

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E  
BIOTECNOLÓGICOS**

**DEISE NARDINO**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES POLIMORFOS  
DO CLORIDRATO DE METFORMINA UTILIZANDO TÉCNICA DE  
RECRISTALIZAÇÃO POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTES**

**DISSERTAÇÃO**

**TOLEDO**

**2018**

**DEISE NARDINO**

**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES POLIMORFOS  
DO CLORIDRATO DE METFORMINA UTILIZANDO TÉCNICA DE  
RECRISTALIZAÇÃO POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTES**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Toledo.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt  
Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michelle Budke Costa

**TOLEDO  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

N224p

Nardino, Deise

Preparo e caracterização dos diferentes polimorfos do cloridrato de metformina utilizando técnica de recristalização por evaporação de solventes. / Deise Nardino – 2018.

54 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencout

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Budke Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. Toledo, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Poliformismo. 2. Cristais 3. Processos Químicos – Dissertações. I.Bittencout, Paulo Rodrigo Stival orient. II.Costa, Michelle Budke coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos. IV. Título.

CDD: 660

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES POLIMORFOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA UTILIZANDO TÉCNICA DE RECRISTALIZAÇÃO POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTES**

Por

**DEISE NARDINO**

Essa dissertação foi apresentada às 14 horas do dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos, Linha de Pesquisa de Processos Biotecnológicos, no Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados. Após deliberação, a banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

---

Prof. Dr. Paulo Stival Bittencourt (Orientador – PPGQB)

---

Prof. Dr. Fernando Reinoldo Scremin (Membro Interno – PPGQB)

---

Prof. Dr. Geraldo Emílio Viventini (Membro Externo – UNIOESTE)

***\*A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação do PPGQ***

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, pela oportunidade de cursar o mestrado, dando-me fé e coragem durante toda a caminhada, cercou-me de amigos, e em todos os momentos esteve comigo, serei eternamente grata por tanto amor!

Aos meus Orientadores Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Michele Budke Costa, por acreditar na minha capacidade e em meu trabalho, pela orientação, incentivo, apoio oferecido e pela oportunidade de realizar este projeto. Serviram como motivação para esta realização. Obrigada pela orientação, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando Reinoldo Scremin pelo auxílio e ensinamentos repassados.

A Universidade Federal da Integração Latino-America, por permitir a realização de algumas medidas.

Ao meu amado marido Jonas Roberto, quero agradecer por estar ao meu lado e me acompanhar em todos os momentos, por acreditar em mim, por sempre me confortar e me dar coragem nos desafios da vida. Essa vitória é sua também meu amor!

Aos meus pais, Paulo Cesar e Solange, que embora não tivessem as mesmas oportunidades que tenho tido, sempre lutaram para me proporcionar o melhor.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação durante o mestrado, em especial ao Prof. Dr. Gilberto Cunha pelo acolhimento, atenção, assistência e solicitude.

Aos amigos que sempre estiveram prontos a ajudar em especial meus colegas Pâmela Dalposso, Patricia Dias Gamero e Daniel Marcos Dal Pozzo.

A CAPES, pela concessão de bolsa de estudo que muito me ajudou durante a realização deste trabalho.

# PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES POLIMORFOS DO CLORIDRATO DE METFORMINA UTILIZANDO TÉCNICA DE RECRISTALIZAÇÃO POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTES

## RESUMO

Neste trabalho foi realizado o estudo do comportamento térmico e a caracterização do insumo farmacêutico de trabalho cloridrato de metformina (IFT) e de seus cristais preparados a partir de diferentes solventes. A caracterização do IFT foi preparada através das técnicas de Difração de Raios X, Calorimetria Exploratória Diferencial Simultânea, Espectroscopia no Infravermelho, Análise de gases Evoluídos e Microscopia Óptica. Os resultados obtidos pela caracterização do IFT serviram de referência para posterior comparação com os cristais preparados, a partir do IFT, pela técnica de recristalização por evaporação de solventes. a partir desta técnica, foi preparado dois ensaios de temperatura de dissolução e armazenamento para o crescimento dos cristais. A caracterização dos cristais foi realizada pelas técnicas Difração de Raios X, Calorimetria Exploratória Diferencial Simultânea e Microscopia óptica. Os estudos atentaram que o IFT está na Forma polimórfica I, sendo que com a exposição do IFT à combinação de diferentes solventes e determinadas condições de temperatura de dissolução e armazenamento, resulta em diferentes formas cristalinas do referido fármaco, além os estudos apresentar outra forma polimórfica caracterizada como Forma II. Esta inferência foi concluída a partir dos difratogramas dos cristais, gráficos de análise térmica e imagens de microscopia óptica. Foi visto diferentes difratogramas quando comparados ao referência, diferentes pontos de fusão, além da obtenção de distintos cristais, permitindo seguramente identificar e caracterizar segundo polimorfo obtido. Com estes resultados foi possível apurar que houve polimorfismo. Desta forma, caracterizou-se A Forma polimórfica I E Forma II do fármaco cloridrato de metformina, comprovando a hipótese postulada e o bom desempenho das técnicas de experimentação e análise utilizadas.

**Palavras-chave:** Poliformismo, Cristais, Processos Químicos.

# **PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF THE DIFFERENT POLYMORPHES OF METFORMIN CHLORIDRATE USING SOLVENT EVAPORATION RECRYSTALLATION TECHNIQUE**

## **ABSTRACT**

In this work the thermal behavior and the characterization of the pharmaceutical raw material metformin hydrochloride (IFT) and its crystals prepared from different solvents were performed. The IFT characterization was prepared using the techniques of X-ray Diffraction, Simultaneous Differential Exploration Calorimetry, Infrared Spectroscopy, Evolved Gas Analysis and Optical Microscopy. The results obtained by the characterization of the IFT were used as references for further comparison with the crystals prepared from the IFT by the solvent evaporation recrystallization technique. From this technique, two dissolution and storage temperature tests were prepared for crystal growth. The crystal characterization was performed by the techniques X-Ray Diffraction, Simultaneous Differential Exploratory Calorimetry and Optical Microscopy. The studies have investigated that the IFT is in polymorphic form I, and with the exposure of the IFT to the combination of different solvents and certain dissolution and storage temperature conditions, results in different crystalline forms of said drug, in addition the studies present another polymorphic form characterized as Form II. This inference was concluded from crystal diffractograms, thermal analysis graphs and optical microscopy images. It was observed different diffractograms when compared to the reference, different melting points, besides the obtaining of different crystals, allowing to safely identify and characterize the obtained polymorph. With these results it was possible to verify that there was polymorphism. In this way, the polymorphic Form I and Form II of the drug metformin hydrochloride was characterized, proving the postulated hypothesis and the good performance of the techniques of experimentation and analysis used.

**Key-words:** Polymorphism, Crystals, Chemical Processes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de estruturas (a) cristalina e (b) amorfa. ....	13
Figura 2 - Representação esquemática do retículo cristalino e cela unitária.....	15
Figura 3 - Representação dos sete tipos de sistemas cristalinos (Redes de Bravais).....	16
Figura 4 - Esquema de decisões sobre a definição de especificações de polimorfismo.....	18
Figura 5 - Fórmula estrutural do cloridrato de metformina.....	21
Figura 6 - Método de difração de raio X (Experimento de Laue) .....	22
Figura 7 - Interferência entre raios a nível planar. ....	23
Figura 8 - Fluxo de trabalho utilizado para analisar as amostras recristalizadas do IFT.....	30
Figura 9 - Difratoograma do IFT obtido pela indústria.....	31
Figura 10 - Curva DTG para o IFT. Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 10 °C.min <sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min <sup>-1</sup> . ....	32
Figura 11 - Curva DTG para o IFT. Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 10 °C.min <sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min <sup>-1</sup> .....	33
Figura 12 - Dados do DSC do IFT em diferentes razões de aquecimento. ....	34
Figura 13 - Espectroscopia no Infravermelho do IFT.....	35
Figura 14 - A – Análise de gases evoluídos (EGA) do IFT; B- EGA em 3D do IFT. Para análise dos compostos voláteis desprendidos do IFT.....	36
Figura 15 - Imagem do pó IFT. Microscopia Óptica 10x .....	37
Figura 16 - Difratoograma dos cristais de cloridrato de metformina preparados a partir do ensaio 1 e ensaio 2 com diferente temperatura de armazenamento para crescimento dos cristais.....	40
Figura 17 - Dados do DSC dos cristais obtidos da recristalização do IFT tratadas pelo ensaio 1 (dissolução a 50 °C e armazenamento a 10 °C). Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 2 °C.min <sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min <sup>-1</sup> .....	41
Figura 18 - Dados do DSC dos cristais obtidos da recristalização do IFT tratadas pelo ensaio 1 (dissolução a 50 °C e armazenamento a 55 °C). Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 2 °C.min <sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min <sup>-1</sup> .....	43



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DRX	Difração de Raios X
DRXP	Difração de Raios X em Policristais
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial Simultânea
DTG	Termogravimetria derivada
EGA	Análise de Gases Evoluídos
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFT	Insumo Farmacêutico de Trabalho
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Humana
TG	Termogravimetria

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	13
3.1 Polimorfismo e suas propriedades .....	13
3.2 Propriedades do estado sólido.....	14
3.3 Cristalização.....	16
3.4 Influência do polimorfismo na indústria farmacêutica .....	18
3.5 Cloridrato de metformina .....	21
3.6 Caracterização e detecção dos polimorfos .....	22
3.6.1 Difração de raios x .....	23
3.6.2 Análises térmicas.....	25
3.6.2.1 Análise calorimétrica exploratória diferencial simultânea.....	25
3.6.2.2 Análise termogravimétrica.....	26
3.6.3 Espectroscopia no infravermelho.....	26
3.6.4 Microscopia óptica .....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 Insumo farmacêutico de trabalho (IFT) .....	28
4.2 Caracterização do IFT.....	28
4.2.1 Análise por difração de raios X (DRX) .....	28
4.2.2 Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC).....	28
4.2.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise de gases evoluídos (EGA).....	29
4.2.4 Microscopia óptica .....	29
4.3 Procedimento para a obtenção de cristais a partir do IFT .....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
5.1 Caracterização do IFT .....	32
5.1.1 Análise por difração de raios X .....	32
5.1.2 Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea .....	33

5.1.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise de gases evoluídos (EGA).....	36
5.1.4 Microscopia óptica .....	38
<b>5.2 Caracterização dos cristais obtidos a partir do IFT .....</b>	<b>38</b>
5.2.1 Análise por difração de raios X .....	38
5.2.2 Calorimetria exploratória diferencial simultânea (DSC) .....	41
5.2.3 Microscopia óptica .....	43
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos produtos farmacêuticos, tanto os princípios ativos quanto os excipientes são encontrados no estado sólido e são de uso oral (CUI, 2007). De acordo com Shekunov e York (2000), embora estas formas farmacêuticas sejam de administração cômoda ao paciente, merecem atenção especial, pois sua dissolução pode ser afetada significativamente pelas características peculiares do próprio fármaco, pela presença de excipientes adicionados para beneficiar a dissolução e pelas técnicas de fabricação empregadas.

Segundo Araujo et al. (2012) as alterações não intencionais da dissolução das formas farmacêuticas sólidas podem causar ainda, problemas em relação à biodisponibilidade e à bioequivalência, demandando um controle rigoroso em toda etapa de produção. Este processo é dispendioso e envolve desde as certificações de qualidade das matérias primas utilizadas, excipientes e princípios ativos, até os processos finais de embalagem, armazenamento e distribuição. Considerar tais características garante a manutenção da qualidade dos produtos concedidos à população (SHEKUNOV; YORK, 2000).

A biodisponibilidade de um fármaco é considerada a característica mais relevante para sua comercialização, uma vez que, segundo Capucho et al. (2008), qualquer fator que altere sua solubilidade pode acarretar na ineficácia e/ou toxicidade do medicamento comercializado. Sendo a solubilidade do fármaco o fator limitante para a absorção do medicamento, eleva-se a importância do controle dos fatores que alteram a dissolução do fármaco, na garantia da qualidade dos produtos destinados à população.

Dentre os fatores que afetam a solubilidade e absorção de fármacos está a ocorrência de polimorfismo, que segundo Brittain (2012), é um dos principais problemas na produção e desenvolvimento de medicamentos.

Segundo Celsi e Martino (2015) a falta de conhecimento das diferentes formas cristalinas e da existência de polimorfismo, bem como a influência dos efeitos do polimorfismo no preparo de determinada formulação repercute na qualidade final do produto, podendo acarretar prejuízos para a saúde da população e significativo impacto econômico para as indústrias farmacêuticas.

Diversas técnicas de identificação do polimorfismo podem contribuir para o controle de qualidade durante todo o processo de produção dos fármacos e matérias

primas sólidas utilizadas na sua fabricação, além de auxiliar com informações relevantes para o armazenamento do produto final (EMEA, 2006; BRASIL 2003a; BRASIL, 2003b). Os métodos são utilizados para verificar a estabilidade térmica, indicar possíveis mudanças no hábito cristalino dos fármacos e na formação de polimorfos, reações no estado sólido, possíveis interações entre os princípios ativos e dos excipientes, além de pureza dos princípios ativos e excipientes (GIRON et al., 2004; CHEUNG; PETERSON, 2009).

O cloridrato de metformina é um fármaco anti-hiperglicêmico, pertencente à classe das biguanidas com principal indicação em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 não insulino-dependentes (RAMACHANDRAN; RAMUKUTTY, 2014). Pela literatura, o cloridrato de metformina se apresenta em dois polimorfos diferentes: a forma termodinamicamente estável (Forma I) (HARIHARAN et al., 1989) e o polimorfo metaestável (Forma II) (CHILDS et al., 2004), porém a pouca informação referente a caracterização destas formas cristalinas.

