

4.03.04 – Análise e Controle de Medicamentos

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ESTADO SÓLIDO DE INGREDIENTES FARMACÊUTICOS ATIVOS**

Rúbia A. Sversut<sup>1\*</sup>, Nájla M. Kassab<sup>2</sup>, Lincoln C. de Oliveira Silva<sup>3</sup>, Selma G. Antônio<sup>4</sup>, Hérica R. N. Salgado<sup>5</sup>

1. Professora da Universidade Católica Dom Bosco e Servidora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

2. Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição da UFMS.

3. Professor do Instituto de Química da UFMS.

4. Pesquisadora do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Araraquara).

5. Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

**Resumo**

A caracterização físico-química de ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) é crucial para o desenvolvimento bem-sucedido de medicamentos. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o estado sólido dos fármacos oxitetraciclina (OTC), diclofenaco de sódio (DICLO) e piroxicam (PIRO) através do uso combinado das técnicas analíticas de espectrofotometria no infravermelho, análise térmica, difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura. A existência de polimorfismo para PIRO foi confirmada pela DRX, que revelou a presença de dois polimorfos (formas I e II). Além disso, a DRX confirmou a existência de duas formas polimórficas para DICLO (anidra e penta-hidratada) e de apenas uma forma cristalina (di-hidratada) para OTC. Portanto, este trabalho abrange a caracterização físico-química de três APIs, podendo ser utilizado como fonte de pesquisa e de informações valiosas para o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes.

**Palavras-chave:** oxitetraciclina, anti-inflamatórios não esteroidais, polimorfismo.

**Introdução**

A caracterização físico-química de ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) é importante durante os estudos de pré-formulação de formas farmacêuticas. Alguns IFAs, embora tenham pureza aceitável, frequentemente exibem diferenças nas características do estado sólido, por exemplo: polimorfismo, diferentes tamanhos de partículas e hábitos cristalinos [1]. Essas características, quando não controladas, podem afetar a qualidade e a eficácia dos medicamentos produzidos [2].

Os testes oficiais de caracterização de IFAs, recomendados pelos compêndios farmacopeicos, não são capazes de detectar diferenças sutis na matéria-prima. Por esta razão, as metodologias instrumentais (espectroscopia, análise térmica, difração de raios X e microscopia) são utilizadas como análises complementares e confirmatórias [2-4].

A oxitetraciclina (OTC) é um antimicrobiano de amplo espectro de ação, pertencente à classe das tetraciclina. OTC é amplamente utilizada na medicina veterinária, em associação com diclofenaco de sódio (DICLO) ou piroxicam (PIRO), na forma de soluções injetáveis que são indicadas para tratar infecções sistêmicas acompanhadas de febre e outras condições inflamatórias. Além disso, esses IFAs também são formulados isoladamente na forma de cápsulas, comprimidos ou soluções injetáveis para o uso humano.

Apesar das informações descritas na literatura acerca das propriedades farmacológicas destes IFAs, os dados sobre suas características físico-químicas são limitados ou desatualizados. Portanto, este trabalho tem como objetivo a caracterização físico-química do estado sólido de OTC, PIRO e DICLO através de técnicas analíticas sofisticadas, tais como: espectroscopia de absorção no infravermelho (IV), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difração de raios X (DRX).

**Metodologia**

**Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs)**

Oxitetraciclina di-hidratada (OTC, teor declarado: 90,1%), diclofenaco de sódio (DICLO, teor declarado: 99,3%) e piroxicam (PIRO, teor declarado: 101,7%) foram fornecidos pela Pharmanostra<sup>®</sup> (Rio de Janeiro, Brasil), Fragon<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil) e Valdequímica Produtos Químicos<sup>®</sup> (São Paulo, Brasil), respectivamente.

**Espectrofotometria de absorção no Infravermelho (IV)**

Foi utilizado o espectrofotômetro Thermo Scientific<sup>®</sup>, modelo Nicolet IS-5. A região espectral analisada foi de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>, com resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup> e 100 scans. Utilizou-se o brometo de potássio (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), previamente dessecado em estufa a 105 °C, para a confecção das pastilhas.

**Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG)**

As curvas de Termogravimetria/Termogravimetria Derivada (TG/DTG) foram obtidas no termoanalisador TGA-Q50 da TA Instruments<sup>®</sup> em atmosfera de nitrogênio com vazão de 40 mL min<sup>-1</sup> para a balança e 60 mL min<sup>-1</sup> para o forno, empregando a razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> de 25 a 900°C. As amostras foram colocadas em cadinhos de platina e suas massas iniciais variaram entre 3 e 6 mg. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração da temperatura do instrumento através da determinação da temperatura do ponto de Curie do padrão níquel (temperatura experimental = 373,29 °C).

### Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas no equipamento DSC-Q20, com sistema de refrigeração RCS-90 da TA Instruments® em atmosfera de nitrogênio com vazão de 60 mL min<sup>-1</sup>, razão de aquecimento de 2 °C min<sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 0 a 300 °C. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio tampados e suas massas iniciais variaram entre 1,5 e 5 mg. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios, utilizando o padrão de índio metálico ( $T_{onset_{fusão}} = 156,6$  °C e  $\Delta H_{fusão} = 28,7$  J g<sup>-1</sup>).

### Difração de Raios X (DRX)

Utilizou-se o difratômetro de raios X Bruker AXS Advanced X-ray Solutions®, modelo D8 Advance, com tubo de cobre. Os comprimentos de onda utilizados foram de  $K\alpha_1 = 1,5406$  Å e  $K\alpha_2 = 1,5444$  Å, voltagem e corrente iguais a 40 kV e 40 mA, respectivamente. A região de medida de  $2\theta$  foi de 3 a 35° com varredura contínua de 0,4°/min ( $\Delta 2\theta = 0,02^\circ$ ). O sistema contava com fendas Soller primária e secundária de 2,5° de divergência, fenda de divergência de 0,3 mm e detector Lynxeye. As amostras foram acondicionadas em um porta-amostra de 2 cm de diâmetro e 1 mm de profundidade.

### Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras dos IFAs foram montadas em suportes de amostra de alumínio, fixadas com fita dupla face de carbono e metalizadas com ouro, por cinco minutos, com auxílio do *Sputter Denton Vacuum*®, modelo Desk III (Nova Jersey, EUA). As morfologias das amostras foram verificadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol®, modelo JSM-6380LV. As micrografias ópticas foram obtidas em câmara com tensão de excitação de 30 kV com aumento de 50 a 1500 vezes.

## Resultados e Discussão

### Espectrofotometria de absorção no IV

A Figura 1a ilustra o espectro de IV de OTC e as principais vibrações encontradas foram concordantes com descrito em trabalhos publicados anteriormente [5-6]. Assim, uma banda de média intensidade em 3608 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento da hidroxila “livre” (sem formação de ligação de hidrogênio) do grupamento fenol ligado ao anel D (νO-H fenol). Logo após, observa-se duas bandas em 3362 e 3170 cm<sup>-1</sup> que podem ser atribuídas ao estiramento da ligação N-H da amida primária (-NH<sub>2</sub>) ligada ao anel A. Em 3080 e 2744 cm<sup>-1</sup>, nota-se bandas de fraca intensidade características, respectivamente, do estiramento da ligação Csp<sup>2</sup>-H do anel aromático e da ligação Csp<sup>3</sup>-H dos grupamentos metilas ligados ao anel C e ao grupo amina do anel A. Outras bandas que correspondem às ligações presentes entre os átomos da estrutura química de OTC são: bandas de forte intensidade em 1660 cm<sup>-1</sup>, característica do estiramento da ligação C=O do grupamento amida ligado ao anel C, em 1634 cm<sup>-1</sup> e 1594 cm<sup>-1</sup> correspondentes à vibração das carbonilas (νC=O) dos anéis A e C, respectivamente. No espectro de IV de DICLO (Figura 1b), observa-se duas bandas de média intensidade em 3382 e 3249 cm<sup>-1</sup> características, respectivamente, das vibrações da ligação entre nitrogênio e hidrogênio (νN-H) do grupo amina secundária aromática e da ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio do grupo amina e o oxigênio da carbonila (νNH...O) presentes na forma anidra do fármaco. Além disso, outra evidência que sugere tratar-se da forma anidra de DICLO é a ausência da banda larga de forte intensidade entre 3600 a 3300 cm<sup>-1</sup>, característica da vibração da ligação entre o oxigênio e hidrogênio (νO-H) do grupo hidroxila presente na forma hidratada [7]. Na Figura 1c, que ilustra o espectro IV de PIRO, chama atenção a banda de forte intensidade em 3395 cm<sup>-1</sup> que sugere a presença da forma polimórfica II do fármaco. No entanto, a banda de menor intensidade em 3335 cm<sup>-1</sup> é indicativa da presença da forma polimórfica I [8]. Assim sendo, há indícios da presença e dois polimorfos de PIRO no material analisado.

