



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS



ANDERSON FERREIRA GOMES

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, VIBRACIONAL E TÉRMICA DA
AZITROMICINA DIHIDRATADA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

Imperatriz
2018

ANDERSON FERREIRA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, VIBRACIONAL E TÉRMICA DA
AZITROMICINA DIHIDRATADA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Maranhão.

Área de conhecimento: Estudo estrutural, vibracional e térmico de cristais de fármacos em função da temperatura.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Aurélio Pinheiro Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva Ribeiro

Imperatriz

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Ferreira Gomes, Anderson.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, VIBRACIONAL E TÉRMICA DA
AZITROMICINA DIHIDRATADA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA /

Anderson Ferreira Gomes. - 2018.

80 f.

Coorientador(a): Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva
Ribeiro.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcio Aurélio Pinheiro
Almeida.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciência dos Materiais/ccsst, Universidade Federal do
Maranhão, Imperatriz, 2018.

1. Azitromicina. 2. Difração de Raios-X. 3.
Espectroscopia Raman. 4. Polimorfismo. 5. Variação de
Temperatura. I. da Silva Ribeiro, Prof. Dr. Paulo
Roberto. II. Pinheiro Almeida, Prof. Dr. Marcio Aurélio.

Membros da Comissão julgadora da defesa de Dissertação de Mestrado de Anderson Ferreira Gomes apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM).

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Marcio Aurelio Pinheiro Almeida(Orientador)
PPGCM/UFMA

Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva Ribeiro (Coorientador)
PPGCM/UFMA

Prof^a. Dra.Ana Angélica Mathias Macêdo
IFMA/Imperatriz

Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos
PPGCM/ UFMA

Imperatriz

2018

DEDICO:

A meus pais, Maria Dalvina e Agmualdo, aos meus irmãos, Jheimison e Andressa, e a minha esposa Thabata, por todo incentivo e apoio durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sua infinita bondade, misericórdia e auxílio, pois sempre que clamei Ele me ouviu e estendeu sua mão poderosa sobre mim afim de me amparar e confortar minhas angustias. Pela proteção diária nas idas e vindas. Pela sabedoria, discernimento e por todos os outros dons os quais Ele me confere, na certeza de que sem o Senhor eu nada seria.

Em segundo queria agradecer a minha família. A meu pai Agmualdo, que mesmo com toda a dificuldade sempre buscou dar conforto e oportunidade a mim e a meus irmãos. A minha mãe Maria Dalvina cuja responsabilidade pela educação recaiu mais intensamente, a quem admiro muito pelo exemplo de perseverança e fé, pelas repreensões, pelo não dito na hora certa e pela infinidade de sins para todos os meus sonhos e desejos. Agradeço também a minha irmã Andressa, mesmo sendo a caçula sempre esteve comigo quando não fisicamente, em pensamento, a qual tenho enorme carinho e cuidado. E por fim a meu irmão Jheimison, que apesar de mais novo, tanto me ensinou, apoiou e ajudou durante todo esse trajeto.

A minha mulher, amiga e companheira Thabata Miranda de Souza, agradeço por tudo. Pelo incentivo desde o dia das inscrições para o seletivo do programa até o presente momento. Por ouvir meus dilemas e problemas sempre com um sorriso no rosto e com uma palavra confortadora. Por ser quem é e assim me fazer imensamente feliz.

Agradeço a meu orientador, professor Dr. Marcio Aurélio Pinheiro Almeida, por ter aceito a difícil missão de me orientar e auxiliar cientificamente à distância. Ao professor Dr. Paulo Roberto da Silva Ribeiro, a quem tive oportunidade de trabalhar sob orientação pela segunda vez, agradeço imensamente, pois sem ele este trabalho jamais teria sido possível. Graças a seu empenho e dedicação como coorientador, que acabou por ser também orientador pela proximidade física, pude conhecer o tema e ter a oportunidade de trabalhá-lo.

Ainda sobre os docentes que fizeram parte importante deste trabalho e que não poderiam deixar de serem citados, agradeço ao professor Dr. Francisco Ferreira de Sousa, pela realização das medidas Raman e pelo auxílio sempre que solicitado. Meu muito obrigado também ao professor Dr. Adenilson Oliveira dos Santos, pela realização das medidas de DRX e pela ajuda com os refinamentos. Agradeço imensamente também aos professores do Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LOEF), professores Drs. Marcio José Barbosa, Franciana Pedrochi e Alisson Steimacher, por me adotarem durante esse tempo, sempre dispondo de uma boa conversa, risos e dicas importantes. Enfim agradeço a todos do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais (PPGCM).

