

Gabriela Schneider Rauber

**COCRISTAIS FARMACÊUTICOS DE FUROSEMIDA:  
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE  
ESTABILIDADE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Lúcia Cuffini

Florianópolis  
2013

Rauber, Gabriela Schneider

Cocristais farmacêuticos de Furosemida: obtenção, caracterização e estudos de estabilidade / Gabriela Schneider Rauber ; orientador, Simone Gonçalves Cardoso ; co-orientador, Sílvia Lucia Cuffini. - Florianópolis, SC, 2013.

235 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Furosemida. 3. Cocristais. 4. Mecanossíntese. 5. Química no estado sólido. I. Cardoso, Simone Gonçalves. II. Cuffini, Sílvia Lucia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Gabriela Schneider Rauber

**COCRISTAIS FARMACÊUTICOS DE FUROSEMIDA:  
OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE  
ESTABILIDADE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Farmácia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Florianópolis, 06 de Março de 2013.

---

Prof.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Sílvia Lúcia Cuffini, Dr.<sup>a</sup>  
Co-orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Lúcio Cabral, Dr.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Márcio Celso Fredel, Dr. Ing.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Diva Sonaglio, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedicado a todas as pessoas de coração puro e espírito simples que buscam o conhecimento para a evolução da humanidade.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Noeli e Celso. Seus ensinamentos, seus exemplos e sua simplicidade construíram a base de meu caráter. Seu apoio e incentivo fizeram-me seguir adiante e sonhar em crescer como uma pessoa melhor. À minha irmã, mana Dulci, uma segunda mãe que com suas lágrimas fáceis e posicionamentos ensinome que é possível conciliar força e delicadeza no viver. Inspirou-me desde cedo pela seriedade, doçura, admiração e respeito que infundia como professora. À minha madrinha, madi Celei, e a todas as minhas tias, exemplos de mulheres batalhadoras e firmes em seus princípios. Aos meus sobrinhos Lucas, Maria Helena e Maria Vitória... Vê-los crescer com o coração puro é ter esperança e acreditar no mundo. Amo vocês, crianças!

Àqueles que compartilharam comigo meus primeiros momentos de independência longe da casa de meus pais, meus colegas de graduação da turma de Farmácia 2006.1 UFSC (e agregados). Tive um grande privilégio por compartilhar muitos dos meus anos com esse povo! É maravilhoso olhar os traços e a personalidade de cada um, suas virtudes e seus defeitos, por mais próximos ou distantes que fomos ou que estejamos... E sentir um carinho muito grande, sem julgamentos!

Às minhas orientadoras-mãe! Professora Simone Cardoso apresentou-me a o apaixonante Controle de Qualidade, enquanto que a partir da fronteira Argentina-Brasil conheci o maravilhoso mundo da Química no Estado Sólido com a Professora Sílvia Cuffini. Muito obrigada por acreditarem na minha proposta de trabalhar com cocristais! Muito obrigada por me ensinarem e por permitirem que eu desse meus primeiros passos profissionais com a interdisciplinaridade e aplicação que buscava e que me encantam como Farmacêutica! Muito obrigada pela parceria, pela dedicação, pela amizade, pela confiança, pela liberdade, pelas oportunidades, pelo apoio, pela sinceridade, pela postura reta e pelas gargalhadas. São duas das mulheres-exemplo que levo em minha vida. Tenho muito orgulho de suas histórias e de sua personalidade.

À família “Laboratório de Controle de Qualidade UFSC”. Aos companheiros Rafa, Bruno, Fábio, Paulo, Chari, Amarilis, Silvinha, Lari, Cassi, Camila, Cinira, Andréa Koroishi, Andréa CR, Paola, Aline, Carol, Pedro, professor Marcos e professora Hellen, por tornarem os momentos muito mais divertidos. Às irmãs da caminhada Monika, Gis, Manu, Andréa Granada e, mais recentemente, Vivi e Ana Carol, com as quais dividi os meus insights e desafios; muito obrigada, não seria a mesma sem as reflexões e o aprendizado que nossa amizade me proporcionou. À nossa doce aluna de Iniciação Científica Juli Rosa, com muito carinho, seu auxílio e convívio amigo foram imprescindíveis na realização do presente trabalho e no meu primeiro ensaio docente; felicidade e conhecimento só tem valor quando são sementes compartilhadas! Aos colegas dos outros laboratórios, Maria, Carol, Ana Cláudia, Taliha, Cristian, Mari, Thiaguinho, Didi, e aos amigos de coração-luz Anne e Solomon. Todos contribuíram para meu aprendizado, compartilharam de idéias a copos de cerveja, discutiram de experimentos a religião, organizaram de novas hipóteses experimentais a churrascos, dividiram de reagentes a mojitos, temakis, lanches no Rango’s, cachorro-quente do Space, pastéis de camarão no Iega

e, principalmente, infinitos cafés... Vivenciamos comigo minhas tão marcantes mudanças; como o retorno de Saturno de que falou Renato.

Ao fundamental apoio-técnico dos nossos laboratórios, com Solange, D. Ivonete, Claudinha, Sandra e Madalena.

Aos colegas das Disciplinas e parcerias que conheci durante o mestrado. Pedro e Bruna Botelho, Pablo Lia Fook e Bruna Deschamps pela amizade e por participarem de momentos positivamente decisivos em meus experimentos. Vicente, Schilling, Ana Piotto, Nati e Alcemira por compartilharem seu conhecimento e boas energias durante meu processo de aprendizado.

Ao CNPq e à CAPES, pelo auxílio financeiro do projeto e pela concessão da bolsa de mestrado, respectivamente. Ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC, pela oportunidade e incentivo durante a realização do projeto e na participação em eventos científicos, destacando-se a figura dos coordenadores vigentes em 2011 e 2012, professor Eloir Schenkel e professora Tânia Pasa, e do secretário, Bruno Wanderley Farias. Um agradecimento adicional aos demais professores do PGFAR e do departamento de Ciências Farmacêuticas, pela palavra amiga e pelo apoio.

Aos professores de outros departamentos e Instituições que muito contribuíram para o delineamento do trabalho e para os experimentos realizados: professor Adailton Bortoluzzi do departamento de Química/UFSC, professor Carlos Maduro do departamento de Física/UFSC, professor Juan Manuel García-Ruiz do Instituto Andaluz de Ciências de La Tierra/Universidade de Granada, professora Naír Rodríguez-Hornedo do departamento de Ciências Farmacêuticas/Universidade de Michigan, professor Gustavo Monti do Departamento de Matemática, Física e Astronomia/Universidade Nacional de Córdoba. Destaco a figura de professor Adailton, sempre muito paciente e dedicado, foi nosso professor de cristalografia. Também um agradecimento especial ao professor Carlos Maduro, sempre prestativo e interessado, seu papel foi muito importante na realização deste trabalho.

Aos amigos de longa data, irmãos de existência que podem estar distantes e terem seguido caminhos muito diversos, mas que continuam conectados à minha alma: Wilson, Carol Rotta, Josivan, Pati Piazzon, Carol Maranhão, Rodrigo e Hellin, Gelson, Luís, Débora e Calza.

Àqueles que ajudaram em minha busca espiritual e de autoconhecimento, em especial Myrtes, Eloíta e Saionara, Thalita, Marilena Kaily, Bárbara Rios e Alba. Muito obrigada por estimularem o amanhecer de meu pensamento e o surgimento de uma observadora interna permanente em mim!

Ao amor e ao Deus que fazem parte de minha essência, por mostrarem a verdadeira felicidade. À paz e às boas energias, à liberdade, às oportunidades de evolução, aos erros, ao processo de aprendizagem, à vida e à contemplação... À música, ao nascer e ao pôr do sol, às viagens, às flores, aos insights, às borboletas na barriga, ao olhar sincero, às lembranças do passado, ao sorriso, às reflexões, às leituras, à profundidade das relações humanas... À retomada de nossa verdadeira essência!

Sobretudo, “agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar” (Chico Xavier). Sou muito grata pela vida!



“Quanto mais me capacito como profissional, quanto mais sistematizo minhas experiências, quanto mais me utilizo do patrimônio cultural, que é patrimônio de todos e ao qual todos devem servir, mais aumenta minha responsabilidade com os homens.”

(Paulo Freire)

“O medo pode ser forte, mas o amor é fonte!”

(Daniel José da Silva)

“Quem olha para fora, sonha; quem olha para dentro, desperta”

(Carl Gustav Jung)



## RESUMO

A Furosemida é um potente diurético de alça indicado para o tratamento de edema associado à insuficiência cardíaca. Ela compreende um fármaco-modelo para aplicação em sistemas tecnológicos que aprimorem suas características de labilidade química e baixa solubilidade. Dentre as ferramentas utilizadas no melhoramento de sistemas farmacêuticos, as técnicas de modelagem cristalina vem ganhando destaque pelo impacto que exercem sobre as características biofarmacêuticas de um produto. Neste contexto, o presente trabalho objetivou realizar o *screening* de formas cocrystalinas de furosemida e determinar suas propriedades físicoquímicas em comparação com o fármaco puro. O desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas para determinação de furosemida em estudos de estabilidade e dissolução foram realizados tendo por base a cromatografia líquida de alta eficiência. Os ensaios de *design* supramolecular foram iniciados por estudos de cristalização da furosemida pura em solução e resultaram em materiais cristalinos puros e misturas de fases. Dependendo do método de cristalização escolhido, os sistemas demonstraram partículas marcantemente diferentes para amostras descritas como isomórficas e que apresentaram desempenho variável frente os ensaios de dissolução. Já as tentativas de cocrystalização da furosemida empregaram a moagem como ferramenta principal. O processamento de furosemida com outros compostos em moinho de bolas a seco e com solventes resultou basicamente na obtenção de três situações diferentes: sistemas amorfos, sistemas cristalinos compreendendo novas modificações sólidas e sistemas cristalinos compreendendo os insumos de partida segregados. Observou-se que a presença de fase amorfa levou à formação de cocrystalais sob condições em que a mobilidade e a energia das moléculas encontraram-se aumentadas e havia complementaridade entre os insumos. Destacam-se os exemplos dos sistemas cocrystalinos furosemida:caféina e furosemida:nicotinamida, para os quais foram obtidas uma e cinco modificações cristalinas inéditas, respectivamente. Evidenciou-se experimentalmente que a utilização de técnicas de mecanossíntese e cristalização são efetivas no que se refere ao *screening* e à análise de novas formas sólidas em insumos farmacêuticos ativos. Estas são importantes ferramentas de desenho e controle de qualidade de fármacos e podem influenciar no desempenho dos mesmos e na sua produção.

**Palavras-chave:** Furosemida; Cocrystalais; Mecanossíntese; Caracterização no estado sólido.



## ABSTRACT

Furosemide is a loop diuretic used for the treatment of edema associated with heart failure. It comprises a model molecule for technological systems on the improvement of its low solubility and chemical instability. Among the tools used in advanced pharmaceutical systems, crystal design strategies are highlighted due to their influence on the biopharmaceutical characteristics. The present study aimed to apply cocrystal screening methodologies for furosemide and to characterize the physicochemical properties of the obtained materials. Analytical methods for stability and dissolution studies of furosemide were developed and validated based on high performance liquid chromatography. Crystallization studies of furosemide in solution resulted in pure crystalline materials and phase mixtures. Depending on the chosen method of crystallization, the systems showed markedly different particles for isostructurally samples. These materials showed different behaviour facing dissolution testing. The cocrystallization of furosemide was performed under dry and liquid assisted milling. Basically, the assays resulted in three different situations: amorphous systems, crystalline systems of new solids and crystalline systems of the starting materials. It was observed that the presence of amorphous phase led to the formation of cocrystals under conditions of increased molecular mobility and of shape/synthon complementarity. The milling systems of furosemide:caffeine and furosemide:nicotinamide led to one and five novel crystal modifications, respectively. These results have experimentally proved the effectiveness of crystallization techniques and mechanochemistry regarding solid screening purposes for active pharmaceutical ingredients. These are important tools for the quality control analysis and performance studies of drugs.

**Keywords:** Furosemide; Cocrystals; Mechanosynthesis; Solid state characterization.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representação de sistemas em arranjo monocristalino (A) e policristalino (B). O ordenamento em B é mantido até certa extensão, a partir da qual outro domínio cristalino ordenado se mostra em orientação diferente. A zona circundante destes domínios apresenta certa desordem com átomos/moléculas livres, espaços vazios e impurezas de cristalização. Fonte: Adaptado de Callister; Rethwisch (2009). .....	40
<b>Figura 2 -</b> Classificação dos sólidos cristalinos.Fonte: Adaptado de Aitipamula e co-autores (2012). .....	42
<b>Figura 3 -</b> Conjuntos esquematizando as relações entre os sólidos cristalinos multicomponentes. Fonte: Adaptado de Aitipamula e co-autores (2012). .....	43
<b>Figura 4 -</b> Relação de alguns dos <i>formers</i> mais utilizados na formação de cocristais de uso farmacêutico. Destacam-se entre os grupos funcionais os ácidos carboxílicos e as aminas [(A) nicotinamida, (B) ácido nicotínico, (C) ácido salicílico, (D) ácido oxálico, (E) ácido benzóico, (F) ácido málico, (G) alantoína, (H) ácido p-aminobenzóico, (I) ácido succínico, (J) ácido maleico, (K) ácido fumárico, (L) uréia, (M) ácido cítrico, (N) cafeína, (O) teofilina, (P) sacarina]. Fonte: Adaptado de Fabián (2009). .....	46
<b>Figura 5 -</b> Representação esquemática dos fenômenos que governam as transições em fase sólida. Fonte: Adaptado de Rodriguez-Spong e co-autores (2004). .....	53
<b>Figura 6 -</b> Representação esquemática do processo mais comum envolvendo degradação química no estado sólido. Fonte: Adaptado de De Villiers; Vander Watt; Lotter (1992). .....	57
<b>Figura 7 –</b> Representação da furosemida: (A) estrutura molecular evidenciando a principal ligação de hidrogênio intramolecular (vermelho); (B) minimização das conformações sobrepostas para as moléculas dos três polimorfos do fármaco. Fonte: Adaptado de Babu et al. (2010) .....	66
<b>Figura 8 -</b> Principais <i>synthons</i> observados em cocristais de furosemida. Fonte: Adaptação de Babu e colaboradores (2010), Goud; Babu; Nangia (2011), Ueto e colaboradores (2011), Goud e colaboradores (2012), Stepanovs; Mishnev (2012). .....	70
<b>Figura 9 -</b> Principal reação de degradação da furosemida frente condições diversas (hidrólise e fotólise). Fonte: Adaptado de Carda-Broch, Esteve-Romero; Garcia-Alvarez-Coque (2000).....	71
<b>Figura 10 -</b> Cromatogramas relativos aos ensaios de degradação forçada. As amostras expostas à luz UV por 1 hora são classificadas conforme o diluente - acetonitrila (ACN), metanol (MeOH), acetonitrila:água (ACN:H <sub>2</sub> O), metanol:água (MeOH:H <sub>2</sub> O), diluente de hidrólise ácida (ÁCIDA UV) e diluente de hidrólise básica (ALCALINA UV). As amostras submetidas a refluxo compreenderam dois sistemas: refluxo ácido por 2 horas (ÁCIDA) e refluxo básico por 24 horas (ALCALINA) [Coluna C8, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (eluição gradiente), fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL)]. .....	87

<b>Figura 11</b> - Cromatogramas relativos aos ensaios de especificidade em relação aos <i>formers</i> . CAF – A. NIC – B [Coluna C8, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (eluição gradiente), fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL)].	88
<b>Figura 12</b> - Representação gráfica da curva de calibração de FUR SQR por CLAE [Coluna C8, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (eluição gradiente), fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm].	88
<b>Figura 13</b> - Resultado gráfico da VDI de FUR nos meios 1 (tampão fosfato pH 6,8 200 mM), 2 (tampão acetato de sódio pH 4,5 200 mM), 6 (tampão McLlaine pH 4,6), 7 (tampão McLlaine pH 5,6) e 9 (água) (doseamento por CLAE – UV).	91
<b>Figura 14</b> - Resultado gráfico da VDI de FUR conforme os parâmetros de compressão da pastilha, volume de meio e manutenção em estufa (análise em C18, tampão fosfato 5 mM pH 6,8 a 37 °C; doseamento por CLAE – UV).	92
<b>Figura 15</b> - Cromatogramas relativos à cafeína (A), nicotinamida (B) e furosemida (C) [Coluna C18, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (70:30, v/v) sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm].	94
<b>Figura 16</b> - Representação gráfica da curva de calibração de FUR SQR por CLAE [Coluna C18, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (70:30, v/v) sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm].	94
<b>Figura 17</b> - Esquema representativo dos solventes/anti-solventes utilizados nas recristalizações. BuOH – butanol. HEX – hexano. CLOR – Clorofórmio. ACN – acetonitrila. H <sub>2</sub> O – água. THF – tetrahydrofurano. MeOH – metanol. Aceto – acetona. DIOX – dioxano. DMF – dimetilformamida.	101
<b>Figura 18</b> - Resultado da análise por DRX da amostra FUR matéria-prima.	104
<b>Figura 19</b> - Resultado da análise por DSC/TG de FUR matéria-prima.	105
<b>Figura 20</b> - Resultado da análise por espectroscopia no IV da amostra FUR matéria-prima.	106
<b>Figura 21</b> - Resultados preliminares da análise por MEV de amostras de FUR recristalizadas conforme condições propostas por Matsuda e Tatsumi (1990) – (i) evaporação lenta de solvente quente; (iii) adição de pequena quantidade de água em solução orgânica quente. *Aumentos de 200 vezes.	107
<b>Figura 22</b> - Fotomicrografias eletrônicas das amostras de 1 – 21. Os aumentos apresentam-se variados: 5.000 vezes (amostra 2), 4.000 vezes (amostras 1, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 17), 3.000 vezes (amostras 18, 19), 1.000 vezes (amostras 8, 9, 10, 12, 20), 300 vezes (amostra 11), 200 vezes (amostras 13, 21) e 50 vezes (amostra 7).	110
<b>Figura 23</b> - Fotomicrografias eletrônicas das matérias-primas 22 e 23. Os aumentos apresentam-se variados: 2.000 vezes (amostra 22), 1.000 vezes (amostra 22).	111
<b>Figura 24</b> - Resultado da análise por DRX de amostras de FUR recristalizadas a partir de diferentes sistemas. *A escala de intensidades NÃO é equivalente entre as amostras. A fim de evidenciar o efeito de textura, a reflexão mais intensa foi tomada como escala máxima. * Medidas entre 4 – 30 ° (2 Theta).	114



<b>Figura 25</b> - Resultado gráfico do perfil de dissolução das amostras separadas em grupos (análise em tampão fosfato 5 mM pH 6,8 a 37 °C; doseamento por CLAE – UV).....	116
<b>Figura 26</b> - Fotografias do moinho de bolas (esquerda) e do moinho de facas (direita) .....	124
<b>Figura 27</b> - Difratomogramas dos reagentes de partida e das amostras processadas. Furosemida (FUR), nicotinamida (NIC), moagem da mistura FUR:NIC em moinho de facas (MA - esquerda) e em moinho de bolas (MB - direita), após 1 hora e 2 horas de processamento. ....	131
<b>Figura 28</b> - Difratomogramas representando a evolução da moagem de FUR em recipiente de aço (esquerda) e de alumina (direita). Nas representações foi mantida a mesma escala de intensidade.....	132
<b>Figura 29</b> - Fotografias representando o aspecto dos materiais obtidos a partir da moagem de FUR com CAF seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F).....	133
<b>Figura 30</b> - Resultados das análises por DRX de pó das amostras de FUR com CAF seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). G compreende o padrão de difração calculado para o cocristal FUR:CAF descrito na literatura por Goud et al. (2012). ....	134
<b>Figura 31</b> - Resultados das análises no IV das amostras de FUR com CAF seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). Para efeito de comparação, são apresentados os espectros do fármaco e do <i>former</i> puros e da sua mistura física.....	136
<b>Figura 32</b> - Resultados e detalhes das análises por DSC das amostras de FUR com CAF seco (D) e no sistema de moagem assistida com água (E), metanol (F), acetonitrila (G), acetona (H) e dioxano (I). A – <i>former</i> . B – FUR. C – mistura física.....	137
<b>Figura 33</b> - Resultados da evolução de FUR:CAF seco recém preparado frente o aquecimento (taxa de 10 °C/min). À esquerda estão apresentados os difratogramas antes do aquecimento em 25 °C (vermelho), durante o aquecimento em 100 °C (azul) e após resfriamento em 25 °C (rosa). À direita estão representadas as curvas DSC para a mesma sequência com destaque para pontos equivalentes ao DRX.....	138
<b>Figura 34</b> - Resultados da análise da amostra FUR:CAF seco (DSC, TG e TG derivada). ....	139
<b>Figura 35</b> - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:CAF seco, armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo sete dias em câmara de umidade. C – tempo 90 dias em câmara de umidade. D – tempo 90 dias em dessecador.....	140
<b>Figura 36</b> - Resultados das análises de DSC da amostra FUR:CAF seco armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em câmara de umidade. G – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são	

apresentadas as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).....141

**Figura 37** - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:CAF metanol, acetonitrila e acetona armazenadas em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – FUR:CAF metanol tempo zero. B – FUR:CAF metanol tempo 90 dias em câmara de umidade. C – FUR:CAF metanol tempo 90 dias em dessecador. D – FUR:CAF acetonitrila tempo zero. E – FUR:CAF acetonitrila tempo 90 dias em câmara de umidade. F – FUR:CAF acetonitrila tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:CAF acetona tempo zero. H – FUR:CAF acetona tempo 90 dias em câmara de umidade. I – FUR:CAF acetona tempo 90 dias em dessecador. ....142

**Figura 38** - Resultados do DSC da amostra FUR:CAF água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. À direita destacam-se os resultados da amostra armazenada em temperatura ambiente em dessecador por 90 dias (DSC, TG e TG derivada). D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são apresentados as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).....143

**Figura 39** - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:CAF água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. ....144

**Figura 40** - Resultados do DSC da amostra FUR:CAF dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. ). D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são apresentados as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).....145

**Figura 41** - Resultados das análises por DRX da amostra FUR:CAF dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. São destacadas as reflexões remanescentes da fase desconhecida em função do tempo de armazenamento. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. ....146

**Figura 42** - Resultados das análises por IV da amostra FUR:CAF dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.....147

<b>Figura 43</b> - Comparação dos resultados das análises do teor (em relação ao teor esperado de 64 % m/m no material) de furosemida e de água nas amostras FUR:CAF; os resultados foram obtidos a partir de CLAE e TG, respectivamente. FUR com CAF seco (A) e LAG com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). .....	148
<b>Figura 44</b> - Difratoograma destacando as reflexões primárias do cocrystal FUR:CAF no material recém processado. ....	149
<b>Figura 45</b> - Representações de planos existentes no cocrystal FUR:CAF descrito por Goud et. al (2012). A – plano 002 em vermelho. B – plano 20-3 perpendicular ao plano da figura.....	150
<b>Figura 46</b> - Fotografias representando o aspecto dos materiais obtidos a partir da moagem de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F).....	151
<b>Figura 47</b> - Resultados das análises por DRX de pó das amostras de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). G compreende o padrão de difração calculado para a FUR e H para o hidrato de cocrystal FUR:NIC. ....	152
<b>Figura 48</b> - Resultados das análises no IV das amostras de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). Para efeito de comparação, são apresentados os espectros do fármaco e do <i>former</i> puros e da sua mistura física.....	154
<b>Figura 49</b> - Resultados das análises no IV das amostras de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). São destacadas as frequências características.	155
<b>Figura 50</b> - Resultados das análises por DSC das amostras FUR:NIC (esquerda). À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. A – <i>former</i> . B – FUR. C – mistura física. D – FUR:NIC seco (D). E – FUR:NIC água. F – FUR:NIC metanol. G – FUR:NIC acetonitrila. H – FUR:NIC acetona. I – FUR:NIC dioxano. ....	156
<b>Figura 51</b> - Evolução de FUR:NIC seco recém preparado frente ao aquecimento (taxa de 10 °C/min). À esquerda estão apresentados os difratogramas antes do aquecimento em 25 °C (vermelho), durante o aquecimento em 110 °C (azul) e após resfriamento em 25 °C (rosa). À direita estão representadas as curvas DSC para a mesma sequência com destaque para pontos equivalentes ao DRX.....	157
<b>Figura 52</b> - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC seco armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.....	158
<b>Figura 53</b> - Resultados do DSC da amostra FUR:NIC seco armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – <i>former</i> . B – FUR. C – mistura física. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. ....	159

**Figura 54** - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade (apenas DRX; esta análise no IV foi considerada ponto expúrio). D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. ....160

**Figura 55** - Resultados do DSC da amostra FUR:NIC dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C (esquerda). À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. A – *former*. B – FUR. C – mistura física. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. ....161

**Figura 56** - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC acetona 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. ....162

**Figura 57** - Resultados das análises por DSC das amostras FUR:NIC acetona em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C (esquerda). À direita destacam-se os resultados de TG de algumas amostras. B – tempo zero. C – tempo sete dias em câmara de umidade. D – tempo 15 dias em câmara de umidade. E – tempo 30 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em câmara de umidade. G – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, é apresentada a curva DSC do da mistura física fármaco:*former* (A).....163

**Figura 58** - Resultados das análises por DRX da amostra FUR:NIC água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. São destacadas as reflexões coincidentes com FUR:NIC seco que aparecem em função do tempo de armazenamento. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:NIC seco após armazenamento.....164

**Figura 59** - Resultados das análises por IV e detalhes da amostra FUR:NIC água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:NIC seco após armazenamento.....165

**Figura 60** - Resultados do DSC da amostra FUR:NIC água armazenada (esquerda) em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de

comparação, são apresentadas as curvas DSC do <i>former</i> (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C). .....	166
<b>Figura 61</b> - Comparação dos resultados das análises do teor (em relação ao teor esperado de 72 % m/m no material) de furosemida e de água nas amostras FUR:NIC; Os resultados foram obtidos a partir de CLAE e TG, respectivamente. FUR com NIC seco (A) e LAG com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). .....	167
<b>Figura 62</b> - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC metanol e acetonitrila armazenadas em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – FUR:NIC metanol tempo zero. B – FUR: NIC metanol tempo 90 dias em câmara de umidade. C – FUR: NIC metanol tempo 90 dias em dessecador. D – FUR: NIC acetonitrila tempo zero. E – FUR: NIC acetonitrila tempo 90 dias em câmara de umidade. F – FUR: NIC acetonitrila tempo 90 dias em dessecador.....	168
<b>Figura 63</b> - Resultados do DSC das amostras FUR:NIC metanol e acetonitrila armazenadas (esquerda) em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – <i>former</i> . B – FUR. C – mistura física. D – FUR:NIC metanol tempo zero. E – FUR:NIC metanol tempo 90 dias em câmara de umidade. F – FUR:NIC metanol tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:NIC acetonitrila tempo zero. H – FUR:NIC acetonitrila tempo 90 dias em câmara de umidade. I – FUR:NIC acetonitrila tempo 90 dias em dessecador.....	169
<b>Figura 64</b> - Resultados do comportamento das amostras frente à luz UV 254 nm, após 15 dias de exposição. O teor foi definindo utilizando-se sistema cromatográfico composto por fase móvel de tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila com eluição gradiente em fase reversa C8, sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL). .....	171
<b>Figura 65</b> - Resultado gráfico da velocidade de dissolução intrínseca para as amostras após sete dias de armazenamento a 40 °C / 75 % UR (análise em tampão fosfato 5 mM pH 6,8 a 37 °C; doseamento por CLAE – UV 232 nm). .....	172
<b>Figura 66</b> - Difrátogramas comparando as amostras processadas e os insumos de partida. URE – uréia. ACTAR – ácido tartárico. ACCIT – ácido cítrico. ACFUM – ácido fumárico. ACOX – ácido oxálico. ACSUC – ácido succínico. *As intensidades não estão representadas equivalentemente. ....	175
<b>Figura 67</b> - Espectros IR comparando as amostras processadas e os insumos de partida URE – uréia, FUR – furosemida. FUR:URE – mistura fármaco <i>former</i> . .....	175
<b>Figura 68</b> - Curvas DSC comparando as amostras processadas e os insumos de partida. A – uréia, B – furosemida. C – mistura fármaco <i>former</i> processada. .	176
<b>Figura 69</b> - Difrátogramas comparando as amostras processadas e os insumos de partida. ACNIC – ácido nicotínico. ALA – alantoína. ACPAB – ácido p-aminobenzóico. ACBEN – ácido benzóico. ACSAL – ácido salicílico. ACASC – ácido ascórbico. *As intensidades não estão representadas equivalentemente. ....	177

<b>Figura 70</b> - Espectros IR comparando as amostras processadas e os insumos de partida. ACPAB – ácido p-aminobenzóico, FUR – furosemida. FUR:ACPAB – mistura fármaco <i>former</i> processada.....	178
<b>Figura 71</b> - Curvas DSC comparando as amostras processadas e os insumos de partida. A – ácido p-aminobenzóico, B – furosemida. C – mistura física fármaco <i>former</i> . D – mistura fármaco: <i>former</i> processada. ....	178
<b>Figura 72</b> - Curvas DSC comparando as amostras processadas e os insumos de partida. A – ácido nicotínico. B – alantoína. C – furosemida. D – mistura física FUR:ácido nicotínico. E – mistura FUR:ácido nicotínico processada. F – mistura física FUR:alantoína. G – mistura FUR:alantoína processada.....	179
<b>Figura 73</b> - Resultados da evolução de FUR: <i>former</i> frente o aquecimento (taxa de 10 °C/min). À esquerda estão apresentados os difratogramas do sistema FUR:ácido nicotínico antes do aquecimento em 25 °C (A), durante o aquecimento em 55 °C (B), durante o aquecimento em 110 °C (C) e após resfriamento em 25 °C (D). À direita estão apresentados os difratogramas do sistema FUR:alantoína antes do aquecimento em 25 °C (E), durante o aquecimento em 110 °C (F) e após resfriamento em 25 °C (G). *As intensidades não estão representadas equivalentemente. ....	180
<b>Figura 74</b> - Difratogramas comparando as amostras processadas e os insumos de partida. TEO – teofilina. FUR – furosemida. SAC – sacarina. *As intensidades não estão representadas equivalentemente. ....	181
<b>Figura 75</b> - Curvas DSC comparando a amostra processada e os insumos de partida. A – teofilina. B – furosemida. C – mistura física FUR:ácido teofilina. D – mistura FUR:teofilina processada.....	181
<b>Figura 76</b> - Resultados da evolução de FUR: <i>former</i> frente ao aquecimento (taxa de 10 °C/min). Estão apresentados os difratogramas do sistema FUR:teofilina antes do aquecimento em 25 °C (A), durante o aquecimento em 150 °C (B) e após resfriamento em 25 °C (C). *As intensidades não estão representadas equivalentemente. ....	182
<b>Figura 77</b> - Representação das transformações sólidas observadas no presente trabalho (FUR:CAF).....	183
<b>Figura 78</b> - Representação das transformações sólidas observadas no presente trabalho (FUR:NIC).....	184
<b>Figura 79</b> - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) de furosemida armazenada. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade.....	225
<b>Figura 80</b> - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) de caféina armazenada. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. ....	226
<b>Figura 81</b> - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) de nicotinamida armazenada. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade.....	227

<b>Figura 82</b> - Curvas DSC comparativas entre nicotinamida (NIC), cafeína (CAF) e furosemda (FUR). .....	228
<b>Figura 83</b> - Difratoograma calculado ( $\lambda = 1,5418$ nm) para o polimorfo I de furosemda (FUROSEM 01) disponível no CSD (2012). .....	233
<b>Figura 84</b> - Difratoogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$ nm) para as formas polimórficas de nicotinamida disponíveis no CSD (2012). .....	233
<b>Figura 85</b> - Difratoogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$ nm) para as formas polimórficas de cafeína disponíveis no CSD (2012).....	234
<b>Figura 86</b> - Difratoogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$ nm) para as formas polimórficas do hidrato de cafeína disponíveis no CSD (2012). .....	234
<b>Figura 87</b> - Difratoogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$ nm) para as formas cocrystalinas FUR:NIC descritas por (UETO et al., 2011).....	235
<b>Figura 88</b> - Difratoogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$ nm) para a forma cocrystalina FUR:CAF descrita por (GOUD et al., 2012). .....	235





## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Classificação dos sistemas cristalinos de acordo com os parâmetros relativos às medidas dos eixos e ângulos da cela unitária.....	39
<b>Quadro 2</b> - Relação de alguns dos solventes mais utilizados em recristalização e suas propriedades.....	51
<b>Quadro 3</b> - Classificação dos fármacos conforme sua solubilidade e permeabilidade, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica...58	
<b>Quadro 4</b> - Informações cristalográficas dos polimorfos e cocristais de FUR relatados na literatura.....	67
<b>Quadro 5</b> - Detalhamento do fatorial fracionado.....	78
<b>Quadro 6</b> - Detalhamento da análise composta central.....	79
<b>Quadro 7</b> - Relação dos <i>formers</i> avaliados no presente trabalho.....	124
<b>Quadro 8</b> - Relação das amostras obtidas por moagem de FUR com CAF/NIC.....	125



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Programa do gradiente utilizado no método indicativo de estabilidade.....	80
<b>Tabela 2</b> - Preparo das soluções para o teste de recuperação de FUR em matéria-prima, em metanol:água (50:50, v/v), utilizando CLAE.....	82
<b>Tabela 3</b> - Meios de dissolução avaliados: classificação e composição.....	83
<b>Tabela 4</b> - Resultados da curva analítica obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método indicativo de estabilidade.....	89
<b>Tabela 5</b> - Resultados de precisão obtidos para a determinação de FUR em amostra de matéria-prima .....	89
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos nos testes de recuperação de FUR SQR na amostra de matéria-prima. ....	90
<b>Tabela 7</b> - Resultados de robustez obtidos para a determinação de FUR em amostra de matéria-prima. ....	90
<b>Tabela 8</b> - Parâmetros experimentais definidos para o método de dissolução intrínseca de Furosemda .....	93
<b>Tabela 9</b> - Resultados da curva analítica obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método indicativo de estabilidade.....	95
<b>Tabela 10</b> - Resultados obtidos para a precisão do método de dissolução. ....	95
<b>Tabela 11</b> - Codificação e descrição dos testes de cristalização.....	100
<b>Tabela 12</b> - Descrição das amostras selecionadas para caracterização. Os elementos C e D estão relacionados com a metodologia utilizada (proporção dos solventes).....	108
<b>Tabela 13</b> - Conjunto de informações obtidas a partir da análise por MEV e DRX das amostras. O elemento * caracteriza o polimorfo predominante. ....	115
<b>Tabela 14</b> - Dados de dissolução intrínseca das amostras comparados com os dados de solubilidade de equilíbrio máxima em 3 horas de ensaio de perfil de dissolução. ....	117
<b>Tabela 15</b> - Dados da análise estatística das médias da taxa de dissolução intrínseca das amostras (nível de significância de 5 %). ....	118
<b>Tabela 16</b> - Resultados da análise por CLAE das amostras FUR:CAF. O teor esperado para o material compreende 64 % (m/m). ....	134
<b>Tabela 17</b> - Resultados da análise por CLAE das amostras FUR:NIC. O teor esperado para o material compreende 72 % (m/m). ....	152
<b>Tabela 18</b> - Resultados da análise estatística dos dados de dissolução obtidos para as amostras. ....	173



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

$\mu\text{g}$	Micrograma.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
BCS	“ <i>Biopharmaceutical Classification System</i> ” ou Sistema de Classificação Biofarmacêutica.
CAF	Caféina.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
CSA	“ <i>4-chloro-5-sulfamoylanthranilic acid</i> ” ou ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico.
CSD	“ <i>Cambridge Structural Database</i> ”.
DPR	Desvio Padrão Relativo.
DSC	“ <i>Differential Scanning Calorimetry</i> ” ou Calorimetria Exploratória Diferencial.
EDX	“ <i>Energy-Dispersive X-ray detection</i> ” ou modo de Detecção por Energia Dispersiva de raios-X.
EDS	“ <i>Energy-Dispersive X-ray Spectrometry</i> ” ou Espectrometria de Energia Dispersiva de raios-X.
FDA	“ <i>Food and Drug Administration</i> ”.
FUR	Furosemida.
ICH	“ <i>International Conference of Harmonisation</i> ”
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo.
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual.
IV	Infravermelho.
kg	Quilograma.
kgf	Quilograma-força.
LAG	“ <i>Liquid Assisted Grinding</i> ” ou Moagem Assistida.
m/m	Massa/massa.
min	Minuto.
mL	Mililitro.
mM	Milimol.L <sup>-1</sup> .
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura.
n	Número de mol.
NIC	Nicotinamida.
OMS	Organização Mundial da Saúde.
pH	Potencial hidrogeniônico.
SQR	Substância Química Referência.
SUS	Sistema Único de Saúde.
TG	Termogravimetria.
Tt	Temperatura de transição.
ua	Unidades arbitrárias.

UR	Umidade relativa
USP	“ <i>United States Pharmacopoeia</i> ”.
UV	Ultravioleta.
v/v	Volume/volume.
VDI	Velocidade de Dissolução Intrínseca.
WDS	“ <i>Wavelength-Dispersive Spectrometry</i> ” ou Espectrometria de Comprimento de Onda Dispersivo.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	OBJETIVOS	34
1.1.1	Objetivo Geral	34
1.1.2	Objetivos Específicos	34
2	CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA	37
2.1	OS SÓLIDOS CRISTALINOS	38
2.1.1	Nomenclatura	41
2.2	DESIGN E ENGENHARIA DE CRISTAIS	43
2.2.1	Cristalização e preparo	47
2.2.2	Propriedades dos materiais cristalinos	53
2.3	A FUROSEMIDA	64
3	CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS	75
3.1	INTRODUÇÃO	75
3.2	MATERIAIS	77
3.3	MÉTODOS	77
3.3.1	Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade por CLAE para furosemida matéria-prima	77
3.3.2	Desenvolvimento e validação de método de dissolução intrínseca para furosemida matéria-prima	82
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.4.1	Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade por CLAE para furosemida matéria-prima	85
3.4.2	Validação de método de dissolução intrínseca para furosemida matéria-prima	91
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
4	CAPÍTULO III – CRISTALIZAÇÃO DA FUROSEMIDA	99
4.1	INTRODUÇÃO	99
4.2	MATERIAIS	100
4.3	MÉTODOS	100
4.3.1	Técnica de cristalização	100
4.3.2	Caracterização dos sólidos obtidos	101
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
5	CAPÍTULO IV – COCRISTALIZAÇÃO DA FUROSEMIDA	123
5.1	INTRODUÇÃO	123
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	124
5.2.1	Cristalização	124
5.2.2	Caracterização dos sólidos obtidos	126

5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
5.3.1	Avaliação preliminar do sistema	130
5.3.2	Avaliação da moagem a seco <i>versus</i> moagem assistida: Sistema Furosemida:Cafeína	133
5.3.3	Avaliação da moagem a seco <i>versus</i> moagem assistida: Sistema Furosemida:Nicotinamida	151
5.3.4	Estabilidade frente à luz UV e Dissolução intrínseca	170
5.3.5	<i>Screening</i> de cocristais – moagem associada ao aquecimento	173
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	182
6	CONCLUSÕES	187
	REFERÊNCIAS	189
	APÊNDICE 1	225
	APÊNDICE 2	229
	ANEXO 1	233
	ANEXO 2	235



## 1 INTRODUÇÃO

Em 1832, Friedrich Wöhler e J. Liebig descobriram muito mais do que o polimorfismo na benzamida, descobriram uma nova ferramenta de desenho e controle do desempenho de fármacos utilizando a química no estado sólido. Atualmente, os estudos envolvendo sólidos cristalinos desempenham importantes papéis na indústria farmacêutica, influenciando áreas da pesquisa como a toxicologia, a biofarmácia, a tecnologia da produção, o desenvolvimento de formas farmacêuticas, a purificação de matérias primas, o controle de qualidade e seus estudos de estabilidade, a manufatura, os aspectos regulatórios e as patentes de medicamentos, e o marketing (VIPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001; BRAGA et al., 2002; AAKERÖY; DESPER; URBINA, 2005; SHAN; ZAWOROTKO, 2008; BERNSTEIN, 2011; CHEN et al., 2011).

Diversos são os recursos utilizados e as formas cristalinas sólidas estudadas. Dentre elas, destacam-se os cristais multicomponentes: os cocrystalais. Quando comparados com outras formas sólidas utilizadas na tecnologia farmacêutica, os cocrystalais proporcionam uma maior diversidade de entidades possíveis de ser produzidas, permitem a utilização simultânea de vários grupos funcionais de um mesmo composto (incluindo aqueles que não são suficientemente ácidos ou básicos para formar sais), além de possibilitar o desenho da estrutura de interesse e de serem inseridos em métodos de produção livres de solventes e que seguem a linha da química verde (AAKERÖY; FASULO; DESPER, 2007; SHAN; ZAWOROTKO, 2008; JAMES et al., 2012; SCHULTHEISS; HENCK, 2012; WEYNA et al., 2012).

Embora os cocrystalais ofereçam oportunidades no desenvolvimento de medicamentos por modificar propriedades físicoquímicas dos fármacos, como a solubilidade e a estabilidade, essa é uma área que merece direcionamento de esforços no que se refere aos mecanismos envolvidos e à produção em larga escala. Assim, estudos que permitam popularizar os métodos de cocrystalização de fármacos e determinar relações entre a sua estrutura cristalina e as características biofarmacêuticas da matéria prima são muito importantes. Adequada a esse propósito, a furosemida (FUR) representa uma molécula-modelo interessante tendo em vista sua alta instabilidade e baixas solubilidade e permeabilidade (GOUD; BABU; NANGIA, 2011; UETO et al., 2011; GOUD et al., 2012; STEPANOV; MISHNEV, 2012; THAKURIA et al., 2012).

Considerando a importância da inserção de entidades químicas novas no mercado farmacêutico e a aplicabilidade da cocristalização de fármacos, o presente trabalho propõe ensaios de screening de cocristais de furosemida por mecanossíntese. A associação de métodos de doseamento, procedimentos de validação analítica, cristalização, caracterização no estado sólido e estudos de performance e estabilidade, reflete o caráter multidisciplinar que abrange o controle de qualidade farmacêutico.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar o *screening* de formas cocristalinas da furosemida e determinar as propriedades físicoquímicas, a taxa de dissolução e a estabilidade dos cocristais em comparação com o fármaco puro.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar metodologias analíticas de dissolução e doseamento para a furosemida;
- Realizar o *screening* de diferentes hábitos cristalinos de furosemida pura;
- Realizar o *screening* de cocristais farmacêuticos contendo furosemida;
- Caracterizar quimicamente os sólidos obtidos;
- Determinar a taxa de dissolução intrínseca dos materiais;
- Avaliar a estabilidade acelerada e sob condições de degradação forçada dos cocristais em comparação com o fármaco puro;

**CAPÍTULO I**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

---



## 2 CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

A demanda por medicamentos e tratamentos preventivos movimentou cifras substanciais e ocupa lugar de destaque econômico (ALBUQUERQUE, 2007). Em nível mundial, esta seção do comércio cresceu de forma consistente ao longo dos últimos anos, embora o impacto da crise europeia tenha abalado as estruturas de consumo de várias nações. No que se refere ao Brasil, sexto país no ranking mundial do mercado farmacêutico, estatísticas recentes revelaram um crescimento do ramo de 18,9 % em 2011, sendo que esta tendência foi mantida nos primeiros meses de 2012 (CIRILO, 2010; GARRIDO, 2012).

Dentro deste panorama global, além do dinamismo e da lucratividade, enfatiza-se o aspecto social e sanitário do consumo de medicamentos. Durante a concepção da Organização Mundial da Saúde, no ano de 1948, os medicamentos foram considerados insumos essenciais na resolução da saúde como direito humano fundamental (CORDEIRO; LEITE, 2008; WHO, 2010b). Muito além de um conceito minimalista, definiu-se com o passar dos anos que a promoção e a proteção da saúde são essenciais para o bem-estar do homem, para o desenvolvimento econômico e social sustentável e para a paz e a segurança globais. No momento atual, em que o mundo se debate com o abrandamento da economia, com a globalização das doenças e dos mercados e com as exigências crescentes por cuidados crônicos parcialmente ligados ao envelhecimento das populações, destaca-se a implementação de políticas públicas a fim de assegurar o acesso efetivo aos serviços e tecnologias em saúde (WHO, 2010a).

Neste contexto, o Brasil apresenta diversos planos estratégicos formulados principalmente no âmbito do SUS (Sistema único de saúde). Destaca-se a Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde, a qual firma um compromisso político e ético com a redução das desigualdades sociais em saúde e com o desenvolvimento nacional, sob a luz dos princípios da universalidade, integralidade e equidade. Este plano político tem como objetivos principais desenvolver e aperfeiçoar processos de produção e absorção de conhecimento científico e tecnológico pelos sistemas, serviços e instituições de saúde, centros de formação de recursos humanos, empresas do setor produtivo e demais segmentos da sociedade, bem como fornecer subsídio para instrumentos de regulação e operacionalização. Dentre outras considerações, pontua-se como essencial o incremento do poder competitivo nacional, bem como a garantia de auto-suficiência em itens estratégicos para o país.

Segundo Guimarães (2004), o campo mais desafiador e difícil certamente é o dos medicamentos e fármacos. Além da acentuada concentração/repartição do mercado mundial, outro agravante ainda consiste no recuo comercial da empresa privada brasileira ocorrido durante a década de 1990 (VARGAS, 1997; GUIMARÃES, 2004; ANDRADE, 2007; BRASIL, 2008).

Embora muitos esforços tenham sido realizados e muitos avanços conquistados nos últimos anos, o Brasil ainda é considerado totalmente dependente de insumos farmacêuticos oriundos de mercados produtivos distantes, como a Índia, a Coreia e a China. Esta dependência de matérias-primas importadas representa um problema no que diz respeito ao setor financeiro, mas também à segurança da população devido às freqüentes não conformidades observadas nestes materiais (DIAS, 2010; BRASIL, 2013b).

Vários são os desafios da produção de medicamentos competitivos e de qualidade no Brasil. Considerando-se que a oferta de insumos já representa uma rica problemática, muito mais se pode esperar da descoberta de novas moléculas ativas e sua inserção no mercado. Por isso, muito se tem falado a respeito da utilização de inovações incrementais em fármacos e medicamentos. Mais especificamente, enfatiza-se o papel da manipulação dos sólidos cristalinos representada, por exemplo, pela redução do tamanho de partícula, pela manipulação da forma cristalina e amorfa e pela formação de sais, complexos ou cocristsais (BRESOLIN; CECHINEL, 2003; SZYMOCHA, 2003a; BUCKTON, 2005; AUGSBURGUER; HOAG, 2008; BERNSTEIN, 2011; CRIVELLI, 2011; THAKURIA et al., 2012; WEYNA et al., 2012). Dentro do atual panorama da pesquisa em saúde no Brasil, estas técnicas representam vantagens no que se refere à qualidade e diversidade das matérias-primas ofertadas, à patenteabilidade dos processos e, por conseguinte, compreendem ferramentas estratégicas para o setor farmacêutico tecnológico/produtivo nacional (HUANG; TONG, 2004; MORISSETTE et al., 2004; TRASK, 2007; BRASIL, 2008; ZAWOROTKO, 2009).

## 2.1 OS SÓLIDOS CRISTALINOS

Cristais são sólidos homogêneos com arranjo atômico interno ordenado e composição química definida. No âmbito cristalográfico, existe uma variedade de classificações e termos utilizados com freqüência na caracterização destes sólidos, começando pela *simetria*. Ela compreende a propriedade fundamental do estado cristalino e está

relacionada a entidades geométricas (pontos, linhas ou planos) chamadas *elementos de simetria*. Quando associados em um ponto de coordenadas no cristal, conjuntos de elementos de simetria formam os *grupos pontuais* que caracterizam as 32 *classes cristalinas*. Além disso, os grupos pontuais podem ser acrescidos de elementos de simetria que envolvem operações de translação, passando a constituir os 230 *grupos espaciais* (CULLITY, 1978; GIACOVAZZO, 2011). A existência de operações de simetria por translação permite estruturar as unidades de disposição ordenada das moléculas no cristal de acordo com eixos, ângulos e faces. Por definição, a unidade regular que se repete no cristal por translação e apresenta a mais alta simetria compreende a chamada *cela unitária* (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001).

A cela unitária representa pequenos “blocos” que se organizam no espaço regularmente e refletem no empacotamento cristalino. Ela é formada por estruturas independentes, as *unidades assimétricas*, que se referem à menor parte que traduz a estrutura tridimensional por operações de simetria. O número de moléculas contidas na cela unitária é chamado de Z, enquanto que o número de moléculas da unidade assimétrica consiste o Z'. Além disso, as celas unitárias podem ser agrupadas em 7 *sistemas cristalinos*: triclinico, monoclinico, ortorrômbico, tetragonal, hexagonal, trigonal e cúbico. De acordo com o tipo de preenchimento da cela, estes sistemas também podem ser classificados como primitivos, corpo-centrados, face-centrados ou centro-centrados (Quadro 1) (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; CARSTENSEN, 2001; VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; BRITAIN, 2009b; GIACOVAZZO, 2011).

Quadro 1 - Classificação dos sistemas cristalinos de acordo com os parâmetros relativos às medidas dos eixos e ângulos da cela unitária.

Sistema cristalino	Eixos	Ângulos
Triclinico	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$
Monoclinico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Hexagonal	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
Trigonal	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Cúbico	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$

Fonte: Adaptado de Giacovazzo (2011).

Todas estas relações de simetria e ordem podem ser empregadas na análise dos sólidos pelo fenômeno de difração de raios-X. Nos cristais, os átomos estão dispostos em planos cuja distância interatômica é da mesma ordem que o comprimento de onda da radiação incidente. Por isso, as relações de fase entre os espalhamentos se tornam periódicas e podem ser observadas em vários ângulos. De acordo com a lei de Bragg, os raios-X difratados que emergem de um cristal podem ser tratados matematicamente como reflexões a partir dos planos atômicos, facilitando a manipulação dos dados. Resumindo, a difração revela a distribuição eletrônica na cela unitária e permite o estabelecimento de modelos consistentes com relação aos comprimentos de ligação, aos ângulos e posições químicas em amostras cristalinas (CULLITY, 1978; BRITAIN, 1995; GIACOVAZZO, 2011).

Para um material cristalino, quando o arranjo periódico e repetido de átomos for perfeito ou se estender através de toda a amostra sem interrupção, o resultado é um *monocristal*. Por outro lado, conforme representado na Figura 1, as amostras *policristalinas* são formadas por monocristais dispostos em orientações cristalográficas randômicas compondo os domínios ou cristalitos, e que apresentam um tamanho variável menor que a partícula. Além disso, a morfologia externa da *partícula* em um material é referida como *hábito cristalino*. Diferentes hábitos cristalinos podem, mas não necessariamente, refletir diferentes estruturas cristalinas internas (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; CALLISTER; RETHWISCH, 2009).

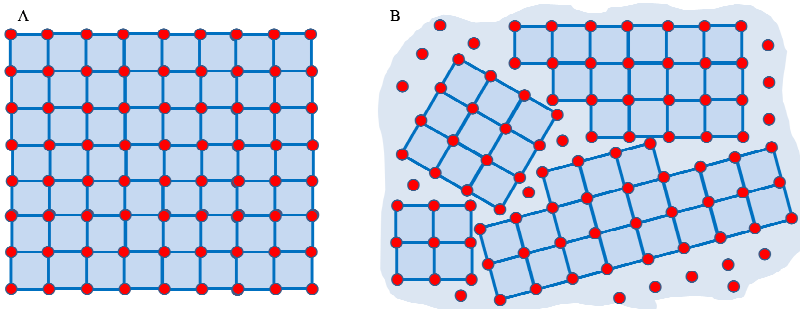


Figura 1- Representação de sistemas em arranjo monocristalino (A) e policristalino (B). O ordenamento em B é mantido até certa extensão, a partir da qual outro domínio cristalino ordenado se mostra em orientação diferente. A zona circundante destes domínios apresenta certa desordem com átomos/moléculas livres, espaços vazios e impurezas de cristalização. Fonte: Adaptado de Callister; Rethwisch (2009).



### 2.1.1 Nomenclatura

Embora a nomenclatura dos materiais cristalinos de uso farmacêutico ainda apresente divergências, principalmente com relação à concordância das visões química e regulatória, são crescentes os esforços em definir e padronizar conceitos. Neste contexto, destaca-se o guia publicado em 2011 pelo FDA a respeito da opinião da agência sobre os cocristais farmacêuticos. O documento de apenas quatro páginas provocou inúmeros desdobramentos na comunidade científica, culminando com a resposta de aproximadamente 50 renomados pesquisadores da área em artigo publicado no periódico *Crystal Growth and Design*®. O primeiro ponto a ser destacado é a aceitação/definição dos cocristais como formas sólidas possíveis de serem utilizadas na área farmacêutica. Além de abrir um leque enorme de possibilidades de desenvolvimento e aprovação de novos produtos pela indústria, isto consolida as mais de duas décadas de estudos desenvolvidos em *design* e engenharia de cristais aplicada. Embora preliminar, o conceito estabelecido para cocristais farmacêuticos pelo FDA estimula o debate acerca da nomenclatura em sólidos cristalinos (SHAN; ZAWOROTKO, 2008; STAHLY, 2009; FDA, 2011; AITIPAMULA et al., 2012).

A diversidade de formas sólidas existentes é extensa e ainda merece muitos debates e reformulações, partindo-se de definições básicas. É consenso que os materiais podem ser classificados em termos estruturais como sólidos *amorfos* ou *cristalinos*. Enquanto que os amorfos apresentam arranjos moleculares locais e ordem de pequeno alcance, os cristais são caracterizados por apresentar padrões moleculares que se repetem e ordem de longo alcance (CULLITY, 1978; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; BRITAIN, 2009b).

Além disso, os IFAs (Insumos Farmacêuticos Ativos) sólidos podem ser classificados como multicomponentes ou unicomponentes, de acordo com a presença de diferentes espécimes estequiometricamente relacionadas no sistema. O ramo dos cristais unicomponentes abrange os *polimorfos*, nos quais a composição química é a mesma, mas os sólidos apresentam diferentes estruturas cristalinas com relação ao ordenamento e/ou à conformação molecular (CARSTENSEN, 2001; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; BRITAIN, 2012a). No caso dos cristais multicomponentes, existem os *solvatos*, os *sais* e os *cocristais*, que também podem apresentar-se na forma de polimorfos principalmente caracterizados por mudanças conformacionais (Figura 2) (HORST; CAINS, 2008; NANGIA, 2008;

PORTER III; ELIE; MATZGER, 2008; AITIPAMULA; CHOW; TAN, 2010; AITIPAMULA et al., 2012; LIMWIKRANT et al., 2012).

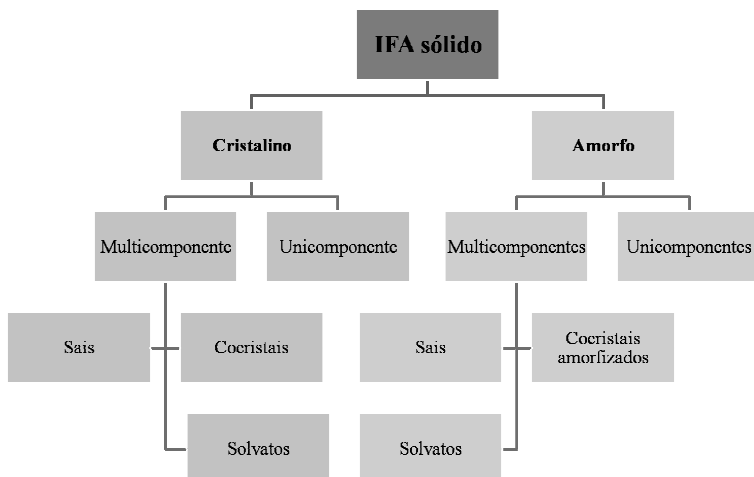


Figura 2 - Classificação dos sólidos cristalinos. Fonte: Adaptado de Aitipamula e co-autores (2012).

Os solvatos são sólidos que trazem moléculas de solvente em sua composição cristalina. Enquanto isso, os sais são classificados como sólidos iônicos ou eletrovalentes, mais especificamente, são compostos resultantes da substituição de parte ou da totalidade dos hidrogênios ácidos de uma molécula por um metal ou um radical atuando como um metal (BERNSTEIN, 2005; AAKERÖY; FASULO; DESPER, 2007).

Primeiramente reportados como “addition compounds” no início do século 20, os cocristais já foram denominados “complexos orgânicos moleculares” e “cristais heteromoleculares” (ZAWOROTKO, 2009). Recentemente, os cocristais foram classificados pelo FDA como materiais sólidos cristalinos compostos por duas ou mais moléculas na mesma rede e regulados comparavelmente a produtos intermediários da produção (FDA, 2011). Entretanto, no presente trabalho compreendeu-se ser mais adequada a definição sugerida por Aitipamula et al. (2012): “materiais apresentando uma única fase cristalina formada por dois ou mais compostos” moleculares e/ou iônicos interagindo intermolecularmente e que, isolados, são sólidos em condições ambientes (25 °C / 1 atm). Em muitos casos, um dos componentes (correspondente ao fármaco) é denominado molécula/ion “alvo”, enquanto que outro corresponde ao “*former*” do cocrystal (AAKERÖY;

FASULO; DESPER, 2007; SHAN; ZAWOROTKO, 2008; BOND, 2012; DESIRAJU, 2012; GREPIONI et al., 2012). Estes conceitos permitem esboçar uma correlação entre os sólidos cristalinos multicomponentes entre si conforme Figura 3.

