão a presença dos prováveis polimorfos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014).

Sabe-se que o polimorfismo é um dos aspectos que mais afeta a biodisponibilidade do fármaco, comprometendo a eficácia do medicamento. Entretanto, este aspecto não mostra efeito significativo sobre a biodisponibilidade quando se trata de fármacos de elevada solubilidade (Classe III), uma vez que a permeação é a etapa limitante para sua absorção. O fato só pode ser considerado crítico quando se trata de fármacos de baixa solubilidade aquosa, ou seja, Classe II e IV (AMIDON, 1995).

Vale ressaltar que a avaliação dos polimorfos durante o processo de desenvolvimento do medicamento faz parte do sistema de controle de qualidade. Portanto, é necessário certificar-se que a produção industrial e os estudos de estabilidade não originem variações na forma cristalina do fármaco. Deste modo, garante-se que o produto final esteja em conformidade com as exigências das agências regulatórias, sem comprometer a proteção da propriedade intelectual de outras estruturas cristalinas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre a importância do polimorfismo e seu impacto no desenvolvimento de fármacos, com enfoque, sobretudo, nos aspectos relacionados à sua caracterização.

2. POLIMORFISMO

Define-se polimorfismo como a possibilidade de um material sólido cristalino existir em, no mínimo, duas formas ou estruturas cristalinas diferentes, que apresentam propriedades físico-químicas distintas (BERNSTEIN, 2002; YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998). As variações da forma cristalina têm sua origem nas condições específicas em que o fármaco é obtido, ou seja, no processo ou sequência

de síntese, como purificação, cristalização, secagem e estocagem, bem como no processo de produção de medicamentos. Deste modo, a compreensão do polimorfismo e seu controle químico são muito importantes, uma vez que podem influenciar a estabilidade física, a solubilidade, a velocidade de dissolução e, portanto, a biodisponibilidade do fármaco.

De acordo com as condições de produção do fármaco, dois tipos de polimorfismo podem ser originados, *polimorfismo orientacional* ou de *empacotamento* e *polimorfismo conformacional*. O primeiro ocorre em moléculas relativamente rígidas, que adotam diferentes estruturas tridimensionais por meio de diferentes arranjos intramoleculares (DATTA; GRANT, 2004). Como exemplo deste tipo, podem-se citar o etambutol e o acetaminofeno (RUBIN-PREMIER *et al.*, 2004; HENG; WILLIAMS, 2006).

O segundo tipo de polimorfismo, *conformacional*, ocorre em moléculas flexíveis que se dobram em diferentes conformações, capazes de empacotarem-se em estruturas cristalinas alternativas (DATTA; GRANT, 2004). Como exemplo deste tipo temos o modafinil, que apresenta sete formas polimórficas, das quais a forma I é estável e a III é metaestável. Ambas moléculas apresentam duas conformações independentes de cada um destes polimorfos, as quais são enantiômeros (PASCHOAL, 2007; PAUCHET *et al.*, 2004). Além do modafinil, podem-se citar, também, as cinco formas do piracetam, as da ranitidina e das rotigotina (BUČAR; LANCASTER; BERNSTEIN, 2015; CRUZ-CABEZA; BERNSTEIN, 2014). Embora, a diferença entre o polimorfismo *orientacional* e *conformacional* pareça ser artificial, as disposições das moléculas no empacotamento cristalino geram conformações distintas, com interações inter e intramoleculares diferentes, que podem influenciar nas propriedades físicas e químicas dos sólidos. Na FIGURA 1 são apresentados alguns exemplos destes tipos de polimorfismo.

FIGURA 1. Polimorfismo orientacional ou de empacotamento: RS-EB2HCl a) Forma II, b) Forma I e Polimorfismo conformacional: c) 4-cianofeniloxi, d) Rotigotina. Adaptado de RUBIN-PREMIER, et al 2004, CRUZ-CABEZA; BERNSTEIN, 2014 e BUČAR; LANCASTER; BERNSTEIN, 2015.

Apesar dos IFAs existirem sob duas ou mais estruturas cristalinas, apenas uma forma é termodinamicamente estável, a uma determinada temperatura e pressão. As outras são consideradas metaestáveis, porém se converterão à forma estável com o passar do tempo (YU; REUTZEL; STEPHENSON, 1998). Em geral, a forma polimórfica estável exibe um ponto de fusão mais alto, menor solubilidade e maior estabilidade química (YU; REUTZEL; STEPHENSON, 1998), ou seja, consegue manter sua integridade dentro dos limites especificados sem perder suas propriedades físico-químicas e características.

A estabilidade termodinâmica relativa é, possivelmente, a propriedade física mais importante de um fármaco polimórfico (YU, 1995), uma vez que influencia na seleção da melhor forma cristalina para o desenvolvimento do medicamento. De acordo com a relação termodinâmica, os polimorfos podem ser classificados em monotrópico e enantiotrópico. O primeiro se caracteriza pela transição de uma estrutura cristalina metaestável para outra mais estável (YU, 1995), este tipo de transição é frequentemente irreversível e acontece em uma só direção. O segundo (enantiotrópico) apresenta uma conversão reversível e algumas vezes é bem definido, se caracteriza pela existência de uma temperatura de transição (T_t) que inverte a ordem de estabilidade dos polimorfos (FIGURA 2) (YU, 1995).

De acordo com Burger e Ramberger (1979) a estabilidade termodinâmica das formas polimórficas pode ser determinada mediante a aplicação da calorimetria exploratória diferencial (DSC). Eles estabeleceram duas regras: a) *Regra do calor de transição* e b) *Regra do calor de fusão*, ambas proporcionam uma predição confiável da existência de monotropia e enantiotropia. Segundo a primeira regra, dois polimorfos têm relação monotrópica se um deles é sempre estável abaixo do ponto de fusão (T_f) de ambas as formas sólidas (FIGURA 2). Como resultado, um dos polimorfos pode sofrer uma transformação exotérmica para outro mais estável, e então se pode supor que existe um ponto de transição virtual (T_{tv}) acima da T_f (YU, 1995). No entanto, se for observada uma transição endotérmica entre as duas formas sólidas, pode-se dizer que há uma T_t abaixo da T_f de ambos polimorfos (FIGURA 2), ou seja, as duas formas são enantiotrópicas (YU, 1995). De acordo com a segunda regra, o polimorfo que apresenta menor temperatura de fusão terá maior entalpia de fusão (calor de fusão), então as duas formas serão enantiotrópicas, caso contrário serão monotrópicas (LOHANI; GRANT, 2006; YU, 1995; BURGER; RAMBERGER, 1979)

A estabilidade termodinâmica é determinada pela diferença de suas energias livres, ΔG , representada pela seguinte equação: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. A entalpia (ΔH) é o resultado da diferença da energia estrutural (rede cristalina) entre os polimorfos, e entropia (ΔS) é a diferença das vibrações da rede e a desordem (YU, 1995; YU; REUTZEL; STEPHENSON, 1998). Desta forma, o polimorfo mais estável a uma

determinada pressão e temperatura terá menor energia livre e será a forma termodinamicamente mais estável, enquanto que os outros serão considerados como metaestáveis.

A identificação de um fármaco polimórfico pode ser realizada por meio de diagramas de fase como energia de Gibbs (energia livre) vs temperatura, pressão vs temperatura e solubilidade vs temperatura. Diagramas que são de suma importância na interpretação das relações polimórficas do fármaco, pois possuem informações termodinâmicas próprias de cada estrutura, (YU; REUTZEL; STEPHENSON, 1998; YU, 1995), as quais são relevantes para o desenvolvimento do medicamento.

FIGURA 2. Relação de estabilidade entre dois polimorfos (pressão constante). Adaptado de Yu, 1995.

2.1. PSEUDOPOLIMORFISMO

Pseudopolimorfismo é uma expressão utilizada na indústria farmacêutica que implica indeterminação de *solvatos* e *hidratos* (BERNSTEIN, 2002). Trata-se de formas

cristalinas, em que moléculas do solvente fazem parte da estrutura do cristal e que, usualmente, são obtidos por meio de um processo de cristalização. No caso em que a água for a molécula solvatante, o composto a cristalizar será um *hidrato*. No entanto, se a substância estiver livre de água o sólido a formar será um *anidro* (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

O composto que contém outro tipo de solvente na sua estrutura será denominado *solvato*. Este pode apresentar uma ampla gama de comportamentos, devido à interação soluto-solvente, e muitas vezes cumpre um papel fundamental na ligação dos átomos da rede cristalina (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Os *solvatos* podem ser muito estáveis, quando o solvente está fortemente ligado e faz parte integrante da estrutura cristalina; desta forma o processo de dessolvatação é difícil de acontecer (BERNSTEIN, 2002). Entretanto, existe o caso em que isto pode ocorrer, o que levaria ao colapso e à modificação da estrutura cristalina original para uma nova estrutura (*solvato polimórfico*). Por outro lado, existem *solvatos* que perdem facilmente o solvente. Isto geralmente ocorre quando as moléculas do solvente estão fracamente ligadas, porém não apresentam o retículo cristalino destruído (BERNSTEIN, 2002), este tipo de estrutura é conhecido como *solvato pseudopolimórfico* (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Conforme exposto anteriormente, os *hidratos* podem apresentar maior ou menor solubilidade quando comparados às formas anidras. A baixa solubilidade dos *hidratos* está relacionada à existência de ligações de hidrogênio das moléculas de água, que mantêm o retículo cristalino forte e estável. Embora as formas *anidras*, normalmente, apresentem maior solubilidade do que os *hidratos*, há relatos que demonstram o contrário. Em tais circunstâncias, a água promove a separação das moléculas, impedindo que as moléculas do retículo cristalino alcancem um nível máximo de interação. Como resultado, o retículo cristalino enfraquece, levando ao aumento da solubilidade. Como exemplo deste caso, pode citar o hidrato de eritromicina (AULTON, 2005).

A modificação estrutural de um composto resulta em sólidos cristalinos que apresentam diferentes propriedades físico-químicas, incluindo ponto de fusão, entalpia de fusão, pressão de vapor, solubilidade, índice de refração, densidade, dureza, compressibilidade e cor (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001). O ponto de fusão, definido como a temperatura na qual a rede cristalina muda de fase (ou de estado de agregação), é um parâmetro fundamental, e, como foi comentado anteriormente, sua variação permite obter diferentes valores de capacidade de calor, com o qual é possível estabelecer uma relação entre duas estruturas cristalinas, em monotrópico ou enantiotrópico (YU, 1995).

De modo geral, não é recomendável utilizar *hidratos* e *solvatos* para fins farmacêuticos, uma vez que a instabilidade dos hidratos aumenta em temperaturas elevadas causando desidratação durante o processo de secagem (KRATOCHVÍL, 2011). No caso de *solvatos* a presença de vapores orgânicos pode ser observada como impureza e se estes fossem evidenciados como tóxicos, obviamente, a substância seria inadequada. Entretanto, é possível melhorar a estabilidade química destas formas sólidas, desde que se utilizem excipientes e processos de formulação apropriados que garantissem a adequada biodisponibilidade do fármaco (SINGHAL; CURATOLO, 2004). Desta forma, a presença de *hidratos* e *solvatos* devem ser verificadas e monitoradas durante todas as etapas de desenvolvimento do fármaco, dado que a maioria das formas cristalinas pode ser obtida mudando-se o tipo de solvente.

3. ESTRUTURAS CRISTALINAS E CARACTERÍSTICAS

Os sólidos podem se apresentar como estruturas cristalinas ou amorfas, ou uma combinação de ambos. Estas espécies estão constituídas por átomos, moléculas ou íons, que estão unidos por ligações químicas como ligações metálicas, iônicas, covalentes, forças de van der Waals, interações π - π , entre outros. A estrutura física e as propriedades dos sólidos dependem, principalmente, do arranjo estrutural e do tipo de forças que unem aos átomos e moléculas (CRUZ-CABEZA; BERNSTEIN, 2014), os quais se empacotam de tal forma que geram uma estrutura microscópica ordenada, que se repete continuamente. Esse empacotamento em três dimensões é conhecido como rede cristalina.

Entre as propriedades fundamentais das estruturas cristalinas temos a periodicidade, simetria, homogeneidade e anisotropia. As duas primeiras são responsáveis pela morfologia. A periodicidade é responsável pela distribuição espacial periódica dos átomos e íons na estrutura tridimensional (célula unitária), em que os átomos se encontram sempre a distâncias específicas, conhecida como período de translação e medida em Angstrom ($\text{\AA}$). A simetria corresponde à figura tridimensional que por intermédio dos operadores de reflexão, rotação, inversão e roto-inversão, justificam a existência de elementos como: planos de simetria, centros de inversão e eixos de rotação ou rotação-inversão (CARENAS; GINER; GONZÁLES; POZO, 2014).

As outras propriedades dos cristais que não estão relacionados com a morfologia são a homogeneidade e anisotropia. A primeira envolve uma semelhança composicional, enquanto que a anisotropia é um fenômeno relacionado com a direção do cristal (orientação) (CARENAS; GINER; GONZÁLES; POZO, 2014). Isto é, direções diferentes dos eixos ou vetores cristalográficos, por exemplo, $[001]$ e $[111]$ geram valores distintos de condutividade elétrica e de índice de refração. A esse direcionamento denomina-se anisotropia e ela está relacionada com a variação da distância atômica ou iônica segundo a direção cristalográfica.

Toda estrutura cristalina pode ser estudada a partir de uma pequena unidade estrutural (célula unitária) que, por translação (repetição), gera a rede cristalina, ou seja, o padrão de ordenamento tridimensional de átomos e moléculas. A forma e o tamanho de uma célula unitária podem ser determinados a partir de três eixos ou vetores fundamentais (a , b , c) (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001). Estes vetores definem a célula unitária em termos de distância. As relações específicas da distância desses vetores e os ângulos entre eles (α , β , γ) podem gerar catorze células unitárias, conhecidos como redes de Bravais e estas podem ser agrupadas em sete sistemas cristalinos de diferentes formas e tamanhos: Triclínico, monoclínico, ortorrômbico, romboédrico, tetragonal, hexagonal e cúbico (TABELA 1). As redes de Bravais são representadas por símbolos, a célula primitiva ou simples é simbolizada por P ou R (célula primitiva romboédrica), enquanto que as células não primitivas são

representadas pelos símbolos *I*, *F* ou *C*, quando se trata de células unitárias de corpo centrado, face centrada ou base centrada, respectivamente (TABELA 1).

A descrição mais detalhada dos parâmetros e ângulos dos sete sistemas cristalinos é apresentada na TABELA 1. As moléculas dos fármacos geralmente formam células unitária triclinicas, monoclinicas e ortorrômbicas.

TABELA 1

As catorze redes de Bravais, agrupadas em sete sistemas cristalinos

Sistema Cristalino	Relação entre os eixos	Relação entre os ângulos	Simples (P)	Corpo centrado (I)	Base centrada (C)	Face centrada (F)
Triclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Romboédrico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

4. IMPACTO DO POLIMORFISMO SOBRE A BIODISPONIBILIDADE E ESTABILIDADE DE FÁRMACOS

Diversos trabalhos na literatura relatam a importância dos estudos de formas polimórficas para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que muitas das propriedades físico-químicas de uma substância variam quando sua estrutura cristalina é alterada.

Um polimorfo pode apresentar algumas propriedades indesejáveis relacionadas às suas outras formas possíveis, que podem impossibilitar o desenvolvimento adequado de medicamentos. Aspectos como a solubilidade, fluidez, morfologia, e higroscopicidade podem dificultar operações tecnológicas como a compressão, pulverização/moagem, liofilização, secagem, etc (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001). Portanto, recomenda-se a utilização de fases puras de polimorfos, bem como a validação de seus processos industriais, com a finalidade de garantir a biodisponibilidade apropriada do fármaco, evitando possíveis formas polimórficas indesejáveis.

É importante controlar a forma cristalina de um fármaco durante todas as etapas de desenvolvimento do medicamento, uma vez que pode influenciar significativamente na estabilidade. Um polimorfo pode se transformar em outro que seja termodinamicamente estável. Isto pode acontecer com simples mudanças ambientais de pressão e temperatura durante a produção, distribuição e armazenamento do medicamento (SINGHAL; CURATOLO, 2004; VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001). A utilização da forma metaestável durante a produção leva frequentemente à instabilidade do produto. Desta forma, seu monitoramento é indispensável para garantir a adequada biodisponibilidade do fármaco.

Como foi comentado anteriormente muito dos IFAs podem ser obtidos em mais de uma estrutura cristalina, mas o fenômeno do polimorfismo só teve grande repercussão na indústria farmacêutica a partir do caso de ritonavir em 1998, em que o fármaco apresentou problemas de solubilidade, devido ao aparecimento de um segundo polimorfo termodinamicamente mais estável (Forma II), que ocasionou

problemas na sua formulação original, causando ao laboratório Abbott um grande prejuízo financeiro. Todas as tentativas para desenvolver a Forma I fracassaram, porém, uma decisão devia ser tomada. Dois enfoques foram abordados, primeiro desenvolver uma formulação para acondicionar a Forma II e segundo estabelecer um processo de sínteses controlado para produzir consistentemente a Forma I. Durante este último enfoque os cientistas identificaram que três intermediários “*BOC-core-succinate*, *5-Wing* e *2,4-Wing acid*” eram cruciais na identificação do problema. Eles observaram que “*2,4-Wing acid*” se convertia por reação *in situ* ao éster ativo de “*2,4-Wing acid*”, que foi o material de partida para sintetizar a Forma II do ritonavir (CHEMBURKAR *et al.*, 2000).

