

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUAN FARINELLI DINIZ

AVALIAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E BIOFARMACÊUTICA
DE NOVAS FORMAS SÓLIDAS MULTICOMPONENTES DE
FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS E ANTIDIABÉTICOS

Belo Horizonte

2022

LUAN FARINELLI DINIZ

**AVALIAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E BIOFARMACÊUTICA
DE NOVAS FORMAS SÓLIDAS MULTICOMPONENTES DE
FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS E ANTIDIABÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Christian Fernandes

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Diniz

Belo Horizonte

2022

D585a Diniz, Luan Farinelli.
Avaliação químico-estrutural e biofarmacêutica de novas formas sólidas multicomponentes de fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos [recurso eletrônico] / Luan Farinelli Diniz. – 2022.
1 recurso eletrônico (190 f. : il.) : pdf

Orientador: Christian Fernandes.
Coorientadora: Renata Diniz.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Cristalografia – Teses. 2. Difração de raios X – Teses. 3. Sais – Teses. 4. Insumos farmacêuticos – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Diniz, Renata. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“AVALIAÇÃO QUÍMICO-ESTRUTURAL E BIOFARMACÊUTICA DE NOVAS FORMAS SÓLIDAS
MULTICOMPONENTES DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS E ANTIDIABÉTICOS”*

LUAN FARINELLI DINIZ

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Jacqueline de Souza
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Profa. Dra. Isabela da Costa César
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Christian Fernandes - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Renata Diniz - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 22 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Professora do Magistério Superior**, em 22/06/2022, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Helena dos Reis Serra, Usuário Externo**, em



22/06/2022, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline de Souza, Usuária Externa**, em 22/06/2022, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 22/06/2022, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Carlos Doriguetto, Usuário Externo**, em 22/06/2022, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Christian Fernandes, Professor do Magistério Superior**, em 22/06/2022, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1490921** e o código CRC **25D4BD98**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Gessé e Sagramor, pelo apoio, confiança, carinho e por terem me ensinado os valores da vida, vocês são simplesmente maravilhosos. Minha singela e humilde retribuição por tudo que fizeram e fazem por mim.

À minha avó Leninha (*In memoriam*), por todo carinho, amor e compreensão e por ter estado ao meu lado durante toda a minha vida.

À minha amada noiva e grande amor da minha vida Tayane, por todo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus orientadores, Christian Fernandes e Renata Diniz, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, pela orientação e por fornecerem as condições para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da Faculdade de Farmácia, André, Mateus, Naialy, Melina e Rafael, pelos gratos momentos, comemorações e discussões.

Aos meus companheiros do Departamento de Química, Jennifer, Daniely, Larissa, Pedro e Sérgio, pela convivência diária, ajuda e rica troca de informações.

Ao prof. José Eduardo Gonçalves, pela colaboração e por toda dedicação e ajuda no cultivo celular bem como realização dos experimentos de permeabilidade.

À profa. Charlane Cimini Corrêa, pela colaboração na realização das medidas de difração de raios X por monocristal.

Ao prof. Ruben Dario Sinisterra Millán e Dr. Lucius F. O. Bomfim Filho, pela ajuda nos experimentos de dissolução intrínseca.

Ao prof. Javier Ellena e Dra. Cecilia Carolina Pinheiro da Silva, pelas análises termo-ópticas dos cristais.

Ao Dr. Chris Hebert de Jesus Franco pela realização das medidas de difração de raios X por policristais.

Aos professores da Faculdade de Farmácia e Departamento de Química da UFMG, pelos valiosos ensinamentos durante essa jornada.

À CAPES pela bolsa concedida.

À TODOS que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Quanto maior a sabedoria mais óbvia deve ser a
noção da nossa ignorância."*

(Sócrates)

RESUMO

Os atributos químico-estruturais de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) estão diretamente relacionados com as propriedades biofarmacêuticas. Dentre estas propriedades, destacam-se a solubilidade, a dissolução intrínseca e a permeabilidade, que são características importantes de um fármaco, na medida em que influenciam a biodisponibilidade. Nesse contexto, a engenharia de cristais se consolidou como uma das ferramentas mais eficazes para aprimorar as propriedades biofarmacêuticas de IFAs. Neste trabalho, onze novas formas sólidas cristalinas multicomponentes, entre sais e cocrystalais, dos fármacos carvedilol (CVD), furosemida (FSM), diltiazem (DIL) e metformina (MET), foram racionalmente preparadas e tiveram suas estruturas cristalinas elucidadas. As modificações cristalinas obtidas foram caracterizadas por meio de técnicas difratométricas, espectroscópicas e térmicas. Adicionalmente, estudos de solubilidade, dissolução intrínseca e permeabilidade *in vitro* também foram conduzidos. Os novos sais racêmicos de CVD, CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O, se cristalizaram na forma de soluções sólidas de enantiômeros, enquanto o sal CVD-OXA cristalizou-se na forma de um racemato. Nas soluções sólidas, a miscibilidade entre unidades homoquirais de pares enantioméricos R··R e S··S, levou à formação desse raro sistema. Em termos de solubilidade, os três novos sais de CVD promoveram ganhos significativos na solubilidade do fármaco CVD. Já o planejamento das modificações cristalinas da FSM teve como objetivo principal melhorar a baixa solubilidade e permeabilidade do IFA. Estes objetivos foram alcançados com sucesso, uma vez que o sal imidazolinio de FSM (FSM-IMI) e o cocrystal hidratado de FSM com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O) demonstraram ser mais solúveis e permeáveis em comparação com a FSM pura (não modificada). Em relação ao DIL, os dois sais hidratados (DIL-OXA-H₂O e DIL-SUC-H₂O) e o sal-cocrystal (DIL-FUM-H₂FUM) obtidos promoveram uma redução considerável na solubilidade e velocidade de dissolução intrínseca do fármaco, sendo tal diminuição justificada pela formação de estruturas cristalinas mais eficientemente empacotadas. Tais evidências foram comprovadas estimando-se a energia de rede dos sais bem como por meio de detalhada análise cristalográfica. Por fim, reações envolvendo a MET base livre levou a formação dos sais maleato (MET-MAL), malonato (MET-MLN) e sacarinato (MET-SAC) de metformina. Estes novos três sais são menos solúveis e se dissolvem mais lentamente em relação à forma comercial (MET-HCl), sendo todos potencialmente promissores para comporem futuras formulações de liberação controlada. Portanto, os resultados apresentados nesta tese trazem importantes e inovadoras contribuições científicas, principalmente no que se refere à possibilidade de melhoria das propriedades biofarmacêuticas dos IFAs estudados.

Palavras-chave: engenharia de cristais; difração de raios X; formas sólidas; sais; cocrystalais.

ABSTRACT

The chemical and structural attributes of active pharmaceutical ingredients (APIs) are directly related to their biopharmaceutical properties. Among these properties, solubility, intrinsic dissolution, and permeability are considered important characteristics of a drug since they modulate bioavailability. In this context, crystal engineering has established itself as one of the most effective tools to improve the biopharmaceutical properties of APIs. In this work, eleven new multicomponent crystal forms, including salts and cocrystals, from the drugs carvedilol (CVD), furosemide (FSM), diltiazem (DIL) and metformin (MET), were rationally designed and had their crystal structures elucidated. Also, the crystalline modifications obtained were fully characterized by diffractometric, spectroscopic, and thermal techniques. Additionally, solubility, intrinsic dissolution, and *in vitro* permeability studies were also carried out. The two new racemic salts CVD-HCl-H₂O and CVD-HBr-H₂O crystallized as solid solutions of enantiomers while the CVD-OXA salt crystallized as a racemate. In the solid solutions, the notable miscibility between homochiral units of R··R and S··S enantiomeric pairs resulted in the formation of this rare system. Regarding solubility, the three new CVD salts promoted considerable improvements in CVD solubility. The design of the FSM solid forms had the main purpose to enhance the low solubility and permeability of the API. These objectives were successfully achieved since the FSM imidazolium salt (FSM-IMI) and the FSM 5-fluorocytosine monohydrate cocrystal (FSM-5FC-H₂O) proved to be more soluble and permeable compared to pure FSM. With respect to the DIL the two hydrated salts (DIL-OXA-H₂O and DIL-SUC-H₂O) and the anhydrous salt-cocrystal (DIL-FUM-H₂FUM) obtained provided a noticeable reduction in both solubility and intrinsic dissolution rate of the API. This is due to the formation of more efficiently packed crystalline structures. Such evidence was confirmed by estimating the salts energy framework as well as through detailed crystallographic analysis. Finally, the reactions involving MET free base made it possible to obtain the following salts: MET maleate (MET-MAL), malonate (MET-MLN), and saccharinate (MET-SAC). These new three salts were less soluble and dissolved more slowly compared to the commercial form MET-HCl, being all considered potentially promising to compose future controlled-release formulations. Therefore, the results presented in this thesis bring relevant and innovative scientific contributions, especially regarding the possibility of enhancing the biopharmaceutical properties of all APIs involved in this work.

Keywords: crystal engineering; X-ray diffraction; solid forms; salts; cocrystals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular dos fármacos carvedilol, diltiazem e furosemida.....	28
Figura 2 - Estrutura molecular do fármaco metformina	29
Figura 3 - Atual classificação das formas sólidas de IFAs.....	30
Figura 4 - Representação das formas sólidas cristalinas de IFAs.....	31
Figura 5 - Principais etapas envolvidas no planejamento de novas formas sólidas multicomponentes de um IFA.....	36
Figura 6 - Demonstração da superfície apical e basolateral em poços de placas Transwell®.....	58
Figura 7 - Formas de apresentação de um IFA quiral no estado sólido.....	73
Figura 8 - Unidades assimétricas dos sais hidratados (a) cloridrato (CVD-HCl-H ₂ O) e (b) bromidrato (CVD-HBr-H ₂ O) de carvedilol. Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	75
Figura 9 - (a) Representação dos dois planos dos grupos aromáticos nos cátions de CVD. (b) Valor do ângulo entre os planos das porções aromáticas dos cátions de CVD.....	77
Figura 10 - (a) Visão de empacotamento cristalino dos sais CVD-HCl-H ₂ O e CVD-HBr-H ₂ O no plano cristalográfico <i>bc</i> (as esferas roxas representam os ânions Cl ⁻ e Br ⁻). (b) Unidade não centrossimétrica estabilizada pelas interações NH ₂ ⁺ ...A ⁻ (A ⁻ = Cl ⁻ ou Br ⁻) e C-H...π. (c) Montagem das cadeias 1D a partir de unidades homquirais miscíveis R...R e S...S ao longo do eixo cristalográfico <i>c</i> . (d) Estrutura da folha formada no plano <i>ac</i> através de interações NH...A ⁻ . (e) Cadeias enantiomericamente enriquecidas formando camadas racêmicas paralelas ao eixo cristalográfico <i>b</i>	78
Figura 11 - Unidade assimétrica do sal oxalato de carvedilol (CVD-OXA). Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	80
Figura 12 - Empacotamento cristalino do sal CVD-OXA representado no plano cristalográfico <i>ac</i> . (b) Na estrutura cristalina, os ânions oxalato estão no centro de inversão, conectando ambos os enantiômeros <i>R</i> e <i>S</i> do CVD através das interações N-H...O e C-H...π. (c) Visão das cadeias 1D racêmicas que se propagam ao longo do eixo cristalográfico <i>b</i>	81

Figura 13 - Sobreposição das conformações moleculares dos cátions de CVD (enantiômeros <i>R</i>) dos sais cloridrato de carvedilol (CVD-HCl-H ₂ O), bromidrato de carvedilol (CVD-HBr-H ₂ O) e oxalato de carvedilol (CVD-OXA).....	82
Figura 14 - Difratomogramas calculados (calc) e experimentais (exp) dos sais oxalato (CVD-OXA), cloridrato (CVD-HCl-H ₂ O) e bromidrato (CVD-HBr-H ₂ O) monohidratados de carvedilol. Os difratogramas simulado e experimental do CVD foram acrescentados para critérios de comparação.....	84
Figura 15 - Espectros na região do infravermelho do fármaco carvedilol (CVD) e dos sais oxalato de carvedilol (CVD-OXA), cloridrato de carvedilol (CVD-HCl-H ₂ O) e bromidrato de carvedilol (CVD-HBr-H ₂ O).....	85
Figura 16 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos compostos: carvedilol (CVD), oxalato de carvedilol (CVD-OXA), cloridrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HCl-H ₂ O) e bromidrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HBr-H ₂ O).....	87
Figura 17 - Imagens obtidas por análise termo-ótica a partir de monocristais dos compostos: (a) carvedilol (CVD), (b) oxalato de carvedilol (CVD-OXA), (c) cloridrato de carvedilol (CVD-HCl-H ₂ O) e (d) bromidrato de carvedilol (CVD-HBr-H ₂ O).....	88
Figura 18 - Cromatogramas obtidos após a injeção de soluções de concentração 100 µg mL ⁻¹ dos compostos CVD racêmico SQR (vermelho), CVD matéria-prima (preto), sal CVD-HCl-H ₂ O (verde), sal CVD-HBr-H ₂ O (marrom) e sal CVD-OXA (azul). Os parâmetros tempo de retenção e área do pico de cada cromatograma foram inseridos.....	89
Figura 19 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução do fármaco carvedilol (CVD) e dos sais cloridrato de carvedilol monohidratado (CVD-HCl-H ₂ O), bromidrato de carvedilol monohidratado (CVD-HBr-H ₂ O) e oxalato de carvedilol (CVD-OXA).....	91
Figura 20 - (a) Estrutura molecular da furosemida mostrando os números dos átomos e os principais ângulos de torção da molécula. (b) Sobreposição das conformações moleculares da furosemida a partir dos compostos: polimorfo II (cinza), sal FSM-IMI (amarelo) e cocrystal FSM-5FC-H ₂ O (verde).....	98
Figura 21 - Unidade assimétrica do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI). Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	99

Figura 22 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion imidazol (IMI^+) e do ânion furosemida (FSM^-) provenientes do sal FSM-IMI. É possível notar a protonação do anel imidazólico no átomo de nitrogênio N3. A escala numérica do mapa é dada por $\text{e} \cdot \text{Å}^{-3}$	100
Figura 23 - (a) Par iônico do sal FSM-IMI que representa a sua unidade assimétrica. (b) Empacotamento cristalino do sal FSM-IMI no plano cristalográfico <i>bc</i> . (c) Estrutura tipo folha mostrando a participação do cátion IMI^+ na formação das cadeia 1D entre os ânions FSM^- ao longo da direção [-101]. (d) Visão parcial do empacotamento das folhas cuja rede de ligações de hidrogênio gera vazios discretos na estrutura preenchidos por cátions IMI^+	100
Figura 24 - Unidade assimétrica do cocrystal mono-hidratado de furosemida e 5-fluorocitosina ($\text{FSM-5FC-H}_2\text{O}$). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	102
Figura 25 - Mapas de diferença de densidade eletrônica, sob duas diferentes perspectivas, das moléculas de furosemida (FSM) e 5-fluorocitosina (5FC) provenientes do cocrystal $\text{FSM-5FC-H}_2\text{O}$, mostrando a presença de um átomo de hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio O2 do grupo carboxila da FSM. É possível notar também que o átomo de nitrogênio N3 da 5FC não está protonado. A escala numérica do mapa é dada por $\text{e} \cdot \text{Å}^{-3}$	103
Figura 26 - (a) Unidade do cocrystal $\text{FSM-5FC-H}_2\text{O}$ que representa a sua unidade assimétrica. (b) Empacotamento cristalino do cocrystal $\text{FSM-5FC-H}_2\text{O}$ no plano cristalográfico <i>ac</i> mostrando as camadas e bicamadas formadas ao longo da estrutura. (c) Visão das cadeias 1D que se propagam paralelamente ao eixo cristalográfico <i>c</i> e dos padrões de ligações de hidrogênio na estrutura cristalina.....	104
Figura 27 - (a) Visão do empacotamento cristalino do cocrystal $\text{FSM-5FC-H}_2\text{O}$ no plano cristalográfico <i>ac</i> , mostrando a estrutura cristalina tipo coluna. (b) Representação 3D do empacotamento do cocrystal $\text{FSM-5FC-H}_2\text{O}$, destacando que os espaços vazios encontram-se preenchidos por moléculas de água. (c) Cadeias individuais formadas entre as moléculas de FSM e 5FC ao longo do eixo cristalográfico <i>b</i> . (d) Padrão de ligações de hidrogênio estabelecido entre as unidades do cocrystal.....	104

Figura 28 - Difractogramas calculados (calc) e experimentais (exp) do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e do cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H ₂ O). Os difratogramas da furosemida (FSM) foram acrescentados para critérios de comparação.....	106
Figura 29 - Espectros na região do infravermelho do fármaco furosemida (FSM), do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e do cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H ₂ O).....	107
Figura 30 - Espectros de ¹ H RMN (600 MHz), obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ , (a) do fármaco furosemida (FSM), (b) do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e (c) do cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H ₂ O).....	109
Figura 31 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos compostos: (a) furosemida (FSM), (b) sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e (c) cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H ₂ O). (d) Imagens obtidas por análise termo-ótica de monocristais dos compostos FSM, FSM-IMI e FSM-5FC-H ₂ O.....	111
Figura 32 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução das formas furosemida (FSM), sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H ₂ O).....	112
Figura 33 - Perfil de dissolução intrínseca dos compostos furosemida (FSM), sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H ₂ O) em tampão fosfato pH 6,8.....	114
Figura 34 - Sobreposição das conformações moleculares dos cátions de DIL ⁺ das estruturas cristalinas dos compostos DIL-HCl (cinza), DIL-SUC-H ₂ O (verde), DIL-OXA-H ₂ O (azul claro) e DIL-FUM-H ₂ FUM (vermelho escuro e rosa claro)....	124
Figura 35 - Unidade assimétrica do sal succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O). A porção desordenada da molécula do ânion SUC ⁻ foi omitida para melhor visualização da estrutura. Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	126

Figura 36 - (a) Visão das ligações de hidrogênio entre cátion DIL^+ , ânions SUC^- e moléculas de água na estrutura do sal $DIL-SUC-H_2O$. (b) Representação da cadeia de ânions SUC^- ao longo do eixo cristalográfico b . (c) Empacotamento cristalino parcial do sal $DIL-SUC-H_2O$ no plano cristalográfico ac	127
Figura 37 - Unidade assimétrica do sal oxalato de diltiazem di-hidratado ($DIL-OXA-H_2O$). Os átomos de hidrogênio das moléculas de água foram omitidos. Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	128
Figura 38 - (a) Ligações de hidrogênio bifurcadas no par iônico $DIL^+ \cdot OXA^-$. (b) Interações $C-H \cdots \pi$ entre moléculas adjacentes de cátions DIL^+ . (c) Representação do arranjo cristalino em colunas do sal $DIL-OXA-H_2O$ no plano cristalográfico ac	130
Figura 39 - Unidade assimétrica do sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de diltiazem ($DIL-FUM-H_2FUM$). A porção desordenada da molécula do ânion FUM^{2-} foi omitida para melhor visualização da estrutura. Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	131
Figura 40 - (a) Representação das ligações de hidrogênio entre cátions DIL^+ (A e B) e as moléculas do ânion FUM^{2-} e do ácido H_2FUM . (b) Cadeias 1D formadas entre as moléculas de FUM^{2-} e H_2FUM ao longo do eixo cristalográfico c . (c) Visão parcial do empacotamento cristalino do sal-cocrystal $DIL-FUM-H_2FUM$ no plano cristalográfico ab	133
Figura 41 - Difrátogramas calculados (calc) e experimentais (exp) dos sais succinato de diltiazem mono-hidratado ($DIL-SUC-H_2O$), oxalato de diltiazem di-hidratado ($DIL-OXA-H_2O$) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem ($DIL-FUM-H_2FUM$). Os difratogramas das formas cloridrato ($DIL-HCl$) e base livre (DIL) do diltiazem foram acrescentados para critérios de comparação.....	134
Figura 42 - Espectros na região do infravermelho da base livre do fármaco diltiazem (DIL), dos sais succinato de diltiazem mono-hidratado ($DIL-SUC-H_2O$), oxalato de diltiazem di-hidratado ($DIL-OXA-H_2O$) e do sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de diltiazem ($DIL-FUM-H_2FUM$).....	135

Figura 43 - Representação da topologia de energia de rede levando-se em consideração as contribuições eletrostáticas (vermelho), dispersivas (verde) e total (azul) para os sais (a) cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), (b) succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O), (c) oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O) e (d) fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	137
Figura 44 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos compostos: cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	139
Figura 45 - Imagens obtidas por análise termo-ótica a partir de monocristais dos compostos (a) succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O), (b) oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O) e (c) fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	140
Figura 46 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	141
Figura 47 - Perfil de dissolução intrínseca dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM) em água ultrapura.....	143
Figura 48 - Unidade assimétrica do sal maleato de metformina (MET-MAL). Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	150
Figura 49 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion MET ⁺ e do ânion MAL ⁻ do sal MET-MAL. As regiões em azul representam posições ocupadas por átomos de hidrogênio. A escala numérica do mapa é dada por e.Å ⁻³	150
Figura 50 - (a) Par iônico MET ⁺ ·MAL ⁻ correspondente a unidade assimétrica do sal MET-MAL. (b) Cadeias 1D de pares iônicos MET ⁺ ·MAL ⁻ ao longo do eixo cristalográfico <i>b</i> . (c) Folhas 2D mostrando os padrões de interações intermoleculares na estrutura. (d) Empacotamento cristalino do sal MET-MAL no plano cristalográfico <i>ac</i>	152

Figura 51 - Unidade assimétrica do sal malonato de metformina (MET-MLN). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	153
Figura 52 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion MET ⁺ e do ânion MLN ⁻ do sal MET-MLN. As regiões em azul representam posições ocupadas por átomos de hidrogênio. A escala numérica do mapa é dada por e.Å ⁻³	153
Figura 53 - (a) Par iônico MET ⁺ ·MLN ⁻ correspondente a unidade assimétrica do sal MET-MLN. (b) Cadeias 1D de pares iônicos MET ⁺ ·MLN ⁻ ao longo do eixo cristalográfico <i>a</i> . (c) Montagem das cadeias de pares iônicos MET ⁺ ·MLN ⁻ resultando na formação de folhas 2D na estrutura. (d) Empacotamento cristalino do sal MET-MLN no plano cristalográfico <i>ac</i>	155
Figura 54 - Unidade assimétrica do sal sacarinato de metformina (MET-SAC). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.....	156
Figura 55 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion MET ⁺ e do ânion SAC ⁻ do sal MET-SAC. As regiões em azul representam posições ocupadas por átomos de hidrogênio. A escala numérica do mapa é dada por e.Å ⁻³	156
Figura 56 - (a) Unidade assimétrica do sal MET-SAC enfatizando o par iônico MET ⁺ ·SAC ⁻ . (b) Unidades diméricas de pares iônicos MET ⁺ ·SAC ⁻ ao longo da direção cristalográfica [312]. (c) Cadeias de unidades diméricas ortogonalmente dispostas na estrutura. (d) Empacotamento cristalino do sal MET-SAC no plano cristalográfico <i>bc</i> . (e) Homodímeros formados entre ânions SAC ⁻	157
Figura 57 - Difratoformas calculados (calc) e experimentais (exp) dos sais cloridrato (MET-HCl), maleato (MET-MAL), malonato (MET-MLN) e sacarinato (MET-SAC) de metformina.....	159
Figura 58 - Espectros na região do infravermelho da base livre do fármaco metformina (MET) e dos sais maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).....	160
Figura 59 - Espectros de ¹ H RMN (400 MHz), obtidos em DMSO- <i>d</i> ₆ , dos sais (a) cloridrato de metformina (MET-HCl), (b) maleato de metformina (MET-MAL), (c) malonato de metformina (MET-MLN) e (d) sacarinato de metformina (MET- SAC).....	162

Figura 60 - Representação da topologia de energia de rede levando-se em consideração as contribuições eletrostáticas (vermelho), dispersivas (verde) e total (azul) para os sais (a) maleato de metformina (MET-MAL), (b) malonato de metformina (MET-MLN) e (c) sacarinato de metformina (MET-SAC).....	163
Figura 61 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).....	165
Figura 62 - Imagens obtidas por análise termo-ótica a partir de monocristais dos sais (a) maleato de metformina (MET-MAL), (b) malonato de metformina (MET-MLN) e (c) sacarinato de metformina (MET-SAC).....	166
Figura 63 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).....	167
Figura 64 - Perfil de dissolução intrínseca dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC) em tampão fosfato pH 6,8.....	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações do CVD com os ácidos usados como coformadores.....	43
Tabela 2 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações da FSM com os bases usadas como coformadores.....	45
Tabela 3 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações do DIL com os ácidos usados como coformadores.....	47
Tabela 4 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações da MET com os compostos usados como coformadores.....	49
Tabela 5 - Preparo dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio.....	56
Tabela 6 - Preparo das soluções de CVD para avaliação da linearidade do método analítico.....	66
Tabela 7 - Preparo das soluções de FSM para avaliação da linearidade do método analítico.....	67
Tabela 8 - Preparo das soluções de FSM para avaliação da linearidade do método bioanalítico.....	68
Tabela 9 - Preparo das soluções de FSM para avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.....	69
Tabela 10 - Preparo das soluções de DIL para avaliação da linearidade do método analítico.....	69
Tabela 11 - Preparo das soluções de MET para avaliação da linearidade do método analítico.....	70
Tabela 12 - Preparo das soluções de MET para avaliação da linearidade do método bioanalítico.....	71
Tabela 13 - Preparo das soluções de MET para avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.....	71
Tabela 14 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos sais de carvedilol.....	74
Tabela 15 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio dos sais hidratados cloridrato (CVD-HCl-H ₂ O) e bromidrato (CVD-HBr-H ₂ O) de carvedilol.....	76

Tabela 16 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal oxalato de carvedilol (CVD-OXA).....	80
Tabela 17 - Atribuições das principais bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros infravermelho do fármaco CVD e dos novos sais de CVD.....	85
Tabela 18 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de CVD.....	93
Tabela 19 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de CVD.....	93
Tabela 20 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas durante a validação do método bioanalítico para a quantificação de CVD.....	94
Tabela 21 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos do sal e do cocrystal da furosemida.....	98
Tabela 22 - Ângulos de torção τ_1 , τ_2 e τ_3 das moléculas de FSM.....	99
Tabela 23 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI).....	100
Tabela 24 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do cocrystal de furosemida e 5-fluorocitosina (FSM-5FC- H_2O).....	102
Tabela 25 - Atribuições das principais bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros infravermelho do fármaco FSM e das novas modificações cristalinas.....	107
Tabela 26 - Dados biofarmacêuticos dos compostos furosemida (FSM), sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e cocrystal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC- H_2O).....	114
Tabela 27 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de FSM.....	116
Tabela 28 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de FSM.....	117
Tabela 29 - Resultados de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de FSM.....	118
Tabela 30 - Resultados da avaliação da linearidade do método bioanalítico para a quantificação de FSM.....	119
Tabela 31 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas durante a validação do método bioanalítico para a quantificação de FSM.....	119

Tabela 32 - Resultados de precisão e exatidão do método bioanalítico para a quantificação de FSM.....	120
Tabela 33 - Resultados do estudo de estabilidade do fármaco FSM em tampão HBSS obtido durante a validação do método bioanalítico.....	120
Tabela 34 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos sais de diltiazem.....	125
Tabela 35 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O).....	126
Tabela 36 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O).....	129
Tabela 37 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal-cocristal fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	132
Tabela 38 - Atribuições das principais bandas (em cm ⁻¹) observadas nos espectros infravermelho do DIL base livre e dos novos sais de DIL.....	135
Tabela 39 - Parâmetros físico-químicos dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	138
Tabela 40 - Dados biofarmacêuticos dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H ₂ O), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H ₂ O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H ₂ FUM).....	142
Tabela 41 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de DIL.....	144
Tabela 42 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de DIL.....	145
Tabela 43 - Resultados de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de DIL.....	145
Tabela 44 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos sais de metformina.....	149
Tabela 45 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal maleato de metformina (MET-MAL).....	150

Tabela 46 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal malonato de metformina (MET-MLN).....	153
Tabela 47 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal sacarinato de metformina (MET-SAC).....	158
Tabela 48 - Atribuições das principais bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros no infravermelho da base livre da metformina (MET) e dos novos sais de MET.....	160
Tabela 49 - Parâmetros físico-químicos dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).....	164
Tabela 50 - Dados biofarmacêuticos dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).....	169
Tabela 51 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de MET.....	171
Tabela 52 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de MET.....	171
Tabela 53 - Resultados de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de MET.....	172
Tabela 54 - Resultados da avaliação da linearidade do método bioanalítico para a quantificação de MET.....	173
Tabela 55 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas durante a validação do método bioanalítico para a quantificação de MET.....	173
Tabela 56 - Resultados de precisão e exatidão do método bioanalítico para a quantificação de MET.....	174
Tabela 57 - Resultados do estudo de estabilidade do fármaco MET em tampão HBSS obtido durante a validação do método bioanalítico.....	174

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Procedimentos envolvidos no preparo dos novos sais de CVD.....	44
Esquema 2 - Procedimentos envolvidos no preparo do sal e do cocristal de FSM.....	46
Esquema 3 - Procedimentos envolvidos no preparo dos novos sais de DIL.....	48
Esquema 4 - Procedimentos envolvidos no preparo dos novos sais de MET.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FC	5-fluorocitosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflection</i> ; Reflexão total atenuada
C ₁₈	Octadecilsilano
CIF	<i>Crystallography information file</i> ; Arquivo com informações cristalográficas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQLIQ	Controle de qualidade no limite inferior de quantificação
CQM	Controle de qualidade de média concentração
CSD	<i>Cambridge structural database</i> ; Base de dados de estruturas de <i>Cambridge</i>
CVD	Carvedilol
CVD-HCl-H ₂ O	Sal cloridrato de carvedilol mono-hidratado
CVD-HBr-H ₂ O	Sal bromidrato de carvedilol mono-hidratado
CVD-OXA	Sal oxalato de carvedilol
DIL	Diltiazem base livre
DIL-FUM-H ₂ FUM	Sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de diltiazem
DIL-HCl	Sal cloridrato de diltiazem
DIL-OXA-H ₂ O	Sal oxalato de diltiazem di-hidratado
DIL-SUC-H ₂ O	Sal succinato de diltiazem mono-hidratado
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de raios X
DRXM	Difração de raios X por monocristal
DRXP	Difração de raios X por policristais
DSC	<i>Differential Scanning Calorimeter</i> ; Calorimetria exploratória diferencial
EPR	Erro padrão relativo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSM	Furosemida
FSM-IMI	Sal imidazolínio de furosemida

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (continuação)

FSM-5FC-H ₂ O	Cocristal mono-hidratado de furosemida e 5-fluorocitosina
FLU	Fluorescência
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> ; Reconhecido como seguro
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> ; Solução tampão <i>Hanks</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IMI	Imidazol
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
LQ	Limite de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
MET	Metformina base livre
MET-HCl	Sal cloridrato de metformina
MET-MAL	Sal maleato de metformina
MET-MLN	Sal malonato de metformina
MET-SAC	Sal sacarinato de metformina
<i>Papp</i>	Permeabilidade aparente
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo negativo da constante de acidez
R ²	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RMN	Ressonância magnética nuclear
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
SQR	Substância química de referência
SSE	Soluções sólidas de enantiômeros
TG	Termogravimetria
TOA	<i>Thermal-optical analysis</i> ; Análise termo-ótica
UV	Ultravioleta
VDI	Velocidade de dissolução intrínseca
v/v	Volume por volume
Ω	Ômega

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Hipertensão arterial sistêmica e diabetes <i>mellitus</i>	27
3.2 Formas de apresentação de insumos farmacêuticos ativos.....	29
3.2.1 <i>Sais e cocristsais farmacêuticos</i>	32
3.3 Engenharia de cristais e obtenção de novas formas sólidas.....	34
3.4 Técnicas de caracterização de sólidos multicomponentes.....	36
3.5 Estado sólido e propriedades biofarmacêuticas.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Reagentes, fármacos e substâncias químicas de referência.....	41
4.2 Síntese, seleção dos coformadores e protocolos de cristalização.....	41
4.2.1 <i>Sais e soluções sólidas de enantiômeros de carvedilol</i>	42
4.2.2 <i>Sal e cocrystal de furosemida</i>	44
4.2.3 <i>Sais e sal-cocrystal de diltiazem</i>	46
4.2.4 <i>Sais de metformina</i>	47
4.3 Caracterização químico-estrutural.....	50
4.3.1 <i>Difração de raios X por monocristal</i>	51
4.3.2 <i>Difração de raios X por policristais</i>	53
4.3.3 <i>Estimativa da energia de rede</i>	53
4.3.4 <i>Análises espectroscópicas</i>	54
4.3.5 <i>Análises térmicas</i>	54
4.4 Avaliação das propriedades biofarmacêuticas.....	55
4.4.1 <i>Solubilidade</i>	55
4.4.2 <i>Dissolução intrínseca</i>	56
4.4.3 <i>Permeabilidade</i>	57
4.4.4 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	59
4.4.5 <i>Desenvolvimento dos métodos cromatográficos</i>	59
4.4.6 <i>Validação dos métodos cromatográficos</i>	60

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1 Novos sais e soluções sólidas de enantiômeros do fármaco carvedilol e suas implicações biofarmacêuticas.....	72
5.1.1 <i>Descrição cristalográfica e conformacional</i>	73
5.1.2 <i>Análise por difração de raios X por policristais</i>	83
5.1.3 <i>Espectros vibracionais no infravermelho</i>	84
5.1.4 <i>Caracterização térmica</i>	86
5.1.5 <i>Análise por cromatografia quiral</i>	88
5.1.6 <i>Determinação da solubilidade</i>	90
5.1.7 <i>Validação do método analítico para quantificação de carvedilol por CLAE-FLU</i>	92
5.1.8 <i>Impactos das novas formas sólidas de carvedilol</i>	94
5.2 Novo sal e cocrystal do fármaco furosemida e suas propriedades biofarmacêuticas.....	96
5.2.1 <i>Análise conformacional e das estruturas cristalinas</i>	97
5.2.2 <i>Análise por difração de raios X por policristais</i>	105
5.2.3 <i>Espectros vibracionais no infravermelho</i>	106
5.2.4 <i>Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio</i>	108
5.2.5 <i>Caracterização térmica</i>	110
5.2.6 <i>Determinação da solubilidade e dissolução intrínseca</i>	112
5.2.7 <i>Avaliação in vitro da permeabilidade</i>	114
5.2.8 <i>Validação do método analítico para quantificação de furosemida por CLAE-UV</i>	116
5.2.9 <i>Validação do método bioanalítico para quantificação de furosemida por CLAE-FLU</i>	118
5.2.10 <i>Impactos das novas formas sólidas de furosemida</i>	121
5.3 Novos sais e sal-cocrystal do fármaco diltiazem e suas implicações biofarmacêuticas.....	122
5.3.1 <i>Descrição cristalográfica e conformacional</i>	123
5.3.2 <i>Análise por difração de raios X por policristais</i>	133
5.3.3 <i>Espectros vibracionais no infravermelho</i>	134
5.3.4 <i>Avaliação de energia de rede</i>	136
5.3.5 <i>Caracterização térmica</i>	138

5.3.6 Determinação da solubilidade e dissolução intrínseca	141
5.3.7 Validação de método analítico para quantificação de diltiazem por CLAE-UV.....	143
5.3.8 Impactos das novas formas sólidas de diltiazem.....	146
5.4 Novos sais do fármaco metformina e suas propriedades biofarmacêuticas.....	147
5.4.1 Análise das estruturas cristalinas.....	148
5.4.2 Análise por difração de raios X por policristais.....	158
5.4.3 Espectros vibracionais no infravermelho.....	159
5.4.4 Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.....	161
5.4.5 Avaliação de energia de rede.....	162
5.4.6 Caracterização térmica.....	164
5.4.7 Determinação da solubilidade e dissolução intrínseca.....	166
5.4.8 Avaliação in vitro da permeabilidade.....	169
5.4.9 Validação de método analítico para quantificação de metformina por CLAE-UV.....	170
5.4.10 Validação de método bioanalítico para quantificação de metformina por CLAE-UV.....	172
5.4.11 Impactos das novas formas sólidas de metformina.....	175
6 CONCLUSÕES.....	176
REFERÊNCIAS.....	178

1 INTRODUÇÃO

O tratamento de doenças crônicas degenerativas no Brasil, como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e o diabetes *mellitus* (DM), é ofertada em parte pelo setor público, seguindo os protocolos recomendados pelo Ministério da Saúde. Com o envelhecimento populacional, decorrente principalmente do aumento da expectativa de vida, o número de pessoas portadoras dessas doenças tem aumentado, o que reforça cada vez mais a ideia de que é necessário levar medicamentos com qualidade assegurada para a população. Nas últimas décadas, foi possível perceber um aumento considerável na utilização de fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos, de forma a minimizar e controlar o avanço dessas doenças nos indivíduos acometidos por elas. Nesse sentido, ficou ainda mais evidente que muitos dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) indicados para o tratamento dessas doenças apresentam propriedades biofarmacêuticas que podem ou que precisam ser aprimoradas, como a solubilidade, a dissolução intrínseca, a permeabilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade.

Diante deste cenário, a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos, com características biofarmacêuticas melhoradas, se consolidou como uma das principais linhas de investigação de muitos grupos de pesquisa do segmento químico-farmacêutico. Existe também um apelo muito grande no sentido de melhorar as características dos IFAs que já são utilizados atualmente na terapêutica. Dentre as inúmeras estratégias empregadas nesse contexto, a que tem demonstrado ser uma das mais viáveis e eficazes é a engenharia de cristais moleculares. Essa abordagem, que se baseia nos princípios da química supramolecular, é pautada no planejamento racional de novas formas sólidas cristalinas, tais como sais e cocrystalos. As novas modificações cristalinas (consideradas novas entidades químicas) alteram, na maioria das vezes para melhor, as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas dos IFAs, sem que haja mudanças nos grupos farmacofóricos, tornando-as atraentes no sentido de melhorar a eficácia, a segurança e a qualidade dos medicamentos.

Em uma busca na literatura, notou-se que os fármacos anti-hipertensivos carvedilol (CVD), diltiazem (DIL) e furosemida (FSM), bem como a metformina (MET), um antidiabético, apresentam pelo menos uma característica biofarmacêutica indesejável, que pode ser melhorada. Além disso, há poucas estruturas cristalinas reportadas para estes IFAs, o que os tornam excelentes candidatos para o desenvolvimento de novas formas sólidas cristalinas. Assim, estes quatro fármacos constituem o objeto de estudo desta tese.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Obtenção e caracterização químico-estrutural/biofarmacêutica de novas formas sólidas multicomponentes dos fármacos CVD, FSM, DIL e MET.

2.2 Específicos

- Estabelecer protocolos de síntese supramolecular e de cristalização a fim de obter monocristais viáveis para a difração de raios X;
- Realizar uma ampla caracterização químico-estrutural dos novos cristais obtidos por meio de técnicas espectroscópicas, térmicas e difratométricas;
- Comparar as estruturas e os arranjos supramoleculares das novas modificações cristalinas relacionando-as com propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas;
- Determinar a solubilidade e velocidade de dissolução intrínseca das novas formas sólidas obtidas para os fármacos estudados;
- Avaliar a permeabilidade *in vitro* dos novos cristais de FSM e MET, empregando cultura de células intestinais humanas Caco-2;
- Analisar criticamente as implicações biofarmacêuticas dos novos sólidos cristalinos obtidos no contexto farmacoterapêutico em que tais IFAs se inserem.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Hipertensão arterial sistêmica e diabetes *mellitus*

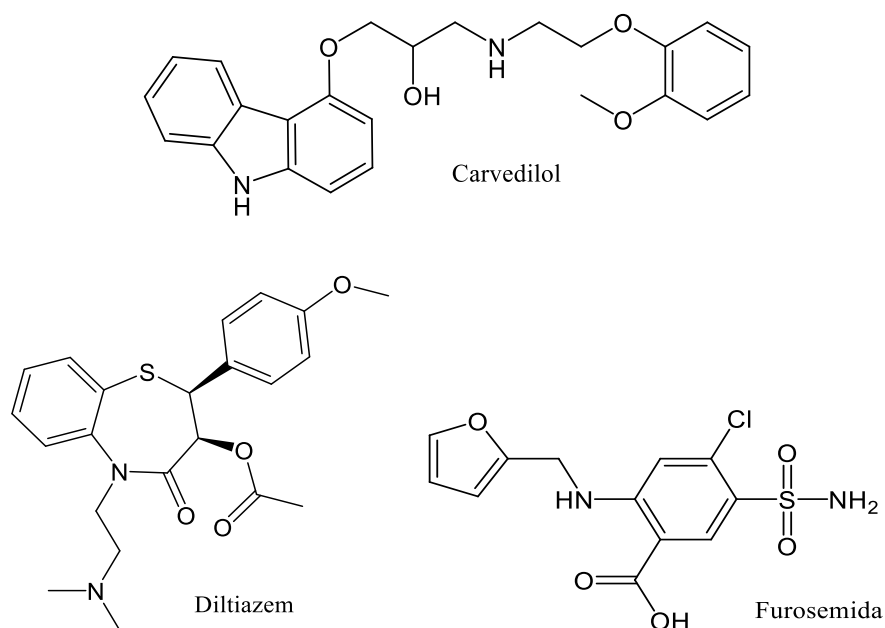
A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada pela elevação sustentada dos níveis pressóricos. A HAS está frequentemente associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo agravada pela presença de outros fatores de risco, como dislipidemia, obesidade abdominal, intolerância à glicose e diabetes *mellitus* (DM). Além disso, a HAS está associada com eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal crônica, fatal e não fatal (WEBER *et al.*, 2015).

A classe das doenças cardiovasculares (DCV) é a primeira causa de mortes no mundo, com cerca de 17,3 milhões de mortes por ano. A HAS é responsável por pelo menos 45% das mortes devido às doenças cardíacas e 51% das mortes devido às doenças cerebrovasculares. Estudos estimam que, em 2025, haverá 1,6 bilhão de pacientes hipertensos no mundo. Sem contar que a hipertensão arterial é responsável por 10% de todo o custo global de saúde, com o gasto estimado em US\$ 370 bilhões de dólares por ano (BENJAMIN *et al.*, 2017). No Brasil, as doenças cardiovasculares têm sido a principal causa de morte. Em 2015, ocorreram 339.672 óbitos por doenças relacionadas com o aparelho circulatório. A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, sendo então considerada um grave problema de saúde pública no Brasil (SCALA *et al.*, 2015).

Com relação ao tratamento da hipertensão, existem dois tipos: o medicamentoso e o não-medicamentoso. O tratamento não-medicamentoso envolve mudanças no estilo de vida do indivíduo, tais como: controle de peso, uso de um padrão alimentar adequado, redução do consumo de sal, moderação no consumo de álcool, realização de atividade física regular, dentre outras. O tratamento medicamentoso deve não só reduzir a pressão arterial como também os eventos cardiovasculares fatais e não-fatais, e, se possível, a taxa de mortalidade (MALACHIAS *et al.*, 2016). Dessa forma, alguns aspectos são importantes na escolha do fármaco anti-hipertensivo, como eficácia por via oral; tolerância pelo organismo; administração em menor número de administrações possíveis, com preferência para dose única diária; início em menores doses, podendo ser aumentada gradativamente; e ser considerado em associação para os pacientes em estágios de hipertensão mais graves. Os fármacos anti-hipertensivos preferenciais para a realização do controle da pressão arterial em monoterapia inicial são: diuréticos; betabloqueadores;

bloqueadores dos canais de cálcio; inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina e antagonistas dos canais de cálcio. Na prática, a associação de fármacos anti-hipertensivos é quase sempre requerida e necessária para o devido controle da hipertensão arterial (MALACHIAS *et al.*, 2016). Nesse sentido, considerando o tratamento medicamentoso da HAS, os fármacos utilizados neste trabalho como compostos de partida para a realização de modificações nas respectivas estruturas cristalinas são: CVD, DIL e a FSM (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura molecular dos fármacos carvedilol, diltiazem e furosemida.



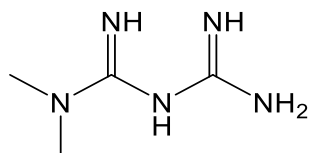
A DM não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos caracterizado pela presença de hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na sua secreção ou em ambas. A classificação atual da DM baseia-se na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde e pela Associação Americana de Diabetes inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Há ainda duas categorias, referidas como pré-diabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e DCV (ADA *et al.*, 2010).

Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 387 milhões e que alcance 471 milhões em 2035. Cerca de 80% desses indivíduos vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade e há crescente

proporção de pessoas acometidas em grupos etários mais jovens. O número de diabéticos está aumentando em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional, da maior urbanização, da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como da maior sobrevida de pacientes com DM. No Brasil, o número de pessoas com diabetes em 2014 era de 11,9 milhões de pessoas, na faixa etária de 20 a 79 anos. Este número pode alcançar 19,2 milhões em 2035, segundo estimativas (SCHMIDT *et al.*, 2014).

O objetivo principal do tratamento da diabetes não é a cura. De forma geral, o tratamento visa estabelecer um maior controle metabólico, minimizando as complicações da doença causadas pelas oscilações da glicemia. No entanto, nem sempre a manutenção dos níveis glicêmicos é obtida pela utilização de um único agente terapêutico, sendo então indicada a adição de uma segunda ou terceira substância antidiabética, ou a introdução de insulinoterapia para que se alcance melhor adequação do controle glicêmico necessário para a prevenção das alterações crônicas da diabetes. Os antidiabéticos orais, utilizados na farmacoterapia da diabetes, são compostos que tem por finalidade reduzir a glicemia de forma a mantê-la no nível considerado normal. Tais fármacos encontram-se agrupados em diferentes classes, podendo-se citar as biguanidas, as sulfonilureias, as tiazolidinedionas e as glinidas (OLIVEIRA; MILECH, 2014). O único fármaco com ação hipoglicemiante utilizado neste trabalho para a realização de modificações cristalinas em sua estrutura é a MET (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura molecular do fármaco metformina.

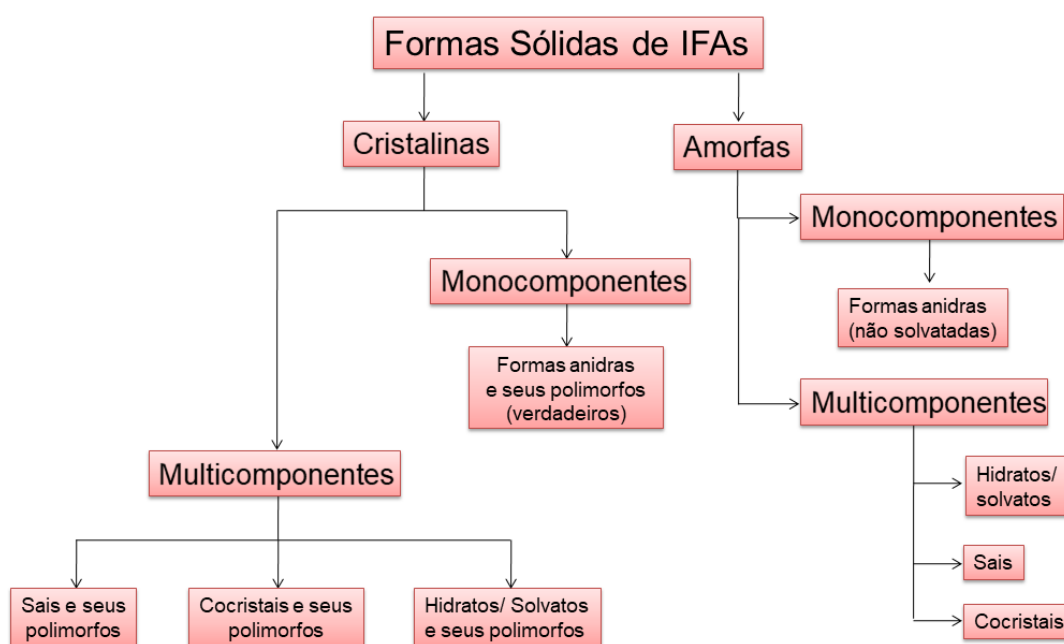


3.2 Formas de apresentação de insumos farmacêuticos ativos

Os IFAs são utilizados, na sua grande maioria, por meio de formas farmacêuticas sólidas de uso oral, tais como comprimidos e cápsulas, principalmente por apresentarem administração mais cômoda para o paciente, aumentando as chances de adesão ao tratamento. Os baixos custos de produção, associados à elevada estabilidade e manufaturabilidade de IFAs no estado sólido, também são fatores que contribuem bastante para a produção e a comercialização de medicamentos sólidos (AUGSBURGER; HOAG, 2016).

Em relação às formas de apresentação, os IFAs podem assumir configurações bastante variadas no estado sólido. Estas formas englobam sais, cocristais, solvatos, hidratos, polimorfos, sólidos amorfos, entre outros. A Figura 3 ilustra esquematicamente a classificação mais aceita atualmente que categoriza as diferentes formas sólidas existentes para um IFA, levando em consideração aspectos científicos, industriais e, obviamente, químico-estruturais (AITIPAMULA *et al.*, 2012). De maneira geral, as formas sólidas são divididas com base em dois critérios principais: o primeiro deles refere-se ao ordenamento das moléculas, existindo sólidos cristalinos (ordenados) e sólidos amorfos (desordenados ou não-cristalinos) e o segundo está relacionado com o número de componentes que formam o sólido, havendo sistemas monocomponentes e multicomponentes.

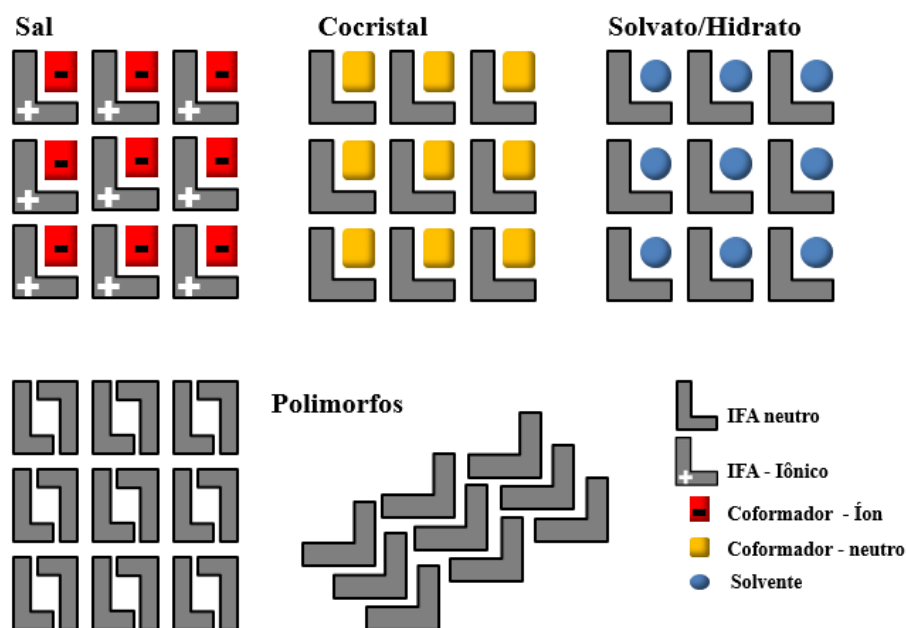
Figura 3 - Atual classificação das formas sólidas de IFAs.



Quando a forma sólida é composta unicamente por moléculas do IFA, tem-se um sistema dito monocomponente que pode, por sua vez, ser constituído por um ou mais polimorfos, caso as moléculas do IFA no cristal apresentem diferentes conformações e/ou orientações, levando à formação de distintos empacotamentos cristalinos. Nesse caso, os diferentes compostos formados são considerados polimorfos verdadeiros. Por outro lado, quando o IFA realiza uma interação com outra espécie química dentro da estrutura cristalina, um sistema multicomponente é formado e, dependendo da natureza química, da composição e da forma como essas espécies interagem entre si dentro do cristal, têm-

se três grandes subdivisões: os hidratos/solvatos, os sais e os cocrystalis (AITIPAMULA *et al.*, 2012; HILFIKER, 2009). A Figura 4 ilustra as principais características das formas sólidas cristalinas (GROTHER *et al.*, 2016). Vale salientar que formas cristalinas multicomponentes podem ser combinadas entre si, levando à formação de sistemas ainda mais complexos, cuja formação pode envolver três ou até quatro componentes, dependendo do caso.

Figura 4 - Representação das formas sólidas cristalinas de IFAs.



Além das formas cristalinas que se caracterizam por apresentar organização estrutural de longo alcance, cabe destacar a importância dos IFAs amorfos. Os sólidos amorfos geralmente apresentam solubilidade e biodisponibilidade maiores quando comparados com formas sólidas cristalinas. Isso acontece, pois essa forma possui estados de alta energia que são associados ao desordenamento estrutural, sendo termodinamicamente menos estáveis. Apesar de apresentarem vantagens, principalmente em relação à solubilidade, a baixa estabilidade dos IFAs amorfos favorece a conversão espontânea para as formas cristalinas mais estáveis. Assim, em termos de estabilidade, os IFAs cristalinos são mais vantajosos comparado aos amorfos (BABU; NANGIA, 2011).

A formação de hidratos e solvatos está relacionada com a inclusão de moléculas de água ou de solvente, respectivamente, na rede cristalina junto com o IFA, podendo esta inclusão ocorrer em proporções estequiométricas ou não-estequiométricas. A presença de solvente no arranjo cristalino, muitas vezes, tem um papel decisivo na estabilização da estrutura, sobretudo quando estas moléculas realizam interações

intermoleculares com o IFA (como comumente acontece em hidratos onde as moléculas de água realizam ligações de hidrogênio com os IFAs). Por outro lado, os solventes podem estar livres na rede cristalina, ficando retidos em cavidades durante a cristalização e interagindo intermolecularmente (de forma menos pronunciada) com o IFA (FETH *et al.*, 2011).

Devido à grande importância e ocorrência de sais e cocristais em sólidos farmacêuticos ativos e por ser um dos focos de estudo nesse trabalho, essas formas serão abordadas com maiores detalhes na próxima seção. É importante mencionar que a busca por novas formas cristalinas, bem como a caracterização e a padronização de novos métodos analíticos para a análise e controle de qualidade, são desafios enfrentados pela indústria farmacêutica e constituem também um dos enfoques deste trabalho. As condições e métodos requeridos para a síntese e obtenção de novas formas cristalinas e as suas respectivas propriedades no estado sólido apresentam uma questão que desafia pesquisadores. Além disso, novas modificações cristalinas podem ainda melhorar propriedades como solubilidade, dissolução, permeabilidade e biodisponibilidade, que influenciam diretamente no comportamento e no desempenho de um fármaco.

3.2.1 Sais e cocristais farmacêuticos

Sais farmacêuticos representam, dentro do universo de formas sólidas, o mais recorrente modo de apresentação de um IFA. Estima-se que cerca de 50% de todas as moléculas de fármacos usadas na terapêutica são administradas na forma de sais (SERAJUDDIN, 2007). Tal fato indica que a formação de sais, a partir de um composto farmacêutico neutro, configura uma etapa crítica e fundamental no processo de desenvolvimento de um fármaco. Por definição, sais são compostos formados quando a molécula do IFA encontra-se carregada positiva ou negativamente e ácidos e bases (contra-íons) são adicionados a fim de neutralizá-las. Nesse sentido, diferentes formas salinas, partindo de uma mesma molécula do fármaco, podem ser obtidas, sendo consideradas como diferentes IFAs, na medida em que o contra-íon pode nem sempre ser o mesmo (DAVIES, 2001).

A maioria dos fármacos possui grupos ionizáveis na estrutura, sendo, portanto, capazes de formar sais. No entanto, o sucesso e a estabilidade na preparação de um sal dependem das constantes ácidas ou básicas (expressas em função do pKa) das espécies envolvidas, sendo estas constantes uma medida da capacidade de doação ou captação de prótons. Assim, a análise dos valores de pKa do fármaco e do contra-íon é importante

durante a preparação de um sal, sendo requerida uma diferença de pelo menos 3 unidades entre os valores de pKa da base e do ácido para a formação de um sal (CHILDS *et al.*, 2007).

Nesse sentido, as mudanças químicas e estruturais que ocorrem em virtude da formação de um composto salino permitem melhorar consideravelmente algumas propriedades físico-químicas do IFA, sobretudo a solubilidade aquosa (ELDER *et al.*, 2013). Essa melhora ocorre devido ao processo de formação de cargas das espécies envolvidas que leva a um aumento da polaridade do composto. Tal efeito pode inclusive aumentar a biodisponibilidade do fármaco (CHENEY *et al.*, 2009). Além disso, os sais geralmente aumentam a estabilidade da forma sólida, por formarem empacotamentos cristalinos mais compactos e coesivos, evitando problemas de higroscopicidade e aumentando os pontos de fusão e degradação dos compostos (DINIZ *et al.*, 2017). Em processos de síntese química, a formação de sais desempenha um importante papel nas etapas de purificação dos produtos finais, além de melhorar a manufaturabilidade de IFAs durante sua manipulação (STAHL; WERMUTH, 2008).

Os cocristais farmacêuticos são formas cristalinas multicomponentes constituídas de dois ou mais compostos moleculares e/ou iônicos diferentes, sendo um deles o IFA e o outro que denominamos de coformador, geralmente numa proporção estequiométrica, e que não se enquadram na classificação de sais ou solvatos (STAHLY, 2007; GROTHE *et al.*, 2016). Os coformadores são moléculas orgânicas complementares que realizam interações intermoleculares com os IFAs, levando a formação de cocristais. A principal diferença entre sais e cocristais reside no fato de que em formas salinas há necessariamente a transferência de prótons do ácido para a base, enquanto nos cocristais nenhuma transferência de carga ocorre, sendo o composto resultante estabilizado principalmente por ligações de hidrogênio e outras interações intermoleculares. Apesar desta clara e sucinta definição de cocristais, que permite diferenciá-los das demais formas multicomponentes, ainda prevalece uma discussão de pesquisadores da área de engenharia de cristais sobre tais compostos. Isto ocorre devido à grande versatilidade química com a qual alguns IFAs conseguem se associar com outros componentes durante ensaios de cristalização, podendo extrapolar em alguns casos a definição de cocristais (WOUTERS *et al.*, 2011). Existe ainda outro embate envolvendo os cocristais, já que alguns autores defendem que esses compostos são apenas formas intermediárias entre o IFA e os excipientes em formulações farmacêuticas, ou seja, são complexos moleculares. Entretanto, na maioria das vezes, os excipientes são substâncias inertes que são

adicionadas com propósitos específicos, não interagindo diretamente com o IFA. Portanto, essa afirmação está na contramão da definição clássica de cocrystalis, que prevê que o IFA e o agente cocrystalizante (coformador) realizam interações intermoleculares, formando sítions dentro da rede cristalina (RODRÍGUEZ-HORNEDO, 2007).

Nos últimos anos, o número de cocrystalis de fármacos reportados na literatura cresceu consideravelmente, representando um avanço no contexto das ciências farmacêuticas. O interesse por esses compostos advém da possibilidade de se diversificar o número de formas sólidas cristalinas existentes para um determinado IFA, sem a necessidade de mudanças nos grupos farmacofóricos das moléculas (DUGGIRALA *et al.*, 2016). A possibilidade de cocrystalizar dois IFAs numa única forma sólida vem despertando interesse da indústria farmacêutica e de pesquisadores que trabalham com engenharia de cocrystalis. Além disso, por se tratar de compostos com novas propriedades no estado sólido, os cocrystalis são candidatos à patenteabilidade e proteção intelectual (TRASK, 2007).

Em relação às vantagens, a cocrystalização de IFAs pode implicar em melhora significativa da solubilidade, dissolução, estabilidade e de outras propriedades físico-químicas. O planejamento e a síntese de cocrystalis, em geral, são feitos para fármacos que não possuem grupos ionizáveis na estrutura, sendo por isso impossibilitados de formarem sais. Ademais, dependendo das características do coformador, a polaridade do composto final pode ser aumentada e, conseqüentemente, a solubilidade aquosa do fármaco tende a ser melhorada. A formação de cocrystalis também tem sido utilizada para melhorar a estabilidade física de IFAs. Dessa forma, o planejamento racional de cocrystalis com base nos princípios da engenharia de cocrystalis já se configura como uma eficiente estratégia para o aprimoramento de propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de fármacos (BRITTAIN, 2012; CHOW *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2010).

3.3 Engenharia de cocrystalis e obtenção de novas formas sólidas

O desenvolvimento de diferentes formas sólidas cristalinas tem se tornado, cada vez mais, parte da rotina em ciências farmacêuticas, sendo direcionada pelos princípios da engenharia de cocrystalis (HICKEY *et al.*, 2012). Como as diferentes formas cristalinas de um fármaco podem apresentar distintas propriedades físico-químicas, é essencial descobrir a forma mais apropriada, que irá apresentar as características desejadas, para aplicação em produtos farmacêuticos (RANTANEN; KHINAST, 2015). Por este motivo, o entendimento acerca da diversidade de formas sólidas que podem ser criadas a partir de

uma molécula e a preparação de protocolos que direcionem para a produção de uma forma sólida desejável possuem um estimado interesse científico (DESIRAJU, 2013).

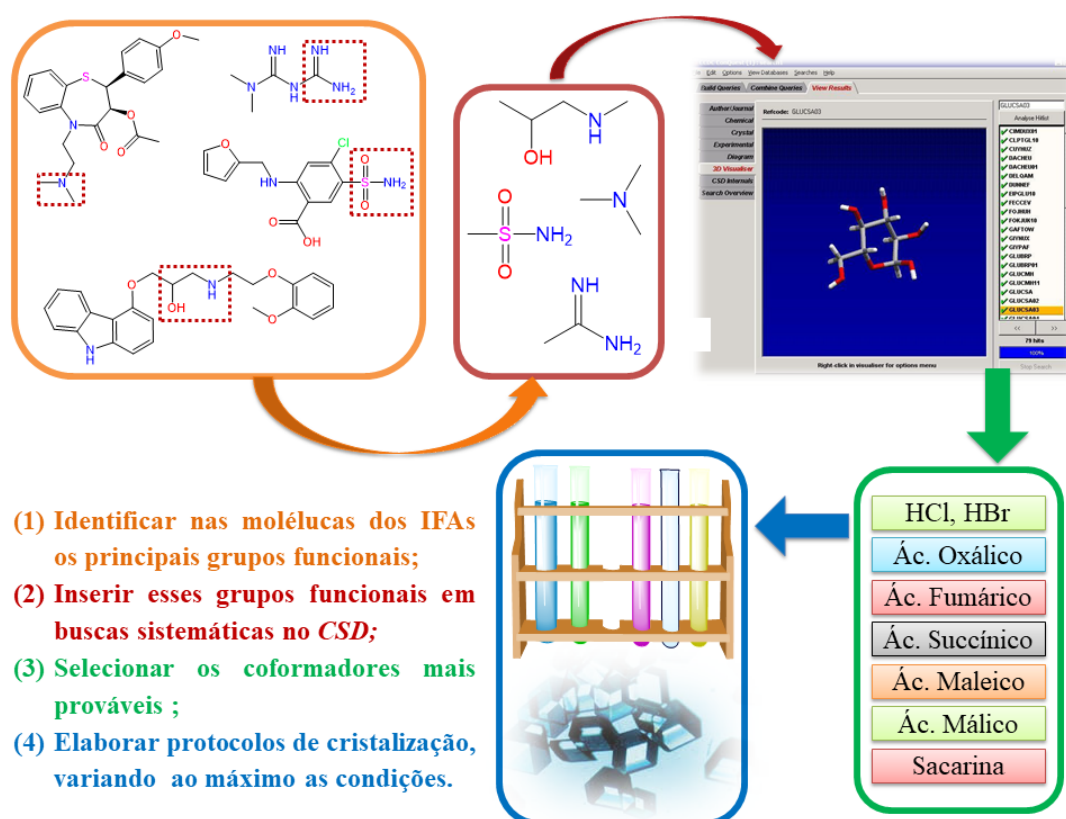
Dentro deste cenário, a engenharia de cristais, que é definida como o entendimento das interações intermoleculares no contexto do empacotamento cristalino e a utilização deste entendimento no planejamento de novos sólidos cristalinos com propriedades físicas e químicas melhoradas (DESIRAJU; PARSHALL, 1989), dispõe de valiosas ferramentas que permitem a realização de modificações cristalinas em compostos orgânicos, sobretudo os de interesse farmacêutico (BLAGDEN *et al.*, 2007). Nesse contexto, as propriedades de um composto dependem do arranjo estrutural de suas moléculas no cristal, de modo que modificações feitas na estrutura cristalina, pelo controle das suas interações intermoleculares, permitem o planejamento racional de novos compostos cristalinos com características específicas. Vale ressaltar que o empacotamento de moléculas (neutras ou carregadas) em um cristal é fruto de um delicado equilíbrio entre interações e conformações moleculares, de modo que a energia do sistema tende a ser a menor possível, do ponto de vista termodinâmico (BRICE, 1975).