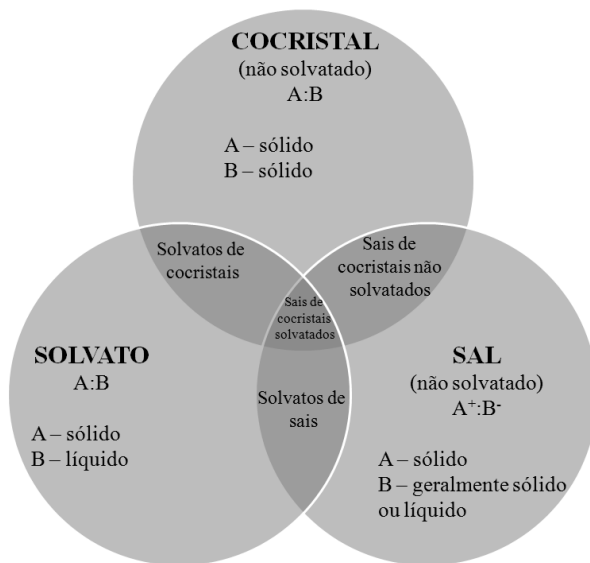


Figura 3 - Conjuntos esquematizando as relações entre os sólidos cristalinos multicomponentes. Fonte: Adaptado de Aitipamula e co-autores (2012).

## 2.2 DESIGN E ENGENHARIA DE CRISTAIS

A química supramolecular consiste no ramo da ciência que estuda as interações intermoleculares. Quando estas interações são avaliadas em solução, tem-se o que se chama reconhecimento molecular, enquanto que o estudo das mesmas no estado sólido recebe o nome de engenharia de cristais. A engenharia e o *design de cristais* são importantes para as ciências farmacêuticas por estabelecerem conexões entre as interações intermoleculares acima citadas, as estruturas cristalinas e as propriedades no estado sólido, tendo em vista a futura predição de materiais (BLAGDEN et al., 2007; PRICE, 2008; FRIŠČIĆ; MACGILLIVRAY, 2009; HE; CHOW; TAN, 2009; CHOW; STROBRIDGE; FRIŠČIĆ, 2010; CRUZ-CABEZA et al., 2010; TIEKINK; VITTAL; ZAWOROTKO, 2010; YU, Z. Q.; CHOW; TAN, 2010; DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012; FRIŠČIĆ, 2012;

MORAGUES-BARTOLOME; JONES; CRUZ-CABEZA, 2012; WEYNA et al., 2012).

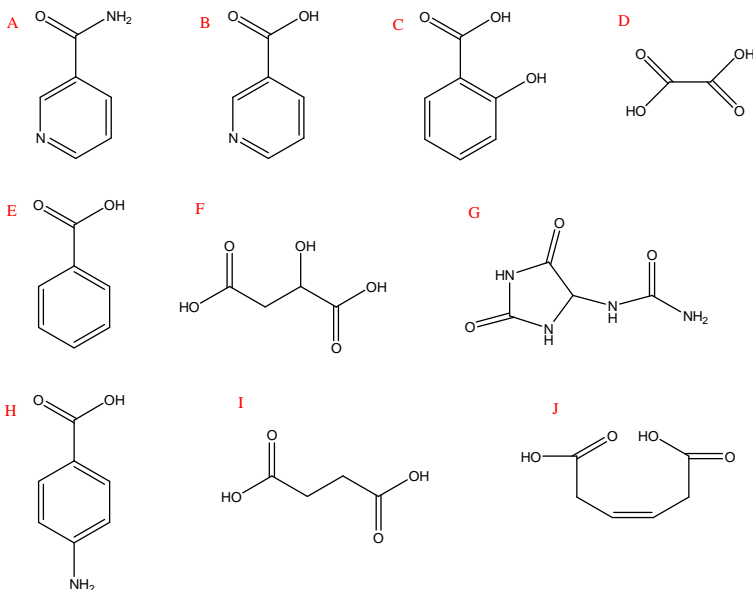
Nesta área, o estudo dos *synthons supramoleculares* e da competição entre os mesmos é fundamental. Eles são classificados como unidades subestruturais críticas que contém um máximo de informação em padrões de tamanho reduzido suficientemente estáveis para serem consideradas entidades independentes. Quimicamente falando, são padrões de interações não-covalentes que se repetem entre as moléculas e contribuem sobremaneira para a sua estruturação tridimensional. Na literatura, os principais *synthons* são formados por forças de van der Waals, por empilhamento  $\pi$  e por *ligações de hidrogênio* (NANGIA; DESIRAJU, 1998; BRAMMER, 2003; BHOGALA et al., 2008; HE et al., 2008; KARKI; FRIŠČIĆ; JONES, 2009; KAVURU et al., 2010; MORAGUES-BARTOLOME; JONES; CRUZ-CABEZA, 2012).

A ligação de hidrogênio caracteriza os *synthons* mais amplamente estudados até o momento. Corresponde a uma interação atrativa definida como  $X-H\cdots Y-Z$ . Nela, o fragmento molecular do tipo  $X-H$  é formado por uma ligação sigma na qual  $X$  é o elemento mais eletronegativo e  $H$  carrega uma carga positiva parcial. Este grupo interage via átomo de hidrogênio com pelo menos um átomo aceptor da mesma molécula ou de molécula distinta. Em decorrência, o tamanho da ligação  $X-H$  geralmente aumenta e ocorre um deslocamento para menores frequências no caso dos estiramentos das bandas  $X-H$ . Já no que se refere ao tamanho de ligação  $Y-Z$ , o mesmo apresenta-se diferente do observado para esta ligação em unidades isoladas, podendo ter modificações nas suas frequências vibracionais e nas intensidades espectrais das bandas. Além disso, o ângulo entre  $X-H\cdots Y$  tende a ser próximo de  $180^\circ$ , apresentando preferencialmente valores acima de  $110^\circ$  (DESIRAJU, 2011).

As ligações de hidrogênio são interações complexas que apresentam como características químicas a polarização, a transferência de carga e o fenômeno de dispersão/repulsão. De acordo com as *Regras de Etter*, as ligações de hidrogênio podem ser classificadas em ocasionais ou persistentes e intermoleculares ou intramoleculares. Segundo a pesquisadora, todos os doadores e aceptores persistentes são utilizados nas ligações de hidrogênio preferencialmente intramoleculares, mas sucedidas por ligações intermoleculares entre grupamentos ocasionais (ETTER, 1991; BRAMMER, 2003; DESIRAJU, G. R., 2005; KARAMERTZANIS et al., 2008; KAVURU et al., 2010). Entretanto, existem outros fatores importantes associados à

análise pura de *synthons*. Os estudos de modelagem sólida em cocrystalis revelam que, muito além do balanço entre o número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, a força destas interações e a forma das moléculas são prevalentes na formação do cristal multicomponente. Além disso, é estabelecida uma dependência entre a semelhança de polaridades do fármaco e do(s) *former(s)*, principalmente quando estes sistemas apresentarem solubilidades similares e diagramas de fase idealmente equilibrados (CHILDS et al., 2004; MORISSETTE et al., 2004; GAGNIERE et al., 2009; CLARKE et al., 2010; KAVURU et al., 2010; DESIRAJU, 2011; QIAO et al., 2011; FÁBIÁN; FRISCIC, 2012; FRIŠČIĆ, 2012; GAGNIÈRE et al., 2012).

Este tipo de análise permite estabelecer correlações químicas para uma futura utilização dos *synthons* no design de estruturas cristalinas. Uma importante ferramenta consiste no Banco de Dados Estruturais da Cambridge (CSD, *Cambridge Structural Database*) e suas informações em difração de raios-X. No que se refere ao grande repertório de interações observadas em sólidos cocrystalinos orgânicos no CSD, alguns *formers* se destacam pelo sucesso na sua utilização (Figura 4) (AAKERÖY; DESPER; URBINA, 2005; FÁBIÁN, 2009; STANTON et al., 2009; TIEKINK; VITTAL; ZAWOROTKO, 2010).



(continua na próxima página)

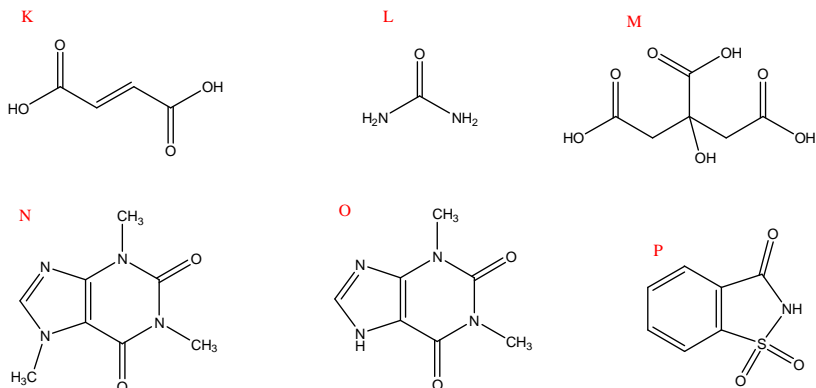


Figura 4 - Relação de alguns dos *formers* mais utilizados na formação de cocristais de uso farmacêutico. Destacam-se entre os grupos funcionais os ácidos carboxílicos e as aminas [(A) nicotinamida, (B) ácido nicotínico, (C) ácido salicílico, (D) ácido oxálico, (E) ácido benzóico, (F) ácido málico, (G) alantoína, (H) ácido p-aminobenzóico, (I) ácido succínico, (J) ácido maleico, (K) ácido fumárico, (L) uréia, (M) ácido cítrico, (N) cafeína, (O) teofilina, (P) sacarina]. Fonte: Adaptado de Fabián (2009).

Além da análise do CSD, patentes e trabalhos acadêmicos analisados também demonstram a frequente utilização de *formers* como a uréia, a nicotinamida, o ácido fumárico, o ácido succínico, o ácido oxálico, o ácido p-aminobenzóico, a cafeína e a sacarina (CHILDERS et al., 2004; AAKERÖY; DESPER; URBINA, 2005; BASAVOJU; BOSTRÖM; VELAGA, 2008; CHERUKUVADA; BABU; NANGIA, 2011; GHOSH; REDDY, 2012; ISSA et al., 2012; LEUSEN; KENDRICK, 2012). Com relação aos fármacos cocristalizados, uma avaliação de patentes depositadas atualmente na Europa e nos Estados Unidos comprova a grande aplicabilidade destes materiais em compostos de diversas naturezas. São cocristais de nutracêuticos, de compostos utilizados no tratamento do câncer, de antiinflamatórios não esteroidais, de antifúngicos, de antivirais, dentre outros (BUCHHOLZ et al., 2009; SEPENDA; STOREY, 2009; BUSCHMANN; TESSON; FARRAN, 2010; BABU; NANGIA, 2011; BETHUNE; SCHULTHEISS; HENCK, 2011; SANPHUI et al., 2011; SCHULTHEISS; ROE; BOERRIGTER, 2011; BAERT et al., 2012; KRUTHIVENTI et al., 2012; LEUNG et al., 2012; SALAMAN; TESSON, 2012; SEKHON, 2012). Destacam-se os fármacos para tratamento da dor e do HIV como de grande interesse da indústria, devido ao mercado existente e às suas potencialidades. Neste sentido, a

patente PII012666-0 A2 (Etravirina:Nicotinamida), também se encontra depositada no Brasil e consiste no único registro de cocristais farmacêuticos no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) até o presente momento (DANNEMANN et al., 2012).

Enquanto muitos parâmetros ainda necessitam ser esclarecidos a respeito dos cocristais, a indústria de medicamentos impulsiona as pesquisas na área. Os cocristais satisfazem os três critérios de patenteabilidade: a novidade, a utilidade e a atividade inventiva. Eles são claramente novos produtos, com inúmeras aplicações farmacêuticas e cujo design utilizando síntese supramolecular compreende estratégias especializadas de retrossíntese. Entretanto, prever a estrutura cristalina de uma molécula ainda é uma tarefa desafiadora atualmente. Neste sentido, as relações complexas e ainda não totalmente elucidadas estimulam os estudos dos materiais cocristalinos como modelos no intuito de desenvolver a engenharia e o *design* de cristais (BRAGA et al., 2002; TRASK, 2007; BETHUNE et al., 2009; GAGNIERE et al., 2009; FRIŠČIĆ; JONES, 2010; HOFFMAN; LINDEMAN, 2012).

### 2.2.1 Cristalização e preparo

As reações de cristalização em geral envolvem duas etapas básicas, a *nucleação* e o *crescimento dos cristais*. A nucleação compreende fenômenos de formação de um núcleo viável de moléculas ordenadamente reunidas via interações supramoleculares, tanto em soluções quanto em sistemas fundidos e sólidos. Este núcleo não corresponde necessariamente à cela unitária, mas a arranjos de moléculas com tendência à dissolução/segregação, exceto a partir de um número crítico de núcleos, quando persistem e formam novas estruturas sólidas. Diversos fatores afetam a nucleação, dentre eles destacam-se a natureza dos componentes e os distúrbios do sistema como superfícies de contato irregulares, presença de impurezas, movimentação brusca, gradientes de temperatura e concentração e semeadura proposital para posterior nucleação secundária. A importância destes processos reside no fato de que esta etapa define a fase cristalina formada e o número de partículas resultantes em um determinado experimento (GARSIDE; DAVEY, 2000; BLAGDEN et al., 2007; COX; FERRIS; THALLADI, 2007; ERDEMIR; LEE; MYERSON, 2009; FRIŠČIĆ; MACGILLIVRAY, 2009; JIANG; TER HORST, 2010; LU; LI; JIANG, 2010; CHEN et al., 2011).

A partir da nucleação, o processo dominante passa a ser o crescimento dos cristais. Em primeiro nível, a força das interações

intermoleculares entre as celas unitárias determina qual face dirige o processo que também é afetado pela presença de moléculas de solvente e de aditivos (BHO GALA et al., 2008). Esta é uma etapa importante, principalmente por permitir processos de resolução quiral e polimórfica, bem como de controle da morfologia das partículas, sua forma e tamanho (BLAGDEN et al., 2007; BERNSTEIN, 2011; CHEN et al., 2011).

Recentes trabalhos na literatura sugerem que sejam reconsiderados estes dois mecanismos e a afirmação de que uma vez que a etapa de crescimento tenha começado a estrutura cristalina já esteja essencialmente definida. O que se verifica é que, caso a primeira forma nucleada seja metaestável, pode ocorrer uma modificação para uma forma mais estável durante a cristalização via transições de fase sólido-sólido ou mediadas por solvente. Além disso, a existência de polimorfos concomitantes, com nucleação praticamente simultânea e taxa de crescimento semelhante, demonstra-se um desafio à regra e ao isolamento destas formas cristalinas. Estes fenômenos reforçam a importância da relação entre os padrões de ligação de hidrogênio observados em soluções saturadas e o efeito de memória determinante da estrutura cristalina do material. Como já dizia Margareth Etter, a estrutura cristalina final deve refletir o “estado dos estados de agregação em solução” (BLAGDEN et al., 2007; DESGRANGES; DELHOMMELLE, 2007; BERNSTEIN, 2011; CHEN et al., 2011).

Os métodos de preparo das formas cristalinas na área farmacêutica envolvem, na grande maioria das vezes, reações em soluções líquidas tradicionais por evaporação ou resfriamento do solvente e adição de anti-solvente (BAG; PATNI; REDDY, 2011; GAGNIERE et al., 2011; MALAJ et al., 2011). Entretanto, novas técnicas surgem frequentemente visando diminuir a produção de resíduos químicos, melhorar a efetiva capacidade de *screening* de novas formas sólidas e aumentar o controle dos sistemas em desenvolvimento. Dentre as novas técnicas, podem-se citar a cristalização em gel, a utilização de fluido supercrítico, as reações livres de solvente via moagem e aquecimento, os métodos de cristalização de alto desempenho utilizando sistemas robotizados, a nucleação laser-induzida, a cristalização em capilares e a heteronucleação via filmes poliméricos (COX; FERRIS; THALLADI, 2007; TAKATA et al., 2008; SHEIKH; HAMMOND; ROBERTS, 2009; PADRELA et al., 2010; BYSOUTH; BIS; IGO, 2011; CHEN et al., 2011; CHOQUESILLO-LAZARTE; GARCIA-RUIZ, 2011).



Uma das técnicas de maior visibilidade atualmente corresponde à mecanossíntese, mais especificamente à moagem (BOLDYREV; TKÁČOVÁ, 2000; CHIKHALIA et al., 2006a; BOLDYREV, 2007; CHOW; STROBRIDGE; FRIŠČIĆ, 2010; FRIŠČIĆ, 2010; FRIŠČIĆ; DAY, 2011; FRIŠČIĆ, 2012; FRIŠČIĆ; JONES, 2012; JAMES et al., 2012). As razões para este sucesso compreendem a facilidade de remodelamento de *synthons* e a possibilidade de condução de “reações verdes” (TRASK; MOTHERWELL; JONES, 2004; BRAGA; GREPIONI, 2005; WEYNA et al., 2009; ŠTRUKIL et al., 2010).

Os estudos envolvendo moagem começaram com Etter, durante o final da década de 1980. Naquela época, a pesquisadora demonstrou-se visionária ao investigar e descrever exaustivamente as ligações de hidrogênio em cocristais e sua relação com o pKa, o impedimento estérico das moléculas, as propriedades da reação e o ranking da capacidade acceptora e doadora de prótons em diferentes grupos funcionais (ETTER; BAURES, 1988; ETTER; FRANKENBACH, 1989; ETTER; ADSMOND, 1990; ETTER et al., 1990; ETTER; REUTZEL, 1991; DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012).

As reações de mecanossíntese podem ser graduais ou necessitar de uma energia crítica de ativação, demonstrando a existência de efeitos concorrentes e concomitantes. Um deles compreende a diminuição do tamanho de partícula com consequente aceleração do processo de difusão dos materiais. Além disso, o armazenamento de energia na forma de defeitos estruturais e de desordem dentro da rede cristalina e/ou nas regiões interdomínios, pode provocar a desestabilização da fase cristalina e a perda da ordem de longo alcance, com posterior amorfização. Acredita-se que este não seja um processo simplesmente mecânico, mas que as altas taxas de deformação plástica dos materiais de partida sejam relevantes. Neste caso, o fenômeno provocaria o aumento da temperatura do material e a fusão de partículas que, ao serem resfriadas pelo contato rápido com outras regiões da amostra (regiões frias) sofreriam amorfização (BOLDYREV; TKÁČOVÁ, 2000; SURYANARAYANA, 2001; BOLDYREV, 2007).

Neste sentido, com relação ao aspecto mecanístico da formação de cocristais por mecanossíntese, trabalhos recentes avaliam a influência de transferência de massa mediada por fase de vapor, a formação de mistura eutética, a presença de fase amorfa intermediária e o efeito cineticamente controlado pela força dos *synthons* (JAYASANKAR et al., 2006; BRAGA et al., 2007; JAYASANKAR; DAVID; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2007; SEEFELDT et al., 2007; CHIENG et al., 2009; FRIŠČIĆ; JONES, 2009; WEYNA et al., 2009; CHOW;

STROBRIDGE; FRIŠČIĆ, 2010; FRIŠČIĆ; DAY, 2011; DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012). Estes efeitos dependem, basicamente, do tipo de moagem envolvido: a moagem a seco e a moagem assistida (LAG, *Liquid Assisted Grinding*).

A LAG é destacada por permitir a obtenção de insumos de alta cristalinidade, apresentando direcionamento da fase sólida produzida, além de rapidez e bom rendimento. Esta superioridade em eficiência é explicada na literatura por efeitos cinéticos de incremento da taxa de reação na presença de líquido. Já a diferença da moagem em relação às técnicas que utilizam suspensões mais fluídas (*slurry*) e a cristalização em solução é explicada por fatores termodinâmicos, principalmente pela diferença de solubilidade entre os componentes individuais do cocristal (SHAN; TODA; JONES, 2002; FRIŠČIĆ et al., 2006; ATKINSON et al., 2008; JAYASANKAR et al., 2009; ALHALAWEH; VELAGA, 2010; BUČAR et al., 2010; FRIŠČIĆ; JONES, 2012; JAMES et al., 2012).

A seletividade das formas sólidas produzidas por LAG está relacionada com as interações soluto-solvente em nível molecular e seus efeitos sobre a nucleação e o crescimento cristalino. Existem solventes polares doadores de ligações de hidrogênio, solventes polares não doadores de ligações de hidrogênio e solventes não polares. A diferença entre estes grupos se reflete no tempo de indução da nucleação e na estrutura/hábito cristalino do material obtido (GU et al., 2004; ALLESØ et al., 2007; BRAGA et al., 2007; XU; REDMAN-FUREY, 2007; FRIŠČIĆ et al., 2008; STROBRIDGE; JUDAŠ; FRIŠČIĆ, 2010). Outras características dos solventes, como a viscosidade e a tensão superficial, podem também afetar a saturação do sistema, a cinética de cristalização e o aparecimento de novas formas sólidas. Além disso, a não toxicidade do material utilizado deve ser assegurada para sua aplicação em farmácia, conforme normatiza o guia de solventes residuais ICH (Q3C) R5 (ICH, 2009). Estas variáveis permitem o estabelecimento de classificações entre os solventes de modo a facilitar o desenho de experimentos de cristalização (Quadro 2). Em última análise, a utilização de grupos de solventes com características diversas pode aumentar o sucesso na taxa de descobrimento de novas estruturas durante o *screening* (GU et al., 2004).

Quadro 2 - Relação de alguns dos solventes mais utilizados em recristalização e suas propriedades.

Nome do solvente	$\pi^a$	$\alpha^b$	$\beta^c$	Momento dipolar (debye)	Constante dielétrica	Viscosidade (mPas, 25 °C)	Tensão superficial (mPas, 25 °C)	Classe ICH - <i>Solventes residuais</i> <sup>d</sup>
Hexano	-0,04	0,00	0,00	0,00	1,88	0,30	25,75	2
Tolueno	0,54	0,00	0,14	0,38	2,37	0,56	40,20	2
Acetato de etila	0,55	0,00	0,45	1,78	5,99	0,42	33,67	3
Tetrahidrofurano	0,58	0,00	0,48	1,75	7,43	0,46	39,44	2
1,4-dioxano	0,51	0,00	0,64	0,00	2,21	1,18	47,14	2
N,N-dimetilformamida	0,88	0,00	0,74	3,82	37,22	0,79	49,56	2
Acetona	0,71	0,04	0,49	2,88	20,49	0,31	33,77	3
Acetonitrila	0,75	0,07	0,32	3,92	35,69	0,37	41,25	2
Diclorometano	0,82	0,10	0,05	1,60	8,93	0,41	39,15	2
Clorofórmio	0,58	0,15	0,02	1,04	4,71	0,54	38,39	2
2-butanol	0,40	0,33	0,56	1,80	15,94	3,10	32,44	3
2-propanol	0,48	0,33	0,56	1,56	19,26	2,04	30,13	3
Etanol	0,54	0,37	0,48	1,69	24,85	1,07	31,62	3
Metanol	0,60	0,43	0,47	1,70	32,61	0,54	31,77	2
Água	1,09	1,17	0,47	1,87	78,36	0,89	104,70	-

Legenda:

a: polaridade/dipolaridade.

b: propensão como doador de ligação de hidrogênio.

c: propensão como acceptor de ligação de hidrogênio.

d: classificação ICH na qual 2 corresponde a “solventes de uso limitado” e 3 corresponde a “solventes de baixo potencial tóxico”.

Fonte: Adaptado de Gu e co-autores (2004).

As condições de ocorrência de LAG compreendem as proximidades de regiões do diagrama de fases do sistema cocristalino em que as solubilidades relativas dos componentes não são relevantes, ou seja, quando a quantidade de solvente utilizada é suficientemente pequena e sustenta uma saturação constante. Como resultado, obtém-se produtos mais cristalinos e de rápido *screening*. O sistema cafeína:ácido cítrico é um exemplo: enquanto que a moagem a seco não resulta na formação de cocristais, ao adicionar pequena quantidade de água ou solventes orgânicos ocorre cocristalização (KARKI et al., 2007b; DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012; FRIŠČIĆ; JONES, 2012; JAMES et al., 2012).

Além de ser mais eficiente no *screening* de cocristais e ser ambientalmente sustentável, a moagem fornece produtos dificilmente obtidos por métodos envolvendo soluções (DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012). Este é o caso dos cocristais compostos por teobromina com os ácidos malônico ou tricloroacético, cuja obtenção não teve êxito por meio de cristalização a partir de solução, mas pôde ser realizada via moagem assistida por solvente (KARKI et al., 2007a). Outro estudo, envolvendo a cocristalização de p-benzoquinona com 2,2-bifenol, demonstrou que a formação do cocristal foi acelerada consideravelmente devido à moagem (KURODA; SATO; IMAI, 2008). Segundo os autores, a justificativa é de que a moagem promove maior mobilidade molecular, removendo o produto já formado e, expondo assim a superfície que ainda não reagiu (LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Estes efeitos, por sua vez, sofrem influência das variáveis do sistema de moagem. Em ciências farmacêuticas, a cocristalização ainda não apresenta muitos estudos de automação e implementação em grande escala. As reações na maioria das vezes são realizadas em gral e pistilo, estando sujeitas a pouca robustez e grande variabilidade nos resultados. Isso é evidenciado quando se analisam as variáveis do processo de moagem. Elas compreendem basicamente a intensidade e a temperatura do sistema, caracterizadas por parâmetros práticos: o tipo do moinho, o recipiente, a velocidade e o tempo de moagem, a relação pó/bola, o preenchimento do recipiente, a atmosfera e a temperatura do equipamento. Além disso, a contaminação do material pela própria composição do sistema de moagem pode alterar substancialmente a constituição e a estabilidade das fases cristalinas/amorfas (BOLDYREV; TKÁČOVÁ, 2000; SURYANARAYANA, 2001; BRANHAM; MOYO; GOVENDER, 2012).

A complexidade de mecanismos envolvidos em reações de cristalização e síntese supramolecular remete à grande variedade de

transformações sólidas frequentes em IFAs. Neste sentido, a prevalência da comercialização de fármacos em formas farmacêuticas sólidas, torna crítico o conhecimento das características químicas e biofarmacêuticas destes materiais (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; HUANG; TONG, 2004; MORISSETTE et al., 2004; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; SCHULTHEISS; HENCK, 2012).

## 2.2.2 Propriedades dos materiais cristalinos

### 2.2.2.1 Reações em fase sólida

As reações em fase sólida podem ser classificadas em transformações físicas e químicas. As transformações físicas compreendem reações de solvatação/dessolvatação, cristalização/amorfização e mudanças polimórficas. A ocorrência destas transições envolve um balanço de mecanismos termodinâmicos, cinéticos e moleculares, conforme a Figura 5 abaixo (MORRIS et al., 2001; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; FRIŠČIĆ; JONES, 2007; WISHKERMANN; BERNSTEIN, 2008; FRIŠČIĆ; DAY, 2011; SANPHUI; SARMA; NANGIA, 2011; BRITAIN, 2012a).

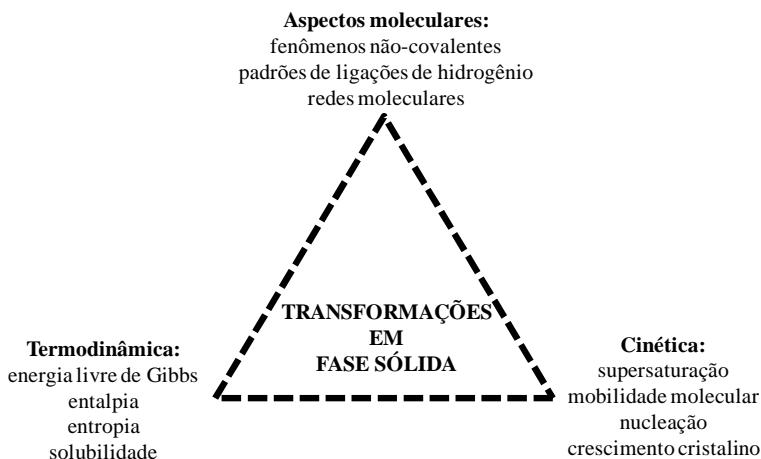


Figura 5 - Representação esquemática dos fenômenos que governam as transições em fase sólida. Fonte: Adaptado de Rodriguez-Spong e co-autores (2004).

A relação de estabilidade entre um par de polimorfos pode ser categorizada como *monotrópica* ou *enantiotrópica*. Sistemas enantiotrópicos apresentam um polimorfo estável abaixo de uma temperatura de transição ( $T_t$ ), enquanto que outro polimorfo é estável acima da mesma. Neste caso, a  $T_t$  se encontra abaixo do ponto de fusão dos componentes e o sistema é caracterizado pela reversibilidade entre as fases. Já as relações monotrópicas remetem à estabilidade de apenas uma forma polimórfica em toda a faixa de temperatura precedente à fusão (ZHANG et al., 2004; BARBAS et al., 2006; BRITAIN, 2009b; LU; ROHANI, 2009; AITIPAMULA; CHOW; TAN, 2010; BRUNI et al., 2011).

O isolamento de polimorfos relacionados por enantiotropia requer rigoroso controle das condições experimentais e pode se mostrar difícil, principalmente nos casos em que a energia de transição é pequena. Neste sentido, Kawakami e colaboradores (2006) destacam o papel que a cinética exerce na reversibilidade de uma transformação. Isso se deve ao fato de que uma reação reversível pode ser impedida se a energia de ativação associada constituir uma barreira prática (KAWAKAMI, 2006; BRITAIN, 2008).

Destacam-se as transições entre polimorfos pela repercussão mundial que tiveram no caso do fármaco ritonavir. Recordam-se o surgimento de uma não conhecida e menos solúvel forma polimórfica durante a comercialização do produto, com recolhimento dos medicamentos do mercado e perdas econômicas substanciais. O fato deu visibilidade ao assunto “polimorfismo” e despertou interesse das indústrias e das agências oficiais pelas aplicações nas áreas de vigilância sanitária, controle de qualidade e produção (LLINÀS; GOODMAN, 2008; BERNSTEIN, 2011; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011). Neste sentido, a robustez dos processos farmacêuticos não compreende uma tarefa fácil, principalmente no que concernem os chamados “*disappearing polymorphs*” (BARSKY et al., 2007; LANCASTER et al., 2007; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

São inúmeros os documentos relatando casos nos quais se tornou difícil ou impossível obter uma determinada forma polimórfica utilizando a mesma técnica pela qual aquele material vinha sendo obtido ao longo de anos. Identificar o fator de impacto nestes sistemas é muito complicado, entretanto, pode-se dizer que frequentemente o processo de sementeira é relatado. Uma vez que uma nova forma cristalina aparece, a presença de sementes desta nova forma nas proximidades faz com que a cristalização da forma primitiva seja dificultada para as mesmas condições. Nestes casos, a literatura sugere que seja realizada uma

pesquisa sistemática em busca de novas condições experimentais de obtenção do material, bem como uma avaliação das relações entre as formas cristalinas entre si e a existência de transições de fase (HENCK et al., 2001; BARSKY et al., 2007; BERNSTEIN, 2011).

A maioria dos trabalhos descreve processos em que a natureza do solvente de cristalização e as condições de umidade são os fatores preponderantes nas transições físicas (HORST; CAINS, 2008; MAHESHWARI et al., 2009). Levando-se em consideração a utilização de água no processamento farmacêutico e as condições de armazenamento dos produtos em países tropicais como o Brasil, destaca-se o papel da umidade frente estas reações. A umidade pode acelerar uma transição polimórfica simples, como é o que ocorre no caso do ácido mefenâmico e da famodipina, mas também pode provocar reações de hidratação do material (KATO; OTSUKA; MATSUDA, 2006; JAYASANKAR; DAVID; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2007; CHENG; LIN, 2008)

De acordo com Jayasankar e colaboradores (2011), as reações de hidratação em cocrystalis são influenciadas pela atividade/solubilidade aquosa de seus componentes. Foi verificado que o sistema teofilina:ácido cítrico sofre hidratação quando submetido a condições de umidade controladas. Entretanto, o sistema demonstrou-se lábil frente ao armazenamento, resultando na formação do cocrystal anidro e do fármaco isolado em misturas de fase com o hidrato. Em comparação, o sistema carbamazepina:ácido p-aminobenzóico e seu hidrato demonstrou-se estável frente à umidade (JAYASANKAR; ROY; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010).

Além disso, muito do que se relata na literatura acerca dos solvatos refere-se ao fenômeno de dessolvatação isomórfica, como no exemplo de fases contendo eritromicina (HENRY; ZHANG, 2007). O dessolvato pode ser encontrado principalmente nos casos em que o solvente adota a formação de canais na estrutura do cristal (BERNSTEIN, 2005; SRIDHAR; RAVIKUMAR, 2006; VOGT et al., 2006; FUJII et al., 2009; CLARKE et al., 2010). De acordo com as experiências práticas, a relação solvato/dessolvato é instigante do ponto de vista da reversibilidade da reação e do controle de qualidade do insumo, visto que apresenta caracterização complexa e difícil previsão (BORGMANN et al., 2012).

Com relação à cinética de cristalização de fármacos amorfos, os exemplos da griseofulvina e da carbamazepina são amplamente explorados (YAMAMURA; TAKAHIRA; MOMOSE, 2007; ZEITLER et al., 2007; FENG; BATES; CARVAJAL, 2009). Além das tradicionais

variáveis que aceleram estas reações, como a temperatura e as condições ambientais, evidencia-se que o tamanho diminuto das partículas desestabiliza materiais amorfos produzidos por moagem, como no caso da sinvastatina (BRITAIN, 2008; ZHANG, F. et al., 2009). A influência do tamanho das partículas também é frequentemente relacionada com transições polimórficas. Nestes casos, o principal mecanismo envolve a nucleação da nova fase a partir do fármaco parcialmente amorfo, como se verificou em sistemas contendo paracetamol, famotidina, fananserina, estavudina e nimesulida (HENG; THIELMANN; WILLIAMS, 2006; LIN; CHENG; WANG, 2006; DE GUSSEME et al., 2008; STRYDOM et al., 2009; SANPHUI; SARMA; NANGIA, 2011).

Percebe-se que além dos processos de produção favorecer alguns tipos de reações sólidas, os polímeros são aditivos que podem agir da mesma maneira. Na literatura, o acetato de betametasona, na presença de polímeros, apresentou sua conversão polimórfica retardada, enquanto que no caso da carbamazepina e do ciprofloxacino, as reações de hidratação foram impedidas (LI, X.; ZHI; HU, 2007; TIAN et al., 2007). No que se refere aos cocrystalis, misturas físicas contendo dois reagentes e um polímero tendem a cocrystalizar com rapidez, principalmente frente à umidade elevada. Acredita-se que os efeitos dos polímeros como adjuvantes sejam dependentes da sua hidrofobicidade, dos padrões de ligações de hidrogênio existentes e da capacidade deliquescente do polímero na mistura (KE; PING; LIAO, 2006; QU; LOUHI-KULTANEN; KALLAS, 2007; BRITAIN, 2008; GOOD; MIRANDA; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2011).

Estes fenômenos também evidenciam diferenças de reatividade química entre muitos sistemas sólidos que, por sua vez, podem acelerar reações de degradação química dos IFA. Por definição, estas reações são especificamente caracterizadas por apresentarem algumas peculiaridades: (i) não ocorrem ou são muito lentas no estado líquido; (ii) quando relatadas em solução, diferentes produtos de degradação são produzidos; (iii) um mesmo reagente apresenta diferentes reatividades sobre diferentes modificações cristalinas; (iv) modificações cristalinas parecidas podem demonstrar reatividade distinta (BYRN; XU; NEWMAN, 2001; CARSTENSEN, 2001; RAIJADA et al., 2010).

As variadas taxas de degradação sólida podem ser explicadas pelas diferenças nas barreiras energéticas de um sistema, na densidade do empacotamento cristalino e na orientação das moléculas de superfície nas partículas. Descreve-se na literatura que estas reações iniciam em um ou mais pontos de nucleação e depois se espalham para o restante do



crystal. A origem da nucleação geralmente corresponde às zonas de defeitos de cristalização ou de processamento das partículas, mas também pode ser randomicamente localizada. Um dos modelos cinéticos mais explorados refere-se a uma curva de degradação com um período inicial de nucleação e difusão dos reagentes através da superfície das partículas, o qual é sucedido por uma etapa de aceleração da degradação até atingir um platô (Figura 6). Estas teorias cinéticas de degradação no estado sólido são de ajuste muito complexo tendo em vista que ocorrem em sistemas heterogêneos. Assim, além da natureza e das condições ambientais iniciais interferirem na degradação química do material, variações físicas durante o tempo de análise podem modificar a reatividade do sistema principalmente por alterar o tempo de estabelecimento do raio crítico da reação. Destacam-se como interferentes a difusividade e os defeitos superficiais das partículas, a forma polimórfica, a cristalinidade, a distribuição do tamanho de partícula, o hábito cristalino e a formação de aglomerados (DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1992; BYRN; XU; NEWMAN, 2001; CARSTENSEN, 2001; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

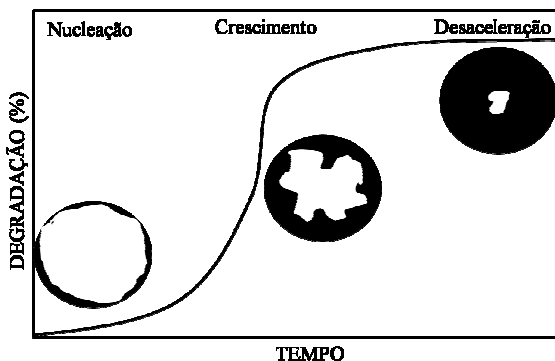


Figura 6 - Representação esquemática do processo mais comum envolvendo degradação química no estado sólido. Fonte: Adaptado de De Villiers; Vander Watt; Lotter (1992).

Apesar desta complexidade e do cuidado requerido na análise dos dados, os tipos de reações químicas que governam estas transformações são semelhantes aos que ocorrem em solução. Alguns casos já são bem estudados como, por exemplo, a oxidação da vitamina A, de peptídeos contendo metionina e de esteróides, e a hidrólise da aspirina (BYRN;

XU; NEWMAN, 2001; HUANG; TONG, 2004; SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Percebe-se a existência de uma relação entre as transformações físicas e as reações de degradação nos materiais. E mais, seja nas transformações ocorrentes entre formas polimórficas, entre formas solvatadas ou entre formas cristalinas e amorfas, bem como nas transformações químicas, estas reações podem ser mediadas por solventes e aditivos, por aquecimento e tensão mecânica, ou seja, podem ocorrer durante as operações unitárias da produção de medicamentos. Destacam-se os processos de redução do tamanho de partícula, granulação, compressão, secagem e estocagem como fontes de transições durante a manufatura (MORRIS et al., 2001; SINGHAL; CURATOLO, 2004; ZHANG et al., 2004).

### 2.2.2.2 As propriedades farmacêuticas

No que se refere ao *design* no estado sólido, existem diversas vertentes estratégicas como campo de atuação farmacêutica: o aprimoramento das características de higroscopicidade, molhabilidade, compressibilidade, densidade, fluxo, toxicidade, estabilidade e solubilidade (HUANG; TONG, 2004; BLAGDEN et al., 2007; SHIRAKI et al., 2008; GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2009; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009; BABU; NANGIA, 2011; BERNSTEIN, 2011; RAHMAN et al., 2011; BRANHAM; MOYO; GOVENDER, 2012). Com relação ao incremento das características de solubilidade, os fármacos objeto de estudo compreendem os compostos pertencentes às classes II e IV do sistema de classificação biofarmacêutica (Quadro 3) (BCS, *Biopharmaceutical Classification System*) (LÖBENBERG; AMIDON, 2000; YU et al., 2002; DAHAN; MILLER; AMIDON, 2009).

Quadro 3 - Classificação dos fármacos conforme sua solubilidade e permeabilidade, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

<b>CLASSE I</b>	<b>CLASSE II</b>
Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Alta permeabilidade	Alta permeabilidade
<b>CLASSE III</b>	<b>CLASSE IV</b>
Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Baixa permeabilidade	Baixa permeabilidade

Fonte: Adaptado de Löbenberg; Amidon (2000).

A manipulação polimórfica é uma ferramenta bem descrita na área. São exemplos os casos da espironolactona, do fenobarbital e da carbamazepina, nos quais a escolha do polimorfo promoveu diferenças na dissolução das moléculas (BERNSTEIN, 2011; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011; BRITAIN, 2012a). A modificação destas propriedades pode, em última análise, refletir em propriedades farmacocinéticas diferenciadas, como é o caso do nimodipino, no qual diferentes estruturas sólidas determinaram diferentes graus de atividade anti-hipertensiva (DOCOSLIS et al., 2007; RIEKES et al., 2012).

Recentemente diversos estudos têm apresentado a formação de cocristais como estratégia para a área tecnológica farmacêutica como, por exemplo, em estudos de estabilidade (VISHWESHWAR et al., 2006; CHILDS et al., 2008; SHAN; ZAWOROTKO, 2008). Chieng et al. (2009) utilizaram a cocristalização para melhorar a estabilidade física da carbamazepina tendo a nicotinamida como *former*. Nesse trabalho, foi avaliada a formação de cocristais a partir de várias formas polimórficas do fármaco isolado, complementando outro estudo realizado com essa mesma molécula no estado amorfo (SEEFELDT et al., 2007). Outro trabalho se destaca pelo controle da estabilidade frente à umidade mediado pela formação de cocristais de cafeína e ácido oxálico/ácido glutárico (CASSIDY; GARDNER; JONES, 2009).

A cocristalização via mecanossíntese foi explorada na obtenção de formas termodinamicamente estáveis e com boas características de compactação do paracetamol (KARKI; FRIŠČIĆ; JONES, 2009). Além disso, a utilização de moagem tem promovido grandes melhorias em relação ao uso de solventes em processos farmacêuticos, como no caso do citrato de sildenafil, cujo uso de solvente na manufatura foi reduzido drasticamente. Neste caso, o uso de solventes foi reduzido da faixa média de 25–100 kg para apenas 6 kg de solvente por quilo de produto (DUNN; GALVIN; HETTENBACH, 2003; DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012).

Outro exemplo prático também se refere à *Vectorpharma Spa*, indústria italiana que prepara complexos de nimesulida e  $\beta$ -ciclodextrina utilizando energia de moagem com grande escala de produção (20-50 Kg) e alta reprodutibilidade. O complexo preparado via mecanossíntese apresenta propriedades diferentes em relação àqueles preparados por métodos convencionais, especificamente com taxas de dissolução muito superiores (DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012).

No que se refere ao aprimoramento da solubilidade do fármaco, destacam-se os estudos de cocristalização com a fluoxetina, o

itraconazol e a gabapentina. Além de demonstrar solubilidade semelhante ao sólido amorfo, essas alterações podem ter como consequência o aumento da biodisponibilidade da molécula, como observado para os cocristais de carbamazepina:sacarina (REMENAR et al., 2003; ZAWOROTKO, 2009; BRITAIN, 2012b; THAKURIA et al., 2012).

Também relacionado com o efeito *in vivo*, a formação de cristais multicomponentes já foi descrita no aprimoramento de formas farmacêuticas de liberação modificada. Pode-se citar o estudo de Brader et al. (2002), no qual cocristais de insulina com seu próprio derivado lipofílico foram utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada da substância. O estudo levou em consideração a hipótese de que o aumento da hidrofobicidade da nova fase cristalina poderia modular a liberação do fármaco e afetar tanto a dissolução *in vitro* do sistema, quanto sua atividade farmacológica. Neste aspecto, foi verificado que os cocristais mantiveram a glicemia de 24 horas de um modo mais uniforme do que a forma de apresentação convencional (BRADER et al., 2002).

Modificações no perfil de dissolução também podem ser obtidas com sistemas mais sutilmente modificados, como o são os sólidos apresentando diferentes hábitos cristalinos (CARSTENSEN, 2001; GAREKANI et al., 2001; VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; RASENACK; MÜLLER, 2002; CHIKHALIA et al., 2006b; PASQUALI; BETTINI; GIORDANO, 2006; RODOMONTE et al., 2008; DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012). O efeito que o hábito cristalino apresenta sobre a molhabilidade e a dissolução vem sendo muito relacionado às interações intermoleculares com as moléculas do meio dissolvente via exposição de determinadas faces cristalinas na superfície (RASENACK; MÜLLER, 2002; TENHO et al., 2007). Como é verificado no caso do dipiridamol, a taxa de dissolução para partículas aciculares demonstrou ser inferior à observada para partículas na forma de bastonetes (BLAGDEN et al., 2007). Entretanto, alguns estudos chamam a atenção para o efeito que as associações entre as mudanças de hábito cristalino e de área superficial exerceram sobre as variações físicoquímicas de amostras de fenitoína recristalizadas a partir de diferentes solventes (NOKHODCHI; BOLOURTCHIAN; DINARVAND, 2003).

Trabalho recentemente publicado em nosso grupo de pesquisa também demonstrou uma associação de efeitos influenciando as características do fármaco deflazacorte. Estimulado por diferenças observadas entre as amostras comercialmente disponíveis no mercado

brasileiro, foi realizado um estudo de cristalização a fim de definir condições ideais de obtenção de uma matéria prima de qualidade. As modificações dos perfis de dissolução foram atribuídas às relações existentes entre a área superficial, a molhabilidade, o hábito cristalino e a aglomeração (PAULINO et al., 2013).

A aglomeração de partículas, por sua vez, também exerce importante papel no desempenho sólido de um IFA. Ela abrange um processo posterior ao crescimento cristalino pouco compreendido por ocorrer simultaneamente com outros processos (LE BOLAY, 2003; SZYMOCHA, 2003b; DHUMAL et al., 2010). Destaca-se uma competição entre a redução do tamanho de partícula e a aglomeração; um exemplo típico é o caso da micronização, que normalmente promove um incremento na dissolução intrínseca do fármaco. Entretanto, quando adotada para fármacos muito lipossolúveis, pode provocar aglomeração das partículas com diminuição da área superficial de contato da droga com o meio dissolvente, e redução da taxa de dissolução. Neste sentido, relata-se também o incremento das atrações eletrostáticas e interações de van der Waals entre partículas ultrafinas como potencial interferente na área superficial efetiva (IKEGAMI et al., 2003; PIETSCH, 2003; YASUJI; TAKEUCHI; KAWASHIMA, 2008).

Embora seja muito promissora, a manipulação das propriedades sólidas dos IFAs deve ser avaliada sobre todos os aspectos farmacêuticos: a qualidade, a eficácia e a toxicidade. Neste sentido, é preciso ter em mente que o aumento da taxa de dissolução pode levar ao acúmulo do fármaco no meio fisiológico com o potencial para provocar efeitos adversos. Um exemplo de toxicidade muito peculiar compreende as mortes de animais domésticos por falência renal causadas pela cocristalização da melamina e do ácido cianúrico nos túbulos renais. Estes compostos estavam presentes nas rações dos animais e se apresentavam não tóxicos separadamente. Entretanto, quando administrados concomitantemente, direcionavam a força de nucleação e cristalização e formavam cocristais muito pouco solúveis em água, em uma reação catalisada pela acidez da urina dos animais (BISWAS, 2012). Excluindo-se alguns aspectos legais muito particulares, esta situação nos recorda a complexidade existente na elaboração de sistemas farmacêuticos seguros, eficazes e de qualidade.

### **2.2.2.3 Técnicas de caracterização**

O interesse na determinação do tipo específico de forma sólida de um IFA reside no fato de que cada espécime cristalino apresenta

propriedades físico-químicas diferentes, as quais devem ser levadas em consideração em assuntos como propriedade intelectual, registro e aprovação legal, processamento industrial e desenvolvimento de sistemas de liberação. Nestes casos, além da busca por conceitos e definições claros para estes materiais, diversos ensaios de investigação são requeridos (BRITAIN, 1995; BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004; SINGHAL; CURATOLO, 2004; ZHANG et al., 2004; BRITAIN, 2009b; REUTZEL-EDENS, 2012).

A caracterização dos materiais farmacêuticos cristalinos normalmente envolve a combinação de metodologias discriminatórias entre suas possíveis apresentações, evidenciando propriedades associadas às moléculas e/ou às partículas do *bulk*. Dentre elas, a técnica considerada definitiva é a difração de raios-X (DRX) de monocristal pela possibilidade de avaliação direta do empacotamento e conformação das moléculas, bem como pela elucidação das interações moleculares (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; NANGIA, 2008; BRITAIN, 2009b; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

O padrão de difração de raios-X em amostras policristalinas também é muito útil na rápida identificação de diferentes sólidos, embora a diferenciação entre alguns tipos de polimorfos e solvatos específicos não seja possível e o fenômeno de orientação preferencial possa ser um obstáculo (FUJII et al., 2009). Quando as análises realizadas em laboratório apresentam algumas limitações com relação à intensidade dos picos e à qualidade dos difratogramas, principalmente objetivando-se resolver a estrutura de amostras policristalinas, a difração de raios-X a partir de fontes de radiação sincrotron pode ser utilizada (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BRITAIN, 2009b).

Além disso, nos casos em que a obtenção de monocristais é dificultada, a ressonância magnética nuclear no estado sólido também fornece algumas informações estruturais, principalmente conformacionais, a respeito da equivalência magnética de núcleos específicos entre moléculas de sólidos diferentes (PEREZ et al., 2005; VOGT et al., 2008). Já as espectroscopias vibracionais Raman e no infravermelho também podem ser discriminatórias entre materiais que apresentem ambientes químicos diferenciados, sobretudo quando os padrões de ligações de hidrogênio dos grupos funcionais mudam entre os sólidos analisados (AYALA et al., 2006; BRITAIN, 2006; AALTONEN et al., 2008; BRITAIN, 2009a).

Outra ferramenta muito importante compreende as técnicas termoanalíticas. A avaliação de eventos endotérmicos e exotérmicos

visualizados a partir da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC, “*Differential Scanning Calorimetry*”) abrange processos de fusão, dessolvatação, transição sólida, cristalização e degradação. Ao associar-se esta técnica com a Termogravimetria (TG), pode-se caracterizar melhor os fenômenos para as faixas de temperatura em que ocorrem perdas de massa, bem como aprofundar a investigação do material. Embora estas duas técnicas sejam de fundamental importância ao revelar a existência de reações termicamente induzidas, a dificuldade nas conclusões a respeito da natureza destas reações representa uma desvantagem. Podem-se superar muitas destas limitações acoplando-se sistemas de aquecimento em outros equipamentos, como é o caso da difração de raios-X e da microscopia (*hot stage*) moduladas por temperatura (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BRITAIN, 2009b).

No que se refere à morfologia externa das partículas, sua forma, tamanho e aglomeração, os mesmos são verificados principalmente via microscopia óptica ou eletrônica. Estas observações não são conclusivas a respeito da forma polimórfica do material visto que modificações nas condições de crescimento dos cristais podem afetar sua morfologia sem, contudo, modificar a fase cristalina. Além disso, as técnicas de microscopia, principalmente a microscopia eletrônica de varredura (MEV), podem ser associadas a sondas diferenciadas e permitem a análise da composição elementar. Nestes casos, a análise química do material é determinada pela medida da energia e da distribuição da intensidade do sinal de raio-X gerado por um feixe de elétrons focalizado sobre a amostra (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BRITAIN, 2009b). Estas análises podem ser feitas basicamente utilizando-se espectrômetros em dois modos de operação, o EDS e o WDS, os quais variam conforme a resolução, o limite de detecção, o tempo de coleta de dados e a suscetibilidade a artefatos (GOLDSTEIN et al., 2003).

Além da caracterização física, a avaliação do desempenho é muito solicitada em testes de pré-formulação da indústria farmacêutica e para fins de controle e regulação dos insumos. Destacam-se, neste caso, os ensaios de solubilidade, dissolução e estabilidade. Embora muitos termos sejam associados intercambiavelmente, cabe uma distinção entre os mesmos: “dissolução” é processo pelo qual uma forma sólida se dissolve em um solvente, em uma dada temperatura; “taxa de dissolução” é um parâmetro cinético que, por exemplo, pode ser avaliado sob área superficial constante via “velocidade de dissolução intrínseca” (VDI); “solubilidade” é a condição de equilíbrio do processo

de dissolução, caracterizado pela máxima concentração do fármaco no meio de dissolução em uma dada temperatura (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BARTOLOMEI et al., 2006; BRITAIN, 2009b; BISWAS, 2012).

Os ensaios de desempenho podem apresentar parâmetros definidos por órgãos reguladores oficiais ou necessitem de métodos acessórios, como os de identificação/quantificação física e química e validação analítica. Neste último caso, existem diretrizes legais de regulação de ensaios que assegurem analiticamente que o método utilizado seja adequado para o objetivo proposto. Destacam-se os parâmetros especificidade, linearidade, precisão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e robustez como importantes durante as etapas de validação (ICH, 2005).

### 2.3 A FUROSEMIDA

Considerando a importância da inserção de entidades químicas novas no mercado farmacêutico e a carência de estudos mais amplos em cocristalização e caracterização destes sistemas, a furosemida (FUR) se apresenta como molécula-modelo interessante.

A FUR é um diurético de alça potente e de ação rápida. Sua ação farmacológica está baseada no bloqueio do simporte  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  principalmente no ramo ascendente espesso da alça de Henle. Por atuar nesta porção do néfron, apresenta alta eficiência visto que os segmentos após o ramo ascendente espesso não têm a capacidade de reabsorção de água para recuperar o fluxo de produtos rejeitados (JACKSON, 2005; RANG et al., 2008). É usada no tratamento de edema associado à insuficiência cardíaca, incluindo edema pulmonar, desordens renais e hepáticas. Consiste em alternativa aos pacientes que não respondem aos diuréticos tiazídicos, bem como pode ser utilizado em doses altas no gerenciamento da oligúria por insuficiência renal e no tratamento da hipertensão, sozinha ou associada a outros antihipertensivos (SWEETMANN, 2007).

Embora esse seja um potente diurético, a terapia com a FUR é frequentemente prejudicada pela pobre disponibilidade sistêmica por via oral (SPAMER et al., 2002). Apresenta absorção oral média de 60%, no entanto esta taxa pode variar de 11% a 90%, indicando forte influência exercida pelos alimentos. Com relação aos demais aspectos farmacocinéticos, o fármaco tem o pico plasmático alcançado após 4-5 horas da ingestão, liga-se fortemente às proteínas plasmáticas, tem duração do efeito diurético de 6-8 horas e tempo de meia-vida de



aproximadamente 1,5 horas (0,5-4 horas), sendo 80% eliminado inalterado na urina (RANKIN, 2002; MOFFAT; OSSELTON; WIDDOP, 2004).

A FUR, ácido 4-cloro-2(furfurilamino)-5-sulfamoilbenzóico ( $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ ), é um pó cristalino branco ou amarelado, praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em acetonitrila e ácido acético, ligeiramente solúvel em etanol e solúvel em acetona, metanol, N,N-dimetilformamida e em soluções alcalinas. Apresenta evento de fusão entre (218 – 220) °C, seguido de degradação. Pertence à classe IV do BCS (BEYERS et al., 2000; LÖBENBERG; AMIDON, 2000; RANKIN, 2002).

Como se verifica na Figura 7, a molécula apresenta um grupamento amino substituído, formando uma cadeia lateral com um anel furano. Além disso, um grupo sulfonamida e um grupo carboxila livre fornecem à molécula caráter ácido (pKa 3,9), enquanto que o átomo de cloro substituído no anel aromático aumenta a atividade da molécula (RANKIN, 2002; SWEETMANN, 2007). O grupo sulfonamida e a cadeia lateral contendo um anel furano possibilitam a ocorrência de ligações de hidrogênio importantes no que se refere a interações fármaco-fármaco e fármaco-excipiente, sendo que apresentam grande mobilidade conformacional. Em contrapartida, a ligação de hidrogênio que se forma entre o grupamento amino substituído e a carbonila do ácido carboxílico, fornecem rigidez a esta porção da molécula. Provavelmente, esta é a característica que mais influencia as propriedades e reações que envolvem a FUR, tanto no estado líquido, mas principalmente no estado sólido (MATSUDA; TATSUMI, 1990; BEYERS et al., 2000; LATOSIŃSKA et al., 2006; BABU et al., 2010; BOLUKBASI; YILMAZ, 2012). Beyers e colaboradores (2000) destacam a existência de interações moleculares fortes na molécula de FUR, com destaque para a ligação de hidrogênio intramolecular que forma o equivalente a um anel rígido de ressonância e confere uma apolaridade incomum para a molécula. Este tipo de interação é visualizado em quaisquer dos polimorfos descritos para o fármaco.

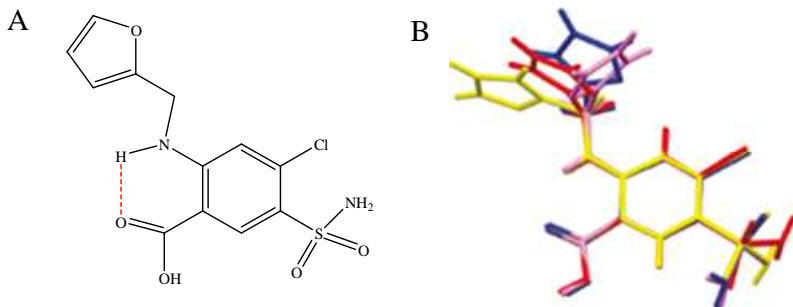


Figura 7 – Representação da furosemida: (A) estrutura molecular evidenciando a principal ligação de hidrogênio intramolecular (vermelho); (B) minimização das conformações sobrepostas para as moléculas dos três polimorfos do fármaco. Fonte: Adaptado de Babu et al. (2010)

Matsuda e Tatsumi (1990) realizaram estudos de caracterização físico-química de modificações da FUR no estado sólido, empregando técnicas espectroscópicas, termoanalíticas, de imagem e de difração de raios-X de pó. Os autores apresentaram 4 polimorfos diferentes e 2 solvatos denominados I, II, III, IV (dimetilformamida solvato), V (dioxano solvato) e VI. Sob aquecimento os sólidos I, II, III, IV e V sofrem mudança de fase cristalina, formando o polimorfo VI mais estável termodinamicamente. As estruturas cristalinas neste trabalho não foram resolvidas (MATSUDA; TATSUMI, 1990).

