



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Andrea Mariela Araya Sibaja

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DOS POLIMORFOS DA
PROGESTERONA E ESTABILIZAÇÃO DA FORMA
METAESTÁVEL SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS**

Florianópolis
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Andrea Mariela Araya Sibaja

**ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO DOS POLIMORFOS DA
PROGESTERONA E ESTABILIZAÇÃO DA FORMA
METAESTÁVEL SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Lucia
Cuffini

Co-orientadora: Profa. Dra. Simone
Gonçalves Cardoso

Florianópolis
2012

Às minhas mulheres: à mamãe,
mamaicha e mamamiamia, acho que a
herança genética de vocês resultou
numa boa mistura.

AGRADECIMENTOS

Considero que todo suporte por mais simples que seja faz-se indispensável para a realização de um trabalho, assim, a sequência na qual os nomes estão citados, não segue uma relação de importância, são todos igualmente importantes. Porém, preciso agradecer primeiro à Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso pela confiança em abrir as portas do Brasil e do laboratório sem me conhecer, espero não tê-la desapontado.

Agradeço a meu Deus pela oportunidade que me deu e soube aproveitar. Ao Luis pela persistência, perseverança e apoio, sem você não teria tido a coragem de morar em outro país e de ter alcançado este sonho.

Aos meus pais Bernardita e Edgar, com carinho especial à minha mãe que é a melhor mãe do mundo; as minhas irmãs Gréthel e Karina; ao meu irmão Edgardo, família maravilhosa que eu tenho e que me apoiou incondicionalmente.

Às minhas amigas Cinira, Amarílis, Andrea Japa e Paola por me fazerem sentir em casa e ser a minha família brasileira. Ao meu amigo e colega Rafael pela colaboração e amizade.

Aos meus amigos Isabella e Bruno pela paciência e apoio na fase final do trabalho.

Ao PGFAR, à Universidade Federal de Santa Catarina e à CAPES pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo apoio financeiro, junto à Universidad de Costa Rica e à Escuela de Química pelo tempo de licença outorgado.

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Lucia Cuffini quem apareceu no lugar correto no momento certo, quem me ensinou não só do estado sólido senão da vida, tenho muito que aprender ainda de você.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade e aos professores Prof. Dr. Marcos A. Segatto e Profa. Dra. Hellen K. Stulzer que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Aos colegas, funcionários e professores do PGFAR pela colaboração.

Aos professores e laboratórios que participaram neste trabalho: ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos do Laboratório de Difração de Raios X de Pó; ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC e seus funcionários; ao Prof. Dr. Valdir Soldi do Grupo de estudo em materiais poliméricos da UFSC e ao Prof. Dr. Gustavo Alberto Monti do FaMAF-Universidad Nacional de Córdoba e IFEG-CONICET, Córdoba Argentina.

E a todas as pessoas que fazem parte importante da minha vida, mas que por questão de espaço não consigo mencionar aqui.

“The important thing in science is not so much to obtain new facts as to discover new ways of thinking about them”

Sir William Henry Bragg

RESUMO

A nucleação heterogênea induzida por polímeros (PIHn) é uma técnica inovadora utilizada no “*screening*” de polimorfos na área farmacêutica. Consiste em cristalizar o fármaco sobre diferentes matrizes poliméricas e teve sucesso na descoberta de novas formas sólidas de fármacos como a carbamazepina, o sulindaco e o ácido tolfenâmico. A progesterona é utilizada em humanos e em animais, administrado em diferentes formas farmacêuticas, que podem ser preparadas cristalizando o fármaco em uma superfície polimérica. A progesterona apresenta duas formas cristalinas: a forma 1, que é termodinamicamente mais estável, e a forma 2, é a metaestável e mais solúvel. Apenas a forma estável é usada atualmente. Neste trabalho contemplou-se a aplicação da técnica PIHn para a progesterona, com o objetivo de estudar a cristalização polimórfica e determinar condições para estabilizar a forma 2. Foi utilizado o vidro, como controle, e seis polímeros: hidroxipropilmetil celulose (HPMC), álcool polivinílico (PVA), poliisopreno (PI), butadieno/acrilonitrila (NBR), dextrana e gelatina; três concentrações do fármaco: 0,5; 10 e 40 mg/mL e dois solventes: clorofórmio e acetona. Utilizando clorofórmio obteve-se a forma 2, a partir de soluções de 0,5 mg/mL, em quase todas as matrizes. Mistura de polimorfos foi obtida nas seguintes condições: a) das soluções de 40 mg/mL em clorofórmio em PVA, HPMC e gelatina; b) das soluções de 10 mg/mL em clorofórmio em PVA, e em ambos os solventes em HPMC, dextrana e gelatina; c) das soluções de 0,5 mg/mL em clorofórmio em gelatina, e em acetona em PVA, HPMC e dextrana. Na maioria dos polímeros os polimorfos apresentaram diferentes morfologias. Realizou-se estudo de estabilidade polimórfica da forma 2 obtida em PVA, HPMC e dextrana, a partir de soluções de 0,5 e 10 mg/mL em clorofórmio. No HPMC a forma 2 foi estável por 3 meses sob condições aceleradas de estabilidade (40°C, 75% UR), e no PVA e dextrana a estabilidade foi dependente da concentração. Ambos os polimorfos foram caracterizados e as estabilidades no estado sólido foram avaliadas, sob condições de estresse mecânico, ambiental e térmico, juntamente com a avaliação da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) dos mesmos. A forma 2 apresentou maior VDI, similar estabilidade química e maior resistência à degradação térmica que a forma 1. A forma 2 apresentou significativa instabilidade polimórfica com a moagem. Esses resultados apresentam-se interessantes para futuras aplicações farmacêuticas.

Palavras-chave: Progesterona. Polimorfismo em fármacos. Nucleação heterogênea induzida por polímeros. Estabilização de formas metaestáveis.

ABSTRACT

PHYSICAL AND CHEMICAL STUDY OF PROGESTERONE POLYMORPH AND STABILIZATION OF FORM 2 ON POLYMERIC MATRIZES

Polymer-induced heteronucleation (PIHn) is a novel technique used in polymorphic screening in the pharmaceutical field, that consists in crystallizes the drug on different polymeric matrices. It allowed to discover new solid forms of drugs such as carbamazepine, sulindac and tolfenamic acid. Progesterone is used in humans and in animals, it is administered in different dosage forms usually made crystallizing the drug on the polymers. Progesterone presents two crystal forms: form 1 is thermodynamically stable and form 2 is the metastable and more soluble form. Nowadays only the stable form is used. PIHn technique was applied in the study of progesterone polymorphs to determine the conditions to stabilize the metastable form. Six polymers: hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC), polyvinyl alcohol (PVA), polyisoprene (PI), butadiene/acrylonitrile (NBR), dextran, gelatin and glass as a control; three concentrations solutions: 0.5, 10 and 40 mg/mL and two solvents: chloroform and acetone were used. Form 2 was obtained from 0.5 mg/mL solutions in chloroform in almost all the polymers. A mixture of polymorphs was obtained from the following conditions: a) from 40 mg/mL solutions in chloroform on PVA, HPMC and gelatin; b) from 10 mg/mL solutions in chloroform on PVA, and in both solvents on HPMC, dextran and gelatin; c) from de 0,5 mg/mL solutions in chloroform on gelatin, and in acetone on PVA, HPMC e dextran. Both polymorphs exhibited differences in morphology on the different polymers. A stability study of form 2, obtained from 0.5 and 10 mg/mL solutions in chloroform on PVA, HPMC and dextran was performed. On HPMC form 2 was stable for 3 months under accelerated conditions (40 °C, 75% RH) and on PVA and dextran the stability was concentration dependent. Both polymorphs were characterized, including intrinsic dissolution rate (IDR) tests, and its stabilities in the solid state were evaluated under mechanical, environmental and thermal stress conditions. Form 2 presented higher IDR, similar chemical stability and greater resistance to thermal degradation than form 1. Form 2 showed significant polymorphic instability to grinding. These results are important for future pharmaceutical applications.

Keywords: Progesterone. Polimorphism in pharmaceuticals. Solid state chemistry. Polymer-induced heteronucleation. Solid state stress study

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Os sete sistemas cristalinos.....	37
Figura 2 – Esquema de classificação dos sólidos farmacêuticos.	38
Figura 3. Feixe de raios-X formando um ângulo θ com o conjunto de planos..	47
Figura 4. Zeolitas preparadas por crescimento secundário: (A) Difractogramas com diferentes graus de orientação preferencial e (B) Microfotografia e esquema do filme obtido.....	48
Figura 5. Difractogramas do α - manitol comprimido e pó, utilizados para determinar a orientação preferencial.....	49
Figura 6. Esquema de sistema utilizado nos testes de VDI.....	55
Figura 7. Esquema de fluxo padrão do solvente ao redor do sistema de disco rotatório.	56
Figura 8 – Estrutura química da Pregn-4-ene-3, 20-diona.....	58
Figura 9 – Empacotamento cristalino da progesterona: A) forma 1 e B) forma 2	61

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFOS DA PROGESTERONA

ARTIGO-1: Solid state characterization of progesterone polymorphs

Figure 1 – Chemical structure of Pregn-4-ene-3, 20-diona (progesterona).....	68
Figure 2 – Molecules overlaid of progesterone form 1 and form 2	72
Figure 3- Experimental and calculated XRPD patterns of progesterone polymorphs.....	73
Figure 4- (A) FT-IR Spectra and (B) of Raman spectra of solid-state progesterone polymorphs.....	74
Figure 5- ^{13}C CP/MAS ssNMR spectra of progesterone forms 1 and 2.....	75
Figure 6- Progesterone form 2 after 15 minutes of grinding (A) XRPD measured every 10 hours by 80 hours (B) DSC curve	78
Figure 7- Intrinsic dissolution profile of progesterone polymorphs.....	79
Figure 8- Experimental XRPD of progesterone form 1 crystallized from 40mg/mL solutions in: (A) acetone and (B) chloroform.....	80
Figure 9 – Experimental XRPD of progesterone form 1, form 2 and a mixture of polymorphs crystallized from 10 mg/mL solutions in: (A) acetone and (B) chloroform	81
Figure 10- Microphotographs of progesterone crystallized from chloroform: (A) 40 mg/mL (form 1), (B) 10 mg/mL (mixture of polymorphs) and (C) 0.5 mg/mL (form 2).....	82

Figure 11- Photographs of progesterone crystallized from acetone: (A) 40 mg/mL (form 1), (B) 10 mg/mL (mixture of polymorphs) and (C) 0.5 mg/mL (form 2)	82
---	----

CAPÍTULO 3- ESTABILIDADE QUÍMICA E POLIMORFICA DA PROGESTERONA

ARTIGO 2- Effects of seeding induced by grinding in the polymorphic stability of form 2

Figure 1- DSC curves of progesterone form 2 during grinding time, analytical curve of progesterone form 1 and kinetic analysis	94
Figure 2- XRPD patterns and FT-IR of progesterone form 2 during grinding time.....	95
Figure 3- DSC curves of progesterone form 2 mixed with different proportions of form.....	96
Figure 4- Relationship between heat of fusion and mass of progesterone polymorphs.....	96
Figure 5- Hot stage microscopy of progesterone form 2 ground for 15 minutes	97

ARTIGO 3- Chemical and polymorphic stability of progesterone under solid state stress conditions

Figure 1- Chromatogram of a mixture of progesterone stressed samples solution	108
Figure 2- Chromatograms of progesterone under acid storage conditions for 3 months	108
Figure 3- TGA curves of progesterone polymorphs and α -T curve for the thermal decomposition of progesterone at different temperatures.....	110
Figure 4- Ozawa-Flynn- Wall analysis for both progesterone polymorphs.....	110
Figure 5- XRPD patterns of progesterone form 2 of stability study.	112
Figure 6- DSC cuves of progesterone form 2 of stability study	113

CAPÍTULO 4- CRISTALIZAÇÃO DE PROGESTERONA SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS

ARTIGO 4-Crystal growth of progesterone polymorphs on polymeric matrices

Figure 1- Chemical structure of progesterone and polymers used.....	125
Figure 2- ATR-IR spectra of polymers used and progesterone polymorphs ...	126
Figure 3- XRPD patterns of progesterone form 1 obtained from 40mg/mL solutions in acetone.....	127

Figure 4- XRPD patterns of progesterone form 1 obtained from 40mg/mL solutions in acetone.....	127
Figure 5- ATR-IR spectra of progesterone form 1 obtained from 40mg/mL solutions in acetone.....	128
Figure 6- Microphotographs of progesterone crystallized from 40 mg/mL solutions in acetone.....	129
Figure 7- XRPD patterns and DSC curves of progesterone form 1 obtained from 10mg/mL solutions in acetone.....	130
Figure 8- XRPD patterns and DSC curves of progesterone form 1 obtained from 10mg/mL solutions in acetone.....	131
Figure 9- XRPD patterns of progesterone crystallized from 0.5mg/mL solutions in acetone.....	132
Figure 10- DSC curves of progesterone crystallized from 40mg/mL solutions in acetone.....	132
Figure 11- Microphotographs of progesterone crystallized from 0.5mg/mL solutions in acetone	133
Figure 12- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on HPMC from the three concentrations in chloroform	134
Figure 13- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on PVA from the three concentration in chloroform	135
Figure 14- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on gelatin from the three concentration in chloroform	135
Figure 15- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on dextran from the three concentrations in chloroform.....	136
Figure 16- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on NBR from three concentrations in chloroform	136
Figure 17- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on PI from the three concentrations in chloroform.....	137
Figure 18- ATR-IR spectra of progesterone crystallized on dextran and PVA from the three concentration in chloroform	138
Figure 19- Photomicrographs of progesterone crystallized on gelatin, HPMC, and PVA from the three concentrations in chloroform	141
Figure 20- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on PVA from 0.5 mg/mL solution in chloroform: stability study.....	142
Figure 21- XRPD patterns and DSC curves of progesterone crystallized on dextran from 10mg/mL solution in chloroform: stability study.....	143

ARTIGO 5- Morphology study of progesterone polymorphs prepared by polymer induced heteronucleation

Figure 1- SEM image of progesterone crystals obtained on PVA from the three concentrations in chloroform.....	150
Figure 2- SEM image of progesterone crystals obtained from 10 mg/mL solutions in acetone on PVA.....	150

Figure 3- SEM image of progesterone crystals obtained from 40mg/mL solutions in acetone on HPMC, PI and NBR.....	151
Figure 4- SEM image of progesterone crystals obtained from 10mg/mL solutions in acetone on NBR, HPMC and gelatin.....	152
Figure 5- SEM image of progesterone crystals obtained PI from the three concentrations in chloroform.....	152
Figure 6- SEM image of progesterone crystals obtained from 0.5 mg/mL solutions in acetone on gelatin, HPMC and PI.....	153
Figure 7- SEM image of progesterone crystals obtained on HPMC from the three concentrations in chloroform.....	153
Figure 8- SEM image of progesterone crystals obtained on dextran from the three concentrations in chloroform.....	154
Figure 9- SEM image of progesterone crystals obtained on gelatin from the three concentrations in chloroform.....	155
Figure 10- DSC curves of progesterone crystallized from 10mg/mL solution in chloroform on gelatin, dextran, PVA and HPMC.....	156

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quadro 1 – As redes de Bravais com o respectivo sistema cristalino definido pela célula unitária.....	36
Quadro 2 - Resumo das propriedades físico-químicas afetadas pelo polimorfismo.	39
Quadro 3 – Técnicas de cristalização comumente utilizadas na indústria farmacêutica.....	42
Quadro 4 – Códigos CCD relacionados aos polimorfos da progesterona.	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2- CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLIMORFOS DA PROGESTERONA

Table 1- Solid State ¹³ C CP/MAS NMR peaks of progesterone forms 1 and 2.....	76
Table 2- Progesterone crystal form obtained from acetone and chloroform at the three concentrations.....	79

CAPÍTULO 3- ESTABILIDADE QUÍMICA E POLIMÓRFICA DE PROGESTERONA

Table 1- Linearity data from progesterone analytical curves.....	107
Table 2- Accuracy: drug substance added into a mixture of stressed samples.....	107
Table 3- Precision: drug substance (%RSD).....	107
Table 4- Activation energies for the 0.05 to 0.90 conversions for the both progesterone polymorphs obtained by the Ozawa-Flynn-Wall method.....	111

CAPÍTULO 4- CRISTALIZAÇÃO DA PROGESTERONA SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS

ARTIGO 4- Progesterone crystal growth on polymeric matrices

Table 1- Progesterone crystal growth on the polymeric matrices at the three concentration levels and two solvents	139
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔH – Enthalpy change
ATR-IR – Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy
CCD – Charge-Coupled Device
CCDC – Cambridge Crystallographic Data Center
Cp – Heat capacity
CP – Cross Polarization
CSD - Cambridge Structural Database
DRIFT- Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform spectroscopy
DSC – Differential Scanning Calorimetry
DTG – TGA derivative
FDA – United States Food Drug and Administration
FT-IR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy
FWHM - Full Width at Half Maximum
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
HPMC – Hidroxypropylmethyl cellulose
HSM - Hot-stage microscopy
ICH – International Conference of Harmonisation
IDR – Intrinsic Dissolution Rate
API – Active Pharmaceutical Ingredient
MAS – Magic Angle Spinning
NBR – Acrilonitrile/butadiene copolymer
NMR- Nuclear Magnetic Resonance
NQS – Non quaternary Suppression
PDMS – Polydimetylsiloxane
PI – Polyisoprene
PIHn: Polymer-induced Heteronucleation
PVA – Polyvinyl Alcohol
RF – Radio Frequency
SEM – Scanning Electron Microscopy
ssNMR – Solid state Nuclear Magnetic Resonance
TA – Thermal Analysis
Tg – Glass transition temperature
TGA – Thermogravimetry
USP – United States Pharmacopeia
UV-Vis – Ultraviolet-visible spectroscopy
XRPD – X-Ray Powder Diffraction

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	29
OBJETIVOS	31
Objetivo Geral	31
Objetivos Específicos	31
CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
1.1 O ESTADO SÓLIDO E OS SÓLIDOS CRISTALINOS	35
1.1.1 Classificação dos sólidos farmacêuticos	37
1.1.1.1 Polimorfismo.....	38
1.1.1.2 Polimorfismo na indústria farmacêutica.....	39
1.1.2 O “screening” de polimorfos.....	40
1.1.2.1 Preparação de formas sólidas	41
1.1.2.1.1 Cristalização a partir do solvente	41
1.1.2.1.2 Técnicas de cristalização inovadoras no “screening” de polimorfos 43	
1.1.2.1.3 A técnica PIHn na área farmacêutica	44
1.1.3 Técnicas de caracterização do estado sólido.....	45
1.1.3.1 Difração de Raio-X de pó (DRXP)	46
1.1.3.1.1 Orientação preferencial	47
1.1.3.2 Métodos térmicos	49
1.1.3.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	50
1.1.3.3 Espectroscopias no estado sólido	51
1.1.3.3.1 Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	51
1.1.3.3.2 Espectroscopia Raman	52
1.1.3.3.3 ¹³ C Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido	52
1.1.3.4 Microscopias	53
1.1.3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
1.1.3.4.2 Hot stage (MHS)	53
1.1.3.5 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI).....	53
1.1.3.5.1 Aspectos teóricos da VDI.....	54
1.1.3.5.2 Método de disco rotatório	55
1.1.3.5.3 Cálculo da VDI e interpretação dos resultados	56
1.2 PROGESTERONA	58
1.2.1 O polimorfismo da progesterona e a sua escolha como fármaco modelo no uso da técnica PIHn.....	59
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLIMORFOS DA PROGESTERONA	63

2.1 ARTIGO 1 – Caracterização no estado sólido dos polimorfos da progesterona.....	65
Solid state characterization of progesterone polymorphs	67
CAPÍTULO 3: ESTABILIDADE QUÍMICA E POLIMÓRFICA DA PROGESTERONA	87
3.1 SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE MECÂNICO, TÉRMICO E AMBIENTAL.....	89
3.1.1 ARTIGO 2 – Efeitos do semeado induzido por moagem na estabilidade polimórfica da forma 2 da progesterona.....	91
Effects of seeding induced by grinding in the polymorphic stability of progesterone form 2	91
.....	91
3.1.2 ARTIGO 3 – Estabilidade química e polimórfica da progesterona sob condições de estresse.....	102
Chemical and polymorphic stability of progesterone under solid state stress conditions	102
CAPÍTULO 4 – CRISTALIZAÇÃO DA PROGESTERONA SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS	117
4.1 ARTIGO 4 – Crescimento de cristais da progesterone em matrizes poliméricas.....	121
Crystals growth of progesterone polymorphs on polymeric matrices	121
4.2 ARTIGO 5 – Estudo da morfologia dos polimorfos da progesterona preparadas através da nucleação heterogênea induzida por polímeros.....	147
Morphology study of progesterone polymorphs prepared by polymer induced heteronucleation.....	147
DISCUSSÃO GERAL.....	163
CONCLUSÕES	167
PERSPECTIVAS	169
REFERÊNCIAS	171

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

A propriedade de uma substância sólida de existir em mais de uma forma sólida é conhecida como polimorfismo. Os polimorfos apresentam diferenças nas suas características físicas e químicas. Algumas dessas características incluem: solubilidade, velocidade de dissolução, estabilidade física e química, higroscopicidade e reatividade. As diferenças na solubilidade são de particular importância na indústria farmacêutica, podendo afetar a eficiência, biodisponibilidade e toxicidade do fármaco (BYRN et al., 1999; CUFFINI; PITAULGA; TOMBARI, 2009; HUANG; TONG, 2004).

A ocorrência do polimorfismo e das transformações polimórficas em fármacos no processo de produção tem sido amplamente estudada (BRITTAIN, 2012; FUJIWARA et al., 2005; HUANG; TONG, 2004; LIN et al., 2006; ZHANG et al., 2004). Para evitar esses riscos a melhor prática é realizar um screening de polimorfos, antes de prosseguir com testes de pre-formulação e comercialização do produto. O objetivo do screening é gerar, isolar e caracterizar todas as possíveis formas sólidas do fármaco (AULTON, 2002).

Novas metodologias de cristalização têm sido desenvolvidas na procura e controle do polimorfismo. Mais recentemente a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros (Polymer-induced heteronucleation, PIHn) tem demonstrado sucesso na descoberta de novas formas sólidas de fármacos como a carbamazepina (LANG; KAMPF; MATZGER, 2002), o sulfametoxazol (PRICE et al., 2005), o sulindaco, o flurbiprofeno (GRZESIAK; MATZGER, 2007), e o ácido tolfenâmico (LÓPEZ-MEJÍAS; KAMPF; MATZGER, 2009b). Neste método o fármaco é cristalizado sobre superfícies poliméricas utilizando alguma das técnicas tradicionais de cristalização (RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004).

A progesterona apresenta dois polimorfos, a forma 1 é termodinamicamente estável à temperatura ambiente e pressão atmosférica; a forma 2 é metaestável sob as mesmas condições (DEFOSSEMONT et al., 2004). Estudos recentes realizados com a progesterona demonstraram a presença da forma 1 quando cristalizada em polidimetilsiloxano. Entretanto foi observada mistura das duas formas polimórficas quando cristalizada em poliisopreno (PI) (HEREDIA et al., 2009). A progesterona apresenta-se como um fármaco modelo interessante para a aplicação da técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros.

Neste trabalho, foi realizada uma caracterização completa do estado sólido incluindo a determinação da Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI) para ambos os polimorfos da progesterona. O trabalho contemplou, também, o estudo de estabilidade química no estado sólido e em solução. Este último foi realizado com o intuito de otimizar e validar o método analítico indicativo de estabilidade.

Realizaram-se experiências de cristalização com a técnica propriamente dita, em três concentrações do fármaco: 0,5; 10 e 40 mg/mL; em dois solventes: clorofórmio e acetona e sobre seis matrizes poliméricas: hidroxipropil metil celulose (HPMC), polivinil álcool (PVA), poliisopreno (PI), butadieno/acrilonitrila (NBR), dextrana e gelatina. Caracterizaram-se as amostras obtidas com relação à forma cristalina presente nos filmes poliméricos.

Finalmente, o estudo de estabilidade física e polimórfica contemplou a avaliação da transformação do polimorfo metaestável para o estável. Também se avaliou a transformação dele puro e misturado com a forma 1 e verificou-se a estabilidade da forma 2 cristalizada nos polímeros e na ausência destes.

Esta dissertação está apresentada em forma de capítulos com a seguinte estrutura: Capítulo 1- Revisão bibliográfica; Capítulo 2- Caracterização dos polimorfos de progesterona; Capítulo 3- Estabilidade física e química da progesterona; Capítulo 4- Cristalização da progesterona sobre matrizes poliméricas, para finalmente concluir o trabalho com a discussão geral, conclusões e as perspectivas a futuro.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Realizar a caracterização físico-química dos polimorfos da progesterona e aplicar a metodologia de “*screening*” de polimorfos utilizando a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros para determinar as condições de cristalização apropriadas para estabilizar a forma metaestável sobre matrizes poliméricas.

Objetivos Específicos

- Avaliar as propriedades do estado sólido dos polimorfos da progesterona;
- Determinar a estabilidade química dos polimorfos da progesterona e a estabilidade polimórfica da forma cristalina metaestável;
- Estudar diferentes condições de cristalização da progesterona em diferentes solventes e sobre diferentes matrizes poliméricas, realizando um “*screening*”, aplicando a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros;
- Identificar as diferentes morfologias adotadas pelos polimorfos da progesterona obtidos da cristalização sobre matrizes poliméricas de diferentes solventes.
- Estabelecer solventes, concentrações e matrizes poliméricas que estabilizam a forma metaestável ou forma 2.

CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão será dividida em duas partes, na primeira descrevem-se as características do estado sólido incluindo as técnicas analíticas empregadas na caracterização do estado sólido. Na segunda parte apresenta-se a progesterona como fármaco de escolha para uso da técnica PIHn.

1.1 O ESTADO SÓLIDO E OS SÓLIDOS CRISTALINOS

A matéria classifica-se convenientemente em três estados: sólido, líquido e gasoso. Estes estados apresentam diferentes níveis de mobilidade dos átomos ou moléculas. No estado sólido essa mobilidade limita-se às oscilações em uma posição fixa, inserida em uma estrutura rígida conhecida como rede. Com base na estrutura interna os sólidos são classificados em sólidos amorfos e sólidos cristalinos (MULLIN, 2001).

Os sólidos cristalinos estão formados pela repetição regular e indefinida, nas três dimensões do espaço, de unidades estruturais idênticas chamadas de célula unitária. A célula unitária apresenta orientação, dimensões e volume definidos, e contém os átomos ou as moléculas necessárias para gerar o cristal (VIPPAGUNTA et al., 2001).

Cada cristal pode ser classificado em uma das 7 classes de células unitárias ou sistemas cristalinos (Quadro 1, Figura 1). Os grupos espaciais mais comumente encontrados nos fármacos correspondem aos sistemas cristalinos: triclinicos, monoclinicos e ortorrômbicos (BYRN et al., 1999). Esses sistemas estão definidos pela relação entre as dimensões individuais a , b , c e entre os ângulos individuais α , β , γ da célula unitária (VIPPAGUNTA et al., 2001).

Quadro 1 – As redes de Bravais com o respectivo sistema cristalino definido pela célula unitária.

Sistema cristalino	Tipos de Rede	Dimensões da célula unitária	Ângulos da célula unitária
CÚBICO	Cúbico primitivo (<i>P</i>)	$a = b = c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Cúbico corpo centrado (<i>I</i>)		
	Cúbico face centrada (<i>F</i>)		
TETRAGONAL	Tetragonal primitivo (<i>P</i>)	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Tetragonal corpo centrado (<i>I</i>)		
ORTORRÔMBICO	Ortorrômico primitivo (<i>P</i>)	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Ortorrômico corpo centrado (<i>I</i>)		
	Ortorrômico face centrada (<i>F</i>)		
	Ortorrômico base centrada (<i>C</i>)		
ROMBOÉDRICO/ TRIGONAL	Trigonal/romboédrico primitivo (<i>P</i>)	$a = b = c$	$\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma \neq 90^\circ$
HEXAGONAL	hexagonal primitivo (<i>P</i>)	$a = b \neq c$	$\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$
MONOCLÍNICO	Monoclínico primitivo (<i>P</i>)	$a \neq b \neq c$	$\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$
	Moniclínico base centrada (<i>C</i>)		
TRICLÍNICO	Triclínico primitivo (<i>P</i>)	$a \neq b \neq c$	$\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

Fonte: Adaptado de HAMMOND, 2009; MULLIN, 2001; BRITAIN, 1999.

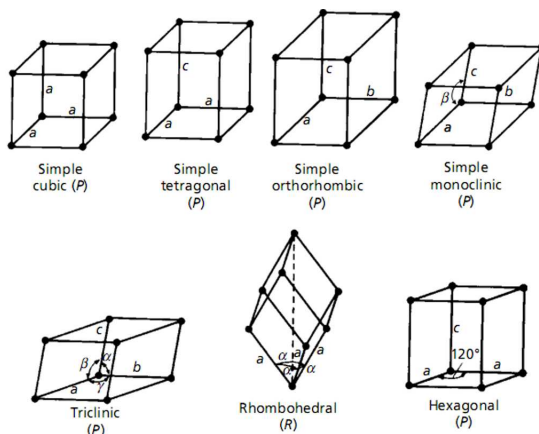


Figura 1 – Os sete sistemas cristalinos.

Fonte: HAMMOND 2009

Na teoria da rede espacial considera-se esta como um arranjo regular de pontos nas três dimensões, cada ponto representa uma unidade estrutural e deve ter um ambiente idêntico com os pontos restantes. Existem 14 tipos básicos de rede que conseguem essa homogeneidade e são conhecidas como redes de Bravais. Estas redes podem ser classificadas dentro dos 7 sistemas cristalinos com base na sua simetria. Existem somente 14 redes básicas e 230 possíveis grupos espaciais nos quais as estruturas cristalinas podem ser representadas (MULLIN, 2001).

As forças responsáveis pela formação do arranjo regular das moléculas no cristal são, no caso das moléculas orgânicas, interações não-covalentes, como as eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e dipolo-dipolo (BYRN et al., 1999).

1.1.1 Classificação dos sólidos farmacêuticos

Cuffini e colaboradores (2009) sugerem a classificação dos sólidos farmacêuticos em monocomponente e multicomponente. Como seu nome indica, os monocomponentes são aqueles que contêm um único componente (o fármaco) na estrutura cristalina. Incluem os sólidos anidros e, dentro desta classificação, os dessolvatos isomórficos são um

caso particular de anidros. Dentro dos multicomponentes encontram-se os solvatos, os sais e os co-cristais. Os hidratos são um tipo particular de solvatos, nos quais o solvente incorporado na estrutura cristalina é a água. Na figura 2 observa-se esquematizada essa classificação. Independentemente da classificação, esses sólidos são conhecidos de maneira geral na indústria farmacêutica como formas sólidas e todas elas, com exceção dos sólidos amorfos, podem apresentar polimorfismo (CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009).

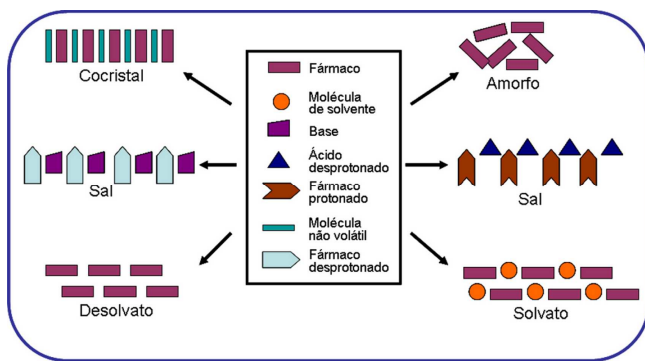


Figura 2 – Esquema de classificação dos sólidos farmacêuticos.

Fonte: Adaptado de CUFFINI; PITAULGA; TOMBARI (2009) e BRAGA et al. (2010).

1.1.1.1 Polimorfismo

Polimorfismo é a habilidade de uma substância química de cristalizar-se em mais de uma forma cristalina, sendo que a diferença entre elas é o arranjo e/ou conformação diferente dos átomos ou moléculas na rede cristalina. Essas formas cristalinas são chamadas de polimorfos (GEOFF et al., 2009). Na área farmacêutica essas substâncias sólidas podem ser tanto fármacos quanto excipientes. Apesar de ter a mesma composição química, os polimorfos apresentam diferenças na estrutura interna do cristal, portanto, apresentam diferenças nas propriedades físico-químicas (VIPPAGUNTA et al., 2001). De particular importância na indústria farmacêutica são as diferenças de solubilidade, as quais podem afetar a eficácia e biodisponibilidade do fármaco (HUANG; TONG, 2004). Os efeitos nas propriedades físico-químicas estão amplamente

documentados na literatura (BRITAIN, 2012; AALTONEN et al., 2009; CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009; BYRN et al., 1999) e resumidas no quadro 2.

Quadro 2 - Resumo das propriedades físico-químicas afetadas pelo polimorfismo.

Propriedades	Diferenças
Empacotamento	Volume da célula unitária (apenas formas cristalinas), densidade, índice de refração, condutividade térmica e elétrica, higroscopicidade e cor.
Termodinâmicas	Temperaturas de fusão e sublimação, energia interna e entropia, capacidade calorífica, potencial químico e energia livre, atividade termodinâmica, pressão de vapor e solubilidade.
Espectroscópicas	Transições eletrônicas (espectro UV-Vis), transições vibracionais (espectros IV e Raman), transições rotacionais (espectro IV-distante ou microondas), transições <i>spin</i> nuclear (espectros RMN).
Cinéticas	Velocidade de dissolução, velocidade de reação do estado sólido, estabilidade.
Superficiais	Energia livre de superfície, tensões interfaciais e hábito cristalino (ou morfologia).
Mecânicas	Dureza, resistência à tração, compactabilidade, <i>tableting</i> , fluidez e mistura.