As interações intermoleculares, dentre elas, ligações de hidrogênio, forças de *van der Waals*, interações eletrostáticas e interações π - π constituem a base da química supramolecular e exercem um papel fundamental no processo de reconhecimento molecular e automontagem de moléculas em sistemas cristalinos (DESIRAJU, 2010; BOSCH, 2010). A aplicação dos conceitos da engenharia de cristais e da química supramolecular na otimização do desempenho de fármacos ganhou destaque nas últimas décadas, como parte dos interesses da indústria farmacêutica e de centros de pesquisa na cocrystalização de compostos de interesse farmacêutico visando à produção de novas formas sólidas cristalinas, tais como polimorfos, hidratos, sais e cocrystalais. Para a síntese de sais e cocrystalais, um esforço considerável tem sido direcionado para a compreensão da relação entre as interações intermoleculares envolvidas na formação desses compostos, levando a novas abordagens para a engenharia de cristais. Dentre estas, destaca-se a valiosa abordagem utilizada para projetar novas modificações cristalinas de um IFA que se baseia na identificação dos grupos funcionais e atributos estruturais complementares da molécula, responsáveis pela criação de entidades químicas supramoleculares ou sítions que irão gerar, posteriormente, padrões de interações intermoleculares no cristal (ABRAMOV, 2015; STEED, 2013).

A Figura 5 mostra, de maneira resumida, as etapas geralmente adotadas na pesquisa desses sítions supramoleculares, sobretudo para o planejamento sintético de sais

e cocrystalos. As etapas envolvidas podem ser assim descritas: (1) identificar na molécula do IFA os principais grupos funcionais; (2) desenhar esses grupos funcionais separadamente; (3) inserir esses grupos funcionais em pesquisas sistemáticas na base de dados de estruturas cristalinas de pequenas moléculas *Cambridge Structural Database - CSD* (GROOM *et al.*, 2016) na tentativa de selecionar os coformadores mais prováveis; (4) determinar quais coformadores são realmente capazes de interagir intermolecularmente com a molécula do IFA; (5) realizar os experimentos de cristalização, visando obter as novas modificações cristalinas (ALMARSSON; ZAWOROTKO, 2004).

Figura 5 - Principais etapas envolvidas no planejamento de novas formas sólidas multicomponentes de um IFA.



3.4 Técnicas de caracterização de sólidos multicomponentes

A utilização combinada de técnicas de caracterização estrutural tem sido cada vez mais frequente para a identificação e elucidação molecular de compostos farmacêuticos (VIPPAGUNTA *et al.*, 2001). Dentre as mais utilizadas destacam-se a difração de raios X (DRX) por mono (DRXM) (BRITAIN, 2000) e policristais (DRXP) (THAKRAL *et al.*, 2018), as técnicas termoanalíticas de termogravimetria (TG) e calorimetria

exploratória diferencial (DSC, do inglês *differential scanning calorimeter*) (CHADHA; BHANDARI, 2014), análises por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) e de espalhamento Raman (HEINZ *et al.*, 2009), a ressonância magnética nuclear (RMN) (GEPPI *et al.*, 2008) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SUN; GRANT, 2001).

Uma das técnicas mais apropriadas para diferenciar formas sólidas cristalinas é a DRX, seja a DRXM ou a DRXP. A análise dos padrões de difração obtidos nos experimentos de DRX permite distinguir os diferentes arranjos dos átomos nos sólidos cristalinos. Por meio da DRXM é possível determinar a estrutura de moléculas dentro da rede cristalina, o que fornece informações valiosas e essenciais sobre a forma sólida, permitindo classificá-la em sistemas monocomponentes (no caso de polimorfos verdadeiros) ou multicomponentes (no caso de sais, cocrists e solvatos). Além disso, informações das interações intra e intermoleculares, do empacotamento cristalino e conformação das moléculas são obtidas a partir dos dados de DRXM mediante a resolução e refinamento estrutural (GIACOVAZZO, 2002). Entretanto, um fator limitante desta técnica é a necessidade de a amostra estar na forma monocristalina. Assim, torna-se conveniente utilizar a DRXP toda vez que não for possível a obtenção de monocristais de boa qualidade.

A DRXP é outra técnica apropriada para distinguir fases cristalinas de compostos dos mais variados tipos, sobretudo os de interesse farmacêutico. Diferentemente da DRXM, a amostra pode estar na forma de policristais ou pó, o qual é constituído de cristalitos de pequenas dimensões (de 1 a 50 μm). A partir dos dados de DRXP é possível determinar o grau de cristalinidade da amostra, realizar análises qualitativas e quantitativas das fases em sólidos farmacêuticos e estudar a cinética de reações no estado sólido, por exemplo. Além disso, em alguns casos, é possível determinar aspectos cristalográficos importantes, tais como: parâmetros de cela unitária e grupo espacial, bem como a determinação da estrutura cristalina (DAVID, 2002).

A espectroscopia vibracional (absorção no IV e espalhamento Raman) também é amplamente utilizada na caracterização de sólidos farmacêuticos. Os espectros de absorção na região do IV e espalhamento Raman fornecem informações sobre os modos vibracionais das moléculas. As bandas que aparecem nos espectros IV e Raman são atribuídas a grupos funcionais e à conformação das moléculas, sendo, portanto, úteis na caracterização estrutural de modificações cristalinas de fármacos (BUGAY, 2001). Nesse sentido, os espectros vibracionais são tidos como impressões digitais das formas sólidas,

permitindo a caracterização e distinção dos compostos de interesse. Além disso, empregando análises espectroscópicas é possível caracterizar sais e cocristsais e, principalmente, polimorfos, uma vez que as informações relativas aos modos de vibração na rede cristalina, que são geradas por diferentes empacotamentos cristalinos (no caso de polimorfos), podem ser obtidas por meio de bandas que aparecem na região de baixa frequência ($1000-50\text{ cm}^{-1}$) sobretudo nos espectros Raman (HEINZ *et al.*, 2009; RODRÍGUEZ-SPONG *et al.*, 2004).

As técnicas termoanalíticas são aquelas nas quais as propriedades físicas e químicas dos compostos são determinadas em função de uma variação programada de temperatura que é aplicada ao sistema, permitindo distinguir as modificações cristalinas com base não só em eventos de transições de fase que ocorrem nas amostras durante a alteração da temperatura, como também considerando o ponto de fusão e processos de dessolvatação, desidratação, cristalização, entre outros (SAUNDERS; GABBOTT, 2011). Pelas curvas DSC é possível quantificar a energia absorvida ou liberada pela amostra, em virtude de eventos endo e exotérmicos que acontecem durante as medidas, quando esta é aquecida, resfriada ou mantida em temperatura constante. Já as curvas TG permitem mensurar a perda de massa em função da temperatura, sendo importante na determinação da estabilidade térmica das amostras. Além disso, as curvas de DSC e TG podem ser correlacionadas, auxiliando na correta interpretação dos resultados e permitindo estabelecer o comportamento térmico de modificações cristalinas, sendo úteis para estabelecimento de relações estruturais e energéticas, assim como para a diferenciação e identificação de modificações cristalinas de fármacos (CRAIG, 2006). As técnicas térmicas também podem ser empregadas para determinar a estabilidade relativa entre polimorfos e diferenciar sistemas cuja forma cristalina sofre transição de fase reversível daqueles onde a transição é irreversível.

3.5 Estado sólido e propriedades biofarmacêuticas

Conforme mencionado anteriormente, a partir de modificações da configuração das moléculas nos sólidos cristalinos, o composto resultante pode exibir diferentes propriedades físico-químicas em virtude do novo padrão de interações supramoleculares que surgem com tais mudanças. Dentre essas propriedades, merecem destaque aquelas que apresentam interesse farmacêutico, pois é justamente a partir do aprimoramento destas propriedades que é possível otimizar o comportamento biofarmacêutico dos fármacos utilizados na terapêutica (DUGGIRALA *et al.*, 2016; KAWAKAMI, 2012). É

nesta perspectiva que o presente trabalho se insere, uma vez que os princípios da engenharia de cristais e da química supramolecular foram utilizados para a melhoria da solubilidade, dissolução intrínseca e permeabilidade de fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos.

A solubilidade e a dissolução de fármacos possuem enorme importância na área de medicamentos, com vastas aplicações que vão desde a rotina de controle de qualidade até a pesquisa e desenvolvimento de formas farmacêuticas (ZHANG; YU, 2004). Enquanto a solubilidade é definida como a quantidade máxima de fármaco dissolvida em um meio e temperatura específicos, a dissolução indica como esse processo ocorre em função do tempo (AULTON, 2005). Os estudos de dissolução apresentam caráter regulatório e perfis de dissolução comparativos são essenciais para a avaliação da equivalência farmacêutica. Além disso, os testes de dissolução têm sido utilizados para o estabelecimento da correlação *in vitro/in vivo* entre a dissolução do fármaco e a absorção sistêmica, com o objetivo de prever a biodisponibilidade e assessorar os estudos de bioequivalência (GRAY *et al.*, 2009).

Na literatura, inúmeros trabalhos de sais, cocrystalis e até polimorfos que tiveram melhoramento da solubilidade e dissolução intrínseca em relação ao fármaco de referência já foram reportados, provando que a engenharia de cristais é uma estratégia eficiente para o aprimoramento dessas propriedades (ELDER *et al.*, 2013; DINIZ *et al.*, 2017; SWAPNA *et al.*, 2014). Dentre estes estudos, pode-se citar aquele relacionado ao desenvolvimento de sais e cocrystalis do antifúngico miconazol (TSUTSUMI *et al.*, 2011). Os sais de maleato e nitrato e os cocrystalis contendo os ácidos fumárico e succínico apresentaram um aumento significativo na solubilidade e no percentual de fármaco dissolvido nos ensaios de dissolução intrínseca em relação à base livre, o que é de suma importância no caso do miconazol, uma vez que a solubilidade da base livre do fármaco é extremamente baixa (menor que 1 µg/mL).

A permeabilidade é um parâmetro baseado na extensão da absorção intestinal do fármaco no organismo ou pela medida da sua velocidade de transferência através da membrana intestinal. Para a sua determinação, modelos de estudos *in vitro* tem sido os mais frequentemente utilizados por apresentarem execução e interpretação menos complexas e ainda permitirem prever com alta confiabilidade a extensão da absorção intestinal de um fármaco (GONÇALVES *et al.*, 2009). Os estudos de permeação por monocamada formada por cultura de células epiteliais, como Caco-2 por exemplo, vêm sendo extensivamente empregados como modelo de absorção intestinal humana de

fármacos. Essa linhagem celular, quando cultivada em condições adequadas, tem a capacidade de se diferenciar espontaneamente e formar uma membrana semelhante ao intestino delgado humano. A monocamada de células cilíndricas apresenta junções estreitas entre as células (servindo como um modelo paracelular) e microvilosidades na borda apical. Além disso, as células Caco-2 expressam proteínas transportadoras, proteínas de efluxo e atividade enzimática (BREEMEN; LI, 2005).

Em levantamento realizado na literatura, verificou-se relatos demonstrando que também é possível otimizar a permeabilidade de um fármaco por meio de modificações da estrutura cristalina ou cocristalização com outras moléculas (YAN *et al.*, 2013). Um dos casos mais interessantes foi o trabalho publicado por Sanphui e colaboradores (SANPHUI *et al.*, 2015) que reportaram uma série de cocristais do diurético hidroclorotiazida, um fármaco conhecido por apresentar baixa permeabilidade. A maioria dos cocristais exibiram maior capacidade de permeação em comparação com a forma livre do IFA. Tal aumento foi associado ao novo padrão de interações intermoleculares verificado nas estruturas dos cocristais e devido à ausência dos principais sítios supramoleculares presentes apenas na estrutura cristalina da hidroclorotiazida.

No contexto farmacêutico, com base na permeabilidade e na solubilidade de um fármaco, o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) propõe a subdivisão em quatro classes. A classe I abrange fármacos de alta permeabilidade e solubilidade, a II alta permeabilidade e baixa solubilidade, a III baixa permeabilidade e alta solubilidade, e por fim, a classe IV baixa permeabilidade e solubilidade (AMIDON *et al.*, 1995). O SCB foi proposto para auxiliar na previsão da biodisponibilidade de fármacos por meio de métodos *in vitro*. Para que um fármaco seja considerado altamente solúvel sua maior dose posológica deve ser completamente solúvel em até 250 mL de meios biorelevantes e que abranjam a faixa de pH fisiológico (1,2; 4,5 e 6,8) em temperatura de 37 ± 1 °C (DAHAN *et al.*, 2010). Já para um fármaco ser considerado de alta permeabilidade, deve possuir uma extensão de absorção igual ou superior a 85% (YU *et al.*, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, fármacos e substâncias químicas de referência

Os solventes utilizados para a síntese e cristalização das formas sólidas aqui apresentadas foram: água ultrapura (sistema de purificação Milli-Q[®]), metanol, etanol, isopropanol, *n*-pentanol e acetonitrila, sendo estes cinco últimos adquiridos comercialmente (todos grau analítico P.A., Vetec[®]). Os compostos usados como coformadores para a formação dos sais e cocristais foram: ácidos clorídrico e bromídrico concentrados, ácido oxálico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido malônico, sacarina, imidazol e 5-fluorocitosina (todos adquiridos da Sigma-Aldrich[®]). No desenvolvimento e validação dos métodos analíticos, foram utilizados solventes grau cromatográfico e substâncias químicas de referência das Farmacopeias Americana e Brasileira. Os fármacos carvedilol, furosemida, cloridrato de diltiazem e cloridrato de metformina, usados como materiais de partida nas sínteses, foram adquiridos de fontes comerciais e usados como recebido sem purificação adicional.

4.2 Síntese, seleção dos coformadores e protocolos de cristalização

O planejamento e execução das sínteses das modificações cristalinas descritas nessa tese foram baseados nas características químicas e estruturais dos fármacos CVD, FSM, DIL e MET e em relatos recentes de formas cristalinas dos mesmos publicados na literatura técnico-científica. Todos esses fármacos possuem uma grande diversidade de grupos funcionais em seus respectivos arcabouços moleculares, nos quais os átomos (sobretudo oxigênio e nitrogênio) atuam tanto como receptores quanto doadores em ligações de hidrogênio e ainda realizam outras interações não-covalentes, o que fundamentou a escolha de coformadores. Priorizou-se a busca por coformadores de baixa toxicidade e boa tolerabilidade pelo organismo, de modo que todos os as moléculas selecionadas são reconhecidas como seguras, ou seja, possuem o status GRAS (do inglês *Generally Recognized as Safe*).

Dado o caráter ionizável dos fármacos, a busca por moléculas com características complementares visando a obtenção de sais ou cocristais como produto das reações, também foi levada em consideração. Vale lembrar que a “regra do pKa” assume um papel de destaque nesse contexto, auxiliando principalmente na predição da natureza química dos compostos a serem formados nas reações. É bem estabelecido na literatura que,

quando a diferença de unidades de pKa (ΔpK_a) entre um ácido e um ácido conjugado da base numa reação química, for maior que três unidades, existe uma forte evidência que aponta para a formação de um sal. Por outro lado, quando o ΔpK_a assumir valores menores ou iguais a zero, um cocrystal será formado como produto da reação. Entretanto, quando o ΔpK_a cair num intervalo de 0 a 3, tanto sais quanto cocrystal podem ser formados, sendo necessário a utilização de outras análises para confirmar a natureza química do produto formado (CHILDS *et al.*, 2007; CRUZ-CABEZA, 2012). Essas previsões baseadas nos valores de pKa das moléculas foram bastante úteis no planejamento de todas as novas formas sólidas.

Após a adequada escolha dos coformadores, planos de sínteses e protocolos de cristalização puderam ser elaborados visando a obtenção de monocristais de novas formas sólidas ao final do processo. Todas as reações foram feitas partindo-se de proporções estequiométricas entre o fármaco e o coformador. A escolha dos solventes utilizados nas reações e durante a cristalização foi realizada com base em trabalhos semelhantes encontrados na literatura que reportaram a obtenção de formas sólidas dos fármacos em questão. A massa dos fármacos e dos coformadores foram devidamente pesadas em balanças analíticas, assim como os volumes dos solventes e das soluções foram aferidos com o auxílio de pipetas graduadas. Quando os volumes utilizados foram inferiores a 1 mililitro, utilizou-se nesses casos micropipetas automáticas de 100 a 1000 microlitros. As soluções de cristalização foram acondicionadas em béqueres ou vidros de penicilina e não foram vedados durante o período de repouso. Os cristais obtidos foram filtrados da solução de cristalização, secos e depois analisados. Uma descrição detalhada da obtenção de cada cristal é apresentada a seguir.

4.2.1 Sais e soluções sólidas de enantiômeros de carvedilol

O CVD é um fármaco de caráter básico ($pK_a = 7,8$) (STOJANOVIĆ *et al.*, 2007), podendo formar sais mediante a reação com ácidos fortes. Nesse sentido, os ácidos clorídrico, bromídrico e oxálico, foram definidos como os agentes formadores de sais mais adequados para reagirem com o CVD, uma vez que o ΔpK_a resultante das respectivas reações com o fármaco assume valores acima de 3 unidades em todos os casos (Tabela 1). Além disso, os ânions (ou contra-íons) provenientes desses ácidos, são capazes de formar com a molécula do CVD ligações de hidrogênio assistidas por carga do tipo $NH_2^+ \cdots A^-$ (em que A^- representa os contra-íons Cl^- , Br^- e OXA^- e NH_2^+ o átomo de nitrogênio protonado da amina secundária do CVD), que são determinantes na

estabilização dos novos sólidos cristalinos formados. Vale ressaltar que outros ácidos carboxílicos (maleico, fumárico, succínico, tartárico, málico, malônico e benzoico) também foram utilizados na tentativa de formar novas fases salinas de CVD. Entretanto, todas essas tentativas falharam ou resultaram na imediata cristalização do CVD na sua forma pura. Uma vez obtidos, os cristais foram submetidos a coleta de dados por DRXM visando a elucidação estrutural, que ocorreu com sucesso.

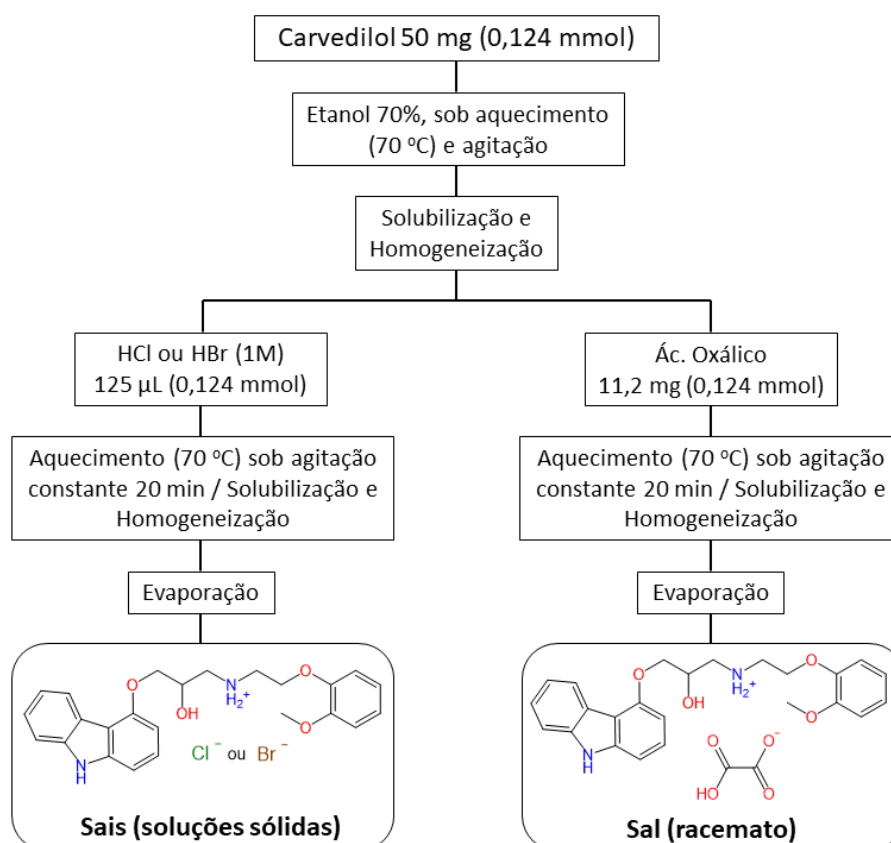
Tabela 1 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações do CVD com os ácidos usados como coformadores.

Composto	pKa	$\Delta pK_a =$ pKa(CVD) - pKa(ácido)	Estequiometria
Carvedilol	7,80	-	-
Ácido clorídrico	-7,00	14,8	sal (SSE*) 1:1
Ácido bromídrico	-8,00	15,8	sal (SSE*) 1:1
Ácido oxálico	1,23	6,57	sal (racemato) 1:1

*SSE = solução sólida de enantiômeros

A preparação dos cristais dos sais e das novas soluções sólidas de CVD encontra-se resumido no Esquema 1 e envolveu os seguintes passos:

- 1) Preparação de soluções de CVD (40 mg, 0,292 mmol) em etanol 70%, que foram aquecidas (70 °C) e mantidas sob agitação constante até a completa solubilização do CVD;
- 2) Adição de quantidades estequiométricas dos ácidos clorídrico, bromídrico e oxálico às soluções de CVD preparadas anteriormente;
- 3) Aquecimento das misturas (70 °C) sob agitação constante por cerca de 20 minutos até a completa solubilização e homogeneização das soluções;
- 4) Repouso das soluções finais em temperatura ambiente para a evaporação do solvente até a formação de monocristais.
- 5) Filtração e secagem dos monocristais dos novos sais de CVD, que foram obtidos num intervalo de 5 a 7 dias após o início da evaporação do solvente (com rendimentos entre 78 e 85%).

Esquema 1 - Procedimentos envolvidos no preparo dos novos sais de CVD.

4.2.2 Sal e cocrystal de furosemida

Diferente dos demais fármacos abordados neste trabalho, a FSM é a única que possui um caráter ácido, sendo considerada um ácido fraco ($pK_a = 3,9$) (GRANERO *et al.*, 2012). Dessa forma, a formação de sais passa a ocorrer somente quando o fármaco reage com bases consideradas fortes. Portanto, a molécula de imidazol (IMI), cujo pK_a é 6,95, foi escolhida como um dos coformadores, já que o ΔpK_a da reação com a FSM possui pelo menos 3 unidades de diferença (Tabela 2), requisito central para a formação de sais. Além disso, o anel imidazólico possui uma conformação plana rígida com apenas um sítio de protonação, fazendo com que o cátion imidazolínio (IMI^+) formado adquira capacidade de realizar ligações de hidrogênio que tendem a se estender no plano da molécula, gerando empacotamentos cristalinos estáveis. Por outro lado, os cocrystalis de FSM são bem mais recorrentes que os sais, uma vez que a molécula do fármaco possui diversos grupos funcionais (sulfonamida, amina, éter e carboxila) capazes de gerar sítios supramoleculares estáveis e robustos com coformadores neutros. Nesse sentido, um dos coformadores testados e que levou à formação de um cocrystal, foi o pró-fármaco 5-fluorocitosina (5FC). A 5FC é uma molécula de geometria plana rica em grupos

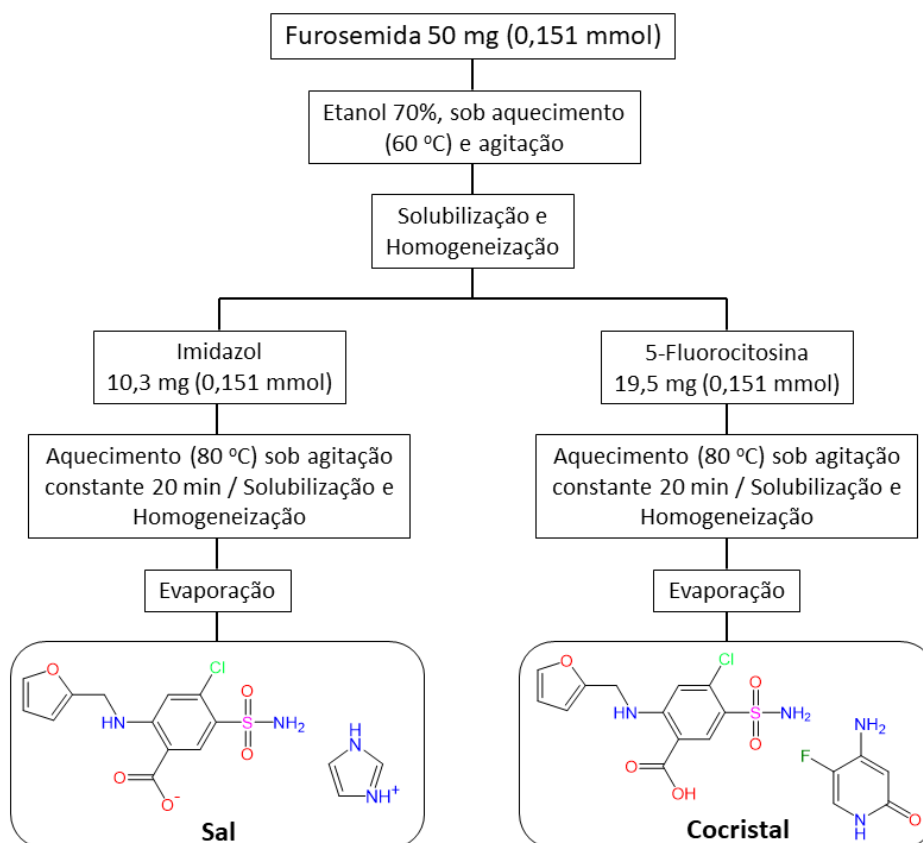
funcionais capazes de realizar inúmeras ligações de hidrogênio, possuindo características consideradas complementares à FSM. Além disso, o ΔpK_a resultante da reação entre a FSM e a 5FC é negativo (Tabela 2), indicando a formação de um cocristal como produto da reação.

Tabela 2 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações da FSM com as bases usadas como coformadores.

Composto	pKa	$\Delta pK_a =$ pKa(base) - pKa(FSM)	Estequiometria
Furosemida	3,90	-	-
Imidazol	6,95	3,05	sal 1:1
5-fluorocitosina	3,26	-0,64	cocristal 1:1

O sal e o cocristal de FSM foram obtidos a partir de reações estequiométricas do fármaco com os coformadores básicos IMI e 5FC, previamente selecionados. A preparação dos novos cristais de FSM encontra-se resumido no Esquema 2 e envolveu os seguintes passos:

- 1) Preparação de duas soluções de FSM (40 mg, 0,292 mmol) em etanol 70%, que foram aquecidas brandamente (60 °C) e mantidas sob agitação constante até a completa solubilização da FSM;
- 2) Adição de quantidades estequiométricas dos coformadores (IMI e 5FC) às soluções de FSM preparadas anteriormente;
- 3) Aquecimento das misturas (a 80 °C) sob agitação constante por cerca de 20 minutos até a completa solubilização e homogeneização das soluções;
- 4) Repouso das soluções finais em temperatura ambiente para a evaporação do solvente até a formação de monocristais.
- 5) Filtração e secagem dos monocristais das formas sólidas da FSM que foram obtidos num intervalo de 5 a 7 dias após o início da evaporação do solvente (com rendimentos de ~80%).

Esquema 2 - Procedimentos envolvidos no preparo do sal e do cocrystal de FSM.

4.2.3 Sais e sal-cocrystal de diltiazem

O planejamento dos sais de DIL e a seleção dos coformadores foi feita levando em consideração o pKa do átomo de nitrogênio da amina terciária da molécula de DIL ($pK_a = 7,7$) (SATEESHA *et al.*, 2010), que é passível de ser protonado em reações com ácidos em geral. Nesse sentido, foram selecionados ácidos carboxílicos que concordassem com a “regra do pKa” para a formação de sais ($\Delta pK_a > 3$) na tentativa de reproduzir o sinton supramolecular $NH^+ \cdots COO^-$. Os seguintes ácidos carboxílicos foram selecionados para os experimentos de cristalização: ácido oxálico, ácido fumárico e ácido succínico. Outros ácidos carboxílicos também foram testados, a saber ácido maleico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido malônico, ácido salicílico, dentre outros. Entretanto, nenhum deles levou à formação de novas formas sólidas. Na Tabela 3 estão representados o pKa dos compostos bem como os valores de ΔpK_a , calculados a partir da reação do DIL com os respectivos ácidos. Em todos os casos, o ΔpK_a resultante das reações assumiu valores acima do exigido para a formação de sais ($\Delta pK_a > 3$).

Tabela 3 - Valores de pKa e de ΔpK_a calculados para as reações do DIL com os ácidos usados como coformadores.

Composto	pKa	$\Delta pK_a =$ pKa(DIL) - pKa(ácido)	Estequiometria
Diltiazem	7,70	-	-
Ácido oxálico	1,23	6,47	sal 1:1
Ácido fumárico	3,03	4,67	sal-cocristal 1:1
Ácido succínico	4,19	3,51	sal 1:1

Antes da preparação dos novos sais de DIL propriamente ditos, foi necessário primeiramente extrair a base livre do fármaco, ou seja, obter sua forma desprotonada. Isso foi feito, pois o material de partida utilizado nas reações foi a forma comercial cloridrato de diltiazem. Essa etapa foi feita com base nos procedimentos experimentais descritos por Stepanovs e colaboradores (STEPANOV *et al.*, 2016) e envolveu os seguintes passos:

- 1) Dissolução de 2 g (4,434 mmol) de cloridrato de diltiazem em 20 mL de água, sendo adicionado a essa solução 1,8 g de Na_2CO_3 ;
- 2) Agitação desta mistura por 20 minutos até a completa precipitação da base livre de DIL;
- 3) Filtração do precipitado formado (DIL base livre) e secagem em dessecador contendo sílica por 3 dias (rendimento superior a 90%).

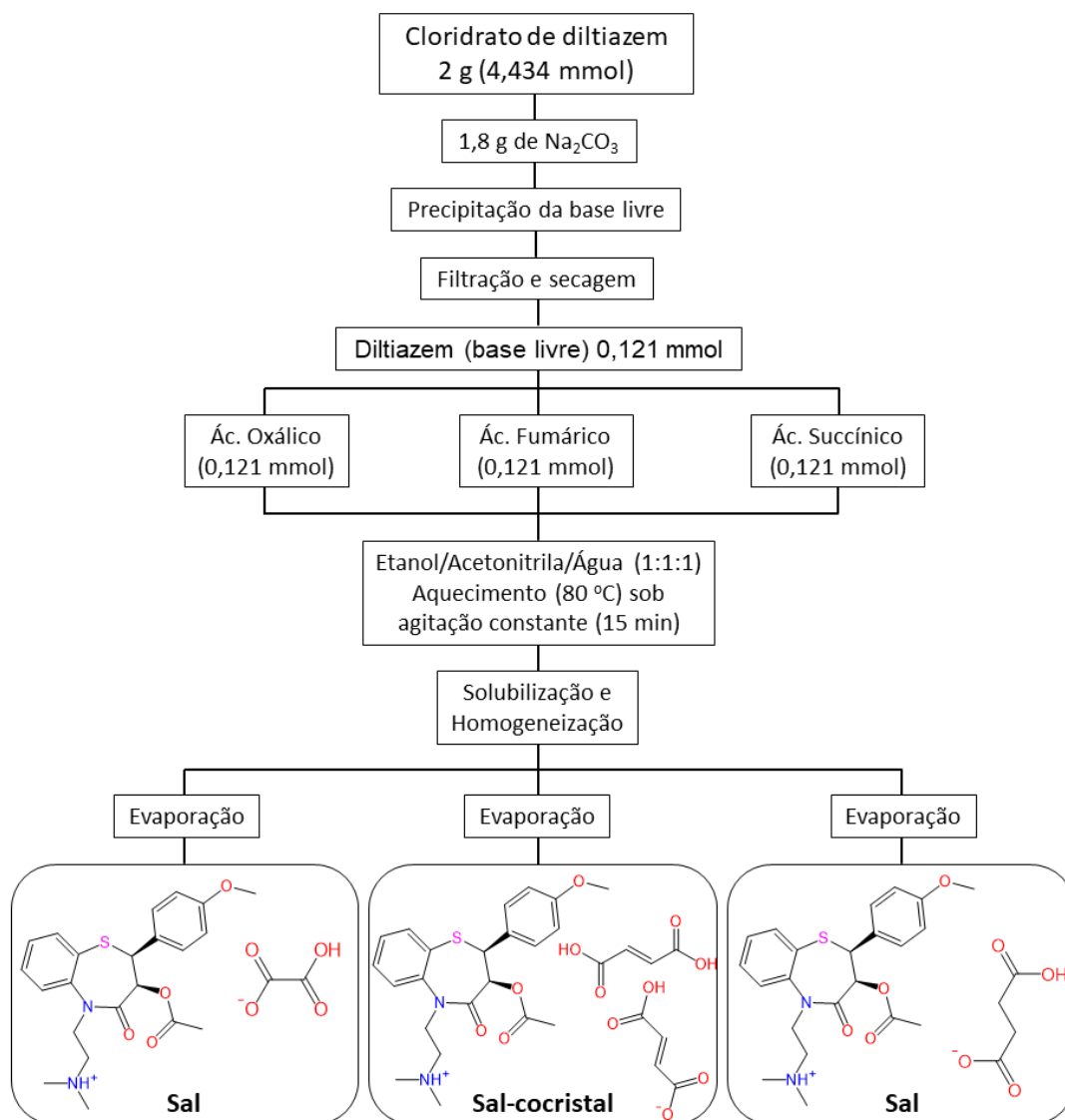
Uma vez obtido o DIL na forma de base livre, procedeu-se às sínteses das novas formas sólidas do DIL. No Esquema 3, encontram-se descritas todas as etapas que culminaram na formação destes novos compostos, cuja preparação envolveu os seguintes passos:

- 1) Pesagem de 50 mg (0,121 mmol) de DIL (base livre) em três béqueres diferentes;
- 2) Adição de 10,8 mg de ácido oxálico (0,121 mmol), 14,0 mg de ácido fumárico (0,121 mmol) e 14,5 mg de ácido succínico (0,121 mmol) a cada um dos três béqueres contendo o DIL previamente pesado;
- 3) Adição de 10 mL de uma mistura de etanol/acetonitrila/água (1:1:1, v/v) a cada um dos béqueres contendo o DIL mais o coformador e aquecimento das misturas até 80 °C;
- 4) Agitação constante na temperatura de 80 °C por 15 minutos até a completa solubilização e homogeneização das misturas;

6) Repouso das soluções finais em temperatura ambiente para a lenta evaporação do solvente;

7) Formação de monocristais dos sais de DIL, que foram filtrados e secos, sendo obtidos num intervalo de 5 a 7 dias após o início da evaporação do solvente (com rendimentos entre 70 e 80%).

Esquema 3 - Procedimentos envolvidos no preparo dos novos sais de DIL.



4.2.4 Sais de metformina

O planejamento das sínteses dos sais de MET foi feito considerando o elevado pKa de um dos átomos de nitrogênio das aminas presentes na molécula do fármaco (pKa = 12,4) (DESAI *et al.*, 2014) que apresenta forte tendência de ser protonado em reações com compostos de caráter ácido. Seguindo este raciocínio, os seguintes coformadores

foram selecionados para as reações de cristalização: ácido maleico, ácido malônico e sacarina. Outros coformadores de caráter ácido também foram testados, não havendo êxito no que se refere à formação de novas formas sólidas de MET. Os três coformadores selecionados possuem não só os grupos funcionais capazes de interagir *via* ligações de hidrogênio com os átomos de nitrogênio da MET (formando o sinton supramolecular $\text{NH}^+\cdots\text{O}^-$), como também valores de pKa que são condizentes com a formação de sais ($\Delta\text{pKa} > 3$), conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de pKa e de ΔpKa calculados para as reações da MET com os compostos usados como coformadores.

Composto	pKa	$\Delta\text{pKa} =$ $\text{pKa}(\text{MET}) - \text{pKa}(\text{ácido})$	Estequiometria
Metformina	12,4	-	-
Ácido maleico	1,93	10,47	sal 1:1
Ácido malônico	2,84	9,56	sal 1:1
Sacarina	1,60	10,80	sal 1:1

Como o sal cloridrato de metformina foi utilizado como reagente de partida das reações, foi necessário primeiro realizar a extração da base livre de MET, que envolveu os seguintes passos:

- 1) Dissolução de 1 g (6,038 mmol) de cloridrato de metformina em 20 mL de isopropanol, sendo adicionado a essa solução 0,24 g (6,038 mmol) de NaOH;
- 2) Agitação desta mistura por 60 minutos até a completa precipitação da base livre de MET;
- 3) Filtração do precipitado formado (MET base livre) e secagem em dessecador contendo sílica por 3 dias (rendimento de ~75%).

Após a extração da MET base livre, iniciou-se a segunda etapa das reações. A preparação dos novos sais de MET encontra-se resumido no Esquema 4 e envolveu os seguintes passos:

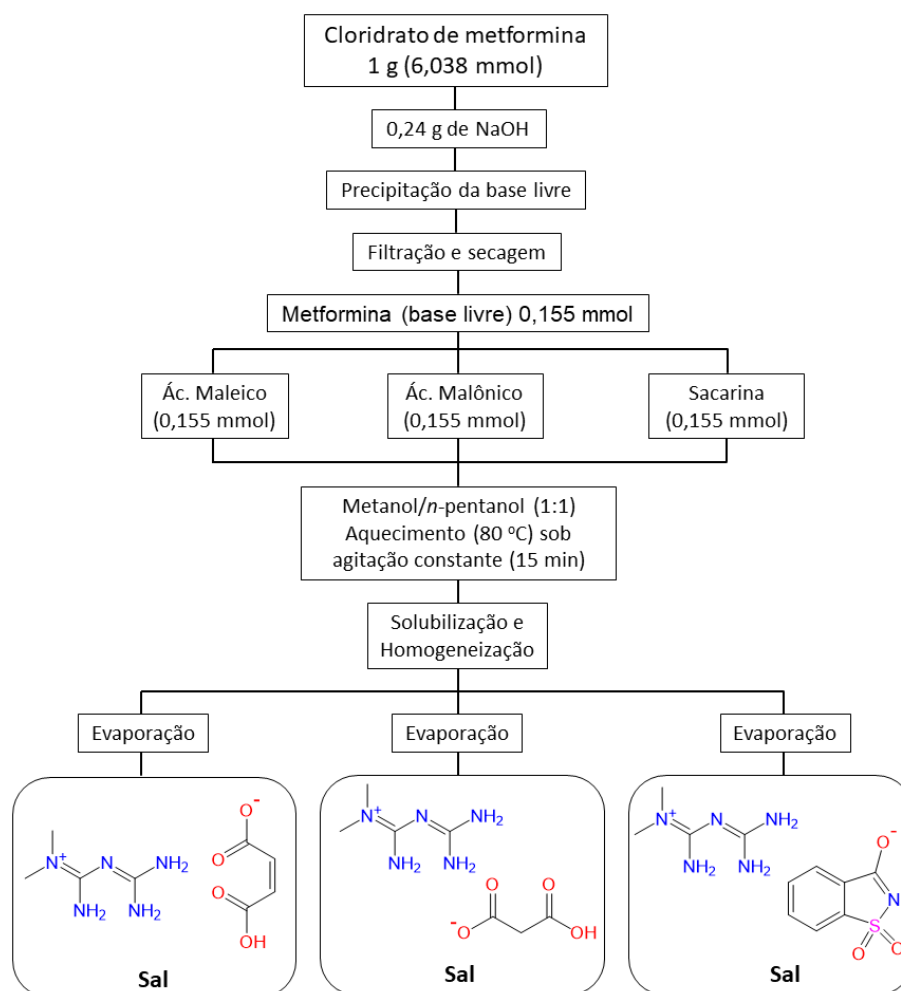
- 1) Pesagem de 20 mg (0,155 mmol) de MET (base livre) em três béqueres diferentes;
- 2) Adição de 18 mg de ácido maleico (0,155 mmol), 16,1 mg de ácido malônico (0,155 mmol) e 28,3 mg de sacarina (0,155 mmol) a cada um dos três béqueres contendo a MET previamente pesada;
- 3) Adição de 10 mL de uma mistura de metanol/*n*-pentanol (1:1, v/v) a cada um dos béqueres contendo a MET mais o coformador e aquecimento das misturas até 80 °C;

4) Agitação constante na temperatura de 80 °C por 15 minutos até a completa solubilização e homogeneização das misturas;

6) Repouso das soluções finais em temperatura ambiente para a evaporação do solvente e a formação de monocristais;

7) Filtração e secagem dos monocristais das formas sólidas da MET que foram obtidos num intervalo de 3 a 4 dias após o início da evaporação do solvente (com rendimentos superiores a 75%).

Esquema 4 - Procedimentos envolvidos no preparo dos novos sais de MET.



4.3 Caracterização químico-estrutural

Uma vez obtidos, os cristais das novas formas sólidas de CVD, FSM, DIL e MET foram caracterizados pelas seguintes técnicas: difração de raios X por monocristal (DRXM) e por material policristalino (DRXP), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN), calorimetria

exploratória diferencial (DSC), análise termogravimétrica (TG) e análise termo-ótica (TOA).

4.3.1 Difração de raios X por monocristal

Após as etapas de síntese e cristalização, foi possível selecionar cristais, de dimensões adequadas e composição homogênea, de cada uma das novas formas sólidas para os experimentos de DRXM. A fim de checar a qualidade desses monocristais, os mesmos foram observados em um microscópio com luz polarizada de modo a selecionar apenas aqueles que se apresentaram brilhantes ao serem expostos a luz, sendo essa uma propriedade de materiais cristalinos. Em seguida, com auxílio de microscópio ótico com luz polarizada, buscou-se separar os cristais com tamanhos adequados, com dimensões médias variando de 0,05 a 0,4 mm. Por fim, após esta seleção, procedeu-se a montagem de um único cristal para a realização da coleta de dados.

Os dados cristalográficos necessários para a determinação estrutural dos compostos envolvidos nesta tese foram obtidos num difratômetro Agilent-Rigaku Super Nova equipado com detetor CCD, pertencente ao Laboratório de Cristalografia, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Utilizou-se para as medidas fonte de radiação de molibdênio ($\text{MoK}\alpha = 0,71073 \text{ \AA}$) e temperatura ambiente (298 K). A coleta das reflexões, determinação da cela unitária, integração e redução dos dados, bem como eventuais correções por absorção foram realizadas por meio do software CrysAlisPro (RIGAKU, 2015).

Com a determinação das celas unitárias, procedeu-se à resolução e refinamento das estruturas. Estes procedimentos foram realizados utilizando o pacote de programas cristalográficos Olex2 (DOLOMANOV *et al.*, 2009). A resolução das estruturas foi realizada empregando-se os métodos diretos. A fim de encontrar as fases dos fatores de estrutura para cada uma das estruturas dos novos compostos propostos, o programa ShelXT (SHELDRICK, 2015) foi utilizado. A resolução das estruturas forneceu, num primeiro momento, os esqueletos moleculares das modificações cristalinas aqui descritas. Assim, foram obtidos os correspondentes mapas de diferença de densidade eletrônica (mapas de *Fourier*), nos quais foram encontradas, em princípio, as posições dos átomos não hidrogenóides. As posições destes átomos foram inicialmente refinadas de forma isotrópica pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa, tentando em cada ciclo de refinamento, minimizar a diferença entre os fatores de estrutura observados F_o e calculados F_c , utilizando para isto o programa ShelXL (SHELDRICK, 2015).

Posteriormente, foi realizado o refinamento anisotrópico dos átomos, deixando em liberdade os parâmetros de vibração térmica, consolidando mais ainda o modelo estrutural.

A próxima etapa do refinamento foi a localização dos átomos de hidrogênio, os quais foram observados a partir dos mapas de diferença de densidade eletrônica. Todos os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono foram fixados, dependendo da natureza química e hibridação do carbono. Para átomos de hidrogênio ligados aos de carbono aromático, as distâncias foram fixadas em 0,93 Å com um parâmetro isotrópico 20% maior do que o parâmetro de deslocamento isotrópico equivalente para o átomo de carbono ($U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C_{sp^2})$). Os átomos de carbono primários e secundários com hibridação C_{sp^3} , presentes em grupamentos alifáticos, por exemplo, tiveram as distâncias idealizadas das ligações com os átomos de hidrogênio, em torno de 0,97 Å ($C_{sp^3}-H$ dos grupos metileno) e de 0,96 Å ($C_{sp^3}-H$ dos grupos metila) e com incrementos de 20% e 50% em relação aos parâmetros de vibração dos átomos de carbono do metileno e da metila, respectivamente. Já os átomos de hidrogênio ligados a átomos de oxigênio (O—H grupo hidroxila e carboxila) e nitrogênio (N—H grupo amina) foram localizados através dos mapas de diferença de densidade eletrônica, sendo suas posições refinadas livremente conforme as densidades observadas e com os parâmetros térmicos isotrópicos fixos definidos como: ($U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(N)$ e $1,5 U_{eq}(O)$).

As validações dos modelos cristalográficos, após serem concluídos os respectivos refinamentos, foram realizadas por intermédio do programa PLATON (SPEK, 2003). As informações dos refinamentos, das coletas e outros parâmetros associados nas determinações estruturais, encontram-se condensadas nos arquivos com extensão *.CIF* (*Crystallography Information File*), os quais foram validados utilizando a rotina *CheckCIF* (SPEK, 2009), disponibilizada pela União Internacional de Cristalografia. Dessa forma, foi possível se certificar sobre a qualidade dos refinamentos e a coerência dos modelos estruturais propostos para cada modificação cristalina. As análises supramoleculares e a determinação das interações intermoleculares foram realizadas com a ajuda dos programas Mercury 4.0 (MACRAE *et al.*, 2020) e PARST (NARDELLI, 1995), este último incluído no pacote de programas WINGX (FARRUGIA, 2012). Para visualizar as conformações estruturais e os empacotamentos cristalinos, utilizaram-se os programas Mercury 4.0 e ORTEP-3 for Windows (FARRUGIA, 2012). Estes programas também foram empregados para a elaboração do material gráfico das estruturas cristalinas.

4.3.2 Difração de raios X por policristais

Os dados de difração de raios X por policristais dos compostos reportados neste trabalho foram obtidos no difratômetro Bruker D8 Advance DaVinci de geometria Bragg-Brentano, equipado com detector Lynxeye, filtro de Ni e tubo de cobre (radiação $\text{CuK}\alpha = 1,5418\text{\AA}$), pertencente ao Laboratório de Cristalografia, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora. Uma tensão de 40 kV foi aplicada gerando uma corrente de 40 mA. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, com um intervalo de detecção compreendido entre 3° e 50° em 2θ , passo de amostragem de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 5s por passo. As amostras foram trituradas em almofariz de ágata e pulverizadas em lâminas de vidro sulcadas, usadas como porta-amostra. Os difratogramas experimentais foram comparados com os padrões teóricos obtidos por simulação através do programa Mercury 4.0 (MACRAE *et al.*, 2020). As simulações foram realizadas sob as mesmas condições dos padrões experimentais (radiação $\text{CuK}\alpha$ e faixa angular de varredura em 2θ) utilizando os arquivos *CIF* validados para as estruturas cristalinas determinadas previamente.

4.3.3 Estimativa da energia de rede

Os cálculos que visaram estimar as energias de rede de cada estrutura cristalina foram realizados por meio do programa CrystalExplorer17 (TURNER *et al.*, 2017). Tal escolha foi pautada na possibilidade de obtenção da energia de rede baseada nas interações intermoleculares existentes no ambiente cristalino, além da visualização topológica destas energias no sólido (TURNER *et al.*, 2015). Para todos os cálculos utilizou-se como entrada os arquivos *CIF* validados de cada estrutura cristalina. O nível de teoria empregado foi o funcional B3LYP/6-31G (d,p). Ao término de cada cálculo obteve-se a energia total de interação intermolecular (E_{tot}), que é dada como a soma dos componentes eletrostático (E_{ele}), polarização (E_{pol}), dispersão (E_{dis}) e repulsão (E_{rep}) atuantes no ambiente cristalino. Cada um destes componentes possui fatores de escala específicos, sendo aplicados no decorrer dos cálculos (MACKENZIE *et al.*, 2017). As energias de rede resultantes foram representadas graficamente (na forma de cilindros) conectando os centros de massa das moléculas de modo que as espessuras dos cilindros são sempre proporcionais à magnitude das energias de interações intermoleculares.

4.3.4 Análises espectroscópicas

Os espectros vibracionais na região do infravermelho de todas as novas formas sólidas sintetizadas foram registrados em espectrômetro Perkin-Elmer Spectrum One, utilizando módulo ATR e intervalo espectral de 4000-650 cm^{-1} , com 256 acumulações e 2 cm^{-1} de resolução espectral. Os dados de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) dos novos cristais de furosemida foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance NEO operando na frequência de 600 MHz. No caso dos sais de metformina, os dados de ^1H RMN foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance DRX400 operando na frequência de 400 MHz. Para o registro dos espectros de ^1H RMN, as amostras foram solubilizadas em $\text{DMSO-}d_6$ e transferidas para tubos de RMN. O pacote de programas Bruker TopSpin 4.0 foi utilizado na aquisição e processamento dos dados. Ambos os espectrômetros de RMN utilizados pertencem ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.3.5 Análises térmicas

As análises por DSC foram realizadas num calorímetro Shimadzu modelo DSC-60. Nas medidas de DSC, as amostras foram aquecidas por meio de um termopar, sob fluxo de nitrogênio (N_2) com vazão de 50 mL min^{-1} . As amostras foram pesadas (cerca de $2,0 \pm 0,5$ mg) em cadinhos de alumínio (usados como porta-amostras e referência), sendo, posteriormente, conduzidas a uma taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$, desde a temperatura ambiente até as correspondentes temperaturas de decomposição. As análises termogravimétricas foram realizadas em termobalança Shimadzu modelo TGA-60. Aproximadamente $4,0 \pm 0,5$ mg das amostras foram colocadas em cadinhos de alumina, os quais foram previamente lavados com acetona a fim de remover possíveis impurezas. As medidas foram realizadas utilizando uma taxa de aquecimento de 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$, dentro da faixa de temperatura de 25 $^\circ\text{C}$ a 500 $^\circ\text{C}$, sob atmosfera de nitrogênio (N_2) com vazão de 50 mL min^{-1} . Os dados obtidos de ambas as curvas foram processados usando o software de análise de dados térmicos TA-60. As energias e as perdas de massa envolvidas nos eventos térmicos bem como as temperaturas nas quais ocorreram cada evento foram também determinadas com auxílio deste mesmo software. As medidas de TG e DSC foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os cristais das novas formas sólidas obtidas também foram analisados por TOA, utilizando microscópio de luz polarizada Leica, modelo DM2500P, conectado ao sistema Linkam T95-PE. Este microscópio é equipado com lentes objetivas de aumento, além de câmera digital acoplada e software de captação de imagens em tempo real (Linksys 32) que permitem adquirir, analisar e processar imagens de altíssima qualidade dos cristais. Acoplado a este equipamento, há também uma placa de aquecimento *Hot-Stage* controlada pelo software Linksys 32 que permite ajustar a temperatura da amostra. Dessa forma, cristais de cada uma das novas modificações cristalinas foram colocados numa lamínula de vidro e, posteriormente, dentro de um bloco de aquecimento de prata que faz parte do sistema Linkam T95-PE. As amostras foram então aquecidas a uma taxa de 10 °C min⁻¹, em atmosfera de ar, de 25 °C até uma temperatura final que fosse possível verificar a fusão e/ou a degradação das amostras. Os experimentos de TOA foram realizados no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo em colaboração com o prof. Dr. Javier Ellena e a Dra. Cecília Carolina Pinheiro da Silva.

4.4 Avaliação das propriedades biofarmacêuticas

Após a caracterização químico-estrutural das novas formas sólidas obtidas, as mesmas também foram submetidas a ensaios para avaliação de suas propriedades biofarmacêuticas. Os ensaios realizados foram solubilidade em equilíbrio, dissolução intrínseca e permeabilidade.

4.4.1 Solubilidade

Os ensaios para a determinação da solubilidade em equilíbrio foram realizados empregando o método miniaturizado de agitação em frasco (GLOMME *et al.*, 2005). Inicialmente, soluções saturadas das amostras foram preparadas seguindo o método da saturação descrito por Higuchi e Connors (HIGUCHI; CONNORS, 1965). A formação de uma solução saturada é verificada pela presença de material sólido não dissolvido após agitação, a uma determinada temperatura, indicando que a quantidade máxima do sólido que pode ser dissolvida em um volume determinado de meio já fora alcançada. Neste ponto, as velocidades de dissolução e agregação molecular à fase sólida se equivalem, configurando, portanto, um estado de equilíbrio termodinâmico (GLOMME *et al.*, 2005). Triplicatas de cada um dos fármacos estudados e de suas respectivas modificações cristalinas foram adicionadas em excesso em tubos de penicilina contendo 1,5 mL dos

seguintes meios de dissolução que abrangem o pH fisiológico: água ultrapura, HCl 0,1 M pH 1,2; tampão acetato pH 4,5; e tampão fosfato pH 6,8. O preparo dos meios de dissolução está descrito na Tabela 5. Posteriormente, os tubos foram agitados na velocidade de 150 rpm em incubadora com plataforma de agitação orbital com temperatura controlada em 37 ± 1 °C, por 24 horas. Após 24 h de agitação, as amostras foram filtradas em filtros de membrana de 0,45 µm de porosidade e diluídas em meio de dissolução apropriado, antes de serem quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando métodos analíticos devidamente validados (ver seção 4.4.6) e destinados para estes fins.

Tabela 5 - Preparo dos meios utilizados no estudo de solubilidade em equilíbrio.

Meio	Preparo
HCl 0,1 M pH 1,2	Transferir 8,4 mL de ácido clorídrico concentrado para balão volumétrico de 1000 mL. Completar o volume com água.
Tampão acetato pH 4,5	Transferir 2,99 g de acetato de sódio tri-hidratado e 1,66 mL de ácido acético glacial para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente.
Tampão fosfato pH 6,8	Transferir 6,8 g de fosfato de potássio monobásico e 112 mL de hidróxido de sódio 0,2 M para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em água e completar o volume com o mesmo solvente.

4.4.2 Dissolução intrínseca

Os ensaios de dissolução intrínseca foram conduzidos com base nas recomendações da Farmacopeia Americana (USP, 2014), sendo utilizado o método de disco rotatório. A escolha dos meios de dissolução empregados foi pautada nas monografias dos respectivos fármacos estudados neste trabalho e que constam em compêndios farmacêuticos oficiais. Inicialmente, cerca de 100 mg de cada amostra avaliada, previamente triturada e tamisada, foi pesada e prensada, utilizando um aparato denominado *holder* que possui área superficial de 0,5 cm². A força e o tempo de compressão empregado no preparo de cada pastilha foi de 1 KN por 1 min. O aparato contendo a pastilha recém preparada do fármaco ou de sua respectiva modificação cristalina foi levado para o dissolutor com cubas contendo 900 mL de cada meio à temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C, e foi submetido à agitação de 100 rpm. No decorrer do experimento, alíquotas de 5 mL foram retiradas, com imediata reposição do mesmo volume de meio, em intervalos de tempos pré-determinados, e imediatamente filtradas em filtros de membrana de 0,45 µm de porosidade. Por fim, a concentração de cada um

dos fármacos estudados foi determinada por CLAE-UV, utilizando os métodos analíticos validados (conforme descrito na seção 4.4.6).

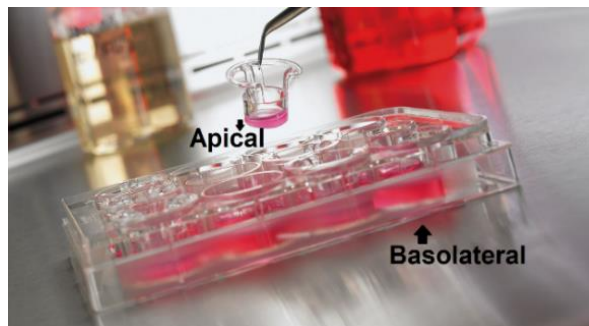
4.4.3 Permeabilidade

Os estudos de permeabilidade celular com cultura de células intestinais humanas Caco-2 foram realizados para os fármacos FSM e MET-HCl bem como para as suas novas formas sólidas cristalinas. As células foram cedidas pelo Laboratório de Estudo de Permeabilidade em Culturas Celulares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sendo provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC). Para retorno da viabilidade, as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria contendo água a 37 °C e transferidas para garrafas de cultivo. O cultivo celular foi realizado em garrafas de 75 cm² contendo meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) glicosado, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução glutamina 200 mM e 1% de solução de aminoácidos. As culturas foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5% e 90% de umidade relativa. A cada dois dias o meio de cultivo foi trocado por meio novo. Quando atingido crescimento de aproximadamente 90% de cobertura celular na parede da garrafa, realizou-se o subcultivo. Para tal, usou-se solução de tripsina (0,25%) com EDTA (1 mM) para lavagens (1,5 mL) do tapete celular formado na parede da garrafa e posteriormente do descolamento (0,5 mL) das células aderidas, mantendo-se a garrafa com a solução por 2 minutos em incubadora a 37 °C. Por fim, adicionou-se 3,5 mL de meio DMEM, proporcionando uma passagem celular 4:1 e transferiu-se para uma garrafa nova contendo 13 mL de meio DMEM suplementado, 1 mL de suspensão celular obtida, e seguiu-se o cultivo nas condições citadas.

Para realização dos estudos de permeabilidade celular, transferiu-se volume contendo aproximadamente 5×10^4 células cm⁻², em fase *lag* do crescimento, para placas Transwell[®] contendo doze poços com suporte de policarbonato de porosidade 0,4 μm e área 1,12 cm² (Figura 6). O cultivo celular nas placas foi realizado com 0,5 mL de meio DMEM na porção apical da membrana celular formada e 1,5 mL do mesmo meio na porção basolateral. A cada dois dias os meios foram substituídos nas duas superfícies, até que se completasse 21 dias de cultivo celular nas placas. Ao longo dos 21 dias de cultivo celular em placas Transwell[®], ocorre diferenciação das células Caco-2 e formação de uma monocamada celular. Tal membrana apresenta resistividade elétrica, que foi monitorada utilizando-se minivoltímetro Milicell ERS[®] (marca Milipore). Os valores medidos acima

de $400 \Omega \times \text{cm}^{-2}$ indicam integridade da membrana celular e, portanto, viabilidade para realização do estudo de permeabilidade (GONÇALVES *et. al.*, 2009).

Figura 6 - Demonstração da superfície apical e basolateral em poços de placas Transwell®.



Os estudos foram realizados usando-se poços cuja membrana foi considerada íntegra, a partir da medição da resistência elétrica transepitelial. Todo o meio DMEM foi retirado dos compartimentos apical e basolateral. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de tampão HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) na porção basolateral e 0,5 mL de solução tampão HBSS contendo os compostos avaliados na porção apical, ou vice-versa. As soluções contendo os fármacos FSM e MET-HCl e suas novas modificações cristalinas foram preparadas em tampão HBSS nas concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (para as formas sólidas de FSM) ou $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (para as formas sólidas de MET). Os experimentos se iniciaram com a adição das soluções na porção apical ou basolateral. No decorrer de cada experimento, a placa foi mantida em incubadora com agitação orbital a 100 rpm e 37°C . Foram realizadas coletas de $200 \mu\text{L}$ de solução nos compartimentos receptores nos tempos de 60, 120, 180 e 240 minutos, após o início do estudo. As amostras coletadas foram imediatamente quantificadas por CLAE, utilizando métodos bioanalíticos devidamente validados (ver seção 4.4.6) e destinados para estes fins. Foi realizada a reposição do meio retirado adicionando-se $200 \mu\text{L}$ de tampão HBSS. As concentrações das amostras, obtidas a partir dos cálculos que tiveram como base a curva de calibração preparada no dia do experimento, foram plotadas em gráfico de concentração *versus* tempo. O estabelecimento da permeabilidade foi dado por meio da avaliação dos valores de permeabilidade aparente (P_{app}) em cm s^{-1} , calculados conforme demonstrado na equação:

$$P_{app} = \frac{VR}{A \times C_0} \times \frac{dC}{dt}$$

em que: P_{app} corresponde a permeabilidade aparente; VR o volume do compartimento receptor em cm^3 ; A a área do suporte permeável de cultivo celular; C_0 a concentração inicial adicionada no compartimento doador (apical); e dC/dt o diferencial da concentração em relação ao tempo do experimento (BREEMEN; LI, 2005).

4.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

As análises que visaram a quantificação dos fármacos CVD, FSM, DIL e MET, provenientes das amostras dos estudos de solubilidade, dissolução intrínseca e permeabilidade, bem como aquelas destinadas à separação dos enantiômeros do CVD foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters Alliance (Milford, MA, EUA), composto por um módulo de separação, um forno de coluna, um detector de ultravioleta (UV) e um detector de fluorescência (FLU) multicanais. O software Empower versão 3.0 (Waters, Milford, MA, EUA) foi utilizado para aquisição e análise dos dados. As condições cromatográficas utilizadas em cada método encontram-se descritas na seção 4.4.5.

4.4.5 Desenvolvimento dos métodos cromatográficos

A quantificação dos fármacos CVD, FSM, DIL e MET foi feita empregando-se CLAE. Assim, foi necessário a otimização das condições cromatográficas de modo a tornar cada método adequado à quantificação dos fármacos em questão. Todas as otimizações foram realizadas com base em métodos analíticos e bioanalíticos reportados na literatura que empregaram CLAE e que foram desenvolvidos com finalidades semelhantes às pretendidas nesta tese. Métodos farmacopeicos descritos nas monografias dos fármacos também foram consultados. Após a otimização dos métodos, procedeu-se com as validações.

As condições cromatográficas do método para quantificação de CVD por CLAE foram: coluna Innoval C_{18} Agela Technologies ($150 \times 4,6$ mm; $5,0 \mu\text{m}$); fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido fosfórico a 0,1% (v/v) e acetonitrila na proporção de 60:40 (v/v) com eluição isocrática, na vazão de 1 mL min^{-1} ; temperatura do forno da coluna de $30 \text{ }^\circ\text{C}$; volume de injeção de $20 \mu\text{L}$; e detecção por fluorescência utilizando os comprimento de onda de excitação e emissão de 254 nm e 356 nm, respectivamente.

Para o método destinado à quantificação de FSM, as condições cromatográficas finais foram: coluna Innoval C₁₈ (150 × 4,6 mm; 5,0 μm) da Agela Technologies; fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido fosfórico a 0,1% (v/v) e acetonitrila na proporção de 60:40 (v/v) em modo isocrático de eluição, na vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura do forno da coluna de 30 °C e volume de injeção de 20 μL. A FSM foi quantificada empregando detecção por UV, fixando o comprimento de onda de detecção em 274 nm, enquanto que para o método bioanalítico optou-se por quantificar a FSM por meio de fluorescência, utilizando os comprimento de onda de excitação e emissão de 268 nm e 410 nm, respectivamente

No método que visou a quantificação de DIL, as seguintes condições cromatográficas foram adotadas: coluna Innoval C₁₈ Agela Technologies (150 × 4,6 mm; 5,0 μm); fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido trifluoroacético a 0,05% (v/v) e metanol na proporção de 44:56 (v/v) com eluição isocrática, na vazão de 1 mL min⁻¹; temperatura do forno da coluna de 30 °C; volume de injeção de 20 μL; e detecção por UV em 240 nm.