Até o ano de 2012 existiam quatro estruturas da FUR depositadas no CSD (datadas de 1976, 1978, 1983 e 2007). Destas quatro, estudos comprovaram que os depósitos de 1976, 1978 e 1983 consistiam na mesma forma polimórfica (KARAMI et al., 2006). Mais recentemente, pesquisadores da Índia estudaram as formas de cristalização possíveis para a FUR. Nesse trabalho foram atribuídas três formas polimórficas para o fármaco, denominadas formas 1, 2 e 3. A forma 1 corresponde à mesma estrutura elucidada por Karami e colaboradores (2006), enquanto que as formas 2 e 3 corresponderiam a novas estruturas cristalinas do fármaco. Segundo os autores, o polimorfismo apresentado pela FUR envolve diferentes conformações e diferentes *synthons* supramoleculares, acarretando em ligações de hidrogênio raras e ângulos de torção variados. Estas três estruturas estão hoje depositadas no CSD (BABU et al., 2010).

Durante a realização do presente trabalho foram publicados trabalhos com cocrystalis de FUR, conforme Quadro 4.

Quadro 4 - Informações cristalográficas dos polimorfos e cocristais de FUR relatados na literatura.

	Técnica de obtenção	Tipo de material	Sistema Cristalino	Grupo espacial	Temperatura (K)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Z	Volume (Å <sup>3</sup> )
1	Evaporação de solvente (MeOH, EtOH, PropOH, ACN)	Mono cristal	Triclínico	P-1	100	9,5150 (9)	10,4476 (10)	15,5826 (16)	92,839 (2)	107,088 (2)	116,7470 (10)	4	1291,9 (2)
2	Evaporação de solvente lenta (MeOH anidro)	Mono cristal	Monoclínico	P2 <sub>1</sub> /n	100	5,0097 (5)	10,1086 (11)	26,620 (3)	90	95,396 (2)	90	4	1342,1 (2)
3	Cristalização em CH <sub>3</sub> COOH ou PropOH (a partir de FUR moída)	Mono cristal	Triclínico	P-1	100	4,8764 (7)	10,4999 (14)	13,6407 (18)	78,065 (2)	86,721 (2)	82,589 (2)	2	677,29
4	LAG ACN + solução EtOH (evaporação)	Mono cristal	Triclínico	P-1	100	5,2214 (4)	9,5860 (8)	20,1540 (17)	85,2220 (10)	88,7590 (10)	74,8260 (10)	2	970,20 (14)
5	LAG ACN + solução MeOH (evaporação)	Mono cristal	Triclínico	P-1	100	8,0230 (6)	8,3201 (6)	17,5479 (12)	77,7340 (10)	77,5200 (10)	81,2860 (10)	2	1110,71 (14)
6	Sementes do <i>slurry</i> + solução EtOH + agitação	Pó	Monoclínico	P2 <sub>1</sub> /n	298	4,86286 (13)	20,7109 (6)	19,3632 (5)	90	92,4168 (6)	90	4	1948,42 (9)

(continuação do quadro 4)

	Técnica de obtenção	Tipo de material	Sistema Cristalino	Grupo espacial	Temperatura (K)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Z	Volume (Å <sup>3</sup> )
7	Sementes do <i>slurry</i> + solução EtOH:THF + agitação	Pó	Monoclínico	P2 <sub>1</sub> /n	298	16,4686 (4)	5,01253 (14)	24,7963 (7)	90	108,8400 (6)	90	4	1937,26 (9)
8	Sementes do <i>slurry</i> + solução EtOH:Aceto + agitação	Pó	Monoclínico	P2 <sub>1</sub> /n	298	5,22828 (4)	18,7127 2 (17)	20,1213 8 (18)	90	94,8246 (5)	90	4	1961,61 (3)
9	Secagem do hidrato (estrutura número 7)	Pó	Monoclínico	C2/c	298	40,6357 (13)	5,36051 (15)	18,3727 (5)	90	92,5034 (13)	90	8	3998,3 (2)
10	Sementes do <i>slurry</i> + solução ACN:H <sub>2</sub> O + agitação	Mono cristal	Monoclínico	C2/c	298	46,9784 (16)	5,09800 (15)	18,1866 (6)	90	92,5680 (18)	90	8	4351,2 (3)
11	LAG ACN + solução MeOH:ACN (evaporação)	Mono cristal	Triclínico	P-1	100	7,512 (2)	9,462 (3)	17,198 (5)	95,387 (5)	102,271 (5)	110,101 (5)	2	1103,0 (6)
12	Evaporação lenta (solução MeOH)	Mono cristal	Monoclínico	P2 <sub>1</sub> /n	190	8,0948 (2)	9,3747 (2)	36,291 (1)	90	93,128 (1)	90	4	2749,89 (12)

(continuação do quadro 4)

	Técnica de obtenção	Tipo de material	Sistema Cristalino	Grupo espacial	Temperatura (K)	a (Å)	b (Å)	c (Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)	Z	Volume (Å <sup>3</sup> )
13	Evaporação lenta (solução EtOH)	Mono cristal	Triclínico	P-1	190	8,4052 (2)	9,4494 (3)	19,6748 (9)	92,649 (1)	99,170 (2)	111,466 (1)	2	1426,35 (9)
14	Evaporação lenta (solução Aceto)	Mono cristal	Triclínico	P-1	190	9,3099 (2)	9,5317 (3)	19,2653 (7)	99,733 (2)	96,057 (2)	109,197 (3)	2	1567,27 (9)

Classificação das estruturas:

- 1: FUR polimorfo 1;
- 2: FUR polimorfo 2;
- 3: FUR polimorfo 3;
- 4: Furosemida:N-óxido de nicotinamida;
- 5: Furosemida:N-óxido biperidina:H<sub>2</sub>O;
- 6: Furosemida:Nicotinamida I;
- 7: Furosemida:Nicotinamida II;
- 8: Furosemida:Nicotinamida III;
- 9: Furosemida:Nicotinamida IV;
- 10: Furosemida:Nicotinamida:2H<sub>2</sub>O;
- 11: Furosemida:Cafeína;

12: Furosemida:Pentoxifilina;

13: Furosemida:Pentoxifilina:H<sub>2</sub>O;

14: Furosemida:Pentoxifilina:Acetona.

Legenda solventes:

MeOH: metanol;

EtOH: etanol;

PropOH: propanol;

ACN: acetonitrila;

CH<sub>3</sub>COOH: ácido acético;

THF: tetrahydrofurano.

Fonte: Adaptação de Babu e colaboradores (2010), Goud; Babu; Nangia (2011), Ueto e colaboradores (2011), Goud e colaboradores (2012), Stepanovs; Mishnev (2012).

O primeiro trabalho publicado abrangeu o estudo dos *synthons* entre sulfonamidas e piridinas N-óxido substituídas, sendo que os autores obtiveram um cocrystal de FUR:N-óxido de isonicotinamida (1:1) e outro de FUR:N-óxido de biperidina:H<sub>2</sub>O (1:1:0,25). Outro trabalho envolveu a completa caracterização de quatro polimorfos, um hidrato e um dessolvato do cocrystal FUR:nicotinamida. Já Goud et al. (2012) avaliaram a formação de um sal de FUR com citosina e também a cocrystalização do fármaco com nicotinamida, isonicotinamida, uréia, ácido p-aminobenzóico, acetamida, adenina e cafeína. Além disso, outra metil-xantina, a pentoxifilina, foi utilizada com sucesso na cocrystalização com a FUR, resultando em um cocrystal 1:1 e dois solvatos. (GOUD; BABU; NANGIA, 2011; UETO et al., 2011; GOUD et al., 2012; STEPANOV; MISHNEV, 2012). Nestes sistemas de cocrystalização da FUR supracitados, dois aspectos devem ser destacados: o modo de preparo e os *synthons* formados (Figura 8).

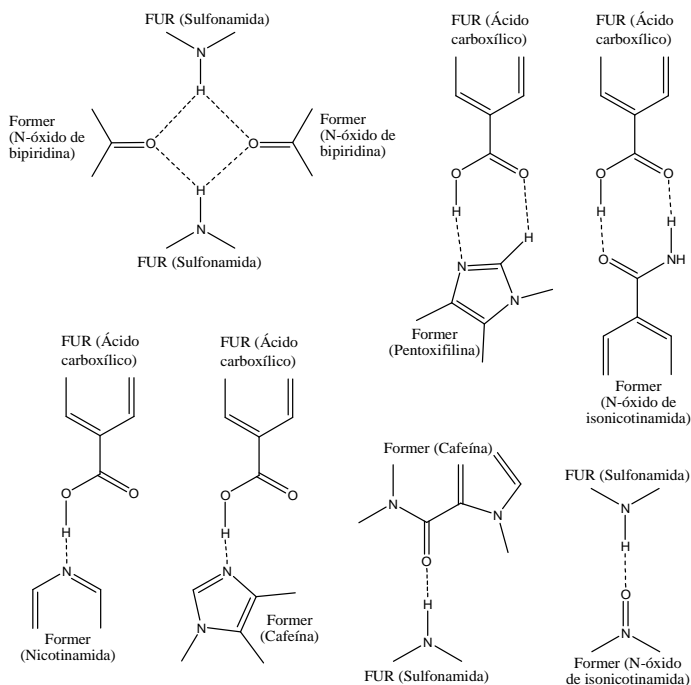


Figura 8 - Principais *synthons* observados em cocrystalos de furosemido. Fonte: Adaptação de Babu e colaboradores (2010), Goud; Babu; Nangia (2011), Ueto e colaboradores (2011), Goud e colaboradores (2012), Stepanov; Mishnev (2012).

O modo de preparo, em geral, utilizou a LAG e os sistemas de *slurry* no processamento inicial, com posterior semeadura de soluções saturadas. A técnica demonstrou-se efetiva na obtenção de monocristais e de novas formas cristalinas com taxas de dissolução por volta de duas vezes superiores à verificada para o fármaco puro. Já no que se refere aos *synthons* observados, verificou-se a influência das interações mediadas pelo grupo sulfonamida para a formação dos cocristais, bem como da manutenção da ligação de hidrogênio intramolecular da FUR (GOUD; BABU; NANGIA, 2011; UETO et al., 2011; GOUD et al., 2012; STEPANOV; MISHNEV, 2012).

Além de diferentes estruturas cristalinas, vários autores relatam que as formas polimórficas da FUR apresentam estabilidade variável e taxas de degradação diferenciadas. Neste sentido, a FUR apresenta instabilidade marcante frente ao aquecimento e à luz. A degradação de soluções aquosas e metanólicas do fármaco sob radiação ultravioleta (UV) tem sido reportada em diversos trabalhos, destacando-se as reações de foto-oxidação, foto-hidrólise e fotodescloração. Em soluções ácidas, ocorre degradação rápida, enquanto que em soluções alcalinas a FUR demonstra ser mais estável. Em altas temperaturas, a molécula é hidrolisada a ácido 4-cloro-5-sulfamoilantranílico (CSA) e álcool furfúrico, o qual é rapidamente convertido em ácido levulínico (Figura 90). Além disso, a degradação aparenta ser ainda mais rápida quando íons sulfato estão presentes, uma questão crítica sob o aspecto da produção de medicamentos (DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1992; ASKER; FERDOUS, 1996; VARGAS et al., 1998; BEYERS et al., 2000; CARDA-BROCH; ESTEVE-ROMERO; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, 2000).

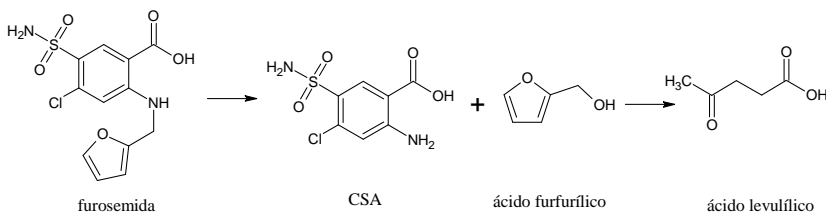


Figura 9 - Principal reação de degradação da furosemida frente condições diversas (hidrólise e fotólise). Fonte: Adaptado de Carda-Broch, Esteve-Romero; Garcia-Alvarez-Coque (2000).

No mercado brasileiro existem registros de apresentações comerciais contendo FUR na forma de solução injetável (10 mg/mL),

comprimidos simples (40 mg de fármaco/comprimido) e solução oral (10 mg/mL), sendo Lasix® (Sanofi-Aventis) o medicamento referência (BRASIL, 2013a). Entretanto, existem diversas formas de apresentação descritas na literatura de patentes. Enfatizam-se as modificações sólidas de sais com amônios quaternários, lisina, ornitina, arginina, urapadil e com o agente betabloqueador pebutolol, mas também sólidas com Eudragit L100 para incrementar o efeito farmacológico (AMSCHLER; KLEMM; LUDWIG, 1978; MUSCHAWECK; FÜLBERTH; SICKMÜLLER, 1986; CHAFETZ; PHILLIP, 1987; PELLEGATA, 1993).

No que se refere à tecnologia farmacêutica, os sistemas de liberação modificada têm sido desenvolvidos a fim de obter efeitos farmacológicos desejados pelo controle da taxa de liberação do fármaco. Para a FUR foi demonstrado que quando idênticas doses são administradas, uma absorção lenta e constante do fármaco no organismo induz um efeito diurético global maior do que taxas de absorção mais rápidas (KLAUSNER et al., 2003). No ambiente acadêmico, diversas têm sido as estratégias adotadas para controlar/modificar a liberação desse fármaco em formas farmacêuticas. Citam-se a formação de nanopartículas e dispersões sólidas, a microencapsulação, a complexação com ciclodextrinas e sílica mesoporosa, bem como a utilização de diferentes componentes matriciais em comprimidos (ACEVES; CRUZ; HERNANDEZ, 2000; SPAMER et al., 2002; AI et al., 2003; CHO; CHOI; SHIN, 2005; KOSEKI et al., 2009; GAIKWAD et al., 2010; PATEL et al., 2010; ZVONAR et al., 2010; ABDUL-RASOOL; FAHMY; ABDUL-GALEEL, 2012; AMBROGI et al., 2012). Destaca-se o efeito que as condições de moagem podem ter sobre a estabilidade de FUR na presença de polímeros, com a degradação da mesma sendo evitada apenas quando da utilização de sistemas criogênicos (ADRJANOWICZ et al., 2011b).

Em parte, esta grande variedade de estudos envolvendo o fármaco está baseada nas propriedades que ele apresenta: baixa solubilidade, baixa permeabilidade, alta instabilidade química e características sólidas peculiares. Assim, embora seu primeiro registro esteja datado de mais de 50 anos atrás, este sistema demonstra ser desafiador no teste de muitas estratégias farmacêuticas inovadoras.



**CAPÍTULO II**  
**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS**  
**ANALÍTICAS**

---



## 3 CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

### 3.1 INTRODUÇÃO

As metodologias analíticas utilizadas em ciências farmacêuticas podem ser destinadas a basicamente quatro tipos de ensaios: (i) ensaios de quantificação de fármacos; (ii) ensaios de análise de impurezas (quantitativos ou ensaios-limite); (iii) ensaios de *performance* ou dissolução; e (iv) ensaios qualitativos de identificação do fármaco. Para cada tipo de análise, por sua vez, existem particularidades com relação ao material e aos parâmetros requeridos para acreditação analítica. A validação apenas não é exigida quando se trabalha com métodos descritos nas Farmacopeias (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

No que se refere às metodologias farmacopeias de FUR, o único método oficial descrito corresponde à avaliação de comprimidos simples de FUR utilizando 900 mL de tampão fosfato pH 5,8 como meio de dissolução, com aparato pá, rotação de 50 rpm, e doseamento por espectrometria no UV em 271 nm (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Além dos guias oficiais existe na literatura uma grande variedade de métodos utilizados em estudos de dissolução de FUR matéria-prima, os quais apresentam variações principalmente no que se refere à natureza e ao pH do meio (MATSUDA; TATSUMI, 1990; YU et al., 2004). Como exemplo, destaca-se a determinação da VDI de cocristsais de FUR utilizando solução etanólica como meio de dissolução (GOUD et al., 2012). Embora analiticamente viável, a utilização de solventes orgânicos nos ensaios de *performance* pode apresentar baixa significância biológica. No caso específico de FUR, estudos prévios demonstram que a dissolução de formas farmacêuticas contendo o fármaco seja melhor conduzida em pH mais elevado. Estes trabalhos demonstram a importância que a seleção cuidadosa do meio diluente tem para a consistência dos ensaios de dissolução de FUR e suas implicações biofarmacêuticas (PRASAD et al., 1982; MCNAMARA et al., 1987).

Além disso, a mesma diversidade metodológica é também observada no caso dos métodos de quantificação do fármaco. No caso da metodologia oficial preconizada para o doseamento de FUR em matérias-primas, descreve-se a técnica de titulação por neutralização em meio não aquoso (dimetilformamida) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Também está descrito método de doseamento da matéria-prima

por espectrofotometria no UV, em hidróxido de sódio 0,1 mol/L e com detecção em 271 nm (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005). Estas técnicas são muito utilizadas principalmente pela sua versatilidade e robustez, mas têm aplicação limitada em amostras com interferentes, como aquelas que apresentam produtos de degradação, analitos associados ou matrizes complexas. Nestes casos, a utilização de técnicas cromatográficas demonstra maior especificidade (WATSON, 2005).

Na literatura científica encontram-se descritos diversos métodos utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na análise de FUR. A diversidade de técnicas utilizadas reflete também a variedade das amostras, as quais compreendem comprimidos, soluções injetáveis, fluidos biológicos, associações com outros fármacos, dentre outras (RADECK; HELLER, 1989; LI et al., 1991; REEUWIJK; TJADEN; VAN DER GREEF, 1992; MATSUURA; NAGAYAMA; KITAGAWA, 1993; PTACEK et al., 1996; ABOU-AUDA et al., 1998; INES TORAL et al., 2002; GUZMAN et al., 2003; MARGALHO et al., 2005; CHAWLA et al., 2006; NEGRO et al., 2006; WENK et al., 2006; GALAON et al., 2007; ESPINOSA BOSCH et al., 2008; BARANOWSKA; WILCZEK; BARANOWSKI, 2010; SORA et al., 2010; LIU et al., 2012; PATIL et al., 2012; RAM; DAVE; JOSHI, 2012; SOLTANI; JOUYBAN, 2012).

Com relação aos estudos de estabilidade, ensaios de pureza em matérias-primas de FUR são também relatados nas Farmacopeias. Enquanto a Farmacopeia Brasileira avalia ensaios de pureza não cromatográficos, as Farmacopeias Americana e Britânica utilizam sistemas por CLAE em fase reversa e normal, respectivamente (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; FARMACOEPIA BRASILEIRA, 2010). Da mesma forma, a degradação da FUR vem sendo bem caracterizada em diferentes sistemas ao longo dos anos. Destaca-se o grupo de Rapaka e colaboradores, os quais contribuíram com diversos estudos para avaliar a presença de produtos de degradação em preparações farmacêuticas contendo FUR (GHANEKAR; GUPTA; GIBBS JR, 1978; ROTH; RAPAKA; PRASAD, 1981; RAPAKA, R.; ROTH; PRASAD, 1982; RAPAKA, R. S. et al., 1982; MATSUDA; TATSUMI, 1990; DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1992; MATSUDA et al., 1992; ASKER; FERDOUS, 1996; VARGAS et al., 1998; BEYERS et al., 2000; ADRJANOWICZ et al., 2011a).

A análise destes e de outros trabalhos da literatura permitiu dividi-los de acordo com as ferramentas de separação cromatográfica utilizadas em sistemas de fase reversa: i) solvente orgânico:água; ii)

solvente orgânico:água com o pH ajustado com ácido fosfórico; iii) solvente orgânico:tampão; iv) emprego de trietilamina no pareamento iônico. Esta classificação norteou os estudos de desenvolvimento de métodos do presente trabalho visando a determinação de FUR em estudos de estabilidade e de dissolução intrínseca. Os procedimentos foram otimizados com relação às condições experimentais (tipo de matriz, tempo de retenção de FUR, resolução cromatográfica entre os analitos/produtos de degradação, sensibilidade e robustez) e às ferramentas disponíveis no laboratório. Posteriormente, os métodos foram validados de acordo com ICH (2005) e Brasil (2003).

## 3.2 MATERIAIS

Utilizaram-se matérias-primas fornecidas pela indústria Prati Donaduzzi (lote FRM-083040 e teor de 99,47 %) e pela UNIVALI (lote 9064H2RI e teor de 99,99 %), todas originárias na Índia. Os insumos foram armazenados em dessecadores e protegidos da luz.

A substância química referência (SQR) foi adquirida da Farmacopeia Brasileira (lote 1002 e teor de 100,0 % calculado em base seca). A amostra certificada foi armazenada em geladeira, lacrada e protegida da luz.

Os ensaios de doseamento de FUR por CLAE utilizaram-se solventes de alta pureza (grau cromatográfico).

## 3.3 MÉTODOS

### 3.3.1 Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade por CLAE para furosemida matéria-prima

No que se refere ao desenvolvimento do método por CLAE para estudos de estabilidade de FUR, os métodos disponíveis na literatura e as análises realizadas preliminarmente, permitiram delinear os experimentos de desenvolvimento por *design* experimental.

De modo simplificado, o desenvolvimento do método por CLAE utilizou duas ferramentas estatísticas: o fatorial fracionado (cinco fatores avaliados e definidos manualmente,  $2^{n-1} = 2^{5-1}$ ), seguido pela análise da superfície de resposta definida utilizando o programa Design Expert® (dois fatores avaliados,  $2^2 + (-\sqrt{2}) + (+\sqrt{2})$ ). As proporções de fase aquosa e fase orgânica foram definidas a partir do cálculo da força total da mistura, adotando-se volumes de metanol e acetonitrila equivalentes

conforme a força de cada solvente. Os parâmetros avaliados estão representados no Quadro 5 e no Quadro 6 (KRULL et al., 2008; DEJAEGHER; DURAND; VANDER-HEYDEN, 2009; DEJAEGHER; VANDER-HEYDEN, 2009; KRULL et al., 2009; DEJAEGHER, B.; VANDER-HEYDEN, 2011; SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2011; VOGT; KORD, 2011).

Quadro 5 - Detalhamento do fatorial fracionado

Análise	Fator 1: coluna cromatográfica <sup>1</sup>	Fator 2: pH <sup>2</sup>	Fator 3: solvente orgânico <sup>3</sup>	Fator 4: tampão <sup>4</sup>	Fator 5: temperatura <sup>5</sup>
	A	B	C	D	E = A.B.C.D
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-
4	+	+	-	-	+
5	-	-	+	-	-
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	+
8	+	+	+	-	-
9	-	-	-	+	-
10	+	-	-	+	+
11	-	+	-	+	+
12	+	+	-	+	-
13	-	-	+	+	-
14	+	-	+	+	-
15	-	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+

Legenda:

Fator 1: - (C18); + (C8).

Fator 2: - (pH 3,0); + (pH 5,0).

Fator 3: - (Metanol 31 %); + (Acetonitrila 25 %).

Fator 4: - (Tampão acetato 50 mM); + (Tampão fosfato 50 mM).

Fator 5: - (25 °C); + (35 °C).

Quadro 6 - Detalhamento da análise composta central

Análise	Fator 1: [Acetonitrila] (%)	Fator 2: pH
1	17,9	4,0
2	25,0	2,6
3	20,0	5,0
4	30,0	5,0
5	25,0	5,4
6	25,0	4,0
7	20,0	3,0
8	32,1	4,0
9	25,0	4,0
10	25,0	4,0
11	30,0	3,0

Foram analisadas soluções de FUR substância química de referência (SQR) e solução amostra submetida à degradação em luz UV 254 nm por uma hora. Ambas as soluções encontravam-se na concentração de 1 mg/mL. A solução de SQR foi preparada em metanol. No caso da amostra, após 1 hora em câmara de luz, alíquota de 250 µL da solução de 1 mg/ml foi transferida para balão volumétrico qsp 10 mL de diluente (metanol:água 50:50, v/v). A mesma diluição foi feita para a solução de SQR, para uma concentração final de FUR de 25,0 µg/mL (sem exposição à luz).

Os cromatogramas obtidos foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros: o tempo de retenção de FUR, a resolução entre os picos FUR/produtos de degradação e a simetria do pico relativo à FUR. O *design* realizado permitiu determinar as seguintes condições experimentais como ideais: coluna cromatográfica Phenomenex C8 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm), temperatura do forno de 25 °C, volume de injeção 20 µL e eluição em gradiente, conforme Tabela 1. Optou-se por utilizar um gradiente de fase móvel tendo em vista a diferença de polaridade dos produtos de degradação da FUR e objetivando um tempo de corrida cromatográfica razoavelmente curto.

Tabela 1- Programa do gradiente utilizado no método indicativo de estabilidade.

Tempo (minutos)	Proporção de acetonitrila (%)	Proporção de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 4,0 (%)
0	13	87
1	13	87
2	30	70
9	30	70
10	13	87
15	13	87

O tampão fosfato foi preparado a partir de solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH ajustado para 4,0 com ácido fosfórico. A fase móvel foi misturada na proporção especificada pelo próprio sistema cromatográfico Shimadzu. As soluções separadas foram filtradas sob vácuo e membrana de Nylon 0,45  $\mu\text{m}$ , com posterior desgaseificação em banho de ultra-som por 15 minutos.

Com relação ao preparo das amostras analisadas, padronizou-se utilizar solução-estoque do fármaco em metanol e proceder diluição de alíquota apropriada em metanol:água (50:50, v/v), denominado diluente.

O método foi validado conforme BRASIL (2003), ICH (2005) e USP (2007), quanto aos parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e robustez.

✓ **Especificidade:** avaliada por meio de estudos de degradação forçada de solução SQR de FUR sob condições hidrolíticas (ácida e alcalina), oxidativas e fotolíticas (SINGH; BAKSHI, 2000). Os tempos de análise e submissão às condições de degradação forçada foram definidos tendo por base a porcentagem de degradação observada e os protocolos internos padronizados no laboratório. Além disso, estudos avaliando a interferência/coeluição dos *formers* utilizados nos experimentos de cocristalização também foram realizados (ICH, 1996; 2003).

Nas condições hidrolíticas, amostras da matéria-prima da FUR foram submetidas à meio ácido (ácido clorídrico 0,1 N; refluxo por 8 horas) e alcalino (hidróxido de sódio 1 N, refluxo por 12 horas). As amostras, na concentração de 1 mg/mL, foram preparadas transferindo-se para balão volumétrico 25,0 mg da matéria-prima e 12 mL de metanol qsp 25 mL de HCl 0,1 N ou NaOH 1 N, dependendo do tipo de análise. Este sistema foi mantido em refluxo. Após o tempo indicado, alíquota de 250  $\mu\text{L}$  desta solução foi retirada e neutralizada em balão



volumétrico de 10 mL com 250  $\mu$ L de NaOH 0,1 N ou HCl 1 N, respectivamente. Por fim, o volume foi ajustado com diluente para uma concentração final de 25,0  $\mu$ g/mL. Também foram analisados os tempos-zero das reações.

A estabilidade da FUR em condições oxidativas foi avaliada em peróxido de hidrogênio 30 %, à temperatura ambiente, por período de 24 horas. A solução inicial foi preparada transferindo-se para balão volumétrico 25,0 mg da matéria-prima e 12 mL de metanol qsp 25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. Posteriormente, uma alíquota de 250  $\mu$ L desta solução foi retirada e transferida para um balão volumétrico de 10 mL qsp diluente, consistindo no tempo zero. O mesmo procedimento foi realizado após 24 horas, retirando-se alíquota de 250  $\mu$ L da solução inicial qsp 10 mL de diluente para uma concentração final de 25,0  $\mu$ g/mL.

Soluções de FUR a 1 mg/mL também foram submetidas à luz ultravioleta 254 nm, em câmara de luz UV apropriada. Estas soluções foram preparadas em metanol, acetonitrila, metanol:água (50:50, v/v) e acetonitrila:água (50:50, v/v). Após 1 hora de exposição à luz, em cubetas de quartzo, 250  $\mu$ L das soluções iniciais foram transferidas para balão volumétrico qsp 10 mL de diluente para uma concentração teórica final de 25,0  $\mu$ g/mL de FUR. Além disso, soluções na concentração de 1 mg/mL de FUR preparadas para hidrólise ácida/básica foram também expostas à luz UV 254 nm a fim de avaliar possível efeito protetor dependente de pH.

As soluções dos *formers* foram obtidas de forma semelhante à FUR SQR, sendo analisadas nas concentrações finais de 25,0  $\mu$ g/mL em diluente.

✓ **Linearidade:** determinada pela análise de 5 concentrações crescentes de FUR SQR na faixa de 5,0 – 50,0  $\mu$ g/mL, em triplicata, em três dias diferentes. Estas soluções foram preparadas a partir de solução-estoque a 500  $\mu$ g/mL em metanol. A linearidade foi avaliada pela análise da regressão linear, a qual foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e pela análise da variância (ANOVA) (Microsoft Office Excel 2007).

✓ **Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ):** calculados a partir da reta obtida na linearidade. LD e LQ correspondem a, respectivamente, 3,3r/S e 10r/S, onde r é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da curva analítica.

✓ **Precisão:** avaliada por meio dos coeficientes de variação percentual obtidos durante a determinação de FUR em matérias-primas comerciais nos testes de repetibilidade (intradia, n=6) e precisão intermediária (inter-dias, n=3). A concentração analítica teórica compreendeu a 25,0 µg/mL (ponto médio aproximado da curva analítica).

✓ **Exatidão:** verificada pelo teste de recuperação de quantidades conhecidas de FUR SQR adicionadas a soluções de amostras de matérias-primas comerciais. Foram preparadas soluções metanólicas de SQR e amostra, ambas na concentração teórica de 100,0 µg/mL. A partir delas, foram preparadas três amostras compreendendo três níveis de concentração nominal (ponto médio aproximado da curva analítica) em balão volumétrico de 25 mL (Tabela 2): 80 % (R1 = 20 µg/mL), 100 % (R2 = 25 µg/mL) e 120 % (R3 = 30 µg/mL). As análises foram feitas em triplicata, em dias diferentes, e avaliadas como porcentagem de recuperação de FUR SQR.

Tabela 2 - Preparo das soluções para o teste de recuperação de FUR em matéria-prima, em metanol:água (50:50, v/v), utilizando CLAE.

Solução	Volume (mL) solução FUR matéria-prima (100 µg/mL)	Volume (mL) solução FUR padrão (100 µg/mL)	Concentração FUR final (µg/mL)
Amostra	4,00	-	16,0
R1	4,00	1,00	20,0
R2	4,00	2,25	25,0
R3	4,00	3,50	30,0
Padrão	-	4,00	16,0

✓ **Robustez:** analisada a partir de pequenas e deliberadas modificações nas condições do método, como o comprimento de onda de detecção, o fluxo, a temperatura do forno e a proporção de solvente orgânico na fase móvel.

### 3.3.2 Desenvolvimento e validação de método de dissolução intrínseca para furosemida matéria-prima

A avaliação dos parâmetros ideais para o método de dissolução intrínseca da FUR foi realizada em dissolutor Varian modelo VK7000,

com proteção da luz ambiente. Foi testado aparato de Wood's modificado com área de exposição do fármaco constante de  $0,5 \text{ cm}^2$ .

Em primeiro momento, foi avaliada a influência da natureza do meio diluente nos ensaios de dissolução. Estudos preliminares estabeleceram que aproximadamente 100 mg da amostra fossem comprimidos sob 400 Kgf por 1 minuto em prensa acoplada com sistema de medida da força aplicada (Asta®). Após prensagem, os aparatos contendo as pastilhas foram mantidos por 15 minutos em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  para eliminar a água adsorvida na superfície. Esse sistema foi submetido aos testes de dissolução na velocidade de 75 rpm, temperatura de  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  e com volume de meio de 250 mL. Estes testes iniciais envolveram tempo total de análise de 2 horas, com coleta de alíquotas nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. As alíquotas foram coletadas manualmente e sucedidas por reposição de mesmo volume. Os meios testados constituíram-se de soluções descritas em estudos de classificação biofarmacêutica e de solubilidade de FUR disponíveis na literatura, conforme Tabela 3 (MATSUDA; TATSUMI, 1990; YU et al., 2004)

Tabela 3 - Meios de dissolução avaliados: classificação e composição.

<b>Meio 1</b>	Tampão fosfato de potássio pH 6,8 (0,2 mol/L)
<b>Meio 2</b>	Tampão acetato de sódio pH 4,5 (0,2 mol/L)
<b>Meio 3</b>	Ácido clorídrico pH 1,2 (0,1 mol/L)
<b>Meio 4</b>	Tampão McLlaine pH 2,2
<b>Meio 5</b>	Tampão McLlaine pH 3,2
<b>Meio 6</b>	Tampão McLlaine pH 4,6
<b>Meio 7</b>	Tampão McLlaine pH 5,6
<b>Meio 8</b>	Tampão fosfato de potássio pH 3,0 (0,2 mol/L)
<b>Meio 9</b>	Água

Optou-se por diminuir a molaridade do tampão fosfato selecionado a fim de evitar solubilização excessiva da pastilha. Após a definição destas condições de dissolução verificou-se a influência exercida pela força de compressão da pastilha (400 kgf e 600 kgf), pelo volume do meio e pela manutenção em estufa a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  na VDI da FUR. Os parâmetros de análise da dissolução intrínseca entre os testes compreenderam a comparação das retas obtidas a partir da plotagem dos resultados (valores de r e equação da reta) bem como ANOVA das taxas de dissolução obtidas.

As condições *sink* de FUR foram determinadas no meio de dissolução utilizando-se aparato pá. Excesso de amostra (500 mg) foi adicionado a 250 mL de meio desgaseificado e ambientado em  $37 \pm 0,5$  °C e com rotação de 75 rpm. Aproximadamente 5 mL do meio-teste foram periodicamente retirados em 2 e 24 horas de ensaio, com posterior reposição de mesmo volume de meio. As alíquotas foram filtradas em papel filtro quantitativo (0,45 µm de poro) e diluídas até concentrações apropriadas para a leitura em CLAE. Os ensaios foram feitos em triplicata e tratados por ANOVA.

A concentração de FUR nos ensaios de dissolução foi avaliada por CLAE em cromatógrafo líquido Shimadzu, baseando-se no teor de FUR indicado para cada amostra. Utilizou-se coluna Waters X-Bridge C18 (100 x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e fase móvel isocrática composta por tampão fosfato 50 mM pH 4:acetonitrila (70:30, v/v) com fluxo de 1 mL/min em corridas cromatográficas de 5 minutos. O volume de injeção foi de 15 µL e a detecção compreendeu o comprimento de onda de 232 nm.

Por pertencer ao grupo de ensaios de desempenho, o método de dissolução intrínseca proposto foi validado de acordo com ajustes convenientes para a finalidade e uso da metodologia proposta. Além dos guias oficiais, foram adaptados procedimentos analíticos realizados em outros grupos de pesquisa (BRASIL, 2003; ICH, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007; BORGMANN, S. H. M. et al., 2008; DONATO et al., 2008; BAJERSKI et al., 2010; ROSSI et al., 2011). Os parâmetros são listados a seguir:

✓ **Especificidade:** verificada por meio da comparação dos cromatogramas obtidos para solução SQR e para soluções contendo os *formers* utilizados durante os ensaios de cocristalização. As amostras avaliadas foram protegidas da luz.

✓ **Linearidade:** determinada pela análise de 7 concentrações crescentes de FUR na faixa de 0,5 – 25 µg/mL, em triplicata, em três dias diferentes e com proteção da luz. Estas soluções foram preparadas a partir de solução-estoque a 250 µg/mL em metanol. As diluições foram realizadas em meio de dissolução. A linearidade foi avaliada pela análise da regressão linear, a qual foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e pela análise da variância (ANOVA) (Microsoft Office Excel 2007).

✓ **Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ):** calculados a partir da reta obtida na linearidade. LD e LQ correspondem a, respectivamente,  $3,3r/S$  e  $10r/S$ , onde  $r$  é o desvio padrão do intercepto e  $S$  é a inclinação da curva analítica. O valor calculado foi confirmado experimentalmente.

✓ **Precisão/Exatidão:** verificada pelo teste de recuperação de quantidades conhecidas de FUR referência adicionadas ao meio de dissolução. Foram preparadas três amostras compreendendo três níveis de concentração nominal (ponto médio da curva analítica) em 250 mL de meio: 20 % ( $R1 = 2 \mu\text{g/mL}$ ), 100 % ( $R2 = 10 \mu\text{g/mL}$ ) e 200 % ( $R3 = 20 \mu\text{g/mL}$ ). Procedeu-se o ensaio de dissolução utilizando-se aparato pá e ambiente a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  com rotação de 75 rpm. Depois de transcorrida 1 hora de ensaio, foram retiradas alíquotas de 5 mL de cada cuba, com posterior análise por CLAE. As análises foram feitas em triplicata, em dias diferentes, e com proteção da luz.

✓ **Estabilidade de FUR no meio de dissolução:** avaliada em soluções de FUR referência a  $20 \mu\text{g/mL}$  em meio de dissolução. As soluções foram submetidas ao teste de dissolução com volume de 250 mL e utilizando aparato pá, ambiente a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  e rotação de 75 rpm. Os ensaios de dissolução foram realizados com e sem proteção da luz, por 2 horas. Após isso, ambas as soluções foram avaliadas por CLAE nos tempos zero e 24 horas de armazenamento. Este, por sua vez, foi realizado em geladeira e temperatura ambiente (também com e sem proteção da luz). Todas as amostras foram avaliadas por CLAE conforme o teor e o surgimento de produtos de degradação.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade por CLAE para furosemida matéria-prima

No que se refere ao desenvolvimento do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram analisados os diferentes sistemas descritos na literatura para o doseamento do fármaco. Após estudos preliminares, foram selecionados cinco sistemas para testes em soluções contendo o fármaco degradado na luz UV 254 nm. Verificou-se que o melhor sistema envolvia a utilização de acetonitrila e tampão, permitindo a separação/quantificação de três produtos de degradação e do fármaco. Entretanto, outros produtos de

degradação continuavam coelindo em baixos tempos de retenção, mesmo com a alteração da composição e da proporção da fase móvel. Estes desafios foram contornados utilizando-se da análise dos experimentos de design experimental. O fatorial fracionado determinou como críticos para a separação cromatográfica as variáveis “proporção de solvente orgânico” e “pH da fase móvel”. Para o sistema proposto, enquanto que menores proporções de solvente orgânico promoviam uma melhor separação dos produtos de degradação mais polares, retardavam o tempo de corrida cromatográfica. Da mesma forma, tampões de pH reduzido resultavam em retardo no tempo de eluição da FUR. Assim, a associação destas duas variáveis na análise de superfície, permitiu adotar um pH ótimo do tampão para utilização de um sistema em gradiente otimizado com relação à separação cromatográfica e ao tempo de análise. O método selecionado foi avaliado conforme os parâmetros de validação requeridos.

Os estudos de validação metodológica fornecem qualidade analítica aos dados gerados a partir de amostras de estabilidade e de desempenho. Nestes casos, o parâmetro especificidade é crítico para o cumprimento do objetivo proposto na metodologia. A Figura 10 mostra os cromatogramas das amostras submetidas a degradação forçada dentro dos ensaios de especificidade. Percebe-se a labilidade da FUR frente à luz UV em solução e frente a condições de hidrólise ácida. Este comportamento já está relatado na literatura, entretanto, o presente método se destaca pela boa resolução entre os picos em corridas cromatográficas relativamente rápidas, tendo em vista as ferramentas disponíveis de aprimoramento cromatográfico. Estudos estão sendo realizados por Espectrofotometria de massas a fim de avaliar o perfil dos produtos de degradação obtidos. Os trabalhos disponíveis na literatura destacam a influência da reatividade do nitrogênio da cadeia lateral de FUR na sua susceptibilidade à hidrólise. Além disso, reações envolvendo luz como catalisador da hidrólise e de outras reações como a desclorinação e a oxidação são bem caracterizadas na literatura e demonstram a reatividade da molécula (DE VILLIERS; VAN DER WATT; LÖTTER, 1992; ASKER; FERDOUS, 1996; VARGAS et al., 1998; BEYERS et al., 2000; CARDA-BROCH; ESTEVE-ROMERO; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, 2000; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

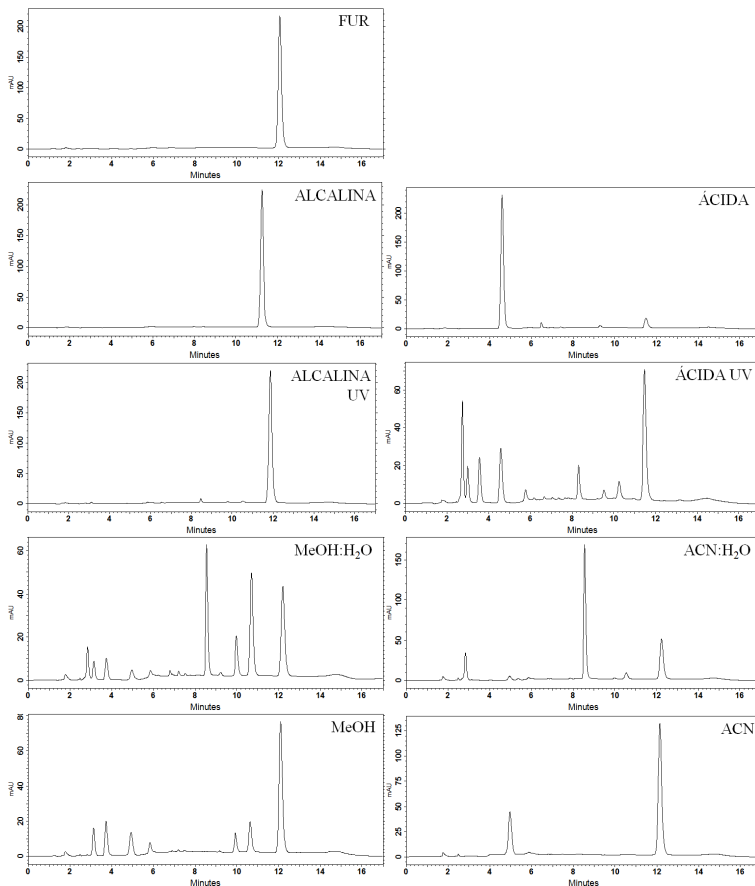


Figura 10 - Cromatogramas relativos aos ensaios de degradação forçada. As amostras expostas à luz UV por 1 hora são classificadas conforme o diluente - acetoneitrila (ACN), metanol (MeOH), acetoneitrila:água (ACN:H<sub>2</sub>O), metanol:água (MeOH:H<sub>2</sub>O), diluente de hidrólise ácida (ÁCIDA UV) e diluente de hidrólise básica (ALCALINA UV). As amostras submetidas a refluxo compreenderam dois sistemas: refluxo ácido por 2 horas (ÁCIDA) e refluxo básico por 24 horas (ALCALINA) [Coluna C8, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetoneitrila (eluição gradiente), fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL)].

Além disso, a análise da especificidade permitiu verificar que os *formers* utilizados nos experimentos de cocristalização não coeluíram com a FUR no método proposto (Figura 11).

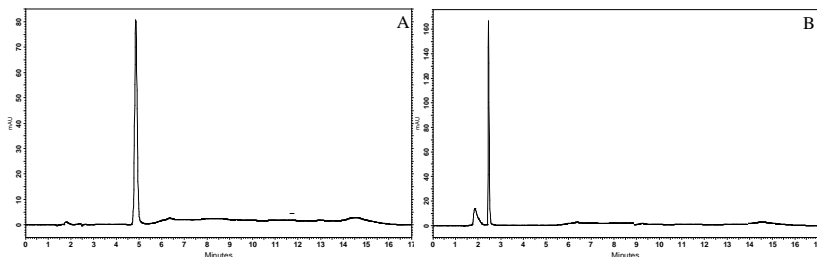


Figura 11 - Cromatogramas relativos aos ensaios de especificidade em relação aos *formers*. CAF – A. NIC – B [Coluna C8, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (eluição gradiente), fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL)].

A curva de calibração obtida a partir da avaliação da linearidade está representada em Figura 12.

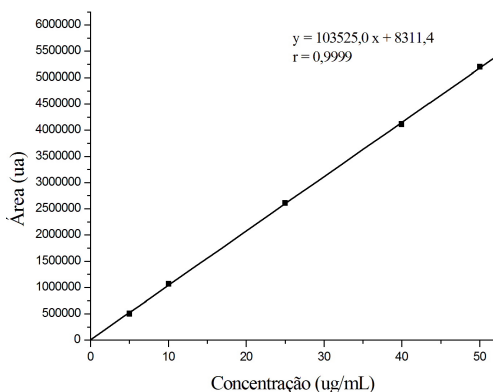


Figura 12 - Representação gráfica da curva de calibração de FUR SQR por CLAE [Coluna C8, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (eluição gradiente), fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm].

Os resultados obtidos demonstraram que soluções de FUR referência apresentam correlação linear entre a área dos picos e a concentração das soluções, conforme Tabela 4. Estes experimentos possibilitaram a determinação dos Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção de FUR (LD) para o método, que foram de 0,48 µg/mL e 0,16 µg/mL, respectivamente, demonstrando a adequada sensibilidade do mesmo.



Tabela 4 - Resultados da curva analítica obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método indicativo de estabilidade.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	5 - 50 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 103525,0 x + 8311,4$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$103525,0 \pm 691,1$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$8311,4 \pm 5019,4$
Coefficiente de correlação	0,9999

ANOVA	
Regressão linear	$4,98 \times 10^4 (5,86)^*$
Desvio da linearidade	2,30 (3,06)*

\* Em parênteses F calculado para  $p \leq 0,05$ .

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), conforme Tabela 5. O teor de FUR encontrado nos três diferentes dias foi equivalente ( $p \leq 0,05$ ) e o desvio padrão relativo está dentro do critério de aceitação de 2 % (BRASIL, 2003).

Tabela 5 - Resultados de precisão obtidos para a determinação de FUR em amostra de matéria-prima

Amostras	Matéria prima		
	Dia 1	Dia 2	Dia 2
1	102,64	102,00	101,11
2	103,27	101,87	101,83
3	102,56	102,47	101,05
4	102,87		
5	101,82		
6	102,08		
Média	102,54	102,11	101,33
Desvio padrão	0,53	0,32	0,44
DPR (%)	0,51	0,31	0,43

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação, cujos valores compreenderam a faixa de (100,4 – 101,9) % de FUR (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados obtidos nos testes de recuperação de FUR SQR na amostra de matéria-prima.

Concentração adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração média encontrada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%) (DPR)
4,0	4,1	100,4 (0,1 %)
9,0	9,2	101,9 (0,3 %)
14,0	14,1	101,4 (0,2 %)

Os ensaios de robustez demonstraram que a resposta do método não foi influenciada por pequenas e deliberadas modificações com relação à temperatura e porcentagem de solvente orgânico do gradiente (Tabela 7). Entretanto, verificou-se que variações no comprimento de onda de detecção e no pH do tampão, embora dentro de uma faixa de 5 % de variação, são fatores críticos a serem controlados.

Tabela 7 - Resultados de robustez obtidos para a determinação de FUR em amostra de matéria-prima.

Variável	Faixa	Teor	DPR (%)
Detecção (nm)	230	98,07	0,03
	234	95,93	0,25
pH	3,7	104,77	0,24
	4,3	98,20	0,30
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	20	100,47	0,16
	30	100,64	0,18
% acetonitrila	11	101,20	0,18
	15	100,78	0,32
Método proposto		100,10	0,33

Desta forma, tendo em vista que o método apresentou especificidade, linearidade, precisão e exatidão, o mesmo foi considerado apropriado para determinação quantitativa e também para estudos de estabilidade de FUR em matérias-primas farmacêuticas. Sugere-se, entretanto, que as condições envolvendo a detecção do sistema cromatográfico e o pH da fase móvel sejam controladas criteriosamente.

### 3.4.2 Validação de método de dissolução intrínseca para furosemda matéria-prima

As análises realizadas nos estudos preliminares de dissolução intrínseca de FUR demonstraram que, na maioria dos meios avaliados, a FUR apresentou degradação significativa e baixíssima taxa de dissolução. Apenas os meios número 1, 2 e 7 (tampão fosfato de potássio pH 6,8, tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão McLlaine pH 5,6, respectivamente) apresentaram-se promissores para a aplicação em estudos de dissolução (Figura 13). Neste caso, optou-se por trabalhar com o meio 1, a fim de otimizar o tempo de análise e evitar a degradação ácida da FUR verificada nos demais meios. Além destes resultados serem importantes na seleção dos parâmetros primários dos ensaios, destaca-se a reatividade química de FUR nestes meios e sua utilização em estudos prévios. Acredita-se que esta característica de labilidade de FUR durante os próprios ensaios de dissolução não foi identificada previamente porque os métodos de doseamento do fármaco normalmente utilizados compreendem a espectrofotometria no UV.

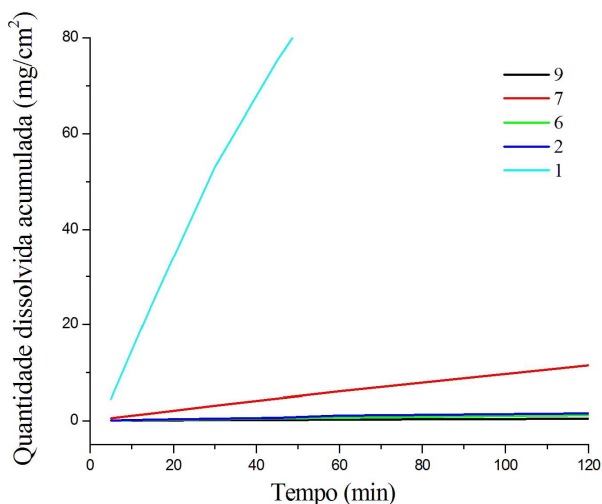


Figura 13 - Resultado gráfico da VDI de FUR nos meios 1 (tampão fosfato pH 6,8 200 mM), 2 (tampão acetato de sódio pH 4,5 200 mM), 6 (tampão McLlaine pH 4,6), 7 (tampão McLlaine pH 5,6) e 9 (água) (doseamento por CLAE – UV).

O volume de meio e a força de compressão não exerceram efeito marcante sobre os resultados obtidos (Figura 14). Entretanto, pontua-se

a influência do tempo de manutenção em estufa a 40 °C como importante para os estudos de dissolução intrínseca. Neste caso, verificou-se que o não cumprimento desta etapa favoreceu o surgimento de bolhas entre o fármaco e o meio de dissolução devido ao efeito que a água adsorvida provoca na molhabilidade da pastilha. A retirada das bolhas foi identificada por alterar a superfície da pastilha e, como consequência, incrementar a taxa de dissolução obtida. Assim, a fim de assegurar a robustez do método, preconizou-se a manutenção do aparato com amostra em estufa a 40 °C por 15 minutos precedentes ao ensaio de dissolução.

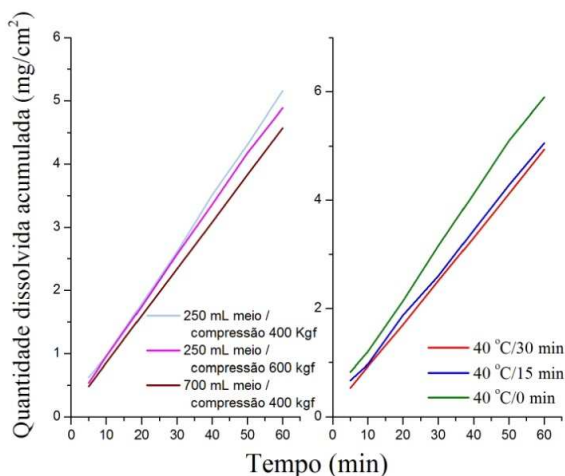


Figura 14 - Resultado gráfico da VDI de FUR conforme os parâmetros de compressão da pastilha, volume de meio e manutenção em estufa (análise em C18, tampão fosfato 5 mM pH 6,8 a 37 °C; doseamento por CLAE – UV).

A molaridade do tampão fosfato selecionado foi diminuída a fim de evitar solubilização elevada da pastilha. Surpreendentemente, a FUR demonstrou-se estável no meio por 24 horas, tanto em soluções recobertas com papel alumínio em geladeira e temperatura ambiente (recuperação de 99,5 %, DPR = 0,4 %, e 101,1 %, DPR = 1,1 %, de recuperação de FUR, respectivamente), quanto em soluções desprotegidas da luz em geladeira e temperatura ambiente (recuperação de 101,5 %, DPR = 0,2 %, e 100,6 %, DPR = 0,4 %, de recuperação de FUR, respectivamente). O efeito protetor que soluções alcalinas, como o NaOH presente no tampão, exercem sobre a estabilidade fotolítica de

FUR já foi destacado no desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por CLAE.

Os estudos preliminares realizados permitiram definir os parâmetros experimentais para estudos de dissolução de FUR (Tabela 8). Destaca-se que a solubilidade de equilíbrio de FUR assegurou a manutenção do sistema dentro das condições *sink* durante o período de realização dos ensaios, com valor de solubilidade de  $592,4 \pm 11,2$   $\mu\text{g/mL}$  de FUR após 24 horas sob agitação ( $37 \pm 0,5$  °C).

Tabela 8 - Parâmetros experimentais definidos para o método de dissolução intrínseca de Furosemda

Parâmetro	Detalhamento
Massa amostra	100 mg
Compressão	400 kgf / 0,5 cm <sup>2</sup>
Volume do meio	250 mL
Tempo de armazenagem em estufa 40 °C	15 minutos
Rotação	75 rpm
Temperatura do banho	$37,0 \pm 0,5$ °C
Meio de dissolução	Tampão fosfato 5 mM pH 6,8 (pH ajustado com NaOH 5 mol/L); degaseificado
Volume coletado	5 mL (com reposição)
Tempo de ensaio	60 minutos
Ensaio de quantificação	CLAE, coluna Waters X-Bridge C18 (100 x 4,6 mm, partícula de 5 $\mu\text{m}$ ) e fase móvel isocrática de tampão fosfato 50 mM pH 4:acetonitrila (70:30, v/v), fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 15 $\mu\text{L}$ , detecção em 232 nm.

Após definidos os parâmetros experimentais, a validação prosseguiu tendo por base a metodologia proposta. A Figura 15 mostra os cromatogramas dos *formers* NIC e CAF utilizados nos experimentos de cocristalização, em comparação com o cromatograma característico para FUR. Não foi verificada interferência na eluição do fármaco.

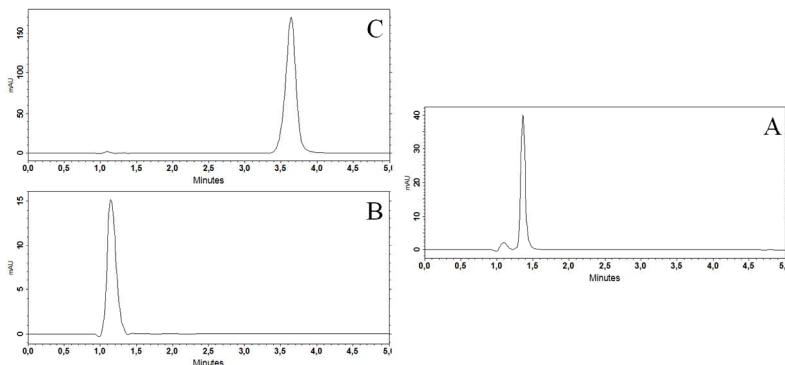


Figura 15 - Cromatogramas relativos à cafeína (A), nicotinamida (B) e furosemida (C) [Coluna C18, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (70:30, v/v) sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm].

A curva de calibração obtida a partir da avaliação da linearidade está representada na Figura 16.

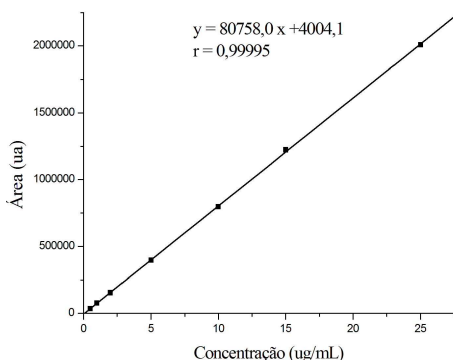


Figura 16 - Representação gráfica da curva de calibração de FUR SQR por CLAE [Coluna C18, fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (70:30, v/v) sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm].

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que soluções de FUR SQR diluídas no meio de dissolução apresentam correlação linear entre a área dos picos e a concentração das soluções, conforme Tabela 9. Estes experimentos possibilitaram a determinação dos Limites de Quantificação (LQ) e de Detecção de FUR (LD) para o método em 0,23  $\mu\text{g/mL}$  e 0,07  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Todos os ensaios de dissolução foram analisados dentro da faixa de concentração definida.

Tabela 9 - Resultados da curva analítica obtida pelo método dos mínimos quadrados para o método indicativo de estabilidade.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,5 - 25,0 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 80758,0x + 4004,1$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$80758,0 \pm 715,6$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$4004,1 \pm 1829,9$
Coefficiente de correlação	0,99995

ANOVA	
Regressão linear	$6,34 \times 10^4 (3,51)^*$
Desvio da linearidade	1,02 (2,66)*

\* Em parênteses F calculado para  $p \leq 0,05$ .