Fonte: Adaptado de AALTONEN et al., 2009 e CUFFINI; PITALUGA; TOMBARI, 2009.

1.1.1.2 Polimorfismo na indústria farmacêutica

Segundo a FDA, para a indústria farmacêutica são considerados polimorfos de um insumo farmacêutico ativo (IFA) as formas cristalinas, as amorfas, os solvatos e os hidratos de uma mesma substância ou fármaco. Devido a essa diferenciação na definição do polimorfismo é utilizado o termo polimorfo verdadeiro para se referir às formas cristalinas, e pseudopolimorfos para as formas sólidas restantes (FDA, 2007).

Para a indústria farmacêutica, os polimorfos verdadeiros e os hidratos desempenham um papel especial entre as possíveis formas sólidas, uma vez que estas são as mais comumente encontradas nos produtos finais (HILFIKER et al., 2006a).

O polimorfismo na indústria farmacêutica é muito comum. Cerca de 90% dos fármacos são moléculas pequenas (peso molecular

menor a 600g/mol), e 32 a 51% dessas moléculas apresentam polimorfismo. Considerando os solvatos, esse valor encontra-se entre 56 e 87% (HILFIKER; BLATTER; et al., 2006).

Alguns fármacos apresentam maior susceptibilidade à formação de polimorfos. Estima-se que aproximadamente 65% das sulfonamidas comerciais e 70% dos barbitúricos exibem várias formas polimórficas (ATTWOOD, 2008).

As formas polimórficas podem aparecer em qualquer etapa do processo de produção de fármacos, tais como: cristalização, moagem, liofilização, “spray drying”, dispersão sólida, granulação via úmida e armazenamento acelerado (YU, 1998). O estresse ao qual é submetida a rede cristalina do sólido pode causar aumento na desordem dessa rede cristalina, ocorrendo transformação de fases (VIPAGUNTA et al., 2001).

Devido à possibilidade de identificação dessa transformação em etapas posteriores ao desenvolvimento do produto, é vital o “screening” do estado sólido e o controle de qualidade durante todas as etapas de produção das formas farmacêuticas.

1.1.2 O “screening” de polimorfos

Segundo Aaltonen e colaboradores (2009), a atividade de gerar, isolar e analisar diferentes formas sólidas de um IFA é conhecido como “screening” de polimorfos. O processo tem como objetivo obter a forma sólida mais adequada de um IFA que possua as melhores características para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. Inclui os diferentes processos de preparação de formas sólidas, com a sua posterior caracterização do estado sólido (AALTONEN et al., 2009).

Atualmente diversas pesquisas têm utilizado programas para predição de polimorfos de um IFA, assim como tem sido desenvolvidos e aperfeiçoados novos programas. A técnica computacional ainda não atende as necessidades da indústria farmacêutica, mas pode fornecer informações interessantes para orientar o “screening” experimental (LANCASTER et al., 2006; PRICE, 2004; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004).

O “screening” de polimorfos de forma experimental é uma exigência do ICH para o desenvolvimento de novos fármacos, conforme descrito no guia Q6A (ICH, 2000).

1.1.2.1 Preparação de formas sólidas

Os métodos clássicos de obtenção de formas sólidas são a cristalização, a sublimação, a precipitação, as transformações induzidas pelo calor e os tratamentos mecânicos, como a moagem. Na procura de novas formas sólidas de um IFA têm sido desenvolvidas técnicas inovadoras baseadas naquelas anteriormente citadas, ou combinações delas. Dentre os métodos de obtenção dos sólidos recentemente utilizados na indústria farmacêutica encontram-se: a dessolvatação, a liofilização e a nebulização, que são variações entre a cristalização e as transformações induzidas pelo calor (AALTONEN et al., 2009).

Historicamente na indústria farmacêutica, a cristalização tem sido a operação de separação e purificação mais importante (PAUL et al., 2005). As condições em que ocorre este processo determinam as propriedades do cristal. Dentre elas destacam-se a pureza do produto, o tamanho e distribuição do hábito cristalino e a forma polimórfica (YU et al., 2007). A cristalização pode ocorrer a partir da substância fundida ou a partir do solvente. Considerando o tema de interesse do presente trabalho, será abordada, a seguir, apenas a cristalização a partir do solvente.

1.1.2.1.1 Cristalização a partir do solvente

A cristalização a partir do solvente consiste em dissolver a substância de interesse em um solvente e reduzir, de alguma forma, a solubilidade da substância no solvente, até obtenção do sólido desejado (BYRN et al., 1999). Os métodos mais comumente utilizados na indústria farmacêutica para atingir essa redução da solubilidade são apresentados no quadro 3. Embora algumas das técnicas apresentadas no quadro 3 sejam estritamente processos de precipitação, no contexto da indústria farmacêutica e desta dissertação em particular, serão consideradas técnicas de cristalização a partir do solvente.

Quadro 3 – Técnicas de cristalização comumente utilizadas na indústria farmacêutica

Técnica de cristalização
Evaporação do solvente
Resfriamento da solução
Semear uma solução supersaturada com cristais da forma sólida desejada
Freeze drying (incluindo mistura de solventes)
Adição de antisolventes
Eliminação de sal
Mudanças de pH
Adição de um reagente para obtenção de um sal o novo composto
Transições de fase deliberadas nos processos de slurry, lavado ou secado
Adição simultânea de duas soluções

Fonte: adaptado de AALTONEN et al., 2009 e BYRN et al., 1999

Independentemente da técnica de cristalização empregada o processo consiste de três passos básicos: supersaturação, nucleação e crescimento (MULLIN, 2001).

Supersaturação

O estado de um sistema onde a fase sólida está em equilíbrio com a fase em solução é conhecido como saturação. Neste estado a solução não solubiliza mais o sólido, nem permite o crescimento dos cristais. A concentração da solução saturada representa o valor da solubilidade da fase cristalina. Soluções diluídas, com concentrações abaixo do valor de saturação, são chamadas de insaturadas e nelas é possível a solubilização do sólido. Entretanto, as concentrações com valores acima da saturação são soluções supersaturadas. Esta concentração é indispensável para promover o crescimento dos cristais. No entanto, soluções supersaturadas podem permanecer nessa condição sem formar cristais. Somente quando existe uma força motriz que faz o sistema se afastar do equilíbrio é que se forma um núcleo, e começa o crescimento do cristal (ICHIRO, 2004).

Nucleação

O primeiro passo para a formação de cristais a partir de uma solução supersaturada é a formação de um núcleo viável. Isso quer dizer um número crítico de moléculas ordenadas, do tamanho mínimo da célula unitária, que atuam como centros de cristalização. A nucleação pode ocorrer espontaneamente ou pode ser induzida artificialmente (BYRN *et al.*, 1999).

- *Nucleação primária*: pode ser homogênea ou heterogênea. Quando a formação do núcleo viável na solução se dá unicamente a partir do sólido dissolvido, ou seja, de maneira espontânea, a nucleação é homogênea. Se, ao contrário, a nucleação é induzida por partículas externas à solução, que atua como núcleo, ela é heterogênea (MULLIN, 2001).
- *Nucleação secundária*: ocorre quando já existe na solução cristais do sólido ou eles são adicionados deliberadamente na solução. Inclui cristalizações sucessivas após o cristal formado e adição de núcleos ou sementes da forma cristalina desejada à solução (BYRN *et al.*, 1999).

Crescimento

O crescimento do cristal é o nascimento e desenvolvimento de uma fase sólida ordenada a partir de uma fase desordenada e irregular que pode ser considerada uma transição de fase de primeira ordem. O crescimento começa uma vez formado o núcleo viável na solução supersaturada até obtenção dos cristais de tamanho visível (ICHIRO, 2004).

1.1.2.1.2 Técnicas de cristalização inovadoras no “screening” de polimorfos

Serão descritas cinco técnicas mais recentes de “screening” de polimorfos voltadas para a indústria farmacêutica. As duas primeiras são modificações da cristalização clássica e as outras utilizam a cristalização convencional, porém atuam no processo de nucleação (AALTONEN *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-SPONG *et al.*, 2004).

Cristalização de alto desempenho (High throughput crystallization method): Esta técnica consiste em utilizar todas as possíveis

combinações de temperatura, concentração e misturas de solventes produzindo, assim, milhares de condições. É uma técnica automatizada que geralmente requer hardware e software para gerar, armazenar e analisar os dados obtidos. Normalmente utiliza acoplamento de técnicas ópticas e de espectroscopia Raman para caracterização dos cristais obtidos (MORISSETTE et al., 2004).

Cristalização em capilares (Capillary growth method): A cristalização é realizada dentro de um tubo capilar de 1.0 mm de diâmetro, requer volumes muito pequenos e pouca quantidade de massa da substância em estudo para atingir a supersaturação. Outra vantagem dessa técnica é que utiliza difração de raios-X de pó ou difração de raios-X de monocristal para a caracterização dos cristais, sem remoção dos cristais do capilar (RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004).

Nucleação induzida por laser (Laser-induced nucleation): A solução supersaturada é irradiada com um laser com o propósito de diminuir a barreira energética necessária para a formação do núcleo viável, afetando, desta forma, a velocidade de nucleação (IEFUJI et al., 2011).

Nucleação heterogênea sobre superfície de monocristal (Heteronucleation on single crystal substrates): Nesta técnica são utilizados monocristais de outras substâncias orgânicas ou inorgânicas como substratos para a cristalização da substância de interesse. A superfície orienta o crescimento do cristal uma vez que alinha os parâmetros de rede da substância (MITCHELL et al., 2001).

Nucleação heterogênea induzida por polímeros (Polymer-induced heteronucleation PIHn): Neste método se utiliza uma biblioteca de polímeros, ou seja, uma seleção de diferentes polímeros quimicamente diversos, nos quais são realizadas as cristalizações. A substância de interesse se cristaliza por qualquer técnica convencional de cristalização, na presença dos polímeros que funcionam como núcleos. É mudado unicamente o substrato sobre o qual é cristalizado o fármaco. (PRICE et al., 2005; RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004).

1.1.2.1.3 A técnica PIHn na área farmacêutica

A técnica foi introduzida como um método eficiente para a produção seletiva de polimorfos, já que tem como estratégia influenciar

no processo de nucleação utilizando o polímero como núcleo. O método também demonstrou ser adequado para a obtenção de monocristais, o que facilita a posterior determinação da estrutura cristalina. A técnica pode ser utilizada em uma ampla variedade de sistemas e permite fazer variações tanto do polímero (que atua como núcleo) quanto do solvente, da temperatura, da concentração e qualquer outra condição da cristalização (LANG; GRZESIAK; MATZGER, 2002a).

Foi primeiramente aplicado à carbamazepina e ao acetaminofeno utilizando uma biblioteca de 84 polímeros diferentes. No caso da carbamazepina foi descoberto o IV polimorfo estável à temperatura ambiente (LANG; KAMPF; MATZGER, 2002) e para o acetaminofeno foi possível obter o polimorfo II a partir de soluções aquosas (LANG; GRZESIAK; MATZGER, 2002b).

Posteriormente, essa técnica teve sucesso na obtenção de 6 polimorfos do 5-metil-2-[(2-nitrofenil)amino]-3-tiofenecarbonitrila (ROY). Esta substância é um intermediário na síntese da olanzapina e representa um desafio quando testadas novas metodologias de “screening” de polimorfos, pois seus 6 polimorfos apresentam cores e hábito cristalino bem diferenciados, o que facilita a identificação por espectroscopia óptica (PRICE et al., 2005).

Outros fármacos foram utilizados para testar a técnica PIHn, dentre eles cita-se o sulfametoxazol, o flurbiprofeno, o sulindaco e o ácido tolfenâmico. Para o sulfametoxazol foram descobertos 2 polimorfos (PRICE et al., 2005). No caso do flurbiprofeno, o polimorfo III foi produzido em grandes quantidades, foi possível determinar sua estrutura cristalina e um novo hidrato desse fármaco também foi descoberto. Já para o sulindaco foi obtido o monocristal do polimorfo I, que teve sua estrutura cristalina determinada e foi descoberto o polimorfo IV (GRZESIAK; MATZGER, 2007). Três novas formas sólidas do ácido tolfenâmico foram descobertas utilizando esta metodologia (LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2009).

Mais recentemente a PIHn vem sendo utilizada com sucesso na elucidação estrutural de proteínas, o que representa uma ferramenta importante no design de fármacos que possam ser direcionados aos sítios específicos dentro da proteína (FOROUGHİ et al., 2011; GRZESIAK; MATZGER, 2008).

1.1.3 Técnicas de caracterização do estado sólido

Nesta seção são apresentadas as principais técnicas de caracterização do estado sólido empregadas no estudo e caracterização

de polimorfos. A FDA, no seu guia para a indústria, considera a difração de raios-X de pó como prova inequívoca da existência de polimorfismo. Contudo, menciona outras técnicas que podem fornecer informação adicional útil para uma caracterização completa dos polimorfos (FDA, 2007).

1.1.3.1 Difração de raios-X de pó (DRXP)

Esta técnica fornece informações da rede cristalina sendo então a técnica primária na determinação de formas cristalinas de um IFA (BUGAY, 2001). O método requer pequena quantidade de substância e pode ser aplicado a qualquer amostra em pó (BYRN et al., 1999).

Os materiais cristalinos possuem seus átomos ordenados em uma rede tridimensional que se repete periodicamente e que é conhecida como estrutura cristalina (VIPAGUNTA et al., 2001). Nesse arranjo periódico dos átomos é possível construir conjuntos de planos paralelos entre si, com distâncias interplanares (d) da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda dos raios-X (λ). A difração de raios-X ocorre apenas quando o ângulo entre o raio e o conjunto de planos no cristal satisfazem a lei de Bragg (Equação 1):

$$2d_{hkl} \sin \theta = n\lambda \quad \text{Equação 1}$$

onde θ é o ângulo entre o raio e o plano (ângulo de difração) e n é um número inteiro (figura 3) (CULLITY; STOCK, 2001).

Os conjuntos de planos no espaço se definem mediante três números inteiros chamados de índices de Miller (hkl) e o espaço interplanar específico para cada conjunto de planos paralelos se indica como d_{hkl} . Para cada conjunto de planos no cristal existe um ângulo de difração de Bragg associado para cada λ especificado (DINNEBIER; BILLINGE, 2008).

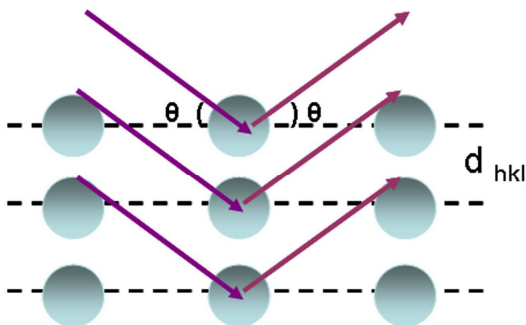


Figura 3. Feixe de raios-X formando um ângulo θ com o conjunto de planos.

Fisicamente o processo consiste na dispersão dos raios-X pelas nuvens eletrônicas que rodeiam os átomos de cada plano do cristal. A intensidade da radiação difratada depende da densidade eletrônica dos átomos nos planos que produzem a difração. O padrão de difração é obtido como resultado das interferências construtivas e destrutivas da radiação dispersada pelos átomos. Consiste em uma série de picos detectados a vários ângulos de difração que são determinados pela rotação da amostra (PECHARSKY; ZAVALIJ, 2009). Esses picos ou reflexões identificam-se pela sua posição em valores de ângulo (2θ) ou de distância interplanar (d_{hkl}) e pela sua intensidade. Sendo que cada substância pura ou composto cristalino apresenta uma determinada distribuição periódica em sua estrutura cristalina o padrão de difração gera um único conjunto de reflexões associadas a um único padrão de difração característico que é considerado uma impressão digital do sólido cristalino (FAUDONE, 2009). Esse padrão é característico tanto nas posições das reflexões quanto na intensidade delas. Entretanto, as intensidades podem variar entre amostras, dependendo da preparação da amostra e condições instrumentais. Segundo a Farmacopéia americana a identificação de formas cristalinas pode ser feita pela posição das reflexões comparadas com as de um padrão de difração de referência e para que duas formas cristalinas sejam consideradas a mesma, as posições não devem variar mais de $\pm 0,2^\circ$ (USP, 2012a).

1.1.3.1.1 Orientação preferencial

A condição ideal para a difração de raios-X de pó ocorre quando a amostra apresenta uma distribuição aleatória dos planos cristalográficos em posição de difração. As vezes esta situação não é atingida devido às morfologias das partículas que privilegiam alguns

planos cristalográficos em preferência a outros, como por exemplo no caso de plaquetas, agulhas e crescimentos epitaxiais (DINNEBIER; BILLINGE, 2008).

Um caso extremo de distribuição não aleatória dos cristalitos é conhecido como orientação preferencial. A comparação das intensidades de um padrão de difração com distribuição aleatória e outro que apresenta orientação preferencial podem-se mostrar completamente diferentes (SCINTAG INC, 2012) em relação às intensidades relativas das reflexões, entretanto a posição das mesmas é coincidente. A figura 4A apresenta diferentes graus de orientação preferencial de zeolitas preparadas por crescimento secundário e a figura 4B mostra uma microfotografia delas com o diagrama proposto do filme obtido.

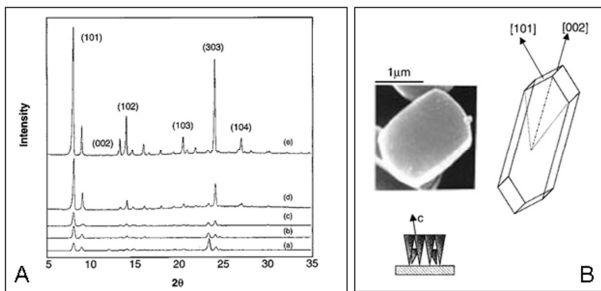


Figura 4. Zeolitas preparadas por crescimento secundário: (A) Difratoogramas com diferentes graus de orientação preferencial e (B) Microfotografia e esquema do filme obtido.

Fonte: GOUZINIS, 1998.

A orientação preferencial pode ser determinada experimentalmente usando um goniômetro de difração de raios-X de textura (X-ray diffraction texture goniometer). Na figura 5 são apresentados os difratogramas do α - manitol em comprimido e da matéria prima em pó utilizados por Koivisto et al. (2004) para caracterizar a orientação preferencial dos cristalitos do α - manitol em comprimidos.

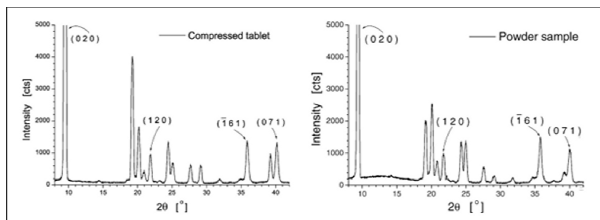


Figura 5. Difractogramas do α - manitol comprimido e pó, utilizados para determinar a orientação preferencial.

Fonte: KOIVISTO et al., 2004.

As análises quantitativas que são dependentes da relação de intensidades são grandemente distorcidas por este fenômeno. Existem vários métodos para evitar a orientação preferencial, um deles é a preparação correta das amostras que inclui a moagem até a obtenção de um pó fino e posterior peneirado. Porém, esta metodologia é desaconselhada para fármacos devido às características físicas da amostra, podendo inclusive provocar transformações polimórficas (BRITTAIN, 2012; LIN et al., 2006).

Entre tanto, a orientação preferencial é procurada em algumas áreas como na engenharia de materiais, para aplicações específicas. Por exemplo, a orientação preferencial do grafite é induzida com o intuito de aumentar a sua condutividade térmica para uso em dispositivos eletrônicos de menor tamanho (YUAN et al., 2012).

1.1.3.2 Métodos térmicos

Dentre os métodos térmicos mais utilizados na análise de sólidos e, em particular na indústria farmacêutica, encontram-se a Termogravimetria (TGA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A Termogravimetria determina mudanças na massa de uma amostra quando submetida a variações de temperatura. A Calorimetria Exploratória Diferencial mede as diferenças de temperatura entre a amostra e uma substância de referência quando é fornecido calor no sistema, fornecendo assim, informações de diferenças de entalpia (BYRN et al., 1999).

Os métodos térmicos podem ser utilizados para avaliação da pureza, porcentagem de cristalinidade, polimorfismo, grau de solvatação, degradação de um IFA assim como para estudo de compatibilidade (GIRON, 2004).

1.1.3.2.1 *Calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

Esta técnica permite medir a diferença de fluxo de calor entre a amostra e um material de referência inerte, em função do tempo ou da temperatura, que corresponde a uma medida de mudança na entalpia ou na capacidade calórica da amostra. Como resultado é obtido um gráfico ou curva DSC (BROWN, 2004).

Dependo da mudança física ou química experimentada pela amostra durante o processo de aquecimento ou resfriamento controlado, serão refletidos na linha de base como eventos endotérmicos, exotérmicos ou desvios. Os eventos endotérmicos correspondem a fenômenos de absorção de energia como, por exemplo, fusão, ebulição, sublimação, transições de fase, dessolvatação, degradação química entre outros. Já os eventos exotérmicos correspondem à liberação de calor como a cristalização e a decomposição oxidativa. A área embaixo da curva dos picos é diretamente proporcional à mudança de entalpia envolvida no processo, portanto se podem determinar as entalpias de transição ΔH e as capacidades calóricas (C_p) (READING; CRAIG, 2007).

Nos sistemas polimórficos a resposta mais importante é a referente à fusão sendo que diferentes formas sólidas de um IFA podem apresentar diferentes pontos e entalpias de fusão. Outro evento importante em sistemas polimórficos e em particular de sistemas enantiotrópicos são os pequenos eventos endo ou exotérmicos que refletem as transformações da forma metaestável para a forma estável (DETOISIEN et al., 2011).

Os sólidos amorfos apresentam desvios na linha de base correspondente a temperatura de transição vítrea (T_g), devido a sua transformação para líquido superresfriado, ou vice-versa. Este processo depende da mobilidade molecular e não tem transferência de calor associada, portanto não produz mudança de entalpia ($\Delta H = 0$) (FAUDONE, 2009).

1.1.3.2.2 *Análise termogravimétrica (TGA)*

Esta técnica permite determinar a variação de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo em uma atmosfera controlada. É utilizada amplamente na área farmacêutica para estudar processos de dessolvatação e decomposição de fármacos e excipientes (GALWEY; CRAIG, 2007). Junto com o DSC apresenta-se como uma ferramenta útil na atribuição de eventos térmicos. A TGA é utilizada para a análise quantitativa de conteúdo de água e solvente nos fármacos.

Geralmente é obtida a derivada da curva TGA conhecida como DTG para o esclarecimento dos eventos de perda de massa que podem aparecer muito próximos e que são difíceis de visualizar (DETOISIEN et al., 2011; BROWN, 2004).

1.1.3.3 Espectroscopias no estado sólido

Devido a sua capacidade para a elucidação estrutural e para determinar interações inter e intra moleculares, as espectroscopias: no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), a Raman e a Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido (ssRMN) são de grande utilidade na área farmacêutica (FAUDONE, 2009).

Diferenças na estrutura cristalina podem ser avaliadas pelas espectroscopias vibracionais (absorção no infravermelho e o Raman dispersivo) se estas afetarem as vibrações moleculares. No caso que as diferenças sejam produto de perturbações do ambiente químico do núcleo a técnica apropriada será a Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido (ssRMN) (MORCOMBE; ZILM, 2003).

1.1.3.3.1 *Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)*

Esta técnica consiste em expor a amostra à radiação eletromagnética de número de onda na região do infravermelho e medir a radiação absorvida pela amostra. Para que uma vibração seja ativa no infravermelho deve existir uma mudança no momento dipolar. O número de onda na faixa de 400-4000 cm^{-1} que corresponde ao infravermelho médio é muito utilizado para estudo de compostos orgânicos, sendo que nesse intervalo ocorrem as frequências de vibração naturais dos átomos nas moléculas (BUGAY, 2001).

Uma vez que as mudanças vibracionais indicam interações moleculares no estado sólido, esta técnica é extremamente sensível à estrutura, conformação e ambiente químico dos compostos orgânicos. Portanto, ela é comumente utilizada para estudos no estado sólido, porque adicionalmente apresenta-se como uma técnica rápida, barata e que não requer de tratamento prévio da amostra (FAUDONE, 2009).

Dentre as técnicas de infravermelho a refletância difusa com transformada de Fourier (DRIFT) é considerada a mais apropriada para o estudo do polimorfismo pois não é necessário submeter a estrutura cristalina à um estresse mecânico que possa provocar transformação polimórfica. Nesta técnica, um feixe de radiação infravermelha incide sobre a amostra em pó e é absorvida, refletida e difratada pelas partículas da amostra. Apenas a radiação incidente que sofre refletância contém informação da absorvidade da amostra e permite analisar o

espectro infravermelho que produz a amostra (HOLLAS, 2004). Uma desvantagem desta técnica é a dependência com o tamanho das partículas, que pode interferir em análises quantitativas. A refletância total atenuada (ATR-IR) é outra das técnicas apropriadas para estudos no estado sólido. Consiste na obtenção de informação espectral da superfície do cristal. A radiação penetra o material apenas uns poucos microns (BUGAY, 2001).

1.1.3.3.2 *Espectroscopia Raman*

O nome da técnica deriva do pesquisador indiano que demonstrou experimentalmente o efeito Raman: Chandrasekara Venkata Raman. O efeito Raman consiste no espalhamento inelástico de radiação eletromagnética e monocromática que interage com as moléculas (LOPES, 2008). Nesta técnica a amostra é irradiada com uma fonte laser potente, monocromática na região do visível ou infravermelho próximo, a radiação espalhada é medida em cm^{-1} em um determinado ângulo com um espectrômetro apropriado. As frequências vibracionais são determinadas pela diferença entre frequências de radiação espalhada e incidente (SKOOG; HOLLER, 2000).

Os espectros Raman de uma molécula consistem em uma série de picos ou faixas cada um fornecido por frequência vibracional inerente a cada molécula (LORINCZ et al., 2004). Esta técnica fornece informações do movimento de translação e rotatório de uma molécula inteira na rede cristalina. Essas vibrações ocorrem na faixa de $400\text{-}10\text{cm}^{-1}$ e são também ativas no infravermelho; porém o desenho do espectrofotômetro Raman permite melhor seu estudo (BUGAY, 2001), fazendo com que esta técnica seja apropriado para estudos no estado sólido.

1.1.3.3.3 *^{13}C Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido*

Esta técnica é baseada na absorção da energia de radio frequência (RF) do espectro eletromagnético. A amostra é colocada em um campo magnético forte e a absorção ocorre quando o spin do núcleo muda a orientação. Para que isso ocorra é necessário um núcleo com spin diferente de zero. Os núcleos mais utilizados são ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{25}Mg e ^{23}Na . Os deslocamentos químicos detectados são característicos do entorno local e químico da molécula (MORCOMBE; ZILM, 2003).

O espectro RMN no estado sólido é medido em condições diferentes das utilizadas para as medidas em solução. No estado sólido existem interações internas e externas, bipolares e deslocamentos químicos anisotrópicos que devem ser minimizados para obter sinais de

ressonância estreitos. A RMN no estado sólido utiliza o espectro ^{13}C -RMN desacoplando os prótons dos núcleos de carbono, com rotação do ângulo mágico (MAS) e polarização cruzada (CP) que permite a obtenção de espectros de alta resolução mais fáceis de interpretar (DYBOWSKI; BAI, 2008).

1.1.3.4 Microscopias

1.1.3.4.1 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Nesta técnica a amostra é coberta com ouro ou grafite para torná-la condutora e evitar que se carregue eletrostaticamente. A amostra é irradiada com um feixe fino de elétrons, a interação deste feixe de elétrons com a superfície da amostra provoca a emissão de vários tipos de radiações, e, dentre elas, a detecção de elétrons secundários é responsável pela formação da imagem de alta resolução da topografia da superfície das amostras do MEV (FAUDONE, 2009).

A microscopia eletrônica de varredura apresenta-se como uma técnica muito útil para na caracterização de polimorfos que apresentam diferentes hábitos cristalinos e/ou efeitos superficiais (BYRN et al., 1999).

1.1.3.4.2 *Hot stage (MHS)*

Também conhecida como microscopia térmica ou termomicroscopia, a microscopia de Hot-stage é uma técnica analítica que combina as propriedades da microscopia e da análise térmica permitindo a caracterização dos materiais em função da temperatura. A adaptação à microscopia de Hot-stage de novas tecnologias como câmeras de alta resolução e software para manipulação das imagens tem melhorado a utilização desta técnica (VITEZ et al., 1998).

As principais aplicações desta técnica na área farmacêutica para o estudo de IFAs, excipientes, polímeros de interesse farmacêutico e lipídios incluem: estudos da morfologia, birrefringência, dessolvatação, transformações sólido-sólido, sólido-liquido e liquido-sólido e taxa crescimento cristalino entre outras (STIEGER et al., 2012).

1.1.3.5 Velocidade de dissolução intrínseca (VDI)

A dissolução é influenciada por fatores extrínsecos dos sólidos como área superficial (A), hidrodinâmica, propriedades do meio de dissolução, incluindo: solvente, pH, presença de surfactantes, temperatura, tipo e concentração da solução tampão. Adicionalmente, a

velocidade de dissolução (VD) é influenciada pelas propriedades intrínsecas dos sólidos como o estado cristalino que inclui os polimorfos, solvatos assim como o grau de não-cristalinidade (YU, 2004). Para fármacos puros é utilizado o método de pó disperso para estudar o efeito da A e da distribuição de tamanho de partícula na VD, por sua vez, a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é utilizada para avaliar a propriedade intrínseca do sólido de se dissolver na ausência de excipientes. A VDI refere-se à VD de um IFA sob condições de A, temperatura, velocidade de rotação, pH e força iônica do meio de dissolução constantes (USP, 2012b).

1.1.3.5.1 Aspectos teóricos da VDI

Segundo Fauno (2009) a VD de um fármaco está definida pela equação de Noyes-Whitney (Equação 2) como a quantidade de massa (m) ou concentração (C) do fármaco dissolvido no meio por unidade de tempo (t) em condições preestabelecidas da interfase sólido-líquido, temperatura e composição do meio de dissolução.

$$VD = \frac{dm}{dt} = KA(S_{ap} - Ct) \quad \text{Equação 2}$$

onde A é a área superficial de dissolução, S_{ap} é a solubilidade aparente, Ct a concentração do soluto no meio de dissolução no tempo t e K uma constante relacionada à hidrodinâmica (Equação 3).

$$K = \frac{D}{VhD} \quad \text{Equação 3}$$

onde D é o coeficiente de difusão do soluto, hD é a largura da capa de difusão e V o volume do meio de dissolução.

Condição sink: considera-se que o sistema está em condição sink quando a concentração em um determinado tempo (Ct) alcança um valor entre de 5-10 % da S_{ap} , fazendo válido o suposto: $Ct \ll S_{ap}$, podendo-se deduzir assim a expressão correspondente da VD inicial (VD_i) (Equação 4):

$$VD_i = \frac{dm}{dt}_{t \rightarrow 0} = KAS_{ap} \quad \text{Equação 4}$$

A *VD* de um sólido geralmente é proporcional à área superficial umedecida (*A*), mesmo que vá diminuindo conforme o sólido vai se dissolvendo. Se *A* permanece constante e a *VD* é dividida pela área, em condições *sink*, obtém-se a velocidade de dissolução intrínseca (*VDI*) como mostrado na equação 5.

$$VDI = \frac{dm}{dt} \frac{1}{A} \underset{t \rightarrow 0}{K} = \frac{A}{V} S_{ap} = K S_{ap} \quad \text{Equação 5}$$

Preferentemente os testes de *VDI* devem ser realizados sob condições *sink* para evitar que se retarde artificialmente a *VD*. A escolha do meio de dissolução é importante e recomenda-se o uso de soluções aquosas com pH na faixa fisiológica e temperatura de 37°C, para obter resultados comparáveis aos resultados *in vivo* (EMAMI, 2006). A *VDI* pode ser avaliada pelos métodos de disco rotatório e disco estacionário (USP, 2012b).

1.1.3.5.2 Método de disco rotatório

Neste método utiliza-se um sistema que consta de um punção e uma matriz, fabricadas em aço resiste. O fármaco puro é comprimido com ajuda de uma prensa hidráulica, diretamente na matriz que possui uma cavidade de diâmetro conhecido. A pressão aplicada deve ser mínima para formar um disco (pastilha) não desintegrante. Com isto logra-se uma área superficial conhecida (geralmente 0,5 cm²) que deve ser mantida constante. A haste que fixa a matriz contendo a pastilha é fixada ao dissolutor (Figura 6). O disco ou pastilha é rotacionado a uma velocidade constante e a *VD* é medida (YU, 2004).

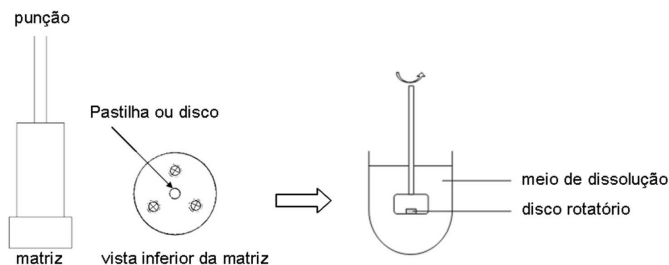


Figura 6. Esquema de sistema utilizado nos testes de *VDI*

Fonte: Adaptado de JIANZHUO; FLANAGAN, 2009; USP, 2012

A hidrodinâmica para o método de disco rotatório é um caso de aplicação do modelo de difusão convectiva. Neste modelo o fluxo padrão do solvente pode ser descrito como mostrado na figura 7. Longe do disco, o fluido move-se de forma axial na direção do disco. Em uma camada fina perto da superfície do disco, o líquido adquire um movimento de rotação, e move-se radialmente para longe do centro do disco (JIANZHUO; FLANAGAN, 2009).