Neste contexto, o presente trabalho visa fornecer informações comportamentais do fármaco cloridrato de metformina quando submetido a recristalização pela técnica de evaporação de solventes. Estes dados são obtidos com a utilizando das técnicas Difração de Raio X, TG-DSC, FTIR, além das técnicas EGA e Microscopia Óptica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do trabalho foi em preparar cristais do insumo farmacêutico cloridrato de metformina utilizando a técnica de recristalização por evaporação de solventes.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar o insumo farmacêutico de trabalho cloridrato de metformina (IFT) através das técnicas de DRX, DSC-TG, FTIR, EGA e Microscopia Óptica
2. Realizar um estudo a partir da técnica DSC para determinar qual a condição de razão de aquecimento mais favorável para melhor caracterização térmica dos cristais a partir do IFT.
3. Preparar cristais a partir do IFT utilizando diversos solventes sob duas condições de temperaturas de armazenamento para o crescimento do cristais;
4. Caracterizar os cristais preparados pela técnica de DRX, DSC e Microscopia óptica.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão dos conceitos relevantes para o desenvolvimento desse trabalho abrange desde os conceitos do polimorfismo até propriedades do estado sólido. Dessa forma, este capítulo está subdividido em tópicos para descrever esses processos.

#### 3.1 Polimorfismo e suas propriedades

O polimorfismo é definido como a capacidade de uma substância química sólida apresentar no mínimo duas estruturas cristalinas distintas (FDA, 2007). Estas substâncias são chamadas polimorfos e possuem a mesma composição química, porém estruturas e propriedades físico-químicas diferentes.

De forma análoga, o pseudopolimorfismo é o termo utilizado para as formas cristalinas de uma dada molécula que apresenta partículas como água ou solventes (FDA, 2007). Nos pseudopolimorfos, os solvatos são a subclasse de cristal que apresenta quantidades estequiométricas de solventes na estrutura da molécula, e os hidratos caracterizam pseudopolimorfos onde a água é o solvente (VIPPAGUNTA et al., 2001).

Grande parte dos polimorfos pode ser obtida mudando-se o solvente de cristalização. De modo geral, é indesejável utilizar solvatos para fins farmacêuticos, dado que a presença de vapores orgânicos pode ser vista como impureza no produto (MORISSETTE et al., 2004).

Além das estruturas polimórficas descritas, existem ainda os cocristais, definidos como uma forma sólida cristalina contendo mais de uma partícula sólida em temperatura ambiente (PUIGJANER et al., 2009). Estes compostos coexistem no cristal seguindo uma razão estequiométrica (organização molecular) bem definida entre uma molécula alvo e uma molécula neutra formadora do cocrystal, denominada coformador (SHAN; ZAWOROTKO, 2008; PUIGJANER et al., 2009). Quando não há organização molecular e não há definição da forma cristalina, se trata de uma estrutura amorfa (RAW et al., 2004).

Em comparação com polimorfos cristalinos, a forma amorfa de um sólido é geralmente a quimicamente menos estável (BALANI et al., 1995; PETERSON et al., 2006). De acordo com Glusker e Trueblood (2010), o conhecimento da configuração

absoluta e das conformações moleculares é adicionalmente útil para o entendimento das suas propriedades químicas, físico-químicas e biológicas.

A determinação da forma termodinamicamente mais estável de um fármaco, que apresente diversas formas cristalinas, demanda analisar sua temperatura e pressão de transição dos diferentes polimorfismos.

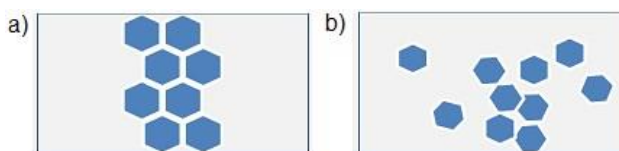
É importante definir as propriedades físico-químicas de um dado composto que apresenta diferentes polimorfos, a saber: solubilidade, perfil de dissolução, ponto de fusão, fluidez, espectro molecular, dureza, cristalinidade, cor, estabilidade, higroscopicidade, ponto de ebulição, índice de refração, densidade, volume, condutividade elétrica ou térmica, difração de raio X, estabilidade química e reações no estado sólido (ROLLAND; SULLIVAN, 2003; FLORENCE; ATTWOOD, 2003; VIPPAGUNTA et al., 2001), pois tais propriedades caracterizam aplicabilidade e potenciais benefícios do fármaco.

### 3.2 Propriedades do estado sólido

As propriedades físicas de fármacos e excipientes farmacêuticos no estado sólido são de interesse, pois praticamente todos os fármacos em alguma etapa da formulação são manipulados na forma de pó, e tais propriedades afetam diretamente o comportamento biológico do paciente e a formulação do fármaco (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Os fármacos em estado sólido podem ocorrer como substâncias cristalinas, apresentando forma definida identificável, ou como partículas amorfas sem estrutura definida, como apresentado na Figura 1.

**Figura 1 - Representação de estruturas (a) cristalina e (b) amorfa**



Fonte: Adaptado de Cuffini et al. (2011)

As estruturas da Figura 1 são classificadas por subfases com base na ordem da embalagem molecular e apresentando diferentes níveis de energia (CUI, 2007; PETERSON et al., 2006).



Embora uma molécula orgânica de um sólido possa existir sob duas ou mais formas cristalinas, apenas uma destas formas é termodinamicamente estável a uma determinada pressão e temperatura, com níveis energéticos potencialmente mais baixos, devido à redução do seu volume molecular em relação aos amorfos ou outro estado desordenado.

Em geral, a forma mais estável (menor energia livre) de uma substância polimórfica exibe um ponto de fusão mais alto e menor solubilidade com o máximo de estabilidade química, ou seja, mantém sua integridade química dentro de limites especificados e as mesmas propriedades e características durante o período de armazenamento e uso (RAW et al., 2004; VISHWESHWAR et al., 2006).

Na maioria dos casos, a forma mais estável resulta em menor velocidade de dissolução e, conseqüentemente, menor velocidade de absorção (SINGHAL; CURATOLO, 2004; FDA, 2007). É possível afirmar, adicionalmente, que as demais formas, consideradas metaestáveis, se converteriam à forma estável com o passar do tempo induzidas por fatores termodinâmicos (VIPAGUNTA et al., 2001). Segundo Burger e Ramberger (1979), quanto mais termodinamicamente estável é o polimorfo, mais quimicamente estável o polimorfo é em relação a uma forma metaestável.

A conversão de uma forma polimórfica metaestável para um polimorfo mais estável pode afetar o desempenho farmacêutico do medicamento (RODRIGUEZSPONG et al., 2004). De acordo com Segundo Shekunov e York (2000), verificações de dificuldades nos processos de moenda, micronização, liofilização, compressão, granulação úmida, granulação seca e armazenamento são indícios de diferentes polimorfos nos medicamentos.

O polimorfismo pode também resultar em alterações na estabilidade química, principalmente para compostos com predisposição à degradação no estado sólido (ARAÚJO, 2009). Porém, dentre as conseqüências do polimorfismo, a mais crítica é a diferença na biodisponibilidade dos diferentes polimorfos de um fármaco, uma vez que, a velocidade de absorção de um fármaco depende da sua velocidade de dissolução podendo torná-lo menos ativo, inativo ou tóxico de acordo com o tipo de polimorfo empregado (FERREIRA, 2011; CUFFINI et al., 2011).

O rastreamento de todas as formas no estado sólido e o desenvolvimento de técnicas de cristalização para sua caracterização devem preferencialmente ser efetuadas o mais cedo possível no desenvolvimento de um medicamento

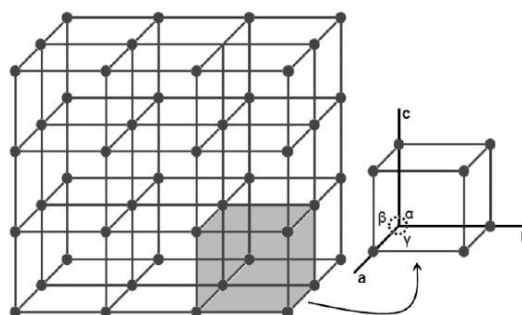
(SHEKUNOV; YORK, 2000; ARAUJO et al., 2012) para a garantia da qualidade de medicamentos.

### 3.3 Cristalização

O processo de formação de um cristal, a cristalização, caracteriza-se pelo agrupamento de moléculas ou íons em um arranjo regular (BERNSTEIN et al., 1999). O conjunto de métodos de cristalização se denomina engenharia de cristais, e abrange desde a concepção e o crescimento de sólidos moleculares cristalinos até a análise da transformação das propriedades dos materiais (PETERSON et al., 2006).

A cela unitária é o menor subcomponente (menor unidade imaginária) de organização de uma estrutura cristalina, ilustrada na Figura 2.

**Figura 2 - Representação esquemática do retículo cristalino e ad cela unitária.**

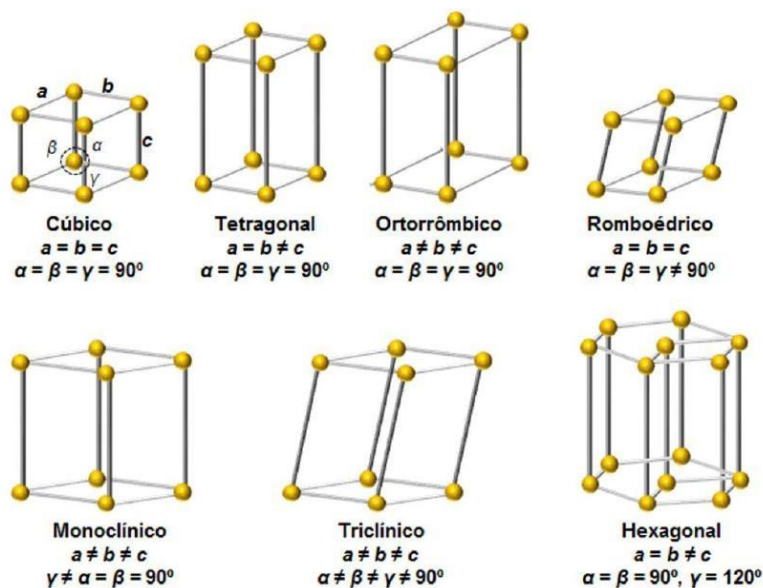


**Fonte: Prado e Rocha (2015).**

A geometria é determinada pelos comprimentos das arestas e ângulos entre as faces (parâmetros de rede), onde as dimensões das celas são definidas pelos vetores de translacionais (eixos cristalográficos)  $a$ ,  $b$  e  $c$  que indicam o comprimento dos três eixos, enquanto  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , são os três ângulos existentes em um vértice da célula (DATTA; GRANT, 2004).

Existem celas unitárias com sete tipos de simetria: cúbica, tetragonal, ortorrômbica, romboédrica (ou trigonal), hexagonal, monoclinica e triclínica, como ilustrado na Figura 3 (ARAUJO et al., 2012; DATTA; GRANT, 2004).

Figura 3 - Representação dos sete tipos de sistemas cristalinos, Redes de Bravais.



Fonte: Prado e Rocha (2015).

Derivam dessas sete formas simétricas as chamadas 14 redes de Bravais, onde diferentes combinações possíveis geram múltiplos sistemas cristalinos com diferentes níveis de energia e se propagam continuamente em três dimensões (FLORENCE; ATTWOOD, 2003; BLEICHER; SASAKI, 2000). A diferenciação da geometria das moléculas caracteriza o polimorfismo (VIPAGUNTA et al., 2001; CUI, 2007; FLORENCE; ATTWOOD, 2003), onde os cristais podem variar quanto a distribuição das celas unitárias e não ser iguais ao longo das diferentes direções cristalográficas (BRITAIN; FIESE, 1999; FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Segundo Beinstein et al. (1999) os cristais, podem apresentar-se estruturados e espacialmente organizados. Uma ferramenta principal para que ocorra esse agrupamento molecular é a ligação de hidrogênio, que é responsável pela maioria das interações intermoleculares dirigidas nos sólidos moleculares (PETERSON et al., 2006).

Dentre muitas técnicas utilizadas para determinar as formas cristalinas de um sólido, as mais comumente utilizadas são as técnicas com solventes realizadas com soluções ou suspensões (CUI, 2007). Este método é bastante usual na produção de cristais, logo, largamente utilizado pela indústria farmacêutica na investigação do fenômeno do polimorfismo nos medicamentos (MANGIN; PUEL; VEESLER, 2009).

### 3.4 Influência do polimorfismo na indústria farmacêutica

O evento culminante do polimorfismo na indústria farmacêutica foi a remoção temporária de mercado farmacêutico do inibidor da protease do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) usado no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), Norvir® em 1998. Tal medicamento passou a apresentar graves problemas de solubilidade devido ao aparecimento de um segundo polimorfo previamente desconhecido que impedia sua formulação original. Resultando também num enorme custo e inconveniência para o inovador, afetado o uso deste medicamento pelos doentes com HIV durante cerca de um ano, quando não havia formulação de cápsula disponível (BAUER et al., 2001; CHEMBURKAR et al., 2000).