A exatidão do método foi demonstrada pela recuperação de quantidades conhecidas de FUR a partir das cubas de dissolução, sendo recomendados valores entre 95,0 % e 105,0 % (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Foram avaliados três níveis de concentração (2,00 µg/mL, 10,00 µg/mL e 20,00 µg/mL) com recuperações médias de  $104,2 \pm 0,4$  %,  $103,6 \pm 0,9$  % e  $103,6 \pm 1,2$  %, respectivamente. A precisão foi determinada pela avaliação da repetibilidade nas replicatas das soluções submetidas ao teste de exatidão, conforme apresentado em Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados obtidos para a precisão do método de dissolução.

Concentração (µg/mL)	Precisão		
	DPR intra-dia (%)	DPR inter-dia (%)	
Dia 1	2,0	0,45	0,40
Dia 2	2,0	0,59	
Dia 3	2,0	0,13	
Dia 1	100,0	1,00	0,93
Dia 2	100,0	0,71	
Dia 3	100,0	0,10	
Dia 1	200,0	0,14	1,17
Dia 2	200,0	0,03	
Dia 3	200,0	0,28	

Os resultados da validação analítica demonstram que o método de dissolução intrínseca foi considerado exato, específico, linear e preciso.

Tanto o método cromatográfico quanto o método de dissolução foram considerados satisfatórios para a avaliação da velocidade de dissolução intrínseca de FUR em amostras cocrystalinas com NIC e CAF.

### **3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os estudos de estabilidade e validação analítica compreendem etapas fundamentais da acreditação dos ensaios no ambiente farmacêutico. Neste contexto, o presente capítulo apresentou o desenvolvimento e a validação de métodos utilizados em estudos de estabilidade e dissolução de FUR matéria-prima tendo por base as ferramentas analíticas disponíveis no laboratório.

Estudos de estabilidade e análise de produtos de degradação observados nos ensaios de degradação forçada estão em andamento.



**CAPÍTULO III**  
**CRISTALIZAÇÃO DA FUROSEMIDA**

---



## 4 CAPÍTULO III – CRISTALIZAÇÃO DA FUROSEMIDA

### 4.1 INTRODUÇÃO

A cristalização compreende uma etapa crucial no *design* das características de insumos farmacêuticos. Muito além da simples purificação química, a pureza cristalina e as relações polimórficas consistem no foco de muitos estudos atualmente (GARSIDE; DAVEY, 2000; QIAO et al., 2011; BRITAIN, 2012a).

As técnicas mais comuns na indústria farmacêutica compreendem a cristalização a partir de soluções e suas variações metodológicas. Dentre elas, destacam-se a evaporação do solvente, a difusão de solvente/vapor, o gradiente de temperatura e a adição de anti-solvente. Embora diversificadas, estas técnicas apresentam como característica comum a mudança de estado da solução de cristalização dentro do diagrama de fase do sistema. Como princípio geral, a cristalização lenta e os processos de transformação operados sob condições moderadas produzem materiais mais estáveis e cristalinos, bem como as características das partículas obtidas também podem variar (GARSIDE; DAVEY, 2000; PASQUALI; BETTINI; GIORDANO, 2006; BRITAIN, 2009b).

O hábito cristalino dos IFAs, por sua vez, tem ganhado destaque pela influência que exerce em propriedades como a dureza, a densidade, a molhabilidade, a filtrabilidade, a secagem e o processamento em geral. Assim como no controle da forma cristalina, são muitas as variáveis que interferem na reprodutibilidade morfológica lote-a-lote em uma cristalização, dentre elas a supersaturação, a concentração do soluto, a temperatura e a taxa de resfriamento, a utilização de aditivos e a escolha do solvente, as fases existentes no sistema e os processos de semeadura. Desta forma, estudos que melhorem a compreensão destes fenômenos são importantes a fim de obter sistemas particulados de alta qualidade e robustez (BRITAIN, 2009b; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009; LU; LI; JIANG, 2010; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

Dentro deste panorama geral, o presente capítulo objetiva avaliar a influência do processo de cristalização de FUR pura nos sólidos obtidos e no seu desempenho. Além de auxiliar na organização dos experimentos de cocristalização descritos no próximo capítulo, estes ensaios preliminares compreendem estratégias adicionais de *design* farmacêutico e destacam o conjunto de sistemas já avaliados no grupo de pesquisa (BORGMANN et al., 2012; PAULINO et al., 2013).

## 4.2 MATERIAIS

Utilizaram-se matérias-primas fornecidas pela indústria Prati Donaduzzi (X - lote FRM-083040 e teor de 99,47 %) e pela UNIVALI (Y - lote 9064H2RI e teor de 99,99 %), todas originárias na Índia. Os insumos foram armazenados em dessecadores e protegidos da luz.

A substância química referência (SQR) foi adquirida da Farmacopeia Brasileira (lote 1002 e teor de 100,0 % calculado em base seca). A amostra certificada foi armazenada em geladeira, lacrada e protegida da luz.

As recristalizações utilizaram solventes PA, enquanto que para os ensaios de doseamento de FUR por CLAE utilizaram-se solventes de alta pureza (grau cromatográfico).

## 4.3 MÉTODOS

### 4.3.1 Técnica de cristalização

Foram realizadas cristalizações partindo-se de solução saturada do fármaco e seguindo técnicas diversas, conforme Tabela 11.

Tabela 11 - Codificação e descrição dos testes de cristalização.

Código	Proporção de solvente	Proporção de contrassolvente	Condições de cristalização	Condições de processamento final
A	100%	-	Evaporação a 25 °C	Manutenção em estufa 40 °C por 24 horas
B	90%	10%	Repouso por 1 hora	Filtragem e manutenção em estufa 40 °C por 24 horas
C	50%	50%	Repouso por 1 hora	Filtragem e manutenção em estufa 40 °C por 24 horas
D	10%	90%	Repouso por 1 hora	Filtragem e manutenção em estufa 40 °C por 24 horas
E	100%	-	Evaporação a 4 °C	Manutenção em estufa 40 °C por 24 horas

Os solventes utilizados na técnica de adição de anti-solvente miscível obedeceram ao esquema proposto na Figura 17. As amostras que apresentaram maior rendimento foram posteriormente caracterizadas pela sua morfologia e fase cristalina, bem como pela sua *performance*, conforme descrito adiante.

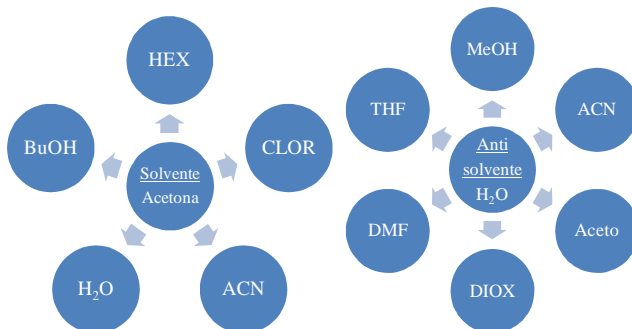


Figura 17 - Esquema representativo dos solventes/anti-solventes utilizados nas recristalizações. BuOH – butanol. HEX – hexano. CLOR – Clorofórmio. ACN – acetonitrila. H<sub>2</sub>O – água. THF – tetrahidrofurano. MeOH – metanol. Aceto – acetona. DIOX – dioxano. DMF – dimetilformamida.

### 4.3.2 Caracterização dos sólidos obtidos

#### 4.3.2.1 Difração de raios X de pó (DRX pó)

Os difratogramas foram obtidos utilizando-se equipamentos de tubo de raios X com ânodo de cobre – CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). No Laboratório de Difração de Raios-X do Departamento de Física – UFSC foi utilizado difratômetro Xpert Pro Multi-Purpose (PanAnalytical) equipado com *spinner* e detector X'Celerator com tecnologia “Real Time Multiple Strip (RTMS)”. O gerador de raios-X foi ajustado para voltagem de 45 kV e corrente de 40 mA. De acordo com a quantidade de material disponível, foram utilizados suportes de amostras de background zero em monocristal de silício e também porta-amostras com cavidade adaptados em suportes de prensagem específicos. Os difratogramas foram coletados de  $4^\circ$  a  $40^\circ$  ( $2\theta$ ) utilizando um passo de  $0,033^\circ$ , tempo 30 segundos. O equipamento também permitiu a realização de medidas em alta temperatura em câmara Aaton Parker HTK 16. As etapas de aquecimento normalmente foram realizadas com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  em atmosfera ambiente, até a temperatura desejada, com etapa de posterior resfriamento na razão de  $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Na Central Analítica do Departamento de Química – UFSC foi utilizado difratômetro D2 Phaser (Bruker) equipado com detector 1-dimensional LYNXEYE. O gerador de raios-X é ajustado para voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA, sem necessidade de sistema de

resfriamento externo. Foram utilizados porta-amostras com cavidade e a coleta de dados ocorreu entre 4 ° to 30 ° (2θ) com passo de 0,091 °/s.

#### **4.3.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)**

O comportamento termoanalítico dos materiais foi analisado por DSC e TG. As curvas de DSC foram obtidas em célula DSC-60 Shimadzu utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados com aproximadamente 2 mg de amostra. Foram realizados ciclos únicos de aquecimento na faixa de temperatura de 40 °C a 300 °C, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. Um cadinho de alumínio vazio selado foi utilizado como referência. O equipamento foi previamente calibrado com índio (ponto de fusão: 156,6 °C, entalpia de fusão = 28,54 J/g) e zinco (ponto de fusão 419,6 °C). A taxa de aquecimento foi definida a partir de estudos prévios a fim de assegurar que o evento de transição polimórfica da FUR em alta temperatura fosse visualizado com tempo de análise otimizado (GIRON, 2002; CRAIG; READING, 2006).

As curvas TG foram obtidas numa termobalança TGA-50 Shimadzu, utilizando cadinho de platina, com aproximadamente 4 mg de amostra. As análises ocorreram na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC).

#### **4.3.2.3 Espectrofotometria no Infravermelho (IV)**

Os espectros de absorção na região do IV com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em equipamento Shimadzu (IR Prestige 21), com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram dispersas em brometo de potássio (KBr) e submetidas à análise entre 400 cm<sup>-1</sup> e 4.000 cm<sup>-1</sup> (AYALA et al., 2006; AALTONEN et al., 2008).

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC).

#### **4.3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A análise da morfologia das amostras foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura em microscópio JEOL JSM-

6390LV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras foram dispersas em fita de dupla face de carbono e a remoção de resíduos e partículas soltas foi feita sutilmente com jato de ar. O recobrimento foi realizado com filme de ouro sobre todo o *stub* porta-amostra. A voltagem de aceleração do feixe primário foi de 10 kV, com resolução de 3 nm (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999).

#### 4.3.2.5 Ensaios de velocidade de dissolução intrínseca (VDI)

A VDI das amostras foi medida conforme descrito no Capítulo II. Utilizou-se aparato de Woods modificado (aparato do disco rotatório) com cavidade de 8 mm de diâmetro (área superficial de 0,5 cm<sup>2</sup>), de acordo com a USP 31 (2008). Aproximadamente 100 mg de amostra foram pesados e compactados em prensa Asta®, utilizando força de 400 kgf. Os ensaios de dissolução foram avaliados com 250 mL de meio (tampão fosfato 5 mM pH 6,8 desgasificado) a 37 ± 0,5 °C e 75 rpm. Aproximadamente 5 mL do meio-teste foram periodicamente retirados (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos), com posterior reposição de mesmo volume de meio. Os ensaios foram feitos em duplicata (LEE; ZHANG; FLANAGAN, 2011; BISWAS, 2012).

O perfil de dissolução das amostras foi avaliado conforme capítulo II, utilizando-se aparato pá. Excesso de amostra em pó (500 mg) foi adicionado a 250 mL de meio (tampão fosfato 5 mM pH 6,8 desgasificado) ambientado em 37 ± 0,5 °C e com rotação de 75 rpm. Aproximadamente 5 mL do meio-teste foram periodicamente retirados (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos), com posterior reposição de mesmo volume de meio. As alíquotas foram filtradas em papel filtro quantitativo (0,45µm de poro) e diluídas até concentrações apropriadas para a leitura em CLAE, conforme dados de linearidade do capítulo II. Os ensaios foram feitos em duplicata (BISWAS, 2012).

A concentração de FUR nos ensaios de dissolução foi avaliada por CLAE, conforme também descrito no Capítulo II, baseando-se no teor de FUR indicado para cada amostra. Utilizou-se coluna Waters X-Bridge C18 (100 x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e fase móvel isocrática composta por tampão fosfato 50 mM pH 4:acetonitrila (70:30, v/v) com fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 15 µL e a detecção compreendeu o comprimento de onda de 232 nm.

De acordo com análises estatísticas, foram calculados a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual das taxas de dissolução das amostras. A fim de avaliar a igualdade das variâncias e das médias, foram realizados os

testes de Bartlett e de ANOVA, respectivamente. Comprovando-se a diferença entre as medidas, os dados foram submetidos ao teste de Tukey a fim de comparar as amostras entre si e identificar a diferença real existente entre as médias. Adotou-se nível de significância de 5 % (OTTO, 2007) (Microsoft Office Excel 2007).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização primária de matérias-primas compreende uma importante etapa do controle de qualidade em Farmácia. Devido à correlação dos efeitos biofarmacêuticos com as propriedades físico-químicas, há um grande interesse na caracterização destes insumos, principalmente em ensaios de pré-formulação (CARSTENSEN, 2001). No caso do presente trabalho, o conhecimento a respeito do sistema polimórfico envolvendo a FUR demonstrou ser importante por embasar as futuras tentativas de cocristalização.

Em primeira etapa, amostra comercial de FUR matéria-prima fornecida por indústria farmacêutica foi caracterizada. Observou-se por DRX que a forma polimórfica da amostra compreendia o polimorfo 1 (Figura 18). Este dado corrobora com o estudo de Babu et. al (2010), o qual também determinou que este compreende o polimorfo disponível comercialmente na Índia. A ocorrência freqüente do polimorfo 1 é influenciada pela sua maior estabilidade sólida em relação às outras estruturas cristalinas de FUR.

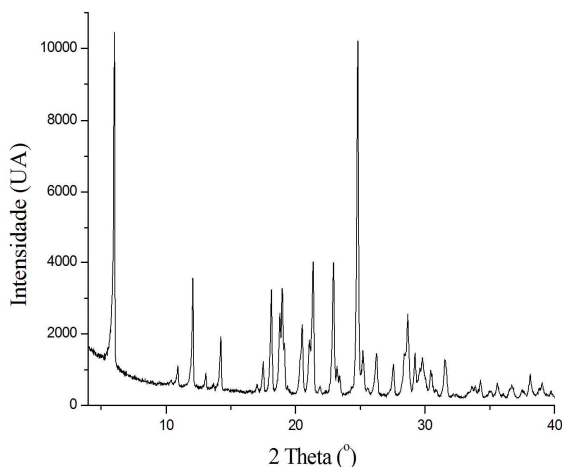
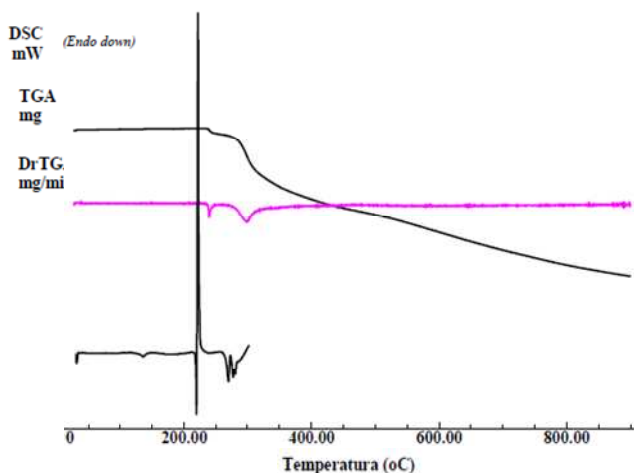


Figura 18 - Resultado da análise por DRX da amostra FUR matéria-prima.



Neste sentido, a caracterização inicial da amostra utilizando câmara de alta temperatura acoplada com DRX também possibilitou a identificação de transição polimórfica entre o polimorfo 1 e o polimorfo estável em alta temperatura. Esta demonstrou ser uma reação reversível pela análise DSC, caracterizando uma relação enantiotrópica entre as fases. De acordo com a Figura 19, a matéria-prima de FUR apresentou duas endotermas, uma em 135,9 °C ( $\Delta H = 1,08$  J/g) e outra em 219,5 °C, características da transição cristalina e da fusão, respectivamente. Além disso, a fusão demonstrou ser sucedida por reação exotérmica drástica característica da decomposição do fármaco (MATSUDA; TATSUMI, 1990; BABU et al., 2010). Acredita-se que a variação do conteúdo amorfo e de defeitos microcristalinos nas amostras esteja relacionada com as variações observadas na resolução das duas reações e na temperatura/entalpia de fusão da FUR nas amostras estudadas (GIRON, 2002; MITTEMEIJER; SCARDI, 2004). No que se refere ao comportamento termogravimétrico, o fármaco apresentou um primeiro evento de perda de massa definido em 240,2 °C ( $\Delta m = 3,64$  % m/m), bem como um segundo evento iniciado em 286,8 °C e que se estende até o final da análise .

Figura 19 - Resultado da análise por DSC/TG de FUR matéria-prima.



A análise do espectro no IV da amostra revelou a presença de bandas características de grupamentos sulfonamida, amina e ácido carboxílico, todas favoráveis à análise discriminatória de interações

supramoleculares no sólido (Figura 20) (MATSUDA; TATSUMI, 1990; PAVIA, 2009; SCHULTHEISS; NEWMAN, 2009; BABU et al., 2010).

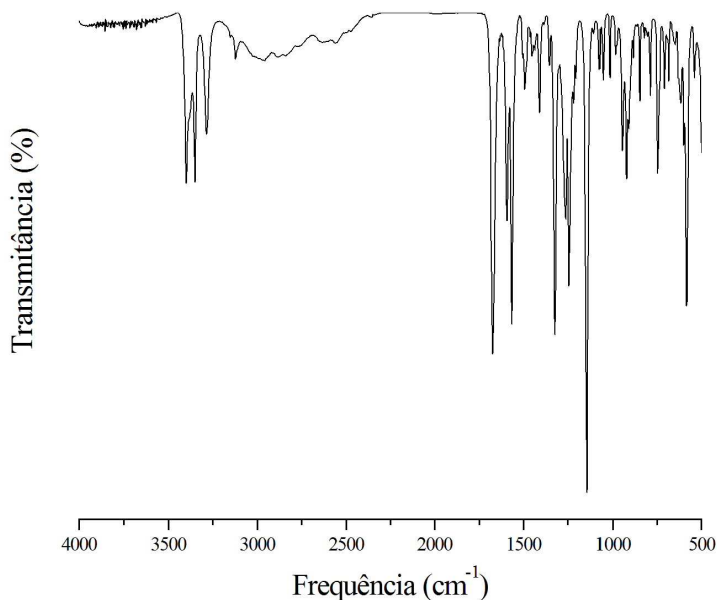


Figura 20 - Resultado da análise por espectroscopia no IV da amostra FUR matéria-prima.

No caso da FUR, a associação destas interações e a conformação diferenciada das moléculas no estado sólido são responsáveis pelas diferenças entre os polimorfos do fármaco (BABU et al., 2010). Com relação aos estudos de *screening* de modificações sólidas de FUR, destaca-se o trabalho de Matsuda e Tatsumi (1990). Embora antigo, ele norteou as primeiras cristalizações do presente trabalho pela amplitude de experimentos realizados, pelas técnicas de caracterização utilizadas e pelo número de materiais obtidos. Entretanto, a investigação preliminar não foi bem sucedida na obtenção de formas sólidas puras de FUR, além do polimorfo 1. As diferenças observadas nos materiais obtidos entre os trabalhos são muito comuns quando se estuda cristalização de fármacos. Isso se deve principalmente ao fato de muitas condições não serem relatadas e controladas durante os experimentos. Dentre elas destacam-se as condições de umidade, o aparato de recristalização, o volume de solução recristalizada, as condições de supersaturação e a taxa de

evaporação (BARKSKY et al., 2007; LANCASTER et al., 2007; BERNSTEIN, 2011; LEE; ERDEMIR; MYERSON, 2011).

Além de divergências nas formas cristalinas obtidas, foi verificado que a morfologia, o tamanho de partícula e a homogeneidade dos sólidos, quando se tratava de um mesmo polimorfo, também variaram conforme o método de recristalização (Figura 21). Entretanto, nenhum trabalho na literatura avaliava a influência do hábito cristalino nas propriedades de FUR matéria-prima.

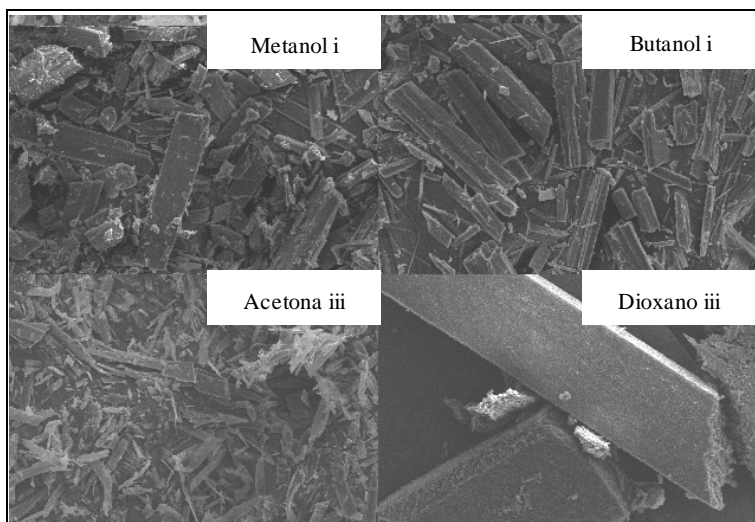


Figura 21- Resultados preliminares da análise por MEV de amostras de FUR recristalizadas conforme condições propostas por Matsuda e Tatsumi (1990) – (i) evaporação lenta de solvente quente; (iii) adição de pequena quantidade de água em solução orgânica quente. \*Aumentos de 200 vezes.

Neste sentido, idealizou-se estudo sistemático da cristalização de FUR a fim de determinar as relações existentes entre os parâmetros de cristalização, as variantes sólidas das amostras e os perfis e taxas de dissolução. Após a cristalização, os sistemas propostos que se demonstraram viáveis pela relação rendimento *versus* quantidade de solvente orgânico utilizado, foram selecionados para estudos de caracterização. A lista de materiais está representada na Tabela 12.

Tabela 12 - Descrição das amostras selecionadas para caracterização. Os elementos C e D estão relacionados com a metodologia utilizada (proporção dos solventes)

<b>Código</b>	<b>Sistema de cristalização / Origem da amostra</b>
1	Acetona:Hexano C
2	Acetona:Hexano D
3	Acetona:Clorofórmio C
4	Acetona:Clorofórmio D
5	Acetona:Acetonitrila C
6	Acetona:Acetonitrila D
7	Metanol:Água C
8	Metanol:Água D
9	Acetonitrila:Água C
10	Acetonitrila:Água D
11	Dioxano:Água C
12	Dioxano:Água D
13	Acetona:Água C
14	Acetona:Água D
15	Dimetilformamida:Água D
16	Acetona:Butanol D
17	Tetrahidrofurano:Água D
18	Acetonitrila A
19	Acetonitrila E
20	Metanol A
21	Metanol:Água B
22	Matéria-prima comercial fornecedor X
23	Matéria-prima comercial fornecedor Y

As primeiras análises comparativas das amostras envolveram a sua avaliação morfológica (Figura 22). As fotomicrografias demonstraram variações no tamanho e na morfologia cristalina, o que tornou necessária a análise dos dados em diferentes aumentos. Dentre as particularidades observadas, as amostras 7, 11 e 13 se apresentaram na forma de blocos muito grandes, candidatos à cominuição, mas que neste trabalho foram tomados como controles para a influência do tamanho nos estudos de *performance*.



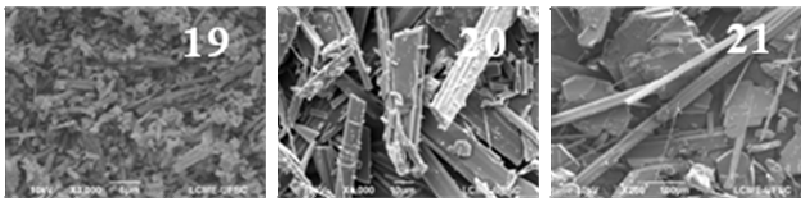


Figura 22 - Fotomicrografias eletrônicas das amostras de 1 – 21. Os aumentos apresentam-se variados: 5.000 vezes (amostra 2), 4.000 vezes (amostras 1, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 17), 3.000 vezes (amostras 18, 19), 1.000 vezes (amostras 8, 9, 10, 12, 20), 300 vezes (amostra 11), 200 vezes (amostras 13, 21) e 50 vezes (amostra 7).

Observou-se a tendência de obtenção de partículas mais finas, menores e irregulares nos sistemas envolvendo a acetona, o tetrahydrofurano e a dimetilformamida como solventes (1 – 6, 14, 15 e 17). Particularmente, o aspecto destas partículas pode refletir mecanismos de cristalização em que os fenômenos cinéticos dominam o crescimento cristalino. Esta hipótese é suportada pela alta solubilidade de FUR nestes solventes. Embora todos os outros experimentos também tenham partido de soluções saturadas de FUR, as características dos experimentos em acetona, tetrahydrofurano e dimetilformamida levam a crer que estes sistemas apresentam diagramas de fase com zonas de metaestabilidade mais estreitas. Nestes casos, a velocidade de crescimento dos cristais é elevada e existem muitos pontos de nucleação, o que favorece o rendimento da reação, mas demonstra difícil controle externo do processo (GARSIDE; DAVEY, 2000). Acredita-se que o mesmo fenômeno é observado nas amostras obtidas a partir do resfriamento rápido de solução de FUR em acetonitrila (19).

Já a análise dos demais sistemas revelou a predominância de fenômenos de formação de partículas de “equilíbrio” com minimização da energia livre superficial. Isso ocorre geralmente em sistemas que apresentam zonas de metaestabilidade mais amplas em suas curvas de solubilidade. De forma prática, a quantidade de anti-solvente adicionada nestes experimentos parece não ter proporcionado ambientes com sobressaturação demasiadamente elevada, possibilitando a ocorrência de taxas de cristalização mais lentas. Além das influências oriundas da cinética da cristalização, a natureza diversa dos solventes pode ter favorecido o crescimento de algumas faces cristalinas, em detrimento de outras (GARSIDE; DAVEY, 2000).

A análise das matérias-primas comerciais revela uma diferença grande no tamanho das partículas, as quais se apresentaram diminutas na

amostra 23 (Figura 23). O aspecto dos materiais revela heterogeneidade na distribuição do tamanho das partículas, especialmente para a matéria-prima 22.

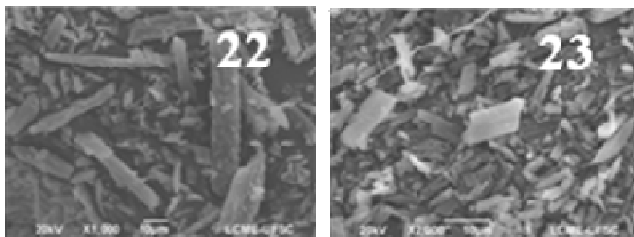
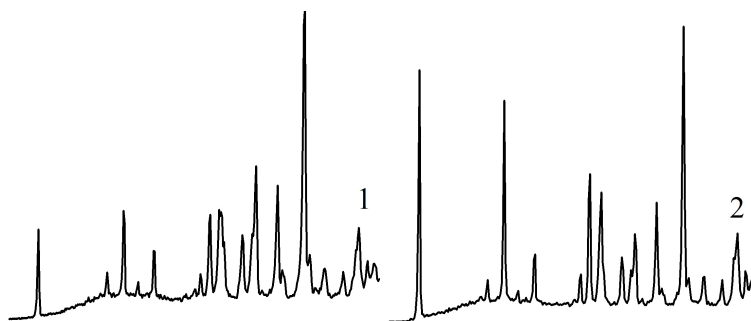
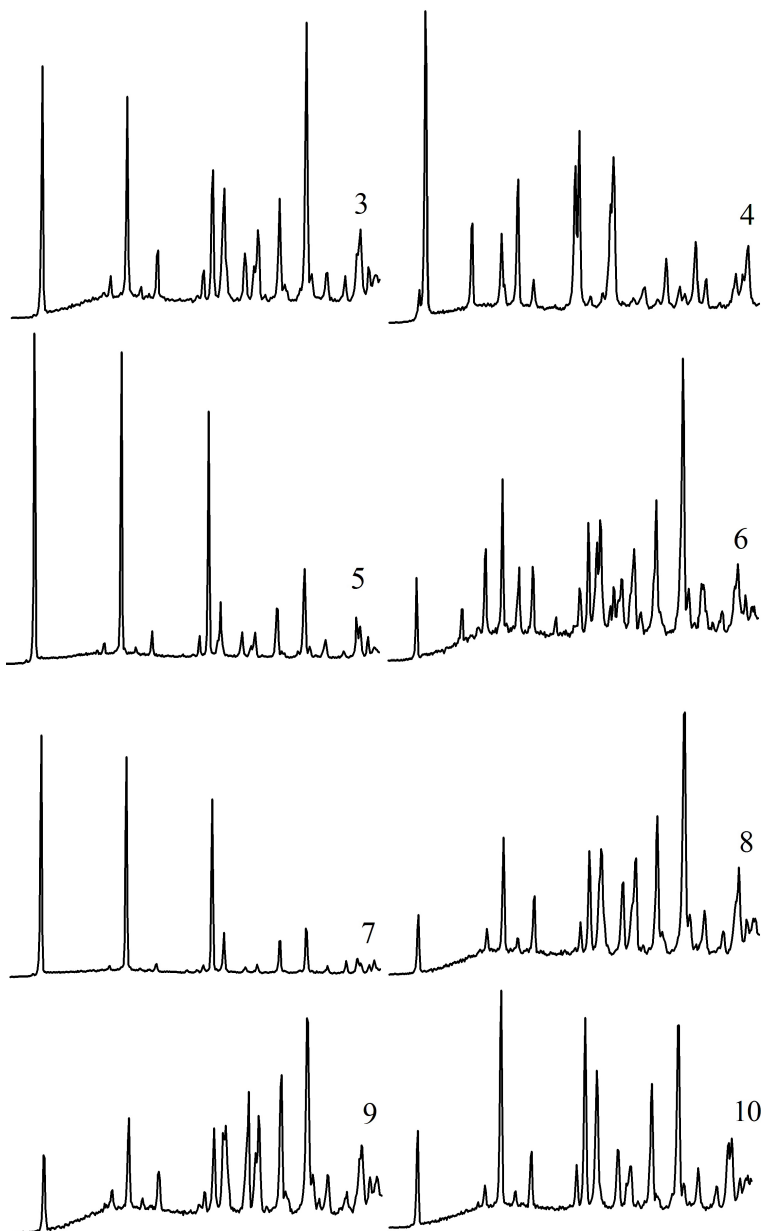


Figura 23 - Fotomicrografias eletrônicas das matérias-primas 22 e 23. Os aumentos apresentam-se variados: 2.000 vezes (amostra 22), 1.000 vezes (amostra 22).

Da mesma forma, alguns recristalizados apresentaram certa heterogeneidade no tamanho e também na morfologia das partículas. Entretanto, além dos aspectos cinéticos envolvidos no crescimento cristalino, estas características são de interpretação complexa quando também está envolvida a cristalização de diferentes polimorfos. As análises por DRX demonstraram que as amostras 4, 16, 18, 20 e 21 apresentam mistura de fases (Figura 24). Aparentemente não foram verificadas correlações entre as formas polimórficas e as condições de cristalização controladas durante os experimentos.

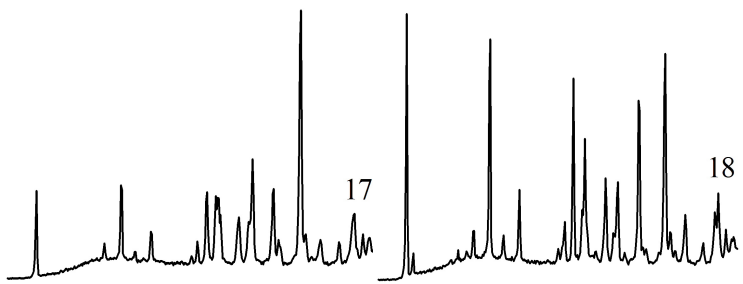
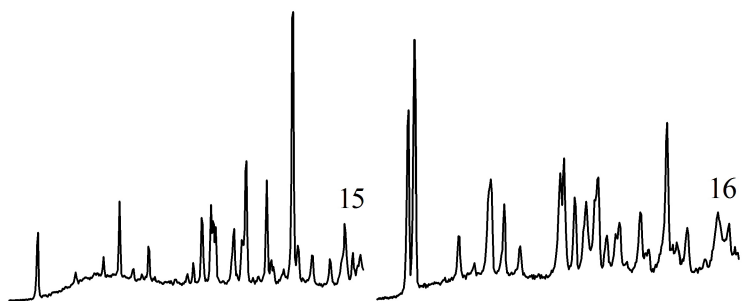
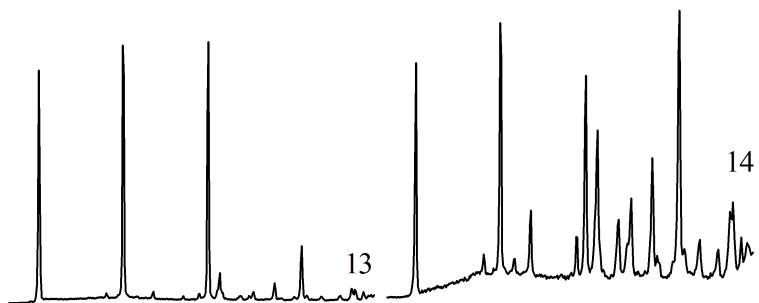
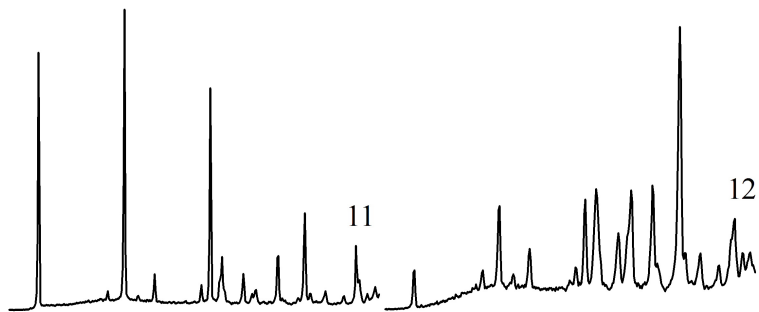


*(Continua na próxima página)*



*(Continua na próxima página)*





*(Continua na próxima página)*

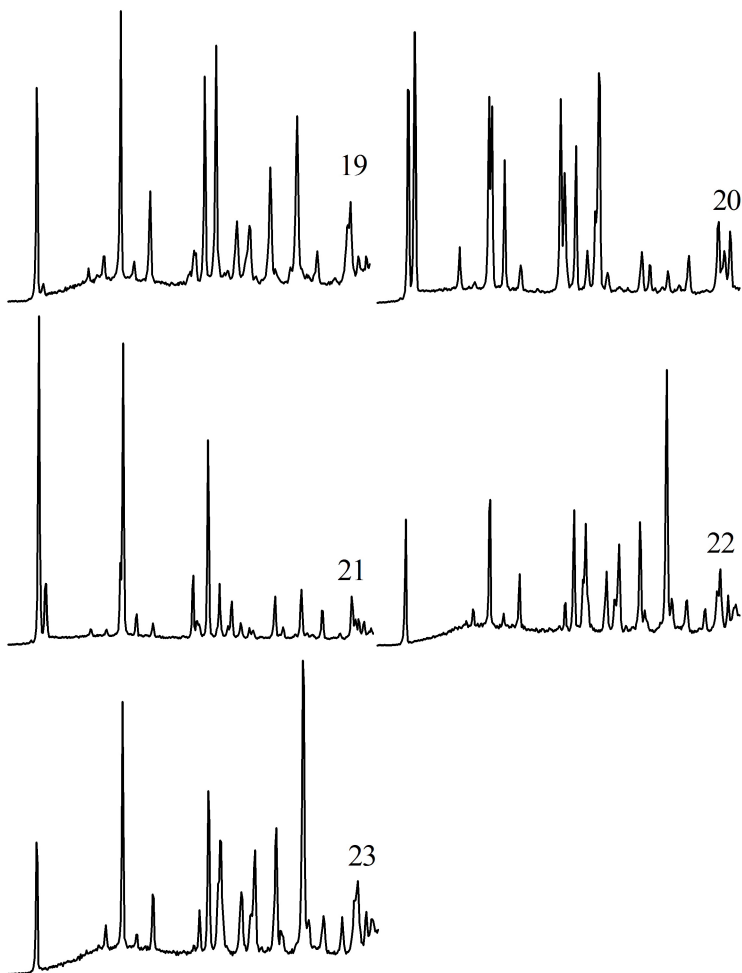


Figura 24 - Resultado da análise por DRX de amostras de FUR recristalizadas a partir de diferentes sistemas. \*A escala de intensidades NÃO é equivalente entre as amostras. A fim de evidenciar o efeito de textura, a reflexão mais intensa foi tomada como escala máxima. \* Medidas entre 4 – 30 ° (2 Theta).

Conforme foi sugerido inicialmente, os ensaios por DRX demonstraram a prevalência do polimorfo 1 nas amostras obtidas por cristalização e nas matérias-primas comerciais, embora algumas amostras tenham apresentado diferenças de cristalinidade. Além disso, verificaram-se fenômenos de orientação preferencial principalmente nas reflexões localizadas em 6,03°, 12,08 ° e 18,20 ° theta, as quais estão

associadas aos planos 010, 020 e 030/20-1, respectivamente. Este efeito normalmente ocorre em materiais que apresentam hábitos cristalinos altamente assimétricos e que tendem a adotar uma mesma orientação quando processados ou comprimidos (FUJII et al., 2009). No caso dos sistemas de cristalização de FUR, os sistemas que apresentaram características de textura mais pronunciadas foram aqueles que utilizaram menores quantidades de anti-solvente ou condições de evaporação lenta na cristalização. Acredita-se que estas condições tenham favorecido cineticamente o crescimento dos cristais principalmente ao longo do eixo b de coordenadas.

Esta caracterização inicial permitiu organizar as amostras conforme a Tabela 13.

Tabela 13 - Conjunto de informações obtidas a partir da análise por MEV e DRX das amostras. O elemento \* caracteriza o polimorfo predominante.

<b>Amostra</b>	<b>Forma cristalina</b>	<b>Orientação preferencial</b>	<b>Partículas</b>
1	1		Irregulares
2	1	✓	Irregulares
3	1	✓	Irregulares
4	1 + 3*		Aciculares
5	1	✓	Irregulares
6	1		Irregulares
7	1	✓	Irregulares grosseiras
8	1		Colunares
9	1		Colunares
10	1		Colunares finas
11	1	✓	Irregulares grosseiras
12	1		Irregulares
13	1	✓	Irregulares grosseiras
14	1	✓	Irregulares
15	1		Irregulares
16	1* + 3		Aciculares + Placas
17	1		Irregulares finas
18	1* + 3	✓	Irregulares
19	1	✓	Irregulares
20	1 + 3		Aciculares + Placas
21	1* + 3	✓	Aciculares + Colunares
22	1		Irregulares
23	1		Irregulares

Além destes estudos de caracterização, foi também avaliada a *performance* dos materiais. Enquanto que o perfil de dissolução revela a influência do estado global da matéria-prima frente à exposição ao meio, a VDI expressa o impacto da forma sólida na taxa de dissolução, excluídos os efeitos de área superficial e tamanho de partícula. Neste sentido, a VDI de uma determinada amostra pode apresentar variações influenciadas pela sua cristalinidade, pela existência de orientação preferencial, pelo tipo de estrutura cristalina e pela molhabilidade, dentre outros fatores (BYRN; PFEIFFER; STOWELL, 1999; BARTOLOMEI et al., 2006; BRITTAIN, 2009b). Desta forma, percebe-se que a variabilidade física das amostras de FUR recristalizadas pode tornar a interpretação dos resultados de dissolução complexos, como verificado a seguir.

A análise primária do perfil de dissolução dos sólidos revelou a existência de, basicamente, três comportamentos distintos entre as amostras: um grupo que alcançou índices de dissolução mais elevados (i – representado em azul no gráfico) e outros dois grupos que alcançaram processo de dissolução intermediário de forma rápida (ii – representado em preto no gráfico) ou mais lentamente (iii – representado em vermelho no gráfico) (Figura 25).

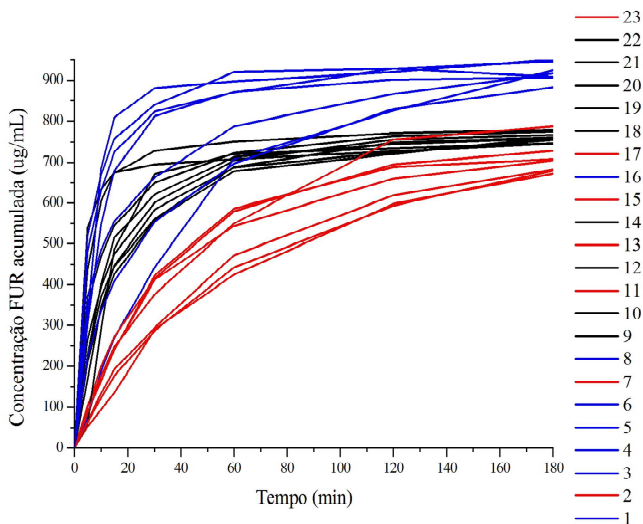


Figura 25 - Resultado gráfico do perfil de dissolução das amostras separadas em grupos (análise em tampão fosfato 5 mM pH 6,8 a 37 °C; doseamento por CLAE – UV).

Dentro do grupo i, foram identificadas amostras que atingiram o platô de concentração máxima em aproximadamente 1 hora (1, 3, 5, 6 e 8), enquanto que outras apresentaram amplitudes de dissolução equivalentes apenas após 3 horas (4, 5 e 16). Esta característica também foi verificada dentro do grupo ii, no qual as amostras 20 e 22 apresentaram maior rapidez na dissolução. As amostras recristalizadas em acetona tiveram comportamento semelhantes.

Destaca-se ainda que as amostras caracterizadas como misturas polimórficas apresentaram transformações de fase do polimorfo 3 para o polimorfo 1 durante as análises. O mesmo foi verificado por DRX e corroborou com os dados da literatura.(BABU et al., 2010).

Os dados de dissolução intrínseca estão representados na Tabela 14, em associação com os valores de concentração máxima dissolvida nos estudos de perfil em 3 horas de ensaio.

Tabela 14 - Dados de dissolução intrínseca das amostras comparados com os dados de solubilidade de equilíbrio máxima em 3 horas de ensaio de perfil de dissolução.

Amostras	Equação da reta	r	VDI (mg/cm <sup>2</sup> .min)	Solubilidade equilíbrio (µg/mL)
1	$y = 0,0657x + 0,9650$	0,9998	0,0657	904,5
2	$y = 0,0530x + 0,2655$	0,9987	0,0530	788,0
3	$y = 0,0647x + 0,6399$	0,9980	0,0647	945,6
4	$y = 0,0618x + 0,2286$	0,9989	0,0618	916,9
5	$y = 0,0541x + 0,1692$	0,9995	0,0541	883,6
6	$y = 0,0502x + 0,8664$	0,9883	0,0502	908,2
7	$y = 0,0680x + 0,1423$	0,9999	0,0680	680,3
8	$y = 0,0586x + 0,1737$	0,9999	0,0586	950,5
9	$y = 0,0602x + 0,1366$	0,9998	0,0602	755,3
10	$y = 0,0560x + 0,1525$	0,9997	0,0560	746,0
11	$y = 0,0563x + 0,0465$	0,9999	0,0563	728,3
12	$y = 0,0617x + 0,4832$	0,9984	0,0617	758,9
13	$y = 0,0566x + 0,1274$	0,9997	0,0566	683,1
14	$y = 0,0589x + 0,1633$	0,9998	0,0589	761,3
15	$y = 0,0527x + 0,2013$	0,9995	0,0527	704,8
16	$y = 0,0503x + 0,9260$	0,9963	0,0503	924,5
17	$y = 0,0604x + 0,0562$	0,9999	0,0604	672,7
18	$y = 0,0584x + 0,0788$	0,9999	0,0584	775,8
19	$y = 0,0560x + 0,0671$	0,9999	0,0560	767,1
20	$y = 0,1061x + 1,1185$	0,9986	0,1061	779,4
21	$y = 0,0636x + 0,2992$	0,9999	0,0636	760,9
22	$y = 0,0624x + 0,2514$	0,9998	0,0624	745,0
23	$y = 0,0661x + 0,0665$	0,9999	0,0661	707,8

Dentre os resultados, destaca-se o comportamento da amostra 20, a qual demonstrou não ser fidedignamente avaliada pelo método proposto, tendo em vista sua baixa compressibilidade. Verificou-se que logo após o procedimento de compressão na pastilha utilizada para a VDI, a amostra apresentava expansão de volume a ponto de perder parte de um *capping* durante a dissolução. Surpreendentemente, as respostas obtidas durante os ensaios para a amostra 20 resultaram em gráfico linear; entretanto, este resultado não apresenta aplicabilidade real. Já no que se refere à amostra 6, não foi possível estabelecer uma correlação linear entre os pontos do gráfico de dissolução para as replicatas.

A avaliação por ANOVA das taxas de dissolução intrínseca entre todos os materiais revelou diferenças significativas entre os dados. Tendo em vista a heterogeneidade das amostras, considerou-se agrupá-las de acordo com as semelhanças que demonstraram por DRX e prosseguir com a análise estatística. A classificação realizada compreendeu os seguintes grupos: (A) amostras caracterizadas como polimorfo 1, com cristalinidade semelhante e que não apresentaram textura; (B) amostras caracterizadas como polimorfo 1, com cristalinidade semelhante e que apresentaram textura; (C) amostras caracterizadas como polimorfo 1, que não apresentaram textura, mas que apresentavam reflexões de base alargada e pouco intensas; (D) amostras caracterizadas como misturas polimórficas de FUR. Entretanto, não foi estabelecida similaridade estatística dentro destes grupos avaliados (Tabela 15).

Tabela 15 - Dados da análise estatística das médias da taxa de dissolução intrínseca das amostras (nível de significância de 5 %).

<b>DADOS</b>	<b>ANOVA</b>	
Entre todas as amostras	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>
	212,50	2,07
Entre grupo A	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>
	85,96	3,18
Entre grupo B	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>
	32,78	6,39
Entre grupo C	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>
	884,20	9,28
Entre grupo D	<i>F calculado</i>	<i>F crítico</i>
	77,05	19,00

Dentre os resultados obtidos, destaca-se o comportamento das amostras compreendidas no grupo iii do ensaio de perfil de dissolução.

Dentre as amostras que compreendem este grupo estão aquelas citadas anteriormente como referência para características irregulares e elevados tamanhos de partícula (7, 11 e 13). Surpreendentemente, estas amostras apresentaram perfil de dissolução semelhante às amostras de tamanho diminuto, como a 2, a 15 e a 17, bem como a matéria-prima 23. Acredita-se que o baixo desempenho das amostras seja oriundo do efeito de atração de partículas muito pequenas. Esta característica é muito citada na redução do tamanho de partícula de fármacos lipossolúveis, na qual costuma ocorrer aglomeração das partículas com diminuição da área superficial efetiva e, conseqüentemente, das propriedades de dissolução (IKEGAMI et al., 2003; PIETSCH, 2003; YASUJI; TAKEUCHI; KAWASHIMA, 2008). Tendo em vista que as taxas de dissolução intrínseca para as amostras foram menores para 2 e 15 e maiores para 17 e 23 (em relação ao grupo total de amostras), pode ser que existam efeitos concorrentes entre as características de aglomeração e a microestrutura dos materiais. Entretanto, ensaios adicionais necessitam ser realizados, principalmente porque as variações na VDI das amostras são pequenas em amplitude quando analisadas comparativamente a outros estudos realizados no nosso grupo de pesquisa (KUMINEK et al., 2013; PAULINO et al., 2013).

#### **4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Dentre as baterias de cristalização realizadas, observou-se grande heterogeneidade entre as amostras, ressaltando a importância da caracterização de IFAs. A análise comparativa dos perfis e das taxas de dissolução permitiu estabelecer que as características relativas às partículas são as que influenciam a dissolução dos insumos em maior extensão. Entretanto, sugere-se a existência de um conjunto de variáveis complexas da microestrutura atuando sobre o desempenho das amostras, destacando-se os efeitos associados de molhabilidade, cristalinidade, estrutura cristalina e transformações sólidas.





**CAPÍTULO IV**  
**COCRISTALIZAÇÃO DA FUROSEMIDA**

---



## 5 CAPÍTULO IV – COCRISTALIZAÇÃO DA FUROSEMIDA

### 5.1 INTRODUÇÃO

Além do design cristalino de fármacos puros, a cocristalização também representa uma modificação sólida viável para o melhoramento das propriedades físicoquímicas de matérias-primas farmacêuticas. Durante a etapa de *screening* de cocristais normalmente os *formers* são selecionados tendo em vista a presença de *synthons* supramoleculares característicos e/ou tamanhos e formas específicas para a inserção em sistemas cocristalinos (SCHULTHEISS; HENCK, 2012; THAKURIA et al., 2012). Diversas técnicas tem sido utilizadas na obtenção destes sólidos, como as reações em soluções líquidas tradicionais por evaporação ou resfriamento do solvente e adição de anti-solvente, a cristalização em gel; a utilização de fluido supercrítico, os métodos de cristalização de alto desempenho utilizando sistemas robotizados; a nucleação laser-induzida, a cristalização em capilares e a heteronucleação via filmes poliméricos, (BAG; PATNI; REDDY, 2011; GAGNIERE et al., 2011; MALAJ et al., 2011). Somado a estas técnicas, as reações livres de solvente via moagem demonstram ser promissoras (FRIŠČIĆ; JONES, 2012; JAMES et al., 2012; BOWMAKER, 2013).

Além de apresentar fácil implementação industrial e ser ambientalmente sustentável, a moagem é caracterizada por fornecer uma grande variedade de formas cristalinas. Isso ocorre pela possibilidade da utilização de diferentes associações e proporções fármaco:*former* e da obtenção de polimorfos de cocristais. Assim como o cuidado demandado pela manipulação de formas polimórficas clássicas, cocristais de mesma composição apresentando estruturas cristalinas diversas devem ser caracterizados e estudados principalmente com relação à sua estabilidade, relações termodinâmicas e modos de obtenção (HORST; CAINS, 2008; JAMES, S. L. et al., 2012; LEUSEN; KENDRICK, 2012).

Neste sentido, o presente capítulo abrange o *screening* e a caracterização de cocristais de FUR via moagem. O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira utilizou dois sistemas já conhecidos de cocristais de FUR visando compreender as variáveis envolvidas na moagem, a influência da utilização de solventes durante o processo mecânico e o efeito que as condições de armazenamento têm sobre os materiais obtidos. Foram selecionados para LAG solventes apresentando diferentes propriedades e polaridades, enquanto que os *formers* escolhidos compreenderam a cafeína (CAF) e a nicotinamida (NIC). A

segunda etapa utilizou a moagem com posterior aquecimento como método de análise preliminar da afinidade entre os compostos e suas relações estruturais supramoleculares em sistemas de cocristalização utilizando *formers* diversos. Todos os *formers* utilizados nos experimentos são descritos no Quadro 7, sendo que suas estruturas foram previamente apresentadas no capítulo I.

Quadro 7 - Relação dos *formers* avaliados no presente trabalho.

<i>Formers</i> estudados	
Ácido oxálico	Ácido p-aminobenzóico
Ácido succínico	Ácido nicotínico
Ácido fumárico	Nicotinamida
Ácido cítrico	Ácido ascórbico
Ácido tartárico	Alantoína
Uréia	Cafeína
Ácido benzóico	Teofilina
Ácido salicílico	Sacarina

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Cristalização

A moagem foi avaliada em moinho de facas e moinho de bolas no Departamento de Física (UFSC), os quais estão demonstrados na figura 26. Na sequência, os experimentos foram realizados em moinho SPEX Dual Mixer Mill® conforme experiências prévias. Utilizaram-se recipientes do mesmo fabricante em alumina (modelo 8003), aço endurecido (modelo 8001) e aço inoxidável (modelo 8007). Inicialmente, a Furosemida foi moída por 3 horas nos cadinhos 8003 e 8007, seguindo a relação bola/pó (BPR) de 1,6 e 3,2 respectivamente.



Figura 26 - Fotografias do moinho de bolas (esquerda) e do moinho de facas (direita).

Amostras foram avaliadas preliminarmente e permitiram definir os parâmetros de moagem descritos a seguir:

- Recipientes: cadinhos de aço (8001 e 8007).
- Quantidade de mistura fármaco/*former*: 2,5 gramas.
- Proporção fármaco/*former*: 1:1 (n/n) molar.
- Quantidade de bolas: 1 unidade.
- Relação em massa bola/pó: 3,2.
- Tempo de moagem: 4 horas.

A proporção molar (n = número de mol) costuma ser o modo de descrever as misturas utilizadas nas moagens, tendo em vista a equivalência supramolecular desejada. Por isso, a proporção em massa (m/m) fármaco/*former* é variável dependendo da massa molar destes insumos. Estes parâmetros têm influência no teor de fármaco no material.

Com relação à técnica de moagem, neste trabalho a grande maioria dos *formers* foi submetida a moagem com FUR em ensaios a seco a fim de investigar o efeito energético da moagem sobre a cocristalização dos materiais e deduzir relações estruturais e de afinidade com FUR. Além disso, CAF e NIC foram escolhidos para realização de experimentos de moagem e armazenamento diferenciados. Nestes casos, foram realizadas moagens a seco e assistidas por solventes.

Em relação à LAG, acrescentou-se à mistura FUR:*former* pequenas quantidades de fase líquida (1 mL). Os solventes foram escolhidos de acordo com sua estrutura e polaridade, de modo a explorar o maior número de grupos de solventes capazes de interagir de formas distintas com os materiais sólidos. Assim, utilizaram-se os seguintes solventes: água, metanol, acetonitrila, acetona e dioxano. As amostras obtidas nestes ensaios são descritas no Quadro 8.

Quadro 8 - Relação das amostras obtidas por moagem de FUR com CAF/NIC.

Modo de moagem	Associação fármaco: <i>former</i>	
	FUROSEMIDA	
	Nicotinamida	Cafeína
A seco	<i>FUR:NIC seco</i>	<i>FUR:CAF seco</i>
LAG em água	<i>FUR:NIC água</i>	<i>FUR:CAF água</i>
LAG em metanol	<i>FUR:NIC metanol</i>	<i>FUR:CAF metanol</i>
LAG em acetonitrila	<i>FUR:NIC acetonitrila</i>	<i>FUR:CAF acetonitrila</i>
LAG em acetona	<i>FUR:NIC acetona</i>	<i>FUR:CAF acetona</i>
LAG em dioxano	<i>FUR:NIC dioxano</i>	<i>FUR:CAF dioxano</i>

## 5.2.2 Caracterização dos sólidos obtidos

### 5.2.2.1 Difração de raios X de pó (DRX pó)

Os difratogramas foram obtidos utilizando-se equipamentos de tubo de raios X com ânodo de cobre –  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ). No Laboratório de Difração de Raios-X do Departamento de Física – UFSC foi utilizado difratômetro Xpert Pro Multi-Purpose (PanAnalytical) equipado com *spinner* e detector X'Celerator com tecnologia “Real Time Multiple Strip (RTMS)”. O gerador de raios-X foi ajustado para voltagem de 45 kV e corrente de 40 mA. De acordo com a quantidade de material disponível foram utilizados suportes de amostras de background zero em monocristal de silício e também porta-amostras com cavidade adaptados em suportes de prensagem específicos. Os difratogramas foram coletados de  $4^\circ$  a  $40^\circ$  ( $2\theta$ ) utilizando um passo de  $0,0067^\circ$ , tempo 30 segundos. O equipamento também permitiu a realização de medidas em alta temperatura em câmara Aaton Parker HTK 16. As etapas de aquecimento normalmente foram realizadas com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  em atmosfera ambiente, até a temperatura desejada, com etapa de posterior resfriamento na razão de  $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Alguns ensaios adicionais foram realizados utilizando-se taxas de aquecimento de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ , os quais serão destacados no texto.

Na Central Analítica do Departamento de Química – UFSC foi utilizado difratômetro D2 Phaser (Bruker) equipado com detector 1-dimensional LYNXEYE. O gerador de raios-X foi ajustado para voltagem de 30 kV e corrente de 10 mA, sem necessidade de sistema de resfriamento externo. Foram utilizados porta-amostras com cavidade e a coleta de dados ocorreu entre  $4^\circ$  to  $40^\circ$  ( $2\theta$ ), com passo de  $0,091^\circ/\text{s}$ .

### 5.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

O comportamento termoanalítico dos materiais foi analisado por DSC e TG. As curvas de DSC foram obtidas em célula DSC-60 Shimadzu utilizando cadinhos de alumínio hermeticamente fechados com aproximadamente 2 mg de amostra. Foram realizados ciclos únicos de aquecimento na faixa de temperatura de  $40^\circ\text{C}$  a  $300^\circ\text{C}$ , sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio ( $50 \text{ mL}/\text{min}$ ) e razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Um cadinho de alumínio vazio selado foi utilizado como referência. O equipamento foi previamente calibrado com índio (ponto de fusão:  $156,6^\circ\text{C}$ , entalpia de fusão =  $28,54 \text{ J}/\text{g}$ ) e zinco (ponto de

fusão 419,6 °C). A taxa de aquecimento foi definida a partir de estudos prévios a fim de assegurar que o evento de transição polimórfica da FUR em alta temperatura fosse visualizado com tempo de análise otimizado (GIRON, 2002; CRAIG; READING, 2006).