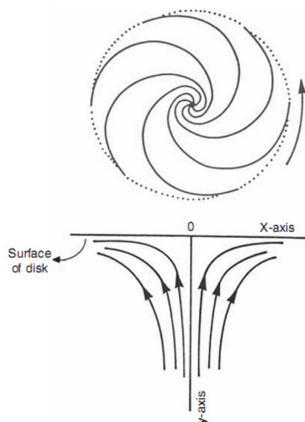


Figura 7. Esquema de fluxo padrão do solvente ao redor do sistema de disco rotatório.

Fonte: JIANZHUO; FLANAGAN, 2009

Para evitar alterações no fluxo do meio de dissolução, deve-se ter cuidado com o alinhamento da haste, com a formação de bolhas de ar na superfície da pastilha e com o ajuste da distância não menor a 1,0 cm entre o fundo da cuba e a área de exposição da pastilha ao meio de dissolução (USP, 2012b)

1.1.3.5.3 Cálculo da VDI e interpretação dos resultados

Alíquotas do meio devem ser retiradas em intervalo de tempo pré-estabelecidos, com a respectiva reposição do meio. A concentração do fármaco é determinada usando método quantitativo de análises devidamente validado ou preconizado nos compêndios oficiais. A VD é determinada graficando o aumento da concentração do fármaco dissolvido em função do tempo. Por meio de análises de regressão linear é determinada a inclinação da curva que corresponde a VD (mg/min). A

VDI se obtém normalizando a VD pela área da superfície e se expressa em unidades de $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ (YU, 2004)

Quando a relação entre a quantidade de fármaco dissolvido e o tempo não se comporta linear, apenas a parte linear é utilizada para a determinação da VDI. O comportamento não linear é indicativo de problemas experimentais sistemáticos devidos à degradação física do disco por rachaduras, delaminação ou desintegração. Curvaturas negativas são devidas principalmente a transformação da forma sólida na superfície. Isso geralmente ocorre quando uma forma menos estável converte-se para uma forma mais estável. Exemplos incluem a conversão de uma forma amorfa para uma forma cristalina ou pela formação de um hidrato a partir de uma forma anidra. Nesses casos a forma cristalina deve ser posteriormente avaliada (USP, 2012b).

1.2 PROGESTERONA

O hormônio esteróide progesterona (Pregn-4-ene-3, 20-diona, número CAS 57-83-0, estrutura mostrada na figura 8) está envolvido no ciclo menstrual feminino, na gravidez e embriogênese dos seres humanos e de outras espécies. Pertence a uma classe de hormônios chamados progestágenos e é o único naturalmente presente no ser humano (HIRVONEN, 1996). A progesterona é sintetizada a partir de um produto natural (LEDNICER; MISTCHER, 1977), possui seis centros quirais e está disponível comercialmente na forma opticamente pura *nat*-progesterona (LANCASTER et al., 2007). Em humanos é utilizada na menopausa, como terapia de substituição hormonal, (CAMPAGNOLI et al., 2005) e como constituinte em muitos contraceptivos orais (HIRVONEN, 1996). Nos animais, este hormônio é utilizado para o controle na reprodução, sincronizando o ciclo de estrógeno e contribuindo com o planejamento da inseminação artificial e fertilização *in vitro*. Para esse propósito a progesterona é administrada em dispositivos intravaginais de liberação controlada. Atualmente eles são feitos de polidimetilsiloxano (PDMS), com uma dispersão da progesterona micronizada (RHATHBONE et al., 1997). Recentemente foi avaliada a capacidade de outro polímero como transportador de esteróides e desenvolvida uma nova versão mais eficiente (HEREDIA et al., 2008).

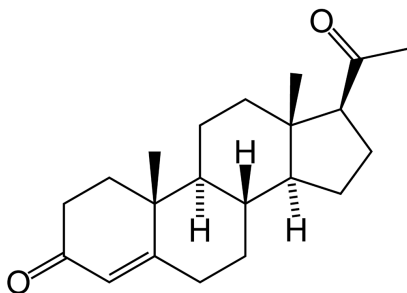


Figura 8 – Estrutura química da Pregn-4-ene-3, 20-diona
Fonte: USP, 2007

1.2.1 O polimorfismo da progesterona e a sua escolha como fármaco modelo no uso da técnica PIHn

Duas formas cristalinas da progesterona são conhecidas desde os anos 70 e segundo Lancaster e colaboradores (2007) diferentes condições de cristalização para produzir estes dois polimorfos têm sido amplamente reportadas na literatura. Entretanto, existe ambiguidade e confusão em relação à quantidade e nomenclatura dos polimorfos da progesterona. A literatura reporta 5 polimorfos que foram identificados por microscopia de Hot Stage no ano 1969 (LANCASTER et al., 2011). Atualmente, na base de compostos orgânicos depositados na CCDC (do inglês Cambridge Crystallographic Data Center), encontram-se 10 códigos relacionados com a progesterona ou com a fórmula $C_{21}H_{30}O_2$, dos quais 7 iniciam com o mesmo código de letras (PROGST), o que corresponderia a polimorfos da progesterona. No entanto, essas 10 entradas se referem a dados antigos, junto com dados recentes de estruturas depositadas com melhoras na coleta de dados. No quadro 4 são apresentados os códigos relacionados à progesterona, o nome do composto indicando a que polimorfo corresponde e a respectiva referência. No caso da nomenclatura para um dos polimorfos são usadas as seguintes notações: forma 1, forma I e forma α ; já para o outro são usadas: forma 2, forma II e forma β . Nesta dissertação, será utilizada a nomenclatura de números arábicos, em concordância à convenção moderna: forma 1 e forma 2.

Quadro 4 – Códigos CCD relacionados aos polimorfos da progesterona.

Código CCD	Nome do composto	Polimorfo	Referência¹
PROGST01	Progesterona	Forma 2	(CAMERONI et al., 1973)
PROGST02	Progesterona	Forma 1	(VAN DEN BOSSCHE, 1971)
PROGST03	Progesterona	Forma 1	(HANER; NORTON, 1964)
PROGST10	Progesterona	Forma 1	(CAMPSTEYN et al., 1972)
PROGST11	Progesterona	Forma 1	(KUHNERT-BRÄNDSTTER; KOFLE, 1959)
PROGST12	Progesterona	Forma 1	(LANCASTER et al., 2007)
PROGST13	Progesterona	Forma 2	(LANCASTER <i>et al.</i> , 2007)
PRETPG	<i>rac</i> -pseudo- <i>retro</i> -Progesterone	N/A	(WEBER; GALANTAY, 1974)
EWACU01	<i>ent</i> -progesterona (enantiômero)	Forma 2	(AUCHUS et al., 2003)
KESBEQ	<i>rac</i> -progesterona (mistura racêmica)	N/A	(LANCASTER <i>et al.</i> , 2006)

N/A: não aplica

Fonte: LANCASTER et al.(2007) e CSD.

A forma 1 da progesterona (Figura 9A) é termodinamicamente estável à temperatura ambiente e pressão atmosférica. Apresenta temperatura de fusão de 402,4 K (129,25°C) e entalpia de fusão de 83,2 J/g. A forma 2 (Figura 9B) é metaestável sob as mesmas condições, com temperatura de fusão de 395,4 K (122,15°) e entalpia de fusão de 68.1 J/g. Em concordância com a regra do calor de fusão os dois polimorfos estão relacionados monotropicamente (DEFOSSEMONT et al., 2004).

¹ Referência reportada na base de dados da Cambridge com cada código

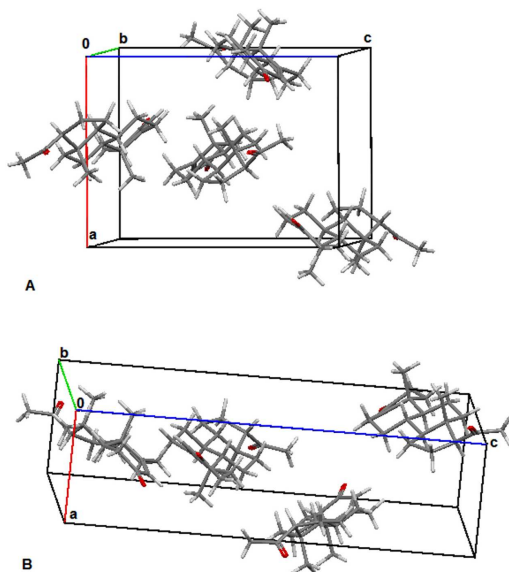


Figura 9 – Empacotamento cristalino da progesterona: A) forma 1 e B) forma 2
Fonte: Programa computacional Mercury versão 2.4.6 (PROGST12 e PROGST13).

Recentemente, HEREDIA (2009) e colaboradores demonstraram que quando cristalizada em polidimetilsiloxano a progesterona cristaliza como polimorfo 1 puro, mas quando cristalizada sobre poliisopreno (PI) cristaliza como mistura das duas formas polimórficas. Os autores relatam que esse fenômeno está fortemente ligado ao polímero, no qual a matriz e ou aditivos possuem um papel importante na obtenção dos polimorfos, mesmo sem o polímero estar incorporado na rede cristalina (HEREDIA et al., 2009). Esses resultados indicam que a progesterona pode ser um fármaco promissor para o uso da cristalização heteronuclear induzida por polímeros.

**CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS
POLIMORFOS DA PROGESTERONA**

2.1 ARTIGO 1 – Caracterização no estado sólido dos polimorfos da progesterona

Propósito. Realizar uma caracterização completa no estado sólido de ambas as formas polimórficas da progesterona, incluindo a determinação da Velocidade de Dissolução Intrínseca (VDI) para cada polimorfo, bem como realizar experiências de cristalização visando a obtenção da forma metaestável sem interferir no processo de nucleação (em ausência de polímeros). Estudos recentes revelam resultados interessantes em relação às propriedades de solubilidade de progesterona quando há presença da forma 2. Contudo, não existem valores de VDI reportados na literatura para nenhum dos dois polimorfos.

Métodos. Foram utilizadas amostras de progesterona micronizada, disponível comercialmente como a forma 1, e a forma 2 foi obtida da recristalização por resfriamento lento a partir do fundido da forma 1. A progesterona foi cristalizada sobre vidro a partir de soluções do fármaco com concentrações de 0,5; 10 e 40 mg/mL, em acetona e clorofórmio. Para a caracterização de ambos os polimorfos puros utilizaram-se as seguintes técnicas de caracterização do estado sólido: DRXP, DSC-TGA, FT-IR, Raman, RMN no estado sólido, Microscopia ótica e eletrônica e VDI. UV-Vis foi utilizado na determinação quantitativa da VDI. A determinação do polimorfo obtido das cristalizações a partir de solvente foi realizada usando DRXP e DSC.

Resultados. A forma 1 foi obtida de cristalizações de soluções com concentração de 40 mg/mL; mistura dos dois polimorfos foi cristalizada das soluções com concentração de 10 mg/mL e a forma 2 foi obtida de soluções de 0,5 mg/mL. Os cristais obtidos de acetona apresentam tamanho maior do que aqueles obtidos de clorofórmio. Ambos os polimorfos apresentaram diferentes hábitos cristalinos, porém nas amostras que possuíam mistura de polimorfos não se observou as duas morfologias. Como esperado, a forma 2 apresentou maior VDI por ser a forma metaestável e mais solúvel.

Conclusões. Demonstrou-se que a forma metaestável é a mais solúvel. A cristalização da forma 2 apresentou-se dependente da concentração. Não foi possível diferenciar os polimorfos pela sua morfologia.

Solid state characterization of progesterone polymorphs

Andrea Mariela Araya Sibaja ^{a,b}, Amarilis Scremin Paulino ^a, Gabriela Schneider Rauber ^a, Carlos Eduardo Maduro Campos ^c, Simone Gonçalves Cardoso ^a, Gustavo Alberto Monti ^d, Valeria Heredia ^e, Ismael Bianco ^{e,f,g}, Dante Beltrano ^{e,f,h} and Silvia Lucia Cuffini ^{a,f,i}.

^a Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

^c Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^d FaMAF-Universidad Nacional de Córdoba and IFEG-CONICET, Córdoba Argentina.

^e Centro de Excelencia en Productos y Procesos de Córdoba (CEPROCOR).

^f Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

^g Departamento de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de La Rioja, Argentina.

^h Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

ⁱ Ministerio de Ciencia y Técnica de Córdoba, Argentina.

Abstract

Crystallizations of progesterone from melt and from solutions at room temperature were performed. From solutions were tested three concentrations and two solvents. Form 2 was obtained from diluted solutions and from melt at slow cooling rate. Form 1 was obtained from concentrated solutions and, a mixture of both polymorphs was crystallized from intermediate solutions. A solid state characterization of both progesterone polymorphs was conducted. X-ray powder diffraction, hot stage microscopy, Fourier transform infrared, dispersive Raman, ¹³C solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, thermal analyses and scanning electron microscopy techniques were applied to investigate physical-chemical properties of these two polymorphs. The intrinsic dissolution rates (IDR) of two polymorphs were determined. Form 2 presented higher IDR than form 1 in hydroalcoholic solution. The crystals grown from acetone presented greater size than those grown from chloroform and the crystal habit was not a distinctive characteristic of the each polymorph. The effect of grinding form 2 was evaluated. The grinding of form 2 produced seeds of form 1 that induced the transformation of form 2 into form 1 at high temperature.

Key words: Progesterone, Polymorphism, Solid state characterization, Intrinsic dissolution rate, Phase transformation.

1. Introduction

Polymorphism is a characteristic of molecules that confers differences in their solubility, dissolution rate, stability and bioavailability (Huang and Tong, 2004). Although polymorphism is responsible for the sudden appearance of a less soluble and bioavailable form of Ritonavir with an appropriate control, it can be advantageous for a specific pharmaceutical application (Aaltonen et al., 2009). Hence, the selection of a suitable polymorph, is an effective way to improve *in vivo* performance of drugs with poor oral bioavailability (Byrn, Pfeiffer and Stowell, 1999).

Progesterone (pregn-4-ene-3, 20-dione) (Figure 1) is secreted by the ovary as part of the menstrual cycle; it is a natural steroid hormone that has six chiral centers (Lancaster et al., 2007; Lancaster et al., 2006). It is used in birth control pills and in menopausal hormone replacement therapies (Hirvonen 1996). It is known to exist in two polymorphic forms: form 1 (α -form) and form 2 (β -form) (Payne et al., 1999). Form 1 presents the highest melting point, it is the most thermodynamically stable and the least soluble of the two polymorphs at normal pressure and room temperature (Defossemont et al., 2004). Several attempts have been made to enhance the progesterone (form 1) solubility (Vaugelade et al., 2001; Memişoğlu et al., 2003; Zoppetti et al., 2007) not taking into consideration that an improvement in solubility may be related to the presence of the metastable form 2.

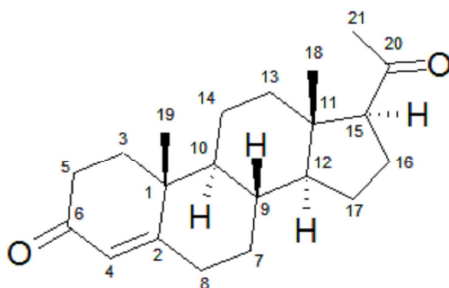


Figure 1 – Chemical structure of Pregn-4-ene-3, 20-diona (progesterona)

Although progesterone form 2 is considered a ‘disappearing’ polymorph (Lancaster et al., 2007); Heredia et al. (2009) and Tripathi et al. (2010)

have established that both polymorphs presented differences in their dissolution characteristics. These studies verified improvements in the dissolution characteristics with the presence of form 2 in the samples. However, to date, the IDR of progesterone polymorphs have not been determined.

The aim of this work was to study the crystallization conditions to obtain both progesterone polymorphs through different methods, to perform a complete characterization of both crystal forms including IDR test. Finally, the evaluation of polymorphic stability of form 2, since it is the metastable and the most soluble polymorph.

2. Materials and method

2.1 Samples preparation and crystallization experiments

Form 1 micronized progesterone (purity>99%) was purchased from Pharmanostra (Rio do Janeiro, Brazil) imported from China. Form 2 was obtained after melting form 1 at 140°C and cooling at room temperature. Recrystallizations were conducted in chloroform and in acetone by solvent evaporation at room temperature. Progesterone solutions of 0.5, 10 and 40 mg/mL in both solvents were prepared and 2 mL each of these solutions were added glass substrates. For the polymorphic stability of form 2 an appropriate quantity of sample was placed in a porcelain mortar and ground for different time ranges from 5 to 25 minutes.

2.2 Analytical methodology

2.2.1 X-ray powder diffraction (XRPD)

X-ray diffraction patterns were collected from a PANalytical X'PERT Multipurpose diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) operated at 45 kV and 40 mA, step size 0.016° , step time 20 s, angular scanning speed $2^\circ/\text{min}^{-1}$ and 2θ angular range between 5° and 50° .

2.2.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

Spectra from 1% solid dispersions in KBr were recorded in a FT-IR Shimadzu IR Prestige-21 in the range of $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$.

2.2.3 Dispersive Raman spectroscopy (Raman)

Raman spectra were collected in backscattering geometry using a PeakSeeker 785 (RAM – PRO – 785) Raman system operating with a

diode laser of 785 nm and 300 mW at the source. The collected Raman radiation was dispersed with a grating and focused on a Peltier-cooled charge-coupled device CCD detector obtaining a spectral resolution of 6 cm^{-1} . The laser was focused on the sample by 20x objective lens of a microscope given spot of approximately $2 \mu\text{m}$ in diameter. All spectra were recorded in the spectral window $200 - 1800 \text{ cm}^{-1}$ with the same acquisition time (10 seconds). The sample powders were analyzed in glass blades at room temperature.

2.2.4 Solid state nuclear magnetic resonance (ssNMR)

High-resolution solid-state ^{13}C cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS) spectra for progesterone 1 and 2 were recorded using a Bruker Avance II-300 spectrometer (300.13 MHz for ^1H and 75.46 MHz for ^{13}C). The samples were packed into a 4 mm rotor and spun with a rate of 10 kHz. The CP/MAS spectra were recorded employing a variable amplitude CP (2 ms contact time) (Harris, 1994). The SPINAL64 sequence was used for heteronuclear decoupling during acquisition with a proton field $H_{1\text{H}}$ satisfying $\omega_{1\text{H}}/2\pi = \omega_{\text{H}}H_{1\text{H}} = 62.5 \text{ kHz}$ (Bräuniger et al., 2002). The recycling time was 5 s and 4096 scans were recorded for each compound in order to obtain an adequate signal to noise ratio. The quaternary carbon edition spectra were recorded for all the samples. These spectra were acquired with the non quaternary suppression (NQS) sequence, in which the ^1H and ^{13}C r. f. fields are removed during $40 \mu\text{s}$ after CP and before acquisition (Harris, 1994). This experiment allowed us to identify quaternary carbon signals and methyl groups, and to perform the assignments in the solid-state. All the solid-state NMR experiments were performed at room temperature.

2.2.5 Thermal analysis (TA)

Differential scanning calorimetry (DSC) curves were obtained on a Shimadzu DSC-60 cell using aluminum pans, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and a heating rate of $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ in a temperature range from 40 to $150 \text{ }^\circ\text{C}$. In order to prevent an uncontrolled variation in pressure, the samples were placed on pans sealed with holes (Legendre et al., 2003). The thermogravimetric (TG) measurements were obtained with a thermobalance model TGA-50 (Shimadzu) in a temperature range from 20 to $400 \text{ }^\circ\text{C}$, using platinum crucibles, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and a heating rate of $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

2.2.6 Hot-stage microscopy (HSM)

Thermal events were observed on Olympus BX50 microscope equipped with a Mettler Toledo FP-82 hot stage. The sample was placed on a microscope slide, covered with a cover slip and heated at a rate of 5 °C min⁻¹.

2.2.7 Scanning electron microscopy (SEM)

Microphotographs were obtained from a JEOL JSM-6390LV scanning electron microscope operated at 15kV. The samples were mounted on a metal stub with double-sided adhesive tape and coated under vacuum with gold in an argon atmosphere.

2.2.8 Intrinsic Dissolution Rate test (IDR)

Intrinsic dissolution essays were conducted in a Varian VK 7000 dissolution testing station, a rotating disk system of 0.8 mm in diameter (surface area 0.5 cm²) according to USP 31 (2007). Then, 100 mg of pure progesterone forms 1 and 2, were compressed at 6000 psi in a Shimadzu hydraulic press.

Given that progesterone is practically insoluble in water, hydroalcoholic solutions were reported by Taghizadeh et al (2004) for *in vitro* controlled released experiments. In order to evaluate the dissolution performance of both polymorph, the conditions of IDR test were 200.0 ml of ethanol/water (50/50, v/v) as dissolution medium at 25±1 °C for 20 min at 100 rpm. Aliquots of 5.0 ml were withdrawn every two minutes. The dissolution medium was replaced after every sampling. The concentration of progesterone in the solution was measured by UV spectrophotometer Varian Cary 50 Bio at a wavelength of 240 nm (Farmacopéia Brasileira, 2010). The sink conditions were maintained during the entire dissolution experiment.

3. Results and Discussion

3.1 Solid state characterization of progesterone polymorphs

3.1.1 X-ray powder diffraction

Form 1 and form 2 are pure enantiomers and its crystal structure has been re-determined recently by Lancaster et al (2007) with considerable improvements of previous crystal structure determinations. Both polymorphs are orthorhombic; form 1 (P2₁2₁2₁; *a*=10.2496(7) Å, *b*=12.4830(9) Å, *c*=13.6406(9) Å; Z'=1; 150 K; R=3.9%) and form 2

($P2_12_12_1$; $a=6.2089(6)$ Å, $b=12.5804(12)$ Å, $c=22.188(2)$ Å; $Z'=1$; 150 K; $R=4.5\%$).

The crystal structures of these two polymorphs are very similar, nevertheless, the intermolecular carbonyl-carbonyl interactions are highly distorted in form 1 and absent in form 2 (Lancaster et al., 2007). They also presented conformational differences in the acetyl group (Figure 2). The acetyl rotation varies between the molecules: $-65.2(2)$ in form 1 and $-77.9(3)$ in form 2. This methyl yields a close intermolecular contact with the 3-keto group ($C21\dots O3$ 2.497 Å) in form 1 and with the keto-methyl group ($C21\dots O20$ 2.689 Å) in form 2 (Lancaster et al., 2007).

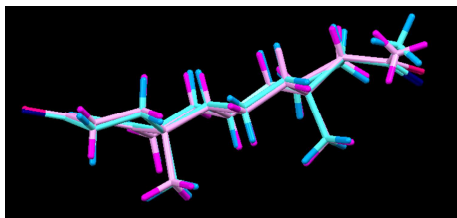


Figure 2 – Molecules overlaid of progesterone form 1 (pink) and form 2 (blue)

The XRPD patterns of pure samples of progesterone forms 1 and 2 were analyzed and compared with Cambridge Structural Database (CSD) crystallographic data (PROGST12: form 1 and PROGST13: form 2) (Lancaster et al., 2007). Subsequently, these patterns were used as references to analyze the samples obtained in the crystallization screening study, presented in the following session. Figure 3 shows the calculated and experimental patterns of both progesterone polymorphs. Taking into account that the XRPD patterns of both polymorphs presented several superimposed reflections, we selected 12.95° to identify form 1 and 13.94° and 16.42° to distinguish form 2. These reflections are intense and they are not overlapped.

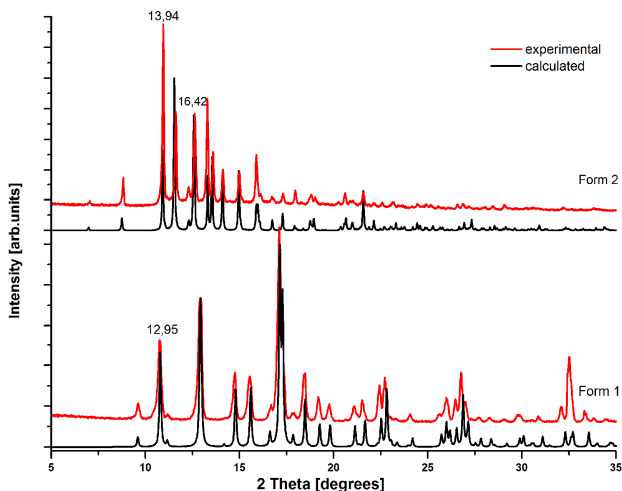


Figure 3- Experimental and calculated XRPD patterns of progesterone polymorphs. (Calculated XRPD patterns using PROGST12: form 1 and PROGST13: form 2 as references (Lancaster et al., 2007))

3.1.2 Fourier transform infrared spectroscopy

FT-IR spectroscopy is a valuable method in the study of polymorphs. It is widely used to differentiate between polymorphs (Van Eerdenbrugh and Taylor, 2010). The FT-IR spectra of progesterone forms 1 and 2 show a distinctive band due to the out-of-plane bending of hydrogen bonded to a sp^2 carbon at 870.56 cm^{-1} in form 1 that it is shifted to 863.18 cm^{-1} in form 2 (Figure 4A).

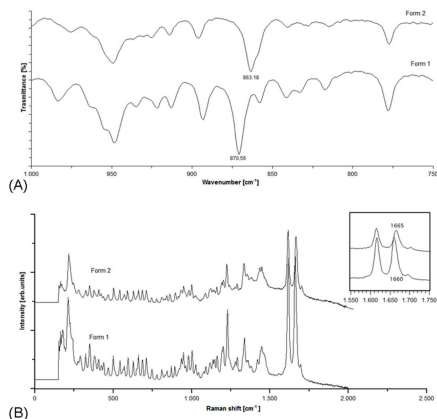


Figure 4- (A) FT-IR Spectra and (B) of Raman spectra of solid-state progesterone polymorphs

3.1.3 Raman spectroscopy

Figure 4B shows the Raman spectra of both progesterone polymorphs. The selected region has been previously described in the literature (Wang et al., 2000) and a peak shift from 1660 to 1665 cm^{-1} corresponds from form 1 to form 2 is observed.

3.1.4 Solid state nuclear magnetic resonance

The ^{13}C ssNMR spectra for both progesterone forms are shown in Figure 5. The assignments for the ^{13}C spectra (see carbon numbering in Figure 1) were carried out taking into account the quaternary carbon spectra and by comparing with the simulations of solution spectra resulting from commercial software. The ^{13}C ssNMR chemical shifts for both form 1 and form 2 are displayed in Table 1. The greatest chemical shift was observed in C6 and C16. The other carbons presented similar chemical shifts. Chemical shift of C3, C5, C7, C8 and C9 between 31.9 and 37.0 can not be assigned to a specific carbon. This suggests small differences between structures of forms 1 and 2, caused by the limited flexibility of the progesterone molecule. Additionally, progesterone has no conventional hydrogen bond donors (Payne et al., 1999).

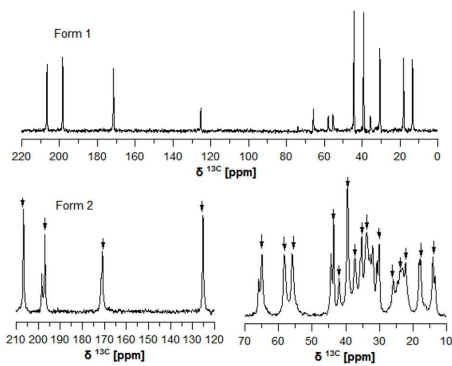


Figure 5- ^{13}C CP/MAS ssNMR spectra of progesterone forms 1 and 2

Table 1- Solid State ^{13}C CP/MAS NMR peaks of progesterone forms 1 and 2

Carbon number	^{13}C -chemical shift (ppm)	
	Form 1	Form 2
18, 19	13.3, 18.1	14.0, 17.7
14, 16, 17	22.9, 23.2, 24.6	22.2, 20.8, 25.9
21	30.6	30.1
3, 5, 7, 8, 9	31.9, 32.7, 33.3, 35.7, 37.0	31.9, 32.7, 33.8, 35.2, 37.3
13	39.0	39.5
1	39.2	42.0
11	44.3	43.6
10	55.5	55.9
12	58.0	58.3
15	65.9	64.9
4	125.3	125.3
2	171.4	170.8
6	198.4	196.9
20	206.7	206.7

The spectrum of form 1 showed a set of narrow resonances, approximately 30 Hz FWHM, indicating a high crystalline polymorph. Almost each carbon atom in the molecule was resolved, except for two broader peaks at 23 ppm and 39 ppm, corresponding each to a couple of resonances not completely resolved. We can conclude that there is only one molecule in the asymmetric unit of form 1. The ^{13}C spectrum of form 2 clearly showed the presence of resonances corresponding to form 1. In order to obtain a fine powder for the CP/MAS NMR experiment sample was ground, it probably transforms part of the form 2 sample into form 1. In this case the resonances were broader than in form 1, due to crystal stress produced during the cooling down from the melt of form 1. Resonances of form 2 are indicated by arrows. The number of resonances indicated that there is also only one molecule in the asymmetric unit of form 2. These results were in agreement with crystallographic data of progesterone forms 1 and 2.

3.1.5 Thermal Analysis

DSC curves show an endothermic event at 128.2 °C for form 1 and at 121.8 °C for form 2, both in agreement with previously reported values (Legendre et al., 2003). The system was evaluated in four different heating rates: 1, 2, 5 and 10 °C/min without significant changes

in the peak shape and melting point temperature. Then 5°C/min was selected as the appropriate heating rate with adequate resolution of the endothermic events. When form 2 was scraped from the substrate and a DSC analysis was immediately conducted, an endothermic event, corresponding to form 1 was observed. In order to determine the stability of progesterone form 2, experiments involving the transformation of form 2 into form 1 by grinding were performed and are discussed below. The TGA of both polymorphs showed no weight loss before the melting temperature, and a slightly difference in thermal decomposition behavior was observed.

3.2 Effect of seeding induced by grinding process in the stability of progesterone form 2

The transformation of progesterone form 2 into form 1 by grinding process was earlier observed by the ¹³C ssNMR measurements, previously mentioned. Grinding and compacting are routine parts of the drug processing, therefore, it is important to study the effect on polymorphic transitions. In addition to that, when a metastable form is being used an investigation of effects induced by mechanical stress is essential (Narang, Rao and Raghavan, 2009).

In sample preparation for the IDR determination the solid form undergoes mechanical stress (Yu 2004). Hence, the polymorphic stability of progesterone form 2 was previously evaluated.

During the grinding process of the sample, DSC curve (Figure 6 B) showed two events, an endothermic in approximately 118 °C and an exothermic around 123°C, corresponding to the melting point of form 2 and form 1, respectively. Since the two polymorphs are monotropically related (Defossemont et al. 2004) and the solid-state transformation of form 2 into form 1 induced by heating was not expected, we deduced that a mixture of form 1 and 2 was present in the sample. However, this assumption was not confirmed by XRPD analyzes in the samples ground for 5 and 10 minutes. Only when the sample was ground for 15 minutes it showed a very low reflection of the highest reflection of form 1 (12.95°). Figure 6 A shows the arising of this reflection of form 1 from 0 to 80 hours in the sample which was ground for 15 min. This is further evidence that the grinding process caused the formation of seeds of form 1 which would explain the DSC results. The effect of milling on samples generated crystal nuclei and the subsequently thermally induced a crystallization event which was also observed in amorphous and crystalline griseofulvin samples (Brittain 2012).

The presence of seeds of form 1 and the crystallization of form 1 from molten sample of form 2 was clearly observed by Hot stage microscopy (see Video 1). Initially, the crystalline sample with polarizes light was identified as a wide gray area. At 122°C, dark sections started to arise corresponding to fusion of form 2 and simultaneously the seeds of form 1 were distinguished. The crystals of form 1 were very well detectable using polarizing light. Afterward, a rapid crystallization around 123 °C occurred. Finally, the fusion of form 1 was detected when the crystallized area was transformed completely dark at 130°C. This result confirmed that seeds of form 1 were nuclei in molten form 2 that induced the crystallization of form 1.

After one week, the sample, which was ground for 15 minutes, was analyzed and it was completely converted into form 1.

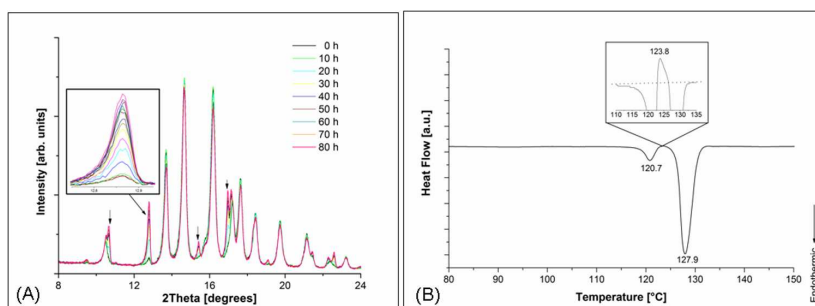


Figure 6- Progesterone form 2 after 15 minutes of grinding (A) XRPD measured every 10 hours by 80 hours (B) DSC curve

3.3 Intrinsic Dissolution Rate

The IDR value could be considered more useful than solubility to correlate the *in vivo* drug dissolution dynamics (Yu, 2004). According to Šehić et al. (2010) values lower than 0.001 $\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}^2$ indicate dissolution rate-limiting absorption. Under sink conditions the IDR for two polymorphs of a drug must be proportional to the respective solubilities (Byrn, Pfeiffer and Stowell, 1999). In the previous section, the polymorphic instability of form 2 was evaluated against mechanical stress. The polycrystalline powder of form 2 had to be ground and part of it transformed into form 1, and then compacted to prepare the IDR sample. Hence, the IDR test, determined to form 2, was actually conducted to a mixture of polymorphs, being form 2 the larger quantity in the sample. However, the polycrystalline powder of form 2 had to be ground and then compacted to prepare the VDI sample. Polymorphs did

not change at the pressure used in this test but polymorph 2 transformed to form 1 with grinding.

Figure 7 shows a linear behavior in the intrinsic dissolution profile of both progesterone polymorphs. The IDR of the sample which presented the highest content of form 2 had a higher value than form 1. Thus indicating that form 2 is more soluble than form 1.