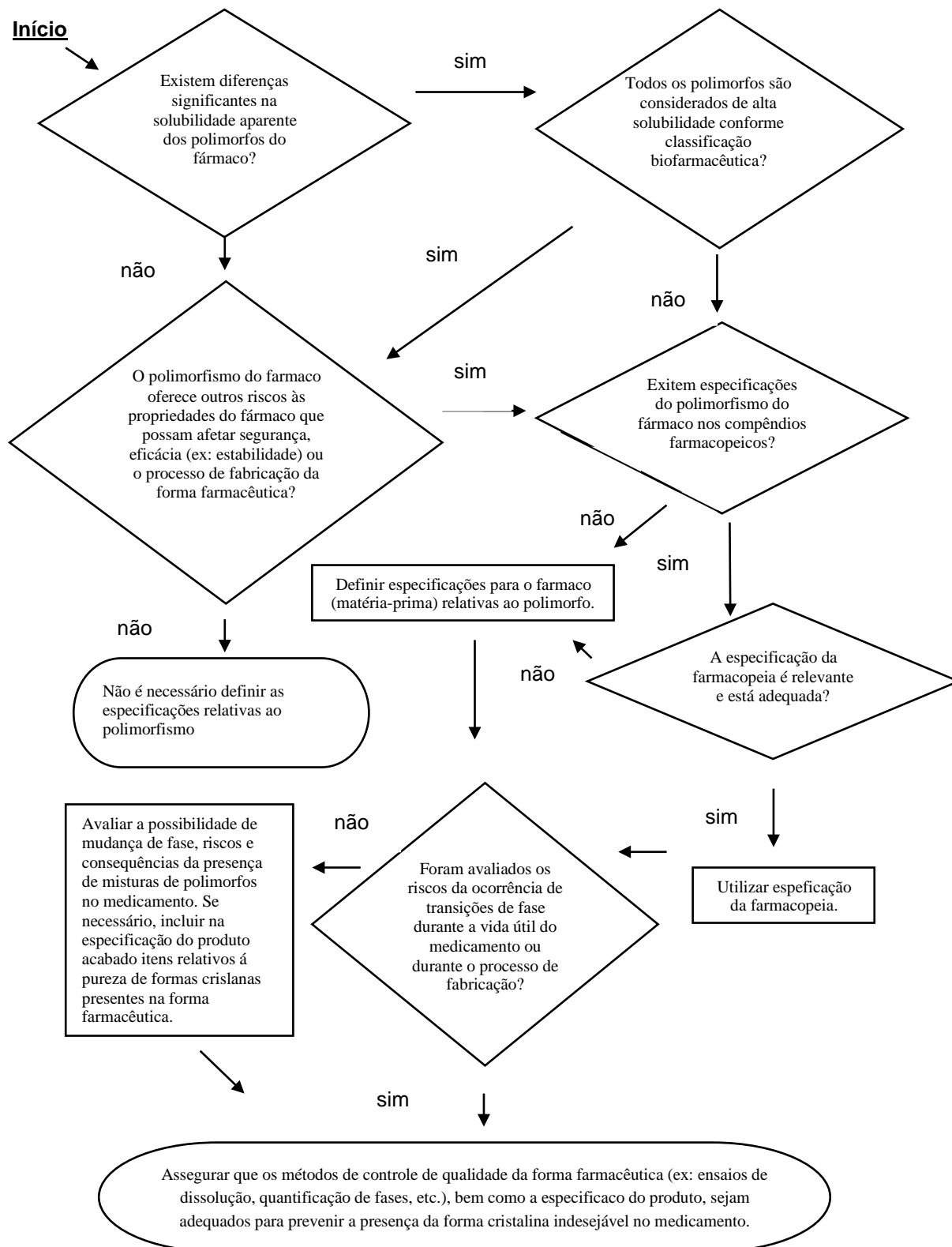
Esse fato colaborou para maiores discussões acerca do assunto por parte das agências reguladoras de vários países, de modo a se tentar evitar novas ocorrências semelhantes (BAUER et al., 2001; FDA, 2007; BRASIL, 2003<sup>a</sup>; BRASIL, 2003<sup>b</sup>). Trouxe também um nível maior de consciência para a indústria, desencadeando interesses na investigação e desenvolvimento dos medicamentos (BYRN, 2001).

Já existem trabalhos publicados em relação aos problemas tanto de compostos em estágio inicial (LEWIS, 2000) quanto de medicamentos já comercializados (BAUER et al., 2001; CHEMBURKAR et al., 2000).

Em complementação, um guia, foi disponibilizado pela FDA em julho de 2007 onde recomenda que procedimentos analíticos apropriados sejam utilizados para detectar as formas cristalinas.

Na Figura 4 está apresentada o esquema de decisões para auxiliar na identificação das necessidades de se definir especificações para polimorfos na matéria-prima e no produto acabado.

**Figura 4 - Esquema de decisões sobre a definição de especificações de polimorfismo.**



**Fonte: Adaptado de FDA (2007).**

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), solicita para o registro de genéricos, similares e inovadores, informações sobre os prováveis polimorfos e, sempre que possível, a metodologia analítica para a sua determinação na matéria-prima e no produto final, através da resolução RDC nº 136, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003a).

Uma vez que é permitido o registro de até três fabricantes de princípio ativo por medicamento, uma avaliação técnica criteriosa deve ser realizada, pelo laboratório fabricante e pela agência reguladora, a respeito das possíveis diferenças na matéria-prima adquirida e dos impactos relacionados ao polimorfismo (BRASIL, 2003a; BRASIL, 2003b).

Em controvérsia, a entrada precoce de versões genéricas de alguns fármacos notáveis foi permitida com base no uso de um polimorfo (ou hidratos) patentemente distintos na equivalência farmacêutica, sendo uma alternativa atraente para a indústria farmacêutica (PETERSON et al., 2006).

Em se tratando do processo de síntese de fármacos, a sequência de ações é: purificação, cristalização, secagem, cisalhamento e estocagem do fármaco (GIRON et al., 2004). Durante estes processos, as características físico-químicas do fármaco serão determinadas, bem como possíveis impurezas e resíduos de solventes, além de substâncias relacionadas a síntese do fármaco (ZHANG et al., 2004).

No entanto, em todas as etapas do seu desenvolvimento, há a possibilidade de haver transformações polimórficas, o que demanda implantação de etapas adicionais de controle (STAHLY, 2007).

Sabe-se que as impurezas afetam as cristalizações, inibindo o processo, podendo em alguns casos ter influência na forma polimórfica produzida. No caso citado "ritanovir", há evidências de que impurezas levaram ao aparecimento da forma II mais estável e com solubilidade quase seis vezes menor do que o polimorfo inicial, anteriormente desconhecido (CHEMBURKAR et al., 2000).

Uma das questões básicas da formulação farmacêutica é determinar quais condições (por exemplo, temperatura, umidade, composição) tornam as formas sólidas instáveis (BYRN et al., 2001). Pois de fato, a estabilidade do fármaco durante a vida útil do produto é de importância primordial no desenvolvimento de um medicamento. (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Portanto, mesmo com a identificação, caracterização e seleção de formas cristalinas para um desenvolvimento de formulação, é importante garantir que a forma cristalina permaneça inalterada até o final do prazo de validade do medicamento (CAPUCHO et al., 2008).

### 3.5 Cloridrato de metformina

O cloridrato de metformina é um fármaco anti-hiperglicêmico, pertencente à classe das biguanidas com principal indicação em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 não insulino-dependentes (RAMACHANDRAN; RAMUKUTTY, 2014).

Segundo a Farmacopeia Brasileira Volume 1 (2010), as biguanidinas são indicadas, principalmente, para o tratamento dos diabéticos obesos, porque não estimulam o aumento da síntese de insulina nem dos de ácidos graxos, ao contrário das sulfoniluréias.

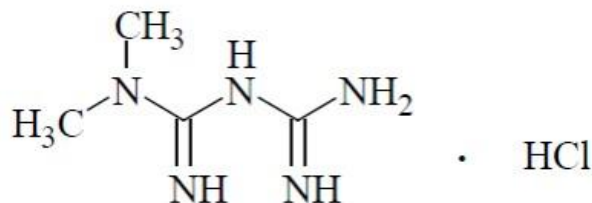
De acordo com Silva (2006), o principal mecanismo de ação do cloridrato de metformina é em suprimir a gliconeogênese, constituindo 75% do seu efeito farmacológico. Outros efeitos desempenhados são a redução da absorção da glicose pelo trato gastrointestinal e a redução dos níveis plasmáticos de glucagon.

A dose inicial deste fármaco no tratamento citado é desde 500-850 mg ao dia, com doses máximas de 1.000-1.700 mg dia<sup>-1</sup> e requer o fracionamento em pelo menos duas tomadas diárias. A dose máxima recomendada é de 2,550 mg ao dia, que devem ser divididas em três doses por refeição (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; PINHO; STORPIRTIS, 2001).

O tempo de meia vida deste fármaco é de 12 horas e, convém salientar que não é metabolizado e sim excretado como composto ativo pela urina. Sua disponibilização comercial se dá sob vários nomes comerciais, que incluem o fármaco de referência, genéricos e similares (GOODMAN & GILMAN, 2007)

O cloridrato de metformina corresponde quimicamente à 1,1 dimetilbiguanida cuja molécula correspondente está ilustrada na Figura 5. Apresenta-se como pó cristalino higroscópico branco, inodoro e de sabor amargo. A massa molecular para o cloridrato é 165,6 g mol<sup>-1</sup>, enquanto a base é de 129,2 g mol<sup>-1</sup> e o pKa é 11,5 (BRETNALL; CLARKE, 1998; CRISTON et al., 2012).

**Figura 5 - Fórmula estrutural do cloridrato de metformina.**



**Fonte: Adaptado de Bretnall e Clarke (1998).**

Este fármaco é classificado como de classe III no sistema biofarmacêutico (BCS), é solúvel em água (1:2), levemente solúvel no álcool etílico 96°, e praticamente insolúvel em acetona, clorofórmio e diclorometano. Deve ser conservado em recipientes bem fechados, visto que é higroscópico (BRETNALL; CLARKE, 1998).

Pela literatura, o cloridrato de metformina se apresenta em dois polimorfos diferentes: a forma termodinamicamente estável (Forma I) (HARIHARAN et al., 1989) e o polimorfo metaestável (Forma II) (CHILDS et al., 2004), ambos com estruturas monoclinicas (RAMACHANDRAN; RAMUKUTTY, 2014).

O ponto de fusão de cloridrato de metformina foi relatado como aproximadamente 225 °C, podendo variar para mais ou para menos (BRETNALL; CLARKE, 1998).

### **3.6 Caracterização e detecção dos polimorfos**

Numerosos métodos têm sido desenvolvidos e utilizados para a identificação e caracterização das diferentes formas (tanto cristalinas quanto amorfas) de compostos sólidos (FDA, 2007; YU, 2004).

A combinação de métodos analíticos fornece meios para identificação e isolamento de cada modificação no material estudado. Visa a determinação da estequiometria da estrutura cristalina, estabilidade térmica, determinação das propriedades espectroscópicas, indicação de possíveis mudanças no hábito cristalino dos fármacos e formação de polimorfos. Além de reações no estado sólido, possíveis interações entre os princípios ativos e os excipientes, pureza dos



princípios ativos e excipientes, entre outras propriedades (ALLEN et al., 2013; CUFFINI et al., 2011).

Dentre os recursos, destacam-se pela precisão a Difração de Raio X, análises térmicas como DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura) e TG (termogravimetria), espectroscopia de Infravermelho e microscopia óptica (CHEUNG; PETERSON, 2009), que são detalhadas a seguir.

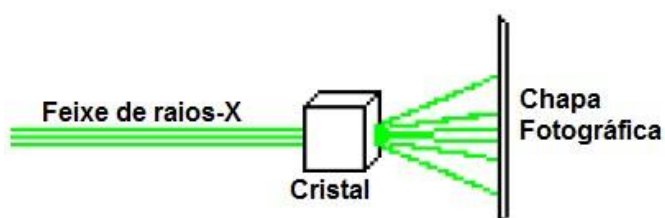
### 3.6.1 Difração de raios X

A Difração de Raios X (DRX), desenvolvida em 1912 por Max von Laue, tem provido informações muito importantes sobre o arranjo e distribuição dos átomos em materiais cristalinos (HOLLER et al., 2009), sendo considerada a técnica mais apropriada para diferenciar e caracterizar polimorfos (TIWARI et al., 2007; CUFFINI et al., 2011; STEPHENSON, 2005).

Aplicações dessa técnica na pesquisa de polimorfos podem ser citadas na identificação de polimorfos do benzilato de anlodipino combinado à diferentes solventes (DANDU et al., 2012) e na dissolução dos polimorfos do ácido mefenâmico por secagem por pulverização (DIXIT et al., 2012).

O método de DRX ocorre pela excitação de um átomo, o que leva a emissão de um feixe de raios X incidentes sobre a superfície de um cristal em um determinado ângulo (denominado  $\theta$ ), onde parte desta energia é absorvida pelos átomos da amostra que está sob análise. O mecanismo é ilustrado na Figura 6.

**Figura 6 - Método de difração de raios X.**

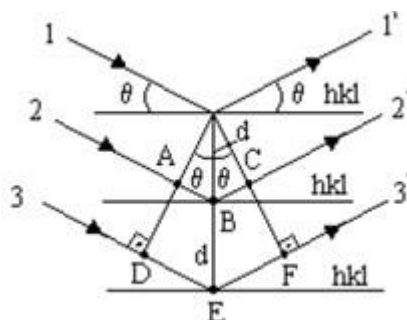


Fonte: Adaptado de Bleicher e Sasaki (2000).