As curvas TG foram obtidas numa termobalança TGA-50 Shimadzu, utilizando cadinho de platina, com aproximadamente 4 mg de amostra. As análises ocorreram na faixa de temperatura de 25 °C a 600 °C, sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC).

### **5.2.2.3 Espectrofotometria no Infravermelho (IV)**

Os espectros de absorção na região do IV com transformada de Fourier (FT-IR) foram obtidos em equipamento Shimadzu (IR Prestige 21), com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram dispersas em brometo de potássio (KBr) e submetidas à análise entre 400 cm<sup>-1</sup> e 4.000 cm<sup>-1</sup> (AYALA et al., 2006; AALTONEN et al., 2008).

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC).

### **5.2.2.4 Espectrofotometria Raman**

Os espectros de espalhamento Raman foram obtidos em equipamento PeakSeeker 785 (RAM – PRO – 785), dotado de detector CCD (“charge-coupled device”) refrigerado e com resolução de 6 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas sobre lâminas de vidro sem manipulação especial, em temperatura ambiente, e focalizadas em microscópio com lente objetiva de 4x e diâmetro do feixe de laser de 2 µm. Os espectros foram analisados com radiação de 785 nm e potência de 300 mW, na faixa de 200 cm<sup>-1</sup> a 1800 cm<sup>-1</sup> (AYALA et al., 2006; AALTONEN et al., 2008).

As análises foram realizadas no Departamento de Física (UFSC). As amostras avaliadas por espalhamento Raman apenas compreenderam FUR:CAF e FUR:NIC (seco e em LAG) recém processadas por moagem.

### 5.2.2.5 Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A análise da composição elementar das amostras foi avaliada por espectrometria de energia de raios-X acoplado a microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-6390LV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras foram dispersas em fita de dupla face de carbono e a remoção de resíduos e partículas soltas foi feita sutilmente com jato de ar. O recobrimento foi realizado com filme de ouro sobre todo o *stub* porta-amostra. A voltagem de aceleração do feixe primário foi de 15 kV, com resolução de 3 nm.

A investigação da contaminação das amostras pelos recipientes de moagem utilizou a análise de mapas composicionais de raios-X pelo fenômeno de dispersão de energia (EDX - “Energy-Dispersive X-ray detection”, ou EDS - “Energy-Dispersive X-ray Spectrometer”) (GOLDSTEIN et al., 2003). Os mapas foram construídos a partir de seis coletas pontuais e aleatórias nas amostras selecionadas. As amostras foram escolhidas a fim de contemplar a influência de cada um dos solventes em moagem assistida e dos *formers* em moagem a seco, sendo discriminadas na sequência: FUR:NIC seco, FUR:CAF seco, FUR:NIC água, FUR:NIC acetonitrila, FUR:NIC acetona, FUR:NIC metanol e FUR:NIC dioxano.

### 5.2.2.6 Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI)

A VDI das amostras foi medida conforme descrito no Capítulo II. Utilizou-se aparato de Woods modificado (aparato de disco rotatório) com cavidade de 8 mm de diâmetro (área superficial de 0,5 cm<sup>2</sup>), de acordo com a USP 31 (2008). Aproximadamente 100 mg de amostra foram pesados e compactados em prensa Asta®, utilizando força de compressão de 400 kgf. Os ensaios de dissolução foram avaliados com 250 mL de meio (tampão fosfato 5 mM pH 6,8 degaseificado) a 37 ± 0,5 °C e 75 rpm. Aproximadamente 5 mL do meio-teste foram periodicamente retirados (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos), com posterior reposição de mesmo volume de meio. Os ensaios foram feitos em duplicata (LEE; ZHANG; FLANAGAN, 2011; BISWAS, 2012).

A concentração de FUR nos ensaios de dissolução foi avaliada por CLAE, conforme também descrito no Capítulo II, baseando-se no teor de FUR indicado para cada amostra. Utilizou-se coluna Waters X-Bridge C18 (100 x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e fase móvel isocrática composta por tampão fosfato 50 mM pH 4:acetonitrila (70:30, v/v) com



fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 15 µL e a detecção compreendeu o comprimento de onda de 232 nm.

De acordo com análises estatísticas, foram calculados a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual das concentrações e das taxas de dissolução das amostras. A fim de avaliar a igualdade das variâncias e das médias foram realizados os testes de Bartlett e de ANOVA, respectivamente. Comprovando-se a diferença entre as medidas, os dados foram submetidos ao teste de Tukey a fim de comparar as amostras entre si e identificar a diferença real existente entre as médias. Adotou-se nível de significância de 5 % (Microsoft Office Excel 2007) (OTTO, 2007).

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC).

#### **5.2.2.7 Estudos de estabilidade**

Para avaliar a estabilidade da FUR frente a condições de estresse fotolítico e sob temperatura e umidade controladas, foram adotados sistemas propostos na literatura (ICH, 1996; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999; SINGH; BAKSHI, 2000; BAKSHI; SINGH, 2002); ICH 2003).

Nas condições de temperatura e umidade controladas, as amostras processadas por moagem foram submetidas a dois diferentes sistemas: (i) armazenamento em estufa dentro de dessecadores equilibrados com solução saturada de NaCl para ambiente de  $75 \pm 1$  % UR /  $40 \pm 1$  °C; e (ii) armazenamento em temperatura ambiente dentro de dessecadores contendo sílica para ambiente de baixa UR e  $25 \pm 2$  °C. As condições foram controladas por termohigrômetros certificados. Os tempos de análise das amostras foram: (i) 0 dias, 7 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias; e (ii) 0 dias e 90 dias. Em geral, as análises das amostras coletadas envolveram CLAE, DRX pó, MEV, espectrofotometria no IV e DSC/TG.

Da mesma forma, avaliou-se a estabilidade química das amostras frente à exposição à luz UV no comprimento de onda de 254 nm. As amostras processadas foram dispersas em placas e colocadas em câmara de luz UV 254 nm com paredes espelhadas, por 15 dias. O acompanhamento da degradação FUR foi realizado pela análise por CLAE de alíquotas coletadas em 0 dias, 2 dias, 7 dias e 15 dias.

A concentração de FUR nas amostras submetidas a condições de degradação forçada foi expressa de acordo com dois parâmetros distinto.

O “teor do material” leva em consideração a proporção massa:massa de fármaco e *former* no sólido processado e expressa a quantidade de FUR em relação à mistura total. Já o “teor de FUR” expressa a quantidade de FUR observada em relação ao teor esperado de FUR no material. No caso das misturas FUR:CAF e FUR:NIC, o teor dos materiais compreende 64 % (m/m) e 72 % (m/m), respectivamente.

A quantificação das amostras utilizou método de quantificação indicativo de estabilidade por CLAE, conforme descrito no Capítulo II. O método envolveu coluna Phenomenex C8 (150 x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e eluição em formato gradiente de fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4:acetonitrila em proporções variáveis e fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a detecção compreendeu o comprimento de onda de 232 nm.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Avaliação preliminar do sistema

Em um primeiro momento, estudos preliminares foram conduzidos utilizando-se técnicas tradicionais de cocristalização em solução e cocristalização em gel, entretanto, não foi obtido sucesso nas tentativas realizadas. Avaliando-se os artigos publicados por Babu et al. (2011) e Goud et al. (2012), verificou-se que a cocristalização de FUR em solução apenas foi possível após processamento prévio por moagem em gral e pistilo. Estes indícios estimularam a investigação da moagem automatizada como ferramenta no *screening* de cocristais de FUR e no entendimento dos processos envolvidos nestes sistemas.

Os testes preliminares utilizando moagem foram conduzidos em moinho de bolas (recipiente de alumina) e moinho de facas com o sistema-modelo FUR:NIC. Esta escolha foi baseada na disponibilidade de matérias-primas na época dos ensaios e serviu para a definição dos parâmetros dos experimentos posteriores.

Observou-se por DRX uma amorfização muito mais drástica dos componentes via moinho de bolas quando em comparação com o moinho de facas (Figura 27). Além disso, o moinho de facas demonstrou-se ineficiente na moagem de materiais muito finos no que concerne a homogeneidade das misturas.

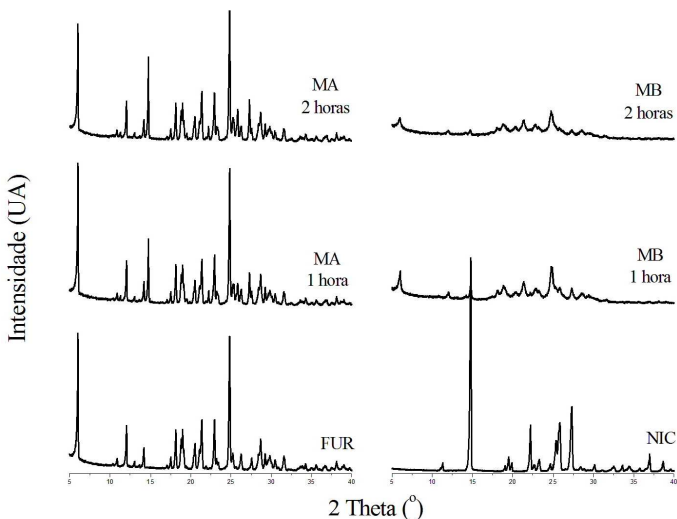


Figura 27 - Difratogramas dos reagentes de partida e das amostras processadas. Furosemida (FUR), nicotinamida (NIC), moagem da mistura FUR:NIC em moinho de facas (MA - esquerda) e em moinho de bolas (MB - direita), após 1 hora e 2 horas de processamento.

Verificou-se que conforme progredia a moagem no moinho de bolas, o aspecto da mistura sólida se modificava com relação à cor e aglomeração, passando de um pó fino e branco para uma espécie de pasta muito amarelada. A análise por CLAE não evidenciou nenhum tipo de degradação do fármaco, sugerindo que estas modificações ocorrem devido à redução do tamanho das partículas ou a outras modificações físicas que estão sob avaliação. Aparentemente nenhuma fase cristalina nova foi observada durante o tempo de moagem, entretanto as expectativas de análise sugeriram avaliar a evolução desta dispersão amorfa após armazenamento e também analisar o efeito da moagem com adição de solventes.

Visando otimizar os experimentos realizados conforme a disponibilidade de recipientes de moagem, avaliaram-se, comparativamente, cadinhos de alumina e aço com apenas uma bola (BPR de 1,6 e 3,2, respectivamente). Verificou-se que a moagem de FUR pura em recipiente de aço e BPR elevada manteve o mesmo padrão de resposta que o outro sistema, exceto pelo fato de que a amorfização foi um pouco mais drástica (Figura 28).

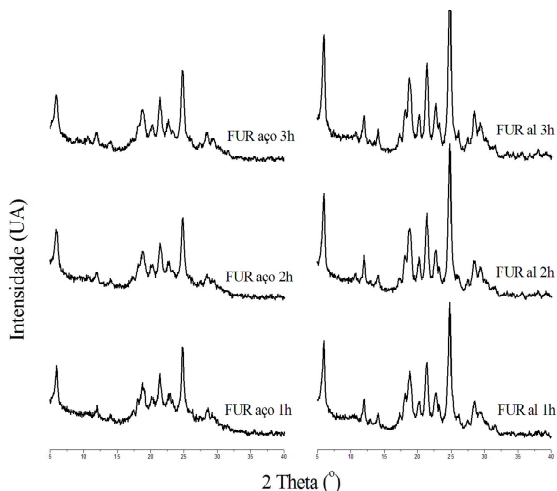


Figura 28 - Difratogramas representando a evolução da moagem de FUR em recipiente de aço (esquerda) e de alumina (direita). Nas representações foi mantida a mesma escala de intensidade.

Ainda no que se refere à padronização dos procedimentos, foram selecionadas primariamente algumas amostras a fim de avaliar a existência eventual de metais pesados oriundos do processo de moagem em recipiente de aço. De acordo com as informações de EDS para as amostras testadas, apenas FUR:CAF seco e FUR:NIC seco apresentaram resíduo de alumínio (0,080 % m/m, e 0,007 % m/m, respectivamente). Além disso, todas as amostras, exceto FUR:NIC obtida por LAG com água, apresentaram rubídio declarado como artefato analítico (0,523 % – 3,003 %).

Após a determinação dos parâmetros de moagem, os insumos utilizados nos experimentos foram previamente caracterizados e acompanhados durante os estudos de estabilidade de modo isolado. A FUR utilizada compreendeu matéria-prima comercial caracterizada como o polimorfo I e condizente com o arquivo FUROSEM 01 do CSD (Anexo 1). Além das variadas formas polimórficas descritas para o fármaco, os *formers* NIC e CAF também podem ter diferentes apresentações, destacando-se os hidratos descritos na literatura (Anexo 1). Desta forma, a análise comparativa dos dados do CSD e dos DRX pô das amostras permitiu definir a estrutura cristalina do *former* CAF como sendo condizente com o arquivo NIWFEE 02, e do *former* NIC como condizente com os arquivos NICOAM 0, 2, 3 e 5 (CSD, 2012).

Os experimentos realizados também permitiram averiguar que, durante o processamento e o armazenamento dos insumos isolados, nenhuma mudança de fase cristalina foi percebida para FUR e NIC nas condições definidas no presente trabalho. Entretanto, para CAF ocorreu uma transformação polimórfica de NIWFEE 02 para NIWFEE 03 logo nos primeiros sete dias de armazenamento em temperatura e umidade controladas (resultados demonstrados no Apêndice 1). Esta instabilidade física da CAF deve ser destacada por inserir um novo elemento de complexidade no sistema de moagem, ou seja, no processamento dos materiais e na análise dos resultados descritos a seguir.

### 5.3.2 Avaliação da moagem a seco *versus* moagem assistida: Sistema Furosemida:Cafeína

A moagem de FUR com CAF levou à obtenção de materiais sólidos diferentes dos insumos de partida e com aspecto muito variado (Figura 29). As análises macroscópicas das amostras revelaram colorações não habituais em matérias-primas farmacêuticas, bem como certa heterogeneidade no sistema FUR:CAF água.

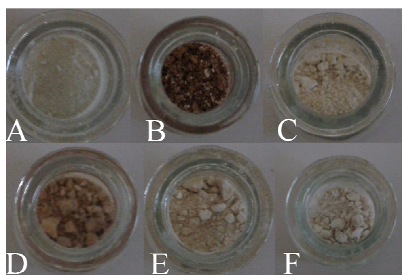


Figura 29 - Fotografias representando o aspecto dos materiais obtidos a partir da moagem de FUR com CAF seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F).

A investigação do perfil cromatográfico dos materiais não identificou características de degradação química. As análises revelaram que as amostras se mantiveram estáveis nas condições de tensão mecânica tendo em vista a ausência de produtos de degradação nas análises (Apêndice 2). Além disso, embora a proporção de FUR e CAF tenha se mantido relativamente constante e condizente com os valores obtidos para a mistura física, o teor de FUR apresentou-se variável nas análises por CLAE (Tabela 16). O fato sugere a presença de solvente

residual nas amostras, destacando-se o baixo teor de FUR nas amostras preparadas por LAG em acetonitrila e em água.

Tabela 16 - Resultados da análise por CLAE das amostras FUR:CAF. O teor esperado para o material compreende 64 % (m/m).

Amostras	Teor do material (%, m/m)	Teor de FUR (%, m/m)	Proporção FUR:CAF (ua/ua)
FUR:CAF MF	63,22	98,77	7,09
FUR:CAF seco	63,19	98,73	6,77
FUR:CAF água	46,71	72,99	6,60
FUR:CAF metanol	59,86	93,57	6,77
FUR:CAF acetonitrila	28,25	44,61	7,46
FUR:CAF acetona	57,72	90,18	6,65
FUR:CAF dioxano	56,19	87,80	6,89

Com relação à avaliação estrutural das amostras, verificou-se por DRX que a moagem a seco resultou em sistema amorfo, enquanto que a moagem assistida com solventes obteve amostras cristalinas coincidentes com o cocristal FUR:CAF reportado na literatura (Figura 30; Anexo 2) (GOUD et al., 2012).

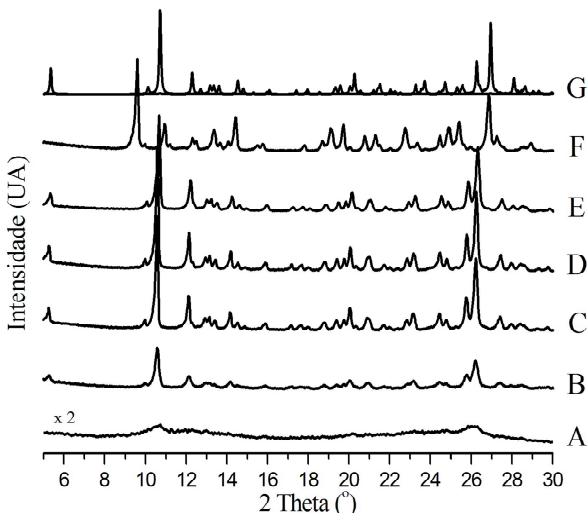


Figura 30 - Resultados das análises por DRX de pó das amostras de FUR com CAF seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). G compreende o padrão de difração calculado para o cocristal FUR:CAF descrito na literatura por Goud et al. (2012).

A única exceção compreendeu a amostra preparada por LAG em dioxano, que apresentou um padrão de difração muito diferente e com reflexões de base alargada. Neste sentido, o cocrystal obtido por LAG em água também apresentou um grau de amorfização mais elevado que os cocrystalais FUR:CAF obtidos por LAG com solventes orgânicos.

Como descrito anteriormente, as diferenças estruturais em cocrystalais são o reflexo de diferentes interações moleculares. Embora apresentem as mesmas moléculas dos insumos isolados, as moléculas de amostras caracterizadas como cocrystalais estão inseridas em ambientes químicos diferenciados dentro do cristal e que podem refletir, por exemplo, diferentes modos de absorção no IV. No caso do sistema FUR:CAF, as amostras foram analisadas principalmente conforme os grupos funcionais existentes nas moléculas de FUR: sulfonamida (estiramento N-H assimétrico em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , estiramento N-H simétrico em  $3285\text{ cm}^{-1}$ , estiramento S-O assimétrico em  $1323\text{ cm}^{-1}$  e estiramento S-O simétrico em  $1144\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico (estiramento O-H em banda alargada entre  $3200\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$  e estiramento C-O em  $1674\text{ cm}^{-1}$ ) e amina secundária (estiramento N-H em  $3350\text{ cm}^{-1}$  e dobramento N-H em  $1592\text{ cm}^{-1}$ ). Já as carbonilas presentes na CAF foram avaliadas pelo estiramento C-O em  $1700\text{ cm}^{-1}$  e em aproximadamente  $1658\text{ cm}^{-1}$ ) (PAVIA, 2009; DESIRAJU, 2011; 2012; GOUD et al., 2012; MORAGUES-BARTOLOME; JONES; CRUZ-CABEZA, 2012).

Os dados obtidos demonstraram modificações nos espectros IV das amostras (Figura 31). Enquanto que a mistura física de CAF com FUR resultou na sobreposição dos espectros característicos para estes insumos, a moagem resultou no surgimento de bandas alargadas e intensas acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , exceto para FUR:CAF seco. Estas bandas são de interpretação complexa, por mascarar outras, e estão relacionadas na literatura com ligações de hidrogênio fortes entre as moléculas ou com solventes (PAVIA, 2009). Desta forma, optou-se por prosseguir a análise dos espectros IV a partir de comprimentos de onda mais baixos.

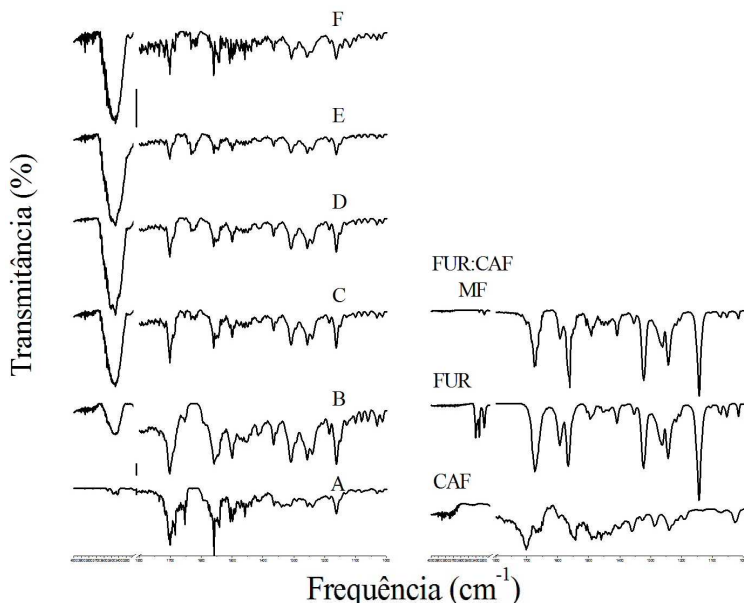


Figura 31 - Resultados das análises no IV das amostras de FUR com CAF seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). Para efeito de comparação, são apresentados os espectros do fármaco e do *former* puros e da sua mistura física.

Para as amostras FUR:CAF seco e LAG em água, metanol, acetonitrila e acetona, ocorreram deslocamentos nas frequências de estiramento C-O ( $1700\text{ cm}^{-1}$ ), de dobramento N-H ( $1633\text{ cm}^{-1}$ ) e de vibrações de estiramento S-O ( $1308\text{ cm}^{-1}$  e  $1162\text{ cm}^{-1}$ ). No caso da amostra FUR:CAF dioxano, foram verificadas modificações semelhantes da absorção no IV, exceto que o estiramento S-O simétrico encontrado apresentou valor de  $1172\text{ cm}^{-1}$ . Além disso, verificou-se que a intensidade das bandas entre  $1800\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$  nas amostras FUR:CAF seco e, principalmente, FUR:CAF dioxano estão bem diminuídas. Este efeito é observado quando existe um alongamento das ligações com diminuição da constante de força de estiramento em amostras que apresentam desordem ou ligações de hidrogênio fortes.

Já a análise dos espectros Raman não possibilitou comparar todos os materiais obtidos, principalmente pelo efeito de luminescência verificado. Este efeito de *background* foi visualizado com mais



intensidade nas amostras que apresentaram menor cristalinidade e está possivelmente relacionado à degradação de FUR mediada pelo laser no momento da medida Raman. Acredita-se que a quantidade de fase amorfa e os defeitos presentes nos materiais moídos aumentem a energia acumulada no sistema e, como consequência, a labilidade do fármaco frente a ativação da luz e calor durante as medidas Raman (GALEENER, 1977; BOLDYREV, 2007).

O comportamento termoanalítico das amostras foi avaliado por DSC/TG, conforme Figura 32. Elas foram caracterizadas como o cocristal FUR:CAF de Goud et al. (2012) e apresentaram evento de fusão em  $219,96 \pm 1,32$  °C, exceto pela amostra obtida por moagem assistida com água, a qual apresentou evento de fusão em 212,05 °C. Esta diferença entre as amostras, bem como entre o valor da temperatura de fusão descrito na literatura ( $T = 225$  °C), está provavelmente relacionada com a cristalinidade dos materiais. Em contrapartida, em todas estas amostras o evento de fusão é sucedido por reação exotérmica característica da degradação da FUR.

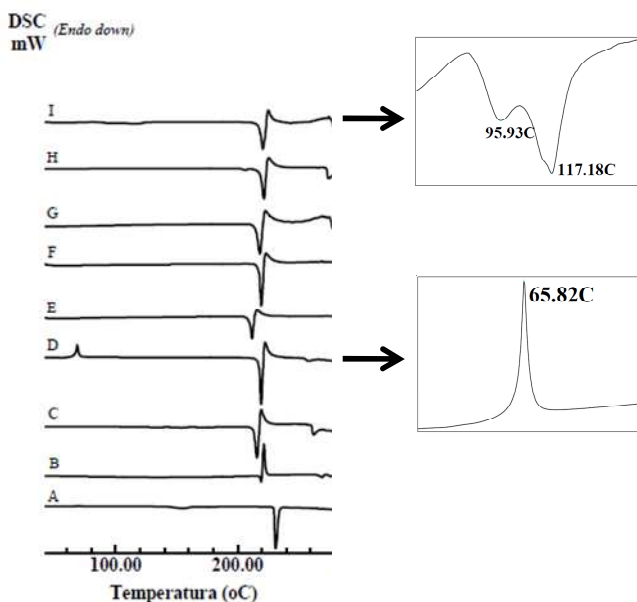


Figura 32 - Resultados e detalhes das análises por DSC das amostras de FUR com CAF seco (D) e no sistema de moagem assistida com água (E), metanol (F), acetonitrila (G), acetona (H) e dioxano (I). A – former. B – FUR. C – mistura física.

No caso das amostras FUR:CAF seco e FUR:CAF dioxano, foram destacados eventos adicionais em resposta ao aquecimento. Em FUR:CAF seco, observou-se ao DSC evento exotérmico irreversível em 65,82 °C. A análise utilizando DRX pó acoplada a câmara de alta temperatura permitiu relacionar este evento com a reação de cristalização na mesma forma cocristalina descrita na literatura e observada na LAG com água, metanol, acetonitrila e acetona (GOUD et al., 2012). Entretanto, o que se percebe é que o aquecimento apenas provocou leve aumento na cristalinidade da amostra, a qual já apresentava reflexões residuais. Após a cristalização, a amostra apresentou evento de fusão característico em 220,05 °C (Figura 33).

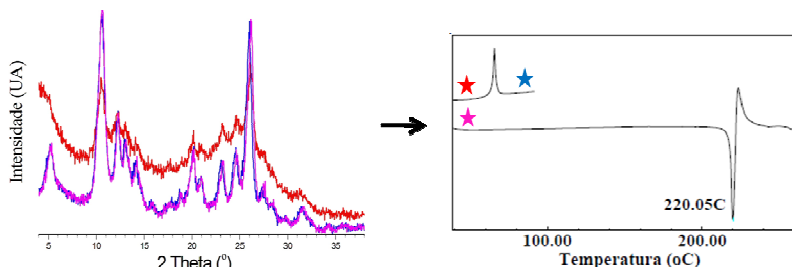


Figura 33 - Resultados da evolução de FUR:CAF seco recém preparado frente o aquecimento (taxa de 10 °C/min). À esquerda estão apresentados os difratogramas antes do aquecimento em 25 °C (vermelho), durante o aquecimento em 100 °C (azul) e após resfriamento em 25 °C (rosa). À direita estão representadas as curvas DSC para a mesma sequência com destaque para pontos equivalentes ao DRX.

Além disso, foram observadas diferentes características nas curvas DSC/TG da amostra FUR:CAF dioxano. Verificaram-se dois eventos endotérmicos não resolvidos em 95,93 °C e 117,2 °C, enquanto que o evento de fusão foi observado em 220,92 °C (Figura 34). A análise termogravimétrica da amostra demonstrou que os eventos próximos a 100 °C são caracterizados por dois eventos de perda de massa também não muito bem resolvidos, um iniciando em 76,0 °C ( $\Delta m = 2,55 \%$ , m/m) e outro iniciando aproximadamente em 127,3 °C ( $\Delta m = 4,49 \%$ , m/m). A associação das características e da temperatura de ocorrência destes eventos às demais análises realizadas, permite propor que esta amostra compreenda um solvato, provavelmente de água ou dioxano, com moléculas de cristalização dispostas em ambientes estruturalmente diversos (BRITTAIN, 2009b; CLARKE et al., 2010; BORGMANN et al., 2012; FRIŠČIĆ, 2012; BOWMAKER, 2013).

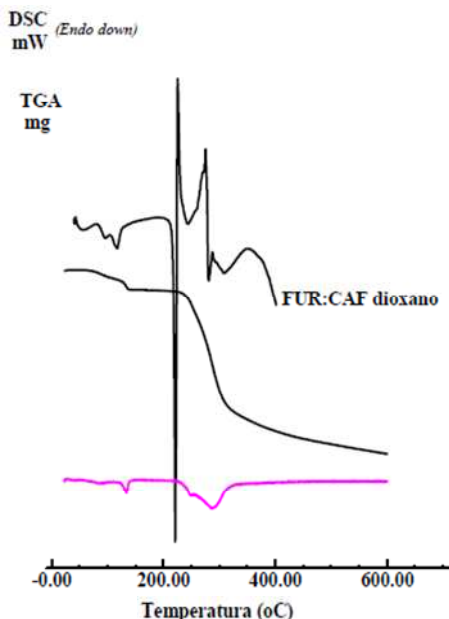


Figura 34 - Resultados da análise da amostra FUR:CAF seco (DSC, TG e TG derivada).

Após esta caracterização inicial, as amostras foram armazenadas em temperatura e umidade controladas (40 °C / 75 % UR). O objetivo destes estudos foi fornecer evidência a respeito do comportamento dos sólidos cristalinos ao longo do tempo, sob a influência de fatores ambientais, em condições aceleradas. Este é um fator importante na avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados com a qualidade de um IFA durante o seu tempo de validade. Além da estabilidade química, a estabilidade física e a análise de transformações de fase compreenderam parâmetros importantes avaliados.

### 5.3.2.1 Armazenamento dos materiais

Além da resposta frente ao aquecimento programado, verificou-se que a umidade também contribuiu para a cocristalização de FUR:CAF seco logo nos primeiros sete dias de exposição. Enquanto isso, quando armazenada em temperatura ambiente e baixa umidade, a amostra manteve características semelhantes ao sólido amorfo recém preparado (Figura 35).

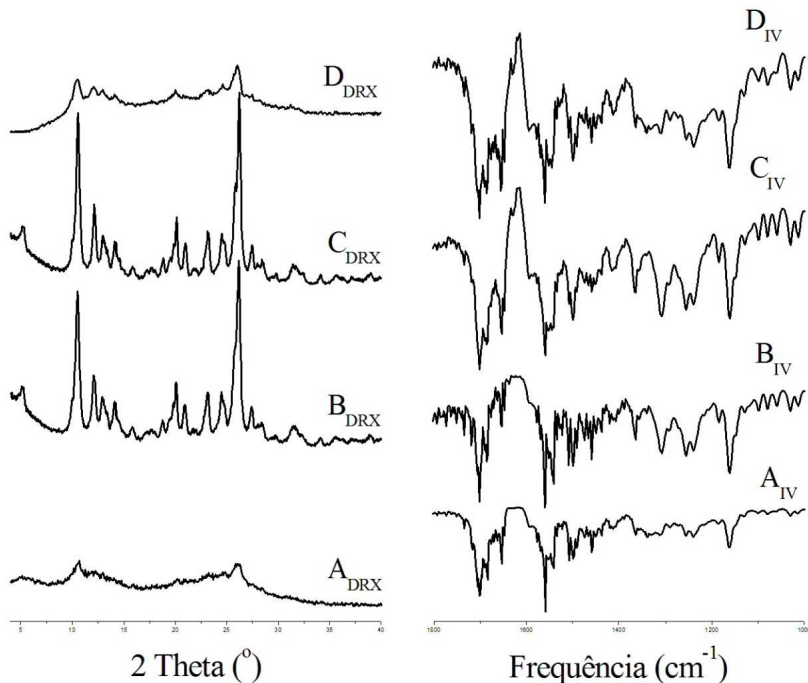


Figura 35 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:CAF seco, armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo sete dias em câmara de umidade. C – tempo 90 dias em câmara de umidade. D – tempo 90 dias em dessecador.

Este fenômeno foi observado claramente por DRX e por DSC. A amostra armazenada em dessecador continuou apresentando na curva DSC evento exotérmico irreversível em 69,21 °C, mas com entalpia de 26,14 J/g. Embora a amostra FUR:CAF seco armazenada em câmara de umidade não gere um sólido de alta cristalinidade, sua análise demonstrou a não ocorrência de eventos exotérmicos de cristalização detectáveis por DSC logo nos primeiros sete dias de armazenamento. Após este período, destaca-se que o sólido manteve suas características com relação à cristalinidade e propriedades térmicas durante os 90 dias de manutenção em 40 °C/75 % UR. A caracterização realizada permitiu identificar a formação do cocrystal reportado primariamente por Goud et. al (2012) (Figura 36).

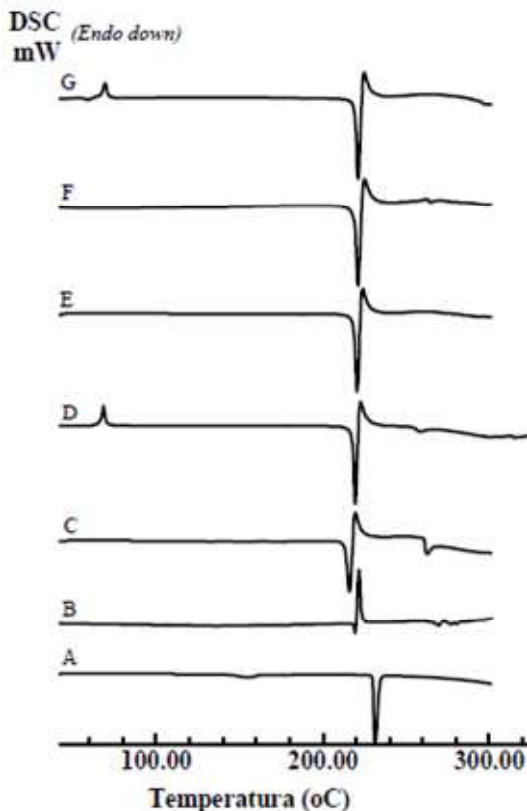


Figura 36 - Resultados das análises de DSC da amostra FUR:CAF seco armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em câmara de umidade. G – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são apresentadas as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).

Da mesma forma, verificou-se a manutenção das propriedades cristalinas e termoanalíticas para as amostras FUR:CAF metanol, acetonitrila e acetona. Este resultado já era esperado, tendo em vista a similaridade cristalina entre elas. Algumas variações foram decorrentes, principalmente, do sutil incremento da cristalinidade por efeito da umidade (Figura 37).

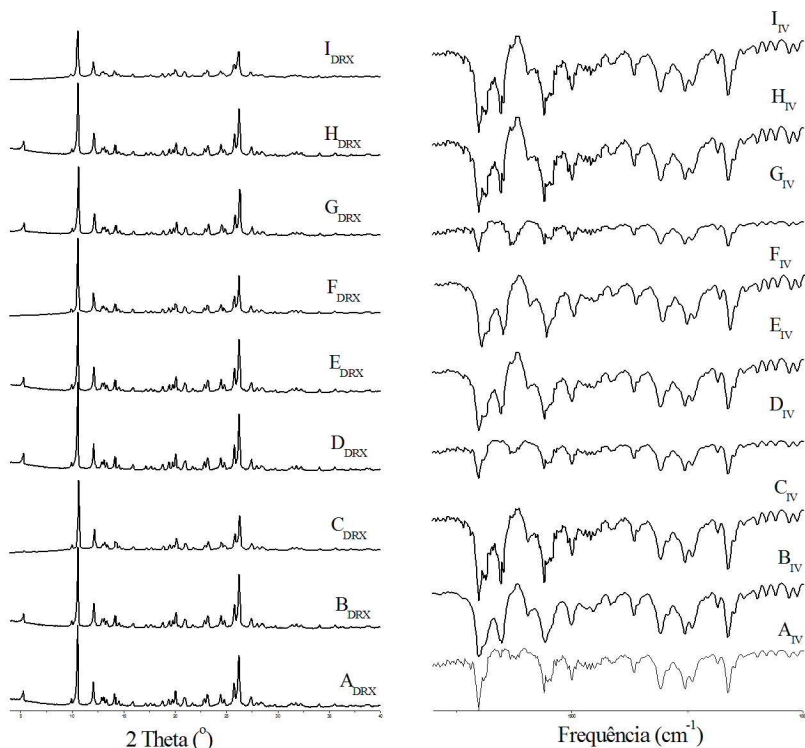


Figura 37 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:CAF metanol, acetonitrila e acetona armazenadas em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – FUR:CAF metanol tempo zero. B – FUR:CAF metanol tempo 90 dias em câmara de umidade. C – FUR:CAF metanol tempo 90 dias em dessecador. D – FUR:CAF acetonitrila tempo zero. E – FUR:CAF acetonitrila tempo 90 dias em câmara de umidade. F – FUR:CAF acetonitrila tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:CAF acetona tempo zero. H – FUR:CAF acetona tempo 90 dias em câmara de umidade. I – FUR:CAF acetona tempo 90 dias em dessecador.

Característica excepcional foi visualizada para a amostra FUR:CAF água armazenada em dessecador ao constatar-se a presença de água adsorvida na amplitude de 12,8 % e evento endotérmico adicional em 102,6 °C com entalpia de 259,54 J/g (Figura 38).

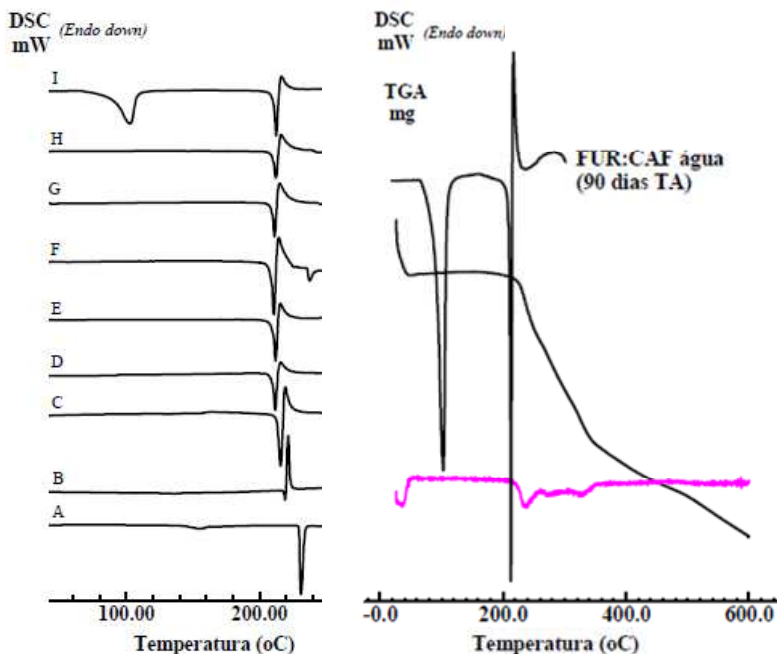


Figura 38 - Resultados do DSC da amostra FUR:CAF água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. À direita destacam-se os resultados da amostra armazenada em temperatura ambiente em dessecador por 90 dias (DSC, TG e TG derivada). D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são apresentadas as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).

Embora a fase cristalina tenha se mantido, acredita-se que a menor cristalinidade da amostra tenha aumentado sua reatividade superficial de modo a favorecer a adsorção de água do ambiente durante a análise e processamento/pesagem da amostra (Figura 39). Entretanto, este material deve ser avaliado mais detalhadamente devido à diferença observada entre a temperatura da perda de massa ao TG e a temperatura do evento endotérmico adicional da curva DSC. Este efeito pode ser decorrente da utilização de cadinho fechado na análise calorimétrica de amostras contendo quantidade elevada de solvente (ROYALL; CRAIG; DOHERTY, 1999; BRITAIN, H. G., 2002; SINGARE et al., 2010).

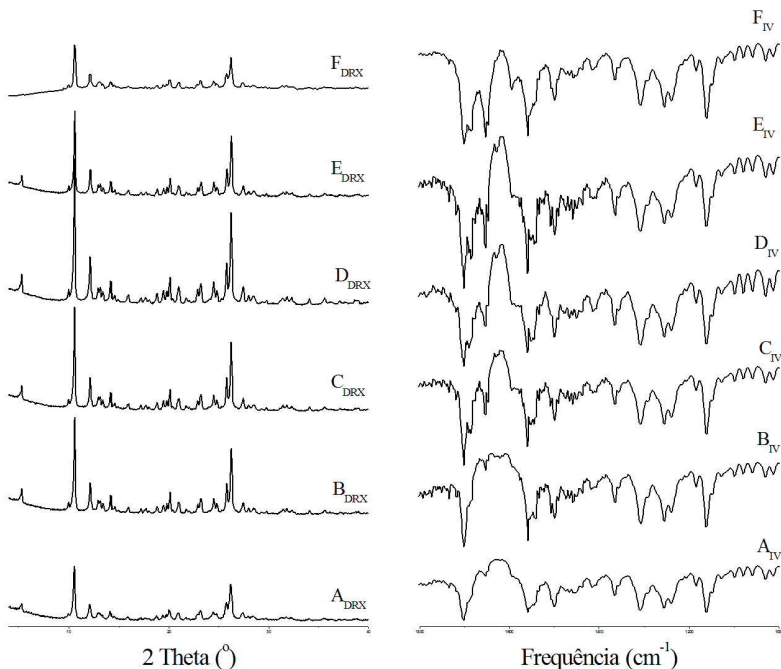


Figura 39 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:CAF água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.

Efeito semelhante de deslocamento também foi verificado na análise das amostras FUR:CAF dioxano, muito embora a diferença entre as técnicas (TG/DSC) tenha sido muito menor (Figura 40). Esta foi a única amostra do sistema de cocristalização com CAF que apresentou fase cristalina diferente do cocristal reportado na literatura, provavelmente um solvato do cocristal. Existem muitos estudos de caracterização de solvatos destacando diversas propriedades, principalmente a labilidade física de alguns sistemas frente a condições ambientais (JAYASANKAR; DAVID; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2007; CHENG; LIN, 2008; JAYASANKAR; ROY; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2010). As análises por DSC/TG demonstraram modificações nos sólidos visto que os eventos endotérmicos com perda de massa próximos a 100 °C não foram mais detectados a partir dos sete primeiros dias de armazenamento em



temperatura e umidade. Já o armazenamento em dessecador resultou na manutenção das características do material, apresentando eventos com perda de massa de 7,2 % em aproximadamente 90 °C e 135 °C, com posterior fusão em 212,8 °C.

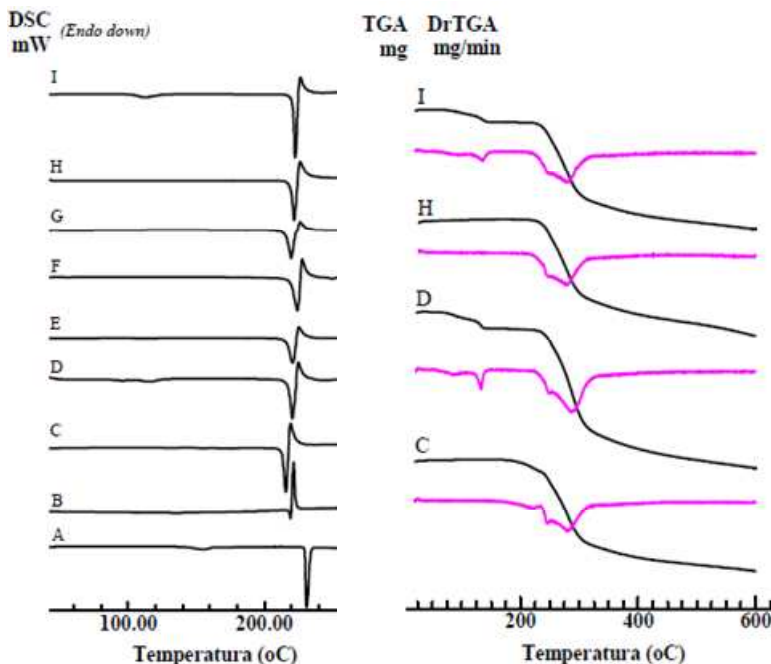


Figura 40 - Resultados do DSC da amostra FUR:CAF dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são apresentados as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).

As análises por DRX confirmaram uma transição estrutural da fase desconhecida FUR:CAF dioxano para o cocristal FUR:CAF de Goud et al. (2012). Entretanto, verificou-se a formação de mistura das fases, detectável até 15 dias de armazenamento em câmara de umidade (Figura 41). Assim como observado na cristalização de FUR:CAF seco amorfo, esta transição sólida também aparenta ser estimulada pelas

condições ambientais, tendo em vista sua ocorrência gradual a partir do armazenamento em câmara de estabilidade, enquanto que noventa dias em dessecador mantiveram as características iniciais da amostra.

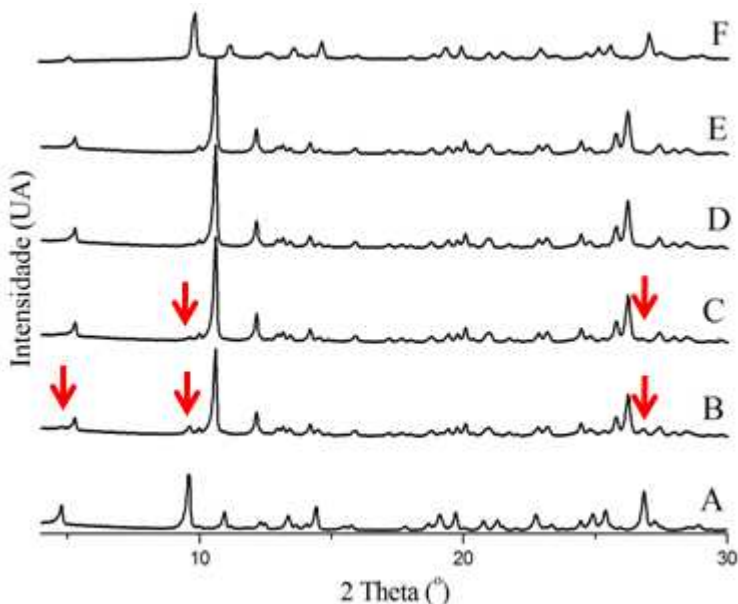


Figura 41 - Resultados das análises por DRX da amostra FUR:CAF dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. São destacadas as reflexões remanescentes da fase desconhecida em função do tempo de armazenamento. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.

Assim como os difratogramas, os espectros no IV das amostras FUR:CAF dioxano também evidenciaram diferenças entre as amostras nas diferentes coletas (Figura 42).

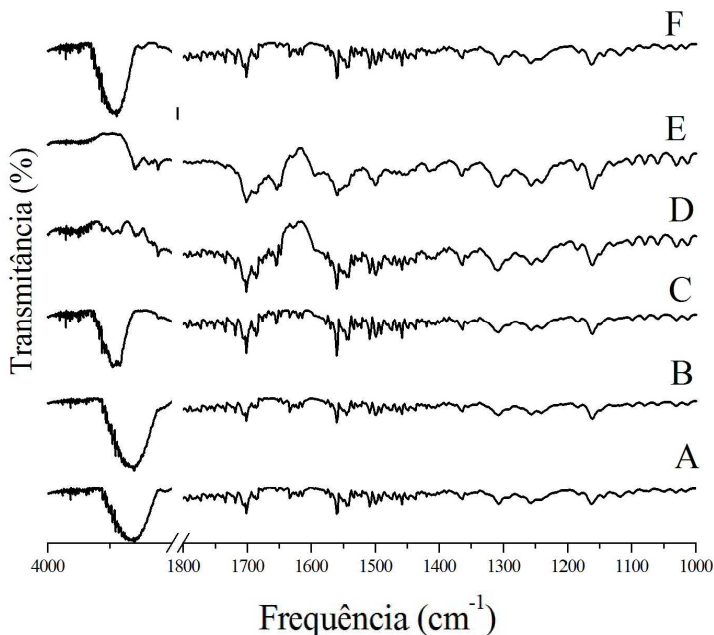


Figura 42 - Resultados das análises por IV da amostra FUR:CAF dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F –tempo 90 dias em dessecador.

A hipótese de solvatação em LAG com dioxano e posterior transição cristalina também é suportada pela análise da evolução do teor de FUR no sólido em função do tempo de armazenamento. Os gráficos abaixo representam a evolução do teor de fármaco em todas as amostras em comparação com as perdas de massa evidenciadas pela termoanálise (Figura 43). Os dados corroboram com as demais técnicas de caracterização, além de assegurar a estabilidade e não formação de produtos de degradação nas amostras. Destaca-se que a oscilação do teor esperado de fármaco em amostras cocristalinas é um fenômeno reconhecidamente citado por especialistas da área (RODRIGUEZ-HORNEDO, 2011). Ele pode refletir a pureza cristalina da amostra, a existência de solventes incorporados e de eventos de segregação de fases não detectáveis por outras técnicas, bem como a não homogeneidade da amostra durante a análise.

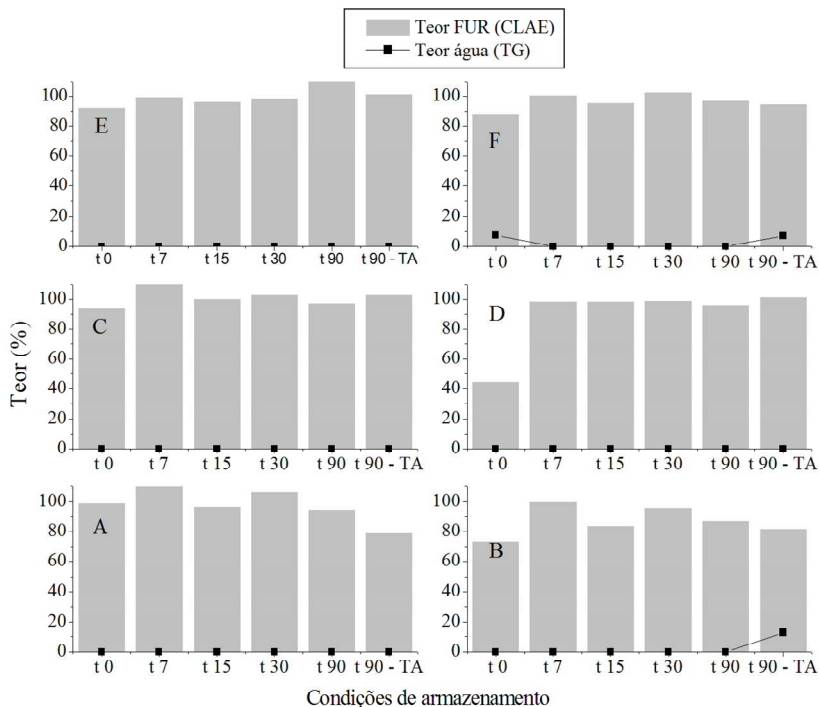


Figura 43 - Comparação dos resultados das análises do teor (em relação ao teor esperado de 64 % m/m no material) de furosemida e de água nas amostras FUR:CAF; os resultados foram obtidos a partir de CLAE e TG, respectivamente. FUR com CAF seco (A) e LAG com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F).

A análise das características dos materiais obtidos permitiu realizar algumas extrapolações a respeito da mecanística da formação de cocristais de FUR com CAF. A primeira teoria relaciona a grande estabilidade da fase cocrystalina FUR:CAF com a afinidade conformacional das moléculas fármaco:former dentro do cocrystal. Neste sentido, destaca-se a comparação do presente trabalho com os resultados descritos na literatura para a cocrystalização de cafeína com ácido cítrico (KARKI et al., 2007b; FRIŠČIĆ; JONES, 2009). Em seu estudo, Karki e colaboradores (2007) concluíram que a formação dos cocristais apenas foi possível por moagem assistida e com o estabelecimento de uma ligação de hidrogênio forte  $\text{COOH}^{\text{H}}\text{N}$  entre as moléculas. Enquanto que este também compreende o principal *synthon* entre as moléculas no cocrystal FUR:CAF, o que se verificou no

presente trabalho é que já existe a organização de uma nova estrutura ao processar os sólidos via moagem a seco. Neste caso, embora a moagem a seco tenha resultado em um halo amorfo considerável, já puderam ser visualizados por DRX indícios de reflexões primárias diferentes dos materiais de partida e coerentes com a fase do cocrystal resolvida na literatura (Figura 44). Analisando-se a estrutura deste cocrystal, verificou-se que as reflexões observadas precocemente correspondem ao plano 002 e aos planos 20-3, 20-4 e 2-13 sobrepostos. Esta observação pode retratar a tendência do ordenamento e afinidade das moléculas na estrutura do cocrystal ao analisar a composição dos planos cristalográficos (CSD, 2012).

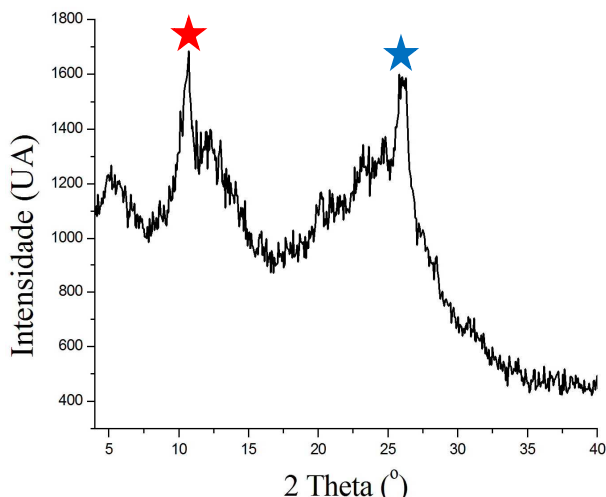


Figura 44 - Difratograma destacando as reflexões primárias do cocrystal FUR:CAF no material recém processado.

Neste sentido, o plano 002 divide a cela unitária ao meio passando justamente sobre o único elemento de simetria do sistema: o centro de inversão que relaciona as unidades assimétricas (CSD, 2012). Estas, por sua vez, contêm a unidade básica de interação fármaco e *former* e podem justificar, além da densidade eletrônica do plano, o surgimento precoce da reflexão no difratograma. Já o plano 20-3 contém as estruturas cíclicas das moléculas combinadas ao longo do eixo b, reforçando que além de ligações de hidrogênio, a conformação coplanar pode ser favorável à formação do cocrystal. As características conformacionais das moléculas favorecem a formação de ambientes

supramoleculares semelhantes a ductos favoráveis à incorporação de solventes, como aparenta ser o caso do sistema FUR:CAF dioxano. Entretanto, estas hipóteses necessitam de confirmação utilizando-se técnicas adicionais de DRX de monocristal e RMN sólido (NANGIA, 2008; PRICE, 2008; BABU et al., 2010; KAVURU et al., 2010; FRIŠČIĆ, 2012) (Figura 45).

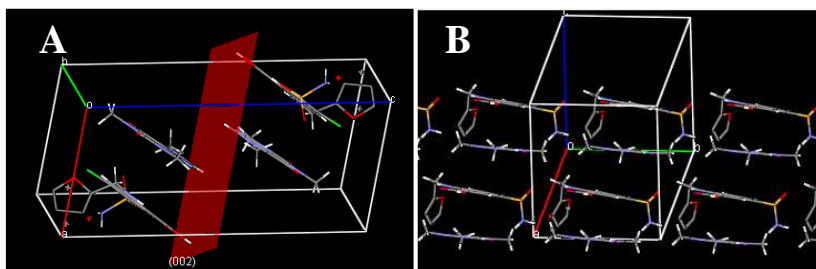


Figura 45 - Representações de planos existentes no cocrystal FUR:CAF descrito por Goud et. al (2012). A – plano 002 em vermelho. B – plano 20-3 perpendicular ao plano da figura.

Em última análise, o que os autores propõem é que, além da hierarquia dos *synthons*, um fator preponderante neste cocrystal compreende a forma das moléculas de FUR e CAF e sua complementaridade. Este aspecto estaria relacionado com a estabilidade e a prevalência na formação da mesma fase cristalina em vários experimentos, utilizando LAG e solventes diferentes (FÁBIÁN; FRISCIC, 2012).

Além dessa teoria, a velocidade aumentada da cocrystalização FUR:CAF durante a moagem assistida e o armazenamento a 75 % UR, sugerem que a formação do cocrystal FUR:CAF ocorra por transferência de massa mediada por fase de vapor (FRIŠČIĆ; JONES, 2012). Embora a afinidade e a termodinâmica possam favorecer a formação do cocrystal FUR:CAF, a reação aparenta ser cineticamente desfavorável. Neste caso, as moléculas envolvidas necessitam passar por um estado temporário de dissolução no que muitos autores chamam de transformações de fase sólido-líquido-sólido (BRITAIN, 2009b; GAGNIERE et al., 2009). Além disso, outros autores destacam que a umidade do ambiente afeta a cocrystalização por diminuir a temperatura de transição vítrea de sólidos amorfos e aumentar a mobilidade molecular e a taxa de cristalização dos sistemas (JAYASANKAR; DAVID; RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2007).

Verifica-se ainda que neste sistema a influência da fase amorfa aparenta não ser tão importante, visto que o armazenamento de FUR:CAF seco por 90 dias em ambiente de baixa umidade não demonstrou mudanças significativas nas características do material.

### 5.3.3 Avaliação da moagem a seco *versus* moagem assistida: Sistema Furosemida:Nicotinamida

Assim como no sistema FUR:CAF, a moagem de FUR com NIC levou à obtenção de materiais sólidos diferentes dos insumos de partida e com aspecto muito variado (Figura 46). Entretanto, as análises macroscópicas das amostras revelaram colorações habituais em matérias-primas farmacêuticas e aspecto homogêneo.

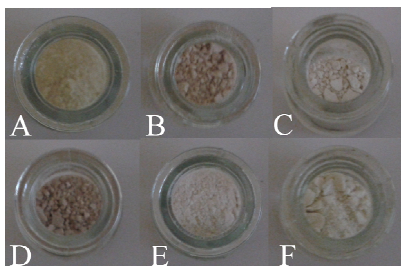


Figura 46 - Fotografias representando o aspecto dos materiais obtidos a partir da moagem de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F).

Foi realizado estudo cromatográfico com avaliação do perfil e do teor de FUR nos materiais. Não foi evidenciada a ocorrência de degradação química pela ausência de produtos de degradação nas análises utilizando método validado previamente. Entretanto, algumas variações foram obtidas com relação ao teor de FUR nas análises por CLAE (Tabela 17). Sugere-se que as amostras obtidas por LAG apresentem solvente residual, destacando-se o baixo teor de FUR nas amostras preparadas por LAG em água e dioxano.