As condições cromatográficas do método para quantificação de MET por CLAE foram: coluna Zorbax[®] Cyano Agilent Technologies (250 × 4,6 mm; 5,0 μm); fase móvel constituída de uma mistura de solução de ácido fosfórico a 0,1% (v/v) e metanol na proporção de 30:70 (v/v) com eluição isocrática, na vazão de 1 mL min⁻¹; temperatura do forno da coluna de 30 °C; volume de injeção de 20 μL; e detecção por UV em 240 nm.

Por fim, a separação dos enantiômeros do CVD também foi feita empregando-se CLAE. As condições cromatográficas do método que permitiram a separação enantiomérica foram: coluna CHIRALPAK ADH (150 × 4,6 mm; 5,0 μm); fase móvel constituída de uma mistura de *n*-hexano e isopropanol na proporção de 70:30 (v/v) com eluição isocrática, na vazão de 1 mL min⁻¹; temperatura do forno da coluna de 30 °C; volume de injeção de 20 μL; e detecção por UV em 240 nm. Essas condições cromatográficas já haviam sido reportadas por Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2020) e se mostrou compatível com o proposto nesta tese.

4.4.6 Validação dos métodos cromatográficos

Os métodos analíticos e bioanalíticos otimizados foram validados de acordo com as normas atualmente vigentes no Brasil. Para os métodos destinados à quantificação dos fármacos provenientes dos estudos de solubilidade e dissolução intrínseca, utilizou-se a Resolução RDC nº 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA, por ser a norma que trata da

validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017). Na validação destes métodos, foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, efeito matriz, linearidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção. Já para os métodos utilizados para a quantificação dos fármacos nos estudos de permeabilidade, utilizou-se adicionalmente a Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, por ser a norma atualmente vigente para a validação de métodos bioanalíticos (BRASIL, 2012). Nesses casos, os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, efeito residual, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade do analito e limites de quantificação e detecção. Outras normas e guias internacionais (AOAC, 2016; ICH, 2005; FDA, 2018) também foram usados na validação dos métodos.

Durante as validações dos métodos, todas as soluções foram preparadas e injetadas no sistema cromatográfico em ordem aleatória no decorrer das análises para evitar que variações temporais das condições do equipamento interferissem no resultado e para garantir a independência dos mesmos. Os cálculos e avaliações estatísticas dos dados foram realizados com auxílio dos softwares Empower 3.0 e Microsoft Excel 2013, bem como nos trabalhos reportados por Souza e Junqueira (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

4.4.6.1 Parâmetros validados para os métodos analíticos

4.4.6.1.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada por meio da análise dos resultados de injeções em triplicata das soluções dos meios de dissolução (soluções tamponantes) empregados nos ensaios de solubilidade cujo preparo encontra-se descrito na Tabela 5. Avaliou-se a presença de possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção do analito de interesse e a eventual intensidade desse sinal. As áreas sob os picos cromatográficos correspondentes a interferentes foram comparadas àquela obtida para solução do analito, não devendo ser superior a 2%. Adicionalmente, soluções contendo os coformadores dos novos sais e cocristais propostos foram injetadas no sistema cromatográfico a fim de verificar possível coeluição destas espécies com os picos dos analitos de interesse (fármacos).

4.4.6.1.2 Efeito matriz

A verificação da ocorrência de efeito de matriz foi realizada por meio da comparação estatística (teste *t* de *Student* com nível de significância de 5%) entre os

coeficientes angulares das curvas de calibração do analito construídas nos quatro meios de dissolução empregados nos estudos de solubilidade. Cada curva foi preparada em triplicata e nos mesmos níveis de concentração empregados nos estudos da linearidade.

4.4.6.1.3 Linearidade

A linearidade da faixa de trabalho foi avaliada por meio da análise dos resultados provenientes da injeção de soluções padrão em concentrações crescentes para cada um dos fármacos estudados. Três curvas de calibração distintas foram construídas, sendo as amostras injetadas aleatoriamente no cromatógrafo. As faixas de trabalho (ver seção 4.4.6.3) para avaliação da linearidade foram escolhidas com base nas concentrações esperadas dos fármacos nos experimentos de solubilidade e dissolução intrínseca.

Para avaliação da linearidade, as respostas cromatográficas obtidas foram plotadas graficamente em função das concentrações das soluções analisadas. Valores considerados dispersos (*outliers*) foram determinados por meio do teste de resíduo padronizado de *Jackknife*, considerando-se para tal um nível de significância de 5%. A exclusão desses valores ocorreu apenas quando necessário e foi menor que 22% do total de dados originais, sendo excluído no máximo um ponto por nível de concentração conforme preconizado por Souza e Junqueira (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Os resíduos foram avaliados estatisticamente quanto: a normalidade pelo teste de *Ryan-Joiner*; a independência pelo teste de *Durbin-Watson*; e a homoscedasticidade, usando o teste de *Brown* ou *Levene* modificado. As regressões foram estimadas pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), sendo a significância e o desvio da linearidade avaliados por meio do teste ANOVA. As equações das retas foram determinadas e avaliaram-se a relação entre as variáveis por meio do coeficiente de determinação (R^2), sendo que R^2 deveria ser maior que 0,99 (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

4.4.6.1.4 Precisão e exatidão

A avaliação da precisão foi feita por uma série de determinações em dois dias distintos por dois analistas diferentes, como forma de avaliar a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, utilizando nove determinações (concentrações baixa, média e alta). A precisão intermediária foi avaliada, repetindo o procedimento de repetibilidade, no mesmo laboratório em um dia diferente

por um analista diferente. Para determinação da precisão, preparou-se, de maneira independente, pelo menos três réplicas dos fármacos, contemplando os níveis de concentração mais baixo, o intermediário e o mais alto de acordo com a faixa de trabalho da linearidade. As áreas correspondentes ao pico cromatográfico do analito de interesse foram usadas para calcular a concentração do fármaco nas soluções. O cálculo foi realizado utilizando-se a equação da reta obtida a partir da curva de calibração preparada no dia de cada análise. O desvio padrão relativo (DPR) foi utilizado para expressar a precisão dos métodos analíticos, não sendo aceitos valores superiores a 2% (AOAC, 2016). O cálculo do DPR foi feito considerando todos os valores obtidos, conforme a equação:

$$DPR = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

A avaliação da exatidão foi feita por meio de nove determinações que também contemplaram os níveis de concentração mais baixo, o intermediário e o mais alto de cada método, sendo preparadas pelo menos três réplicas independentes em cada nível. O preparo das soluções padrão, contendo concentrações conhecidas dos fármacos seguiu o mesmo protocolo utilizado no preparo das soluções dos estudos de linearidade. A porcentagem de recuperação foi utilizada para expressar a exatidão de cada método, não sendo aceito valores fora da faixa de 98 a 102% (AOAC, 2016). O cálculo da recuperação foi feito considerando todos os valores obtidos, conforme a equação:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{(\text{Concentração experimental}) \times 100}{(\text{Concentração teórica})}$$

4.4.6.1.5 Limites de quantificação e detecção

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos métodos analíticos foram estabelecidos por meio dos parâmetros das curvas analíticas usando as equações demonstradas a seguir:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

em que: IC corresponde a inclinação da curva de calibração e σ ao desvio padrão, obtido pelo intercepto com o eixo y das três curvas de calibração executadas no teste de linearidade.

4.4.6.2 Parâmetros validados para os métodos bioanalíticos

4.4.6.2.1 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada por meio de cinco injeções no sistema cromatográfico de amostras branco (solução tampão HBSS sem a presença dos fármacos). Posteriormente, procedeu-se com a injeção de soluções padrão dos fármacos nas concentrações correspondentes aos limites inferiores de quantificação de cada método. A demonstração de eventuais picos interferentes no mesmo tempo de retenção do analito, porém com respostas inferiores a 20% da resposta obtida pela amostra no nível de concentração mais baixo do método é um indicativo da seletividade do mesmo.

4.4.6.2.2 Efeito residual

A verificação de efeito residual foi feita injetando três soluções branco (tampão HBSS), sendo uma antes e duas logo após a injeção de soluções padrão dos fármacos nas concentrações correspondentes dos limites superiores de quantificação de cada método. Em seguida, injetou-se uma solução padrão dos fármacos na concentração do limite inferior de quantificação. Para que o método não possua efeito residual significativo, as respostas (em área, por exemplo) de picos interferentes com o mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse devem ser inferiores a 20% da resposta dos analitos na concentração correspondente ao limite inferior de quantificação.

4.4.6.2.3 Linearidade

A avaliação da linearidade das curvas de calibração (ver seção 4.4.6.3) construídas para os métodos bioanalíticos seguiu a mesma lógica adotada na análise deste parâmetro para os métodos analíticos. Todos os testes estatísticos indicados para a verificação das premissas da linearidade bem como para a avaliação da significância da regressão e da falta de ajuste também foram realizados antes da validação dos demais parâmetros dos métodos bioanalíticos.

4.4.6.2.4 Precisão e exatidão

A certificação da precisão e da exatidão dos métodos bioanalíticos foi realizada simultaneamente, por meio de uma série de determinações que ocorreram no mesmo laboratório, abrangendo três dias distintos. A precisão e exatidão intracorrída foram determinadas considerando os resultados obtidos dentro de corridas analíticas realizadas em um mesmo dia, enquanto a precisão e a exatidão intercorridas foram estabelecidas a partir dos resultados provenientes de corridas realizadas em dias diferentes. Para isso, preparou-se, de forma independente e em quintuplicata, soluções dos fármacos em tampão HBSS e nas concentrações correspondentes aos controles de qualidade no limite inferior de quantificação (CQLIQ), baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e de diluição (CQD), estabelecidos para cada método bioanalítico.

As soluções recém preparadas contendo os fármacos foram injetadas no sistema cromatográfico, sendo as áreas correspondentes aos picos cromatográficos dos fármacos utilizadas no cálculo das concentrações reais, utilizando curva de calibração preparada no dia. Os resultados de precisão foram expressos em termos de DPR (%), enquanto os dados referentes à exatidão foram expressos como erro padrão relativo (EPR %). Em ambos os casos, todos os valores obtidos foram considerados nos cálculos. Quando se trata de métodos bioanalíticos, não se admite valores de DPR e EPR superiores a 15% em relação aos valores de concentrações nominais, exceto para a menor concentração, para o qual não se admitiram valores fora da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal. Os cálculos de DPR e ERP foram feitos a partir das seguintes equações:

$$DPR \% = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Concentração média experimental}}$$

$$EPR \% = \frac{(\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}) \times 100}{(\text{Valor nominal})}$$

4.4.6.2.5 Estabilidade dos analitos

A estabilidade dos analitos de interesse em solução HBSS (matriz do experimento de permeabilidade) foi demonstrada em temperatura ambiente em períodos de curta duração (90 min) e longa duração (270 min). Adicionalmente, avaliou-se a estabilidade dos fármacos após três ciclos de congelamento (a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) e descongelamento (temperatura ambiente). O período de congelamento em cada ciclo foi de no mínimo 12

horas. Foram utilizadas três soluções dos fármacos nas concentrações correspondentes ao CQB e CQA de cada método. Um desvio de até 15% em relação aos valores nominais de concentração foram aceitos nos estudos de estabilidade.

4.4.6.2.6 Limites de quantificação e detecção

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos métodos bioanalíticos também puderam ser estimados por meio dos parâmetros das curvas de calibração, a partir das seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

em que: *IC* corresponde a inclinação da curva e σ ao desvio padrão, obtido pelo intercepto com o eixo y das três curvas de calibração construídas para a avaliação da linearidade do método bioanalítico.

4.4.6.3 Preparo de soluções para validação dos métodos cromatográficos

4.4.6.3.1 Método analítico para a quantificação de CVD por CLAE-FLU

A faixa de concentração adotada para a validação deste método é composta por cinco níveis, abrangendo os valores 100,0 ng mL⁻¹; 300,0 ng mL⁻¹, 500,0 ng mL⁻¹, 700,0 ng mL⁻¹ e 900,0 ng mL⁻¹. O preparo das soluções padrão de CVD nos cinco níveis de concentração avaliados é descrito na Tabela 6.

Tabela 6 - Preparo das soluções de CVD para avaliação da linearidade do método analítico.

Concentração de CVD (ng mL ⁻¹)	Volume (μL) de solução padrão estoque CVD 10 μg mL ⁻¹	Diluyente (água ultrapura) q.s.p (mL)
100,0	100	10
300,0	300	10
500,0	500	10
700,0	700	10
900,0	900	10

A solução padrão estoque de CVD foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 1 mg de SQR para balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, realizou-se a solubilização em água ultrapura e completou-se o volume com o mesmo diluyente e

homogeneizou-se. A solução padrão estoque de CVD $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtida foi utilizada nas diluições demonstradas na Tabela 6.

Na determinação da precisão três réplicas do fármaco CVD foram preparadas, de maneira independente, nos níveis de concentração $100,0$; $500,0$ e $900,0 \text{ ng mL}^{-1}$, conforme descrito na Tabela 6. A avaliação da exatidão foi feita por meio de nove determinações, sendo todas réplicas independentes, nos níveis de concentração baixo ($100,0 \text{ ng mL}^{-1}$), médio ($500,0 \text{ ng mL}^{-1}$) e alto ($900,0 \text{ ng mL}^{-1}$). O preparo das soluções padrão de concentrações conhecidas de CVD seguiu o procedimento do teste de linearidade (Tabela 6).

4.4.6.3.2 Método analítico para a quantificação de FSM por CLAE-UV

A faixa de concentração definida para a validação deste método abrangeu cinco níveis, a saber: $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$; $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na Tabela 7 encontra-se descrito o preparo das soluções padrão de FSM nos cinco níveis de concentração estudados.

Tabela 7 - Preparo das soluções de FSM para avaliação da linearidade do método analítico.

Concentração de FSM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume (μL) de solução padrão estoque FSM $50 \mu\text{g mL}^{-1}$	Diluyente (água ultrapura) q.s.p (mL)
2,0	400	10
4,0	800	10
6,0	1200	10
8,0	1600	10
10,0	2000	10

A solução padrão estoque de FSM foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 5 mg de SQR para balão volumétrico de 100 mL . Realizou-se a solubilização em água ultrapura e completou-se o volume com o mesmo diluyente e homogeneizou-se. A solução padrão estoque de FSM $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtida foi utilizada nas diluições demonstradas na Tabela 7.

Na determinação da precisão, preparou-se, de maneira independente, três réplicas do fármaco FSM nos níveis de concentração $2,0$, $6,0$ e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, conforme descrito na Tabela 7. A avaliação da exatidão foi feita por meio de nove determinações nos níveis de concentração baixo, médio e alto ($2,0$, $6,0$ e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), com três réplicas independentes em cada nível. O preparo das soluções padrão, contendo concentrações conhecidas de FSM, foi realizado conforme descrito no teste de linearidade (Tabela 7).

4.4.6.3.3 Método bioanalítico para a quantificação de FSM por CLAE-FLU

A faixa de trabalho escolhida na validação deste método visou abranger as concentrações esperadas no estudo de permeabilidade. Ao todo, oito níveis de concentração compuseram a curva de calibração no estudo da linearidade, a saber 100,0; 300,0; 500,0; 700,0; 900,0; 1100,0; 1300,0 e 1500,0 ng mL⁻¹. Na Tabela 8 encontra-se descrito o preparo das soluções de FSM em cada um dos oito níveis de concentração estudados, a partir de uma solução padrão estoque do fármaco.

Tabela 8 - Preparo das soluções de FSM para avaliação da linearidade do método bioanalítico.

Concentração de FSM (ng mL⁻¹)	Volume (µL) de solução padrão estoque FSM 10 µg mL⁻¹	Diluyente (tampão HBSS) q.s.p (mL)
100,0	100,0	10
300,0	300,0	10
500,0	500,0	10
700,0	700,0	10
900,0	900,0	10
1100,0	1100,0	10
1300,0	1300,0	10
1500,0	1500,0	10

Neste caso, a solução padrão estoque de FSM foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 1 mg de SQR para balão volumétrico de 100 mL. Realizou-se a solubilização em tampão HBSS e completou-se o volume com o mesmo diluyente e homogeneizou-se. A solução padrão estoque de FSM 10 µg mL⁻¹ foi utilizada em todas as diluições subsequentes, que resultaram nas soluções de FSM que compõem os oito níveis de concentração demonstrados na Tabela 8.

Para os testes de precisão e exatidão preparou-se, de forma independente e em quintuplicata, soluções de FSM em tampão HBSS nas concentrações 100; 300; 800; 1200 e 2000 ng mL⁻¹ que correspondem, respectivamente, aos controles de qualidade no limite inferior de quantificação (CQLIQ), baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e de diluição (CQD). As informações relacionadas ao preparo dessas soluções são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9 - Preparo das soluções de FSM para avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.

Nível de concentração de FSM (ng mL ⁻¹)	Volume (µL) de solução estoque de FSM 10 µg mL ⁻¹	Diluyente (tampão HBSS) q.s.p (mL)
100,0 (CQLIQ)	100,0	10
300,0 (CQB)	300,0	10
800,0 (CQM)	800,0	10
1200,0 (CQA)	1100,0	10
2000,0 (CQD)	2000,0	10

No estudo de estabilidade da FSM na matriz do experimento de permeabilidade (tampão HBSS) foram utilizadas três soluções do fármaco nas concentrações 300 ng mL⁻¹ (CQB) e 1200 ng mL⁻¹ (CQA) que foram preparadas conforme descrito na Tabela 9.

4.4.6.3.4 Método analítico para a quantificação de DIL por CLAE-UV

A faixa de concentração validada para este método é constituída pelos níveis 1,0 µg mL⁻¹; 3,0 µg mL⁻¹, 5,0 µg mL⁻¹, 7,0 µg mL⁻¹ e 9,0 µg mL⁻¹. Na Tabela 10 é descrito o preparo das soluções padrão de DIL nos cinco níveis de concentração avaliados.

Tabela 10 - Preparo das soluções de DIL para avaliação da linearidade do método analítico.

Concentração de CVD (µg mL ⁻¹)	Volume (µL) de solução padrão estoque DIL 100 µg mL ⁻¹	Diluyente (água ultrapura) q.s.p (mL)
1,0	100	10
3,0	300	10
5,0	500	10
7,0	700	10
9,0	900	10

O preparo da solução padrão estoque de DIL envolveu a transferência de exatamente cerca de 10 mg de SQR para balão volumétrico de 100 mL. Em seguida, realizou-se a solubilização em água ultrapura e completou-se o volume com o mesmo diluyente e homogeneizou-se. A solução padrão estoque de CVD na concentração de 100 µg mL⁻¹ foi utilizada nas diluições apresentadas na Tabela 10.

No estudo da precisão, três réplicas independentes do fármaco DIL foram preparadas nos níveis de concentração 1,0; 5,0 e 9,0 µg mL⁻¹, conforme mostrado na Tabela 10. A avaliação da exatidão foi realizada preparando-se nove réplicas independentes, contemplando os níveis de concentração baixo (1,0 µg mL⁻¹), médio (5,0 µg mL⁻¹) e alto (9,0 µg mL⁻¹). O preparo das soluções padrão de DIL para o estudo da exatidão seguiu o mesmo protocolo de preparo de soluções adotada para a avaliação da linearidade de DIL (Tabela 10).

4.4.6.3.5 Método analítico para a quantificação de MET por CLAE-UV

A faixa final validada para este método abrangeu cinco níveis de concentração, a saber: 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 32,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Um resumo do preparo das soluções padrão contendo MET nos diferentes níveis de concentração é mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Preparo das soluções de MET para avaliação da linearidade do método analítico.

Concentração de MET ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Volume (μL) de solução padrão estoque MET 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Diluyente (água ultrapura) q.s.p (mL)
8,0	200	10
16,0	400	10
24,0	600	10
32,0	800	10
40,0	1000	10

A solução padrão estoque de MET foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 25 mg de SQR para balão volumétrico de 50 mL. Realizou-se a solubilização em água ultrapura e completou-se o volume com água e homogeneizou-se. A solução padrão estoque de MET 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtida foi utilizada nas diluições mostradas na Tabela 11.

Na determinação da precisão, preparou-se três réplicas independentes do fármaco MET para cada um dos níveis de concentração 8,0, 24,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme descrito na Tabela 11. A avaliação da exatidão foi feita a partir de nove determinações nos níveis de concentração baixo (8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), médio (24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e alto (40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo cada nível constituído por três réplicas independentes. O preparo das soluções padrão, contendo concentrações conhecidas de MET seguiu os mesmos procedimentos de preparo de soluções do teste de linearidade (Tabela 11).

4.4.6.3.6 Método bioanalítico para a quantificação de MET por CLAE-UV

A faixa de trabalho definida na validação deste método visou abranger as concentrações previstas no estudo de permeabilidade. As curvas de calibração do estudo de linearidade foram compostas de sete níveis de concentração, a saber: 200,0; 400,0; 600,0; 800,0; 1000,0; 1200,0 e 1400,0 ng mL^{-1} . O preparo das soluções de MET em cada um dos sete níveis de concentração estudados pode ser visto na Tabela 12. Todas as soluções de MET foram preparadas a partir de uma solução padrão estoque do fármaco.

Tabela 12 - Preparo das soluções de MET para avaliação da linearidade do método bioanalítico.

Concentração de MET (ng mL⁻¹)	Volume (µL) de solução padrão estoque MET 20 µg mL⁻¹	Diluyente (tampão HBSS) q.s.p (mL)
200,0	100,0	10
400,0	200,0	10
600,0	300,0	10
800,0	400,0	10
1000,0	500,0	10
1200,0	600,0	10
1400,0	700,0	10

A solução padrão estoque de MET foi preparada transferindo-se exatamente cerca de 2 mg de SQR para balão volumétrico de 100 mL. Realizou-se a solubilização em tampão HBSS e completou-se o volume com o mesmo diluyente e homogeneizou-se. A solução padrão estoque resultante de MET na concentração de 20 µg mL⁻¹ foi utilizada em todas as diluições subsequentes, permitindo o preparo das soluções de MET nos sete níveis de concentração definidos para avaliação da linearidade.

Para os testes de precisão e exatidão preparou-se, de forma independente e em quintuplicata, soluções de MET em tampão HBSS nas concentrações 200; 500; 800; 1100 e 2000 ng mL⁻¹ que correspondem, respectivamente, aos controles de qualidade no limite inferior de quantificação (CQLIQ), baixo (CQB), médio (CQM), alto (CQA) e de diluição (CQD). As informações relacionadas ao preparo dessas soluções são resumidas na Tabela 13.

Tabela 13 - Preparo das soluções de MET para avaliação da precisão e exatidão do método bioanalítico.

Nível de concentração de MET (ng mL⁻¹)	Volume (µL) de solução estoque de MET 10 µg mL⁻¹	Diluyente (tampão HBSS) q.s.p (mL)
200,0 (CQLIQ)	100,0	10
500,0 (CQB)	250,0	10
800,0 (CQM)	400,0	10
1100,0 (CQA)	550,0	10
2000,0 (CQD)	1000,0	10

Por fim, para o estudo de estabilidade da MET na matriz do experimento de permeabilidade (tampão HBSS), três soluções do fármaco foram preparadas nos níveis de concentração 500 ng mL⁻¹ e 1100 ng mL⁻¹ que correspondem, respectivamente, aos valores definidos para o CQB e CQA. O preparo destas soluções é descrito na Tabela 13.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação e discussão dos resultados de obtenção e caracterização dos sais e cocristais de cada fármaco estão compilados neste capítulo da tese. Para melhor entendimento e organização, os resultados referentes aos fármacos CVD, FSM, DIL e MET são mostrados, nesta ordem, nas seções subsequentes.

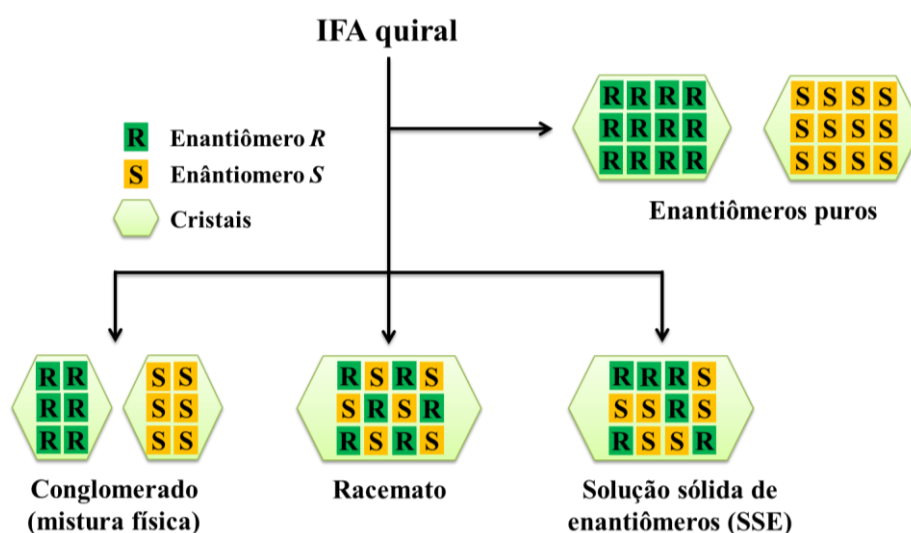
5.1 Novos sais e soluções sólidas de enantiômeros do fármaco carvedilol e suas implicações biofarmacêuticas

Nesta seção são apresentados os resultados de três novas modificações cristalinas do fármaco anti-hipertensivo CVD. Tratam-se de três novos sais farmacêuticos racêmicos, que foram obtidos a partir da reação do CVD com os ácidos clorídrico, bromídrico e oxálico. Tais reações ocasionaram a formação das seguintes formas sólidas: cloridrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HCl-H₂O), bromidrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HBr-H₂O) e oxalato de carvedilol (CVD-OXA). Por se tratar de um fármaco de caráter básico com pKa de 7,8, a molécula de CVD é facilmente protonada em reações com ácidos orgânicos e inorgânicos fortes, e essa eficiente estratégia tem sido utilizada para tentar melhorar a baixa solubilidade aquosa (0,0191 mg mL⁻¹) (HAMED *et al.*, 2016) e biodisponibilidade (cerca de 30%) do fármaco (MORGAN, 1994). Dentre as modificações cristalinas de CVD reportadas recentemente com o intuito de melhorar as características biofarmacêuticas indesejáveis do fármaco (PRADO *et al.*, 2014; VOGT *et al.*, 2010), há evidências de que alguns sais mais solúveis foram capazes de aumentar a concentração plasmática do fármaco em estudos de farmacocinéticos (ZHANG *et al.*, 2021), sugerindo que a estratégia de formação de sais poderia, de fato, promover uma melhoria da biodisponibilidade oral do fármaco.

Outro aspecto importante envolvendo o CVD é a presença de um centro quiral na molécula. O desenvolvimento de novas formas sólidas a partir de um fármaco quiral pode resultar em diferentes sistemas racêmicos, dependendo da proporção e ocupação assumida pelos enantiômeros dentro do cristal (SRISANGA; TER HORST, 2010; WERMESTER *et al.*, 2007). A Figura 7 ilustra os três tipos de sistemas racêmicos que podem ser formados após a cristalização de um IFA quiral. Os racematos são as formas mais comuns (mais de 90% dos casos) e ocorrem quando os enantiômeros *R* e *S* estão presentes exatamente na mesma proporção na rede cristalina, estando relacionados um ao outro por simetria (geralmente um centro de inversão). Já os conglomerados, são

compostos menos recorrentes (cerca de 10% dos casos) e se caracterizam por serem uma mistura física equimolar de cada enantiômero que cristalizou como fases enantioméricas puras dentro do cristal. Por fim, as soluções sólidas de enantiômeros (SSE), sistemas raros e bem particulares, que correspondem a menos de 1% dos casos, ocorrem quando há miscibilidade entre os enantiômeros, resultando em uma distribuição aleatória (total ou parcial) dos mesmos dentro da rede cristalina. Nas SSE, as diferenças espaciais entre os enantiômeros não são prontamente reconhecidas no processo de cristalização, o que leva à formação de sistemas enantiomericamente enriquecidos, com proporções diferentes entre os enantiômeros (BRANDEL *et al.*, 2016; REKIS; BERZINŠ, 2018).

Figura 7 - Formas de apresentação de um IFA quiral no estado sólido.



5.1.1 Descrição cristalográfica e conformacional

A análise dos dados de DRXM revelou que as reações entre o CVD e os ácidos clorídrico, bromídrico e oxálico, resultaram na formação de novos sistemas racêmicos. Nos sais hidratados cloridrato e bromidrato de CVD, a posição ocupada pelos enantiômeros (formas R e S do CVD) dentro do cristal, não seguiu um padrão totalmente lógico e esperado de organização (como num racemato, por exemplo), havendo uma certa miscibilidade entre eles no que se refere às posições ocupadas no cristal, resultando no raro sistema de soluções sólidas de enantiômeros. Por outro lado, no sal oxalato de CVD, as formas R e S ocuparam posições já esperadas no cristal, não sendo possível, a princípio, que um enantiômero assumira a posição ocupada pelo outro (nesse caso não há miscibilidade entre eles), o que resultou num padrão de organização de um típico racemato. No sentido de compreender a formação desses intrigantes sistemas envolvendo

os enantiômeros do CVD, uma detalhada análise estrutural e supramolecular dos novos sais de CVD foi realizada e os resultados encontram-se descritos nas seções subsequentes (5.1.1.1 e 5.1.1.2). Na Tabela 14 estão listados os dados cristalográficos e os detalhes de cada refinamento dessas novas modificações cristalinas.

Tabela 14 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos sais de carvedilol.

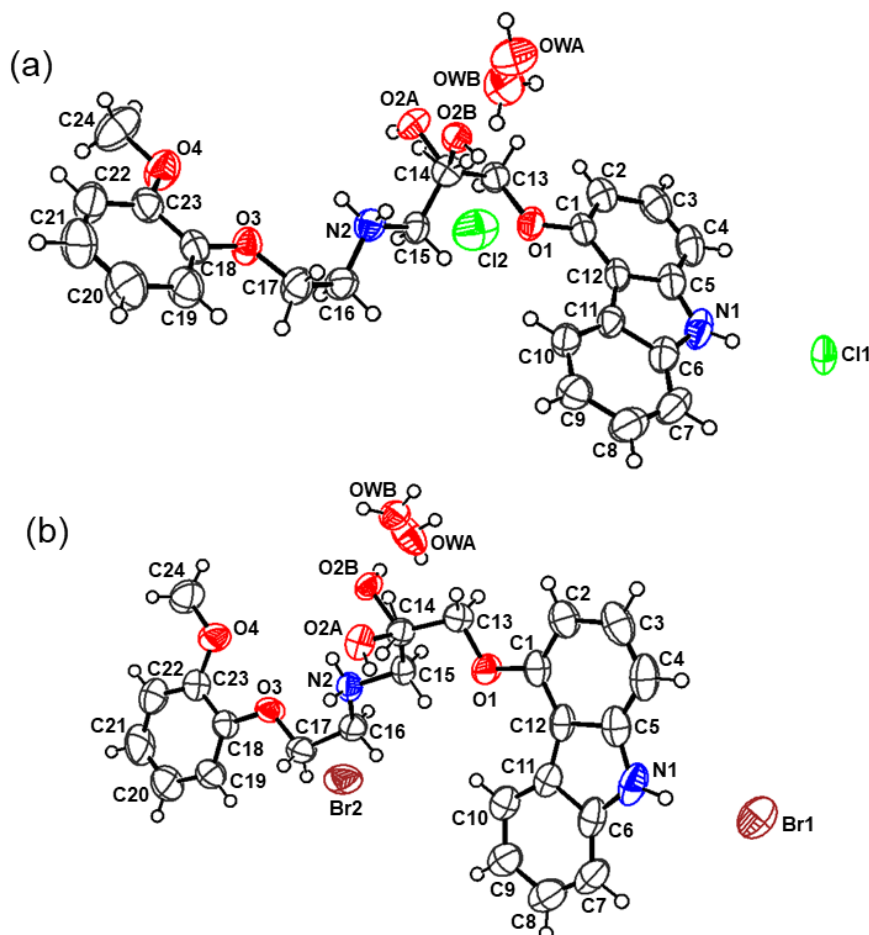
Identificação do cristal	CVD-HCl-H ₂ O	CVD-HBr-H ₂ O	CVD-OXA
Fórmula empírica	C ₂₄ H ₂₉ ClN ₂ O ₅	C ₂₄ H ₂₉ BrN ₂ O ₅	C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₆
Peso molecular	460,94	505,40	451,48
Temperatura (K)	298(2)	298(2)	298(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Ortorrômbico
Grupo espacial	C2/c	C2/c	Pbca
a (Å)	17,7925(11)	18,0098(11)	19,793(2)
b (Å)	21,3203(12)	21,0711(9)	6,8279(8)
c (Å)	12,7668(6)	13,0140(7)	33,188(3)
α (°)	90	90	90
β (°)	102,378(5)	103,049(6)	90
γ (°)	90	90	90
Volume (Å ³)	4730,4(5)	4811,1(5)	4485,1(8)
Z / Z'	8 / 1	8 / 1	8 / 1
ρ _{calc} (g cm ³)	1,294	1,396	1,337
μ (mm ⁻¹)	0,199	1,745	0,096
Reflexões coletadas	13525	14160	13452
Reflexões independentes	4324	4409	4094
R ₁ [I ≥ 2σ(I)]	0,0508	0,0478	0,0558
wR ₂ [all data]	0,1354	0,1198	0,1315
S	1,029	1,035	1,077

5.1.1.1 Soluções sólidas de enantiômeros dos sais mono-hidratados cloridrato e bromidrato de carvedilol

Os novos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O são considerados formas isoestruturais, conforme demonstram os parâmetros de cela unitária desses dois compostos (Tabela 14). Como consequência, ambas as estruturas cristalinas exibem exatamente o mesmo padrão de interações intermoleculares e empacotamentos cristalinos e, por esse motivo, serão analisadas e discutidas juntas. Esses novos sais, que se apresentam na forma de SSE, cristalizaram-se no grupo espacial monoclinico centrossimétrico C2/c. As respectivas unidades assimétricas, representadas na Figura 8, são constituídas por um cátion CVD⁺, um ânion cloreto ou brometo (contra-íons) e uma

molécula de água, na proporção estequiométrica de 1:1:1. Os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio desses sais podem ser vistos na Tabela 15.

Figura 8 - Unidades assimétricas dos sais hidratados (a) cloridrato (CVD-HCl-H₂O) e (b) bromidrato (CVD-HBr-H₂O) de carvedilol. Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.



A formação desses novos sais é associada, dentre outros motivos, ao processo de hidratação dos compostos (inserção de uma molécula de água na rede cristalina) como também à miscibilidade dos enantiômeros no estado sólido, que resultou num modelo estrutural desordenado. Ao longo do processo de resolução e refinamento das estruturas cristalinas, picos de densidade eletrônica residual (*Q-peaks*), obtidos a partir dos mapas de diferença de densidade eletrônica, foram identificados próximos ao centro quiral da molécula de CVD, sendo atribuídos, num primeiro momento, a uma desordem do tipo substitucional. Entretanto, esses picos de densidade eletrônica remanescentes indicavam, na verdade, a existência do grupo hidroxila (esperado para a molécula), mas em uma posição oposta em relação à conformação assumida pela molécula de CVD. Além disso, o átomo de oxigênio da molécula de água também exibiu um elevado deslocamento

anisotrópico, sugerindo que o átomo de oxigênio pudesse apresentar outra posição/ocupação no cristal. Dessa forma, os átomos de oxigênio tanto do grupo hidroxila quanto da molécula de água foram refinadas em duas partes com as respectivas ocupações dos átomos de 0,67:0,33 e 0,72:0,28 para os sais cloridrato e bromidrato, respectivamente. Estes fatores de ocupação sugerem, na verdade, que os enantiômeros do CVD estão em proporções de aproximadamente 0,70:0,30 nos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O.

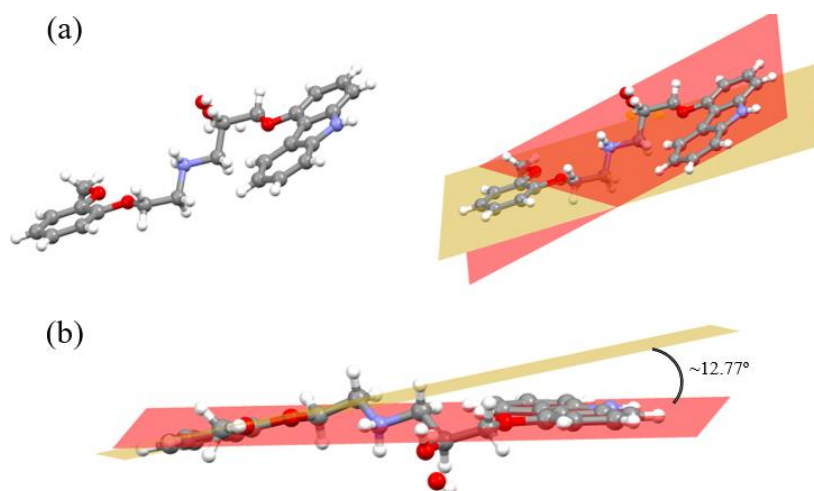
Tabela 15 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio dos sais hidratados cloridrato (CVD-HCl-H₂O) e bromidrato (CVD-HBr-H₂O) de carvedilol.

Interação	D...A (Å)	D-H...A (°)	código de simetria
CVD-HCl-H₂O			
O2A-H2A...OwA	2,892(5)	173	<i>x,y,z</i>
O2A-H2A...OwB	2,856(5)	168	<i>x,y,z</i>
O2B-H2B...Cl2 ⁻	3,161(4)	146	<i>x,y,z</i>
N1-H1...Cl1 ⁻	3,153(1)	168	<i>x,y,z</i>
N2 ⁺ -H2C...Cl2 ⁻	3,247(2)	142	<i>x,y,z</i>
N2 ⁺ -H2C...O2A	2,910(3)	124	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
OwA-HwAB...Cl2 ⁻	3,326(7)	175	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
N2 ⁺ -H2C...OwA	2,993(6)	158	<i>-x+1,+y,-z+1/2+1</i>
OwB-HwAA...O4	3,014(5)	146	<i>-x+1,+y,-z+1/2+1</i>
OwB-HwBA...O3	2,995(5)	151	<i>-x+1,+y,-z+1/2+1</i>
OwA-HwAA...O4	2,941(8)	173	<i>-x+1,+y,-z+1/2+1</i>
OwB-HwBB...Cl1 ⁻	3,165(5)	169	<i>-x+1/2+1,-y+1/2+1,-z+1</i>
C17-H17A...Cg3 ^c	3,385(5)	130	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
C19-H19...Cg4 ^d	3,703(6)	160	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
C24-H24C...Cg2 ^b	3,914(7)	169	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
CVD-HBr-H₂O			
O2A-H2A...OwA	2,881(10)	177	<i>x,-y+1,+z+1/2</i>
O2A-H2A...OwB	2,904(24)	165	<i>x,-y+1,+z+1/2</i>
O2B-H2B...Br2 ⁻	3,271(7)	141	<i>x,y,z</i>
N1-H1...Br1 ⁻	3,272(4)	164	<i>x,y,z</i>
N2 ⁺ -H2D...Br2 ⁻	3,395(3)	137	<i>x,y,z</i>
N2 ⁺ -H2D...O2A	2,915(4)	133	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
OwB-HwBA...Br2 ⁻	3,192(16)	177	<i>x,y,z</i>
N2 ⁺ -H2D...OwA	2,986(11)	152	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
OwA-HwAA...O4	2,974(10)	158	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
OwA-HwAA...O3	3,010(9)	125	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
OwB-HwBB...O4	2,836(24)	165	<i>-x+1,-y+1,-z+1</i>
OwA-HwAB...Br1 ⁻	3,536(7)	164	<i>x-1/2,+y+1/2,+z</i>
C17-H17B...Cg3 ^b	3,408(8)	129	<i>-x+1/2+1,-y+1/2+1,-z+1</i>
C19-H19...Cg4 ^c	3,798(7)	162	<i>-x+1/2+1,-y+1/2+1,-z+1</i>
C24-H24A...Cg2 ^a	3,857(9)	166	<i>-x+1/2+1,-y+1/2+1,-z+1</i>

a Cg2: C1-C2-C3-C4-C5-C12; *b* Cg3: C6-C7-C8-C9-C10-C11; *c* Cg4: C5-N1-C6-C11-C12

As novas formas sólidas CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O foram então definidas como SSE e ambas as unidades assimétricas (Figura 8) exibem um cátion de CVD⁺ que é, na verdade, uma sobreposição das duas formas enantioméricas (*R* e *S*). Cada um dos enantiômeros assume uma conformação semelhante, mas não correspondente nas estruturas cristalinas. Os cátions CVD⁺ têm porções aromáticas orientadas cerca de 12,77° entre si e, portanto, com exceção da cadeia central alifática, a molécula é quase plana (Figura 9). Os ânions cloreto/brometo estão localizados em um eixo de ordem 2, sendo refinados com uma ocupação de 0,5, o que gera uma estequiometria de 1:1 na unidade assimétrica. Ademais, nas estruturas cristalinas de ambos os sais, os enantiômeros *R* e *S* do CVD possuem fatores de ocupação que são complementares entre si, dando origem a uma composição racêmica final aos cristais. Tal fato foi corroborado por meio de análise por cromatografia quiral, mostrado na seção 5.1.5.

Figura 9 - (a) Representação dos dois planos dos grupos aromáticos nos cátions de CVD. (b) Valor do ângulo entre os planos das porções aromáticas dos cátions de CVD.



As estruturas cristalinas dos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O são formadas por camadas de pares iônicos (CVD⁺·Cl⁻ ou CVD⁺·Br⁻) que encontram-se separadas por domínios onde residem moléculas de água (Figura 10). Ao observar a Tabela 15, percebe-se que os empacotamentos cristalinos desses sais são estabilizados por interações intermoleculares e ligações de hidrogênio dos mais variados tipos, tais como: N-H···O, O-H···O, C-H···O, C-H···π, O-H···A⁻ e N-H···A⁻ (A⁻ = Cl⁻ ou Br⁻). Nas estruturas cristalinas, os ânions estão localizados nos eixos de simetria de ordem 2, se conectando aos cátions de CVD⁺ por meio de interações que envolvem a amina secundária protonada (NH₂⁺) do CVD e os anions Cl⁻ e Br⁻ (N2⁺-H2C···Cl2⁻, 3,247(2) Å, 142° ou N2⁺-H2D···Br2⁻, 3,395(3) Å, 137°). Como resultado dessas interações, uma unidade não

outras através de duas moléculas de água (Figura 10c), dando origem à cadeias unidimensionais (1D). Curiosamente, os grupos hidroxila (que difere um enantiômero do outro) não estão diretamente envolvidos na formação dessas cadeias 1D, sendo a molécula de água a principal responsável pela extensão e estabilização das cadeias formadas. Esta observação concorda com a suposição de que as cadeias 1D não precisam necessariamente ser homoquirais para que sejam formadas, podendo perfeitamente ser enantiomericamente enriquecidas uma vez que a molécula de água, que exerce um papel crucial nesse contexto, não é capaz de reconhecer duas unidades diastereoisômeras, ou seja, não difere R...R de S...S.

Nas estruturas dos sais, as moléculas de água estão ligadas em um formato do tipo tetragonal aos cátions de CVD, no momento em que se conectam às unidades homoquirais (Figura 10c). No entanto, a construção das cadeias não é interrompida se um conjunto considerado diastereoisomérico estiver presente ao longo dela, como mostrado na Figura 10c. No plano cristalográfico *ac*, duas cadeias 1D independentes estão associadas entre si através de interações intermoleculares entre o nitrogênio do anel carbazol (NH) do CVD e os ânions Cl⁻ e Br⁻ (N1-H1...Cl1⁻, 3,153(1) Å, 168° ou N1-H1...Br1⁻, 3,272(4) Å, 164°), conforme mostrado na Figura 10d. Finalmente, paralelamente ao eixo cristalográfico *b*, as cadeias enantiomericamente enriquecidas dos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O também interagem entre si *via* ligações C-H...π (C24-H24...Cg2, 3,914(7) Å, 169° / 3,857(9) Å, 166°) formando camadas de moléculas consideradas racêmicas (Figura 10e), que são posteriormente conectadas por moléculas de água *via* Ow-H...A⁻ (OwB-HwBB...Cl1⁻, 3,165(5) Å, 169° ou OwA-HwAB...Br1⁻, 3,536(7) Å, 165°).

Em resumo, a partir da detalhada análise cristalográfica realizada, as principais características das SSE descritas neste trabalho são: (i) ambos os sais de CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O são compostos racêmicos que se comportam como SSE e não como conglomerados, uma vez que em ambas as estruturas os enantiômeros *R* e *S* do CVD não cristalizaram como fases enantiomericamente puras dentro do cristal; (ii) não foi observada nenhuma variação da composição enantiomérica nos cristais, sendo a proporção de cada enantiômero relacionada aos fatores de ocupação encontrados ao final do tratamento da desordem substitucional; e (iii) as soluções sólidas exibiram uma enantioseletividade parcial, já que a distribuição e ocupação dos enantiômeros no cristal não parece ser totalmente aleatória.

5.1.1.2 Sal oxalato de carvedilol

O sal oxalato de carvedilol (CVD-OXA) cristalizou-se no sistema cristalino ortorrômbico com o grupo espacial centrossimétrico *Pbca*. A unidade assimétrica deste sal (Figura 11) é constituída por um cátion de carvedilol e por ânion oxalato, cuja representação é de apenas metade da molécula, uma vez que o ânion se encontra localizado no centro de inversão. A Tabela 16 mostra os parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal CVD-OXA.

Figura 11 - Unidade assimétrica do sal oxalato de carvedilol (CVD-OXA). Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

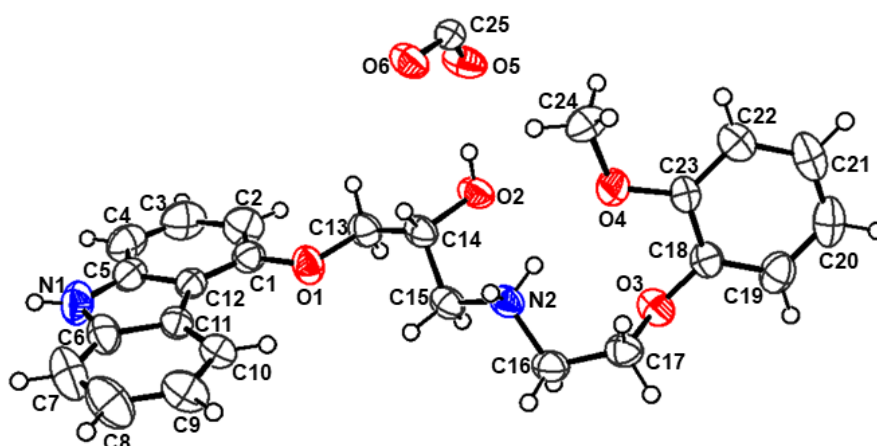


Tabela 16 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal oxalato de carvedilol (CVD-OXA).

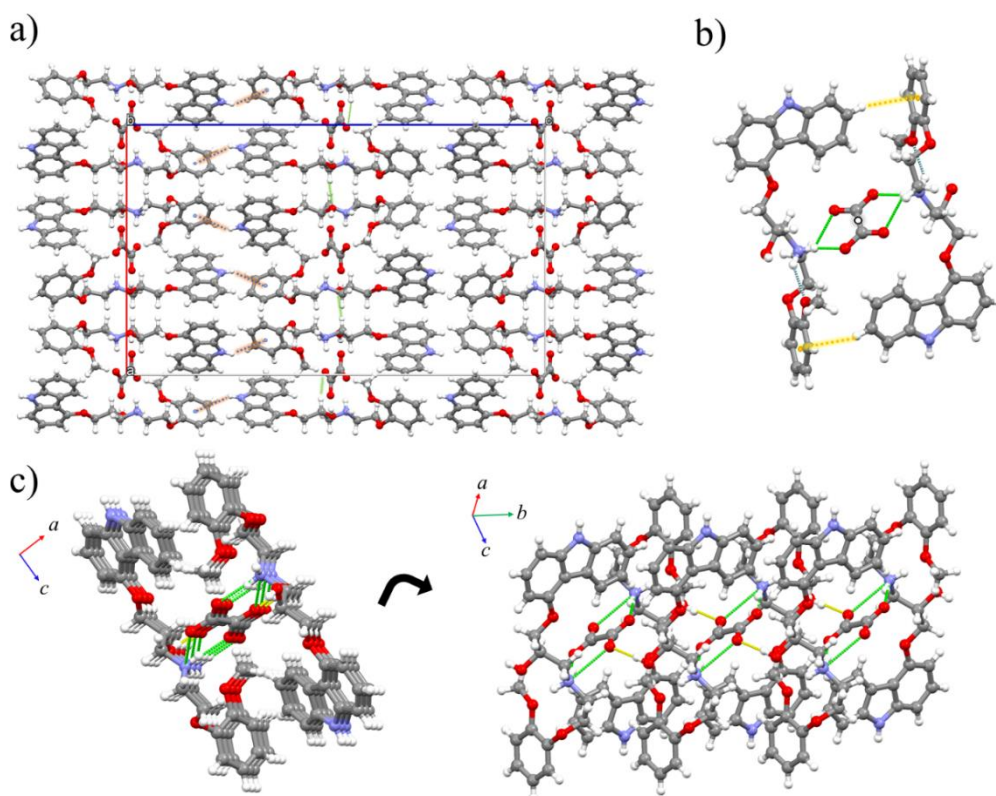
Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	código de simetria
O2-H2...O5 ⁻	2,605(2)	173	<i>x, y, z</i>
N2 ⁺ -H2A...O4	2,984(3)	142	<i>x, y, z</i>
C24-H24A...O6 ⁻	3,517(3)	143	<i>x, y, z</i>
N2 ⁺ -H2A...O6 ⁻	2,704(2)	167	<i>-x+1, -y+1, -z+1</i>
N2 ⁺ -H2A...O5 ⁻	2,927(2)	116	<i>x, +y-1, +z</i>
C15-H15A...O5 ⁻	3,091(3)	124	<i>x, +y-1, +z</i>
C16-H16B...O5 ⁻	3,175(3)	122	<i>x, +y-1, +z</i>
C9-H9...O6 ⁻	3,529(4)	146	<i>x, +y-1, +z</i>
C15-H15B...O2	3,353(3)	149	<i>-x+1/2+1, +y-1/2, +z</i>
C17-H17B...O3	3,393(3)	130	<i>-x+1/2+1, +y-1/2, +z</i>
C8-H8...Cg1 ^a	3,900(4)	153	<i>x, +y-1, +z</i>

a Cg1: C18-C19-C20-C21-C22-C23.

A análise da estrutura do sal CVD-OXA revelou que o seu empacotamento cristalino é estabilizado tanto pelas ligações de hidrogênio clássicas (N-H...O e O-H...O) quanto por não-clássicas (C-H...O e C-H...π), conforme listado na Tabela 16. A maioria dessas interações intermoleculares envolvem principalmente os grupos amina, hidroxila

e éter do cátion do CVD e o carboxilato do ânion oxalato. Como resultado dessas interações, uma rede interessante de ligações de hidrogênio é formada, conectando ambos os enantiômeros *R* e *S* do CVD e os ânions oxalato em um arranjo supramolecular. Diferentemente dos sais de cloridrato e bromidrato de CVD, na estrutura do sal CVD-OXA, a unidade iônica formada é do tipo dimérica, como mostrado na Figura 12b. Como os ânions oxalato residem no centro de inversão, eles são capazes de conectar dois cátions de CVD, sendo cada cátion do fármaco representado por um dos enantiômeros *R* e *S*. Com isso, a unidade dimérica formada é estabilizada por ligações de hidrogênio bifurcadas ($N2^+-H2A\cdots O6^-$, 2,704(2) Å, 167° e $N2^+-H2A\cdots O5^-$, 2,927(2) Å, 116°) entre a amina secundária protonada do CVD (NH_2^+) e o carboxilato desprotonado do oxalato (COO^-). Os dímeros são ainda estabilizados por meios de interações do tipo $C-H\cdots\pi$ ($C8-H8\cdots Cg1$, 3,900(4) Å, 153°).

Figura 12 - (a) Empacotamento cristalino do sal CVD-OXA representado no plano cristalográfico *ac*. (b) Na estrutura cristalina, os ânions oxalato estão no centro de inversão, conectando ambos os enantiômeros *R* e *S* do CVD através das interações $N-H\cdots O$ e $C-H\cdots\pi$. (c) Visão das cadeias 1D racêmicas que se propagam ao longo do eixo cristalográfico *b*.



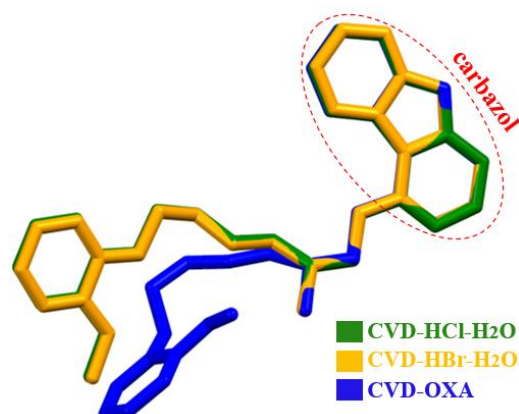
Adicionalmente, os ânions oxalato estão diretamente ligados ao centro quiral da molécula de CVD *via* ligações de hidrogênio do tipo $O-H\cdots O$ ($O2-H2\cdots O5^-$, 2,605(2) Å, 173°), levando à formação de cadeias racêmicas 1D de dímeros na direção do eixo

crystallográfico *b* (Figura 12c). Ao longo dessas cadeias racêmicas, as moléculas do IFA também são estabilizadas por interações do tipo $\pi \cdots \pi$, com uma distância entre os centroides dos anéis *Cg2* e *Cg3* das moléculas de CVD de 4,141(3) Å, o que resulta na formação de cadeias homoquirais, como mostrado na Figura 12c. Por fim, ao longo do eixo cristallográfico *a*, em consequência de todas as interações já descritas, uma estrutura em folhas é montada em uma rede 3D (Figura 12a) *via* ligações de hidrogênio não-clássicas do tipo C–H \cdots O (C15–H15B \cdots O2, 3,353(3) Å, 149°). Em comparação com as estruturas cristalinas dos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O, nas quais a característica principal que os definem como racêmicos está relacionada à montagem centrossimétrica de arranjos enantiomericamente enriquecidos, na estrutura cristalina do sal CVD-OXA, o atributo estrutural determinante para que o composto seja racêmico é a capacidade dos ânions oxalato em reconhecer os enantiômeros *R* e *S* do CVD (Figura 12b). Conclui-se, então, que o sal CVD-OXA cristalizou como um racemato padrão.

5.1.1.3 Análise conformacional dos novos sais de carvedilol

A análise de moléculas conformacionalmente flexíveis, como o CVD, tem sido extensivamente utilizada para indicar quais as conformações mais prováveis a serem adotadas pelos grupamentos moleculares flexíveis no estado sólido (BACK *et al.*, 2012). A sobreposição das moléculas dos cátions do CVD (enantiômeros *R*), provenientes de seus três novos sais, foi realizada a partir do fragmento carbazol das moléculas. Diante da sobreposição (Figura 13), observa-se que as conformações dos cátions CVD⁺ nos sais cloridrato e bromidrato (SSE) são praticamente idênticas entre si e completamente diferentes da conformação adotada pelo cátion CVD⁺ no sal de oxalato.

Figura 13 - Sobreposição das conformações moleculares dos cátions de CVD (enantiômeros *R*) dos sais cloridrato de carvedilol (CVD-HCl-H₂O), bromidrato de carvedilol (CVD-HBr-H₂O) e oxalato de carvedilol (CVD-OXA).



Quando levamos em consideração a orientação dos grupos aromáticos das moléculas, percebemos que nos cations CVD^+ das soluções sólidas, estes grupos estão praticamente no mesmo plano. Os planos médios desses dois sistemas aromáticos nas moléculas dos sais $CVD-HCl-H_2O$ e $CVD-HBr-H_2O$ formam um ângulo de aproximadamente $12,60^\circ$ entre si, enquanto que no sal $CVD-OXA$, os grupos aromáticos são quase ortogonais entre si, formando um ângulo de $\sim 82,00^\circ$. A Figura 13 mostra também que a orientação do grupos carbazol é semelhante em todos os compostos. Em contrapartida, as cadeias alifáticas centrais exibem orientações diferentes, sendo tais diferenças atribuídas, em parte, à ocorrência de uma ligação de hidrogênio intramolecular do tipo $N-H\cdots O$ ($N2^+-H2A\cdots O4$, $2,989(3)$ Å, 142°) na molécula do cátion do sal $CVD-OXA$, que não é observada nos sais isoestruturais $CVD-HCl-H_2O$ e $CVD-HBr-H_2O$.

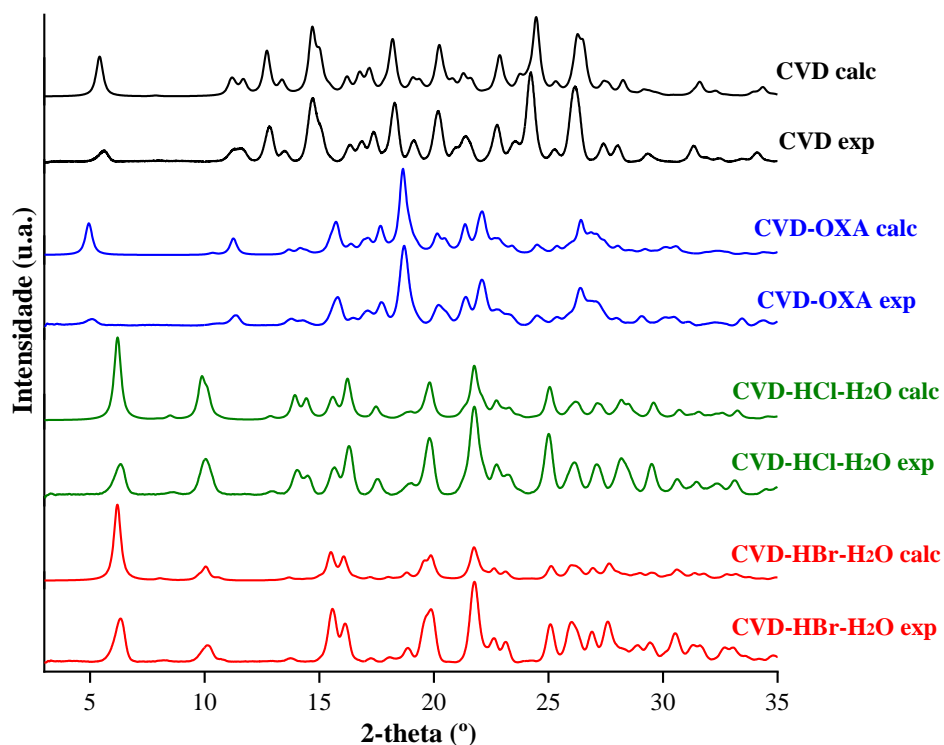
5.1.2 Análise por difração de raios X por policristais

Os padrões de DRXP dos sais cloridrato, bromidrato e oxalato de CVD, sintetizados neste trabalho, estão apresentados na Figura 14. Os difratogramas experimentais de cada modificação cristalina foram comparados com os padrões simulados a partir das respectivas estruturas cristalinas determinadas por DRXM. A técnica de DRXP foi utilizada neste caso para duas finalidades: confirmar se o monocristal escolhido para o experimento de DRXM era representativo de toda amostra sintetizada e avaliar se houve a formação de uma fase cristalina adicional durante o processo sintético. Caso isso tivesse ocorrido, essa nova fase poderia ser facilmente detectada no difratograma experimental por meio da identificação dos picos adicionais que eventualmente apareceriam. Portanto, a técnica de DRXP foi utilizada para garantir e verificar a pureza das novas formas sólidas sintetizadas.

A análise dos difratogramas experimentais e simulados tiveram uma boa concordância, inexistindo picos ao longo de toda faixa angular em 2θ que não fossem esperados para as respectivas fases cristalinas. Além disso, a orientação aleatória dos cristalitos durante o preparo da amostra fez com os efeitos de orientação preferencial fossem minimizados, uma vez que as intensidades observadas e calculadas apresentaram poucas diferenças. Nesse sentido, os resultados de DRXP revelaram que os monocristais escolhidos para os experimentos de DRXM eram representativos de toda amostra e os novos sais de CVD sintetizados apresentaram elevada pureza de fase, sem a presença dos materiais de partida ou de qualquer outra impureza cristalina na amostra final. Vale ressaltar que, conforme esperado, a análise dos difratogramas dos sais $CVD-HCl-H_2O$ e

CVD-HBr-H₂O confirmou a isoestruturalidade entre eles, uma vez que seus padrões de DRXP experimentais mostraram a presença dos principais picos característicos de ambos os sais nas mesmas posições em 2 θ (Figura 14).

Figura 14 - Difractogramas calculados (calc) e experimentais (exp) dos sais oxalato (CVD-OXA), cloridrato (CVD-HCl-H₂O) e bromidrato (CVD-HBr-H₂O) mono-hidratados de carvedilol. Os difractogramas simulado e experimental do CVD foram acrescentados para critérios de comparação



5.1.3 Espectros vibracionais no infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho foi utilizada com o intuito de confirmar a formação dos novos sais de CVD. É esperado que os espectros no infravermelho dos novos sistemas racêmicos sintetizados apresentem mudanças, isto é, algumas bandas referentes a modos vibracionais específicos devem estar deslocadas nos espectros em virtude da protonação/desprotonação das espécies químicas presentes e de interações intermoleculares entre o CVD e os coformadores (HEINZ *et al.*, 2009). Os espectros no infravermelho do fármaco CVD e dos sais e SSE de CVD reportados neste trabalho estão apresentados na Figura 15. As atribuições de bandas (Tabela 17) foram realizadas utilizando dados espectroscópicos reportados para sais de oxalato, cloridrato e bromidrato bem como de outras formas sólidas encontradas na literatura para o fármaco CVD (JAGANNATHAN *et al.*, 2010; MARQUES *et al.*, 2002; PRADO *et al.*, 2018).

Além disso, as características supramoleculares observadas durante a análise cristalográfica foram de extrema importância na interpretação dos resultados.

A molécula de CVD apresenta grupos funcionais importantes, dentre eles, hidroxila, aminas (alifáticas e cíclicas) e éter. Os modos vibracionais desses grupos são facilmente identificados no espectro infravermelho do IFA. Uma banda em 3343 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O–H da hidroxila e uma banda em 3305 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação N–H da amina secundária aparecem no espectro. Além disso, mais duas bandas características do CVD podem ser observadas em 1040 cm^{-1} e 1021 cm^{-1} , referentes aos estiramentos da ligação C–O do grupo éter. Todas essas frequências de vibração aparecem deslocadas nos espectros de infravermelho dos novos sais de CVD, confirmando que essas novas modificações cristalinas foram formadas.

Figura 15 - Espectros na região do infravermelho do fármaco carvedilol (CVD) e dos sais oxalato de carvedilol (CVD-OXA), cloridrato de carvedilol (CVD-HCl-H₂O) e bromidrato de carvedilol (CVD-HBr-H₂O).