Outro exemplo clássico sobre a influência do polimorfismo na dissolução e biodisponibilidade é o caso do cloridrato de cloranfenicol. O pró-fármaco existe em três formas polimórficas, a forma A termodinamicamente estável, e as formas B e C metaestável e instável, respectivamente. Para se conseguir a adequada absorção do pró-fármaco, este deve ser hidrolisado pelas esterases intestinais. Evidenciou-se que a forma B foi mais bioativa e solúvel que a forma A, demonstrando maior absorção oral (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

A atorvastatina cálcica, também, é um fármaco que apresenta polimorfismo. É um inibidor da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, utilizada para diminuir os níveis de colesterol (JIN; ULRICH, 2010; CHADHA *et al.*, 2012). O fármaco apresenta baixa solubilidade (0,1 mg/mL) devido à instabilidade do cálcio, portanto é pouco absorvido, mostrando baixa biodisponibilidade (KHAN; DEGHAN, 2011).

O efeito do polimorfismo sobre a estabilidade da rifaximin, antibiótico de amplo espectro, também foi observado por Viscomi *et al.*, (2008). Os pesquisadores evidenciaram que o fármaco existe em cinco formas cristalinas (α , β , γ , δ e ϵ). A Forma α é termodinamicamente estável, portanto pouco solúvel. Estudos de dissolução *in vivo* mostraram padrões farmacocinéticos diferentes entre essas formas, sendo as Formas γ e δ as que exibiram maior biodisponibilidade (BLANDIZZI; VISCOMI; SCARPIGNATO, 2015).

A carbamazepina é outro fármaco que apresenta polimorfismo, quatro formas anidras (I, II, III e IV) foram identificadas como triclinico, trigonal, monoclinico simples (*P*) e monoclinico centrado (*C*), respectivamente (BRICE; HAMMER, 1969). Estudos de farmacocinética demonstraram resultados semelhantes tanto das formas anidras como das dihidratadas (KAHELA *et al.*, 1983). E foi confirmado que a taxa de dissolução inicial da carbamazepina na Forma III foi superior à Forma I, enquanto que os valores de *AUC* da Forma I foram superiores à Forma III. Essa discrepância parece estar atribuída à rápida transformação da Forma III para a Forma I nos fluidos gastrointestinais (KOBAYASHI *et al.*, 2000).

O efeito do polimorfismo também foi observado por Takahashi e colaboradores (1985). Os pesquisadores evidenciaram que o fostedil, antagonista do cálcio, existe em duas formas polimórficas, I e II, a forma II é mais solúvel e, portanto, alcança maiores concentrações sanguíneas, não obstante, esta forma polimórfica pode se transformar na forma menos solúvel (I) mediante um processo simples de pulverização (TAKAHASHI; NAKASHIMA; ISHIHARA, 1985). Por outro lado, a adição de microcristais de celulose durante este processo de pré-formação, aumenta a resistência à moagem, diminuindo a conversão polimórfica.

Como foi observado, a forma polimórfica pode afetar a velocidade de dissolução de um fármaco. Tal fato foi evidenciado por Sanphui e colaboradores (2011) nos estudos da cristalização da nimesulida, em que os autores descreveram duas formas polimórficas (I e II) do fármaco, relatando diferenças entre seus perfis de dissolução (SANPHUI; SARMA; NANGIA, 2011).

A influência do polimorfismo também foi observada por Park *et al.* (2010). Os autores caracterizaram três formas cristalinas de fluconazol, sendo duas anidras (formas I e II) e uma monoidratada. Os autores observaram que o polimorfo anidro II apresentou maior velocidade de dissolução intrínseca (*VDI*) quando foi comparado aos demais. Além disso, evidenciaram, por meio do perfil de *DI*, a diminuição da inclinação da reta, o que foi observado 20 minutos após a realização do ensaio. Esse fato foi correlacionado à transformação da forma polimórfica anidra II metaestável para a forma monoidratada do fármaco. As medidas de *DSC* da superfície dos discos, realizadas

após os ensaios de DI, confirmaram as transformações cristalinas do polimorfo anidro II para a forma monoidratada.

Estudos, baseados na transformação do polimorfo C de mebendazol, fármaco anti-helmíntico, mostraram que a forma polimórfica C foi estável até 179°C e transformou-se para a forma termodinamicamente mais estável (Forma A) à temperatura maior de 180°C (DE VILLIERS, 2005). Outro estudo relacionado com a estabilidade acelerada do fármaco demonstrou que comprimidos desenvolvidos com a Forma C evidenciaram pequenas quantidades da Forma A, após seu armazenamento. Essa transformação reduziu significativamente a vida de prateleira, bem como a dissolução do fármaco (BRITS; LIEBENBERG; De VILLIERS, 2010). A caracterização físico-química dos polimorfos do mebendazol, também, foi estudada por Roque Flores, (2011) que demonstrou que as diferentes formas polimórficas (A e C) influenciaram na solubilidade e na dissolução intrínseca do fármaco. A influência do polimorfismo em outro fármaco anti-helmíntico, o albendazol, também foi constatada por Roque Flores, (2011). A autora observou diferenças de VDI de duas formas polimórficas diferentes desse fármaco, que foram evidenciadas por meio de perfis de dissolução intrínseca.

O impacto do polimorfismo, também, foi evidenciado na biodisponibilidade do antibiótico de novobiocina. Apesar da forma cristalina ser quimicamente mais estável do que a forma amorfa, esta é pouco absorvida e não fornece níveis plasmáticos terapeuticamente adequados. Portanto, é recomendada a adição de supressores de cristalização no preparo de suspensões da forma amorfa que é terapeuticamente ativa (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999).

A fenilbutazona, fármaco anti-reumático, mostrou diferentes formas polimórficas e solvatadas (MATSUNAGA; NAMBU; NAGAI, 1976; IBRAHIM; PISANO; BRUNO, 1977; HOSOKAWA; DATTA; SHETH, 2004). Duas formas são conhecidas como anidras (I e II), e exibem diferentes solubilidades, taxas de dissolução e absorção oral. A Forma II mostrou ser mais solúvel do que a Forma I. E a Forma III se apresenta como a mais instável (MATSUNAGA; NAMBU; NAGAI, 1976).

A oxitetraciclina, antibiótico de amplo espectro, apresenta dois polimorfos diferentes (LIEBENBERG, 1999). O fármaco mostrou diferenças tanto nos níveis sanguíneos dos pacientes como na dissolução *in vitro* de comprimidos devido a diferenças nas formas polimórficas (BRICE; HAMMER, 1969; GROVES, 1973).

Conforme descrito acima diferenças de solubilidade de várias formas sólidas de um mesmo fármaco podem levar a problemas na biodisponibilidade. Em vista desta preocupação, a diretriz regulatória de substâncias medicamentosas da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos tem mostrado maior interesse regulatório no estudo e compreensão das propriedades do estado sólido. Atualmente, para a aprovação de um novo fármaco a FDA determina que métodos analíticos adequados precisam ser usados para caracterizar e identificar polimorfos, hidratos e formas amorfas do IFA. Além disso, destaca a importância do controle da forma cristalina do fármaco durante todas as etapas de desenvolvimento do medicamento e durante seu tempo de vida de prateleira (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2007, VIPPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001). Por todos os relatos apresentados se fazem necessárias a identificação, caracterização e avaliação das diferentes formas cristalinas de um fármaco para garantir a adequada biodisponibilidade dos medicamentos.

Embora as estruturas cristalinas tenham sido e continuem sendo tema de intensas pesquisas, o fenômeno do polimorfismo ainda representa um desafio científico, uma vez que é difícil prever se uma substância cristalizará em uma ou várias formas. De acordo com Walter McCrone, 1965 “*O número de formas conhecidas para um determinado composto é proporcional ao tempo e à energia investida na pesquisa do composto.*” (BERNSTEIN, 2002).

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X (DRX)

A DRX é uma das técnicas mais importantes na caracterização e identificação de sistemas polimórficos, uma vez que permite determinar as estruturas cristalinas, ou seja, fornece informações detalhadas sobre suas dimensões, orientação e presença de

defeitos. A utilização de raios X deve-se ao fato de que sua radiação é de alta energia, tem comprimento de onda muito pequeno (0,05 a 10 nm), o que permite interagir com estruturas, em que a distância de suas ligações químicas está entre 0,1 e 0,2 nm. Dentro desta técnica podem-se destacar dois métodos, a DRX pelo método do pó e a cristalografia de raios X de monocristal. A primeira tem sido empregada na identificação qualitativa de fases sólidas individuais bem como na mistura de fases. Os resultados proporcionados por este método, geralmente, são satisfatórios. No entanto, a preparação da amostra para a aplicação desta técnica pode gerar variações e incertezas entre as medidas de uma mesma substância. De fato, estas mudanças podem acontecer durante a moagem, utilizada muitas vezes para reduzir a orientação preferencial do cristal, que pode levar à amorfização, deformação de partículas, decomposição, reação em estado sólido ou à contaminação. Outras modificações como a polimerização, transformação de estado amorfo, entre outras podem ocorrer e estas são induzidas pelos raios X (BERNSTEIN, 2002). O segundo método, a cristalografia de raios X de monocristal destaca-se por proporcionar dados precisos e detalhados da estrutura cristalina e molecular dos sólidos, ou seja, identifica os comprimentos das ligações intramoleculares e intermoleculares, ângulos de ligação, entre outros (BERNSTEIN, 2002). Além disso, é considerado pela FDA como o método que evidência de forma definitiva o polimorfismo de fármacos. Ambas as técnicas podem auxiliar-se simultaneamente, uma vez que a DRX pelo método do pó pode obter informações não adquiridas ou não solucionadas pela cristalografia de raios X de monocristal, ou seja, pode oferecer uma solução na determinação de estruturas cristalinas desde que se utilizem programas “software” que permitam determinar o tamanho, a forma e a simetria da célula unitária.

O método de Rietveld é uma das técnicas que proporciona melhor evidência estrutural de um polimorfo devido à sua maior sofisticação na identificação e quantificação das diferentes fases polimórficas de um fármaco. O método emprega difratogramas totais de DRX, obtidos pelo método do pó, para refinamento de parâmetros da rede cristalina de fases. O refinamento da estrutura cristalina é possível desde que se tenham as informações do modelo estrutural como parâmetros da célula unitária, grupo espacial, conformação molecular e posições atômicas (YU; REUTZEL;

STERPHENSON, 1998). No entanto, apesar do grande avanço desta técnica, o método ainda é limitado, pois só pode ser aplicado para estruturas cristalinas conhecidas.

5.2. TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS

A Análise Térmica abrange um grupo de técnicas, a partir das quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida em função do tempo ou da temperatura enquanto essa substância é submetida a uma programação controlada de temperatura (MATOS; MERCURI; ARAÚJO, 2009; WENDLANDT, 1986). As técnicas mais largamente empregadas são a termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

A termogravimetria (TG) é a técnica da análise térmica na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas adquirem composição química fixa, definida e constante. Também, permite determinar a temperatura em que a amostra começa a se decompor. Desse modo, pode-se acompanhar o andamento de reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição, entre outras alterações físicas ou químicas, desde que haja variação de massa.

No método termogravimétrico convencional ou dinâmico, são registradas curvas de massa da amostra (m), em função da temperatura (T), ou do tempo (t), conforme a equação 1:

$$m = f(T \text{ ou } t) \quad (1)$$

Essas curvas são denominadas **curvas termogravimétricas** ou, simplesmente, **curvas TG**.

Na termogravimetria derivada (DTG), as curvas são registradas a partir das curvas TG e correspondem à derivada primeira da variação de massa em relação ao

tempo (dm/dt) que é registrada em função da temperatura ou do tempo, isto é, conforme a equação 2:

$$dm/dt = f(T \text{ ou } t) \quad (2)$$

ou ainda, à derivada primeira da variação de massa em relação à temperatura (dm/dT) que é registrada em função da temperatura ou do tempo, isto é, conforme a equação 3:

$$dm/dT = f(T \text{ ou } t) \quad (3)$$

Deve ser compreendido que uma curva DTG não contém mais informações do que uma curva TG integral, obtida sob as mesmas condições experimentais. Ela, simplesmente, apresenta os dados de forma mais visualmente acessível, permite a rápida determinação da temperatura em que a taxa de variação de massa é máxima, T_{pico} e auxilia na definição das temperaturas iniciais e finais para os cálculos de perda de massa a partir da curva TG.

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica de análise térmica, na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Quando uma amostra sofre alterações de temperatura devido a um evento endotérmico ou exotérmico em função do aquecimento ou resfriamento a que é submetida, registra-se o fluxo de calor diferencial necessário para mantê-los na mesma temperatura. A diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência é devida às reações químicas (decomposição, combustão), mudança de estado (fusão, sublimação) ou transições cristalinas. Os eventos são apresentados na forma de picos. Considerando o DSC de fluxo de calor, os picos ascendentes caracterizam eventos exotérmicos, enquanto os descendentes os endotérmicos.

A curva DSC permite estudar fenômenos tanto de origem física quanto química, que envolvem variações entálpicas (transições de primeira ordem), a área contida sob o pico é representativa da variação de entalpia, ΔH , referente ao evento térmico ocorrido.

No caso de transições de segunda ordem, observa-se mudança de linha base, sem picos, por exemplo, a transição vítrea é evidenciada por uma variação na linha base no sentido endotérmico.

Tanto quanto possível é recomendável a obtenção de dados, em conjunto, de TG/DTG e DSC, os quais quando associados podem permitir uma melhor caracterização de materiais, visto que enquanto a TG/DTG indica todo tipo de evento térmico relacionado a variações de massa, a DSC detecta eventos associados ou não a perda de massa, como no caso de eventos térmicos de origem física. Por exemplo, mudança de estado físico (fusão) pode ser inequivocamente atribuída a partir da curva DSC, se na mesma faixa de temperatura não forem observados, nas curvas TG/DTG, eventos de variação de massa. Na maioria dos casos é difícil a interpretação dos processos térmicos sem a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC obtidas nas mesmas condições experimentais.

Em ciências farmacêuticas, a TG/DTG e DSC são as técnicas mais utilizadas para caracterização de fármacos sólidos e excipientes, assim como as possíveis interações desses componentes em formulações (MATOS; MERCURI; ARAÚJO, 2009), desde que seja associado a outras técnicas de caracterização como DRX. A determinação da pureza de uma dada espécie pode ser obtida por DSC a partir da avaliação da endoterma de fusão, desde que o processo de mudança de estado ocorra sem que haja a decomposição térmica da espécie. A caracterização de fármacos polimorfos pode ser realizada pela associação das técnicas de TG/DTG e DSC, esta última distingue os polimorfos a partir das propriedades termodinâmicas e proporciona a relação de estabilidade entre os mesmos (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998). Estudos envolvendo estabilidade térmica de produtos farmacêuticos podem ser desenvolvidos por TG/DTG aplicando-se métodos cinéticos isotérmicos e/ou não isotérmicos. Informações adicionais relacionadas a efeitos de estocagem em função de temperatura e tempo, também, podem ser obtidas. Essas reações que podem ocorrer conduzem ou não à inativação do fármaco na formulação (MATOS; MERCURI; ARAÚJO, 2009; LOTTER; MALAN; VILLIERS, 1997; VENKATARAM; KHOHLOKWANE; WALLIS, 1995). Vários estudos já foram desenvolvidos neste campo,

por exemplo, Venkataram; Khohlokwane; Wallis, (1995) relataram a avaliação da compatibilidade de vários excipientes comumente usados com indometacina a partir do DSC. Lotter; Malan; Villiers, (1997), também reportaram o estudo da compatibilidade de excipientes empregando as técnicas de DSC e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na avaliação do albendazol e closantel.

5.3. OUTRAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

As outras técnicas físico-químicas e analíticas utilizadas na caracterização de polimorfos são a espectrometria no infravermelho (IV), espectroscopia Raman, microscopia óptica, espectroscopia de ressonância magnética nuclear no estado sólido (RMN), solubilidade ou dissolução intrínseca, entre outras.

A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta útil na investigação das propriedades moleculares. A técnica baseia-se na medição dos modos de vibração, geralmente, de átomos ligados, com absorções na faixa de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. A FTIR é o método atual de escolha para monitorar as características das ligações de átomos (SILVERSTEIN *et al.*, 2012, SALARY; YOUNG, 1998). Desta forma, as transformações conformacionais dos polimorfos podem ser avaliadas, uma vez que essas transformações levam às diferenças nos espectros evidenciando deformações das vibrações do composto.

A espectroscopia Raman e FTIR são técnicas úteis para análise de sólidos, ambas geram informações químicas semelhantes, entretanto, fundamentam-se em diferentes princípios físicos, ou seja, a espectroscopia no IV se baseia no fenômeno de absorção enquanto que a espectroscopia Raman no fenômeno de dispersão. Esta última apresenta inúmeras vantagens, uma vez que permite caracterizar pequenas quantidades de amostra sólida, dispensando a etapa de preparação da amostra, ou seja, as medições podem ser realizadas sem o preparo da amostra, sendo sensíveis às estruturas, conformações e ambiente químico de um composto orgânico. Desta forma, estas técnicas tornam-se potentes na caracterização e identificação de fármacos polimórficos. Cloridrato de propanolol, cloridrato de ranitidina, tolbutamida, meprobamato, carbamazepina e rifampicina são alguns exemplos de fármacos que

apresentam polimorfismo e que foram caracterizados mediante a aplicação destas técnicas (AUER; GRIESSER; SAWATZKI, 2003; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999; ALVES, 2007).