A interação eletrostática entre o feixe incidente e as camadas eletrônicas dos átomos da amostra, faz com que ocorra a emissão de raios X por parte da substância analisada, o que caracteriza o fenômeno denominado difração (BLEICHER; SASAKI, 2000).

A condição para que se observe a difração de um feixe de raios X pelo cristal é dada pela equação da Lei de Bragg ( $\lambda = 2d \sin \theta$ ), que determina que pelo fato de existir planos de átomos paralelos em materiais cristalinos, ocorre uma diferença de percurso entre o feixe de raios X difratado em dois planos de átomos paralelos e adjacentes (TAUPIN, 1964). Este fenômeno é ilustrado na Figura 7.

Figura 7 - Interferência entre raios a nível planar.



Fonte: Adaptado de Bleicher e Sasaki (2000).

As linhas horizontais na Figura 7 representam os planos cristalinos, e as setas representam os raios X incidentes no cristal. Quando a condição  $\lambda = 2d \sin \theta$  é obedecida, há um pico de intensidade, responsável pelos pontos mais claros no padrão de Laue. Logo, a Equação de Bragg possibilita calcular a distância interplanar dos átomos, representada pela letra “d” (BLEICHER; SASAKI, 2000).

Como nas substâncias cristalinas existe uma significativa quantidade de planos de átomos com orientações diferentes, e que possuem distâncias interplanares diferentes, o conjunto de valores de “d” possibilita diferenciar todos os materiais cristalinos, incluindo os polimorfos (HOLLER et al., 2009; SANTOS, 1975).

No difratograma de DRX ocorre uma série de picos ou linhas, onde as linhas de intensidades são produzidas em função da composição química e ao ordenamento cristalino das moléculas no cristal. A posição dos feixes difratados depende da unidade repetitiva da estrutura do cristal e do comprimento de onda do feixe incidente (BLEICHER; SASAKI, 2000).

Por esse motivo, as diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco podem ser diferenciadas inequivocamente pelo seu difratograma, onde a posição dos picos não se altera no caso de mistura com outras substâncias (BRITTAIN, FIESE, 1999). Esta condição é válida mesmo que se considere a direção e a intensidade de todos os feixes difratados (HOLLER et al., 2009).

Esta técnica destaca-se por ser o único método analítico que fornece dados qualitativos e quantitativos sobre os compostos presentes em um material sólido. Estes são recomendados para a identificação qualitativa do cristalino, figurando na confirmação de identidade de amostras desconhecidas por comparação ao padrão de referência (CHUNG; SMITH, 1999). Além de ser necessário apenas uma quantidade muito pequena de amostra (TIWARI et al., 2007).

Durante a síntese, a maioria das substâncias de interesse farmacêutico é obtida na forma de pó microcristalino, o que torna a DRX muito utilizada para a identificação de diferentes polimorfos (BRITAIN, 2009).

### 3.6.2 Análises térmicas

#### 3.6.2.1 Análise calorimétrica exploratória diferencial simultânea

A calorimetria exploratória diferencial (DSC), mede a diferença de energia entre a substância e um material de referência (cadinho de alumínio vazio), em função da temperatura, enquanto são submetidos a uma programação controlada de temperatura (GIRON, 1995).

Esta técnica demonstra extensa aplicabilidade na identificação de transformações de fase, caracterização de hidratos e sistemas solvatados, assim como na previsão da estabilidade de compostos (BRITAIN, 1999).

Na avaliação de substâncias que apresentam diferentes formas cristalinas é possível determinar a mudança das estruturas, pelas temperaturas de fusão e dessolvatação, que são obtidas como fluxo de aquecimento diferencial *versus* temperatura (GIRON, 1995).

A área do pico relativo ao evento de fusão é diretamente proporcional à quantidade de calor absorvida (evento endotérmico) ou liberada (evento exotérmico) na transformação física (em mJ ou kJ/mol) (BRITAIN, 1999).

As curvas DSC possibilitam a determinação de transformações no estado sólido e, de acordo com Giron (1999), no estudo do polimorfismo, podem apresentar três perfis diferentes.

A título exemplificativo, se consideradas duas formas sólidas A e B, A de menor ponto de fusão e B de maior ponto de fusão, os perfis são:

- 1 – A transição ocorre antes do ponto de fusão da forma B, e aparece como um pico exotérmico para sistemas monotrópicos ou endotérmicos para sistemas enantiotrópicos;
- 2 – Após fusão da forma A, cristais da forma B crescem dando lugar aos fundidos, representada por um pico exotérmico. Este perfil pode corresponder a um sistema monotrópico ou enantiotrópico;
- 3 – Cada forma cristalina apresenta seu próprio pico de fusão, sem conversão entre elas. Além dessas correlações, é possível também obter informações sobre a ocorrência de hidratos e solvatos (GIRON, 1995).

### 3.6.2.2 Análise termogravimétrica

A termogravimétrica é utilizada para medir a variação de massa em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a programação controlada de atmosfera e temperatura (BRITAIN, 1999).

Para fins farmacêuticos, seu uso é descrito na caracterização, determinação de pureza, quantificação de umidade, identificação de pseudopolimorfismo e na avaliação da estabilidade de fármacos de estruturas cristalinas (PALERMO et al., 2012).

Estudos de cinética de decomposição também podem ser analisados por essa técnica, onde, quanto mais alta for a temperatura da decomposição de um determinado composto, maior será a sua estabilidade à temperatura ambiente (BRITAIN, 1999).

O resultado da TG é mostrado sob a forma de uma curva termogravimétrica, fornecendo informações relativas a composição e a estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários na degradação e do resíduo formado (GIRON, 1995).

### 3.6.3 Espectroscopia no infravermelho

O método de Espectroscopia no Infravermelho (FTIR), baseiam-se na exposição da amostra a uma radiação eletromagnética com energia suficiente para ocasionar alterações nos níveis de energia vibracional acompanhado por mudanças nos níveis de energia rotacional das moléculas da amostra (VOGEL, 2011; WATSON, 2005).

Estas possibilitam obter informações diretas acerca dos grupos funcionais no material a ser analisado, sendo de grande valor para confirmar a existência do polimorfismo (ou da formação do solvato) pois são governadas pelas massas dos átomos constituintes e as constantes de força entre eles que afetam os modos vibracionais.

Além disso, as alterações espectroscópicas são influenciadas pelo estado físico da amostra e pelas ligações intermoleculares e intramoleculares existentes, especialmente ligações de hidrogênio (LU; ROHANI, 2009).

Uma vez que a espectroscopia no infravermelho em estado sólido pode ser utilizada para verificar a natureza do polimorfismo em escala molecular, o método é útil em casos que a caracterização cristalográfica não é possível, sendo necessária apenas uma pequena quantidade de amostra (cerca de 1 mg) (BUGAY, 2001). Além do que, esta técnica ainda proporciona investigação das interações intermoleculares entre fármacos e excipientes (HÉDOUX; GUINET; DESCAMPS, 2011).

Apesar de espectroscopia de infravermelho ser conveniente, em alguns casos, os espectros de diferentes polimorfos são idênticos, gerando a necessidade de técnicas complementares (LU; ROHANI, 2009).

#### 3.6.4 Microscopia óptica

A microscopia é uma técnica importante para a caracterização de polimorfos, pois através dela pode-se observar a forma cristalina de uma substância, como por exemplo, o tamanho e a forma dos cristais (YU et al., 2003).

Florence e Attwood (2003), relataram que dois cristais podem obter morfologias diferentes e a mesma cela unitária; isto pode acontecer por influência no eixo de crescimento do núcleo, que é dependente de concentração, temperatura e tipo de solventes utilizados. Desta forma, em alguns casos, o polimorfismo se encontra de forma diferenciada, sendo possível ser observado por alguns tipos de microscópios.

O microscópio óptico tem a iluminação e o conjunto de lentes como seus elementos básicos. Para materiais opacos à luz, observa-se uma superfície polida e utiliza-se a luz refletida na amostra. A superfície polida pode ou não sofrer ataque químico para evidenciar a presença de alguns cristais. O aumento máximo de um microscópio óptico é da ordem de 2000 vezes, conseqüentemente, alguns

elementos estruturais por serem muito pequenos, tornam-se difíceis de serem observados neste tipo de microscópio.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Insumo farmacêutico de trabalho (IFT)**

O IFT (teor de pureza declarado 99,74%) empregado neste trabalho, foi sintetizado pela empresa Aarti Drugs Limited (Manufactures of Bulk & Drugs Chemicals – Índia), adquirido por um laboratório farmacêutico e cedido pelo mesmo para a pesquisa deste trabalho.

### **4.2 Caracterização do IFT**

#### **4.2.1 Análise por difração de raios X (DRX)**

Para a obtenção do difratograma de raios x, cerca de 1 grama da amostra de IFT foi acomodada em um molde do difratômetro, sendo bem compactada manualmente e analisada em temperatura ambiente. Os parâmetros para a leitura da difração foram corrente de 30 mA, submetido a 40 kV e radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,542 \text{ \AA}$ ). A leitura  $2\theta$  foi realizada de  $10^\circ$  a  $40^\circ$ , com taxa de  $0,01^\circ.\text{min}^{-1}$ . A análise foi realizada em um difratômetro de raios X, marca PANalytical, modelo Empyrean.

A identificação de fase (estrutura cristalina) ocorre através do uso de algoritmos de comparação (*Software Difrac® Plus EVA*) baseados no banco de dados do JCPDS (Joint Committee on Power Diffraction Standards).

#### **4.2.2 Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC)**

A amostra de IFT foi submetida a análises térmicas TG-DSC. Pesou-se em torno de 8 mg da amostra e esta foi colocada na panela do analisador térmico iniciando a programação estabelecida para análise da amostra.

A programação foi submetida em atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 20 ml.min<sup>-1</sup> e razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> iniciando em 150 °C até 600 °C. As curvas TG e DSC foram obtidas utilizando um analisador térmico simultâneo da marca Perkin Elmer, modelo STA 6000.

Após submeter o IFT ao TG-DSC para confirmação do seu ponto de fusão em relação ao laudo do laboratório, uma amostra de cristal a partir do IFT foi submetida a quatro programas de razão de aquecimento para determinar qual a condição favorecia sua melhor caracterização térmica.

A programação foi estabelecida com razões de aquecimento de 2 °C.min<sup>-1</sup>, 5 °C.min<sup>-1</sup>, 10°C.min<sup>-1</sup> e 20 °C.min<sup>-1</sup>. Atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 20 ml.min<sup>-1</sup>. Temperatura do programa 200 °C á 250 °C.

#### 4.2.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise de gases evoluídos (EGA)

Para a obtenção do espectro do IFT, colocou-se em torno de 1 grama da amostra no equipamento Espectrofotômetro da marca Perkin Elmer, modelo "Frontier Universal ATR Simplym". A programação foi estabelecida através da absorção na região do infravermelho na faixa de 4000 cm<sup>-1</sup> a 600 cm<sup>-1</sup>, com intervalo de 4 cm<sup>-1</sup>.

O IFT também foi submetido a Análise de Gases Evoluídos (EGA), sendo utilizado um programa controlado de temperatura de 290°C a 570°C, com comprimento de ondas na faixa de 4000 cm<sup>-1</sup> a 600 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2.4 Microscopia óptica

O IFT também foi submetido a análise de fotomicrografia obtida em um microscópio óptico marca Olympus Modelo BX51 acoplado a câmera filmadora Olympus DP25, com ampliação de 10 vezes e tamanho da régua de 1 mm.

Foi pego cerca de 1 grama de amostra e colocado em uma lâmina para visualização. O microscópio foi ajustado até obter foco perfeito do material para tirar a foto.

### 4.3 Procedimento para a obtenção de cristais a partir do IFT

Foi utilizado o método de recristalização por evaporação de solventes por ser mais rápido, barato e com bons resultados. Aplicou-se a combinação de duas metodologias empregadas pelos autores Childs et al. (2004) e Benmessaoud et al. (2016), para a obtenção dos cristais.

Do estudo dos dois métodos, dois ensaios com temperatura de dissolução em solução e armazenamento para seus crescimentos foram definidos, onde as condições de cada ensaio seguem descritas nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1 - Condições experimentais para recristalização IFT: Ensaio 1**

<b>Solvente</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Condição de temperatura de solubilização °C</b>	<b>Condição de armazenamento do material °C</b>	<b>Tempo de cristalização (dias)</b>
Água	1	50	10	7
Acetona	1	50	10	7
Etanol	1	50	10	7
Metanol	1	50	10	7
Acetonitrila	1	50	10	7

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 2 - Condições experimentais para recristalização IFT: Ensaio 2**

<b>Solvente</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Condição de temperatura de dissolução °C</b>	<b>Condição de armazenamento do material °C</b>	<b>Tempo de cristalização (dias)</b>
Água	1	50	55	1
Acetona	1	50	55	1
Etanol	1	50	55	1
Metanol	1	50	55	1
Acetonitrila	1	50	55	1

Fonte: Autoria própria.

