



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO:**

**HIDRATOS DE LEVOFLOXACINO**

Aluno: Rafael Nicolay Pereira

Orientador: Dr. Marcos Antonio Segatto Silva

Programa de Pós-Graduação em Farmácia - PPGFAR

**Florianópolis, 2014**



# **CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO:**

## **Hidratos de Levofloxacino**

**Por**

**Rafael Nicolay Pereira**

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

Orientador: Dr. Marcos Antonio Segatto Silva

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Rafael Nicolay  
CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO : HIDRATOS DE  
LEVOFLOXACINO / Rafael Nicolay Pereira ; orientadora,  
Marcos Antonio Segatto Silva - Florianópolis, SC, 2014.  
148 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Caracterização no estado sólido. 3.  
Levofloxacino. 4. Hidrato. 5. Determinação estrutural. I.  
Antonio Segatto Silva, Marcos. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.  
Titulo.

**“Caracterização no estado sólido: hidratos de  
levofloxacinó”**

**POR**

**Rafael Nicolay Pereira**

Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pelo(a) Orientador(a) e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutóres:

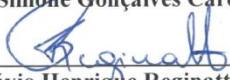
**Banca Examinadora:**

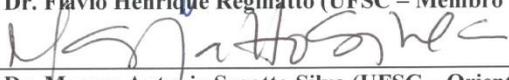
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Aurélio da Silva Carvalho Filho (POSITIVO –  
Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Vitor Farago (UEPG – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Manique Barreto (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto Silva (UFSC – Orientador)

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa**  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 10 de abril de 2014.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marcos pela amizade e pela oportunidade e confiança depositada. Agradeço muito todos os ensinamentos profissionais e pessoais e por acreditar em mim. Obrigado pela orientação e apoio. À Professora Dra. Silvia Lucia Cuffini, pessoa pela qual tenho grande apreço, amizade. MUITÍSSIMO obrigado por tudo, apoio, amizade e pelos ensinamentos.

Aos meus pais, Alceu e Liria, pelo amor, carinho, incentivo, compreensão, dedicação, confiança e apoio durante todo o processo de minha formação. Ao irmão Maurício que tanto amo. Você é, além de meu irmão, meu grande amigo, pessoa na qual me espelho. Te amo demais. As minhas cunhadas, Cladia e Juciana, irmãs que ganhei de presente e que amo demais. Obrigado por tudo, vocês são pessoas sensacionais e sempre estarão em meu coração. À minha esposa Luisa Helena Cazarolli, minha amiga, companheira, confidente, incentivadora. Luisa, você sabe o quanto você tem participação nesta tese, pois não fosse seu incentivo isso não seria possível. TE AMO.

A todos os amigos do LCQ, Química Farmacêutica, Farmacotécnica e Farmacognosia. Aos grandes amigos que sempre estiveram ao meu lado. As grandes amigas, que participaram ativamente no desenvolvimento desta tese e que foram cruciais para o seu fechamento (Cassiana e Cinira). Aos parceiros e colaboradores, Prof. Dr. Carlos Eduardo Maduro de Campos e ao Prof. Dr. Pedro Manique Barreto (CAL). À UFSC, PGFAR e CAPES. Aos professores e mestres que fizeram parte de minha formação.



Após a descoberta dos primeiros casos de polimorfismo, com drásticas diferenças na atividade biológica entre duas formas do mesmo fármaco ... nenhum fabricante farmacêutico pode mais negligenciar este problema. "Laszlo Borca"



## Resumo

A proposta deste trabalho foi avaliar os efeitos dos processos de recristalização, moagem e desidratação na estrutura cristalina do Levofloxacino Hemidrato e determinação estrutural das formas hemidrato e anidro. As técnicas utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram Termogravimetria, Calorimetria, Raman, Infravermelho, Microscopia Eletrônica de Varredura, Ressonância Magnética Nuclear, Difração de raios X, HotStage, Karl Fischer e Dissolução Intrínseca. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que a recristalização apresenta efeito semelhante ao processo de moagem, ou seja, estes processos causam defeitos na estrutura cristalina, acarretando em alterações importantes, principalmente na dissolução. O processo de moagem dificulta a saída e entrada da molécula de água no fármaco. Isso se deve ao fato de a molécula de água estar situada em canais na estrutura do fármaco, resultado observado em comparação com a literatura e com dados da determinação estrutural. A partir da elucidação da estrutura cristalina, tanto para a forma hemidrato quanto da forma anidra, foi possível observar e melhor compreender como ocorre a ligação da molécula de água na estrutura do cristal. Em relação à forma hemidrato do levofloxacino, a ligação da molécula de água ocorre na posição 4' do grupamento piperazinil do fármaco, fato este comprovado tanto por infravermelho, quanto pelo refinamento estrutural. Todos os resultados obtidos são importantes para a compreensão dos possíveis impactos que o processamento durante a formulação pode acarretar na qualidade final do produto farmacêutico.

Palavras-chave: Levofloxacino; Hemidrato, Anidrato, Estado Sólido.



## Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of recrystallization, grinding and dehydration cause in the crystalline structure of the hemihydrate levofloxacin, besides the determination of the crystal structure of the hemihydrate and anhydrate forms. The techniques used for the development of this work were TGA, DSC, Raman, FTIR, SEM, ssNMR, XRPD, HotStage, KF and IDR. From the results obtained, it was concluded that the recrystallization are similar to the grinding process. These processes cause defects in the crystal structure, resulting in significant changes in the dissolution profile and consequently the absorption of the drug. The milling process difficult entry and exit of the water molecule in the sample. This is because of the water molecule is situated in channels. This result was observed in comparison with the literature and with data obtained in this work, on the structural determination. From the crystal structure determination, in the hemihydrate form as the anhydrous form, it was possible to observe and understand the connection of the water molecule in the crystal lattice occurs. Regarding form of levofloxacin hemihydrate, the connection of the water molecule occurs in the 5' position of the piperazinyl group. This fact was confirm by both infrared and by structural refinement. All results are important for understanding the potential impacts that processing during formulation may result in the final quality of the pharmaceutical product.

**Key-words:** Levofloxacin, Hemihydrate, Anhydrate, Solid State.



## Lista de Figuras

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE FORMAS DO ESTADO SÓLIDO.....	28
FIGURA 2 - CÉLULA UNITÁRIA COM SUAS DIMENSÕES (A) E ORGANIZAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA REDE CRISTALINA (B). .....	29
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LEVOFLOXACINO (S-) COM A ESTRUTURA NUMERADA (* DENOTA O CENTRO QUIRAL). .....	54
FIGURA 4 - A) CURVA TG DO LVF RM E LVF R; B) CURVA DSC DO LVF RM E LVF R. ....	72
FIGURA 5 - DRXP PARA AS AMOSTRAS LVF RM E R.....	74
FIGURA 6 - FTIR PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF R. ....	76
FIGURA 7 - RAMAN PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF R. ....	77
FIGURA 8 - SSNMR PARA AS AMOSTRAS LVF RM LVF R. ....	79
FIGURA 9 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF R. ....	80
FIGURA 10 - A) EFEITO DA MOAGEM NAS CURVAS TG; B) EFEITO DA MOAGEM NAS CURVAS DSC.....	84
FIGURA 11 - DSC E TG DA MATÉRIA-PRIMA (LVF RM). ....	87
FIGURA 12 - DSC DAS AMOSTRAS LVF HEMIDRATO E ANIDRATO. ....	89
FIGURA 13 - DRXP DO LVF RM COM A) AQUECIMENTO E B) RESFRIAMENTO; REPRESENTANDO AS FORMAS HEMIDRATO E ANIDRA.....	91
FIGURA 14 - DRXP DO LVF HEMODRATO E ANIDRO. ....	94
FIGURA 15 - DRXP DO LVF HEMODRATO E ANIDRO. ....	95
FIGURA 16 - (A E B) ESTRUTURA CRISTALINA DO LEVOFLOXACINO HEMIDRATO E ANIDRO, OBTIDO POR DADOS DE LUZ SINCRONTRON. ....	100
FIGURA 17 - ESTRUTURA CRISTALINA OBTIDA ATRAVÉS DOS RESULTADOS DE LUZ SINCRONTRON PARA A FORMA DESIDRATADA (LVF ANIDRO) DO FÁRMACO LEVOFLOXACINO.....	102
FIGURA 18 - ESTRUTURA CRISTALINA OBTIDA ATRAVÉS DOS RESULTADOS DE LUZ SINCRONTRON PARA A FORMA HIDRATADA (LVF HEMIDRATO) DO FÁRMACO LEVOFLOXACINO.....	104
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE LEVOFLOXACINO SEM LIGAÇÃO DE ÁGUA NA ESTRUTURA CRISTALINA.....	106
FIGURA 20 - REPRESENTAÇÃO DA MOLÉCULA DE LEVOFLOXACINO SEM LIGAÇÃO DE ÁGUA NA ESTRUTURA CRISTALINA.....	107
FIGURA 21 - CURVA TG PARA O LVF RM E LVF g40. AMBAS AS AMOSTRAS FORAM SUBMETIDAS AO CICLO DE AQUECIMENTO. ....	110
FIGURA 22 - TG COM CICLO DE AQUECIMENTO PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF g40 APRESENTANDO VARIAÇÕES DE MASSA NAS TEMPERATURAS DE 80 oC NO AQUECIMENTO E 40 oC NO RESFRIAMENTO. ....	112

FIGURA 23 - CURVAS DSC COM CICLO DE AQUECIMENTO PARA O LVF RM E LVF G40.	114
FIGURA 24 - DSC DO LEVOFLOXACINO HEMIDRATO (LVF RM) E DO TRITURADO EM DIFERENTES TEMPOS DE MOAGEM (LVF G5 – 5 MIN.; LVF G10 – 10 MIN.; LVF G20 – 20 MIN.; LVF G40 – 40 MIN.).	116
FIGURA 25 - PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DO LVF RM REALIZADAS COM CICLO DE AQUECIMENTO.	119
FIGURA 26 - PADRÃO DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X DO LVF G40 REALIZADAS COM CICLO DE AQUECIMENTO.	120
FIGURA 27 - DRXP PARA A AMOSTRA LVF G40 EM TEMPERATURA AMBIENTE (LVF G40 25C), APÓS RESFRIAMENTO A 25 O C (LVF G40 COOLING 25C) E APÓS 1 HORA DE RESFRIAMENTO (LVF G40 COOLING – 1H).	121
FIGURA 28 - PADRÕES DE DIFRAÇÃO DE RAIOS X PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40 DURANTE O AQUECIMENTO E RESFRIAMENTO NAS TEMPERATURAS DE 30 O C E 50 O C.	124
FIGURA 29 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PARA O LVF RM E LVF G40 APÓS AQUECIMENTO EM TG.	126
FIGURA 30 - MICROSCÓPIO ÓPTICO EQUIPADO COM SISTEMA DE AQUECIMENTO. ANÁLISES REALIZADAS PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40. AS IMAGENS A, B, C, D, E E F PARA AMBAS AS AMOSTRAS REPRESENTAM A LIBERAÇÃO DA MOLÉCULA DE ÁGUA DAS AMOSTRAS CONFORME O AQUECIMENTO.	129
FIGURA 31 - MEV OBTIDO NAS RESOLUÇÕES X300 E X1000 PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40 (A E B – LVF RM/ C E D – LVF G40).	131
FIGURA 32 - PERFIL GRANULOMÉTRICO DAS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40.	134
FIGURA 33 - ESQUEMA PARA A DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO DAS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40 (DOIS ESTÁGIOS REPRESENTADOS, GOTA PENDENTE E APÓS ATINGIR A SUPERFÍCIE).	136
FIGURA 34 - REPRESENTAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE ÂNGULO DE CONTATO.	137
FIGURA 35 - VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DE LVF E LVFG40.	140

## Lista de Tabelas

TABELA 1 - SETE SISTEMAS CRISTALINOS POSSÍVEIS. ....	30
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DE HIDRATOS CRISTALINOS. ....	35
TABELA 3 - AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁGUA (%) POR KARL FISCHER (KF) E TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	69
TABELA 4 - COMPARATIVO DE PARÂMETROS DE CÉLULA ENTRE O LEVOFLOXACINO HEMIDRATO E SUA FORMA ANIDRA. ....	97
TABELA 5 - RESULTADOS DAS CURVAS TG PARA O LVF RM E LVF G40. ....	109
TABELA 6 - RESULTADOS DAS CURVAS DSC PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40. ...	118
TABELA 7 - RELAÇÃO DOS VALORES DE DIÂMETRO DAS AMOSTRAS DE LEVOFLOXACINO.	132
TABELA 8 - VALORES DE ÂNGULOS DE CONTATO PARA AS AMOSTRAS LVF RM E LVF G40. .....	138
TABELA 9 - EQUAÇÕES E VALORES DE R <sup>2</sup> OBTIDOS POR REGRESSÃO LINEAR DOS MÍNIMOS QUADRADOS PARA O TESTE DE VELOCIDADE DE DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA DO LVF E LVFG40.....	141



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA – Análise de Variância

BCS – *Biopharmaceutics Classification System* (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV% – Coeficiente de variação percentual

DIDR – *Disk Intrinsic Dissolution Rate* (Taxa de Dissolução Intrínseca em Disco)

DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)

DTA – Differential Thermal Analysis (Análise Térmica Diferencial)

DTG – *Derivative Thermogravimetry* (Termogravimetria Derivada)

FDA – *Food and Drugs Administration*

FT-IR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia com Transformada de Fourier)

g/mol – gramas por mol

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

ICH – *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

IDR – *Intrinsic Dissolution Rate* (Taxa de Dissolução Intrínseca)

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

IV – Infravermelho

KF – Karl Fischer

LVF - Levofloxacino

LOD – *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

LOQ – *Limit of Quantification* (Limite de Quatificação)

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ml – Mililitro

nm – Nanômetro

NMR – Nuclear Magnetic Resonance (RMN – Ressonância Magnética Nuclear)

MOP – Microscopy Optical (microscopia Óptica)

RAMAN – Espectroscopia por Raman

rpm – Rotações por minuto

RS – Raman Spectroscopy

RSD – Relative Standard Deviation

SEM – Scanning Electron Microscopy

TG – Termogravimetria

USP – United States Pharmacopoeia (Farmacopeia Americana)

UV-VIS – Ultravioleta Visível

XRPD – X-ray powder diffraction (Difração de raios X de pó)

µg – Micrograma

µl – Microlitro

# Sumário

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

<b>POLIMORFISMO</b>	<b>26</b>
<b>POLIMORFISMO, SOLVATOS E HIDRATOS</b>	<b>32</b>
<i>HIDRATOS</i>	34
<b>OCORRÊNCIA DE POLIMORFISMO NA ÁREA FARMACÊUTICA</b>	<b>38</b>
<i>FÁRMACOS</i>	38
<i>EXCIPIENTES</i>	39
<b>IMPORTÂNCIA DO POLIMORFISMO NA FARMÁCIA</b>	<b>40</b>
<i>TAXA DE DISSOLUÇÃO E SOLUBILIDADE</i>	40
<i>BIODISPONIBILIDADE</i>	41
<b>GENERALIDADES DE FORMAS SÓLIDAS</b>	<b>42</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO</b>	<b>43</b>
<i>TÉCNICAS UTILIZADAS</i>	45
<i>MICROSCOPIA E TERMOMICROSCOPIA</i>	45
<i>ANÁLISE TÉRMICA</i>	46
<i>MICROSCOPIA ÓPTICA COM AQUECIMENTO (HOT STAGE)</i>	47
<i>DIFRAÇÃO DE RAIOS X</i>	49
<i>ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO</i>	50
<i>ESPECTROSCOPIA POR RAMAN</i>	51
<i>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM SÓLIDO (RMNS)</i>	52
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)</i>	53
<b>LEVOFLOXACINO</b>	<b>54</b>
<i>TÉCNICAS PARA CARACTERIZAÇÃO DE HIDRATOS FARMACÊUTICOS</i>	56

## 3. JUSTIFICATIVA

---

## 4. OBJETIVOS

---

**OBJETIVO GERAL**

**59**

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

<i>PREPARAÇÃO DO LEVOFLOXACINO HEMIDRATO RECRISTALIZADO (LVF R)</i>	60
<i>PREPARAÇÃO DO LEVOFLOXACINO HEMIDRATO TRITURADO/MOÍDO (LVF G)</i>	61
<i>CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)</i>	61
<i>TERMOGRAVIMETRIA (TG)</i>	62
<i>INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR)</i>	62
<i>DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓ (DRXP)</i>	63
<i>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM SÓLIDO (RMNs)</i>	64
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)</i>	64
<i>MICROSCOPIA ÓPTICA ACOPLADA COM PLACA DE AQUECIMENTO (HOTSTAGE)</i>	64
<i>DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DO CRISTAL</i>	65
<i>TAMANHO DE PARTÍCULA - MASTER SIZER</i>	65
<i>MOLHABILIDADE</i>	66
<i>DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA</i>	67

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

<b>6.1 EFEITO DA RECRISTALIZAÇÃO E MOAGEM NO LEVOFLOXACINO HEMIDRATO</b>	<b>68</b>
<i>COMPORTAMENTO TÉRMICO (DSC E TG)</i>	69
<i>DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓS (DRXP)</i>	73
<i>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR) E RAMAN</i>	75
<i>RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NO ESTADO SÓLIDO (RMNs)</i>	78
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)</i>	80
<i>EFEITO DA MOAGEM</i>	81
<b>6.2 EFEITO DESIDRATAÇÃO NA ESTRUTURA CRISTALINA E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA FORMA ANIDRA DO LEVOFLOXACINO</b>	<b>86</b>

<i>CARACTERIZAÇÃO (HEMIDRATO E ANIDRO)</i>	
<i>DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO LEVOFLOXACINO ANIDRO</i>	96
<b>6.3 EFEITO DA MOAGEM NA ESTRUTURA CRISTALINA DO LEVOFLOXACINO HEMIDRATO</b>	<b>108</b>
COMPORTAMENTO TÉRMICO	108
<i>DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE PÓS (DRXP)</i>	118
<i>ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR)</i>	125
<i>MICROSCOPIA ÓPTICA ACOPLADA COM AQUECIMENTO (HOTSTAGE)</i>	127
<i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)</i>	130
<i>TAMANHO DE PARTÍCULA (MASTER SIZER)</i>	132
<b>6.4 MOLHABILIDADE E DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA</b>	<b>136</b>
<i>MOLHABILIDADE</i>	136
<i>DISSOLUÇÃO INTRÍNSECA</i>	139

## **7. CONCLUSÕES**

---

## **8. REFERÊNCIAS**

---

## 1. INTRODUÇÃO

Polimorfismo e pseudopolimorfismo são propriedades importantes do estado sólido que influenciam a comportamento e processamento das formas farmacêuticas (Morris et al., 2001). O polimorfismo é baseado na habilidade de um sólido existir em uma ou mais forma ou estrutura cristalina, enquanto o pseudopolimorfismo trata de diferentes formas de solvato de uma mesma substância química (Vippagunta et al., 2001).

O potencial impacto farmacológico causado por mudanças no estado de hidratação de fármacos e excipientes pode ser comprovado durante o processamento e desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, sendo que o comportamento de hidratos farmacêuticos tem se tornado objeto de interesse nas últimas décadas (Brittain, 2006). O solvato mais comum dentre os produtos farmacêuticos é o hidrato. As moléculas de água nos hidratos podem estar presentes tanto estequiometricamente quanto não estequiometricamente, dependendo do arranjo do cristal bem como da natureza das ligações moleculares da água. Os hidratos podem influenciar as propriedades físico-químicas, o processamento mecânico e o comportamento de compactação do fármaco. Além disso, as moléculas de água em hidratos pode também influenciar interações intermoleculares, desordens cristalinas e mudanças na energia livre dos fármacos bem como em parâmetros como atividade termodinâmica, solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade do material em questão. Portanto, a caracterização das propriedades do estado sólido em um estágio inicial, usando técnicas analíticas adequadas, representa um pré-requisito essencial no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas (Byrn et al., 1995). Neste contexto, as

técnicas mais comumente utilizadas na caracterização de hidratos são termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de raios X de pó (DRXP). Além dessas técnicas, a microscopia óptica associada com aquecimento (hotstage) pode ser de grande utilidade na complementação das análises (Dorofeev, 2004).

O levofloxacino hemidrato (LVF é o enantiomero S(-) do ofloxacino e demonstra melhor efeito farmacêutico em menores dosagens quando comparado com a mistura racêmica (ofloxacino) (Kitaoka et al., 1995; Gonzalez, Mochon and Rosa, 2000; Wang e Wang, 2006; Brittain, 2006). Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o lefloxacino hemidrato e avaliar os efeitos que o processamento, representados pelos processos de moagem e desidratação, causam nas propriedades físicas e químicas deste fármaco.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Polimorfismo**

Nas últimas três décadas a consciência da importância do polimorfismo vem aumentando. Como as metodologias analíticas tem se tornado mais sofisticadas, mais precisas e mais rápidas, a proliferação de dados tem revelado diferenças na estrutura e comportamento dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs), que pode ser atribuído ao polimorfismo. Dessa forma, o polimorfismo passa de um fenômeno incomum para uma área legítima e importante da pesquisa, que pode ser utilizada de maneira original e eficiente para o estudo, compreensão e desenvolvimento das relações estrutura-propriedade em sólidos (Bernstein, 2013). Uma molécula pode se arranjar em diferentes formas cristalinas e os polimorfos tem diferentes distancias relativas intermoleculares e/ou interatômicas assim como as células unitárias, resultando em diferentes propriedades como densidade, dureza, compressibilidade, índice de refração, ponto de fusão, entalpia de fusão, pressão de vapor, solubilidade, taxa de dissolução, outras propriedades termodinâmicas e cinéticas e coloração. As diferentes estruturas cristalinas em polimorfos surgem quando um fármaco cristaliza em diferentes arranjos ou conformações de empacotamento. A ocorrência de polimorfismo é muito frequente em moléculas orgânicas e em um grande número de compostos farmacêuticos (Giron, 1995).

Polimorfos e pseudopolimorfos são importantes propriedades do estado sólido que influenciam a eficácia e processamento de formas

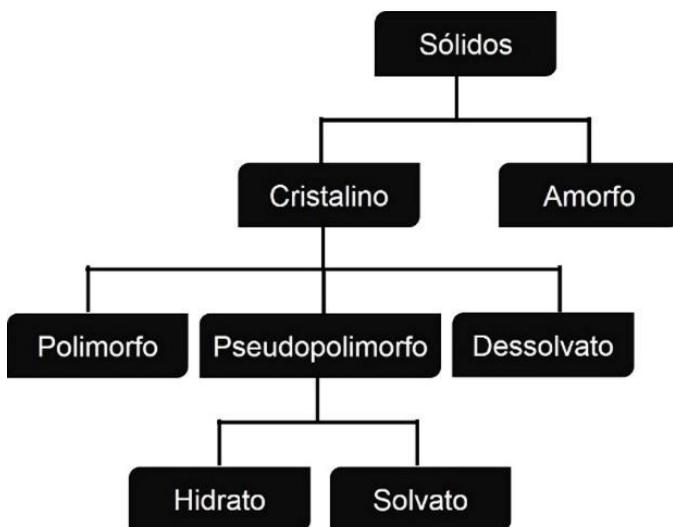
farmacêuticas sólidas (Morris et al., 2001). O polimorfismo se apresenta com diferenças estruturais no interior do cristal enquanto os pseudopolimorfos possuem diferentes solvatos no mesmo composto químico (Vippagunta et al., 2001). O solvato mais comum em compostos farmacêuticos é o hidrato. A molécula de água em hidratos pode estar presente tanto estequometricamente quanto não estequimetricamente, dependendo do arranjo cristalino bem como a natureza da ligação das moléculas de água (Gandhi et al., 2002).

Como muitos termos químicos, a definição de polimorfismo é abrangente e imprecisa. O problema foi discutido por McCrone, cujas definições e advertências são tão relevantes hoje como quando enunciadas pela primeira vez. McCrone definiu polimorfismo como uma fase cristalina sólida de um dado composto resultante da possibilidade de ao menos dois arranjos diferentes entre as moléculas deste composto em seu estado sólido (Bernstein, 2013).