A microscopia de placa quente ou termomicroscopia tem sua origem na microscopia óptica e é uma das técnicas mais antigas e utilizadas no estudo de polimorfismo, uma vez que fornece informações sobre as propriedades morfológicas e ópticas (birrefringência, índices de refração, cor de dispersão, etc.) das partículas. A técnica tem sido considerada uma importante ferramenta, sobretudo quando está associada à calorimetria exploratória diferencial (DSC), pois permite a visualização e interpretação da transformação polimórfica do fármaco em determinadas temperaturas, ampliando mais sua potencialidade (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998).

A RMN no estado sólido tem sido bastante utilizada na pesquisa sobre polimorfismo, uma vez que fornece diversas informações comparáveis às obtidas por DRX (BUGAY, 1993). A técnica proporciona informação sobre o ambiente dos átomos individuais, particularmente, a mudança do entorno local do átomo. Isto é, se um composto apresenta dois polimorfos, um dos átomos de carbono de um determinado polimorfo pode possuir geometria molecular ligeiramente diferente quando comparada com o mesmo carbono do outro polimorfo. A mudança do entorno do átomo pode ser evidenciada, devido à conformação diferente da estrutura, que pode gerar diferentes interações de deslocamento químico.

Outra ferramenta importante na caracterização de polimorfos é a dissolução intrínseca (DI). A técnica permite avaliar a solubilidade aparente de diferentes formas polimórficas, por meio de seus perfis de dissolução, e a transformação de uma forma polimórfica instável a outra estável durante o ensaio de dissolução (PARK *et al.*, 2010).

O conhecimento da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) de fármacos é importante, não só na predição de problemas de absorção relacionados à biodisponibilidade, como também na determinação de parâmetros termodinâmicos (entalpia, entropia, etc.) associados à transição de fase cristalina, pois fármacos de

diferentes estruturas cristalinas podem apresentar grandes diferenças de energia livre, que levariam a diferenças significativas na VDI (YU *et al.*, 2004).

Apesar do grande potencial destas técnicas na caracterização de fármacos sólidos, o uso individual das mesmas é insuficiente, sendo necessária a utilização e a associação dos resultados obtidos por outras técnicas para garantir sua identificação e caracterização (RUSTICHELLI *et al.*, 2000; YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998).

6. CONCLUSÃO

A partir das informações da literatura, pôde-se concluir que o polimorfismo de fármacos continua sendo um aspecto relevante para a indústria farmacêutica, sobretudo, nas áreas relacionadas ao desenvolvimento e produção de fármacos, visto que o mesmo pode influenciar na biodisponibilidade e na estabilidade do fármaco. Entre as técnicas físico-químicas e analíticas fundamentais e padrões para identificação e caracterização a DRX pelo método do pó e a cristalografia de raios X de monocristal são as mais adequadas uma vez que proporcionam dados precisos e detalhados da estrutura molecular, além de quantificar as diferentes fases polimórficas de um fármaco (Método do Rietveld). No entanto, o uso individual destas técnicas pode não fornecer algumas informações importantes dos polimorfos, portanto, a utilização de outras técnicas de caracterização tais como: a análise térmica (TG, DTA e DSC), FTIR, espectroscopia Raman, RMN e DI devem ser associadas para proporcionar informações adicionais que não são observadas quando se aplica apenas as técnicas de DRX.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC 60, de 10 de outubro de 2014**. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares e dá outras providências. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867994/%282%29RDC 60 2014 COMP.pdf/ae0590e1-0f17-41d0-8c3c-061f4b903c57](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867994/%282%29RDC+60+2014+COMP.pdf/ae0590e1-0f17-41d0-8c3c-061f4b903c57). Acesso em: 03 maio 2017.

ALVES, R. **Estudo Termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose**. São Paulo, 2007. 113p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmácia – Universidade de São Paulo.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.3, p.413-420, 1995.

AUER, M.E.; GRIESSER, U.J.; SAWATZKI, J. Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v.661/662, p.307-317, 2003.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystal**. Oxford Clarendon Press: Oxford University Press, 2002 New York. p.410.

BLANDIZZI, C.; VISCOMI, G.C.; SCARPIGNATO, C. Impact of crystal polymorphism on the systemic bioavailability of rifaximin, an antibiotic acting locally in the gastrointestinal tract, in healthy volunteers. **Drug Design Development and Therapy**, v.9, p.1-11, 2015.

BRITS, M.; LIEBENBERG, W.; De VILLIERS, M.M. Characterization of polymorph transformations that decrease the stability of tables containing the WHO essential drug mebendazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, p.1138-1151, 2010.

BUČAR, D.-K.; LANCASTER, R.W.; BERNSTEIN, J. Disappearing polymorphs revisited. **Angewandte Chemie - International Edition**, v.54, p.6972-6993, 2015.

BUGAY, D.E. Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy: theory and pharmaceutical applications. **Pharmaceutical Research**, v.10, n.3, p.317-327, 1993.

BURGER, A.; RAMBERGER, R. On the polymorphism of pharmaceutical and other molecular crystal. I **Mikrochimica Acta**, v.72, n.3, p.259-271, 1979.

BURGER, A.; RAMBERGER, R. On the polymorphism of pharmaceutical and other molecular crystal. II **Mikrochimica Acta**, v.72, n.3, p.273-316, 1979.

BRICE, G.W.; HAMMER, H.F. Therapeutic nonequivalence of oxytetracycline capsules. **Journal of the American Medical Association**, v.208, p.1189-1190, 1969.

BYRN, S.R.; PFEIFFE, R.R.; STOWELL, J.G. **Solid-state chemistry of drugs**. 2.ed. West Lafayette: SSCI, 1999. p.576.

CARENAS, F.M.B.; GINER, R.J.L.; GONZÁLES, Y.J.; POZO, R.M. **Geología**. Madrid: Ediciones Paraninfo, 2014. p.36-38.

CHADHA, R.; KUHAD, A.; ARORA, P.; KISHOR, S. Characterization and evaluation of pharmaceutical solvates of atorvastatin calcium by thermoanalytical and spectroscopic studies. **Chemistry Central Journal**, v.6, p.114-129, 2012.

CHEMBURKAR, S. R.; BAUER, J.; DEMING, K.; SPIWEK, H.; PATEL, K.; MORRIS, J.; HENRY, R.; SPANTON, S.; DZIKI, W.; PORTER, W.; QUICK, J.; BAUER, P.; DONAUBAUER, J.; NARAYANAN, B.A.; SOLDANI, M.; RILEY, D.; MCFARLAND, K. Dealing with the impact of ritanovir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. **Organic Process Research & development**, v.4, p.413-417, 2000.

CRUZ-CABEZA, A.J.; BERNSTEIN, J. Conformational Polymorphism. **Chemical Reviews**, v.114, p.2170-2191, 2014.

CUI, Y. A material science perspective of pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.339, p3-18, 2007.

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

DE VILLIERS, M.M.; TERBLANCHE, R.J.; LIEBENBERG, E.S.; DEKKER, T.G.; SONG, M. Variable temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorphism C of mebendazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, p.435-441, 2005.

GROVES, M.J. Solution tests on generic brands of oxytetracycline tablets. **Pharmaceutical Journal**, v.210, p.318-319, 1973.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2.ed. São Paulo: Pharmabook, 2011. 690p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Guidance for Industry: ANDAs: **Pharmaceutical Solid Polymorphism**: Chemistry, Manufacturing and Controls Information, 2007. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf>>. Acesso em: 21 abril 2017.

GAVEZZOTTI, A. A solid-state chemist's view of the crystal polymorphism of organic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, n.9, p.2232-2241, 2007.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v.248, p.1-59, 1995.

HENG, J.Y.Y.; WILLIAMS, D.R. Wettability of paracetamol polymorphic forms I and II. **Langmuir**, v.22, n.16, p.6905-6909, 2006.

HOSOKAWA, T.; DATTA, S.; SHETH, A.R.; Grant, D.J.W. Relationships between crystal structures and thermodynamic properties of phenylbutazone solvates. **Crystal Engineering Community**, v.6, p.243-249, 2004.
IBRAHIM, H.G.; PISANO, F.; BRUNO, A. Polymorphism of phenylbutazone: Properties and comparisnal behavior of crystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.66, p.669-673, 1977.

JIN, Y.S.; ULRICH, J. New crystalline solvates of atorvastatin calcium. **Chemical Engineering & Technology**, v.33, p.839-844, 2010

KAHELA, P.; AALTONEN, R.; LEWING, E.; ANTILA, M.; KRISTOFFERSSON, E. Pharmacokinetics and dissolution of two crystalline forms of carbamazepine. **International Journal of Pharmaceutical**, v.14, p.103-112, 1983.

KHAN, F.N.; DEGHAN, M.H.G. Enhanced bioavailability of atorvastatin calcium from stabilized gastric resident formulation. **AAPS Pharmaceutical Science Technology**, v.12, 1077-1086, 2011.

KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S.; YAMAMOTO, K. Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate. **International Journal of Pharmaceutical**, v.193, p.137-146, 2000.

KRATOCHVÍL, B. Solid forms of pharmaceutical molecules. In: Jaroslav Šesták; Jiří J. Mareš; Pavel Hubík. **Glassy, amorphous and nano-crystalline materials**: thermal physics, analysis, structure and properties, New York: Springer., 2011, p.129-140.

LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M.M.; WURSTER, D.E.; SWANEPOEL, E.; DEKKER, T.G.; LOTTER, A.P. The effect of polymorphism on powder compaction and dissolution properties of chemically equivalent oxytetracycline hydrochloride powders. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.25, p.1027-1033, 1999.

LOHANI, S.; GRANT, D.J.W. Thermodynamic of polymorphs. In Hilfiker, Rolf. **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. John Wiley & Sons, 2006 Weinheim, Germany. p.25-28.

LOTTER, A.P.; MALAN, C.E.P.; VILLIERS, M.M. Evaluation of compatibility of table excipients with albendazole and closantel using DSC and HPLC. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.23, n.6, p.533-537, 1997.

MATOS, J.R.; MERCURI, L.P.; ARAUJO, G.L.B. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos. In: Sílvia Storpirtis; José Eduardo Gonçalves; Chang Chiann; María Nella Gai. (Org.). Ciências Farmacêuticas: **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2009, v. Único, p.32-65.

MATSUNAGA, J.; NAMBU, N.; NAGAI, T. Physicochemical approach to biopharmaceutical phenomena. Polymorphism of phenylbutazone. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.24, p.1169-1172, 1976.

PARK, H.J.; KIM, M.-S.; KIM, J.-S.; CHO, W.; PARK, J.; CHA, K.-H.; KANG, Y.-S.; HWANG, S.-J. Solid-state carbon NMR characterization and investigation of intrinsic dissolution behavior of fluconazole polymorphic, anhydrate form I and II. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.58, n.9, p.1243-1247, 2010.

PASCHOAL, A.R. **Polimorfismo conformacional no modafinil investigado através de cálculos DFT e espectroscopia vibracional**. Fortaleza, 2007. 95p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Física - Universidade Federal do Ceará.

PAUCHET, M.; GERVAIS, C.; COURVOISIER, L.; COQUEREL, G. Successful application of the derived crystal packing (DCP) model in resolving the crystal structure of a metastable polymorph of ($\pm$) modafinil. **Crystal Growth Desing**, v.4, p.1143-1151, 2004.

ROQUE FLORES, R.L. **Caracterização físico-química e desenvolvimento de metodologia para a avaliação da dissolução intrínseca de albendazol e mebendazol**. São Paulo, 2011. 80p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmácia – Universidade de São Paulo.

RUBIN-PREMIER, J.M.; BERNSTEIN, J.; HARRIS, R.K.; EVANS, I.R.; GHI, P.Y. [R,S]-Ethambutol dihydrochloride: Variable-temperature studies of a dimorphic system

with very similar packing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.93, n.11, p.2810-2819, 2004.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M.C.; FICARRA, R.; TOMMASINI, S. Solid-state study polymorphic drugs: carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.23, p.41-54, 2000.

SALARY, A.; YOUNG, R.E. Application of attenuated total reflectance FTIR spectroscopy to the analysis of mixtures of pharmaceutical polymorphs. **International Journal of Pharmaceutical**, v.163, p.157-166, 1998.

SANPHUI, P.; SARMA, B.; NANGIA, A. Phase transformation in conformational polymorphs of nimesulide. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.6, p.2287-2299, 2011.

SHEKUNOV, B., YORK, P. Crystallization process in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v.211, p.122-136, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 490p.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.335-347, 2004.

TAKAHASHI, Y.; NAKASHIMA, K.; ISHIHARA, T. Polymorphism of fostedil: chracterization and polymophic change by mechanical treatments. **Drug Development and Industry Pharmacy**, v.11, n.8, p.1563-1985, 1985.

VENKATARAM, S.; KHOHLOKWANE, M.; WALLIS, S.H. Differential scanning calorimetry as a quick scanning technique for solid state stability studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.21, n.7, p.847-855, 1995.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITTAI, H.G.; GRANT, D.J.W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.48, p.3-26, 2001.

VISCOMI, G.C.; CAMPANA, M.; BARBANTI, M.; GREPIONI, F.; POLITO, M.; CONFORTINI, D.; ROSINI, G.; RIGHI, P.; CANNATA, V.; BRAGA, D. Crystal forms of rifaximin and their effect on pharmaceutical properties. **Crystal Engineering Community**, v.10, p.1074-1081, 2008.

WENDLANDT, W.W. **Thermal analysis**. 3.ed. New York: Willey, 1986. 814p. (Chemical analysis, v.19).

YU, L. Inferring thermodynamic stability relationship of polymorphs from melting data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.84, n.8, p.996-984, 1995.

YU, L.X.; CARLIN, A.S.; AMIDON, G.L.; HUSSAIN, A.S. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.270, p.221-227, 2004.

YU, L.; REUTZEL, S.M.; STERPHENSON, G. A. Physical characterization of Polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.1, n.3, p.118-127, 1998.

CAPÍTULO III

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ANALÍTICA DO GANCICLOVIR

RESUMO

O objetivo desse capítulo foi realizar a caracterização do ganciclovir (GCV) e investigar a presença de polimorfos em amostra comercial do fármaco. Utilizaram-se, neste estudo, técnicas físico-químicas e analíticas DRX, TG/DTG e DSC associadas a outras técnicas de caracterização, como FTIR, MEV, análise elementar e *Hot Stage Microscopy*. Os percentuais de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) obtidos por análise elementar para a amostra de GCV revelaram valores próximos aos calculados estequiometricamente. As pequenas diferenças observadas foram atribuídas à presença de água superficial e/ou de hidratação, conforme os resultados de TG/DTG, que indicaram Δm de cerca de 2,5% até 150°C. As curvas TG/DTG evidenciaram quatro etapas de perda de massa, os dois primeiros eventos corresponderam à liberação de água superficial e de hidratação e ocorreram na faixa de 25 a 190°C. A terceira etapa ocorreu entre 196 a 275°C e correspondeu à Δm de 35,9%, devido à liberação de um produto gasoso com massa molar de cerca de 90 g mol⁻¹. Observou-se no equipamento convencional de ponto de fusão a formação de um sólido castanho escuro. A quarta etapa de decomposição térmica ocorreu entre 300 a 600°C, com Δm de 61,6%, totalizando 99,5% de perda de massa. A curva DSC revelou sete eventos térmicos. Os dois primeiros eventos térmicos foram associados à desidratação do fármaco, o evento com T_{pico} em 190°C foi exotérmico e de origem física, uma vez que não houve Δm nessa temperatura, e foi atribuído à transição cristalina do fármaco, que ocorreu após a desidratação do GCV hidratado. O difratograma de raios X da amostra de GCV evidenciou os picos de difração característicos do GCV hidratado 5° e 8,5° (2 θ) (Forma III). Além disso, foi evidenciado ao redor de 7° e 8° (2 θ), dois picos de difração característicos da Forma I e II, respectivamente. Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas permitiram caracterizar a amostra de GCV. Além disso, foi possível identificar a presença das formas polimórficas do fármaco.

Palavras-chave: Ganciclovir. Polimorfismo. DRX. Análise térmica. *Hot Stage Microscopy*.

1. INTRODUÇÃO

O ganciclovir (GCV), designado pela IUPAC como 2-amino-9-(1,3-dihidroxiopropan-2-iloximetil) -3H-purina-6-ona ($C_9H_{13}N_5O_4$, $M = 255,23 \text{ g mol}^{-1}$) (FIGURA 1) é um nucleósido sintético análogo da guanina e estruturalmente similar ao aciclovir (UNITED ..., 2009; MERCK ..., 2006). É um fármaco antiviral, amplamente utilizado no tratamento de infecções por citomegalovírus (CMV) em pacientes com imunidade celular alterada, sobretudo, em indivíduos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) mal controlado ou avançado, pacientes que receberam transplante de medula óssea, ou aqueles que estão sob tratamento quimioterápico ou sob ação de fármacos que inibem o sistema imunológico (GROSS *et al.*, 1990).

FIGURA 1. Estrutura molecular de GCV.