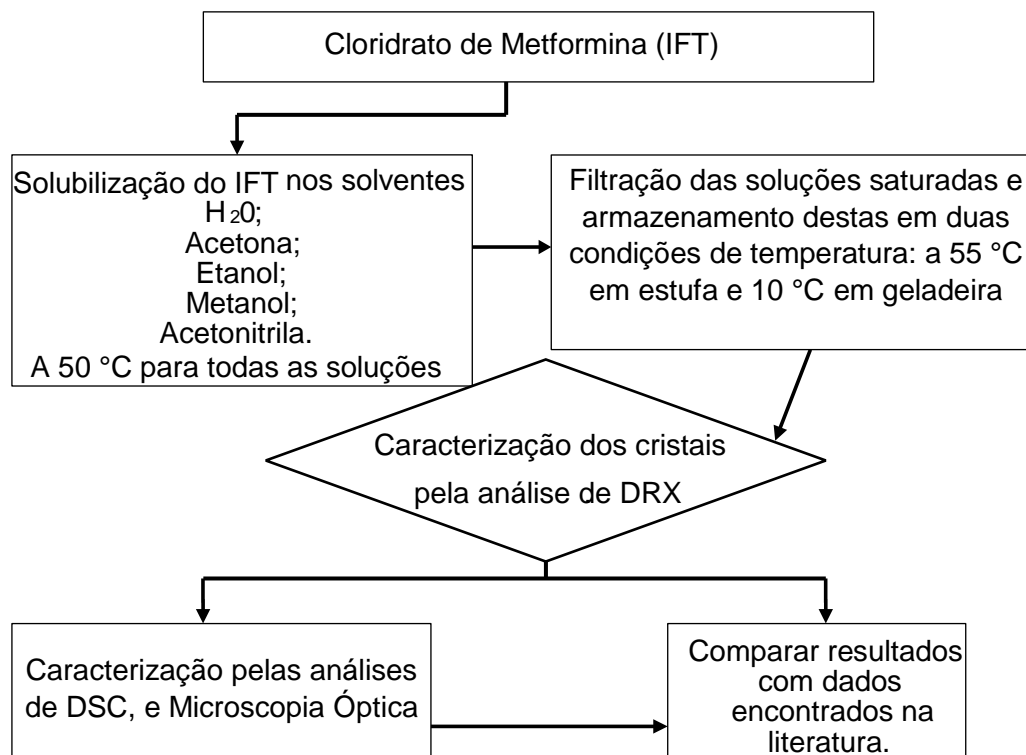
Os solventes utilizados para o trabalho tiveram como relevância para seleção sua polaridade em relação ao IFT e classificação de toxicidade, sendo utilizado a maioria dos solventes com poder de toxicidade baixa.

O trabalho iniciou-se em pesar um grama do IFT para solubilizá-lo a 50 °C em cada solvente nos dois ensaios pré definidos. Após a solubilização em solução saturada, foi realizado um processo de filtração simples com papel filtro de todas as soluções para a retirada de possíveis impurezas, e armazenado de acordo com cada condição de ensaio até o crescimento dos primeiros cristais. Estes foram coletados do becker e permanecidos em papel filtro na temperatura de crescimento do cristal



até a total secura do solvente. Em seguida, foi dado início as análises dos cristais de acordo os as programações definidos para as mesmas análises do IFT. O fluxo da sequência de análises para os cristais segue representado na Figura 8.

**Figura 8 - Fluxo de trabalho utilizado para analisar as amostras recristalizadas do IFT.**



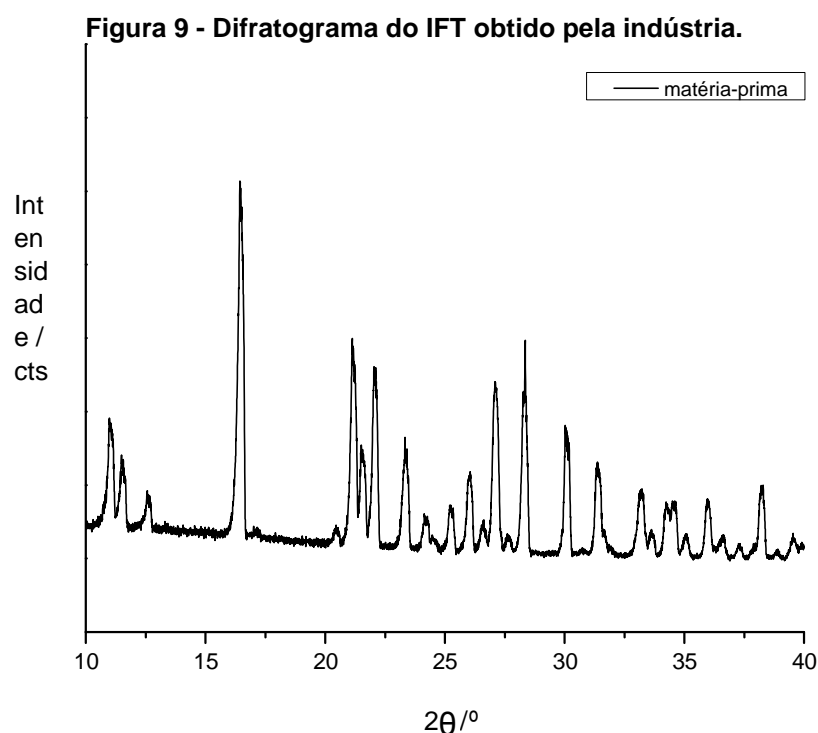
**Fonte: Autoria Própria.**

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do IFT

#### 5.1.1 Análise por difração de raios X

O difratograma padrão obtido para a matéria prima de trabalho é representado na Figura 9.



Fonte: Autoria própria.

O difratograma resultante do IFT é semelhante ao resultado reportado por Childs et al. (2004), que caracteriza o difratograma como sendo a Forma I do fármaco cloridrato de metformina.

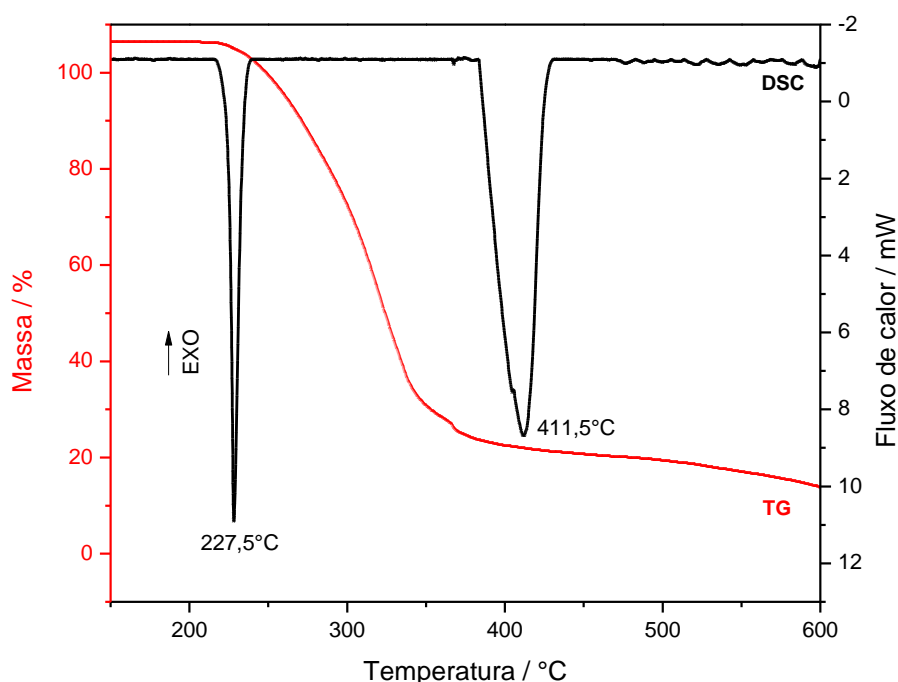
De acordo com o mesmo autor, os principais picos que caracterizam a Forma I do fármaco cloridrato de metformina são de 10° à 15° e de 18 à 25° de 2-Theta. Logo, pode ser confirmada a identificação do IFT como sendo a forma cristalina de Forma I. Esta segue como sendo a forma padrão para comparativo com os cristais preparados na sequência do trabalho.

### 5.1.2 Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial simultânea

A caracterização térmica visou avaliar modificações relacionadas à fusão e ao surgimento de alguma alteração térmica anormal do IFT.

No estudo do comportamento térmico, uma amostra do IFT foi analisada por TG-DSC, sendo as curvas apresentadas na Figura 10.

**Figura 10 – Curva TG/DSC para o IFT. Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min<sup>-1</sup>**



**Fonte: Autoria própria.**

A curva de DSC apresenta dois picos endotérmicos: um pico agudo em 227,5 °C e outro à 411,5 °C, atribuídos ao ponto de fusão e de decomposição (pirólise), respectivamente. Próximo a fusão e um pouco antes da decomposição, apresentou-se pequenos distúrbios decorrentes da acomodação da amostra na fusão e no início da degradação, respectivamente. De acordo com Ramachandran e Ramukutty (2014), o ponto de fusão do cloridrato de metformina é próximo a 227,08 °C, o que está de acordo com o observado no presente estudo.

O pico agudo referente a fusão sugere elevado grau de pureza para a amostra. Fato reportado pelos autores Benmessaoud et al., (2016). Além disso, o

fato da amostra apresentar apenas um pico de fusão, demonstra que o material de estudo possui apenas uma forma polimórfica.

Na Figura 11 é observado o gráfico de termogravimetria derivada (DTG) do IFT. Nesta análise é evidenciado três alterações da amostra: uma à aproximadamente 300 °C, outra a 350 °C e uma terceira a 553 °C. As duas primeiras alterações sugerem que o fármaco cloridrato de metformina apresenta volatilização de compostos gasosos após a fusão seguido da decomposição do fármaco, representado pela terceira alteração.

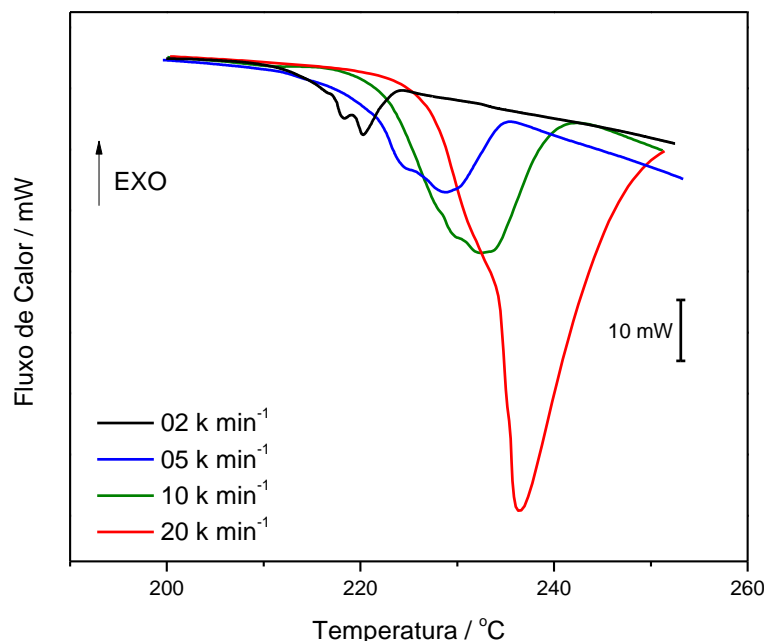
**Figura 11 - Curva DTG para o IFT. Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min<sup>-1</sup>**



Fonte: Autoria própria.

Ainda pela técnica de calorimetria DSC, o estudo realizado no estudo IFT para determinar qual a condição de razão de aquecimento favorecia uma melhor caracterização térmica tanto do IFT quanto dos cristais preparados a partir do IFT, está apresentado na Figura 12:

**Figura 12 – Ensaio de diferentes razões de aquecimento utilizando uma amostra de cristal que apresentou dois picos de fusão.**



**Fonte: Autoria própria.**

A amostra do cristal foi submetida a quatro programações de razão de aquecimento determinadas à  $2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  e  $20\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

A programação foi estabelecida em atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de  $20\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  iniciando de  $200\text{ °C}$  à  $250\text{ °C}$ .

Sob as condições das análises utilizadas, é possível notar que ambas as curvas de DSC apresentam dois picos endotérmicos referente a dois picos de fusão.

No entanto, a intensidade dos picos variam de acordo com a razão de aquecimento. Conforme a elevação da razão de aquecimento, os dois picos endotérmicos vão se descaracterizando.

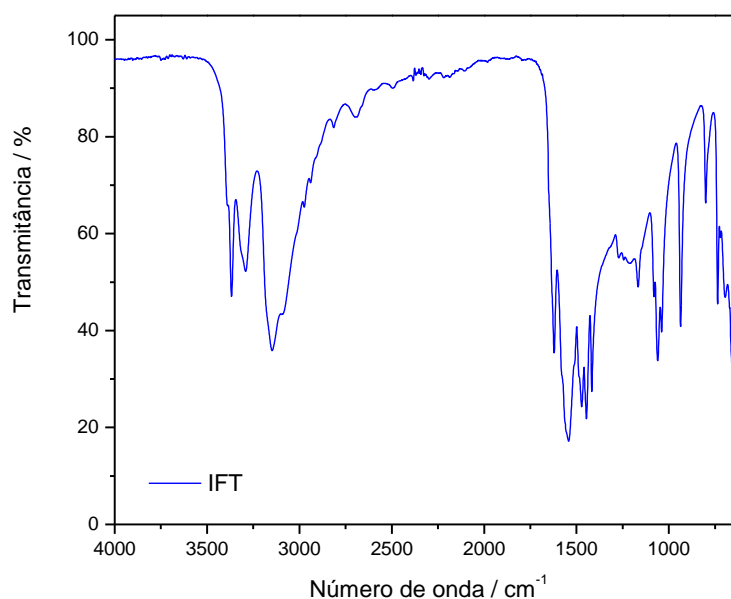
Quando a amostra é submetida a razão de aquecimento à  $20\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ , é visto apenas um leve ombro e em seguida um pico agudo. Fato este que ocorre devido a perda da sensibilidade do equipamento em relação ao cristal cloridrato de metformina.