As minhas amigas agradeço pela partilha de tantos momentos bons e ruins sempre um ajudando o outro. A Rachel Avelar, minha copiloto, pelas conversas no caminho diário para a UFMA que tanto me incentivavam. A Suzanny Brito, a musa do laboratório, pelos risos contagiantes, pela amizade sincera e por todo o auxílio. A Valéria Lima, a arrombada (apelido carinhoso), pela preocupação, pelos materiais de estudo compartilhados e pelos momentos de descontração que não seriam nada sem ela. A Luana Cristina, por ser uma grande amiga de longa data, a quem tenho orgulho de ter sido pupilo científico. A Larissa pela ajuda indispensável com os programas de fit. A Mônica por ser sempre um amorzinho na nossa turma. E a todas as demais que estiveram comigo nessa longa jornada.

Aos amigos, Leonardo Sobreira, Carlos Alberto, Diego Abreu, Jefferson Santos, Marcus Lima e Henrique, pelo auxílio com os programas de tratamento de dados e pela amizade e coleguismo incontestável que sempre tiveram para comigo.

Ao PPGCM pela oportunidade de fazer parte desse excelente curso. As instituições de fomento que tornam viáveis os programas de pós-graduação mesmo em tempos difíceis para a pesquisa como os que vivemos.

RESUMO

A azitromicina (AZM) é um antibiótico empregado no tratamento de infecções bacterianas e encontra-se na relação nacional de medicamentos essenciais. A AZM possui diferentes formas cristalinas que dependem de condições as quais o medicamento seja submetido e que apresentam variações em suas propriedades finais. Assim, estudar as possíveis modificações estruturais da AZM, bem como as condições em que estas ocorrem, se faz necessário para o controle de qualidade. Este trabalho objetivou realizar a caracterização térmica, estrutural e vibracional da azitromicina dihidratada (AZM-DH) em função da temperatura. Para tanto, o fármaco foi adquirido em sua forma pura e foram empregadas técnicas de Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP), Espectroscopia Raman (ER), Termogravimetria (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) simultâneas e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), visando traçar o perfil de partida. Posteriormente as alterações estruturais foram investigadas utilizando a DRXP e a ER em função da temperatura (25 a 140 °C). A curva TG indicou que o material tem estabilidade térmica até cerca de 51 °C. Após essa temperatura o material sofreu perda de massa até cerca de 104 °C, atribuída à desidratação, e outra perda com início em 188 °C, atribuída a decomposição. As curvas DTA e DSC se assemelham, apresentando inicialmente um evento endotérmico (~54 °C) extenso atribuído a desidratação do material, seguido por um evento exotérmico (~96 °C) atribuído a cristalização de uma fase anidra e logo depois, um novo evento endotérmico (~116 °C) característico da fusão do material. A análise de DRXP em função da temperatura, revelou que a estrutura do material é estável até cerca de 70 °C, porém a partir desta temperatura a AZM-DH sofre mudanças nas reflexões dos picos de Bragg indicando transformação de fase durante a desidratação. Ao se atingir a temperatura de 115 °C os picos característicos da AZM-DH decaem drasticamente de intensidade, dando lugar aos novos picos referentes a uma nova fase anidra do material. A técnica de ER em função da temperatura, comprovou estabilidade térmica nos modos vibracionais do material até o patamar de 77 °C, exceto para os modos de vibração da água (3494 e 3558 cm^{-1}). Concluiu-se que a AZM-DH sofre desidratação e passa para uma nova fase cristalina anidra, depois para sua fase amorfa e fundiu em seguida. Os resultados obtidos podem servir como parâmetro para o controle de qualidade do material com destaque para a espectroscopia Raman.

Palavras-Chave: Polimorfismo, Azitromicina, Difração de Raios-X, Espectroscopia Raman, Variação de Temperatura.