O fármaco é eficaz no tratamento e supressão crônica da retinite por CMV, infecção ocular oportunista mais comum e a maior causa da perda da visão em pacientes com AIDS (GROSS *et al.*, 1990). A septicemia é causada por um membro do grupo do herpes vírus, mais conhecido como herpes vírus humano - 5 (HHV-5 ou CMV). A maioria das pessoas está exposta ao CMV, entretanto, a doença só se manifesta em indivíduos imunossuprimidos (GROSS *et al.*, 1990).

A AIDS, infecção que atinge o sistema imune humano se caracteriza pela redução no número de linfócitos CD4, que torna o indivíduo altamente vulnerável às doenças

oportunistas. Estima-se que existem aproximadamente 37 milhões de pessoas infectadas com o AIDS no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No entanto, apesar do crescimento da epidemia, o desenvolvimento de novos fármacos antirretrovirais, bem como o progresso no diagnóstico e no tratamento das infecções oportunistas têm permitido melhorar a qualidade de vida dos pacientes infectados.

De acordo com o Ministério da Saúde e a Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (CNT-DST/AIDS) o Brasil tem investido nos últimos anos, aproximadamente, R\$ 1.200.000 no combate de DST/AIDS (AIDS ..., 2011), e foi o primeiro país em desenvolvimento a oferecer uma terapia antirretroviral gratuita aos portadores do HIV e/ou pacientes com AIDS, programa que vem sendo financiado pelo Governo Federal, através do Ministério da Saúde (BRASIL, 1999). Desta forma, o Brasil torna-se uma das nações líderes no combate e no suporte ao tratamento das infecções por HIV.

O GCV é um composto hidrofílico polar com solubilidade de $2,6 \text{ mg mL}^{-1}$ (água a 25°C) (CYTOVENE-IV, 2010). O fármaco apresenta baixa permeabilidade, portanto é pouco absorvido, reportando uma biodisponibilidade de aproximadamente 5% (BIRON, 2006). Desta forma é considerado pelo Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) como fármaco de classe III (SHEN *et al.*, 2011; CUSTODIO; WU; BENET, 2008). Essa baixa biodisponibilidade é creditada à baixa permeabilidade, entretanto, existem poucos trabalhos de investigação sobre a solubilidade do GCV, característica importante relacionada à propriedade do estado sólido (polimorfismo). Sendo, portanto, necessárias mais pesquisas sobre o polimorfismo do fármaco com a finalidade de explicar suas propriedades biofarmacêuticas.

O polimorfismo do GCV foi reportado pela primeira vez por Sarbajna *et al.*, (2011), que indicaram a existência de duas formas anidras (Forma I e II) e duas hidratadas (Forma III e IV). Entretanto, o *Cambridge Crystallographic Data Center* (CCDC) somente exibia até o momento uma forma anidra do composto, que foi determinada por Kawamura e Hirayama no 2009. Atualmente, tem-se determinado a estrutura cristalográfica de mais duas formas hidratadas denominadas como Forma III e

IV (FERNANDES *et al.*, 2016). De acordo com as informações relatadas e dada a importância do polimorfismo e suas implicações no desenvolvimento de formas farmacêuticas, tornam-se necessárias mais pesquisas de investigação que exibam estudos detalhados sobre o comportamento do estado sólido do GCV, medicamento importante no combate das infecções por CMV e que é comercializado mundialmente.

As agências regulatórias FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos e ANVISA do Brasil exigem, no momento do registro de um medicamento, o fornecimento de informações dos possíveis polimorfos do fármaco, além da metodologia analítica adequada para sua caracterização de modo a garantir a segurança e qualidade dos mesmos. (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2007; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014). A Conferência Internacional de Harmonização (ICH) (1999) em seu tópico de qualidade Q6A provê um guia breve de como e quando os polimorfos devem ser monitorados e controlados. Entretanto, ao lado de uma lista de vários parâmetros físico-químicos e diferentes técnicas físico-químicas e analíticas, até o momento, não há nenhuma informação ou recomendação consistente sobre como realizar os referidos testes. Atualmente no país existe a necessidade de maiores investimentos na caracterização de fármacos, fase crucial que assegura a qualidade dos medicamentos. Portanto, faz-se necessário mais estudos de investigação de modo a proporcionar informações consistentes para a caracterização de fármaco.

Dentre as técnicas físico-químicas e analíticas mais utilizadas na caracterização de fármacos polimórficos, estão descritas, a difratometria de raios X (DRX), a análise térmica (DSC, TG/DTG), a espectrometria no infravermelho, a espectroscopia Raman, a ressonância magnética nuclear no estado sólido, a microscopia eletrônica de varredura, entre outras (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998). A DRX é considerada a técnica padrão, pois proporciona melhor evidência estrutural do polimorfo. Isto se deve à sua maior sofisticação na identificação e quantificação de sólidos. Por outro lado, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornece dados termodinâmicos que ajudam a estabelecer a relação da estabilidade relativa. No entanto, para garantir o sucesso do estudo polimórfico outras ferramentas potenciais de caracterização devem ser usadas

(MATOS; MERCURI; ARAÚJO, 2009; BERNSTEIN, 2002, YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização físico-química do GCV e investigar a presença de polimorfos na amostra comercial do fármaco. Utilizaram-se, neste estudo, técnicas físico-químicas e analíticas como difratometria de raios X (DRX), análise térmica (TG/DTG e DSC) associada a outras técnicas de caracterização, como espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise elementar e *Hot stage microscopy*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foi analisada uma amostra de GCV, cedida por uma indústria farmacêutica, com as seguintes especificações: pó branco, cristalino, isento de impurezas visíveis; umidade 0,6% e impurezas totais 0,5%.

3.1.1. Substâncias químicas de referência

Substâncias padrão de calibração: $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Zn^0 e In^0 (pureza 99.99%) para calibração e/ou verificação das calibrações dos equipamentos de análise térmica.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Equipamentos

Técnica	Equipamento e procedência
TG	Termobalança modelo TGA 51 (Shimadzu)
DSC	Célula de DSC-50 (Shimadzu)
TG/DTA	Sistema DTG 50 (Shimadzu)
Análise Elementar	Analizador de CHN modelo 2400 (Perkin-Elmer)
FTIR	Espectofotômetro modelo MB100 (Bomem)
DRX	Difratômetro modelo D5000 (Siemens Bruker)

3.3. Difractometria de raios X

As amostras foram colocadas em um porta-amostra de plástico e os dados foram coletados por um difratômetro Siemens Bruker modelo D5000, de raio 200,5 mm, com tubo de geração $\text{CuK}\alpha$, filtro de Ni (para absorver as radiações branca e $\text{K}\beta$), comprimento de onda médio $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ($\text{CuK}\alpha$), com fenda de divergência de 0,2 mm e fenda de espalhamento de 8 mm, fenda Soller primária e secundária de $2,5^\circ$, com detector sensível a posição (PSD) LynxEye, com aceitação angular de 4.1° , operando em 40 kV e 40 mA de tensão e corrente do tubo, respectivamente. A varredura, em modo contínuo, foi feita com tempo de exposição de 2 s por passo médio ($\sim 0,02^\circ$ em 2θ) na faixa entre 2° e 40° (2θ). O tempo total de aquisição foi da ordem de 40 min.

3.4. Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas a partir da termobalança modelo TGA-51 (Shimadzu), no intervalo de temperatura de 25 a 600°C , com razão de aquecimento (β) de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 50 mL min^{-1}), utilizando cadinho de Pt, contendo cerca de 15 mg de amostra. Antes dos experimentos, foi obtida uma curva em branco, na mesma programação de temperatura, para ser utilizada para subtração de linha base. A verificação das condições da instrumentação foi realizada pela obtenção das curvas TG/DTG de uma amostra padrão de $\text{CaC}_2\text{O}_4.\text{H}_2\text{O}$, que apresenta três perdas de massa características.

O estudo cinético não-isotérmico foi realizado a partir de ensaios termogravimétricos pelo método de Ozawa. Os ensaios foram realizados sob atmosfera dinâmica de ar sintético (50 mL min^{-1}) utilizando as seguintes razões de aquecimento: 5; 7,5; 10; 12,5 e $15^\circ\text{C min}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas entre 25 e 700°C . Foi utilizado um cadinho de Pt contendo cerca de 15 mg de amostra. Para o tratamento dos dados, utilizou-se o modelo proposto por Ozawa, para uma perda de massa definida em cerca de 10%, conforme programa de análise cinética desenvolvido pela *Shimadzu*. O coeficiente angular (*slope*) do gráfico que correlaciona $\text{Log } \beta$ vs. $1/T$ (K^{-1}) fornece a energia de ativação do processo de decomposição térmica. Os valores do fator frequência (A) e ordem de reação foram obtidos também neste estudo cinético. A ordem

de reação foi obtida a partir do gráfico que correlaciona a massa residual da amostra com tempo reduzido em minutos (KOGA, 2013; CIDES *et al.*, 2006).

O estudo cinético isotérmico foi realizado a partir de ensaios termogravimétricos realizados sob atmosfera dinâmica de ar sintético (50 mL min^{-1}). A escolha das temperaturas de isotermas foi baseada na curva termogravimétrica obtida em modo dinâmico ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$). Foram escolhidas temperaturas de isotermas (220, 225, 230, 235 e 240°C) situadas entre os valores de temperatura em que dm/dt deixou de ser zero e a T_{onset} . Os ensaios foram realizados até perda de 5% da massa inicial, utilizando cadinho de Pt contendo cerca de 15 mg de amostra.

3.5. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas a partir da célula calorimétrica modelo DSC-50 (Shimadzu), entre 25 e 500°C com β de $10^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL min^{-1}), em cadinho de Al fechado contendo massa cerca de 2 a 3 mg.

Antes dos ensaios, foi obtida uma curva em branco na mesma programação de temperatura para verificar as condições do equipamento. A linha base não apresentou variação maior que $\pm 0,5 \text{ mW}$ no intervalo de temperatura utilizado, indicando que a instrumentação estava adequada para o uso.

A calibração do equipamento foi verificada utilizando padrões de In^0 e Zn^0 com pureza 99,99%. O procedimento consiste em verificar a resposta do equipamento tanto para os valores de ΔH como para os valores de temperatura, que são medidos a partir do ΔH e evento de fusão. Para verificação do calor medido, foi utilizado apenas o In^0 ($\Delta H_{\text{fusão}} = 28,6 \text{ J mol}^{-1}$, $T_{\text{fusão}} = 156,6^{\circ}\text{C}$) enquanto, para verificação da temperatura utilizou-se tanto as temperaturas de fusão do In^0 com do Zn^0 ($T_{\text{fusão}} = 419,5^{\circ}\text{C}$).

3.6. DRX-DSC combinado.

Os difratogramas de raios X e as curvas de DSC foram obtidos a partir do Sistema de difração de raios X Multiuso SmartLab (Rigaku), com tubo de geração de $\text{Cu-K}\alpha$. A varredura, em modo contínuo, foi feita com tempo de exposição de 2 s por passo médio ($\sim 0,02^{\circ}$ em 2θ) na faixa entre 3° até 35° (2θ). As curvas DSC foram obtidas no intervalo

de temperatura de 25 a 350°C com β de 5°C min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹).

3.7. Medidas de ponto de fusão

As medidas de fusão e o comportamento térmico de GCV foram realizados no equipamento Eletrothermal modelo 9100 até a temperatura de 300°C. As medidas foram realizadas em tubo capilar com aproximadamente 1 mm de diâmetro.

3.8. Análise elementar

Os teores dos elementos C, N e H da amostra de ganciclovir e de seus produtos de recristalização foram obtidos utilizando o equipamento Elemental Analyzer, modelo 2400 CHN (Perkin Elmer) no Laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

3.9. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho do ganciclovir foram registrados na faixa de 4000 a 350 cm⁻¹ em pastilha de KBr (cerca de 2% da amostra de GCV foram dispersas em KBr) utilizando o espectrofotômetro FTIR Bomen modelo MB100 no Laboratório da Central Analítica do IQ-USP.

3.10. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das amostras foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), modelo LEO 440I (Carl Zeiss). Foi empregado, como fonte emissora, o filamento de tungstênio. As amostras foram montadas em suportes de alumínio ("stubs"), em fita condutora de dupla face de carbono com um filme de, aproximadamente, 15 nm de espessura. As condições das medidas foram de 20 kV e 150 pA.

3.11. Microscopia de placa quente (*Hot Stage Microscopy*)

As fotomicrografias do GCV foram registradas a partir do microscópio polarizado BX53 (Olympus, Hamburgo, Alemanha) equipado a uma câmera monocromática e a

uma placa quente de kofler. Os ensaios foram realizados entre 25 a 300°C com β de 10°C min⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram determinados os teores de CHN por análise elementar para verificar se a amostra recebida era correspondente a uma de GCV anidra ou hidratada e se os resultados eram compatíveis com o referido fármaco. A TABELA 1 lista os resultados de análise elementar. Os percentuais encontrados experimentalmente de C, H e N foram muito próximos daqueles calculados estequiometricamente e estando em concordância aos relatados na literatura (MERCK ..., 2006) e podendo ser comparados com a amostra de GCV de fórmula molecular C₉H₁₃N₅O₄. As pequenas diferenças observadas nos percentuais de carbono e nitrogênio foram atribuídas à presença de água superficial e/ou de hidratação, conforme os resultados de TG/DTG que indicaram perda de massa de cerca de 2,5% até a temperatura de 150°C. Recalculando os percentuais, considerando-se a amostra com 97,5% do fármaco (anidra), de C e N foram, respectivamente, 41,29% e 26,75%, concordante com os valores obtidos experimentalmente.

TABELA 1: Resultado da análise elementar de GCV

Dados	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio
Experimental	41,24	5,18	26,84
Calculado	42,35	5,13	27,45
Considerando 2,5%	41,29	5,18	26,75

Na FIGURA 2 são apresentados os difratogramas de raios X da amostra de GCV e das formas polimórficas do fármaco, calculados a partir de suas estruturas cristalinas (monocristal) e obtidas do CCDC. Observaram-se picos de difração bem definidos em torno de 5° e 8,5° da posição 2 θ , bem como a presença de outros picos ao redor de 6°, 12,5°, 17°, 18°, 19°, 21°, 22°, 25,5°, 26° e 34,3° (2 θ), característicos do GCV hidratado (CHAN; HUONG, 1987). Entretanto, segundo Sarbajna *et al.* 2011 e Fernandes *et al.*

2016 a presença destes picos (5° e 6°) na posição 2θ seriam característicos das formas polimórficas III e IV do GCV, respectivamente, ou seja, correspondem às formas hidratadas do fármaco. Também, é possível evidenciar a existência de um pico de difração predominante em $8,5^\circ$ (2θ), característico da Forma I do fármaco. De acordo com essas informações é possível pressupor que a amostra de GCV trata-se de uma mistura polimórfica.

FIGURA 2. Difratomogramas de raios X da amostra de GCV e das Formas I, III e IV. Adaptado de ROQUE FLORES, *et al.*, manuscrito em preparação (Forma I) e CCDC - código de referência 1475570 (Forma III) e 1475571 (Forma IV).

As curvas TG/DTG da amostra de GCV (FIGURA 3) evidenciaram que o fármaco apresentou quatro etapas de perda de massa. A primeira ocorreu entre 25 a 118°C, a segunda na faixa de 118 a 180°C, com Δm total de 2,5%, que corresponde à liberação de água superficial e/ou de hidratação. As curvas DSC (FIGURAS 5 e 6) mostraram nessa faixa de temperatura dois eventos endotérmicos, indicando a desidratação da amostra.

A terceira etapa ocorreu entre 220 a 320°C e corresponde à perda de massa de 35,9%, equivalente à liberação de um produto gasoso com massa molar de aproximadamente 90 g mol⁻¹. Evidenciou-se a formação de um sólido castanho escuro, (FIGURA 4), tanto observado no equipamento de ponto de fusão, como no resíduo isolado do ensaio de TG até 319°C. Essa coloração caracteriza o início da carbonização da amostra. A quarta etapa de decomposição térmica ocorreu entre 320 e 600°C, com perda de massa de 61,6%, correspondente à degradação do produto formado na etapa anterior e carbonização, totalizando 99,5% de perda de massa.

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

O terceiro evento em 190°C é exotérmico e foi evidenciado numa faixa de temperatura em que as curvas TG/DTG não mostraram perda de massa, portanto, é de origem física e pode ser atribuído a uma transição cristalina, que ocorreu após processo de desidratação do GCV hidratado (CHAN; HUONG, 1987). Sarbajna et al. 2011 e Fernandes et al. 2016 atribuíram esse comportamento à presença do polimorfo I, visto que constataram nesse intervalo de temperatura um evento exotérmico característico do fármaco (SARBAJNA *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2016).

FIGURA 3. Curvas TG/DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min^{-1}) da amostra de GCV.

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

O quarto evento ($249,6^{\circ}\text{C}$) é endotérmico sendo correlacionado com a terceira perda de massa observada nas curvas TG/DTG (FIGURA 5), na faixa de temperatura entre 235 e 275°C indicando claramente decomposição térmica do fármaco. Além disso, o aquecimento lento da amostra em aparelho convencional de medição de ponto de fusão evidenciou visualmente o escurecimento do material, confirmando o início da decomposição térmica do GCV sem a ocorrência da fusão. Os três últimos eventos térmicos são exotérmicos e foram relacionados com a quarta perda de massa observadas nas curvas TG/DTG e se referem à decomposição do produto formado na terceira etapa. Entre 275 e 400°C a Δm ocorre lentamente ($\sim 8\%$) e entre 400 e 600°C esta evidencia-se mais rapidamente com Δm de aproximadamente 60% . O escurecimento da amostra indica que houve carbonização e o material carbonáceo foi eliminado quase que completamente na temperatura de 600°C .