Para prosseguir o estudo, através do parâmetros analisados, determinamos que a condição de razão de aquecimento mais favorável para melhor caracterização térmica dos cristais cloridrato de metformina é a  $2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 5.1.3 Espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise de gases evoluídos (EGA)

Na Figura 13 está representado o espectro no infravermelho do IFT. Este é apresentado com bandas típicas de absorção intensa em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$  devido à vibração de alongamento primária N-H. Uma banda em  $3150\text{ cm}^{-1}$  é relevante em relação ao alongamento secundário N-H. As bandas de absorção intensas e características em  $1627\text{ cm}^{-1}$  e  $1548\text{ cm}^{-1}$ , além das  $1467\text{-}1416\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas as vibrações de alongamento C=N, e que de acordo com Ramachandran e Ramukutty (2014) essas bandas são as impressões digitais do cloridrato de metformina revelando a estrutura das biguanidas, comprovando assim, que o material de estudo é o fármaco cloridrato de metformina.

**Figura 13 - Espectroscopia no Infravermelho do IFT.**

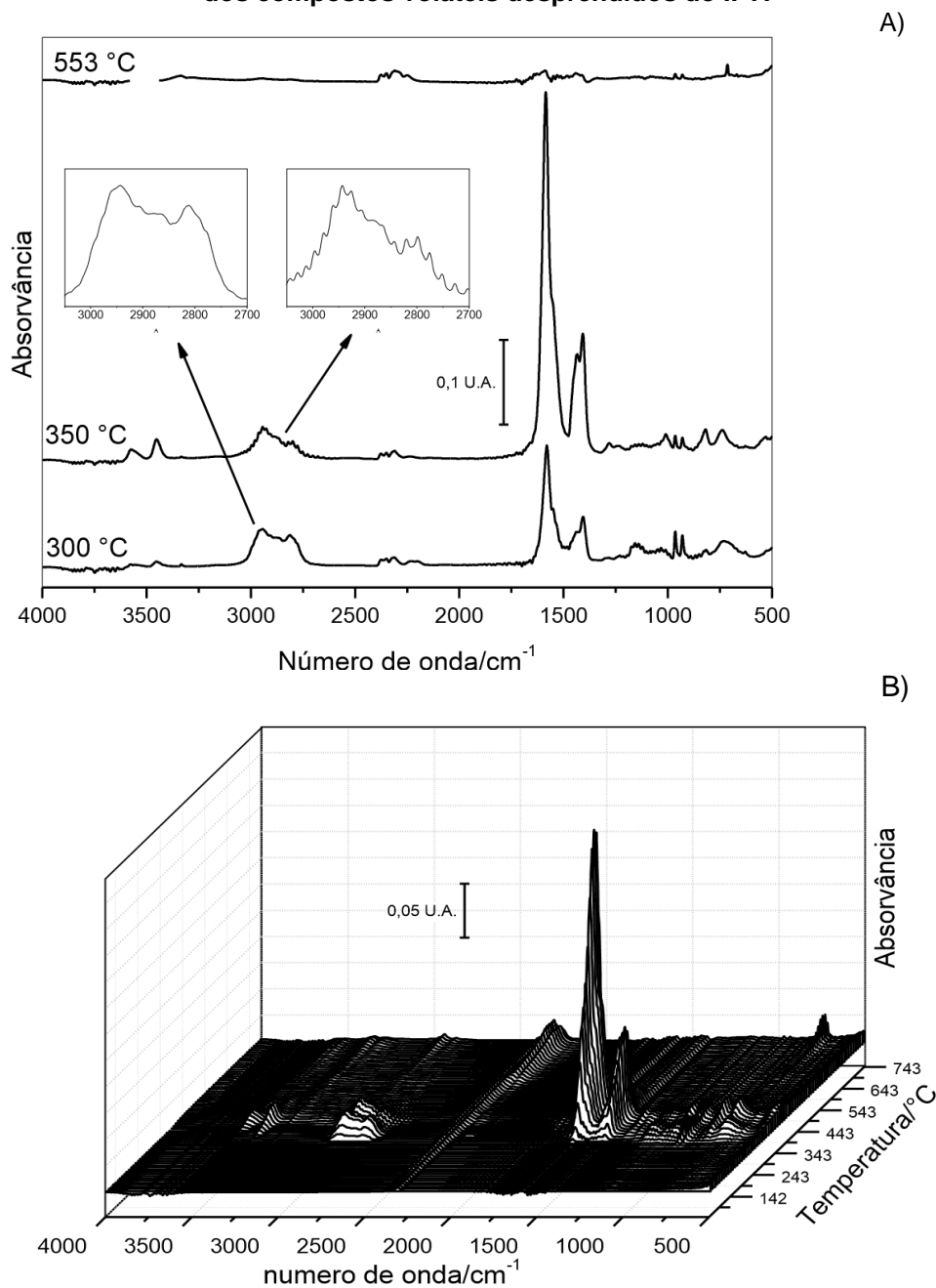


**Fonte: Autoria própria.**

As bandas de absorção que aparecem na região do número de ondas inferiores ( $1000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ ) são geralmente devidas a movimentação, torção, balanço, flexão ou vibrações de estiramento das moléculas. De acordo com Bretnall e Clarke (1998), a análise do espectro é um dos procedimentos para a identificação do cloridrato de metformina. Equiparando o espectro obtido do IFT em relação a referência reportado na Farmacopeia Britânica Volume I (1993), a amostra está em concordância.

Os produtos gasosos detectados por FTIR a partir da técnica de EGA antes da decomposição térmica do IFT, segue representado na Figura 14. Esta análise possibilitou um estudo qualitativo dos produtos gasosos liberados pelo IFT.

**Figura 14 - A – Análise de gases evoluídos (EGA) do IFT; B- EGA em 3D do IFT. Para análise dos compostos voláteis desprendidos do IFT.**



**Fonte: Autoria própria.**

Observa-se para a faixa de temperatura de 300 a 350 °C o surgimento de bandas para a região de 2800 a 3050  $\text{cm}^{-1}$ , resultado da volatilização do IFT, sendo

que bandas para esta região podem ser atribuídas a vibração de estiramento  $\nu_{C-H}$ , presentes na molécula de cloridrato de metformina. Tal volatilização é confirmada pela presença de bandas para a região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  a temperatura de  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o que é referente ao grupamento N-H. Desta forma, observa-se que antes do evento de degradação que ocorreu a temperatura de aproximadamente  $410\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ocorre primeiramente uma volatilização do IFT, fato este que foi confirmado por EGA.

#### 5.1.4 Microscopia óptica

Na Figura 15 está representada a imagem do cristal do IFT, obtida através da microscopia óptica.

**Figura 15 - Imagem do pó IFT por Microscopia Óptica.**



**Fonte: Autoria própria.**

Moriyama et al., (2015) e Benmessaoud et al., (2016) relatam que em suas observações, os cristais puros do fármaco cloridrato de metformina foram encontrados na Forma polimórfica I, apresentam hábitos cristalinos prismáticos. Estando de acordo com o observado neste estudo.

## 5.2 Caracterização dos cristais obtidos a partir do IFT

### 5.2.1 Análise por difração de raios X

Os difratogramas de raios X dos cristais do cloridrato de metformina preparadas a partir do ensaio 1 e ensaio 2 seguem representados na Figura 16.

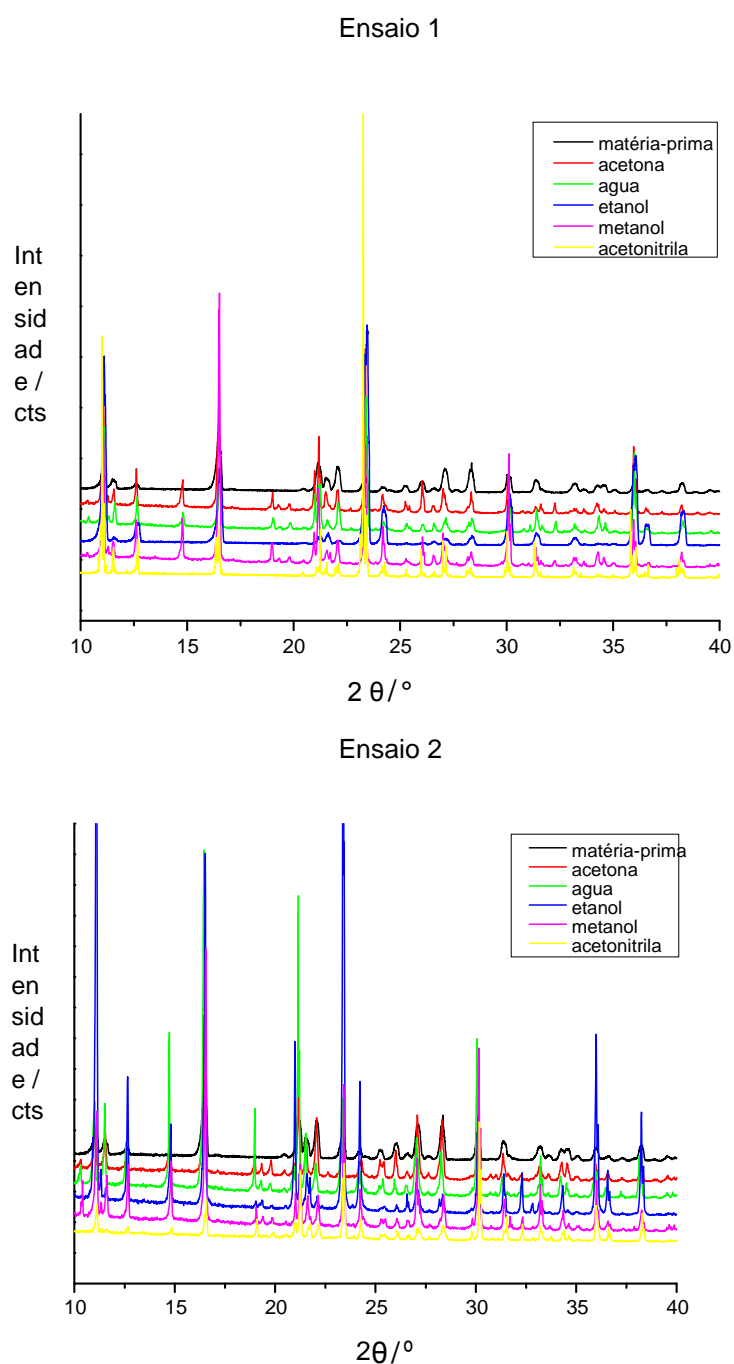
Os perfis dos difratogramas do ensaio 1 apresentam duas substâncias cristalinas, com picos definidos. As amostras preparadas com os solventes etanol e acetone nitrila apresentaram a forma semelhante ao padrão IFT, definido como sendo



Forma I, com picos que caracterizam esta forma cristalina de 2-Theta de 10 à 15° e de 18 à 25°.

Já as amostras do ensaio 1 preparadas com os solventes acetona, água e metanol apresentaram um difratograma diferente do padrão IFT. Quando comparado os resultados com a literatura, os difratogramas são muito semelhantes ao atribuído a Forma II, reportado por Childs et al., (2004). Os principais picos de difração de raios X pertencentes ao composto cloridrato de metformina na Forma II em relação aos picos que caracterizam a Forma I são mais intensos e mais numerosos de 10 ° à 15 ° e entre 18 ° à 25 °, além de posições variadas de picos entre 30 ° à 35 °. Estas mesmas variações de picos são vistos nos difratogramas de todas as amostras preparadas pelo ensaio 2, com picos menos intensos na amostra preparada com acetonitrila. Apesar disso, mesmo com picos menores, não foi encontrado nenhuma tendência aparente no viés em direção a cristalização na Forma I.

**Figura 16 - Difratoograma dos cristais de cloridrato de metformina preparados a partir do ensaio 1 e ensaio 2 com diferente temperatura de armazenamento para crescimento dos cristais.**



**Fonte: Autoria própria.**

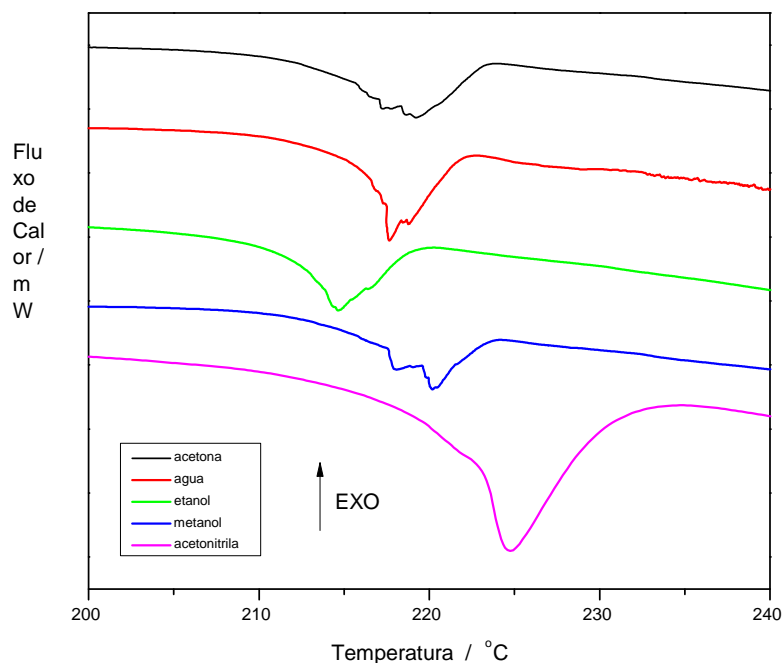
Neste âmbito, a temperatura de evaporação dos solventes a 55 °C para a formação das amostras de cristais do ensaio 2, teve um efeito significativo para estes cristais apresentassem diferente resultado quando comparado ao difratograma padrão IFT.