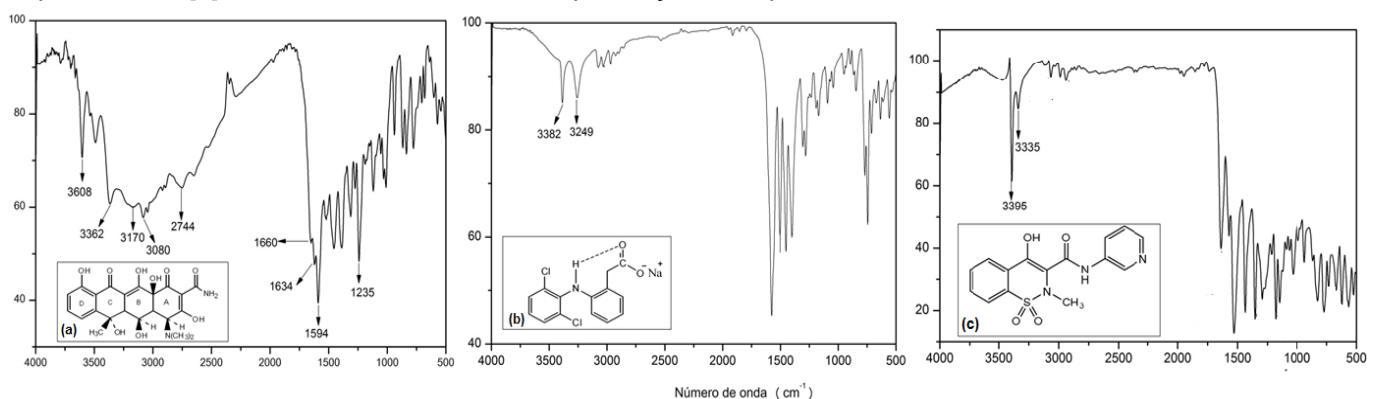
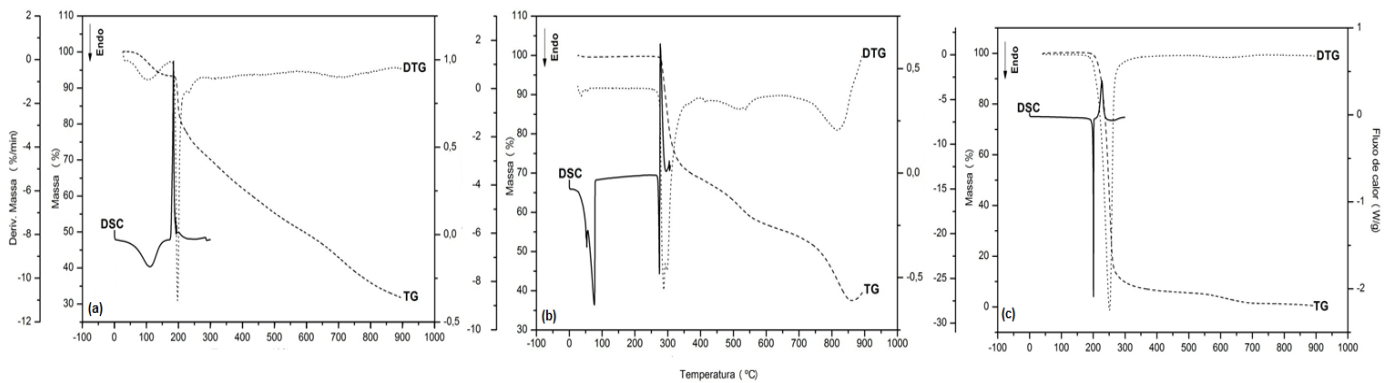


Figura 1. Espectros de absorção no IV de (a) oxitetraciclina, (b) diclofenaco de sódio e (c) piroxicam.