A formação de polimorfos na área farmacêutica pode ser influenciada, ainda, por estresse durante a produção, como na desidratação, moagem, granulação úmida, compactação ou compressão. Estes fatores aceleram a transição de fases em produtos farmacêuticos e o grau de conversão polimórfica dependerá da estabilidade relativa da fase em questão e/ou do tipo e grau de processamento mecânico aplicado à amostra. Tendo-se em vista estes fatores, é desejável escolher a forma polimórfica mais estável no início para controlar a forma dos cristais e a distribuição de tamanho e forma dos mesmos durante todo o processo de desenvolvimento. A presença da forma metaestável durante o processamento ou na forma farmacêutica final frequentemente leva a

instabilidade na liberação como resultado da transformação de fase. A fase sólida é a mais comumente encontrada na prática farmacêutica. A escolha exata e a caracterização completa do sólido influencia a qualidade do processo de produção, o desempenho e a biodisponibilidade da forma farmacêutica final (Malaj, 2009).

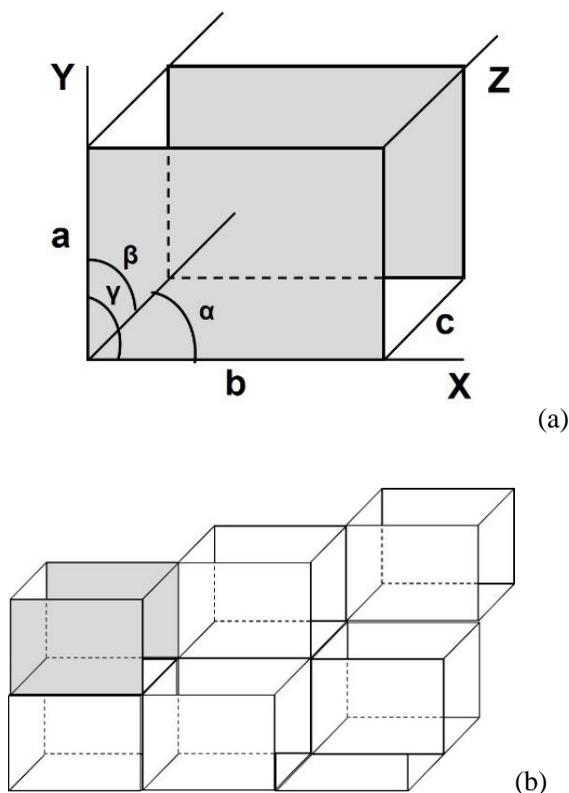
A fase sólida pode ser classificada, com base na ordem do empacotamento, em dois tipos principais de subfases, a cristalina e fase amorfa (Figura 1).



**Figura 1 - Representação esquemática de formas do estado sólido.**

(Adaptado de Malaj, 2009).

Quando aplicado a sólidos, o adjetivo cristalino implica em um cristal ideal, na qual a estrutura unitária, denominada célula unitária, se repete regularmente nas três dimensões espaciais (figura 2a e 2b). A célula unitária possui orientação e forma definidas pelos vetores translacionais  $a$ ,  $b$  e  $c$  e possui volume definido,  $V$ , que contém os átomos e moléculas necessárias para a geração do cristal (Bernstein, 2013).



**Figura 2 - Célula unitária com suas dimensões (a) e organização da estrutura tridimensional da rede cristalina (b).**

(Adaptado de Bernstein, 2013).

Cada cristal pode ser classificado com um número de 1 a 7 possíveis sistemas cristalinos ou classes cristalinas (tabela 1) que são definidos pela relação entre a dimensão individual,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  de uma célula unitária e entre os ângulos individuais,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  da célula unitária (Brittain, 1999).

**Tabela 1 - Sete sistemas cristalinos possíveis.**

(Adaptado de Brittain, 1999).

<b>Sistema cristalinos</b>	<b>Comprimento axial e ângulos</b>
<b>Cúbico</b>	$a=b=c$ $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
<b>Tetragonal</b>	$a=b\neq c$ $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
<b>Ortorrômico</b>	$a\neq b\neq c$ $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
<b>Romboédrico (Trigonal)</b>	$a=b=c$ $\alpha=\beta=\gamma\neq 90^\circ$
<b>Hexagonal</b>	$a=b\neq c$ $\alpha=\beta=90^\circ \quad \gamma= 120^\circ$
<b>Monoclínico</b>	$a\neq b\neq c$ $\alpha=\gamma=90^\circ \neq \beta$
<b>Triclínico</b>	$a\neq b\neq c$ $\alpha\neq\beta\neq\gamma\neq 90^\circ$

A estrutura de um dado cristal pode ser atribuída a um dos sete sistemas cristalinos, a uma das 14 redes Bravais e a um dos 230 grupos espaciais (Kim, 2005).

Todos os 230 grupos espaciais possíveis, suas simetrias e simetrias de seus padrões de difração de raios X estão compilados no *International Tables for Crystallography*. Os sólidos cristalinos existem em três grupos que são classificados em polimorfos, solvatos e hidratos, e dessolvatos (Brittain, 1999).

Um dos aspectos mais importantes do desenvolvimento de formas farmacêuticas no estado sólido diz respeito ao estado físico da IFA, já que tem sido amplamente demonstrado que muitos fármacos podem apresentar uma ou mais formas cristalinas (Brittain, 2008; Vippagunta; Brittain; Grant, 2001).

As moléculas na estrutura cristalina de um polimorfo são ligadas por interações fracas (Pontes de H, Forças de Van der Waals, interações  $\pi$ - $\pi$ ). Duas categorias de polimorfismo são distinguidas: polimorfismo de empacotamento e polimorfismo conformacional. O polimorfismo de empacotamento difere por apresentar moléculas empacotadas na estrutura cristalina, são formados por uma molécula rígida (por exemplo: sulfapiridina), embora existindo uma molécula flexível em polimorfos de várias formas conformacionais (por exemplo: ácido L-glutâmico) (Brittain, 2008; Vippagunta; Brittain; Grant, 2001).

Na prática tipos mistos de polimorfismo são frequentemente encontrados. A denominação/terminologia de polimorfos não é unificada (por exemplo: I, II, III; A, B, C...;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e, ocasionalmente, acontece que polimorfos idênticos são nomeados de forma diferente por autores diferentes. O polimorfismo anidrido (não-solvatos) significa que a molécula de água não está envolvida na estrutura cristalina. O

polimorfismo de hidratos (solvatos) é chamado solvatomorfismo ou pseudopolimorfismo. Polimorfos podem ou não diferir por sua forma cristalina (hábito). Uma habilidade de um composto em formar várias formas cristalinas, embora sua estrutura cristalina permaneça a mesma, não é polimorfismo, mas, morfologia dos cristais (Brittain, 1997; Rodriguez-Spong et. al., 2004; Vippagunta; Brittain; Grant, 2001).

Entre as moléculas farmacêuticas, o caso mais frequente é o dimorfismo. Um exemplo bem conhecido é o litígio de patentes entre as empresas farmacêuticas Glaxo e Novopharm com dois polimorfos de cloridrato de ranitidina, fármaco que diminui a produção de ácido gástrico (Bernstein , 2002). Outro exemplo trata dos problemas da empresa Abbot Laboratórios relativos a dois polimorfos de ritonavir, um inibidor da HIV-protease (Bauer et.al. 2001). Os polimorfos diferem pela sua estrutura cristalina e por suas propriedades, das quais a solubilidade é a mais importante. Uma relação típica de solubilidade de dois polimorfos é de dois para um, mas há exceções, por exemplo, polimorfos de premafloxacino I/III ou polimorfos de cloranfenicol A/B, que apresentam essa relação para mais de 10. Assim, pode acontecer que um polimorfo menos solúvel nem sequer atinja a concentração mínima no sangue (Bond et.al. 2007).

### **Polimorfismo, Solvatos e Hidratos**

A literatura de polimorfismo e fenômenos relacionados tem apresentado um grande número de definições adicionais e termos que potencialmente

levam a uma maior confusão, dificultando o seu melhor entendimento. Um destes termos é o chamado *Pseudopolimorfismo* (Bernstein, 2013).

Provavelmente a utilização mais comum, particularmente prevalente na indústria farmacêutica, envolve a confusão entre solvato (incluindo hidratos) e materiais cristalinos que não contém solvente (anidratos no caso da água). Como Byrn et al. (1999) tem apontado, cristais de solvatos exibem uma vasta gama alterações em suas características físico-químicas. Em um extremo, o solvente está fortemente ligado e condições vigorosas são necessárias para o processo de dessolvatação. Em muitos desses casos, o solvente é parte integrante da estrutura cristalina original e sua eliminação leva ao colapso da estrutura e a formação de uma nova estrutura. No outro extremo estão os solvatos nos quais o solvente está levemente ligado e a dessolvatação não leva ao colapso da estrutura original. Uma vez que um solvato e sua forma cristalina dessolvatada sejam constitucionalmente distintas, estas não podem ser caracterizados como polimorfos por nenhuma definição. Apesar das objeções do uso do pseudopolimorfismo para descrever estruturas solvatadas de um material, o termo parece ter ganhado grande aceitação neste contexto, especialmente na indústria farmacêutica, tanto na caracterização quanto produção e processamento (Kitaoka et al. 1995; Bernstein, 2013).

### *Hidratos*

Hidratos são moléculas complexas que possuem moléculas de água dentro de sua rede cristalina. O comportamento físico-químico, processamento mecânico e compactação de hidratos farmacêuticos podem ser diferentes do correspondente anidro (Byrn et al, 1999). O FDA (Food and Drug Administration's) preconiza procedimentos analíticos apropriados na detecção de diferentes formas sólidas de fármacos. Byrn et al. 1995, desenvolveram fluxogramas descrevendo as mais importantes características científicas e regulatórias considerando a caracterização de sólidos farmacêuticos, incluindo polimorfos, hidratos (solvatos), solvatos dessolvatos e formas amorfas. Dentre os diferentes estados sólidos de fármacos, a formação de hidratos é o fenômeno mais comum encontrado, podendo causar pequenas mudanças até a formação de diferentes polimorfos (Byrn et al, 1995; Morris, 1999; Vippagunta et al., 2001; Giron, 1999; Giron et al., 2002).

A molécula de água é pequena o suficiente para preencher os espaços vazios formados quando moléculas maiores são empacotadas e interagem através de ligações de hidrogênio para superar a entropia do sistema. Hidratos cristalinos têm sido classificados tanto pela estrutura quanto por aspectos energéticos. A classificação de hidratos cristalinos de interesse farmacêutico por suas características cristalinas é a mais comum, intuitiva e usual (Morris et al., 1999)..

Baseado em seus aspectos estruturais, hidratos cristalinos foram classificados em três classes (Tabela 2) e estas podem ser facilmente

identificadas por técnicas analíticas facilmente disponíveis (Morris et al., 1999).

**Tabela 2 - Classificação de hidratos cristalinos.**

(Morris et al., 1999).

Classe	1	2	3
Descrição	Sítios isolados da rede	Rede de canais  a) Canais expandidos  b) Rede plana  c) Hidratos desidratados	Água coordenada por íon metálico

O grande impacto farmacêutico causado pelas mudanças no estado de hidratação de fármacos e excipientes é observado durante o processo de desenvolvimento de formas farmacêuticas (Brittain, 2006). Morris afirma que substâncias podem hidratar/desidratar ou solvatar/dessolvatar em resposta a mudanças nas condições ambientais, processamento ou ao longo do tempo em uma forma metaestável, termodinamicamente estável (Morris et al., 1999).

Além de interferir nas propriedades físico-químicas, a água em hidratos também pode influenciar nas interações intermoleculares, desordem cristalina, mudanças na energia livre, atividade termodinâmica,

solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade. Entretanto, a prévia caracterização de propriedades do estado sólido utilizando metodologias analíticas apropriadas é um pré-requisito essencial no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas, tanto do ponto de vista regulatório quanto de controle (Byrn et al., 1995).

A primeira escolha de uma IFA para uma formulação de fármacos sólidos é o anidro (ácido livre, base livre ou composto neutro). Anidros, juntamente com sais formam a maioria de todas as formulações. Se o anidro, por algum motivo não é adequado (por exemplo, é pouco solúvel, instável, etc.), os possíveis hidratos deverão ser monitorados. O hidrato é mais frequentemente um solvato contendo moléculas de água em sua estrutura cristalina. Para uma formulação estável, hidratos estequiométricos em um estágio inferior de hidratação são escolhidos em que as moléculas de água estão ligadas às moléculas da substância ativa por pontes de hidrogênio. A desidratação de um hidrato estequiométrico muitas vezes resulta no colapso da estrutura cristalina e possibilita a origem de uma fase amorfa. Hidratos não estequiométricos não são adequados para a formulação, pois o teor de água em si muda com a pressão parcial de vapor d'água na atmosfera e com a temperatura. Em hidratos não estequiométricos, a água não está ligada muito firmemente, preenchendo fracamente as cavidades presentes na estrutura, sem formação de pontes de hidrogênio. A desidratação dos hidratos não estequiométricos poderia resultar em uma fase amorfa, porém origina um anidro cristalino. Um exemplo de um hidrato não estequiométrico é a  $\beta$ -ciclodextrina, representado pelas moléculas de água intersticial na cavidade (Malaj, 2009).

A estabilidade do sistema anidrato/hidrato depende da umidade relativa do ambiente. Muitas substâncias ativas formam hidratos, frequentemente em vários graus de hidratação e estabilidade. Se o hidrato é o mais estável em um sistema anidrato/hidrato, então o hidrato possui todos os sítios doadores e aceptores de prótons disponíveis mais saturados comparados ao anidrato (Etter's rule). Como exemplo, cita-se o alcaloide de cereais terguride que se apresenta como um anidrato, como hidrato 2/3 (dois terços) e como monohidrato (Bernstein, 2013).

Formulações de IFAs de hidratos não são muito frequentes considerando-se o número total de IFA's (por exemplo, hidrato de cloral, hemihidrato de levofloxacino e outros). A razão é sua instabilidade térmica e a possibilidade de desidratação durante a secagem (Bernstein, 2013).

De fato, processos tecnológicos como granulação úmida, redução de tamanho de partícula, revestimento e compressão podem favorecer um composto em formar uma fase metaestável que pode relaxar a uma forma mais estável durante a validade de uma forma farmacêutica. Alternativamente, uma forma cineticamente favorecida, mas termodinamicamente instável pode ser convertida durante esse processo para uma forma mais estável e menos solúvel (Bernstein, 2013).

## *Ocorrência de polimorfismo na área farmacêutica*

### *Fármacos*

“Após a descoberta dos primeiros casos de polimorfismo, com diferenças drásticas na atividade biológica entre duas formas do mesmo fármaco, nenhum farmacêutico industrial deverá negligenciar este problema” (Borka, 1991). Esta frase demonstra, em poucas palavras, a importância da pesquisa e do conhecimento do estado sólido de produtos farmacêuticos.

O processo de desenvolvimento de novos fármacos como promessa de produtos novos no mercado é um processo dispendioso, com probabilidade de sucesso de um em dez mil. A estrita exigência de controle de qualidade e as implicações das propriedades intelectuais na indústria farmacêutica levam a uma minuciosa e intensa investigação da formação e das propriedades de um sólido de interesse farmacêutico, tanto para excipientes quanto para fármacos. Esses esforços se estendem por grandes períodos de tempo com muitas variáveis experimentais e ambientais, que podem levar ao aparecimento de formas polimórficas, de maneira intencional ou espontânea.

Numerosos estudos sobre polimorfismo em produtos farmacêuticos têm aparecido desde a década de 60, muitos dos quais listados por Byrn e Borka, os quais compilaram uma lista com cerca de 500 referências que relatam polimorfismo em aproximadamente 470 importantes compostos farmacêuticos. Isso foi logo seguido por uma análise polimórfica incluída no fascículo 1 a 12 da Farmacopeia Europeia (FE), trazendo

uma comparação dos pontos de fusão na FE e na literatura de origem. A última versão foi posteriormente atualizada em 1995, com as entradas dos fascículos 13 a 19 (Bernstein, 2013).

Cerca de 560 formas polimórficas, solvatos (incluindo hidratos) de sólidos farmacêuticos a 25 °C, estão presentes na edição da FE de 1997. Além disso, dos 10330 compostos da edição de 1997 do Merk Index, somente 140 (1,4 %) são especificamente relatados como polimorfos, 540 (5 %) como hidratos e 55 (0,5 %) considerados como solvatos. Esses números refletem uma falha nos relatórios de inclusão desses fenômenos e pode sugerir a atual consciência do polimorfismo por parte dos compiladores de compêndios e obras de referência (Malaj, 2009).

### *Excipientes*

As formulações farmacêuticas possuem em sua formulação, além de fármacos, excipientes, que servem para uma variedade de funções como enchimento, estabilizante, revestimento, agente secante, entre outras. Estes materiais podem exibir polimorfismo, os quais podem influenciar sua *performance* na formulação. Um grande número de excipientes exibem um grande número de polimorfos, solvatos e amorfos e estes são amplamente utilizados na tecnologia farmacêutica, a exemplo de lactose, sorbitol, glicose, sacarose, estearato de magnésio, fosfato de cálcio e manitol. A natureza sólida dos excipientes pode influenciar a forma física final de um comprimido, bem como a tendência a manter ou induzir a conversão polimórfica do fármaco. Por isso, tem se tomado

cuidado para o desenvolvimento de protocolos para a seleção de excipientes compatíveis com o fármaco (Burger et al. 2000).

### ***Importância do Polimorfismo na Farmácia***

O polimorfismo pode influenciar cada aspecto da propriedade do estado sólido de um fármaco. Um dos aspectos importantes do polimorfismo na indústria farmacêutica é a possibilidade da interconversão entre formas polimórficas, seja planejado ou ao acaso.

### ***Taxa de Dissolução e Solubilidade***

As propriedades de dissolução e solubilidade são frequentemente cruciais na escolha da forma cristalina para a formulação de um produto farmacêutico. Em geral, estes dois fatores desempenham papel importante, senão fundamental, na biodisponibilidade de um fármaco. A absorção fisiológica de um sólido farmacêutico oral geralmente envolve dissolução do sólido no estômago e a taxa e extensão da dissolução é frequentemente o passo determinante da velocidade do processo de absorção. Um vez que diferentes formas cristalinas podem apresentar diferentes limites e cinéticas de dissolução, estas propriedades são rotineiramente estudadas em grande detalhe para muitos fármacos, possuindo polimorfos ou não e claramente a caracterização de polimorfos é frequentemente mais crítica (Bernstein, 2013).

### *Biodisponibilidade*

A taxa e extensão da absorção fisiológica de um fármaco é fator decisivo em sua eficácia. Isto pode variar em diferentes modificações cristalinas e tem se tornado um importante aspecto científico e regulatório (Bernstein, 2013).

Embora grande número de estudos que fazem conexão entre modificações do cristal e sua biodisponibilidade tenham sido publicados, é razoável supor que muitos continuam a ser propriedade intelectual de empresas farmacêuticas ou de documentos confidenciais enviados para as agências reguladoras. Também, muitos estudos, especialmente os de taxa de dissolução são usados para extrapolar a biodisponibilidade esperada.

A biodisponibilidade pode também variar entre modificações cristalinas e amorfas bem como entre formas polimórficas. Além disso, o grau de hidratação de diferentes modificações pode ter papel importante na biodisponibilidade. Um dos sistemas mais estudados é o da ampicilina desidratada e tri hidratada, embora os resultados não tenham em muitas vezes levado a resultados consistentes, porém existem muitos solvatos que demonstraram diferenças em sua biodisponibilidade (Bernstein, 2013).

### *Generalidades de formas sólidas*

A descoberta de um fármaco é caracterizada por duas fases. A primeira em termos de tempo é chamada de “estrutura primária”, seguido pelo chamado “fármaco candidato”. O estágio “estrutura primária” envolve seleção de uma molécula ótima, enquanto o estágio “fármaco candidato” se relaciona com a seleção da forma sólida ideal. Aproximadamente 5-10 candidatos passam para a fase de candidato e o resultado é a seleção do sólido final (IFA - Ingredientes Farmacêuticos Ativos), para subsequente formulação da forma farmacêutica. O estágio de “estrutura primária” refere-se somente à descoberta de um fármaco original, o “fármaco candidato” pode estar relacionado aos genéricos (fármaco bioequivalente ao original, produzido e distribuído após expirar sua patente) (Bernstein, 2013).

As propriedades mais importantes de um fármaco incluem a sua solubilidade, a taxa de dissolução e a permeabilidade, que estão intimamente relacionados com a biodisponibilidade oral do fármaco. Para a seleção de uma IFA ideal, várias dezenas de formas sólidas podem estar disponíveis a partir de uma molécula. Um exemplo é a atorvastatina cálcica, um fármaco usado no tratamento de hipercolesterolemia, para os quais mais de 60 formas sólidas são patenteados. O piroxicam, fármaco anti-inflamatório não-esteroidal, foi sintetizado em mais de 50 formas e mais de 100 formas são descritos para sulfatiazol, um agente antimicrobiano de uso local (Bernstein, 2013).

No caso de compostos multicomponentes, a redução do número de formas sólidas é dada pela condição de aceitabilidade farmacêutica do componente (por exemplo, contra íons no caso dos sais), ver GRAS (Generally Recognized as Safe ou Geralmente Reconhecido Como Seguro) (FDA, GRAS, 2010).

### *Caracterização No Estado Sólido*

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica implica em vários passos, objetivando-se a criação de um sistema físico que contenha a substância ativa e os requisitos de qualidade que assegurem a sua eficácia e a segurança.

Muito embora novas formas farmacêuticas continuem a ser desenvolvidas, muitos fármacos ainda são administrados na forma sólida (Brittain, 1997), devido à conveniência e estabilidade, confiabilidade à dose veiculada, proteção ao fármaco e melhor aceitação pelo paciente. (De Castro et. al., 2006).

Nos últimos anos, houve muitas discussões e investigações científicas relacionadas à determinação da equivalência farmacêutica. Ficou bem estabelecido que a velocidade e a extensão com que o fármaco torna-se disponível para a absorção, dependem, em grande parte, das matérias-primas utilizadas e também do método de obtenção.

Matérias-primas de origem nacional ou importada são utilizadas e, apesar da sua pureza química ser aceitável, frequentemente as matérias-

primas apresentam diferenças de características no estado sólido (polimorfismo, tamanho de partículas, hábitos cristalinos, etc.). Características que podem afetar a estabilidade ou a disponibilidade da forma sólida do fármaco devem ser monitoradas e controladas, assim, a caracterização física dos sólidos tem se tornado uma área extremamente importante na indústria farmacêutica (Brittain, 1997).

Aspectos como a biodisponibilidade, solubilidade, procedimentos farmacotécnicos e condições de administração estão intimamente relacionados às propriedades químicas e físico-químicas dos fármacos no estado sólido. As propriedades físico-químicas dos princípios ativos constituem, sem dúvida, um elemento essencial no desenvolvimento de formulações farmacêuticas destinadas à administração por via oral. A absorção gastrointestinal está relacionada à solubilidade, ao caráter ácido/base do fármaco e à sua permeabilidade através de membranas biológicas, o que irá determinar a biodisponibilidade de uma determinada substância (Cuffini et. al., 2001).

A grande importância do controle das características do estado sólido dos fármacos, como o polimorfismo, no desenvolvimento de fármacos está principalmente relacionada às diferenças significativas que podem ser geradas na solubilidade, na processabilidade e na estabilidade física e química. Estas diferenças poderão modificar o comportamento da molécula quanto ao meio biológico, podendo afetar diretamente a biodistribuição e, portanto, sua eficácia.

### *Técnicas Utilizadas*

O polimorfismo representa diferenças estruturais cristalinas essencialmente nas propriedades físicas ou químicas que podem variar muito entre as estruturas polimórficas dos materiais. A consequência disso é o fato de que virtualmente qualquer técnica que consiga medir as propriedades de um material sólido pode em princípio ser usada na detecção de polimorfos e na caracterização de suas similaridades e diferenças estruturais. Algumas técnicas possuem maior sensibilidade para detecção da estrutura cristalina ou do ambiente molecular e em alguns casos podem ser preferidas para a detecção e caracterização da estrutura cristalina.

Devido ao fato de a grande maioria de técnicas fornecerem informações diferentes e de algumas não distinguirem características polimórficas específicas, é importante a utilização de grande variedade de técnicas a fim de complementar os resultados. A seguir serão listadas algumas técnicas utilizadas na identificação e caracterização polimórficas de materiais, dentre as quais muitas foram utilizadas no desenvolvimento deste trabalho (Morris et al. 1998).