Tabela 17 - Resultados da análise por CLAE das amostras FUR:NIC. O teor esperado para o material compreende 72 % (m/m).

Amostras	Teor do material (%, m/m)	Teor de FUR (%, m/m)	Proporção FUR:NIC (ua/ua)
FUR:NIC MF	75,72	105,17	11,45
FUR:NIC seco	71,59	99,43	11,57
FUR:NIC água	57,91	80,43	11,92
FUR:NIC metanol	71,00	98,62	11,84
FUR:NIC acetonitrila	73,25	101,73	11,89
FUR:NIC acetona	67,32	93,50	11,83
FUR:NIC dioxano	62,18	86,36	11,84

Além do aspecto e do teor, puderam ser verificadas diferenças por DRX entre as amostras FUR:NIC moídas (Figura 47)

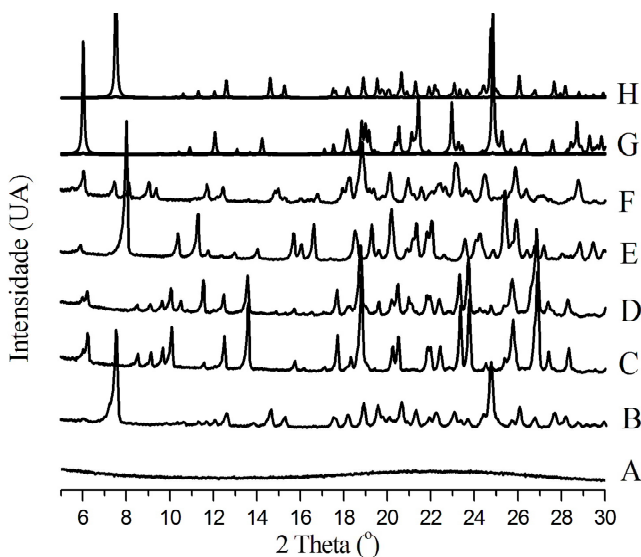


Figura 47 - Resultados das análises por DRX de pó das amostras de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). G compreende o padrão de difração calculado para a FUR e H para o hidrato de cocrystal FUR:NIC.

Em sua aplicação farmacêutica, a comparação dos difratogramas de amostras cristalinas em baixos ângulos é muito interessante sob o ponto de vista da discriminação de fases (RODRÍGUEZ-SPONG et al.,



2004; SINGHAL; CURATOLO, 2004; BRITAIN, 2009b). Entretanto, nos sistemas contendo FUR:NIC deve-se tomar certa cautela devido à sobreposição de reflexões verificada na região próxima a  $6,0^\circ$  theta. Tomadas as devidas precauções neste sentido, verificou-se por DRX que a moagem resultou na obtenção de diferentes estruturas, dependendo do sistema proposto (0). A variedade de formas cristalinas já foi reportada para cocristais de FUR:NIC no estudo de Ueto et al. (2011), sendo que todos os padrões de difração para as amostras são apresentados no Anexo 2. Ao comparar as estruturas resolvidas com os resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que a única fase coincidente compreende o hidrato, o qual foi obtido por LAG com água.

Observa-se que a moagem a seco FUR:NIC resultou em mistura amorfa, sem nenhum indício de difração de planos cristalinos específicos. Já no caso das amostras cristalinas, verificou-se que as fases obtidas em LAG com metanol e acetonitrila foram coincidentes entre si, embora a segunda tenha apresentado menor cristalinidade. Reflexões de base alargada também foram verificadas para as amostras obtidas em acetona e dioxano, sendo que FUR:NIC acetona apresentou estrutura cristalina diferente dos outros materiais. Aparentemente a amostra FUR:NIC dioxano compreendeu estrutura cristalina diferente, talvez uma mistura de fases.

No que se refere às análises espectroscópicas, as amostras foram analisadas por Raman e IV. Os espectros Raman apresentaram predominante o efeito de luminescência nas medidas. Já os espectros no IV foram analisados da mesma forma que o sistema com CAF anteriormente descrito, ou seja, comparando os deslocamentos e a intensidade das bandas relativas aos grupos funcionais existentes nas moléculas de FUR: sulfonamida (estiramento N–H assimétrico em  $3400\text{ cm}^{-1}$ , estiramento N–H simétrico em  $3285\text{ cm}^{-1}$ , estiramento S–O assimétrico em  $1323\text{ cm}^{-1}$  e estiramento S–O simétrico em  $1144\text{ cm}^{-1}$ ), ácido carboxílico (estiramento O–H em banda alargada entre  $3200\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$  e estiramento C–O em  $1674\text{ cm}^{-1}$ ) e amina secundária (estiramento N–H em  $3350\text{ cm}^{-1}$  e dobramento N–H em  $1592\text{ cm}^{-1}$ ). O espectro de NIC fornece bandas características dos grupamentos amida: estiramento C–O em  $1680\text{ cm}^{-1}$  alargado e quase sobreponível a dobramento N–H em  $1593\text{ cm}^{-1}$ ; estiramento N–H em banda complexa entre  $3500\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$  caracterizando vibrações assimétricas e simétricas N–H (PAVIA, 2009).

Os dados obtidos demonstraram modificações nos espectros IV das amostras, diferentemente da mistura física de NIC com FUR, a qual resultou na sobreposição dos espectros dos insumos (Figura 48).

Observou-se por IV que a moagem resultou no surgimento de bandas alargadas e intensas acima de  $3000\text{ cm}^{-1}$  para as amostras FUR:CAF metanol e dioxano. Assim como observado no sistema com CAF, estas bandas são de interpretação complexa por mascarar outras e estão relacionadas na literatura com ligações de hidrogênio fortes entre as moléculas ou com solventes (AALTONEN et al., 2008; PAVIA, 2009). Por isso, as amostras serão analisadas a partir de comprimentos de onda mais baixos.

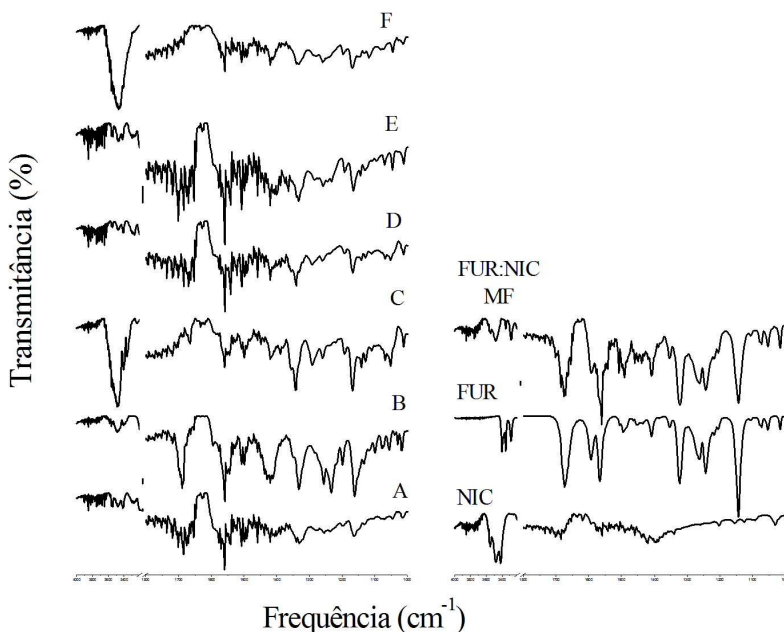


Figura 48 - Resultados das análises no IV das amostras de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). Para efeito de comparação, são apresentados os espectros do fármaco e do *former* puros e da sua mistura física.

Verificou-se que a região próxima a  $1700\text{ cm}^{-1}$  apresentou bastante ruído em quase todas as amostras, provavelmente oriundo do alongamento das ligações C–O com diminuição da constante de força de estiramento. Isso pode ocorrer em amostras que apresentam desordem ou ligações de hidrogênio fortes, sendo que este efeito apenas não foi verificado para o hidrato obtido em FUR:NIC água. Neste caso, observou-se uma banda intensa e bem definida em  $1690\text{ cm}^{-1}$ . Com

relação ao dobramento N–H, analisado mesmo apresentando ruído de fundo, não foi possível diferenciá-lo nas amostras contendo NIC devido à mesma posição da banda em todas as análises ( $1559\text{ cm}^{-1}$ ).

Verificou-se que uma região do espectro IV de fácil discriminação entre as amostras compreendeu a faixa  $1400\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ , relacionada com estiramentos S–O da sulfonamida e C–O do grupo ácido carboxílico da FUR. Como se observa na Figura 49, as posições das bandas sustentam as suposições realizadas a partir dos dados de DRX e permitem agrupar as amostras FUR:NIC metanol e acetonitrila de acordo com o ambiente supramolecular na estrutura cristalina. As amostras FUR:NIC acetona e dioxano também apresentaram semelhanças.

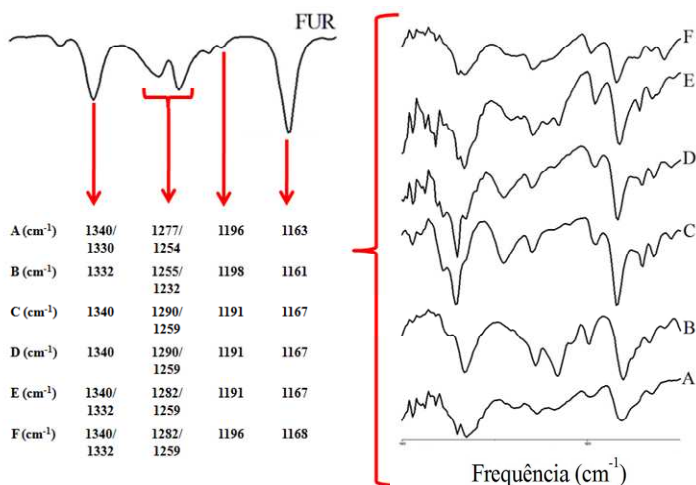


Figura 49 - Resultados das análises no IV das amostras de FUR com NIC seco (A) e no sistema de moagem assistida com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F). São destacadas as frequências características.

O comportamento termoanalítico das amostras demonstrou ser muito variado em relação aos insumos/mistura física e entre si. Destaca-se multiplicidade de eventos endotérmicos obtida em FUR:NIC acetona ( $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $131\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $141\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $151\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Estes eventos foram acompanhados de um evento de perda de massa adicional de  $9,9\%$  em  $104\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 50).

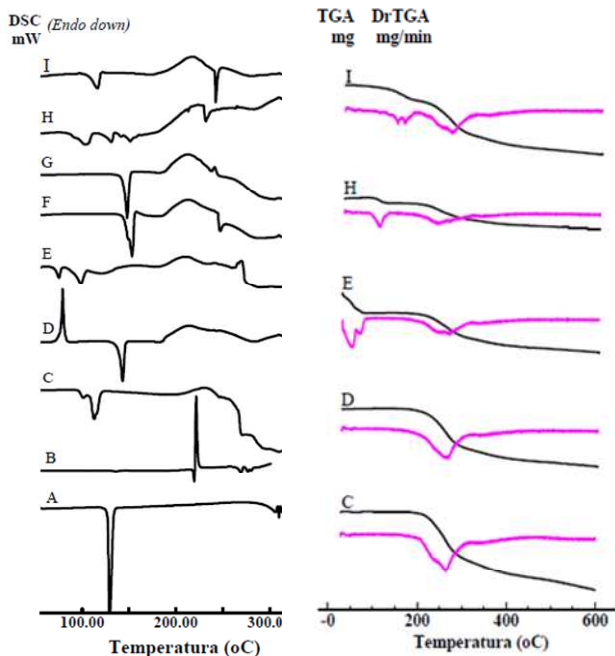


Figura 50 - Resultados das análises por DSC das amostras FUR:NIC (esquerda). À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. A – *former*. B – FUR. C – mistura física. D – FUR:NIC seco (D). E – FUR:NIC água. F – FUR:NIC metanol. G – FUR:NIC acetonitrila. H – FUR:NIC acetona. I – FUR:NIC dioxano.

Já FUR:NIC dioxano apresentou um único evento endotérmico no DSC, correspondendo a 45,1 J/g em 116 °C, enquanto que a perda de massa adicional nesta amostra demonstrou ser complexa. Neste sentido, a derivada da curva TG permitiu determinar a existência de reação com início em 45 °C e apresentando picos em 141°C e 156 °C. Estes eventos caracterizaram a perda de 14,0 % (m/m) em massa estendida até o início do evento de degradação característico da mistura fármaco:*former*.

Outra amostra complexa representou ser o hidrato obtido a partir do processamento FUR:NIC em água (UETO et al., 2011). Enquanto que seu padrão de difração encontra-se relatado na literatura, nenhum dado termoanalítico foi publicado até o presente momento. Por TG a amostra demonstrou ser muito lábil, com perda de massa de 22,1 % na faixa de 30 °C – 80 °C apresentando picos em 45,3 °C e 64,0 °C. O DSC, por sua vez, evidenciaram-se dois eventos endotérmicos em 75,1

$^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 19,9 \text{ J/g}$ ) e em  $98,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 52,6 \text{ J/g}$ ). O cálculo da proporção molar em relação à perda de massa observada permitiu definir preliminarmente a proporção de água no material em 1:1:7 (FUR:NIC:H<sub>2</sub>O). Estes resultados são de difícil interpretação e necessitam de análises acessórias, entretanto, sugere-se que a amostra apresente água adsorvida e cristalizada.

Diferentemente, as amostras obtidas por moagem a seco e por LAG em metanol e acetonitrila não apresentaram perda de massa em baixas temperaturas, apenas acima de  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A amostra FUR:NIC acetonitrila apresentou evento endotérmico em  $147,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 86,8 \text{ J/g}$ ). Embora as análises preliminares tenham demonstrado similaridades entre as amostras FUR:NIC acetonitrila e metanol, a última apresentou ao DSC eventos endotérmicos sobrepostos em  $148,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $153,1^{\circ}\text{C}$ . Este pode ser um efeito causado por diferenças no tamanho das partículas da amostras.

FUR:NIC seco também apresentou evento endotérmico em  $147,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 73,3 \text{ J/g}$ ) precedido por evento exotérmico irreversível em  $78,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 51). A análise utilizando DRX pó acoplado a câmara de alta temperatura permitiu relacionar esta exoterma com a reação de cristalização em uma estrutura desconhecida. Enquanto que no sistema FUR:CAF o aquecimento apenas provocou leve aumento na cristalinidade da amostra, no sistema FUR:NIC amorfo observou-se um aumento da cristalinidade considerável. Além disso, após sequência de aquecimento  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  > resfriamento a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  > aquecimento até  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , observou-se que a temperatura de fusão do sólido diminuiu para  $143,2^{\circ}\text{C}$ .

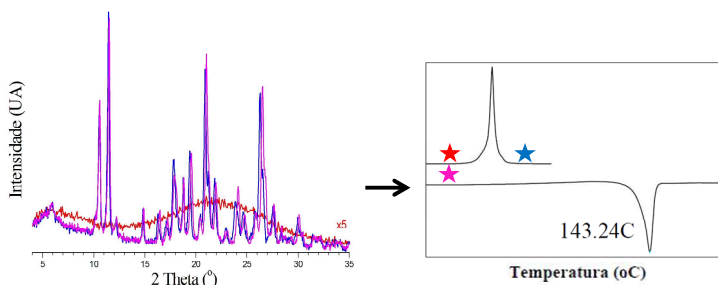


Figura 51 - Evolução de FUR:NIC seco recém preparado frente ao aquecimento (taxa de  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). À esquerda estão apresentados os difratogramas antes do aquecimento em  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (vermelho), durante o aquecimento em  $110 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (azul) e após resfriamento em  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (rosa). À direita estão representadas as curvas DSC para a mesma sequência com destaque para pontos equivalentes ao DRX.

A NIC é descrita na literatura como um *former* muito versátil na cocristalização. Sugere-se que a heterogeneidade das amostras esteja relacionada com a capacidade de FUR e NIC se apresentarem em diferentes conformações e sob o ordenamento de diferentes *synthons* supramoleculares. Neste sentido, a caracterização inicial do sistema supõe a existência de relações complexas destes materiais frente o armazenamento.

### 5.3.3.1 Armazenamento dos materiais

Além do aquecimento programado, verificou-se que a umidade também contribuiu para a cocristalização de FUR:NIC seco nos primeiros sete dias de exposição (Figura 52). Da mesma forma, o armazenamento em dessecador levou à cristalização parcial da amostra na mesma estrutura desconhecida, mas com halo amorfo significativo.

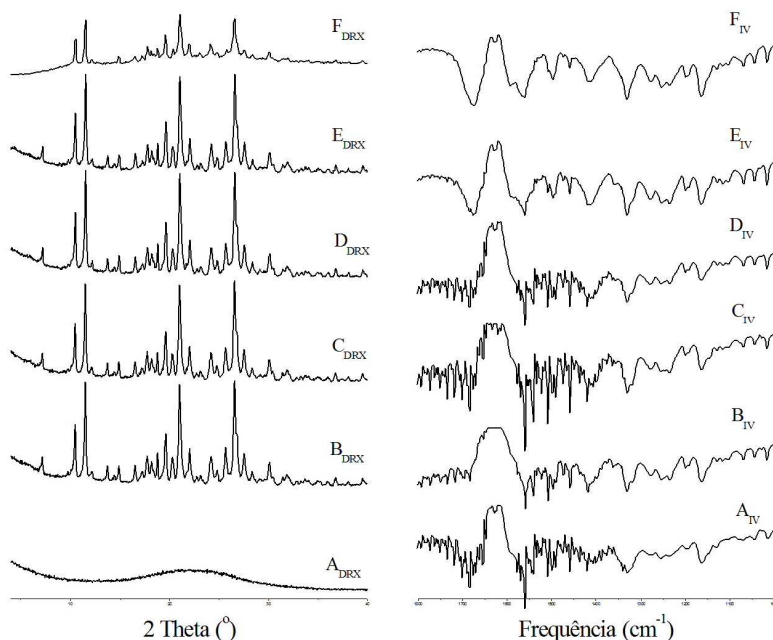


Figura 52 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC seco armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.

Este fenômeno foi observado por DRX, IV e por DSC. Da mesma forma que o DRX demonstrou um padrão de difração não condizente com as outras estruturas, os espectros no IV para o novo sólido demonstraram deslocamentos do conjunto de bandas de estiramento S–O e C–O. Enquanto que esta série apresentava anteriormente valores de  $1340/1330\text{ cm}^{-1}$ ,  $1277/1254\text{ cm}^{-1}$ ,  $1196\text{ cm}^{-1}$  e  $1163\text{ cm}^{-1}$ , passou a apresentar  $1331\text{ cm}^{-1}$ ,  $1277/1254/1235\text{ cm}^{-1}$ ,  $1199/1193\text{ cm}^{-1}$  e  $1163\text{ cm}^{-1}$ .

Com relação ao comportamento termoanalítico, a amostra FUR:NIC seco armazenada em dessecador continuou apresentando na curva DSC evento exotérmico irreversível em  $79,7\text{ °C}$  (Figura 53). A energia liberada na reação de cristalização ( $\Delta H = 34,84\text{ J/g}$ ) foi menor que o valor obtido para a amostra recém processada devido à cristalização parcial da amostra ocorrida durante o armazenamento.

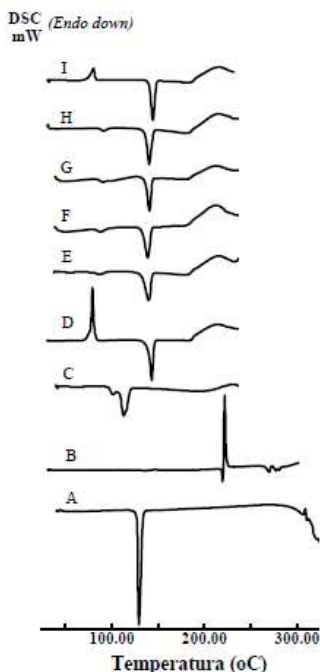


Figura 53 - Resultados do DSC da amostra FUR:NIC seco armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – *former*. B – FUR. C – mistura física. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador.

Já quando a amostra foi mantida em câmara de temperatura e umidade, não foram observados eventos exotérmicos de cristalização detectáveis logo a partir da primeira coleta da amostra. O evento de fusão foi observado em  $139,7 \pm 0,23$  °C,  $80,56 \pm 3,97$  J/g. Além disso, verificou-se evento endotérmico adicional em  $88,8 \pm 2,3$  °C acompanhado por uma sutil perda de massa de  $0,94 \pm 0,06$  % (m/m). A partir de sete dias de análise, o sólido não apresentou modificações em suas características com relação à cristalinidade e às propriedades térmicas durante os 90 dias de manutenção em 40 °C/75 % UR.

Além da obtenção a partir de mistura amorfa, esta nova fase foi também resultante do armazenamento de FUR:NIC dioxano em condições de umidade elevada. Esta transformação aparentou ser muito rápida e acompanhada por modificações nos difratogramas e espectros IV condizentes com as características da forma cristalina obtida a partir do armazenamento de FUR:NIC seco (Figura 54).

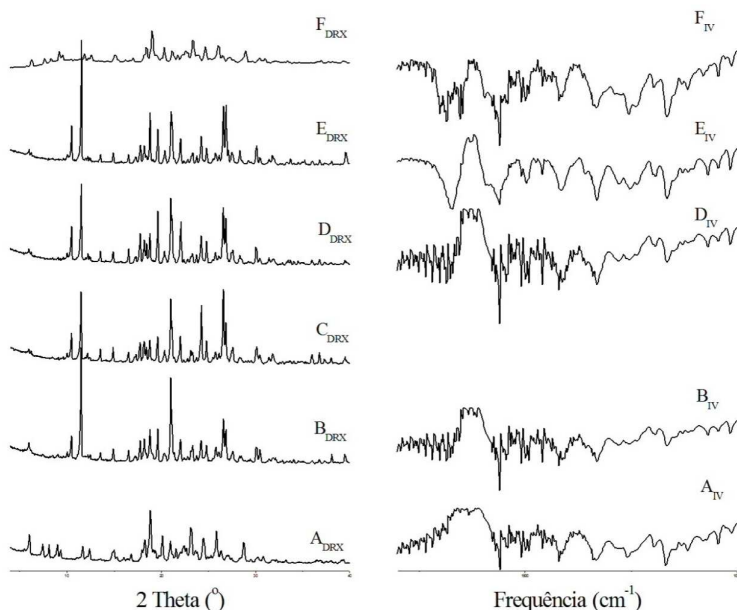


Figura 54 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade (apenas DRX; esta análise no IV foi considerada ponto expúrio). D – tempo 30 dias em câmara de umidade. E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.



A análise das curvas DSC das amostras após armazenamento em câmara de temperatura e umidade possibilitou determinar evento de fusão em  $145,6 \pm 0,6$  °C com calor de fusão de  $88,9 \pm 7,0$  J/g (Figura 55). Diferentemente da estrutura sólida inicialmente obtida por LAG, não foram observadas reações de perda de massa detectáveis abaixo de 170 °C. A amostra mantida em dessecador, por sua vez, não apresentou transição cristalina. Verifica-se que o evento de fusão se manteve em 117,5 °C ( $\Delta H = 62,6$  J/g). Entretanto, a derivada da curva TG permitiu determinar a existência de reação de perda de massa de 13,4 % (m/m) com início em 45 °C e apresentando pico apenas em 139,0 °C.

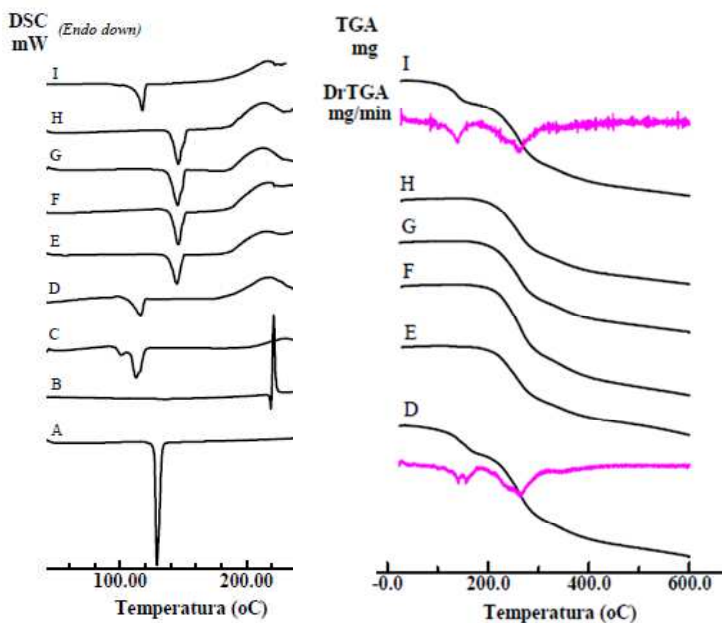


Figura 55 - Resultados do DSC da amostra FUR:NIC dioxano armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C (esquerda). À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. A – *former*. B – FUR. C – mistura física. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador.

Outra amostra que apresentou modificação cristalina rápida apenas frente à umidade foi a FUR:NIC acetona. No DRX observaram-

se algumas reflexões coincidindo com o sistema sólido obtido para FUR:NIC metanol e acetonitrila, entretanto, outras fases desconhecidas adicionais foram também observadas (Figura 56). Além de modificações nos padrões de difração no que se refere à presença de reflexões, observou-se uma menor cristalinidade na amostra, com alargamento da base das reflexões e presença de halo amorfo considerável. Os espectros no IV, por sua vez, também apresentaram modificações a partir de sete dias de exposição à umidade.

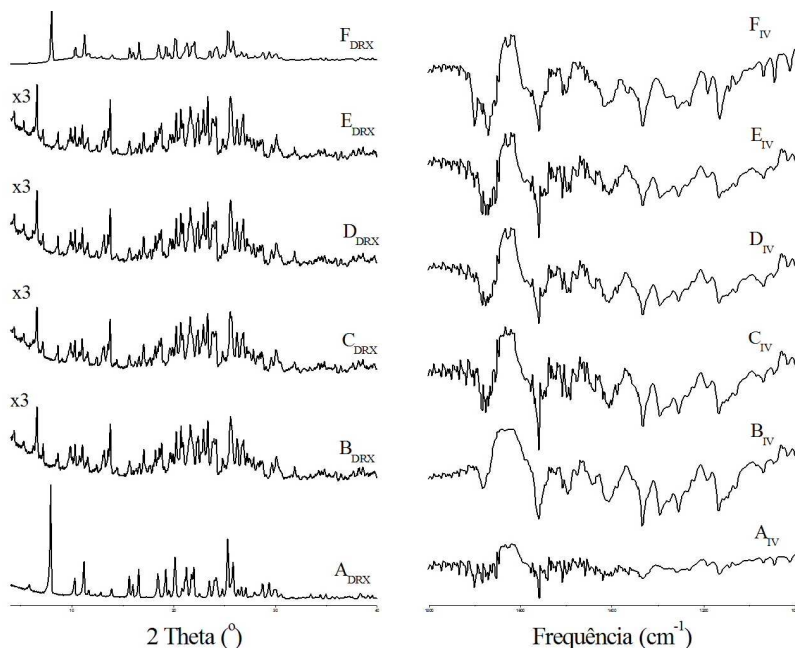


Figura 56 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC acetona 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador.

Com relação ao comportamento termoanalítico, a multiplicidade de eventos endotérmicos de FUR:NIC acetona continuou sendo observada por DSC e dificultou a interpretação dos dados (Figura 57). As análises termogravimétricas também refletiram a perda do solvente residual frente à câmara de umidade, com ausência de reações de perda de massa abaixo de 170 °C. Este evento apenas foi mantido na amostra

armazenada em dessecador, na qual se observa evento de perda de massa de 9,6 % (m/m) em 105 °C.

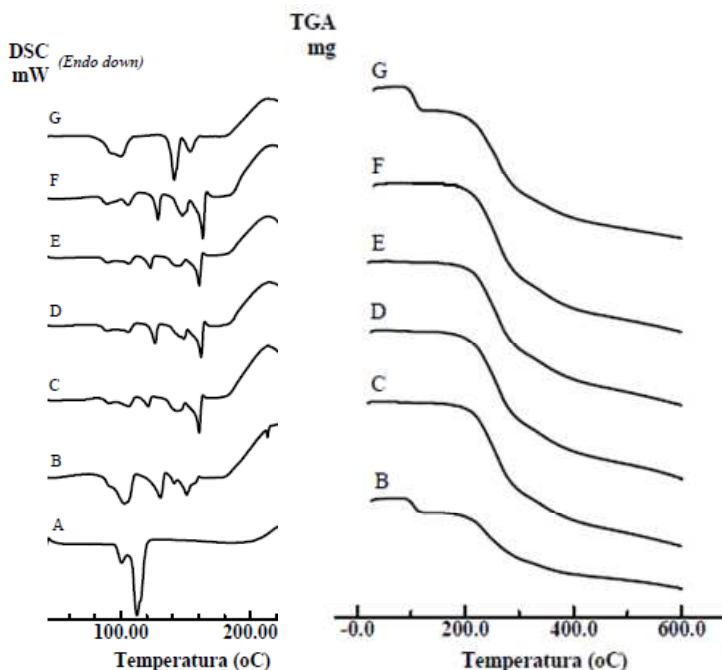


Figura 57 - Resultados das análises por DSC das amostras FUR:NIC acetona em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C (esquerda). À direita destacam-se os resultados de TG de algumas amostras. B – tempo zero. C – tempo sete dias em câmara de umidade. D – tempo 15 dias em câmara de umidade. E – tempo 30 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em câmara de umidade. G – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, é apresentada a curva DSC do da mistura física fármaco:former (A).

Enquanto alguns sistemas sofreram transformações sólidas rápidas, observou-se uma lenta transição de fase na amostra FUR:NIC água a partir do armazenamento em condições de temperatura e umidade. Ao analisar o padrão de difração da estrutura cristalina formada a partir do armazenamento de FUR:NIC seco em comparação com o sistema FUR:NIC água, pode-se observar coincidência nas novas reflexões (Figura 58).

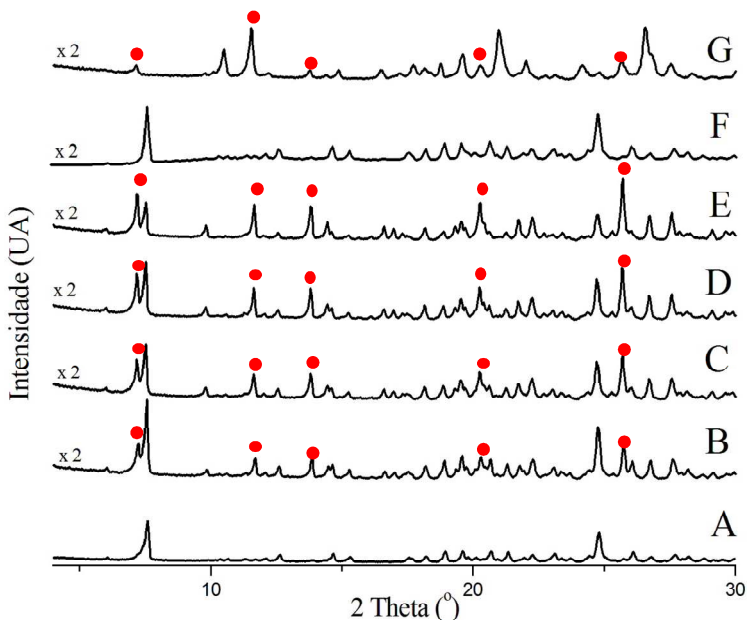


Figura 58 - Resultados das análises por DRX da amostra FUR:NIC água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. São destacadas as reflexões coincidentes com FUR:NIC seco que aparecem em função do tempo de armazenamento. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:NIC seco após armazenamento.

No entanto, é precipitado sugerir a ocorrência de transformação de fase do hidrato do cocristal para a mesma fase formada pelo armazenamento de FUR:NIC seco. Esta hipótese necessita ser confirmada devido a duas informações: (i) algumas das reflexões mais intensas do sistema obtido por moagem a seco não foram observadas nos difratogramas FUR:NIC água armazenada; (ii) a análise dos espectros no IV das amostras sugere diferenças entre as fases analisadas. É evidente que quanto maior a quantidade da fase desconhecida em FUR:NIC água, maior a intensidade de uma nova banda de estiramento S–O em  $1319\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que o hidrato e a fase obtida a partir de FUR:NIC amorfo apresentam esta banda em  $1331\text{ cm}^{-1}$  (Figura 59).

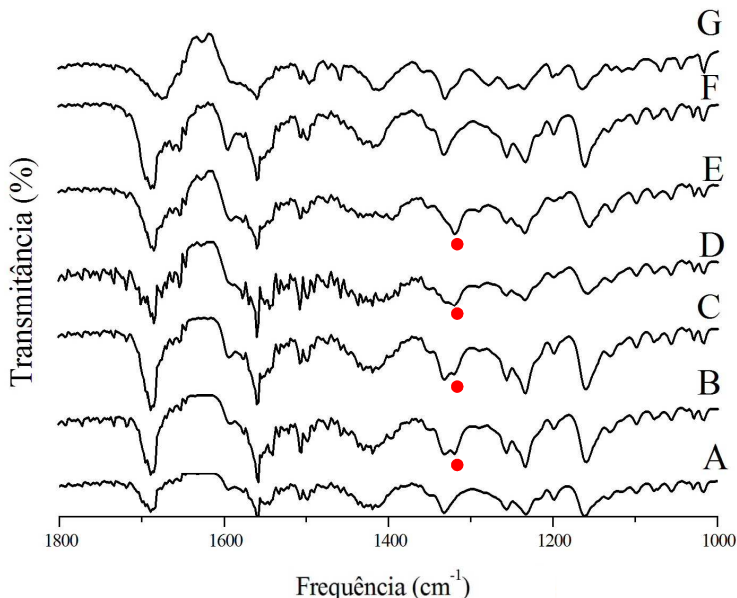


Figura 59 - Resultados das análises por IV e detalhes da amostra FUR:NIC água armazenada em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade. F – tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:NIC seco após armazenamento.

Além disso, também são observadas não conformidades nas análises por DSC, as quais dificultam a avaliação do presente sistema (Figura 60). Observa-se, por exemplo, que a amostra recém preparada e a armazenada em dessecador apresentam curvas DSC diferenciadas, enquanto que o padrão de difração caracterizou a mesma estrutura cristalina. Acredita-se que, em algumas análises, as reações de dessolvatação e fusão precedentes possam ter solubilizado as amostras e apagado/abrandado eventos de fusão em temperaturas mais elevadas. Além disso, este fenômeno pode promover o deslocamento dos eventos em função da temperatura e prejudicar a análise confiável dos dados (GIRON, 2002; CRAIG; READING, 2006).

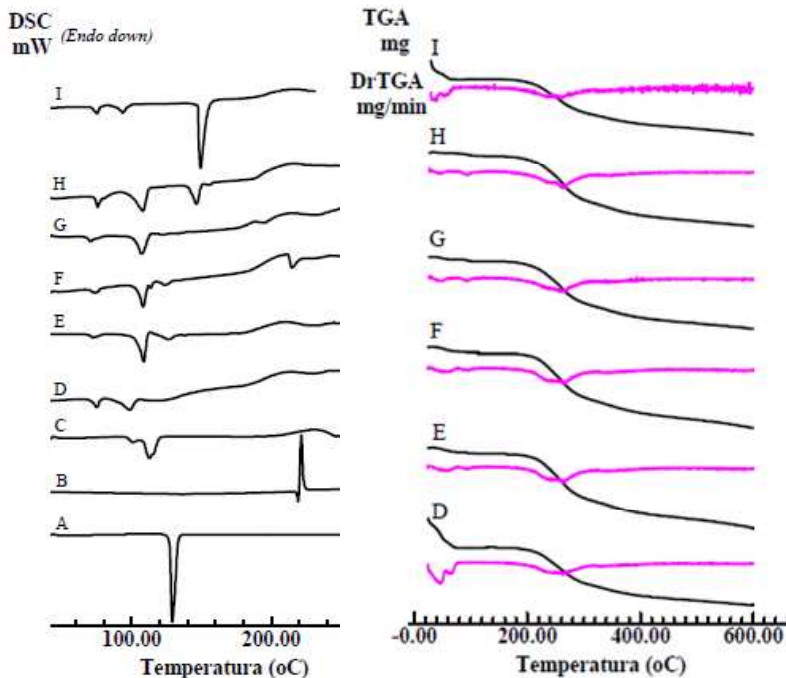


Figura 60 - Resultados do DSC da amostra FUR:NIC água armazenada (esquerda) em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. À direita destacam-se os resultados de TG e respectiva TG derivada de algumas amostras. D – tempo zero. E – tempo sete dias em câmara de umidade. F – tempo 15 dias em câmara de umidade. G – tempo 30 dias em câmara de umidade. H – tempo 90 dias em câmara de umidade. I – tempo 90 dias em dessecador. Para efeito de comparação, são apresentadas as curvas DSC do *former* (A), do fármaco (B) e da sua mistura física (C).

Por enquanto, o que se pode afirmar é que a temperatura e a umidade promovem mudanças na estrutura cristalina de FUR:NIC água, com diminuição do conteúdo de solvente da amostra. Neste caso, verificou-se pelo TG que a perda de massa em aproximadamente 90 °C diminuiu consideravelmente com o passar do tempo. Esta foi uma tendência observada em todos os sistemas de moagem propostos para FUR:NIC e está representado na Figura 61. Estes dados corroboram com os teores em massa obtidos para FUR por análises cromatográficas. Enquanto que não foram detectados por CLAE produtos de degradação nas amostras, observaram-se variações significativas de teor

características para estes materiais e provavelmente relacionadas com a perda de solvente das amostras, exceto para FUR:NIC metanol e acetonitrila.

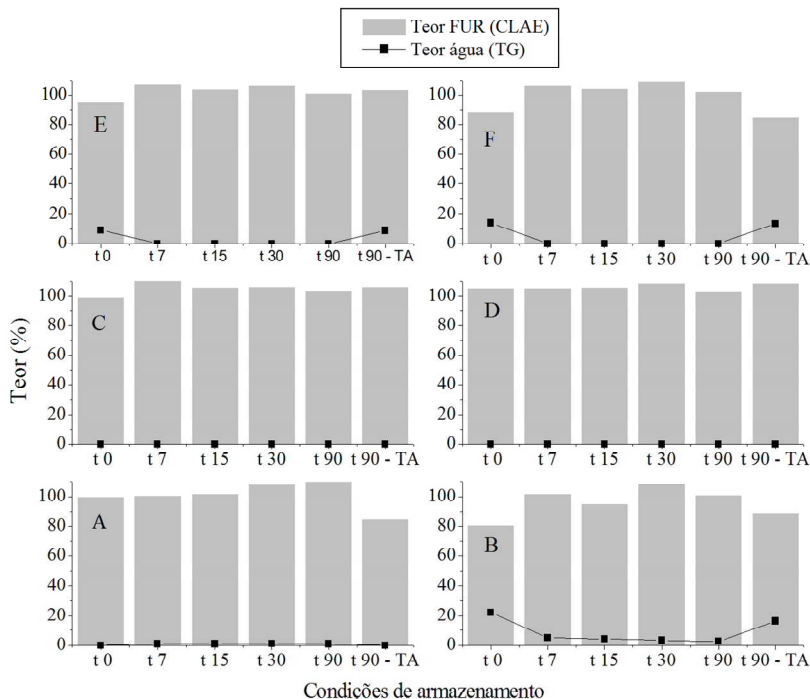


Figura 61 - Comparação dos resultados das análises do teor (em relação ao teor esperado de 72 % m/m no material) de furosemida e de água nas amostras FUR:NIC; Os resultados foram obtidos a partir de CLAE e TG, respectivamente. FUR com NIC seco (A) e LAG com água (B), metanol (C), acetonitrila (D), acetona (E) e dioxano (F).

O sistema sólido obtido por LAG a partir de solventes orgânicos como o metanol e a acetonitrila demonstrou ser estável frente ao armazenamento nas diferentes condições. Verificou-se a manutenção das propriedades cristalinas e espectroscópicas entre as amostras, sendo que algumas variações ocorreram decorrentes principalmente do sutil incremento da cristalinidade por efeito da umidade (Figura 62).

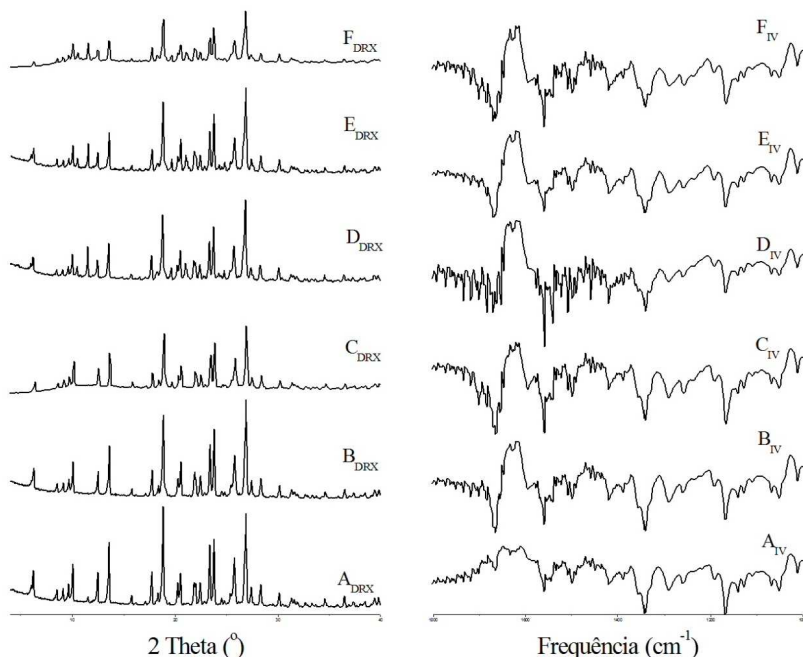


Figura 62 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) da amostra FUR:NIC metanol e acetoneitrila armazenadas em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – FUR:NIC metanol tempo zero. B – FUR: NIC metanol tempo 90 dias em câmara de umidade. C – FUR: NIC metanol tempo 90 dias em dessecador. D – FUR: NIC acetoneitrila tempo zero. E – FUR: NIC acetoneitrila tempo 90 dias em câmara de umidade. F – FUR: NIC acetoneitrila tempo 90 dias em dessecador.

Da mesma forma, verificou-se que o comportamento termoanalítico destes sistemas não foi alterado, conforme Figura 63. A duplicidade do evento de fusão de FUR:NIC metanol observado na amostra recém preparada não foi visualizada em nenhuma outra análise durante o estudo de estabilidade em temperatura e umidade controladas.



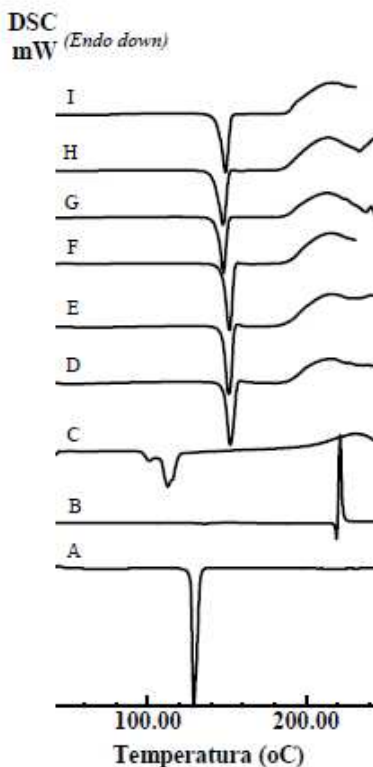


Figura 63 - Resultados do DSC das amostras FUR:NIC metanol e acetonitrila armazenadas (esquerda) em 75 % UR/40 °C e em dessecador/25 °C. A – *former*. B – FUR. C – mistura física. D – FUR:NIC metanol tempo zero. E – FUR:NIC metanol tempo 90 dias em câmara de umidade. F – FUR:NIC metanol tempo 90 dias em dessecador. G – FUR:NIC acetonitrila tempo zero. H – FUR:NIC acetonitrila tempo 90 dias em câmara de umidade. I – FUR:NIC acetonitrila tempo 90 dias em dessecador.

Verificou-se que o sistema FUR:NIC apresenta complexidade elevada no que se refere ao mecanismo de formação dos cocristais e às relações termodinâmicas entre as fases obtidas. Percebe-se claramente o efeito que os solventes exercem sobre estes materiais, tanto frente à moagem, quanto frente ao armazenamento.

Além de interferirem na cinética de cocrystalização, os solventes contemplam ferramentas de controle polimórfico em cocristais (FRISČIĆ; JONES, 2012). Os mecanismos desta seletividade na cristalização via moagem descritos na literatura levam em consideração,

principalmente, a polaridade do solvente. Neste sentido, pequenas quantidades de solvente em LAG atuam sobre a exposição de determinados grupamentos moleculares com estabilização de planos cristalinos sob clivagem moagem-induzida. Existe também a hipótese de que eles atuem como zonas de defeitos nos sólidos ao adsorverem sobre as faces cristalinas e propagarem a reação de cocristalização durante a moagem (TRASK; MOTHERWELL; JONES, 2004; TRASK et al., 2005; VISHWESHWAR et al., 2006).

Além disso, com relação às variadas formas cristalinas obtidas a partir do processamento FUR:NIC, outro destaque merece ser dado ao efeito que a versatilidade conformacional das moléculas de NIC exerce sobre a labilidade e a diversidade dos materiais FUR:NIC. Acredita-se que a grande variedade de *synthons* supramoleculares possíveis de existirem entre as moléculas favoreceu o surgimento de polimorfos do cocristal FUR:NIC (FÁBIÁN, 2009).

Seja qual for complementaridade entre os insumos, acredita-se que a formação de cocristais FUR:NIC envolva uma combinação de efeitos. A análise dos ensaios realizados permitiu verificar a existência de três tipos de comportamento frente ao armazenamento: i) transformações sólidas ocorrentes com e sem umidade (FUR:NIC seco); ii) transformações sólidas ocorrentes apenas frente a umidade (FUR:NIC água, acetona e dioxano); iii) ausência de modificações cristalinas (FUR:NIC metanol e acetonitrila). Enquanto i sugere que estas sejam reações mediadas pela fase amorfa, ii é indicativo de que as relações sólidas sejam influenciadas pelo efeito da sorção de vapor. No caso de transformações polimórficas, como aparenta ser o caso observado para as transformações físicas dos sistemas FUR:NIC, o aumento da mobilidade molecular mediado por difusão de vapor pode ter favorecido a transição para formas cristalinas termodinamicamente mais estáveis.

### **5.3.4 Estabilidade frente à luz UV e Dissolução intrínseca**

Durante a caracterização preliminar, os ensaios em condições de estabilidade acelerada permitiram a obtenção de dados da estabilidade química e física dos materiais desenvolvidos. Baseando-se nos resultados iniciais, foram selecionados para demonstração os resultados para o ensaio de estabilidade acelerada frente à luz UV apenas as amostras diferentes entre si e que demonstraram ser fisicamente estáveis em condições de umidade (FUR:CAF e FUR NIC após pelo menos sete dias em câmara de umidade, e FUR:NIC metanol). Isso evita a

sobreposição de reações complexas de degradação química frente a modificações físicas. Entretanto, estudos com os outros sólidos estão em andamento.

Percebeu-se que após 15 dias em luz UV 254 não houve surgimento de produtos de degradação no perfil cromatográfico dos materiais sólidos, mas verificou-se decaimento de seu teor (5,61 % para FUR, 8,70 % para FUR:CAF, 4,27 % para FUR:NIC e 6,65 % para FUR:NIC metanol (Figura 64). Estes resultados demonstram mudanças consideradas significativas pelas regulamentações farmacêuticas em estudos de degradação forçada (ICH 2003; (HUYNH-BA, 2008).

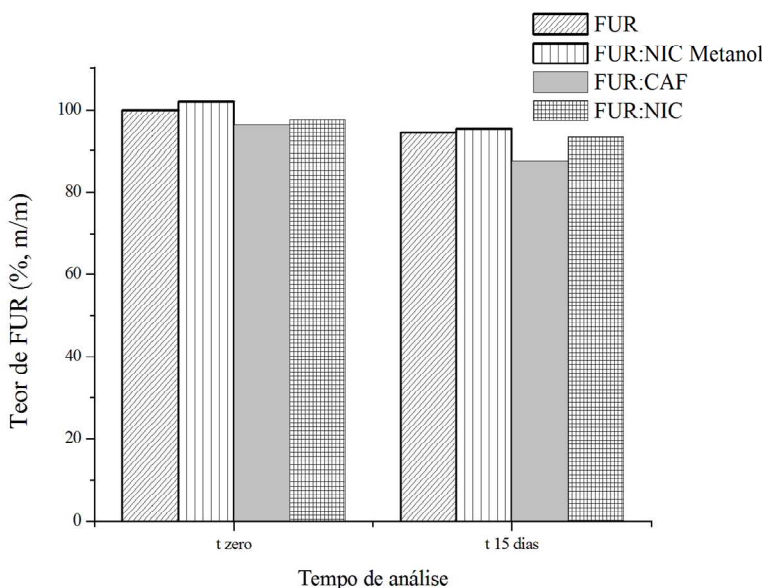


Figura 64 - Resultados do comportamento das amostras frente à luz UV 254 nm, após 15 dias de exposição. O teor foi definido utilizando-se sistema cromatográfico composto por fase móvel de tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila com eluição gradiente em fase reversa C8, sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL).

Estudos estão em andamento para avaliar este comportamento, entretanto, chama a atenção a possibilidade de formação de produtos de degradação não detectáveis por métodos cromatográficos com detecção no UV, sugerindo a análise destes materiais utilizando espectrometria de massas.

Além disso, foram realizados ensaios de dissolução intrínseca para algumas das amostras. Foram selecionadas amostras diferentes entre si: FUR pura e FUR:NIC seco, FUR:NIC água, FUR:NIC metanol, FUR:NIC acetonitrila, FUR:NIC acetona e FUR:NIC dioxano após pelo menos sete dias em câmara de umidade. Os resultados gráficos são mostrados Figura 65.

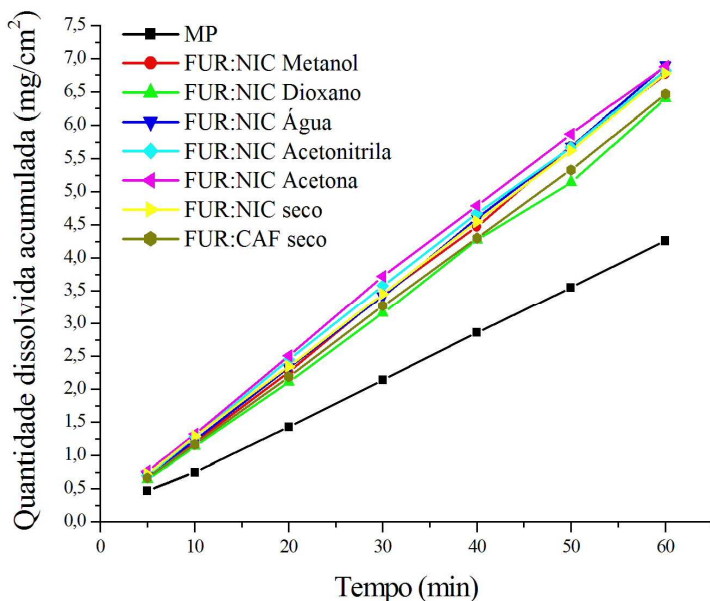


Figura 65 - Resultado gráfico da velocidade de dissolução intrínseca para as amostras após sete dias de armazenamento a 40 °C / 75 % UR (análise em tampão fosfato 5 mM pH 6,8 a 37 °C; doseamento por CLAE – UV 232 nm).

A análise das taxas de dissolução obtidas para cada duplicata das amostras permitiu estabelecer uma comparação entre as mesmas, muito embora algumas compreendessem misturas de fases (Tabela 18). Enquanto que pelo teste de Bartlett admitiu-se a hipótese de igualdade de variâncias, visto que  $B/K1$  foi menor que  $c_a^2(K-1)$ , a ANOVA possibilitou a rejeição da igualdade entre as médias (F calculado maior que F crítico). O Teste de Tukey, por sua vez, permitiu definir diferenças estatisticamente significativas entre a VDI dos cocrystalis e da FUR pura em nível de confiança de 5 %. Nas condições avaliadas experimentalmente definiu-se que as amostras obtidas no presente trabalho apresentam taxa de dissolução de amplitude aproximadamente

duas vezes superior que a FUR matéria-prima pura (polimorfo 1). Já quando se compararam as amostras entre si, não foram observadas diferenças significativas.

Tabela 18 - Resultados da análise estatística dos dados de dissolução obtidos para as amostras.

Amostras	Equação da reta	$r^2$	Taxa de dissolução média (mg/cm <sup>2</sup> .min)	Desvio padrão	CV%
FUR	$y = 0,0677x + 0,1351$	0,9992	0,068	0,00250	3,68
FUR:CAF	$y = 0,1052x + 0,1106$	0,9998	0,105	0,00198	1,89
FUR:NIC	$y = 0,1095x + 0,1795$	0,9999	0,111	0,00262	2,36
FUR:NIC água	$y = 0,1125x + 0,0986$	0,9997	0,113	0,00332	2,93
FUR:NIC metanol	$y = 0,1113x + 0,0833$	0,9997	0,111	0,00190	1,72
FUR:NIC acetonitrila	$y = 0,1106x + 0,2007$	0,9995	0,111	0,00170	1,53
FUR:NIC acetona	$y = 0,1120x + 0,2554$	0,9991	0,112	0,00120	1,07
FUR:NIC dioxano	$y = 0,1036x + 0,0852$	0,9989	0,104	0,00050	0,48

Teste de Bartlett		ANOVA	
$B/K1$	$c^2_{\alpha}(K-1)$	$F_{calculado}$	$F_{crítico}$
-6,59065	14,06714	152,54512	3,50046

$p \leq 0,05$

Ao avaliar comparativamente estes ensaios de dissolução com os propostos por Goud e colaboradores (2012), observou-se a mesma relação entre as taxas de dissolução do fármaco e do cocrystal FUR:CAF (x 2). Esta é uma observação interessante do ponto de vista analítico, já que, embora a estrutura cristalina destes materiais seja a mesma, os métodos de dissolução foram diferentes e obtiveram a mesma resposta. Entretanto, o diferencial do método de dissolução utilizado no presente trabalho compreende a baixa volatilidade do meio, o tempo de análise otimizado e os coeficientes de correlação observados.

O incremento na taxa de dissolução dos novos sólidos obtidos no presente trabalho estimularam a continuação de estudos de *screening* de cocrystalis em uma segunda etapa de experimentos. Neles, foram feitas associações de FUR com outros *formers* visando implementar a técnica.

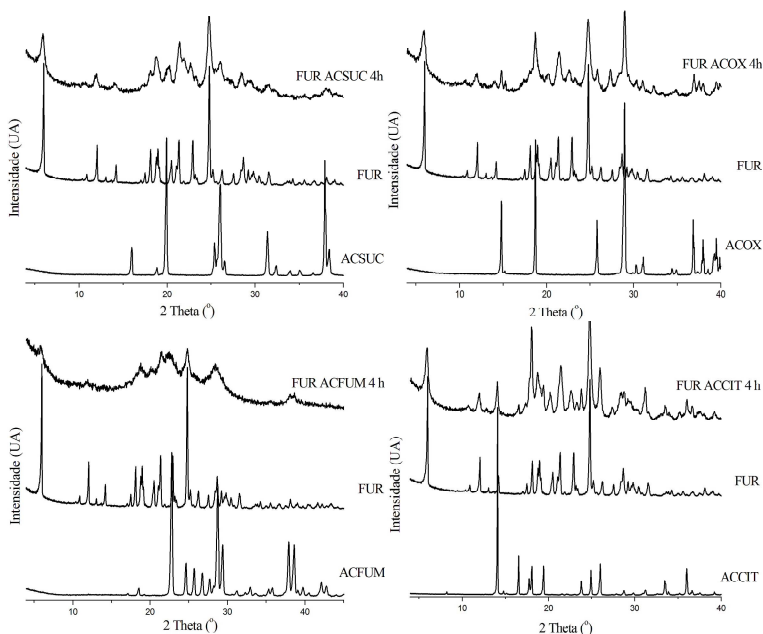
### 5.3.5 *Screening* de cocrystalis – moagem associada ao aquecimento

Com relação ao mecanismo de formação dos cocrystalis, a moagem com posterior tratamento térmico demonstrou ser uma importante ferramenta de *screening* e obtenção de novas formas sólidas (DELORI; FRIŠČIĆ; JONES, 2012; FRIŠČIĆ, 2012; FRIŠČIĆ;

JONES, 2012; JAMES et al., 2012). Neste sentido, também se avaliou a resposta de outras associações FUR:*former* a fim de identificar prováveis relações de complementaridade e tendências de interação entre os insumos. Foram selecionados diferentes grupos de *formers* de acordo com sua estrutura molecular: grupo 1 (moléculas lineares), grupo 2 (moléculas cíclicas) e grupo 3 (moléculas cíclicas conjugadas). Eles foram processados por moagem a seco durante 4 horas e caracterizados conforme descrito a seguir.

### 5.3.5.1 Grupo 1 – *Screening formers lineares*

O processamento de misturas envolvendo FUR e *formers* com estruturas lineares resultou em amostras com padrão de difração apresentando halo amorfo, mas com reflexões definidas, conforme Figura 66.