ABSTRACT

Azithromycin (AZM) is an antibiotic used in the treatment of bacterial infections and is in the national list of essential medicines. The AZM has different crystalline forms that depend on the conditions under which the drug is submitted and which present variations in its final properties. Thus, to study the possible structural modifications of AZM, as well as the conditions in which these occur, is necessary for the quality control. This work aimed to perform the thermal, structural and vibrational characterization of azithromycin dihydrate (AZM-DH) as a function of temperature. In order to do so, the drug was acquired in its pure form and X-Ray Diffraction techniques were used by the powder method (DRXP), Raman Spectroscopy (ER), Thermogravimetry (TG) and Simultaneous Differential Thermal Analysis (DTA) and Exploratory Calorimetry Differential (DSC), in order to trace the starting profile. Subsequently the structural changes were investigated using DRXP and ER as a function of temperature (25 to 140 ° C). The TG curve indicated that the material has thermal stability up to about 51 ° C. After this temperature the material underwent mass loss to about 104 ° C, attributed to dehydration, and another loss starting at 188 ° C, attributed to decomposition. The DTA and DSC curves resemble each other, initially presenting an extensive endothermic event (~ 54 ° C) attributed to dehydration of the material, followed by an exothermic event (~ 96 ° C) attributed to the crystallization of an anhydrous phase and then a new endothermic event (~ 116 ° C) characteristic of material melting. Analysis of DRXP as a function of temperature revealed that the structure of the material is stable to about 70 ° C, but from this temperature the AZM-DH undergoes changes in the reflections of the Bragg peaks indicating phase transformation during dehydration. When reaching the temperature of 115 ° C the characteristic peaks of AZM-DH decay drastically of intensity, giving rise to the new peaks referring to a new anhydrous phase of the material. The ER technique as a function of temperature showed thermal stability in the vibrational modes of the material up to the 77 ° C level, except for the water vibration modes (3494 and 3558 cm⁻¹). It was concluded that AZM-DH undergoes dehydration and passes to a new crystalline anhydrous phase, then to its amorphous phase and then fused. The results obtained can serve as parameters for the quality control of the material with highlight for Raman spectroscopy.

Keywords: Polymorphism, Azithromycin, X-ray Diffraction, Raman Spectroscopy, Temperature Variation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da molécula de azitromicina. ^[12]	20
Figura 2 – Estrutura molecular tridimensional enumerada da azitromicina dihidratada ^[13] ...	21
Figura 3 – Arranjo da célula unitária de um cristal de azitromicina dihidratada. ^[13]	22
Figura 4 - Arranjo molecular das ligações de hidrogênio entre a água e a azitromicina na célula unitária de azitromicina dihidratada. Em vermelho as ligações intermoleculares e em azul as intramoleculares ^[13]	23
Figura 5 - Esquema proposto por Bragg para a difração de Raios-X [38]	27
Figura 6 - Representação do modelo quântico das transições ocorridas no efeito Rayleigh, efeito Raman Stokes e anti-Stokes ^[61]	33
Figura 7 - Curvas TGA de diferentes reações químicas. (a) Decomposição térmica. (b) Corrosão ou oxidação (óxidos não voláteis). (c) combustão de carbono negro em comutação de N ₂ para O ₂ . (d) Decomposição por etapas. ^[67]	37
Figura 8 - Curva genérica para um experimento DTA/DSC. (I) Mudança de linha de base. (II) Pico Exotérmico atribuído a cristalização. (III) Pico endotérmico atribuído a fusão. (IV) Pico exotérmico atribuído a oxidação. (V) Curva ruidosa atribuída a decomposição. ^[43]	40
Figura 9 - Fluxograma das etapas de análises utilizadas no experimento.	42
Figura 10 - Difratorômetro de Raios-X da marca PANalytical modelo Empyrean. Fonte da imagem: http://img.directindustry.com/pt/images_di/photo-g/14669-12069849.jpg	43
Figura 11 - Espectrômetro triplo da Jobin-Yvon modelo T64000. Fonte da imagem: http://nytek.ru/upload/iblock/2f9/t64000.jpg	44
Figura 12 - Analisador termogravimétrico Shimadzu modelo DTG-60. Fonte da imagem: https://www.shimadzu.com/an/sites/default/files/ckeditor/an/thermal/qn50420000005wgc-img/qn50420000005wdf.jpg	45
Figura 13 - Calorímetro Shimadzu modelo DSC-60. Fonte da imagem: http://www.tai-zhun.com/upload/20110323/20110323002043463.gif	46
Figura 14 – Difratoograma com o refinamento de Rietveld da difração de Raios-X pelo método do pó a 30 °C do fármaco azitromicina dihidratada.	47
Figura 15 - Espectro Raman da azitromicina dihidratada na região de 20 a 1800 cm ⁻¹ . Em destaque a região de 100 a 250 cm ⁻¹ , atribuída a modos vibracionais de rede. δ : <i>bending</i> (dobramento); ν : <i>stretching</i> (estiramento).	49
Figura 16 - Espectro Raman da azitromicina dihidratada na região de 2700 a 3700 cm ⁻¹ . ν : <i>stretching</i> (estiramento).	50