FIGURA 5. Curvas de DSC e TG/DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min^{-1}) da amostra de GCV.

Na FIGURA 6 está ilustrada a curva TG, obtida sob atmosfera de ar, sobreposta com a curva de DSC obtida entre 25 e 500°C sob atmosfera dinâmica de N_2 da amostra de GCV. Neste caso, a curva DSC apresenta seis eventos térmicos com as seguintes T_{pico} : 50 ; 150 ; 189 ; 225 ; 249 e 473°C . Os dois primeiros eventos (50 e 150°C) corresponderam ao processo de desidratação da amostra (polimorfo III e IV), e o terceiro exotérmico (189°C) foi atribuído à transição cristalina do fármaco com liberação de energia para a formação do polimorfo I (SARBAJNA *et al.*, 2011; FERNADES *et al.*, 2016). O evento em 225°C é endotérmico (não foi observado na curva DSC obtida sob atmosfera de ar, FIGURA 5, porque sob atmosfera oxidante a decomposição térmica é antecipada) correspondendo à fusão do composto formado na etapa anterior seguida da recristalização para a forma mais estável do GCV (polimorfo II). De fato, a curva TG não indicou perda de massa nessa faixa de temperatura, o evento térmico é de origem

física e pode ser inequivocamente atribuído a uma transição cristalina. O evento endotérmico (249°C) foi correlacionado com a terceira perda de massa das curvas TG/DTG (FIGURA 3 e 6), e corresponde à fusão com decomposição da forma polimórfica II. O último evento foi atribuído à decomposição térmica do material com carbonização e eliminação do material carbonáceo formado.

FIGURA 6. Curvas de TG (atmosfera de ar) e DSC (atmosfera de N₂) obtidas a 10°C min⁻¹ da amostra de GCV.

Os resultados obtidos a partir das curvas de TG/DTG e DSC (FIGURAS 3 e 6) estão em concordância com as observações realizadas na análise de DRX, uma vez que o fármaco mostrou comportamento característico do GCV hidratado (CHAN; HUONG, 1987).

A FIGURA 7 apresenta a curva de DSC e os difratogramas de raios X, obtidos para a mesma amostra durante o processo de aquecimento do fármaco, empregando o sistema DRX-DSC simultâneo. Três eventos térmicos foram observados na curva DSC

com as seguintes T_{pico} : 188°C, 222°C e 246°C. O primeiro evento exotérmico em 188°C é de origem física e é atribuído à liberação de energia com conversão para uma nova estrutura cristalina do fármaco, uma vez que foi observado no difratograma de raios X (FIGURA 7), nessa mesma temperatura, a ausência do pico de difração a 5° na posição 2 θ , característico do GCV anidro e o aparecimento de dois novos picos de difração em torno de 12,5 e 25,7° (2 θ), particular do polimorfo I do fármaco (SARBAJNA *et al.*, 2011).

O segundo evento endotérmico, em 222°C, corresponde à fusão seguida da recristalização da estrutura cristalina formada na etapa anterior (polimorfo I), visto que próximo a essa temperatura se evidenciaram picos de difração (FIGURA 7) em torno de 7,5°, 11,5°, 16,8°, 22,8°, 24° e 29° na posição 2 θ , característicos da forma polimórfica II do GCV (SARBAJNA *et al.*, 2011).

O evento endotérmico a 246°C corresponde à fusão com decomposição do polimorfo II, uma vez que próximo a 245°C o difratograma da amostra não evidenciou picos de difração de raios X (FIGURA 7). De fato, esses resultados, também, foram observados na FIGURA 6, e confirmou-se que a decomposição do GCV ocorreu a 246°C, como evidenciada nas curvas TG/DTG (FIGURA 3). De acordo com esses resultados pode-se indicar que o polimorfo II é a forma polimórfica mais estável do GCV a 240°C.

O perfil da curva DSC obtida a partir do sistema DRX-DSC simultâneo (FIGURA 7) apresentou algumas variações em relação à curva de DSC (FIGURA 6). Esse fato parece estar relacionado com as condições experimentais utilizadas nos ensaios de DSC (ver Pag. 59). Como se sabe alguns fatores instrumentais como a razão de aquecimento (β), a vazão do gás e as características da atmosfera utilizada podem influenciar no perfil da curva DSC, deslocando os eventos térmicos para temperaturas menores.

A FIGURA 8 apresenta os difratogramas de raios X dos resíduos obtidos de GCV a 200°C e 240°C. A ausência do pico de difração a 5° (2 θ) no difratograma a 200°C é característico do polimorfo I do GCV. O resultado está em concordância com a curva

DSC (FIGURA 6), a qual mostrou abaixo de 200°C três eventos, dois endotérmicos, que corresponderam ao processo de desidratação, e um exotérmico (189°C), particular do polimorfo I.

O aparecimento de novos picos de difração em torno de 7,5°, 11,5°, 15,7°, 17,8°, 22,8°, 24° e 29° (2 θ) no difratograma a 240°C indicaram a presença de uma nova estrutura cristalina do fármaco. Este comportamento característico também pôde ser verificado na curva DSC (FIGURA 6), em que a amostra sofre um evento endotérmico em torno de 225°C, particular da fusão do polimorfo I, seguida da cristalização do polimorfo II. Pelos resultados apresentados pode-se afirmar que a forma polimórfica II é a estrutura cristalina estável do fármaco a 240°C.

FIGURA 7. Curva DSC e difratogramas de DRX durante a decomposição do GCV, analisado por meio do sistema DRX-DSC simultâneo.

FIGURA 8. Difratogramas de DRX durante a decomposição da amostra de GCV.

A FIGURA 9 ilustra o espectro no infravermelho da amostra GCV, evidenciou-se bandas de absorção em 3425 e 3311 cm^{-1} correspondentes ao estiramento simétrico e assimétrico em aminas primárias. Além disso, a presença de bandas ao redor de 1658 a 1609 cm^{-1} confirmaram o estiramento N-H, que correspondem às ligações de hidrogênio da amina primária. A absorção a 3177 cm^{-1} foi característica do estiramento N-H em amina secundária.

A existência da banda a 1732 cm^{-1} confirmou o estiramento C=O da amida terciária na molécula e as absorções em 2845 e 2923 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento simétrico de C-H. Observaram-se, também, outras bandas a 1609 e 1490 cm^{-1} características do estiramento C=C, que junto à banda em 3099 cm^{-1} (C-H) confirmaram a presença da estrutura aromática.

Na FIGURA 10, são exibidas as micrografias de MEV da amostra de GCV. Observou-se que o fármaco apresentou cristais retangulares irregulares bem definidos na faixa de 20 a $150\text{ }\mu\text{m}$, aproximadamente. A maioria das partículas mostraram-se

dispersas, enquanto que outras apresentaram sobreposição de placas de aspecto rugoso, aderidas densamente a cristais maiores, como observado na micrografia B. Uma avaliação mais detalhada indicou, também, a existência de partículas finas unidas na superfície, contribuindo com a aparência rugosa dos cristais.

FIGURA 9. Espectros de absorção na região do infravermelho da amostra de GCV.

FIGURA 10. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura do GCV, aumento de 100 vezes (A) e 250 vezes (B).

A FIGURA 11 apresenta as fotomicrografias com luz polarizada do GCV analisadas no *Hot Stage Microscopy* em intervalos de temperatura diferentes. As condições dos ensaios foram as mesmas para as medidas de DSC ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$; no intervalo de temperatura de 25°C a 300°C). A fotomicrografia (A), investigada a 25°C mostrou cristais retangulares de diferentes tamanhos. Estes se mostraram completamente preservados nesta temperatura, enquanto que, acima de 189°C (micrografia B) evidenciou-se ligeira mudança na coloração do material. Este acontecimento reafirma as observações realizadas na curva DSC (FIGURA 6), em que o GCV teve uma transição de fase ao redor de 189°C , fato característico do polimorfo I. Próximo da temperatura de 225°C (micrografia C) o material evidenciou leve escurecimento sem fusão, que indicaria a transição cristalina desta forma polimórfica para outra estrutura cristalina. Ao redor de 249°C (micrografia D) se observou a fusão dos cristais menores do fármaco, e o escurecimento das partículas maiores sem a fusão. Correlacionando este resultado com o comportamento do material na curva DSC (FIGURA 6), pôde-se concluir que o evento endotérmico ao redor de 249°C corresponde à decomposição do fármaco. Além disso, foi evidenciado acima desta temperatura o escurecimento total dos cristais, confirmando a decomposição térmica com carbonização do composto.

FIGURA 11. Fotomicrografias de GCV analisadas no *Hot Stage Microscopy* no intervalo de temperatura de 25°C (A), 189°C (B), 225°C (C) e 249°C (D).

A cinética de decomposição do material foi realizada pelo método não-isotérmico (FIGURA 12). Estimou-se o intervalo de tempo de vida útil do fármaco, em razões de aquecimento (β) de 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15°C.min⁻¹ e sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 50 mL min⁻¹).

A FIGURA 12 ilustra as curvas TG obtidas para o estudo cinético não-isotérmico para a amostra do fármaco. As curvas TG foram obtidas sob atmosfera dinâmica de ar sintético (vazão de 50 mL mn⁻¹) em diferentes β (5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15°C.min⁻¹). Os ensaios foram realizados utilizando 15,0 $\pm$ 0,5 mg de amostra. Pôde se observar que sob razões de aquecimento mais elevadas, houve um descolamento do evento de perda de massa para temperaturas mais altas. A estabilidade térmica da amostra pode

ser avaliada a partir de parâmetros cinéticos (energia de ativação, ordem de reação e fator pré-exponencial da equação de Arrhenius).

FIGURA 12. Curvas TG obtidas sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min^{-1}) da amostra de GCV.

A FIGURA 13 e 14 apresentam os gráficos de $\text{Log}(\beta)$ versus $1/T$ (K^{-1}) e a linha de tendência obtido pelo método de não-isotérmico, respectivamente. Demonstrou-se por meio dessas figuras a boa correlação das cinco razões de aquecimento para o GCV. A energia de ativação (E_a) foi calculada pelo método de Ozawa para a primeira etapa de decomposição térmica do fármaco. A TABELA 2 apresenta os valores da E_a (kJ mol^{-1}), a ordem de reação, o fator de pré-exponencial (A , min^{-1}) e a estimativa do tempo de vida útil do GCV obtidos pelo método não-isotérmico. O valor da E_a para a primeira etapa de decomposição térmica foi de 106 kJ mol^{-1} (FIGURA 14).

FIGURA 13. Gráfico de $\text{Log } (\beta)$ versus $1/T \text{ (K}^{-1}\text{)}$ da amostra de GCV.

FIGURA 14. Gráficos obtido pelo método de Ozawa para a amostra de GCV.

TABELA 2. Parâmetros cinéticos obtidos por meio do Método de Ozawa para o GCV

E_a / kJ mol^{-1}	A / min^{-1}	Ordem	t (min)
106,34	$1,3 \times 10^9$	0	$3,36 \times 10^7$

Outro método empregado para o estudo da cinética de decomposição térmica é isotérmico. Nesse caso são empregados ensaios termogravimétricos em modo isotérmico, os quais são baseados na perda de 5 ou 10% da massa da amostra em função do tempo, nas diferentes temperaturas de isoterma. O tratamento dos dados é baseado na equação de Arrhenius, assim, o gráfico obtido a partir dos valores do logaritmo natural do tempo em função do inverso da temperatura conduz a uma reta, na qual a razão E_a/R é a inclinação da reta.

A partir do estudo da curva TG da amostra de GCV no modo dinâmico, foi possível conhecer o intervalo de temperatura na qual dm/dt deixou de ser zero e a T_{onset} , ou seja, foi possível saber em qual temperatura iniciou-se o processo de perda de massa. Dessa forma, fez-se a escolha das temperaturas de isotermas dentro deste intervalo, as quais foram iguais a 220, 225, 230, 235 e 240°C. A amostra foi aquecida até 10°C abaixo da temperatura de isoterma ($\beta = 20^\circ\text{C min}^{-1}$), em seguida utilizou-se uma razão de 2°C min^{-1} até atingir T_{iso} . A amostra foi mantida na T_{iso} até ocorrer pelo menos a perda de 5% da massa inicial. Para atingir esse percentual de variação de massa, o tempo de isoterma foi de 2 a 5 horas. Quanto maior a temperatura utilizada, menor foi o tempo necessário para ocorrer perda de massa (5%).

A FIGURA 15 apresenta as curvas TG isotérmicas obtidas no estudo cinético isotérmico da primeira etapa de decomposição do GCV. Na FIGURA 16 apresenta-se o gráfico de Arrhenius ($\ln t$, min versus $1/T$, K^{-1}) construído a partir dos dados da TABELA 3. As curvas TG obtidas sob condições isotérmicas (FIGURA 15) mostram a correlação entre a perda de massa (Δm %) e a temperatura isotérmica.

O gráfico de Arrhenius (FIGURA 16), $\ln t$, min vs $1/T$ (K⁻¹), foi construído usando o método de regressão linear. O valor da energia de ativação (E_a) foi calculado pela multiplicação do valor da inclinação (equação de Arrhenius) e pela constante de gás molar ($R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). A FIGURA 16 apresenta os valores de E_a e o coeficiente de correlação linear (r) obtidos para o estudo isotérmico do GCV. A TABELA 4 lista os valores de previsão de decomposição de 5% em massa da amostra para as temperaturas de 25 e 40°C.

FIGURA 15. Curvas TG isotérmicas ($T_{\text{iso}} = 220, 225, 230, 235$ e 240°C) obtidas sob atmosfera dinâmica de ar ($50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) da amostra de GCV.

TABELA 3. Valores de $1/T$ e $\ln t$ para a construção do Gráfico de Arrhenius

T(°C)	T(K)	$1/T$ ($\times 10^{-3}$)	t(min)	$\ln t$
220	493	2,028	684	6,52787
225	498	2,008	233	5,449406
230	503	1,988	163	5,092215
235	508	1,968	66	4,188138
239	512	1,953	30	3,386422

TABELA 4. Previsão para $\Delta m = 5\%$ nas temperaturas de 25 e 40°C da amostra de GCV

T(°C)	T(K)	1/T (K ⁻¹)	ln t	t (min)	t (horas)	t (dias)	t (anos)
25	298,12	3,354	61,23	3,91x10 ²⁶	6,5x10 ²⁴	2,7x10 ²³	7,4x10 ²⁰
40	313,12	3,194	52,61	7,05x10 ²²	1,17x10 ²¹	4.89x10 ¹⁹	1,34x10 ¹⁷

FIGURA 16. Gráfico de Arrhenius obtido a partir das curvas TG_{iso} para a primeira etapa de decomposição térmica da amostra de GCV.

Os métodos não-isotérmico e isotérmico utilizados para estimar a degradação do GCV por meio da determinação de valores de tempo diferiram significativamente (106 e 329 kJ.mol⁻¹) um em relação ao outro. Embora exista esta diferença, é importante ressaltar que ambos os métodos proporcionam uma estimativa do tempo de vida útil do fármaco, sendo a E_a um parâmetro útil na avaliação, sobretudo, quando se estuda a compatibilidade de fármacos e excipientes (SALVIO NETO, 2010). O método não-isotérmico permite uma estimativa mais rápida, além disso o tratamento dos dados é mais simplificado. O método isotérmico proporciona uma estimativa do tempo mais real, uma vez que apresenta maiores aproximações do que o método não-isotérmico, porém

a análise e o tratamento dos dados são mais demorados. Então cabe ao formulador escolher o método mais conveniente segundo sua necessidade.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados mostrados pôde-se concluir que o GCV é um fármaco que apresenta polimorfismo. Quatro formas polimórficas foram identificadas, duas hidratadas (Forma III e IV) e duas anidros (Forma I e II). Estas duas últimas foram evidenciadas em torno de 190°C e 240°C, respectivamente. Além disso, verificou-se que a forma polimórfica II foi a estrutura cristalina estável a 240°C do fármaco, sendo as técnicas de DRX, DSC, TG/DTG e *Hot stage microscopy* fundamentais para sua identificação. A associação dos resultados obtidos a partir das diferentes técnicas físico-químicas e analíticas permitiu a caracterização da amostra sendo uma mistura de polimorfos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC 60, de 10 de outubro de 2014**. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares e dá outras providências. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867994/%282%29RDC_60_2014_COMP.pdf/ae0590e1-0f17-41d0-8c3c-061f4b903c57. Acesso em: 03 maio 2017.

AIDS no Brasil: epidemia concentrada e estabilizada em populações de maior vulnerabilidade. **Boletim Epidemiológico - Aids.DST**. v.8, n.1, p.10-11, 2011.

BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystal**. Oxford: Oxford Clarendon Press; New York: University Press, 2002. 410p.

BIRON, K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. **Antiviral Research**, v.71, p.154-163, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Terapia anti-retroviral e Saúde Pública**: um balanço da experiência brasileira. Brasília: Ministério da Saúde, 1999.

CHAN, T.W.; HUONG, T.N. **Anhydrous Crystalline 9-(1,3-Dihydroxy-2-Propoxymethyl)-Guanine**. US Pat. 4,642,346, 10 feb. 1987. 7p.

CIDES, L.C.S.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS-FILHO, M.; MATOS, J.R. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.84, n.2, p.441–445, 2006.