### *Microscopia e Termomicroscopia*

A microscopia e termomicroscopia são ferramentas bastante simples, úteis e eficientes na caracterização e estudo de polimorfismo. Talvez a mais difundida e sistemática aplicação para estas técnicas tenha sido o campo de materiais farmacêuticos. Antes do desenvolvimento de

métodos analíticos de rotina cada vez mais sofisticados, a microscopia de fase quente (hot stage microscopy) competiu como uma das principais ferramentas para a caracterização e classificação de polimorfismo. Para o sucesso da caracterização de polimorfos é essencial a utilização de uma gama de ferramentas e o “hot stage” foi uma das primeiras, senão a primeira, na caracterização de compostos. O uso da combinação de estudos térmicos e ópticos com a gravação de vídeos combinado com outros métodos analíticos possibilita obtenção de maior número de dados para uma caracterização mais precisa dos materiais sólidos. Dentre as combinações destacam-se o DTA, RAMAN e FTIR (Morris et al. 1998).

### *Análise Térmica*

Os métodos térmicos são baseados no princípio de que mudanças no estado físico de um material são acompanhadas pela liberação ou absorção de calor. Várias técnicas termoanalíticas são designadas para a determinação da entalpia acompanhando as mudanças pela medida das diferenças entre o fluxo de calor entre a amostra estudada e um referencial inerte. Este método é comumente chamado de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC – Differential Scanning Calorimetry).

Na Analise Térmica Diferencial (DTA) clássica, tanto a amostra quanto a referência são aquecidos por uma única fonte de calor. As duas temperaturas são medidas por um sensor em contato com a amostra e a referência. Os dados são coletados como a diferença de temperatura

entre a amostra e a referência em função do tempo. O objetivo desta determinação é geralmente determinar as mudanças entálpicas obtidas pela área do pico formada.

No caso do DSC, a amostra e a referência são aquecidas separadamente. Neste caso ocorre compensação de fluxo de energia com variações entálpicas na amostra. Assim, quando ocorre alguma alteração (liberação ou absorção de energia) na amostra há uma compensação energética na referência (material inerte). O pico formado fornece dados entálpicos da transição.

Outra técnica termoanalítica bastante utilizada na caracterização polimórfica é a Termogravimetria (TGA – Thermogravimetric Analysis). Nesta técnica o que se avalia é a mudança na massa da amostra quando submetida a variações térmicas. Como exemplo, ela pode fornecer dados de presença de volátil, determinação de cinética de degradação térmica e, no caso de hidratos farmacêuticos, fornece dados de presença de água, sendo possível quantificá-los e diferenciar um hidrato de outro (Bernstein, 2013).

### *Microscopia Óptica com Aquecimento (Hot Stage)*

A microscopia com aquecimento apresenta-se como um método rápido para varredura de substâncias em relação à presença de polimorfismo. Apesar da grande utilidade desta técnica na área de polimorfismo, esta não tem recebido a atenção que realmente merece. A microscopia foi uma técnica muito ignorada em meados do século XX devido, em parte,

a sua natureza subjetiva de observação e medida e falta de analistas que transmitissem o conhecimento científico. Entretanto sua utilização e importância tem se tornado amplamente reconhecida (Bernstein and Henck 1998).

O uso mais geral da microscopia para o estudo de polimorfismo é simplesmente a observação da homogeneidade ou diversidade cristalina da amostra. Variações do tamanho, forma e cor podem indicar a presença de polimorfos e requerem maiores exames posteriores.

O acessório mais utilizado para a microscopia de luz polarizada de longe é o passo de aquecimento (Hot Stage). Com prática, o real ponto de fusão pode ser determinado por esta técnica. Esta determinação auxilia na caracterização de materiais sólidos, embora possa haver diferentes polimorfos com o mesmo ponto de fusão. Uma variedade de outras propriedades pode ser estudada com esta ferramenta, a qual pode ser a primeira opção na caracterização de um material sólido, especificamente na pesquisa de polimorfismo (Bernstein and Henck 1998).

A utilização da microscopia com aquecimento tem papel importante no estudo de solvatos, os quais podem ser rapidamente detectados e a dessolvatação pode ser facilmente distinguida usando a termomicroscopia. O aparecimento de turbidez no cristal pelo aquecimento é um sinal da liberação do solvente, água no caso de hidratos. Porém um teste mais conclusivo pode ser realizado cobrindo o cristal com gel de silicone ou óleo de parafina, que aprisiona as bolhas do solvente liberado. Métodos térmicos tem se mostrado bastante

eficazes como complemento das técnicas microscópicas com aquecimento.

### *Difração de Raios X*

Os métodos de cristalografia de raios X, os quais refletem diferenças na estrutura do cristal, em muitos dos casos pode ser definitivo na identificação e caracterização de polimorfos e, sempre que possível, deve ser incluído dentre os métodos analíticos utilizados na definição do sistema polimórfico.

A aplicação de métodos de difração de raios X no estudo de sólidos moleculares em geral e sistemas polimórficos é frequentemente realizado em pós ou em monocristal. Tradicionalmente, o primeiro tem sido utilizado na identificação qualitativa de fases polimórficas individuais ou mistura de fases enquanto que o último tem disso usado na determinação da estrutura cristalina final e molecular mais detalhada. O aumento da utilização de radiação Síncrotron para difração de pó tem contribuído significativamente para preencher as lacunas existentes e em alguns casos revelar polimorfos não detectáveis por pesquisas de difração de raios X de laboratório. A técnica de difração de raios X é provavelmente o método mais efetivo para identificar polimorfos e distingui-los entre si (Bernstein, 2013).

### *Espectroscopia na Região do Infravermelho*

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica padrão para a caracterização de compostos no contexto de materiais sólidos. Pelo fato de se basear em medidas de modos vibracionais geralmente de átomos ligados, com absorções na faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , é a primeira ferramenta para investigar propriedades moleculares ao invés de propriedades do estado sólido. Todavia, durante meio século tem sido amplamente utilizada para investigar a propensão de materiais formarem polimorfos incluindo detalhes termodinâmicos como pontos de transição e número de componentes (Brittain 1997).

Uma vez que as características de ligação e átomos ligados são monitorados por esta técnica, são as perturbações de suas vibrações devido a variações conformacionais ou fatores ambientais entre os polimorfos que podem levar a diferenças no espectro. Em geral muitas características moleculares são constantes de polimorfo para polimorfo e os efeitos ambientais em especial ligações e efeitos vibracionais podem não ser suficientes para evidenciar diferenças no espectro de infravermelho entre polimorfos.

A técnica e instrumentação de FTIR (Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier) fornece a localização precisa de bandas de absorção e esta informação juntamente com comparações e atribuições do IR de vários polimorfos, permite a caracterização e comparação entre estes polimorfos. Muitas informações sobre similaridades e diferenças entre polimorfos podem ser perdidas com a representação gráfica, dessa forma é necessário se tomar cuidado durante a plotagem dos gráficos.

Apesar das dificuldades experimentais e potenciais armadilhas, a espectroscopia na região do infravermelho demonstra ser um método simples e amplamente utilizado rotineiramente como ferramenta no estudo e caracterização de polimorfismo (Brittain 1997).

### *Espectroscopia por Raman*

As técnicas espectroscópicas por Infravermelho e Raman são geralmente agrupadas uma vez que fornecem informações dos modos vibracionais de um composto. Entretanto, uma vez que as duas técnicas são baseadas em diferentes princípios físicos as regras para seleção são diferentes. O infravermelho é um fenômeno de absorção enquanto o Raman é baseado no fenômeno de espalhamento. Em geral a energia do infravermelho é absorvida por grupos polares, enquanto a radiação é mais efetivamente espalhada no efeito Raman por vibrações não simétricas e grupos não polares (Bernstein, 2013).

A maior vantagem da espectroscopia por Raman sobre o Infravermelho é que geralmente não há necessidade de maiores preparos da amostra, sendo muitas vezes dispensado seu preparo. O preparo da amostra, como a moagem, por exemplo, pode alterar a amostra e modificar sua estrutura cristalina, podendo formar um novo polimorfo.

### *Ressonância Magnética Nuclear em sólido (RMNs)*

Em termos de características estruturais, as quais são avaliadas por várias técnicas analíticas, a Ressonância Magnética Nuclear no estado sólido (RMNss) pode ser vista como a técnica intermediária entre a espectroscopia na região do infravermelho e a difração de raios X de pó. A primeira fornece essencialmente parâmetros estruturais, principalmente as forças de ligações representadas pelas frequências características, enquanto o último reflete a natureza periódica da estrutura de um sólido. Para polimorfos, diferenças no ambiente e/ou conformação molecular pode refletir no espectro de infravermelho. As diferenças na estrutura do cristal que definem um sistema polimórfico são claramente refletidas nos padrões de difração de raios X.

A técnica fornece informações do ambiente de átomos individuais. Em essência, a mudança no ambiente de algum átomo pode originar-se de dois fatores, os quais não são separáveis na interpretação do RMNss, mas são conceitualmente independentes. Uma vez que diferentes polimorfos são estruturas cristalinas diferentes, é esperado que o ambiente cristalino ao menos alguns átomos será diferente de polimorfo para polimorfo. Além disso, uma vez que a conformação molecular pode frequentemente variar entre polimorfos, a mudança no ambiente de um átomo devido a diferença conformacional pode também ser refletida no RMNss (Bugay 2001; Strohmeier et al. 2001).

O RMNss, assim como as outras técnicas descritas anteriormente, é uma área de grande rápido desenvolvimento com grande potencial no estudo

de polimorfismo, podendo ser adaptada para análises quantitativas de misturas de polimorfos e ou sistemas multicomponentes.

O uso do RMNss para estudo de polimorfismo possui uma série de vantagens: a) o sinal não é influenciado pelo tamanho de partícula que pode eliminar possíveis complicações de possíveis transformações polimórficas devido a moagem requerida em técnicas como IR e DRX, por exemplo; b) a intensidade do sinal é proporcional ao número de núcleos então a presença de misturas de modificações cristalinas podem ser reconhecidas ou a composição quantitativa de misturas polimórficas podem ser determinadas; c) não há necessidade de preparo da amostra sendo que a pesquisa por polimorfos possa ser realizada durante qualquer estágio do desenvolvimento ou processamento de um material sólido, como algum fármaco.

No estudo polimórfico, o RMNss pode fornecer importantes informações cristalográficas, mesmo na ausência de um monocristal para determinação estrutural completa da amostra.

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

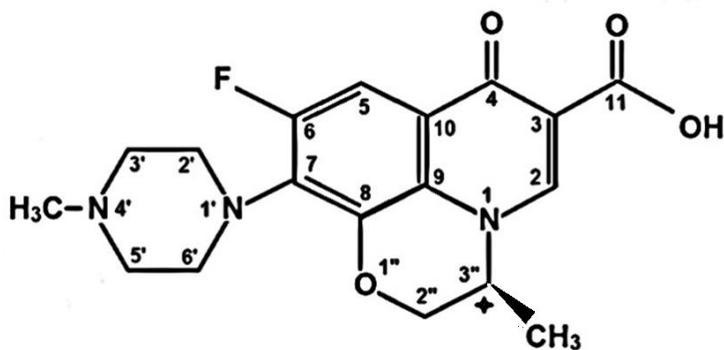
O MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) fornece magnificações maiores que a microscopia óptica. No estudo de polimorfismo esta técnica pode ter grande utilidade na caracterização e entendimento de diferenças nas propriedades de polimorfos. Além da caracterização dos hábitos cristalinos e de características de superfície, o MEV pode

auxiliar no estudo da simbiose estrutural entre duas modificações cristalinas (Bernstein, 2013).

### *Levofloxacino*

Fármacos do grupo das fluoroquinolonas são agentes antimicrobianos com amplo espectro de ação. Embora se disponha de extensa literatura sobre propriedades farmacológicas e uso clínico destes fármacos, informações em relação a propriedades físico-químicas ainda são insuficientes (Dorofeev, 2004).

Inicialmente, somente o ofloxacino racêmico estava disponível como fármaco, porém atualmente tem sido amplamente substituído pelo seu isômero óptico (S-oflo) (nome comercial – Levofloxacino) (figura 3) o qual se tornou líder de mercado dentre as quinolonas do mercado.



**Figura 3 – Estrutura química do levofloxacino (S-) com a estrutura numerada (\* denota o centro quiral).**

Adaptado de: (USP, 2011).

A levofloxacinó é o L-isómero do racemato ofloxacinó, um agente de quinolona antimicrobianos. A atividade antibacteriana de ofloxacinó reside essencialmente no isómero-L. O mecanismo de ação do levofloxacinó e outros antimicrobianos fluoroquinolonas envolvem a inibição da topoisomerase IV bacteriana e DNA girase (ambos dos quais são topoisomerases do tipo II), as enzimas necessárias para a replicação do DNA, transcrição, reparo e recombinação (USP, 2011).

Levofloxacinó apresenta atividade *in vitro* contra uma ampla gama de microrganismos Gram-negativas e Gram-positivas e muitas vezes são bactericidas em concentrações iguais ou ligeiramente superiores às concentrações inibitórias (USP, 2011).

Fluoroquinolonas, incluindo a levofloxacinó, diferem na estrutura química e modo de ação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos, e, portanto, pode ser ativo contra bactérias resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos. Além disso, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos podem ser ativos contra bactérias resistentes à levofloxacinó. A resistência à levofloxacinó devido à mutação espontânea *in vitro* é uma ocorrência rara (USP, 2011).

O levofloxacinó hemidrato, ou ((-)-(S)-9-fluoro-2,3-diidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido [1,2,3-de]-[1,4] benzoxazino-6-ácido carboxílico hemidrato) é um Isómero S do ofloxacinó que é amplamente utilizado no mundo inteiro como agente antibacteriano. Além disso, o Levofloxacinó é geralmente 3 vezes mais potente que o ofloxacinó contra uma variedade de patógenos gram-positivos e gram-

negativos (Kitaoka H., et.al. 1995). Deve ser armazenado entre 15 - 25 °C. É solúvel em ácido acético, clorofórmio, pouco solúvel em água (Merck Index). Possui massa molar de 361,37, fórmula molecular  $C_{18}H_{20}FN_3O_4$  e sua polaridade é dada pelo coeficiente de partição octanol/água, Log P 1,268 (USP, 2011).

O levofloxacino existe em pelo menos duas modificações, o hemidrato e o monohidrato. É bem conhecido que diferentes polimorfos e hidratos de fármacos exibem diferentes propriedades físico-químicas como estabilidade e solubilidade (Kitaoka e Ohya, 1993; Kitaoka et.al. 1995). O levofloxacino hemidrato possui maior estabilidade de fase em relação ao monohidrato (Nakagami et.al 1994; Kitaoka et.al. 1995).

### *Técnicas para caracterização de Hidratos Farmacêuticos*

A completa caracterização de hidratos farmacêuticos deve incluir o conhecimento coletivo sobre a identificação, quantificação, propriedades termodinâmicas e diagrama de fases (Han, 1998; Newman e Byrn, 2003; Giron et al., 2002; Byrn, 1994)

As técnicas mais comumente utilizadas na identificação de hidratos incluem difração de raios X de pó e de monocristal, a qual possibilita identificar mudanças no padrões de difração, uma vez que a molécula de água influencia diretamente na estrutura do cristal (Suryanarayanan, 1995; Brittain, 2002), análise térmica, fornecendo dados de massa de água presente na molécula, bem como a energia necessária para a desidratação do material (Giron D., 1999), microscopia óptica (hot

stage) que possibilita a visualização dos eventos referentes a movimentação da molécula de; água na estrutura cristalina (Clarke, 1998), técnicas espectroscópicas que fornecem dados da localização da ligação da água na molécula de fármaco (IR, FTIR, Raman e IR próximo), além de titulação por Karl Fischer, que pode corroborar com dados termoanalíticos em relação ao percentual de água no cristal.

### 3. JUSTIFICATIVA

O fato de formas de hidratos representarem um percentual pequeno em formulações farmacêuticas, por serem mais instáveis termicamente, desperta grande interesse em estudos do estado sólido. Um exemplo disso é o hemidrato de levofloxacino, um isômero S do ofloxacino, amplamente utilizado no mundo inteiro como agente antibacteriano. O levofloxacino é geralmente três vezes mais potente que o ofloxacino contra uma variedade de patógenos gram-positivos e gram-negativos.

O fármaco existe em pelo menos duas modificações, o hemidrato e o monohidrato. Sabe-se que diferentes polimorfos e hidratos de fármacos exibem distintas propriedades físico-químicas como estabilidade e solubilidade. No caso do levofloxacino hemidrato, este possui maior estabilidade em relação ao monohidrato.

Dessa forma, o entendimento do comportamento no estado sólido se mostra de suma importância no controle de qualidade da matéria-prima e no desenvolvimento de formulações que sejam mais estáveis para a comercialização.

## 4. OBJETIVOS

### *Objetivo Geral*

Avaliar as propriedades do estado sólido e realizar a determinação estrutural do fármaco hemidrato de levofloxacino, bem como de sua forma anidra.

### *Objetivos Específicos*

- ✓ Avaliar e caracterizar a matéria-prima (levofloxacino hemidrato) e suas formas anidrato, triturada e recristalizada;
- ✓ Obter, a partir da forma hemidrato do levofloxacino, sua forma anidrato;
- ✓ Determinar a estrutura cristalina do levofloxacino anidro.
- ✓ Avaliar o impacto do processamento da matéria-prima através de moagem;
- ✓ Realizar estudo de molhabilidade através do ângulo de contato;
- ✓ Realizar estudo de dissolução intrínseca das amostras;

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de levofloxacino hemidrato foram obtidas da Zhejiang East-Asia Pharm, tendo sido denominadas de LVF rm (matéria-prima - raw material) e LVF g40 (triturado - grinding). A amostra LVF g40 foi triturada por vários tempos diferentes até que se estipulasse o tempo ideal de 40 minutos, em gral de porcelana (LVF g40). Além disso, a matéria-prima foi recristalizada (LVF r) de acordo com método de preparação do levofloxacino monohidrato descrito por Kitaoka et al., 1995. Foi possível através desta técnica obter a forma hemidratada recristalizada.

### *Preparação do levofloxacino hemidrato recristalizado (LVF r)*

Cerca de 10 g de amostra de levofloxacino hemidrato foi adicionada em 100 ml de água e agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse período foi realizado processo de filtração, o material coletado sobre o papel filtro foi lavado com 20 ml de água e seco sob pressão reduzida a cerca de 80 °C durante um período de 4 horas. Após a secagem, o material foi levado à umidade relativa de 60 % durante uma noite. A técnica descrita foi baseada no método de obtenção do levofloxacino monohidrato descrito por Kitaoka (Kitaoka et al., 1995).

### ***Preparação do levofloxacino hemidrato triturado/moído (LVF g)***

A amostra de levofloxacino hemidrato foi triturada em graal de porcelana por 5, 10 e 20 minutos.

### ***Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)***

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram obtidas em célula DSC-60 (Shimadzu, Japão) com a utilização de cápsulas de alumínio abertas com aproximadamente 2 mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min), com razão de aquecimento de 10 °C/min, na faixa de temperatura de 30 °C a 240 °C. O equipamento de DSC foi previamente calibrado com padrão de referência índio (ponto de fusão: 156,6 °C,  $\Delta H_{\text{fusão}} = -28,54 \text{ J/g}$ ) e zinco (ponto de fusão 419,5 °C) e a linha de base foi calibrada de acordo com as especificações para o equipamento.

Para avaliação do perfil térmico da forma anidrato, foi realizado um ciclo de aquecimento. Para isso a amostra hidratada foi aquecida até 140 °C, resfriada até a temperatura ambiente e rapidamente aquecida para obtenção da curva da forma anidra do levofloxacino. Os eventos endotérmicos são representados para baixo em todas as curvas calorimétricas.

### *Termogravimetria (TG)*

A termogravimetria (TG) foi realizada em termobalança TGA-50 (Shimadzu, Kioto, Japão) usando cadinho de platina, com razão de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera dinâmica de Nitrogênio (N<sub>2</sub>) com fluxo de 50 ml/min. Aproximadamente 4 mg de amostra foi utilizada para a análise. A linha de base foi ajustada com branco para todas as análises. A temperatura de início das análises foi de 25 °C e a temperatura final foi de 400 °C.

### *Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

Os espectros foram coletados em espectrofotômetro modelo FTIR Prestige da Shimadzu. O *scan* foi na faixa de 600-4000 cm<sup>-1</sup> e a resolução do espectro foi de 4 cm<sup>-1</sup>. Todas as amostras foram analisadas em mistura de KBr com fármaco (LVF rm e LVF r) na proporção de 1:1.

Também foi utilizado equipamento FTIR Frontier (PerkinElmer, Brasil) na faixa entre 4000 e 600 cm<sup>-1</sup>, com uma média de 32 scans, na resolução do espectro de 4 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram pré-aquecidas em TG com razão de aquecimento de 10 °C/min até 140 °C seguido por aquecimento e subsequente análise em espectrofotômetro IR.

### *Difração de raios X de pó (DRXP)*

Os padrões de difração de raios X de pó foram coletados em difratômetro XPERT PANalytical, equipado com detector X'Celerator, usando radiação  $k_{\alpha}$  de tubo de cobre operando com 45 kV e 40 mA, faixa de  $5 - 40^{\circ} 2\theta$ , passo de scan de  $0.033^{\circ}$  e tempo de scan de 45 segundos. Os Soller, divergente e anti-dispersão usados foram  $0,04$  rad,  $0,25^{\circ}$  e  $0,5^{\circ}$ , respectivamente.

Para a realização das análises foi utilizado aquecimento. Em um dos experimentos foi realizada avaliação nas temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60, 70 e  $80^{\circ}\text{C}$  para o aquecimento e posteriormente nas mesmas temperaturas para o resfriamento. Além disso foi avaliado padrões de difração após 1 hora de resfriamento bem como em temperaturas mais elevadas, a  $140^{\circ}\text{C}$ .

Foram realizadas medidas em aquecimento utilizando para isso uma câmara de alta temperatura Anton Paar HTK16, com taxas de aquecimento/resfriamento de  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  nas temperaturas de 24, 30, 40, 50, 60 e  $80^{\circ}\text{C}$  para aquecimento e resfriamento para as amostras LVF rm e LVF g40. Além disso foram avaliadas possíveis alterações após 1 hora de resfriamento. A fim de identificar possíveis diferenças na hidratação ainda foram avaliadas as temperaturas de 30 e  $50^{\circ}\text{C}$  em aquecimento e em resfriamento.

### *Ressonância Magnética Nuclear em sólido (RMNs)*

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  em alta resolução foram obtidos utilizando CP/MAS com desacoplamento de próton durante a aquisição. Os experimentos de RMN em sólido foram realizados a temperatura ambiente e a 80 °C em espectrômetro Bruker Avance II operando a 300,13 MHz para prótons e equipado com sonda MAS de 4 mm. A frequência de operação para carbon foi de 75,46 MHz.

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

As fotomicrografias de LVF foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV (Japão). As amostras foram fixadas em base metálica usando fita dupla-face, revestidas a vácuo em Polaron E 5000 e diretamente analisadas. Foram utilizadas as resoluções de x300 e x1000 para avaliação das amostras LVF rm e VF r.

### *Microscopia óptica acoplada com placa de aquecimento (HotStage)*

Ensaio de microscopia com aquecimento foram realizados em microscópio Olympus BX50 equipado com um Mettler Toledo FP-82. As amostras foram aquecidas em razão de 10 °C/min até sua fusão total. Todo o processo foi filmado (software PVR plus). Todas as análises foram conduzidas com as amostras imersas em óleo mineral para melhor visualização da liberação da água do cristal. A calibração do equipamento foi realizada com padrão de referência cafeína (ponto de

fusão:  $235,6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), benzofenona ( $48,1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e ácido benzóico ( $122,3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Para a realização desta técnica foram seguidas as mesmas condições de aquecimento do DSC, porém se a presença de nitrogênio como gás de purga.

### *Determinação da Estrutura do Cristal*

Difração de raios X de pó de alta resolução (DRXP) para o levofloxacinó anidro (I) e hemidrato (II) foram coletados por capilar de vidro em luz X16C. O comprimento de onda foi selecionado com duplcromador de Si (111) e calibrado com padrão NIST  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . A incidência paralela da luz foi monitorada com câmara iônica.

Foi utilizado método de refinamento por Rietveld para as amostras hemidrato e anidra.

### *Tamanho de partícula - Master Sizer*

A distribuição granulométrica das amostras de levofloxacinó foi determinadas pelo método de difração a laser utilizando um analisador de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha (632,8 nm) de um laser de He Ne, com obscurecimento entre 20 e 30%.