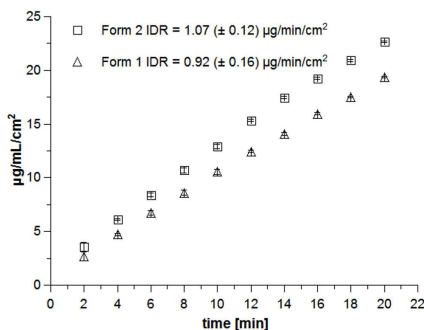


Figure 7- Intrinsic dissolution profile of progesterone polymorphs

3.4 Conditions to obtain pure progesterone form 2

The study of progesterone crystallization using acetone and chloroform solvents and at three different concentrations was analyzed. Table 2 shows that form 1 was crystallized from concentrated solutions whereas form 2 was obtained from diluted solutions and a mixture of the two polymorphs from intermediate concentrations.

Table 2- Progesterone crystal form obtained from acetone and chloroform at the three concentrations

Solvent	Polymorph		
	Progesterone concentration (mg/mL)		
	40	10	0.5
Acetone	Form 1	Mixture	Form 2
Chloroform	Form 1	Mixture	Form 2

In order to identify the polymorphism in the different preparations, XRPD patterns of the sample and the calculated powder pattern of single crystal data were compared. The XRPD pattern for crystals obtained from 40 mg/mL solutions in chloroform and acetone confirmed the presence of progesterone form 1 (Figure 8B). In addition,

crystallization from acetone presented four intense reflections, indicating high preferred orientation (Figure 8A). The XRPD pattern for crystals obtained from intermediate solutions, in chloroform, matched with form 1 and presented a reflection of form 2 at 13.94° (Figure 9), thus confirming the presence of a mixture of progesterone polymorphs. In the case of crystals obtained from acetone, presenting preferred orientation again, the reflections observed, were coincident in both polymorphs. For samples obtained from diluted solutions, a few reflections corresponding to form 2 were observed. In order to confirm the presence of form 2, DSC analyzes were done and the crystallization of form 2 was confirmed.

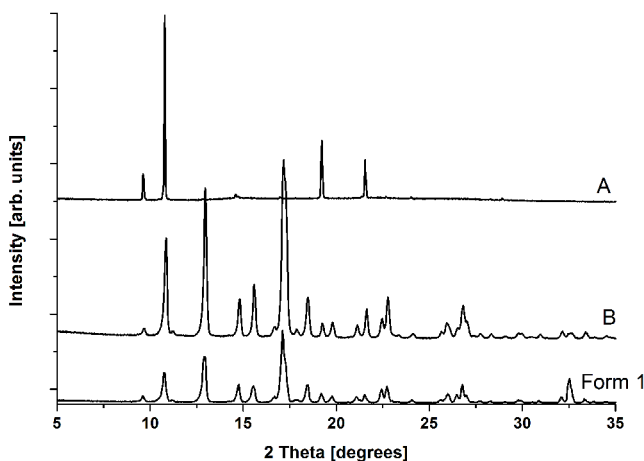


Figure 8- Experimental XRPD of progesterone form 1 crystallized from 40mg/mL solutions in: (A) acetone and (B) chloroform

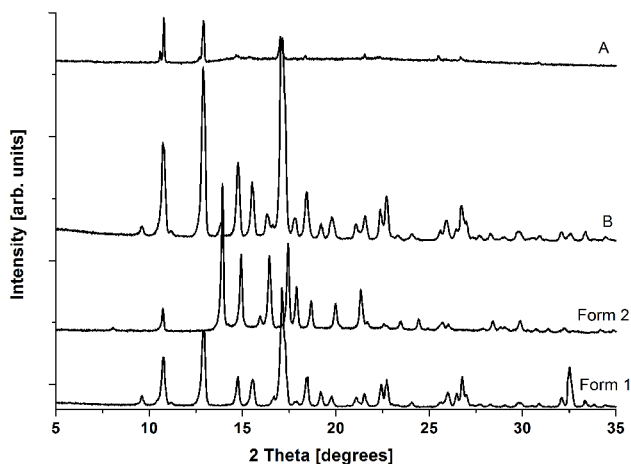


Figure 9 – Experimental XRPD of progesterone form 1, form 2 and a mixture of polymorphs crystallized from 10 mg/mL solutions in: (A) acetone and (B) chloroform

Lancaster et al (2007) reported progesterone form 2 as a ‘disappearing polymorph’ since the metastable form was exceptionally difficult to obtain. They argued that when form 2 was initially reported, it was stabilized by impurities of synthesis in the sample used. In a recent work, the same author analyzed a fifty-year old sample of progesterone, showing the role of impurities in the form 2 stabilization (Lancaster et al. 2011). However, we obtained the metastable form (form 2) using a highly pure raw material, from two methods: crystallization from solvents and melting. Finally, as it was concluded in a preceding review by Dunitz & Bernstein (1995), the case of disappearing polymorphs of progesterone may be the result of an inability to reproduce the correct experimental conditions.

3.5. Crystals morphology

The crystal sizes obtained from 40mg/mL and 10 mg/mL solutions prepared in acetone, were greater than those obtained from chloroform solutions at the same concentration (Figure 10 and 11 (A-B)). However, the crystal habit presented by form 1 crystallized from both solvents were similar (Figure 10 and 11 (B)). On the other hand, form 2 presented a different crystal habit than form 1. However two different morphologies were not observed when progesterone crystallizes as a

mixture of polymorphs; disabling a differentiation between polymorphs by their morphology.

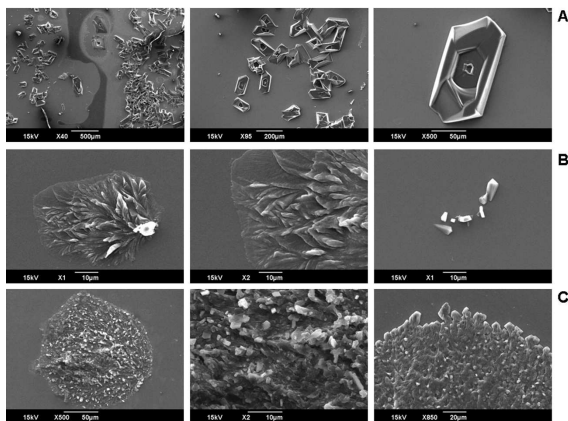


Figure 10- Microphotographs of progesterone crystallized from chloroform: (A) 40 mg/mL (form 1), (B) 10 mg/mL (mixture of polymorphs) and (C) 0.5 mg/mL (form 2)

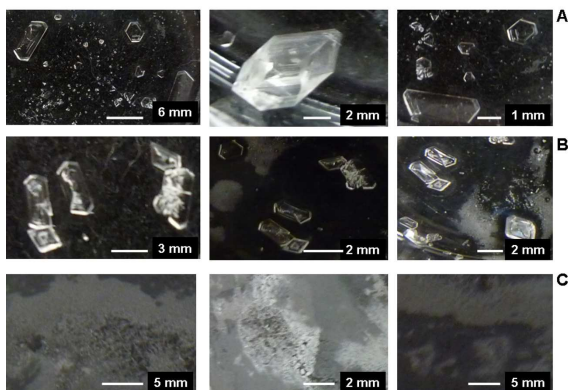


Figure 11- Photographs of progesterone crystallized from acetone: (A) 40 mg/mL (form 1), (B) 10 mg/mL (mixture of polymorphs) and (C) 0.5 mg/mL (form 2)

4. Conclusions

Progesterone forms 1 and 2 were obtained as pure samples and, also, a mixture of forms depending on the preparation conditions. Form 2 was crystallized from molten sample and in acetone and chloroform solvents using diluted solutions. Form 1 was crystallized from concentrated

solutions, whereas a mixture of the two polymorphs was obtained from intermediate solutions. The IDR experiments demonstrated that form 2 is more soluble than form 1 and DSC, XRPD, ssNMR and HSM measurements permitted preliminary studies of the phase transformation of progesterone from form 2 into form 1 by grinding. Other studies have to be done in order to understand the grinding process and its impact in the chemical and polymorphic stability of progesterone. Finally, the morphology was not a distinctive characteristic of each polymorph.

Acknowledgements

The authors thank Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) and Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos e Materiais Moleculares Funcionais at UFSC for XRPD, SEM and MHS analysis respectively, CNPq, CAPES, FAPESC, CLAF, Fundación Sauberan and CONICET for student fellowships and financial support. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for Visited Professor fellowship. Silvia L. Cuffini and Gustavo A. Monti are fellows of CONICET, Argentina. Thanks are given also to the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) of Spain for the award of a license for the use of the CSD.

References

- Aaltonen, J., Allesø, M., Mirza, S., Koradia, V., Gordon, K.C., Rantanen, J., 2009. Solid form screening: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71(1), 23-37.
- Brittain, H.G., 2012. Polymorphism and solvatomorphism 2010., *J. Pharm. Sci.* 101(2), 464-84.
- Bräuniger, T., Wormald, P., Hodgkinson, P., 2002. Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the S PINAL -64 Sequence. *Monatsh. Chem.* 133(12), 1549-1554.
- Byrn, S., Pfeiffer, R., Stowell, J., 1999. *Solid-State Chemistry of Drugs* second ed. SSCI Inc, Indiana.
- Defossemont, G., Randzio, S.L., Legendre, B., 2004. Contributions of calorimetry for Cp determination and of scanning transitionometry

for the study of polymorphism. *Cryst. Growth Des.* 4(6), 1169-1174.

Dunitz, J.D., Bernstein, J., 1995. Disappearing Polymorphs. *Accounts. Chem. Res.* 28(4), 193-200.

Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p., 1v/il

Harris, R., 1994. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Longman Scientific and Technical, London.

Heredia, V., Bianco, I.D., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Ferro Seoanea, M., Faudonea, S., Cuffini L.C., Demichelisa, N.A., Schalliol, H., Beltramo, D.M., 2009. Polyisoprene matrix for progesterone release: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 382(1-2), 98-103.

Hirvonen, E., 1996. Progestins. *Maturitas.* 23 (96), S13-8.

Huang, L.F., Tong, W.Q., 2004. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56(3), 321-34.

Lancaster, R.W., Karamertzanis, P.G., Hulme, A.T., Tocher, D.A., Lewis, T.C., Price, S.L., 2007. The polymorphism of progesterone: stabilization of a “disappearing” polymorph by Co-crystallization. *J. Pharm. Sci.* 96(12), 3419–3431.

Lancaster, R.W., Panagiotis, G.K., Hulme, A.T., Tocher, D.A., Covey D.F., Price, S.L., 2006. Racemic progesterone: predicted in silico and produced in the solid state. *Chem. Comm.* (47), 4921-3.

Lancaster, Robert W., Harris, L.D., Pearson, D., 2011. Fifty-year old samples of progesterone demonstrate the complex role of synthetic impurities in stabilizing a metastable polymorph. *Cryst. Eng. Comm.* 13(6), 1775-77.

- Legendre, B., Feutelais, Y., Defossefont, G., 2003. Importance of heat capacity determination in homogeneous nucleation: application to progesterone. *Thermochim. Acta.* 400(1-2), 213-219.
- Memişoğlu, E., Bochot, A., Şen, M., Duchêne, D., Hıncal, A.A., 2003. Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic beta-cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 251(1-2), pp.143-53.
- Narang, A.S., Rao, V.M., Raghavan, K.S., 2009. Excipient Compatibility, in: *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice*. Elsevier Inc., pp. 125-145.
- Payne, R.S., Roberts, R.J., Rowe, R.C., Docherty, R., 1999. Examples of successful crystal structure prediction: polymorphs of primidone and progesterone. *Int. J. Pharm.* 177(2), 231-45.
- Sehić, S., Betz, G., Hadžidedić, Š., El-Arini, S.K., Leuenberger, H., 2010. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. *Int. J. Pharm.* 386(1-2), 77-90.
- Taghizadeh, S.M., Mashak, A., Jamshidi, A., Imani, M., 2004. Study of progesterone release mechanisms from a silicone matrix by a new analytical method. *J. Appl. Polym. Sci.* 91(5), 3040-3044.
- Tripathi, R., Biradar, S.V., Mishra, B., Paradkar, A.R., 2010. Study of polymorphs of progesterone by novel melt sonocrystallization technique: a technical note. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 11(3), 1493-8.
- USP – The United States Pharmacopeia., 2007. 30th ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville.
- Vaugelade, C., Rohmer, A.-C., Burel, F., Belleney, J., Duclos, R., Bunel, C., 2001. Progesterone freeze-dried systems in sublingual dosage form. *Int. J. Pharm.* 229(1-2), 67-73.

- Van Eerdenbrugh, B., Taylor, L.S., 2010. Application of mid-IR spectroscopy for the characterization of pharmaceutical systems. *Int. J. Pharm.* doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.011
- Wang, F., Wachter, J.A., Antosz, F.J., Berglund, K.A., 2000. An investigation of solvent-mediated polymorphic transformation of progesterone using in situ Raman spectroscopy. *Org. Process. Res. Dev.* 4(5), 391–395.
- Yu, L.X., Carlin, A.S., Gordon, L.A., Hussain, A.S., 2004. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *Int. J. Pharm.* 270(1-2), 221-227.
- Zoppetti, G., Pupinni, N., Ospitali, F., Fini, A., 2007. Solid state characterization of progesterone in a Freeze Dried 1: 2 Progesterone / HPBCD Mixture. *J. Pharm. Sci.* 96(7), 1729-1736.

**CAPÍTULO 3: ESTABILIDADE QUÍMICA E POLIMÓRFICA
DA PROGESTERONA**

3.1 SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE MECÂNICO, TÉRMICO E AMBIENTAL

Propósito. Avaliar a estabilidade polimórfica da forma metaestável da progesterona sob condições de estresse mecânico, particularmente da moagem, e sob condições aceleradas de estabilidade (40°C e 75% UR e luz UV). Avaliar a estabilidade química de ambos os polimorfos através de estudos acelerados no estado sólido a 40°C e 75% UR, gerando ou não microambientes de diferentes pHs, e exposição à luz. Estudar a degradação térmica de ambos os polimorfos através da técnica TGA.

Métodos. A forma 1 foi progesterona micronizada, disponível comercialmente; a forma 2 foi obtida de recristalização por resfriamento lento a partir do fundido da forma 1. Para avaliação no estado sólido foram utilizadas as seguintes técnicas: DRXP, DSC, MHS, TGA. CLAE foi utilizada na determinação da estabilidade química.

Resultados. A forma 2 apresentou-se estável por 3 meses sob condições aceleradas de temperatura e umidade, e durante 1 mês sob exposição à luz UV. Entretanto, quando moída por 15 minutos, houve transformação para a forma estável após uma semana. Um método indicativo de estabilidade foi otimizado e validado pela técnica de CLAE usando coluna C8, fase móvel composta de acetonitrila/água (60/40, v/v), fluxo de 1,5 mL/min e detecção em 254 nm. Ambos os polimorfos foram estáveis durante o período de 6 meses de armazenagem a 40°C /75%UR em ambientes neutros, ácidos e básicos, e durante 1 mês de exposição na luz UV. A degradação térmica de ambos os polimorfos foi estudada pela técnica TGA, através do cálculo da energia de ativação (E_a). O polimorfo 2 apresentou maiores valores de E_a , indicando que estabilidade térmica desta forma é maior do que a do polimorfo 1.

Conclusões. Os dois polimorfos apresentaram estabilidade química semelhante, e o polimorfo 2 mostrou-se mais resistente à degradação térmica que a forma 1. Não se recomenda utilizar a forma 2 na produção de formas sólidas que requeiram operações de moagem. No entanto, esta forma metaestável poderia ser utilizada na produção de formas farmacêuticas que não envolvam o processo de moagem.

3.1.1 ARTIGO 2 – Efeitos do sementeado induzido por moagem na estabilidade polimórfica da forma 2 da progesterona

Effects of seeding induced by grinding in the polymorphic stability of progesterone form 2

Andrea Mariela Araya Sibaja ^{1,2}, Cinira Fandaruff ¹, Carlos Eduardo Maduro Campos ³, Simone Gonçalves Cardoso ¹, Sílvia Lucia Cuffini ^{1,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

² Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

³ Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

⁴ CONICET. Ministerio de Ciencia y Técnica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Abstract

Studies of polymorphic transformation are important to design processes and optimize solid dosage forms. The effect of the grinding on the polymorphic transformation of progesterone was investigated. Progesterone form 2 was ground for different grinding times in a porcelain mortar. X-ray powder diffraction (XRPD) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy monitored the polymorphic stability, whereas ultraviolet spectroscopy (UV) analysis detected chemical degradation. Differential scanning calorimetry (DSC) detected the formation of seeds of form 1 during the grinding of form 2. The solid state transformation, form 2 to form 1 induced by seeds, followed first-order kinetic model until 15 minutes, over this time progesterone degraded.

Keywords: Progesterone; Polymorphic transformation; DSC; Grinding.

Introduction

Pharmaceutical polymorphism is defined as the property of an active pharmaceutical ingredient (API) to crystallize into more than one solid form. These solid forms exhibit different physicochemical properties that can influence the stability and performance of a dosage form [1] and can be produced by standard pharmaceutical processes [2]. Grinding is one of the most common processes used for reduction of particle size; the stress experienced by the solid when mechanical energy is applied can result in phase transformation. The effect of grinding on physical forms and the behavior of the phase transformation can be understood only by monitoring the phases during processing. This information can

be useful to design processes and to optimize formulation controlling the solid form both during manufacture and shelf-life storage of dosage forms [3].

In the identification of polymorphs the most appropriated technique is X-ray diffraction with subsequent analysis by thermal analysis such as DSC-TG as well as other complementary techniques. Thermal methods, particularly DSC, are the most commonly used method for polymorphic screening [4] because they allow the production of forms which are not obtained from solvents only by heating/cooling curves on DSC or by combinatorial techniques. In addition, DSC presents a low limit detection of solid forms.

Progesterone is used in menopausal hormone replacement therapy [5] and in oral contraception pills [6]. In veterinary is used to control the estrous cycle in livestock for artificial insemination in planned conception [8]. It exists in two polymorphic forms: form 1 and form 2 (Cambridge Structural Database reference PROGST12 and PROGST13 respectively) [8]. The more stable polymorph, form 1, presents melting point in the range of 128 to 130°C, whereas the metastable polymorphs, form 2, exhibits melting point between 120-122°C. They are monotropically related [9], therefore, is not expected a solid state transformation of the metastable form into the stable form promoted by increasing temperature. Although the characteristic and crystal structure of both progesterone polymorphs have been considerably studied [9, 11, 12], the influence of grinding on the polymorphic transformation of progesterone has not been reported.

The objective of this study was to monitor the effect of the grinding process in the polymorphic stability of progesterone form 2 and calculate the kinetic order of the solid state transition of form 2 to form 1, at high temperature.

Experimental

Materials

Micronized progesterone (purity >99%) was obtained from Pharmed (Rio de Janeiro, Brazil). Organic solvent was HPLC/UV grade obtained from Vetec® (Rio de Janeiro, Brazil).

Preparation of progesterone polymorphs

Form 1 was micronized raw material of progesterone. Form 2 was obtained with a slow cooling rate after melting the micronized progesterone.

Preparation of ground samples

An appropriate quantity of progesterone form 2 was placed in a porcelain mortar and ground for different times ranging 5 to 25 minutes.

Ultraviolet spectroscopy (UV) analysis

Chemical degradation of progesterone form 2 was monitored using a Cary 50 Varian® spectrophotometer. After 25 minutes of grinding the sample, it was quantified using the official method of Brazilian Pharmacopeia [12].

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC curves were obtained on a Shimadzu DSC-60 cell using aluminum pans, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and a heating rate of 5 °C min⁻¹ in a temperature range from 40 to 150 °C. In order to prevent an uncontrolled variation of pressure, the samples were placed on pans sealed with holes [13].

Hot-stage microscopy (HSM)

Thermal events were observed on Olympus BX50 microscope equipped with a Mettler Toledo FP-82 hot stage. The sample was placed on a microscope slide, covered with a cover slip and heated at a rate of 5 °C min⁻¹.

X-ray powder diffraction (XRPD)

X-ray diffraction patterns were collected from a PANalytical X'PERT Multipurpose diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) operated at 45 kV and 40 mA, step size 0.016°, 20 s per step, angular scanning speed 2°/min⁻¹ and 2/min⁻¹ angular range between 5° and 50°.

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR)

Spectra from 1% solid dispersions in KBr were recorded in a FT-IR Shimadzu IR Prestige-21 in the range of 4000 – 600 cm⁻¹.

Results and discussion

It has been reported that the progesterone polymorphs exhibit a monotropic behavior in which the form 1 is the stable and form 2 is the metastable form [9]. Both polymorphs present separate and well defined endothermic events. DSC curves in Figure 1A shows the arising of progesterone form 1 at different times of grinding. Apparently, the

grinding process produced the direct transformation of form 2 into form 1. After grinding form 2 for 15 minutes, the DSC curve presented a subtle exothermic event around 123°C, suggesting that a crystallization process occurred.

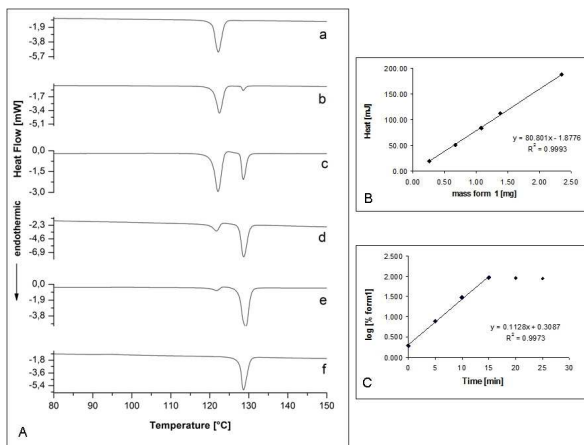


Figure 1-(A) DSC curves of progesterone form 2 during grinding time: (a) 0, (b) 5, (c) 10 (d) 15, (e) 20 and (f) 25 minutes. (B) Analytical curve of progesterone form 1 and (C) Kinetic analysis

However XRPD (Figure 2A) measurements demonstrated no appearance of form 1 with grinding times of up to 15 minutes. At this time, the XRPD pattern presented only one reflection of form 1 with very low intensity. Apparently, it might be a contradiction since the enthalpy of form 1 evidenced the presence of higher quantity of form 1 in the sample than it was detected by XRPD. Thus, there could be other plausible explanation; the grinding process caused the formation of seeds of form 1 that induced the crystallization of form 1 from the melts of form 2 during the heating process. In order to confirm this hypothesis we analyzed the samples with another techniques and different thermal analytical measurements.

Progesterone presents a characteristic band between $900\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ correspondent to the hydrogen bonded to $\text{C}=\text{C}$. In form 1 this band appears in 870 cm^{-1} and it is shifted to 863 cm^{-1} in form 2 [8]. Hence, FT-IR analyses were performed and are given in Figure 2A. After different times of grinding the distinctive band of form 2 was unchanged, confirming the results obtained by XRPD measurements. Finally, UV analysis was conducted to evaluate the chemical stability of

progesterone. Chemical degradation was detected after 25 minutes of grinding.

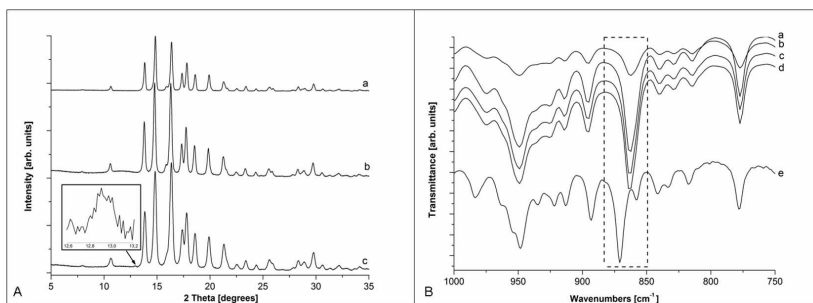


Figure 2- (A) XRPD patterns of progesterone form 2 during grinding time: (a) 0, (b) 5 and (c) 15 minutes. (B) FT-IR spectra of progesterone form 2 during grinding time: (a) 0, (b) 5, (c) 10, (d) 15 minutes and (e) progesterone form 1.

Effect of progesterone form1 nuclei in thermal behavior of form 2

Tripathi et al. [10] reported a quantitative analysis of progesterone polymorphs in a mixture, using enthalpies of fusion as a parameter for the quantification. However, if there is a crystallization followed by a fusion process, the values of heat of fusion are not reliable for a quantitative analysis. In order to determine whether the nuclei of form 1 influence in the thermal behavior of form 2, different quantities of form 1 were added to form 2 and submitted to thermal analysis. Results are given in Figure 3 where an exothermic event is observed in the DSC curves of samples containing 30, 50 and 70% of form 1. The crystallization process was more evident in DSC curves of form 2 and form 1 50/50 (%m/m) mixture (Figure 3c). Afterwards, heat of fusion versus mass of each polymorph was plotted, these two parameters of form 1 did not present a linear relationship, because the heat of fusion involved in the process corresponds to the initial mass of the form 1 and the mass that has crystallized from the form 2 (Figure 4A). On the other hand, form 2 presented a linear relationship between mass and heat of fusion, as was expected (Figure 4B).

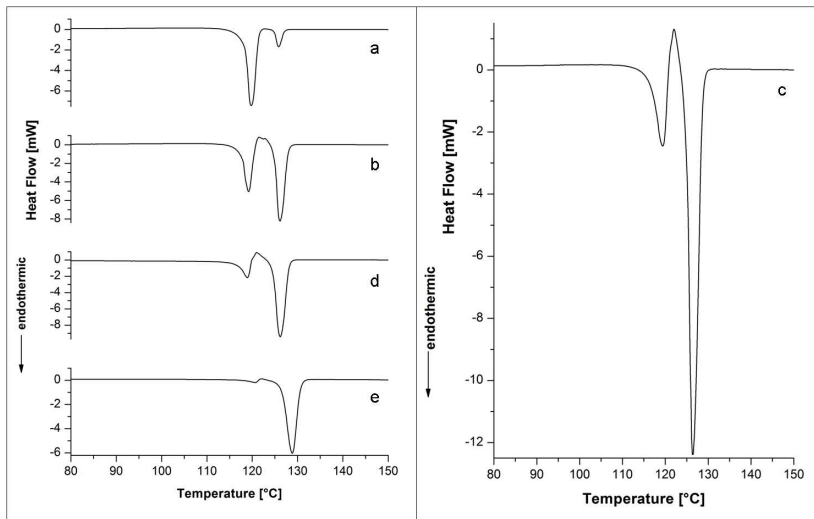


Figure 3- DSC curves of progesterone form 2 mixed with different proportions of form 1: (a) 5, (b) 30, (c) 50, (d) 70 and (e) 95 %

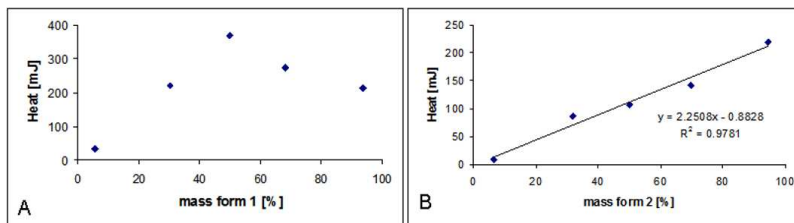


Figure 4- Relationship between heat of fusion and mass of progesterone: (A) form 1 and (B) form 2

Figure 5 shows the thermal event occurred to form 2 ground sample. It is possible to observe the fusion of form 2 with presence of seeds of form 1 on the melt (Figure 5b). The recrystallization process (Figure 5c) and then the complete fusion of the sample were observed. This result confirmed that seeds of form 1 were nucleus in molten form 2 that induced the crystallization of form 1.

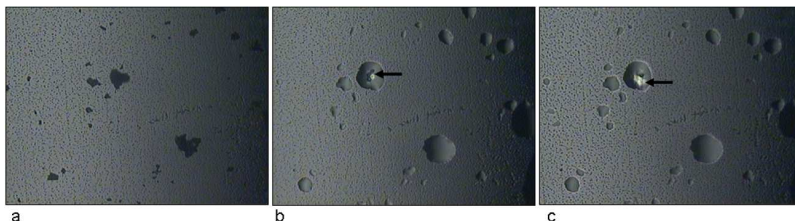


Figure 5- Hot stage microscopy of progesterone form 2 ground for 15 minutes: (a) 40°C, (b) 122 °C and (c) 123 °C (seeds of form 1 (b) and form 1 crystallized from the melt of form 2 (c) are indicated by an arrow)

Solid state kinetic analysis

Progesterone pure form 1 exhibits a linear relationship between heat of fusion and mass as is observed in Figure 1B. It was used to quantify the appearance of form 1 induced by grinding form 2. The relationship between the logarithm of form 1 concentration and grinding time is shown in Figure 1C. It was linear (correlation coefficient, $r = 0.9973$) until 15 minutes, as determined by using the least-squares method. The crystallization of form 1 from the melt of form 2 due to the presence of nuclei of form 1 caused by grinding, seems to be a first order kinetic model, being possible the increasing of seeds of form 1.

Conclusions

Grinding process affects the chemical and polymorphic stability of progesterone form 2. This process induced the transformation of form 2 into form 1 at high temperature. In the initial part of the grinding process, the low quantity of seeds was undetectable by XRPD or FT-IR. However, the appearance of nuclei of form 1 could be detected by DSC, due to crystallization event of form 1 after the melting process of form 2. Above 15 minutes of grinding chemical degradation of progesterone was detected. The solid state transformation of progesterone form 2 into form 1 induced by nucleation of seeds of form 1 caused by the grinding process follows first order kinetic model. Finally, the enthalpy of form 2 may be used as a reliable parameter for quantitative measurements. However, in the case of polymorphic mixture, there is not a linear relationship between the mass content of form 1 and the enthalpy.

Acknowledgments

The authors thank Professor Dr. Eloir Paulo Schenkel for providing FT-IR spectroscopic facility, Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX) at

UFSC for the X-ray measurements, Laboratório de Síntese de Cristais Líquidos e Materiais Moleculares Funcionais for hot stage analysis, CNPq, CAPES, FAPESC, CLAF, Fundación Sauberan and CONICET for student fellowships and financial support. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for Visiting Professor fellowship. Silvia L. Cuffini is a fellow of CONICET, Argentina. Thanks are also given to the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) of Spain for the award of a license for the use of the CSD.

References

- [1] Lin SY, Cheng WT, Wang SL. Thermodynamic and kinetic characterization of polymorphic transformation of famotidine during grinding. *Int J Pharm.* 2006; 318 (1–2): 86-91.
- [2] Yu L. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. *Pharm Sci Technol To.* 1998; 1 (3): 118-127.
- [3] Govindarajan R, Suryanarayanan R. Processing-induced phase transformations and their implications on pharmaceutical product quality. In *Polymorphism in the pharmaceutical industry*. First ed. R. Hilfiker, Ed. Darmstadt: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2006, pp. 333-364.
- [4] Craig DQM. Characterization of Polymorphic Systems Using Thermal Analysis. In *Polymorphism in the pharmaceutical industry*. First ed., R. Hilfiker, Ed. Darmstadt: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2006, pp. 43-79.
- [5] Campagnoli C, Clavel-Chapelon F, Kaaks R, Peris C, Berrino F. Progestins and progesterone in hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *J Steroid Biochem.* 2005; 96 (2): 95-108.
- [6] Hirvonen E. Progestins. *Maturitas.* 1996; 23 (96): S13-8.
- [7] Rhathbone MJ, Macmillan KL, Bunt CR, Burggraaf S. Conceptual and commercially available intravaginal veterinary

- drug delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev.* 1997; 28 (3): 363-392.
- [8] Lancaster RW, Karamertzanis PG, Hulme AT, Tocher DA, Lewis TC, Price SL. The Polymorphism of Progesterone: Stabilization of a 'Disappearing' Polymorph by Co-Crystallization. *J Pharm Sci.* 2007; 12: 3419–3431.
- [9] Defossement G, Randzio SL, Legendre B. Contributions of calorimetry for Cp determination and of Scanning Transitiometry for the study of polymorphism. *Cryst Growth Des.* 2004; 4 (6): 1169-1174.
- [10] Tripathi R, Biradar SV, Mishra B, Paradkar AR. Study of polymorphs of progesterone by novel melt sonocrystallization technique: a technical note. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2001; 3: 1493-8.
- [11] Heredia V, Bianco ID, Tríbulo H, Tríbulo R, Ferro Seoanea M, Faudonea S, Cuffini LC, Demichelisa NA, Schalliol H, Beltramo DM .Polyisoprene matrix for progesterone release: in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm.* 2009; 1–2: 98-103.
- [12] Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.546p., 1v/il
- [13] Legendre B, Feutelais Y, Defossement G. Importance of heat capacity determination in homogeneous nucleation: application to progesterone. *Thermochim Acta.* 2003; 400 (1–2): 213-219.

3.1.2 ARTIGO 3 – Estabilidade química e polimórfica da progesterona sob condições de estresse.

Chemical and polymorphic stability of progesterone under solid state stress conditions

Andrea Mariela Araya Sibaja ^{a,b}, Carlos Eduardo Maduro Campos ^c, Cinira Fandaruff ^a, Marcos Antônio Segatto Silva ^a, Simone Gonçalves Cardoso and Silvia Lucia Cuffini ^{a,d}.

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

^c Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^d CONICET e Ministerio de Ciencia y Técnica de Córdoba, Argentina

Abstract

Physical and chemical stability of progesterone under solid state stress conditions were studied. Physical stability of form 2 was evaluated in dark storage condition at 40°C/75% relative humidity (RH) for 3 months and it was also exposed to UV light for 1 month. For chemical stability, both progesterone polymorphs were stored with and without create pH microenvironments at 40°C/75% RH for 6 months. Chemical degradation was evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC) and progesterone forms 1 and 2 were chemically stable in the period studied. The activation energy values were calculated through thermogravimetry (TGA) and the values obtained suggested that form 2 require more energy than form 1 to be thermally degraded. Form 2, the metastable polymorph, was chemically stable for six months and it was not transformed into form 1 under temperature and humidity stress conditions and with light exposition either.