### Avaliação do Comportamento Térmico

As curvas TG/DTG de OTC (Figura 2a) mostram que a perda de massa ( $\Delta m$ ) ocorreu em três etapas consecutivas no intervalo entre 53 e 730 °C, sem evidenciar nenhuma região de platô característica da formação de intermediários estáveis. A primeira  $\Delta m$  (53 a 163 °C) foi de 6,46% e corresponde à desidratação da molécula. A segunda e a terceira etapas de  $\Delta m$  foram nos intervalos de 163 a 251 °C ( $\Delta m = 19,14\%$ ) e 253 a 730 °C ( $\Delta m = 35,63\%$ ), respectivamente. A perda de massa total foi de, aproximadamente, 62%, produzindo

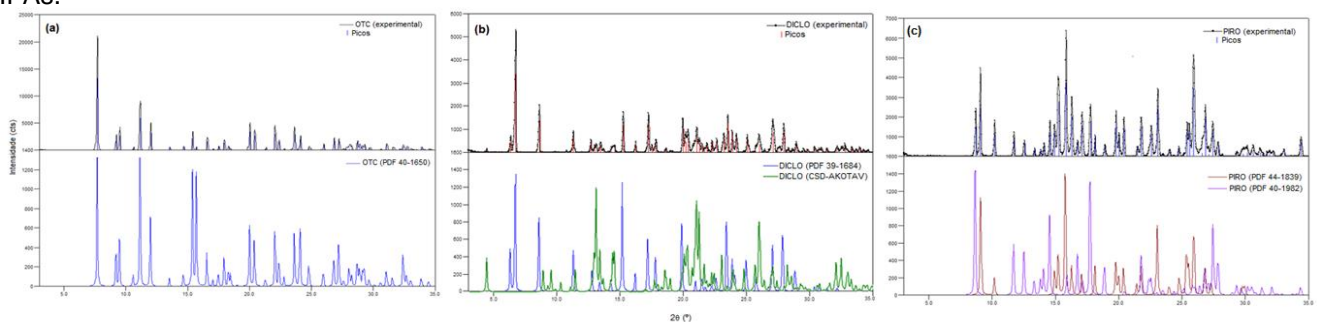
30% de resíduo carbonáceo. Na curva DSC (Figura 2a) observa-se um largo pico endotérmico (67,62 – 151,85 °C) atribuído à desidratação da molécula, estando em concordância com a primeira perda de massa evidenciada nas curvas TG/DTG. Em seguida, observa-se um pico exotérmico agudo entre 173,29 – 198,98 °C, característico da cristalização seguida da decomposição térmica do material. Na curva DSC de DICLO (Figura 2b), observa-se dois picos endotérmicos consecutivos entre 18,0 – 84,7 °C que correspondem à desidratação da molécula, estando de acordo com a perda de massa visualizada na curva DTG ( $\Delta m = 0,53\%$ ). Em seguida, DICLO mantém-se termicamente estável até 275 °C. O segundo evento endotérmico ocorre na faixa de 265,93 a 276,58 °C e corresponde à fusão do fármaco ( $T_{onset_{fusão}} = 271,48$  °C e  $\Delta H_{fusão} = 58,17$  J g<sup>-1</sup>). Logo após, observa-se um pico exotérmico entre 287 e 322 °C, característico da cristalização seguida de decomposição térmica. A partir de 274°C, DICLO sofre três sucessivas perdas de massa: a primeira na faixa de 275 a 340 °C ( $\Delta m = 27,50\%$ ), a segunda entre 340-530 °C ( $\Delta m = 11,68\%$ ) e a terceira entre 340 a 880 °C ( $\Delta m = 22,30\%$ ). A perda de massa total foi cerca de 70%, produzindo 39% de resíduo carbonáceo. Na curva DSC de PIRO (Figura 2c), evidencia-se um pico endotérmico fino e estreito entre 192,02 a 202,8 °C, correspondente à fusão do material. A  $T_{onset_{fusão}}$  calculada foi de 199,8 °C com  $\Delta H_{fusão}$  de 101,51 J g<sup>-1</sup>, estando mais próximo do ponto de fusão de 198,8°C, descrito por Upadhyay e Bond [9] para forma polimórfica II. Todavia, a fusão do fármaco terminou em 202,8 °C, sendo esse valor bastante próximo do descrito para a fusão da forma polimórfica I que foi de 202,6 °C [10]. Assim sendo, acredita-se que o IFA analisado contenha uma mistura das formas polimórficas I e II, estando coerente com o resultado obtido com a espectrofotometria no IV. Conforme observado nas curvas TG/DTG (Figura 2c), PIRO mantém-se termicamente estável até 203 °C. O segundo evento observado na curva DSC é um pico exotérmico entre 218,0 e 228,0 °C, característico da decomposição térmica da substância, que é simultânea a perda de massa visualizada nas curvas TG/DTG ( $\Delta m = 97,57\%$ ), resultando na produção de 0,51% de resíduo carbonáceo.