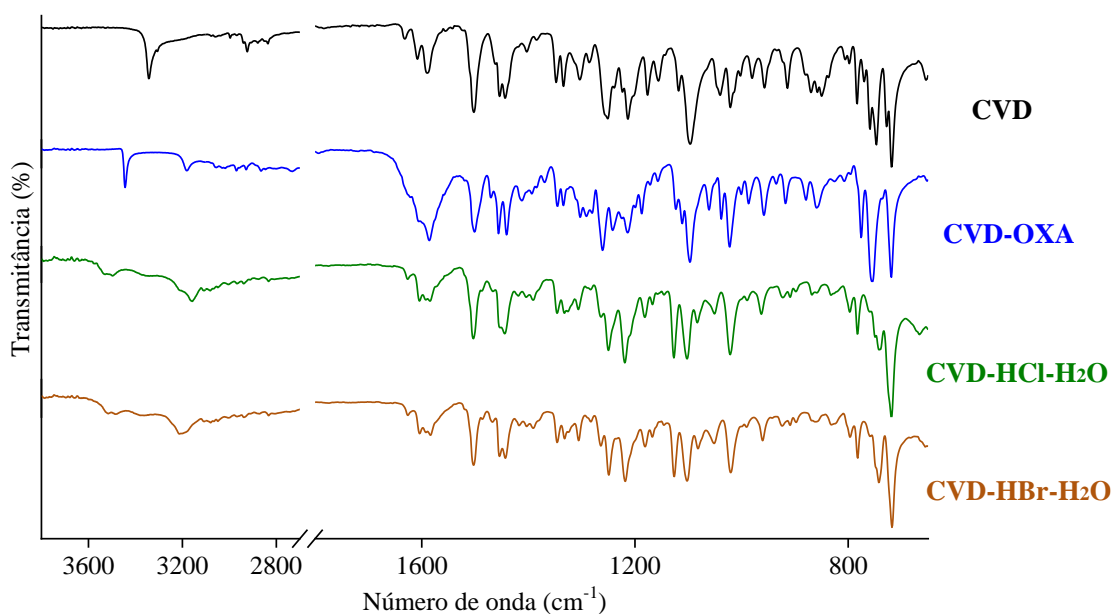


Tabela 17 - Atribuições das principais bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros infravermelho do fármaco CVD e dos novos sais de CVD.

CVD	CVD-HCl-H ₂ O	CVD-HBr-H ₂ O	CVD-OXA	Atribuições
3343	3515	3505	-	$\nu(\text{O-H})_{\text{hidroxila/água}}$
3305	3210, 3160	3217, 3178	3444, 3180	$\nu(\text{N-H})_{\text{amina secundária}}$
3056	3050	3049	3059	$\nu(\text{C-H})_{\text{aromático}}$
2924	2941	2939	2929	$\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$
1608	1604	1603	1605	$\nu(\text{C=C})_{\text{aromático}}$
-	-	-	1586	$\nu_a(\text{COO}^-)_{\text{carboxilato}}$
-	-	-	1413	$\nu_s(\text{COO}^-)_{\text{carboxilato}}$
1040, 1021	1051, 1021	1052, 1020	1038, 1023	$\nu(\text{C-O})_{\text{éter}}$

ν = estiramento da ligação, a = modo antissimétrico, s = modo simétrico

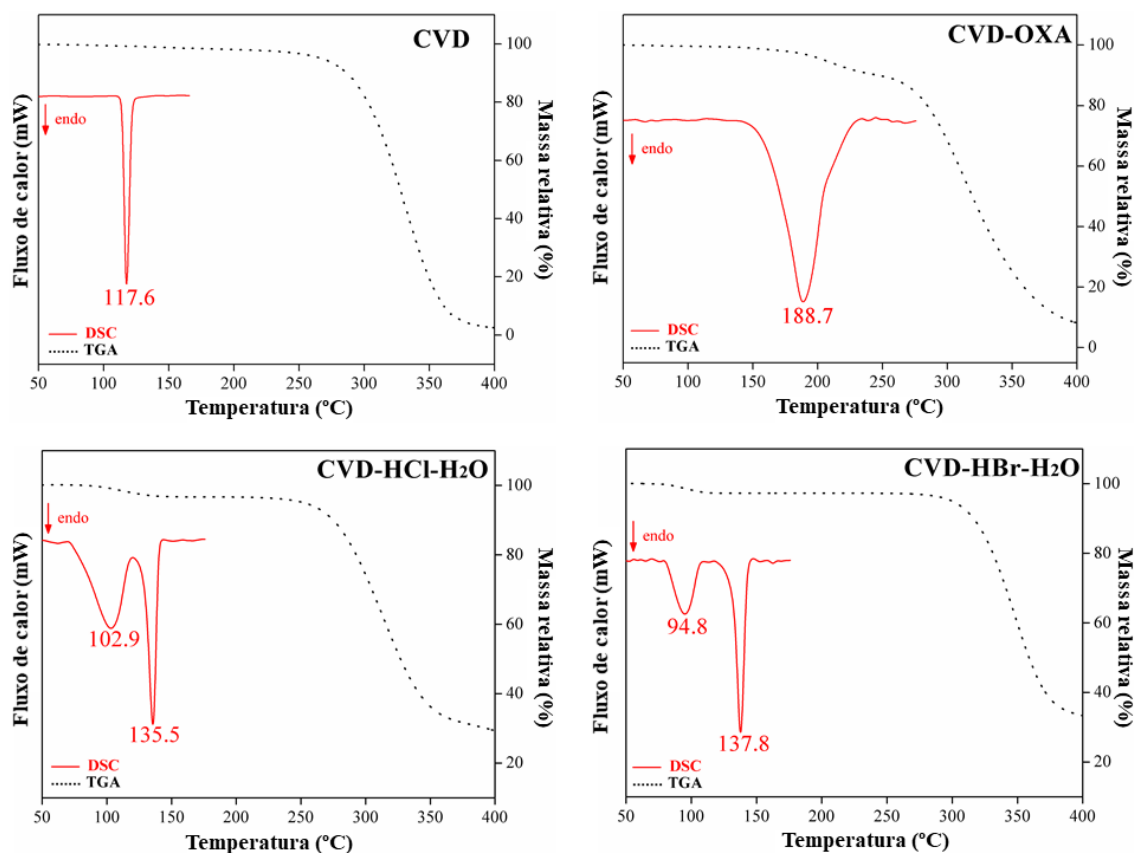
Como esperado, os espectros dos sais de CVD foram afetados pela protonação do átomo de nitrogênio da amina secundária alifática do fármaco. A banda em 3305 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação N–H no espectro do CVD, aparece deslocada para menores números de onda nos espectros dos sais, conforme evidenciado na Tabela 17. Além disso, no espectro do sal CVD-OXA, é possível observar o aparecimento de duas novas bandas, que foram relacionadas às vibrações do ânion oxalato. Essas bandas, que aparecem em 1586 cm^{-1} e 1413 cm^{-1} , foram atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico de grupo carboxilato (COO^-), respectivamente. Essas duas bandas de absorção não aparecem nos demais espectros analisados. Em relação aos sais de cloridrato e de bromidrato de CVD, por serem formas mono-hidratadas, duas bandas de absorção fracas na região de 3500 cm^{-1} também foram observadas, sendo ambas relacionadas aos estiramentos da ligação O–H de moléculas de água.

5.1.4 Caracterização térmica

O comportamento térmico dos novos sais do CVD foi avaliado por meio das seguintes técnicas de caracterização térmica: calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e análise termo-óptica (TOA). As curvas DSC e TG do CVD e de suas novas modificações cristalinas são mostrados na Figura 16. De acordo com as curvas DSC, fases únicas e puras correspondentes aos novos sais de CVD sintetizados foram observadas. A presença de picos endotérmicos característicos nas curvas DSC, exclui a existência de eventos de transições de fase e/ou polimórfica nas faixas de temperatura avaliadas. A curva DSC do CVD é caracterizada por apenas um pico endotérmico em $117,6\text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{on-set} = 114,5\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H = -118,72\text{ J g}^{-1}$) atribuído ao processo de fusão. Na curva TG, observa-se que a degradação do fármaco ocorre em uma única etapa com início de perda de massa em aproximadamente $265\text{ }^\circ\text{C}$ e término em $\sim 390\text{ }^\circ\text{C}$.

A estabilidade térmica pode ser expressa em termos da ruptura da estrutura cristalina de uma determinada amostra mediante sua exposição a um processo controlado de aquecimento. Considerando as temperaturas de degradação e desidratação das novas formas sólidas de CVD, percebe-se que os novos sais sintetizados exibem menor estabilidade térmica quando comparados ao CVD. A curva DSC do sal CVD-OXA é caracterizada por um pico endotérmico alargado, centrado em $188,7\text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{on-set} = 167,1\text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H = -222,42\text{ J g}^{-1}$), que foi atribuído ao processo de fusão/degradação da amostra. Este evento concorda com a perda de massa do sal ($\sim 90\%$) observada na curva TG que começa em aproximadamente $190\text{ }^\circ\text{C}$ e segue de maneira gradual até $400\text{ }^\circ\text{C}$.

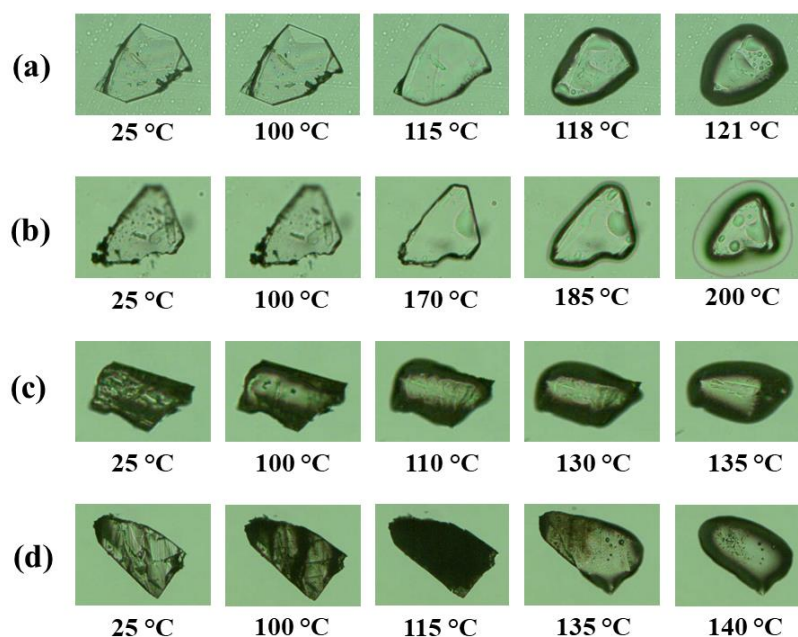
Figura 16 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos compostos: carvedilol (CVD), oxalato de carvedilol (CVD-OXA), cloridrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HCl-H₂O) e bromidrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HBr-H₂O).



Já para os demais sais de CVD (formas cloridrato e bromidrato), devido à isoestruturalidade, as suas respectivas curvas DSC são muito semelhantes entre si e ambas exibem dois picos endotérmicos bem definidos. Os primeiros picos, que aparecem em 102,9 °C ($T_{on-set} = 80,56$ °C e $\Delta H = -90,06$ J g⁻¹) e 94,8 °C ($T_{on-set} = 81,87$ °C e $\Delta H = -38,70$ J g⁻¹) foram atribuídos à desidratação das amostras, enquanto que os segundos picos, observados em 135,5 °C ($T_{on-set} = 130,08$ °C e $\Delta H = -45,22$ J g⁻¹) e 137,8 °C ($T_{on-set} = 133,64$ °C e $\Delta H = -69,34$ J g⁻¹) foram correlacionados com processo de fusão dos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O, respectivamente. Esses resultados concordam com o que foi observado nas curvas TG desses dois sais, que mostram claramente a ocorrência de dois eventos de perda de massa. A primeira etapa de perda de massa (de cerca de 3,0%) ocorreu entre 80 e 120 °C e corresponde a saída de uma molécula de água da rede cristalina e a segunda etapa, que se inicia em aproximadamente 250 °C, foi atribuída à degradação das amostras.

As imagens obtidas por TOA (Figura 17) confirmaram com sucesso os eventos térmicos observados nas curvas DSC e TG. Mediante as imagens, foi possível afirmar inequivocamente que os cristais do fármaco CVD e de seus sais CVD-OXA, CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O iniciam seus respectivos processos de fusão/degradação em torno de 115 °C, 170 °C, 130 °C e 135 °C, respectivamente, concordando com os picos endotérmicos de fusão/degradação observados nas curvas de DSC desses sais. Acima dessas temperaturas, os cristais vão gradualmente se transformando em resíduos líquidos homogêneos, se mantendo neste estado até as suas respectivas temperaturas de degradação. Por fim, as imagens de TOA também mostraram que cristais dos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O ficam levemente opacos entre 100 e 120 °C, devido ao processo de desidratação das amostras.

Figura 17 - Imagens obtidas por análise termo-ótica a partir de monocristais dos compostos: (a) carvedilol (CVD), (b) oxalato de carvedilol (CVD-OXA), (c) cloridrato de carvedilol (CVD-HCl-H₂O) e (d) bromidrato de carvedilol (CVD-HBr-H₂O).

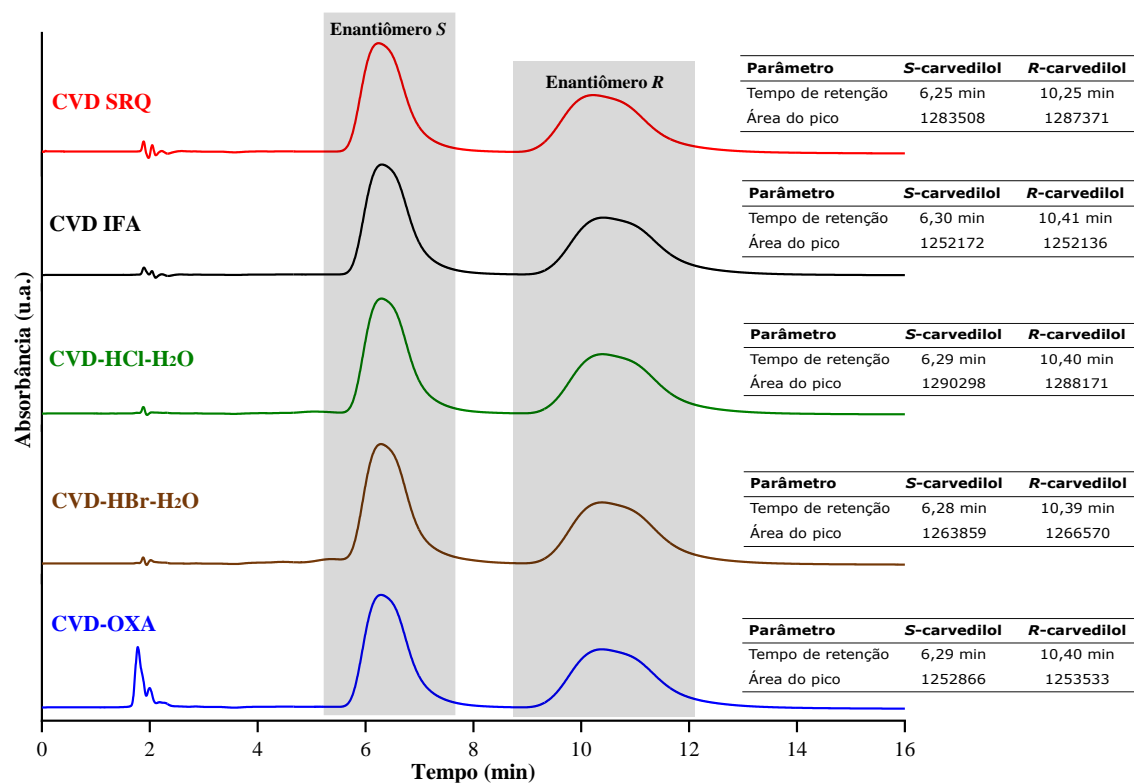


5.1.5 Análise por cromatografia quiral

A fim de confirmar a proporção dos enantiômeros *R* e *S* nos sais isoestruturais hidratados CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O bem como no sal anidro CVD-OXA, uma análise por cromatografia quiral foi conduzida. Para sistemas racêmicos, é esperado que as formas *R* e *S* estejam em proporções equivalentes (1:1) no sólido. Caso o sistema seja enantiomericamente enriquecido e sem a ocorrência de operações de simetria como centros de inversão, a proporção dos enantiômeros pode assumir valores diversos. Os

cromatogramas obtidos a partir de soluções de mesma concentração ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) de uma SQR racêmica do fármaco CVD, da matéria-prima do fármaco CVD (utilizada como reagente de partida nas sínteses dos novos sais) bem como dos próprios sais de CVD obtidos são mostrados na Figura 18. Ao observar os cromatogramas, nota-se que o método cromatográfico empregado permitiu a separação completa dos enantiômeros *R* e *S* do CVD da amostra sabidamente racêmica (SQR do fármaco CVD), havendo em todos os casos resolução na linha de base dos picos.

Figura 18 - Cromatogramas obtidos após a injeção de soluções de concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos compostos CVD racêmico SQR (vermelho), CVD matéria-prima (preto), sal CVD-HCl-H₂O (verde), sal CVD-HBr-H₂O (marrom) e sal CVD-OXA (azul). Os parâmetros tempo de retenção e área do pico de cada cromatograma foram inseridos.



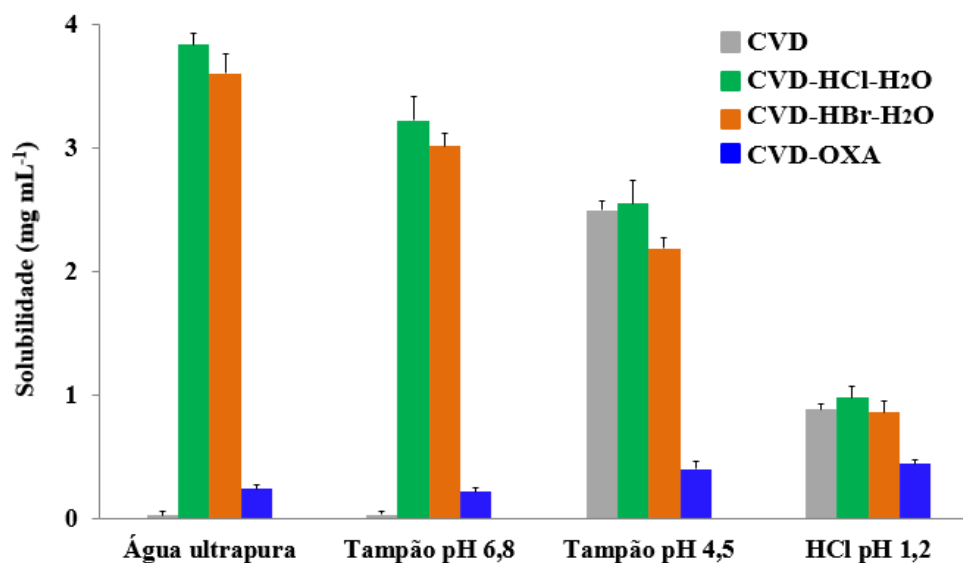
A ordem de eluição dos enantiômeros foi comprovada com base nos resultados reportados por Zhang e colaboradores (ZHANG *et al.*, 2020) que avaliaram, por meio da injeção das formas *R* e *S* isoladas, e atribuíram o primeiro pico observado no cromatograma ao enantiômero *S*. Sabendo-se que não houve mudança significativas nas condições cromatográficas em relação ao método reportado e utilizado como referência, conclui-se que a ordem de eluição dos enantiômeros do CVD observada nos nossos cromatogramas é a mesma. Além da resolução na linha de base dos picos, outro ponto que comprovou inequivocamente a natureza racêmica de todas as amostras analisadas foi

a área dos picos de *S*-carvedilol e *R*-carvedilol. Independente da amostra, dada a grande proximidade dos valores das áreas dos picos, sobretudo quando se compara as áreas de um mesmo cromatograma, pode-se afirmar que os enantiômeros *R* e *S* estão em proporções equivalentes de 1:1 nos sólidos investigados, o que configura a ocorrência de racematos.

5.1.6 Determinação da solubilidade

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes de um fármaco, porque está intrinsecamente relacionada ao processo de absorção e, conseqüentemente, à eficácia terapêutica (BLAGDEN *et al.*, 2007). Por definição, a solubilidade em equilíbrio representa a quantidade máxima de fármaco dissolvida num meio a uma temperatura e pH específicos (HANCOCK *et al.*, 1997). A solubilidade em equilíbrio dos sais CVD-HCl-H₂O, CVD-HBr-H₂O e CVD-OXA e em meios considerados biorrelevantes (HCl 0,1 M pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8), bem como em água purificada, a 37 °C, é representada na Figura 19. Para fins de comparação, a solubilidade do fármaco CVD puro também foi inserida. Nota-se, que a solubilidade do CVD, estando na forma pura ou na forma de sais, sofre influência direta do pH do meio em que está dissolvido. Nos meios nos quais os valores de pH são mais altos, o CVD exibe baixa solubilidade ($0,029 \pm 0,009$ mg mL⁻¹ em água e $0,032 \pm 0,007$ mg mL⁻¹ em tampão fosfato). Dado o pKa de 7,8 da molécula, nesses meios ainda há o predomínio da forma não-ionizada do fármaco, tornando-o pobremente solúvel. Quando o CVD está dissolvido nos meios ácidos, a sua solubilidade ($2,497 \pm 0,068$ mg mL⁻¹ em tampão acetato e $0,881 \pm 0,049$ mg mL⁻¹ em HCl 0,1 M) aumenta consideravelmente, fato justificado pela ocorrência da forma ionizada da molécula nesses meios. Vale ressaltar que os valores de solubilidade determinados para o CVD apresentaram ótima concordância com dados reportados na literatura (HAMED *et al.*, 2016; MARKOVIC *et al.*, 2020).

Figura 19 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução do fármaco carvedilol (CVD) e dos sais cloridrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HCl-H₂O), bromidrato de carvedilol mono-hidratado (CVD-HBr-H₂O) e oxalato de carvedilol (CVD-OXA).



No caso dos novos sais de CVD propostos, a forma que exibiu uma solubilidade mais próxima da encontrada para o CVD puro foi o sal CVD-OXA. Para este sal, enquanto a solubilidade nos meios água purificada ($0,239 \pm 0,040 \text{ mg mL}^{-1}$) e tampão fosfato ($0,216 \pm 0,038 \text{ mg mL}^{-1}$) foram 8,2 e 6,8 vezes maiores, respectivamente, em relação ao CVD puro, nos meios tampão acetato ($0,405 \pm 0,061 \text{ mg mL}^{-1}$) e HCl 0,1 M ($0,442 \pm 0,032 \text{ mg mL}^{-1}$) a solubilidade do sal CVD-OXA foi 6,2 e 2,0 vezes menores, respectivamente, comparado ao CVD. Já os sais isoestruturais hidratados CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O promoveram um aumento muito significativo (de 95 a 131 vezes) na solubilidade do fármaco CVD nos meios água ($3,835 \pm 0,091 \text{ mg mL}^{-1}$ e $3,598 \pm 0,164 \text{ mg mL}^{-1}$) e tampão fosfato ($3,221 \pm 0,196 \text{ mg mL}^{-1}$ e $3,013 \pm 0,102 \text{ mg mL}^{-1}$). Entretanto, esse aumento não foi observado nos meios ácidos, sendo a solubilidade do CVD puro e dos sais CVD-HCl-H₂O ($2,545 \pm 0,187 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão acetato e $0,980 \pm 0,087 \text{ mg mL}^{-1}$ em HCl 0,1 M) e CVD-HBr-H₂O ($2,184 \pm 0,090 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão acetato e $0,859 \pm 0,097 \text{ mg mL}^{-1}$ em HCl 0,1 M) semelhantes nestes meios. Sabendo-se que o CVD exibe uma solubilidade mais alta em meio ácido e que a sua maior deficiência seria sua baixa solubilidade em meios de tendência mais básica, conclui-se que o emprego dos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O minimizaria o problema da solubilidade do IFA seja qual for o pH do meio em que estará dissolvido. Outro importante argumento que reforça a necessidade de se ter sais mais solúveis em toda a faixa de pH fisiológico, é a real possibilidade destes compostos em promover um aumento significativo na concentração

plasmática do fármaco, conforme demonstrado em recente trabalho publicado na literatura (ZHANG *et al.*, 2021). Uma vez que o CVD apresenta baixa biodisponibilidade oral (~30%), as novas formas sólidas propostas, sobretudo os sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O, são considerados promissores neste sentido.

5.1.7 Validação do método analítico para quantificação de carvedilol por CLAE-FLU

Na validação do método cromatográfico uma avaliação acerca da ocorrência de possíveis interferentes foi realizada. Entende-se como interferentes, neste caso, potenciais produtos de degradação e impurezas do fármaco CVD. Vale destacar que um método é considerado seletivo quando a determinação do analito de interesse é possível mesmo na presença de interferentes, sendo o método capaz de discerní-los. Todos os compostos submetidos ao ensaio de solubilidade exibiram elevado grau de pureza, conforme mostrado nas seções destinadas à caracterização dos materiais. Soma-se a isto o fato de inúmeros trabalhos da literatura demonstrarem que o fármaco CVD não sofre degradação nem nas condições em que foi realizado o experimento de solubilidade e nem sob condições estressantes usualmente empregadas em estudos de degradação forçada (AHMED *et al.*, 2018; CHANDER *et al.*, 2013), o que reitera sua estabilidade. Por esses motivos, a possibilidade de existência de qualquer interferente, sobretudo produtos de degradação é muito baixa. Assim, para o método analítico otimizado para a quantificação do CVD, a validação completa do parâmetro seletividade não se mostrou necessária. Por último, os contra-íons (Cl⁻, Br⁻ e OXA⁻) dos sais de CVD, por não apresentarem qualquer tendência de serem retidos na coluna dado seu elevado caráter polar e, principalmente, por não serem espécies que emitem fluorescência, a possibilidade é remota de que esses contra-íons interfiram na seletividade do método.

A fim de comprovar que o método apresenta ou não efeito de matriz, avaliou-se a inclinação (coeficiente angular) de uma curva de calibração usual (construída em água ultrapura) comparada às inclinações obtidas para curvas matrizadas (preparadas nos diferentes meios de dissolução). Conforme evidenciado na Tabela 18, além do paralelismo observado entre as retas, não se observou diferença estatisticamente significativa nas inclinações das curvas, sendo tal fato corroborado pelos menores valores de *t* calculados (1,09-1,88) em relação ao valor de *t* crítico (2,78). Assim, foi possível comprovar que o método proposto não apresenta efeito de matriz significativo, permitindo que os demais parâmetros validados possam ser avaliados partindo-se de soluções de CVD preparadas apenas em água ultrapura.

Tabela 18 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de CVD.

Meio de dissolução utilizado no preparo da curva	Faixa de concentração (ng mL ⁻¹)	Regressão linear	
		Coefficiente angular (<i>a</i>)	R ²
Água ultrapura	100-900	339649	0,9996
Tampão fosfato pH 6,8		334440	0,9997
Tampão acetato pH 4,5		335387	0,9998
HCl 0,1 M pH 1,2		339565	0,9998

A linearidade do método na faixa de trabalho de 100 a 900 ng mL⁻¹ foi avaliada por meio do MMQO. Devido ao emprego da fluorescência como sistema de detecção, a faixa de trabalho escolhida não pôde abranger concentrações muito superiores em relação ao nível de maior concentração do método (900 ng mL⁻¹), em virtude da possibilidade de ocorrer saturação do sinal analítico pelo detector de fluorescência. A significância da regressão, a verificação da falta de ajuste do modelo, bem como a verificação das premissas da linearidade foram os principais parâmetros considerados no estudo da linearidade. Os resultados dos testes estatísticos que comprovaram a linearidade do método na faixa de 100 a 900 ng mL⁻¹ encontram-se listados na Tabela 19. Nota-se que o modelo da regressão é linear do tipo $y = ax + b$, sendo y a área sob o pico do analito de interesse (CVD), a o coeficiente angular, x a concentração nominal de CVD e b o coeficiente linear.

Tabela 19 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de CVD.

Item avaliado	Analito de interesse (CVD)
Equação da reta	$y = 339060x - 7267047$
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9993
Modelo estatístico	MMQO
<i>Outliers</i> descartados	Nenhum
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9818 > 0,9383)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,3596 < 1,7657 < 2,6404)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,4831 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,5168 > 0,0500)

O método empregado também se mostrou preciso, devido à proximidade entre os valores de concentração de soluções de CVD, que foram avaliadas nas condições de repetibilidade (mesmo dia e analista) e de precisão intermediária (dias e analistas diferentes). Os valores de DPR calculados a partir de nove determinações, que foram preparadas em triplicata nas concentrações de 100; 500 e 900 ng mL⁻¹, foram inferiores a 2%, conforme evidenciado na Tabela 20. O método também se mostrou exato, uma vez que houve concordância entre os resultados de concentração de cada determinação em relação ao valor aceito como verdadeiro. A exatidão foi certificada baseado nos valores médios de recuperação de CVD nos três níveis de concentração avaliados (100; 500 e 900 ng mL⁻¹), que se encontram entre 98 e 102% (Tabela 20).

Tabela 20 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas durante a validação do método bioanalítico para a quantificação de CVD.

Nível de concentração (ng mL ⁻¹)	Precisão		Exatidão
	DPR (%) repetibilidade	DPR (%) precisão intermediária	Recuperação média (%)
100	1,44	1,66	99,54
500	0,90	1,32	100,58
900	0,79	1,52	100,89

A estimativa dos limites de quantificação e detecção foi realizada com base nos parâmetros das curvas de calibração. A determinação destes limites, ainda que teóricos, demonstram até quais concentrações o método seria capaz de quantificar e detectar o fármaco CVD, com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores de LQ e LD encontrados foram 17,03 ng mL⁻¹ e 5,62 ng mL⁻¹, respectivamente.

5.1.8 Impactos das novas formas sólidas de carvedilol

Na seção 5.1, apresentamos três novos sais do fármaco anti-hipertensivo CVD. Nos sais CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O, os enantiômeros *R* e *S* do fármaco se dispuseram na forma de soluções sólidas na estrutura cristalina, o que é bastante raro (menos de 1% dos casos), nos motivando a estudar como esses sistemas ocorrem e quais os fatores estruturais estão envolvidos na sua formação e estabilização. O sal CVD-OXA cristalizou como uma racemato padrão, o que nos auxiliou ainda mais na compreensão do processo de reconhecimento supramolecular dos enantiômeros do CVD no estado sólido. Todos esses novos sistemas racêmicos do CVD foram investigados em detalhes por meio de uma minuciosa caracterização de estado sólido, o que permitiu a publicação

dos dados na revista de renome internacional e alto fator de impacto *Crystal Growth & Design* em junho de 2019 (DINIZ *et al.*, 2019).

Após a publicação deste artigo científico, deu-se continuidade à avaliação biofarmacêutica das novas formas sólidas de CVD sintetizadas. Nos testes de solubilidade em equilíbrio realizados em meios que abrangem o pH fisiológico, verificou-se que o IFA se tornou consideravelmente mais solúvel (até 131 vezes) quando está na forma de sais, sobretudo nos meios de dissolução em que o fármaco CVD neutro é fracamente solúvel. Vale ressaltar que o CVD é um fármaco classe II do SCB, ou seja, de baixa solubilidade e alta permeabilidade. A sua baixa solubilidade é um fator já conhecido e determinante para a sua pobre biodisponibilidade oral (cerca de 30%), o que nos deixa muito otimistas diante, não só da clara oportunidade, como também do grande potencial destes novos sais de CVD em melhorar essa característica biofarmacêutica indesejável do IFA. Deve-se destacar que já há evidências na literatura mostrando que sais mais solúveis de CVD, análogos aos reportados nesta tese, melhoraram consideravelmente o perfil farmacocinético do fármaco. Soma-se a este fato a realização, pela primeira vez, de uma investigação detalhada de como novas soluções sólidas de enantiômeros podem ser usadas para aprimorar as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de um determinado fármaco. Dada a importância e relevância destes resultados, um artigo científico será submetido futuramente em um periódico farmacêutico de renome internacional (ainda a ser definido).

5.2 Novo sal e cocrystal do fármaco furosemida e suas propriedades biofarmacêuticas

Nesta seção são apresentados os resultados de duas novas formas sólidas cristalinas multicomponentes do fármaco diurético FSM. Trata-se de um novo sal e um novo cocrystal, que foram obtidos a partir da reação da FSM com os coformadores imidazol e 5-fluorocitosina. Após as etapas de cristalização, o sal imidazólio de furosemida (FSM-IMI) e o cocrystal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O) foram obtidos com sucesso, tendo suas respectivas estruturas cristalinas elucidadas por DRXM. A FSM é um fármaco de caráter ácido (pKa de 3,9), podendo formar sais em reações com bases orgânicas e inorgânicas fortes. Além disso, este IFA possui vários grupos funcionais em sua molécula, tais como carboxila, sulfonamida, éter e amina, que são passíveis de realizarem inúmeras interações intermoleculares e formarem sítios supramoleculares robustos com outras moléculas neutras, fazendo com que este IFA seja também considerado bastante versátil e atraente para a formação de cocrystalis.

Por ser um fármaco de baixa solubilidade e permeabilidade (classe IV do SCB), a FSM tem sido alvo de várias abordagens que visam a melhoria de suas características biofarmacêuticas (ÖZDEMİR; ORDU, 1998; RADWAN *et al.*, 2017; SHIN; KIM, 2003). Nesse sentido, a estratégia de formação de sais e cocrystalis foi bastante empregada na última década, com inúmeras estruturas cristalinas reportadas (BANIK *et al.*, 2016; GOUD *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2019; KHANDAVILLI *et al.*, 2014). Ainda que alguns desses compostos tenha proporcionado uma melhoria na solubilidade do IFA, o aumento simultâneo da solubilidade e da permeabilidade ainda não foi alcançado por nenhuma forma sólida até o momento. Diante disso, duas novas modificações cristalinas foram planejadas e preparadas, utilizando coformadores de alta solubilidade e permeabilidade (ambos classe I do SCB), e suas propriedades no estado sólido foram avaliadas. A análise supramolecular e do empacotamento cristalino do sal FSM-IMI e do cocrystal FSM-5FC-H₂O foi feita visando correlacionar as características estruturais destes compostos com as suas propriedades biofarmacêuticas, dentre elas, a solubilidade, a dissolução intrínseca e a permeabilidade.

5.2.1 Análise conformacional e das estruturas cristalinas

Os polimorfos da FSM (formas I, II e III) se caracterizam por apresentarem empacotamentos cristalinos altamente eficientes (de baixa energia) e densos (densidades superiores a $1,6 \text{ g cm}^{-3}$), exercendo um papel decisivo na baixa solubilidade do fármaco (GRANERO *et al.*, 2012). Associado a isso, a FSM também apresenta uma baixa permeabilidade e um transporte bastante assimétrico durante sua absorção, sendo altamente secretada no intestino (PADE; STAVCHANSKY, 1997). Esses fatores contribuem para que o fármaco tenha uma baixa e variável biodisponibilidade oral (37–51%) (MICHAEL *et al.*, 1974). Dessa forma, optou-se por cocristalizar a FSM com coformadores de alta solubilidade e permeabilidade (IMI e 5FC) (SOUZA *et al.*, 2018; VERMA *et al.*, 2013) na tentativa de melhorar o perfil biofarmacêutico do fármaco. Conseqüentemente, a baixa biodisponibilidade oral da FSM também poderia ser aumentada, seguindo essa abordagem.

Na Tabela 21 estão listados os dados cristalográficos e os detalhes dos refinamentos das duas novas formas sólidas da FSM. Nas duas próximas seções (5.2.1.1 e 5.2.1.2) estão descritas as principais características estruturais de cada modificação cristalina. Do ponto de vista estrutural, nota-se que a livre rotação dos substituintes do anel aromático da FSM faz com que a molécula possa adotar diferentes conformações no estado sólido. A conformação molecular da FSM pode ser descrita pelos seguintes ângulos de torção: τ_1 : C2–C1–N1–C12, τ_2 : N2–S1–C9–C10 e τ_3 : O3–C6–C7–C12, conforme mostrado na Figura 20a e na Tabela 22. No sal FSM-IMI, por exemplo, o ânion de FSM possui uma conformação (τ_1 : $-173,4(2)^\circ$ e τ_2 : $-65,6(2)^\circ$) que é compatível com a conformação molecular do polimorfo II (τ_1 : $-166,4(3)^\circ$ e τ_2 : $-79,9(3)^\circ$) da FSM. Tal conformação do ânion FSM^- no sal está relacionada, em parte, com o fato dos planos dos anéis benzeno e furano estarem quase perpendicularmente orientados entre si ($\sim 79,61^\circ$). Por outro lado, na estrutura cristalina do cocristal FSM-5FC- H_2O , a molécula de FSM assume uma conformação levemente diferente, com os ângulos de torção τ_1 e τ_2 assumindo os valores de $96,3(4)^\circ$ e $60,3(4)^\circ$, respectivamente. A sobreposição das conformações moleculares da FSM, realizada a partir dos anéis aromáticos das moléculas, é mostrada na Figura 20b. É importante mencionar que as distintas conformações das moléculas de FSM nas estruturas cristalinas do sal e do cocristal faz com que os empacotamentos cristalinos resultantes destes compostos sejam bem diferentes entre si.

Tabela 21 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos do sal e do cocrystal da furosemida.

Identificação do cristal	FSM-IMI	FSM-5FC-H ₂ O
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₅ ClN ₄ O ₅ S	C ₁₆ H ₁₇ ClFN ₅ O ₇ S
Peso molecular	398,82	477,85
Temperatura (K)	298(2)	298(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P $\bar{1}$
a (Å)	8,7312(4)	5,0768(3)
b (Å)	21,498(1)	10,183(6)
c (Å)	9,2111(5)	19,936(1)
α (°)	90	97,169(5)
β (°)	94,768(4)	92,777(5)
γ (°)	90	96,450(5)
Volume (Å ³)	1723,0(1)	1014,0(1)
Z / Z'	4 / 1	2 / 1
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,537	1,565
μ (mm ⁻¹)	0,379	0,351
Reflexões coletadas	11205	12862
Reflexões independentes	3867	4446
R ₁ [I \geq 2 σ (I)]	0,0413	0,0640
wR ₂ [all data]	0,1098	0,1490
S	1,040	1,031

Figura 20 - (a) Estrutura molecular da furosemida mostrando os números dos átomos e os principais ângulos de torção da molécula. (b) Sobreposição das conformações moleculares da furosemida a partir dos compostos: polimorfo II (cinza), sal FSM-IMI (amarelo) e cocrystal FSM-5FC-H₂O (verde).

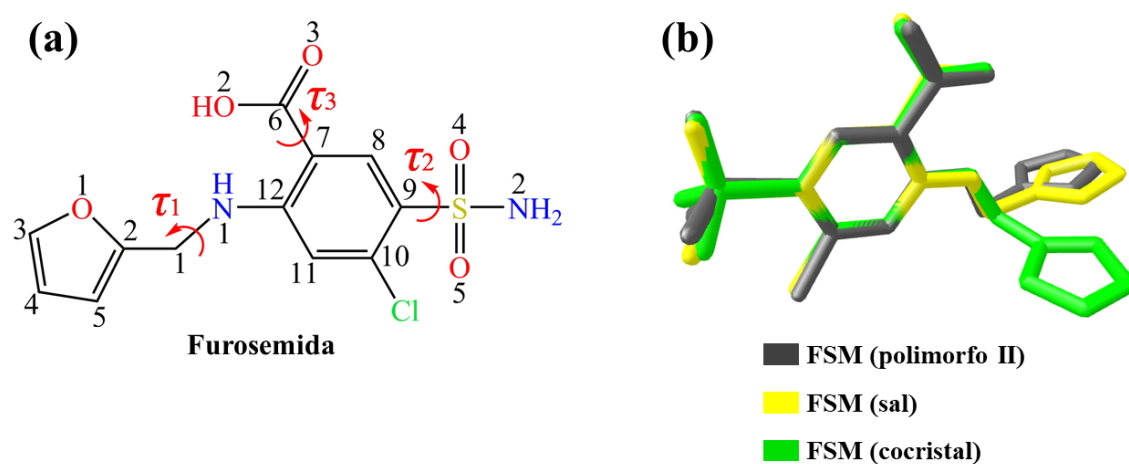


Tabela 22 - Ângulos de torção τ_1 , τ_2 e τ_3 das moléculas de FSM.

Ângulo de torção	Composto	Valores
	FSM (polimorfo II)	
τ_1	C2–C1–N1–C12	-166,4(3)
τ_2	N2–S1–C9–C10	-79,9(3)
τ_3	O3–C6–C7–C12	-4,4(5)
	FSM-IMI (sal)	
τ_1	C2–C1–N1–C12	-173,4(2)
τ_2	N2–S1–C9–C10	-65,6(2)
τ_3	O3–C6–C7–C12	13,4(3)
	FSM-5FC-H₂O (cocrystal)	
τ_1	C2–C1–N1–C12	96,3(4)
τ_2	N2–S1–C9–C10	60,3(4)
τ_3	O3–C6–C7–C12	-2,6(5)

5.2.1.1 Sal imidazolínio de furosemida

O sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) cristalizou-se no grupo espacial monoclinico $P2_1/c$ e a sua unidade assimétrica (Figura 21) é constituída por uma molécula de FSM desprotonada (anion FSM⁻) e um cátion imidazolínio (IMI⁺), formando um par iônico na proporção estequiométrica de 1:1 (Figuras 21 e 23a). Conforme evidenciado pelo mapa de diferença de densidade eletrônica (Figura 22) e pela análise do comprimento das ligações C–O da carboxila da FSM (o ΔD_{C-O} das ligações são menores que 0,03 Å, condizente com a formação de um carboxilato) (CHILDS *et al.*, 2007), a formação do sal FSM-IMI ocorre a partir da transferência do proton do grupo carboxila (COOH) da FSM para um dos átomos de nitrogênio do anel imidazol. Os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio podem ser vistos na Tabela 23.

Figura 21 - Unidade assimétrica do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

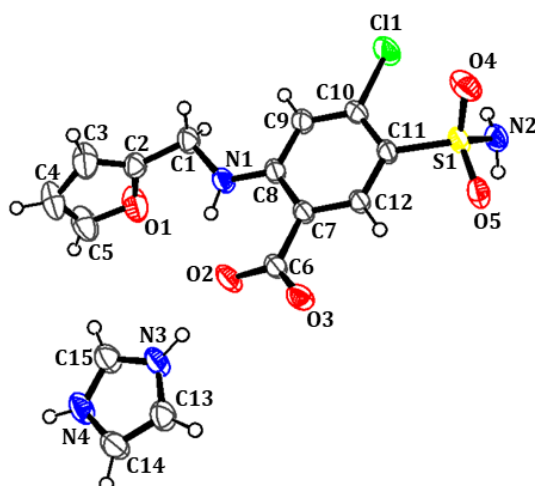


Tabela 23 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI).

Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
N3 ⁺ -H3A...O2 ⁻	2,609(2)	166	x, y, z
N2-H2B...O3 ⁻	2,833(2)	172	$-x+1, -y+1, -z$
N4-H4A...O5	2,839(2)	168	$x-1, +y, +z+1$
C5-H5...O3 ⁻	3,366(3)	166	$x, +y, +z+1$
C13-H13...O3 ⁻	3,311(3)	175	$-x, -y+1, -z$
C14-H14...O5	3,409(3)	161	$-x, -y+1, -z$

Figura 22 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion imidazol (IMI⁺) e do ânion furosemida (FSM⁻) provenientes do sal FSM-IMI. É possível notar a protonação do anel imidazólico no átomo de nitrogênio N3. A escala numérica do mapa é dada por e.Å⁻³.

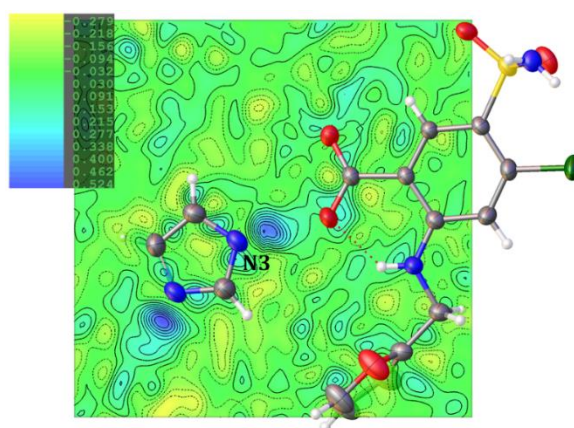
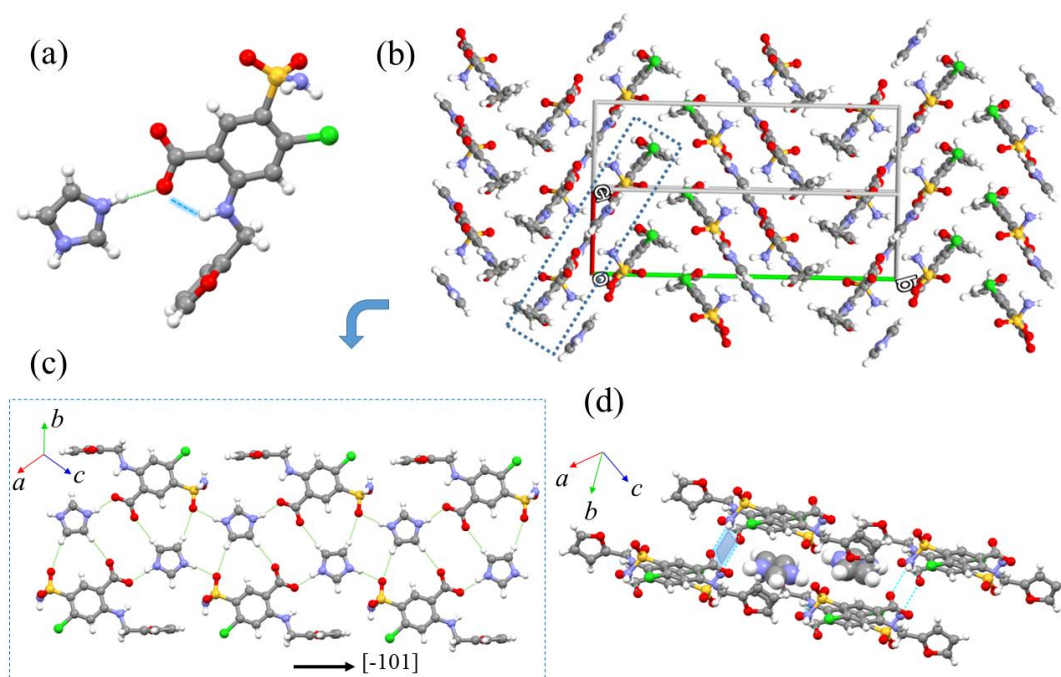


Figura 23 - (a) Par iônico do sal FSM-IMI que representa a sua unidade assimétrica. (b) Empacotamento cristalino do sal FSM-IMI no plano cristalográfico bc . (c) Estrutura tipo folha mostrando a participação do cátion IMI⁺ na formação das cadeia 1D entre os ânions FSM⁻ ao longo da direção $[-101]$. (d) Visão parcial do empacotamento das folhas cuja rede de ligações de hidrogênio gera vazios discretos na estrutura preenchidos por cátions IMI⁺.



Analisando o empacotamento cristalino, nota-se que o sal FSM-IMI apresenta uma estrutura cristalina tipo folha no plano cristalográfico *bc*, no qual os planos moleculares estão dispostos alternadamente em zigue-zague, como evidenciado na Figura 23b. Os ânions FSM⁻ estão conectados aos cátions IMI⁺ no cristal por meio de ligações de hidrogênio clássicas do tipo N–H...O (N3⁺–H3A...O2⁻, 2,609(2) Å, 166° e N4–H4A...O5, 2,839(2) Å, 168°), o que resulta na formação de cadeias 1D que se propagam ao longo da direção cristalográfica [-101] (Figura 23c). Na estrutura cristalina, duas cadeias 1D que se propagam na mesma direção, porém em sentidos opostos (antiparalelas entre si) são unidas umas as outras *via* ligações de hidrogênio não clássicas do tipo C–H...O (C13–H13...O3, 3,311(3) Å, 175° e C14–H14...O5, 3,409(3) Å, 161°) a partir de cátions IMI⁺ e ânions FSM⁻ de cadeias adjacentes, dando origem a uma folha (Figura 23c). As folhas formadas também interagem entre si por meio de duas ligações de hidrogênio (N2–H2B...O3⁻, 2,833(2) Å; 172° e C5–H5...O3⁻, 3,366(3) Å, 166°) que envolvem os grupos sulfonamida (SO₂NH₂), carboxilato (COO⁻) e anel furano da FSM. Como resultado dessas interações intermoleculares, duas folhas independentes assumem orientações quase ortogonais entre si, permitindo a formação de um padrão de interações tipo anel com código $R_4^4(8)$ entre os ânions FSM⁻ e gerando vazios (*voids*) discretos na estrutura cristalina que são ocupados justamente pelos cátions IMI⁺. Os cátions IMI⁺ são ainda estabilizados por interações do tipo $\pi\cdots\pi$ (com uma distância entre os centroides de 3,743(3) Å) entre os anéis imidazólico do IMI⁺ e aromático do FSM⁻ (Figura 23d).

5.2.1.2 Cocrystal mono-hidratado de furosemida e 5-fluorocitosina

O cocrystal FSM-5FC-H₂O cristalizou no grupo espacial triclínico $P\bar{1}$ e sua unidade assimétrica (Figura 24) é formada pelas moléculas do fármaco FSM e do pró-fármaco 5FC, ambas na forma neutra, além de uma molécula de água. Dessa forma, por apresentar uma proporção estequiométrica de 1:1:1 das moléculas na unidade assimétrica, o composto FSM-5FC-H₂O é definido como um cocrystal mono-hidratado. Conforme esperado, não houve a transferência de prótons entre as moléculas de FSM e 5FC e a formação do cocrystal foi confirmada por meio da observação de um máximo de densidade eletrônica próximo a um dos átomos de oxigênio do grupo carboxila da FSM e pela ausência de densidade eletrônica significativa nos átomos de nitrogênio (sítios protonáveis) da 5FC (Figura 25). Além disso, a análise do comprimento das ligações C–O da carboxila da FSM mostrou que o ΔD_{C-O} das ligações são superiores a 0,08 Å, indicando

que estas ligações não são simétricas no cocrystal, comportamento condizente e esperado para ácidos carboxílicos (CHILDS *et al.*, 2007). Na Tabela 24 estão descritos os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio do cocrystal FSM-5FC-H₂O.

Figura 24 - Unidade assimétrica do cocrystal mono-hidratado de furosemida e 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

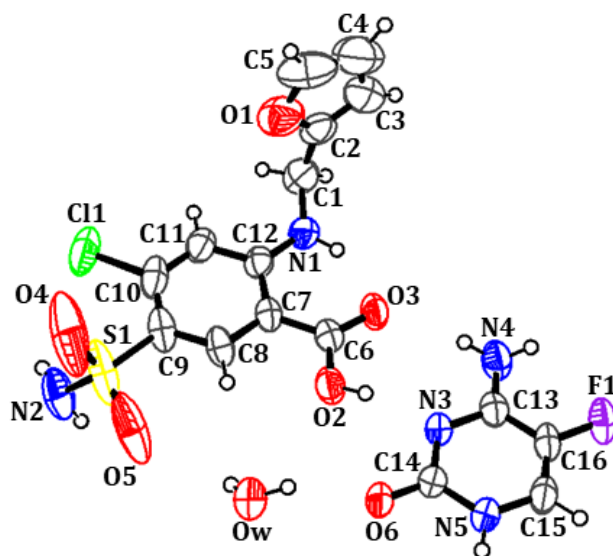


Tabela 24 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do cocrystal de furosemida e 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O).

Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
O2-H2...N3	2,627(3)	166	<i>x,y,z</i>
N4-H4A...O3	3,001(3)	166	<i>x,y,z</i>
O _w -H _w A...O6	2,789(4)	150	<i>x,y,z</i>
O _w -H _w B...O4	3,127(4)	131	<i>x,y,z</i>
N4-H4B...O4	2,963(4)	151	<i>x-I,+y-I,+z</i>
N2-H2A...O _w	2,965(5)	172	<i>x+I,+y,+z</i>
N5-H5A...O6	2,768(4)	165	<i>-x,-y+I,-z</i>
C5-H5...O1	3,540(8)	122	<i>-x+2,-y+I,-z+I</i>

Como resultado das múltiplas interações intermoleculares, um empacotamento cristalino do tipo coluna foi observado para o cocrystal FSM-5FC-H₂O, como representado nas Figuras 26 e 27. Na estrutura cristalina, as moléculas de FSM e 5FC estão associadas por meio de um padrão de interações tipo anel com código $R_2^2(8)$ (Figura 26a). Este anel é formado entre os átomos de oxigênio da carboxila da FSM e os de nitrogênio da amina e do anel pirimidínico da 5FC, sendo estabilizado pelas ligações de

hidrogênio O2–H2···N3 (2,627(3) Å, 166°) e N4–H4A···O3 (3,001(3) Å, 166°). Nesse contexto, a molécula de água exerce uma papel crucial, pois atua também conectando as moléculas de FSM e 5FC através das interações Ow–HwA···O6 (2,789(4) Å, 150°) e Ow–HwB···O4 (3,127 Å, 131°), de modo que a unidade do cocrystal possa ser formada (Figura 26a). As unidades de cocrystal encontram-se dispostas na forma de cadeias 1D que se propagam, paralelamente ao eixo cristalográfico *b*, por meio das interações N4–H4B···O4 (2,963(4) Å, 151°) entre os grupos amina da 5FC e sulfonamida da FSM, como mostrado na Figura 26c. É possível notar ainda que duas cadeias 1D estão centrossimetricamente relacionadas na estrutura cristalina por meio de interações do tipo C–H···O (C5–H5···O1, 3,540(8) Å, 122°), entre os fragmentos furano de moléculas de FSM de cadeias vizinhas. Como consequência, a montagem 3D na forma de bicamadas é gerada (Figura 26b), com a incorporação de moléculas de água pela unidade do cocrystal, que acabaram preenchendo os vazios existentes entre as bicamadas (Figura 27b). Além disso, cadeias individuais entre as moléculas de FSM e 5FC são formadas ao longo do eixo cristalográfico *b*, conforme mostrado na Figura 27c. Por fim, as bicamadas presentes no empacotamento cristalino do cocrystal são ainda conectadas umas as outras por meio de homosíntons formados entre os grupos amida das moléculas de 5FC (N5–H5A···O6, 2,768(4) Å, 165°), resultando na montagem 3D final do cocrystal FSM-5FC-H₂O, representado na Figura 26b.

Figura 25 - Mapas de diferença de densidade eletrônica, sob duas diferentes perspectivas, das moléculas de furosemida (FSM) e 5-fluorocitosina (5FC) provenientes do cocrystal FSM-5FC-H₂O, mostrando a presença de um átomo de hidrogênio ligado ao átomo de oxigênio O2 do grupo carboxila da FSM. É possível notar também que o átomo de nitrogênio N3 da 5FC não está protonado. A escala numérica do mapa é dada por e.Å⁻³.

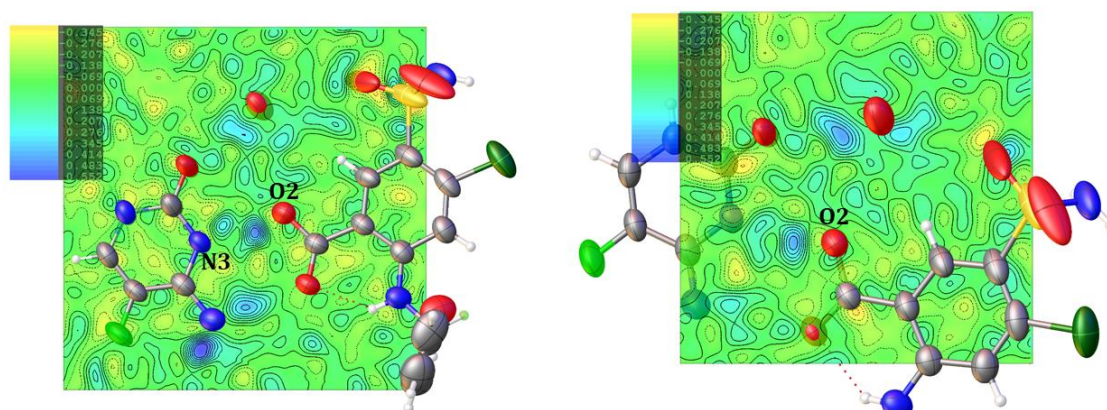


Figura 26 - (a) Unidade do cocrystal FSM-5FC-H₂O que representa a sua unidade assimétrica. (b) Empacotamento cristalino do cocrystal FSM-5FC-H₂O no plano cristalográfico *ac* mostrando as camadas e bicamadas formadas ao longo da estrutura. (c) Visão das cadeias 1D que se propagam paralelamente ao eixo cristalográfico *c* e dos padrões de ligações de hidrogênio na estrutura cristalina.

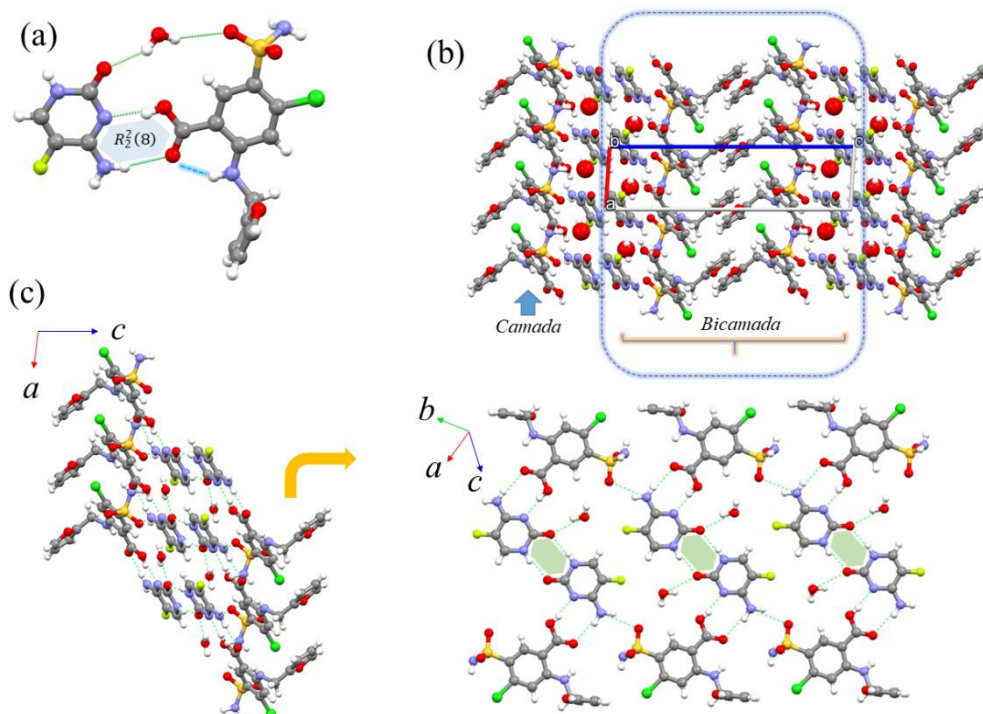
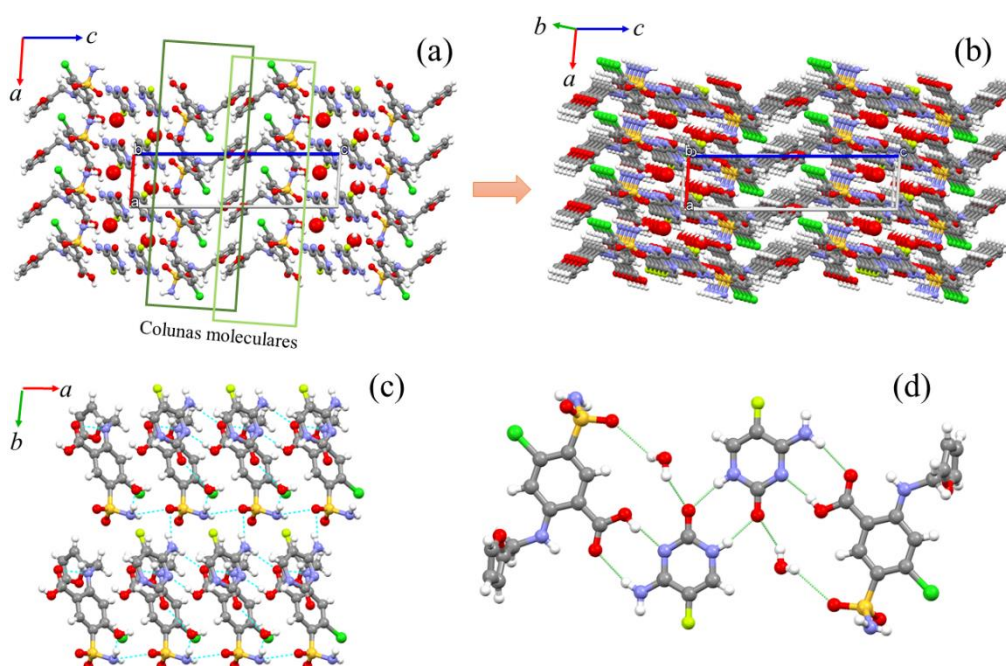


Figura 27 - (a) Visão do empacotamento cristalino do cocrystal FSM-5FC-H₂O no plano cristalográfico *ac*, mostrando a estrutura cristalina tipo coluna. (b) Representação 3D do empacotamento do cocrystal FSM-5FC-H₂O, destacando que os espaços vazios encontram-se preenchidos por moléculas de água. (c) Cadeias individuais formadas entre as moléculas de FSM e 5FC ao longo do eixo cristalográfico *b*. (d) Padrão de ligações de hidrogênio estabelecido entre as unidades do cocrystal.

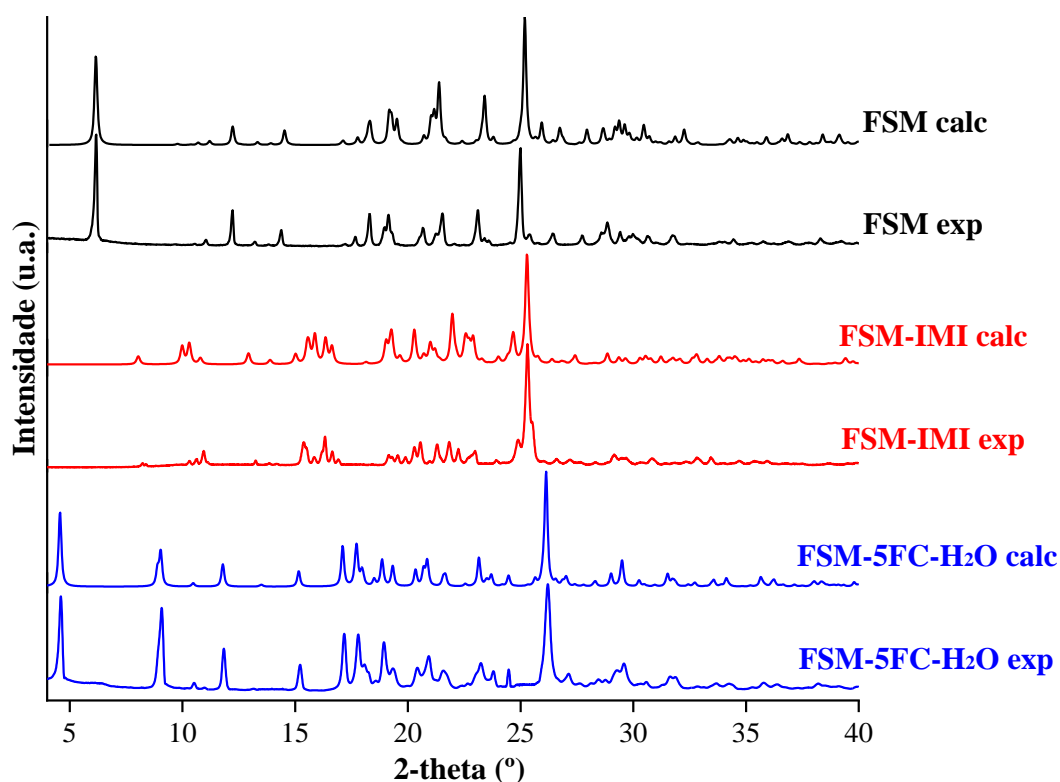


Em relação às similaridades estruturais, tanto o sal quanto o cocrystal de FSM possuem estruturas cristalinas de menor densidade ($1,537 \text{ g cm}^{-3}$ para o sal FSM-IMI e $1,565 \text{ g cm}^{-3}$ para o cocrystal FSM-5FC- H_2O) em comparação com os polimorfos da FSM (todos maiores que $1,622 \text{ g cm}^{-3}$). Tais diferenças podem ser explicadas, em parte, pela presença de ligações de hidrogênio mais curtas e direcionais nos polimorfos de FSM que contribuem para o aumento da eficiência do empacotamento cristalino destes compostos. As estruturas moleculares de ambos os coformadores IMI e 5FC, ricas em grupos funcionais, diversificam por si só a ocorrência de interações intermoleculares no estado sólido. Em contrapartida, a inclusão dessas novas espécies nas novas estruturas cristalinas gerou vazios discretos, o que também contribuiu para a diminuição da densidade dos cristais. No sal FSM-IMI, as moléculas estão arranjadas em folhas, de modo que os espaços vazios entre essas folhas possam ser preenchidos com os cátions IMI^+ , sem que eles estejam necessariamente ligados entre si (Figura 23d). No cocrystal FSM-5FC- H_2O , todos os espaços vazios presentes na estrutura cristalina encontram-se preenchidos por moléculas de água (Figura 27b). Todas essas características estruturais são consistentes com o aprimoramento das propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas da FSM.