Keywords: Progesterone polymorphs, Solid-state stress study, Polymorphic stability, Thermal decomposition.

1. Introduction

In the solid state, drug substances may exhibit polymorphism, it occurs when two crystals of the same chemical compound have different crystal structure [1], including crystal packing arrangement and/or molecular conformation [2, 3]. These differences determine its pharmaceutical properties including solubility and stability.

Additionally, the therapeutic efficacy of a drug substance or drug product can be altered by its physical or chemical degradation [4]. Physical or polymorphic instability occurs when a metastable solid state form transforms into the most thermodynamically stable form and, this change depends on kinetic and thermodynamic factors [5]. Then, stability studies are conducted in order to evaluate chemical and physical changes of the drug, under the influence of environment factors like temperature, humidity and light [6]. It is well-known that chemical and physical factors cause solid state reactions, however, there are a few reports showing the importance of stability testing in the solid state [7].

Natural progesterone is an essential hormone in regulating the female reproductive system. It is used in gynecology, including contraception, medical abortion, and treatment of conditions related to endometrial and myometrial growth [8]. This drug exhibits two different crystal structures: forms 1 and 2, both with equal pharmacological effects. Form 2 is the metastable form and it is 1.1 kcal/mol less stable than form 1 [9]. This metastable form is more soluble; therefore, it presents a good advantage for the formulation of solid forms. In order to evaluate its application in solid dosage forms, the polymorphic and chemical stability under solid state stress conditions become essential. [7].

Although, crystallographic and calorimetric data for both progesterone polymorphs are already reported and, recently compiled by Barrio et al [10]; solid state stress studies has not been reported. Hence the objective of this study was to investigate chemical stability of the two progesterone forms and the physical or polymorphic stability of form 2 under several ambient stress conditions.

2. Experimental

2.1 Materials

Commercially available micronized progesterone was used as pure form 1. Form 2 was prepared in-house from the met of form 1 at 140°C by slow cooling form 1. HPLC/UV grade acetonitrile was purchased from J.T. Baker; salts and all other chemicals were of analytical reagent grade and obtained from Vetec. Ultrapure water was purified using a Millipore system (18.2 MΩ/cm, resistivity, MilliQ®).

2.2 Instrumentation

Stress stability system consisted of a Biopar oven, with relative humidity obtained by sodium chloride saturated solutions; temperature and humidity were monitored with a calibrated thermohygrometer

throughout all storage time. Photostability chamber was equipped with an illumination bank on inside top consisting of a UVC lamp-254 nm (30 W), the samples were placed at a distance of 10 cm from the light bank. The light system complied with option 2 of the ICH guideline Q1B. At any given time, UV energy and visible illumination were tested using a calibrated lux meter Mimipo MLM-1011.

HPLC analyses were performed on a Shimadzu LC-10A system equipped with a model LC-10AT pump, an SPD-10AV variable wavelength detector, an SCL-10Avp system controller and a Jasco AS-2055 Plus auto-sampler with an effective volume of 20 μ L. Peak areas were integrated automatically by Shimadzu Class VP R V 6.14 software program. The system utilizes a reversed-phase Browleen Analytical C8 column (150 mm x 4,6 mm i.d., 5 μ m pore size 110 $^{\circ}$ A) from Perkin Elmer, maintained at 25 $^{\circ}$ C using a mobile phase of 60:40 acetonitrile:water (% v:v).

Thermal stability studies were performed on a thermobalance model TGA-50 (Shimadzu), using platinum crucibles, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min). Because the kinetic analysis required at least 3 dynamic curves with different heating rates, was used: 5, 10 and 20 $^{\circ}$ C/min from room temperature to 400 $^{\circ}$ C. Samples of approximate 2 mg were weighed in the platinum crucibles.

Polymorphic stability was monitored by X-ray powder diffraction (XRPD) and differential scanning calorimetry techniques. XRPD patterns were recorded on a PANalytical X'PERT Multipurpose diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418^{\circ}$ A) operated at 45 kV and 40 mA, step size 0.016 $^{\circ}$, step time 20 s, angular scanning speed 2 $^{\circ}$ /min $^{-1}$ and 2 θ angular range between 5 $^{\circ}$ and 50 $^{\circ}$. Differential Scanning Calorimetry (DSC) analyses were carried out using a Shimadzu DSC-60 cell using aluminum pans, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and a heating rate of 5 $^{\circ}$ C/min in a temperature range from 40 to 150 $^{\circ}$ C. In order to prevent an uncontrolled variation of pressure, the samples were placed on pans sealed with holes [11].

2.3 Chemical stability

2.3.1 Preparation of solid-state stress samples

For pH stress studies 10 mg of each polymorph were accurately weighed into vials and 20 mg each of oxalic acid and sodium carbonate were added to create acidic and alkaline pH microenvironment, respectively. The contents were mixed using a glass capillary. Separate sets were prepared without any additive to allow for study at inherent

pH of the drug. Sufficient number of samples was prepared to allow for withdrawal of replicates after 3 and 6 months for HPLC analysis. The samples in open vials were placed to stability stress studies system at 40 °C/75% relative humidity (RH).

For photolytic solid stress study both polymorphs were placed on a photostability chamber for 1 month.

2.3.2 Optimization and revalidation of a stability-indicating HPLC method

The analytical method used was previously reported by Kintner and Kruep [12]. This uses C8 column at a flow rate of 1.5 mL/min using a mobile phase of 60:40 acetonitrile:water (%v:v). For the optimization and revalidation of the method to our system, forced degradation of progesterone in neutral, acid, oxidative and photolytic conditions were performed. The following validation characteristics were evaluated: linearity, accuracy and precision.

2.3.3 HPLC analysis of solid stressed samples

The samples collected after 3 and 6 months were evaluated for physical and chemical changes. For chemical analyses, 3 mL of mobile phase was added to each glass vial, followed by sonication for 5 min in an ultrasonic bath. The contents were transferred to a 50 mL volumetric flask and the volume was made up with mobile phase. Finally, 1 mL of this solution was transferred to a 10 mL volumetric flask and the volume was completely with mobile phase, the resultant solution was injected into an HPLC system (n = 3). In each condition, percent drug remaining was calculated.

2.4 Thermal stability

Both progesterone polymorphs were submitted to thermal extreme conditions using TGA analysis. The thermal decomposition data generated from this technique can be analyzed to obtain kinetic parameters.

2.4.1 Kinetic procedure

Most of the kinetic methods used in thermal analysis consider that the isothermal rate of conversion, $d\alpha/dt$, is function of two variables: temperature (T) and extent of conversion α [13] as showed in equation 1.

$$d\alpha/dt = k(T)f(\alpha) \quad (1)$$

where $k(T)$ is the rate constant that is temperature dependent and $f(\alpha)$ is the function of conversion, which is temperature-independent. The kinetic methods assume that $d\alpha/dt$ is a linear function of $k(T)$ and $f(\alpha)$ [14]. Under non-isothermal conditions, equation 1 turns into equation 2.

$$d\alpha / f\alpha = (A / \beta) e^{-E/RT} dT \quad (2)$$

where $\beta = dT/dt$ is the heating rate, A is the pre-exponential factor, E is the activation energy and R is the gas constant.

Accordingly Muraleedharan et al. [14], the method proposed by Ozawa–Flynn–Wall is an isoconversional method that uses linear regression to calculate E . This method postulates that $f(\alpha)$ does not change with heating rate for all values of α . Hence, measurement of temperature corresponding to fixed values of α at different heating rate is necessary. Under these conditions equation 2 becomes into equation 3

$$\ln \beta = \ln[Af(\alpha)]/[d\alpha/dt] - E/RT \quad (3)$$

For practical calculations a plot can be constructed using $\ln \beta$ versus $1/T$ to obtain a straight line with a slope of $-E/R$.

If the calculated values of E show almost constant for several values of α , the reaction involves a single step. Differences of 40 kJ mol^{-1} are usually considered as a constant behavior [15, 16]. Otherwise, changes higher than these values in E with increases of α , is an evidence that a complex reaction mechanism occurs. This condition is not in agreement with the separation of variables related to the Ozawa-Flynn-Wall analysis [14]. The relevance of solid state thermal decomposition studies is because the multi-step nature of reaction that usually occurs in the solid state [17].

2.5 Polymorphic stability

Progesterone form 2 in cover slips were placed in the stress stability studies system at $40 \text{ }^\circ\text{C}/75\%$ relative humidity (RH) (as described above) for 3 months and other set of samples were placed in the photostability chamber for 1 month. Subsequently, XRPD and DSC analysis were conducted.

3. Results and Discussion

3.1 Method optimization and validation

The method was evaluated in the parameters: linearity, accuracy, precision and specificity, accordingly USP acceptance criteria [18]. Table 1 shows the results obtained in the linearity. It was confirmed by preparing progesterone standard curves for the analytical range of 1.00–20.00 $\mu\text{g/mL}$. A correlation between peak area and concentration of the drug was observed with $r^2 \geq 0.99$ for all standard curves. The percentages of R.S.D. for intra- and inter-day precision studies at 100% of work concentration are given in Table 2 and these values were less than 5%. Also, good recoveries were obtained when a mixture of stressed samples was added to the drug at the above given three concentrations (Table 3). As shown in Figure 1, the method showed to be specific, for the properly quantification of progesterone in presence of its major degradation products.

Table 1- Linearity data from progesterone analytical curves

<i>Standard curve</i>	<i>Calibrators</i>	<i>Slope</i>	<i>y-intercept</i>	<i>R² value</i>
Validation day 1	5	33728	47187	0.9905
Validation day 2	5	32889	53184	0.9931
Validation day 3	5	33282	57590	0.9928

Table 2- Accuracy: drug substance added into a mixture of stressed samples

Target concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Experimental concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
8	8.55 ± 0.10	106.88
10	10.33 ± 0.12	103.30
12	11.91 ± 0.33	99.25

Table 3- Precision: drug substance (%RSD)

Precision	10.00 $\mu\text{g/mL}$
Intra-day <i>n=6</i>	3.80
Inter-day <i>n=3</i>	1.17

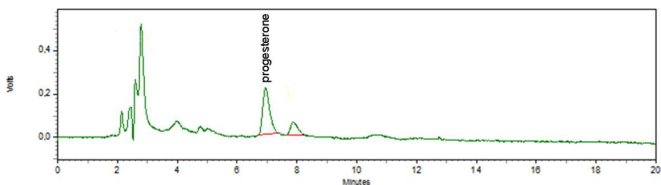


Figure 1- Chromatogram of a mixture of progesterone stressed samples solution

3.2 Progesterone polymorphs stability

3.2.1 Chemical degradation

The salts oxalic acid and sodium carbonate with progesterone produced microenvironments with pH of 1.42 ± 0.02 and 10.86 ± 0.02 respectively. These pH values were calculated by the method reported by Serajuddin et al. [19].

Chemical degradation in progesterone forms 1 and 2 was not observed after 6 months of storage at $40^{\circ}\text{C}/75\%$ RH in both acid and alkaline conditions. Figure 2 shows the chromatograms of progesterone polymorphs under acid conditions. They were also stable to photodegradation.

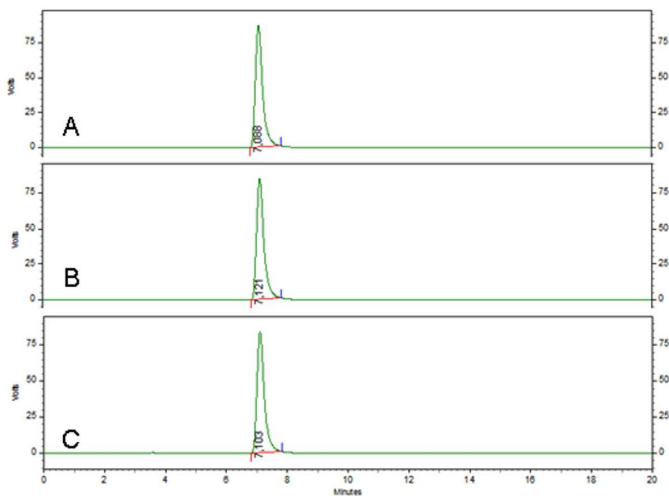


Figure 2- Chromatograms of progesterone: (A) standar solution, (B) form 2 and (C) form 1 under acid storage conditions for 3 months

3.2.2 Thermal decomposition

Although, the thermoanalytical technique can not replace the classical stability studies that usually require weeks or months, it can provide an early alert to redirect the process toward the most successful formulation [17]. TGA curves for the two progesterone polymorphs and the α -T plot for the non-isothermal decomposition of progesterone polymorphs are presented in Figures 3A and 3B respectively. The estimated values of E related to thermal decomposition of both progesterone polymorphs are shown in Table 4. These values were calculated using the Ozawa-Flynn-Wall method [14] by fitting the plots of $\ln \beta$ versus $1/T$ (Figure 4). Linear Regression was used to obtain the slope and the coefficient of correlation (r) the r values are also presented in Table 4. The activation energy values obtained for both progesterone polymorphs at different extent of conversion can be considered similar (R.S.D. was 2% and 6% for forms 1 and 2 respectively). Hence, thermal degradation of progesterone polymorphs might be considered as a single reaction step.

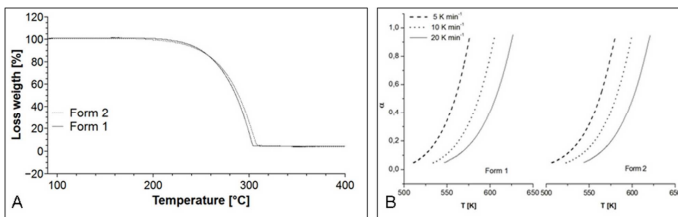


Figure 3- (A) TGA curves of progesterone polymorphs and (B) α -T curve for the thermal decomposition of progesterone at different temperatures

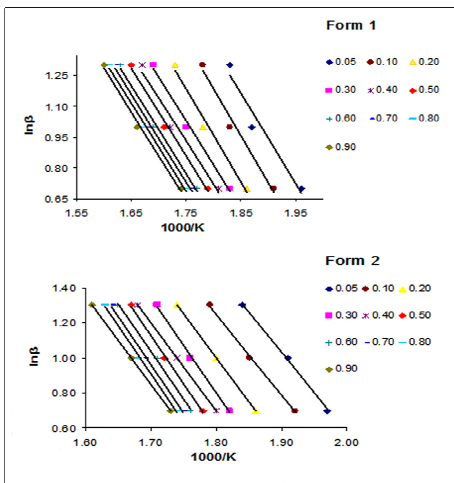


Figure 4- Ozawa-Flynn- Wall analysis for both progesterone polymorphs

Table 4- Activation energies for the 0.05 to 0.90 conversions for the both progesterone polymorphs obtained by the Ozawa-Flynn-Wall method

Extent of conversion α	Form 1		Form 2	
	E (kJ mol ⁻¹)	$-r$	E (kJ mol ⁻¹)	$-r$
0.05	80.29	-0.9762	84.09	-0.9990
0.10	82.78	-0.9912	84.09	-0.9990
0.20	82.78	-0.9912	91.28	-1.0000
0.30	77.71	-0.9966	99.30	-0.9986
0.40	76.16	-0.9867	91.28	-1.0000
0.50	77.71	-0.9966	99.30	-0.9986
0.60	77.71	-0.9966	99.30	-0.9986
0.70	77.71	-0.9966	99.30	-0.9986
0.80	77.71	-0.9966	99.30	-0.9986
0.90	77.71	-0.9966	91.28	-1.0000

3.2.3 Polymorphic stability of form 2

Progesterone form 2 retained its crystal structure after 3 months to be submitted to 40°C/75% RH conditions. Figure 5 shows the diffractograms of this sample before and after storage, compared with the calculated XRPD pattern. These results were confirmed by DSC analysis and are shown in Figure 6.

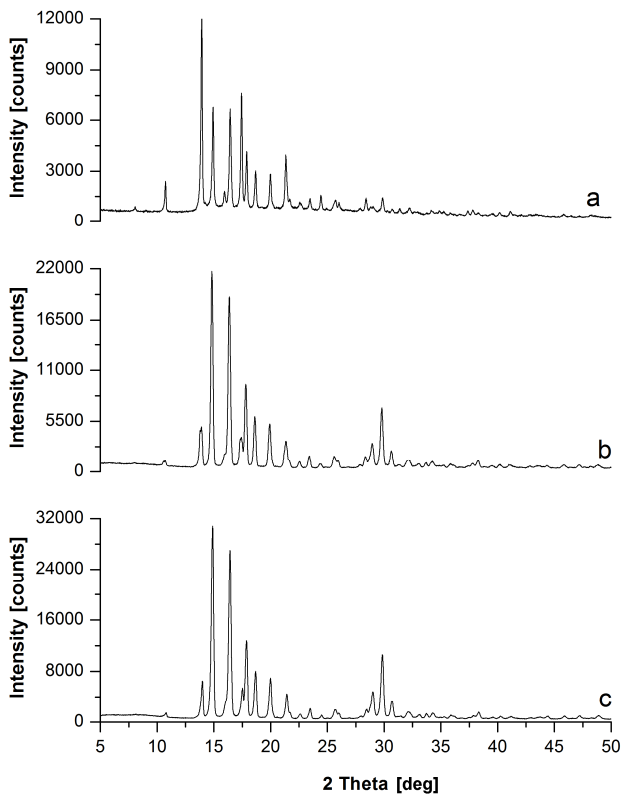


Figure 5- XRPD patterns of progesterone form 2: (a) reference, (b) after 3 months storage at 40°C/75% RH and (c) after 1 month exposed to light. Intensity modifications of the reflections in the patterns correspond to preferred orientation effect.

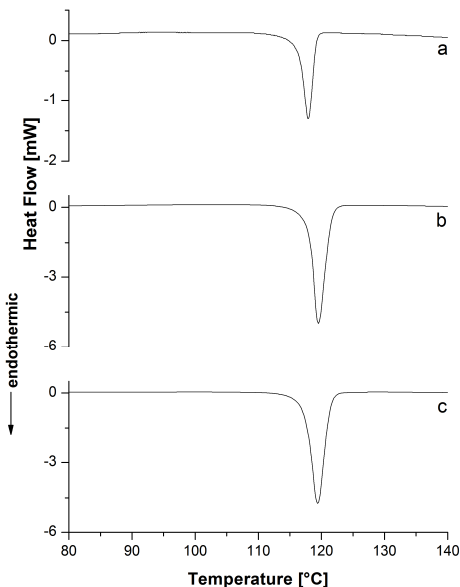


Figure 6- DSC curves of progesterone form 2: (a) reference, (b) after 3 months storage at 40°C/75% RH and (c) after 1 month exposed to light

4. Conclusions

The two progesterone polymorphs were stable in the different microenvironment conditions. The thermal degradation of both progesterone polymorphs can be described properly by a single-step model. The metastable form 2 presented higher activation energy values than form 1; hence form 2 required more energy to be degraded under thermal conditions. The metastable form 2 was chemically stable for the period evaluated (6 months) and it was not transformed into form 1 under temperature and humidity stress conditions and either with light exposition. These results are useful to design solid dosage formulations using form 2, since at present they are only being formulated with the form 1.

Acknowledgments

The authors want to thank Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX) at UFSC, CNPq, CAPES, FAPESC, CLAF, Fundación Sauberan and CONICET for student fellowships and financial support. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for Visited Professor and CONICET, Argentina fellowships. Thanks are given also to the Consejo Superior de

Investigaciones Científicas (CSIC) of Spain for the award of a license for the use of the CSD

Reference

- [1] Byrn, S.; Pfeiffer, R.; Stowell, J. *Solid-State Chemistry of Drugs*; second.; SSCI, Inc.: Indiana, 1999; p. 574.
- [2] Brittain, H. *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*; Brittain, H. G., Ed.; First ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1999, p. 427.
- [3] S. Cuffini, Jr. A. Pitaluga, D. Tombari, In *Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica*; Editora Guanabara: Rio de Janeiro, 2009; pp. 21-31.
- [4] S. Yoshioka, V. J. Stella, *Stability of drugs and dosage forms*; First ed.; Kluwer Academic Publishers, 2002; p. 268.
- [5] FDA Scientific Considerations of Polymorphism in Pharmaceutical Solids: Abbreviated New Drug Applications.
- [6] A. Sobczak, A. Jelińska, M. Leśniewska, A. Firlej, I. Oszczapowicz, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 869-72.
- [7] D. K. Raijada, B. Prasad, A. Paudel, R. P. Shah, S. Singh, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 332-44.
- [8] M. I. Rodriguez, M. Warden, P. D. Darney, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202 (2010) 420-8.
- [9] R. S. Payne, R. J. Roberts, R. C. Rowe, R. Docherty, *Int. J. Pharm.* 177 (1999) 231-45.
- [10] M. Barrio, P. Espeau, J. L. Tamarit, M.-A. Perrin, N. Veglio, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1657-167.
- [11] B. Legendre, Y. Feutelais, G. Defossefont, *Thermochim. Acta.* 400 (2003) 213-219.

- [12] S. L. Kintner, D. A. Kruep, AAPS Annual Meeting and Exposition. T2015 (2005).
- [13] S. Vyazovkin, A. K. Burnham, J. M. Criado, L. A. Pérez-Maqueda, C. Popescu, N. Sbirrazzuoli, *Thermochim. Acta.* 520 (2011) 1-19.
- [14] K. Muraleedharan, M. P. Kannan, T. Ganga Devi, *J. Therm. Anal. Calorim.* 103 (2010), 943-955.
- [15] F. M. Aquino, D. M. A. Melo, R. C. Santiago, M. A. F. Melo, A. E. Martinelli, J. C. O. Freitas, L. C. B. Araújo, *J. Therm. Anal. Calorim.* 104 (2010), 701-705.
- [16] W. Wu, X. Wu, S. Lai, S. Liao, *J. Therm. Anal. Calorim.* 104 (2010), 685-691.
- [17] F. Rodante, *Thermochim. Acta.* 394 (2002), 7-18.
- [18] USP United State Pharmacopeia; 30th ed.; Rockville United State Convention, 2007.
- [18] A. T. Serajuddin, A. B. Thakur, R. N. Ghoshal, M. G. Fakes, S. A. Ranadive, K. R. Morris, S. A. Varia, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 696-704.

**CAPÍTULO 4 – CRISTALIZAÇÃO DA PROGESTERONA
SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS**

4.1 CRISTALIZAÇÃO DA PROGESTERONA SOBRE MATRIZES POLIMÉRICAS

Propósito. Determinar as condições para obtenção e estabilização da forma metaestável da progesterona, através do “*screening*”, aplicando a técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros.

Métodos. Foram realizadas experiências de cristalização utilizando dois solventes: acetona e clorofórmio; seis matrizes poliméricas: PVA, HPMC, PI, NBR, dextrana e gelatina, assim como três concentrações de fármaco: 0,5; 10 e 40 mg/mL. Os filmes poliméricos foram preparados entre 2 e 3% (% m/v) em água através do método de evaporação de solvente e no caso do PI e NBR foram obtidos já em forma de filmes. Posteriormente, os filmes foram cortados em círculos de diâmetro constante e transferidos para béqueres, aos quais se adicionou 2,00 mL das soluções de diferentes concentrações. As amostras foram caracterizadas pelas técnicas de estado sólido: DRXP, DSC, ATR-IR e MEV.

Resultados. A forma 2 foi obtida a partir de cristalizações do fármaco na concentração de 0,5 mg/mL, em clorofórmio, em quase todas as matrizes, exceto na gelatina, na qual obteve-se mistura de ambos os polimorfos. Mistura de polimorfos foi também obtida com PVA e HPMC, a partir de soluções com concentrações de 10 mg/mL e 40 mg/mL, e em NBR, a partir de soluções com concentração de 10 mg/mL. A forma 1 foi obtida de soluções com concentração de 40 mg/mL cristalizadas em PI e NBR, e em PI, a partir de soluções com concentração de 10 mg/mL. Nas cristalizações em acetona o comportamento foi similar, exceto nas soluções com concentração de 40 mg/mL, em que apenas a forma 1 foi obtida em todos os polímeros. Os cristais obtidos em acetona apresentaram maior tamanho que os obtidos em clorofórmio. Na maioria dos polímeros os polimorfos apresentaram diferentes hábitos cristalinos, tendo sido observado mesmo polimorfo com morfologias diferentes e diferentes polimorfos com a mesma morfologia.

Conclusões. A técnica de nucleação heterogênea induzida por polímeros permitiu obter a forma 2 pura e em mistura com a forma 1 principalmente em cristalizações de soluções com concentrações de 0,5 e 10 mg/mL, na maioria dos polímeros. A concentração, os solventes e os polímeros influenciaram a cristalização seletiva dos polimorfos. A forma 2 foi estável sob condições de estabilidade acelerada (40°C/75% UR), por 3 meses, dependendo do polímero e da concentração utilizada. A morfologia não é característica de cada polimorfo quando preparados

por esta técnica. Considerando que a forma 2 apresenta melhor solubilidade que a forma 1, os resultados obtidos são promissores para sugerir a utilização da forma 2 em dispositivos de liberação modificada. Este fato representa uma grande vantagem para aplicações farmacêuticas, pois permitiria diminuir a dose necessária para atingir a mesma biodisponibilidade alcançada com a forma 1.

4.1 ARTIGO 4 – Crescimento de cristais da progesterone em matrizes poliméricas

Crystals growth of progesterone polymorphs on polymeric matrices

Andrea Mariela Araya Sibaja ^{a,b}, Valdir Soldi ^c, Carlos Eduardo Maduro Campos ^d, Simone Gonçalves Cardoso ^a and Silvia Lucia Cuffini ^{a,e}.

^a Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

^c Grupo de estudo em materiais poliméricos (POLIMAT), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^e CONICET, Ministerio de Ciencia y Técnica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Abstract

The crystals of progesterone polymorphs were prepared by polymer templating (polymer-induced heteronucleation) and characterized by solid-state techniques. Polyvinyl alcohol (PVA), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), dextran, gelatin, polyisoprene (PI), and acrylonitrile-butadiene (NBR) copolymer were used as polymeric surfaces. Crystals were prepared from 0.5, 10 and 40 mg/mL solutions in acetone and in chloroform at room temperature by solvent evaporation. Form 1 was nucleated from 40 mg/mL solutions in acetone on the six polymers and in chloroform on dextran, PI and NBR. Form 1 was also obtained from 10 mg/mL solutions in acetone on PVA, PI and NBR and in chloroform on PI. Form 2 was obtained from crystallization at 0.5 mg/mL in chloroform, in almost all the polymers except on gelatin in which was obtained mixture of both polymorphs. A mixture of polymorphs was also obtained from 10 mg/mL and 40 mg/mL solutions on PVA and HPMC, and from 10 mg / mL solutions on NBR. Form 1 was obtained from 40 mg/mL on PI and NBR, and from 10 mg/mL on PI. In crystallizations from acetone the behavior was similar with the following exceptions: form 1 was crystallized from 40 mg/mL solutions in all polymers and from 10 mg/mL solutions on PVA, PI and NBR. Finally, a mixture of polymorphs was obtained from 0.5 mg/mL. The crystals obtained in acetone of larger size than those obtained with chloroform. In the most of the polymers studied, different crystal habits for the same polymorph were observed and even the same morphology for both progesterone polymorphs.

Keywords: Progesterone, polymorphism, crystal growth, polymer-induced heteronucleation, preferred orientation.

1. Introduction

Progesterone is a natural hormone steroid used in humans for the treatment of premenstrual and polycystic ovary syndromes¹, in hormone replacement therapy² and as a component in oral contraception pills³. Recently its potential use as a neuroprotector and myelin repairer have been studied⁴. This drug is also used in livestock for artificial insemination⁵, administered by intravaginal polymeric devices⁶. Structurally, progesterone exhibits two polymorphic forms at ambient conditions: form 1 and form 2 (Cambridge Structural Database reference PROGST12 and PROGST13 respectively)⁷. Form 1 is thermodynamically stable and less soluble than form 2. Form 2 is metastable and it is more soluble than form 1. In an earlier study, we reported the effects of grinding in the solid-state transformation of form 2 into form 1. These results suggest that form 2 is not a suitable to use as powder raw material for processing of solid forms with mechanical stress. Additionally, its efficacy is limited for peroral administration, because its intensive hepatic metabolism⁸. The transdermal and vaginal routes have more advantages including reduction of possible hepatic side-effects⁹.

In other hand, in the polymorphic screening area Polymer-induced heteronucleation (PIHn) is a new approach for target nucleation in the polymorphic crystallization process. PIHn is a successful method that made it possible to isolate new solid forms of carbamazepine¹⁰, sulindac, flurbiprofen¹¹ and sulfamethoxazole¹² from solution, using the surfaces of dispersed polymers as template.

There are already polymeric parches for transdermal administration of progesterone. Hence, polymeric films are adequate to study the polymorphic crystallization of progesterone in this sort of systems. The knowledge about crystallization process of progesterone using polymeric matrices might make possible to design new delivery systems for this drug. Therefore, the aim of the present work is to study the polymorph crystal growth of progesterone through the heteronucleation process in polymeric matrices using polymeric films and solvent evaporation as crystallization method.

2. Experimental section

2.1. Materials.

Micronized progesterone (>99% pure) was obtained from Pharmanostra imported from China. PVA was obtained from Vetec®; HPMC, dextran T-500 and gelatin G-9382 were purchased from Sigma-Aldrich. PI and NBR sheets with 0.1mm thickness were obtained from Embrac® and Danny®, respectively.

2.2. Polymeric films preparation.

PVA, HPMC, dextran and gelatin films were prepared between 2-3% in water by solvent evaporation. PI and NBR sheets were used as purchased. All polymeric films were cut into approximately 1 cm diameter circles.

2.3. Progesterone crystals growth.

Three solutions of different concentrations of progesterone were prepared in acetone and chloroform: 0.5 mg/mL, 10 mg/mL and 40 mg/mL. From each concentration crystallizations on polymeric matrices were performed. Substrates were placed in beakers and were added 2.00 mL of progesterone solution. Solvent evaporation at room temperature (approx. 25 °C) was used as the crystallization method.

The polymorphic stability essays of form 2 obtained on polymeric matrices was evaluated under stress conditions (40°C and 75% relative humidity (RH)) for 3 months.

2.4 X-ray diffraction study

X-ray diffraction patterns were collected from a PANalytical X'PERT Multipurpose diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) operated at 45 kV and 40 mA, step size 0.016° , step time 20 s, angular scanning speed $2^\circ/\text{min}^{-1}$ and 2θ angular range between 5° and 50° using a linear solid-state detector (Xcelerator). Substrates with progesterone crystallized were placed between two Kapton® films in a transmission sample-holder. In order to reduce the huge crystalline preferred orientation induced by crystal grown process on substrates, progesterone crystals were scraped out from the matrices, grounded, forming a fine powder sample, and placed on a zero-background sample holder. The polymorphic forms were identified by comparing the experimental X-ray powder diffraction patterns with calculated patterns obtained from crystallographic data of Form 1 and 2 progesterone polymorphs. (PROGST12: Form 1 and PROGST13: Form 2 (Lancaster et al., 2007)).

2.5. Attenuated Total Reflectance Infrared Spectroscopy (ATR-IR) technique.

Infrared spectra were obtained using a Shimadzu IR Prestige-21 infrared spectrometer fitted with a diamond ATR accessory, collecting 32 scans at 4 cm^{-1} resolution. Samples were dried and placed directly without other manipulation.

2.6. Thermal analysis (DSC) analysis.

DSC curves were obtained on a Shimadzu DSC-60 cell using aluminum pans, under dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and heating rate of $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in temperature range from 40 to $150\text{ }^{\circ}\text{C}$. The samples were cut and placed on the pans, sealed. In order to avoid uncontrolled variation of pressure the pans were perforated¹³.

2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM).

Microphotographs were obtained from a JEOL JSM-6390LV scanning electron microscope operated at 10kV and 15kV. The samples were seated on a metal stub with double-sided adhesive tape and coated under vacuum with gold in an argon atmosphere.

3. Results and discussion

PVA, HPMC, dextran and gelatin were selected taking into account its pharmaceuticals use in drug delivery^{14,15}, coating^{16,17} and as excipients¹⁸. In addition, these polymers have ability to form films and are water soluble; therefore it is expected to be slightly solubility in organic solvents. PI systems have already been used in drug delivery devices for veterinarian applications⁶. Finally, NBR was selected by its similar texture with PI and in order to increase the variety of the polymeric surfaces. The monomers of these six polymers are given in Figure 1. The polymorphic forms were identified firstly by comparison of experimental XRPD data with calculated patterns of progesterone forms 1 and 2 (PROGST12: form 1 and PROGST13: form 2)⁷. XRPD patterns of both polymorphs have several superimposed reflections, thus we select those intense without superposition at 12.95° for form 1 and at 13.95 and 16.42° for form 2. These positions are indicated in the figures with the symbols (+) and (*) to forms 1 and 2, respectively. Afterward, the samples were subjected to DSC analyses and polymorphs were identified by comparing the melting range reported in the literature with the range obtained experimentally. Forms 1 and 2 melt in the range of

128-131 °C, and 120-122°C, respectively ^{7,19}. Additionally, in the cases that the polymer did not interfere in the identification, ATR-IR spectra were used to confirm the results. Form 1 presents a distinctive band in 870 cm^{-1} and this is shifted to 863 cm^{-1} in form 2 ⁷. The polymers used neither have crystalline structure nor melting points. Figure 2 shows the ATR-IR spectra of the pure polymers (a-f) and progesterone polymorphs (g and h).