CYTOVENE-IV: ganciclovir sodium for intravenous infusion only. Roche Laboratories, 2010. [Package insert].

CUSTODIO, J.M.; WU, C.-Y.; BENET, L.Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.717-733, 2008.

FERNANDES, J.A.; GALLI, S.; PALMISANO, G.; VOLANTE, P.; MENDES, R.F.; ALMEIDA PAZ, F.A.; MASCIOCCHI, N. Reviewing the manifold aspects of ganciclovir crystal forms. **Crystal Growth & Design**, v.16, p.4108-4118, 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Guidance for Industry: ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing and Controls Information, 2007. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf>. Acesso em: 21 abr. 2017.

GROOM, C.R.; BRUNO, I.J.; LIGHTFOOT, M.P.; WARD, S.C. The Cambridge Structural Database. **Acta Crystallographica Section B**, B72:171-179, 2016.

GROSS, J.B.; BOZZETE, S.A.; MATHEWS, W.C.; SPECTOR, S.A.; ABRAMSON, I.S.; McCUTCHAN, J.A.; MENDEZ, T.; MUNGIA, D.; FREEMAN, W.R. Longitudinal study of cytomegalovirus retinitis in acquired immune deficiency syndrome. **Ophthalmology**, v.97, p.681-686, 1990.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENT FOR THE REGISTRATION OF DRUGS FOR HUMAN USE; Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances Q6A, 1999. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf. Acesso em: 25 abr. 2017.

KAWAMURA, T.; HIRAYAMA, N. Crystal structure of ganciclovir. **X-ray structure analysis online**, v.25, p.51-52, 2009.

KOGA, N. Ozawa's kinetic method for analyzing thermoanalytical curves. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.113, n.3, p.1527-1541, 2013.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. p.750.

ROQUE FLORES, R.L.; GUZEI, I.A.; MATOS, J.R.; YU, L. Crystal structure of Ganciclovir polymorph I, manuscrito em preparação.

SALVIO NETO, H. **Estudo de compatibilidade fármaco/excipientes e de estabilidade do prednicartrato por meio de técnicas termoanalíticas, e encapsulação do fármaco em sílica mesoporosa do tipo SBA-15**. São Paulo, 2010. 206p. Tese de Doutorado – Departamento de Farmácia – Universidade de São Paulo.

SARBAJNA, R.M.; PREETAN, A.; DEVI, A.S.; SURYANARAYANA, M.V.; SETHI, M.; DUTTA, D. Studies on crystal modifications of ganciclovir. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v.537, p.103-107, 2011.

SHEN, Y.; LU, Y.; JI, M.; HU, J.; LI, Q.; TU, J. Enhancing effect of labrasol on the intestinal absorption of ganciclovir in rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.17, n.12, p.1415-1421, 2011.

UNITED States Pharmacopeia: USP32. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The right to health**: Geneva: 2008. (Fact Sheet, n.31). Disponível em: <<http://www.ohchr.org/Documents/Publications/Factsheet31.pdf>>. Acesso em: 25 fev. 2017.

YU, L.; REUTZEL, S.M.; STERPHENSON, G. A. Physical characterization of Polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.1, n.3, p.118-127, 1998.

CAPÍTULO IV
POLIMORFOS DE GANCICLOVIR

RESUMO

Atualmente, o GCV é conhecido por apresentar duas formas hidratadas (III e IV) e duas formas cristalinas livres de solvente (I e II). A Forma I é identificada como o padrão da *United States Pharmacopoeia* (USP) e a Forma II é descrita na literatura como a forma estável. De particular interesse sobre este sistema é que a estrutura cristalina atualmente conhecida é da Forma II, enquanto que da Forma I é desconhecida, e tentativas recentes não conseguiram obter a Forma I. Reportamos aqui uma preparação bem-sucedida da Forma I de GCV e a solução de sua estrutura cristalográfica descrita pela primeira vez. Esta forma apresenta os seguintes parâmetros cristalográficos: grupo espacial P21, $a = 4.6448 (10) \text{ \AA}$, $b = 15.632 (3) \text{ \AA}$, $c = 14.130 (3) \text{ \AA}$, $\beta = 91.632 (10)^\circ$ e $Z = 4$. Experimentos de conversão por *slurry* demonstraram que todas as formas recristalizadas de GCV se converteram na Forma I ao longo do tempo. No entanto, tal como com outras descobertas ou estranhezas polimórficas, os nossos ensaios não geraram a Forma II previamente relatada. Os resultados que apresentamos aqui são relevantes para o desenvolvimento farmacêutico de GCV.

Palavras-chave: Estado sólido. Polimorfismo. Estrutura cristalina. Ganciclovir. Propriedades físico-químicas. Estabilidade do estado sólido. DRX. Análise térmica. *Hot Stage Microscopy*.

1. INTRODUÇÃO

O ganciclovir (GCV, FIGURA 1) é um fármaco antiviral, amplamente usado no tratamento das infecções por citomegalovírus (CMV) em pacientes imunossuprimidos como indivíduos com HIV/AIDS. O fármaco é eficaz no tratamento e supressão crônica da retinite por CMV, infecção ocular oportunista mais comum e a maior causa da perda da visão em pacientes com AIDS (GROSS *et al.*, 1990). O GCV é fracamente absorvido, apresentando biodisponibilidade de 5 a 9% (ANDERSON *et al.*, 1995; LAVELLE *et al.*, 1996; BIRON, 2006), sendo, portanto, motivo de estudo de suas formas sólidas com a finalidade de melhorar suas propriedades biofarmacêuticas.

FIGURA 1. Estrutura molecular de GCV.

Apesar do seu amplo uso, poucos estudos sobre as formas sólidas do fármaco têm sido reportados. Abaixo se resume os trabalhos anteriores em ordem cronológica: Em 2009, Kawamura e Hirayama relataram a estrutura de uma forma cristalina livre de solvente, denominada neste trabalho como Forma II (*Cambridge Crystallographic Data Center* (CCDC) código de referência 714337). Em 2011 outro estudo descreve quatro formas do fármaco denominadas como: I, II, III e IV, sendo I e II livres de solventes e III e IV hidratos (SARBAJNA *et al.*, 2011), entretanto, não foram fornecidas as informações cristalográficas dos compostos. Em 2016, Fernandes e colaboradores reportaram as estruturas cristalográficas das duas formas hidratadas de GCV (Forma III e IV).

De acordo com Sarbajna *et al.* (2011). A Forma I não pode ser obtida por métodos de cristalização, entretanto, está só pode ser acessível por vias químicas a partir do N2-acetil-9- (1,3-diacetoxi-2-propoximetil) guanina (PARTHASARADHI *et al.*, 2011). Embora estes estudos não forneçam as informações cristalográficas da Forma I e afirmem que não pode ser obtida por outros métodos de cristalização, são necessários mais estudos de investigação sobre as formas sólidas de GCV de modo a assegurar a forma termodinamicamente estável. Parâmetro fundamental que influencia na eleição da melhor forma cristalina para o desenvolvimento de fármacos.

A obtenção dos compostos sólidos é frequentemente realizada por cristalização, que consiste na formação de um sólido cristalino a partir de um produto impuro fundido ou a partir de uma solução supersaturada. A cristalização é considerada uma transição de fase, em que forças de *Van der waals* e ligações de hidrogênio desempenham um papel fundamental nas interações das moléculas. Estas ligações têm um tempo de alcance relativamente curto; sua distância é determinada por um potencial, que calcula a interação entre as moléculas. A acelerada diminuição deste potencial faz com que a interação da molécula mais próxima determine a energia dos arranjos. Como resultado, a disposição do cristal apresentará boa simetria (BECKMANN, 2013).

O processo de cristalização, normalmente, é descrito em duas etapas, nucleação e crescimento dos cristais. A ampla variedade da morfologia dos cristais está determinada pela variação da taxa de crescimento, em alguns casos diferenças grandes desta taxa podem dar lugar à formação de cristais em forma de agulhas. Outros fatores como a mudança de solventes ou a modificação do perfil de pureza, também, podem influenciar na morfologia do cristal (BECKMANN, 2013).

O *screening* polimórfico é um dos métodos mais importantes na descoberta sistemática de formas cristalinas de uma determinada substância. O ensaio é conduzido por cristalização a partir de diferentes solventes, algumas vezes empregando equipamentos sofisticados de alto rendimento. O processo de cristalização pode ser realizado por diferentes métodos, entre eles podemos destacar a cristalização por resfriamento, adição de anti-solvente, experimentos de suspensão e evaporação do solvente (GETSOIAN, LODAYA, BLACKBURN, 2008). Este último utilizado na obtenção

de monocristais. Fatores como o tipo de solvente, concentração, taxa de supersaturação e outros como velocidade de agitação e temperatura podem influenciar o resultado de uma cristalização. Por outro lado, parâmetros de solventes, tais como a viscosidade, polaridade e ligações de hidrogênio, também, podem influir no processo de cristalização (nucleação e crescimento do cristal), isto deve-se às interações entre o soluto e o solvente, que dependem das propriedades físico-químicas do fármaco (SUN, 2006; CAMPETA, 2010).

Para entender melhor o comportamento das formas sólidas de GCV, foi explorado o polimorfismo do fármaco por meio de um sistema de *screening* pelo método de evaporação lenta de solvente, no qual foram realizados nove ensaios de cristalização. Neste trabalho, é apresentada uma preparação bem-sucedida da Forma I de GCV e a solução de sua estrutura cristalográfica descrita pela primeira vez. Esta forma foi determinada diretamente por cristalografia de raios X de monocristal, técnica crucial na identificação e caracterização de formas polimórficas. Além desta técnica, outras ferramentas de caracterização foram utilizadas como análise térmica (TG/DTG e DSC), *Hot stage microscopy*, análise elementar, e espectroscopia de absorção na região no infravermelho (FTIR).

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo explorar o polimorfismo do GCV por meio de um sistema de *screening* pelo método de evaporação de solvente.

2.1. Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química e analítica dos recristalizados do GCV, utilizando DRX, TG, DSC, FTIR, análise elementar e *Hot stage microscopy*;
- Caracterizar a forma cristalina mais estável dentre os produtos recristalizados do GCV por DRX e DSC e avaliar o polimorfo mais estável do fármaco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Foi analisada uma amostra de GCV, cedida por uma indústria farmacêutica, com grau de pureza maior que 99,0%, apresentando as seguintes especificações: pó branco ou quase branco, cristalino, isento de impurezas visíveis; umidade 0,6% e impurezas totais 0,5%. Utilizou-se para o *screening* experimental: metanol, dimetilformamida, acetonitrila, dimetilsulfoxido, 1-propanol, etilacetato, tetrahydrofurano, e 1,4-dioxane todos de grau analítico (pureza maior que 99,0%) (TABELA 1). Os solventes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Fisher Scientific. Água ultrapura, também, foi utilizada em todas as cristalizações.

3.2. METÓDOS

3.2.1. Cristalização

O *screening* experimental foi realizado pelo método de evaporação lenta de solvente, utilizando-se oito solventes (TABELA 1). A massa de 100 mg da amostra de GCV foi colocada em um Becker de 100 mL e fez-se a adição de água ultrapura e metanol como primeiros solventes. A solução foi agitada constantemente e aquecida a uma temperatura na faixa de 40 a 90°C por cerca de 30 minutos. Após a dissolução completa do sólido, uma quantidade conhecida do terceiro solvente foi adicionada. Finalmente, esta solução foi deixada à temperatura ambiente até a formação dos cristais. Posteriormente, os cristais foram filtrados, secos a temperatura ambiente e armazenados em frascos de vidros. Todas as cristalizações foram conduzidas sob iguais condições. Utilizou-se como terceiros solventes dimetilformamida, acetonitrila, dimetilsulfoxido, 1-propanol, etilacetato, tetrahydrofurano, e 1,4-dioxane, respectivamente, em cada experimento. Os produtos cristalizados em cada condição foram codificados com siglas conforme listadas na TABELA 1 (ver item 4, resultados e discussão).

3.2.2. Difratometria de raios X

As amostras foram prensadas em um porta-amostra de plástico e os dados foram coletados por um difratômetro Siemens Bruker modelo D5000, de raio 200,5 mm, com tubo de geração $\text{CuK}\alpha$, filtro de Ni (para absorver as radiações branca e $\text{K}\beta$), comprimento de onda médio $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ($\text{CuK}\alpha$), com fenda de divergência de 0,2 mm e fenda de espalhamento de 8 mm, fenda Soller primária e secundária de $2,5^\circ$, com detector sensível a posição (PSD) LynxEye, com aceitação angular de 4.1° , operando em 40 kV e 40 mA de tensão e corrente do tubo, respectivamente. A varredura, em modo contínuo, foi feita com tempo de exposição de 2 s por passo médio ($\sim 0,02^\circ$ em 2θ) na faixa entre 2° e 40° (2θ). O tempo total de aquisição foi da ordem de 40 min.

3.2.3. Difratometria de raios X por monocristal

O monocristal de GCV (Forma I) foi obtido a partir da cristalização de GCV-1 pelo método de evaporação lenta. Utilizou-se dimetilformamida, metanol e água ultrapura como solventes (ver TABELA 1). Aproximadamente 100 mg de GCV foram dissolvidos e filtrados. A solução aquecida foi colocada em uma placa de cristalização e foi deixada a temperatura ambiente até a evaporação completa dos solventes. Um cristal incolor de boa qualidade foi selecionado em óleo sob condições ambientes e acoplado à extremidade de um MiTeGen MicroMount. O cristal foi montado em uma corrente de azoto frio a 100 K e centrado no feixe de raios X, usando uma câmara de vídeo. A coleção dos dados e a avaliação do cristal foram realizadas em um difratômetro Bruker Quazar SMART APEXII com radiação $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$).

3.2.4. Termogravimetria/Análise Térmica Diferencial (TG/DTA)

As curvas TG/DTA foram obtidas a partir da termobalança modelo SDT Q600 (TA Instruments), no intervalo de temperatura de 25 a 300°C , com razão de aquecimento (β) de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de N_2 (vazão de 100 mL min^{-1}), utilizando cadinho de Pt, contendo cerca de 5 mg de amostra.

3.2.5. Análise elementar

Os teores dos elementos C, N e H da amostra de GCV e de seus produtos recristalizados foram obtidos utilizando o equipamento Elemental Analyzer, modelo 2400 CHN (Perkin Elmer).

3.2.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho do ganciclovir e de seus produtos de recristalização foram registrados na faixa de 4000 a 350 cm^{-1} utilizando o espectrômetro modelo FTIR Bomem MB100 (Perkin Elmer), em pastilha de KBr.

3.2.7. Microscopia de placa quente (*Hot Stage Microscopy*)

As fotomicrografias do GCV foram registradas no microscópio polarizado BX53 (Olympus, Hamburgo, Alemanha) equipado a uma câmera monocromática e a uma placa quente de kofler. Os ensaios foram realizados entre 25 a 300°C com β de 10°C min^{-1} .

3.2.8. Conversão de *slurry*

A mistura 1:1 das formas cristalinas de GCV (Formas I e V) foi colocada dentro de um recipiente fechado com 10 mL de metanol na temperatura ambiente, assegurando o excesso do sólido. Após duas semanas de agitação, alterações nas formas cristalinas foram observadas, e as mesmas foram caracterizadas por TG e DRX.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo do *screening* do GCV e as formas cristalinas geradas estão apresentadas na FIGURA 2 e TABELA 1. De todas as cristalizações realizadas foram obtidas quatro formas sólidas do fármaco e estas foram denominadas como Forma I, III, IV e V. A Forma I teve como precursores a GCV-1, GCV-B e GCV-H, enquanto que da Forma III foram GCV-C, GCV-D, GCV-F e GCV-G, esta última forma foi evidenciada com maior frequência. O composto de GCV-A deu origem à Forma IV, finalmente a Forma V teve como precursor o GCV-E. De acordo com os resultados apresentados é

possível evidenciar que as Formas I e III, também, foram obtidas na presença de outros solventes.

FIGURA 2. Difratomogramas de raios X do GCV e dos recrystalizados GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H.

TABELA 1. Materiais utilizados para a cristalização do GCV e siglas e formas de identificação dos produtos cristalizados

Fármaco	Solvente	Sigla	Método de cristalização	Forma
GCV	Água, metanol, dimetilformamida	GCV-1	Evaporação de solvente	I
	Água, acetonitrilo	GCV-A	Evaporação de solvente	IV
	Água, metanol, dimetilsulfóxido	GCV-B	Evaporação de solvente	I
	Água, metanol, 1-propanol	GCV-C	Evaporação de solvente	III
	Água, metanol, acetato de etilo	GCV-D	Evaporação de solvente	III
	Água, metanol, tetrahidrofurano	GCV-E	Evaporação de solvente	V
	Água, metanol, 1,4-dioxano	GCV-F	Evaporação de solvente	III
	Água, 1,4-dioxano, tetrahidrofurano	GCV-G	Evaporação de solvente	III
	Água, DMF, THF	GCV-H	Evaporação de solvente	I

É possível evidenciar na FIGURA 2 que os compostos GCV-1, GCV-B e GCV-H (Forma I) mostraram pico de difração bem definido ao redor de 8,43 e 25,7° na posição de 2θ , característico da Forma I do fármaco (SARBAJNA *et al.*, 2011). Entretanto, os compostos de GCV-C, GCV-D, GCV-F e GCV-G (Forma III) exibiram picos de difração em torno de 5,34 e 8,23°, particular, da forma hidratada III do fármaco (FERNANDES *et al.*, 2016; SARBAJNA *et al.*, 2011). O cristalizado de GCV-A (Forma IV) mostrou picos de difração em 5,34 e 6,39° característicos da outra forma hidratada do GCV (FIGURA 2). O composto de GCV-E (Forma V) evidenciou picos de difração ao redor de 5,34; 10,38° na posição 2θ .