5.2.2 Análise por difração de raios X por policristais

Os difratogramas experimentais referentes às novas modificações cristalinas da FSM foram comparados com os padrões de DRXP simulados (Figura 28), calculados a partir das respectivas estruturas cristalinas determinadas por DRXM. Sabendo que o sal e o cocrystal de FSM foram obtidos por meio de reações estequiométricas do IFA com os coformadores IMI e 5FC, picos de Bragg de outras fases cristalinas poderiam ser observados nos difratogramas experimentais das formas sólidas. Isso teria acontecido caso houvesse uma cristalização concomitante da FSM e/ou dos coformadores durante a formação do sal/cocrystal, por exemplo. Entretanto, em todos os difratogramas experimentais, foi observada a formação de uma única fase cristalina, uma vez que não foram verificados a presença de picos adicionais e inesperados, em toda faixa angular 2θ avaliada, que pudessem ser atribuídos à presença de uma nova fase cristalina na amostra. Portanto, devido à boa concordância encontrada entre os difratogramas experimentais e calculados, é possível afirmar que os monocristais escolhidos para o experimento de DRXM eram representativos das amostras sintetizadas. Ademais, não foi verificada a presença dos reagentes de partida ou de qualquer outra impureza cristalina na amostra final, confirmando a elevada pureza dos cristais formados.

Figura 28 - Difrátogramas calculados (calc) e experimentais (exp) do sal imidazólio de furosemida (FSM-IMI) e do cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O). Os difratogramas da furosemida (FSM) foram acrescentados para critérios de comparação.



5.2.3 Espectros vibracionais no infravermelho

A espectroscopia vibracional no infravermelho foi utilizada para caracterizar as novas modificações cristalinas da furosemida. Com a formação do novo sal e cocristal, esperava-se observar, nos espectros infravermelho, bandas referentes aos modos vibracionais da FSM e dos coformadores imidazol e 5-fluorocitosina. Além disso, algumas dessas bandas deveriam sofrer deslocamentos nos espectros em virtude de interações intermoleculares e formação de sítions supramoleculares entre a FSM e os coformadores. Para comparação, o espectro da FSM também foi incluído nas análises, sendo apresentado junto com os espectros das novas formas sólidas (Figura 29). A atribuição das principais bandas observadas nos espectros encontra-se na Tabela 25 e foi realizada com base na análise das estruturas cristalinas descritas na seção 5.2.1 e a partir de dados espectroscópicos reportados para outras formas sólidas da FSM (BABU *et al.*, 2010; GOUD *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2019).

Figura 29 - Espectros na região do infravermelho do fármaco furosemida (FSM), do sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e do co cristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O).

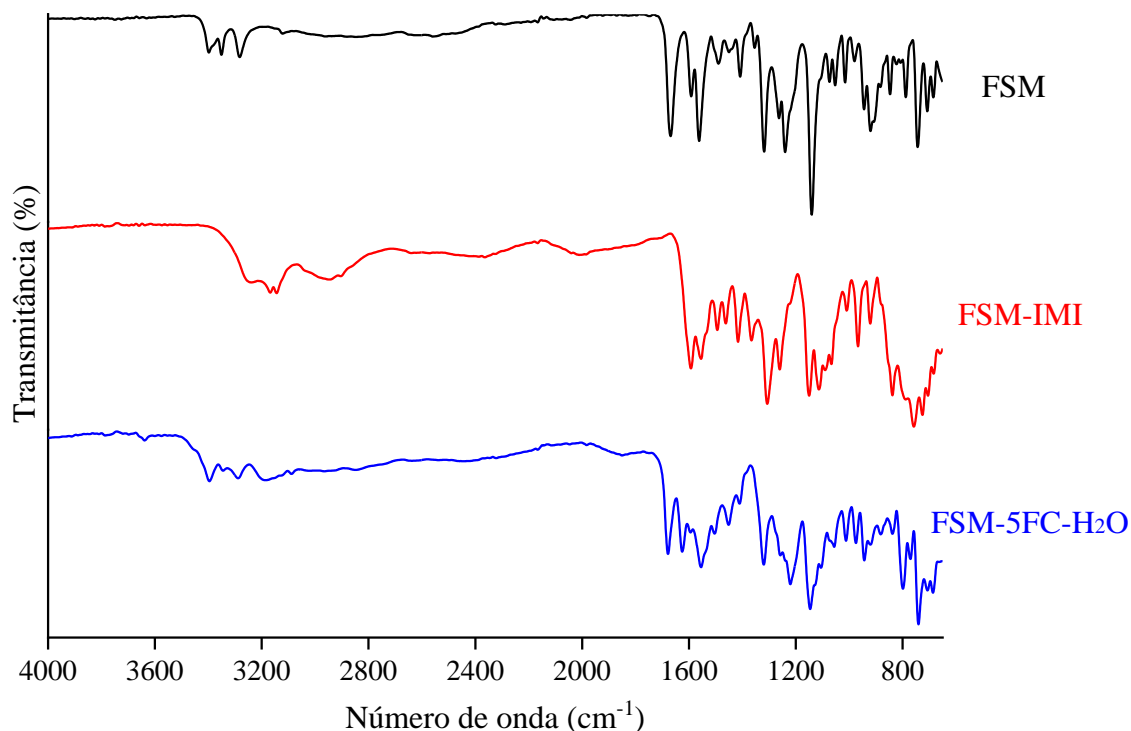


Tabela 25 - Atribuições das principais bandas (em cm⁻¹) observadas nos espectros infravermelho do fármaco FSM e das novas modificações cristalinas.

FSM	FSM-IMI	FSM-5FC-H ₂ O	Atribuições
3401	3242	3396	$\nu_a(\text{NH}_2)$ sulfonamida
3351	3166	3344	$\nu_s(\text{NH}_2)$ sulfonamida
3281	3146	3287	$\nu(\text{N-H})$ amina secundária
1670	-	1628	$\nu(\text{C=O})$ carboxila
-	-	1680	$\nu(\text{C=O})$ amida
-	1557	-	$\nu_a(\text{COO}^-)$ carboxilato
-	1417	-	$\nu_s(\text{COO}^-)$ carboxilato
1318	1306	1319	$\nu_a(\text{SO}_2)$ sulfonamida
-	-	1212	$\nu(\text{C-F})$ anel pirimidínico
1139	1147	1144	$\nu_s(\text{SO}_2)$ sulfonamida

ν = estiramento da ligação, a = modo antissimétrico, s = modo simétrico.

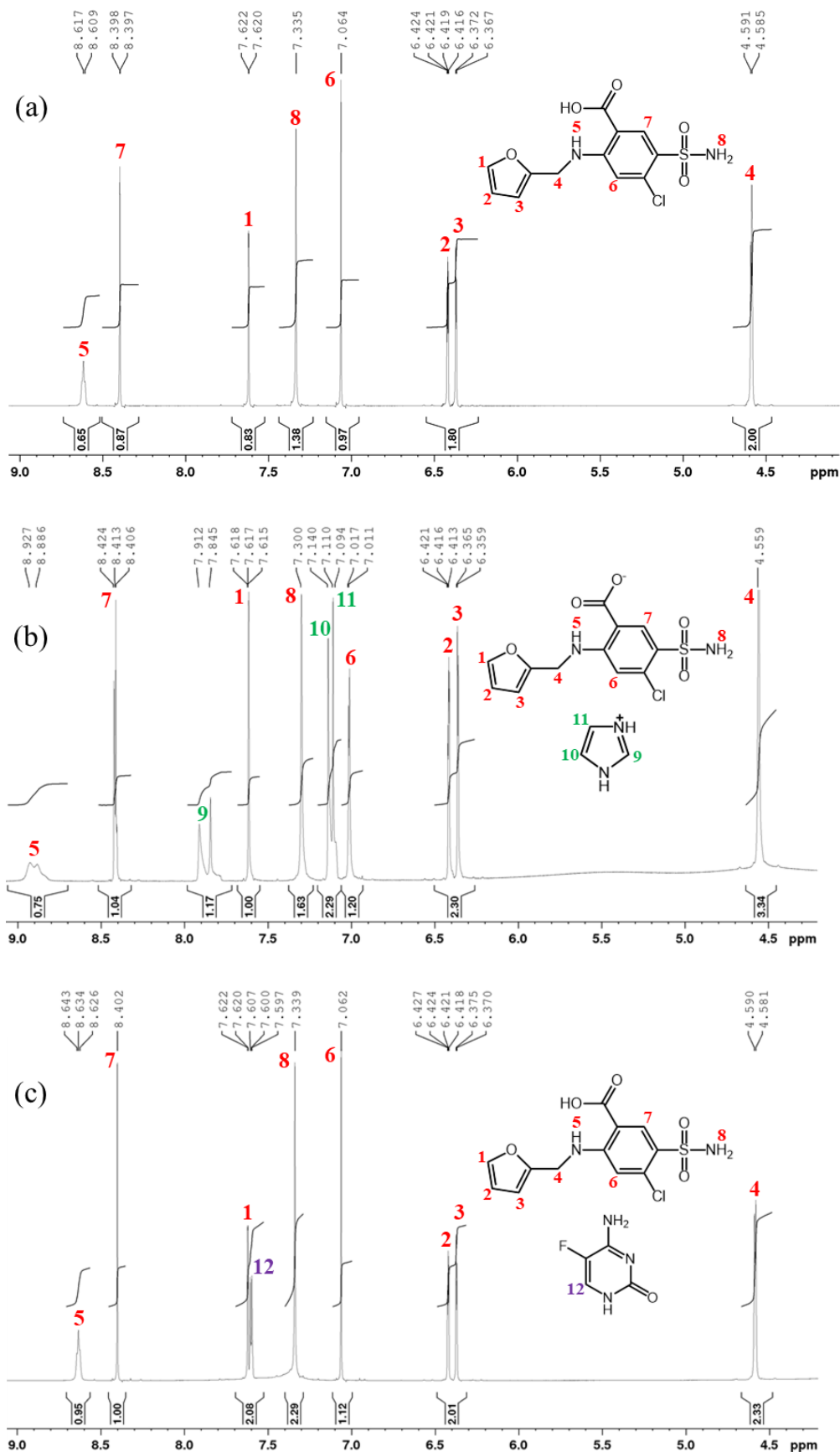
A FSM possui bandas de absorção características no infravermelho, como aquelas que aparecem nos espectros em 3401 cm⁻¹ e 3351 cm⁻¹ (atribuídas aos estiramentos da ligação N-H do grupo NH₂), 3281 cm⁻¹ (atribuída ao estiramento da ligação N-H do grupo NH), 1670 cm⁻¹ (atribuída ao estiramento da ligação C=O do grupo COOH) e 1318 cm⁻¹ e 1139 cm⁻¹ (atribuídas aos estiramentos da ligação S=O do grupo SO₂NH₂). Conforme esperado, após a formação do sal FSM-IMI, a banda em 1670 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação C=O do grupo carboxílico da FSM desaparece, dando origem

a duas bandas no espectro do sal imidazolínio de FSM. Essas novas bandas, que apareceram em 1557 cm^{-1} e 1417 cm^{-1} , foram atribuídas aos modos vibracionais antissimétrico e simétrico do grupo carboxilato (COO^-), confirmando a formação do novo sal de FSM. Por outro lado, no espectro infravermelho do cocrystal FSM-5FC- H_2O , observa-se o aparecimento de novas bandas em 1680 cm^{-1} e 1212 cm^{-1} , por exemplo, que foram atribuídas aos estiramentos das ligações $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}-\text{F}$ referentes ao esqueleto molecular da 5FC. Essas duas últimas bandas, que são características da 5FC, não foram observadas no espectro infravermelho da FSM, indicando a formação do cocrystal. Além disso, a banda referente ao grupo carboxila da FSM (1670 cm^{-1}) encontra-se deslocada para menores números de onda no espectro do cocrystal (1628 cm^{-1}), confirmando que esse grupo funcional interage com a molécula do coformador 5FC, como demonstrado na análise das estruturas cristalinas.

5.2.4 Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os experimentos de ^1H RMN foram realizados para confirmar a proporção estequiométrica (entre IFA e coformador) nas novas formas sólidas de FSM sintetizadas e, adicionalmente, para corroborar a pureza destes novos cristais. As atribuições dos deslocamentos químicos (δ) referentes aos átomos de hidrogênio da FSM, bem como a interpretação dos espectros, foram feitas por comparação com outros espectros de ^1H RMN da FSM e de compostos relacionados disponíveis na literatura (SANGTANI *et al.*, 2017; SPAMER *et al.*, 2002). Como esperado, foi possível observar a presença de sinais referentes às moléculas dos coformadores nos espectros de ^1H RMN do sal FSM-IMI e do cocrystal FSM-5FC- H_2O (Figura 30). Dentre os sinais, estavam presentes aqueles atribuídos aos fragmentos $\text{R}=\text{C}-\text{H}$, presentes nas moléculas de IMI e 5FC, que aparecem em $\sim 7,11\text{ ppm}$ e $\sim 7,60\text{ ppm}$, respectivamente. Esses sinais, característicos dos anéis imidazólico e pirimidínico da 5FC, não foram observados no espectro de ^1H RMN da FSM (Figura 30a). Além disso, os valores das integrais encontrados nos espectros do sal e do cocrystal confirmaram que ambas as estruturas cristalinas contêm uma molécula de FSM e uma molécula do coformador (IMI ou 5FC), satisfazendo a proporção estequiométrica de 1:1, conforme mostrado na descrição cristalográfica de ambos os compostos.

Figura 30 - Espectros de ^1H RMN (600 MHz), obtidos em $\text{DMSO-}d_6$, (a) do fármaco furosemda (FSM), (b) do sal imidazolínio de furosemda (FSM-IMI) e (c) do cocristal monohidratado de furosemda com 5-fluorocitosina (FSM-5FC- H_2O).



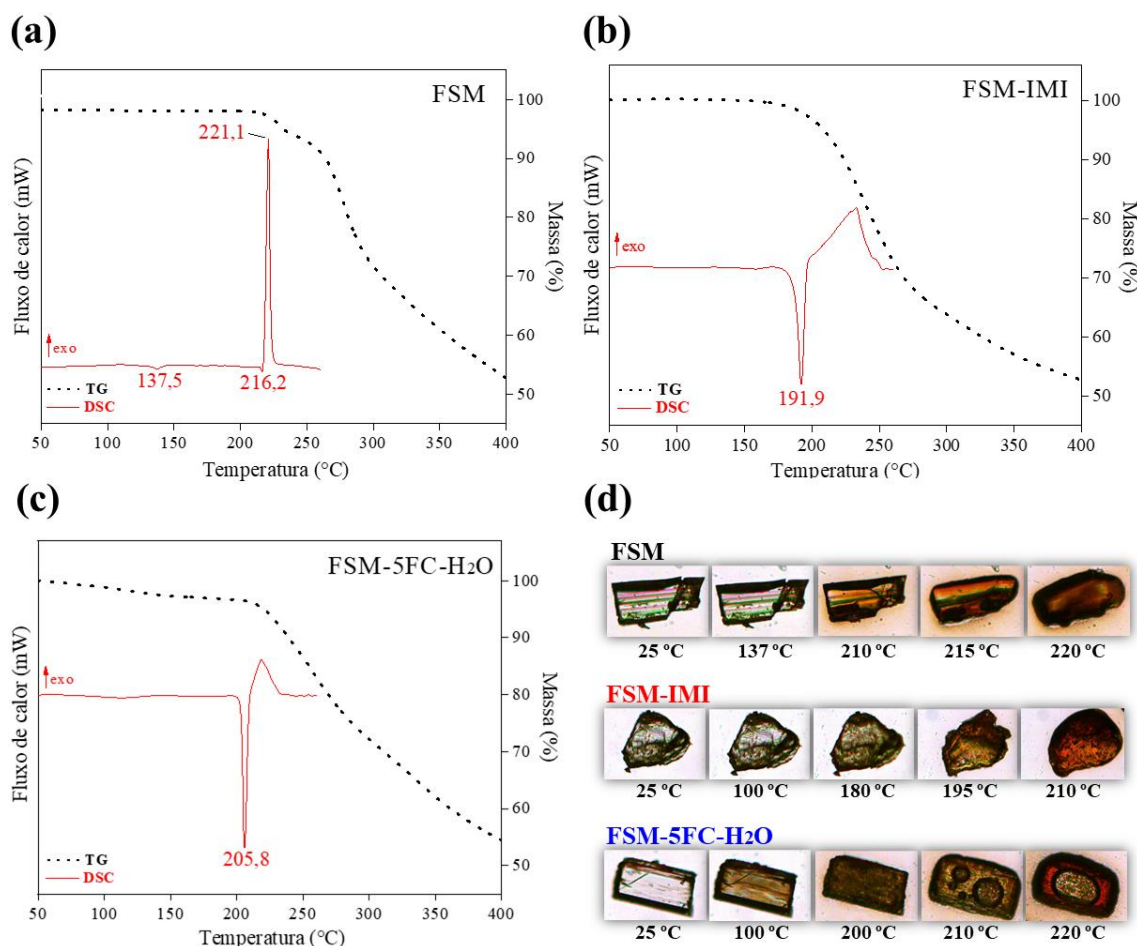
5.2.5 Caracterização térmica

A avaliação do comportamento térmico do sal FSM-IMI e do cocrystal FSM-5FC-H₂O foi realizada por meio das técnicas DSC, TG e TOA, conforme ilustrado na Figura 31. Para fins de comparação, as curvas TG e DSC do fármaco FSM também foram incluídas (Figura 31a) e mostraram que os eventos térmicos que apareceram em ambas as curvas são consistentes com os da forma polimórfica I (BABU *et al.*, 2010). A curva DSC da FSM é caracterizada pela presença de um pico endotérmico discreto em 216,2 °C, seguido de um pico exotérmico acentuado em 221,1 °C ($T_{on-set} = 218,4$ °C, $\Delta H = 126,62$ J g⁻¹), que foram atribuídos à fusão e degradação do fármaco, respectivamente. Esses eventos concordaram com a etapa inicial de degradação da amostra observada na curva TG que revelou que a FSM é termicamente estável até ~218 °C. Acima deste temperatura, uma perda de massa lenta e gradual foi observada na curva TG do fármaco. Além disso, a curva DSC também mostra um pico endotérmico discreto em 137,5 °C ($T_{on-set} = 133,6$ °C, $\Delta H = -3,47$ J g⁻¹), resultante de uma transição de fase sólido-sólido, que transforma o polimorfo I em uma forma estável do IFA em altas temperaturas (MATSUDA *et al.*, 1990). Entretanto, a partir das imagens de TOA (que também correspondem à forma I), não foi possível observar nenhuma mudança morfológica em torno de 137 °C que pudesse ser atribuída à referida transição de fase sólido-sólido da FSM durante o processo de aquecimento do cristal, como evidenciado na Figura 31d.

Em relação ao perfil térmico das novas formas sólidas de FSM, nota-se na curva DSC do sal FSM-IMI um pico endotérmico centrado em 191,9 °C ($T_{on-set} = 188,4$ °C, $\Delta H = -128,48$ J g⁻¹), associado à fusão/degradação da amostra. Este evento térmico concorda com o que foi observado na curva TG, que mostrou que a perda de massa do sal FSM-IMI acontece de forma lenta e gradual, começando em aproximadamente 190 °C. No caso do cocrystal FSM-5FC-H₂O, a curva DSC é caracterizada pela presença de um evento endotérmico inicial, discreto e estendido, entre 70 e 140 °C que corresponde à desidratação da amostra, ou seja, saída de uma molécula de água da rede cristalina. Este evento térmico foi acompanhado por uma perda de massa inicial na curva TG (de cerca de 3,0 %) no intervalo de temperatura compreendido entre 65 e 140 °C, estando de acordo com o valor calculado (3,7 %), que se baseia na saída de uma molécula de água do cristal. Além disso, um segundo pico endotérmico acentuado em 205,8 °C ($T_{on-set} = 203,9$ °C, $\Delta H = -121,43$ J g⁻¹) foi observado na curva DSC do cocrystal FSM-5FC-H₂O. Este evento foi

atribuído ao processo de fusão/degradação da amostra e concorda com a perda de massa gradual que ocorreu na curva TG a partir de ~204 °C.

Figura 31 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos compostos: (a) furoseimida (FSM), (b) sal imidazolínio de furoseimida (FSM-IMI) e (c) cocristal mono-hidratado de furoseimida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O). (d) Imagens obtidas por análise termo-ótica de monocristais dos compostos FSM, FSM-IMI e FSM-5FC-H₂O.



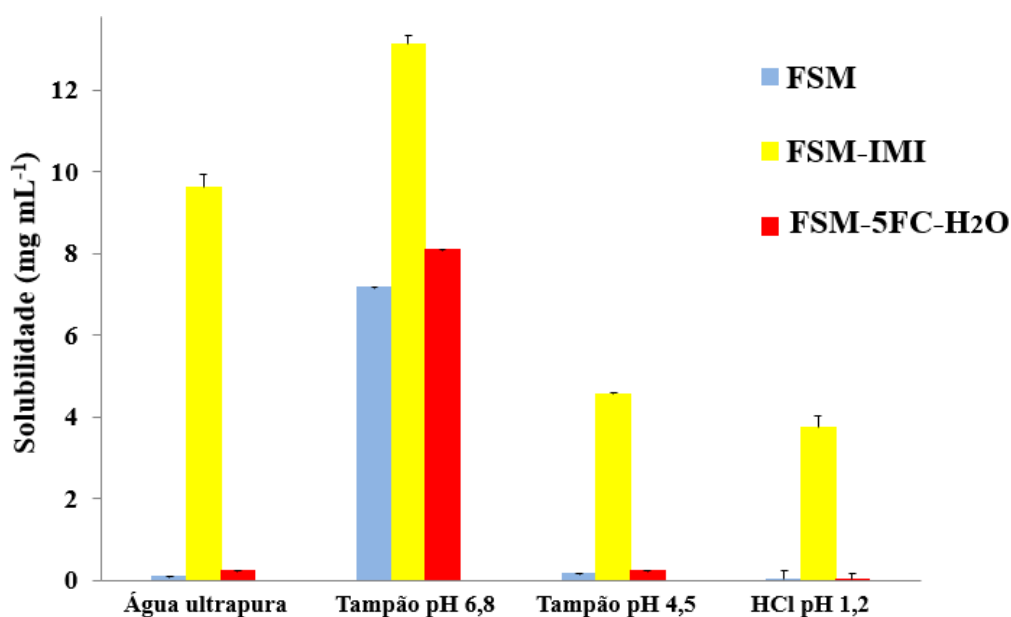
As imagens obtidas por TOA foram utilizadas visando confirmar os eventos térmicos observados nas curvas TG e DSC. Mediante as imagens (Figura 31d), foi possível visualizar, de forma inequívoca, que os cristais referentes aos compostos FSM, FSM-IMI e FSM-5FC-H₂O começam a fundir e, simultaneamente, vão se tornando opacos em torno de 215 °C, 195 °C e 210 °C, respectivamente, confirmando que as amostras fundem/degradam nas temperaturas citadas. É possível observar também que o cristal referente ao composto FSM-5FC-H₂O muda de cor em aproximadamente 100 °C devido ao processo de desidratação da amostra. Por fim, vale ressaltar que as estruturas cristalinas do sal FSM-IMI e do cocristal FSM-5FC-H₂O possuem empacotamentos menos densos comparados ao dos polimorfos da FSM, fazendo com que estas novas

modificações cristalinas apresentem uma estabilidade térmica menor que a do IFA puro. Portanto, o comportamento térmico dos novos compostos sintetizados concorda com a descrição cristalográfica das novas formas sólidas de FSM.

5.2.6 Determinação da solubilidade e dissolução intrínseca

Do ponto de vista farmacêutico, a solubilidade e a dissolução intrínseca são consideradas propriedades muito importantes de um fármaco, uma vez que ambas exercem um imenso impacto na biodisponibilidade e, portanto, no desempenho terapêutico do fármaco (WILLIAMS *et al.*, 2013). Nesse contexto, a estratégia de formação de cristais multicomponentes a partir de IFAs com baixa solubilidade e velocidade de dissolução intrínseca (VDI), tem sido amplamente utilizada, já que está entre as abordagens mais eficientes para modular e aprimorar essas propriedades. Por ser um ácido fraco e, por isso, susceptível à ionização, a molécula de FSM ($pK_a = 3,9$) possui uma solubilidade dependente do pH do meio em que está dissolvida. Dessa forma, os testes de solubilidade envolvendo a FSM e suas novas modificações cristalinas foram realizados em água ultrapura, bem como em tampões que simulam as condições fisiológicas (HCl 0,1 M pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8). Os dados de solubilidade nos diferentes meios de dissolução utilizados estão exemplificados na Figura 32.

Figura 32 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução das formas furosemida (FSM), sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e cocristal monohidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O).



Inicialmente, os valores de solubilidade determinados para o fármaco FSM encontraram-se em excelente acordo com os valores descritos na literatura (GRANERO *et al.*, 2012). De fato, a solubilidade do IFA provou ser dependente do pH do meio de dissolução, atingindo o valor mais alto em tampão fosfato pH 6,8 ($7,19 \pm 0,21 \text{ mg mL}^{-1}$). Em relação ao sal FSM-IMI, esta forma promoveu um aumento considerável na solubilidade da FSM, em todos os meios de dissolução avaliados (Figura 32 e Tabela 26). Em água ultrapura, por exemplo, a solubilidade do sal FSM-IMI foi $9,61 \pm 0,31 \text{ mg mL}^{-1}$, ou seja, cerca de 120 vezes mais solúvel que a FSM pura ($0,081 \pm 0,006 \text{ mg mL}^{-1}$). Para o cocrystal FSM-5FC-H₂O, a solubilidade é ligeiramente maior em relação a FSM pura em todos os meios de dissolução considerados, com aumentos discretos na solubilidade do IFA (de 1,1 a 2,7 vezes). Aparentemente, esses resultados podem ser atribuídos à natureza não iônica das interações intermoleculares presentes nos compostos FSM e FSM-5FC-H₂O.

Nos ensaios de dissolução intrínseca, realizado no meio tampão fosfato pH 6,8, as velocidades de dissolução intrínseca (VDIs), dada pelas inclinações das retas, do fármaco FSM puderam ser determinadas e os valores encontram-se listados na Tabela 26. Conforme esperado, tanto o sal quanto o cocrystal apresentaram VDI superiores em relação à FSM pura (Figura 33). O sal FSM-IMI ($1,14 \pm 0,03 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) e o cocrystal FSM-5FC-H₂O ($0,56 \pm 0,02 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) possuem VDI de cerca de 2,6 a 1,3 vezes maiores, respectivamente, em comparação com a FSM ($0,44 \pm 0,01 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$). Esse comportamento é condizente com os empacotamentos cristalinos menos eficientes e menos densos das modificações cristalinas FSM-IMI e FSM-5FC-H₂O que, quando expostos em meios aquoso, tornam a ruptura das estruturas cristalinas por moléculas de água mais facilitada durante o processo de dissolução. Dessa forma, os compostos estudados possuem VDI que seguem a seguinte ordem: FSM-IMI > FSM-5FC-H₂O > FSM. Em resumo, as melhorias de solubilidade e velocidade de dissolução intrínseca das novas formas sólidas de FSM podem ser atribuídas, em parte, à agregação no estado sólido do fármaco com coformadores mais polares e solúveis (IMI e 5FC), o que aumenta a diversidade e ocorrência de interações e conformações supramoleculares das espécies químicas no cristal, facilitando ambos os processos de solubilidade e dissolução intrínseca.

Figura 33 - Perfil de dissolução intrínseca dos compostos furosemida (FSM), sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O) em tampão fosfato pH 6,8.

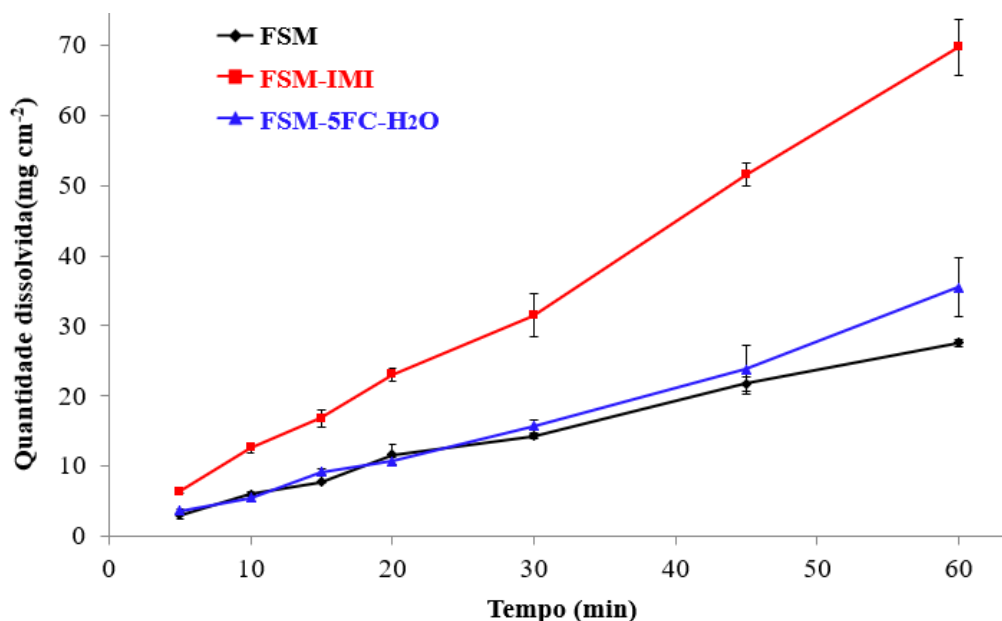


Tabela 26 - Dados biofarmacêuticos dos compostos furosemida (FSM), sal imidazolínio de furosemida (FSM-IMI) e cocristal mono-hidratado de furosemida com 5-fluorocitosina (FSM-5FC-H₂O).

Composto	Solubilidade média em água (mg mL ⁻¹)	VDI em tampão fosfato pH 6,8 (mg cm ⁻² min ⁻¹)	P_{app} ($\times 10^{-6}$ cm s ⁻¹)		
			A-B ^b	B-A ^c	R ^d
FSM ^a	0,081	0,44	0,107	13,03	121
FSM-IMI	9,61 (119×)	1,14 (2,6×)	0,304 (2,8×)	13,56	44
FSM-5FC-H ₂ O	0,22 (2,7×)	0,56 (1,3×)	0,224 (2,1×)	15,32	68

Os números entre parênteses expressam a magnitude de aumento.

^a dados correspondentes ao polimorfo I da furosemida.

^b Transporte apical-basolateral.

^c Transporte basolateral-apical.

^d O parâmetro R representa a taxa de efluxo calculada a partir da razão: P_{app} (B-A) / P_{app} (A-B).

5.2.7 Avaliação *in vitro* da permeabilidade

A permeabilidade é um parâmetro crucial e determinante na biodisponibilidade de fármacos (PADE; STAVCHANSKY, 1998). Apesar da sua importância, são raros os trabalhos descritos na literatura que descreveram a capacidade dos sais e dos cocristais farmacêuticos em modular a permeabilidade *in vitro* de IFAs, empregando cultura de células intestinais humanas Caco-2. Portanto, este modelo de membrana, que é bastante representativo do processo de absorção através do epitélio gastrointestinal, foi escolhido para avaliar a permeabilidade da FSM e de suas novas modificações cristalinas. Como esperado, a FSM apresentou baixa permeabilidade, bem como um transporte celular

assimétrico, já que é um substrato conhecido dos transportadores de efluxo. Os valores de P_{app} calculados (dados mostrados na Tabela 26), tanto no sentido apical-basolateral (A-B) quanto no sentido basolateral-apical (B-A), estão em concordância com os valores reportados na literatura (CORTI *et al.*, 2006; HILGENDORF *et al.*, 2000; PADE; STAVCHANSKY, 1997).

Notavelmente, o valor de P_{app} (A-B) da FSM ($0,107 \pm 0,005 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) aumentou, quando o IFA estava cocristalizado com os coformadores IMI e 5FC. Os valores de P_{app} (A-B) do sal FSM-IMI e do cocristal FSM-5FC-H₂O foram $0,304 \pm 0,018 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ e $0,224 \pm 0,015 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente. Com base nesses resultados, é possível sugerir que, de fato, as moléculas do IFA e dos coformadores (IMI ou 5FC) interagem entre si, formando agregados heteromoleculares, não só no estado sólido como também em solução. Esses sistemas, resultantes do processo de dissolução dos cristais, ainda que transitórios, prolongam a concentração do fármaco em solução, permitindo que os agregados moleculares (constituídos de IFA mais coformador) interajam, mais eficientemente e por mais tempo, com as estruturas macromoleculares dos sistemas biológicos, tais como bicamadas lipídicas e transportadores proteicos, ambos presentes na monocamada de células Caco-2 (BANIK *et al.*, 2016; DALPIAZ *et al.*, 2018).

Por outro lado, os valores de P_{app} (B-A) da FSM e de suas modificações cristalinas (FSM-IMI e FSM-5FC-H₂O), não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 26), indicando que a FSM continuou sendo secretada, em grandes quantidades pelos sistemas de efluxo, independentemente de estar em sua forma livre ou cocristalizada. Esses resultados revelaram que as possíveis contribuições que os coformadores (IMI e 5FC) exerceram no aprimoramento da permeabilidade do IFA foram minimizados, em parte, pela alta taxa de efluxo do fármaco. No entanto, como consequência direta do aumento dos valores de P_{app} (A-B) encontrados para o sal FSM-IMI e para o cocristal FSM-5FC-H₂O em relação a FSM, observou-se uma redução significativa (de 43,8 a 63,6%) nos valores de razão de efluxo, representado como termo R na Tabela 26. Tais reduções indicaram que a FSM foi consideravelmente menos secretada pelos sistemas de efluxo quando estava cocristalizada. Por fim, é importante mencionar que, após os experimentos de permeabilidade, não foram observadas alterações significativas nas medidas de resistividade elétrica das membranas (valores permaneceram próximos ao valor de $400 \text{ } \Omega \text{ cm}^{-2}$ aferido antes dos experimentos), sugerindo que houve manutenção da integridade da monocamada de células Caco-2 durante o transporte da FSM (DE ANGELIS; TURCO, 2011).

5.2.8 Validação do método analítico para quantificação de furosemida por CLAE-UV

A seletividade consiste na capacidade do método em diferenciar e quantificar de forma confiável o analito de interesse na presença de interferentes, como por exemplo, componentes de formulação (excipientes), produtos de degradação e impurezas. Como o método analítico foi otimizado para quantificar o fármaco FSM em estudos de solubilidade e dissolução intrínseca e sabendo que nesses ensaios não há a presença de excipientes, uma vez que foram feitos apenas com o IFA na sua forma pura ou modificada (novos cristais), a possibilidade de que tenha algum interferente neste contexto é pequena. Além disso, mesmo após extensa busca na literatura, não foram encontrados quaisquer indícios de que a FSM sofra degradação nas condições em que foram realizados ambos os experimentos, indicando que a formação de produtos de degradação se apresenta como uma possibilidade bastante remota. Portanto, os únicos interferentes prováveis para este método seriam os coformadores (IMI e 5FC) dos novos cristais, bem como os componentes dos tampões usados como meios de dissolução. Por se tratar de compostos extremamente polares, tanto os coformadores quanto os sais dos tampões não foram retidos na coluna, sendo todos eluídos no tempo morto, comprovando a seletividade do método.

A avaliação do efeito matriz revelou que a inclinação (coeficiente angular) da curva de calibração usual (em água ultrapura) não diferiu estatisticamente das inclinações das curvas matrizadas (preparadas nos tampões), conforme mostrado na Tabela 27. Além do paralelismo observado entre as retas, os valores de t calculado (1,05-1,50) foram inferiores ao valor de t crítico (2,78), indicando que não há efeito de matriz significativo neste método. Dessa forma, a validação dos demais parâmetros do método puderam ser realizados a partir de soluções do analito preparadas em água ultrapura.

Tabela 27 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de FSM.

Meio de dissolução utilizado no preparo da curva	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Regressão linear	
		Coefficiente angular (a)	R^2
Água ultrapura	2,0-10,0	72945	0,9995
Tampão fosfato pH 6,8		73129	0,9997
Tampão acetato pH 4,5		72852	0,9996
HCl 0,1 M pH 1,2		71959	0,9996

A linearidade do método foi comprovada pelo MMQO, considerando a faixa de trabalho de 2,0 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, já que abrange as concentrações esperadas a partir dos estudos de dissolução intrínseca da FSM e de suas novas formas sólidas. Além de demonstrar a significância da regressão e que o modelo não apresentou falta de ajuste, verificou-se também que todas as premissas da linearidade foram atendidas. Na Tabela 28 estão dispostos os resultados dos testes estatísticos que comprovaram que o modelo apresentado é linear para a faixa de 2,0 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O modelo de regressão linear utilizado para a quantificação de FSM foi do tipo $y = ax + b$, sendo y a área sob o pico do analito, a o coeficiente angular, x a concentração nominal de FSM e b o coeficiente linear.

Tabela 28 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de FSM.

Item avaliado	Analito de interesse (FSM)
Equação da reta	$y = 117089x - 5097,3$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9998
Modelo estatístico	MMQO
<i>Outliers</i> descartados	Nenhum
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico\ 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9832 > 0,9383)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,3596 < 2,1691 < 2,6403)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,1108 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,3102 > 0,0500)

O método analítico foi considerado preciso, já que houve proximidade entre os resultados das medidas de concentração das soluções de FSM, que foram avaliadas nas condições de repetibilidade (mesmo dia e analista) e de precisão intermediária (dias e analistas diferentes). Os valores de DPR das nove determinações, que foram preparadas em triplicata nas concentrações de 2,0; 6,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram inferiores a 2%, conforme mostrado na Tabela 29. Além de preciso, o método também foi considerado exato devido à concordância observada entre os resultados de concentração de cada determinação em relação ao valor aceito como verdadeiro. Tal evidência foi pautada nos valores médios de recuperação de FSM nos três níveis de concentração avaliados (2,0; 6,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), que se encontram entre 98 e 102% (Tabela 29).

Tabela 29 - Resultados de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de FSM.

Nível de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão		Exatidão
	DPR (%) repetibilidade	DPR (%) precisão intermediária	Recuperação média (%)
2,0	0,98	1,34	100,89
6,0	0,95	1,16	98,93
10,0	0,03	1,10	99,53

A determinação dos limites de quantificação e detecção teóricos do método foi realizada baseando-se nos parâmetros das curvas de calibração. Os valores de LQ e LD encontrados foram $0,102 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,034 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

5.2.9 Validação do método bioanalítico para quantificação de furosemida por CLAE-FLU

Na validação do método bioanalítico por CLAE-FLU, a faixa de concentração de FSM testada (de 100 a 1500 ng mL^{-1}) permitiu a obtenção de resultados satisfatórios no que se refere à comprovação da linearidade pelo MMQO. A verificação das premissas da linearidade bem como os resultados dos testes estatísticos indicaram que o modelo proposto não apresenta desvio da linearidade. Os dados são mostrados na Tabela 30. O modelo de regressão linear, utilizado nesse caso, também foi $y = ax + b$, sendo y a área sob o pico do analito, a o coeficiente angular, x a concentração nominal de FSM e b o coeficiente linear.

Conforme recomendado pelos guias de validação de métodos bioanalíticos, três curvas de calibração foram construídas para avaliação da relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito. As curvas foram elaboradas a partir de amostras de diferentes concentrações do analito, sendo todas preparadas na mesma matriz do experimento (tampão HBSS). Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) das três curvas, todos muito próximos a 1 (Tabela 31), confirmou a existência da relação linear entre resposta e concentração.

Tabela 30 - Resultados da avaliação da linearidade do método bioanalítico para a quantificação de FSM.

Item avaliado	Analito de interesse (FSM)
Equação da reta	$y = 3292x + 33452$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9996
Modelo estatístico	MMQO
<i>Outliers</i> descartados	3
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9796 > 0,9521)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,4197 < 1,8993 < 2,5802)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,8667 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,2063 > 0,0500)

Tabela 31 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas durante a validação do método bioanalítico para a quantificação de FSM.

Curva de calibração	Faixa de concentração (ng mL ⁻¹)	Regressão linear		
		Coefficiente angular (<i>a</i>)	Coefficiente linear (<i>b</i>)	R^2
1 ^a	100-1500	3051,8	39623	0,9995
2 ^a		3292,0	33452	0,9996
3 ^a		3203,9	28675	0,9991

A seletividade do método bioanalítico foi comprovada determinando-se a área sob os picos que apareceram com o mesmo tempo de retenção do fármaco FSM, mediante a injeção de cinco amostras de tampão HBSS (considerado branco). Nos cromatogramas referentes às amostras branco, as áreas relativas dos picos interferentes variaram de 5,4 a 8,1% em comparação com a área média de amostras do analito na concentração correspondente ao LIQ (100 ng mL⁻¹), sendo todas inferiores a 20%, comprovando que o método é seletivo. Além disso, não foi constatado a presença de efeito residual, uma vez que as áreas relativas dos picos que apareceram com o mesmo tempo de retenção do fármaco nos dois cromatogramas de amostras branco (tampão HBSS), imediatamente obtidos após a injeção de uma amostra na concentração do LSQ (1500 ng mL⁻¹), foram inferiores a 20% em relação a área média de picos obtidos por amostras no LIQ (100 ng mL⁻¹).

O método bioanalítico apresentou resultados satisfatórios para precisão e exatidão, tanto nos ensaios intracorrída quanto nos intercorrídas. Conforme mostrado na Tabela 32,

todos os valores de DPR e EPR, nos cinco níveis de concentração avaliados, foram inferiores a 15% em relação aos valores de concentração nominais dos cinco controles de qualidade avaliados.

Tabela 32 - Resultados de precisão e exatidão do método bioanalítico para a quantificação de FSM.

Nível de concentração (ng mL ⁻¹)	Ensaio intracorrida (n = 5)			Ensaio intercorrida (n = 15)		
	Conc. real	Precisão DPR (%)	Exatidão EPR (%)	Conc. real	Precisão DPR (%)	Exatidão EPR (%)
100 (CQLIQ)	91,13	1,95	-8,87	95,44	7,23	-4,56
300 (CQB)	277,9	1,08	-7,38	291,6	6,58	-2,81
800 (CQM)	737,9	1,50	-7,76	765,6	6,91	-4,30
1200 (CQA)	1116	1,13	-7,03	1168	7,48	-2,69
2000 (CQD)	1838	0,36	-8,12	1834	11,3	-8,29

Os resultados referentes à estabilidade do fármaco FSM em tampão HBSS são mostrados na Tabela 33. Nas três condições avaliadas, o analito provou ser estável em ambos os níveis de concentração testados (CQB e CQA). Os valores de DPR e EPR encontrados para estes níveis foram todos inferiores a 15% em relações aos valores nominais de concentração do fármaco.

Tabela 33 - Resultados do estudo de estabilidade do fármaco FSM em tampão HBSS obtido durante a validação do método bioanalítico.

Nível de concentração (ng mL ⁻¹)	Curta duração (temp. ambiente por 90 min)		Longa duração (temp. ambiente por 270 min)		Ciclos de congelamento e descongelamento	
	DPR (%)	EPR (%)	DPR (%)	EPR (%)	DPR (%)	EPR (%)
300 (CQB)	2,50	7,57	0,53	7,47	2,00	-12,8
1200 (CQA)	1,68	8,01	1,87	10,2	8,14	-8,57

Por fim, ainda que o limite de quantificação esteja associado com o menor nível de concentração da curva de calibração (100 ng mL⁻¹) que corresponde ao LIQ do método bioanalítico, optou-se por demonstrar, de maneira adicional, qual seria o menor valor de concentração que o método proposto seria capaz de quantificar, com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores de LQ e LD encontrados, com base nos parâmetros das curvas de calibração, foram 17,25 ng mL⁻¹ e 5,75 ng mL⁻¹, respectivamente.

5.2.10 Impactos das novas formas sólidas de furosemida

Na seção 5.2, apresentamos um sal (FSM-IMI) e um co cristal (FSM-5FC-H₂O) do fármaco FSM. Essas novas formas sólidas foram racionalmente planejadas a partir da reação e cristalização da FSM com os coformadores IMI e 5FC, na tentativa de melhorar simultaneamente a solubilidade e permeabilidade da FSM. Por meio de uma detalhada caracterização químico-estrutural dos novos cristais obtidos, que envolveu análises difratométricas, espectroscópicas e térmicas, foi possível entender como as novas estruturas cristalinas foram capazes de melhorar as propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas da FSM. Vale lembrar que tanto o sal FSM-IMI quanto o co cristal FSM-5FC-H₂O demonstraram ser mais solúveis e permeáveis em relação à FSM não modificada, além de promoverem uma redução significativa na secreção do fármaco. Tais evidências sugerem fortemente que essas duas formas sólidas poderiam proporcionar um aumento na biodisponibilidade do fármaco, já que os principais fatores que modulam a absorção foram consideravelmente aprimorados. Por se tratar de resultados potencialmente promissores, tanto no aspecto de inovação quanto do ponto de vista farmacoterapêutico, os mesmos foram publicados na renomada revista *International Journal of Pharmaceutics* em julho de 2020 (DINIZ *et al.*, 2020).

5.3 Novos sais e sal-cocrystal do fármaco diltiazem e suas implicações biofarmacêuticas

Esta seção é destinada à apresentação dos resultados de três novas modificações cristalinas do fármaco anti-hipertensivo DIL. Tratam-se de dois novos sais hidratados e um sal-cocrystal, sendo todos obtidos a partir da reação da base livre de DIL com os ácidos carboxílicos succínico, oxálico e fumárico. As novas formas sólidas foram designadas como DIL-SUC-H₂O (sal succinato de diltiazem mono-hidratado), DIL-OXA-H₂O (sal oxalato de diltiazem di-hidratado) e DIL-FUM-H₂FUM (sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de diltiazem anidro). Por ser um fármaco de caráter básico (pKa = 7,7) (SATEESHA *et al.*, 2010), a molécula de DIL é passível de protonação em reações com ácidos. Embora a estrutura da base livre de DIL seja conhecida e exiba certa estabilidade, esta forma é fracamente solúvel (STEPANOVS *et al.*, 2016). Baseado nestas características, o DIL é comercializado na forma salina de cloridrato (DIL-HCl), sendo conhecido por apresentar elevada solubilidade aquosa (da ordem de 565 mg mL⁻¹) (HAN *et al.*, 2013). Por consequência, o perfil farmacocinético do DIL-HCl se caracteriza por apresentar um curto tempo de meia-vida (3,2 ± 1,3h), implicando em múltiplas administrações do fármaco (de 3 a 4 vezes) ao longo do dia (HERMANN *et al.*, 1983).

Ainda que, comercialmente, existam formulações de liberação retardada contendo DIL-HCl, o emprego de uma forma sólida de DIL de menor solubilidade e velocidade de dissolução é altamente requerida, já que contribuiriam para uma liberação mais lenta do fármaco. Como a obtenção de novos sais que proporcionem diminuição/modulação da solubilidade e velocidade de dissolução de fármacos não é uma tarefa trivial, o que se aplica, inclusive, para o DIL, diversas outras abordagens são reportadas na literatura, sendo a maioria delas baseada em sistemas poliméricos que visaram uma liberação prolongada do DIL (KOJIMA *et al.*, 2008; TOTI; AMINABHAVI, 2004). No único trabalho que relatou o desenvolvimento de sais de DIL (STEPANOVS *et al.*, 2016), os autores não mostraram como as modificações cristalinas impactariam na farmacocinética do fármaco, na medida em que dados de dissolução ou qualquer outra informação relativa aos aspectos biofarmacêuticos não foram apresentados. Assim, não há até o momento nenhuma forma sólida de DIL que mostrou uma capacidade efetiva de aumentar o tempo de meia-vida do fármaco e, conseqüentemente, aprimorar seu perfil farmacocinético. A fim de se demonstrar o potencial das novas formas sólidas de DIL propostas (DIL-SUC-

H₂O, DIL-OXA-H₂O e DIL-FUM-H₂FUM) comparado ao sal DIL-HCl, uma ampla caracterização estrutural e biofarmacêutica foi conduzida.

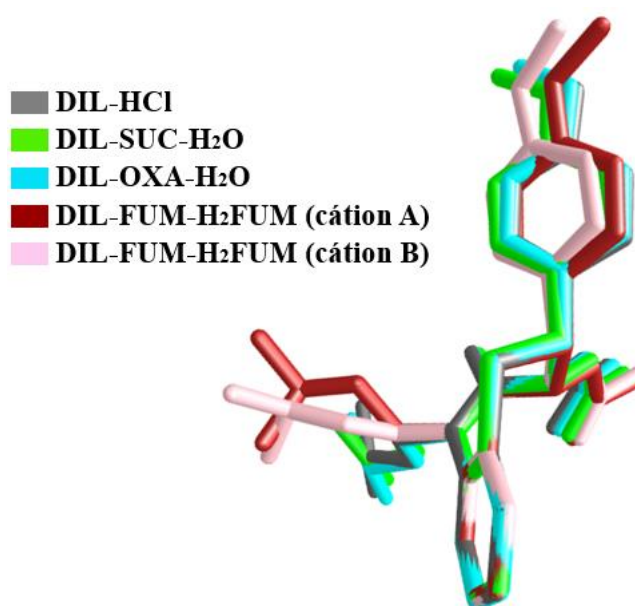
5.3.1 Descrição cristalográfica e conformacional

A determinação das estruturas cristalinas dos sais hidratados DIL-SUC-H₂O e DIL-OXA-H₂O e do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM foi realizada por DRXM dos sólidos obtidos. Primeiramente, como não são esperadas diferenças geométricas significativas para o átomo de nitrogênio N2 da amina terciária do DIL após sua protonação, a comprovação de que os novos sais foram formados foi demonstrada pela identificação dos grupos carboxilatos COO⁻ nas estruturas dos ânions derivados das moléculas dos ácidos. A ocorrência de ânions carboxilatos nas estruturas dos novos sais foi corroborada pelos valores próximos dos comprimentos das ligações C–O, que sugerem um caráter ressonante tipicamente observado para grupos COO⁻ (CHILDS *et al.*, 2007). Outra característica comum às três modificações cristalinas de DIL é a presença de efeitos de desordem nas moléculas dos ânions. Para que houvesse convergência nos refinamentos das estruturas dos sais, os valores de ocupação dos fragmentos desordenados das moléculas dos ânions hidrogenosuccinato (SUC⁻), hidrogenooxalato (OXA⁻) e fumarato (FUM²⁻) foram de 0,78:0,22, 0,59:0,41 e 0,65:0,35, respectivamente. Para o sal DIL-OXA-H₂O em particular, o pronunciado efeito de desordem dificultou a localização dos átomos de hidrogênio derivados das moléculas do ânion OXA⁻ e das moléculas de água.

Por exibir um centro quiral, a configuração absoluta da molécula do fármaco foi determinada. Nas estruturas dos sais, o DIL exibiu configuração do tipo S, apresentando-se, portanto, em sua forma enantiomericamente pura. Esta observação está de acordo com os valores próximo a 0 do parâmetro de Flack (FLACK; BERNARDINELLI, 1999) encontrados no término dos refinamentos (Tabela 34), indicando que o enantiômero S refinado representa a configuração absoluta correta para o fármaco. Vale lembrar que este resultado já era esperado, pois no processo reacional que culminou na formação dos novos sais, partiu-se do sal (S)-DIL-HCl. Do ponto de vista conformacional, o cátion DIL⁺ presente nas estruturas dos sais possui conformações moleculares ligeiramente distintas. A sobreposição das moléculas dos cátions DIL⁺ dos sais de DIL, mostrando essas diferenças pode ser observada na Figura 34. Nota-se que o anel benzotiazepínico apresenta uma configuração de barco levemente torcido com conformação semelhante à descrita por Kojić-Prodić e colaboradores (KOJIĆ-PRODIĆ *et al.*, 1984). Já o fragmento

dimetilaminoetil demonstrou ser a porção mais flexível dos cátions DIL^+ . Enquanto o ângulo de torção C4-N1-C19-C20 assumiu valores de $115,2(7)^\circ$ e $107,5(7)^\circ$ nos sais $\text{DIL-SUC-H}_2\text{O}$ e $\text{DIL-OXA-H}_2\text{O}$, respectivamente, este mesmo ângulo de torção possui valores de $-90,95(5)^\circ$ e $-53,73(1)^\circ$ nos cátions DIL^+ A e B independentes do sal-cocrystal $\text{DIL-FUM-H}_2\text{FUM}$. Essas variações podem ser explicadas pelas diferentes forças intermoleculares que atuam no contexto dos empacotamentos cristalinos de cada sal de DIL .

Figura 34 - Sobreposição das conformações moleculares dos cátions de DIL^+ das estruturas cristalinas dos compostos DIL-HCl (cinza), $\text{DIL-SUC-H}_2\text{O}$ (verde), $\text{DIL-OXA-H}_2\text{O}$ (azul claro) e $\text{DIL-FUM-H}_2\text{FUM}$ (vermelho escuro e rosa claro).



Visando uma melhor compreensão das estruturas de estado sólido e a fim de estabelecer quais aspectos cristalográficos dos novos sais de DIL exercem maior influência nas propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas do fármaco, uma detalhada análise químico-estrutural destes compostos é apresentada nas seções subsequentes (5.3.1.1, 5.3.1.2 e 5.3.1.3). Na Tabela 34 estão descritos os dados cristalográficos e os detalhes de cada refinamento dessas novas modificações cristalinas.

Tabela 34 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos sais de diltiazem.

Identificação do cristal	DIL-SUC-H ₂ O	DIL-OXA-H ₂ O	DIL-FUM-H ₂ FUM
Fórmula empírica	C ₂₆ H ₃₄ N ₂ O ₉ S	C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₈ S	C ₅₂ H ₆₀ N ₄ O ₁₆ S ₂
Peso molecular	550,61	504,15	1061,16
Temperatura (K)	298(2)	298(2)	298(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P2₁</i>	<i>C2</i>	<i>P2₁</i>
a (Å)	8,8575(9)	47,881(4)	9,0217(6)
b (Å)	6,6437(6)	6,1551(4)	24,7529(14)
c (Å)	25,0886(19)	8,8416(4)	11,9962(9)
α (°)	90	90	90
β (°)	97,690(9)	95,229(5)	93,759(6)
γ (°)	90	90	90
Volume (Å ³)	1463,1(2)	2594,9(3)	2673,1(3)
Z / Z'	2 / 1	4 / 1	2 / 1
ρ _{calc} (g cm ³)	1,250	1,291	1,318
μ (mm ⁻¹)	0,162	1,530	0,172
Reflexões coletadas	13695	14842	15785
Reflexões independentes	5210	3992	9186
R ₁ [I ≥ 2σ(I)]	0,0638	0,0967	0,0524
wR ₂ [<i>all data</i>]	0,1879	0,2611	0,1334
S	1,043	1,127	1,052
Parâmetro de Flack	-0,01(5)	-0,04(4)	-0,03(4)

5.3.1.1 Sal succinato de diltiazem mono-hidratado

O sal DIL-SUC-H₂O cristalizou no grupo espacial monoclínico não-centrossimétrico *P2₁*. A unidade assimétrica deste sal, representada na Figura 35, é constituída por um cátion de diltiazem (DIL⁺), um ânion hidrogenosuccinato (SUC⁻) e uma molécula de água. Devido à proporção estequiométrica 1:1:1 das moléculas na unidade assimétrica, o sal succinato de DIL é classificado como mono-hidratado. A protonação do nitrogênio da amina terciária do DIL foi confirmada pela localização do hidrogênio no mapa de diferença de densidade eletrônica. Já a desprotonação parcial da molécula de ácido succínico não pôde ser comprovada pela análise dos valores de ΔD_{C-O} dos grupos carboxílicos, uma vez que os resultados encontrados foram de 0,048 e 0,058. Esses valores de ΔD_{C-O} estão acima do limite definido (ΔD_{C-O} < 0,03 Å) para a formação de sais e abaixo do limite definido (ΔD_{C-O} > 0,08 Å) para a formação de cocristais. Entretanto, como observado na unidade assimétrica do sal DIL-SUC-H₂O, um grupo carboxílico permaneceu com o próton e o outro encontra-se na forma de ânion

carboxilato. Tal evidência foi suportada pela localização de apenas um átomo de hidrogênio no mapa de diferença de densidade em um dos grupos carboxílicos do ânion SUC^- . Esse comportamento do ácido succínico é pouco frequente devido à proximidade dos valores de pK_{a1} (4,19) e pK_{a2} (5,48) da molécula. Assim, era esperado que a liberação dos prótons ocorresse simultaneamente, o que não ocorreu. A presença de uma única molécula de DIL na unidade assimétrica seria uma das principais razões para a não liberação do segundo próton do ácido succínico.

Figura 35 - Unidade assimétrica do sal succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC- H_2O). A porção desordenada da molécula do ânion SUC^- foi omitida para melhor visualização da estrutura. Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

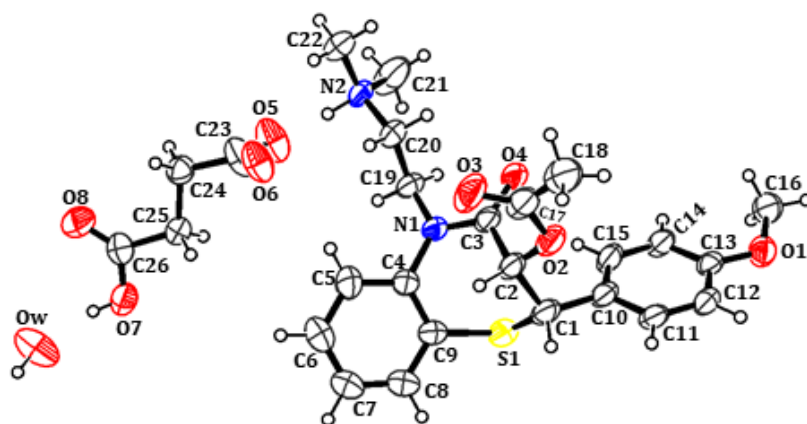


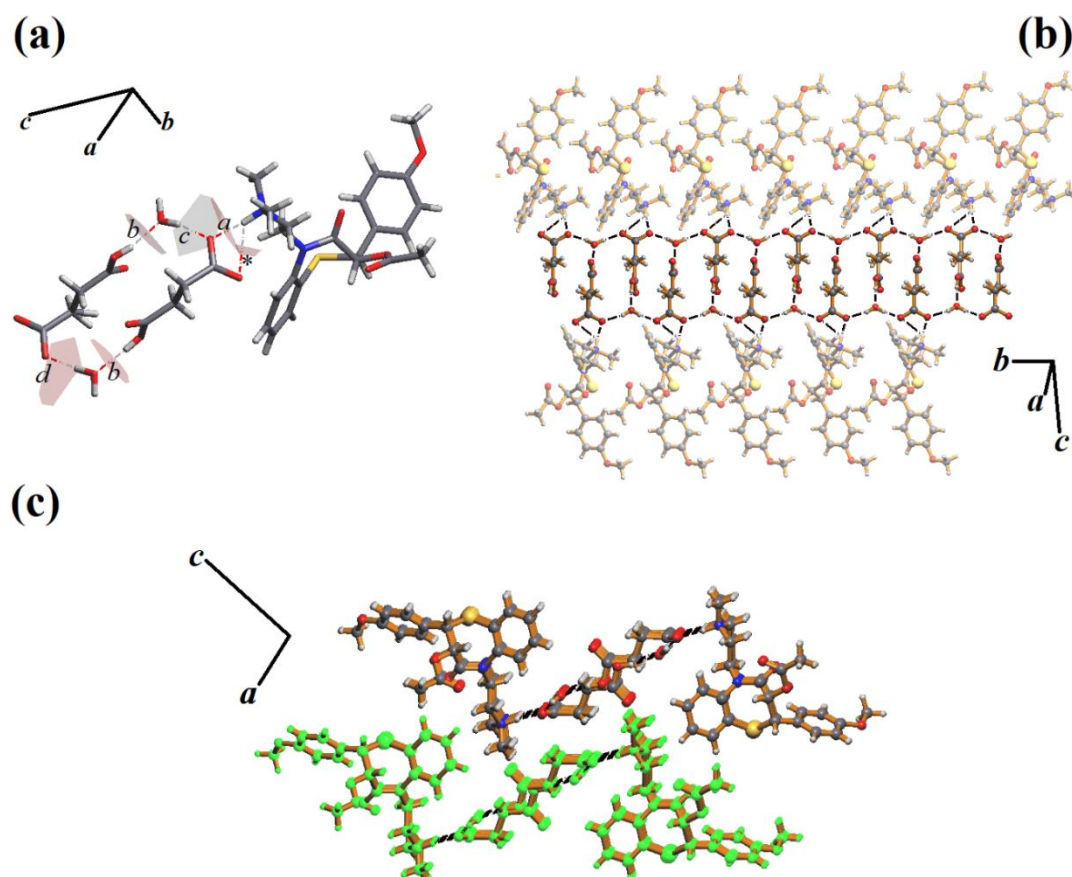
Tabela 35 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC- H_2O).

Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
O _w -H _w A...O5	2,707(7)	168	2-x, 1/2+y, 1-z
N2-H2...O5	2,604(7)	173	2-x, 1/2+y, 1-z
N2-H2...O6	3,103(7)	124	2-x, 1/2+y, 1-z
O _w -H _w B...O6	2,634(7)	173	2-x, y-1/2, 1-z
O7-H7A...O _w	2,566(7)	166	2-x, y-1/2, 1-z
C18-H18A...O4	3,311(10)	143	x, y+1, z
C18-H18C...O1	3,259(9)	148	-x, 1/2+y, -z
C19-H19B...O3	3,489(9)	171	x, y-1, z
C21-H21B...O7	3,171(8)	129	x-1, y, z
C22-H22B...O8	3,297(11)	153	1-x, y-1/2, 1-z
C22-H22C...O3	3,172(9)	126	x, y-1, z

Para melhor compreensão e visualização da estrutura cristalina do sal DIL-SUC- H_2O , são listados os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio na Tabela 35. Com a protonação da molécula de DIL, o átomo N2 protonado de geometria tetraédrica do cátion DIL^+ está conectado ao ânion SUC^- por meio das ligações de

hidrogênio bifurcadas N2–H2···O5 (2,604(7) Å, 173°) e N2–H2···O6 (3,103(7) Å, 124°). Ademais, o grupo COOH do ânion SUC⁻ se associa a uma molécula de água por meio da ligação de hidrogênio O7–H7A···Ow (2,566(7) Å, 166°), conforme evidenciado na Figura 36a. Complementarmente, outras duas ligações de hidrogênio, Ow–HwA···O5 (2,707(7) Å, 168°) e Ow–HwB···O6 (2,634(7) Å, 173°), auxiliam na estabilização da estrutura cristalina, conectando a molécula de água ao grupo COO⁻ do ânion SUC⁻. É justamente por meio dessas interações intermoleculares que uma cadeia 1D infinita de ânions SUC⁻ se estende ao longo do eixo cristalográfico *b*, sendo adicionalmente estabilizada por interações do tipo C–H···O (Tabela 35). Como resultado, o arranjo cristalino de folha representado na Figura 36b é gerado. Por fim, nenhuma interação $\pi\cdots\pi$ foi constatada entre grupos aromáticos de cátions DIL⁺ adjacentes, sendo as interações intermoleculares entre as cadeias 1D de ânions SUC⁻ as responsáveis por proporcionar a formação e estabilização do empacotamento cristalino 3D do sal DIL-SUC-H₂O, mostrado na Figura 36c.