As amostras de cristais preparadas pelo ensaio 2 em relação aos cristais preparados pelo ensaio 1 também provocaram resultados de difratogramas diferentes. Enquanto que os cristais preparados a 10 °C (ensaio 1) apresentaram duas formas cristalinas diferentes, os cristais preparados a 55 °C (ensaio 2) provocaram apenas uma forma cristalina. De acordo com Yang e Gogos (2013), este evento pode ser atribuído a um efeito de temperatura, onde o aumento da taxa de evaporação que ocorre em temperaturas mais elevadas induz a formação de apenas um cristal.

### 5.2.2 Calorimetria exploratória diferencial simultânea (DSC)

Na Figura 17 estão apresentadas as curvas de DSC dos cristais obtidos pelo ensaio 1.

**Figura 17 - Dados do DSC dos cristais obtidos da recristalização do IFT tratadas pelo ensaio 1 (dissolução a 50 °C e armazenamento a 10 °C). Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 2 °C.min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min<sup>-1</sup>**



**Fonte: Autoria própria.**

Nota-se que as curvas de DSC do ensaio 1 referentes aos solventes acetona, água e metanol, é visto dois picos endotérmicos distintos, atribuídos a dois pontos de fusão respectivamente. Os eventos dos dois picos indicam a possibilidade de da presença de duas formas cristalinas nas amostras de cristais

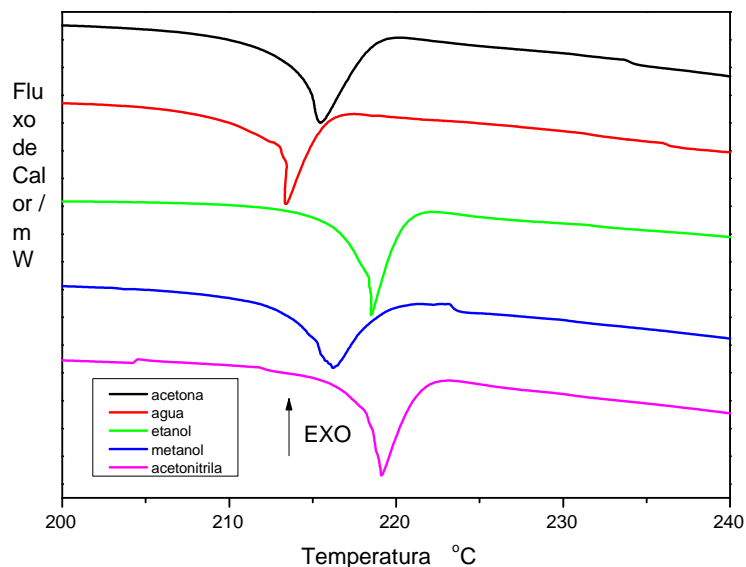
com estabilidades térmicas diferentes. Giron (1995), relata que cada forma cristalina apresenta seu próprio pico de fusão, sem conversão entre elas. Logo, a solubilização do IFT à 50 °C com os solventes acetona, água e metanol, e havendo o resfriamento destas soluções a 10 °C, foi relevante para que as amostras caracterizassem este tipo de comportamento térmico. Vippagunta et al., (2001) reporta que as estruturas polimórficas podem ser interconvertidas por transformações de fase induzidas por fatores termodinâmicos como calor ou processos mediados por solventes, não envolvendo mudança na estrutura molecular do fármaco. Morissette et al., (2004) também relata que a maioria dos polimorfos podem ser obtidos mudando-se a temperatura e o solvente de cristalização.

Já as curvas de DSC das amostras preparadas com os solventes etanol e acetonitrila, pode ser observado apenas um pico endotérmico, o qual representa a fusão dos cristais. É visto que a polaridade dos solvente em relação ao IFT, influenciou a estabilidade térmica dos cristalinos, elevando o ponto de fusão da amostra acetonitrila e diminuindo a fusão da amostra preparada com etanol.

Na Figura 18 é possível visualizar as curvas de DSC das amostras do IFT recristalizadas a partir do ensaio 2 de temperatura de dissolução e armazenamento (dissolução a 50 °C e armazenamento em estufa a 55 °C).

É possível notar que ambas as amostras do ensaio 2 possuem curvas de DSC semelhantes, e em todas elas há presença de apenas um pico endotérmico que caracteriza o ponto de fusão de cada cristalino. Neste caso, o aumento da temperatura de armazenamento das soluções do ensaio 2 para o crescimento dos cristais influenciou significativamente a estabilidade térmica destas amostras.

**Figura 18 - Dados do DSC dos cristais obtidos da recristalização do IFT tratadas pelo ensaio 1 (dissolução a 50 °C e armazenamento a 55 °C). Condições: massa de amostra 8,0 mg, razão de aquecimento 2 °C.min<sup>-1</sup> e atmosfera dinâmica de nitrogênio a 20 mL.min<sup>-1</sup>**



**Fonte: Autoria própria.**

Paulino et al., (2013) confirmam este fato relatando que o solvente tem influência significativa na formação dos cristais quando aplicado em diferentes condições de estabilidades térmicas.

### 5.2.3 Microscopia óptica

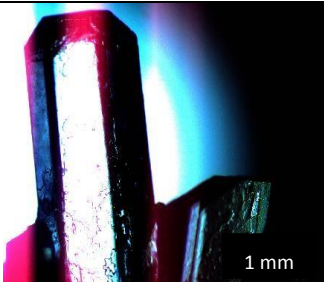
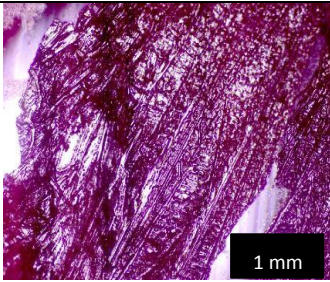
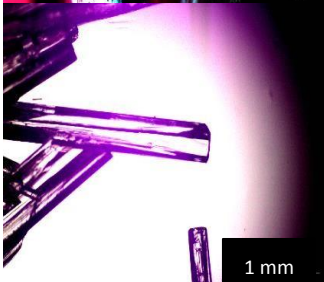
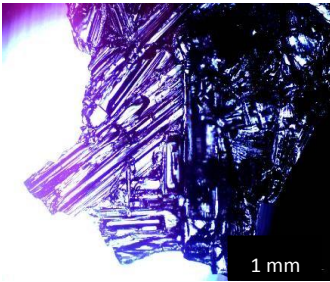
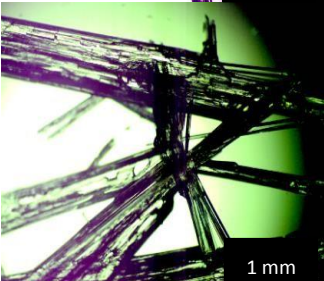
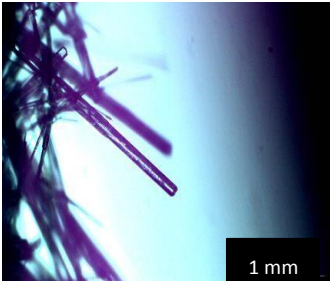
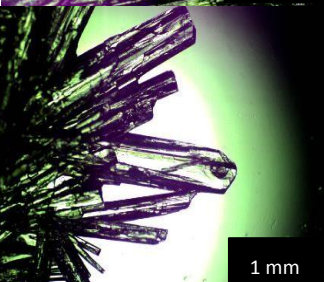
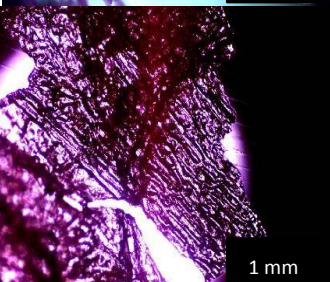
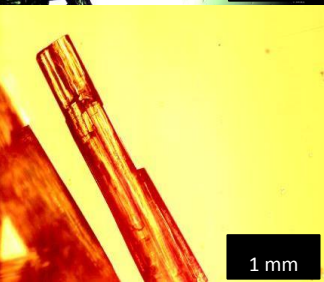
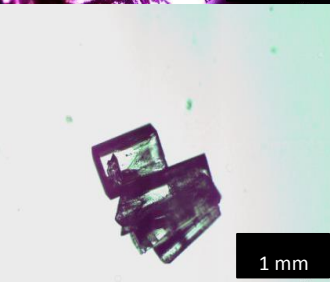
Na Tabela 3, estão apresentadas imagens dos cristais e suas formas cristalinas obtidas a partir do IFT após recristalização pelo ensaio 1 e ensaio 2, onde os hábitos cristalinos obtidos dependem ambos da natureza do soluto/solvente e temperatura para a recristalização.

Os cristais obtidos pelo ensaio 1, a partir de acetona, apresentaram um hábito cristalino semelhante a prisma, que confirmam a observação reportada por Moriyama et al., (2015) e também observado por Benmessaoud et al., (2016) em suas imagens.

Os cristais obtidos a partir de água pelo ensaio 1, também apresentaram a mesma morfologia que os preparados com acetona. Dados da literatura trazem informações do cristal preparado com o solvente água. Werner e Bell (1922) e

Bretnall e Clarke (1998) reportam as mesmas observações da morfologia cristalina na forma de prisma encontradas neste trabalho.

**Tabela 3 - Imagens e forma cristalina dos cristais obtidos através do Ensaio 1 e Ensaio 2. Microscopia Óptica com ampliação de 10x.**

Solvente	Ensaio 1: dissolução a 50 °C e armazenamento a 10°C	Forma	Ensaio 2: dissolução a 50 °C e armazenamento a 55 °C	Forma
Acetona		prismático		lâmina irregular escamosa
Água		prismático		lâmina com junção de pequenos cristais
Etanol		acicular		acicular mais fino
Metanol		acicular		lâmina irregular escamosa
Acetonitrila		acicular		acicular

Fonte: Autoria própria.

As recristalizações preparadas pelos solventes metanol, etanol e acetonitrila no ensaio 1, adquiriram uma morfologia cristalina acicular semelhante a agulha, com tamanhos e espessuras variados. A mesma morfologia cristalina é confirmada na observação reportada por Hariharan et al, 1989 para o solvente metanol. E relatado os mesmos resultados por Benmessaoud et al., (2016) para os cristais preparados com os solventes etanol e metanol.

Na indústria farmacêutica, quando do processo da formação do cristal apresentar forma de agulha e estas são muito compridas, o cristalino geralmente não é desejável, uma vez que conduz a problemas operacionais nos processos de filtragem, secagem, armazenamento, manuseio etc (PUEL, et al. 2008). No caso dos resultados obtidos no trabalho, a utilização do solvente etanol para a formação de cristais para o IFT, apresentaram forma não desejável de cristal acicular semelhante a agulha.

As recristalizações que ocorrem lentamente, como no caso do ensaio 1 (10 °C), geram cristais maiores em relação aos cristais do ensaio 2 (55°C) e, muitas vezes, com maior heterogeneidade de tamanhos. Yang e Gogos (2013), relatam que o tamanho e o teor dos cristais formados são dependentes em relação à razão de velocidade de resfriamento usado no processo da recristalização.

Os cristais obtidos a partir do solvente acetona pelo ensaio 2, apresentaram uma conversão completa da morfologia cristalina em relação aos cristais obtidos pelo ensaio 1. De cristal prismático (ensaio 1), para um material na forma de lâmina irregular escamosa, uma espécie de “manta” (ensaio 2), cresceu em toda a superfície do frasco.

Uma outra alteração morfológica cristalina também ocorreu com os solventes água e metanol em relação aos cristais formados com os mesmos solventes pelo ensaio 1. Essa alteração cristalina se deve pela diminuição da taxa de crescimento do cristal em resposta à mudança de temperatura. No ensaio 2, também ocorreu uma aceleração da evaporação dos solventes, dificultando a nucleação e crescimento dos cristais. Já os cristais obtidos pelo ensaio 2 a partir do solvente etanol e acetonitrila, apresentaram apenas uma diminuição do tamanho e largura em relação aos cristais do ensaio 1. Isso se deve ao aumento da temperatura de armazenamento forçando o aceleração do crescimento dos cristais.

O início do processo de recristalização pelo ensaio 1 com os solventes acetona, água, etanol e metanol ocorreu entre dois a três dias na geladeira, porém, foram permanecidos por 7 dias para a segura total do solvente no cristal. Em parte, com o solvente acetonitrila, a recristalização ocorreu após duas semanas. No ensaio 2, o processo de recristalização com os solventes acetona, água, etanol e metanol ocorreu no primeiro dia em estufa, e com o solvente acetonitrila levou 3 dias para recristalizar os primeiros cristais.

Os resultados apresentados na Tabela 3 sugerem a presença de diferentes estruturas cristalinas originadas dos dois ensaios de recristalização, porém, os resultados demonstram que mesmo o IFT recristalizado sob duas condições diferentes de temperatura e formando diferente morfologia cristalina, quando essas matérias são analisados pela técnica de difração de raios X, é visto apenas uma forma polimórfica, como é o caso dos solventes acetona, água e metanol que nos dois ensaios apresentaram a Forma II do fármaco cloridrato de metformina. Florence e Attwood (2003), relataram que dois cristais podem obter morfologias diferentes e a mesma cela unitária; isto pode acontecer por influência no eixo de crescimento do núcleo, que é dependente de concentração, temperatura e tipo de solventes utilizados. Desta forma, em alguns casos, o cristal se encontra de forma diferenciada, apresentando o mesmo polimorfo.