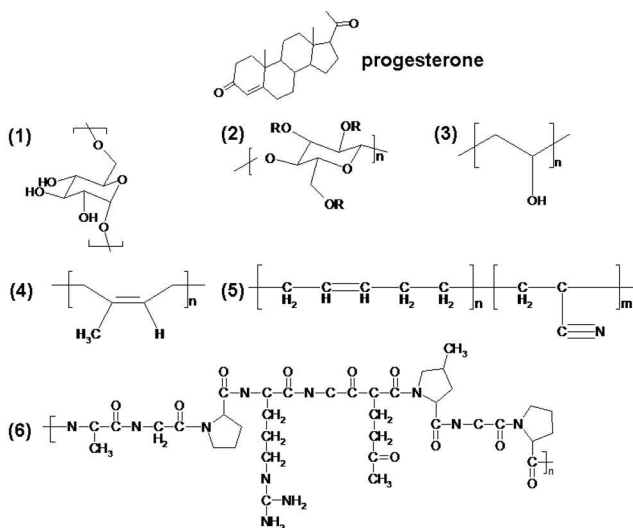


Figure 1- Chemical structure of progesterone and polymers used: (1) dextran, (2) HPMC, (3) PVA, (4) PI, (5) NBR and (6) gelatin

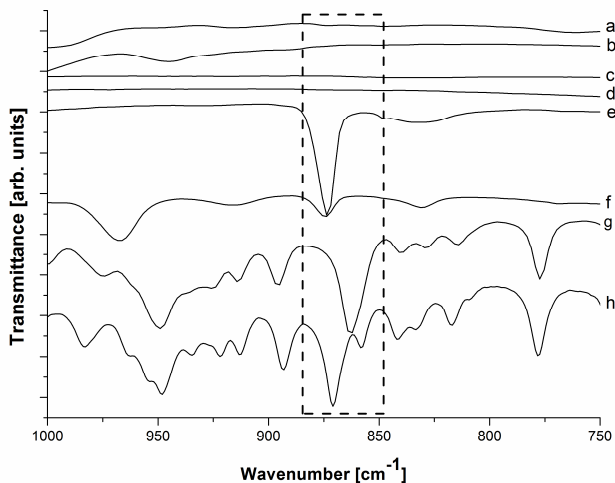


Figure 2- ATR-IR spectra of : (a) dextran, (b) HPMC, (c) PVA, (d) gelatin, (e) PI, (f) NBR, (g) progesterone form 2 and (h) progesterone form 1

3.1. Progesterone crystals growth from acetone solutions

The crystallizations from 40 mg/mL solutions, progesterone form 1 was obtained on the six polymeric matrices. In the XRPD patterns for these samples high preferred orientation was observed (Figures 3 and 4). On PI and on dextran the preferred orientation was remarkable. Figure 3 shows XRPD patterns and the microphotographs of progesterone crystals grew on these two polymers. It is observed that the large size of the crystals was caused the preferred orientation. The diffractograms obtained for crystals grown on PI presented an intense reflection at 10.82° . It is apparent, therefore, that at slow growth occurred in the crystallographic direction $[1\ 0\ 1]$. For crystals obtained on dextran, the major growth was observed in the $[1\ 0\ 1]$ and $[1\ 2\ 2]$ directions. In order to reduce preferred orientation, crystals were removed from the polymeric surfaces and softly ground, forming fine powder samples. After that, XRPD measurements of the powder samples were performed using a zero-background sample holder and the presence of form 1 was confirmed for all samples prepared using 40 mg/mL solutions. In this case, the soft grinding process did not cause any crystalline phase transition, because the form 1 is the stable polymorph and the grinding conditions used were as soft as possible.

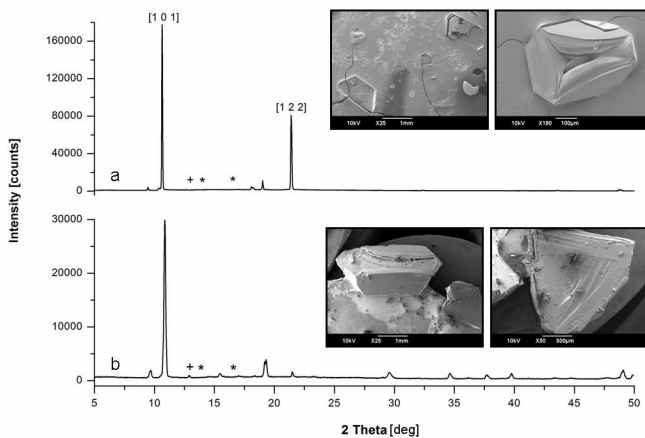


Figure 3- XRPD patterns of progesterone crystal (form 1) obtained from 40mg/mL solutions on: (a) dextran and (b) PI (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°). The inset shows the respective microphotographs of each sample

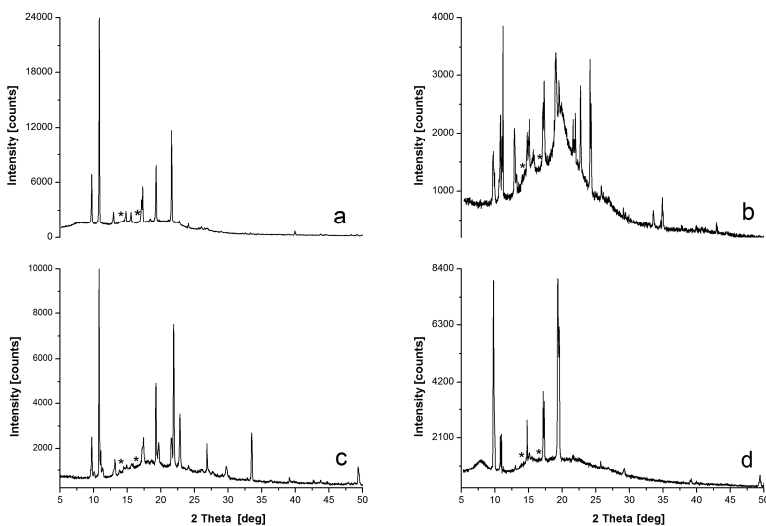


Figure 4- XRPD patterns of progesterone form 1 obtained from 40mg/mL solutions on: (a) HPMC, (b) PVA, (c) NBR and (d) gelatin (selected reflections to identify * form 2)

DSC curves for all samples presented a unique endothermic event corresponding to progesterone form 1 confirming the results obtained by XRPD.

ATR-IR measurements were useful to confirm the polymorphic crystallization on PVA, HPMC, dextran and gelatin and to compare the vibrational spectra of these polymers with progesterone. In Figure 5 the distinctive band in 870 cm^{-1} corresponding to form 1 was observed. Nevertheless, PI, NBR and progesterone (Figure 2 e and f) showed similar vibrational modes due to the out-of-plane bending of hydrogen bonded to a sp^2 carbon²⁰ presented in these three molecules. Hence, ATR technique was not useful for the identification of polymorphs in these two polymers since the superposition of some characteristics bands.

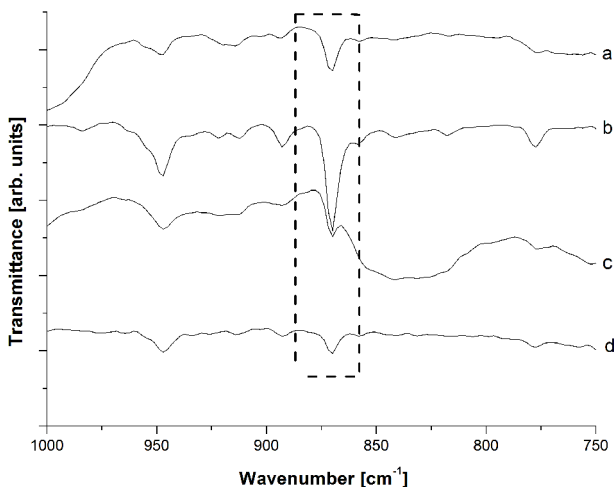


Figure 5- ATR-IR spectra of progesterone form 1 obtained from 40mg/mL solutions on: (a) dextran, (b) HPMC, (c) PVA and (d) gelatin

In Figures 3 and 6 are observed the morphology of crystals presented by progesterone form 1. Three different polyhedral crystal habits and a dendritic morphology were observed with sizes varying from millimeters to micrometers.

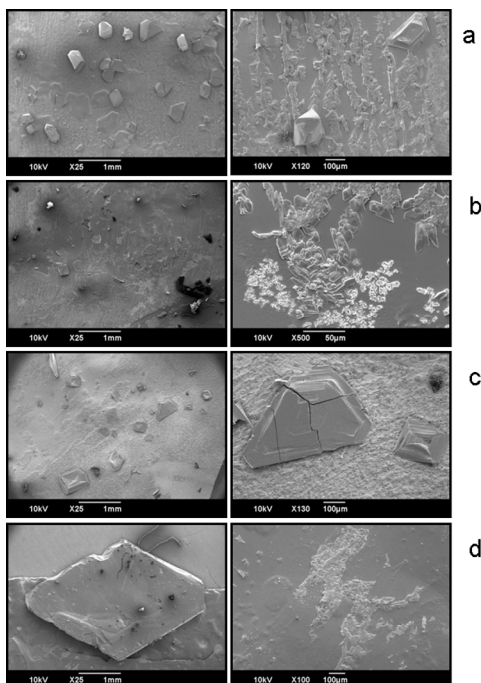


Figure 6- Microphotographs of progesterone crystallized from 40 mg/mL solutions in acetone on: (a) HPMC, (b) PVA, (c) NBR and (d) gelatin

Progesterone form 1 was obtained from crystallizations at 10 mg/mL solutions on PVA, PI and NBR. For these samples the XRPD data also presented preferred orientation (Figure 7A). For PVA the diffractogram on Figure 7A (a) was coincident with form 1, however the more intense reflection at 17.14° and 17.28° is observed with very low intensity. The crystals grown on PVA presented a slow growth of the $[1\ 0\ 1]$ and $[0\ 2\ 2]$ directions. After prepared properly the progesterone crystal, the XRPD data showed two more intense reflections of progesterone form 1. Progesterone crystallized on PI was presented an intense reflection at $2\theta\ 29.59^\circ$ evidencing a major growth of the $[0\ 4\ 1]$ direction. The XRPD data also showed reflections higher than 30° which were presented in the pattern of form 1 of low intensity. When progesterone crystals were ground, those reflections were disappeared in the XRPD data, confirming preferred orientation. On NBR, progesterone crystals presented a slow growth in two crystallographic directions mainly: $[1\ 0\ 1]$ and $[0\ 4\ 1]$. After measurements of progesterone crystals ground properly, all the reflections were coincident with form 1. Finally, DSC

experiments confirmed the presence of form 1 on these three polymers (Figure 7B (a-c)).

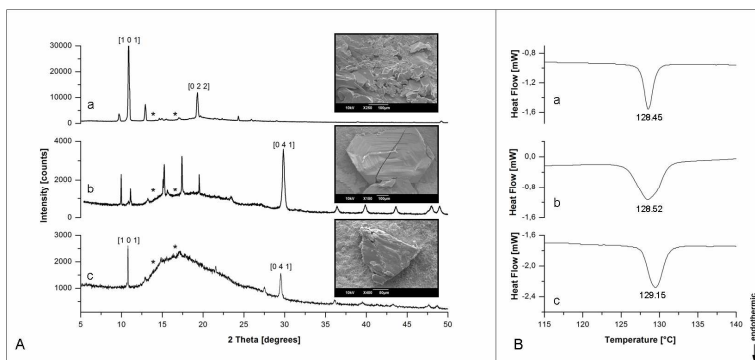


Figure 7- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°). The inset shows the respective microphotographs of each sample. (B) DSC curves of progesterone form 1 obtained from 10mg/mL solutions in acetone on: (a) PVA, (b) PI and (c) NBR

On HPMC, dextran and gelatin, progesterone was crystallized as a mixture of the two polymorphs. The XRPD patterns of gelatin presented none of the selected reflections to form 2 (Figure 8). On the other hand, on dextran, the most intense reflection of form 1 (2 theta 17.14° and 17.28°) attributed also to preferred orientation was not observed. After removing the crystals from the polymer and grinding them, all reflections appeared were coincident with form 1. However, form 2 is the metastable polymorph, hence it transforms into form 1 through the grinding process as we investigated previously²¹. On the DSC curves in figure 8B it was possible to confirm the results obtained by XRPD analysis, which presented high preferred orientation.

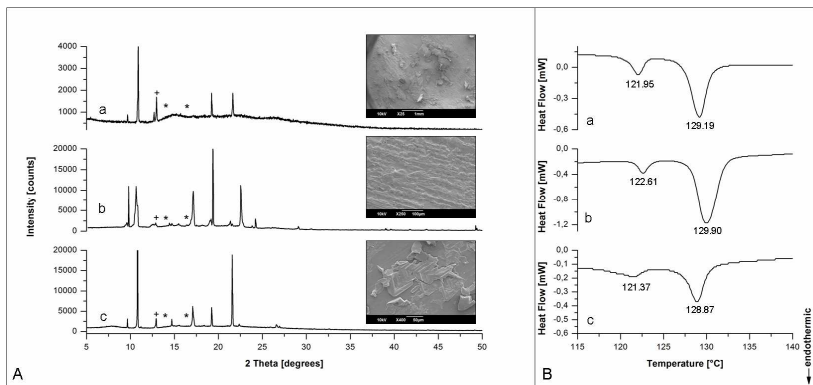


Figure 8- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95° and * form 2: 13.95° and 16.42°). The inset shows the respective microphotographs of each sample. (B) DSC curves of progesterone form 1 obtained from 10mg/mL solutions in acetone on: (a) dextran, (b) HPMC and (c) gelatin

In the experiments from the concentration of 0.5mg/mL, crystallized progesterone was predominantly as a mixture of the two polymorphs. For PVA, HPMC gelatin the XRPD data presented insufficient reflections, therefore, coincident with form 1 for PVA and HPMC (Figure 9a-b). In the case of gelatin the unique reflection observed is present in both polymorphs (Figure 8c). XRPD for dextran in Figure 9d presented no reflections and only the characteristic halo of amorphous polymers was observed. The use of further analysis to identify polymorphs in these samples was critical. DSC curves were useful to confirm the presence of the mixture of progesterone polymorphs on these four polymers (Figure 10). The elastomers PI and NBR also presented few reflections which are present in both powder patterns of the two polymorphs. On both polymers an intense reflection at 2 Theta 29.59° was observed. Additionally, other reflections at 2 Theta higher than 30° were observed; which must have very low intensity in the calculated pattern of form 1 of. It was similar to the one observed on crystals obtained on PI from intermediate solutions crystallizations. However, for these two polymers DSC curves did not allow to confirm the presence of progesterone form 2.

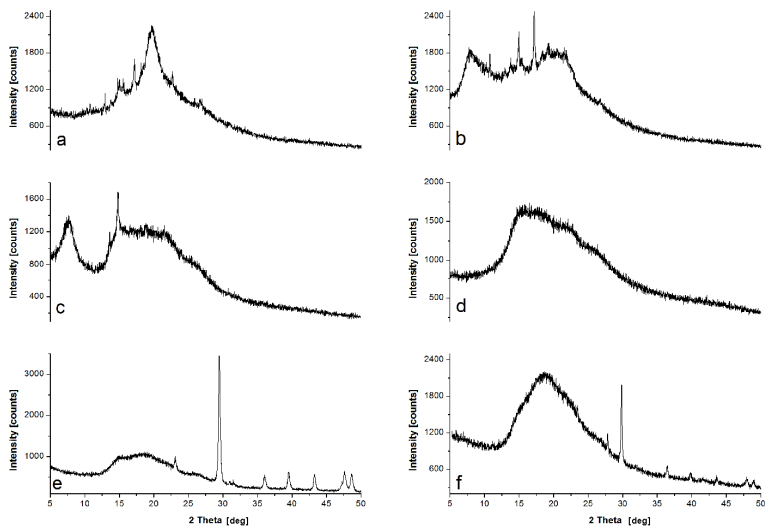


Figure 9- XRPD patterns of progesterone crystallized from 0.5mg/mL solutions in acetone on: (a) PVA, (b) HPMC, (c) gelatin, (d) dextran, (e) PI and (f) NBR

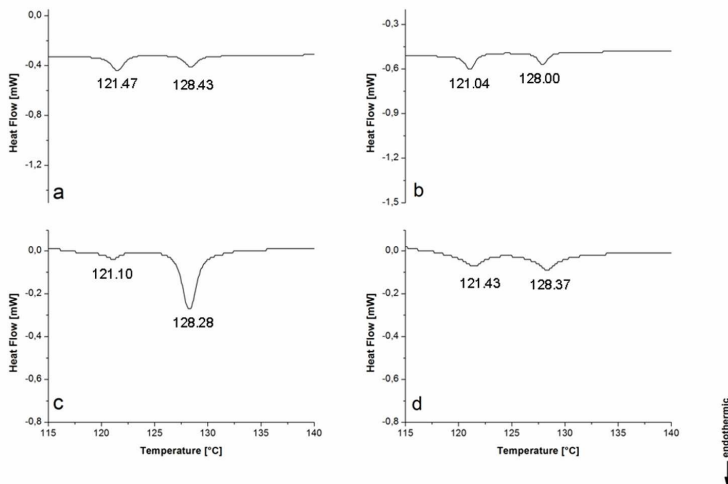


Figure 10- DSC curves of progesterone crystallized from 40mg/mL solutions in acetone on: (a) dextran, (b) gelatin, (c) HPMC and (d) PVA

Similar crystal habits were observed on PVA, HPMC, gelatin and dextran (Figure 11). Therefore, on the both elastomers none specific

morphology was observed. Hence, in this case the morphology was not able to be used as a distinctive characteristic of each polymorph.

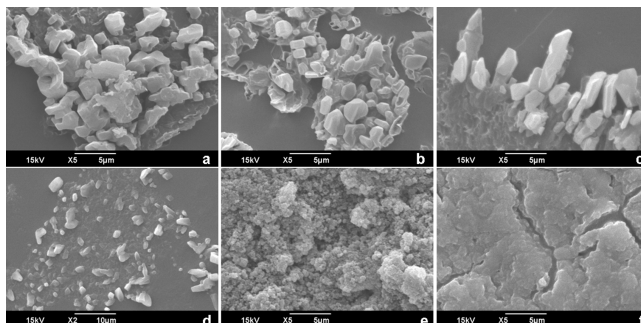


Figure 11- Microphotographs of progesterone crystallized from 0.5mg/mL solutions in acetone on: (a) PVA, (b) HPMC, (c) gelatin, (d) dextran, (e) PI and (f) NBR

3.2 Progesterone crystals growth from chloroform solutions

On HPMC, PVA and gelatin, even from 40 mg/mL solutions the metastable form 2 mixed with the form 1 were obtained, detected by XRPD and DSC analyses (see Figures 12, 13 and 14). Gelatin presented a unique behavior since it induced the two polymorphic forms from all studied concentrations. Therefore, polymeric matrix and the concentration used have influenced in the selection of the progesterone crystal forms. Figure 13A shows the diffractograms of crystallized progesterone on gelatin from the three concentrations, where the preferred orientation is observed. However, this distortion was expected in concentrated solutions since the crystals could present large sizes. In gelatin the preferred orientation was also detected for diluted solutions (Figure 13A (c)).

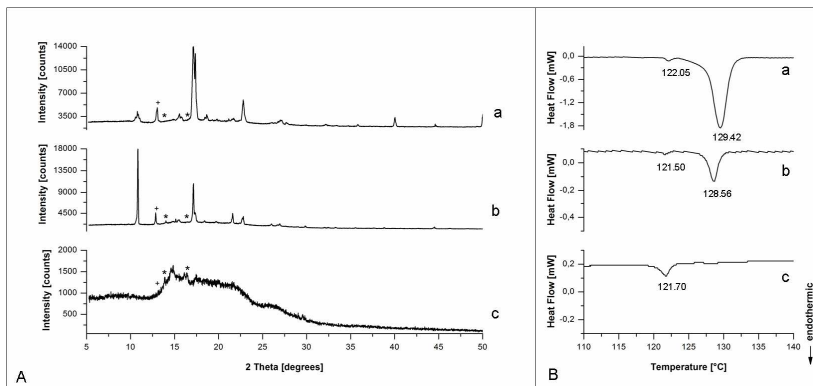


Figure 12- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°). (B) DSC curves of progesterone crystallized on HPMC from: (c) 40 mg/mL, (b) 10 mg/mL, and (c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

Figure 12A presents XRPD data for the crystallizations performed from the three concentrations solutions on PVA. The halo, corresponding to the pure polymer, was observed using intermediated and diluted concentrations. A similar situation occurred on dextran (Figures 14A). However, on the latter polymer from diluted solutions the mass of progesterone was not sufficiently crystalline to show reflections. Figures 11A (c) and 15A (c) illustrate for HPMC and NBR the presence of halo and absence of reflections. We could identify the polymorph 2 using DSC in the case of dextran and HPMC. On the case of PI from diluted solution, some particular reflections in the range of 35°- 50°, and an intense reflection in ~ 30° were observed. Unfortunately, these reflections are coincident in both polymorphs (Figure 16A).

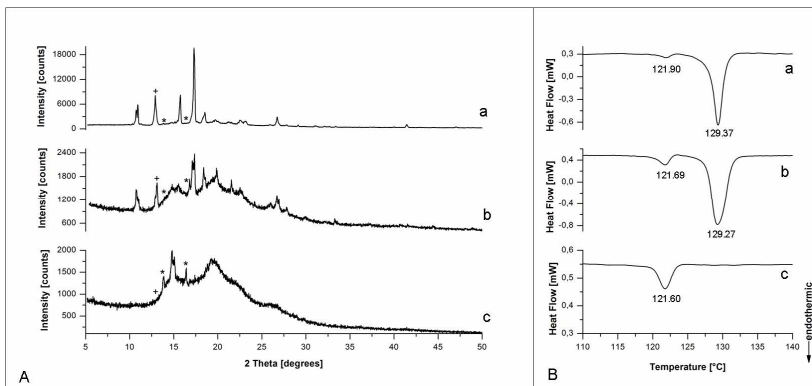


Figure 13- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°). (B) DSC curves of progesterone crystallized on PVA from: (a) 40 mg/mL, (b) 10 mg/mL, and (c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

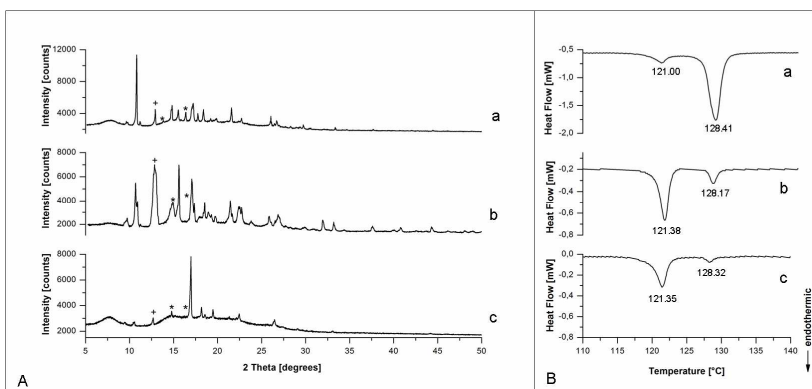


Figure 14- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°) (B) DSC curves of progesterone crystallized on gelatin from: (a) 40 mg/mL, (b) 10 mg/mL, and (c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

DSC analyses were used to resolve the cases where superposition of reflections occurred, being difficult to identify only by XRPD. For instance, the samples obtained by crystallizations from 40 mg/mL solution on HPMC and PVA were identified with form 1 from XRPD. However, in Figures 11B and 12B show in DSC curves the presence of form 2, confirming a mixture of polymorphs on these samples. The samples obtained on NBR by crystallization from 10mg/mL solutions, the XRPD pattern of progesterone crystals directly on the polymeric

films; could be identified with form 2. In order to confirm the identification, the crystals were scrapped from surface and ground before they were measured again using XRPD, evidencing the presence of form 2. However, in Figure 15B an endothermic event in the melting temperature of form 1 is observed. Due to the XRPD and DSC data not being in agreement, further studies would be required.

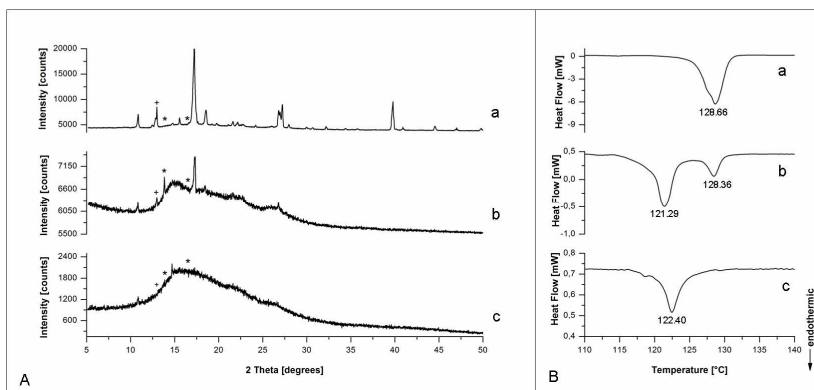


Figure 15- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°) (B) DSC curves of progesterone crystallized on dextran from: (a) 40 mg/mL, (b) 10 mg/mL, and (c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

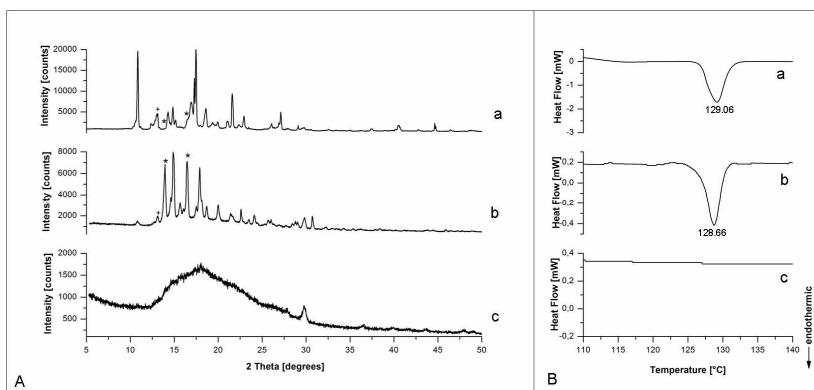


Figure 16- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°). (B) DSC curves of progesterone crystallized on NBR from: (a) 40 mg/mL, (b) 10 mg/mL, and (c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

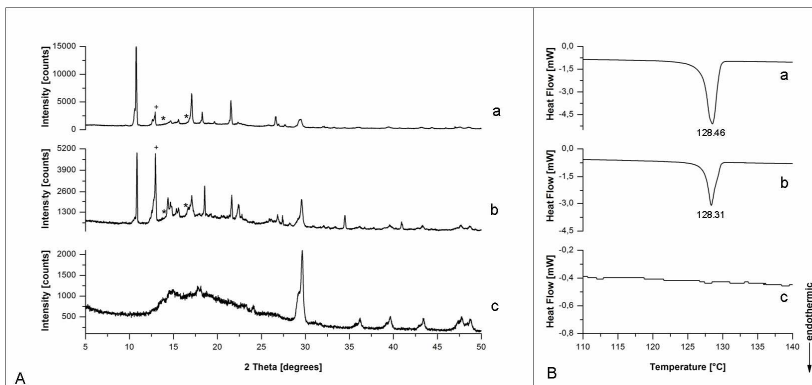


Figure 17- (A) XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°). (B) DSC curves of progesterone crystallized on PI from: (a) 40 mg/mL, (b) 10 mg/mL, and (c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

ATR-IR progesterone crystallized on dextran and PVA are given in Figure 18. In the sample obtained from 40 mg/mL on dextran a characteristic band of progesterone form 1 was observed. From the other two concentrations, the band was shifted to 863 cm^{-1} , indicating the presence of progesterone form 2 on the polymeric film. On PVA form 40mg/mL the band was observed in 860 cm^{-1} and from 10 mg/mL appears in 870 cm^{-1} . These results indicate the presence of form 1 or 2, however, they are inconclusive in cases where there is a presence of a mixture. Nevertheless, for progesterone nucleated on PI and NBR the band was misleading, owing its presence to the polymer (Figure 2). Hence, for PI and NBR, it was not useful to identify the polymorph and neither provided information of polymer modification with the crystallized phase.

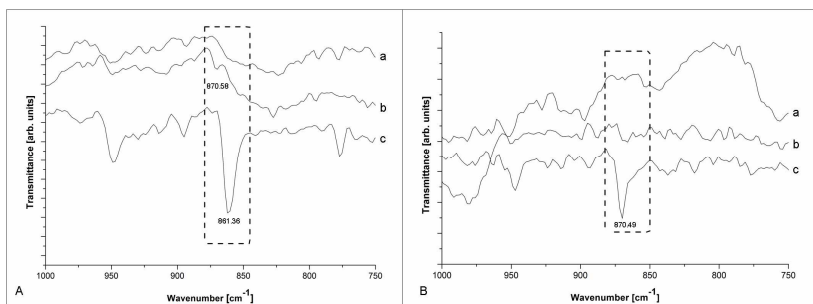


Figure 18- ATR-IR spectra of progesterone crystallized on: (A) dextran, and (B) PVA from: (a) 0.5, (b) 10 and (c) 40 mg/mL solutions in chloroform

Table 1 summarizes the results of this polymorphic screening. These results suggested that the polymer and the solvent interfere in the selection of progesterone polymorphs.

Table 1- Polymorph found on the matrices at three concentration levels and two solvents

Solvent	Concentration (mg/mL)	Progesterone polymorph/matrices					
		PVA	HPMC	dextran	gelatin	PI	NBR
Acetone	40	Forma 1 ^{a+b+c}	Form 1 ^{a+b+c}	Form 1 ^{a+b}	Form 1 ^{a+c}	Form 1 ^{a+b+c}	Form 1 ^{a+b+c}
	10	Forma 1 ^{a+b+c}	Mixture 1 ^{a+c}	Mixture ^{a+b+c}	Mixture ^{a+c}	Form 1 ^{a+c}	Form 1 ^{a+c}
	0.5	Mixture ^{a+c}	Mixture 1 ^{a+c}	Mixture ^c	Mixture ^{a+c}	- ^d	- ^d
Chloroform	40	Mixture ^c	Mixture ^{a+c}	Form 1 ^{a+b+c}	Mixture ^{a+c}	Form 1 ^{a+c}	Form 1 ^{a+c}
	10	Mixture ^{a+c}	Mixture ^{a+c}	Mixture ^{a+b+c}	Mixture ^{a+c}	Form 1 ^{a+c}	Mixture ^a
	0.5	Form 2 ^{a+c}	Form 2 ^c	Form 2 ^{b+c}	Mixture ^{a+c}	- ^d	- ^d

^a XRPD^b AT-IR^c DSC^d The polymorphs could not be determined since the results were inconclusive

In a previous study we demonstrated that form 2 is more soluble than form 1²². Additionally, it is reported in literature that form 2 is a 'disappearing polymorph'²³. Hence our interests to study the conditions that produce this crystal form. Crystallizations performed from intermediate and diluted solutions were the condition that produced form 2 or mixture of polymorphs in its majority.

The solvent-mediated polymorphic transformation of progesterone form 2 into form 1 was previously reported by Wang et al. (2000). In this study they demonstrated that the metastable form 2 is firstly crystallized and transforms into a stable one²⁴, according to Ostwald's rule²⁵.

3.3 Morphology of progesterone polymorphs

In general, the morphology of a crystal specimen is determined by structure and by factors involved in crystal growth, hence the same crystal form may appear in several morphologies²⁶. Figure 19 shows the SEM micrographs of progesterone crystallized on gelatin from the three concentrations in chloroform. Under these conditions, progesterone crystallized as a mixture of polymorphs. However, two different morphologies were not visualized. On the other hand, the morphology observed on gelatin crystallized from 10mg/mL solutions (Figure 19A (b)) was quite similar with the exhibited on HPMC from 40mg/mL (Figure 19B (a)); both presented a mixture of the two polymorphs and exhibited a fractal polycrystalline texture. Crystallization was non uniform, leaving some parts of the polymer crystal free, as observed for gelatin and HPMC (Figures 19 A and B). In contrast, on PVA progesterone also nucleated as a mixture of polymorphs and crystals completely covered the film surface (Figure 19C). On this last polymer, progesterone crystallized from 10mg/mL solution presented a spiral texture, this polycrystalline behavior is characteristic of solvent evaporation and it is graphically represented in Figure 19 C (b).

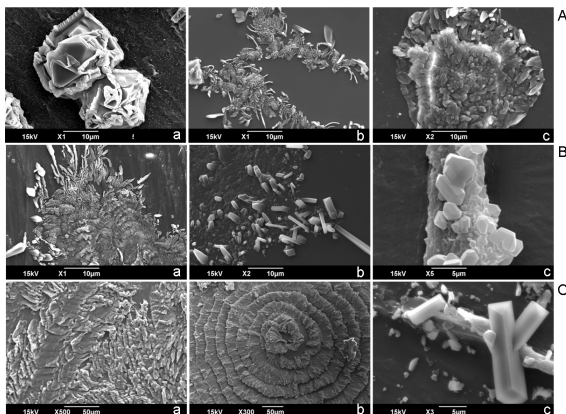


Figure 19- Photomicrographs of progesterone crystallized on: (A) gelatin, (B) HPMC, and (C) PVA from: a) 40 mg/mL, b) 10 mg/mL, and c) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

The morphology of progesterone form 1 obtained from acetone solution at diluted concentration was different in comparison with at concentrated solutions in the same solvent. In the samples that progesterone crystallized as a mixture of polymorphs, it was not clearly observed two different crystal habits.

Similar crystal habits were observed on PVA, HPMC, gelatin and dextran (Figure 19). Therefore, on the both elastomers none specific morphology was observed. Hence, in this case the morphology was not able to be used as a distinctive characteristic of each polymorph.