Para as análises, cerca de 250 mg de cada uma das amostras foram previamente dispersas em acetato de etila, e adicionadas gota a gota até

atingir o nível de obscurecimento desejado. A distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de Frounhoffer e expressa em diâmetro por volume equivalente a 10 ( $d_{10\%}$ ), 50 ( $d_{50\%}$ ) e 90% ( $d_{90\%}$ ) do volume acumulado, e diâmetro médio ( $D[4,3]$ ). O span foi calculado segundo a equação abaixo.

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}}$$

### *Molhabilidade*

As análises de molhabilidade foram realizadas por determinação de ângulo de contato realizado usando Goniometro OCA 15EC (Filderstadt, Alemanha) com processamento de imagem de alta performance processado em instrumento Data Physics. Para as análises foi utilizado como líquido padrão água desionizada, com 5  $\mu\text{l}$  adicionada por seringa movida por motor automatizado a 25 °C. Os dados de ângulo de contato obtidos para as amostras LVF rm e LVF g40 são apresentados como a média de três análises.

### *Dissolução Intrínseca*

O método de quantificação do LVF para a determinação da VDI foi previamente otimizado e validado. As amostras de levofloxacin (100 mg) foram compactadas em discos usando uma prensa hidráulica com manômetro ASTA a 400 Kg e analisadas em um equipamento de dissolução VARIAN VK 7000. O meio de dissolução selecionado foi água 250 mL previamente aquecida a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As análises foram feitas na velocidade de rotação de 75 rpm, aparato 2 (USP) e as amostras foram coletadas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 20 minutos com reposição do meio para manutenção do volume total. As alíquotas foram filtradas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento Shimadzu LC10AT (Kyoto, Japão). O volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu\text{L}$  para todas as amostras. A fase móvel foi composta de trietilamina a 0,4% (em água ultrapura) pH 3,0 e acetonitrila (83:17; v/v) e eluída em fase reversa com coluna C18 Synergi Fusion (150 mm x 4,6 mm, 4  $\mu\text{m}$ ) Phenomenex (Torrance, EUA) a um fluxo de 1,0 mL/min e pré-coluna (4.0 mm x 3.0 mm). O comprimento de onda de emissão utilizado foi 292 nm e o de emissão foi 294 nm.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *6.1 Efeito da Recristalização e Moagem no Levofloxacino Hemidrato*

A caracterização de hidratos foi realizada por técnicas que se encontravam disponíveis no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e em outros Laboratórios parceiros. Dentre as técnicas utilizadas são citadas a microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria (TGA), infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e difração de Raios X de pó (DRXP), além de titulação por Karl Fischer. O trabalho teve por objetivo estudar o efeito da moagem e da recristalização em características do estado sólido do levofloxacino hemidrato.

A preparação do levofloxacino recristalizado (LVF r) foi realizada de acordo com o método de preparação do levofloxacino monohidrato apresentado por Kitaoka et al., 1995. O objetivo inicial desta preparação era obter o monohidrato do levofloxacino, porém, com a realização da análise por titulação de Karl Fischer e termogravimetria foi possível observar que se tratava da forma hemidratada do fármaco. Assim, resolveu-se caracterizar esse material a fim de saber quais diferenças poderiam ser observadas em relação à matéria-prima.

Para a determinação conteúdo de água foi realizada a comparação dos valores encontrados por titulação por Karl Fischer e análise por Termogravimetria (TG). Segundo dados das duas técnicas, os valores de água presente nas amostras LVF rm e LVF r se apresentaram bastante semelhantes, como demonstrado na Tabela 3 a seguir.

**Tabela 3 - Avaliação do conteúdo de água (%) por Karl Fischer (KF) e Termogravimetria (TG).**

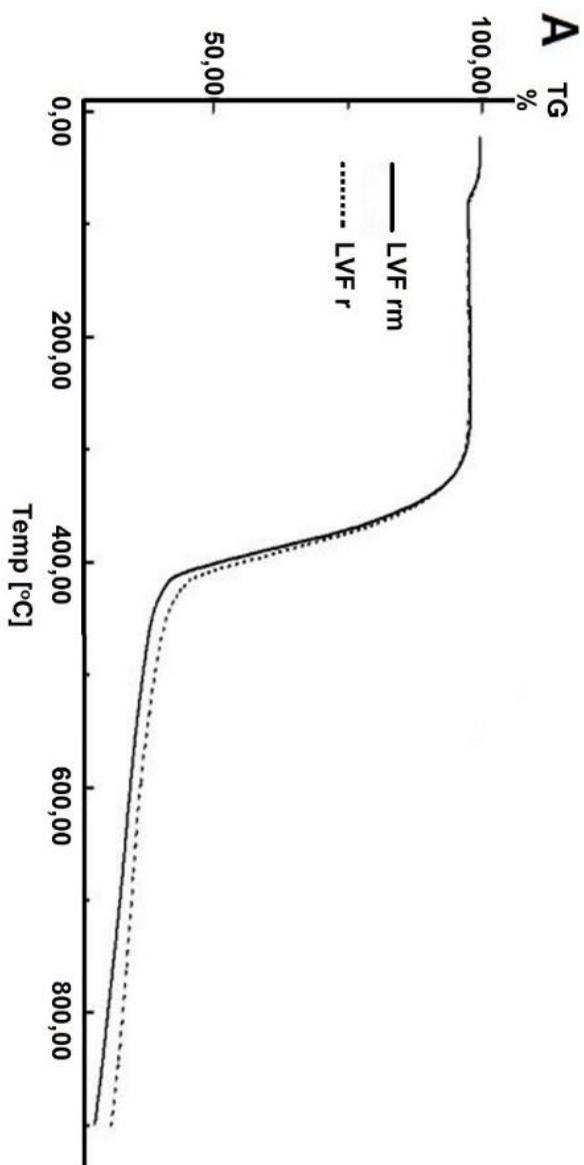
	<i>LVF rm (%)</i>	<i>LVF r (%)</i>
<b>TGA</b>	2.22	2.25
<b>KF</b>	2.76	2.77

Os conteúdos de água do LVF rm e do LVF r apresentaram porcentagens semelhantes, tanto para a análise por Karl Fischer (2,76 % para o LVF rm e 2,77 % para o LVF r) quanto para a análise termogravimétrica (2,22 % para o LVF rm e 2,25 para o LVF r). Os resultados sugeriram que o LVF r tratava-se do hemidrato, porém com estrutura cristalina diferente da matéria-prima, dado este a ser confirmado pelas outras técnicas realizadas neste estudo.

#### *Comportamento Térmico (DSC e TG)*

O comportamento térmico das amostras LVF rm e LVF r foram determinados através das técnicas termoanalíticas DSC e TG. As curvas

TG das amostras analisadas são apresentadas na Figura 4a. As curvas DSC (Figura 4b) das amostras LVF rm e LVF r revelaram os seguintes picos: LVF rm apresentou picos em 221,84 °C, 226,96 °C e 229,09 °C e em relação à amostra LVF r, em 220,87 °C e 229,54 °C. Estes resultados sugerem diferenças no perfil termoanalítico entre as amostras LVF rm e LVF r. Estas diferenças se devem, provavelmente, à desordens causadas no sistema ocasionadas pelo processo de recristalização da amostra. Estas diferenças são apresentadas pela curva TG apresentadas pela Figura 4a.



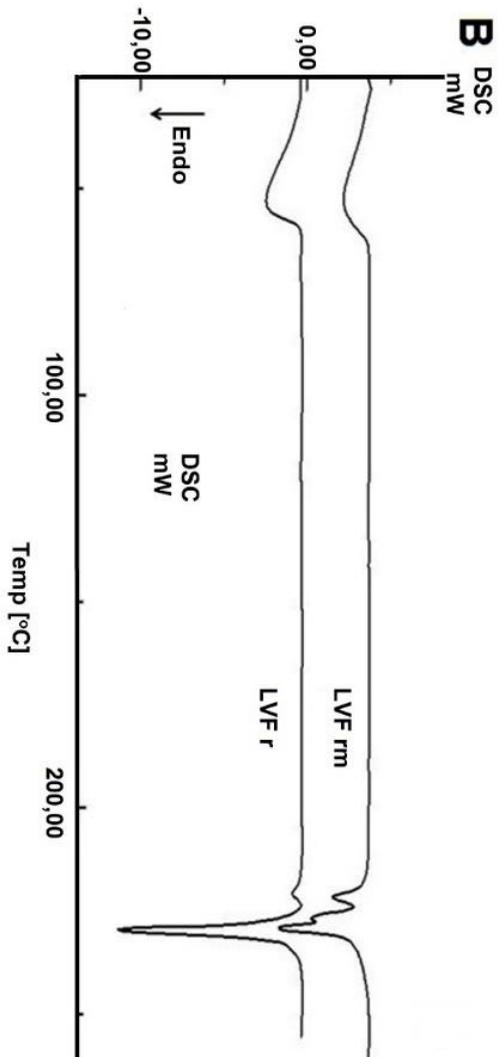


Figura 4 - a) Curva TG do LVF rm e LVF r; b) Curva DSC do LVF rm e LVF r.

A análise térmica demonstrou diferenças entre as duas amostras, conforme a curva TG apresentada pela figura 4a. Perceberam-se semelhanças no evento referente à perda de água, porém o perfil de degradação foi diferente entre o LVF rm e o LVF r. Esta diferença no perfil de degradação pode ser observada na mesma figura, onde é possível constatar uma menor perda de massa de degradação do LVF r. Este dado sugere uma diferença referente a cristalinidade dos dois materiais. Tais diferenças foram confirmadas por calorimetria exploratória diferencial (figura 4b). As curvas DSC para o LVF rm e LVF r apresentaram eventos endotérmicos para as duas amostras, sendo para o LVF rm em 221,84 °C, 226,96 °C e 229,09 °C; e para o LVF r em 220,87 °C e 229,54 °C, respectivamente. Estes dados mostraram-se semelhantes aos dados apresentados por Kitaoka et al., 1995, porém a amostra LVF r se comportou como um monohidrato. Dessa forma, as diferenças encontradas entre as amostras LVF rm e LVF r foram atribuídas devido à desordem causada no sistema pelo processo de recristalização utilizado na obtenção do LVF r, justificando assim o nome LVF r, fazendo referência à recristalização.

#### Difração de raios X de pós (DRXP)

Nenhuma mudança nos padrões de difração de raios X de pó foi observada para as amostras LVF rm e LVF r. A Figura 5 demonstra os padrões de difração para as amostras analisadas, sendo possível observar a mesma forma cristalina para todas as amostras.

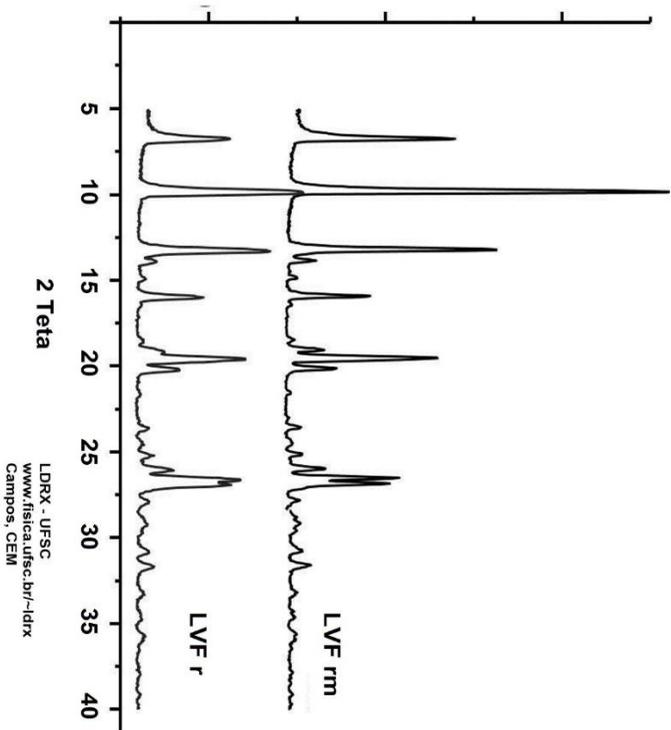


Figura 5 - DRXP para as amostras L VF r e L VF rm.

A partir destes resultados foram realizadas análises de difração de raios X, apresentadas pela figura 5. Observando-se a figura não foi possível comprovar mudanças nos padrões de difração tanto do LVF rm quanto do LVF r. Assim, foi constatada a mesma estrutura cristalina para as duas amostras analisadas.

#### Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e RAMAN

A Figura 6 e 7 representa o espectro de infravermelho e Raman das amostras LVF rm e LVF r. Todas as amostras apresentaram bandas similares aos dados relatados na literatura. Além disso, não foi possível observar nenhuma diferença entre as amostras analisadas.

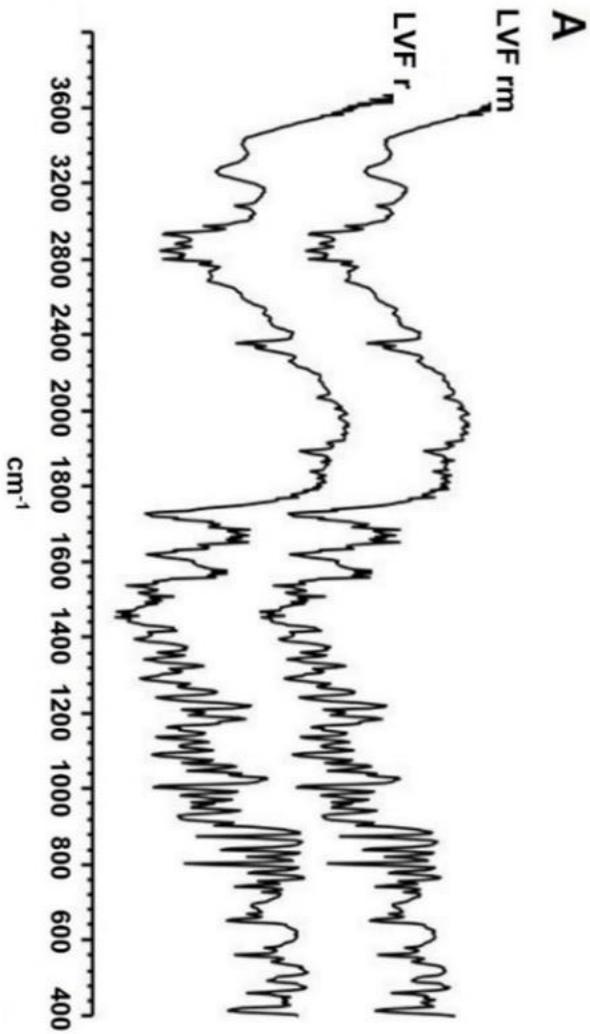


Figura 6 - FTIR para as amostras LVF rm e LVF r.

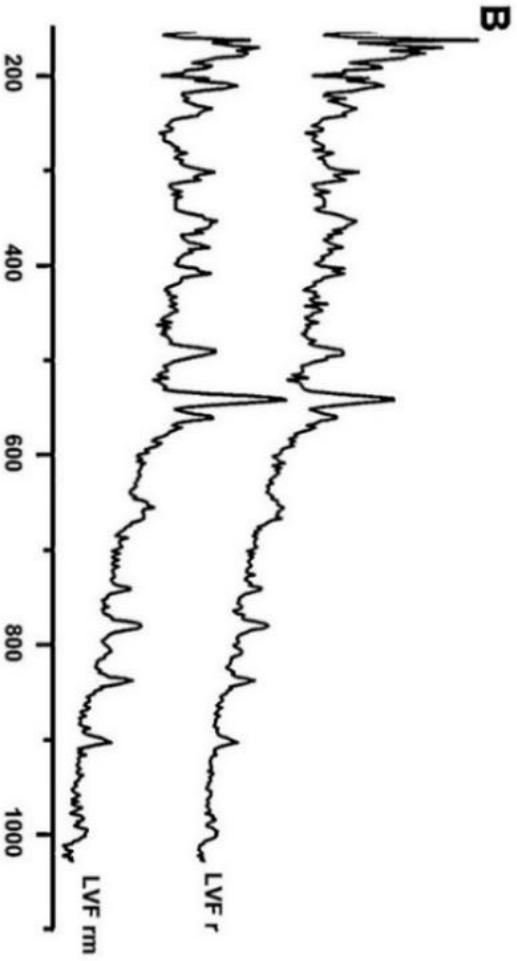


Figura 7 - RAMAN para as amostras LVF rm e LVF r.

O mesmo resultado foi obtido com as técnicas de infravermelho por transformada de Fourier, Raman e ressonância magnética nuclear no estado sólido (figuras 6, 7 e 9). Esta última corrobora com os dados de difração de raios X de pó, os quais mostraram isomorfismo entre as amostras LVF rm e LVF r.

### Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (RMNs)

A técnica de RMN em sólido demonstrou resultados similares para ambas às amostras (LVF rm e LVF r). Dessa forma, de acordo com os resultados observados é possível observar a ocorrência de isomorfismo entre as amostras. Estes resultados são apresentados na Figura 9.

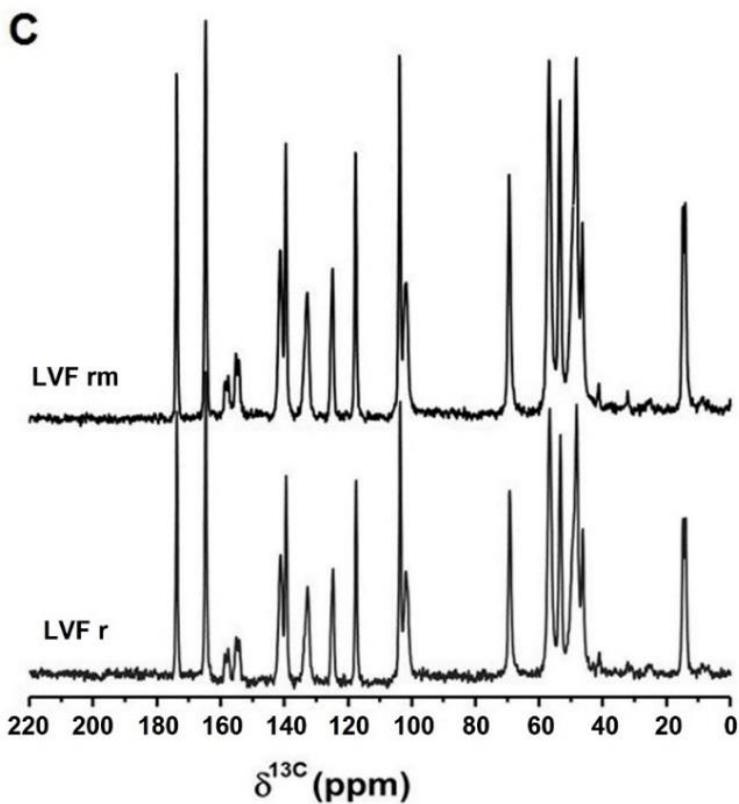
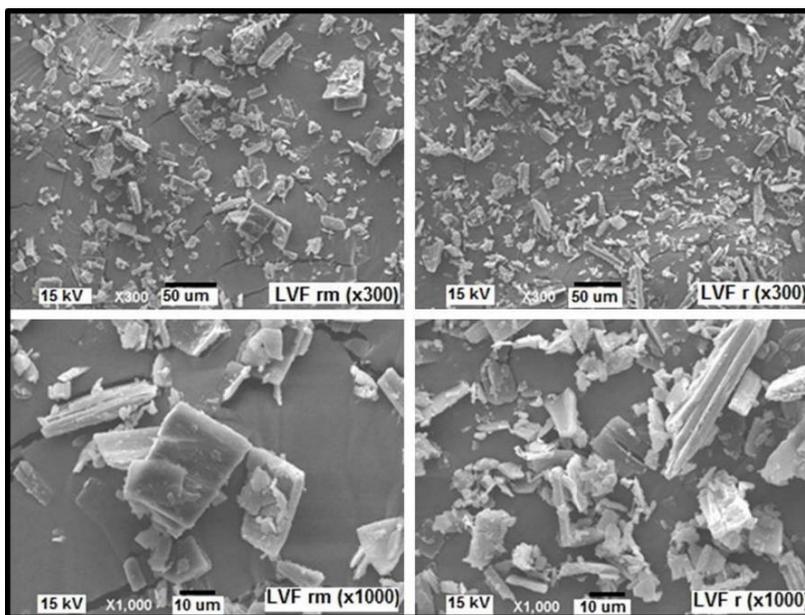


Figura 8 - ssNMR para as amostras LVF rm LVF r.

*Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A Figura 10 apresenta imagens de microscopia para as amostras de LVF rm e LVFr. Através da figura é possível observar pequenas diferenças na forma das partículas entre as amostras LVF rm e LVF r. A amostra LVF rm apresenta tamanhos de partícula bem variados e menos homogêneos quando comparados a amostra LVF r, bem como apresenta formas mais cúbicas.



**Figura 9 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para as amostras LVF rm e LVF r.**

---

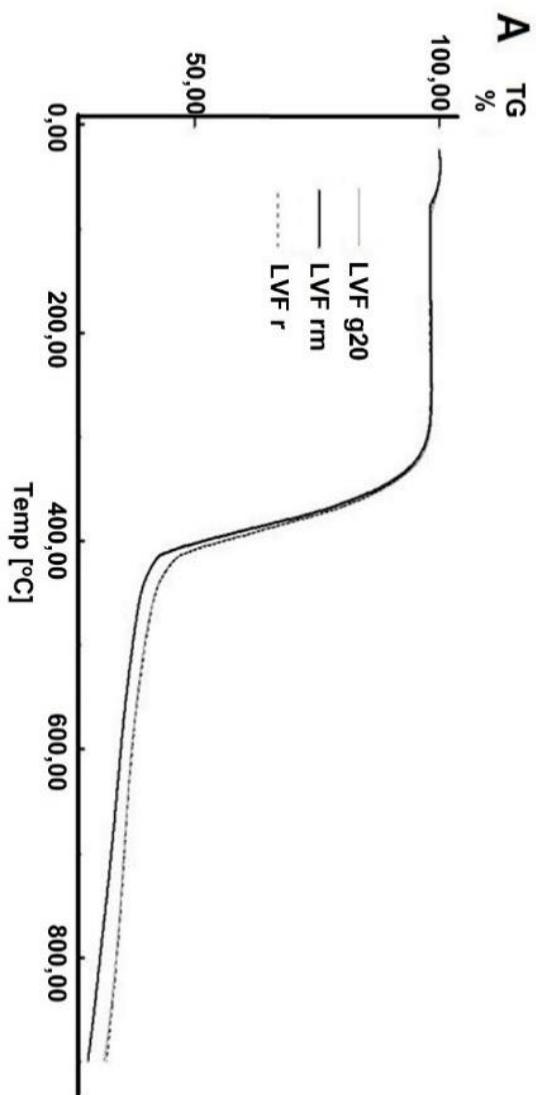
A fim de averiguar a morfologia das duas amostras foi realizada análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 10 apresenta as fotomicrografias para o LVF rm e LVF r. O MEV demonstrou pequenas diferenças entre as duas amostras, principalmente na forma das partículas.

### *Efeito da Moagem*

Uma vez que foi observada diferença entre as amostras LVF rm e LVF r somente através das técnicas termoanalíticas, decidiu-se realizar a moagem da matéria-prima (LVF rm) e observar as alterações que o processo poderia causar na estrutura cristalina do material. Para tanto, estipulou-se os tempos de 5, 10 e 20 minutos de moagem.

A fim de avaliar o efeito que a moagem pode causar nas características físico-químicas da amostra, foi realizado um estudo termoanalítico das mesmas. A Figura 11a mostra os efeitos da moagem no perfil termogravimétrico (TG). Através da Figura 11a é possível observar que a amostra LVF r apresenta perfil termogravimétrico semelhante ao perfil da amostra LVF rm, ou seja, mesma perda de massa relativa à água e mesmo perfil de degradação térmica. Porém, a amostra triturada (LVF g) apresenta perfil de degradação térmica diferente das amostras de LVF rm e LVF r. As curvas DSC, representadas pela Figura 11b apresentam as mesmas características obtidas pela termogravimetria (Figura 11a). As amostras triturada e recristalizada apresentam o mesmo perfil térmico. Quanto maior o tempo de moagem da amostra, mais

semelhante se torna o perfil térmico comparado com a amostra recristalizada. As curvas DSC são apresentadas na Figura 11b. As curvas DSC apresentam as mesmas características obtidas pelas curvas TG. Isto demonstra que tanto a amostra triturada quanto a recristalizada causam grau de desordem no sistema, interferindo com o perfil térmico das amostras. É bem conhecido que o processo de moagem causa desordens e defeitos. No caso da recristalização, é importante mencionar que esta pode apresentar, durante seu preparo, a dessolvatação, passo este que pode causar desordens na amostra, tais como as ocorridas para as amostras analisadas.