(continua na próxima página)

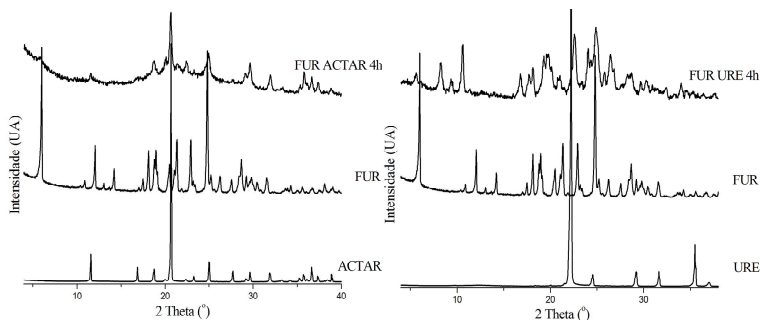


Figura 66 - Difratomogramas comparando as amostras processadas e os insumos de partida. URE – uréia. ACTAR – ácido tartárico. ACCIT – ácido cítrico. ACFUM – ácido fumárico. ACOX – ácido oxálico. ACSUC – ácido succínico. \*As intensidades não estão representadas equivalentemente.

Dentre os *formers* avaliados, apenas a uréia apresentou reflexões distintas dos insumos, dando evidências de se tratar de uma nova fase cristalina. A análise do espectro no IV demonstrou modificações em bandas características. Destaca-se a diminuição de intensidade e duplicidade da banda de estiramento S–O, bem como diminuição da intensidade das bandas de estiramento C–O e de dobramento N–H (Figura 67).

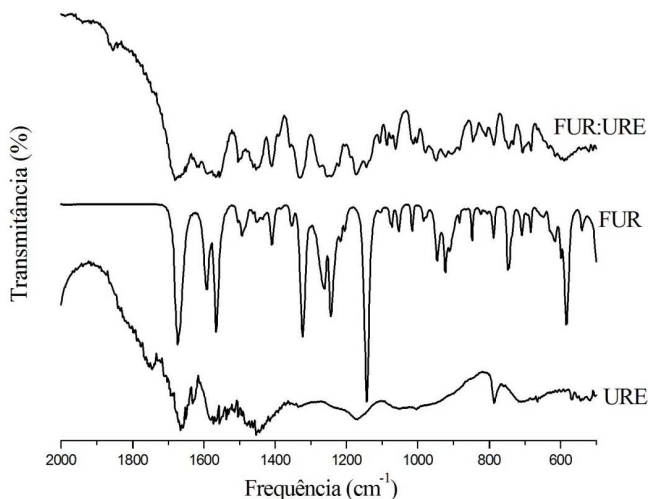


Figura 67 - Espectros IR comparando as amostras processadas e os insumos de partida URE – uréia, FUR – furosemida. FUR:URE – mistura fármaco *former*.

Além disso, a análise da curva DSC da amostra demonstrou a existência de evento de fusão em 151,8 °C, com entalpia de 43,59 J/g (Figura 68). Este evento apresentou-se intermediário entre a fusão da uréia (T = 131,0 °C) e da FUR (T = 219,5 °C), e corresponde a um bom indicativo de cocristalização em conjunto com as demais técnicas.

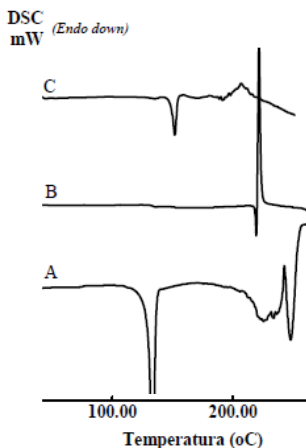


Figura 68 - Curvas DSC comparando as amostras processadas e os insumos de partida. A – uréia, B – furosemida. C – mistura fármaco *former* processada.

A partir desta análise preliminar, observou-se que nenhum dos compostos lineares apresentando grupamentos ácidos favoreceu as interações supramoleculares entre o fármaco e o *former*. O único composto promissor deste grupo, a uréia, apresenta estrutura particularmente diversa dos demais pela presença de uma amida. Goud e colaboradores (2012) já relataram a cocristalização de FUR com uréia, entretanto, a estrutura não foi resolvida.

### 5.3.5.2 Grupo 2 – *Screening formers* cíclicos

O processamento de misturas envolvendo FUR e *formers* com estruturas cíclicas também resultou em amostras com padrão de difração parcialmente amorfo, mas que apresentaram indícios de reflexos, exceto para a alantoína e o ácido nicotínico, os quais apresentaram um grau de amorfização mais elevado (Figura 69).



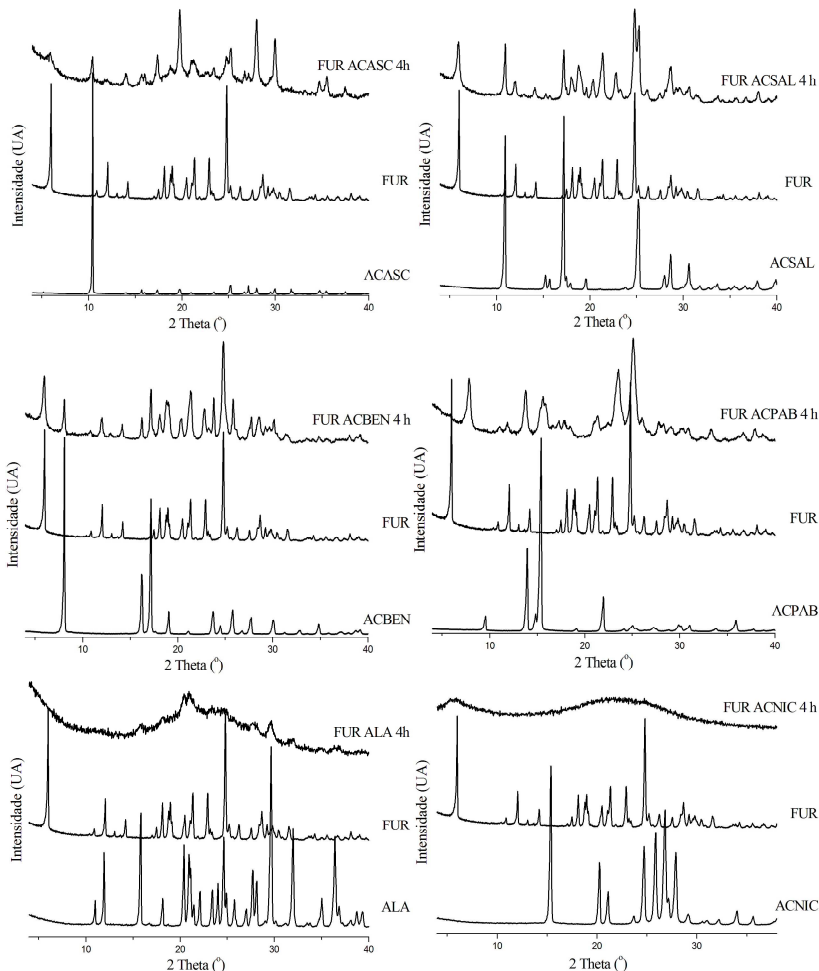


Figura 69 - Difratogramas comparando as amostras processadas e os insumos de partida. ACNIC – ácido nicotínico. ALA – alantóina. ACPAB – ácido p-aminobenzóico. ACBEN – ácido benzóico. ACSAL – ácido salicílico. ACASC – ácido ascórbico. \*As intensidades não estão representadas equivalentemente.

Dentre as amostras cristalinas, destaca-se o material obtido com o ácido p-aminobenzóico, por apresentar reflexões diferentes dos insumos de partida (GOUD et al., 2012). Já o ácido benzóico, embora divirja do ácido p-aminobenzóico apenas pela ausência de um grupamento amina, não interage com a FUR e ambas as fases se mantêm segregadas. Neste sentido, a análise do espectro no IV para FUR:ácido p-aminobenzóico

também sugere modificações no ambiente químico supramolecular do material. A Figura 70 representa a zona de *fingerprint* do IV para as amostras.

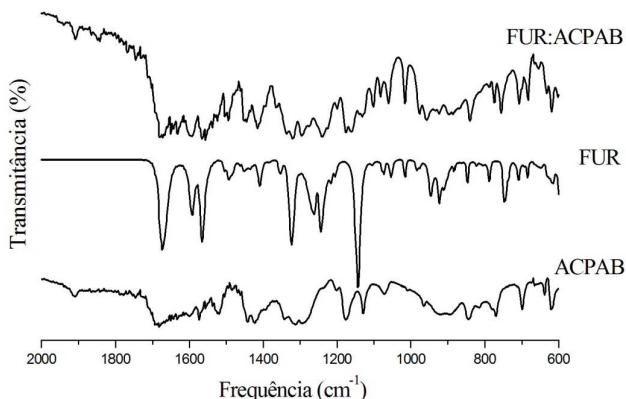


Figura 70 - Espectros IR comparando as amostras processadas e os insumos de partida. ACPAB – ácido p-aminobenzóico, FUR – furosemida. FUR:ACPAB – mistura fármaco *former* processada.

Além destas análises, a amostra FUR:ácido p-aminobenzóico foi avaliada por DSC. Entretanto, esta técnica não se apresentou discriminatória/conclusiva a respeito da investigação de modificações sólidas no material. Isso ocorreu pela semelhança do perfil termoanalítico da amostra moída e da mistura física, nas quais se verificou evento endotérmico característico de fusão em 190,9 °C e 190,6 °C, respectivamente (Figura 71).

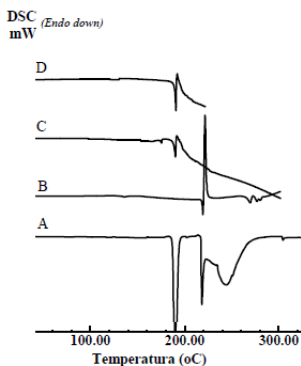


Figura 71 - Curvas DSC comparando as amostras processadas e os insumos de partida. A – ácido p-aminobenzóico, B – furosemida. C – mistura física fármaco *former*. D – mistura fármaco:*former* processada.

Da mesma forma, os materiais predominantemente amorfos obtidos a partir da moagem com alantofina e ácido nicotínico foram avaliados por DSC (Figura 72).

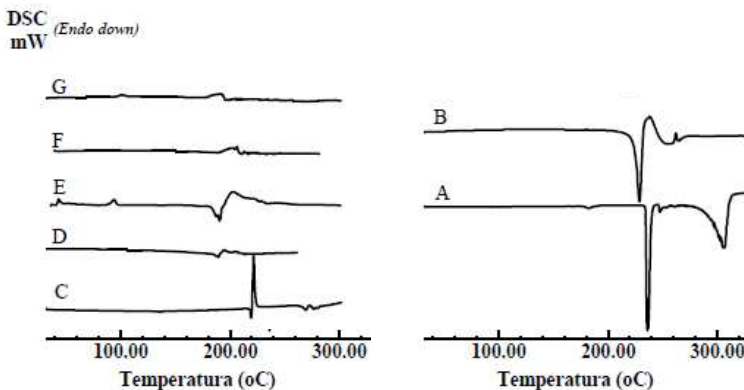


Figura 72 - Curvas DSC comparando as amostras processadas e os insumos de partida. A – ácido nicotínico. B – alantofina. C – furosemeida. D – mistura física FUR:ácido nicotínico. E – mistura FUR:ácido nicotínico processada. F – mistura física FUR:alantofina. G – mistura FUR:alantofina processada.

Observaram-se comportamentos termoanalíticos distintos dos insumos, porém semelhantes às misturas físicas dos compostos. A exceção foi a amostra moída com ácido nicotínico, a qual também apresentou dois eventos exotérmicos característicos de recristalização em 43,4 °C ( $\Delta H = 16,63 \text{ J/g}$ ) e 93,9 °C ( $\Delta H = 29,92 \text{ J/g}$ ).

O comportamento destes sólidos foi melhor investigado por DRX em câmara de aquecimento com taxa de 10 °C/min (Figura 73). Verificou-se que os materiais obtidos após etapa de aquecimento compreenderam as fases FUR e *former* segregadas. Alguns trabalhos relatam que diferentes taxas de aquecimento/resfriamento são parâmetros determinantes na cocristalização a partir de gradientes de temperatura. Por conseguinte, no caso da alantofina, também foram realizados testes utilizando taxa de aquecimento menor (2 °C/min). Porém, estes ensaios não identificaram a obtenção de nova fase cristalina, apenas segregação das fases dos insumos.

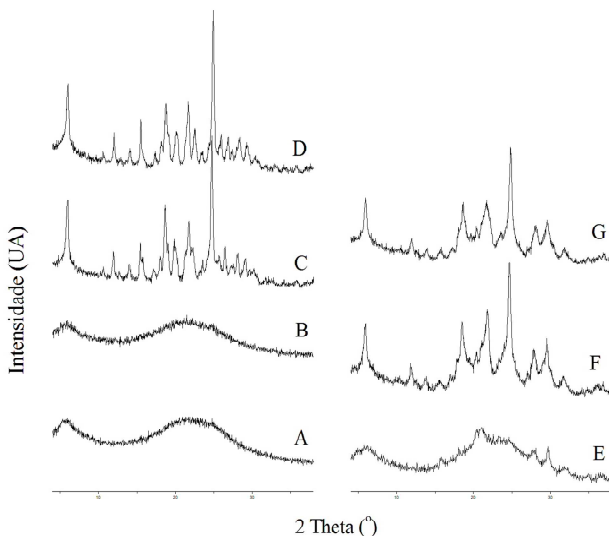


Figura 73 - Resultados da evolução de FUR:*former* frente o aquecimento (taxa de 10 °C/min). À esquerda estão apresentados os difratogramas do sistema FUR:ácido nicotínico antes do aquecimento em 25 °C (A), durante o aquecimento em 55 °C (B), durante o aquecimento em 110 °C (C) e após resfriamento em 25 °C (D). À direita estão apresentados os difratogramas do sistema FUR:alantoína antes do aquecimento em 25 °C (E), durante o aquecimento em 110 °C (F) e após resfriamento em 25 °C (G). \*As intensidades não estão representadas equivalentemente.

O surgimento de novas fases cristalinas em mistura com insumos, a ocorrência de amorfização e as evidências de interação no IV de alguns dos materiais sugerem que eles sejam *formers* promissores para a cocristalização com FUR. No caso dos materiais amorfos que não formaram novas fases com aquecimento, acredita-se que a cocristalização apresente barreira energética que possa ser contornada por LAG. Estudos futuros necessitam ser realizados a fim de esclarecer o fenômeno de cocristalização com estes compostos e as relações estruturais existentes.

### 5.3.5.3 Grupo 3 – *Screening formers* cíclicos conjugados

O processamento de misturas envolvendo FUR e *formers* com estruturas cíclicas conjugadas também resultou em amostra parcialmente amorfa e com reflexões características dos insumos de partida no caso

da sacarina, bem como amostra totalmente amorfa no caso da teofilina (Figura 74).

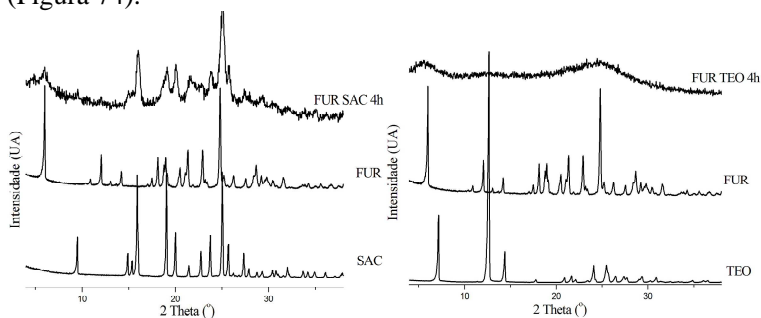


Figura 74 - Difratomogramas comparando as amostras processadas e os insumos de partida. TEO – teofilina. FUR – furosemida. SAC – sacarina. \*As intensidades não estão representadas equivalentemente.

A amostra amorfa FUR:teofilina também foi analisada frente a variações de temperatura (Figura 75). Assim como a CAF anteriormente estudada, a teofilina compreende uma metilxantina. Sua estrutura diverge da CAF apenas pela ausência de uma metila substituída no anel imidazólico. Esperava-se que, pela similaridade com a CAF, este sistema FUR:teofilina respondesse de modo muito semelhante durante o *screening* realizado. Comportamento semelhante foi verificado nas análises por DSC. O material processado FUR:teofilina apresentou evento exotérmico em 125,0 °C ( $\Delta H = 53,82$  J/g) e evento endotérmico característico de fusão ( $T = 191,2$  °C) sucedido por reação exotérmica típica da degradação de FUR.

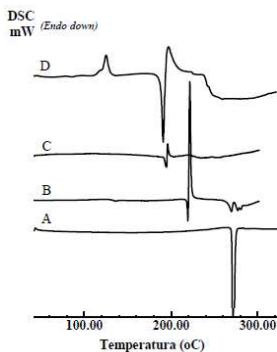


Figura 75 - Curvas DSC comparando a amostra processada e os insumos de partida. A – teofilina. B – furosemida. C – mistura física FUR:ácido teofilina. D – mistura FUR:teofilina processada.

Entretanto, surpreendentemente as análises da amostra por DRX acoplado com câmara de temperatura não verificaram indícios de cocristalização, apenas segregação de fases em ambas as taxas de aquecimento utilizadas (2 °C/min e 10 °C/min) (Figura 76).

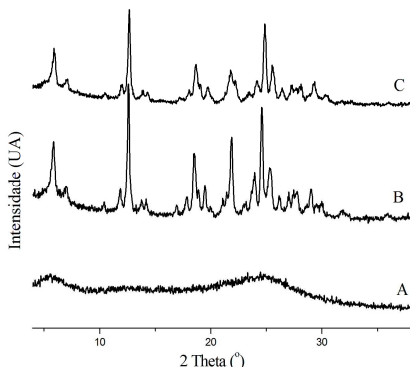


Figura 76 - Resultados da evolução de FUR:*former* frente ao aquecimento (taxa de 10 °C/min). Estão apresentados os difratogramas do sistema FUR:teofilina antes do aquecimento em 25 °C (A), durante o aquecimento em 150 °C (B) e após resfriamento em 25 °C (C). \*As intensidades não estão representadas equivalentemente.

Acredita-se que modificações na conformação das moléculas e o incremento da basicidade da CAF tenham favorecido a cocristalização com FUR, o que não ocorreu no sistema FUR:teofilina. Divergências entre estes mesmos *formers* já foram relatadas em outros estudos envolvendo a cocristalização de cafeína e teofilina com ácido cítrico (KARKI et al., 2007b). Sugere-se que estudos envolvendo LAG sejam realizados a fim de avaliar qual o mecanismo envolvido nas diferenças de cocristalização observadas para os dois componentes.

#### 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FUR compreendeu um modelo de estudo muito interessante na investigação dos mecanismos de formação de cocristais. A comparação dos resultados obtidos frente ao estudo com diferentes *formers* destaca o efeito associado que a forma molecular e a presença de determinados grupamentos químicos exercem. Sugere-se que a presença de grupamentos amina/amida e a complementaridade conformacional com as moléculas de FUR seja um fator preponderante na sua cocristalização. Entretanto, as relações observadas entre as

transformações sólidas/cristalizações e a exposição dos materiais à umidade e ao calor, indicam que além da afinidade molecular, outro fator tende a direcionar fortemente as reações de cocristalização: a energia de ativação do sistema. Embora esta possa parecer uma característica clara e inquestionável, a identificação de maneiras e ferramentas capazes de sobrepor estas barreiras energéticas em reações sólidas não é trivial.

No caso dos cocristais de FUR com CAF e NIC, observou-se que as reações ocorreram especialmente mediadas pela fase de vapor e pela fase amorfa, respectivamente. Embora os experimentos utilizando solventes e exposição à umidade sugerem a existência de mecanismos complexos e complementares na formação dos cocristais, percebe-se que alguns deles demonstram ser preferíveis a outros dentro dos diferentes sistemas fármaco:*former* avaliados. Este efeito pode estar relacionado com a afinidade das moléculas, com a estabilidade das fases, com a quantidade de energia necessária para a reação e com a mobilidade molecular.

Acredita-se que a maior rigidez do sistema FUR:CAF de Ueto et al. (2011) tenha favorecido a sua formação em diferentes condições de moagem e a sua estabilidade frente ao armazenamento. A Figura 77 demonstra as transformações sólidas de acordo com os resultados do presente trabalho.

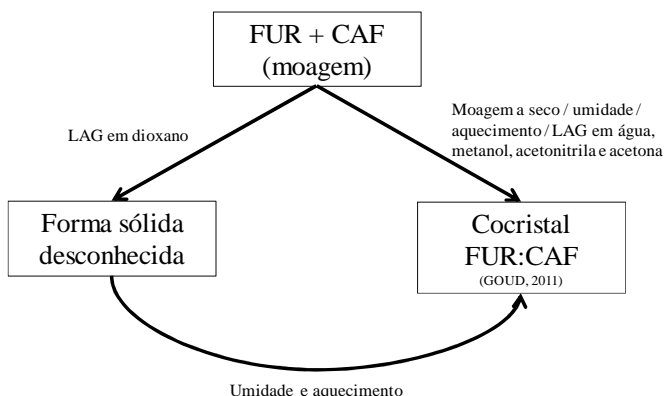


Figura 77 - Representação das transformações sólidas observadas no presente trabalho (FUR:CAF).

Em contrapartida, o sistema FUR:NIC apresentou diversas formas cristalinas obtidas a partir da moagem e do armazenamento. Os

estudos realizados também permitiram esboçar um esquema das relações sólidas observadas entre os materiais obtidos a partir de NIC (Figura 78).

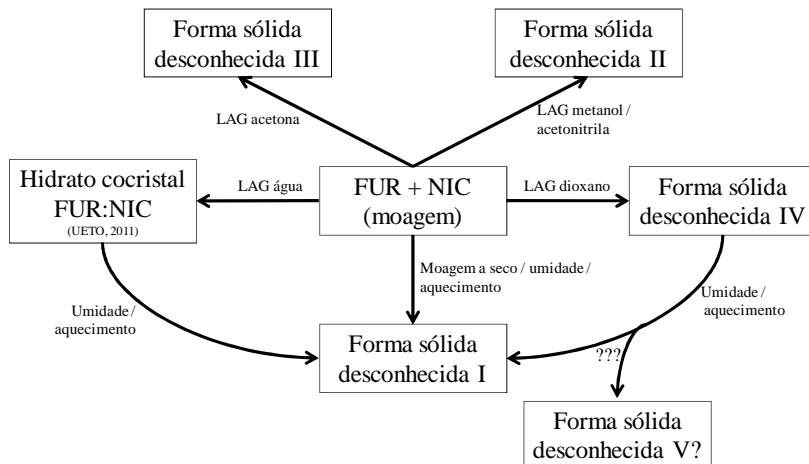


Figura 78 - Representação das transformações sólidas observadas no presente trabalho (FUR:NIC).

Verifica-se que o sistema com NIC compreendeu avaliação complexa dentro das limitações das técnicas utilizadas. Por isso, perspectivas de estudos adicionais envolvendo RMN sólido e resolução estrutural a partir de DRX pó estão sendo analisadas.

Demonstrou-se que sistemas cocrystalinos podem ser obtidos na forma de polimorfos e apresentar relações de transformação física intrincadas. Aparentemente, a formação de estruturas cristalinas distintas foi mediada principalmente pela presença de fase líquida/vapor de diferentes naturezas. O efeito dos solventes na moagem também demonstrou ser preponderante no aprimoramento da cinética da cocrystalização, ao resultar em sólidos mais cristalinos durante LAG. Neste sentido, a técnica de moagem assistida é vista com grande expectativa na avaliação das amostras que falharam na cocrystalização por moagem a seco e posterior aquecimento durante os ensaios de *screening* com *formers* diversos. Aparentemente, estes são importantes modelos de análise do mecanismo de formação dos cocrystalais de FUR.

Além disso, verificou-se que os sólidos obtidos apresentaram aprimoramento do desempenho frente à matéria-prima pura. Os estudos da estabilidade dos materiais frente à luz UV e frente a condições de



degradação forçada em câmara de umidade não evidenciaram a formação de produtos de degradação no período de análise, embora o teor tenha se modificado ou demonstrado oscilações. Estas características, associadas ao incremento da taxa de dissolução dos cocristais, estimulam futuros estudos de investigação sólida visando aplicação farmacêutica.

Verifica-se que este compreende um tema muito vasto e que necessita de técnicas de caracterização e análise físico-química refinadas. No que se refere às técnicas de doseamento dos cocristais e acompanhamento dos ensaios de estabilidade, destaca-se como desafio futuro a investigação do fenômeno de heterogeneidade observado pelas flutuações no teor dos materiais.

Ao finalizar estes experimentos com moagem, evidenciou-se que a complexidade do tema “cocrystalização” não finda os estudos, pelo contrário, abre um horizonte de perguntas e modelos experimentais. Muito além da aplicação específica nos sistemas avaliados, acredita-se que o conhecimento e os avanços nesta área compreendem ferramentas estratégicas importantes para o desenvolvimento técnico-científico nos moldes da Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde.



## 6 CONCLUSÕES

- O método desenvolvido, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa e estudos de estabilidade de furosemida matéria-prima e de cocristais do fármaco.
- O uso de aparato de Wood's modificado em 250 mL de tampão fosfato de potássio 5 mM a  $37 \pm 0,5$  °C, com velocidade de 75 rpm e tratamento prévio apropriado da amostra, demonstrou resultados satisfatórios para a determinação da taxa de dissolução de furosemida em matérias-primas e em cocristais. O método desenvolvido, associado à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso e exato para a análise da dissolução de furosemida em matéria-prima e em cocristais.
- A cristalização de furosemida em solução levou à obtenção e caracterização de materiais diferenciados conforme a composição cristalina, o hábito cristalino e o comportamento na dissolução. Aparentemente, várias características sólidas interferiram no desempenho dos materiais, destacando-se a influência das partículas.
- O *screening* de cocristais farmacêuticos contendo furosemida demonstrou ser mais bem sucedido em sistemas utilizando moagem, quando comparado a sistemas de cristalização em gel e em solução. Os ensaios demonstraram que a utilização dos *formers* cafeína, nicotinamida, uréia, ácido p-aminobenzóico, alantoína, ácido nicotínico e teofilina, é promissora na síntese supramolecular de cocristais contendo furosemida.
- A moagem assistida com solventes resultou em materiais apresentando maior cristalinidade e possibilitou a obtenção de fases cristalinas diversificadas.
- A associação da moagem com condições de aquecimento e umidade promoveu reações de cristalização e transformação de fase nos sistemas envolvendo furosemida associada à nicotinamida e à cafeína. Enquanto que o sistema com cafeína demonstrou maior estabilidade cristalina, sistemas contendo nicotinamida demonstraram maior susceptibilidade a

transformações físicas frente a condições de temperatura e umidade elevadas.

- A moagem de furosemida:caféina permitiu a obtenção e a caracterização de duas modificações cristalinas, sendo uma inédita. A formação dos materiais deste grupo parece ser mediada pela fase de vapor e pela afinidade conformacional entre os componentes.
- A moagem de furosemida:nicotinamida aparentemente permitiu a obtenção e a caracterização de seis modificações cristalinas, sendo cinco inéditas. A formação dos materiais deste grupo parece ser mediada por um conjunto de fatores, destacando-se a influência da fase amorfa.
- Estudos adicionais necessitam ser realizados para estabelecer as relações cristalinas existentes nas modificações sólidas de furosemida:caféina e furosemida:nicotinamida.
- Os diferentes sistemas de cocristalização obtidos com furosemida:caféina e furosemida:nicotinamida foram avaliados em comparação com o fármaco puro conforme a taxa de dissolução intrínseca. As modificações sólidas apresentaram taxa de dissolução intrínseca aproximadamente duas vezes superior à furosemida.
- Os sistemas de cocristalização compreendidos por furosemida:caféina a seco e por furosemida:nicotinamida a seco e em metanol foram avaliados em comparação com o fármaco puro sob condições de degradação forçada em luz UV 254 nm. Após 15 dias de exposição todos os materiais apresentaram degradação superior a 5 %. Verificou-se que as modificações cristalinas não foram capazes de aprimorar a estabilidade do fármaco frente à luz.

## REFERÊNCIAS

- AAKERÖY, C. B.; DESPER, J.; URBINA, J. F. Supramolecular reagents: versatile tools for non-covalent synthesis. **Chemical communications**, n. 22, p. 2820-2822, 2005.
- AAKERÖY, C. B.; FASULO, M. E.; DESPER, J. Cocrystal or salt: Does it really matter? **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 317-322, 2007.
- AALTONEN, J.; GORDON, K. C.; STRACHAN, C. J.; RADES, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterise pharmaceutical solids. **International journal of pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 159-169, 2008.
- ABDUL-RASOOL, B. K.; FAHMY, S. A.; ABDUL-GALEEL, O. W. Impact of chitosan as a disintegrant on the bioavailability of furosemide tablets: in vitro evaluation and in vivo simulation of novel formulations. **Pakistanese Journal of Pharmaceutical Science**, v. 25, n. 4, p. 815-822, 2012.
- ABOU-AUDA, H. S.; AL-YAMANI, M. J.; MORAD, A. M.; BAWAZIR, S. A.; KHAN, S. Z.; AL-KHAMIS, K. I. High-performance liquid chromatographic determination of furosemide in plasma and urine and its use in bioavailability studies. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences Applications**, v. 710, n. 1-2, p. 121-128, 1998.
- ACEVES, J. M.; CRUZ, R.; HERNANDEZ, E. Preparation and characterization of Furosemide-Eudragit controlled release systems. **International journal of pharmaceutics**, v. 195, n. 1, p. 45-53, 2000.
- ADRJANOWICZ, K.; KAMINSKI, K.; GRZYBOWSKA, K.; HAWELEK, L.; PALUCH, M.; GRUSZKA, I.; ZAKOWIECKI, D.; SAWICKI, W.; LEPEK, P.; KAMYSZ, W.; GUZIK, L. Effect of cryogrinding on chemical stability of the sparingly water-soluble drug furosemide. **Pharmaceutical research**, v. 28, n. 12, p. 3220-3236, 2011a.
- ADRJANOWICZ, K.; KAMINSKI, K.; GRZYBOWSKA, K.; HAWELEK, L.; PALUCH, M.; GRUSZKA, I.; ZAKOWIECKI, D.; SAWICKI, W.; LEPEK, P.; KAMYSZ, W.; GUZIK, L. Effect of cryogrinding on chemical stability of the sparingly water-soluble drug furosemide. **Pharm Res**, v. 28, n. 12, p. 3220-3236, 2011b.

AI, H.; JONES, S. A.; DE VILLIERS, M. M.; LVOV, Y. M. Nano-encapsulation of furosemide microcrystals for controlled drug release. **Journal of controlled release**, v. 86, n. 1, p. 59-68, 2003.

AITIPAMULA, S.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Conformational and enantiotropic polymorphism of a 1: 1 cocrystal involving ethenzamide and ethylmalonic acid. **Crystal Engineering Communications**, v. 12, n. 11, p. 3691-3697, 2010.

AITIPAMULA, S.; BANERJEE, R.; BANSAL, A. K.; BIRADHA, K.; CHENEY, M. L.; CHOUDHURY, A. R.; DESIRAJU, G. R.; DIKUNDWAR, A. G.; DUBEY, R.; DUGGIRALA, N. Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.

ALBUQUERQUE, V. Mercado farmacêutico mundial pode chegar a US\$ 1,3 trilhão em 2020. **Folha Online**, v. n. p. 2007. Disponível em: <folha.com.br>. Acesso em: mai 2010.

ALHALAWEH, A.; VELAGA, S. P. Formation of cocrystals from stoichiometric solutions of incongruently saturating systems by spray drying. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 8, p. 3302-3305, 2010.

ALLESØ, M.; VAN DEN BERG, F.; CORNETT, C.; JØRGENSEN, F. S.; HALLING-SØRENSEN, B.; DE DIEGO, H. L.; HOVGAARD, L.; AALTONEN, J.; RANTANEN, J. Solvent diversity in polymorph screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2145-2159, 2007.

AMBROGI, V.; PERIOLI, L.; PAGANO, C.; MARMOTTINI, F.; RICCI, M.; SAGNELLA, A.; ROSSI, C. Use of SBA-15 for furosemide oral delivery enhancement. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 46, n. 1-2, p. 43-48, 2012.

AMSCHLER, H.; KLEMM, K.; LUDWIG, G. **Urapidil/Furosemide compounds, compositions and use**: secondary title. United States: BYK Gulden Lomberg Chemische, 1978. 4,131,678, 7 p.

ANDRADE, P. A. **Análise da Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde (1990 a 2004): a influência de atores e agendas internacionais**. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Serviço Social, Universidade de Brasília, 2007. 224 p.

ASKER, A. F.; FERDOUS, A. J. Photodegradation of furosemide solutions. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 158-162, 1996.

ATKINSON, M. B. J.; BUČAR, D. K.; SOKOLOV, A. N.; FRIŠČIĆ, T.; ROBINSON, C. N.; BILAL, M. Y.; SINADA, N. G.; CHEVANNES, A.; MACGILLIVRAY, L. R. General application of mechanochemistry to templated solid-state reactivity: rapid and solvent-free access to crystalline supermolecules. **Chemical communications**, n. 44, p. 5713-5715, 2008.

AUGSBURGUER, L. L.; HOAG, S. W. **Pharmaceutical dosage form: tablets. Rational design and formulation**. New York: Informa Healthcare, 2008.

AYALA, A.; SIESLER, H.; BOESE, R.; HOFFMANN, G.; POLLA, G.; VEGA, D. Solid state characterization of olanzapine polymorphs using vibrational spectroscopy. **International journal of pharmaceutics**, v. 326, n. 1, p. 69-79, 2006.

BABU, N. J.; CHERUKUVADA, S.; THAKURIA, R.; NANGIA, A. Conformational and synthon polymorphism in furosemide (Lasix). **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 4, p. 1979-1989, 2010.

BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 7, p. 2662-2679, 2011.

BAERT, L. E. C.; REMENAR, J. F.; SANSONE, M. F.; TAWA, M. **Co-crystal of etravirine and nicotinamide**: secondary title. Europe Union: Tibotec Pharmaceuticals, 2012. EP 2413936 A1, 12 p.

BAG, P. P.; PATNI, M.; REDDY, C. M. A kinetically controlled crystallization process for identifying new co-crystal forms: fast evaporation of solvent from solutions to dryness. **Crystal Engineering Communications**, v. 13, n. 19, p. 5650-5652, 2011.

BAJERSKI, L.; ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; BERGOLD, A. M.; FRÖEHLICH, P. E. Development and validation of a discriminating in vitro dissolution method for a poorly soluble drug, olmesartan medoxomil: comparison between commercial tablets. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 637-644, 2010.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 28, n. 6, p. 1011-1040, 2002.

BARANOWSKA, I.; WILCZEK, A.; BARANOWSKI, J. Rapid UHPLC method for simultaneous determination of vancomycin, terbinafine, spironolactone, furosemide and their metabolites: application to human plasma and urine. **Analytical Sciences**, v. 26, n. 7, p. 755-759, 2010.

BARBAS, R.; MARTÍ, F.; PROHENS, R.; PUIGJANER, C. Polymorphism of norfloxacin: Evidence of the enantiotropic relationship between polymorphs A and B. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 6, p. 1463-1467, 2006.

BARSKY, I.; BERNSTEIN, J.; STEPHENS, P. W.; STONE, K. H.; CHEUNG, E.; HICKEY, M. B.; HENCK, J. O. Disappearing and reappearing polymorphism in p-methylchalcone. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 1, p. 63-70, 2007.

BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, P.; ANTONIELLA, E.; RODOMONTE, A. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 5, p. 1105-1113, 2006.

BASAVOJU, S.; BOSTRÖM, D.; VELAGA, S. P. Indomethacin–saccharin cocrystal: design, synthesis and preliminary pharmaceutical characterization. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 3, p. 530-541, 2008.

BERNSTEIN, J. ... And Another Comment on P pseudo polymorphism. **Crystal Growth & Design**, v. 5, n. 5, p. 1661-1662, 2005.

BERNSTEIN, J. Polymorphism– A Perspective. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 3, p. 632-650, 2011.

BETHUNE, S. J.; HUANG, N.; JAYASANKAR, A.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Understanding and predicting the effect of cocrystal components and pH on cocrystal solubility. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 9, p. 3976-3988, 2009.

BETHUNE, S. J.; SCHULTHEISS, N.; HENCK, J. O. Improving the poor aqueous solubility of nutraceutical compound pterostilbene through



cocrystal formation. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 7, p. 2817-2823, 2011.

BEYERS, H.; MALAN, S.; VAN DER WATT, J.; DE VILLIERS, M. Structure-solubility relationship and thermal decomposition of furosemide. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 26, n. 10, p. 1077-1083, 2000.

BHOGALA, B. R.; CHANDRAN, S. K.; REDDY, L. S.; THAKURIA, R.; NANGIA, A. Molecular networks. Design and serendipity. **Crystal Engineering Communications**, v. 10, n. 12, p. 1735-1738, 2008.

BISWAS, N. Solid forms and Pharmacokinetics. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

BLAGDEN, N.; DE MATAS, M.; GAVAN, P.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617-630, 2007.

BOLDYREV; TKÁČOVÁ. Mechanochemistry of solids: past, present, and prospects. **Journal of Materials Synthesis and processing**, v. 8, n. 3, p. 121-132, 2000.

BOLDYREV. Mechanochemistry and mechanical activation of solids. **Russian Chemical Reviews**, v. 75, n. 3, p. 177, 2007.

BOLUKBASI, O.; YILMAZ, A. X-ray structure analysis and vibrational spectra of Furosemide. **Vibrational Spectroscopy**, v., n., p., 2012.

BOND, A. D. Fundamental Aspects of Salts and Co-crystals. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

BORGMANN; BERNARDI, L. S.; RAUBER, G. S.; OLIVEIRA, P. R.; CAMPOS, C. E. M.; MONTI, G.; CUFFINI, S. L.; CARDOSO, S. G. Solid-state characterization and dissolution properties of Fluvastatin sodium salt hydrates. **Pharmaceutical Development Technology**, n. 00, p. 1-10, 2012.

BORGMANN, S. H. M.; PARCIANELLO, L.; AREND, M. Z.; BAJERSKI, L.; CARDOSO, S. G. Development and validation of a

dissolution method with spectrophotometric analysis for diacerein capsules. **Science Pharmaceutics**, v. 76, n., p. 541-554, 2008.

BOWMAKER, G. A. Solvent-assisted mechanochemistry. **Chemical communications**, v. 49, n. 4, p. 334-348, 2013.

BRADER, M. L.; SUKUMAR, M.; PEKAR, A. H.; MCCLELLAN, D. S.; CHANCE, R. E.; FLORA, D. B.; COX, A. L.; IRWIN, L.; MYERS, S. R. Hybrid insulin cocrystals for controlled release delivery. **Nature biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 800-804, 2002.

BRAGA, D.; DESIRAJU, G. R.; MILLER, J. S.; ORPEN, A. G.; PRICE, S. S. L. Innovation in crystal engineering. **Crystal Engineering Communications**, v. 4, n. 83, p. 500-509, 2002.

BRAGA, D.; GREPIONI, F. Making crystals from crystals: a green route to crystal engineering and polymorphism. **Chemical communications**, n. 29, p. 3635-3645, 2005.

BRAGA, D.; GIAFFREDA, S. L.; GREPIONI, F.; CHIEROTTI, M. R.; GOBETTO, R.; PALLADINO, G.; POLITO, M. Solvent effect in a "solvent free" reaction. **Crystal Engineering Communications**, v. 9, n. 10, p. 879-881, 2007.

BRAMMER, L. Hydrogen Bonds in Inorganic Chemistry: Application to Crystal Design. In: Desiraju, G. R. (Ed.). **Crystal Design: Structure and Function**. London: John Wiley & Sons, Inc., 2003. v.7, p.390. (Perspectives in Supramolecular Chemistry)

BRANHAM, M. L.; MOYO, T.; GOVENDER, T. Preparation and solid-state characterization of ball milled saquinavir mesylate for solubility enhancement. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 194-202, 2012.

BRASIL. Portaria 899, de 29 de maio de 2003. v. n. p. 2003. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 2011/2012.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Política nacional de ciência, tecnologia e inovação em saúde**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 44 p.

BRASIL. Banco de dados - medicamentos registrados. 2013a. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan 2013.

BRASIL. Anvisa divulga dados sobre inspeção internacional de insumos. 2013b. Disponível em: <portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: jan 2013.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL, V. **Ciências Farmacêuticas. Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: Editora Univali, 2003. 239 p.

BRITISH PHARMACOPOEIA. British Pharmacopoeia Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, 2009.

BRITAIN. **Physical Characterization of Pharmaceutical Solids.** New York: Marcel Dekker, Inc., 1995, v.70. 424 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)

BRITAIN. **Spectroscopy in Pharmaceutical Solids.** New York: Informa Healthcare, 2006, v.160. 557 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)

BRITAIN. Polymorphism and solvatomorphism 2007. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 5, p. 1617-1642, 2008.

BRITAIN. Vibrational Spectroscopic Studies of Cocrystals and Salts. 2. The Benzylamine– Benzoic Acid System. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 8, p. 3497-3503, 2009a.

BRITAIN. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids.** New York: Informa Healthcare, 2009b, v.192. 640 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)

BRITAIN. Polymorphism and solvatomorphism 2010. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v., n., p., 2012a.

BRITAIN. Cocrystal Systems of Pharmaceutical Interest: 2010. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 2, p. 1046-1054, 2012b.

BRITAIN, H. G. Effects of mechanical processing on phase composition. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 7, p. 1573-1580, 2002.

BRUNI, G.; GOZZO, F.; CAPSONI, D.; BINI, M.; MACCHI, P.; SIMONCIC, P.; BERBENNI, V.; MILANESE, C.; GIRELLA, A.;

FERRARI, S. Thermal, spectroscopic, and ab initio structural characterization of carprofen polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 6, p. 2321-2332, 2011.

BUČAR, D. K.; HENRY, R. F.; DUERST, R. W.; LOU, X.; MACGILLIVRAY, L. R.; ZHANG, G. G. Z. A 1: 1 cocrystal of caffeine and 2-hydroxy-1-naphthoic acid obtained via a slurry screening method. **Journal of Chemical Crystallography**, v. 40, n. 11, p. 933-939, 2010.

BUCHHOLZ, J. B.; BUSCHMANN, H. H.; BERTRAN, J. C. C.; CARANDELL, L. S. **Cocrystals of duloxetine and co-crystal formers for the treatment of pain**. European Union: Laboratorios del Dr. Esteve, S.A., Barcelona (ES), 2009. EP 2123626 A1, 10 p.

BUCKTON, G. Propriedades do estado sólido. In: Aulton, M. E. e Ortega, G. G. (Ed.). **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005,

BUSCHMANN, H. H.; TESSON, N.; FARRAN, J. **Co-crystals of tramadol and paracetamol**. European Union: Laboratorios del Dr. Esteve, S.A., Barcelona (ES), 2010. EP 2199274 A1, 19 p.

BYRN; PFEIFFER; STOWELL. **Solid-State Chemistry of Drugs**. Indiana: SSCI, Inc., 1999. 576 p.

BYRN; XU, W.; NEWMAN, A. W. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 115-136, 2001.

BYSOUTH, S. R.; BIS, J. A.; IGO, D. Cocrystallization via planetary milling: Enhancing throughput of solid-state screening methods. **International journal of pharmaceutics**, v. 411, n. 1, p. 169-171, 2011.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2009. 992 p.

CARDA-BROCH, S.; ESTEVE-ROMERO, J.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. Furosemide assay in pharmaceuticals by Micellar liquid chromatography: study of the stability of the drug. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 23, n. 5, p. 803-817, 2000.

CARSTENSEN, J. T. **Advanced Pharmaceutical Solids**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 518 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)

CASSIDY, A. M.; GARDNER, C. E.; JONES, W. Following the surface response of caffeine cocrystals to controlled humidity storage by atomic force microscopy. **International journal of pharmaceutics**, v. 379, n. 1, p. 59-66, 2009.

CHAFETZ, L.; PHILLIP, J. **Furosemide salts and pharmaceutical preparations thereof**. Estados Unidos: Warner-Lambert Co., Morris Plains, N.J., 1987. 4,663,348, 4 p.

CHAWLA, S.; GHOSH, S.; SIHORKAR, V.; NELLORE, R.; KUMAR, T. R.; SRINIVAS, N. R. High-performance liquid chromatography method development and validation for simultaneous determination of five model compounds, antipyrine, metoprolol, ketoprofen, furosemide and phenol red, as a tool for the standardization of rat in situ intestinal permeability studies using timed wavelength detection. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 4, p. 349-357, 2006.

CHEN, J.; SARMA, B.; EVANS, J. M. B.; MYERSON, A. S. Pharmaceutical crystallization. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 4, p. 887-895, 2011.

CHENG, W. T.; LIN, S. Y. Famotidine polymorphic transformation in the grinding process significantly depends on environmental humidity or water content. **International journal of pharmaceutics**, v. 357, n. 1, p. 164-168, 2008.

CHERUKUVADA, S.; BABU, N. J.; NANGIA, A. Nitrofurantoin-p-aminobenzoic acid cocrystal: Hydration stability and dissolution rate studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 8, p. 3233-3244, 2011.

CHIENG, N.; HUBERT, M.; SAVILLE, D.; RADES, T.; AALTONEN, J. Formation Kinetics and Stability of Carbamazepine– Nicotinamide Cocrystals Prepared by Mechanical Activation. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 5, p. 2377-2386, 2009.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 4, p. 618-644, 2011.

CHIKHALIA, V.; FORBES, R.; STOREY, R.; TICEHURST, M. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2006a.

CHIKHALIA, V.; FORBES, R. T.; STOREY, R. A.; TICEHURST, M. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2006b.

CHILDS, S. L.; CHYALL, L. J.; DUNLAP, J. T.; SMOLENSKAYA, V. N.; STAHLY, B. C.; STAHLY, G. P. Crystal engineering approach to forming cocrystals of amine hydrochlorides with organic acids. Molecular complexes of fluoxetine hydrochloride with benzoic, succinic, and fumaric acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 41, p. 13335-13342, 2004.

CHILDS, S. L.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; REDDY, L. S.; JAYASANKAR, A.; MAHESHWARI, C.; MCCAUSLAND, L.; SHIPPLETT, R.; STAHLY, B. C. Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. **Crystal Engineering Communications**, v. 10, n. 7, p. 856-864, 2008.

CHO, C. W.; CHOI, J. S.; SHIN, S. C. Controlled release of furosemide from the ethylene-vinyl acetate matrix. **International journal of pharmaceutics**, v. 299, n. 1-2, p. 127-133, 2005.

CHOQUESILLO-LAZARTE, D.; GARCIA-RUIZ, J. M. Poly (ethylene) oxide for small-molecule crystal growth in gelled organic solvents. **Journal of Applied Crystallography**, v. 44, n. 1, p. 172-176, 2011.

CHOW, E. H. H.; STROBRIDGE, F. C.; FRIŠČIĆ, T. Mechanochemistry of magnesium oxide revisited: facile derivatisation of pharmaceuticals using coordination and supramolecular chemistry. **Chemical communications**, v. 46, n. 34, p. 6368-6370, 2010.

CIRILO, J. Produção Industrial cresce 1,5 % em fevereiro e 18,4 % sobre 2009. **Folha Online**, v. n. p. 2010. Disponível em: <folha.com.br>. Acesso em: mai 2010.

CLARKE, H. D.; ARORA, K. K.; BASS, H.; KAVURU, P.; ONG, T. T.; PUJARI, T.; WOJTAS, L.; ZAWOROTKO, M. J. Structure– Stability

Relationships in Cocrystal Hydrates: Does the Promiscuity of Water Make Crystalline Hydrates the Nemesis of Crystal Engineering? **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 5, p. 2152-2167, 2010.

CORDEIRO, B. C.; LEITE, S. N. **O Farmacêutico na atenção à Saúde**. Itajaí: Editora Univali, 2008. 286 p.

COX, J. R.; FERRIS, L. A.; THALLADI, V. R. Selective growth of a stable drug polymorph by suppressing the nucleation of corresponding metastable polymorphs. **Angewandte Chemie**, v. 119, n. 23, p. 4411-4414, 2007.

CRAIG, D. Q.; READING, M. **Thermal analysis of pharmaceuticals**: CRC, 2006.

CRIVELLI, I. C. **Propriedade Intelectual é o motor da criatividade**. Correio Popular, 02 jan 2011.

CRUZ-CABEZA, A. J.; KARKI, S.; FÁBIÁN, L.; FRIŠČIĆ, T.; DAY, G. M.; JONES, W. Predicting stoichiometry and structure of solvates. **Chemical communications**, v. 46, n. 13, p. 2224-2226, 2010.

CULLITY, B. D. **Elements of X-RAY DIFFRACTION**. Indiana: Addison-Wesley Publishing Company Inc, 1978. 555 p.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; AMIDON, G. L. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. **The AAPS journal**, v. 11, n. 4, p. 740-746, 2009.

DANNEMANN; SIEMSEN; BIGLER; MOREIRA, I. **Cocrystal de Etravirina e Nicotinamida**. Brasil: Tibotec Pharmaceuticals, 2012. PI1012666-0 A2, 12 p.

DE GUSSEME, A.; NEVES, C.; WILLART, J.; RAMEAU, A.; DESCAMPS, M. Ordering and disordering of molecular solids upon mechanical milling: The case of fananserine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 11, p. 5000-5012, 2008.

DE VILLIERS, M.; VAN DER WATT, J.; LÖTTER, A. Kinetic study of the solid-state photolytic degradation of two polymorphic forms of furosemide. **International journal of pharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 275-283, 1992.

DEJAEGHER; DURAND; VANDER-HEYDEN. Experimental design in method optimization and robustness testing. **Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis**, n., p. 11-74, 2009.

DEJAEGHER; VANDER-HEYDEN. The use of experimental design in separation science. **Acta Chromatographica**, v. 21, n. 2, p. 161-201, 2009.

DEJAEGHER, B.; VANDER-HEYDEN. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, n. 2, p. 141-158, 2011.

DELORI, A.; FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. The role of mechanochemistry and supramolecular design in the development of pharmaceutical materials. **Crystal Engineering Communications**, v. 14, n. 7, p. 2350-2362, 2012.

DESRANGES, C.; DELHOMMELLE, J. Molecular simulation of cross-nucleation between polymorphs. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 6, p. 1465-1469, 2007.

DESIRAJU. A bond by any other name. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 1, p. 52-59, 2011.

DESIRAJU. Pharmaceutical Salts and Co-crystals: Retrospect and Prospects. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

DESIRAJU, G. R. C–HO and other weak hydrogen bonds. From crystal engineering to virtual screening. **Chemical communications**, n. 24, p. 2995-3001, 2005.

DHUMAL, R. S.; KELLY, A. L.; YORK, P.; COATES, P. D.; PARADKAR, A. Cocrystalization and simultaneous agglomeration using hot melt extrusion. **Pharmaceutical research**, v. 27, n. 12, p. 2725-2733, 2010.

DIAS, L. C. **Rumo ao genérico 100% nacional**. Correio Popular, 20 mai 2010.

DOCOSLIS, A.; HUSZARIK, K. L.; PAPAGEORGIOU, G. Z.; BIKIARIS, D.; STERGIOU, D.; GEORGARAKIS, E. Characterization of the distribution, polymorphism, and stability of nimodipine in its solid dispersions in polyethylene glycol by micro-Raman spectroscopy and



powder X-ray diffraction. **Journal of the AAPS**, v. 9, n. 3, p. E361-370, 2007.

DONATO, E. M.; MARTINS, L. A.; FRÖEHLICH, P. E.; BERGOLD, A. M. Development and validation of dissolution test for lopinavir, a poorly water-soluble drug, in soft gel capsules, based on in vivo data. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 47, n. 3, p. 547-552, 2008.

DUNN, P. J.; GALVIN, S.; HETTENBACH, K. The development of an environmentally benign synthesis of sildenafil citrate (Viagra™) and its assessment by Green Chemistry metrics. **Green Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 43-48, 2003.

ERDEMIR, D.; LEE, A. Y.; MYERSON, A. S. Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models. **Accounts of chemical research**, v. 42, n. 5, p. 621-629, 2009.

ESPINOSA BOSCH, M.; RUIZ SANCHEZ, A. J.; SANCHEZ ROJAS, F.; BOSCH OJEDA, C. Recent developments in analytical determination of furosemide. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 3, p. 519-532, 2008.

ETTER, M. C.; BAURES, P. W. Triphenylphosphine oxide as a crystallization aid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n., p. 2, 1988.

ETTER, M. C.; FRANKENBACH, G. M. Hydrogen-Bond directed cocrystallization as a tool for designing acentric organic solids. **Chemistry of Materials**, v. 1, n. 1, p. 3, 1989.

ETTER, M. C.; ADSMOND, D. A. The use of cocrystallization as a method of studying hydrogen bond preferences of 2-aminopyrimidine. **Chemical communications**, v. 8, n., p. 3, 1990.

ETTER, M. C.; URBANCZYK-LIPKOWSKA, Z.; ZIA-EBRAHIMI, M.; PANUNTO, T. W. Hydrogen bond-directed cocrystallization and molecular recognition properties of diarylureas. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 23, p. 8415-8426, 1990.

ETTER, M. C. Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 12, p. 4601-4610, 1991.

ETTER, M. C.; REUTZEL, S. M. Hydrogen bond directed cocrystallization and molecular recognition properties of acyclic imides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 7, p. 2586-2598, 1991.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. World Health Organization, 2005. 5 Ed.

FÁBIÁN, L.; FRISCIC, T. Shape and Polarity in Cocrystal Formation: Database Analysis and Experimental Validation. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

FÁBIÁN, L. Cambridge Structural Database analysis of molecular complementarity in cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 3, p. 1436-1443, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. São Paulo: Atheneu, 2010. 5 Ed.

FDA. **Guidance for Industry - Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-crystals**: secondary title: U.S. Department of Health and Human Services, 2011.

FENG, T.; BATES, S.; CARVAJAL, M. T. Toward understanding the evolution of griseofulvin crystal structure to a mesophase after cryogenic milling. **International journal of pharmaceutics**, v. 367, n. 1, p. 16-19, 2009.

FRIŠČIĆ, T.; FÁBIÁN, L.; BURLEY, J. C.; JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. S. Exploring cocrystal–cocrystal reactivity via liquid-assisted grinding: the assembling of racemic and dismantling of enantiomeric cocrystals. **Chemical communications**, n. 48, p. 5009-5011, 2006.

FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Cocrystal architecture and properties: design and building of chiral and racemic structures by solid–solid reactions. **Faraday discussions**, v. 136, n., p. 167-178, 2007.

FRIŠČIĆ, T.; CHILDS, S. L.; RIZVI, S. A. A.; JONES, W. The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. **Crystal Engineering Communications**, v. 11, n. 3, p. 418-426, 2008.

FRIŠČIĆ, T.; MACGILLIVRAY, L. R. Engineering cocrystal and polymorph architecture via pseudoseeding. **Chemical communications**, v., n. 7, p. 773-775, 2009.

FRIŠČIĆ, T. New opportunities for materials synthesis using mechanochemistry. **Journal of Materials Science**, v. 20, n. 36, p. 7599-7605, 2010.

FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Benefits of cocrystallisation in pharmaceutical materials science: an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1547-1559, 2010.

FRIŠČIĆ, T.; DAY, G. M. Dynamic behaviour in the solid state. **Crystal Engineering Communications**, v. 13, n. 13, p. 4303-4303, 2011.

FRIŠČIĆ, T. Supramolecular concepts and new techniques in mechanochemistry: cocrystals, cages, rotaxanes, open metal-organic frameworks. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 9, p. 3493-3510, 2012.

FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Application of Mechanochemistry in the Synthesis and Discovery of New Pharmaceutical Forms: Cocrystals, Salts and Coordination Compounds. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 3, p. 1621-1637, 2009.

FUJII, K.; UEKUSA, H.; ITODA, N.; HASEGAWA, G.; YONEMOCHI, E.; TERADA, K.; PAN, Z.; HARRIS, K. D. M. Physicochemical understanding of polymorphism and solid-state dehydration/rehydration processes for the pharmaceutical material acrinol, by ab initio powder X-ray diffraction analysis and other techniques. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 580-586, 2009.

GAGNIERE, E.; MANGIN, D.; PUEL, F.; RIVOIRE, A.; MONNIER, O.; GARCIA, E.; KLEIN, J. Formation of co-crystals: Kinetic and thermodynamic aspects. **Journal of Crystal Growth**, v. 311, n. 9, p. 2689-2695, 2009.

GAGNIERE, E.; MANGIN, D.; PUEL, F.; VALOUR, J. P.; KLEIN, J. P.; MONNIER, O. Cocrystal formation in solution: Inducing phase transition by manipulating the amount of cocrystallizing agent. **Journal of Crystal Growth**, v. 316, n. 1, p. 118-125, 2011.

GAGNIÈRE, E.; MANGIN, D.; VEESLER, S.; PUEL, F. Co-crystallization in Solution and Scale-up Issues. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

GAIKWAD, A.; TAMIZHRASI, S.; SORTI, A.; GAVALI, P.; MEHARE, G. Formulation and in vitro characterization of polymethacrylic acid nanoparticle containing Frusemide. **International Journal of Pharmaceutical Technology Research**, v. 2, n., p. 300-304, 2010.

GALAON, T.; UDRESCU, S.; SORA, I.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. High-throughput liquid-chromatography method with fluorescence detection for reciprocal determination of furosemide or norfloxacin in human plasma. **Biomed Chromatogr**, v. 21, n. 1, p. 40-47, 2007.

GALEENER, F. FM spectroscopy: Raman scattering and luminescence. **Chemical physics letters**, v. 48, n. 1, p. 7-11, 1977.

GAREKANI, H.; SADEGHI, F.; BADIIE, A.; MOSTAFA, S.; RAJABI-SIAHBOOMI, A. R.; RAJABI-SIAHBOOMI, A. Crystal habit modifications of ibuprofen and their physicommechanical characteristics. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 27, n. 8, p. 803-809, 2001.