3.4 Stability studies

For these studies the polymer and the concentrations that better induced the crystallization of pure form 2 or as a mixture of polymorphs were selected. Thus PVA, HPMC and dextran from intermediate and diluted solutions in chloroform were selected. The disappearance of the endothermic event and the reflections corresponding to form 2, along with the occurrence of the endothermic event and the reflection selected to form 1 were used as evidence of the solid state transformation of form 2, into form 1. These criteria were used, in order to analyze the samples, after three months of storage in 40°C and 75% RH. Form 2 was stable depending on the polymer and the concentration from which it crystallized. Form 2 on PVA obtained as a pure form, partially transforms into form 1. XRPD patterns and DSC curves are given in Figure 20. Diffractograms show the disappearance of one of the two

selected reflections for form 2 and the appearance of the reflection selected to identify form 1. The arising of the endothermic event correspondent with form 1 was also observed. Form 2 presented on HPMC crystallized from intermediate solutions continued as a mixture after storage time. Whereas, on dextran from intermediate solution, form 2 crystallized as a mixture of polymorphs, it completely transforms into form 1 (Figure 21).

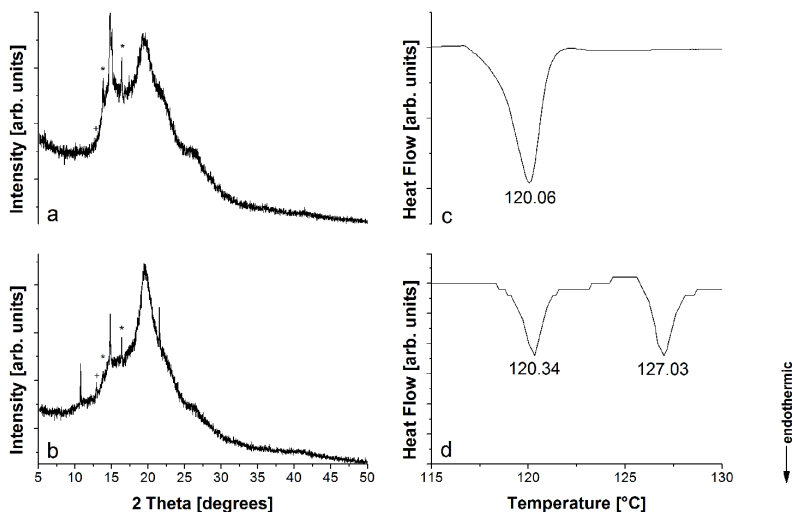


Figure 20- XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°)(+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°) and DSC curves of progesterone crystallized on PVA from 0.5 mg/mL solution in chloroform: (a), (c) initial time of stability study and (b), (d) after three month storage

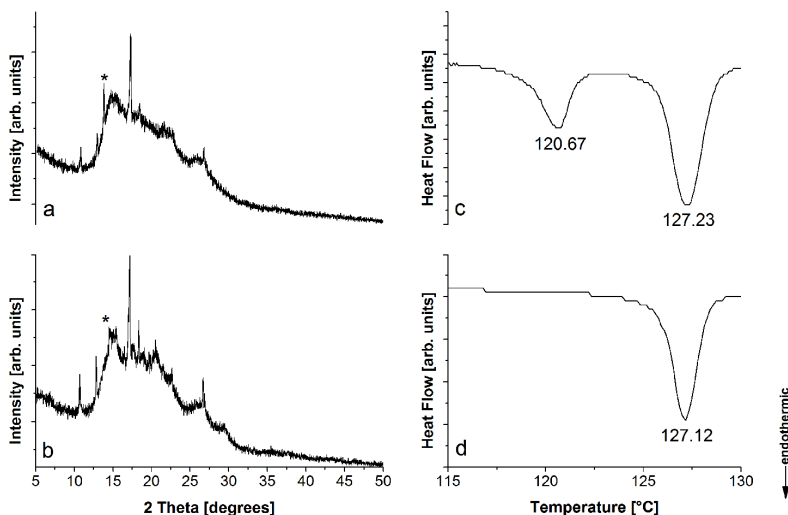


Figure 21- XRPD patterns (+ form 1: 12.95 ° and * form 2: 13.95° and 16.42°) and DSC curves of progesterone crystallized on dextran from 10mg/mL solution in chloroform: (a), (c) initial time of stability study and (b), (d) after three month storage

3.5 Interaction drug-polymer.

ATR-IR technique was initially used to explore possible interactions between drug and polymers that may be contributing in the selective crystallization of progesterone polymorphs. However, depending on which part of the sample the laser was placed, the spectrum was more similar to drug or to polymers. Replicates were performed on different parts of the sample suggesting that progesterone not completely covers the polymer surface. On the other hand, progesterone and polymers presented similar vibrational modes, hence is difficult to identify any difference in the spectra.

Since with ATR-IR was possible to obtain local information on the surface of films, these results evidenced that, depending on the polymer and the concentration, the crystallization was not completely homogenous. In order to determine the drug-polymer interaction, experiments with PVA and progesterone are in progress in our laboratory using sum frequency generation vibrational spectroscopy (SFG-VS). It is a selective to interfaces technique that has been applied

in the study of two crystal forms of acetaminophen on polymer surfaces²⁷.

Conclusions

The PIHn methodology made it possible to obtain a mixture of two solid forms of progesterone from intermediate and diluted solutions in acetone on the majority of the polymers and even from concentrated solutions in chloroform. Form 2 as pure form was obtained from diluted solutions in chloroform on PVA, HPMC and dextran. The concentration of the solutions and the solvent influence in the selection of progesterone polymorphs highlight that polymers also affect the crystallization process and determine the size of the crystals. The crystals obtained from acetone solutions presented, in average, higher size than those obtained from chloroform. The morphology of progesterone polymorphs could not be directly related with the crystalline forms identified. It was remarkable that the polymorph 2 was stable under ambient stress conditions for three months on HPMC. Therefore, being form 2 more soluble than form 1, the pharmaceutical devices loaded by this polymorph might need lower doses with the same bioavailability. This is a great advantage for therapeutic applications and these results are good evidence that the tailoring of new formulations and devices using progesterone form 2 is possible.

Acknowledgements

The authors want to thank Laboratório de Difração de Raio-X (LDRX), Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) and Laboratório de Materiais Poliméricos (POLIMAT) at UFSC, CNPq, CAPES, FAPESC, CLAF, Fundación Sauberan and CONICET for student fellowships and financial support. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for Visited Professor and CONICET, Argentina for fellowship. Thanks are also given to the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) of Spain for the award of a license for the use of the CSD.

References

- 1 V. Unfer, M. L. Casini, G. Marelli, L. Costabile, S. Gerli, G. C. Di Renzo, *Gynecol. Endocrinol.* 2005, **21**, 119-27.

- 2 C. Campagnoli, F. Clavel-Chapelon, R. Kaaks, C. Peris, F. Berrino, *J. Steroid. Biochem.* 2005, **96**, 95-108.
- 3 Hirvonen, E. *Maturitas.* 1996, **23**, S13-8.
- 4 M. Schumacher, R. Guennoun, D. G. Stein, A. F. De Nicola, *Pharmacol. Therapeut.* 2007, **116**, 77-106.
- 5 M. J. Rhathbone, K. L. Macmillan, C. R. Bunt, S. Burggraaf, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 1997, **28**, 363-392.
- 6 V. Heredia, I. D. Bianco, H. Tríbulo, R. Tríbulo, M. F. Seoane, S. Faudone, S. L. Cuffini, N. Demichelis, H. Schalliol, D. M. Beltramo, *Int. J. Pharm.* 2009, **382**, 98-103.
- 7 R. W. Lancaster, P. G. Karamertzanis, A. T. Hulme, D. A. Tocher, T. C. Lewis, S. L. Price, *J. Pharm. Sci.* 2007, **96**, 3419–3431.
- 8 C. Valenta, C. E. Kast, I. Harich, A. Bernkop-Schnürch, *J. Control. Release.* 2001, **77**, 323-32.
- 9 J. L. Richardson, L. Illum, *Drug. Deliv.* 1992, **8**, 341-366.
- 10 Lang, M.; Kampf, J. W.; Matzger, A. J. *J. Pharm. Sci.* 2002, **91**, 1186-90.
- 11 A. L. Grzesiak, A. J. Matzger, *J. Pharm. Sci.* 2007, **96**, 2978-2986
- 12 C. P. Price, A. L. Grzesiak, A. J. Matzger, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 5512-7.
- 13 B. Legendre, Y. Feutelais, G. Defossefont, *Thermochim. Acta.* 2003, **400**, 213-219.
- 14 O. Pillai, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001, 447-451.
- 15 C. Valenta, B. G. Auner, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, **58**, 279-89.

- 16 S. Venkatraman, F. Boey, *J. Control. Release.* 2007, **120**, 149-60.
- 17 C. C. DeMerlis, D. R. Schoneker, *Food. Chem. Toxicol.* 2003, **41**, 319-26.
- 18 R. C. Rowe, P. J. Sheskey, M. E. Quinn, *Handbook of pharmaceutical excipients*; sixth ed.; 2009; p. 888.
- 19 G. Defossefont, S. L. Randzio, B. Legendre, *Cryst. Growth. Des.* 2004, **4**, 1169-1174.
- 20 D. L. Pavia, *Introduction to spectroscopy*; third ed.; 2001.
- 21 A. M. Araya, C. Fandaruff, C. E. M. Campos, S. G. Cardoso, S. L. Cuffini, *Manuscript in preparation* 2012.
- 22 A. M. Araya, A. S. Paulino, G. S. Rauber, C. E. M. Campos, S. G. Cardoso, G. A. Monti, V. Heredia, I. Bianco, D. Beltrano, S. L. Cuffini, *Manuscript in preparation*, 2012.
- 23 R. W. Lancaster, P. G. Karamertzanis, A. T. Hulme, D. A. Tocher, T. C. Lewis, S. L. Price, *J. Pharm. Sci.* 2007, **96**, 3419-3431.
- 24 F. Wang, J. A. Wachter, F. J. Antosz, K. A. Berglund, *Org. Process. Res. Dev.* 2000, **4**, 391-395.
- 25 T. Threlfall, *Org. Process. Res. Dev.* 2003, **7**, 1017-1027.
- 26 Ichiro, S. *Crystals Growth, Morphology, and Perfection*; 2004.
- 27 A. A. McClelland, V. López-Mejías, A. J. Matzger, Z. Chen, *Langmuir.* 2011, **27**, 7575-7579.

4.2 ARTIGO 5 – Estudo da morfologia dos polimorfos da progesterona preparadas através da nucleação heterogênea induzida por polímeros

Morphology study of progesterone polymorphs prepared by polymer induced heteronucleation.

Andrea Mariela Araya Sibaja ^{a,b}, Cinira Fandaruff ^a, Carlos Eduardo Maduro Campos ^c, Valdir Soldi ^d, Simone Gonçalves Cardoso ^a and Silvia Lucia Cuffini ^{a,e}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

^c Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^d Grupo de estudo em materiais poliméricos (POLIMAT), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

^e CONICET, Ministerio de Ciencia y Técnica de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Abstract

Morphology of progesterone polymorphs prepared by Polymer-Induced Heteronucleation (PIHn) technique was studied. HPMC, PVA, gelatin, dextran, PI and NBR were used as substrates. The crystallizations were performed by solvent evaporation at room temperature from 0.5 mg/mL, 10 mg/mL and 40 mg/mL solutions in chloroform. Progesterone polymorphs were identified by X-ray diffraction. Depending on the polymeric matrix and the concentration used form 1, form 2 or mixture of both polymorphs were obtained. SEM pictures evidenced difference in morphology and in homogeneity of the two progesterone polymorphs. These polymorphs, prepared by PIHn, did not present a distinctive morphology that allows identifying polymorph by its crystal habit. Hence, polymeric matrix induced the crystallization, affecting polymorphism and morphology.

Introduction

Crystalline polymorphs presents the same chemical composition; however, different internal structure that causes different physicochemical properties (Vippagunta et al. 2001). On the other hand, differences in particle morphology are closely associated with mechanical properties as filterability, flowability and compaction (Yu et al. 2007). In order to improved processability of drugs, efforts are made to modified the crystal habit; some examples are celecoxib (Banga et al.

2007) and mebendazole (Kumar et al. 2008). Both polymorphism and morphology are intimately related with dissolution rate, which is one of the main concerns on solid pharmaceutical forms.

Progesterone presents two polymorphic forms: form 1 and form 2 (Lancaster et al. 2007). It is used to control the estrous cycle in livestock by intravaginal drug delivery systems (Rhathbone et al., 1997). Commercially devices are usually made of polydimethylsiloxane (PDMS) containing 10 % (w/w) of micronized progesterone (Heredia et al. 2008). In a recently study Heredia et al. (2009) evaluated the potential use of polyisoprene (PI) as a new matrix. They observed crystallization of progesterone form 1 on PDMS, whereas on PI a mixture of polymorphs was crystallized. Indeed, it is the principle of the method introduced by Lang et al. (2002) that is a powerful technique for controlling crystal polymorphism. This technique is named as Polymer-Induced Heteronucleation (PIHn), it was successfully applied in the selective production of polymorphs of acetaminophen; in the discovery of two new polymorphs of sulfamethoxazole and one new polymorph of carbamazepine (Price et al. 2005).

Therefore, the objective of this study was to investigate the different morphologies that the progesterone polymorphs present and its crystallization homogeneous, depending on the polymorphs and polymeric matrix.

Material and methods

Solvents used were analytical grade. Micronized progesterone was purchased from Pharmanostra (São Paulo, Brazil). Polyvinyl alcohol (PVA) was obtained from Vetec® (São Paulo, Brazil); hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), dextran T-500 and gelatin G-9382 were purchased from Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brazil). Polyisoprene (PI) and acrylonitrile/butadiene copolymer (NBR) were obtained from Embrac® and Danny® respectively (São Paulo, Brazil).

Sample preparation

Progesterone solutions in chloroform and in acetone were prepared at three concentrations: 0.5, 10 and 40 mg/mL. A fixed volume of the solutions were added to beakers containing the polymeric films. The crystallizations were conducted at room temperature (~ 25 °C) by solvent evaporation method.

Instrumentation

The analysis was carried out by scanning electron microscope (SEM) JEOL JSM-6390LV (JEOL Corp., Peabody, Mass., USA). Before being exposed to the electron beam, the samples were mounted on a metal stub with double sided adhesive tape and coated under vacuum with gold in with 30 mA current for 180 s, at working distance 50 mm (Leica EM SCD 500) (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), in argon atmosphere. In order to avoid damage on polymeric film, an accelerating voltage of 10 kV and 15 kV were used the working distance of 10 mm proved to be satisfactory. Spot sizes varied from 5 to 100 nm depending on the applied magnification and the scan rate (speed 3) was used.

The identification of progesterone polymorphs in the samples, were performed by X-ray diffractometer Panalytical X'Pert Pro Multipurpose (Panalytical, Almelo, The Netherlands) equipped with a Cu K α source ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) operated at 45 kV and 40 mA, step size 0.016° , step time 20 from 5° to 50° 2θ . Diffractograms obtained were compared with Cambridge Structural Database (CSD) crystallographic data (PROGST12: form 1 and PROGST13: form 2) (Lancaster et al. 2007).

Homogeneity in polymorphs distribution on the samples was observed by Differential Scanning Calorimetry technique on a Shimadzu DSC-60 (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA) using aluminum pans, under a dynamic nitrogen atmosphere (50 mL/min) and a heating rate of $5^\circ\text{C}/\text{min}$ in a temperature range from 40 to 150°C and by Attenuated Total Reflectance infrared spectroscopy using a Shimadzu IR Prestige-21 infrared spectrometer fitted with a diamond ATR accessory, collecting 32 scans at 4 cm^{-1} resolution.

Results and Discussion

Electron beam probed to be the most informative technique when further investigation in the surface characteristics of the solid is required (Byrn et al. 1999). The characterization of six polymeric matrices, loaded with progesterone from three concentrations and using two different solvents, were analyzed focusing in the morphology of the both previously identified polymorphs: form 1 and 2 (Lancaster et al. 2007).

Differences in morphology, homogeneity of progesterone crystal forms and its surface distributions on the polymer were observed. The results of the most representative SEM pictures are discussed

Progesterone polymorphs morphology

Progesterone polymorphs were identified by XRPD with DSC and ATR-IR as complementary techniques. It was identified pure form 1,

pure form 2 and mixture of the two crystal forms, in dependence on matrix and solvent used. We previously reported the complete polymorphism characterization for each polymer (Araya et al., 2012; Araya et al. 2012a). Literature described that progesterone forms 1 and 2 present a prismatic and needle-like morphology, respectively (Payne et al., 1999); however in this study the two progesterone polymorphs crystallized in several morphologies, including both polymorphs with the same morphology.

On PVA from 10 mg/mL solution in chloroform progesterone crystallized as a mixture of polymorphs and only one morphology was observed (Figure 1B). However, on this polymer and using the same concentration in acetone, progesterone crystallized as pure form 1 and different crystal habits were observed (Figure 2).

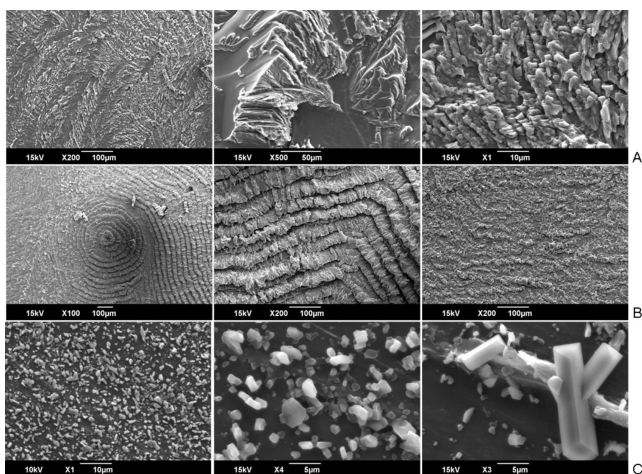


Figure 1- SEM image of progesterone crystals obtained on PVA from: (A) 40 mg/mL, (B) 10 mg/mL and (C) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

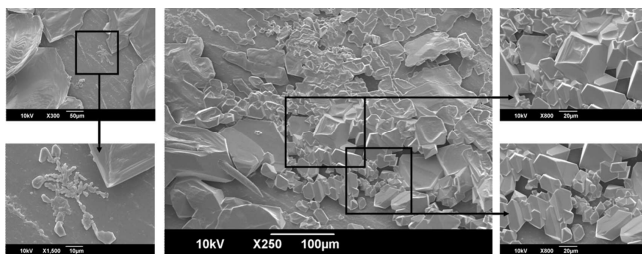


Figure 2- SEM image of progesterone crystals obtained from 10 mg/mL solutions in acetone on PVA

Form 1 was obtained from concentrated solutions in acetone on all polymers with several crystal habits, some examples are given in Figure 3. This polymorph was also obtained on NBR from 10mg/mL in acetone and also presented more than one crystal habit (Figure 4A). However, form 1 obtained on PI from chloroform solutions exhibits similar morphology from the three concentrations studied (Figure 5). This crystal habit was similar to exhibited on PI from 0.5mg/mL solution in acetone (Figure 6C), in which the polymorphic identification was not possible by XRPD.

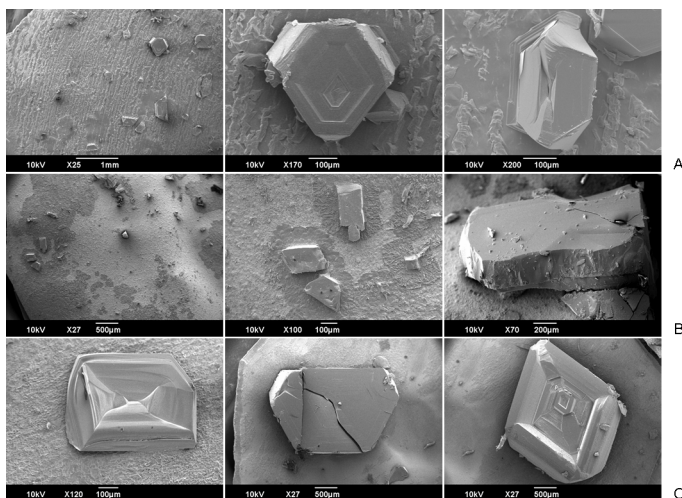


Figure 3- SEM image of progesterone crystals obtained from 40mg/mL solutions in acetone on: (A) HPMC, (B) PI and (C) NBR

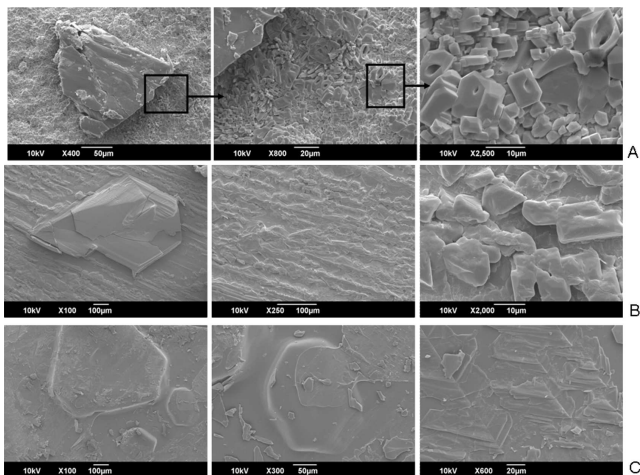


Figure 4- SEM image of progesterone crystals obtained from 10mg/mL solutions in acetone on: (A) NBR, (B) HPMC and (C) gelatin

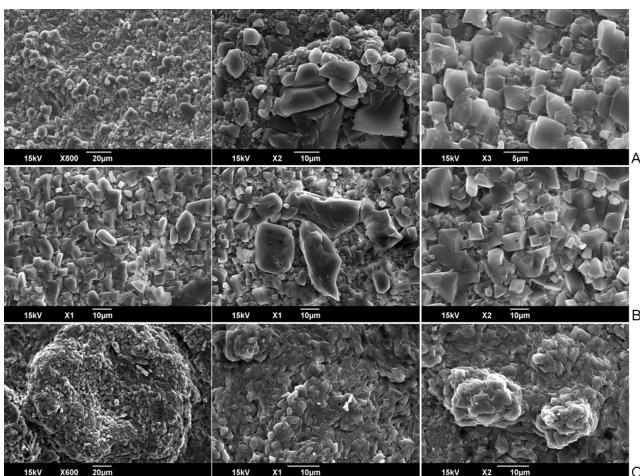


Figure 5- SEM image of progesterone crystals obtained PI from: (A) 40 mg/mL, (B) 10 mg/mL and (C) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

Form 2 was obtained on HPMC, PVA for progesterone crystallized from 0.5 mg/mL solution in chloroform as a pure form and one morphology was observed in these samples (Figures 1C and 7C). On the same polymers and concentration but using acetone as solvent form 2 concomitantly with form 1 were identified and it could not be distinguished two different morphologies (Figure 6B). On contrary, a

heterogeneous behavior was observed on dextran at 40 mg/mL in chloroform (Figure 8A). It presented one polymorph and one defined crystal habit was not observed.

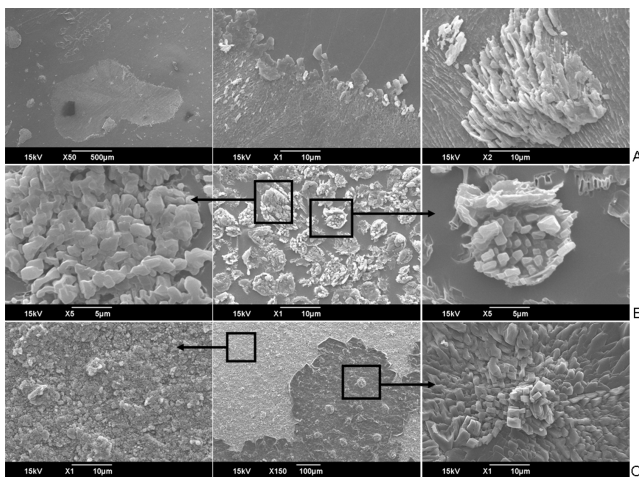


Figure 6- SEM image of progesterone crystals obtained from 0.5 mg/mL solutions in acetone on: (A) gelatin, (B) HPMC and (C) PI

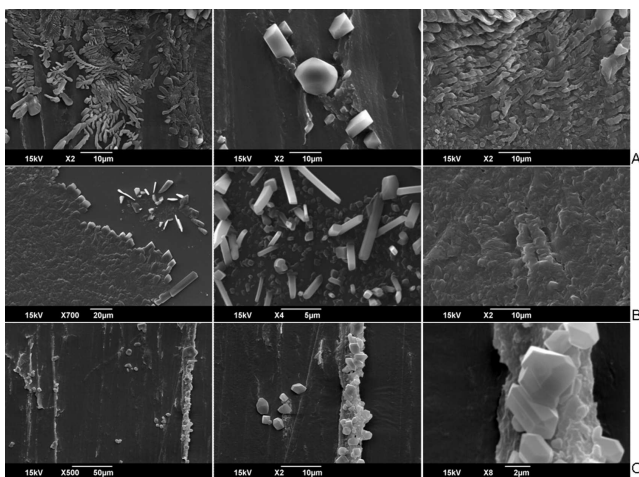


Figure 7- SEM image of progesterone crystals obtained on HPMC from: (A) 40 mg/mL, (B) 10 mg/mL and (C) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

Finally, in the matrices that were obtained mixture of polymorphs, were observed two morphologies as well. Some examples are at diluted solution in both solvents on gelatin (Figure 6A and 9C); at intermediated solution in acetone and chloroform on gelatin (Figure 4C and 9B) on HPMC (Figure 4B and 7B) and from concentrated solutions in chloroform on HPMC (Figure 7A). Progesterone crystallized on gelatin at 10 mg/mL in chloroform (Figure 9B) presented similar morphology than presented at 40 mg/mL on HPMC (Figure 7A); in this last polymer at 10 mg/mL (Figure 7B) the morphology was similar than presented on PVA at 0.5 mg/mL (Figure 1C).

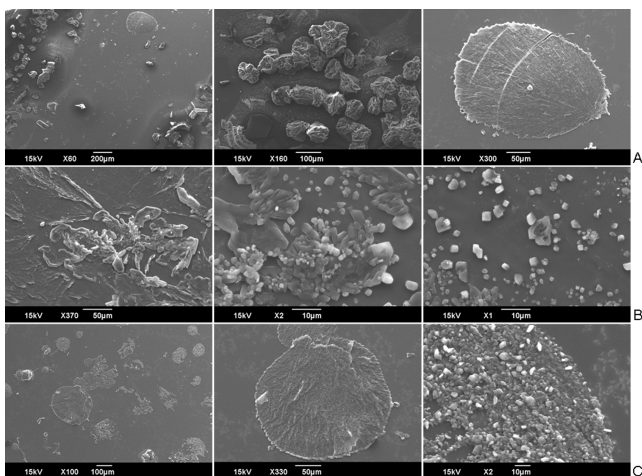


Figure 8- SEM image of progesterone crystals obtained on dextran from: (A) 40 mg/mL, (B) 10 mg/mL and (C) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

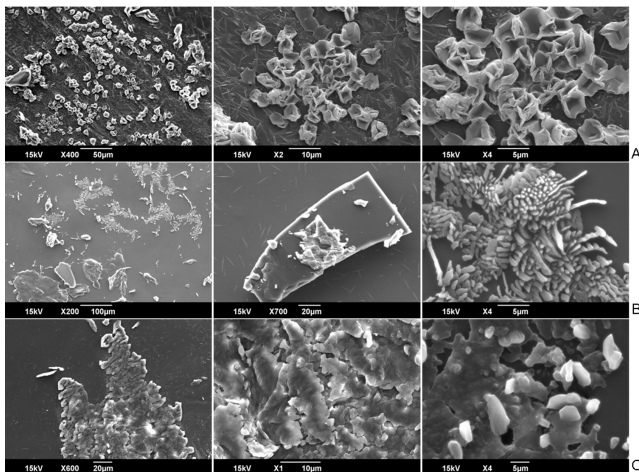


Figure 9- SEM image of progesterone crystals obtained on gelatin from: (A) 40 mg/mL, (B) 10 mg/mL and (C) 0.5 mg/mL solutions in chloroform

The sizes of the crystals obtained from chloroform solution were smaller than the obtained from acetone solutions. In Figures 5A and 3B are presented SEM pictures for crystals obtained from 40mg/mL solutions in chloroform and in acetone respectively on PI.

Progesterone polymorphs distribution by the polymeric film

Homogeneity of the polymorphs distribution on polymer matrices was observed by differential scanning calorimetry. Progesterone form 1 presents melting endotherm at 128 °C and form 2 presents melting point at 122 °C (Tripathi et al., 2010). Figure 10 illustrates the heterogeneous distribution of progesterone polymorphs on the polymer surface. Replicates of DSC experiments with the same sample were conducted and were observed different relation between forms 1 and 2. It was observed on dextran, PVA, gelatin and HPMC from 10 mg/mL solution of progesterone. In some DSC analysis conducted on HPMC was observed only form 1, thus the importance to do the solid state characterization using several and complementary techniques.

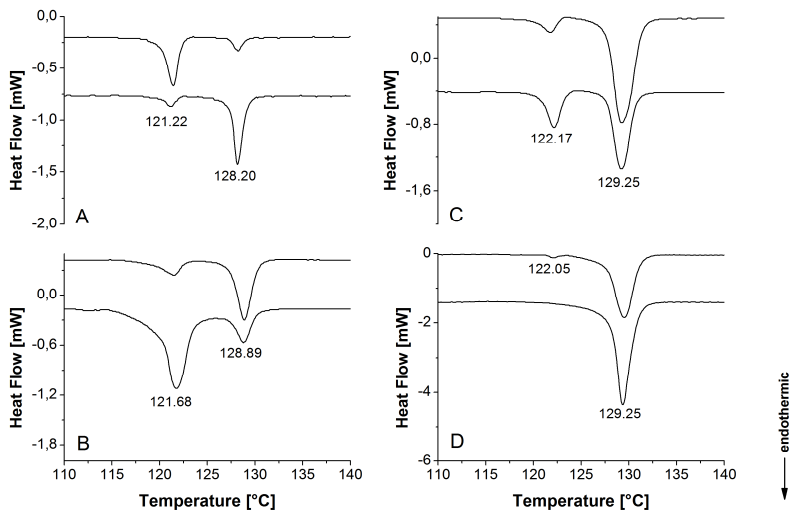


Figure 10- DSC curves of progesterone crystallized from 10mg/mL solution in chloroform on: (A) gelatin, (B) dextran, (C) PVA and (D) HPMC

Progesterone distribution by the polymeric surface

The homogeneity of progesterone crystallization on polymers showed to be independent on concentration. Figure 5 shows that on PI, the progesterone crystals completely covered the polymer at 0.5, 10 and 40 mg/mL solutions in chloroform. It was also observed on PVA (Figure 1A-B) and NBR surfaces crystallized from 10 and 40 mg/mL in chloroform; in crystallizations from the three concentrations in acetone solutions on PVA and HPMC and on dextran and gelatin from 10 mg/mL solutions in chloroform. The same behavior was also observed on NBR using the three concentrations, on HPMC from 10 mg/mL and on PI from 0,5mg/mL solutions in acetone (Figure 6C). On contrary, progesterone crystals did not completely cover the surfaces of HPMC and gelatin from crystallizations at the three concentrations in chloroform (Figures 7 and 9); on PVA from diluted solution (Figure 1C) and on dextran from intermediated solution (Figure 6B). Finally, crystals localized and distributed in some isolated areas on the polymer surface were observed, particularly on dextran from 0.5 mg/mL and 40 mg/mL solution (Figure 6A-C).

Conclusions

SEM pictures evidenced differences in morphology and in homogeneity of different progesterone polymorphs prepared by PIHn. Progesterone crystals completely covered the polymeric surfaces independently on concentrations. Depending on the polymer, the concentration and the solvent used, were obtained the two progesterone polymorphs, as pure forms and a mixture of both. The distribution of polymorphs was inhomogeneous on dextran, PVA, gelatin and HPMC from 10 mg/mL solution. The morphology was particularly heterogeneous in NBR from 0.5 mg/mL, in dextran and PVA from 40 mg/mL solutions. Although, it was expected that different polymorphs presented a characteristic and distinctive morphology, in this study was not possible identified polymorphic form by morphology. Finally, polymeric matrix did induce the crystallization of different polymorphic forms and also modify their morphology.

Acknowledgements

The authors want to thank Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) and Laboratório de Difração de Raios-X at UFSC, CNPq, CAPES, FAPESC, CLAF, Fundación Sauberman and CONICET for student fellowships and financial support. Silvia L. Cuffini thanks CAPES for Visited Professor and CONICET, Argentina fellowships. Thanks are given also to the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) of Spain for the award of a license for the use of the CSD.

References

- Araya A, Soldi V, Campos CEM, Cardoso SG, Cuffini SL. Progesterone crystals growth on polymeric matrices. Manuscript in preparation (2012)
- Araya A, Soldi V, Campos CEM, Cardoso SG, Cuffini SL. Progesterone crystals growth using Polymer-induced heteronucleation method. Manuscript in preparation (2012a)
- Banga S, Chawla G, Varandani D, Mehta B R, Bansal A K. Modification of the crystal habit of celecoxib for improved processability. *J Pharm Pharmacol* **59**, 29-39 (2007).

- Byrn S, Pfeiffer R, Stowell J, *Solid-State Chemistry of Drugs* (2nd ed.). SSCI, Inc. West Lafayette, Indiana. 77-78 (1999).
- Heredia V, Bianco I D, Tríbulo H, Tríbulo R, Seoane M Ferro, Faudone S, Cuffini S L, Demichelis N, Schalliol H, Beltramo D M. Polyisoprene matrix for progesterone release: in vitro and in vivo studies. *Int J Pharm* **382**, 98-103 (2009).
- Heredia V, Bianco I D, Tríbulo H, Cuesta G, Chesta P, Bó G A, Tríbulo R, Mega V I, Beltramo D M. Room temperature vulcanizing silicone sheaths on a reusable support for progesterone delivery in estrous synchronization treatments in cattle. *Anim Reprod Sci* **108**, 356-363 (2008).
- Kumar S, Chawla G, Bansal A K. Spherical crystallization of mebendazole to improve processability. *Pharm Dev Technol* **13**, 559-68 (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. *J Pharm Sci* **96**, 3419-3431.2007.
- Lang M, Grzesiak A L, Matzger A J. The use of polymer heteronuclei for crystalline polymorph selection. *J Am Chem Soc* **124**, 14834-5 (2002).
- Payne R S, Roberts R J, Rowe R C, Docherty R. Examples of successful crystal structure prediction: polymorphs of primidone and progesterone. *Int J Pharm.* 177, 231-45 (1999).
- Price C P, Grzesiak A L, Matzger A J. Crystalline polymorph selection and discovery with polymer heteronuclei. *J Am ChemSoc.* **127**, 5512-7 (2005).
- Rhathbone M J, Macmillan K L, Bunt, C R, Burggraaf S. Conceptual and commercially available intravaginal veterinary drug delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev.* **28**, 363-392 (1997).