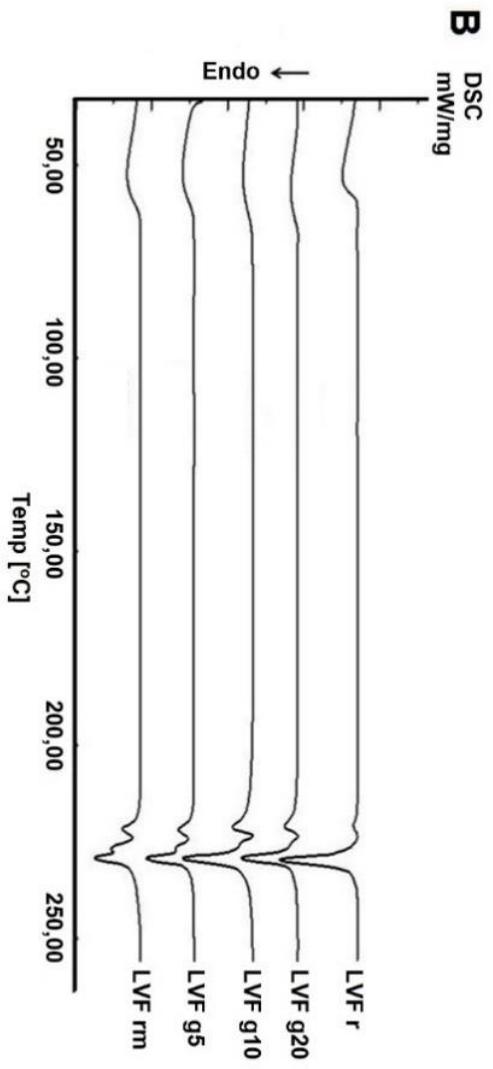


Figura 10 - a) Efeito da moagem nas curvas TG; b) Efeito da moagem nas curvas DSC.

Através da figura 11a foi possível analisar o efeito da moagem através da termogravimetria. Comparando-se a amostra LVF g com o LVF r, percebe-se a semelhança entre as amostras, ou seja, as mesmas perdas de massa referentes à degradação são observadas para ambas as amostras. Em relação ao evento referente à perda de massa da molécula de água, as duas amostras se mostraram semelhantes, ou seja, tratavam-se da forma hemidrato.

As curvas DSC, apresentadas na figura 11b demonstram o mesmo perfil termoanalítico, assim como observado através das curvas termogravimétricas. Isto demonstra que ambas as amostras, trituradas e recristalizadas, causam uma desordem no sistema, interferindo no perfil termoanalítico. É bem conhecido que o processo de moagem poderá gerar desordem e defeitos, porém durante o processo de recristalização deve-se levar em conta o processo de dessolvatação, passo este que também pode alterar a amostra.

As curvas termoanalíticas permitiram observar diferenças entre as amostras estudadas. As curvas termogravimétricas apresentaram a mesma relação de água presente nas amostras (dados confirmados por titulação por Karl Fischer), porém com perfil de degradação diferenciado. Da mesma forma, as curvas calorimétricas apresentaram diferenças no perfil termoanalítico, demonstrando diferenças devido a defeitos criados nas amostras pelos processos de recristalização e moagem, comparados com a matéria-prima intacta. Através de técnicas complementares, tais como DRX de pós, RMN de sólido, FTIR e Raman, foi possível concluir que ambas as amostras apresentaram mesma estrutura cristalina. As análises por microscopia eletrônica de

varredura demonstraram pequenas diferenças na forma das partículas, corroborando com os dados termoanalíticos.

## ***6.2 Efeito desidratação na estrutura cristalina e determinação estrutural da forma anidra do levofloxacino***

### *Caracterização (Hemidrato e Anidro)*

A figura 12 a seguir apresenta a curva DSC e TG para o levofloxacino hemidrato. A curva TG demonstra uma perda de água de 2,205% com o aquecimento. O evento de degradação da amostra ocorre a partir de 300 °C e termina em torno de 400 °C. A curva DSC apresenta eventos endotérmicos em 88,25 °C, 225,65 °C, 227,78 °C e 232,26 °C, respectivamente.

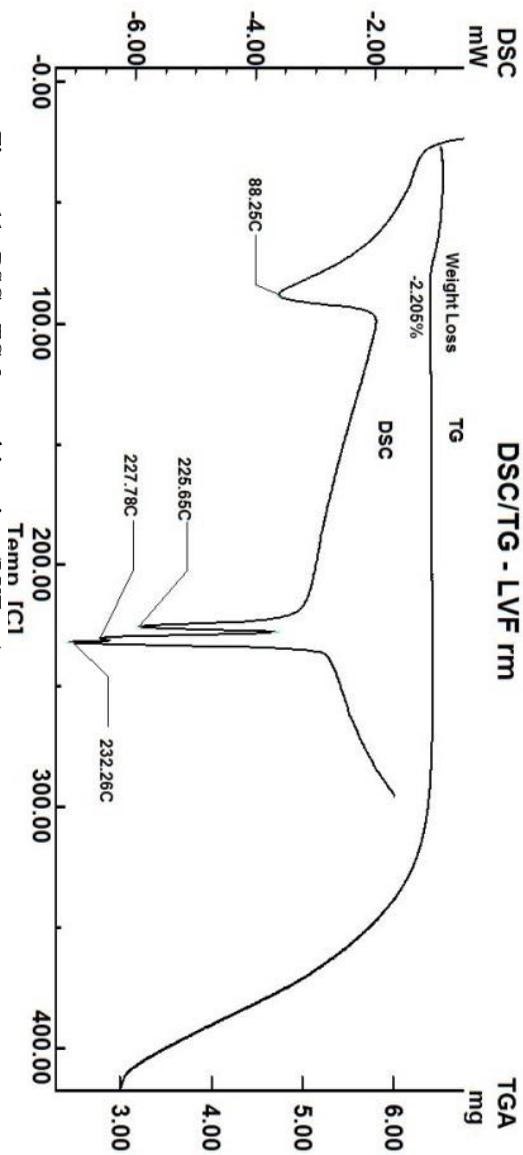


Figura 11 - DSC e TG da matéria-prima (LVF rm).

Na figura 13, que representa as curvas DSC do levofloxacino hemidrato e anidro, é possível observar a ausência do evento endotérmico em 117,86 °C, referente à molécula de água da amostra, porém mantém-se os outros eventos característicos do hemidrato.

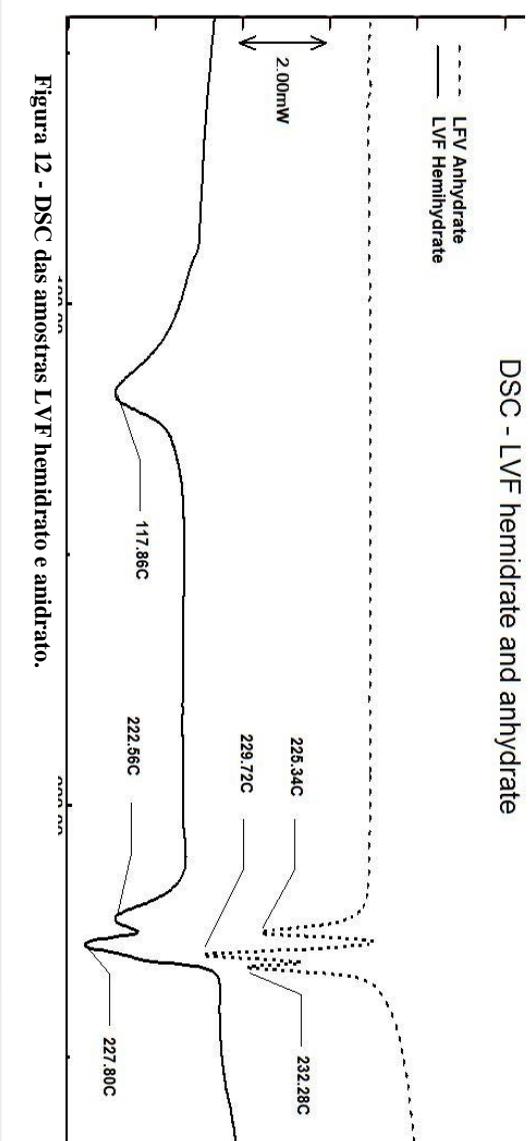


Figura 12 - DSC das amostras LVF hemidrate e anhidrate.

O levofloxacino hemidrato possui um perfil termoanalítico (DSC e TG), representado na figura 12 que demonstra a desidratação do fármaco até 80 °C. O evento de desidratação representa 2,2 % da massa da amostra, sendo estequiometricamente condizente com a meia molécula de água ligada na estrutura do fármaco.

Ao ser realizado um ciclo de aquecimento com a amostra (Figura 13), desidratando, resfriando e realizando novo aquecimento, observou-se o perfil calorimétrico da forma anidra. Isso foi possível pelo fato de as análises serem realizadas com cadinho fechado, dificultando a rehidratação com o resfriamento. Além disso, não houve tempo hábil para ocorrer este processo, pois as análises foram realizadas em sequência, na forma de ciclo. Análises realizadas com cadinho aberto não permitem observar esse tipo de comportamento térmico, pois a rehidratação para a matéria-prima é muito rápida.

As figuras 14 (a e b) representam os padrões de difração de raios X da amostra LVF rm com aquecimento e resfriamento. A figura 14 (a) demonstra alterações nos padrões de difração em 6° e 10° 2 $\theta$ , principais eventos relacionados a forma hemidrato do fármaco. A amostra foi aquecida até 80 °C e os padrões foram coletados nas temperaturas 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C.

A figura 14 (b) representa o resfriamento da amostra LVF rm a partir de 80 °C até 25 °C. É possível que os padrões de difração retornam a sua forma original conforme a amostra resfria. Essas mudanças são observadas também para as reflexões 6° e 10° 2 $\theta$ .

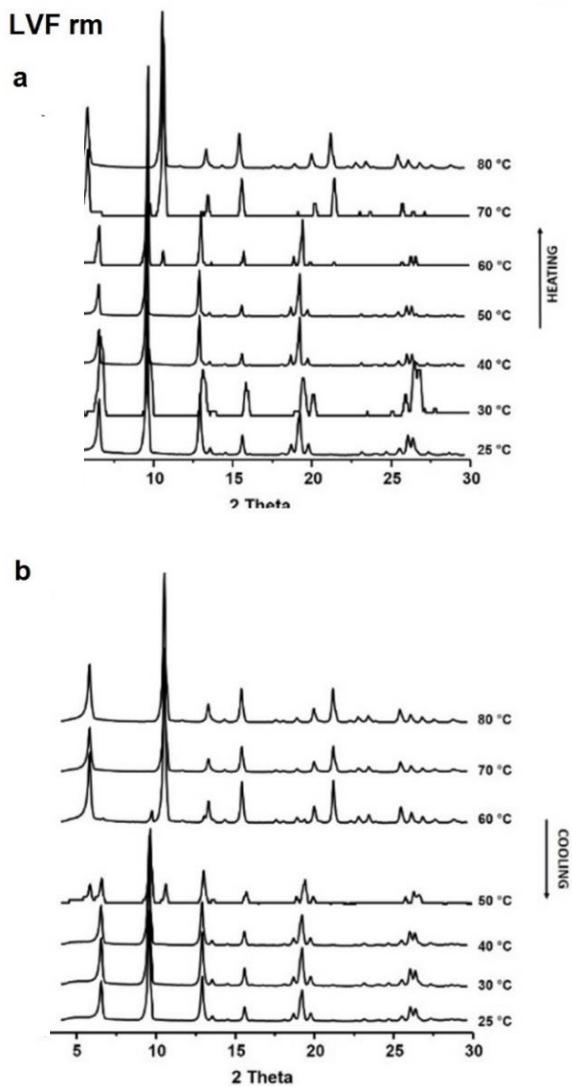


Figura 13 - DRXP do LVF rm com a) aquecimento e b) resfriamento; representando as formas hemidrato e anidra.

As análises de difração de raios X de pós foram realizadas com aquecimento a fim de se observar o processo de desidratação e de que forma isso pode influenciar nos padrões de difração de raios X e, por consequência, na estrutura cristalina do fármaco.

As figuras 14 (a) apresentam o processo de desidratação em função do aquecimento. Foi possível observar que a partir de 50 °C já ocorre alteração na estrutura do cristal do fármaco. Após essa temperatura se observa o padrão de difração da forma anidra, com mudanças nas posições  $6^\circ$  e  $10^\circ 2\theta$ .

Após o ciclo de aquecimento, a amostra foi resfriada tendo sido avaliadas possíveis alterações estruturais, ou seja, mudanças na estrutura cristalina com o resfriamento. A figura 14 (b) demonstrou que na temperatura de 50 °C e abaixo desse valor houveram mudanças dos padrões de difração, conforme apresentados antes do processo de aquecimento. Isso comprova a rehidratação da amostra para a forma hemidrato original. Assim, percebe-se que a forma hemidrato possui facilidade de fluxo da molécula de água através da estrutura do cristal, pois apenas com o resfriamento já ocorre o processo de hidratação.

A figura 15 abaixo representa um comparativo entre as formas anidra e hemidrato do levofloxacino e a forma anidra a 140 °C, a fim de se observar alterações nos padrões com o aquecimento a temperaturas superiores ao evento de desidratação.

Através da figura pode ser observado que a amostra anidra apresenta padrões de difração diferentes do hemidrato, nas mesmas reflexões

citadas na figura anterior (Figura 14 a e b). Além disso, é possível observar que mesmo se elevando a temperatura a 140 °C, a forma anidrato se mantém inalterada, ou seja, com as mesmas reflexões do LVF anidrato.

Foi possível observar que mesmo a temperaturas maiores, porém antes da fusão, há uma estabilidade da estrutura do anidro, pois não houve alteração do padrão de difração a 140 °C, quando comparado com o perfil da forma anidra.

A figura 15 mostra a permanência da estrutura cristalina do fármaco após o resfriamento. Constata-se que logo após o resfriamento ocorre a rehidratação espontânea do levofloxacino, se mantendo estável a partir daí, mesmo após 1 hora do resfriamento.

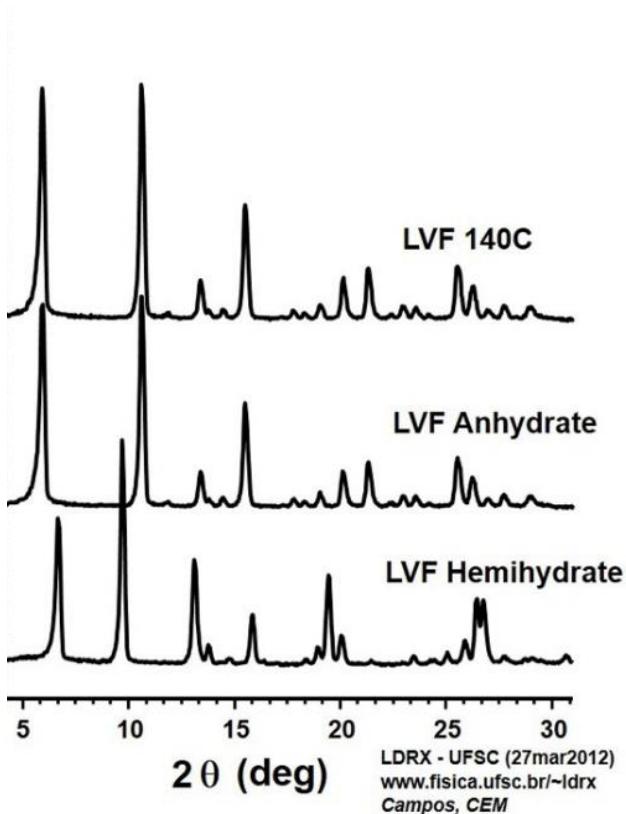


Figura 14 - DRXP do LVF hemodrato e anidro.

A figura 16 a seguir apresenta o processo de resfriamento do LVF rm em tempos diferentes. Através da figura é possível observar que não há alterações nos padrões de difração de raios X para nenhuma das amostras, onde mesmo 1 hora após o resfriamento não ocorre mudanças nos padrões de difração da amostra.

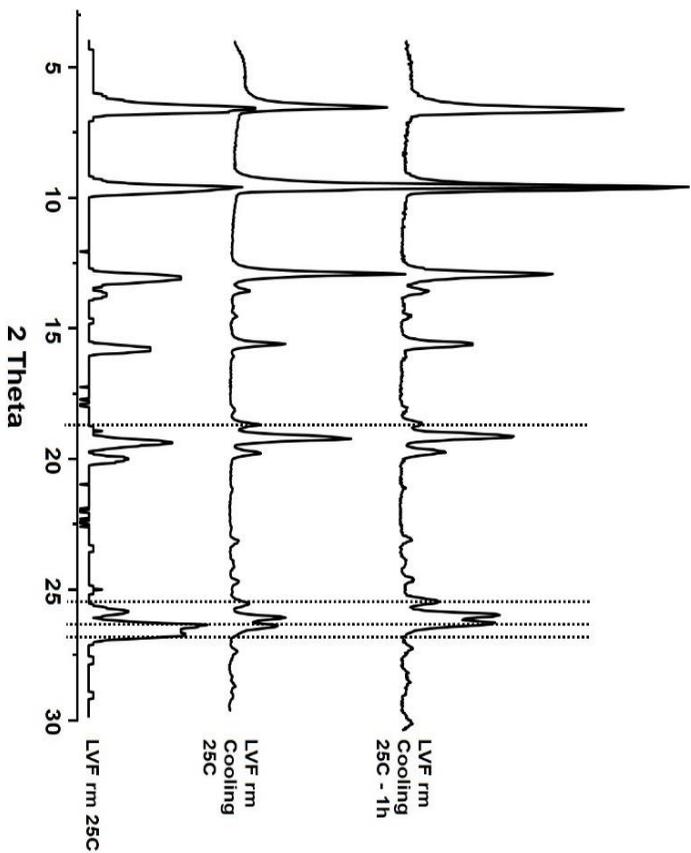


Figura 15 - DRXP do LVF hemodrato e anidro.

### *Determinação Estrutural do Levofloxacino Anidro*

Uma vez concluídos os estudos do fármaco e de sua forma anidra, foi realizada a determinação estrutural, tanto do levofloxacino hemidrato quanto da forma anidra.

A estrutura cristalina do levofloxacino hemidrato e de sua forma anidra não ainda haviam sido completamente determinadas. Na base de dados da Cambridge (programa Mercury 3.0) existe apenas a célula unitária da forma hemidrato, porém os outros parâmetros de rede não estão ainda determinados. Dessa forma, deu-se início nos estudos de determinação destas estruturas. Um artigo publicado em 2012 (Gorman et al., 2012) apresenta a determinação estrutural do levofloxacino hemidrato, o que ajudou a melhor compreender os estudos realizados até então. Além disso, esse trabalho veio de encontro aos resultados achados até aqui corroborando com nossos resultados e conclusões sobre o processo de hidratação e desidratação bem como sobre como a molécula de água está arranjada na célula unitária.

Contando com a colaboração do professor Peter Stephens da Stony Brook University, NY, USA, e da professora Silvia Lucia Cuffini da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), foi realizada a determinação da estrutura cristalina do levofloxacino em sua forma anidra, uma vez que Gorman (Gorman et al., 2012) e colaboradores já determinaram a forma hidratada. A determinação estrutural permite melhor entendimento das características físico-químicas do cristal, sendo esta de fundamental importância para desenvolvimento de formas

farmacêuticas, bem como para o controle de qualidade do pó e do produto acabado.

A partir dos dados obtidos pela determinação estrutural, foi possível realizar a comparação da estrutura da forma hemidrato e anidra, como apresentado pela Tabela 4.

**Tabela 4 - Comparativo de parâmetros de célula entre o levofloxacino hemidrato e sua forma anidra.**

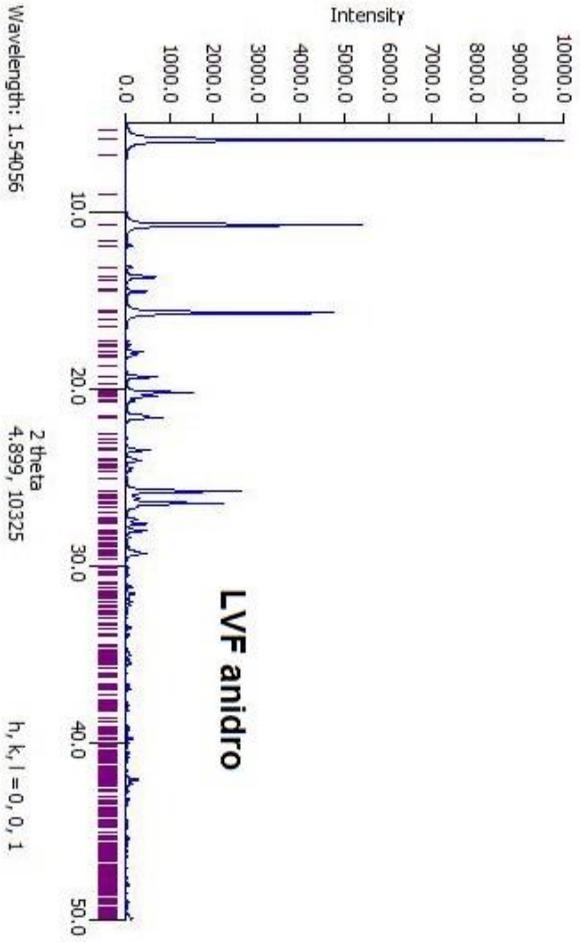
	<b>Levofloxacino Anidro - pó</b>	<b>Levofloxacino Hemidrato - pó</b>	<b><sup>1</sup>Levofloxacino Hemidrato – monocristal (Gorman, 2012)</b>
<b>Nome</b>	Levofloxacino	Levofloxacino hemidrato	Levofloxacino hemidrato
<b>Fórmula</b>	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	$C_{18}H_{20,8}FN_3O_{4,4}$	$C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot 5H_2O$
<b>Grupo espacial</b>	$C_2$	$C_2$	$C_2$
<b>Tamanhos de célula</b>	a)30,8109 b)6,9030 c)17,1141	a)29,1298 b)6,8854 c)18,8413	a)28,758 b)6,799 c)18,765
<b>Ângulos de célula</b>	$\alpha$ )90,0 $\beta$ )105,75 $\gamma$ )90,0	$\alpha$ )90,0 $\beta$ )114,08 $\gamma$ )90,0	$\alpha$ )90,0 $\beta$ )113,85 $\gamma$ )90,0
<b>Volume de célula</b>	3503,2	3450,0	3355,7
<b>Z</b>	Z:8	Z:8	Z:8

<sup>1</sup> – Gorman e colaboradores 2012 determinaram a estrutura do levofloxacino hemidrato a partir do monocristal, diferente deste trabalho, que obteve todos os dados a partir do pó.

Com base nos dados obtidos também foi possível realizar a comparação dos padrões de difração de raios X do levofloxacino hemidrato e de sua forma anidra.

A tabela 4 foi elaborada com dados obtidos por Gorman e colaboradores (Gorman et al., 2012) (levofloxacino hemidrato) e comparado com os dados obtidos por nosso grupo de trabalho a partir do pó (levofloxacino hemidrato e anidrato). É possível observar, pela tabela, que Gorman obteve resultados bastante próximos aos dados desse trabalho para a forma hemidrato, mesmo tendo ele obtido estes dados a partir do monocristal. Dessa forma, pode ser comprovado de que a molécula de água está ligada na estrutura cristalina da forma hemidrato. Além disso, os dados obtidos para a forma anidra demonstram a ausência da água nesta estrutura. Os dados estruturais foram apresentados também na tabela 4.

A Figura 17 (a e b) representa os padrões de difração de raios X, através de luz Sincrotron, das análises de determinação estrutural realizadas por nosso grupo, tanto para o LVF hemidrato, quanto para sua forma anidra.





A figura 17 (a e b) permite observar que as mudanças nos padrões de difração de raios X de luz Sincrontron para a forma hidratada e a forma anidra são idênticas ao observado na figura 6.2.3.

A seguir, a Figura 18 apresenta a estrutura cristalina do levofloxacino anidro, obtido por dados de luz Sincrontron, que permitiram o refinamento estrutural.