**Figura 2.** Curvas DSC e TG/DTG de (a) oxitetraciclina, (b) diclofenaco de sódio e (c) piroxicam.

## DRX

A Figura 3a mostra a comparação entre o difratograma experimental de OTC e o seu difratograma simulado a partir da ficha cristalográfica PDF 40-1650 que corresponde à forma di-hidratada do fármaco. Nessa figura, evidencia-se que o perfil de difração do material analisado é semelhante ao difratograma simulado, apresentando apenas diferença na intensidade dos picos que pode ser atribuída à orientação preferencial dos cristalitos. Assim, é possível afirmar que a matéria-prima de OTC em estudo apresenta apenas uma fase cristalina, descartando a existência de polimorfismo. Conforme observado na Figura 3b, a amostra de DICLO apresenta duas formas polimórficas, uma que coincide com o difratograma simulado na ficha PDF 39-1684 (forma anidra) e outra, em menor quantidade, com o difratograma da ficha CSD-AKOTAV (forma pentahidratada). Do mesmo modo, o padrão de difração de PIRO (Figura 3c), obtido experimentalmente, foi semelhante ao descrito em duas fichas cristalográficas, isto é, as fichas PDF 40-1982 (forma polimórfica I) e PDF44-1839 (forma polimórfica II). A partir desses resultados, é possível afirmar que DICLO e PIRO apresentam polimorfismo, ficando evidente a importância da utilização da DRX na caracterização inequívoca de IFAs.