Figura 36 - (a) Visão das ligações de hidrogênio entre cátion DIL⁺, ânions SUC⁻ e moléculas de água na estrutura do sal DIL-SUC-H₂O. (b) Representação da cadeia de ânions SUC⁻ ao longo do eixo cristalográfico *b*. (c) Empacotamento cristalino parcial do sal DIL-SUC-H₂O no plano cristalográfico *ac*.



5.3.1.2 Sal oxalato de diltiazem di-hidratado

O sal DIL-OXA-H₂O cristalizou no grupo espacial monoclinico não-centrossimétrico *C*2. A unidade assimétrica deste sal, representada na Figura 37, é constituída por um cátion de diltiazem (DIL⁺), um ânion hidrogenooxalato desordenado (OXA⁻) e duas moléculas de água. Com base na estrutura cristalina apresentada, mesmo com o ânion OXA⁻ exibindo um pronunciado efeito de desordem, a proporção estequiométrica das moléculas na unidade assimétrica foi de 1:1:2, indicando que o sal DIL-OXA-H₂O é um di-hidrato. De forma similar ao que ocorreu no sal DIL-SUC-H₂O, na estrutura cristalina do sal DIL-OXA-H₂O a protonação da molécula de DIL ocorreu no átomo de nitrogênio da amina terciária, sendo confirmada pela localização do átomo de hidrogênio no mapa de diferença de densidade eletrônica durante o processo de refinamento da estrutura cristalina. Por se apresentar de forma desordenada, a confirmação de que houve desprotonação parcial ou total da molécula de ácido oxálico tornou-se dificultada, seja pela análise dos valores de ΔD_{C-O} dos grupos carboxílicos ou pela tentativa de localização do átomo de hidrogênio no mapa de diferença de densidade eletrônica. Entretanto, a presença de um único cátion DIL⁺ na unidade assimétrica sugere que o ácido oxálico se encontra parcialmente desprotonado na estrutura, sendo tal fato corroborado por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (ver seção 5.3.3).

Figura 37 - Unidade assimétrica do sal oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O). Os átomos de hidrogênio das moléculas de água foram omitidos. Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

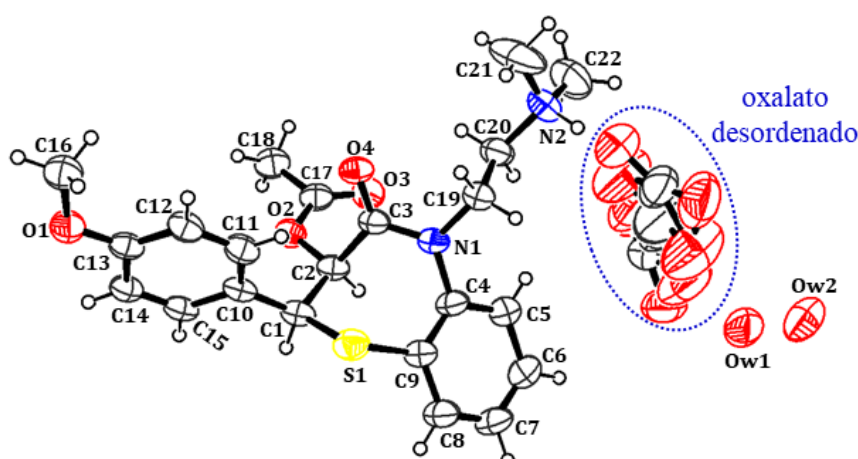
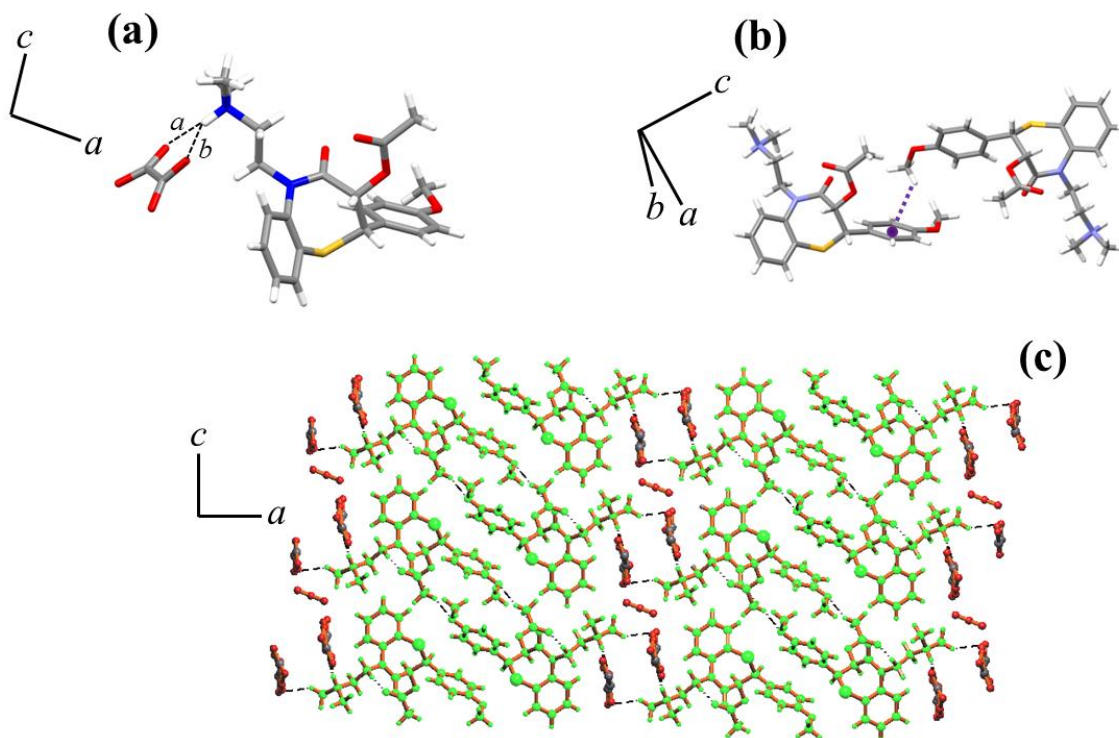


Tabela 36 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O).

Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
N2-H2...O5	2,940(3)	144	x,y,z
N2-H2...O7	2,865(18)	135	x,y,z
C7-H7...O3	3,398(10)	148	$x,-I+y,z$
C18-H18A...O4	3,120(8)	130	$x,I+y,z$
C18-H18C...O1	3,290(9)	157	$x,y,-I+z$
C19-H19B...O3	3,334(9)	175	$3/2-x,-I/2+y,2-z$
C22-H22B...O8	3,340(3)	143	$I-x,y,I-z$

A fim de auxiliar o entendimento da estrutura cristalina do sal DIL-OXA-H₂O, os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio são mostrados na Tabela 36. Uma vez que o sal DIL-OXA-H₂O foi obtido sob a forma de cristais prismáticos de baixa qualidade, ou seja, com um padrão de difração de baixa resolução (poucas reflexões a alto ângulo), a determinação e refinamento da estrutura cristalina se mostrou desafiador. Apesar do pronunciado efeito de desordem do ânion OXA⁻ e das moléculas de água, o que não permitiu a inclusão dos átomos de hidrogênio, os indicadores do refinamento do sal DIL-OXA-H₂O ainda se mostraram satisfatórios (ver Tabela 34). Na estrutura cristalina, a amina terciária protonada do cátion DIL⁺ encontra-se na direção do plano médio do ânion OXA⁻, favorecendo a formação do par iônico DIL⁺·OXA⁻, que é estabilizado pelas ligações de hidrogênio bifurcadas N2-H2...O7 (2,865(18) Å, 135°) e N2-H2...O5 (2,940(3) Å, 144°), como mostrado na Figura 38a. Embora a atribuição dos átomos de hidrogênio das moléculas de água e OXA⁻ não tenha sido possível a partir do mapa de diferença de densidade eletrônica, a distância dos átomos de oxigênio entre tais moléculas (O_{água}...O_{oxalato}) de 2,470 Å indicou formação de um sistema ânion...água na estrutura cristalina. De maneira análoga ao observado no sal DIL-SUC-H₂O, o empacotamento cristalino do sal DIL-OXA-H₂O também exibe um arranjo com a formação de colunas. Ao longo da estrutura, os pares iônicos DIL⁺·OXA⁻ interagem entre si por ligações de hidrogênio do tipo C-H...O (Tabela 36), de tal forma que os cátions DIL⁺ e os sistemas ânion...água estão alternadamente dispostos em cadeias 1D na direção do eixo cristalográfico *c*. Os sistemas ânion...água são os responsáveis por manter as cadeias unidas, resultando na formação de uma estrutura com forma de folhas 2D (Figura 38c). Assim, o empacotamento 3D do sal DIL-OXA-H₂O consiste no empilhamento das folhas 2D que são ainda estabilizadas por interações intermoleculares do tipo C16-H16C...π (3,547(2) Å) entre anéis aromáticos de cátions DIL⁺ (Figura 38b).

Figura 38 - (a) Ligações de hidrogênio bifurcadas no par iônico DIL⁺·OXA⁻. (b) Interações C–H... π entre moléculas adjacentes de cátions DIL⁺. (c) Representação do arranjo cristalino em colunas do sal DIL-OXA-H₂O no plano cristalográfico *ac*.

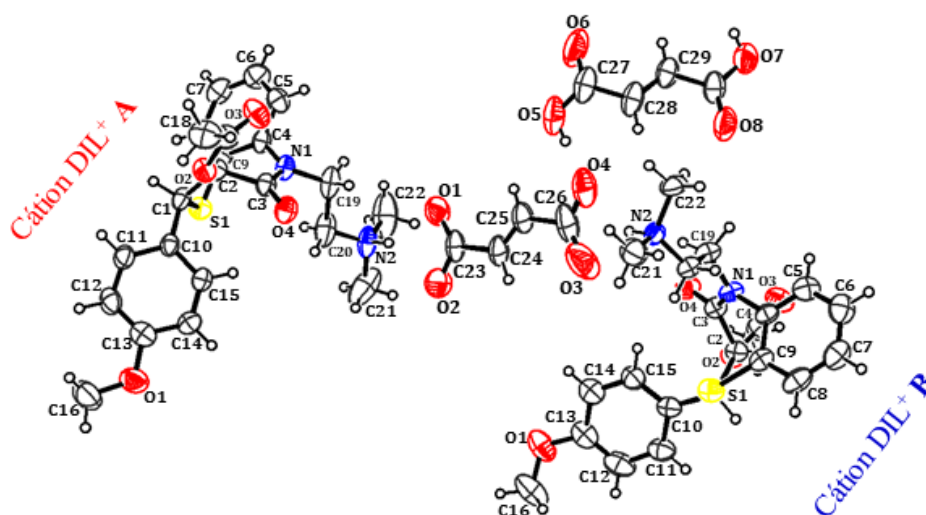


5.3.1.3 Sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de diltiazem

A formação do sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM não seguiu, a princípio, uma tendência lógica, já que era esperado que a unidade assimétrica deste composto fosse semelhante à dos demais sais de DIL reportados nesta tese. Assim, a presença de uma molécula de ácido fumárico (na forma neutra) na unidade assimétrica do composto DIL-FUM-H₂FUM (Figura 39) está possivelmente associado a aspectos energéticos, ou seja, se configura como a forma mais estável (menor energia) dentre as possíveis formas cristalinas existentes para este sistema. O sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM também cristalizou no grupo espacial monoclinico não-centrossimétrico $P2_1$ e a sua unidade assimétrica é constituída por dois cátions de DIL⁺ (denominados de A e B), um diânion fumarato (FUM²⁻) e um ácido fumárico (H₂FUM). A coexistência de moléculas carregadas e neutra na estrutura cristalina (ambas contribuindo na estabilização do sólido), faz com que o composto DIL-FUM-H₂FUM seja classificado como um sal-cocrystal, conforme a classificação proposta por Grothe e colaboradores (GROTHE et al., 2016). A protonação dos átomos de nitrogênio das aminas terciárias dos cátions de DIL A e B por uma das moléculas de ácido fumárico foi confirmada pelos valores de ΔD_{C-O}

(0,023 e 0,030 Å) do ânion FUM^{2-} . Já a molécula de H_2FUM apresentou distâncias de ligação C–O muito desiguais (1,310/1,206 Å e 1,309/1,202 Å), o que fornece valores de $\Delta d_{\text{C-O}}$ de 0,104 Å e 0,107 Å, ou seja, acima do limite de 0,08 Å que indica a natureza não iônica e assimétrica dessas ligações. Vale destacar que a desprotonação total de uma das moléculas de ácido fumárico é mais condizente com os próximos valores de $\text{pK}_{\text{a}1}$ (3,03) e $\text{pK}_{\text{a}2}$ (4,54) da molécula, indicando que a probabilidade de ambos os grupos carboxílicos desprotonarem simultaneamente é maior. Além disso, a presença de duas moléculas de DIL na unidade assimétrica do sal-cocristal (cada uma com apenas um sítio de protonação possível) exerceu uma forte influência para que os dois prótons do ácido fumárico fossem liberados simultaneamente.

Figura 39 - Unidade assimétrica do sal-cocristal fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM- H_2FUM). A porção desordenada da molécula do ânion FUM^{2-} foi omitida para melhor visualização da estrutura. Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.



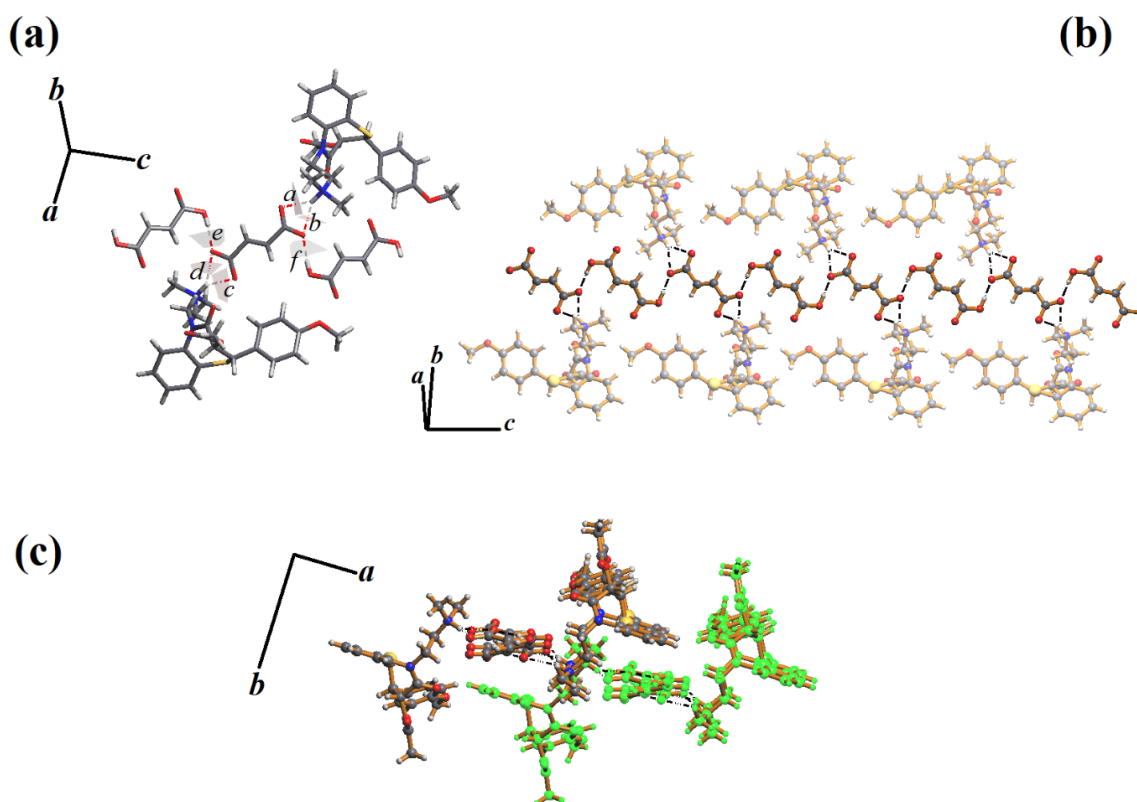
Para um melhor entendimento da estrutura de estado sólido do sal-cocristal DIL-FUM- H_2FUM , foram listados na Tabela 37 os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio. A análise da estrutura cristalina revelou que os cátions DIL^+ A e B estão conectados ao ânion FUM^{2-} por meio de ligações de hidrogênio bifurcadas, a saber $\text{N2A-H2A}\cdots\text{O1}$ (2,815(7) Å, 145°), $\text{N2A-H2A}\cdots\text{O2}$ (2,989(6) Å, 144°), $\text{N2B-H2B}\cdots\text{O3}$, (2,787(8) Å, 149°) e $\text{N2B-H2B}\cdots\text{O4}$ (3,020(7) Å, 147°), conforme mostrado na Figura 40a. As moléculas de H_2FUM interagem com os ânions FUM^{2-} por meio da ligação de hidrogênio $\text{O5-H5}\cdots\text{O4}$ (2,468(8) Å, 143°), formando uma cadeia 1D entre as moléculas $\text{FUM}^{2-}\cdots\text{H}_2\text{FUM}$ que se estende na direção do eixo cristalográfico c , na qual os cátions DIL^+ estão inclusive ligados (Figura 40b). A formação de folhas 2D,

embora não mostradas, também foi verificada na estrutura do sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM, sendo a estabilização de tal arranjo realizada *via* interações do tipo C–H...O (ver Tabela 37) envolvendo os grupos metóxi e acetato do cátion DIL⁺. Assim, a montagem de todas essas unidades mencionadas gerou o arranjo cristalino 3D mostrado na Figura 40c. Ao contrário dos outros dois sais hidratados de DIL apresentados, o empacotamento cristalino do sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM não é colunar, o que possivelmente exerceu influência nos processos de solubilização e dissolução do fármaco.

Tabela 37 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).

Interação	D...A(Å)	D–H...A(°)	Código de simetria
N2A–H2A...O1	2,815(7)	145	<i>x,y,z</i>
N2A–H2A...O2	2,989(6)	144	<i>x,y,z</i>
N2B–H2B...O3	2,787(8)	149	<i>x,y,z</i>
N2B–H2B...O4	3,020(7)	147	<i>x,y,z</i>
O5–H5...O4	2,468(8)	143	<i>x,y,z</i>
O7–H7...O2	2,495(7)	155	<i>x,y,z+1</i>
C7A–H7A...O4A	3,309(7)	136	<i>x+1,y,z</i>
C7B–H7B...O4B	3,291(7)	135	<i>x-1,y,z</i>
C15A–H15A...O4A	3,247(7)	137	<i>x-1,y,z</i>
C15B–H15B...O4B	3,166(7)	139	<i>x-1,y,z</i>
C21A–H21C...O8	3,398(11)	155	<i>x+1,y,z-1</i>
C21B–H21E...O1	3,370(9)	148	<i>x-1,y,z</i>
C22A–H22A...O7	3,415(11)	145	<i>x+1,y,z-1</i>
C22A–H22C...O3	3,284(12)	143	<i>x+1,y,z</i>
C22B–H22D...O6	3,440(9)	169	<i>x-1,y,z</i>
C22B–H22F...O8	3,382(9)	158	<i>x-1,y,z</i>
C24A–H24A...O7	3,210(13)	129	<i>x,y,z-1</i>
C25A–H25A...O5	3,149(13)	127	<i>x,y,z-1</i>
C28–H28...O4	3,084(10)	130	<i>x,y,z-1</i>
C29–H29...O2	3,070(9)	129	<i>x,y,z+1</i>

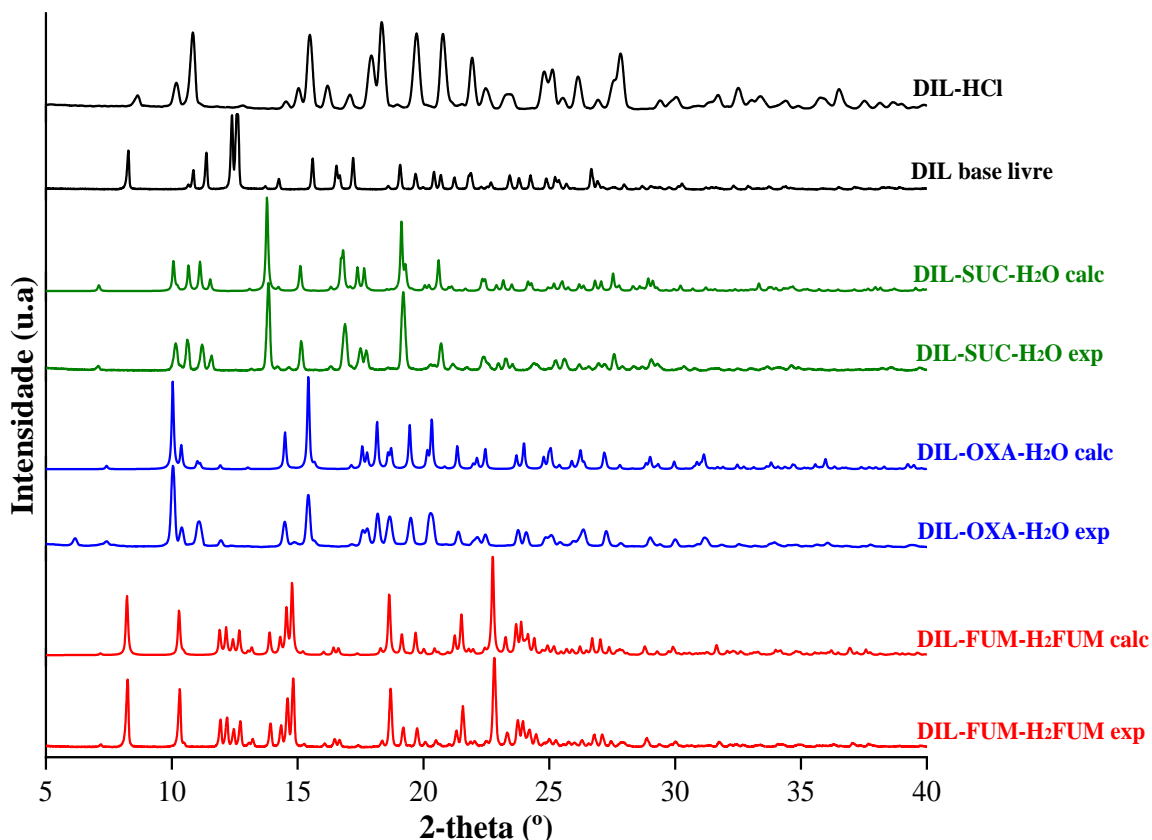
Figura 40 - (a) Representação das ligações de hidrogênio entre cátions DIL⁺ (A e B) e as moléculas do ânion FUM²⁻ e do ácido H₂FUM. (b) Cadeias 1D formadas entre as moléculas de FUM²⁻ e H₂FUM ao longo do eixo cristalográfico *c*. (c) Visão parcial do empacotamento cristalino do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM no plano cristalográfico *ab*.



5.3.2 Análise por difração de raios X por policristais

A fim de comprovar que o processo de obtenção dos cristais referentes às novas formas sólidas de DIL ocorreu de forma eficiente, isto é, com representatividade perante toda a amostra sintetizada e com adequada pureza cristalina, os sólidos formados foram submetidos ao ensaio de DRXP. Conforme mostrado na Figura 41, os difratogramas experimentais das três novas formas sólidas de DIL são completamente diferentes, no que se refere à posição 2θ dos picos de Bragg, dos difratogramas dos compostos DIL-HCl e DIL base livre (ambos utilizados como reagentes de partida das sínteses). Este resultado descarta qualquer indício da presença dessas duas fases cristalinas, como impurezas, por exemplo, nas amostras dos sais de DIL e reitera que os novos cristais obtidos se apresentam como novas fases cristalinas. Além disso, os padrões de difração experimentais dos novos sais apresentaram excelente concordância com os padrões simulados que foram calculados a partir das estruturas cristalinas dos sais, indicando que há uma única fase cristalina nas amostras sintetizadas e essa fase corresponde àquela cuja estrutura foi determinada por DRXM.

Figura 41 - Difratoogramas calculados (calc) e experimentais (exp) dos sais succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM). Os difratoogramas das formas cloridrato (DIL-HCl) e base livre (DIL) do diltiazem foram acrescentados para critérios de comparação.



5.3.3 Espectros vibracionais no infravermelho

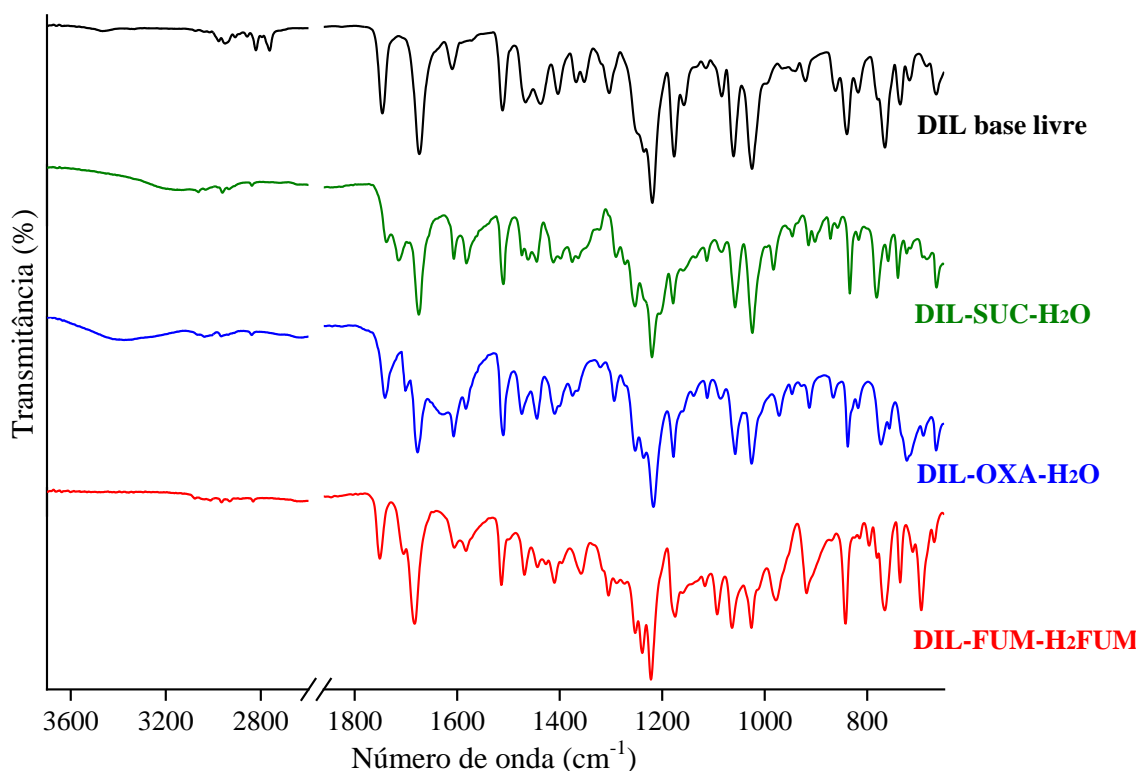
A análise espectroscópica e a atribuição das bandas nos espectros (Tabela 38) foram realizadas levando em consideração as estruturas cristalinas dos sais succinato e oxalato de DIL hidratados e do sal-cocrystal fumarato-ácido fumárico de DIL, bem como dados espectroscópicos reportados na literatura para ácidos dicarboxílicos e outras formas sólidas de DIL (MAGANA *et al.*, 2017; SHAFI *et al.*, 2017; STEPANOV *et al.*, 2016). Os espectros vibracionais na região do infravermelho da base livre do DIL e de suas novas modificações cristalinas são apresentados na Figura 42.

Tabela 38 - Atribuições das principais bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros infravermelho do DIL base livre e dos novos sais de DIL.

DIL	DIL-SUC-H ₂ O	DIL-OXA-H ₂ O	DIL-FUM-H ₂ FUM	Atribuições
-	3200	3374	-	$\nu(\text{O-H})_{\text{água}}$
2822	2839	2836	2832	$\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$
1745	1738	1741	1751	$\nu(\text{C=O})_{\text{éster}}$
1673	1674	1677	1683	$\nu(\text{C=O})_{\text{amida}}$
-	1714	1701	1705	$\nu(\text{C=O})_{\text{ácido}}$
-	1580	1583	1581	$\nu_a(\text{COO}^-)_{\text{carboxilato}}$
-	1413	1414	1410	$\nu_s(\text{COO}^-)_{\text{carboxilato}}$
1060, 1026	1057, 1024	1058, 1026	1065, 1025	$\nu(\text{C-O})_{\text{éster}}$

ν = estiramento da ligação, a = modo antissimétrico, s = modo simétrico

Figura 42 - Espectros na região do infravermelho da base livre do fármaco diltiazem (DIL), dos sais succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O) e do sal-cocristal fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).



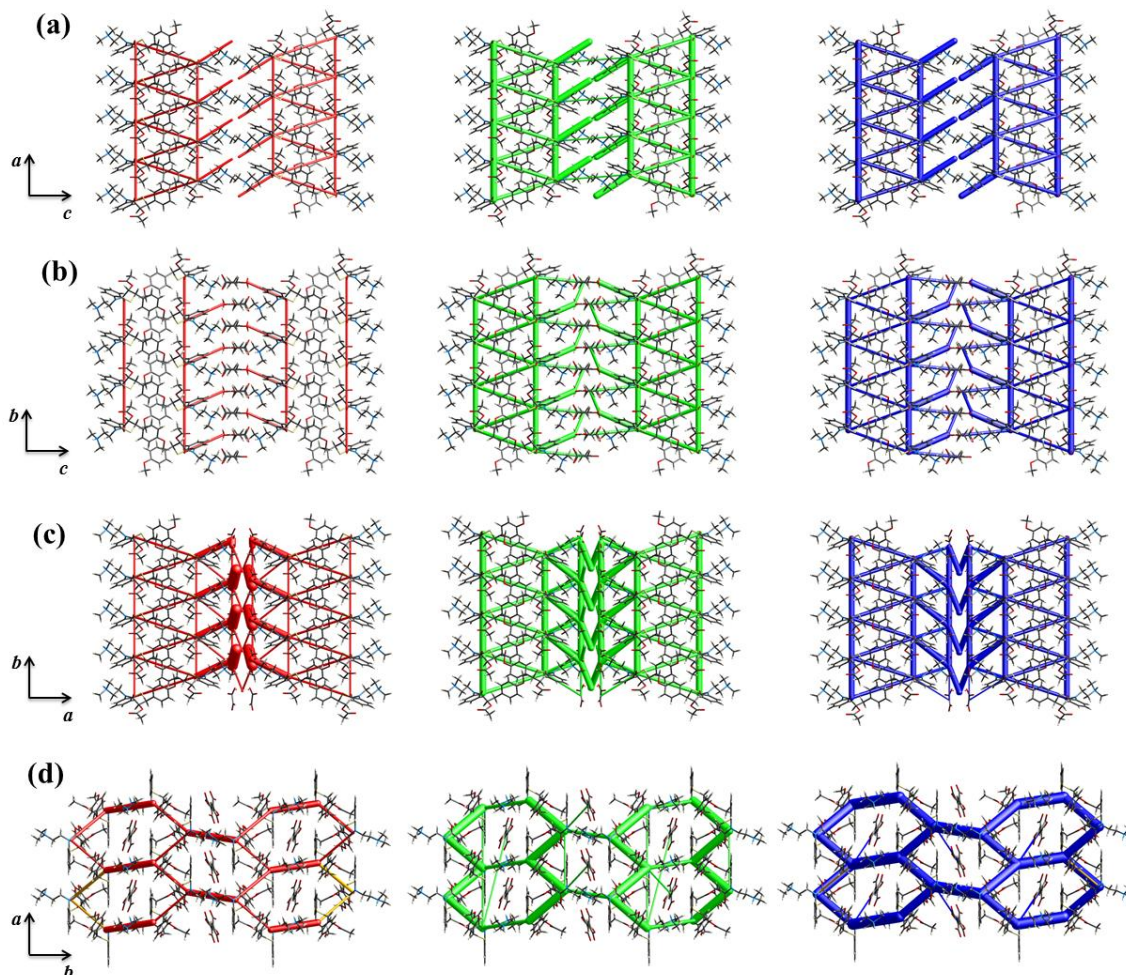
Ao comparar os espectros no infravermelho, nota-se claramente que as bandas de absorção características do DIL também estão presentes nos espectros das três novas formas sólidas. Dentre elas, destacam-se as bandas em $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da ligação C=O do grupo éster, em $\sim 1675 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da ligação C=O do grupo amida e em $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento da ligação C-O do grupo éster. Nos espectros das três modificações cristalinas, foi possível observar o aparecimento de uma banda em $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$ que foi atribuída ao estiramento da ligação

C=O do grupo carboxílico, confirmando que nas estruturas cristalinas dos sais DIL-OXA-H₂O e DIL-SUC-H₂O as moléculas dos ânions oxalato e succinato encontram-se desprotonadas parcialmente. Além disso, a presença da banda em 1705 cm⁻¹ no espectro do composto DIL-FUM-H₂FUM, deixa claro que a forma neutra do ácido fumárico está presente na estrutura cristalina do sal-cocristal. Por fim, nos espectros infravermelho dos sais de DIL, foi possível notar ainda a presença de novas bandas, compreendidas na região de 1583–1410 cm⁻¹, que foram associadas aos modos vibracionais antissimétrico e simétrico dos grupos carboxilatos (COO⁻), confirmando a natureza iônica dos novos cristais, conforme evidenciado pela análise das estruturas cristalinas.

5.3.4 Avaliação de energia de rede

A avaliação de energia de rede dos sais de DIL foi realizada visando estabelecer a contribuição energética das interações intermoleculares na estabilização dos empacotamentos cristalinos. A magnitude e a topologia destas energias de interação são mostradas na Figura 43. As estruturas cristalinas analisadas, com exceção do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM, são formadas por arranjos de folhas 2D que, quando agrupadas nas redes cristalinas, levam à formação de colunas de moléculas. Nestes arranjos de colunas, os cátions DIL⁺ se conectam aos respectivos ânions (Cl⁻, SUC⁻ e OXA⁻) e, no caso dos sais hidratados, à moléculas de água por meio de interações estabilizadoras, sejam elas de natureza Coulombiana (representadas em vermelho) e/ou dispersiva (representadas em verde). Conseqüentemente, nas estruturas destes sais observam-se topologias de energia semelhantes, sendo todas caracterizadas por exibir forma triangular (Figura 43a-c). Para o sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM, ainda que no sólido as contribuições das energias estabilizadoras sejam similares às observadas para os demais sais de DIL, dada a semelhança encontrada nas espessuras dos cilindros, a topologia de energia de rede para o composto se mostrou diferente. A forma hexagonal levemente distorcida observada sugere a ocorrência de uma estrutura de menor energia (mais estável). Tal fato associado a uma estrutura de estado sólido não colunar, como observado para o sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM, tendem a expor menos os domínios polares das moléculas na estrutura cristalina. Com isso, espera-se que os processos de solubilização e dissolução do fármaco sejam menos pronunciados para o sal-cocristal.

Figura 43 - Representação da topologia de energia de rede levando-se em consideração as contribuições eletrostáticas (vermelho), dispersivas (verde) e total (azul) para os sais (a) cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), (b) succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O), (c) oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O) e (d) fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).



Embora a correlação entre energia de rede, estrutura e propriedades físico-químicas e biofarmacêuticas de fármacos não seja trivial, os resultados encontrados apontam para considerações interessantes. Em termos quantitativos, a energia de interação entre as moléculas do cátion DIL⁺ e ânions/coformadores (Cl⁻, SUC⁻, OXA⁻, FUM²⁻ e H₂FUM) correspondentes, bem como entre moléculas de cátions DIL⁺ adjacentes nas estruturas de sais, não estão necessariamente na mesma magnitude. A título de exemplificação, enquanto as energias de interação entre cátions DIL⁺ e ânions/coformadores variou de -12,1 a -48,9 kJ mol⁻¹, as energias de interação entre cátions DIL⁺ adjacentes variou de -20,2 a -84,6 kJ mol⁻¹. Por outro lado, quando soma-se a contribuição da energia (em kJ mol⁻¹) de todas as interações intermoleculares que aparecem dentro de um raio de 3,8 Å dos pares iônicos DIL⁺⋯ânion⁻ e normaliza-se esse

somatório dividindo o valor de energia encontrado pelo número de interações, tem-se uma estimativa bastante fidedigna do quão energético é o microambiente cristalino no qual a molécula do fármaco se encontra. Nota-se nos valores de energia calculados (Tabela 39) que o sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM é o de menor energia (-15,81 kJ mol⁻¹), ou seja, o mais estável, seguido pelos sais hidratados DIL-SUC-H₂O (-10,60 kJ mol⁻¹), DIL-OXA-H₂O (-9,47 kJ mol⁻¹) e, por último, pela forma comercial DIL-HCl (-7,08 kJ mol⁻¹). Vale ressaltar que esses valores de energia estão inversamente correlacionados com as solubilidades dos sais de DIL (dados apresentados na seção 5.3.6), reiterando que para o composto de menor solubilidade (sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM) as moléculas estão num ambiente cristalino de menor energia, com uma contribuição mais efetiva de interações intermoleculares estabilizadoras. Neste sentido, uma correlação concreta pode ser estabelecida para as novas formas sólidas de DIL, já que os resultados sugerem que quanto maior a solubilidade do sal, menor sua energia de rede.

Tabela 39 - Parâmetros físico-químicos dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).

Composto	Temperatura de fusão (°C)	Entalpia de fusão (J g ⁻¹)	Temperatura de decomposição (°C)	Energia de rede* (kJ mol ⁻¹)
DIL-HCl	213,9	-91,54	220	-7,08
DIL-OXA-H₂O	112,1	-43,09	196	-9,47
DIL-SUC-H₂O	70,6	-188,96	180	-10,60
DIL-FUM-H₂FUM	194,2	-95,59	202	-15,81

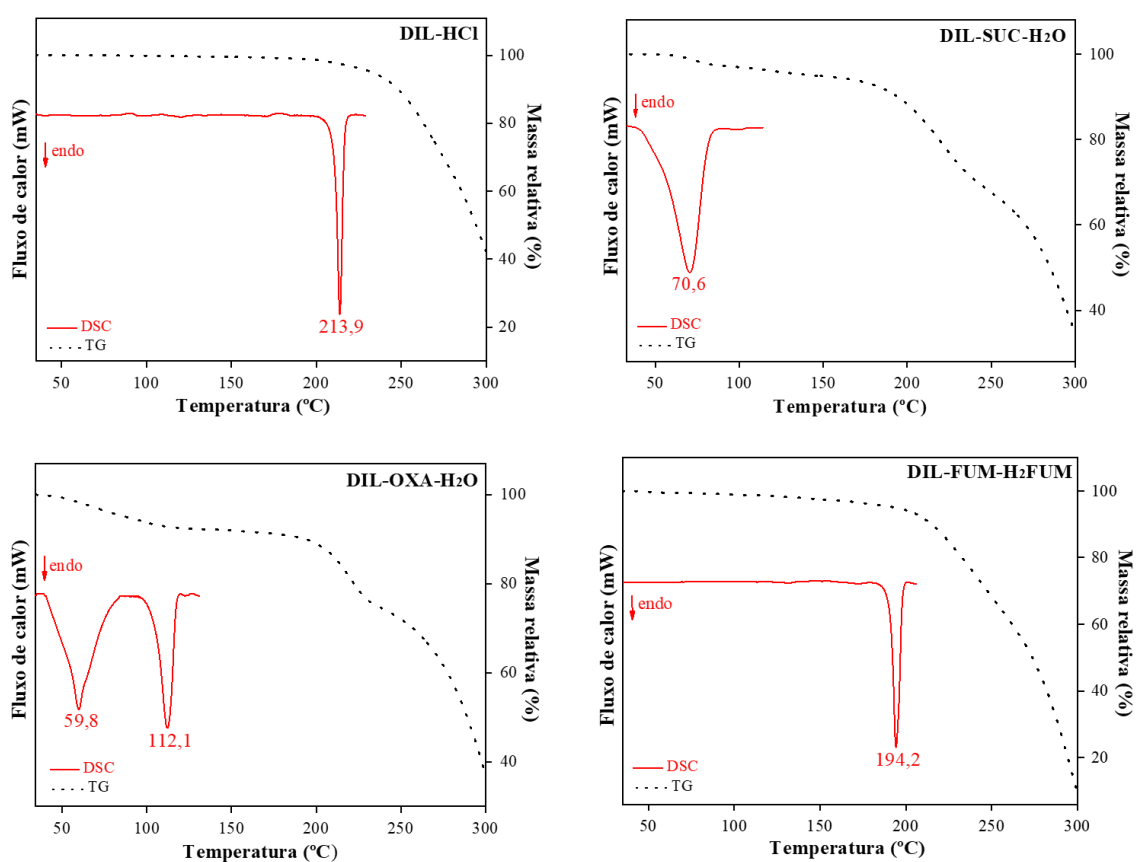
* Somatório das interações dentro do raio de 3,8 Å dividido pelo número de interações.

5.3.5 Caracterização térmica

A análise térmica do sal DIL-HCl bem como das novas modificações cristalinas descritas neste trabalho foi realizada por meio das técnicas de caracterização DSC, TG e TOA. O uso combinado dessas técnicas permitiu a interpretação inequívoca dos eventos térmicos observados. Conforme mostrado na Figura 44, todas as curvas DSC possuem apenas eventos endotérmicos, que foram atribuídos aos processos de desidratação e/ou fusão dos cristais. A curva DSC do sal DIL-HCl por exemplo, caracterizou-se pela presença de um único pico endotérmico em 213,9 °C ($T_{on-set} = 211,5$ °C, $\Delta H = -91,54$ J g⁻¹) atribuído à fusão do fármaco. Na curva TG, observou-se que a degradação ocorreu basicamente em uma única etapa com o início de perda de massa em torno de 220 °C. Por outro lado, o sal DIL-OXA-H₂O possui uma curva DSC que é constituída por dois picos endotérmicos, sendo o primeiro em 59,8 °C ($T_{on-set} = 43,27$ °C e $\Delta H = -72,53$ J g⁻¹) e o

segundo em 112,1 °C ($T_{on-set} = 105,98$ °C e $\Delta H = -43,03$ J g⁻¹). Tais eventos térmicos foram correlacionados à desidratação e fusão do composto, respectivamente, uma vez que a curva TG mostrou uma primeira etapa de perda de massa (de cerca de 7,1%) que ocorreu entre 40 e 110 °C e foi associado a saída de duas moléculas de água do cristal (cuja massa calculada representa 7,0%), bem como uma segunda etapa de perda de massa que se iniciou em ~195 °C e foi atribuída à degradação do sal.

Figura 44 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos compostos: cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).

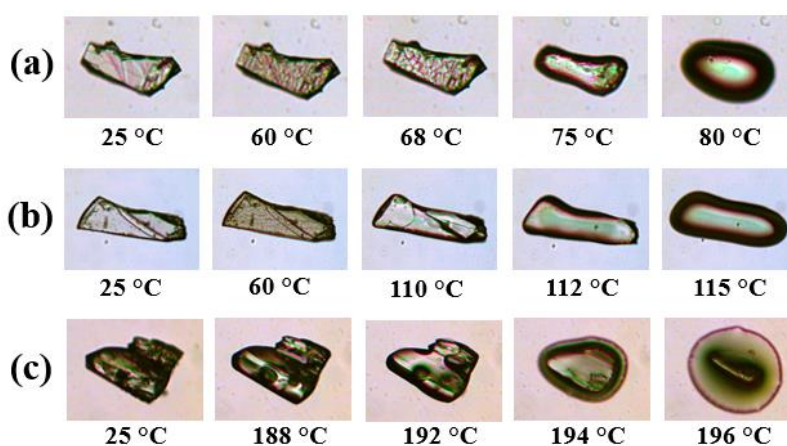


Na curva DSC do sal DIL-SUC-H₂O, um pico endotérmico alargado e centrado em 70,6 °C ($T_{on-set} = 54,28$ °C, $\Delta H = -182,57$ J g⁻¹) foi observado, estando associado aos processos de desidratação/fusão da forma sólida. Tal evidência está de acordo com a perda de massa inicial de ~3,0 % ocorrida entre 50 e 100 °C na curva TG e que representou a saída de uma molécula de água (cujo valor calculado é 3,2%) da rede cristalina. Ainda de acordo com a curva TG do sal DIL-SUC-H₂O, uma segunda etapa de perda de massa só voltou a ocorrer em ~175 °C, indicando que o pico endotérmico da curva DSC representou não só a desidratação, como também a fusão do composto. Por fim, o

comportamento térmico do sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM se mostrou bastante diferente daquele observado para os sais hidratados DIL-OXA-H₂O e DIL-SUC-H₂O. A curva DSC da referida modificação cristalina caracterizou-se pela presença de um pico endotérmico único e muito bem definido em 194,2 °C ($T_{on-set} = 191,76$ °C, $\Delta H = -95,59$ J g⁻¹) que foi atribuído à fusão da amostra. Além disso, o sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM mostrou ser termicamente estável até aproximadamente 202 °C, já que somente a partir dessa temperatura foi possível notar na curva TG, o início de uma gradual perda de massa que está relacionada a degradação da forma sólida.

Os experimentos de TOA foram conduzidos visando acompanhar em tempo real as transformações que aconteceram nos cristais, mediante o aquecimento dos mesmos. A interpretação dos resultados observados nas curvas de DSC e TG dos compostos estudados foi confirmada com sucesso pelas imagens obtidas por TOA (Figura 45). Primeiramente, as imagens confirmaram que os cristais dos sais hidratados DIL-SUC-H₂O e DIL-OXA-H₂O e do sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM começam a fundir em torno das seguintes temperaturas: 68 °C, 110 °C e 192 °C, concordando com os picos endotérmicos de fusão observados nas curvas DSC desses compostos. Além disso, foi possível observar que os cristais dos sais DIL-SUC-H₂O e DIL-OXA-H₂O mudaram de cor, tornando-se levemente opacos em aproximadamente 60 °C. Tal fenômeno está relacionado ao processo de desidratação das amostras.

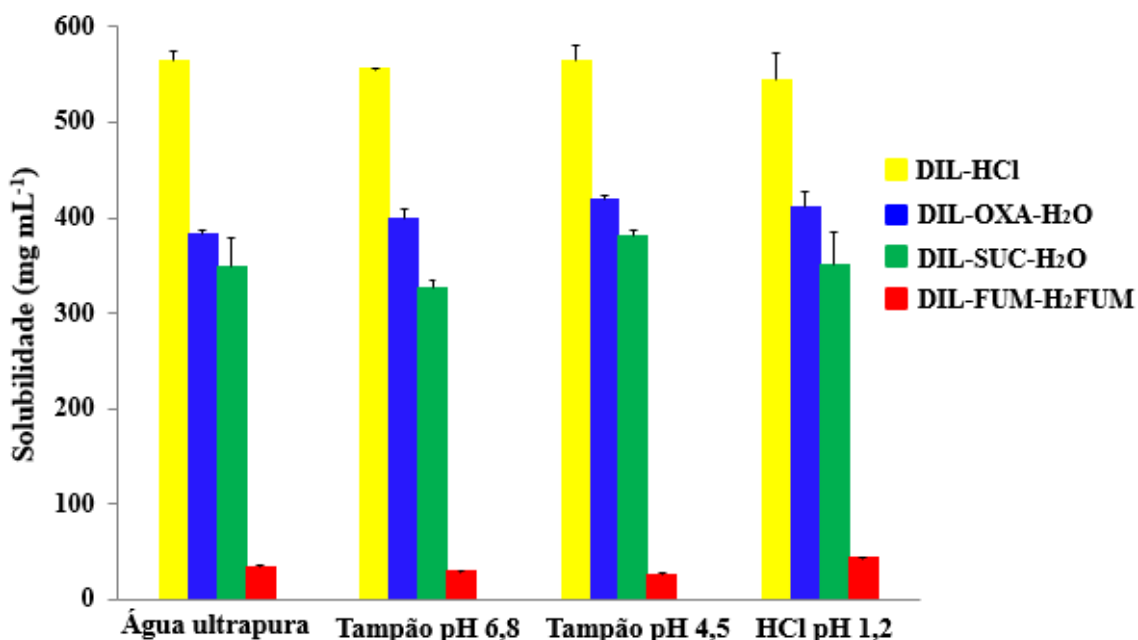
Figura 45 - Imagens obtidas por análise termo-ótica a partir de monocristais dos compostos (a) succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O), (b) oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O) e (c) fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).



5.3.6 Determinação da solubilidade e dissolução intrínseca

Para fármacos de elevada solubilidade que, por consequência, apresentam curto tempo de meia-vida, como é o caso do sal DIL-HCl, o planejamento de novas formas sólidas menos solúveis e de dissolução mais lenta configura uma das premissas mais importantes quando se pensa em formulações de liberação prolongada. Assim, uma avaliação da solubilidade em equilíbrio do sal DIL-HCl bem como das novas formas sólidas de DIL propostas nesta tese em meios que mimetizam o pH fisiológico (HCl 0,1 M pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8) bem como em água purificada foi realizada e os resultados são mostrados na Figura 46. Nota-se que, embora os sais hidratados DIL-SUC-H₂O e DIL-OXA-H₂O ainda sejam considerados facilmente solúveis, com valores de solubilidade nos diferentes meios relativamente próximos aos encontrados para o sal DIL-HCl, o sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM promoveu uma diminuição substancial na solubilidade do fármaco.

Figura 46 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).



Primeiramente, a solubilidade do sal DIL-HCl em todos os meios de dissolução se mostrou, de fato, elevada, variando de $545,01 \pm 28,48$ a $565,13 \pm 9,96$ mg mL⁻¹, exibindo ótima concordância com os valores reportados na literatura (SOOD; PANCHAGNULA, 1998). Os sais hidratados DIL-SUC-H₂O e DIL-OXA-H₂O possuem

solubilidade semelhantes entre si (Tabela 40), sendo ambos ligeiramente menos solúveis (de 1,6 a 1,5 vezes) em relação à forma DIL-HCl. Em contrapartida, para o sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM, dada a maior coesão e eficiência de seu empacotamento cristalino que é corroborado pela menor energia de rede do composto, verifica-se uma solubilidade consideravelmente menor do fármaco nos meios de dissolução avaliados (Figura 46), com reduções de 12,5 a 21,4 vezes em relação à solubilidade do sal DIL-HCl. Do ponto de vista cristalográfico, estas pronunciadas diferenças na solubilidade do DIL se devem, em grande parte, às distintas arquiteturas supramoleculares das formas sólidas. Nos sais de DIL, conforme discutido ao longo da seção 5.3.1, as estruturas cristalinas são dominadas por regiões hidrofílicas, onde se inserem as moléculas dos ânions e água, formando arranjos em colunas. Este tipo de configuração cristalina parece tornar o processo de solubilização do fármaco mais facilitado. Em contraste, pelo fato das moléculas estarem dispostas de uma maneira diferente na estrutura do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM, sem a formação de colunas e com menor exposição dos domínios polares das moléculas, a solubilização do DIL encontra maior dificuldade, sendo tal constatação corroborada pelos menores valores de solubilidade encontrados para esta forma sólida.

Tabela 40 - Dados biofarmacêuticos dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM).

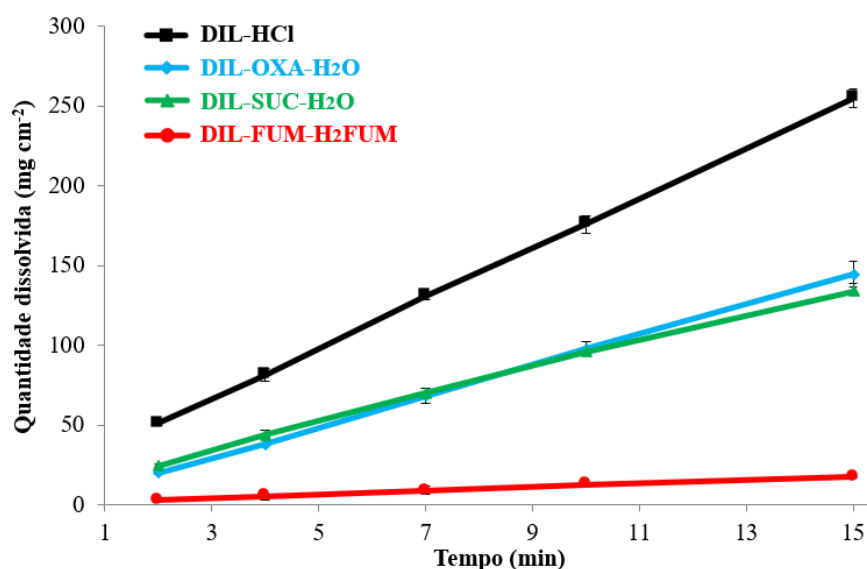
Composto	Solubilidade média (mg mL ⁻¹)	VDI (mg cm ⁻² min ⁻¹)
DIL-HCl	565,13	15,68
DIL-SUC-H₂O	348,07 (1,6×)	8,41 (1,9×)
DIL-OXA-H₂O	382,71 (1,5×)	9,65 (1,7×)
DIL-FUM-H₂FUM	34,25 (16,5×)	1,14 (13,8×)

Os números entre parênteses expressam a magnitude de diminuição.

Com a avaliação comparativa dos perfis de dissolução intrínseca das formas sólidas de DIL, foi possível não somente determinar as diferentes VDIs do fármaco (dada pela inclinação das retas) como também entender o quanto as distintas estruturas de estado sólido foram capazes de modular a quantidade de DIL dissolvida em função do tempo. A Figura 47 sumariza todas essas informações e deixa evidente a grande diferença de VDI dos compostos DIL-HCl (maior observada) e DIL-FUM-H₂FUM (menor observada). Vale ressaltar que os sais DIL-OXA-H₂O ($9,65 \pm 1,51$ mg cm⁻² min⁻¹) e DIL-SUC-H₂O ($8,41 \pm 0,94$ mg cm⁻² min⁻¹) também exibiram velocidades de dissolução de 1,7 e 1,9 vezes menores, respectivamente, em comparação com o sal DIL-HCl ($15,68 \pm 2,45$ mg cm⁻² min⁻¹). Entretanto, como já mencionado, a VDI do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM

foi cerca de $13,7 (1,14 \pm 0,34 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1})$ vezes menor que a observada para o sal DIL-HCl, confirmando que a cocristalização do DIL com ácido fumárico foi a que exerceu maior influência na redução da velocidade de dissolução intrínseca do fármaco. Esta diferença está possivelmente associada à estrutura cristalina do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM que se caracteriza por dispor as moléculas de DIL no estado sólido mais eficientemente empacotadas, comparado aos outros sais avaliados, o que influencia, em parte, a cinética de dissolução das moléculas.

Figura 47 - Perfil de dissolução intrínseca dos sais cloridrato de diltiazem (DIL-HCl), oxalato de diltiazem di-hidratado (DIL-OXA-H₂O), succinato de diltiazem mono-hidratado (DIL-SUC-H₂O) e fumarato-ácido fumárico de diltiazem (DIL-FUM-H₂FUM) em água ultrapura.



5.3.7 Validação de método analítico para quantificação de diltiazem por CLAE-UV

Na quantificação do analito de interesse (fármaco DIL), optou-se por empregar o método analítico desenvolvido e validado por Souza e colaboradores (SOUZA *et al.*, 2017). Comparando o trabalho reportado por estes autores com o que se realizou nessa tese, notou-se um objetivo comum que foi a quantificação do fármaco DIL a partir de amostras provenientes de experimentos de dissolução empregando-se um método cromatográfico (CLAE-UV). Sabendo-se que o método foi reproduzido na íntegra e que sua seletividade foi devidamente comprovada pelos autores que o reportaram, julgou-se não ser necessário validar este parâmetro novamente. Além disso, nas condições experimentais praticadas nos experimentos de solubilidade e dissolução intrínseca, o fármaco DIL não sofre degradação (SOUZA *et al.*, 2017). Um único ponto adicional que precisou ser avaliado foi a possibilidade das moléculas dos contra-íons/coformadores

(SUC⁻, OXA⁻, FUM²⁻ e H₂FUM) que compõem as estruturas das novas formas sólidas de DIL coeluírem junto com o fármaco. Para isso, soluções preparadas a partir destes novos sais foram injetadas empregando-se o método analítico proposto, não sendo detectados quaisquer picos adicionais nos cromatogramas que pudessem ser atribuídas a essas moléculas, o que já era esperado dada a polaridade destas espécies que, por consequência, tendem a não ficar retidas no sistema cromatográfico. Assim, o método empregado provou ser seletivo para a quantificação do fármaco DIL.

A avaliação do efeito matriz mostrou que a inclinação (coeficiente angular) da curva de calibração usual (construída em água ultrapura) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação às inclinações das curvas matrizadas (preparadas nos diferentes meios de dissolução), conforme mostrado na Tabela 41. Além do paralelismo observado entre as retas, os valores de *t* calculado (1,32-1,68) foram inferiores ao valor de *t* crítico (2,78), comprovando a ausência de efeito de matriz significativo no método. Assim, concluiu-se que para os demais parâmetros validados, as soluções de DIL poderiam ser preparadas apenas em água ultrapura.

Tabela 41 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de DIL.

Meio de dissolução utilizado no preparo da curva	Faixa de concentração (µg mL ⁻¹)	Regressão linear	
		Coeficiente angular (<i>a</i>)	R ²
Água ultrapura	1,0-9,0	54728	0,9997
Tampão fosfato pH 6,8		55668	0,9995
Tampão acetato pH 4,5		57006	0,9995
HCl 0,1 M pH 1,2		57153	0,9998

A linearidade do método foi verificada na faixa de trabalho de 1,0 a 9,0 µg mL⁻¹ empregando-se o MMQO. A faixa de trabalho escolhida para validação compreendeu as concentrações de DIL previstas para os experimentos de dissolução intrínseca. A significância da regressão, a avaliação da falta de ajuste, bem como a verificação das premissas da linearidade, foram todas consideradas no estudo da linearidade. Os resultados dos testes estatísticos que comprovaram a linearidade do método na faixa de 1,0 a 9,0 µg mL⁻¹ são mostrados na Tabela 42. Nota-se que o modelo da regressão é linear do tipo $y = ax + b$, sendo *y* a área sob o pico do analito de interesse (DIL), *a* o coeficiente angular, *x* a concentração nominal de DIL e *b* o coeficiente linear.

Tabela 42 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de DIL.

Item avaliado	Analito de interesse (DIL)
Equação da reta	$y = 57984 - 9834,9$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9998
Modelo estatístico	MMQO
<i>Outliers</i> descartados	Nenhum
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9891 > 0,9383)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,3596 < 1,8953 < 2,6404)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,0621 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,3143 > 0,0500)

O método analítico se mostrou preciso, uma vez que houve proximidade entre os valores de concentração de soluções de DIL avaliadas nas condições de repetibilidade (mesmo dia e analista) e de precisão intermediária (dias e analistas diferentes). Os valores de DPR calculados a partir das nove determinações, que foram preparadas em triplicata nas concentrações de 1,0; 5,0 e 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram inferiores a 2%, conforme mostrado na Tabela 43. O método também se mostrou exato dada a concordância observada entre os resultados de concentração de cada determinação em relação ao valor tido como verdadeiro. Neste sentido, a exatidão foi comprovada baseado nos valores médios de recuperação de DIL nos níveis de concentração 1,0; 5,0 e 9,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que se encontram entre 98 e 102% (Tabela 43).

Tabela 43 - Resultados de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de DIL.

Nível de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão		Exatidão
	DPR (%) repetibilidade	DPR (%) precisão intermediária	Recuperação média (%)
1,0	1,31	1,67	101,78
5,0	0,43	0,78	99,17
9,0	0,42	0,53	100,31

Por fim, a estimativa dos limites de quantificação e detecção foi realizada baseando-se nos parâmetros das curvas de calibração. As estimativas do LQ e do LD serviram para mostrar até quais concentrações o método seria capaz de quantificar e

detectar, com precisão e exatidão aceitáveis, o analito de interesse (fármaco DIL). Os valores de LQ e LD encontrados foram $0,069 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,023 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

5.3.8 Impactos das novas formas sólidas de diltiazem

Nesta seção 5.3 foram apresentados dois novos sais hidratados, DIL-OXA-H₂O e DIL-SUC-H₂O, e um sal-cocristal, DIL-FUM-H₂FUM, do fármaco DIL. As três formas sólidas foram sintetizadas por meio de reações do DIL base livre com os ácidos succínico, oxálico e fumárico, visando reduzir a solubilidade e a velocidade de dissolução intrínseca do DIL. Na análise químico-estrutural e biofarmacêutica das novas modificações cristalinas, verificou-se que a mudança do contra-íon Cl⁻ pelos contra-íons SUC⁻ e OXA⁻ que teve ainda a incorporação adicional de água, levou à formação de sais hidratados ligeiramente menos solúveis em relação à forma DIL-HCl. Apesar das formas sólidas DIL-OXA-H₂O e DIL-SUC-H₂O terem sido capazes de aumentar a ocorrência de interações estabilizadoras no estado sólido, o que foi corroborado pela diminuição dos valores de energia de rede, os seus respectivos arranjos cristalinos com as moléculas de cátions DIL⁺, ânions SUC⁻/OXA⁻ e água dispostas na forma de colunas ainda se assemelham muito ao arranjo do sal DIL-HCl. O sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM, entretanto, exibiu uma configuração de estado sólido distinta da observada para os demais sais de DIL, com um empacotamento cristalino não-colunar e de menor energia (mais estável), o que certamente contribuiu para a redução significativa da solubilidade e dissolução intrínseca do fármaco. Tais evidências sugerem que a utilização do sal-cocristal DIL-FUM-H₂FUM em formulações farmacêuticas, ao invés do sal DIL-HCl, poderiam prolongar o tempo de meia-vida do fármaco, o que já traria uma enorme contribuição para a terapia anti-hipertensiva baseada em DIL. Dada a relevância destes resultados, os mesmos foram publicados na conceituada revista *International Journal of Pharmaceutics* em junho de 2021 (DINIZ *et al.*, 2021).

5.4 Novos sais do fármaco metformina e suas propriedades biofarmacêuticas

Nesta última seção são apresentados os resultados referentes ao desenvolvimento de três novos sais do fármaco antidiabético metformina. Todos os sais foram obtidos a partir de reações, com posterior etapa de cristalização, da MET base livre com os coformadores ácido maleico, ácido malônico e sacarina. Os sais resultantes maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC) tiveram suas respectivas estruturas cristalinas determinadas por DRXM com sucesso. Devido a elevada basicidade da molécula (pKa de 12,4) (DESAI *et al.*, 2014), somente a obtenção de sais é prevista para reações da MET base livre com coformadores orgânicos em geral, já que o ΔpK_a resultante das reações é invariavelmente superior a 3 unidades. Além disso, a molécula de MET exibe tautomerismo amino-imino com a possibilidade de ocorrência de diferentes espécies tautoméricas (WEI *et al.*, 2014). Entretanto, quando protonada, o cátion de metformina resultante (MET⁺) não apenas restringe significativamente a ocorrência de tautomerismo, como também proporciona a formação de uma espécie monoprotonada estável, sendo inclusive a forma mais recorrente nas estruturas cristalinas reportadas na literatura contendo o cátion MET⁺ (BHARATAM *et al.*, 2005). Por tais motivos, a obtenção de novos sais de MET se mostra uma tarefa desafiadora.