GARRIDO, J. Indústria Farmacêutica: produção continua com crescimento acelerado. **Valor Setorial - Saúde**, 2012. Disponível em: <ascoferj.com.br>. Acesso em: jan 2013.

GARSIDE, J.; DAVEY, R. **From molecules to crystallizers: an introduction to crystallization**. Oxford: Oxford Chemistry Primers, 2000. 96 p.

GHANEKAR, A.; GUPTA, V. D.; GIBBS JR, C. W. Stability of furosemide in aqueous systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 6, p. 808-811, 1978.

GHOSH, S.; REDDY, C. M. Co-crystals of caffeine with substituted nitroanilines and nitrobenzoic acids: Structure–mechanical property and thermal studies. **Crystal Engineering Communications**, v. 14, n. 7, p. 2444-2453, 2012.

GIACOVAZZO, C. **Fundamentals of Crystallography**. Oxford: Oxford University Press, 2011. 864 p.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335-357, 2002.

GOLDSTEIN, J.; NEWBURY, D. E.; JOY, D. C.; LYMAN, C. E.; ECHLIN, P.; LIFSHIN, E.; SAWYER, L.; MICHAEL, J. R. **Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis**: Springer, 2003.

GOOD; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Solubility advantage of pharmaceutical cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 5, p. 2252-2264, 2009.

GOOD; MIRANDA, C.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Dependence of cocrystal formation and thermodynamic stability on moisture sorption by amorphous polymer. **Crystal Engineering Communications**, v. 13, n. 4, p. 1181-1189, 2011.

GOUD; BABU; NANGIA. Sulfonamide– Pyridine-N-oxide Cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 5, p. 1930-1939, 2011.

GOUD; GANGAVARAM, S.; SURESH, K.; PAL, S.; MANJUNATHA, S. G.; NAMBIAR, S.; NANGIA, A. Novel furosemide cocrystals and selection of high solubility drug forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 664-680, 2012.

GREPIONI, F.; BRAGA, D.; MAINI, L.; QUÉRÉ, L.; AERTS, L.; WOUTERS, J. Combining piracetam and lithium salts: Ionic co-cocrystals and co-drugs? **Chemical communications**, 2012.

GU, C. H.; LI, H.; GANDHI, R. B.; RAGHAVAN, K. Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening. **International journal of pharmaceutics**, v. 283, n. 1, p. 117-125, 2004.

GUIMARÃES, R. Bases para uma política nacional de ciência, tecnologia e inovação em saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n. 2, p. 13, 2004.

GUZMAN, A.; AGUI, L.; PEDRERO, M.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J. M. Flow injection and HPLC determination of furosemide using pulsed amperometric detection at microelectrodes. **J Pharm Biomed Anal**, v. 33, n. 5, p. 923-933, 2003.

HE, G.; JACOB, C.; GUO, L.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Screening for cocrystallization tendency: the role of intermolecular interactions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 32, p. 9890-9895, 2008.

HE, G.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Predicting multicomponent crystal formation: The interplay between homomeric and heteromeric interactions. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 10, p. 4529-4532, 2009.

HENCK, J. O.; BERNSTEIN, J.; ELLERN, A.; BOESE, R. Disappearing and reappearing polymorphs. The benzocaine: picric acid system. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 9, p. 1834-1841, 2001.

HENG, J. Y. Y.; THIELMANN, F.; WILLIAMS, D. R. The effects of milling on the surface properties of form I paracetamol crystals. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 8, p. 1918-1927, 2006.

HENRY, R.; ZHANG, G. G. Z. Crystallographic characterization of several erythromycin A solvates: The environment of the solvent molecules in the crystal lattice. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 5, p. 1251-1257, 2007.

HOFFMAN, M.; LINDEMAN, J. A. Co-crystals: Commercial Opportunities and Patent Considerations. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

HORST, J. H.; CAINS, P. W. Co-crystal polymorphs from a solvent-mediated transformation. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 7, p. 2537-2542, 2008.

HUANG, L. F.; TONG, W. Q. T. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321-334, 2004.

HUYNH-BA, K. **Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices**: Springer, 2008.

ICH. **ICH - Stability testing: photostability testing of new drug substances and products Q1B. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 1996.

ICH. ICH - Stability testing of new drugs and products Q1A (R2). **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

ICH. ICH - Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.

ICH. ICH - Impurities: Guidelines for residual solvents Q3C (R4). **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2009.

IKEGAMI, K.; KAWASHIMA, Y.; TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; ISSHIKI, N.; MOMOSE, D.; OUCHI, K. Simultaneous particulate design of primary and agglomerated crystals of steroid by spherical agglomeration in liquid for dry powder inhalation. **Powder Technology**, v. 130, n. 1, p. 290-297, 2003.

INES TORAL, M.; POPE, S.; QUINTANILLA, S.; RICHTER, P. Simultaneous determination of amiloride and furosemide in pharmaceutical formulations by first digital derivative spectrophotometry. **International journal of pharmaceutics**, v. 249, n. 1-2, p. 117-126, 2002.

ISSA, N.; BARNETT, S. A.; MOHAMED, S.; BRAUN, D. E.; COPLEY, R. C. B.; TOCHER, D. A.; PRICE, S. L. Screening for cocrystals of succinic acid and 4-aminobenzoic acid. **Crystal Engineering Communications**, v. 14, n. 7, p. 2454-2464, 2012.

JACKSON, E. K. Diuréticos. In: Hardman, J. G., Limbird, L. E., *et al* (Ed.). **Good & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005,

JAMES; ADAMS, C. J.; BOLM, C.; BRAGA, D.; COLLIER, P.; FRIŠČIĆ, T.; GREPIONI, F.; HARRIS, K. D. M.; HYETT, G.; JONES, W. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 1, p. 413-447, 2012.

JAMES, S. L.; ADAMS, C. J.; BOLM, C.; BRAGA, D.; COLLIER, P.; FRISCIC, T.; GREPIONI, F.; HARRIS, K. D.; HYETT, G.; JONES, W.; KREBS, A.; MACK, J.; MAINI, L.; ORPEN, A. G.; PARKIN, I. P.; SHEAROUSE, W. C.; STEED, J. W.; WADDELL, D. C.

Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. **Chemistry Society Reviews**, v. 41, n. 1, p. 413-447, 2012.

JAYASANKAR, A.; SOMWANGTHANAROJ, A.; SHAO, Z. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Cocrystal formation during cogrinding and storage is mediated by amorphous phase. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 10, p. 2381-2392, 2006.

JAYASANKAR, A.; DAVID, J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Mechanisms by which moisture generates cocrystals. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 360-372, 2007.

JAYASANKAR, A.; REDDY, L. S.; BETHUNE, S. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Role of cocrystal and solution chemistry on the formation and stability of cocrystals with different stoichiometry. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 2, p. 889-897, 2009.

JAYASANKAR, A.; ROY, L.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Transformation pathways of cocrystal hydrates when cofomer modulates water activity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 3977-3985, 2010.

JIANG, S.; TER HORST, J. H. Crystal Nucleation Rates from Probability Distributions of Induction Times. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 1, p. 256-261, 2010.

KARAMERTZANIS, P. G.; DAY, G. M.; WELCH, G. W. A.; KENDRICK, J.; LEUSEN, F. J. J.; NEUMANN, M. A.; PRICE, S. L. Modeling the interplay of inter- and intramolecular hydrogen bonding in conformational polymorphs. **The Journal of chemical physics**, v. 128, n., p. 244708, 2008.

KARAMI, S.; LI, Y.; HUGHES, D. S.; HURSTHOUSE, M. B.; RUSSELL, A. E.; THRELFALL, T. L.; CLAYBOURN, M.; ROBERTS, R. Further errors in polymorph identification: furosemide and finasteride. **Acta Crystallographica Section B: Structural Science**, v. 62, n. 4, p. 689-691, 2006.

KARKI, S.; FÁBIÁN, L.; FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Powder X-ray diffraction as an emerging method to structurally characterize organic solids. **Organic Letters**, v. 9, n. 16, p. 3133-3136, 2007a.



KARKI, S.; FRISCIC, T.; JONES, W.; MOTHERWELL, W. D. Screening for pharmaceutical cocrystal hydrates via neat and liquid-assisted grinding. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 347-354, 2007b.

KARKI, S.; FRIŠČIĆ, T.; JONES, W. Control and interconversion of cocrystal stoichiometry in grinding: stepwise mechanism for the formation of a hydrogen-bonded cocrystal. **Crystal Engineering Communications**, v. 11, n. 3, p. 470-481, 2009.

KATO, F.; OTSUKA, M.; MATSUDA, Y. Kinetic study of the transformation of mefenamic acid polymorphs in various solvents and under high humidity conditions. **International journal of pharmaceutics**, v. 321, n. 1, p. 18-26, 2006.

KAVURU, P.; ABOARAYES, D.; ARORA, K. K.; CLARKE, H. D.; KENNEDY, A.; MARSHALL, L.; ONG, T. T.; PERMAN, J.; PUJARI, T.; WOJTAS, Ł. Hierarchy of Supramolecular Synthons: Persistent Hydrogen Bonds Between Carboxylates and Weakly Acidic Hydroxyl Moieties in Cocrystals of Zwitterions. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 8, p. 3568-3584, 2010.

KAWAKAMI, K. Reversibility of enantiotropically related polymorphic transformations from a practical viewpoint: Thermal analysis of kinetically reversible/irreversible polymorphic transformations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 5, p. 982-989, 2006.

KE, X.; PING, Q. N.; LIAO, Z. G. Interconversion kinetic studies of betamethasone acetate polymorphs in water. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 32, n. 9, p. 1019-1024, 2006.

KLAUSNER, E. A.; LAVY, E.; STEPENSKY, D.; CSEREPES, E.; BARTA, M.; FRIEDMAN, M.; HOFFMAN, A. Furosemide pharmacokinetics and pharmacodynamics following gastroretentive dosage form administration to healthy volunteers. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. 711-720, 2003.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

KOSEKI, T.; ONISHI, H.; TAKAHASHI, Y.; UCHIDA, M.; MACHIDA, Y. Preparation and evaluation of novel directly-compressed fast-

disintegrating furosemide tablets with sucrose stearic acid ester. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 1126-1130, 2009.

KRULL, I.; SWARTZ, M.; TURPIN, J.; LUKULAY, P. H.; VERSEPUT, R. A quality-by-design methodology for rapid LC method development, part I. v., n., p., 2008.

KRULL, I.; SWARTZ, M.; TURPIN, J.; LUKULAY, P. H.; VERSEPUT, R. A quality-by-design methodology for rapid LC method development, part II. v., n., p., 2009.

KRUTHIVENTI, A. K.; JAVED, I.; JAGGAVARAPA, S. R.; NAGALAPALLI, R.; VISWANADHA, G. S.; ANAND, S. K. **Pharmaceutical co-crystals of quercetin**. Estados Unidos: Nutracyst Therapeutics Private Limited, Noida (IN), 2012. US 2012/0258170 A1, 21 p.

KUMINEK, G.; RAUBER, G. S.; RIEKES, M. K.; CAMPOS, C. E. M.; MONTI, G. A.; BORTOLUZZI, A. J.; CUFFINI, S. L.; CARDOSO, S. G. Single crystal structure, solid state characterization and dissolution rate of terbinafine hydrochloride. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v., n., p., 2013.

KURODA, R.; SATO, T.; IMAI, Y. Varied charge-transfer complex crystals formed between diols and benzoquinone in the solid and solution states. **Crystal Engineering Communications**, v. 10, n. 12, p. 1881-1890, 2008.

LANCASTER, R. W.; KARAMERTZANIS, P. G.; HULME, A. T.; TOCHER, D. A.; LEWIS, T. C.; PRICE, S. L. The polymorphism of progesterone: Stabilization of a 'disappearing' polymorph by co-crystallization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, p. 3419-3431, 2007.

LATOSIŃSKA, J.; LATOSIŃSKA, M.; MEDYCKI, W.; OSUCHOWICZ, J. Molecular dynamics of solid furosemide (4-chloro-2-furfurylamino-5-sulfamoyl-benzoic acid) studied by NMR and DFT methods. **Chemical physics letters**, v. 430, n. 1, p. 127-132, 2006.

LE BOLAY, N. On agglomeration phenomena in ball mills: application to the synthesis of composite materials. **Powder Technology**, v. 130, n. 1, p. 450-455, 2003.

LEE; ERDEMIR; MYERSON. Crystal polymorphism in chemical process development. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n., p. 259-280, 2011.

LEE; ZHANG, G. G.; FLANAGAN, D. R. Cocrystal intrinsic dissolution behavior using a rotating disk. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 5, p. 1736-1744, 2011.

LEUNG, D. H.; LOHANI, S.; BALL, R. G.; CANFIELD, N.; WANG, Y.; RHODES, T.; BAK, A. Two Novel Pharmaceutical Cocrystals of a Development Compound—Screening, Scale-up, and Characterization. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 3, p. 1254-1262, 2012.

LEUSEN, F. J.; KENDRICK, J. Polymorph Prediction of Small Organic Molecules, Cocrystals and Salts. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

LI; KUBO, H.; KOBAYASHI, Y.; KINOSHITA, T. [Quantitative determination of furosemide in serum and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detector]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 26, n. 12, p. 923-927, 1991.

LI, X.; ZHI, F.; HU, Y. Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin. **International journal of pharmaceutics**, v. 328, n. 2, p. 177-182, 2007.

LIMWIKRANT, W.; NAGAI, A.; HAGIWARA, Y.; HIGASHI, K.; YAMAMOTO, K.; MORIBE, K. Formation mechanism of a new carbamazepine/malonic acid cocrystal polymorph. **International journal of pharmaceutics**, 2012.

LIN, S. Y.; CHENG, W. T.; WANG, S. L. Thermodynamic and kinetic characterization of polymorphic transformation of famotidine during grinding. **International journal of pharmaceutics**, v. 318, n. 1, p. 86-91, 2006.

LIU, Y.; WANG, H.; WANG, J.; LI, Y. A simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of furosemide using zinc(II)-1,4-bis(imidazol-1-ylmethyl)benzene complexes. **Luminescence**, 2012.

LLINÀS, A.; GOODMAN, J. M. Polymorph control: past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 5, p. 198-210, 2008.

LÖBENBERG, R.; AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 3-12, 2000.

LU, J.; ROHANI, S. Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 884-905, 2009.

LU, J.; LI, Z.; JIANG, X. Polymorphism of pharmaceutical molecules: perspectives on nucleation. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 4, n. 1, p. 37-44, 2010.

MAHESHWARI, C.; JAYASANKAR, A.; KHAN, N. A.; AMIDON, G. E.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Factors that influence the spontaneous formation of pharmaceutical cocrystals by simply mixing solid reactants. **Crystal Engineering Communications**, v. 11, n. 3, p. 493-500, 2009.

MALAJ, L.; CENSI, R.; CAPSONI, D.; PELLEGRINO, L.; BINI, M.; FERRARI, S.; GOBETTO, R.; MASSAROTTI, V.; MARTINO, P. D. Characterization of nicergoline polymorphs crystallized in several organic solvents. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 7, p. 2610-2622, 2011.

MARGALHO, C.; DE BOER, D.; GALLARDO, E.; BARROSO, M.; VIEIRA, D. N. Determination of furosemide in whole blood using SPE and GC-EI-MS. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 309-313, 2005.

MATSUDA, Y.; TATSUMI, E. Physicochemical characterization of furosemide modifications. **International journal of pharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 11-26, 1990.

MATSUDA, Y.; OTSUKA, M.; ONOE, M.; TATSUMI, E. Amorphism and physicochemical stability of spray-dried frusemide. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 44, n. 8, p. 627-633, 1992.

MATSUURA, A.; NAGAYAMA, T.; KITAGAWA, T. Automated high-performance liquid chromatographic method for determination of

furosemide in dog plasma. **Journal of Chromatography**, v. 617, n. 2, p. 339-343, 1993.

MCNAMARA, P. J.; FOSTER, T. S.; DIGENIS, G. A.; PATEL, R. B.; CRAIG, W. A.; WELLING, P. G.; RAPAKA, R. S.; PRASAD, V. K.; SHAH, V. P. Influence of tablet dissolution on furosemide bioavailability: a bioequivalence study. **Pharmaceutical research**, v. 4, n. 2, p. 150-153, 1987.

MITTEMEIJER, E. J.; SCARDI, P. **Diffraction analysis of the microstructure of materials**: Springer, 2004, v.68.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons**. London: Pharmaceutical Press, 2004.

MORAGUES-BARTOLOME, A. M.; JONES, W.; CRUZ-CABEZA, A. J. Synthon preferences in cocrystals of cis-carboxamides: carboxylic acids. **Crystal Engineering Communications**, v. 14, n. 7, p. 2552-2559, 2012.

MORISSETTE, S. L.; ALMARSSON, O.; PETERSON, M. L.; REMENAR, J. F.; READ, M. J.; LEMMO, A. V.; ELLIS, S.; CIMA, M. J.; GARDNER, C. R. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, cocrystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 275-300, 2004.

MORRIS, K. R.; GRIESSER, U. J.; ECKHARDT, C. J.; STOWELL, J. G. Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 91-114, 2001.

MUSCHAWECK, R.; FÜLBERTH, W.; SICKMÜLLER, A. **Binary compositions of penbutolol and furosemide or piretanide**: secondary title. Estados Unidos: Hoechst Aktiengesellschaft, 1986. 4,564,625, 5 p.

NANGIA, A.; DESIRAJU, G. R. Supramolecular Synthons and Pattern Recognition. In: Weber, E., Aoyama, Y., *et al* (Ed.). **Design of Organic Solids**, 1998, p.39. (Topics in Current Chemistry)

NANGIA, A. Conformational polymorphism in organic crystals. **Accounts of chemical research**, v. 41, n. 5, p. 595-604, 2008.

NEGRO, S.; RENDON, A. L.; AZUARA, M. L.; SANCHEZ, Y.; FERNANDEZ-CARBALLIDO, A.; BARCIA, E. Compatibility and

stability of furosemide and dexamethasone combined in infusion solutions. **Arzneimittelforschung**, v. 56, n. 10, p. 714-720, 2006.

NOKHODCHI, A.; BOLOURTCHIAN, N.; DINARVAND, R. Crystal modification of phenytoin using different solvents and crystallization conditions. **International journal of pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 85-97, 2003.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**: Wiley-Vch, 2007.

PADRELA, L.; RODRIGUES, M. A.; VELAGA, S. P.; FERNANDES, A. C.; MATOS, H. A.; DE AZEVEDO, E. G. Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 53, n. 1, p. 156-164, 2010.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F. Solid-state chemistry and particle engineering with supercritical fluids in pharmaceuticals. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 27, n. 4, p. 299-310, 2006.

PATEL, R. C.; KERALIYA, R. A.; PATEL, M. M.; PATEL, N. M. Formulation of furosemide solid dispersion with micro crystalline cellulose for achieve rapid dissolution. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research**, v. 1, n. 2, p. 180-189, 2010.

PATIL, S. R.; KUMAR, L.; KOHLI, G.; BANSAL, A. K. Validated HPLC Method for Concurrent Determination of Antipyrine, Carbamazepine, Furosemide and Phenytoin and its Application in Assessment of Drug Permeability through Caco-2 Cell Monolayers. **Science Pharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 89-100, 2012.

PAULINO, A.; RAUBER, G.; CAMPOS, C.; MAURÍCIO, M.; DE AVILLEZ, R.; CUFFINI, S.; CARDOSO, S. Hollow crystal anti-solvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs. **Journal of Crystal Growth**, v. 366, n. -, p. 6, 2013.

PAVIA, D. L. **Introduction to spectroscopy**: Brooks/Cole Publishing Company, 2009.

PELLEGATA, R. L. **Furosemide salts**: secondary title. Estados Unidos: Roussel Uclaf, Paris, France, 1993. 5,182,300, 4 p.

PEREZ, S.; CERIONI, L.; WOLFENSON, A.; FAUDONE, S.; CUFFINI, S. Utilization of pure nuclear quadrupole resonance spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. **International journal of pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 143-152, 2005.

PIETSCH, W. An interdisciplinary approach to size enlargement by agglomeration. **Powder Technology**, v. 130, n. 1-3, p. 8-13, 2003.

PORTER III, W. W.; ELIE, S. C.; MATZGER, A. J. Polymorphism in carbamazepine cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 1, p. 14-16, 2008.

PRASAD, V. K.; RAPAKA, R. S.; KNIGHT, P. W.; CABANA, B. E. Dissolution medium—A critical parameter to identify bioavailability problems of furosemide tablets. **International journal of pharmaceutics**, v. 11, n. 1, p. 81-90, 1982.

PRICE, S. L. From crystal structure prediction to polymorph prediction: interpreting the crystal energy landscape. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, n. 15, p. 1996-2009, 2008.

PTACEK, P.; VYHNALEK, O.; BREUEL, H. P.; MACEK, J. Determination of furosemide in plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry. **Arzneimittelforschung**, v. 46, n. 3, p. 277-283, 1996.

QIAO, N.; LI, M.; SCHLINDWEIN, W.; MALEK, N.; DAVIES, A.; TRAPPITT, G. Pharmaceutical cocrystals: An overview. **International journal of pharmaceutics**, v. 419, n. 1, p. 1-11, 2011.

QU, H.; LOUHI-KULTANEN, M.; KALLAS, J. Additive effects on the solvent-mediated anhydrate/hydrate phase transformation in a mixed solvent. **Crystal Growth & Design**, v. 7, n. 4, p. 724-729, 2007.

RADECK, W.; HELLER, M. Improved method for the determination of furosemide in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 497, n., p. 367-370, 1989.

RAHMAN, Z.; AGARABI, C.; ZIDAN, A. S.; KHAN, S. R.; KHAN, M. A. Physico-mechanical and stability evaluation of carbamazepine cocrystal with nicotinamide. **AAPS Pharmaceutica Science Technology**, v. 12, n. 2, p. 693-704, 2011.

RAIJADA, D. K.; PRASAD, B.; PAUDEL, A.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Characterization of degradation products of amorphous and polymorphic forms of clopidogrel bisulphate under solid state stress conditions. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 52, n. 3, p. 332-344, 2010.

RAM, V. R.; DAVE, P. N.; JOSHI, H. S. Development and validation of a stability-indicating HPLC assay method for simultaneous determination of spironolactone and furosemide in tablet formulation. **Journal of Chromatographic Sciences**, v. 50, n. 8, p. 721-726, 2012.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale. Farmacologia**. São Paulo: Elsevier, 2008.

RANKIN, G. O. Diuretics. In: Williams, D. A. e Lemice, T. L. (Ed.). **Foye's principals of medicinal chemistry**. Philadelphia: Lippincott William's & Williams, 2002.

RAPAKA, R.; ROTH, J.; PRASAD, V. The analysis of 4-chloro-5-sulfamoylanthranilic acid in the bulk material and pharmaceutical preparations of furosemide by a high-performance liquid chromatographic method. **International journal of pharmaceutics**, v. 11, n. 3, p. 237-247, 1982.

RAPAKA, R. S.; ROTH, J.; VISWANATHAN, C.; GOEHL, T. J.; PRASAD, V. K.; CABANA, B. E. Improved method for the analysis of furosemide in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 227, n. 2, p. 463-469, 1982.

RASENACK, N.; MÜLLER, B. W. Crystal habit and tableting behavior. **International journal of pharmaceutics**, v. 244, n. 1, p. 45-57, 2002.

REEUWIJK, H. J.; TJADEN, U. R.; VAN DER GREEF, J. Simultaneous determination of furosemide and amiloride in plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography**, v. 575, n. 2, p. 269-274, 1992.

REMENAR, J. F.; MORISSETTE, S. L.; PETERSON, M. L.; MOULTON, B.; MACPHEE, J. M.; GUZMÁN, H. R.; ALMARSSON, Ö. Crystal engineering of novel cocrystals of a triazole drug with 1, 4-dicarboxylic acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 28, p. 8456-8457, 2003.



REUTZEL-EDENS, S. M. Analytical Techniques and Strategies for Salt/Co-crystal Characterization. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

RIEKES, M. K.; PEREIRA, R. N.; RAUBER, G. S.; CUFFINI, S. L.; DE CAMPOS, C. E.; SILVA, M. A.; STULZER, H. K. Polymorphism in nimodipine raw materials: development and validation of a quantitative method through differential scanning calorimetry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 70, n., p. 188-193, 2012.

RODOMONTE, A.; ANTONIELLA, E.; BERTOCCHI, P.; GAUDIANO, M. C.; MANNA, L.; BARTOLOMEI, M. Different crystal morphologies arising from different preparation methods of a same polymorphic form may result in different properties of the final materials: The case of diclofenac sodium trihydrate. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n. 2, p. 477-481, 2008.

RODRIGUEZ-HORNEDO, N. **Palestra ministrada durante a Escola de Altos Estudos em Cristalização e Cristalografia (ECRISLA)**. Florianópolis, 2011.

RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C. P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2004.

ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; BAJERSKI, L.; BERGOLD, A. M.; FRÖHLICH, P. E. Development and validation of discriminating method of dissolution for fosamprenavir tablets based on in vivo data. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 3, p. 439-444, 2011.

ROTH, J.; RAPAKA, R. S.; PRASAD, V. K. An HPLC Procedure for the Analysis of Furosemide in Pharmaceuticals-Analysis of Furosemide Tablets and Furosemide Injection. **Analytical Letters**, v. 14, n. 13, p. 1013-1030, 1981.

ROYALL, P. G.; CRAIG, D. Q.; DOHERTY, C. Characterisation of moisture uptake effects on the glass transitional behaviour of an amorphous drug using modulated temperature DSC. **International journal of pharmaceuticals**, v. 192, n. 1, p. 39-46, 1999.

SALAMAN, C. R. P.; TESSON, N. **Co-crystals of tramadol and coxibs**: secondary title. Estados Unidos: Laboratorios del Dr. Esteve, S.A., Barcelona (ES), 2012. US 2012/0172398 A1, 9 p.

SANPHUI, P.; GOUD, N. R.; KHANDEVILLI, U. B. R.; NANGIA, A. Fast dissolving curcumin cocrystals. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 9, p. 4135-4145, 2011.

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.

SCHULTHEISS, N.; NEWMAN, A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 6, p. 2950-2967, 2009.

SCHULTHEISS, N.; ROE, M.; BOERRIGTER, S. X. M. Cocrystals of nutraceutical p-coumaric acid with caffeine and theophylline: polymorphism and solid-state stability explored in detail using their crystal graphs. **Crystal Engineering Communications**, v. 13, n. 2, p. 611-619, 2011.

SCHULTHEISS, N.; HENCK, J. O. Role of Co-crystals in Pharmaceutical Development Continuum. In: Wouters, J. e Quéré, L. (Ed.). **Pharmaceutical Salts and Co-crystals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012, p.390.

SEEFELDT, K.; MILLER, J.; ALVAREZ-NÚÑEZ, F.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Crystallization pathways and kinetics of carbamazepine–nicotinamide cocrystals from the amorphous state by in situ thermomicroscopy, spectroscopy, and calorimetry studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 5, p. 1147-1158, 2007.

SEKHON, B. S. Nutraceutical Cocrystals: An overview. **RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 10, 2012.

SEPENDA, G. J.; STOREY, R. **Co-crystal**: secondary title. United States: AstraZeneca AB, Sodertalje (SE), 2009. US 7,625,910 B2, 23 p.

SHAN, N.; TODA, F.; JONES, W. Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. **Chemical communications**, v., n. 20, p. 2372-2373, 2002.

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

SHEIKH, A. Y.; HAMMOND, R. B.; ROBERTS, K. J. Scalable solution cocrystallization: case of carbamazepine-nicotinamide I. **Crystal Engineering Communications**, v. 11, n. 3, p. 501-509, 2009.

SHIRAKI, K.; TAKATA, N.; TAKANO, R.; HAYASHI, Y.; TERADA, K. Dissolution improvement and the mechanism of the improvement from cocrystallization of poorly water-soluble compounds. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 11, p. 2581-2592, 2008.

SINGARE, D. S.; MARELLA, S.; GOWTHAMRAJAN, K.; KULKARNI, G. T.; VOOTURI, R.; RAO, P. S. Optimization of formulation and process variable of nanosuspension: An industrial perspective. **International journal of pharmaceutics**, v. 402, n. 1, p. 213-220, 2010.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Stress test to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, v. 4, n., p. 1-14, 2000.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 335-347, 2004.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**: Wiley, 2011.

SOLTANI, S.; JOUYBAN, A. A validated micellar LC method for simultaneous determination of furosemide, metoprolol and verapamil in human plasma. **Bioanalysis**, v. 4, n. 1, p. 41-48, 2012.

SORA, D. I.; UDRESCU, S.; ALBU, F.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Analytical issues in HPLC/MS/MS simultaneous assay of furosemide, spironolactone and canrenone in human plasma samples. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 52, n. 5, p. 734-740, 2010.

SPAMER, E.; MULLER, D. G.; WESSELS, P. L.; VENTER, J. P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and sulfobutyl ether-7-beta-cyclodextrin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 16, n. 4-5, p. 247-253, 2002.

SRIDHAR, B.; RAVIKUMAR, K. Lamotrigine dimethylformamide sesquisolvate. **Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online**, v. 62, n. 10, p. o4752-o4754, 2006.

STAHLY, G. P. A survey of cocrystals reported prior to 2000. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 10, p. 4212-4229, 2009.

STANTON, M. K.; TUFEKČIĆ, S.; MORGAN, C.; BAK, A. Drug substance and former structure property relationships in 15 diverse pharmaceutical co-crystals. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 3, p. 1344-1352, 2009.

STEPANOV, D.; MISHNEV, A. Multicomponent pharmaceutical cocrystals: furosemide and pentoxifylline. **Acta Crystallographica C**, v. 68, n. Pt 12, p. o488-491, 2012.

STROBRIDGE, F. C.; JUDAŠ, N.; FRIŠČIĆ, T. A stepwise mechanism and the role of water in the liquid-assisted grinding synthesis of metal-organic materials. **Crystal Engineering Communications**, v. 12, n. 8, p. 2409-2418, 2010.

ŠTRUKIL, V.; FÁBIÁN, L.; REID, D. G.; DUER, M. J.; JACKSON, G. J.; ECKERT-MAKSIĆ, M.; FRIŠČIĆ, T. Towards an environmentally-friendly laboratory: dimensionality and reactivity in the mechanosynthesis of metal-organic compounds. **Chemical communications**, v. 46, n. 48, p. 9191-9193, 2010.

STRYDOM, S.; LIEBENBERG, W.; YU, L.; DE VILLIERS, M. The effect of temperature and moisture on the amorphous-to-crystalline transformation of stavudine. **International journal of pharmaceutics**, v. 379, n. 1, p. 72-81, 2009.

SURYANARAYANA, C. Mechanical alloying and milling. **Progress in Materials Science**, v. 46, n., p. 184, 2001.

SWEETMANN, S. C. **Martindale: The complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press, 2007.

SZYMOCHA, K. Industrial applications of the agglomeration process. **Powder Technology**, v. 130, n., p. 5, 2003a.

SZYMOCHA, K. Industrial applications of the agglomeration process. **Powder Technology**, v. 130, n. 1, p. 462-467, 2003b.

TAKATA, N.; SHIRAKI, K.; TAKANO, R.; HAYASHI, Y.; TERADA, K. Cocrystal screening of stanolone and mestanolone using slurry crystallization. **Crystal Growth and Design**, v. 8, n. 8, p. 3032-3037, 2008.

TENHO, M.; HEINÄNEN, P.; TANNINEN, V. P.; LEHTO, V. P. Does the preferred orientation of crystallites in tablets affect the intrinsic dissolution? **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n. 4, p. 1315-1323, 2007.

THAKURIA, R.; DELORI, A.; JONES, W.; LIPERT, M. P.; ROY, L.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. **International journal of pharmaceutics**, 2012.

TIAN, F.; SAVILLE, D. J.; GORDON, K. C.; STRACHAN, C. J.; ZEITLER, J. A.; SANDLER, N.; RADES, T. The influence of various excipients on the conversion kinetics of carbamazepine polymorphs in aqueous suspension. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 193-201, 2007.

TIEKINK, E. R.; VITTAL, J. J.; ZAWOROTKO, M. J. **Organic Crystal Engineering: Frontiers in Crystal Engineering**. London: John Wiley & Sons, Ltd, 2010. 319 p.

TRASK; MOTHERWELL; JONES. Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. **Chemical communications**, n. 7, p. 890-891, 2004.

TRASK; SHAN; MOTHERWELL; JONES; FENG; TAN; CARPENTER. Selective polymorph transformation via solvent-drop grinding. **Chemical communications**, v., n. 7, p. 880-882, 2005.

TRASK. An overview of pharmaceutical cocrystals as intellectual property. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 3, p. 301-309, 2007.

UETO, T.; TAKATA, N.; MUROYAMA, N.; NEDU, A.; SASAKI, A.; TANIDA, S.; TERADA, K. Polymorphs and a Hydrate of Furosemide–Nicotinamide 1: 1 Cocrystal. **Crystal Growth & Design**, v. 12, n. 1, p. 485-494, 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **United States Pharmacopeia (USP)**. United States Pharmacopeial Convention, 2007. 30.

VARGAS. Alguns aspectos da Política Nacional de Ciência e Tecnologia. **Química Nova**, v. 20, n. Ed. Especial, p. 14, 1997.

VARGAS; MARTINEZ VOLKMAR, I.; SEQUERA, J.; MENDEZ, H.; ROJAS, J.; FRAILE, G.; VELASQUEZ, M.; MEDINA, R. Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 42, n. 3, p. 219-225, 1998.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

VISHWESHWAR, P.; MCMAHON, J. A.; BIS, J. A.; ZAWOROTKO, M. J. Pharmaceutical co-crystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 3, p. 499-516, 2006.

VOGT; BRUM, J.; KATRINCIC, L. M.; FLACH, A.; SOCHA, J. M.; GOODMAN, R. M.; HALTIWANGER, R. C. Physical, crystallographic, and spectroscopic characterization of a crystalline pharmaceutical hydrate: understanding the role of water. **Crystal Growth & Design**, v. 6, n. 10, p. 2333-2354, 2006.

VOGT; CLAWSON, J. S.; STROHMEIER, M.; EDWARDS, A. J.; PHAM, T. N.; WATSON, S. A. Solid-state NMR analysis of organic cocrystals and complexes. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 2, p. 921-937, 2008.

VOGT; KORD. Development of quality-by-design analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 797-812, 2011.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis**: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WENK, M.; HAEGELI, L.; BRUNNER, H.; KRAHENBUHL, S. Determination of furosemide in plasma and urine using monolithic silica rod liquid chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 4, p. 1367-1370, 2006.

WEYNA, D. R.; SHATTOCK, T.; VISHWESHWAR, P.; ZAWOROTKO, M. J. Synthesis and structural characterization of cocrystals and pharmaceutical cocrystals: mechanochemistry vs slow evaporation from solution. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 2, p. 1106-1123, 2009.

WEYNA, D. R.; CHENEY, M. L.; SHAN, N.; HANNA, M.; WOJTAS, L.; ZAWOROTKO, M. J. Crystal engineering of multiple-component organic solids: Pharmaceutical cocrystals of tadalafil with persistent hydrogen bonding motifs. **Crystal Engineering Communications**, v. 14, n. 7, p. 2377-2380, 2012.

WHO. Relatório Mundial da Saúde. Financiamento dos Sistemas de Saúde - O caminho para a cobertura universal. 2010a. Disponível em: <who.int>. Acesso em: dez 2012.

WHO. Continuity and Change. Implementing the third WHO Medicines Strategy 2008-2013. **WHO Policy Perspectives on Medicines**, 2010b. Disponível em: <who.int>. Acesso em: dez 2012.

WISHKERMANN, S.; BERNSTEIN, J. Polymorphism and Structural Mechanism of the Phase Transformation of Phenyl Carbamate (PC). **Chemistry-a European Journal**, v. 14, n. 1, p. 197-203, 2008.

XU, D.; REDMAN-FUREY, N. Statistical cluster analysis of pharmaceutical solvents. **International journal of pharmaceutics**, v. 339, n. 1, p. 175-188, 2007.

YAMAMURA, S.; TAKAHIRA, R.; MOMOSE, Y. Crystallization kinetics of amorphous griseofulvin by pattern fitting procedure using X-ray diffraction data. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 5, p. 880-887, 2007.

YASUJI, T.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 3, p. 388-398, 2008.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. 268 p.

YU; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; LEE, V. H. L. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical research**, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

YU; 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, n. 1, p. 221-227, 2004.

YU, Z. Q.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Operating regions in cooling cocrystallization of caffeine and glutaric acid in acetonitrile. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 5, p. 2382-2387, 2010.

ZAWOROTKO, M. J. Metal-organic materials: A reversible step forward. **Nature Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 267-268, 2009.

ZEITLER, J. A.; TADAY, P. F.; PEPPER, M.; RADES, T. Relaxation and crystallization of amorphous carbamazepine studied by terahertz pulsed spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2703-2709, 2007.

ZHANG; LAW, D.; SCHMITT, E. A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 371-390, 2004.

ZHANG, F.; AALTONEN, J.; TIAN, F.; SAVILLE, D. J.; RADES, T. Influence of particle size and preparation methods on the physical and chemical stability of amorphous simvastatin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 64-70, 2009.

ZVONAR, A.; BERGINC, K.; KRISTL, A.; GASPERLIN, M. Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide. **International journal of pharmaceutics**, v. 388, n. 1-2, p. 151-158, 2010.



## APÊNDICE 1

Abaixo estão representados os resultados da caracterização prévia de FUR, CAF e NIC puros e após armazenamento em câmara de umidade. Estes dados suportam os experimentos realizados no capítulo IV.

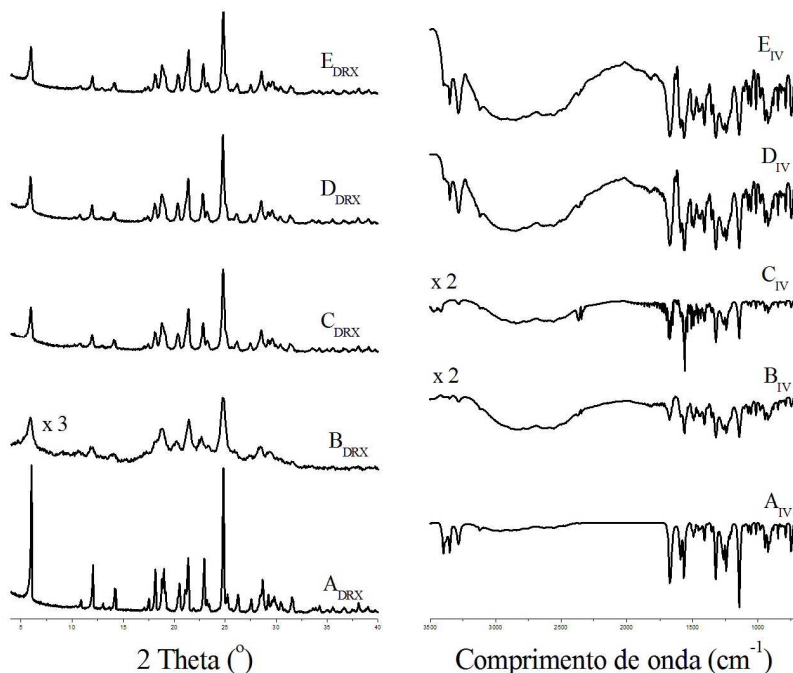


Figura 79 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) de furosemda armazenada. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade.

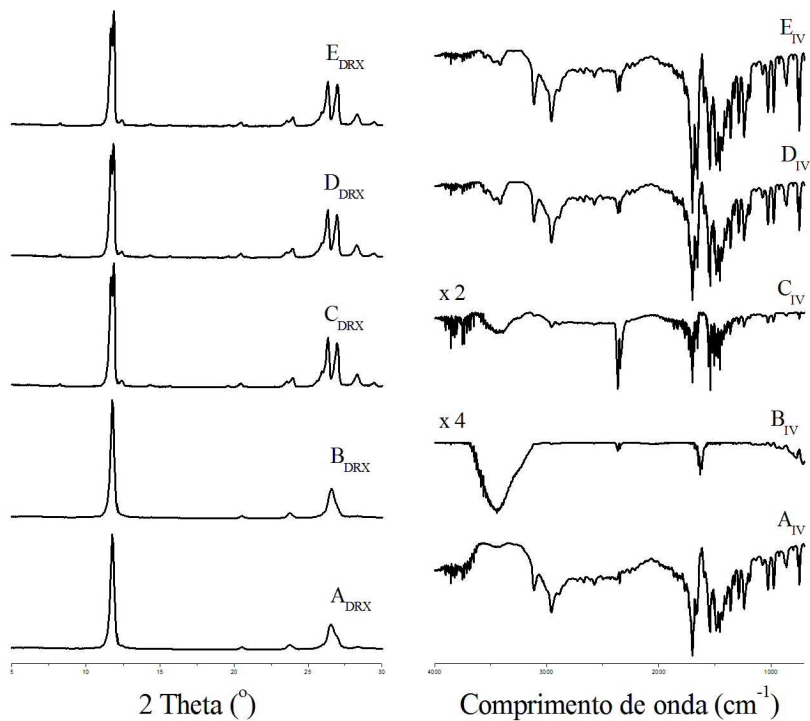


Figura 80 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) de cafeína armazenada. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade.

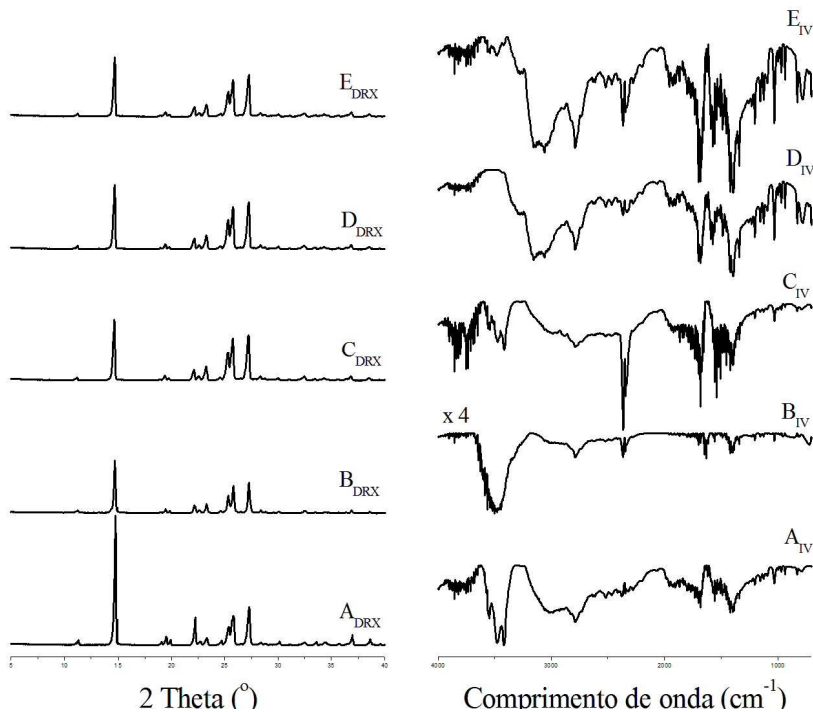


Figura 81 - Resultados das análises por DRX (esquerda) e IV (direita) de nicotinamida armazenada. A – tempo zero. B – tempo 7 dias em câmara de umidade. C – tempo 15 dias em câmara de umidade. D – tempo 30 dias em câmara de umidade E – tempo 90 dias em câmara de umidade.

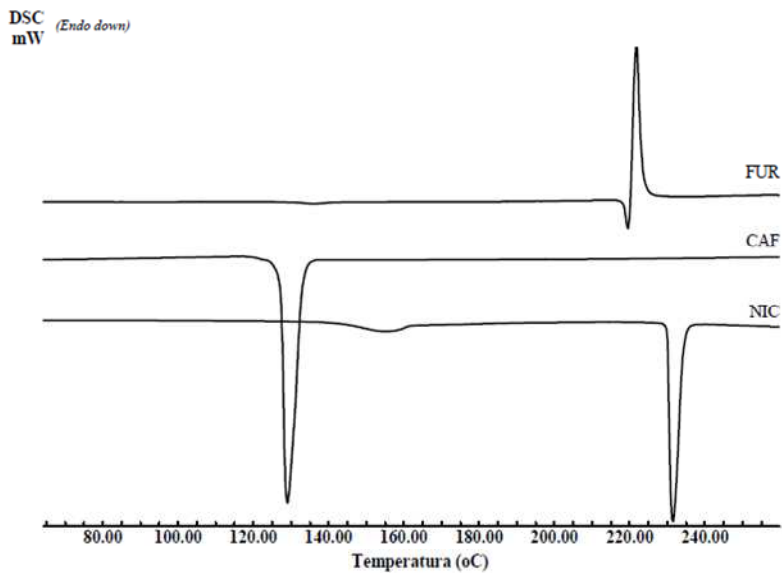


Figura 82 - Curvas DSC comparativas entre nicotinamida (NIC), cafeína (CAF) e furosemida (FUR).

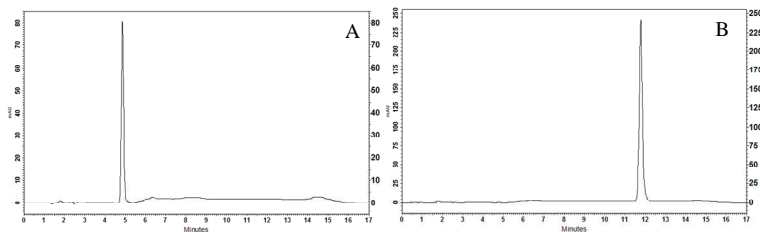
## APÊNDICE 2

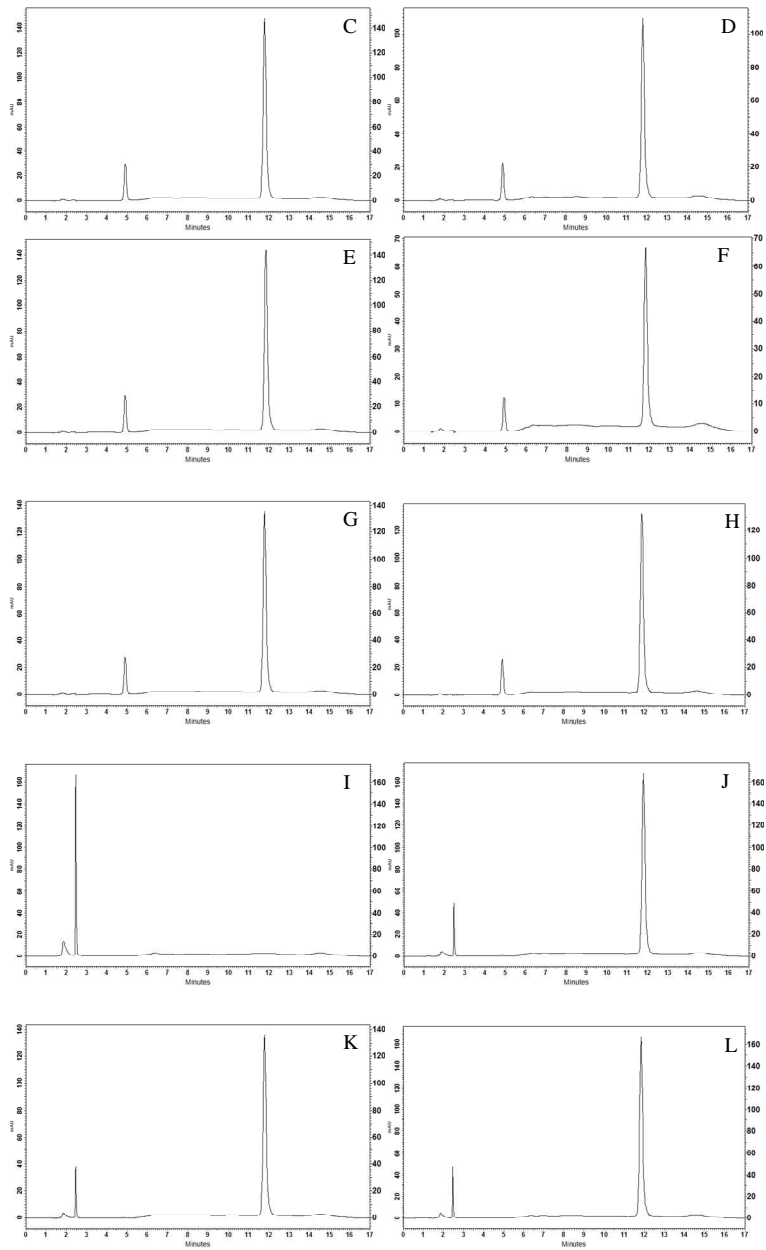
Abaixo estão representados os resultados da análise cromatográfica por CLAE das misturas FUR:CAF E FUR:NIC moídas por 4 horas a seco e em moagem assistida com solventes.

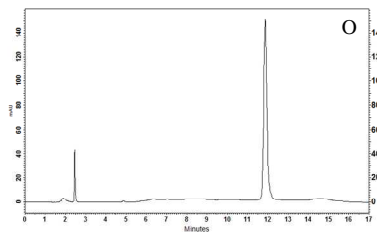
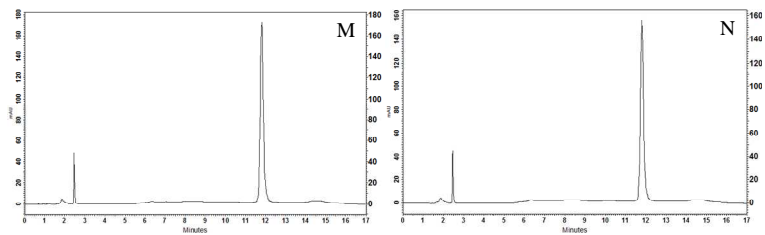
O sistema cromatográfico utilizado compreende fase móvel composta por tampão fosfato 50 mM pH 4 e acetonitrila (eluição gradiente) sob fluxo de 1 mL/min e detecção em 232 nm (concentração de 25 µg/mL).

Os cromatogramas estão identificados conforme a seguinte legenda:

- A – CAF.
- B – FUR.
- C – FUR:CAF seco.
- D – FUR:CAF água.
- E – FUR:CAF metanol.
- F – FUR:CAF acetonitrila.
- G – FUR:CAF acetona.
- H – FUR:CAF dioxano.
- I – NIC.
- J – FUR:NIC seco.
- K – FUR:NIC água.
- L – FUR:NIC metanol.
- M – FUR:NIC acetonitrila.
- N – FUR:NIC acetona.
- O – FUR:NIC dioxano.











## ANEXO 1

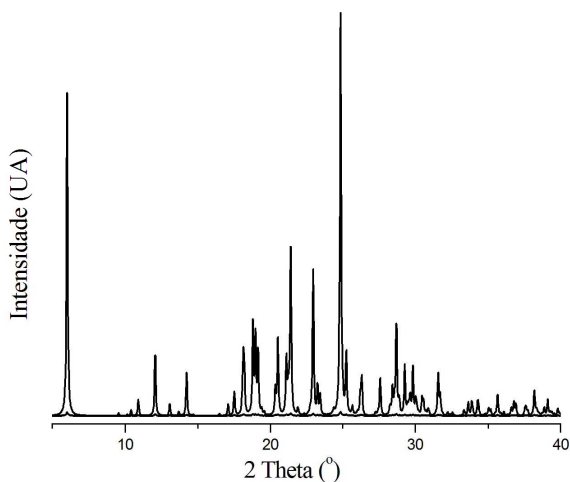


Figura 83 - Difratograma calculado ( $\lambda = 1,5418$  nm) para o polimorfo I de furosemina (FUROSEM 01) disponível no CSD (2012).

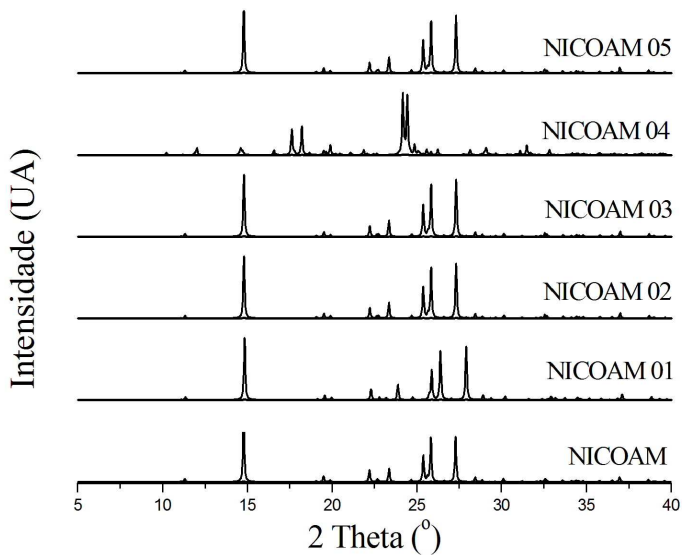


Figura 84 - Difratogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$  nm) para as formas polimórficas de nicotinamida disponíveis no CSD (2012).

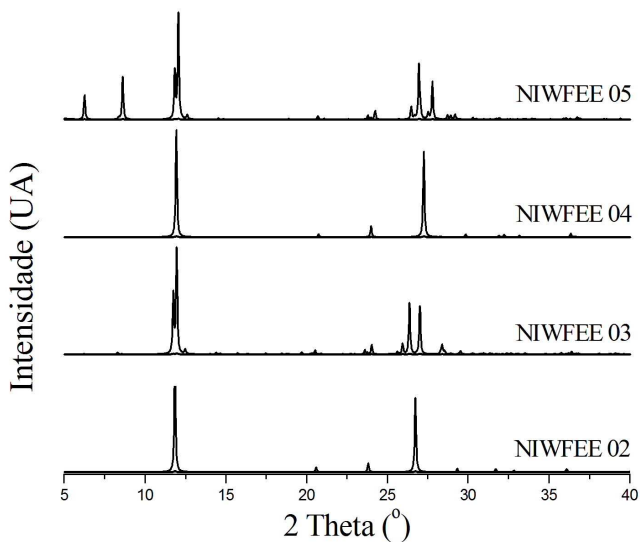


Figura 85 - Difratogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$  nm) para as formas polimórficas de cafeína disponíveis no CSD (2012).

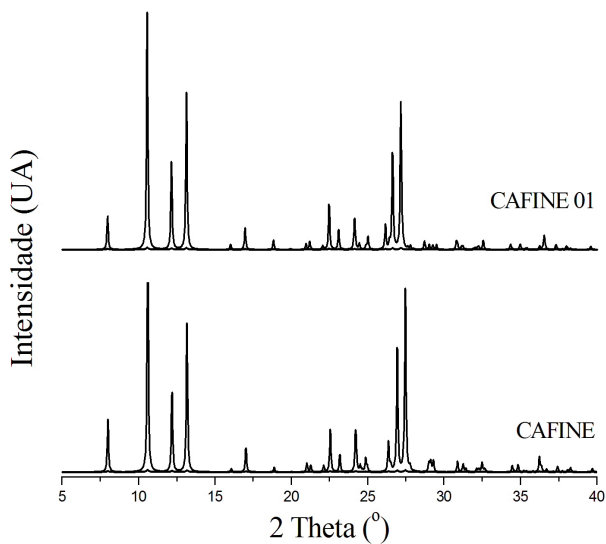


Figura 86 - Difratogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$  nm) para as formas polimórficas do hidrato de cafeína disponíveis no CSD (2012).

## ANEXO 2

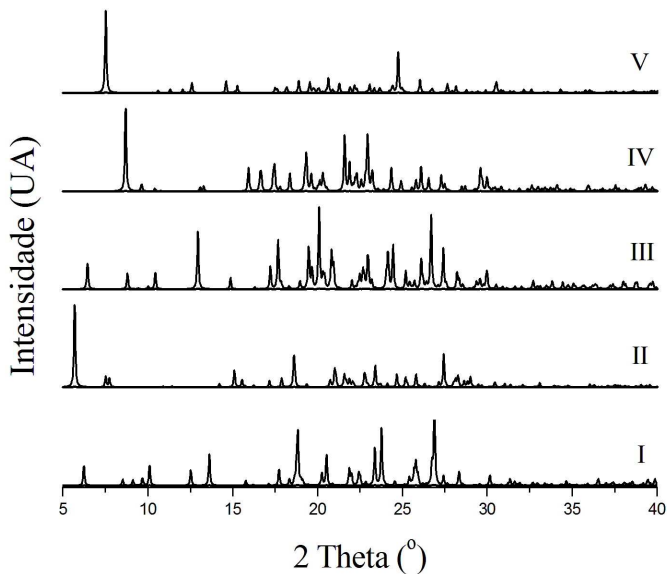


Figura 87 - Difratomogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$  nm) para as formas cocrystalinas FUR:NIC descritas por (UETO et al., 2011).

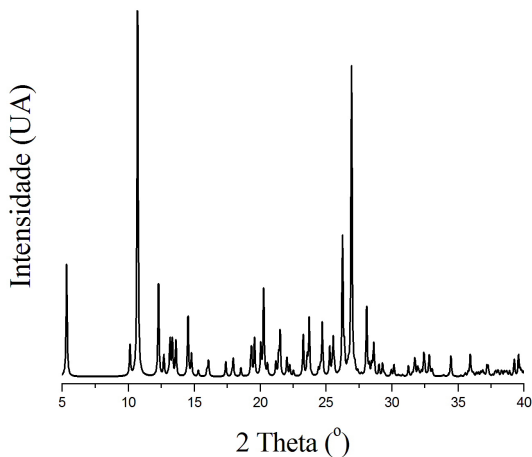


Figura 88 - Difratomogramas calculados ( $\lambda = 1,5418$  nm) para a forma cocrystalina FUR:CAF descrita por (GOUD et al., 2012).