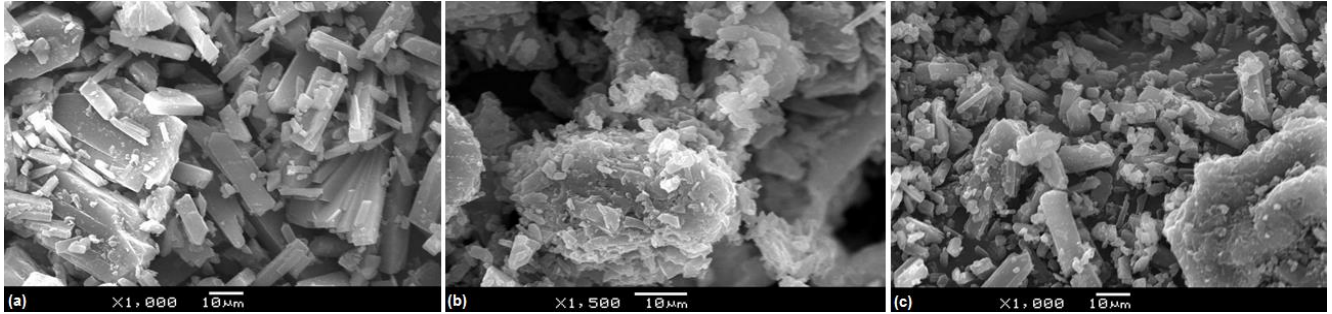


**Figura 3.** Difratogramas experimentais e simulados de (a) oxitetraciclina, (b) diclofenaco de sódio e (c) piroxicam.



## MEV

A Figura 4a ilustra a imagem da morfologia da OTC obtida por MEV, onde se observa hábito cristalino predominante retangular, porém de tamanhos irregulares, evidenciando o certo grau de desordem do material. É possível observar pequenos cristais na superfície dos cristais maiores que podem ser atribuídos à presença de água de hidratação. Na Figura 4b que traz a MEV de DICLO, nota-se a agregação de cristais menores, resultando no formato de placa estratificada. Já na MEV de PIRO (Figura 4c), é possível observar cristais de forma e tamanho irregular, havendo o predomínio do hábito cristalino prismático que é característico do polimorfo I. Apesar de estar em menor quantidade, é possível notar alguns cristais da forma agulha atribuída ao polimorfo II de PIRO.



**Figura 4.** Microscopia Eletrônica de Varredura de (a) oxitetraciclina, (b) diclofenaco de sódio e (c) piroxicam.

## Conclusões

Foi realizada a caracterização físico-química do estado sólido de três APIs (OTC, DICLO e PIRO) através do uso combinado das técnicas analíticas de espectrofotometria no IV, DSC, TG/DTG, DRX e MEV. Confirmou-se a coexistência de formas polimórficas para o fármaco PIRO (formas I e II) e DICLO (anidra e penta-hidratada). Já para o fármaco OTC, foi descartada a ocorrência de polimorfismo, evidenciando a presença de uma única forma cristalina (di-hidratada). Os resultados obtidos constituem informações valiosas e atualizadas que podem servir como fonte de pesquisa e ser utilizadas durante as etapas de desenvolvimento de formulações, uma vez que o polimorfismo pode provocar desvios de qualidade durante o processo produtivo e influenciar na eficácia dos medicamentos.

## Referências bibliográficas

- [1] Nogueira, L.P.P.; Raffin, F.N.; Ayala, A.P. X-ray diffraction applied to the characterization of the fixed dose combination tablets for the treatment of tuberculosis. In: **Proceedings of the International Symposium on Crystallography [Blucher Physics Proceedings, v.1, n.3]**. São Paulo: Blucher, 2015.
- [2] Calvo, L.; Maggio, R.M.; Kaufman, T.S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solidstate employing chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.147, p.538-564, 2018.
- [3] Murakami, F.S.; Lang, K.L.; Mendes, C.; Cruz, A.P.; Filho, M.A.S.C.; Silva, M.A.S. Physico-chemical solid-state characterization of omeprazole sodium: Thermal, spectroscopic and crystallinity studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.72-80, 2009.
- [4] Bambagiotti-Alberti, M.; Bartolucci, G.; Bruni, B.; Coran, S.A.; Di Vaira, M. Physico-chemical and structural characterization of diacerhein. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.49, p.1065–1069, 2009.
- [5] HASSAN, S.S.M.; AMER, M.M.; AHMED, S.A. Composition and stability constants of Iron and Copper-oxytetracycline chelates. **Microchimica Acta**, v.3, p.165-175, 1984.
- [6] Gunasekaran, S.; Varadhan, S.R.; Karunanidhi, N. Qualitative analysis on the infra-red bands tetracycline and ampicillin. **Proceedings Indian National Science Academy - Part A**, v.62, p.309-316, 1996.
- [7] Bartolomei, M.; Bertocchi, P.; Antonietta, E.; Rodomonte, A. Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, p.1105-1113, 2006.
- [8] Mihalic, M.; Hofman, H.; Kufinec, J.; Krile, B.; Caplar, V.; Kajfez, F.; Blazevic, N. Piroxicam. **Analytical Profiles of Drug Substances**, v.15, p.509-531, 1986.
- [9] Upadhyay, P. P.; Bond, A. D. Crystallization and disorder of the polytypic  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  polymorphs of piroxicam. **CrystEngComm**, v.17, p.5266-5272, 2015.
- [10] Vrečer, F.; Vrbinc, M.; Meden, A. Characterization of piroxicam crystal modifications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, p.3-15, 2003.