Tripathi R, Biradar S V, Mishra B Paradkar A R. Study of polymorphs of progesterone by novel melt sonocrystallization technique: a technical note. *AAPS Pharm Sci Tech.* **11**, 1493-8 (2010).

Vippagunta S R, Brittain H G, Grant D J. Crystalline solids. *Adv Drug Deliver Rev.* **48**, 3-26 (2001).

Yu Z, Chew J, Chow P, Tan R. Recent Advances in Crystallization control: An Industrial Perspective. *Chem Eng Res Des.* **85**, 893-905 (2007).

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

DISCUSSÃO GERAL

A caracterização físico-química dos dois polimorfos da progesterona permitiu identificar diferenças nas suas propriedades do estado sólido, sendo de grande interesse na área farmacêutica estabilizar a forma 2, devido à maior velocidade de dissolução desta em relação à forma 1. Adicionalmente, é reportado na literatura que o polimorfo 2 é um polimorfo que desaparece (LANCASTER et al., 2007). Esse fenômeno ocorre quando aparece a forma estável e é praticamente impossível obter o polimorfo metaestável novamente (DUNITZ; BERNSTEIN, 1995). Um caso representativo de desaparecimento de polimorfo é o do ritonavir (CHEMBURKAR et al., 2000), em que o polimorfo I do fármaco, metaestável, foi inicialmente usado nas formulações. No entanto, em 1998, durante a produção, foi obtido o polimorfo II, que era estável e 6 vezes menos solúvel que o metaestável. Em decorrência disto a produção foi suspensa e os produtos foram reformulados com o polimorfo II, uma vez que não foi possível produzir novamente o polimorfo I (FAUDONE, 2009).

O caso da progesterona não parece ser um caso de desaparecimento de polimorfo, pois é possível obtê-lo da cristalização do fundido e do solvente. Lancaster et al. (2007) discutem que a obtenção inicial da forma 2 nos anos 70 foi, provavelmente, devido à presença de impurezas decorrentes da síntese. Em um estudo mais recente o mesmo autor apresenta resultados da análise de pureza de amostra do polimorfo 2, com cinquenta anos de existência (LANCASTER et al., 2011). Apenas a existência de uma amostra da forma 2, após 50 anos, sem ter se transformado na forma estável 1, evidencia a estabilidade desse polimorfo. Já a estabilidade da forma 2 sob condições de estresse mecânico demonstra a rápida transformação (uma semana) para a forma 1 quando aplicada moagem por 15 minutos devido, principalmente, à formação de núcleos ou sementes da forma 1, que induzem a cristalização da forma 1 a partir do fundido da forma 2. Por sua vez, sem moagem, a forma 2 permaneceu estável por 3 meses sob condições de estresse ambiental e por 1 mês sob exposição à luz. Já a estabilidade térmica, avaliada pela determinação da energia de ativação, através de análises por TGA, demonstrou que é necessário uma maior energia para degradar termicamente a forma 2.

A transformação da forma 2 para a forma 1, mediada por solvente, foi previamente reportada na literatura (WANG et al., 2000). Os autores demonstram através de espectroscopia Raman *in situ* a cristalização inicial da forma 2 e a posterior transformação para a forma 1. Em uma dada concentração, acima da curva de solubilidade de ambos

os polimorfos, qualquer um deles pode cristalizar. Segundo a lei de Ostwald, o mais favorecido cineticamente cristaliza primeiro (THRELFALL, 2003), de maneira que a solução fica supersaturada em relação à forma menos solúvel (estável). Assim, núcleos deste polimorfo vão se formando até deixar a solução insaturada em relação à forma metaestável (menos solúvel), fazendo com que os núcleos inicialmente formados se dissolvam, tornando a solução supersaturada em relação à forma estável; todavia, os cristais da forma estável continuam crescendo. O processo continua até o desaparecimento completo da forma metaestável (CARDEW; DAVEY, 1985).

Os resultados obtidos em ausência dos polímeros, ou seja, sem influenciar o processo de nucleação, demonstraram a dependência da concentração e independência do solvente na cristalização seletiva dos polimorfos de progesterona. A forma 1 foi obtida a partir de cristalizações na concentração de 40 mg/mL; mistura de polimorfos foram obtidas na concentração de 10 mg/mL e a forma 2 foi obtida a partir de soluções na concentração de 0,5 mg/mL em ambos os solventes utilizados o que pode ser explicado pela lei de Ostwald. No caso da progesterona a forma 2 é cineticamente mais favorecida, por tanto é a primeira em cristalizar. Em concentrações mais diluídas é favorecida a forma 2, pois não há supersaturação de nenhum dos polimorfos ou massa suficiente para o processo ocorrer. Entretanto, nas soluções intermediárias, o processo não se completa até o desaparecimento da forma metaestável, mas sim nas soluções concentradas, nas quais a forma 1 prevalece.

Já nas cristalizações sobre os polímeros o comportamento foi diferente, observando-se dependência dos solventes e dos polímeros. Em acetona o comportamento foi similar ao obtido sem polímeros, com algumas diferenças interessantes. Por exemplo, na concentração de 40 mg/mL houve apenas cristalização da forma 1, como ocorreu sem polímero. Já na concentração de 10 mg/mL, em PVA e PI, obteve-se somente a forma 1, diferente da mistura de polimorfos obtida sem polímeros, nas mesmas condições. Na concentração de 0,5 mg/mL obteve-se mistura de polimorfos em todos os polímeros; no entanto, sem polímeros cristalizou apenas a forma 2. Das cristalizações em clorofórmio, e usando como referência as cristalizações sem polímeros, houve também algumas diferenças. A forma 2, embora misturada com a forma 1, foi obtida de soluções com concentração de 40 mg/mL em PVA, HPMC e gelatina. Em PI, na concentração de 10 mg/mL, cristalizou apenas a forma 1. Finalmente, nas concentrações de 0,5 mg/mL obteve-se mistura de polimorfos apenas com gelatina. Estes

resultados evidenciam a influência do polímero nas cristalizações. A diferença apresentada entre os mesmos polímeros com os diferentes solventes pode ser explicado pelas diferenças de velocidade de evaporação entre os solventes. No caso do maior tamanho dos cristais obtidos de acetona é devido à menor velocidade de evaporação deste solvente. Entretanto uma velocidade de evaporação mais rápida leva à formação de muitos cristais pequenos, da forma mais cineticamente favorecida como foi observado das cristalizações em clorofórmio.

Os resultados obtidos não estariam em completa concordância com a lei de Ostwald, que indica que o primeiro polimorfo a se formar é o metaestável, com a subsequente transformação para a forma estável (THRELFALL, 2003). Em geral, neste trabalho, nas cristalizações realizadas à baixa concentração (0,5 mg/mL) parece que se alcança a supersaturação lenta, favorecendo a forma metaestável, e não há massa suficiente de progesterona para se cumprir a lei de Ostwald. No entanto, nas cristalizações realizadas em clorofórmio, com concentração alta (40 mg/mL), em PVA, HPMC e gelatina a lei de Ostwald não se cumpriu devido à presença do polímero. Além disso, a literatura reporta que a forma 1 apresenta hábito cristalino prismático e a forma 2 de agulha (PAYNE et al., 1999). No entanto, essas morfologias não foram claramente identificadas nas amostras obtidas. Os polimorfos cristalizados sobre matrizes poliméricas não apresentaram morfologias distintas para cada um deles.

Finalmente, a estabilidade da forma 2 nos polímeros foi dependente do polímero e da concentração da qual foi obtido. Este comportamento pode ser causado pela presença de núcleos ou sementes da forma 1, que desestabilizam a forma 2, como observado após a moagem. As sementes produzidas nas amostras utilizadas para avaliar a estabilidade podem não ter sido detectadas pelas técnicas empregadas. O HPMC apresentou-se como polímero promissor para dispositivos contendo a forma 2, uma vez que estabilizou a forma metaestável por 3 meses em condições de estabilidade acelerada.

CONCLUSÕES

- Demonstrou-se experimentalmente que a forma metaestável é a mais solúvel que a forma 1.
- A forma 2 apresentou-se instável ao estresse mecânico produzido pela moagem. Entretanto, apresentou estabilidade por mais de três meses sob condições de estresse ambientais sempre que não houver estresse mecânico.
- Os polimorfos 1 e 2, apresentam estabilidade química semelhante no entanto o polimorfo 2 mostrou-se mais resistente à degradação térmica que a forma 1.
- Não é recomendado o uso da forma 2 em formulações que envolvam moagem. Mas poderia ser usado em outras formas nas quais o estresse mecânico seja minimizado.
- A cristalização sobre matrizes poliméricas permitiu obter a forma 2 pura e misturada com a forma 1.
- A forma 2 mostrou-se estável nos polímeros sob condições de estresse (40°C, 75%UR) durante os 3 meses de avaliação. A estabilidade foi dependente da matriz e da concentração utilizada, destacando o resultado mais promissor utilizando o HPMC.
- Os resultados mostraram que existem condições para estabilizar a forma 2. Esta forma apresenta maior velocidade de dissolução que a forma 1 e sua utilização nas formulações permitiria diminuir a dose, atingindo-se a mesma biodisponibilidade da forma atualmente utilizada (forma 1), o que representaria uma grande vantagem para aplicações farmacêuticas.

PERSPECTIVAS

Para um maior entendimento das interações polímero-fármaco envolvidas na cristalização seletiva dos polimorfos da progesterona, estudos com uma técnica sensível à interfaces se fazem necessários. Medições com a progesterona cristalizada sobre PVA, na concentração 0,5 mg/mL em clorofórmio, estão sendo realizadas no Instituto de Física de São Carlos com a Espectroscopia Vibracional por Geração de Soma de Frequências. Esta técnica já foi utilizada para estudar a cristalização seletiva dos polimorfos do paracetamol sobre matrizes poliméricas (MCCLELLAND et al., 2011).

Além disso, com os resultados obtidos torna-se interessante levar este estudo básico da cristalização da progesterona sobre matrizes poliméricas à aplicação prática. Assim, como futuros desenvolvimentos, sugerem-se:

- 1) Desenvolver formas farmacêuticas que contenham os polímeros que induzem e estabilizam o polimorfo 2, e que não requeiram operações que estressem a rede cristalina;
- 2) Realizar estudos de liberação *in vitro* e de permeabilidade *in vivo* e *in vitro*, assim como estudos de estabilidade das formas farmacêuticas desenvolvidas;
- 3) Aprofundar os estudos cinéticos de transformação no estado sólido da forma 2 para a forma 1, aplicando modelos como as equações de Hancock-Sharp ou Avrami-Erofe'ev (YOSHIOKA; STELLA, 2002), para determinar o mecanismo pelo qual essa transformação ocorre;
- 4) Estimar os valores de tempo de vida meia utilizando a norma ASTM E1887, a partir dos resultados de degradação térmica obtidos pela técnica de TGA, assim como realizar estudos que permitam comparar estes resultados com os obtidos em estudos estresse convencionais.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, J.; ALLESØ, M.; MIRZA, S. et al. Solid form screening: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 1, p. 23-37, 2009.
- ALVAREZ, A. J.; SINGH, A.; MYERSON, A. S. Polymorph Screening: Comparing a Semi-Automated Approach with a High Throughput Method. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n. 9, p. 4181-4188, 2009.
- AQUINO, F. M.; MELO, D. M. A.; SANTIAGO, R. C. et al. Thermal decomposition kinetics of PrMO₃ (M = Ni or Co) ceramic materials via thermogravimetry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 2, p. 701-705, 2010.
- ATTWOOD, D. **Physical Pharmacy**. 1. ed. London: RPS Publishing, 2008. 182 p. ISBN 978-0-85369-725-1.
- AUCHUS, R. J.; SAMPATH KUMAR, A; ANDREW BOSWELL, C. et al. The enantiomer of progesterone (ent-progesterone) is a competitive inhibitor of human cytochromes P450c17 and P450c21. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 409, n. 1, p. 134-44, 2003.
- AULTON, M. E. (ED.). **Pharmaceutics. The science of dosage form design**. 2. ed., p.679. Leicester, UK: Churchill Livingstone, 2002.
- BANGA, S.; CHAWLA, G.; VARANDANI, D.; MEHTA, B. R.; BANSAL, A. K. Modification of the crystal habit of celecoxib for improved processability. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 29-39, 2007.
- BARRIO, M.; ESPEAU, P.; TAMARIT, J. L.; PERRIN, M.-ANTOINE; VEGLIO, N. Polymorphism of Progesterone : Relative Stabilities of the Orthorhombic Phases I and II Inferred from Topological and Experimental Pressure-Temperature Phase Diagrams. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 98, n. 5, p. 1657-1670, 2009.

BRAGA, D.; GREPIONI, F.; MAINI, L. The growing world of crystal forms. **Chemical Communications**, v. 46, n. 34, p. 6232-42, 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**, volume 2/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. 1v/il.

BRITTAİN, H. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids** (Harris G. Brittain, Ed.). 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999.

BRITTAİN, HARRY G. Polymorphism and solvatomorphism 2010. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 464-84, 2012.

BROWN, M. E. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. 2. ed. p.264. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004.

BRÄUNIGER, T.; WORMALD, P.; HODGKINSON, P. Improved Proton Decoupling in NMR Spectroscopy of Crystalline Solids Using the S PINAL -64 Sequence. **Monatshefte für Chemie**, v. 133, n. 12, p. 1549-1554, 2002.

BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 43-65, 2001.

BYRN, S.; PFEIFFER, R.; STOWELL, J. **Solid-State chemistry of drugs**. 2. ed., p.574. Indiana: SSCI, Inc., 1999.

CAMERONI, R.; GAMBERINI, G.; BERNABEI, M. T.; FACCHINI, M. Polymorphism of progesterone. I. Preparation and characterization of polymorphic forms. **Il Farmaco Edizione Pratica**, v. 28, n. 12, p. 621-635, 1973.

CAMPAGNOLI, C.; CLAVEL-CHAPELON, F.; KAAKS, R.; PERIS, C.; BERRINO, F. Progestins and progesterone in hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 96, n. 2, p. 95-108, 2005.

CAMPSTEYN, H.; DUPONT, L.; DIDEBERG, O. Structure cristalline et moléculaire de la progestérone, C₂₁H₃₀O₂. **Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 3032-3042, 1972.

CARDEW, P. T.; DAVEY, R. J. The Kinetics of Solvent-Mediated Phase Transformations. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 398, n. 1815, p. 415-428, 1985.

CHEMBURKAR, S. R.; BAUER, J.; DEMING, K. et al. Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development Abstract: **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 5, p. 413-417, 2000.

CRAIG, D. Q. M. Characterization of Polymorphic Systems Using Thermal Analysis. In: R. Hilfiker (Ed.); **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. 1. ed. Darmstadt: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2006, p.43-79.

CUFFINI, S.; PITALUGA JR., A.; TOMBARI, D. Polimorfismo em Fármacos. **Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica**. 1. ed., p.21-31. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2009.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-Ray Diffraction** (M. Cohen, Ed.). p.664. Prentice Hall, 2001.

DEFOSSEMONT, G.; RANDZIO, S. L.; LEGENDRE, B. Contributions of Calorimetry for C_p Determination and of Scanning Transitiometry for the Study of Polymorphism. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n. 6, p. 1169-1174, 2004.

DEMERLIS, C. C.; SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 319-26, 2003.

DEN BOSSCHE, G. VAN. Goniometric and optical study of some C₂₁.1.Corticosteroids crystallizing in the orthorhombic system. **Bulletin De La Societe Royale Des Sciences De Liege**, v. 40, p. 142, 1971.

DETOISIEN, T.; ARNOUX, M.; TAULELLE, P. et al. Thermal analysis: a further step in characterizing solid forms obtained by screening crystallization of an API. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 29-36, 2011.

DINNEBIER, R. E.; BILLINGE, S. J. L. (EDS.). **Powder Diffraction: Theory and Practice**. 1. ed., v. 24, p.582. RCS Publishing, 2008.

DUNITZ, J. D.; BERNSTEIN, J. Disappearing Polymorphs. **Accounts of Chemical Research**, 1995. v. 28, n. 4, p. 193-200.

DYBOWSKI, C.; BAI, S. Solid-state NMR spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 4295-300, 2008.

EERDENBRUGH, B. VAN; TAYLOR, L. S. Application of mid-IR spectroscopy for the characterization of pharmaceutical systems. **International Journal of Pharmaceutics**, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.011, 2010.

EMAMI, J. In vitro - In vivo correlation : From theory to applications. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutics Science**, v. 9, n. 2, p. 31-51, 2006.

FAUDONE, S. N. **Estudio del estado sólido de fármacos escasamente solubles en agua y su impacto sobre la equivalencia in vitro**. 2009. 288 p. Dissertação (Mestría en Ciencias Químicas)-Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

FDA. **Scientific Considerations of Polymorphism in Pharmaceutical Solids: Abbreviated New Drug Applications**. Disponível em: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3900B1_04_Polymorphism.htm. Acesso em: 26 abril, 2012.

FDA- Food and Drug Administration. **Pharmaceutical Solid Polymorphism: Guidance for Industry ANDAs**, 2007.

FOROUGH, L. M.; KANG, Y.-N.; MATZGER, A. J. Polymer-Induced Heteronucleation for protein single crystal growth: structural elucidation

of bovine liver catalase and concanavalin A forms. **Crystal Growth & Design**, v. 11, n. 4, p. 1294-1298, 2011.

FUJIWARA, M.; NAGY, Z. K.; CHEW, J. W.; BRAATZ, R. D. First-principles and direct design approaches for the control of pharmaceutical crystallization. **Journal of Process Control**, v. 15, n. 5, p. 493-504, 2005.

GALWEY, A. K.; CRAIG, D. Q. M. Thermogravimetric analysis: Basic principles. **Thermal analysis of pharmaceutical compounds**. 1. ed. Taylor and Francis, 2007, p.139-192.

GEOFF, G. Z.; ZHOU, Z.; ZHOU, D. Crystalline and Amorphous Solids. In: **Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice**. 1 ed., United States of America: Elsevier Inc., 2009. p.25-60.

GIRON, D. Solid-state of pharmaceutical compounds. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 77, n. 2, p. 709-747, 2004.

GOVINDARAJAN, R.; SURYANARAYANAN, R. Processing-induced Phase transformations and their implications on pharmaceutical product quality. In: R. Hilfiker (Ed.); **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. 1. ed., Darmstadt: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2006. p. 333-364.

GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. New Form Discovery for the analgesics flurbiprofen and sulindac facilitated by Polymer-induced heteronucleation. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 96, n. 11, p. 2978-2986, 2007.

GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. Selection of protein crystal forms facilitated by Polymer-induced heteronucleation. **Crystal growth & design**, v. 8, n. 1, p. 347-350, 2008.

HAMMOND, C. **The basics of crystallography and diffraction**. 3a ed., New York: Oxford University Press, 2009. p.432.

HANER, B. A.; NORTON, D. A. Crystal Data (I) for Some Pregnenes +Pregnadienes. **Acta Crystallographica**, v. 17, n. 12, p. 1610, 1964.

HARRIS, R. **Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**. London: Longman Scientific and Technical, 1994.

HEREDIA, V.; BIANCO, I. D.; TRÍBULO, H. et al. Room temperature vulcanizing silicone sheaths on a reusable support for progesterone delivery in estrous synchronization treatments in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 356-363, 2008.

HEREDIA, V.; BIANCO, I D; TRÍBULO, H. et al. Polyisoprene matrix for progesterone release: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 98-103, 2009.

HILFIKER, R.; BLATTER, F.; RAUMER, M. VON. Relevance of solid-state properties for pharmaceutical products. In: **Polimorphism in the pharmaceutical industry**, 2006.

HILFIKER, R.; PAUL, S. M. D.; SZELAGIEWICZ, M. Approaches to polymorphism screening, In: **Polymorphism in the pharmaceutical industry**. p. 287-308, 2006.

HIRVONEN, E. Progestins. **Maturitas**, v. 23 Suppl, n. 96, p. S13-8, 1996.

HOLLAS, J. M. **Modern spectroscopy**. 4. ed. Jonh Wiley & Sons, 2004. p. 452.

HUANG, L-F.; TONG, W.-Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 321-34, 2004.

ICHIRO, S. **Crystals Growth, Morphology, and Perfection**. 1. ed. New York: Cambridge University Press, 2005. 295 p., ISBN 13-978-0-511-11345-1

IEFUJI, N.; MURAI, R.; MARUYAMA, M. et al. Laser-induced nucleation in protein crystallization: Local increase in protein

concentration induced by femtosecond laser irradiation. **Journal of Crystal Growth**, v. 318, n. 1, p. 741-744, 2011.

ICH-International Conference on Harmonisation. **Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Harmonised Tripartite Guideline Q6A**, 2000.

JIANZHUO, W.; FLANAGAN, D. R. Fundamentals of dissolution. **Developing solid oral dosage forms: Pharmaceutical theory and practice**. 1. ed., p.309-318, 2009.

KITNER, S. L.; KRUEP, D.A. Progesterone Assay: An Alternate Approach. In: AAPS Annual meeting and exposition. T2015., 2005, Nashville. **Anais...**, Nashville.

KUHNERT-BRÄNDSTTER, M.; KOFLER, A. Zur mikroskopischen Identitätsprüfung und zur Polymorphie der Sexualhormone. **Mikrochimica Acta**, v. 47, n. 6, p. 847-853, 1959.

KUMAR, S.; CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Spherical crystallization of mebendazole to improve processability. **Pharmaceutical development and technology**, v. 13, n. 6, p. 559-68, 2008.

LANCASTER, ROBERT W; KARAMERTZANIS, PANAGIOTIS G; HULME, ASHLEY T; et al. Racemic progesterone: predicted in silico and produced in the solid state. **Chemical Communications**, n. 47, p. 4921-3, 2006.

LANCASTER, R.W.; KARAMERTZANIS, P.G.; HULME, A.T. et al. The Polymorphism of Progesterone: Stabilization of a “Disappearing” Polymorph by Co-Crystallization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, p. 3419–3431, 2007.

LANCASTER, ROBERT W.; HARRIS, L. D.; PEARSON, D. Fifty-year old samples of progesterone demonstrate the complex role of synthetic impurities in stabilizing a metastable polymorph. **Crystal Engineering Communication**, v. 13, n. 6, p. 1775, 2011.

LANG, M.; GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. The use of polymer heteronuclei for crystalline polymorph selection. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 50, p. 14834-5, 2002.

LANG, M.; GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. The use of polymer heteronuclei for crystalline polymorph selection. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 50, p. 14834-5, 2002.

LANG, M.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Form IV of carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p. 1186-90, 2002.

LEDNICER, D.; MISTCHER, L. A. Chapter 10. Steroids. In: **The organic chemistry of drug synthesis** John Wiley&Sons, 1977. p. 155-207, ISBN 0-471-52141-8.

LEGENDRE, B.; FEUTELAIS, Y.; DEFOSSEMONT, G. Importance of heat capacity determination in homogeneous nucleation: application to progesterone. **Thermochemica Acta**, v. 400, n. 1-2, p. 213-219, 2003.

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. 1-2, p. 86-91, 2006.

LLINÀS, A.; GOODMAN, J. M. Polymorph control: past, present and future. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 5-6, p. 198-210, 2008.

LOPES, D. F. **Utilização da espectroscopia Raman dispersiva na verificação da citotoxicidade do *Viscum album* em células caco-2 in vitro**. 2008. 66 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São Jose dos Campos.

LORINCZ, A.; HADDAD, D.; NAIK, R. et al. Raman spectroscopy for neoplastic tissue differentiation: a pilot study. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 39, n. 6, p. 953-956, 2004.

LÓPEZ-MEJÍAS, V.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Polymer-induced heteronucleation of tolfenamic acid: structural investigation of a pentamorph. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4554-5, 2009a.

LÓPEZ-MEJÍAS, V.; KAMPF, J. W.; MATZGER, A. J. Polymer-induced heteronucleation of tolfenamic acid: structural investigation of a pentamorph. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 13, p. 4554-5, 2009b.

MCCLELLAND, A. A.; LÓPEZ-MEJÍAS, V.; MATZGER, A. J.; CHEN, Z. Peering at a Buried Polymer-Crystal Interface: Probing Heterogeneous Nucleation by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. **Langmuir**, n. 27, p. 2162-2165, 2011.

MEMİŞOĞLU, E.; BOCHOT, A.; SEN, M.; DUCHÊNE, D.; HINCAL, A. A. Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic beta-cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 251, n. 1-2, p. 143-53, 2003.

MITCHELL, C. A.; YU, LIAN; WARD, M. D. Selective nucleation and discovery of organic polymorphs through epitaxy with single crystal substrates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 44, p. 10830-9, 2001.

MORCOMBE, C. R.; ZILM, K. W. Chemical shift referencing in MAS solid state NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 162, n. 2, p. 479-486, 2003.

MORISSETTE, S. L.; ALMARSSON, O.; PETERSON, M. L. et al. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 275-300, 2004.

MULLIN, J. W. **Crystallization**. 4. ed. Butterworth-Heinemann, 2001. p.1-27. ISBN 0-7506-4833-3.

MURALEEDHARAN, K.; KANNAN, M. P.; GANGA DEVI, T. Thermal decomposition kinetics of potassium iodate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 103, n. 3, p. 943-955, 2010.

NARANG, A. S.; RAO, V. M.; RAGHAVAN, K. S. Excipient Compatibility, In: **Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory and Practice**. 1. ed. New York: Elsevier Inc., 2009. p. 125-145. ISBN: 978-0-444-53242-8.

PAUL, E.; TUNG, H.; MIDLER, M. Organic crystallization processes. **Powder Technology**, v. 150, n. 2, p. 133-143, 2005.

PAVIA, D. L. **Introduction to spectroscopy**. 3. ed., 2001. ISBN 0-03-031961-7.

PAYNE, R. S.; ROBERTS, R. J.; ROWE, R. C.; DOCHERTY, R. Examples of successful crystal structure prediction: polymorphs of primidone and progesterone. **International journal of pharmaceutics**, v. 177, n. 2, p. 231-45, 1999.

PECHARSKY, V. K.; ZAVALIJ, P. Y. **Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials**. 2. ed. Boston: Springer US, 2009., v. 777, p.713.

PILLAI, O. Polymers in drug delivery. **Current opinion in chemical biology**, p. 447-451, 2001.

PRICE, C. P.; GRZESIAK, A. L.; MATZGER, A. J. Crystalline polymorph selection and discovery with polymer heteronuclei. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 15, p. 5512-7, 2005.

PRICE, S. L. The computational prediction of pharmaceutical crystal structures and polymorphism. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 301-19, 2004.

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. 332-44, 2010.

READING, M.; CRAIG, D. Q. M. Principles of Differential Scanning Calorimetry. **Thermal analysis of pharmaceutical compounds**. 1. ed., p.1-22. Taylor and Francis, 2007. ISBN 0-8247-5814-5

RHATHBONE, M. J.; MACMILLAN, K. L.; BUNT, C. R.; BURGGRAAF, S. Conceptual and commercially available intravaginal veterinary drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 3, p. 363-392, 1997.

RICHARDSON, J. L.; ILLUM, L. D. Routes of Delivery : Case Studies The vaginal route of peptide and protein drug delivery. **Drug Delivery**, v. 8, 1992.

RODANTE, F. Multi-step decomposition processes for some antibiotics A kinetic study. **Thermochimica Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 7-18, 2002.

RODRIGUEZ, M. I.; WARDEN, M.; DARNEY, P. D. Intrauterine progestins, progesterone antagonists, and receptor modulators: a review of gynecologic applications. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 202, n. 5, p. 420-8, 2010.

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. 241-74, 2004.

ROWE, RAYMOND C; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6. ed.,RPS Publishing, 2009. p.888. ISBN 978 1 58212 135 2

SCHUMACHER, M.; GUENNOUN, R.; STEIN, D. G.; NICOLA, A. F. DE. Progesterone: therapeutic opportunities for neuroprotection and myelin repair. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 116, n. 1, p. 77-106, 2007.

SCINTAG INC. Chapter 7: Basics of X-ray Diffraction. Disponível em: <<http://epswww.unm.edu/xrd/xrdbasics.pdf>>. Acesso em: 15

SERAJUDDIN, A. T.; THAKUR, A. B.; GHOSHAL, R. N. et al. Selection of solid dosage form composition through drug-excipient compatibility testing. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 88, n. 7, p. 696-704, 1999.

SKOOG, D.; HOLLER, F. J.; NEIMAN, T. A. **Principios de análisis instrumental**. 5 ed. Madrid: McGraw Hill, 2000. 1028 p. ISBN 84-481-2775-7

SOBCZAK, A.; JELIŃSKA, A.; LEŚNIEWSKA, M.; FIRLEJ, A.; OSZCZAPOWICZ, I. Stability of epidoxorubicin in solid state. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 4, p. 869-72, 2011.

STIEGER, N.; AUCAMP, M.; ZHANG, S.-W.; VILLIERS, M. M. DE. Hot-stage optical microscopy as an analytical tool to understand solid-state changes in pharmaceutical materials. **American Pharmaceutical Review**. Disponível em: <<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/39283-Hot-stage-Optical-Microscopy-as-an-Analytical-Tool-to-Understand-Solid-state-Changes-in-Pharmaceutical-Materials/>> Acesso em: 22 abril. 2012.

TAGHIZADEH, S. M.; MASHAK, A.; JAMSHIDI, A.; IMANI, M. Study of progesterone release mechanisms from a silicone matrix by a new analytical method. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n. 5, p. 3040-3044, 2004.

THRELFALL, T. Structural and Thermodynamic Explanations of Ostwald's Rule. **Organic Process Research & Development**, v. 7, n. 6, p. 1017-1027, 2003.

TRIPATHI, R.; BIRADAR, S. V.; MISHRA, B.; PARADKAR, A. R. Study of polymorphs of progesterone by novel melt sonocrystallization technique: a technical note. **AAPS Pharmaceutical Science & Technology**, v. 11, n. 3, p. 1493-8, 2010.

UNFER, V.; CASINI, M. L.; MARELLI, G. et al. Different routes of progesterone administration and polycystic ovary syndrome: a review of the literature. **Gynecological endocrinology**, v. 21, n. 2, p. 119-27, 2005.

USP. **United State Pharmacopeia**. The (USP) 30th ed. Rockville United State Convention, 2007.

USP. General Tests: 2.58 X-Ray Powder Diffraction Method. **The United State Pharmacopeia**. p. 64-65, 2012a.

USP. <1087> Apparent intrinsic dissolution-dissolution testing procedures for rotating disk and stationary disk. **The United State Pharmacopeia**. p.609-612, 2012b.

VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 279-89, 2004.

VALENTA, C.; KAST, C. E.; HARICH, I.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. **Journal of Controlled Release**, v. 77, n. 3, p. 323-32, 2001.

VAUGELADE, C.; ROHMER, A C.; BUREL, F. et al. Progesterone freeze-dried systems in sublingual dosage form. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 229, n. 1-2, p. 67-73, 2001.

VENKATRAMAN, S.; BOEY, F. Release profiles in drug-eluting stents: issues and uncertainties. **Journal of Controlled Release**, v. 120, n. 3, p. 149-60, 2007.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITAIN, H G; GRANT, D. J. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3-26, 2001.

VITEZ, I. M.; NEWMAN, A. W.; DAVIDOVICH, M.; KIESNOWSKI, C. The evolution of hot-stage microscopy to aid solid-state characterizations of pharmaceutical solids. **Thermochimica Acta**, n. 324, p. 187-196, 1998.

VYAZOVKIN, S.; BURNHAM, A. K.; CRIADO, J. M. et al. ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data. **Thermochemica Acta**, v. 520, n. 1-2, p. 1-19, 2011.

WANG, F.; WACHTER, J. A.; ANTOSZ, F. J.; BERGLUND, K. A. An investigation of solvent-mediated polymorphic transformation of progesterone using in situ Raman spectroscopy. **Organic Process Research & Development**, v. 4, n. 5, p. 391-395, 2000.

WEBER, H. P.; GALANTAY, E. The molecular and crystal structure of psi-retroprogesterone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 57, n. 1, p. 187-92, 1974.

WU, W.; WU, X.; LAI, S.; LIAO, S. Non-isothermal kinetics of thermal decomposition of $\text{NH}_4\text{ZrH}(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 2, p. 685-691, 2010.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of drugs and dosage forms**. 1. ed. Kluwer Academic Publishers, 2002. p. 268. ISBN 0-306-46829-8

YU, L. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 270, n. 1-2, p. 221-227, 2004.

YU, L. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 3, p. 118-127, 1998.

YU, Z.; CHEW, J.; CHOW, P.; TAN, R. Recent Advances in Crystallization control An Industrial Perspective. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 85, n. 7, p. 893-905, 2007.

YUAN, G.; LI, X.; DONG, Z. et al. Graphite blocks with preferred orientation and high thermal conductivity. **Carbon**, v. 50, n. 1, p. 175-182, 2012.

ZHANG, G. G. Z.; 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. 371-90, 2004.

ZOPPETTI, G.; PUPPINI, N.; OSPITALI, F.; FINI, A. Solid state characterization of progesterone in a freeze dried 1 : 2 progesterone / HPBCD mixture. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 96, n. 7, p. 1729-1736, 2007.