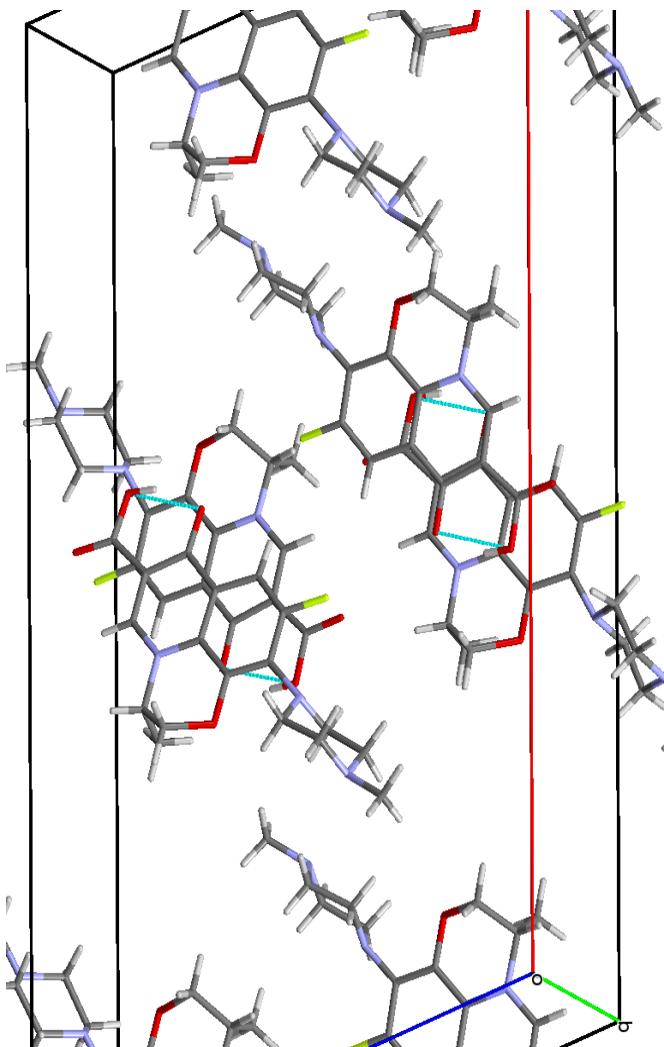


Figura 17 - Estrutura cristalina obtida através dos resultados de luz Sincrotron para a forma desidratada (LVF anidro) do fármaco levofloxacinio.

É possível observar que dentro de célula unitária não há presença da molécula de água como parte integrante da estrutura cristalina, confirmando tratar-se da forma anidra.

Da mesma forma que para a figura 18, a forma anidrato do levofloxacino, a Figura 19 apresenta a estrutura cristalina do levofloxacino hemidrato, obtido por dados de luz Sincrontron, que permitiram o refinamento estrutural.

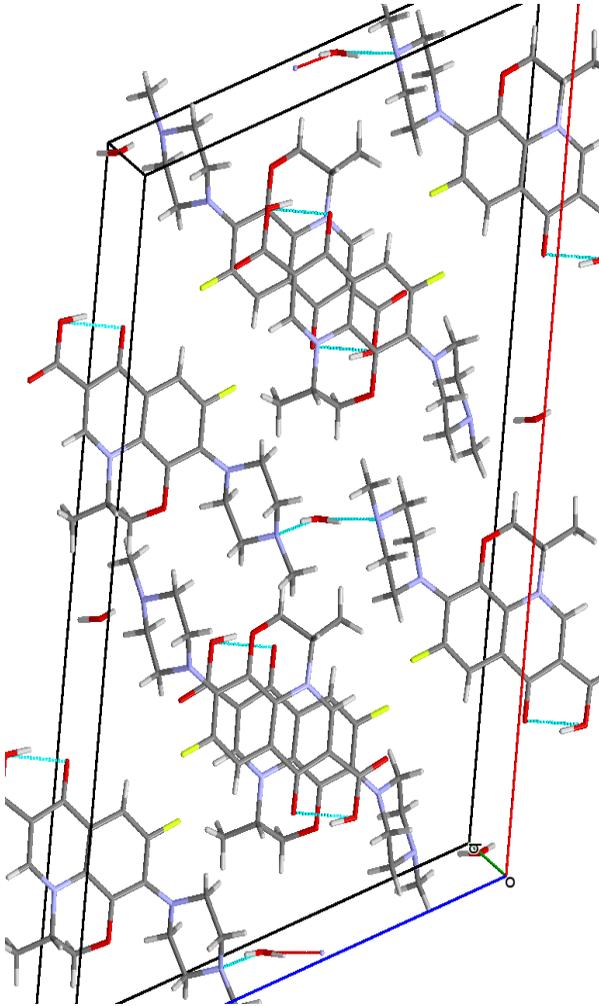
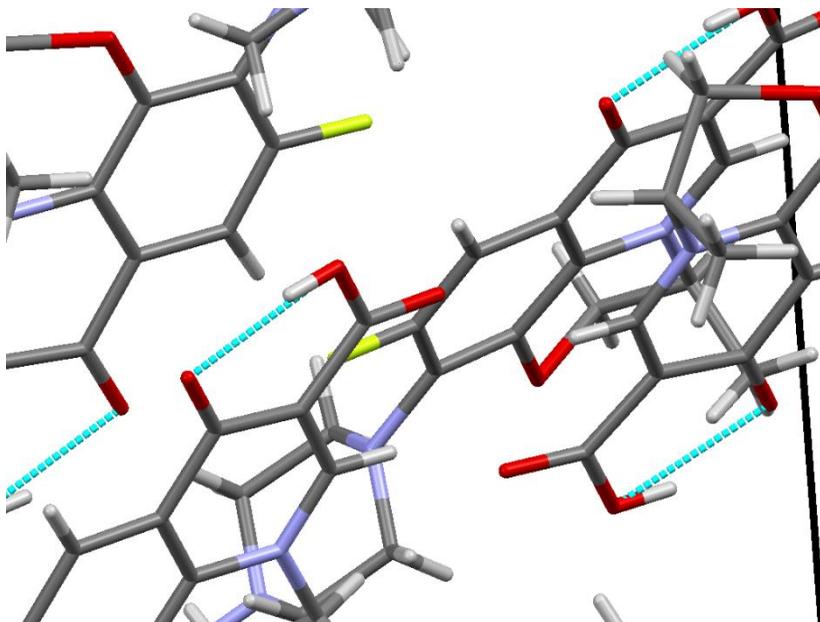


Figura 18 - Estrutura cristalina obtida através dos resultados de luz Sincrotron para a forma hidratada (LVF hemidrato) do fármaco levofloxacino.

É possível observar como ocorre a ligação da molécula de água para a forma hemidrato e como é representada a estrutura do fármaco anidro, sem ligação de água.

Para o LVF anidro (Figura 18) não há presença de moléculas de água na estrutura da célula unitária. As ligações de hidrogênio presentes ocorrem somente entre os grupamentos do próprio fármaco. Já na figura 19, representando a forma hidratada do LVF, é possível observar as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e as moléculas do fármaco, demonstrando haver a participação da molécula de água na estrutura cristalina do fármaco. Estas ligações, tanto no hemidrato quanto no anidro auxiliam no entendimento de como ocorre o processo de desidratação da molécula bem como ajudam a compreender como o processo de moagem afeta a estrutura do fármaco.

A Figura 20 abaixo demonstra a molécula do fármaco anidro sem a presença da molécula de água ligando à molécula do fármaco.



**Figura 19 - representação da molécula de levofloxacino sem ligação de água na estrutura cristalina.**

A seguir, na figura 21, é demonstrado o local onde a molécula de água se liga no fármaco.

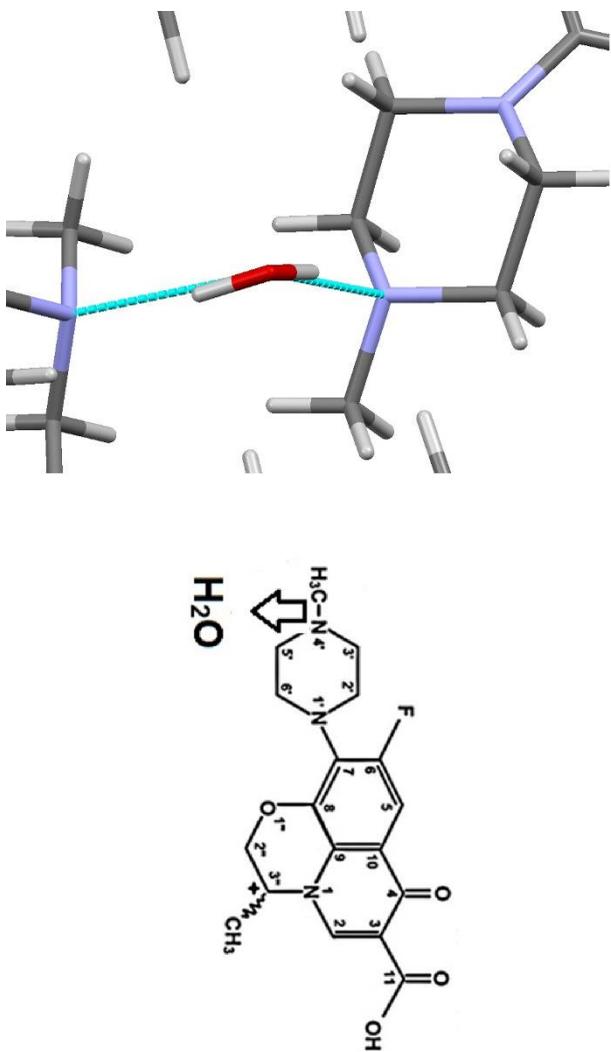


Figura 20 - representação da molécula de levofloxacino sem ligação de água na estrutura cristalina

Através da figura 21 observa-se que a molécula de água, na forma hidratada do levofloxacinó, ocorre na posição 4'.

### ***6.3 Efeito da moagem na estrutura cristalina do Levofloxacinó hemidrato***

#### Comportamento Térmico

Na figura 22, a curva TG apresenta o ciclo de aquecimento das amostras LVF rm e LVF g40. Ambas as amostras foram submetidas a um ciclo de aquecimento variando de 25 °C a 140 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min, resfriamento até 25 °C e novo aquecimento de 25 °C até 900 °C. Como pode ser observado, a primeira rampa de aquecimento corresponde a perda de massa referente à molécula de água presente na amostra, tanto para o LVF rm quanto para o LVF g40. A figura comprova que ambas as amostras, uma vez aquecidas até 80 °C, sofrem processo de desidratação. Quando resfriadas e aquecidas novamente, percebe-se a ausência de água na amostra, demonstrando se tratarem de formas anidrato. De outra forma, o perfil de degradação térmica é diferente para as duas amostras, indicando que a amostra LVF g40 sofreu alguma alteração estrutural. Os dados podem ser observados na Tabela 5 a seguir.

Porém, no que se refere ao processo de desidratação as duas curvas termogravimétricas apresentam os mesmos valores de perda de massa de água, cerca de 2 %.

**Tabela 5 - Resultados das curvas TG para o LVF rm e LVF g40.**

<b><i>LVF rm</i></b>	Temp [°C]	66,78
	$\Delta m$ [%]	-2,306
<b><i>LVF g40</i></b>	Temp [°C]	77,00
	$\Delta m$ [%]	-1,972

A tabela 5 apresenta os dados termogravimétricos. Há uma perda de massa semelhante para as duas amostras, um pouco menos intensa para o LVF g40, indicando que a moagem torna mais difícil a liberação da água da estrutura.

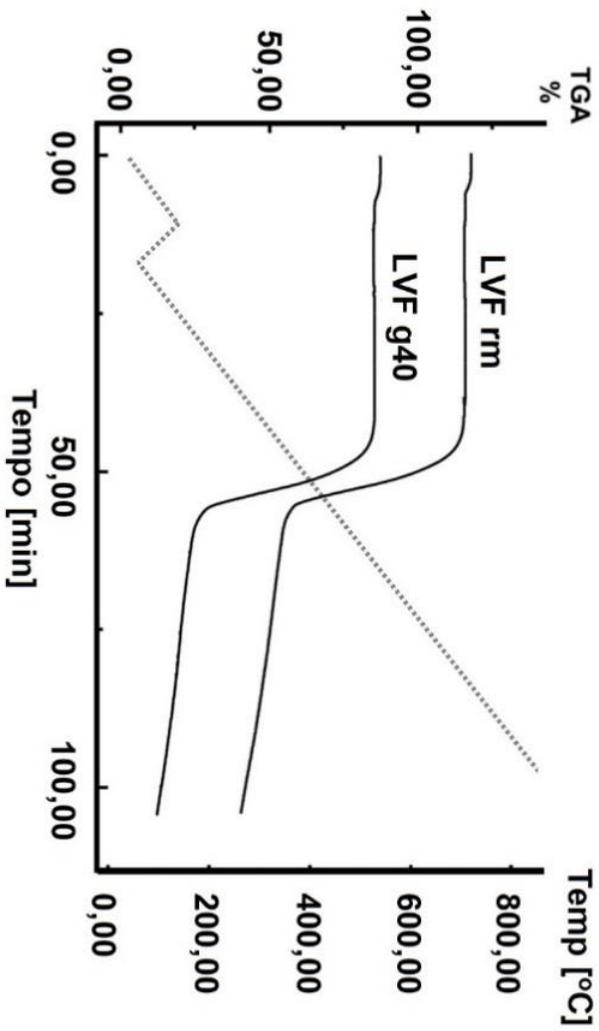


Figura 21 - Curva TG para o LVF rm e LVF g40. Ambas as amostras foram submetidas ao ciclo de aquecimento.

A seguir, a Figura 22 apresenta o ciclo de aquecimento e resfriamento do LVF rm e LVF g40. Até atingir 80 °C, as duas amostras perdem a mesma quantidade de massa, 2,557% e 2,367 % para o LVF rm e LVF g40, respectivamente. Porém, durante o processo de resfriamento, o ganho de massa é diferente para as duas amostras. Para a amostra LVF rm há uma ganho de massa de 1,569 % ao atingir 40 °C, enquanto para a amostra LVF g40 esse ganho é menor, com valor de 0,031 %.

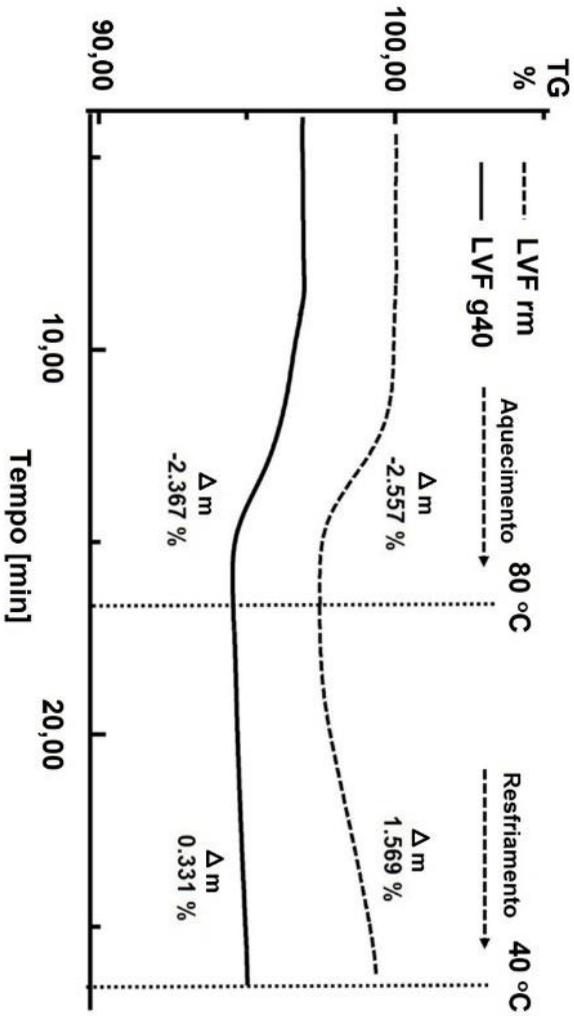


Figura 22 - TG com ciclo de aquecimento para as amostras LVF rm e LVF g40 apresentando variações de massa nas temperaturas de 80 oC no aquecimento e 40 oC no resfriamento.

A perda da molécula de água pode ser observada também pela análise em DSC com ciclo de aquecimento, como observado pela Figura 24, a seguir.

A figura 23 corrobora com este resultado, pois demonstra que a amostra LVF g40, ao sofrer tratamento térmico (aquecimento e resfriamento), tem menor ganho de massa, apontando que a rehidratação se tornou mais difícil. Esse processo de rehidratação mais crítico tem relação direta com o processo de moagem e com os defeitos da estrutura cristalina.

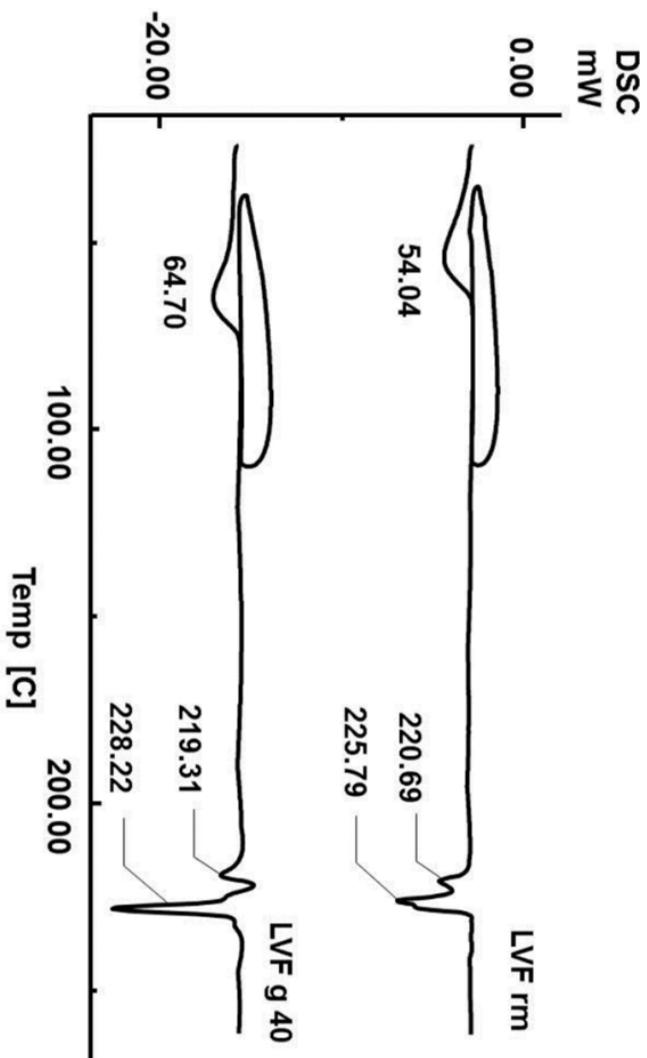


Figura 23 - Curvas DSC com ciclo de aquecimento para o LVF rm e LVF g40.

A figura 25 demonstra as mudanças no perfil calorimétrico conforme o tempo de moagem. Através da figura é possível observar que ao passo que se aumenta o processo de moagem, há uma mudança considerável no perfil da curva DSC, ou seja, a amostra LVF g40 sofre uma alteração significativa quando comparada com a amostra LVF rm. Também é possível observar que o tratamento térmico desidrata a amostra.

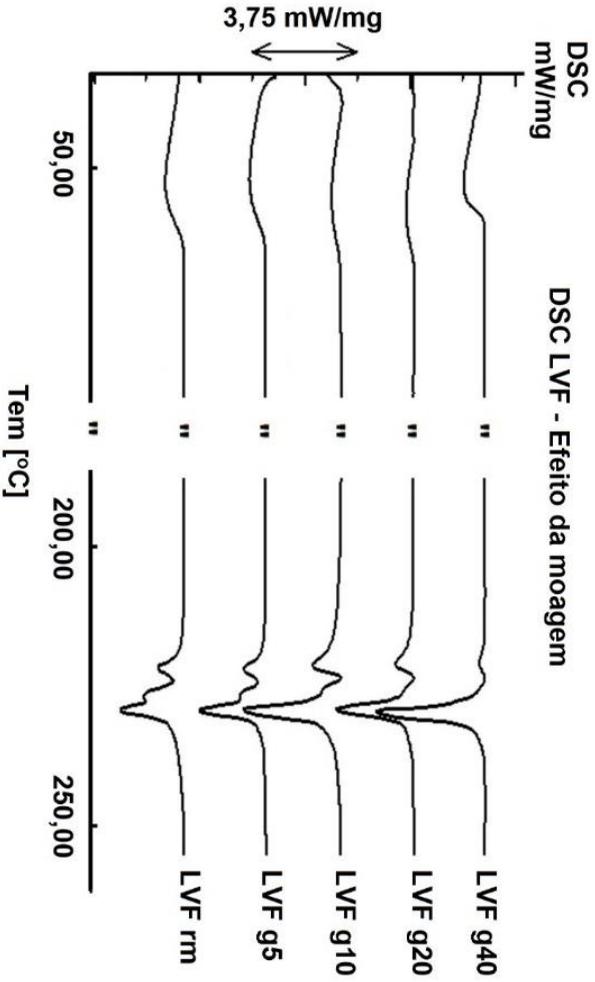


Figura 24 - DSC do levofloxacino hemidrato (LVF rm) e do triturado em diferentes tempos de moagem (LVF g5 – 5 min; LVF g10 – 10 min.; LVF g20 – 20 min.; LVF g40 – 40 min.).

A fim de complementar os resultados apresentados por TG e DSC, os valores de entalpia e temperatura foram agrupados para cada uma das amostras (Tabela 6). As curvas DSC mostraram três eventos diferentes. O primeiro evento, em 54,04 °C representa a perda de massa referente à molécula de água presente na estrutura cristalina do fármaco e o segundo e terceiro eventos (220,69 °C e 225,79 °C, respectivamente) representam eventos de fusão do LVF.

Por outro lado, em relação ao LVF g40, a perda de massa de água ocorre a cerca de 10 °C acima do observado para a amostra LVF rm. O segundo e terceiro eventos ocorrem a 219,31 °C (-1.23 J/g de entalpia) e 228,22 °C (-13.84 J/g de entalpia), respectivamente.

A figura 25 mostra a influência do tempo de moagem no perfil calorimétrico do fármaco. Percebe-se que quanto maior o tempo de moagem, maior o grau de defeitos causados na estrutura, uma vez que o perfil térmico se altera significativamente após 40 minutos de processamento. A tabela 6 apresenta os valores relativos a estas alterações. Já no início do evento calorimétrico é possível observar diferença de cerca de 10 °C no evento de desidratação das amostras LVF rm e LVF g40, indicando a dificuldade de liberação da água da estrutura cristalina.