Em virtude da alta solubilidade do fármaco atrelada à sua baixa permeabilidade (classe III do SCB) (CHENG *et al.*, 2004), o sal MET-HCl, forma comercialmente difundida do IFA, é conhecida por ocasionar desconforto gastrointestinal em cerca de 20-30% dos pacientes submetidos ao uso contínuo do fármaco (MCCREIGHT *et al.*, 2016). Uma das possíveis causas da prevalência deste efeito adverso, seria o acúmulo de MET-HCl no trato gastrointestinal que ocorre devido a rápida solubilização e lenta permeação do ativo (OCHOA; FRANCISCO, 2012). Tal fato é agravado pela alta dosagem de MET-HCl no medicamento (850-1000 mg), que eleva consideravelmente a concentração de cátions MET⁺ e ânions Cl⁻ no microambiente intestinal, causando irritabilidade e desconforto na região. Dada a prevalência da diabetes *mellitus* que, por consequência, torna a farmacoterapia baseada em MET ainda muito demandada, diversas abordagens tecnológico-farmacêuticas que visam minimizar a ocorrência de tais efeitos adversos são encontrados na literatura (ALI *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2006; CORTI *et al.*, 2008; HUNT *et al.*, 2021). A estratégia de formação de sais ainda é pouco explorada, sendo poucas as estruturas cristalinas derivadas de MET reportadas na literatura (NANUBOLU *et al.*,

2013; KIM; PARK, 2015). Sem contar que, nestes poucos trabalhos, uma avaliação da possível melhoria do perfil biofarmacêutico do fármaco não foi, satisfatoriamente, mostrada. Neste sentido, os três novos sais de MET planejados, empregando-se coformadores de baixa toxicidade e reconhecidos como seguros, são promissores não só pela ausência de ânions cloreto (Cl^-) nas modificações cristalinas propostas, mas principalmente pelo fato destes novos sais oferecerem a possibilidade de aprimorar o perfil biofarmacêutico do fármaco. Assim, uma descrição cristalográfica detalhada do empacotamento cristalino dos sais MET-MAL, MET-MLN e MET-SAC foi feita visando correlacionar as características estruturais destes compostos que explicassem os resultados encontrados nos experimentos de solubilidade, dissolução intrínseca e permeabilidade, aos quais aos novos sais de MET foram submetidos.

5.4.1 Análise das estruturas cristalinas

A resolução das estruturas cristalinas por DRXM confirmou que as reações da MET base livre com o ácido maleico, ácido malônico e sacarina resultaram na formação, conforme esperado, dos sais correspondentes maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC). Primeiramente, a confirmação da natureza iônica das formas sólidas obtidas foi feita medindo-se a diferença do comprimento das ligações C–O ($\Delta D_{\text{C-O}}$) dos grupos carboxílicos nas moléculas dos ânions maleato e malonato e pela análise do ângulo diedral S1–N6–C5 da porção não-aromática da molécula do ânion sacarinato. É bem estabelecido que quando o comprimento das ligações C–O são próximos ($\Delta D_{\text{C-O}} < 0,03 \text{ \AA}$), há um forte indicativo de que o grupo carboxílico se encontra carregado na forma de um ânion carboxilato (CHILDS *et al.*, 2007). Já o ângulo diedral S1–N6–C5 da sacarina, que é sensível ao processo de desprotonação e assume um valor de $\sim 115^\circ$ na forma neutra, aparece reduzido quando o ânion sacarinato é formado. Além disso, a comprovação inequívoca da formação dos novos sais de MET foi possível analisando-se os mapas de diferença de densidade eletrônica dos compostos, sendo estabelecido, inclusive, a real posição dos átomos de hidrogênio e, conseqüentemente, os átomos envolvidos nos processos de protonação/desprotonação. Na Tabela 44 estão descritos os dados cristalográficos e os detalhes dos refinamentos dos três novos sais propostos e nos subitens subsequentes (5.4.1.1, 5.4.1.2 e 5.4.1.3) são discutidos os aspectos cristalográficos relevantes de cada modificação cristalina.

Tabela 44 - Dados cristalográficos e detalhes dos refinamentos dos sais de metformina.

Identificação do cristal	MET-MAL	MET-MLN	MET-SAC
Fórmula empírica	C ₈ H ₁₅ N ₅ O ₄	C ₇ H ₁₅ N ₅ O ₄	C ₁₁ H ₁₆ N ₆ O ₃ S
Peso molecular	245,25	233,24	312,36
Temperatura (K)	298(2)	298(2)	298(2)
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c	P2 ₁ /n
a (Å)	10,5887(8)	12,5378(5)	7,7925(4)
b (Å)	8,8945(5)	5,0060(2)	15,5421(6)
c (Å)	13,6358(9)	17,6122(7)	11,8517(6)
α (°)	90	90	90
β (°)	107,807(8)	91,971(4)	92,794(5)
γ (°)	90	90	90
Volume (Å ³)	1222,71(15)	1104,76(8)	1433,67(12)
Z / Z'	4 / 1	4 / 1	4 / 1
ρ _{calc} (g cm ³)	1,332	1,402	1,447
μ (mm ⁻¹)	0,108	0,115	0,247
Reflexões coletadas	10063	16230	14685
Reflexões independentes	2902	2743	3564
R ₁ [I ≥ 2σ(I)]	0,0495	0,0400	0,0460
wR ₂ [all data]	0,1336	0,1169	0,1212
S	1,010	1,027	1,065

5.4.1.1 Sal maleato de metformina

O sal maleato de metformina (MET-MAL) cristalizou-se no grupo espacial monoclínico $P2_1/n$ e a sua unidade assimétrica (Figura 48) é constituída por uma molécula de MET protonada (cátion MET⁺) e um ânion hidrogenomaleato (MAL⁻), formando um par iônico na proporção estequiométrica de 1:1. A desprotonação parcial da molécula de ácido maleico concorda com os valores desiguais de ΔD_{C-O} observados para os grupos carboxílicos da estrutura (0,010 Å e 0,076 Å), sugerindo que o grupo, cujo ΔD_{C-O} é menor que 0,03 Å, está na forma de carboxilato. Para ácidos carboxílicos de isomeria *cis*, a configuração plana assumida pela molécula favoreceu a ocorrência de uma ligação de hidrogênio intramolecular do tipo O–H...O (O3–H3...O1, 2,427 Å, 178°). Este fenômeno, característico do ânion maleato, faz com que as moléculas liberem apenas um próton, já que o outro está envolvido na ligação de hidrogênio intramolecular (STEINER, 1999). Tais evidências concordam com o mapa de diferença de densidade eletrônica deste sal (Figura 49) que também evidencia que os átomos N1, N2 e N4 do cátion MET⁺

correspondem aos grupos amina, enquanto os átomos N3 e N5 são de nitrogênios imínicos. Para fins de caracterização, os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio do sal MET-MAL são listados na Tabela 45.

Figura 48 - Unidade assimétrica do sal maleato de metformina (MET-MAL). Elipsóides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

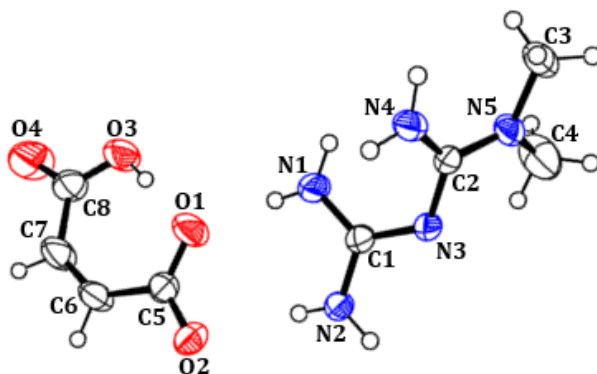
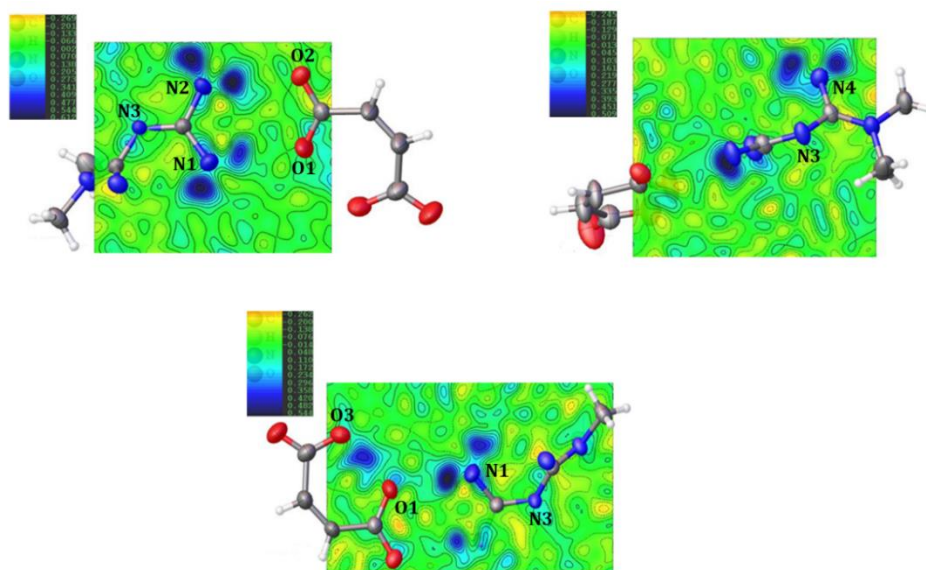


Tabela 45 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal maleato de metformina (MET-MAL).

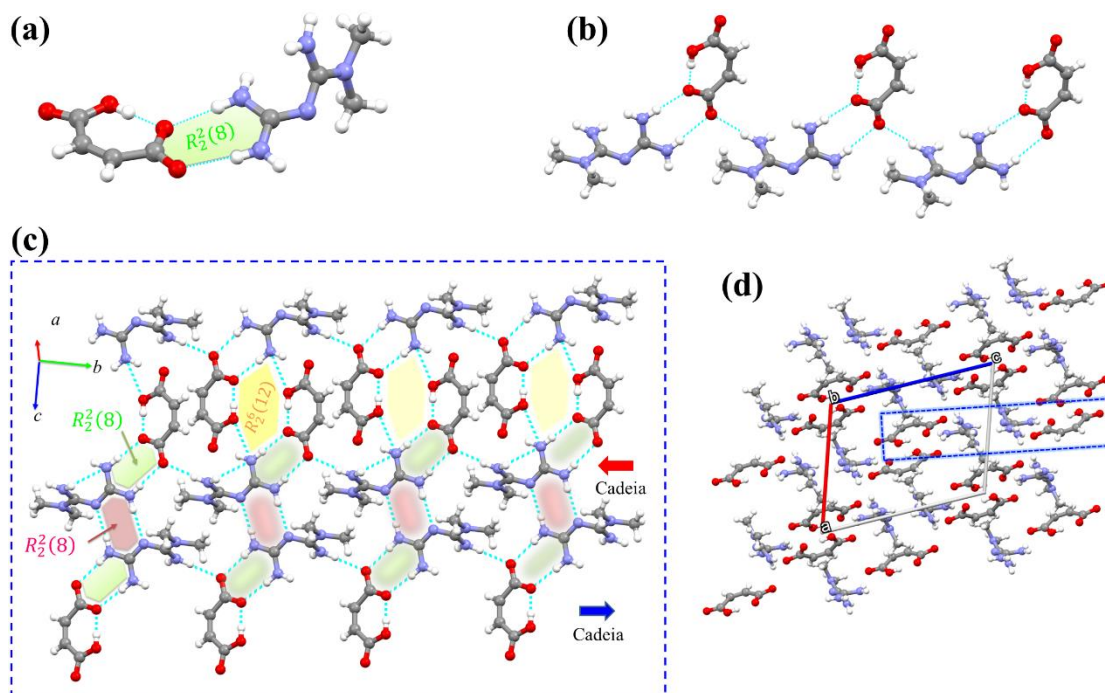
Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
N1-H1B...O1	2,897(2)	178	x,y,z
N2-H2A...O2	3,052(2)	167	x,y,z
N1-H1A...O3	3,060(3)	127	$-x+1,-y+1,-z+1$
N2-H2B...N3	3,058(2)	174	$-x+1,-y+1,-z$
N4-H4A...O2	2,996(2)	175	$x,+y+1,+z$
N4-H4B...O2	3,016(2)	161	$-x+1/2+1,+y+1/2,-z+1/2$

Figura 49 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion MET⁺ e do ânion MAL⁻ do sal MET-MAL. As regiões em azul representam posições ocupadas por átomos de hidrogênio. A escala numérica do mapa é dada por e.Å⁻³.



Na estrutura cristalina do maleato de metformina, o par iônico $\text{MET}^+\cdot\text{MAL}^-$, que constitui a unidade assimétrica, interage entre si gerando um padrão de interação tipo anel com código $R_2^2(8)$, sendo definido por duas ligações do tipo $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ que envolvem os grupos carboxilato do ânion MAL^- e aminas da porção terminal do cátion MET^+ (Figura 50a). Adicionalmente, ao longo do eixo cristalográfico b , uma cadeia unidimensional (1D) de pares iônicos $\text{MET}^+\cdot\text{MAL}^-$ é formada *via* ligações de hidrogênio do tipo $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ ($\text{N4}-\text{H4A}\cdots\text{O2}$, 2,996(2) Å, 175°), envolvendo os grupos amina do cátion MET^+ e carboxilato do ânion MAL^- (Figura 50b). Nota-se ainda que, ao longo do eixo cristalográfico c , as cadeias 1D estão associadas umas às outras por ligações de hidrogênio do tipo $\text{N}-\text{H}\cdots\text{N}$, gerando um segundo padrão de interação tipo anel com código $R_2^2(8)$ entre cátions MET^+ que se encontram relacionados por um centro de inversão na estrutura. Consequentemente, uma folha bidimensional (2D) é formada, mantendo-se os ânions MAL^- para fora desse arranjo (Figura 50c). As folhas 2D adjacentes estão conectadas *via* ligações de hidrogênio do tipo $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ ($\text{N1}-\text{H1B}\cdots\text{O1}$, 2,897(2) Å, 178° e $\text{N1}-\text{H1A}\cdots\text{O3}$, 3,060(3) Å, 127°) entre os grupos amina terminal do cátion MET^+ e carboxílico do ânion MAL^- com a formação de mais um padrão de interação tipo anel, neste caso com código $R_6^2(12)$. Como resultado, os íons MET^+ e MAL^- estão dispostos alternadamente em camadas na estrutura cristalina. Por fim, o empilhamento das folhas 2D ao longo do eixo cristalográfico a , que ocorre por intermédio das ligações de hidrogênio $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ ($\text{N4}-\text{H4B}\cdots\text{O2}$, 3,016(2) Å, 161°), gera o empacotamento cristalino 3D do sal MET-MAL, conforme mostrado na Figura 50d.

Figura 50 - (a) Par iônico MET⁺·MAL⁻ correspondente a unidade assimétrica do sal MET-MAL. (b) Cadeias 1D de pares iônicos MET⁺·MAL⁻ ao longo do eixo cristalográfico *b*. (c) Folhas 2D mostrando os padrões de interações intermoleculares na estrutura. (d) Empacotamento cristalino do sal MET-MAL no plano cristalográfico *ac*.



5.4.1.2 Sal malonato de metformina

O sal malonato de metformina (MET-MLN) também cristalizou-se no sistema cristalino monoclinico, porém no grupo espacial $P2_1/c$. De maneira análoga ao observado para o sal MET-MAL, a unidade assimétrica do MET-MLN é constituída por um cátion de metformina e por um ânion hidrogenomalonato (MLN⁻), na proporção estequiométrica de 1:1. Conforme esperado, os ânions MLN⁻ exibem uma configuração *cis* plana estabilizada pela ligação de hidrogênio intramolecular curta O–H⁺···O (O3–H3⁺···O1, 2,483 Å, 157°). A transferência de um próton da molécula de ácido malônico para a molécula de MET confirma a formação do sal, o que ocasionou a protonação do átomo de nitrogênio imínico N5 (átomo carregado positivamente na estrutura). Tais evidências concordam não só com os valores de ΔD_{C-O} calculados para o ânion MLN⁻ (0,024 Å e 0,089 Å), que sugerem a ocorrência de um grupo carboxilato, mas também com os mapas de diferença de densidade eletrônica que denotam as posições ocupadas pelos átomos de hidrogênio. As Figuras 51 e 52 mostram, respectivamente, a unidade assimétrica e o mapa de densidade do sal MET-MLN e na Tabela 46 estão representados os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio.

Figura 51 - Unidade assimétrica do sal malonato de metformina (MET-MLN). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

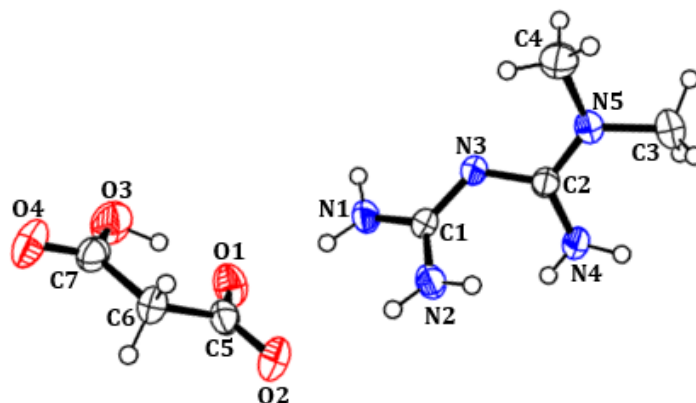
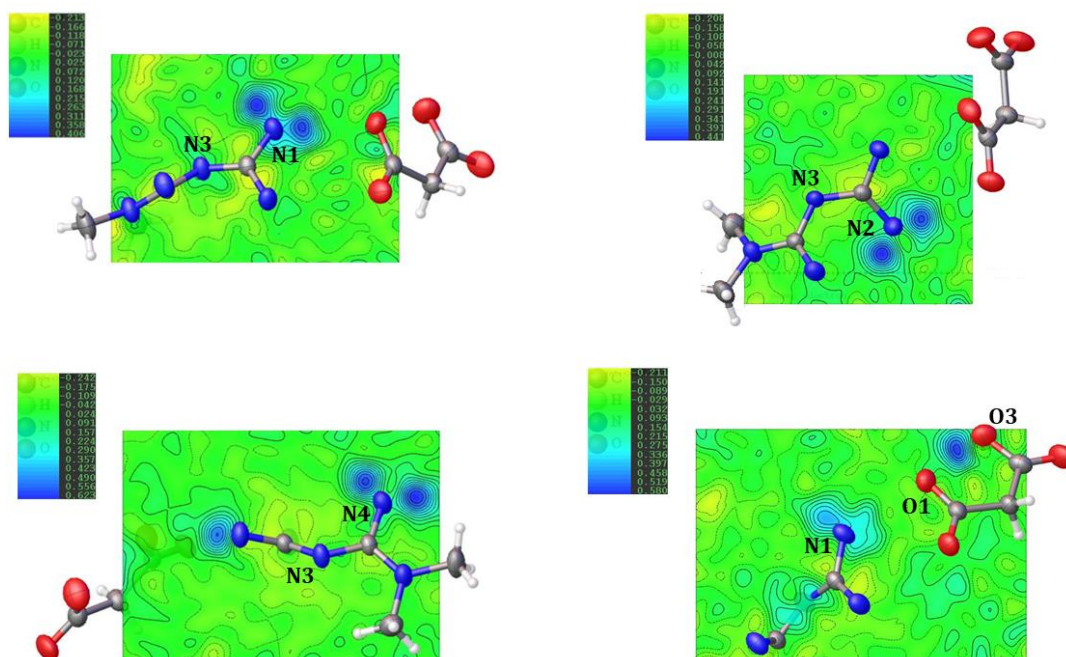


Tabela 46 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal malonato de metformina (MET-MLN).

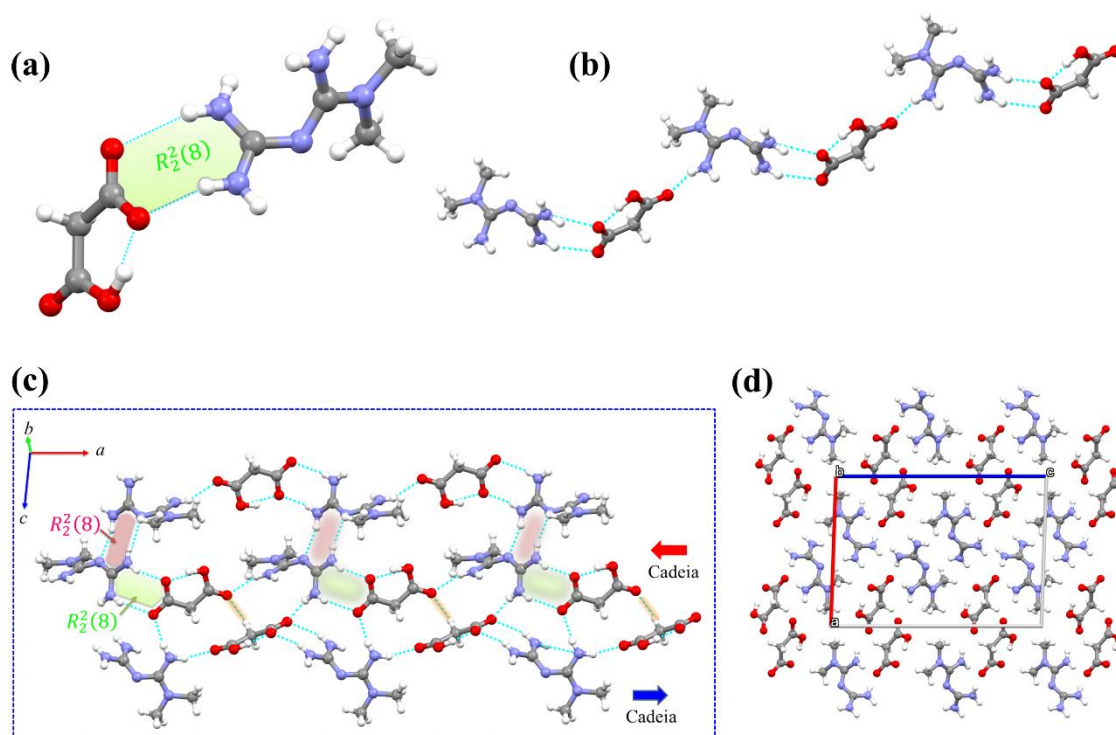
Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
N1-H1A...O1	2,857(2)	170	x,y,z
N2-H2A...O2	3,132(2)	166	x,y,z
N2-H2B...O2	2,998(2)	169	$-x+1, +y-1/2, -z+1/2+1$
N1-H1B...N3	3,053(2)	172	$-x+1, -y+1, -z+1$
N4-H4B...O2	3,004(2)	169	$-x+1, +y+1/2, -z+1/2+1$
N4-H4A...O4	2,946(2)	169	$x-1, +y, +z$
C6-H6A...O4	3,110(2)	112	$-x+2, +y+1/2, -z+1/2+1$

Figura 52 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion MET⁺ e do ânion MLN⁻ do sal MET-MLN. As regiões em azul representam posições ocupadas por átomos de hidrogênio. A escala numérica do mapa é dada por e.Å⁻³.



Apesar dos empacotamentos cristalinos dos sais MET-MAL e MET-MLN exibirem semelhanças, tais compostos não são isoestruturais (consultar Tabela 44 de parâmetros cristalográficos dos sais de MET). Na estrutura do sal MET-MLN, observa-se também a presença do par iônico $\text{MET}^+\cdot\text{MLN}^-$ estabilizado por duas ligações de hidrogênio do tipo N–H \cdots O entre os grupos carboxilato do ânion MLN^- e aminas terminais do cátion MET^+ (Figura 53a), tendo como resultante um padrão de interação tipo anel com código $R_2^2(8)$. Entretanto, ainda que a conformação dos cátions MET^+ em ambos os sais seja semelhante, o ânion MLN^- não exibe coplanaridade em relação ao plano do anel de interação $R_2^2(8)$, diferindo-o do ânion MAL^- que é coplanar. Estruturalmente, a formação da cadeia 1D de pares iônicos $\text{MET}^+\cdot\text{MLN}^-$ se dá por meio de ligações de hidrogênio do tipo N–H \cdots O (N4–H4A \cdots O4, 3,132(2) Å, 169°), que se propagam ao longo do eixo cristalográfico *a* (Figura 53b). A formação de folhas 2D ocorre, em parte, pelo empilhamento de cadeias 1D adjacentes na direção do eixo cristalográfico *c* (Figura 53c). Paralelamente ao eixo cristalográfico *b*, as folhas 2D também se empacotam por meio de ligações de hidrogênio do tipo N–H \cdots O (N2–H2B \cdots O2, 2,998(2) Å, 169°), envolvendo a porção amina terminal do cátion MET^+ e o grupo carboxilato do ânion MAL^- . Como resultado da montagem dessas folhas 2D, o arranjo de cátions e ânions na estrutura se dá em camadas. Entretanto, no sal MET-MLN, os ânions MLN^- têm orientação quase ortogonal entre si. Por fim, a associação das folhas 2D na estrutura do sal MET-MLN, diferentemente da observada para o sal MET-MAL, possibilitou a ocorrência de interações do tipo C–H \cdots O (C6–H6A \cdots O4, 3,110(2) Å, 112°) entre as moléculas dos ânions MLN^- . A visão geral do empacotamento 3D do sal MET-MLN, mostrando camadas catiônicas e aniônicas alternadamente dispostas na estrutura cristalina, é mostrada na Figura 53d.

Figura 53 - (a) Par iônico MET⁺·MLN⁻ correspondente a unidade assimétrica do sal MET-MLN. (b) Cadeias 1D de pares iônicos MET⁺·MLN⁻ ao longo do eixo cristalográfico *a*. (c) Montagem das cadeias de pares iônicos MET⁺·MLN⁻ resultando na formação de folhas 2D na estrutura. (d) Empacotamento cristalino do sal MET-MLN no plano cristalográfico *ac*.



5.4.1.3 Sal sacarinato de metformina

O sal sacarinato de metformina (MET-SAC) cristalizou-se no grupo espacial monoclinico $P2_1/n$ e a sua unidade assimétrica (Figura 54) é constituída por uma molécula de MET protonada (cátion MET⁺) e um ânion sacarinato (SAC⁻), formando um par iônico na proporção estequiométrica de 1:1. Devido ao caráter ácido da molécula, ocorreu a liberação do próton do nitrogênio da sacarina, resultando na protonação do átomo de nitrogênio N5 imínico da metformina. Tal evidência foi confirmada pela análise do mapa de diferença de densidade eletrônica do sal MET-SAC (Figura 55), que evidencia a ausência de densidade eletrônica significativa próximo ao átomo de nitrogênio da sacarina. Adicionalmente, o valor de $\sim 111^\circ$ encontrado para o ângulo diedral S1–N6–C5 da molécula sugere a ocorrência do ânion sacarinato na estrutura, pois na forma neutra este mesmo ângulo assumiria valores da ordem de 115° . Para melhor entendimento das interações intermoleculares responsáveis pela estabilização do sal MET-SAC, os parâmetros geométricos das principais ligações de hidrogênio estão representados na Tabela 47.

Figura 54 - Unidade assimétrica do sal sacarinato de metformina (MET-SAC). Elipsoides desenhados em um nível de 50% de probabilidade.

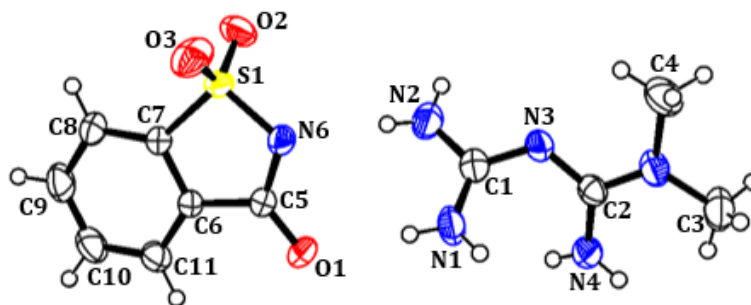
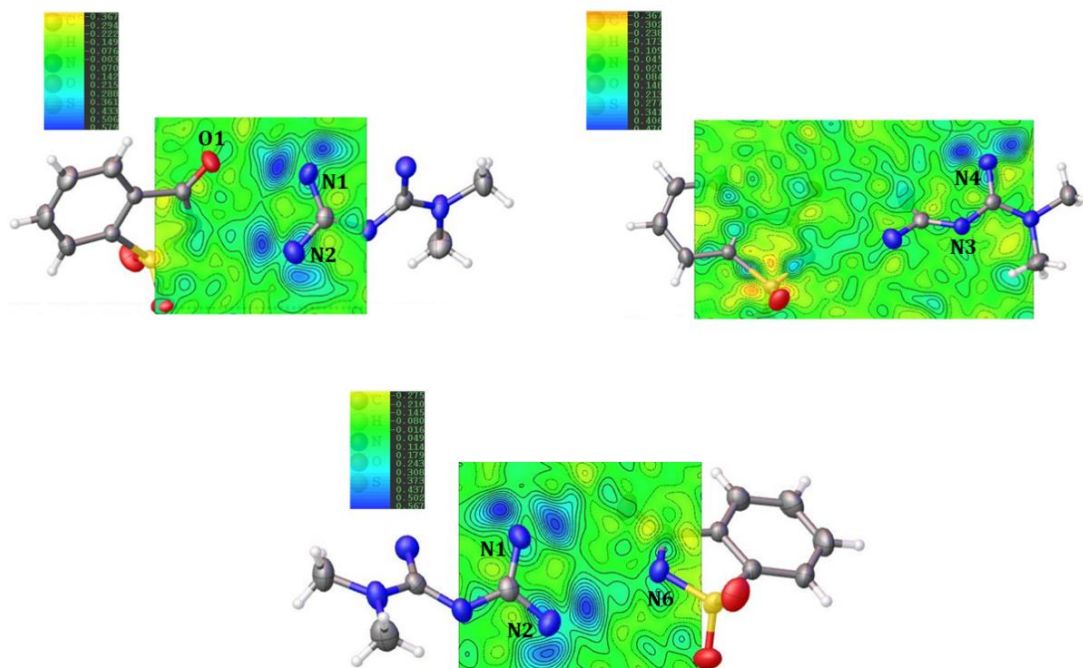


Figura 55 - Mapa de diferença de densidade eletrônica do cátion MET⁺ e do ânion SAC⁻ do sal MET-SAC. As regiões em azul representam posições ocupadas por átomos de hidrogênio. A escala numérica do mapa é dada por e.Å⁻³.



Na estrutura do sal MET-SAC, o cátion MET⁺ está conectado ao ânion SAC⁻ via ligações de hidrogênio, sendo uma N–H···O (N1–H1B···O1, 2,938(3) Å, 172°) e outra N–H···N (N2–H2A···N6, 3,127(3) Å, 166°), envolvendo as aminas terminais da metformina e a imida da sacarina (Figura 56a). Mesmo havendo uma coplanaridade parcial entre o cátion MET⁺ e o ânion SAC⁻ no par iônico da estrutura, as ligações de hidrogênio mencionadas levaram à formação do recorrente padrão de interação tipo anel com código $R_2^2(8)$. No estado sólido, os pares iônicos MET⁺·SAC⁻ formam uma unidade dimérica cuja estabilização se dá por meio de interações N–H···O (N4–H4B···O2, 3,127(3) Å, 157° e N1–H1B···O1, 2,938(3) Å, 172°). As unidades diméricas formadas se estendem sob a

forma de uma cadeia 1D ao longo da direção cristalográfica [312], sendo conectadas por ligações de hidrogênio bifurcadas do tipo C–H \cdots O (C3–H3C \cdots O2, 3,302(3) Å, 168° e C8–H8 \cdots O3, 3,510(3) Å, 175°) entre os grupos metila terminais do cátion MET⁺ e sulfonila do ânion SAC⁻ (Figura 56b). Ao longo da cadeia, os dímeros de pares iônicos encontram-se ortogonalmente orientados entre si, resultando no empacotamento 3D representado nas Figuras 56c e 56d. Por fim, na estrutura do sal MET-SAC, o homodímero usualmente formado entre cátions MET⁺ é desfeito, permitindo a ocorrência de homodímeros de ânions SAC⁻ (Figura 56e), que são estabilizados pela ligação de hidrogênio C–H \cdots O (C8–H8 \cdots O3, 3,510(3) Å, 175°).

Figura 56 - (a) Unidade assimétrica do sal MET-SAC enfatizando o par iônico MET⁺·SAC⁻ (b) Unidades diméricas de pares iônicos MET⁺·SAC⁻ ao longo da direção cristalográfica [312]. (c) Cadeias de unidades diméricas ortogonalmente dispostas na estrutura. (d) Empacotamento cristalino do sal MET-SAC no plano cristalográfico *bc*. (e) Homodímeros formados entre ânions SAC⁻.

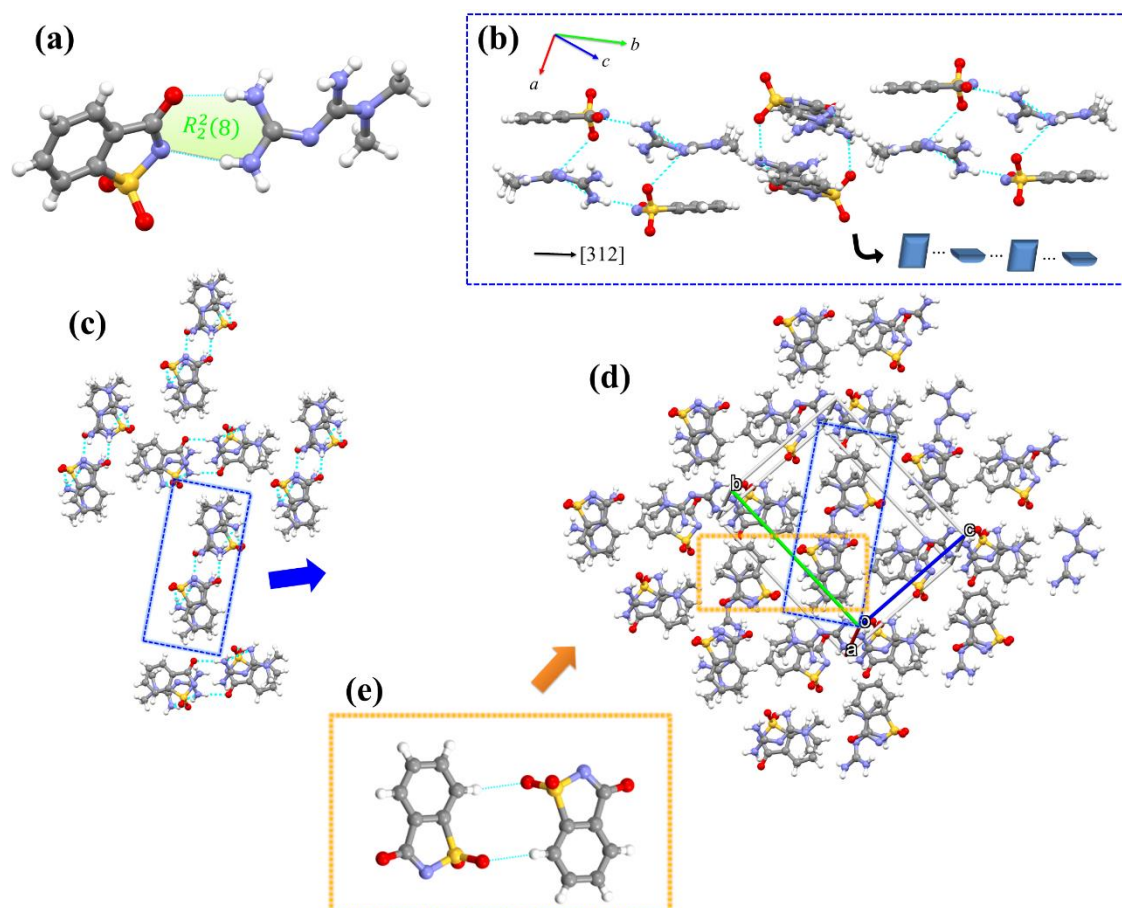


Tabela 47 - Parâmetros geométricos das ligações de hidrogênio do sal sacarinato de metformina (MET-SAC).

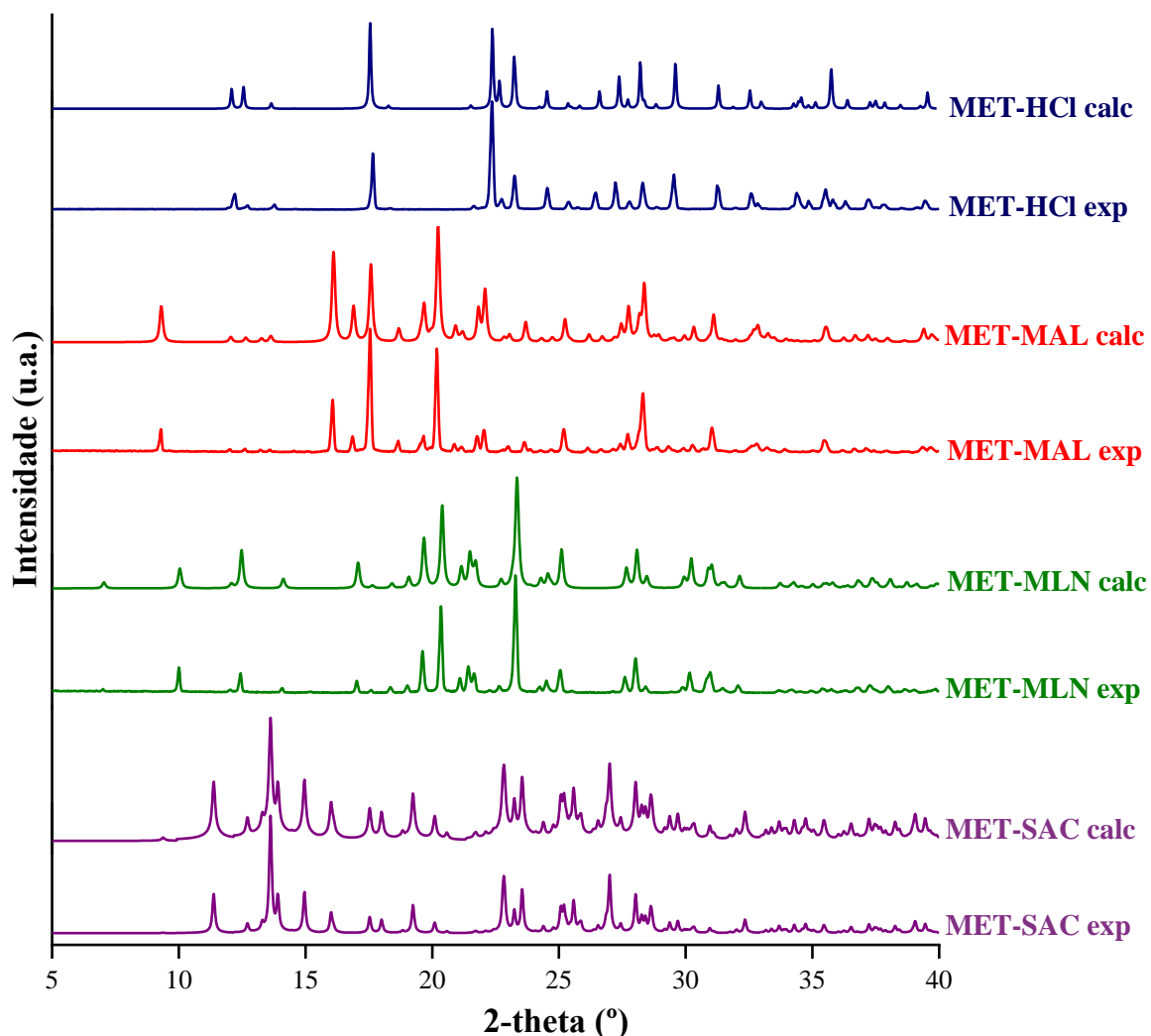
Interação	D...A(Å)	D-H...A(°)	Código de simetria
N1-H1B...O1	2.938(3)	172	x, y, z
N2-H2A...N6	3.127(3)	166	x, y, z
N1-H1A...N6	3.275(3)	155	$-x, -y+I, -z+I$
N4-H4B...O2	3.127(3)	157	$x, +y, +z+I$
N2-H2B...O1	3.472(3)	134	$-x+I, -y+I, -z+I$
N4-H4A...O3	3.057(3)	147	$-x+I, -y+I, -z+I$
C3-H3C...O2	3.302(3)	168	$x, +y, +z+I$
C8-H8...O3	3.510(3)	175	$-x+I, -y+I, -z$

5.4.2 Análise por difração de raios X por policristais

Os dados obtidos nas análises por DRXP para os sais maleato, malonato e sacarinato de MET, estão apresentados na Figura 57. O difratograma experimental de cada modificação cristalina foi comparado com o difratograma simulado a partir das respectivas estruturas cristalinas determinadas por DRXM. Uma vez que esses novos sais foram preparados partindo-se do sal MET-HCl e, posteriormente, da MET base livre, picos dessas fases cristalinas poderiam ser observados nos difratogramas experimentais caso esses materiais de partida tivessem cristalizado junto com os novos sais de MET. Dessa forma, a técnica de DRXP foi utilizada não só para comprovar se os monocristais escolhidos para os experimentos de DRXM eram representativos das amostras sintetizadas, como também para confirmar se houve a formação de uma fase cristalina inesperada durante os processos de síntese e cristalização. Caso isso tivesse ocorrido, essas fases poderiam ser facilmente detectadas no difratograma experimental que apareceriam sob a forma de picos de difração adicionais em 2θ .

A análise dos difratogramas experimentais e calculados dos novos sais de MET exibiram ótima concordância, não sendo detectados quaisquer picos adicionais em 2θ que não fossem esperados para as respectivas fases cristalinas previstas. Além disso, efeitos de orientação preferencial da amostra se mostraram discretos, já que as intensidades observadas e calculadas apresentaram poucas diferenças. Nesse sentido, os resultados de DRXP revelaram que os monocristais escolhidos para os experimentos de DRXM eram representativos de toda amostra e que os novos sais de MET sintetizados apresentaram elevada pureza, sendo fases cristalinas únicas, ou seja, sem a presença dos materiais de partida ou de qualquer outra impureza cristalina na amostra final.

Figura 57 - Difratogramas calculados (calc) e experimentais (exp) dos sais cloridrato (MET-HCl), maleato (MET-MAL), malonato (MET-MLN) e sacarinato (MET-SAC) de metformina.



5.4.3 Espectros vibracionais no infravermelho

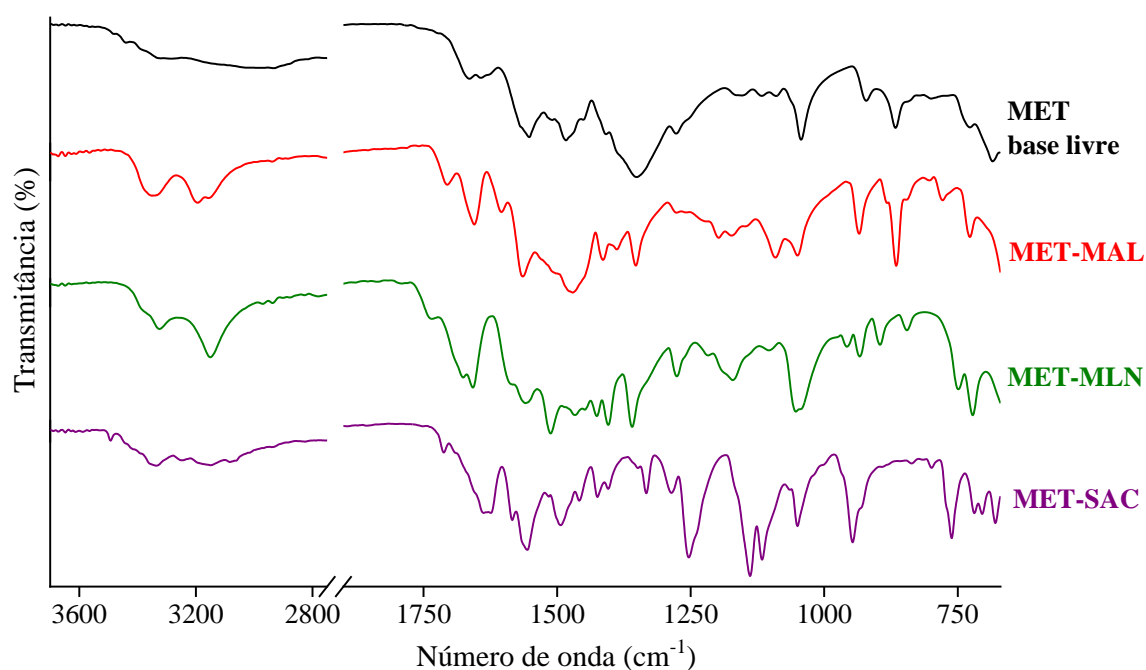
A análise dos espectros de absorção no infravermelho bem como a atribuição das principais bandas (Tabela 48) foram feitas com base nas estruturas cristalinas dos sais maleato, malonato e sacarinato de MET determinadas por DRXM. Além disso, na interpretação dos espectros, também levou-se em consideração dados espectroscópicos referentes às moléculas dos coformadores (ácidos maleico e malônico e sacarina) e de outras formas sólidas cristalinas da MET relatadas na literatura (BIAN *et al.*, 2019; NANUBOLU *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2019). Os espectros vibracionais na região do infravermelho da base livre da MET e de seus novos sais farmacêuticos são apresentados na Figura 58.

Tabela 48 - Atribuições das principais bandas (em cm^{-1}) observadas nos espectros no infravermelho da base livre da metformina (MET) e dos novos sais de MET.

MET	MET-MAL	MET-MLN	MET-SAC	Atribuições
3440, 3320	3350, 3194	3328, 3149	3344, 3150	$\nu(\text{N-H})_{\text{aminas}}$
2930	2936	2937	2930	$\nu(\text{C-H})_{\text{alifático}}$
-	1706	1730	-	$\nu(\text{C=O})_{\text{ácido}}$
-	-	-	1638	$\nu(\text{C=O})_{\text{amida}}$
-	1604	1589	-	$\nu_a(\text{COO}^-)_{\text{carboxilato}}$
-	1414	1425	-	$\nu_s(\text{COO}^-)_{\text{carboxilato}}$
-	-	-	1332, 1140	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{sulfonimida}}$

ν = estiramento da ligação, a = modo antissimétrico, s = modo simétrico

Figura 58 - Espectros na região do infravermelho da base livre do fármaco metformina (MET) e dos sais maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).



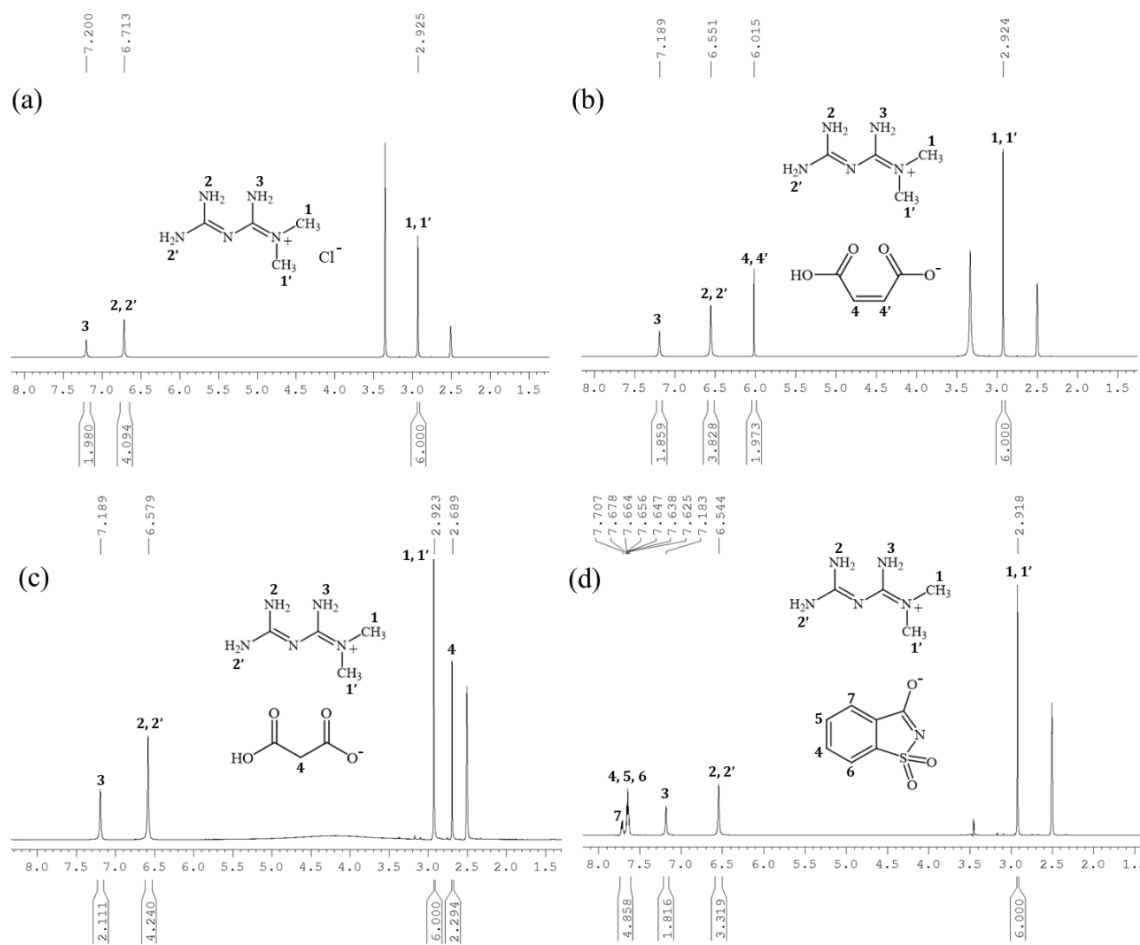
Devido à elevada higroscopicidade da MET base livre, não foi possível atribuir com clareza nenhuma banda de absorção característica da molécula na região de alta frequência. O arcabouço molecular deste IFA é formado basicamente de dois grupamentos guanidinas (NH_2) e duas metila (CH_3). Portanto, as bandas referentes aos estiramentos das ligações N-H e C-H desses grupos, que geralmente aparecem na região compreendida entre 3500 e 2700 cm^{-1} , encontram-se encobertas por uma alargada banda presente na mesma região (associada a vibrações da ligação O-H de moléculas de água). Em contrapartida, as bandas presentes nos espectros no infravermelho dos novos sais de MET foram mais facilmente identificadas (sobretudo àquelas compreendidas na região entre 3500 e 2700 cm^{-1}), sugerindo que as modificações cristalinas não possuem, a

princípio, caráter higroscópico. Além disso, nos espectros dos três novos sais, foi observado o aparecimento de novas bandas associadas às vibrações dos ânions maleato, malonato e sacarinato. Nos espectros dos sais MET-MAL e MET-MLN, por exemplo, foi possível observar o aparecimento de uma banda entre 1730 e 1706 cm^{-1} , que foi atribuída ao estiramento da ligação C=O do grupo carboxílico, e de outras duas bandas entre 1604 e 1414 cm^{-1} , que foram atribuídas aos estiramentos antissimétrico e simétrico da ligação C–O dos grupos carboxilatos. Tais evidências confirmaram que as moléculas dos ácidos maleico e malônico encontram-se parcialmente desprotonadas nas estruturas cristalinas. Por último, duas bandas referentes aos modos de estiramento antissimétrico e simétrico da ligação S=O do grupo sulfonimida do ânion sacarinato também foram observadas, aparecendo em 1332 cm^{-1} e em 1140 cm^{-1} no espectro do sal MET-SAC.

5.4.4 Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Os experimentos de ^1H RMN foram realizados visando confirmar a pureza cristalina e a proporção estequiométrica entre o cátion MET^+ e seu correspondente ânion (Cl^- , MAL^- , MLN^- e SAC^-) nos novos sais de MET propostos. As atribuições dos deslocamentos químicos (δ) referentes aos átomos de hidrogênio da MET e dos coformadores, bem como a interpretação dos espectros, foram feitas com base em espectros de ^1H RMN da MET e de compostos relacionados reportados na literatura (GADAPE; PARIKH, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2015; CAI *et al.*, 2021). Como mostrado na Figura 59, nos espectros de ^1H RMN dos novos sais de MET, observou-se a presença de sinais atribuídos às porções olefínica (=CH), metilênica ($-\text{CH}_2$) e aromática ($-\text{C}_6\text{H}_4$), que compõem o arcabouço molecular dos ânions maleato, malonato e sacarinato, respectivamente, em 6,01 ppm, 2,69 ppm e 7,62-7,70 ppm. Estes sinais, que são característicos das moléculas destes contra-íons orgânicos, não foram observados no espectro de ^1H RMN do sal MET-HCl. No que diz respeito às integrais dos sinais dos espectros, os valores encontrados corroboraram os resultados apresentados na descrição cristalográfica das estruturas. Em todos os casos, as integrais indicam que a proporção estequiométrica entre cátion e ânion nos sais é 1:1.

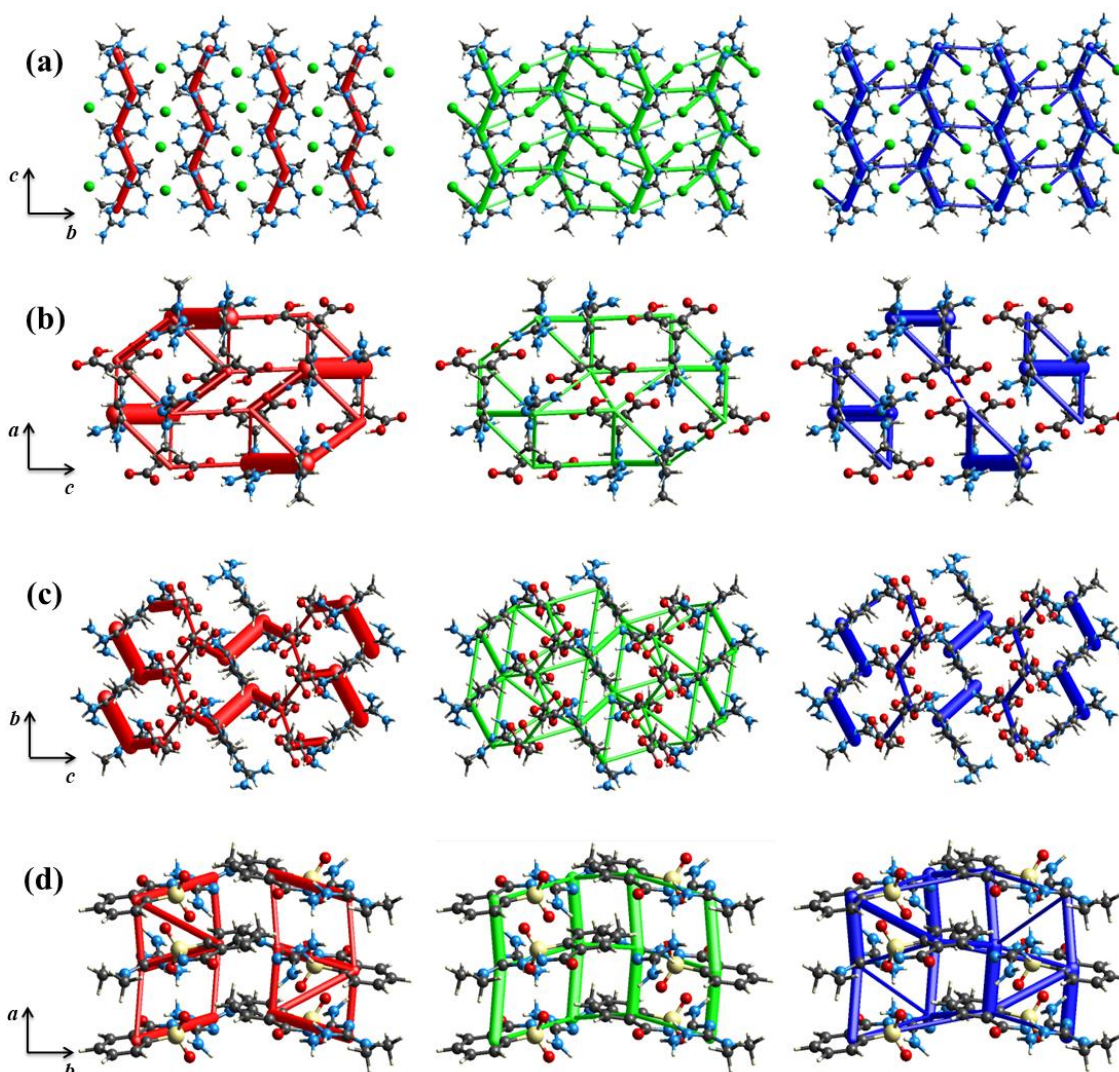
Figura 59 - Espectros de ^1H RMN (400 MHz), obtidos em $\text{DMSO-}d_6$, dos sais (a) cloridrato de metformina (MET-HCl), (b) maleato de metformina (MET-MAL), (c) malonato de metformina (MET-MLN) e (d) sacarinato de metformina (MET-SAC).



5.4.5 Avaliação de energia de rede

Estudos que visam estimar a energia de rede de sólidos cristalinos são cruciais para estabelecer a contribuição energética de interações intermoleculares na estabilização da estrutura cristalina. A magnitude e a topologia das energias de tais interações para os sais de MET são discutidas nesta seção. Nas estruturas cristalinas dos sais, o cátion MET^+ e o ânion correspondente (Cl^- , MAL^- , MLN^- e SAC^-) são estabilizados por interações de natureza eletrostática (Coulombiana) e dispersiva, representadas em vermelho e verde, respectivamente, na Figura 60. Devido à diferença das arquiteturas supramoleculares (como mostrado nas seções 5.4.1.1-5.4.1.3 referentes às análises cristalográficas), cada sal exibiu uma topologia de energia de rede única no estado sólido. Assim, para descobrir qual topologia de distribuição de energia desempenha um papel mais decisivo nas propriedades físico-químicas da MET, foi necessário examinar cuidadosamente a magnitude relativa das forças de interação estabilizadoras para cada sal de MET.

Figura 60 - Representação da topologia de energia de rede levando-se em consideração as contribuições eletrostáticas (vermelho), dispersivas (verde) e total (azul) para os sais (a) maleato de metformina (MET-MAL), (b) malonato de metformina (MET-MLN) e (c) sacarinato de metformina (MET-SAC).



Em termos quantitativos, a energia de interação dos pares iônicos formados pelas moléculas do cátion MET^+ e ânions (Cl^- , MAL^- , MLN^- e SAC^-) correspondentes, bem como entre moléculas de cátions MET^+ adjacentes nas estruturas de sais, não são da mesma magnitude. Espera-se que nas estruturas cristalinas eficientemente empacotadas, o processo de solubilização do fármaco tende a ser menor. Quando somamos a contribuição da energia (em kJ mol^{-1}) de todas as interações intermoleculares que aparecem dentro de um raio de $3,8 \text{ \AA}$ dos pares iônicos $\text{MET}^+ \cdots \text{ânion}^-$ e normalizamos esse somatório, dividindo o valor de energia encontrado pelo número de interações, é possível ter uma ideia do quão energético é o microambiente cristalino no qual a molécula do fármaco se encontra. Ao observar estes valores calculados (Tabela 49), percebe-se que

o sal MET-SAC é o de menor energia ($-14,22 \text{ kJ mol}^{-1}$), ou seja, o mais estável, seguido pelos sais MET-MAL ($-11,97 \text{ kJ mol}^{-1}$), MET-MLN ($-10,20 \text{ kJ mol}^{-1}$) e MET-HCl ($-7,80 \text{ kJ mol}^{-1}$). Notavelmente, esses valores de energia estão inversamente correlacionados com as solubilidades dos sais (dados apresentados na seção 5.4.7), indicando que para o sal de menor solubilidade (MET-SAC) as moléculas estão num ambiente cristalino de menor energia, com uma contribuição mais efetiva de interações intermoleculares estabilizadores. Neste sentido, uma correlação plausível pode ser estabelecida para os novos sais de MET, pois os resultados sugerem que quanto maior a solubilidade do sal, menor sua energia de rede.

Tabela 49 - Parâmetros físico-químicos dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).

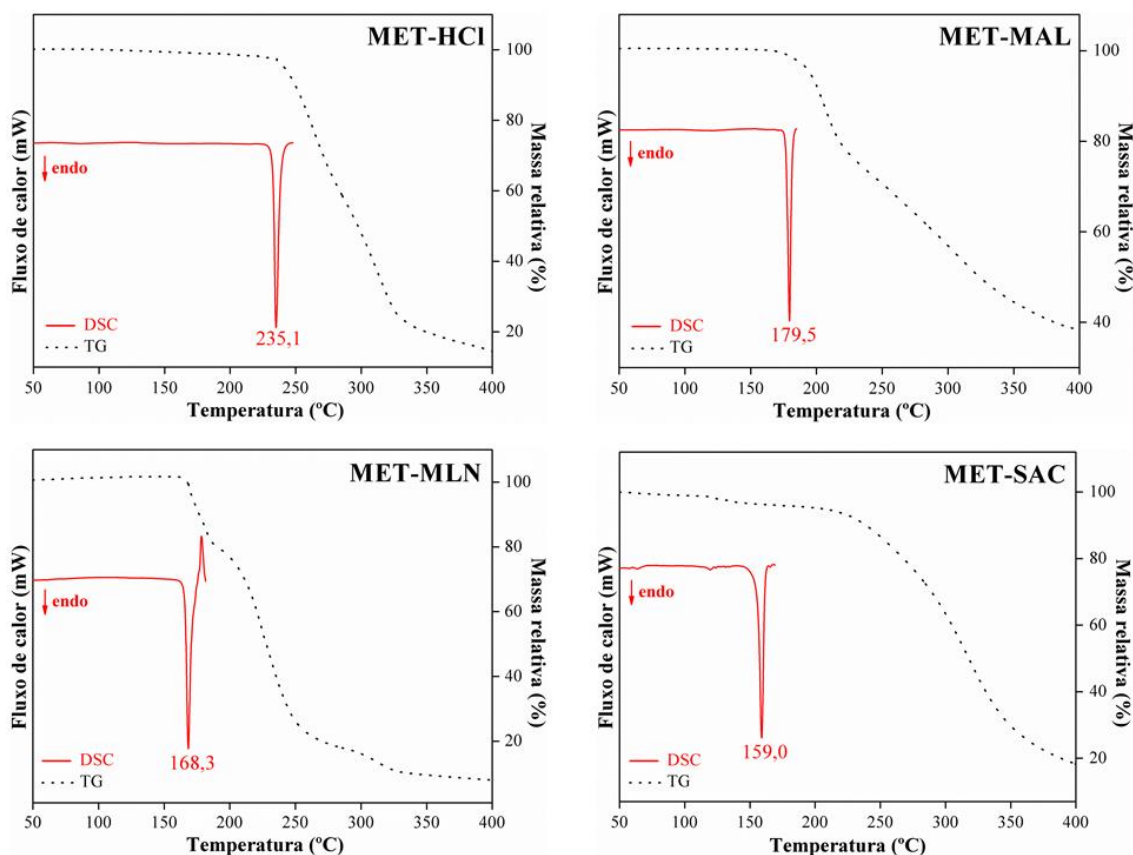
Composto	Temperatura de fusão (°C)	Entalpia de fusão (J g^{-1})	Temperatura de decomposição (°C)	Energia de rede* (kJ mol^{-1})
MET-HCl	235,1	-281,64	235	-7,80
MET-MAL	179,5	-194,06	180	-11,97
MET-MLN	168,3	-288,19	167	-10,20
MET-SAC	159,0	-120,14	220	-14,22

* Somatório das interações dentro do raio de $3,8 \text{ \AA}$ dividido pelo número de interações.