## 6 CONCLUSÃO

Através das técnicas de DRX, DSC/TG, FTIR, EGA e Microscopia Óptica, o IFT foi caracterizado como sendo a Forma I do fármaco cloridrato de metformina. Fez-se factível as informações obtidas, quando comparado com dados encontrados na literatura, comprovando os resultados alcançados. Logo a caracterização do IFT serviu de referência para as análises dos cristais preparados no trabalho.

Ao realizar um estudo do IFT a partir da técnica DSC, tornou-se possível determinar qual a condição de razão de aquecimento mais favorável para melhor caracterização térmica do IFT, e conseqüentemente caracterizar os cristais preparados a partir do IFT.

Neste trabalho, também foi possível preparar diferentes formas cristalinas à partir do IFT, utilizando diferentes solventes sob duas condições de temperaturas pré definidas para o crescimento dos cristais. Foi evidenciado que os cristais preparados com os solventes acetona, água e metanol (nos ensaio 1 e 2) apresentaram diferentes morfologias cristalinas. Na análise de DSC, estes cristais apresentaram dois picos endotérmicos, onde supostamente teria duas formas polimórficas distintas, porém, quando analisados por DRX, as amostras apresentaram mesma forma polimórfica. Neste âmbito, as duas formas polimórficas (Forma I e Forma II) identificadas neste trabalho foram caracterizadas pelo conjunto de ferramentas de Difração de Raios X, DSC e Microscopia Óptica.

Estas observações indicam que ao recristalizar o IFT (caracterizado Forma I) em diferentes solventes e em diferentes condições de temperatura é possível obter a Forma II do fármaco cloridrato de metformina e através das técnicas utilizadas, caracterizá-la. Logo, os procedimentos para obter polimorfos a partir do IFT foi possível, comprovando que o método adotado obteve bom desempenho.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716 p.
- ARAUJO, G. L. B.; PITALUGA JR, A.; ANTONIO, S. G.; SANTOS, C. O. P.; MATOS, J. R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, São Paulo, v.33, n.1, p. 27-36, 2012.
- ARAUJO, G. L. B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BALANI, S. K.; ARISON, B. H.; MATHAI, L.; KAUFMAN, L. R.; MILLER, R. R.; STERNS, R. A.; CHEN, I. W.; LIN, J. H. Metabolites of L-735,524, a potent HIV-1 protease inhibitor, in human urine. **Drug Metabolism & Disposition**, v.23, n.2, p. 266-270, fev. 1995.
- BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. **Pharmacy Research**, v.18, n. 6, p. 859-866, jun. 2001.
- BENMESSAOUD, I.; KOUTCHOUKALI, O.; BOUHELASSA, M.; NOUAR, A.; VEESLER, S. SOLVENT screening and crystal habit of metformin hydrochloride. **Journal of Crystal Growth**, v. 451, p.42-51, 2016.
- BERNSTEIN, J.; DAVEY, R. J.; HENCK, J. O. Concomitant polymorphs. **Angewandte Chemie International Edition**, v.38, n.23, p. 3440-3461, dez.1999.
- BLEICHER, L.; SASAKI, J. M. **Introdução à difração de raios-x em cristais**. Universidade Federal do Ceará, p.1-20, set. 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 136, de 29 de maio de 2003a. Aprova o regulamento técnico para medicamentos novos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 136, de 29 de maio de 2003b. Aprova o regulamento técnico para medicamentos novos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2003.
- BRETNALL A. E.; CLARKE G. S. **Analytical profiles of drug substances and Excipients**. v.25. San Diego, California: Academic Press,1998, p.243–293.
- BRITAIN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. 2 ed. New Jersey: Informa Healthcare, 2009. 656 p.
- BRITAIN, H. G. Polymorphism and Solvatomorphism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 464-484, fev. 2012.

BRITTAİN, H. G.; FIESE, E. F. **Effects of pharmaceutical processing on drug polymorphs and solvates**. In *Polymorphism in Pharmaceutical Solids* edited by H. G. Brittain, Marcel Dekker Inc. New York: 1999, p.3-16.

BRITTAİN, H. G. Methods for the characterization of polymorphs and solvates. In: **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. New York. Marcel Dekker, Inc.1999, v.95, cap.6, p.227-278.

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

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

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

CAPUCHO, H. C., MASTROIANI, P. C., CUFFINI, S. Farmacovigilância no Brasil: a relação entre polimorfismo de fármacos, efetividade e segurança de medicamentos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, Aracuara, v.29, n.3, p. 277-283, dez. 2008.

CELSI R.; MARTINO. Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. **Journal Molecules**, v. 20, p. 18759-18776, out. 2015.

CHEMBURKAR, S. R.; BAUER, J.; DEMING, K.; SPIWEK, H.; PATEL, K.; MORRIS, J.; HENRY, R.; SPANTON, S.; DZIKI, W.; PORTER, W.; QUICK, J.; BAUER, P.; DONAUBAUER, J.; NARAYANAN, B. A.; SOLDANI, M.; RILEY, D.; McFARLAND, K. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. **Organic Process Research & Development**, v.4, n.5, p.413417, jun. 2000.

CHEUNG, E. Y.; PETERSON, M. L. Reconciling thermal and structural data from the polymorphic transitions of malonamide. **Thermochimica Acta**, v.482, n.1-2, p. 57-61, 2009.

CHILDS S. L.; CHYALL, L. J.; DUNLAP, J. T.; COATES, D. A.; STAHLY, B. C.; STAHLY, G. P.. A Metastable polymorph of metformin hydrochloride: isolation and characterization using capillary crystallization and thermal microscopy techniques. **Crystal Growth & Design**, v.4, n.3, p.441-449, abr. 2004.

CHUNG, F. H.; SMITH, D. K. **Industrial Application of X-Ray Diffraction**. 1. ed. Bronken sound Parkway NW, Suite 300, 1999. 1024 p.

CRISTON J. R.; TIMMINS, P.; KEUNG, A.; UPRETI, V. V.; BOULTON, D. W.; SCHEER, B. J. Biowaiver approach for biopharmaceutics classification system class 3 compound metformin hydrochloride using in silico modeling. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.101, n.5, p.1773-1782, mai. 2012.

CUFFINI, S. L.; PITALUGA, J. R. A; TOMBARI, D. **Polimorfismo em fármacos**. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N.; editors. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p.21-31.

CUI, Y. A material science perspective of pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.339, n.1-2, p.3-18, jul. 2007.

DANDU K.; NARRA, N.; MOHAMMAD, F. A.; RAPOLU, K. Design, characterization and evaluation of polymorphism of amlodipine besylate. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v.3, n.1, p.89-104, jan. 2012.

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

DIXIT M.; KINI A. G.; KULKARNI P. K. Enhancing the dissolution of polymorphs I and II of mefenamic acid by spray drying. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.1, p.13-26, jan. 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

EMA. Quality Guidelines. ICH Topic Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (including Decision Trees), 2006.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 736 p.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico químicos em farmácia**. 1. ed. São Paulo: EDUSP, 2003. 732 p.

FDA. Food and Drug Administration. **Guidance for industry. andas: pharmaceutical solid polymorphism. Chemistry, manufacturing, and controls information**. DRAFT GUIDANCE. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2007.

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

GIRON D. Thermal analysis, microcalorimetry and combined techniques for the study of pharmaceuticals. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.56, n.3, p.1285–1304, nov. 1999.

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

GLUSKER, J. P.; TRUEBLOOD, K. N. **Crystal Structure Analysis a Primer**. 3. ed. Oxford University Press, 2010. 288 p.

GOODMAN. GILMAN. **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica**. 11. Ed. Mcgraw-hill Interamericana Editores, 2007.

HÉDOUX, A.; HERNANDEZ, O.; LEFÉBVRE, J.; GUINET, Y.; DESCAMPS, M. Mesoscopic description of the glacial state in triphenyl phosphite from an x-ray diffraction experimente. **Physical Review B Journals**, v.60, n.13, p.9390-9395, 1999.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.1056 p.

HARIHARAN M.; RAJAN S. S.; SRINIVASAN R. Structure of metformin hydrochloride. **Acta Crystallographica**, v. C45, p. 911-913, jun. 1989.

LAWRENCE el al. Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Abbreviated New Drug Applications. **Pharmaceutical Research**, v. 20, p. 531-536, april 2003.

LEWIS, N. shedding some light on crystallization issues: lecture transcript for the first international symposium on aspects of polymorphism and crystallization – chemical development issues. **Organic Process Research & Development**, v.4, n.5, p.407412, mar. 2000.

LU, J.; ROHANI, S. Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.7, p.884-905, 2009.

MANGIN, D.; PUEL, F.; VEESLER, S. Polymorphism in processes of crystallization in solution a practical review abstract. **Organic Process Research & Development**, v.13, n.6, p.1241-1253, 2009.

MORISSETTE, S. L.; ALMARSSON, Ö.; PETERSON, M. L.; REMENAR, J. F.; READ, M. J.; LEMMO, A. V.; ELLIS, S.; CIMA, M. J.; GARDNER, C. R. Highthroughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.3, p.275-300, fev. 2004.

PALERMO N. R.; ANDERSON C. A.; DRENNEN J. K. Review: use of thermal, diffraction, and vibrational analytical methods to determine mechanisms of solid dispersion stability. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v.7, p.2-12, fev. 2012.

PAULINO, A. S.; RAUBER, G. S.; CAMPOS, C. E. M.; MAURICIO M. H. P.; AVILLETZ, R. R.; CUFFINI, S.L.; CARDOSO, S. G. Hollow crystal antisolvent preparation process as a promising technique to improve dissolution of poorly soluble drugs. **Journal of Crystal Growth**, v.366, p. 76-81, mar. 2013.

PETERSON, M. L.; HICKEY, M. B.; ZAWOROTKO, M. J.; ALMARSSON, O. Expanding the scope of crystal form evaluation in pharmaceutical science. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.3, p.317-326, nov. 2006.

PINHO J. J. R. G.; STORPIRTIS S. Estudo comparativo “in vitro” das propriedades biofarmacotécnicas de comprimidos de cloridrato de metformina comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.37, n.1, p.95105, abr. 2001.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado sólido na indústria farmacêutica: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.7, n.6, p. 2080-2112, ago. 2015.  
PUEL, F.; VERDURAND, E.; TAULELLE, P.; BEBON, C.; COLSON, D.; KLEIN, J. P.; VEESLER, S. Crystallization mechanisms of acicular crystals, **Journal. Crystal. Growth**, v.310, p. 110-115, 2008.

PUIGJANER, C.; PROHENS, R.; BARBAS, F.; PORTELL, A. Cocristales farmacêuticos: El nuevo reto. **El farmacêutico**, n.419, p.42-54, set. 2009.

RAMACHANDRAN E.; RAMUKUTTY S. Influence of Polymers on the Crystal Growth of Metformin Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology**, v.2. n.3, p.9-16, 2014.

RAW, A. S; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBE JR, F. O.; YU, L. X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). **Advanced Drug Deliveries Amsterdam**, v. 56, n.3, p. 397-414, fev. 2004.

ROLLAND, A.; SULLIVAN, S. M. **Advanced Pharmaceutical Solids**, In: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.131. Nova York: 2003. 536 p.

RODRIGUEZ-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, fev. 2004.

SANTOS, P. S. **Ciência e tecnologia das argilas**. 2. ed. São Paulo: EDUSP, 1975.  
STENGER F. C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE indicativa de estabilidade do cloridrato de metformina em comprimidos e estudo de citotoxicidade dos produtos de degradação**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) - Universidade do vale de Itajaí, Itajaí, 2011.

SHAN, N.; ZAWOROTKO, M. J. The role of cocrystals in pharmaceutical science. **Drug Discovery Today**, v. 13, n.9-10, p.440–446, mai. 2008.

SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v.211, n.1-4, p.122-136, abr. 2000.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SINGHAL, D.; CURALOTO, W. Drug polymorphism and dosage from desing: a pratical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.3, p.335-347, fev. 2004.

- 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, mai. 2007.
- STEPHENSON, G. A. Applications of X-ray powder diffraction in the pharmaceutical industry. **The Rigaku Journal**, v.22, n.1, p.2-15, 2005.
- TAUPIN, D. Theorie dynamique de la diffraction des rayons X par les cristaux deformes. **Bulletin de la Societe Francaise Mineralogie et de Cristallographie**, v.87, p.469-511, 1964.
- TIWARI, M.; CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Quantification of olanzapine polymorphs using powder X-ray diffraction technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, n.3, p.865-872, fev. 2007.
- VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, n.1, p.3-26, mai. 2001.
- VISHWESHWAR, P.; MCMAHON, J. A.; BIS, J. A.; ZAWOROTKO, M. J. Pharmaceutical co-crystals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.95, n.3, p.499516, mar. 2006.
- VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.
- WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist**. London: Churchill Livingstone, 2005.
- WERNER, E. A.; BELL, J. The preparation of methylguanidine, and of dimethylguanidine by the interaction of dicyandiamide, and methylammonium and dimethylammonium chlorides respectively. **Journal of the Chemical Society**, v.121, p.1790-1794, 1922.
- YANG, M.; GOGOS, C. Crystallization of poly(ethylene oxide) with acetaminophen – A study on solubility, spherulitic growth, and morphology, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.85:, p.889-897, 2013.
- YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.48, n.1, p.27–42, mai. 2004.
- ZHANG G. G. Z.; LAW, D.; SCHIMITT, E. A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.3, p.371-390, fev. 2004.