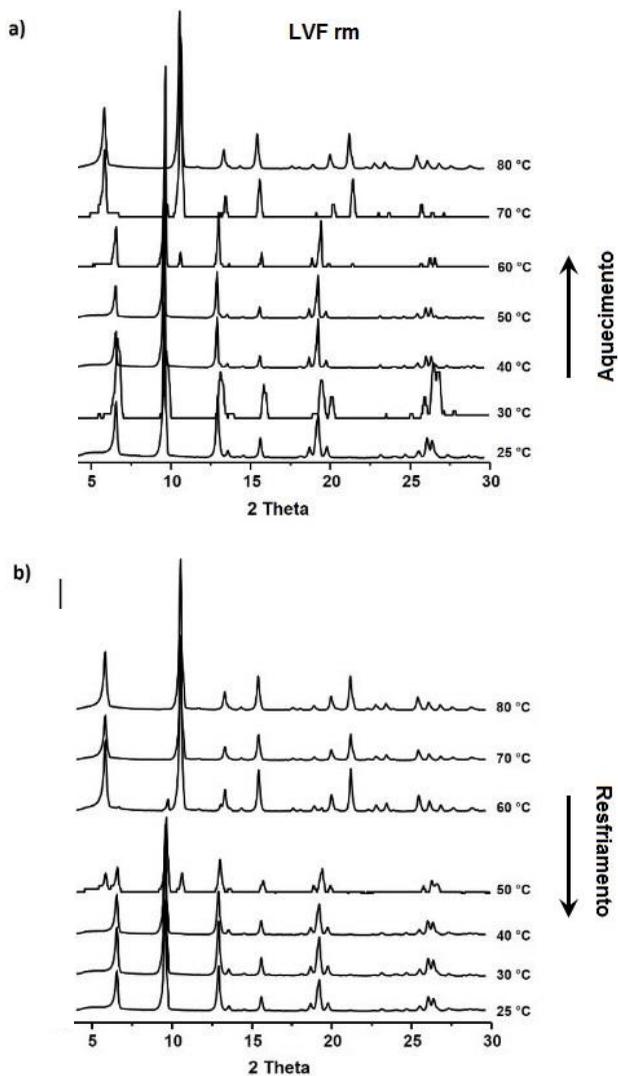
**Tabela 6 - Resultados das curvas DSC para as amostras LVF rm e LVF g40.**

		<i>Evento 1</i>	<i>Evento 2</i>	<i>Evento 3</i>
<b><i>LVF rm</i></b>	Temp [°C]	54,04	220,69	225,79
	$\Delta H$ [J/g]	-70,06	-18,38	-84,55
<b><i>LVF g40</i></b>	Temp [°C]	64,70	219,31	228,22
	$\Delta H$ [J/g]	-77,97	-1,23	-13,84

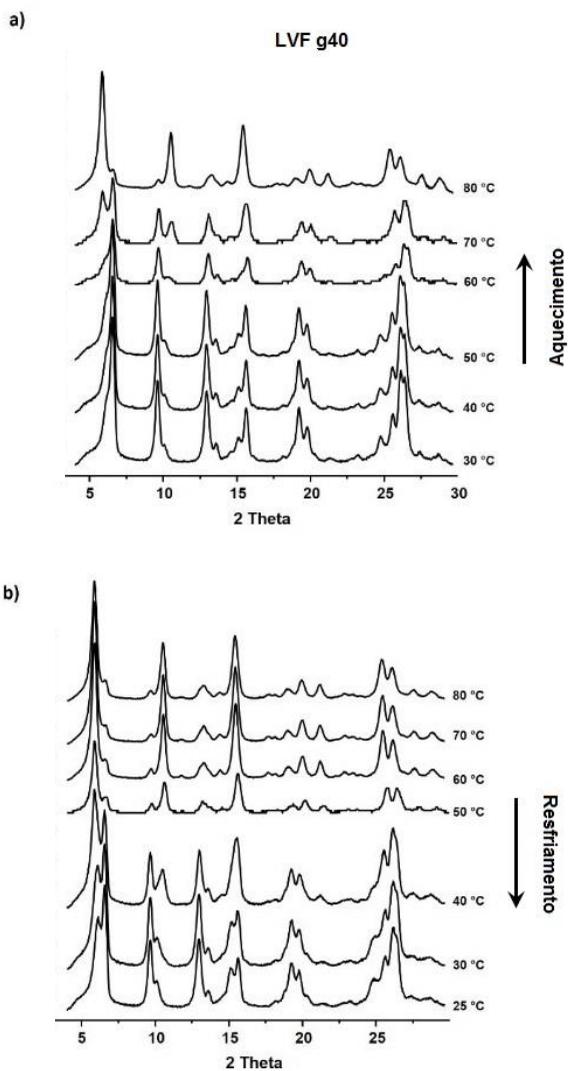
*Difração de raios X de pós (DRXP)*

As Figuras 26 e 27 mostram o padrão de difração de raios X para o LVF rm e LVF g40, respectivamente, em função da temperatura. Os dados foram coletados a cada 5 minutos durante o processo isotérmico, de 25 a 80 °C.

Para a amostra LVF rm é possível observar que esta apresenta reversão de fase após o resfriamento da amostra. Porém, para a amostra LVF g40 foi observado uma transição parcialmente reversível de fase, uma vez que não houve completa recuperação da fase original (anidra para hidratada) mesmo após uma hora após o processo de resfriamento, conforme observado pela Figura 28.



**Figura 25 - Padrão de difração de raios X do LVF rm realizadas com ciclo de aquecimento.**



**Figura 26 - Padrão de difração de raios X do LVF g40 realizadas com ciclo de aquecimento.**

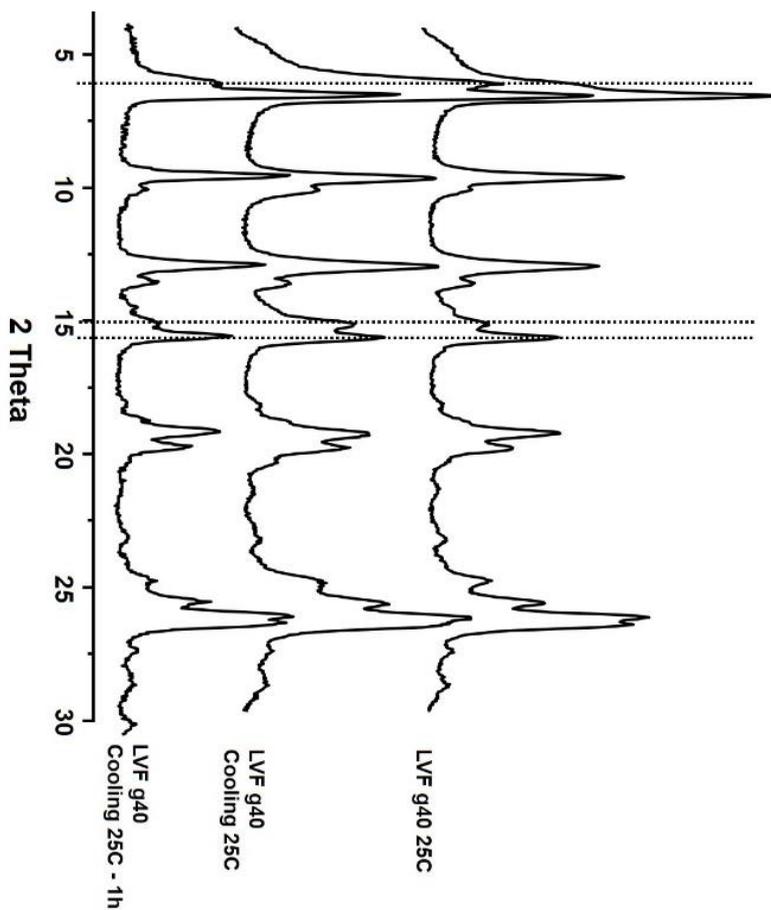
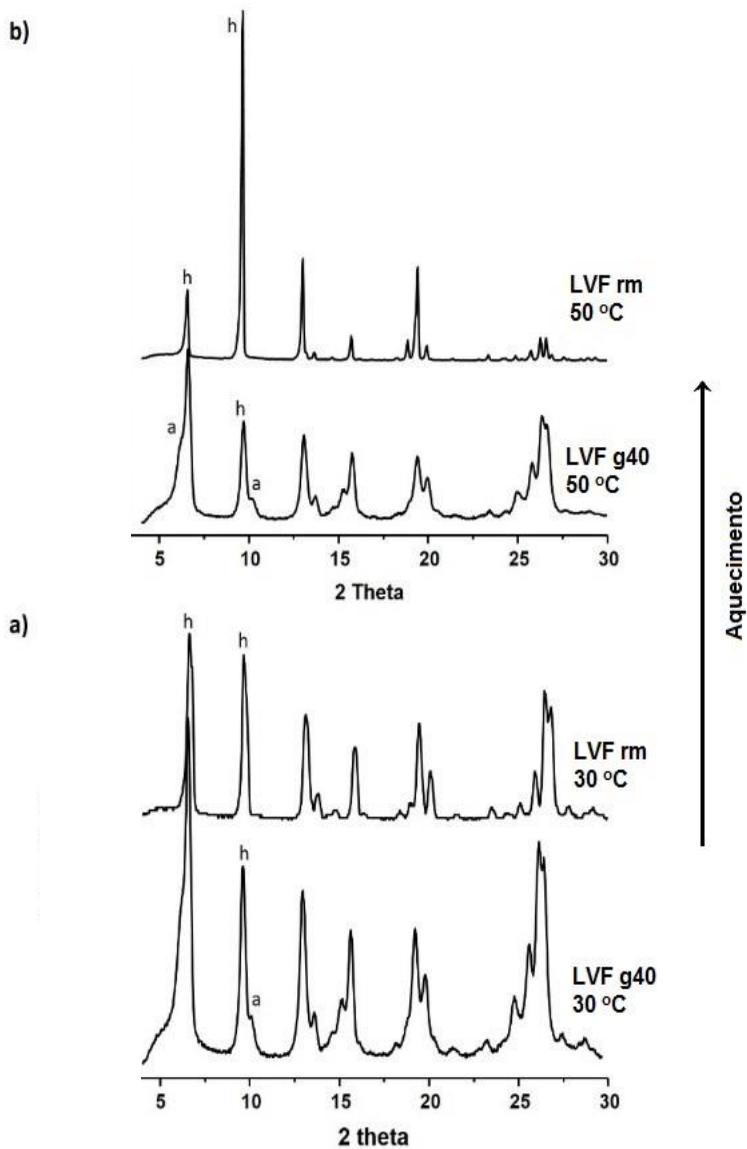


Figura 27 - DRXP para a amostra LVF g40 em temperatura ambiente (LVF g40 25C), após resfriamento a 25 oC (LVF g40 cooling 25C) e após 1 hora de resfriamento (LVF g40 cooling - 1h).

A figura 29, apresenta padrões de difração de raios X para as amostras LVF rm e LVF g40 durante o aquecimento e resfriamento nas temperaturas de 30 °C e 50 °C.

Através da figura é nítido observar a desidratação das amostras e a permanência da fase anidra e fase hemidrato para a amostra triturada, o que não é observado para a amostra LVF rm.



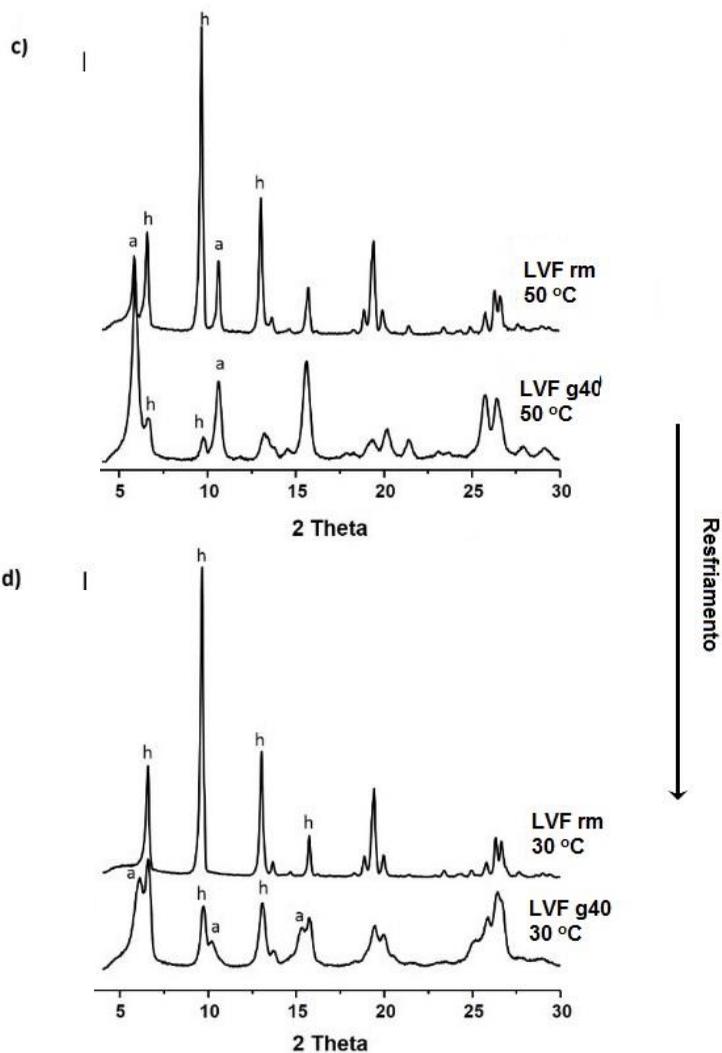


Figura 28 - padrões de difração de raios X para as amostras LVF rm e LVF g40 durante o aquecimento e resfriamento nas temperaturas de 30 °C e 50 °C.

A figura 29 apresentam padrões de difração de raios X para as amostras LVF rm e LVF g40 nas quais é possível constatar uma reversão de fase após o resfriamento para a amostra LF rm, ou seja, há o completo retorno da água para a estrutura cristalina. Dessa forma, o levofloxacino hemidrato ao sofrer processo de desidratação térmica e ser resfriado, retorna a sua forma hemidrato de maneira completa. Porém, o mesmo não é observado para a amostra LVF g40, a qual apresenta duplicidade de fases ao sofrer tratamento térmico. Assim, mesmo após 1 hora de resfriamento a amostra que sofreu moagem ainda apresenta fase anidra e hidratada. Dessa forma, mais uma vez se comprova que o processo de moagem interfere na estrutura cristalina, devido aos defeitos causados pelo processamento.

#### *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

A espectroscopia por infravermelho apresentou alteração apenas para a amostra LVF g40, mais precisamente na banda  $3043.67\text{ cm}^{-1}$ . Em relação ao restante das bandas não houve alteração comparando-se as amostras com os dados da literatura.

As bandas de absorção das amostras são apresentadas na Figura 30 e se apresentaram similares ao relatado na literatura (Dorofeev, 2004; Wang e Wang, 2006). Embora o LVF g40 apresentou uma banda na região de  $3043,67\text{ cm}^{-1}$ , não houve diferenças significantes entre as amostras de LVF rm e LVF rm a  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

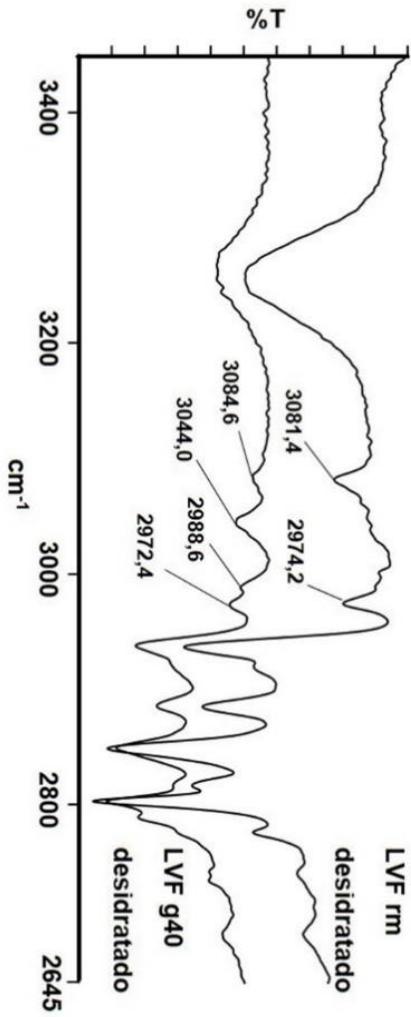


Figura 29 - Espectroscopia de Infravermelho para o L VF rm e L VF g40 após aquecimento em TG.

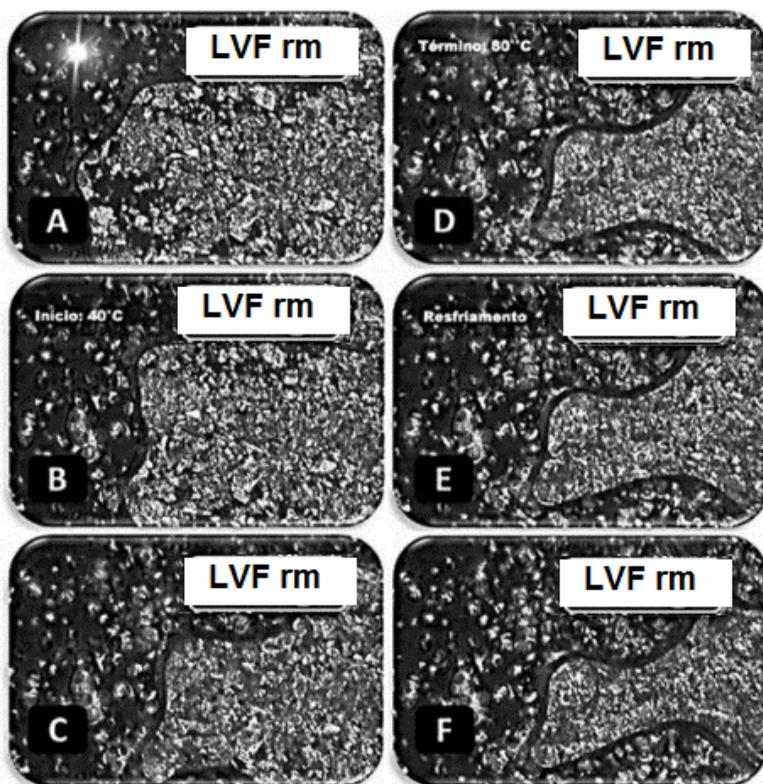
As análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas após o tratamento térmico das amostras em TG. Ambos, LVF rm e LVF g40, apresentaram bandas características ao levofloxacino hemidrato. A amostra LVF g40, porém, apresentou uma nova banda na região de  $3043\text{ cm}^{-1}$ . Segundo Sahoo e colaboradores, 2011, o grupamento piperazinil de algumas fluoroquinolonas, como o ofloxacino (sendo o levofloxacino seu isômero -S), apresentam bandas semelhantes. Tendo em vista que o ofloxacino não é um hidrato e apresenta estrutura idêntica ao levofloxacino, pode-se concluir que essa banda na região de  $3043\text{ cm}^{-1}$  tem ligação com o grupamento piperazinil da forma anidrato do levofloxacino. Tendo em vista que a determinação estrutural demonstrou que a molécula de água de liga na posição 5' do grupamento piperazinil, é possível inferir que essa nova banda presente no FTIR do LVF g40 se deve a porção anidra presente na amostra, casada pelos defeitos na estrutura.

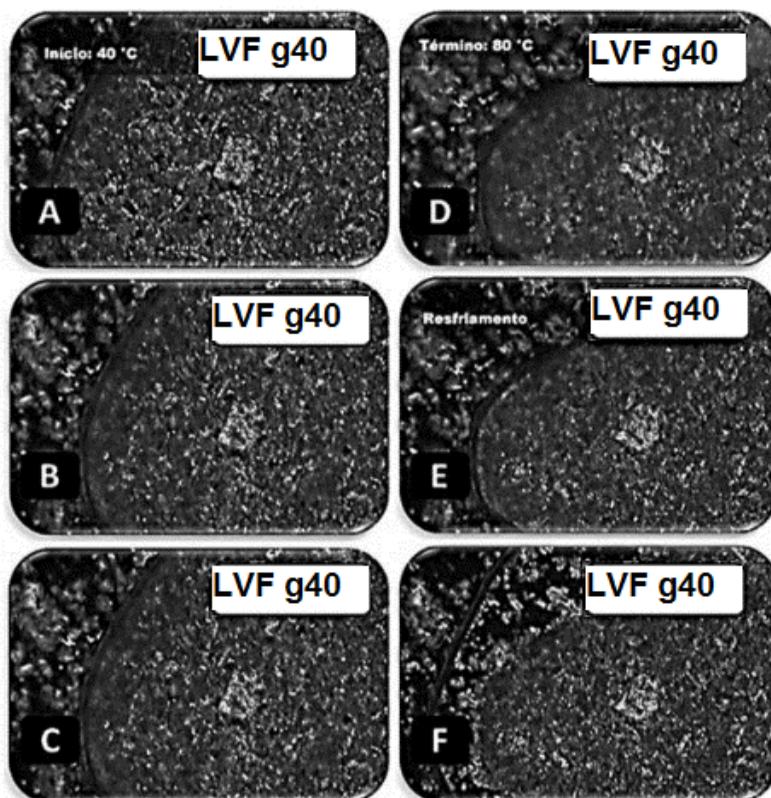
#### *Microscopia Óptica acoplada com Aquecimento (HotStage)*

A microscopia óptica (figura 31) foi realizada com célula de aquecimento, obedecendo ao mesmo esquema de aquecimento da análise térmica e da difração de raios X, atingindo o máximo de  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A Figura 31 apresenta dados do microscópio óptico acoplado com chapa de aquecimento. As amostras foram aquecidas a uma razão de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$  e posteriormente resfriadas sob as mesmas condições.

Através dos vídeos gravados no equipamento foi possível observar a liberação (desprendimento) da molécula de água da estrutura cristalina. A temperatura em que este evento ocorreu foi a mesma observada pelas técnicas termoanalíticas. Este vídeo será disponibilizado como material complementar. Abaixo, a figura 31 representa imagens de alguns dos pontos do vídeo coletados no momento em que o evento de desidratação pode ser observado, tanto para a amostra LVF rm quanto para LVF g.





**Figura 30 - Microscópio óptico equipado com Sistema de aquecimento. Análises realizadas para as amostras LVF rm e LVF g40. As imagens A, B, C, D, E e F para ambas as amostras representam a liberação da molécula de água das amostras conforme o aquecimento.**

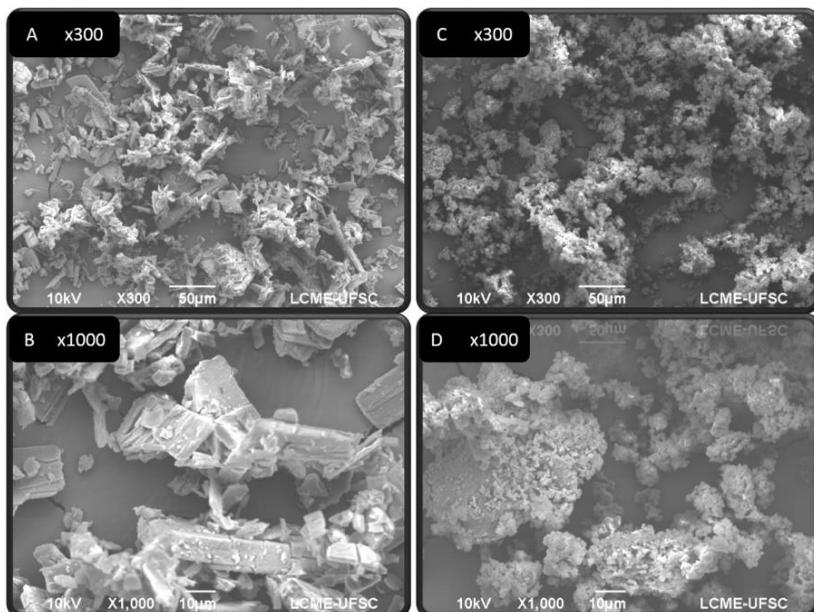
Após o resfriamento, foi ainda possível observar uma movimentação nos cristais do fármaco que provavelmente se deve ao processo de reidratação da amostra. Este evento foi menos intenso para a amostra LVF g40, provavelmente devido ao observado por difração de raios X, em que não há um total retorno da fase anidra para a hidratada.

As análises por Hot Stage corroboram com todos os resultados apresentados até aqui, tanto para o LVF rm quanto para o LVF g40. É possível observar através das imagens (também pelo vídeo) que a amostra LVF rm demonstrou a liberação de água durante o aquecimento, nas mesmas temperaturas apresentadas pelas técnicas termoanalíticas (DSC e TG). Porém, para a amostra LVF g40 houve maior dificuldade em observar esse evento, explicada pela diminuição do tamanho de partícula e pelos defeitos que a moagem causa na amostra.

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

A fim de avaliar a morfologia e observar alterações no tamanho de partícula foram realizadas análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura.

A figura 32 representa as fotomicrografias obtidas para as amostras LVF rm e LVF g40. É possível observar que a amostra triturada (LVF g40) sofreu redução do tamanho de partícula, porém estas se apresentam aglomeradas.



**Figura 31 - MEV obtido nas resoluções x300 e x1000 para as amostras LVF rm e LVF g40 (A e B – LVF rm/ C e D – LVF g40).**

A microscopia eletrônica de varredura auxiliou na avaliação morfológica das amostras LVF rm e LVF g40. Através das fotomicrografias é possível observar que a amostra que sofre processo de moagem tem uma redução no tamanho de partícula, contudo há uma aglomeração das micropartículas geradas. Isso pode ser melhor visualizado na resolução de x 1000. A fim de avaliar melhor a distribuição do tamanho de partículas, realizou-se o estudo com o auxílio de equipamento Master Sizer, como descrito a seguir.