Com o intuito de fornecer maior compreensão das formas polimórficas do GCV são apresentadas nas FIGURAS 3 e 4 os difratogramas de raios X experimentais (FERNANDES *et al.*, 2016) e calculados dos polimorfos do fármaco, estes últimos obtidos do *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC).

FIGURA 3. Difratogramas de raios X (experimental) das Formas II, III e IV de GCV. Adaptado de FERNANDES *et al.*, 2016.

FIGURA 4. Difratomogramas de raios X (calculado) das Formas I, II, III e IV de GCV. Adaptado de ROQUE FLORES, *et al.*, manuscrito em preparação (Forma I) e CCDC - código de referência 714337 (Forma II), 1475570 (Forma III) e 1475571 (Forma IV).

Na FIGURA 5 são apresentados os espectros de absorção na região no infravermelho dos produtos de cristalização do GCV, que originaram as Formas I, III, IV e V do fármaco. Pôde-se observar que os espectros no infravermelho das amostras GCV-1 e GCV-B (Forma I) foram similares, fato que está em concordância com os difratogramas de raios X das respectivas amostras (FIGURA 2). Entretanto, para o composto de GCV-H (Forma I) esta relação foi evidenciada apenas com bandas de absorção de menor intensidade. As amostras de GCV-C, GCV-D, GCV-F e GCV-G (Forma III), também, apresentaram espectros semelhantes e estão em conformidade com os difratogramas de raios X (FIGURA 2). Para as amostras de GCV-A (Forma IV) e

GCV-E (Forma V) os espectros no infravermelho não foram distintivos, uma vez que os compostos evidenciaram bandas espectrais similares e com número de ondas muito próximos (TABELA 2). Porém a técnica de DRX foi crucial para sua diferenciação (FIGURA 2).

Por outro lado, realizando uma observação mais detalhada foi possível evidenciar que a banda de estiramento do grupo N-H na Forma I (GCV-1, GCV-B e GCV-H) é mais estreita, enquanto que para a Forma III, IV e V ela é mais larga. Comportamento similar foi evidenciado para as bandas de absorção referentes ao estiramento C=O (1657) e C-O-C simétrico e assimétrico (1097, 1063, 1043). Nesse caso as bandas espectrais também foram mais estreitas, comparando com os espectros das outras formas do fármaco. Na TABELA 2 são apresentados os valores das principais bandas de absorção das formas cristalinas de GCV, os quais foram diferenciadas a partir dos resultados de DRX (FIGURA 2, TABELA 1)

TABELA 2. Valores das principais bandas de absorção das formas cristalinas de GCV

Principais bandas de absorção				
Modo de vibração, estiramento	Forma I	Forma III	Forma IV	Forma V
N-H / O-H	3416, 3318	3424, 3308	3420, 3294	3424, 3289
C-H aromático	3136	3165	3173	3163
C-H alifático	2934, 2884	2978, 2872, 2851	2913, 2877, 2864	2916, 2859
C=O	1670, 1657	1690, 1607	1730, 1639	1730, 1639
C=C aromático	1609, 1574	1541, 1472	1541	1541
C=N	1493	1391	1487	1487
C-H alifático	1422, 1366	1300, 1283	1385	1385
C-N	1302	1227	1304	1304
C-O-C assimétrico	1242, 1169	1182	1184, 1177	1219, 1177
C-O-C simétrico	1097, 1063, 1043	1109, 1090, 1055	1121, 1076, 1063	1099, 1086, 1057
C-H aromático	768, 731	687, 686	777, 754	777, 754

FIGURA 5. Espectros de absorção na região no infravermelho dos cristalizados de GCV.

Na FIGURA 6 e TABELA 3 são apresentados os difratogramas de raios X e os valores de 2θ das formas cristalinas geradas a partir do *screening* do GCV (agora identificadas como Forma I, III, IV e V) e da estrutura cristalográfica (714337) reportada pelo CCDC, e designada neste estudo como Forma II. O difratograma da Forma I (GCV-1, GCV-B e GCV-H) mostrou picos de difração predominantes ao redor de $8,43^\circ$, $12,56^\circ$, $17,00^\circ$, $18,21^\circ$, $21,24^\circ$, $25,62^\circ$ e $34,5^\circ$ na posição de 2θ (FIGURA 6 e TABELA 3). Enquanto que a Forma III apresentou difratograma característico de uma das formas hidratada do fármaco, descrita na literatura (FERNANDES *et al.*, 2016; SARBAJNA *et al.*, 2011), com picos de difração representativos em torno de $5,34^\circ$ e $8,23^\circ$ (2θ). A Forma IV (GCV-A) mostrou picos de difração específicos e próximos a $5,34^\circ$ e $6,39^\circ$ (2θ), característicos da segunda forma hidratada do fármaco. Por outro lado, realizando uma observação mais detalhada pôde-se evidenciar que o pico de difração em torno de $5,34^\circ$ (2θ) foi particular das formas hidratadas do GCV. Esta característica, também, foi verificada para a Forma V (GCV-E), a qual também apresentou o pico de difração definido em $5,34^\circ$ (2θ) indicando, portanto, a obtenção de outro composto hidratado do fármaco e que está sendo descrito pela primeira vez neste trabalho.

TABELA 3. Valores 2θ característicos das Formas sólidas do GCV e do componente reportado pelo CCDC código de referência 714337 (Forma II)

Forma	Valores de 2θ
Forma I	8,43; 12,56; 17,00; 18,21; 19,12; 21,24; 25,62; 26,39 e 34,5
Forma II	7,82; 11,18; 15,49; 16,28; 22,35; 23,74 e 28,62
Forma III	5,34; 8,23; 10,75; 11,12; 15,34; 15,94; 20,44; 23,75; 24,05; 29,09
Forma IV	5,34; 6,39; 10,38; 11,10; 15,36 e 20,34
Forma V	5,34; 10,38; 11,12; 15,30; 20,32; 25,15 e 35,07

FIGURA 6. Difratomogramas de raios X das formas cristalinas de GCV. O difratograma da Forma II foi calculado a partir da estrutura monocristalina (CCDC código de referência 714337).

A FIGURA 7 apresenta a sobreposição das curvas TG, obtidas a 300°C, dos produtos cristalizados de GCV. Observou-se, que as curvas de GCV-1 e GCV-B indicaram que esses produtos são estáveis termicamente até 245°C, mostrando apenas uma etapa de decomposição térmica. O recristalizado de GCV-H também evidenciou uma etapa de decomposição próximo a 240°C. Por outro lado, as amostras GCV-A, GCV-C, GCV-D e GCV-F apresentaram três etapas de perda de massa. As duas primeiras ocorreram entre 50 e 120°C, com uma Δm de 0,6 a 1,4%, que foram associadas à liberação de água e solvente de cristalização. A terceira perda de massa, ao redor de 230°C, foi relacionada à decomposição térmica do fármaco. As amostras GCV-E e GCV-G também mostraram três etapas de perda de massa, entretanto, a terceira etapa foi evidenciada próximo de 190°C e 200°C, respectivamente, com Δm de

1,5 e 3,4%, para cada composto. Baseado nas curvas TG, foi possível afirmar que os produtos recristalizados GCV-A, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F e GCV-G correspondem às formas hidratadas do fármaco, enquanto que as amostras GCV-1, GCV-B e GCV-H às formas anidras. Além disso, essas últimas mostraram-se mais estáveis termicamente.

FIGURA 7. Curvas TG/DTG obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL min^{-1}) dos recristalizados de GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H.

As curvas DTA de GCV e dos produtos recristalizados estão apresentadas na FIGURA 8. Observou-se que as curvas de GCV-1 e GCV-B mostraram dois eventos endotérmicos. O primeiro em torno de 230°C ocorreu em uma faixa de temperatura em que as curvas TG não evidenciaram perda de massa, portanto é de origem física e pode ser atribuído à transição cristalina para outra forma sólida do fármaco. O segundo

evento próximo a 250°C foi associado com a perda de massa na curva TG e refere-se à fusão com decomposição térmica do GCV. De acordo com Sarbajna *et al.* (2011) esses eventos correspondem, respectivamente, à fusão da forma polimórfica I de GCV seguida da recristalização para a Forma II. Por outro lado, a curva DTA da amostra GCV-H evidenciou evento endotérmico ao redor de 240°C, que foi associado à fusão com decomposição do composto.

Em relação às curvas DTA das amostras GCV-C, GCV-D, GCV-E e GCV-F, estas indicaram, na faixa de 50 e 70°C, a ocorrência de evento discreto que foi atribuído à liberação de água superficial, uma vez que as curvas TG (FIGURA 7) mostraram perda de massa nessa faixa de temperatura. O segundo evento, exotérmico, em torno de 180°C foi correlacionado à transição cristalina do composto formado na etapa anterior para outra forma sólida. De acordo com Sarbajna *et al.* (2011) esses eventos correspondem, respectivamente, à desidratação da forma polimórfica III seguida da cristalização para a Forma II. De fato, não foi observada perda de massa na curva TG (FIGURA 7) nessa faixa de temperatura (180°C), confirmando que houve apenas uma transição cristalina. As curvas DTA também evidenciaram um terceiro evento endotérmico entre 248 e 250°C, característico da fusão com decomposição do fármaco, entretanto, para a amostra GCV-E, este último evento foi evidenciado próximo a 230°C. Comportamento similar, também foi observado na curva DTA da amostra GCV-A, porém o evento exotérmico foi evidenciado ao redor de 190°C. Por outro lado, o produto recristalizado de GCV-G mostrou três eventos endotérmicos 50, 150 e 218°C, respectivamente. Os dois primeiros eventos foram discretos e relacionaram-se à liberação de água superficial e de solvente de cristalização, enquanto que o terceiro (218°C) foi atribuído à decomposição do composto.

FIGURA 8. Curvas DTA obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL min^{-1}) dos recristalizados de GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F, GCV-G e GCV-H.

De acordo com as informações das curvas de DTA e TG (FIGURA 7 e 8) pôde-se verificar que as amostras de GCV-1, GCV-B e GCV-H (Forma I) foram as mais estáveis termicamente, uma vez que apresentaram perda de massa somente a partir de 240°C , confirmando que os compostos são anidros, enquanto que as amostras GCV-C, GCV-D, GCV-F e GCV-G (Forma III), GCV-A (Forma IV) e GCV-E (Forma V) são de compostos hidratados. Por outro lado, foi evidenciado que as características dos solventes empregados influenciaram na cristalização de GCV, fato que pode ser observado nos difratogramas de raios X e nas curvas de TG e DTA dos compostos (FIGURAS 2, 5 e 6).

A TABELA 4 lista os resultados de análise elementar para a amostra de GCV, e de seus materiais cristalizados (GCV-1, GCV-A, GCV-B, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-

F, GCV-G e GCV-H) e %H₂O encontradas a partir das curvas TG/DTG. Os percentuais de C, H e N apresentados foram próximos aos obtidos estequiometricamente estando em concordância com os valores relatados na literatura (MERCK ..., 2006).

Por outro lado, analisando os valores de percentagem de C, H e N para a Forma I (GCV-1, GCV-B e GCV-H), pôde-se observar que os mesmos foram semelhantes aquele calculado para o GCV, indicando que se tratam de amostras puras. Além disso, esses resultados estão em concordância com os resultados obtidos a partir das curvas TG, DTA e dos difratogramas de raio X (FIGURAS 7, 8 e 2), uma vez que as amostras mostraram comportamento característico de compostos anidros, ou seja, livres de água.

TABELA 4. Resultado da análise elementar dos recristalizados de GCV

Amostra	% Carbono	% Hidrogênio	% Nitrogênio	%H ₂ O(*)
GCV Experimental	41,24	5,18	26,84	2,5
GCV Calculado	42,35	5,13	27,45	-
GCV-1	42,53	5,19	27,02	-
GCV-A	40,07	5,19	25,36	1,4
GCV-B	42,18	5,17	26,83	-
GCV-C	41,17	5,05	25,88	0,6
GCV-D	41,20	5,12	26,09	0,7
GCV-E	40,04	5,18	25,36	1,5
GCV-F	40,81	5,12	25,77	0,6
GCV-G	40,38	5,36	25,21	3,4
GCV-H	42,42	5,22	27,37	-

(*) em alguns casos pode ocorrer liberação do volátil empregado na recristalização

Esta avaliação também foi realizada para os compostos hidratados de GCV (GCV-A, GCV-C, GCV-D, GCV-E, GCV-F e GCV-G), em que os percentuais de H e C se mostraram diferentes em relação ao valor calculado, ou seja, valores superiores e inferiores, respectivamente. Estes resultados são consistentes com a presença de água de umidade e/ou de cristalização, conforme os resultados obtidos das curvas TG/DTG (FIGURA 7 e TABELA 4). Além disso, a presença do pico de difração em 5,34° na posição 2θ confirma que estes compostos de recristalização do GCV são hidratados (FIGURA 6).

De acordo, com os resultados apresentados acima, selecionaram-se as amostras de GCV-1 (Forma I) e GCV-A (Forma IV) para avaliar a estabilidade física dos compostos devido à sua maior e menor estabilidade térmica, respectivamente (FIGURA 7). Observou-se que a Forma I foi mais estável do que a Forma IV após os ensaios de conversão de *slurry* (FIGURA 9). O resultado está em concordância com a curva TG (FIGURA 7), uma vez que a amostra de GCV-1 (Forma I) foi aquela em que a decomposição térmica se iniciou em temperatura maior.

FIGURA 9. Difratogramas de raios X da Forma I, IV e da mistura de ambas formas de GCV.

Devido a maior estabilidade física e excelente morfologia da amostra de GCV-1 (Forma I) ela foi escolhida para repetir a cristalização e obter, desta forma, o monocrystal do fármaco que deu origem à Forma I do GCV. Portanto, foram selecionados como solventes água, metanol e *N,N*-dimetilformamida para a sua cristalização, os mesmos que foram utilizados inicialmente (ver TABELA 1). A Forma I

de GCV foi obtida pelo método de evaporação lenta. A combinação de solventes de volatilidades e constante dielétrica diferentes resultou em cristais incolores de dimensão grande, provavelmente, devido ao crescimento lento do cristal (FIGURA 10). Além disso, a evaporação e o resfriamento lento até a temperatura ambiente permitiram a supersaturação da solução, levando à formação de núcleos, e, portanto, à formação de cristais grandes.

A FIGURA 10 apresenta as fotomicrografias da Forma I de GCV obtidas por *Hot stage microscopy* sob luz polarizada em diferentes intervalos de temperatura. A micrografia (A) registrada a 25°C mostrou cristais incolores grandes em forma de agulhas, que se mostraram estáveis nesta temperatura, porém acima de 225°C (micrografia B) os cristais apresentaram uma ligeira mudança de coloração. Este comportamento foi atribuído à transição da forma polimórfica I para a Forma II (micrografia C). Além disso, próximo a 240°C (micrografia D) os cristais revelaram fusão completa, seguida de decomposição, característico da Forma II de GCV.

FIGURA 10. Fotomicrografias da Forma I de GCV fotografadas no *Hot Stage Microscopy* a 25°C (A), 225°C (B), 227°C (C) e 237°C (D).

A FIGURA 11 ilustra as curvas TG e DTA, obtidas a 300°C, da Forma I de GCV, que se mostrou estável termicamente até 237°C e apresentou uma única etapa de decomposição térmica. A curva DTA apresentou um evento endotérmico entre 237 e 248°C, característico da fusão com decomposição do polimorfo II de GCV. Estes resultados estão em concordância com as fotomicrografias obtidas por *Hot stage microscopy* (FIGURA 10), confirmando, portanto, a fusão com decomposição do composto (Forma II). De fato, não foi evidenciada nas curvas DSC e DTA a transição de fase da Forma I para a Forma II, demonstrando que a técnica do *Hot stage microscopy* é uma ferramenta poderosa na identificação de polimorfos de GCV.

FIGURA 11. Curvas TG/DTA obtidas a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de N_2 (100 mL min^{-1}) da Forma I de GCV.

Na FIGURA 12 são apresentados os difratogramas de raios X experimental e calculado da Forma I do GCV. Este último obtido a partir da estrutura cristalina.

FIGURA 12. Difratomogramas de raios X da Forma I de GCV. a) experimental (linha vermelha), b) calculado (linha azul).

Observa-se que os picos de difração obtidos experimentalmente coincidem com os dados teóricos. Além disso, foi possível evidenciar os picos de difração característicos da Forma I em 8,43; 17,00; 18,21; 21,14 e 25,62° na posição (2θ). A intensidade destes picos pode ser justificada pelo empacotamento cristalino da molécula do GCV. Por outro lado, as diferenças evidenciadas nas intensidades dos picos no difratograma experimental, provavelmente, estejam relacionadas à orientação preferencial do cristal.

A TABELA 5 lista os dados referentes à estrutura cristalina da Forma I de GCV encontrados neste trabalho juntamente com aqueles do polimorfo conhecido (Forma II).