5.4.6 Caracterização térmica

A avaliação do comportamento térmico da forma comercial do IFA metformina (MET-HCl) e dos novos sais de MET sintetizados foi conduzida por meio da combinação de três técnicas de caracterização térmica (DSC, TG e TOA). Como evidenciado na Figura 61, as curvas TG e DSC do sal MET-HCl revelaram que o fármaco é estável entre 50 e 230 °C, uma vez que nenhum evento térmico foi observado em ambas as curvas nesse intervalo de temperatura. A curva DSC mostrou a presença de um único pico endotérmico de fusão/degradação em 235,1 °C ($T_{on-set} = 232,82 \text{ °C}$, $\Delta H = -281,64 \text{ J g}^{-1}$), enquanto a curva TG deixou claro que a degradação do IFA ocorreu basicamente em uma única etapa, com início da perda de massa em aproximadamente 235 °C. Por outro lado, os perfis térmicos das novas modificações cristalinas provaram ser bem diferentes, quando comparados ao da forma comercial MET-HCl. As curvas DSC dos novos sais de MET são caracterizadas pela presença de eventos endotérmicos bem definidos, que foram atribuídos à fusão/degradação dos compostos. Na Tabela 49 estão resumidos os principais eventos térmicos observados para os sais de MET.

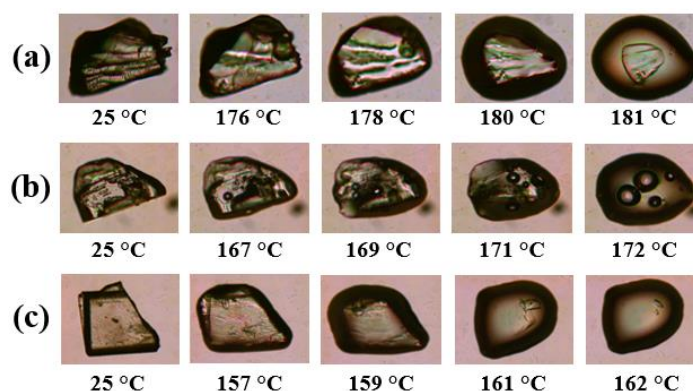
Figura 61 - Curvas TG (linha tracejada preta) e DSC (linha contínua vermelha) dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).



Na curva DSC do sal MET-MAL, um pico endotérmico centrado em 179,5 °C ($T_{on-set} = 176,79$ °C, $\Delta H = -194,06$ J g⁻¹), relacionado à fusão da amostra, foi observado. Este evento concordou com a temperatura na qual se iniciou a perda de massa e que se refere ao começo da degradação do sal MET-MAL na curva TG (~180 °C), indicando que esta forma sólida fundiu e, logo em seguida, degradou. Já a curva DSC do sal MET-MLN, é caracterizada pela presença de um pico endotérmico de fusão em 168,3 °C ($T_{on-set} = 166,01$ °C, $\Delta H = -288,19$ J g⁻¹), acoplado de um pico exotérmico de degradação. Estes dois eventos térmicos coincidiram com o início da perda de massa verificada na curva TG que começou em ~167 °C, comprovando que o sal MET-MLN passou por um processo de fusão que foi imediatamente seguido pelo início da sua degradação. Por fim, a curva DSC do sal MET-SAC mostrou a presença de um pico endotérmico centrado em 159,0 °C ($T_{on-set} = 157,44$ °C, $\Delta H = -120,14$ J g⁻¹) que foi atribuído ao processo de fusão da amostra. Este evento foi consistente com a perda de massa observada para este sal na curva TG que começou em aproximadamente 220 °C e ocorreu de maneira lenta e gradual até a completa degradação do composto.

Os cristais das novas formas sólidas de MET também foram avaliados por TOA. O uso desta técnica permitiu o acompanhamento em tempo real das transformações que aconteceram nos sólidos mediante aquecimento. As imagens obtidas suportaram a interpretação dos resultados observados nas curvas TG e DSC, permitindo a confirmação inequívoca dos mesmos. Na Figura 62, foi possível observar que os cristais dos sais MET-MAL, MET-MLN e MET-SAC passaram por um processo de fusão em torno de 178 °C, 169 °C e 159 °C, respectivamente, concordando com os picos endotérmicos observados nas curvas DSC desses sais. Logo após a fusão dos cristais, notou-se que as amostras iniciaram seus correspondentes processos de degradação, concordando com os resultados das curvas TG.

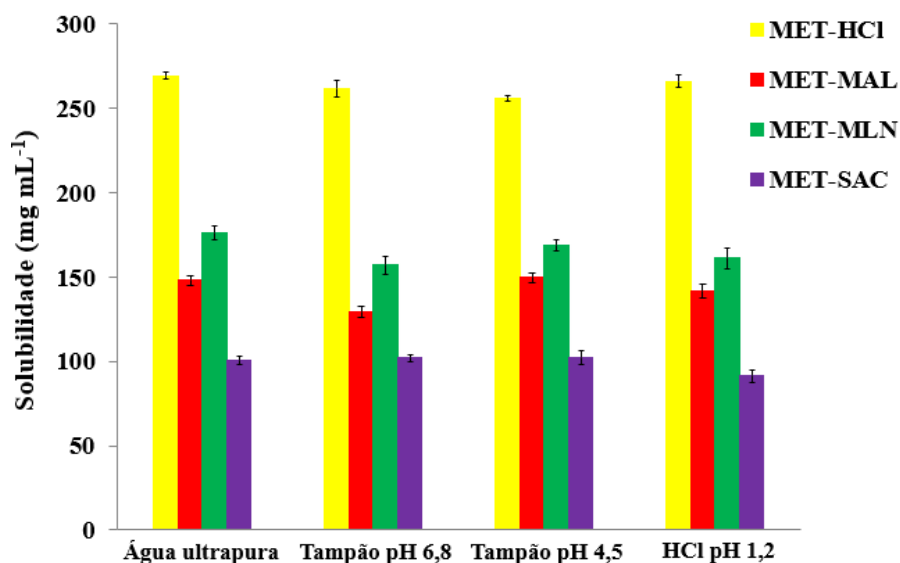
Figura 62 - Imagens obtidas por análise termo-ótica a partir de monocristais dos sais (a) maleato de metformina (MET-MAL), (b) malonato de metformina (MET-MLN) e (c) sacarinato de metformina (MET-SAC).



5.4.7 Determinação da solubilidade e dissolução intrínseca

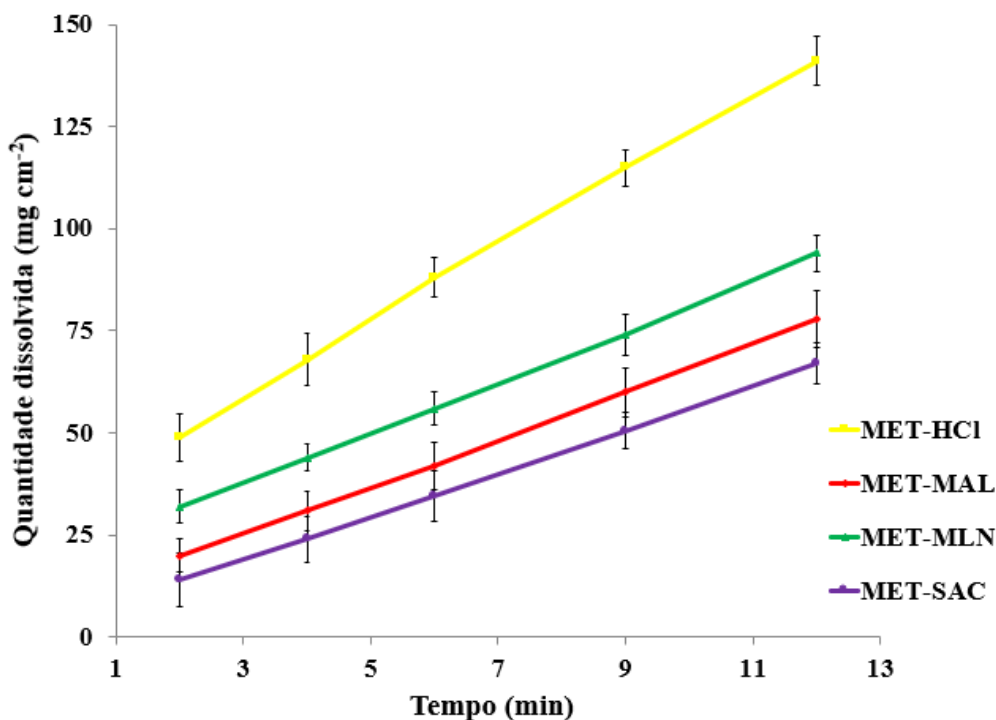
Para o fármaco MET-HCl, que apresenta elevada solubilidade e, sabidamente, alguns efeitos adversos derivados dessa característica, o planejamento racional de sais menos solúveis é um requisito central para o desenvolvimento de formulações que visam uma liberação mais lenta do fármaco. A solubilidade em equilíbrio dos novos sais de MET em meios que mimetizam o pH fisiológico (HCl 0,1 M pH 1,2, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8) e em água purificada é representada na Figura 63. Em linhas gerais, ainda que os novos sais de MET apresentem valores de solubilidade relativamente altos, as três formas sólidas propostas são consideravelmente menos solúveis em relação ao sal MET-HCl.

Figura 63 - Gráfico de solubilidade em equilíbrio nos diferentes meios de dissolução dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).



Primeiramente, a solubilidade dos sais derivados de MET não é dependente do pH do meio, na medida em que se mantiveram praticamente constante ao longo da faixa de pH considerada. Além disso, os valores de solubilidade encontrados para o sal MET-HCl (entre $256,02 \pm 1,88$ e $269,42 \pm 1,96$ mg mL⁻¹) concordaram com dados reportados na literatura (CHENG *et al.*, 2004; KIM; PARK, 2015). Para os novos sais de MET, as formas maleato e malonato apresentaram solubilidades similares entre si (da ordem de 150 mg mL⁻¹) em todos os meios de dissolução considerados, sendo o sal MET-MLN ligeiramente mais solúvel. No caso do sal MET-SAC, o valor médio de solubilidade determinado ($99,1$ mg mL⁻¹) confirma que a forma sacarinato é a de menor solubilidade, dentre os sais considerados, exibindo reduções de solubilidade de 2,5 a 2,9 vezes em comparação com a forma empregada na terapêutica MET-HCl. Este resultado pode ser atribuído, em parte, ao empacotamento cristalino eficiente (de menor energia) e com maior predomínio de interações estabilizadores na estrutura, conforme demonstrado na seção 5.4.5, que muito provavelmente interfere no processo de ruptura do sólido por moléculas de água durante sua solubilização.

Figura 64 - Perfil de dissolução intrínseca dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC) em tampão fosfato pH 6,8.



Paralelamente, a fim de se investigar como as novas formas sólidas de MET afetaram a cinética de dissolução do fármaco, um experimento de dissolução intrínseca foi conduzido, visando determinar a VDI da MET a partir dos diferentes sais (Figura 64). Os três novos sais de MET exibiram VDI menores em relação à forma MET-HCl no meio tampão fosfato pH 6,8 (valores mostrados na Tabela 50). Os sais MET-MAL ($5,81 \pm 0,43 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) e MET-MLN ($6,17 \pm 0,55 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) apresentaram velocidade de dissolução de 1,6 a 1,5 vezes menor, respectivamente, comparado ao sal MET-HCl ($9,22 \pm 0,65 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$). De maneira semelhante, a velocidade de dissolução do sal MET-SAC ($5,31 \pm 0,29 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) foi 1,7 vezes menor que a observada para a forma MET-HCl, indicando que a cocristalização da MET com a sacarina foi a que proporcionou maior efeito retardante na dissolução intrínseca do fármaco, conforme ilustrado na Figura 64. Assim, a VDI dos sais de MET analisados seguiu a seguinte ordem: MET-HCl > MET-MLN > MET-MAL > MET-SAC. Destaca-se que tal comportamento é coerente com as solubilidades destes sais, que seguiu, inclusive, a mesma ordem. Do ponto de vista estrutural, esta tendência pode ser correlacionada com as arquiteturas supramoleculares dos compostos. A agregação no estado sólido do cátion MET⁺ com contra-íons orgânicos (MAL⁻, MLN⁻ e SAC⁻), dotados de grupos funcionais polares, favorece a ocorrência de

síntons supramoleculares que, por consequência, aumenta o número de interações estabilizadoras nas estruturas cristalinas, levando a uma menor solubilidade e velocidade de dissolução do fármaco.

5.4.8 Avaliação *in vitro* da permeabilidade

O fármaco MET-HCl apresentou baixa permeabilidade, com valores de P_{app} , do compartimento apical para basolateral, P_{app} (A-B), e do compartimento basolateral para apical, P_{app} (B-A), muito semelhantes entre si e na mesma magnitude dos valores de P_{app} reportados na literatura para a forma MET-HCl (KIM; PARK, 2015; SAITOH *et al.*, 2004). Ao contrário do esperado, os valores de P_{app} (A-B) e P_{app} (B-A) e as razões de efluxo (indicadas por R) calculados para os novos sais de MET não tiveram diferenças significativas entre si, sendo também semelhantes aos parâmetros de permeabilidade (P_{app} e R) do sal MET-HCl, conforme evidenciado na Tabela 50.

Tabela 50 - Dados biofarmacêuticos dos sais cloridrato de metformina (MET-HCl), maleato de metformina (MET-MAL), malonato de metformina (MET-MLN) e sacarinato de metformina (MET-SAC).

Composto	Solubilidade média (mg mL ⁻¹)	VDI (mg cm ⁻² min ⁻¹)	P_{app} (×10 ⁻⁶ cm s ⁻¹)		
			A-B ^a	B-A ^b	R ^c
MET-HCl	263,3	9,22	1,62	1,55	0,95
MET-MAL	142,2 (1,9×)	5,81 (1,6×)	1,46	1,51	1,03
MET-MLN	165,8 (1,6×)	6,17 (1,5×)	1,27	1,28	1,01
MET-SAC	99,1 (2,7×)	5,31 (1,7×)	1,60	1,51	0,94

Os números entre parênteses expressam a magnitude de diminuição.

^a Transporte apical-basolateral.

^b Transporte basolateral-apical.

^c O parâmetro R representa a taxa de efluxo calculada a partir da razão: P_{app} (B-A) / P_{app} (A-B).

Esses resultados de permeabilidade sugerem que a cocristalização do cátion MET⁺ com os contra-íons orgânicos (MAL⁻, MLN⁻ e SAC⁻), que culminou na formação dos novos sais, não exerceu uma contribuição significativa para o aumento da permeabilidade da molécula de MET. Sabendo-se que esses coformadores (ácido maleico, ácido malônico e sacarina) são moléculas altamente permeáveis, conclui-se que os supostos agregados heteromoleculares formados entre o cátion MET⁺ e seus respectivos contra-íons em solução, parecem ser, neste caso específico, totalmente transitórios. Diante deste cenário, a permeabilidade do fármaco MET, através das monocamadas de células Caco-2, permaneceu discreta, independentemente do cátion MET⁺ estar cocristalizado com o ânion Cl⁻ ou com moléculas livremente permeáveis, como a dos coformadores. Ainda

assim, pode-se dizer que os novos sais de MET propostos configuram uma alternativa no que se refere ao uso prolongado da metformina na terapia da diabetes *mellitus*, na medida em que estes três novos sais impediriam, pelo menos, o acúmulo de ânions Cl^- no trato gastrointestinal, dada a ausência dessa espécie nas estruturas moleculares dos novos sais. Por fim, é importante mencionar que, após os experimentos de permeabilidade, não se observou qualquer alteração significativa nas medidas de resistividade elétrica das membranas (valores permaneceram próximos ao valor de $400 \Omega \text{ cm}^{-2}$ aferido antes dos experimentos), indicando que houve manutenção da integridade da monocamada de células Caco-2 durante o transporte de MET (DE ANGELIS; TURCO, 2011).

5.4.9 Validação de método analítico para quantificação de metformina por CLAE-UV

Nos ensaios de solubilidade e dissolução intrínseca, as amostras dos sais de MET submetidas aos testes encontravam-se com elevado grau de pureza, sendo devidamente comprovado por meio de uma abrangente caracterização dos materiais analisados (resultados mostrados nas seções 5.4.1-5.4.6). Além disso, após extensa busca realizada na literatura não foram encontradas evidências de que a MET sofra degradação nas condições em que foram realizados ambos os experimentos. Pelos motivos citados, a possibilidade de existência de qualquer interferente, sobretudo produtos de degradação, se mostrou bastante remota, sugerindo que para o método analítico empregado na quantificação da MET o parâmetro seletividade se mostrou pouco relevante. Os únicos potenciais interferentes para este método seriam os contra-íons (MAL^- , MLN^- e SAC^-) presentes nas estruturas dos sais. Entretanto, em todos os cromatogramas obtidos, os picos atribuídos a estes contra-íons, quando detectáveis, apresentaram tempo de retenção próximo ao tempo morto, comprovando a seletividade do método.

A avaliação do efeito matriz revelou que a inclinação (coeficiente angular) da curva de calibração usual (construída em água ultrapura) não apresentou diferença estatisticamente significativa das inclinações das curvas matrizadas (preparadas nos diferentes meios de dissolução), conforme mostrado na Tabela 51. Além do paralelismo observado entre as retas, os valores de t calculado (1,64-2,01) foram inferiores ao valor de t crítico (2,78), reiterando a ausência de efeito de matriz significativo no método. Assim, para os demais parâmetros validados, soluções de MET preparadas apenas em água ultrapura foram empregadas.

Tabela 51 - Parâmetros das curvas de calibração utilizados na avaliação do efeito matriz do método analítico para a quantificação de MET.

Meio de dissolução utilizado no preparo da curva	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Regressão linear	
		Coefficiente angular (a)	R^2
Água ultrapura	8,0-40,0	111679	0,9999
Tampão fosfato pH 6,8		113962	0,9999
Tampão acetato pH 4,5		113627	0,9999
HCl 0,1 M pH 1,2		112834	0,9998

A linearidade do método na faixa de trabalho de 8,0 a 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi avaliada por meio do MMQO. A faixa de trabalho escolhida para validação abrange as concentrações de MET encontradas nos experimentos de dissolução intrínseca. Além de se avaliar a significância da regressão e a falta de ajuste, avaliou-se também se as premissas da linearidade foram atendidas. Os resultados dos testes estatísticos que comprovaram a linearidade para a faixa de 8,0 a 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são mostrados na Tabela 52. Nota-se que o modelo da regressão é linear do tipo $y = ax + b$, sendo y a área sob o pico do analito de interesse (MET), a o coeficiente angular, x a concentração nominal de MET e b o coeficiente linear.

Tabela 52 - Resultados da avaliação da linearidade do método analítico para a quantificação de MET.

Item avaliado	Analito de interesse (MET)
Equação da reta	$y = 111531 - 47289$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9998
Modelo estatístico	MMQO
<i>Outliers</i> descartados	Nenhum
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9747 > 0,9383)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,3596 < 2,1076 < 2,6404)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,5603 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,1045 > 0,0500)

O método analítico também foi considerado preciso, dada a proximidade entre os valores de concentração de soluções de MET, que foram avaliadas nas condições de repetibilidade (mesmo dia e analista) e de precisão intermediária (dias e analistas diferentes). O DPR calculado a partir das nove determinações, que foram preparadas em

triplicata nas concentrações de 8,0; 24,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram inferiores a 2%, conforme mostrado na Tabela 53. O método também foi considerado exato devido à concordância observada entre os resultados de concentração de cada determinação em relação ao valor aceito como verdadeiro. Assim, a exatidão foi comprovada com base nos valores médios de recuperação de MET nos três níveis de concentração avaliados (8,0; 24,0 e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), que se encontram entre 98 e 102% (Tabela 53).

Tabela 53 - Resultados de precisão e exatidão do método analítico para a quantificação de MET.

Nível de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão		Exatidão
	DPR (%) repetibilidade	DPR (%) precisão intermediária	Recuperação média (%)
8,0	0,83	0,64	99,98
24,0	0,38	0,37	100,03
40,0	0,27	0,41	100,25

Por fim, a estimativa dos limites de quantificação e detecção foi realizada baseando-se nos parâmetros das curvas de calibração. A comprovação destes limites, ainda que teóricos, serviram para indicar até quais concentrações o método seria capaz de quantificar e detectar, com precisão e exatidão aceitáveis, o fármaco MET. Os valores de LQ e LD encontrados foram 0,153 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,050 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

5.4.10 Validação de método bioanalítico para quantificação de metformina por CLAE-UV

Na validação do método bioanalítico por CLAE-UV que visou quantificar a MET a partir de soluções provenientes do ensaio de permeabilidade, a faixa de trabalho escolhida de 200 a 1400 ng mL^{-1} permitiu a obtenção de resultados satisfatórios no que se refere à comprovação da linearidade do método pelo MMQO. A avaliação das premissas da linearidade bem como os resultados dos testes estatísticos que comprovaram que o modelo proposto não apresenta desvio da linearidade são mostrados na Tabela 54. Mais uma vez, o modelo de regressão linear do tipo $y = ax + b$ foi o empregado, sendo y a área sob o pico do analito, a o coeficiente angular, x a concentração nominal de MET e b o coeficiente linear.

Tabela 54 - Resultados da avaliação da linearidade do método bioanalítico para a quantificação de MET.

Item avaliado	Analito de interesse (MET)
Equação da reta	$y = 108,78x - 1173$
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9998
Modelo estatístico	MMQO
<i>Outliers</i> descartados	1
Normalidade dos resíduos ($R_{eq} > R_{crítico\ 0,05}$)	Resíduos seguem a normal (0,9862 > 0,9521)
Independência dos resíduos ($du < d < 4-du$)	Resíduos independentes (1,4104 < 2,0563 < 2,5896)
Homocedasticidade dos resíduos ($p > 0,05$)	Resíduos homocedásticos (0,5292 > 0,0500)
Análise de variância ANOVA ($p > 0,05$)	Não há desvio da linearidade (0,1445 > 0,0500)

Baseado nas recomendações de guias de validação de métodos bioanalíticos, três curvas de calibração foram preparadas para avaliação da relação entre a resposta instrumental e a concentração do analito. As curvas foram construídas a partir de soluções de diferentes concentrações do fármaco MET, sendo todas preparadas em matriz representativa do experimento de permeabilidade (tampão HBSS). Os valores tendendo a 1 dos coeficientes de determinação (R^2) das três curvas (Tabela 55) confirmou a existência da relação linear entre resposta e concentração.

Tabela 55 - Parâmetros das curvas de calibração obtidas durante a validação do método bioanalítico para a quantificação de MET.

Curva de calibração	Faixa de concentração (ng mL ⁻¹)	Regressão linear		
		Coefficiente angular (<i>a</i>)	Coefficiente linear (<i>b</i>)	R^2
1 ^a	200-1400	108,19	-1031	0,9995
2 ^a		108,24	-1079	0,9997
3 ^a		108,78	-1173	0,9998

A seletividade do método bioanalítico foi comprovada determinando-se a área dos picos que apresentaram tempo de retenção equivalente ao fármaco MET, mediante a injeção de cinco amostras de tampão HBSS, considerado como branco. Nos cromatogramas referentes às amostras branco, as áreas relativas dos picos interferentes variaram de 5,4 a 8,1% em comparação com a área média de amostras do analito na concentração correspondente ao LIQ (200 ng mL⁻¹), sendo todas inferiores a 20%,

confirmando a seletividade do método. Adicionalmente, comprovou-se a ausência de efeito residual, já que as áreas relativas dos picos que apareceram com o mesmo tempo de retenção do fármaco nos dois cromatogramas de amostras branco (tampão HBSS), imediatamente obtidos após a injeção de uma amostra na concentração do LSQ (1400 ng mL⁻¹), foram inferiores a 20% em relação a área média de picos obtidos por amostras no LIQ (200 ng mL⁻¹).

Em relação à precisão e exatidão, o método bioanalítico proposto apresentou resultados satisfatórios, tanto nos ensaios intracorrída quanto nos intercorrídas. Baseado nos resultados apresentados na Tabela 56, os valores de DPR e EPR nos cinco níveis de concentração avaliados, assumiram valores inferiores a 15% em relação aos valores de concentração nominais dos cinco controles de qualidade avaliados.

Tabela 56 - Resultados de precisão e exatidão do método bioanalítico para a quantificação de MET.

Nível de concentração (ng mL ⁻¹)	Ensaio intracorrída (n = 5)			Ensaio intercorrída (n = 15)		
	Conc. real	Precisão DPR (%)	Exatidão EPR (%)	Conc. real	Precisão DPR (%)	Exatidão EPR (%)
200 (CQLIQ)	194,6	2,06	-2,71	200,2	3,71	0,09
500 (CQB)	490,2	1,90	-1,95	488,6	1,26	-2,28
800 (CQM)	801,4	0,24	0,18	784,6	1,75	-1,92
1100 (CQA)	1107,0	0,32	0,64	1086,4	1,82	-1,24
2000 (CQD)	1954,6	0,27	-2,27	1949,6	0,95	-2,52

Quanto à estabilidade em tampão HBSS (Tabela 57), o fármaco MET demonstrou ser estável nos dois níveis de concentração testados (CQB e CQA) bem como nas três condições avaliadas. Os valores de DPR e EPR encontrados para estes níveis foram todos inferiores a 15% em relações aos valores nominais de concentração do fármaco.

Tabela 57 - Resultados do estudo de estabilidade do fármaco MET em tampão HBSS obtido durante a validação do método bioanalítico.

Nível de concentração (ng mL ⁻¹)	Curta duração (temp. ambiente por 90 min)		Longa duração (temp. ambiente por 270 min)		Ciclos de congelamento e descongelamento	
	DPR (%)	EPR (%)	DPR (%)	EPR (%)	DPR (%)	EPR (%)
500 (CQB)	1,03	-2,75	0,57	-3,61	3,52	-1,72
1100 (CQA)	0,15	0,46	0,41	1,06	2,77	3,04

Para métodos bioanalíticos, o limite de quantificação está associado com o menor nível de concentração da curva de calibração, cujo valor corresponde ao LIQ do método. Mesmo assim, para fins complementares, optou-se por demonstrar qual seria o menor valor de concentração que o método proposto seria capaz de quantificar e detectar o fármaco MET, com precisão e exatidão aceitáveis. Os valores de LQ e LD encontrados, com base nos parâmetros das curvas de calibração, foram $43,65 \text{ ng mL}^{-1}$ e $14,40 \text{ ng mL}^{-1}$, respectivamente.

5.4.11 Impactos das novas formas sólidas de metformina

Ao longo da seção 5.4, foi descrito o desenvolvimento de três novos sais do fármaco MET, denominados MET-MAL, MET-MLN e MET-SAC. Esses novos cristais foram preparados mediante reações da MET base livre com os coformadores ácido maleico, ácido malônico e sacarina, tendo como objetivos expandir as formas de apresentação do fármaco no estado sólido e melhorar seu perfil biofarmacêutico. A caracterização químico-estrutural revelou que a MET se cristaliza mais eficientemente, em estruturas de menor energia, na presença dos ânions (contra-íons) derivados dos coformadores selecionados, sendo tal evidência atribuída à maior ocorrência de interações intermoleculares estabilizadoras nas estruturas cristalinas dos novos sais. Por consequência, uma redução na solubilidade e velocidade de dissolução intrínseca da metformina foi alcançada. Dado que o aparecimento de desconforto gastrointestinal nos pacientes submetidos ao uso contínuo de MET-HCl está associado, em parte, à elevada concentração de ânions Cl^- no trato gastrointestinal que é, particularmente, agravado pelo elevado tempo de permanência do fármaco nesta região, o desenvolvimento de novos sais, livres de ânions Cl^- , menos solúveis e de dissolução mais lenta se apresenta como uma alternativa promissora. Como os três novos sais de MET propostos exibem tais características, sugere-se que estas formas poderiam proporcionar uma melhoria do perfil biofarmacêutico da MET. Em virtude da relevância destes resultados, optou-se por publicá-los na reputada revista *New Journal of Chemistry* em junho de 2022 (DINIZ *et al.*, 2022).

6 CONCLUSÕES

Como resultados deste trabalho, onze formas sólidas multicomponentes inéditas dos fármacos carvedilol, furosemida, diltiazem e metformina foram preparadas e tiveram suas estruturas cristalinas determinadas, alcançando com sucesso o objetivo principal proposto. O planejamento das novas modificações cristalinas foi realizado usando como referência o pKa dos fármacos CVD, FSM, DIL e MET e por meio de informações acerca dos sítios supramoleculares preferenciais formados pelos grupos funcionais destes IFAs. Dessa forma, protocolos de síntese e cristalização foram elaborados, permitindo a obtenção das novas formas sólidas. Uma ampla caracterização químico-estrutural e biofarmacêutica foi realizada para cada um dos compostos obtidos e os resultados foram comparados aos das formas comerciais dos respectivos IFAs.

Os novos sais isoestruturais de carvedilol (CVD-HCl-H₂O e CVD-HBr-H₂O) cristalizaram na forma de um raro sistema racêmico, denominado solução sólida de enantiômeros. O sal de oxalato (CVD-OXA) do mesmo IFA cristalizou na forma de um racemato padrão. Com a resolução das estruturas cristalinas, estabeleceram-se os principais aspectos estruturais que foram determinantes no reconhecimento supramolecular dos enantiômeros *R* e *S* do CVD no estado sólido. Além disso, os novos sistemas racêmicos do CVD também foram capazes de promover um aumento na solubilidade do IFA. Tal aumento está associado à mudança de orientação/disposição dos enantiômeros nos novos cristais. Este resultado é promissor por si só, já que sais semelhantes de CVD reportados na literatura levaram a um aumento da biodisponibilidade oral do IFA justamente por serem mais solúveis que o CVD puro.

O planejamento das novas formas de furosemida teve como principal motivação melhorar as propriedades biofarmacêuticas deste IFA, já que se trata de um fármaco classe IV do SCB (baixa solubilidade e permeabilidade). Tal objetivo foi alcançado com sucesso pelo sal FSM-IMI e pelo cocrystal FSM-5FC-H₂O, uma vez que ambos provaram ser mais solúveis e permeáveis que a FSM. A minuciosa caracterização realizada para essas novas formas sólidas revelou os aspectos químico-estruturais mais importantes que explicam o significativo aprimoramento biofarmacêutico observado para o IFA. Tais evidências reforçam a importância de se investir em sistemas como esses quando se pensa no desenvolvimento de novas formulações sólidas contendo FSM.

Os resultados das modificações cristalinas (sais hidratados e sal-cocrystal) do fármaco DIL mostraram o quão promissor esses novos cristais são, já que eles são menos

solúveis e exibem menor velocidade de dissolução intrínseca, sobretudo o sal-cocrystal DIL-FUM-H₂FUM, em relação à forma comercial DIL-HCl. Tal aprimoramento está associado ao empacotamento mais eficiente e de menor energia dos novos cristais, que tornam a cinética de interação com moléculas de água menos pronunciada. Esses resultados sugerem que a incorporação destas novas formas sólidas de DIL em futuras formulações farmacêuticas de liberação retardada contendo o fármaco poderia modular sua liberação, melhorando seu perfil farmacocinético.

Por fim, para o fármaco MET, no qual objetivou-se o desenvolvimento de novos sais, que não contivessem ânions Cl⁻ na estrutura e que fossem opções alternativas para a melhoria das propriedades de interesse farmacêutico do IFA, resultados promissores também foram alcançados. O perfil biofarmacêutico do sal MET-HCl pôde ser ajustado com o desenvolvimento dos sais MET-MAL, MET-MLN e MET-SAC. A mudança de um contra-íon inorgânico (Cl⁻) por moléculas orgânicas (coformadores) diversificou a ocorrência de sítios supramoleculares nas estruturas, levando à formação de sais mais estáveis (de menor energia de rede) e, conseqüentemente, ligeiramente menos solúveis e com permeabilidade semelhante ao da forma MET-HCl. Nesse sentido, os três novos sais de MET se mostraram promissores quanto à uma possível incorporação em futuras formulações farmacêuticas de MET, já que eles são, hipoteticamente, menos propensos a causar o recorrente desconforto gastrointestinal do sal MET-HCl.

Portanto, a maior contribuição deste trabalho foi o desenvolvimento de novas formas sólidas de fármacos anti-hipertensivos e antidiabéticos com propriedades físico-químicas e/ou biofarmacêuticas melhoradas, partindo dos conceitos e estratégias da engenharia de cristais. Todas as modificações cristalinas propostas são promissoras, podendo ser encaradas como potenciais novos fármacos já que seus respectivos perfis biofarmacêuticos, no mínimo, se equivalem aos dos fármacos dos quais se derivaram, tendo sido aprimorados na maioria dos casos.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, Y. A. Virtual hydrate screening and coformer selection for improved relative humidity stability. *CrystEngComm*, v. 17, n. 28, p. 5216-5224, 2015.
- AITIPAMULA, S. *et al.* Polymorphs, salts, and cocrystals: what's in a name? *Crystal Growth & Design*, v. 12, n. 5, p. 2147-2152, 2012.
- ALI, J.; ARORA, S.; AHUJA, A.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; KHAR, R. K.; BABOOTA, S. Formulation and development of hydrodynamically balanced system for metformin: in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, n. 1, p. 196-201, 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION *et al.* Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 33, n. 1, p. S62, 2010.
- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- AOAC. Official Methods of Analysis. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, Appendix F. Rockville: AOAC International, 2016.
- AUGSBURGER, L. L.; HOAG, S. W. *Pharmaceutical Dosage Forms-Tablets*. New York: CRC Press, 2016.
- AULTON, M. *Dissolução e Solubilidade: delineamento de formas farmacêuticas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- BABU, N.J.; CHERUKUVADA, S.; THAKURIA, R.; NANGIA, A. Conformational and synthon polymorphism in furosemide (Lasix). *Crystal Growth & Design*, v. 10, p. 1979-1989, 2010.
- BABU, N. J.; NANGIA, A. Solubility advantage of amorphous drugs and pharmaceutical cocrystals. *Crystal Growth & Design*, v. 11, n. 7, p. 2662-2679, 2011.
- BACK, K. R.; DAVEY, R. J.; GRECU, T.; HUNTER, C. A.; TAYLOR, L. S. Molecular conformation and crystallization: the case of ethenzamide. *Crystal Growth & Design*, v. 12, p. 6110-6117, 2012.
- BANIK, M.; GOPI, S. P.; GANGULY, S.; DESIRAJU, G. R. Cocrystal and salt forms of furosemide: Solubility and diffusion variations. *Crystal Growth & Design*, v. 16, p. 5418-5428, 2016.
- BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, v. 135, n. 10, p. 146-603, 2017.
- BHARATAM, P. V.; PATEL, D. S.; IQBAL, P. Pharmacophoric features of biguanide derivatives: an electronic and structural analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 24, p. 7615-7622, 2005.

- BIAN, X.; JIANG, L.; GAN, Z.; GUAN, X.; ZHANG, L.; CAI, L.; HU, X. A glimepiride-metformin multidrug crystal: synthesis, crystal structure analysis, and physicochemical properties. *Molecules*, v. 24, n. 20, p. 3786-3797, 2019.
- BLAGDEN, N.; DE MATAS, M.; GAVAN, P. T.; YORK, P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 7, p. 617-630, 2007.
- BOSCH, E. Role of sp-C–H···N hydrogen bonding in crystal engineering. *Crystal Growth & Design*, v. 10, n. 8, p. 3808-3813, 2010.
- BRANDEL, C.; PETIT, S.; CARTIGNY, Y.; COQUEREL, G. Structural aspects of solid solutions of enantiomers. *Current Pharmaceutical Design*, v. 22, p. 4929-4941, 2016.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, julho de 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de Maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, maio de 2012.
- BREEMEN, R.B.; LI, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, London, v. 1, n. 2, p. 175-185, 2005.
- BRITTAİN, H. G. X-ray diffraction II: using single-crystal X-ray diffraction to study polymorphism and solvatomorphism. *Pharmaceutical Technology*, v. 24, n. 9, p. 116-125, 2000.
- BRITTAİN, H. G. Cocrystal systems of pharmaceutical interest: 2010. *Crystal Growth & Design*, v. 12, n. 2, p. 1046-1054, 2012.
- CAI, L.; JIANG, L.; LI, C.; GUAN, X.; ZHANG, L.; HU, X. Multicomponent crystal of metformin and barbital: design, crystal structure analysis and characterization. *Molecules*, v. 26, n. 14, p. 4377-4390, 2021.
- CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening-role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 82-97, 2014.
- CHANDER, C. P.; RAJU, B.; SULTHANA, A.; SRINIVAS, R. LC–ESI–MS/MS study of carvedilol and its stress degradation products. *Analytical Methods*, v. 5, n. 17, p. 4330-4335, 2013.
- CHENEY, M. L.; SHAN, N.; HEALEY, E. R.; HANNA, M.; WOJTAS.; L, ZAWOROTKO, M. J.; SAVA, V.; SONG, S.; SANCHEZ-RAMOS, J. R. Effects of crystal form on solubility and pharmacokinetics: a crystal engineering case study of lamotrigine. *Crystal Growth & Design*, v. 10, n. 1, p. 394-405, 2009.

CHENG, C. L.; LAWRENCE, X. Y.; LEE, H. L.; YANG, C. Y.; LUE, C. S.; CHOU, C. H. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, n. 4, p. 297-304, 2004.

CHILDS, S. L.; STAHLY, G. P.; PARK, A. The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, n. 3, p. 323-338, 2007.

CHOW, S. F.; CHEN, M.; SHI L.; CHOW, A. H.; SUN, C. C. Simultaneously improving the mechanical properties, dissolution performance, and hygroscopicity of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide. *Pharmaceutical Research*, v. 29, n. 7, p. 1854-1865, 2012.

CORTI, G.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; MENNINI, N.; MURA, P. Sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, n. 2, p. 303-309, 2008.

CORTI, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; ZERROUK, N.; MURA, P. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: II. Demonstration of the method suitability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 27, p. 354-362, 2006.

CRAIG, D. Q. M. Characterization of polymorphic systems using thermal analysis. In: HILFIKER, Rolf (Ed.) *Polymorphism: in the pharmaceutical industry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, p. 43-79, 2006.

CRUZ-CABEZA, A. J. Acid-base crystalline complexes and the pKa rule. *CrystEngComm*, v. 14, n. 20, p. 6362-6365, 2012.

DAHAN, A.; MILLER, J. M.; HILFINGER, J. M.; YAMASHITA, S.; YU, L. X.; LENNERNÄS, H.; AMIDON, G. L. High-permeability criterion for BCS classification: segmental/pH dependent permeability considerations. *Molecular Pharmaceutics*, v. 7, n. 5, p. 1827-1834, 2010.

DALPIAZ, A.; FERRETTI, V.; BERTOLASI, V.; PAVAN, B.; MONARI, A.; PASTORE, M. From physical mixtures to co-crystals: how the cofomers can modify solubility and biological activity of carbamazepine. *Molecular Pharmaceutics*, v. 15, p. 268-278, 2018.

DAVID, W. I. *Structure determination from powder diffraction data*: Oxford University Press on Demand, 2002.

DAVIES, G. Changing the salt, changing the drug. *Pharmaceutical Journal*, v. 266, n. 7138, p. 322-323, 2001.

DE ANGELIS, I.; TURCO, L. Caco-2 cells as a model for intestinal absorption. *Current Protocols in Toxicology*, v. 41, p. 1-15, 2011.

- DESAI, D.; WONG, B.; HUANG, Y.; YE, Q.; TANG, D.; GUO, H.; TIMMINS, P. Surfactant-mediated dissolution of metformin hydrochloride tablets: wetting effects versus ion pairs diffusivity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 103, n. 3, p. 920-926, 2014.
- DESIRAJU, G. R. Crystal engineering: a brief overview. *Journal of Chemical Sciences*, v. 122, n. 5, p. 667-675, 2010.
- DESIRAJU, G. R. Crystal engineering: from molecule to crystal. *Journal of the American Chemical Society*, v. 135, n. 27, p. 9952-9967, 2013.
- DESIRAJU, G. R.; PARSHALL, G. W. Crystal engineering: the design of organic solids. *Materials Science Monographs*, v. 54, n. 1, p. 1-312. 1989.
- DINIZ, L. F.; CARVALHO, P. S.; DE MELO, C. C.; ELLENA, J. Development of a salt drug with improved solubility: Ethionamide nitrate. *Journal of Molecular Structure*, v. 1137, p. 119-125, 2017.
- DINIZ, L. F.; CARVALHO JR, P. S.; DE MELO, C.; ELLENA, J. Reducing the hygroscopicity of the anti-tuberculosis drug (S, S)-ethambutol using multicomponent crystal forms. *Crystal Growth & Design*, v. 17, n. 5, p. 2622-2630, 2017.
- DINIZ, L. F.; CARVALHO JR, P. S.; MUSSEL, W. N.; YOSHIDA, M. I.; DINIZ, R.; FERNANDES, C. Racemic salts and solid solutions of enantiomers of the antihypertensive drug carvedilol. *Crystal Growth & Design*, v. 19, n. 8, p. 4498-4509, 2019.
- DINIZ, L. F.; CARVALHO JR, P. S.; PENA, S. A.; GONÇALVES, J. E.; SOUZA, M. A.; FILHO, J. D. S.; BOMFIM, L. F.; FRANCO, C. H.; DINIZ, R.; FERNANDES, C. Enhancing the solubility and permeability of the diuretic drug furosemide via multicomponent crystal forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 587, p. 119694-119705, 2020.
- DINIZ, L. F.; FRANCO, C. H.; SILVA, D. F.; MARTINS, L. S.; CARVALHO JR, P. S.; SOUZA, M. A.; REIS, N. F.; FERNANDES, C.; DINIZ R. Multicomponent ionic crystals of diltiazem with dicarboxylic acids toward understanding the structural aspects driving the drug-release. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 605, p. 120790-120804, 2021.
- DINIZ, L. F.; CARVALHO JR, P. S.; GONÇALVES, J. E.; DINIZ, R.; FERNANDES, C. Solid-state landscape and biopharmaceutical implications of novel metformin-based salts. *New Journal of Chemistry*, v. 46, n. 28, p. 13725-13737, 2022.
- DOLOMANOV, O. V.; BOURHIS, L. J.; GILDEA, R. J.; HOWARD, J. A. K.; PUSCHMANN, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*, v. 42, n. 2, p. 339-341, 2009.
- DUGGIRALA, N. K.; PERRY, M. L.; ALMARSSON, O.; ZAWOROTKO, M. J. Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chemical Communications*, v. 52, n. 4, p. 640-655, 2016.

ELDER, D. P.; HOLM, R.; DIEGO, H. L. D. Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 453, n. 1, p. 88-100, 2013.

FARRUGIA, L. WinGX and ORTEP for Windows: an update. *Journal of Applied Crystallography*, v. 45, n. 4, p. 849-854, 2012.

FDA. Food and Drug Administration, Bioanalytical method validation guidance for industry, U.S. Department of Health and Human Services, 2018.

FETH, M. P.; NAGEL, N.; BAUMGARTNER, B.; BRÖCKELMANN, M.; RIGAL, D.; OTTO, B.; SPITZENBERG, M.; SCHULZ, M.; BECKER, B.; FISCHER, F.; PETZOLDT, C. Challenges in the development of hydrate phases as active pharmaceutical ingredients - an example. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 2, p. 116-129, 2011.

FLACK, H. D.; BERNARDINELLI, G. Absolute structure and absolute configuration. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, v. 55, n. 5, p. 908-915, 1999.

GADAPE, H. H.; PARIKH, K. S. Quantitative determination and validation of metformin hydrochloride in pharmaceutical using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. *E-Journal of Chemistry*, v. 8, n. 2, p.767-781, 2011.

GEPPI, M.; MOLLICA, G.; BORSACCHI, S.; VERACINI, C. A. Solid-state NMR studies of pharmaceutical systems. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, n. 3, p. 202-302, 2008.

GIACOVAZZO, C. *Fundamentals of Crystallography*. New York: Oxford University Press, 2002.

GLOMME, A.; MÄRZ, J.; DRESSMAN, J. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94, n. 1, p. 1-16, 2005.

GONÇALVES, J. E.; SOUZA, J.; STORPIRTIS, S. Avaliação da permeabilidade de fármacos empregando culturas celulares. *Biofarmacotécnica - Série Ciências Farmacêuticas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 204-211, 2009.

GOUD, N. R.; GANGAVARAM, S.; SURESH, K.; PAL, S.; MANJUNATHA, S. G.; NAMBIAR, S.; NANGIA, A. Novel furosemide cocrystals and selection of high solubility drug forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, p. 2271-2280, 2012.

GRANERO, G. E.; LONGHI, M. R.; MORA, M. J.; JUNGINGER, H. E.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J. B.; BARENDTS, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: furosemide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 101, p. 2271-2280, 2012.

GRAY, V.; KELLY, G.; XIA, M.; BUTLER, C.; THOMAS, S.; MAYOCK, S. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 6, p. 1289-1302, 2009.

GROTHER, E.; MEEKES, H.; VLIEG, E.; TER HORST, J. H.; DE GELDER, R. D.; Solvates, salts, and cocrystals: a proposal for a feasible classification system. *Crystal Growth & Design*, v.16, p.3237-3243, 2016.

HAMED, R.; AWADALLAH, A.; SUNOQROT, S.; TARAWNEH, O.; NAZZAL, S.; ALBARAGHTHI, T.; AL SAYYAD, J.; ABBAS, A. pH-dependent solubility and dissolution behavior of carvedilol - case example of a weakly basic bcs class ii drug. *AAPS PharmSciTech.*, v. 17, p. 418-426, 2016.

HAN, X.; WANG, L.; SUN, Y.; LIU, X.; LIU, W.; DU, Y.; LI, L.; SUN, J. Preparation and evaluation of sustained-release diltiazem hydrochloride pellets. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 4, p. 244-251, 2013.

HANCOCK, B. C.; YORK, P.; ROWE, R. C. The use of solubility parameters in pharmaceutical dosage form design. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 148, n. 1, p. 1-21, 1997.

HEINZ, A.; STRACHAN, C. J.; GORDON, K. C.; RADES, T. Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, n. 8, p. 971-988, 2009.

HERMANN, P. H.; RODGER, S. D.; REMONES, G.; THENOT, J. P.; LONDON, D. R.; MORSELLI, P. L. Pharmacokinetics of diltiazem after intravenous and oral administration. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 24, n. 3, p. 349-352, 1983.

HICKEY, M. B.; ALMARSSON, Ö.; PETERSON, M. L. Crystal engineering and crystallography in the pharmaceutical industry. *CrystEngComm*, v. 14, n. 7, p. 2349-2349, 2012.

HILFIKER, R. *Polymorphism: in the pharmaceutical industry*. New York: Wiley, 2006.

HILGENDORF, C.; SPAHN-LANGGUTH, H.; REGÅRDH, C. G.; LIPKA, E.; AMIDON, G. L.; LANGGUTH, P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: Permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, p. 63-75, 2000.

HU, L. D.; LIU, Y.; TANG, X.; ZHANG, Q. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of sustained-release metformin hydrochloride pellets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 64, n. 2, p. 185-192, 2006.

HUNT, N. J.; LOCKWOOD, G. P.; KANG, S. W.; WESTWOOD, L. J.; LIMANTORO, C.; CHRZANOWSKI, W.; MCCOURT, P. A.; KUNCIC, Z.; LE COUTEUR, D. G.; COGGER, V. C. Quantum dot nanomedicine formulations dramatically improve pharmacological properties and alter uptake pathways of metformin and nicotinamide mononucleotide in aging mice. *ACS Nano*, v. 15, n. 3, p. 4710-4727, 2021.

IBRAHIM, M. M.; MOHAMED, M. A.; MERSAL, G. A.; AL-JUAID, S. Insulin-like action of novel metformin-containing vanadate as a new antidiabetic drug: Synthesis, characterization and crystal structure of [Metformin-H]₂[V₂O₆].*Journal of Molecular Structure*, v. 1098, p. 92-100, 2015.

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

JAGANNATHAN, L.; MEENAKSHI, R.; GUNASEKARAN, S.; SRINIVASAN, S. FT-IR, FT-Raman and UV-Vis spectra and quantum chemical investigation of carvedilol. *Molecular Simulation*, v. 36, n. 4, p. 283-290, 2010.

JUNG, M. S.; KIM, J. S.; KIM, M. S.; ALHALAWEH, A.; CHO, W.; HWANG, S. J.; VELAGA, S. P. Bioavailability of indomethacin-saccharin cocrystals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 11, p. 1560-1568, 2010.

KAWAKAMI, K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, n. 6, p. 480-495, 2012.

KHANDAVILLI, U. B. R.; GANGAVARAM, S.; GOUD, N. R.; CHERUKUVADA, S.; RAGHAVENDER, S.; NANGIA, A.; MANJUNATHA, S. G.; NAMBIAR, S.; PAL, S. High solubility crystalline hydrates of Na and K furosemide salts. *CrystEngComm*, v. 16, p. 4842-4852, 2014.

KIM, D. W.; PARK, J. B. Development and pharmaceutical approach for sustained-released metformin succinate tablets. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 30, p. 90-99, p. 2015.

KOJIĆ-PRODIĆ, B.; RUŽIĆ-TOROŠ, Ž.; ŠUNJIĆ, V.; DECORTE, E.; MOIMAS, F. Absolute conformation and configuration of (2S, 3S)-3-acetoxy-5-(dimethylaminoethyl)-2-(4-methoxyphenyl)-2, 3-dihydro-1, 5-benzothiazepin-4 (5H)-one chloride (diltiazem hydrochloride). *Helvetica Chimica Acta*, v. 67, n. 3, p. 916-926, 1984.

KOJIMA, H.; YOSHIHARA, K.; SAWADA, T.; KONDO, H.; SAKO, K. Extended release of a large amount of highly water-soluble diltiazem hydrochloride by utilizing counter polymer in polyethylene oxides (PEO)/polyethylene glycol (PEG) matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 70, n. 2, p. 556-562, 2008.

MACKENZIE, C. F.; SPACKMAN, P. R.; JAYATILAKA, D. SPACKMAN, M. A. CrystalExplorer model energies and energy frameworks: extension to metal coordination compounds, organic salts, solvates and open-shell systems. *IUCrJ*, v. 4, n. 5, p. 575-587, 2017.

MACRAE, C. F.; SOVAGO, I.; COTTRELL, S. J.; GALEK, P. T.; MCCABE, P.; PIDCOCK, E.; PLATINGS, M.; SHIELDS, G. P.; STEVENS, J. S.; TOWLER, M.; WOOD, P. A. Mercury 4.0: from visualization to analysis, design and prediction. *Journal of Applied Crystallography*, v. 53, p. 226-235, 2020.

MAGANA, H.; CORNEJO-BRAVO, J. M.; CORDOVA-GUERRERO, I.; PALOMINO, K.; SERRANO-MEDINA, A. pH-dependent release of antihypertensives from complexes with poly (carboxyalkyl methacrylamides). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 39, p. 508-515, 2017.

- MALACHIAS, M. V. B. *et al.* 7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 107, n. 3, p. 1-103, 2016.
- MARKOVIC, M.; ZUR, M.; FINE-SHAMIR, N.; HAIMOV, E.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I.; DAHAN, A. Segmental-dependent solubility and permeability as key factors guiding controlled release drug product development. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 3, p. 295-310, 2020.
- MARQUES, M. P. M.; OLIVEIRA, P. J.; MORENO, A. J. M.; DE CARVALHO, L. A. E. B. Study of carvedilol by combined raman spectroscopy and Ab Initio MO calculations. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 33, p. 778-783, 2002.
- MATSUDA, Y.; TATSUMI, E.; THERMAL, S. Physicochemical characterization of furosemide modifications. *International Journal Pharmaceutics*, v. 60, p. 11-26, 1990.
- MCCREIGHT L. J.; BAILEY, C. J.; PEARSON, E. R. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*, v. 59, n. 3, p. 426-35, 2016.
- MICHAEL, R. K.; RALPH, E. C.; ARDEN, W. F.; BARBARA, M. K. Pharmacokinetics of orally administered furosemide. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 15, p. 178-186, 1974.
- MIRANDA, J. A.; GARNERO, C.; CHATTAH, A. K.; DE OLIVEIRA, Y. S.; AYALA, A. P.; LONGHI, M. R. Furosemide:triethanolamine salt as a strategy to improve the biopharmaceutical properties and photostability of the drug. *Crystal Growth & Design*, v. 19, p 2060-2068, 2019.
- MORGAN, T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of carvedilol. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 26, p. 335-346. 1994.
- NANUBOLU, J. B.; SRIDHAR, B.; RAVIKUMAR, K.; SAWANT, K. D.; NAIK, T. A.; PATKAR, L. N.; CHERUKUVADA, S.; SREEDHAR, B. Polymorphism in metformin embonate salt—recurrence of dimeric and tetrameric guanidinium—carboxylate synthons. *CrystEngComm*, v. 15, n. 22, p. 4448-4464, 2013.
- NARDELLI, M. PARST95 – an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. *Journal of Applied Crystallography*, v. 28, n. 5, p. 659-659, 1995.
- OCHOA, L.; FRANCISCO, J. M. Metformin-based ionic co-crystals, *WO 2012/148252 A2*, p. 1-66, 2012.
- OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar. *São Paulo: Atheneu*, p. 39, 2004.
- ÖZDEMİR, N.; ORDU, Ş. Improvement of dissolution properties of furosemide by complexation with β -cyclodextrin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, p. 19-25, 1998.
- PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Estimation of the relative contribution of the transcellular and paracellular pathway to the transport of passively absorbed drugs in the Caco-2 cell culture model. *Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 1210-1215, 1997.

- PADE, V.; STAVCHANSKY, S. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 1604-607, 1998.
- PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A.; RESENDE, J. A. L. C.; FERREIRA, G. B.; TEIXEIRA, A. M. R. F. An insight into carvedilol solid forms: effect of supramolecular interactions on the dissolution profiles. *CrystEngComm*, v. 16, p. 3168-3179, 2014.
- PRADO, L. D.; SANTOS, A. B. X.; ROCHA, H. V. A.; FERREIRA, G. B.; RESENDE, J. A. L. C. Vibrational spectroscopic and hirshfeld surface analysis of carvedilol crystal forms. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 553, p. 261-271, 2018.
- RADWAN, S. E. S.; SOKAR, M. S.; ABDELMONSIF, D. A.; EL-KAMEL, A. H.; Mucopenetrating nanoparticles for enhancement of oral bioavailability of furosemide: In vitro and in vivo evaluation/sub-acute toxicity study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 526, p. 366-379, 2017.
- RANTANEN, J.; KHINAST, J. The future of pharmaceutical manufacturing sciences. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 11, p. 3612-3638, 2015.
- REKIS, T.; BERZIŃŠ, A. On the structural aspects of solid solutions of enantiomers: an intriguing case study of enantiomer recognition in the solid state. *CrystEngComm*, v. 20, p. 6909-6918, 2018.
- RIGAKU, O. D. CrysAlisPRO. *Rigaku Oxford Diffraction*, Yarnton, England, 2015.
- RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Cocrystals: molecular design of pharmaceutical materials. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, n. 3, p. 299-300, 2007.
- RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C. P.; JAYASANKAR, A.; MATZGER, A. J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, n. 3, p. 241-274, 2004.
- SAITOH, R.; SUGANO, K.; TAKATA, N.; TACHIBANA, T.; HIGASHIDA, A.; NABUCHI, Y.; ASO, Y. Correction of permeability with pore radius of tight junctions in Caco-2 monolayers improves the prediction of the dose fraction of hydrophilic drugs absorbed by humans. *Pharmaceutical Research*, v. 21, n. 5, p. 749-755, 2004.
- SANGTANI, E.; MANDAL, S. K.; SREELAKSHMI, A. S.; MUNSHI, P.; GONNADE, R. G. Salts and cocrystals of furosemide with pyridines: differences in π -stacking and color polymorphism. *Crystal Growth & Design*, v. 17, p. 3071-3087, 2017.
- SANPHUI, P.; DEVI, V. K.; CLARA, D.; MALVIYA, N.; GANGULY, S.; DESIRAJU, G. R. Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/permeability enhancements through drug-coformer interactions. *Molecular Pharmaceutics*, v. 12, n. 5, p. 1615-1622, 2015.
- SATEESHA, S. B.; NARODE, M. K.; VYAS, B. D.; RAJAMMA, A. J. Influence of organic acids on diltiazem HCl release kinetics from hydroxypropyl methyl cellulose matrix tablets. *Journal of Young Pharmacists*, v. 2, n. 3, p. 229-233, 2010.

- SAUNDERS, M.; GABBOTT, P. Thermal analysis – conventional techniques. In: STOREY, R.; YMEN, I. (Ed.). *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*. Chichester: John Wiley & Sons, p. 135-186, 2011.
- SCALA, L. C.; MAGALHÃES, L. B.; MACHADO A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: Moreira S. M.; Paola A. V. *Sociedade Brasileira de Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2ª. ed. São Paulo: Manole, p. 780-785, 2015.*
- SCHMIDT, M. I. *et al.* High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia—the Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v. 6, n. 1, p. 123, 2014.
- SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 7, p. 603-616, 2007.
- SHAFI, N.; SIDDIQUI, F. A.; ARAYNE, M. S.; SULTANA, N. In-vitro drug–drug interaction studies of diltiazem with floroquinolones. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 40, n. 20, p. 1003-1014, 2017.
- SHELDRICK, G. M. SHELXT–Integrated space-group and crystal structure determination. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015.
- SHELDRICK, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C: structural chemistry*, v. 71, n. 1, p. 3-8, 2015.
- SHIN, S. C.; KIM, J. Physicochemical characterization of solid dispersion of furosemide with TPGS. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 251, p. 79-84, 2003.
- SOOD, A.; PANCHAGNULA, R. Drug release evaluation of diltiazem CR preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 175, n. 1, p. 95-107, 1998.
- SOUZA, M. A.; PEREIRA, C. E.; NOGUEIRA, F. H.; PIANETTI, G. A. Development and validation of a stability indicating HPLC method to determine diltiazem hydrochloride in tablets and compounded capsules. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 53, n. 3, p. 41-49, 2017.
- SOUZA, M. S.; DINIZ, L. F.; VOGT, L.; CARVALHO, P. S.; D'VRIES, R. F.; ELLENA, J. Avoiding irreversible 5-fluorocytosine hydration via supramolecular synthesis of pharmaceutical cocrystals. *New Journal of Chemistry*, v. 42, p. 14994-15005, 2018.
- SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.
- SPAMER, E.; MÜLLER, D. G.; WESSELS, P. L.; VENTER, J. P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutyl ether-7- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 16, p. 247-253, 2002.
- SPEK, A. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *Journal of Applied Crystallography*, v. 36, n. 1, p. 7-13, 2003.

- SPEK, A. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, v. 65, n. 2, p. 148-155, 2009.
- SRISANGA, S.; TER HORST, J. H. Racemic compound, conglomerate, or solid solution: phase diagram screening of chiral compounds. *Crystal Growth & Design*, v. 10, p. 1808-1812, 2010.
- STAHL, P. H.; WERMUTH, C. G. *Handbook of pharmaceutical salts properties, selection and use*. 2nd ed. New York: Wiley, 2008.
- STAHLY, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals. the search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. *Crystal Growth & Design*, v. 7, n. 6, p. 1007-1026, 2007.
- STEED, J. W. The role of co-crystals in pharmaceutical design. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 34, n. 3, p. 185-193, 2013.
- STEINER, T. Inter-anion O–H···O interactions are classical hydrogen bonds. *Chemical Communications*, v. 22, p. 2299-2300, 1999.
- STEPANOV, D.; JURE, M.; GOSTEVA, M.; POPELIS, J.; KISELOVS, G.; MISHNEV, A. Crystal structures and physicochemical properties of diltiazem base and its acetylsalicylate, nicotinate and L-malate salts. *CrystEngComm*, v. 18, n. 7, p. 1235-1241, 2016.
- STOJANOVIĆ, J.; VLADIMIROV, S.; MARINKOVIĆ, V.; VELIČKOVIĆ, D.; SIBINOVIĆ, P. Monitoring of the photochemical stability of carvedilol and its degradation products by the RP-HPLC method. *Journal of the Serbian Chemical Society*, v. 72, n. 1, p. 37-44, 2007.
- SWAPNA, B.; MADDILETI, D.; NANGIA, A. Cocrystals of the tuberculosis drug isoniazid: polymorphism, isostructurality, and stability. *Crystal Growth & Design*, v. 14, n. 11, p. 5991-6005, 2014.
- THAKRAL, N. K.; ZANON, R. L.; KELLY, R. C.; THAKRAL, S. Applications of Powder X-ray diffraction in small molecule pharmaceuticals: achievements and aspirations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 107, n. 12, p. 2969-2982, 2018.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. USP 38. 38 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.
- TOTI, U. S.; AMINABHAVI, T. M. Modified guar gum matrix tablet for controlled release of diltiazem hydrochloride. *Journal of Controlled Release*, v. 95, n. 3, p. 567-577, 2004.
- TSUTSUMI, S.; IIDA, M.; TADA, N.; KOJIMA, T.; IKEDA, Y.; MORIWAKI, T.; HIGASHI, K.; MORIBE, K.; YAMAMOTO, K. Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 421, n. 2, p. 230-236, 2011.

TURNER, M. J.; THOMAS, S. P.; SHI, M. W.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M. A. Energy frameworks: insights into interaction anisotropy and the mechanical properties of molecular crystals. *Chemical Communications*, v. 51, n. 18, p. 3735-3738, 2015.

TURNER, M. J.; MCKINNON, J. J.; WOLFF, S. K.; GRIMWOOD, D. J.; SPACKMAN, P. R.; JAYATILAKA, D.; SPACKMAN, M. A. *CrystalExplorer17*, University of Western, Australia, 2017.

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

VERMA, A.; JOSHI, S.; SINGH, D.;. Imidazole: having versatile biological activities. *Journal of Chemistry*, v. 2013, p. 1-12, 2013.

VOGT, F. G.; COPLEY, R. C. B.; MUELLER, R. L.; SPOORS, G. P.; CACCHIO, T. N.; CARLTON, R. A.; KATRINCIC, L. M.; KENNADY, J. M.; PARSONS, S.; CHETINA, O. V. Isomorphism, disorder, and hydration in the crystal structures of racemic and single-enantiomer carvedilol phosphate. *Crystal Growth & Design*, v. 10, p. 2713-2733, 2010.

WEBER, M. A. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*, v. 32, n. 1, p. 3-15, 2014.

WEI, X.; FAN, Y.; BI, C.; YAN, X.; ZHANG, X.; LI, X. Crystal structure and tautomerism study of the mono-protonated metformin salt. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 35, n. 12, p. 3495-3502, 2014.

WERMESTER, N.; AUBIN, E.; PAUCHET, M.; COSTE, S.; COQUEREL, G. Preferential crystallization in an unusual case of conglomerate with partial solid solutions. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 18, p. 821-831, 2007.

WILLIAMS, H. D.; TREVASKIS, N. L.; CHARMAN, S. A.; SHANKER, R. M.; CHARMAN, W. N. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacological Reviews*, v. 65, p. 315-499, 2013.

WOUTERS, J.; QUERE, L.; THURSTON, D. E. *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*: Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011.

YAN, Y.; CHEN, J. M.; LU, T. B. Simultaneously enhancing the solubility and permeability of acyclovir by crystal engineering approach. *CrystEngComm*, v. 15, n. 33, p. 6457-6460, 2013.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; LEE, V. H; HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

ZHANG, H.; YU, L.X. Dissolution testing for solid oral drug products: theoretical considerations. *Journal of the American Pharmaceutical Review*, v. 7, p. 26-31, 2004.

ZHANG, Q.; WANG, X.; XUE, H.; HUANG, B.; LIN, Z.; CAI, Z. Determination and comparison of the solubility, oil-water partition coefficient, intestinal absorption, and biliary excretion of carvedilol enantiomers. *AAPS PharmSciTech*, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2020.

ZHANG, Q.; HUANG, B.; XUE, H.; LIN, Z.; ZHAO, J.; CAI, Z. Preparation, characterization, and selection of optimal forms of (S)-carvedilol salts for the development of extended-release formulation. *Molecular Pharmaceutics*, v. 18, n. 6, p. 2298-310, 2021.

ZHOU, W. X.; ZHAO, H. W.; CHEN, H. H.; ZHANG, Z. Y.; CHEN, D. Y. Characterization of drug–drug salt forms of metformin and aspirin with improved physicochemical properties. *CrystEngComm*, v. 21, n. 25, p. 3770-3773, 2019.