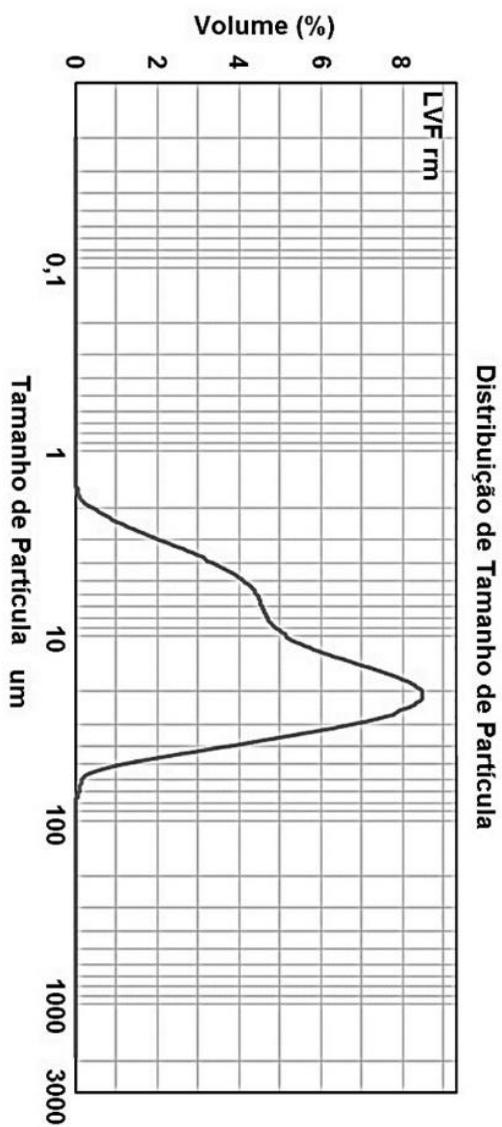
### *Tamanho de Partícula (Master Sizer)*

Com o intuito de determinar o tamanho e distribuição de tamanho de partículas das amostras LVF rm e LVF g40, foram realizados estudos de perfil granulométrico por Master Sizer.

A figura 33 (a e b) demonstra os perfis granulométricos para as amostras LVF rm e LVF g40. As amostras apresentaram perfis granulométricos semelhantes, polidispersos. Na tabela 7 pode-se observar que o processo de moagem induziu um ligeiro aumento no diâmetro da amostra LVF g40, sendo que o diâmetro médio foi alterado de 17,18 para 18,53  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 7 - Relação dos valores de diâmetro das amostras de levofloxacino.**

<b>Amostra</b>	<b>LVF g40</b>	<b>LVF rm</b>
<b>d10% (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,69	4,41
<b>d50% (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	16,50	15,13
<b>d90% (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	35,77	33,31
<b>D[4,3] (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	18,53	17,18
<b>Span</b>	1,88	1,91



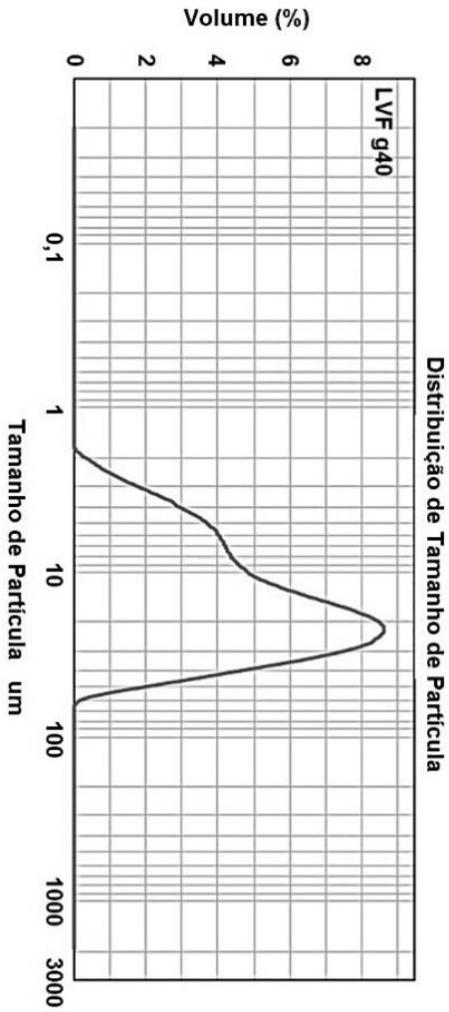


Figura 32 - Perfil granulométrico das amostras L VF rm e L VF g40.

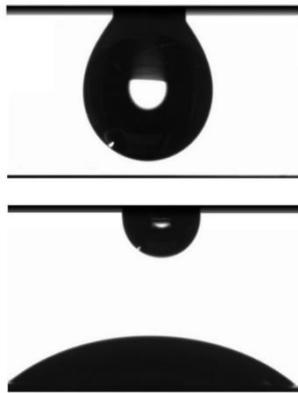
É possível observar, através da figura 33 que as amostras apresentam perfis granulométricos semelhantes, polidispersos. Na tabela 7 apresenta resultados que indicam ligeiro aumento no diâmetro da amostra LVF g40. Como o processo de moagem causa redução no tamanho de partícula, o que pode ter ocorrido neste caso é aglomeração das partículas, como visualizado pelo estudo de microscopia eletrônica de varredura. Dessa forma não foi possível determinar corretamente o tamanho de partícula da amostra LVF g40.

## 6.4 Molhabilidade e Dissolução Intrínseca

### *Molhabilidade*

A determinação do ângulo de repouso, ou seja, da molhabilidade do material, fornece um dado importante para a realização da análise de dissolução intrínseca, ou seja, a escolha do melhor solvente para a avaliação da solubilidade do fármaco. Através disso, é possível determinar o solvente que melhor diferencie duas amostras cristalinas diferentes em relação a sua dissolução.

Abaixo, a Figura 34 apresenta o ângulo de contato calculado para as amostras LVF rm e LVF g40.



**Figura 33 - Esquema para a determinação do ângulo de contato das amostras LVF rm e LVF g40 (dois estágios representados, gota pendente e após atingir a superfície).**

A figura 35 demonstra a forma de determinação do ângulo de contato da gota do solvente na amostra. No momento em que ocorre o contato da gota com a amostra, são realizadas várias leituras do ângulo de contato, gerando uma tabela em função do tempo. À medida que decorre o tempo, há um aumento do ângulo, sugerindo aumento da absorção da gota através da amostra.



**Figura 34 - Representação da determinação de ângulo de contato.**

O valor de ângulo de contato encontrado para as amostras LVF rm e LVF g40 foram 44,93 ° e 57,24°, respectivamente (Tabela 8). Isso indica que a amostra LVF rm é mais molhável comparada com a amostra LVF g40. As análises de dissolução intrínseca realizadas corroboram com estes resultados.

**Tabela 8 - Valores de ângulos de contato para as amostras LVF rm e LVF g40.**

	<b>Ângulo</b>
<b>LVF rm</b>	44,93°
<b>LVF g40</b>	57,24°

O estudo por determinação do ângulo de contato auxiliou na avaliação do efeito que o processo de moagem pode ter na molhabilidade do fármaco e serviu de indicativo de dissolução para a VDI.

O estudo indicou que o LVF g40 é menos molhável em água que a amostra original. Em teoria, quando se realiza um processo de moagem, há diminuição do tamanho de partícula e por consequência um aumento na área de contato, aumentando a molhabilidade da amostra.

Porém, como demonstrado anteriormente, com os estudos de microscopia eletrônica de varredura e distribuição de tamanho de partícula, a moagem causa defeitos e agregação das partículas, interferindo na molhabilidade e possivelmente na dissolução desse fármaco.

### *Dissolução Intrínseca*

O levofloxacino, fármaco pertencente à Classe I do BCS de acordo com a Organização Mundial da Saúde e Koepe et al., 2011, é altamente permeável e altamente solúvel. A água foi o meio de dissolução utilizado para a análise de velocidade de dissolução intrínseca.

A figura 36 mostra o perfil de dissolução intrínseca para as amostras LVF e LVFg40. A análise estatística foi realizada aplicando-se a análise de regressão e revelou que ambas as amostras apresentaram perfis significativamente diferentes (para intervalo de confiança  $\alpha = 0.05$ ,  $p < 0.1$ ).

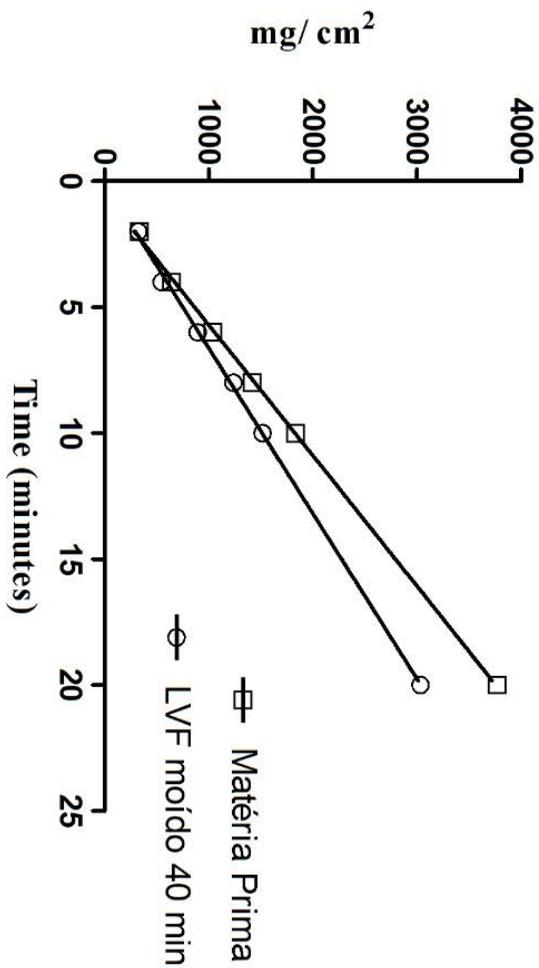


Figura 35 - Velocidade de Dissolução Intrínseca de LVF e LVFg40.

A tabela 9 mostra resultados relevantes, uma vez que a taxa de dissolução intrínseca do LVF matéria-prima ( $192.9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ), apresentou-se maior que a taxa da amostra LVF g40 ( $152.4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

**Tabela 9 - Equações e valores de  $r^2$  obtidos por regressão linear dos mínimos quadrados para o teste de velocidade de dissolução intrínseca do LVF e LVFg40.**

<i>Amostra</i>	<i>Equação</i>	<i><math>r^2</math></i>	<i>VDI (<math>\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}</math>)</i>
<i>LVF rm</i>	$y = 192.9x - 100.5$	0.9994	192.9
<i>LVF g40</i>	$y = 152.4x - 10.62$	0.9991	152.4

Corroborando com os resultados encontrados por MEV, Master Sizer e Molhabilidade, a VDI também apresentou resultados até então inesperados. Conforme indícios de análise de molhabilidade, o LVF g40 apresentou taxa de dissolução inferior ao LVF rm.

Estes resultados mais uma vez demonstram ter relação direta com o processo de moagem da amostra de levofloxacino. Dessa forma, a moagem interfere na VDI e por consequência pode interferir na liberação e absorção do fármaco no organismo, interferindo na sua biodisponibilidade.

Os resultados de molhabilidade e VDI foram fundamentais para comprovar os efeitos que a moagem pode causar na qualidade do levofloxacino hemidrato.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Neste trabalho, primeiramente foi avaliado o efeito que o processo de recristalização pode causar nas características físico-químicas do levofloxacino hemidrato. A obtenção desta forma recristalizada se deu através da metodologia apresentada por Kitaoka et al., 1995 para a forma monohidrato do levofloxacino. Porém, ao ser avaliada a quantidade de água, observou-se que o material resultante se tratava da forma hemidrato, uma forma recristalizada da matéria-prima.
- ✓ Os dados obtidos por análise térmica, no que diz respeito ao processo de degradação, mostraram-se diferentes aos obtidos por Kitaoka, 1995. Sugeriu-se que o material obtido é a forma recristalizada da matéria-prima e não a forma monohidratada proposta pelo autor. As diferenças encontradas entre as amostras LVF rm e LVF r foram atribuídas à desordem causada no sistema devido ao processo de recristalização utilizado na obtenção do LVF r. As análises por DRX, IR, Raman, MEV e RMN corroboraram com estes resultados.
- ✓ O processo de desidratação da forma hemidrato do levofloxacino foi avaliado. As técnicas termoanalíticas apontaram para o comportamento do material anidro. A técnica de difração de raios X de pó foi importante na identificação de

alterações nos padrões de raios X, indicando que a desidratação causa alteração na estrutura cristalina.

- ✓ A saída da água da estrutura foi observada através da técnica de microscopia óptica acoplada com aquecimento, corroborando com os resultados termoanalíticos.
- ✓ A determinação estrutural foi realizada com o auxílio de luz Sincrotron e esta foi determinada por refinamento de Rietveld.
- ✓ As formas hemidrato e anidrato obtidas a partir do pó foram comparadas em termos de parâmetros de rede, com o levofloxacino hemidrato obtido por Gorman e colaboradores (Gorman et al, 2012).
- ✓ A forma anidrato apresentou parâmetros de rede como ângulos e lados da cela diferentes quando comparados a forma hemidrato. Em relação as formas hemidratos obtidas pelo pó e por monocristal, estas demonstraram resultados semelhantes, indicando tratar-se da mesma estrutura e possibilitando identificar o local de ligação da molécula de água junto a molécula do fármaco.
- ✓ O processo de moagem da amostra de levofloxacino demonstrou ser extremamente prejudicial para a qualidade da matéria-prima, causando defeitos na estrutura do fármaco. A amostra triturada apresentou mudanças na estrutura cristalina, uma vez que, ao ser desidratada e rehidratada, a mesma

apresentou dificuldades de saída e entrada da molécula de água para o interior do cristal. Dessa forma, a moagem altera as propriedades cristalinas do fármaco.

- ✓ Testes de ângulo de contato permitiram identificar interferência na molhabilidade da amostra triturada, a qual apresentou um maior ângulo. Isso pode ser justificado pelos defeitos causados na estrutura, uma vez que a moagem tende a melhorar a molhabilidade por diminuir o tamanho de partícula.
  
- ✓ O estudo de molhabilidade auxiliou no entendimento dos resultados obtidos em estudo de dissolução intrínseca, que apresentaram taxa de dissolução inferior para o LVF g40 em relação ao LVF rm. Este resultado concorda com o encontrado por MEV e master sizer.

## 8. REFERÊNCIAS

BRITTAİN, H. G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids, *Discovery Laboratories, Inc. Milford, New Jersey, cap. 4 - Structural Aspects of Hydrates and Solvates*, Morris, K. R. Purdue University West Lafayette, Indiana, 2006.

GONZALEZ, J. A. O., MOCHON M. C., ROSA F. J. B. Spectrofluorimetric determination of levofloxacin in tablets, human urine and serum. *Talanta* 52 1149–1156, 2000.

KITAOKA, H., WADA, C., MOROI, R. and HAKUSUI, H.. Effect of dehydration on the Formation of Levofloxacin Pseudopolymorphs, *Chem. Pharm. Bull.* 43(4) 649-653, 1995.

WANG, Y., YU, K., WANG, S.. Vibrational spectra study on quinolones antibiotics. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 159-163, 2006.

BAUER J., SPONTON S., HENRY R., QUICK J., DZIKI W., PORTER W., MORFIA J.: Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism. *Pharm. Res.* 18, 859-866, 2001.

BERNSTEIN J., *Polymorphism in Molecular Crystals*. Oxford University Press: New York, New York, 2013.

BERNSTEIN, J. and HENK, J.-O. Disappearing and reappearing polymorphs – an anthem to crystal engineering? *Cryst. Eng.*, **1**, 119-28, 1998.

BEYER, T.; DAY, G.M. and PRICE, S.L. The prediction, morphology and mechanical properties of the polymorphs of paracetamol. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5086-94, 2001.

BOND A.,D., BOESE R., DESIRAJU G.R.: On the polymorphism of aspirin. *Angewandte Chemie-International Edition* 46, 615-617, 2007.

BORKA, L. Review of crystal polymorphs of substances in the European Pharmacopoeia. *Pharma. Acta Helv.*, **66**, 16-22, 1991.

BORKA, L. and HALEBLIAN, J.K.. Crystal polymorphism of pharmaceuticals. *Acta Pharm. Jugoslav.*, **40**, 71-94, 1990.

BRITTAIN H G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. USA: Marcel Dekker, 280-326, 1999.

BRITTAIN H.G., Polymorphism in Pharmaceutical Solids, *American Pharmaceutical Review*. 5, 74-80, 2002.

BRITTAIN, H. G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids, *Discovery Laboratories, Inc. Milford, New Jersey, cap. 4 - Structural Aspects of Hydrates and Solvates*, Morris, K. R. Purdue University West Lafayette, Indiana, 2006.

BRITTAIN, H.G. Polymorphism in Pharmaceutical Solids, *Discovery Laboratories, Inc. Milford, New Jersey, cap. 4 - Structural Aspects of Hydrates and Solvates*, Morris, K. R. Purdue University West Lafayette, Indiana, 2006.

BRITTAİN, H.G. Structural methods for the characterization of polymorphs and solvates, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Washington, 86, 4, 405-412, 1997.

BRITTAİN, H.G.; RANADIVE, S.A. and SERAJUDDIN, A.T.M.. Effect of humidity-dependent changes in crystal structure on the solid state fluorescence properties of a new HMG-COA reductase inhibitor. *Pharm. Res.*, 12, 556-9, 1995.

BUGAY, D.E. Characterization of solid state: spectroscopic techniques. *Adv. Drug. Deliv. Revs.*, 48, 43-65, 2001.

BURGER, A.; HENCK, J.-O; HETZ, S.; ROLLINGER, J.M.; WEISSNICHT, A.A and STOTTNER, H.. Energy/temperature diagram and compression behavior of the polymorphs of D-mannitol. *J. Pharm. Sci.*, 89, 457-68, 2000.

BYRN S R, PFEIFFER R R, STOWELL J G. Solid-State Chemistry of Drugs. Indiana, 3-43, 1999.

BYRN S.R., *Chem. Mater.* 6, 1148-1158, 1994.

BYRN SR; PFEIFFER RR; STOWELL JG. Solid-State Chemistry of Drugs, SSCI, West Lafayette, IN, 1999.

BYRN, S., PFEIFFER, R., GANEY, M., HOIBERG, C., POOCHIKIAL, G., Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. *Pharm. Res.* 7, 945-954, 1995.

BYRN, S., PFEIFFER, R., GANEY, M., HOIBERG, C., POOCHIKIAL, G., Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory considerations. *Pharm. Res.* 7, 945-954, 1995.

BYRN, S.R.; PFEIFFER, R.R. and STOWELL, J.G.. *Solid State Chemistry of Drugs*, 2<sup>nd</sup> edn, SSCI, Inc. West Lafayette, IN, 1999.

CLARKE M.J., *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 4, 419-425, 1998.

CUFFINI S L, PITALUGA J R A, TOMBARI D. Polimorfismo em Fármacos, in: Ciências Farmacêuticas Biofarmacotécnica. STORPIRTIS S, GONÇALVES J E, CHIANN C, GAI M N. Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 21-31, 2009.

CUFFINI, S.L.; FAUDONE, S.; DABBENE, V.; BADINI, R.; RUBIO, M., Polymorphism and pseudopolymorphism in pharmaceutical drugs. In: SARX2002 (VII SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE ANÁLISES POR TÉCNICAS DE RAIOS X)", 2002, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil, Resumos. VIII Seminário Latino-Americano de Análises por Técnicas de Raios X, p.75, 2001.

CUFFINI, S.L.; PALACIO, M.; FERRAYOLI, C.; PALACIOS, S.; PAGOLA, S.; STEPHENS, W. Application of powder X-ray diffraction for monitoring the crystallization process and the crystal structure determination of enantiomeric pharmaceutical drug R(-)-Albuterol sulfate. In: SARX2002 (VII SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE ANÁLISES POR TÉCNICAS DE RAIOS X)", 2002, Nova Friburgo,

Rio de Janeiro, Brasil, Resumos. VIII Seminário Latino-Americano de Análises por Técnicas de Raios X, p.100, 2001.

De CASTRO, W.V.; PIRES, M.A.S.; OLIVEIRA, M.A.; VIANNA-SOARES, C.D.; NUNAN, E.A.; PIANETTI, G.A.; MOREIRA-CAMPOS, L.M.; DE CASTRO, W.V.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; DERENDORF, H. Dissolution Profile of Diclofenac Sodium Tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Londres, vol. 32, p. 1103-1109, 2006.

DOROFEEV, V.L. Infrared Spectra and the Structure of Drugs of The Fluoroquinolone Group. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 38, 12, 2004.

ELSEVIER, *Tuberculosis*. 88(2) 119–1, 2008.

FDA, Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, 1997. Available: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>. Accessed on 20 February 2012.

GIRON D.. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. *Thermochim. Acta*. 248, 1–59, 1995.

GIRON D., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 56, 1285-1304, 1999.

GIRON D., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 68 453-465, 2002.

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

GIRON, D. (1997). Thermal analysis of drugs and drug products. In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Vol 15: *Thermal Analysis of drugs and drugs products to unit processes in pharmacy: fundamentals* (ed. J. Swarbrick and J. C. Boylan), pp. 1-79. Marcel Dekker, New York.

GORMAN E.M., SAMAS B., MUNSON E.J. Understanding the Dehydration of Levofloxacin Hemihydrate. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, V 101 (9), 3319-3330, 2012.

HAN J., Ph.D. thesis, Univ. of Minnesota (Minneapolis MN,USA.), 1998.

<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/default.htm>

KIAOKA, H. and OHYA, K. Pseudopolymorphism and phase stability of 7-piperidino-1,2,3,5-tetrahydroimidazo-[2'1-B]quinazolin-2-one (DN-9693). *J. Therm. Anal.*, 44, 1047-56, 1995.

KIM YS. Crystallization and solid-state transformations of the pseudopolymorphic forms of sodium naproxen, Ph.D. Thesis, Georgia Institute of Technology, Atlanta, 2005.

KIM YS; PASKOW HS; ROUSSEAU RW. Propagation of solid-state transformations by dehydration and stabilization of pseudopolymorphic crystals of sodium naproxen. *Crystal Growth Des.* 5, 1623 – 1632, 2005.

KITAOKA H., OHYA K., J. Thermal Anal., 40, 387 (1993); Otsuka M., Onoe M., Matsuda Y., *Pharm. Res.*, 10, 557, 1993.

KITAOKA, H., WADA, C., MOROI, R. and HAKUSUI, H.. Effect of dehydration on the Formation of Levofloxacin Pseudopolymorphs, *Chem. Pharm. Bull.* 43(4) 649-653, 1995.

MALAJ L. Impact of Solid State Properties of Sodium Naproxen Hydrates on their Technological Performance. University of Camerino, Camerino, Italy, 4-14, 2009.

MERK INDEX. 12<sup>o</sup> ed. em CD ROM. Versão 12:1, 1996. Chapman and Hall, London.

MILLER J N, MILLER J C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. England: Pearson Education Limited,43-75, 2000.

MORRIS K.R., *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* 95 125-181, 1999.

MORRIS KR. Structural Aspects of Hydrates and Solvates. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. H. G. Brittain. New York, Marcel Dekker, Inc. 95, 126-179, 1999.

MORRIS, K.R., GRIESSA, U.J., ECKHARDT, C.J., STOWELL, J.G., Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing process. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 91-119, 2001.

MORRIS, K.R.; NAIL, S.L.; PECK, G.E.; BYRN, S.R.; GRIESSER, U.J.; Stowell, J.G.; Hwang, S.J. and Park, K. Advances in pharmaceutical material and processing. *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1**, 235-45, 1998.

NAKAGAMI H., ISHIGAME N., NAGAO K., KITAZAWA Y., *Antibiotics & Chemotherapy*, 10, n° 6, 105, 1994.

NEWMAN A.W., S.R. BYRN, *Drug Discovery Today* 8 898-905, 2003.

RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C.P.; JAYASANKAR, A.; MARZGER, A.J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspectiva. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Londres, vol. 56, p. 241-274, 2004.

SAHHO S., CHAKRABORTI C.K., MISHRA S.C., NANDA U.N., NAIK S. FTIR and XRD Investigations of some Fluoroquinolones. *International Journal of pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 3, 2011.

SURYANARAYANAN R., *Drugs Pharm. Sci.* 70 187-221, 1995.

USP International Standards Draft – For Public Comment, 2007.  
Available at:  
<http://www.usp.org/pdf/EN/pendingStandards/efavirenz.pdf>. Accessed  
on 12 July 2010.

VIPPAGUNTA, S.R., BRITTAIN, H.G., GRANT. D.J.W., Crystalline Solids, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Londres, vol. 48, p. 3-26, 2001.

WANG, Y., Yu, K., WANG, S.. Vibrational spectra study on quinolones antibiotics. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 159-163, 2006.

WANG, Y., YU, K., WANG, S.. Vibrational spectra study on quinolones antibiotics. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 159-163, 2006.