TABELA 5. Dados estruturais da Forma I e da Forma II de GCV

Código de identificação	Forma I	Forma II
Fórmula empírica	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄
Peso molecular (g/mol)	255,24	255,24
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Temperatura, K	100,01	283 - 303
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P2 ₁
a/Å	4,6448(10)	4,380(2)
b/Å	15,632(3)	10,909(4)
c/Å	14,130(3)	11,601(4)
$\beta/^\circ$	91,632(10)	99,11(3)
Volume/Å ³	1025,5(4)	547,3(3)
Z	4	2
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1,653	1,549
Coeficiente de Absorção (mm ⁻¹)	0,132	68,09
F(000)	0,536	0,0583
Tamanho do cristal / mm ³	0,58 × 0,1 × 0,1	0,0561
Radiação	MoK α (λ = 0,71073)	---
Variação do θ para a coleta de dados (°)	3.886 a 61.094	---
Intervalo dos índices	-6 $\leq$ h $\leq$ 6, -22 $\leq$ k $\leq$ 22, -20 $\leq$ l $\leq$ 19	---
Reflexões coletadas	56131	---
Reflexões independentes	45424 [R_{int} = 0,0599, R_{sigma} = 0,0951]	---
Dados/restrições/parâmetros	45424/0/184	---
S	1,022	---
R final para $I \geq 2\sigma(I)$	R_1 = 0,0535, wR_2 = 0,1455	---
R para todos os dados	R_1 = 0,0621, wR_2 = 0,1510	---
$(\Delta\rho)_{\text{max}}$	0,45 e Å ⁻³	0,45 e Å ⁻³
$(\Delta\rho)_{\text{min}}$	- 0,29 e Å ⁻³	- 0,78 e Å ⁻³

As informações estruturais da Forma II foram obtidas a partir do CCDC código de referência 714337.

A estrutura cristalina da Forma I de GCV foi proposta a partir dos dados obtidos no difratômetro Bruker Quazar SMART APEXII à temperatura de 100K. O GCV cristaliza em um sistema monoclínico com grupo espacial *P21/c* e *Z* = 4, com

parâmetros de rede $a = 4,6448\text{\AA}$, $b = 15,632\text{\AA}$, $c = 14,130\text{\AA}$, $\beta = 91,632^\circ$. A cela unitária do GCV determinada a partir dos dados de difração de raios X está ilustrada na FIGURA 13.

FIGURA 13. Célula unitária da Forma I de GCV.

Na FIGURA 14 é apresentada a estrutura, o número de átomos e os elipsoides com 50% de probabilidade da Forma I do GCV. A estrutura cristalina (FIGURA 13), obtida a partir de dados de DRX, contém quatro moléculas de GCV na sua unidade assimétrica as quais estão ligadas por ligações de hidrogênio conforme listadas na TABELA 6. Cada molécula apresenta um sistema de anel coplanar de pirimidina-imidazol insaturado. Dois deles estão localizados na região central da célula unitária e os outros orientados para os eixos b e c , respectivamente. Todas as moléculas mostraram a mesma geometria molecular, porém com disposição diferente, isto é, com a cadeia lateral oposta entre elas (FIGURA 13). Os anéis de purina localizados no centro da unidade assimétrica se projetam para a direita e para a esquerda paralelamente ao plano (011), que atravessa as ligações C-N dos átomos C1 e N2.

Esse comportamento também foi observado nos planos (01-1) e (0-11), situados na extremidade do eixo *b* e *c*, respectivamente.

FIGURA 14. Unidade assimétrica de Forma I de GCV mostrando a numeração dos átomos e elipsóides térmicos com 50% probabilidade.

TABELA 6. Distâncias e ângulos para as ligações de hidrogênio para a Forma I de GCV

Ligações de hidrogênio para a Forma I de GCV (distâncias em Å e ângulos em °)				
D-H...A	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
O3-H3...N3 ¹	0,89(3)	1,93(3)	2,811(2)	172(3)
O4-H4...O3 ²	0,85(3)	1,91(4)	2,754(2)	176(3)
N1-H1A...N5 ³	0,86(3)	2,15(3)	3,012(2)	179(3)
N1-H1B...O2 ⁴	0,88(3)	2,34(3)	3,093(2)	143(2)
N2-H2...O4 ⁴	0,80(3)	2,07(3)	2,869(2)	172(3)

Código de simetria: ¹) -1+X, 1/2-Y, -1/2+Z; ²) 1-X, 1-Y, -Z; ³) -X, 1-Y, 1-Z; ⁴) 1-X, 1-Y, 1-Z

É importante destacar que as quatro moléculas de GCV na sua célula unitária *P21/c* estão relacionadas por três elementos de simetria independentes: A primeira por inversão, que está no centro da célula unitária, a segunda reflexão seguida da translação, a terceira rotação seguida de translação, com rotação paralela ao eixo *b* e translação ao longo do eixo *c* (FIGURA 15).

FIGURA 15. Moléculas de GCV mostrando as ligações de hidrogênio e as principais interações intermoleculares do tipo N-H...O, O-H...O e O-H...N ao longo do eixo *b* cristalográfico.

Conforme mencionado acima, a estrutura molecular da Forma I de GCV evidencia um composto coplanar insaturado, sem flexibilidade. Portanto, a característica molecular mais significativa é dada no resto da cadeia lateral, onde os ângulos de torção foram observados (FIGURA 13). Os ângulos de torção C5-C6-N4-O2 e C4-C6-N4-O2, que determinam a disposição relativa do anel de purina e do átomo de oxigênio do éter são 83,8 (2) e -98,1 (2)°, respectivamente. Distâncias diferentes daquelas relatadas por Kawamura e Hirayama (2009) para a Forma II de GCV. Além disso, foi

possível notar que o N4 adota uma geometria molecular coplanar devido à força de repulsão de seu par de elétrons livres, diferente de O2, que mostra uma geometria molecular angular.

Os outros ângulos de torção significativos são O2-O3-C7-C8, C1-C2-N2-O1 e C8-C9-C7-O4 com distâncias de 173,90 (14), 179,91 (17) e -73,42 (19), também são diferentes daqueles relatados por Kawamura e Hirayama (2009) para a Forma II de GCV. Por outro lado, é importante ressaltar que a atividade biológica do GCV ocorre na cadeia lateral do fármaco, onde estão os ângulos de torção descritos acima.

O ângulo de torção C1-C2-N2-O1 com a distância 179,91 (17)° que faz parte da guanina (sistema de anel pirimidina-imidazol), é também um sítio ativo da molécula e de acordo com Champness *et al.* (1998) parece ser o lugar preferido da enzima timidina quinase do vírus herpes simplex (HSV) para ligar-se e formar o complexo de ganciclovir (Complexo TK / Ganciclovir), provavelmente, por seu caráter polar.

Por outro lado, comparando esta estrutura cristalina (Forma I) com a Forma II, é possível observar que esta última mostra duas moléculas de GCV em sua unidade assimétrica com diferentes orientações dos anéis de purina, ou seja, cada molécula está localizada para final do eixo b e c, comprometidos diagonalmente pelo plano (011), que passa pelos átomos C5, N4 e C8. Além disso, estas moléculas estão ligadas por ligações intermoleculares de hidrogênio N1-H ... N3i, N5 ... O1i, N5 ... O4ii e O4 ... O1iii (KAWAMURA; HIRAYAMA, 2009) diferentes da Forma I (TABELA 6). Embora o arranjo cristalino e o número de moléculas da Forma II sejam diferentes da Forma I, estas estruturas compartilham algumas características comuns, ambos são definidos como sistemas monoclinicos e se descrevem como cristais incolores em forma de agulha (KAWAMURA; HIRAYAMA, 2009).

A FIGURA 16 compara as moléculas de GCV dos dois polimorfos em que os anéis rígidos se sobrepõem para destacar as diferenças conformacionais. É claro que a partir dessas sobreposições as conformações moleculares são significativamente diferentes nos dois polimorfos. Em cada molécula, o grupo lateral tem uma orientação distinta em relação ao anel de purina. Esta diferença conformacional pode estar

relacionada, em parte, com a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares na Forma II, mas não na Forma I (ver abaixo).

FIGURA 16. Conformação molecular da Forma I e II de GCV. Ambas as moléculas estão em sobreposições Forma I (P21/c) e Forma II (P21), colorida em verde.

Uma diferença fundamental entre os dois polimorfos é que, na Forma II, um dos dois grupos OH está ligado por um hidrogênio ao nitrogênio do anel da mesma molécula, enquanto que na Forma I, todas as ligações de hidrogênio são intermoleculares. Esta diferença estrutural é apresentada na FIGURA 17. Como resultado da ligação de hidrogênio intramolecular, cada molécula na Forma II participa em 6 ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto que na Forma I, cada molécula participa em 8 ligações de hidrogênio intermoleculares.

FIGURA 17. Interações de ligações de hidrogênio para as Formas I e II de GCV. A) Forma I apresentando ligações de H intermoleculares; B) Forma II exibindo as ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular.

Por outro lado, de acordo com os resultados e as informações relatadas acima, a ligação intermolecular de hidrogênio N2-H2...O4 (FIGURA 14) parece influenciar nas propriedades físicas do cristal como a densidade (TABELA 5) e o ponto de fusão, uma vez que a amostra apresentou fusão seguida por decomposição na T_{pico} de 237°C, (ver FIGURAS 10 e 11). De fato, esse comportamento não foi observado na análise inicial do GCV, mostrando apenas a decomposição térmica do produto sem a fusão do fármaco (ver FIGURA 11 do CAPÍTULO III).

5. CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados pode-se concluir que o *screening* experimental de GCV pelo método de evaporação lenta de solvente proporcionou quatro formas polimórficas (Forma I, III, IV e V), uma anidra e três hidratadas. A forma anidra mostrou-se física e termicamente mais estável do que as outras, e a sua cristalização deu origem ao monocristal da Forma I de GCV (anidro), estrutura cristalina que passa a ser conhecida a partir deste trabalho de investigação. A solução da estrutura cristalográfica da Forma I de GCV proporciona informações valiosas para o desenvolvimento de mais formas farmacêuticas do fármaco e coloca em evidência a importância do sistema de *screening* pelo método de evaporação lenta de solventes na obtenção de monocristais e de formas sólidas de GCV. Além disso, o presente estudo complementa dados até agora não reportados na literatura proporcionando uma melhor compreensão das formas cristalinas já reportadas do fármaco. Outro resultado relevante deste trabalho foi a obtenção de um novo polimorfo hidratado denominado Forma V.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R.D.; GRIFFY, K.G.; JUNG, D.; DOOR, A.; HULSE, J.D.; SMITH, R.B. Ganciclovir absolute bioavailability and steady-state pharmacokinetics after oral administration of two 300 mg/d dosing regimens in human immunodeficiency virus and cytomegalovirus seropositive patients. **Clinical Therapeutics**, v.17, n.3, p.425-432, 1995.

BECKMANN, W. Mechanisms of crystallization. In: Beckmann, W. ed. **Crystallization: basic concepts and industrial applications**. Weinheim: John Wiley, 2013. cap.2, p.7-33.

BIRON, K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. **Antiviral Research**, v.71, p.154-163, 2006.

CAMPETA, A.M.; CHEKAL, B.P.; ABRAMOV, Y.A.; MEENAN, P.A.; HENSON, M.J.; SHI, B.; SINGER, R.A.; HORSPOOL, K.R. Development of a targeted polymorph screening approach for a complex polymorphic and highly solvating API. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v.99, p.3874-3886, 2010.

CHAMPNESS, J.N.; BENETT, N.S.; WIEN, F.; VISSE, R.; SUMMERS, W.C.; HERDEWIJN, P.; CLERCQ, E.; OSTROWSKI, T.; JARVEST, R.L.; SANDERSON, M.R. Exploring the active site of herpes simplex virus type-1 thymidine kinase by X-ray crystallography of complexes with aciclovir and other ligands. **Proteins**, v.32, p.350-361, 1998.

FERNANDES, J.A.; GALLI, S.; PALMISANO, G.; VOLANTE, P.; MENDES, R.F.; ALMEIDA PAZ, F.A.; MASCIOCCHI, N. Reviewing the manifold aspects of ganciclovir crystal forms. **Crystal Growth & Design**, v.16, p.4108-4118, 2016.

GETSOIAN, A.; LODAYA, R.M.; BLACKBURN, A.C. One-solvent polymorph screen of carbamazepine. **International Journal Pharmaceutical**, v.348, p.3-9, 2008.

GROSS, J.B.; BOZZETE, S.A.; MATHEWS, W.C.; SPECTOR, S.A.; ABRAMSON, I.S.; McCUTCHAN, J.A.; MENDEZ, T.; MUNGIA, D.; FREEMAN, W.R. Longitudinal study of cytomegalovirus retinitis in acquired immune deficiency syndrome. **Ophthalmology**, v.97, p.681-686, 1990.

KAWAMURA, T.; HIRAYAMA, N. Crystal structure of ganciclovir. **X-Ray Structure Analysis Online**, v.25, p.51-52, 2009.

LAVELLE, J.; FOLLANSBEE, S.; TRAPNELL, C.B.; BUHLES, W.C.; GRIFFY, K.G.; JUNG, D.; DORR, A.; CONNOR, J. Effect of food on the relative bioavailability of oral ganciclovir. **Journal of Clinical Pharmacology**, v.36, p.238-241, 1996.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Whitehouse Station: Merck, 2006. p.750.

PARTHASARADHI, R.B.; RATHNAKAR, R.K.; MURALIDHARA, R.D.; RAJI, R.R.; VAMSI, K.B.; SUBASH, C.R.K.; VENKATA, R.R.I. **Process for the isolation of ganciclovir intermediate**. WO Pat. 2011/114336 A1, 22 sep. 2011. 19p.

ROQUE FLORES, R.L.; GUZEI, I.A.; MATOS, J.R.; YU, L. Crystal structure of Ganciclovir polymorph I, manuscrito em preparação.

SARBAJNA, R.M.; PREETAN, A.; DEVI, A.S.; SURYANARAYANA, M.V.; SETHI, M.; DUTTA, D. Studies on crystal modifications of ganciclovir. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v.537, p.103-107, 2011.

SUN, C. Solid-state properties and crystallization behavior of PHA-739521 polymorphs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.319, n.1/2, p.114-120, 2006.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1. Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1. Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2. Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 05 de maio de 2017.

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Presidente da CPG/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6603390/3 - Roxana Lili Roque Flores

Email: roxana@usp.br

Cédula de Identidade: RNE - V532022-C - DF

Local de Nascimento: Peru

Nacionalidade: Peruana

Graduação: Farmacia y Bioquímica - Universidad Católica de Santa María - Arequipa - Peru - 2004

Graduação: Química-farmacêutica - Universidad Católica de Santa María - Arequipa - Peru - 2004

Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Produção e Controle Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Doutorado

Programa: Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Data de Matrícula: 05/02/2013

Início da Contagem de Prazo: 05/02/2013

Data Limite para o Depósito: 05/06/2017

Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 05/02/2013 até 30/07/2013. Email: hajudan@usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Jivaldo do Rosario Matos - 31/07/2013 até o presente. Email: jdrmatos@iq.usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/02/2013

Prorrogação(ões): 120 dias
 Período de 05/02/2017 até 05/06/2017

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/03/2015

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 05/02/2013
 Prorrogação em 02/12/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 30/05/2017 12:19:25

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6603390/3 - Roxana Lili Roque Flores

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5817-1/4	A Prática da Cromatografia Líquida e Eletroforese Capilar	18/02/2013	28/04/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/1	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	04/03/2013	17/03/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5794-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	06/03/2013	14/05/2013	30	2	100	A	N	Concluída
QFL5715-6/2	Projetos em Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	20/03/2013	29/05/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5778-2/1	Estudos Biofarmacotécnicos para Avaliação in vitro da Permeabilidade de Fármacos e Candidatos a Fármacos Empregando Culturas Celulares	15/05/2013	25/06/2013	60	4	85	B	N	Concluída
FBF5779-2/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	16/08/2013	17/10/2013	90	6	90	A	N	Concluída
QFL5631-1/1	Caracterização de Complexos de Inclusão (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	02/12/2013	08/12/2013	30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0342 Desenvolvimento Farmacotécnico, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2014	30/07/2014	-	1	-	-	-	-
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0342 Desenvolvimento Farmacotécnico, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	05/08/2014	25/11/2014	-	1	-	-	-	-
Atividade do Programa	Participou do 11th European Symposium on Thermal Analysis and Calorimetry Dipoli Congress Center, com apresentação do trabalho intitulado: "Thermal behaviour study and decomposition kinetics of polymorph a and c of mebendazole under isothermal and non-iso thermal conditions", publicado em anais, v. 1, p. 1, 2014, Filandia (2)	17/08/2014	21/08/2014	-	1	-	-	-	-
Atividade do Programa	Participou do IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, com apresentação do trabalho intitulado: "Caracterização Físico-Químico e Analítica do Ganciclovir", publicado em anais, v. 1, p. 1-6, 2014, Serra Negra, São Paulo (2)	09/11/2014	12/11/2014	-	1	-	-	-	-
PQ15878-1/2	Fundamentos de Cristalização e Precipitação a partir de Soluções (Escola Politécnica - Universidade de São Paulo)	23/02/2015	29/05/2015	120	8	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	42
Estágios:			
Total:	0	20	42

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

- 1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 31/03/2015.
- 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 01/04/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 30/05/2017 12:19:25

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 6603390/3 - Roxana Lili Roque Flores

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
58356	Jivaldo do Rosario Matos	IQ - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 30/05/2017 12:19:25