Figura 17 – Curvas de termogravimetria, termogravimetria derivativa e análise térmica diferencial da amostra de azitromicina dihidratada. T_x = Temperatura de cristalização; T_f = Temperatura de fusão.	52
Figura 18 - Curva DSC da amostra de azitromicina dihidratada. T_x = Temperatura de cristalização; T_f = Temperatura de fusão.....	55
Figura 19 - Curvas de difração de Raios-X da azitromicina dihidratada em função da temperatura. (#) Pico em $9,7^\circ$ (2 θ) referente ao plano (2 0 0) da fase AZM-DH. (*) Pico em $10,4^\circ$ (2 θ) referente a formação de nova fase. (*) Pico em $8,9^\circ$ (2 θ) atribuído a nova fase. (↓) Aparição de novo pico. (↓) Desaparecimento de picos.	57
Figura 20 - Difrátograma com o refinamento pelo método de Le Bail da DRXP para $117,5^\circ\text{C}$ do fármaco, atribuído a nova fase.....	58
Figura 21 - Difrátogramas da AZM-DH em função da temperatura.....	60
Figura 22 - Espectros Raman em função da temperatura para a azitromicina dihidratada na região de 20 a 250 cm^{-1}	62
Figura 23 - Espectros Raman em função da temperatura para a AZM-DH na região de 250 a 600 cm^{-1}	63
Figura 24 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 20 e 650 cm^{-1}	64
Figura 25 - Espectros Raman em função da temperatura para a AZM-DH na região de 600 a 1150 cm^{-1}	65
Figura 26 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 600 e 1150 cm^{-1}	67
Figura 27 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 1120 a 1600 cm^{-1}	68
Figura 28 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 1150 e 1500 cm^{-1}	69
Figura 29 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 1650 a 2000 cm^{-1}	70
Figura 30 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 1650 a 2000 cm^{-1}	71
Figura 31 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 2700 a 3100 cm^{-1}	72
Figura 32 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 2700 e 3100 cm^{-1}	73

Figura 33 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 3140 a 3525 cm^{-1}	74
Figura 34 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 3140 e 3625 cm^{-1}	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e moléculas de AZM na célula unitária de um cristal de azitromicina dihidratada	23
Tabela 2 - Dados cristalográficos da azitromicina dihidratada.	48
Tabela 3 - Modos ativos Raman do cristal de azitromicina dihidratada em temperatura ambiente, classificados conforme a literatura.....	51
Tabela 4 - Parâmetros obtidos pela análise de termogravimetria do material azitromicina dihidratada.	53
Tabela 5 - Parâmetros obtidos pela análise térmica diferencial do material azitromicina dihidratada.	54
Tabela 6 - Parâmetros obtidos pela análise de DSC do material azitromicina dihidratada.....	56
Tabela 7 - Dados cristalográficos da nova fase encontrada comparados à azitromicina sesqui-hidratada.	59

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
SUMÁRIO	XV
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Azitromicina	20
2.2. Polimorfismo	24
2.3. Polimorfismo em fármacos	25
2.4. Técnicas de caracterização	25
2.4.1. Difração de Raios-X	25
2.4.1.1. <i>Lei de Bragg</i>	26
2.4.1.2. <i>Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP)</i>	27
2.4.1.3. <i>DRXP em função da temperatura</i>	28
2.4.2. Método de Rietveld	28
2.4.3. Método de Le Bail	31
2.4.4. Espectroscopia Raman	32
2.4.4.1. <i>Espectroscopia Raman</i>	34
2.4.5. Caracterizações térmicas	35
2.4.5.1. <i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	36
2.4.5.2. <i>Análise Térmica Diferencial (DTA)</i>	37
2.4.5.3. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	39
2.4.5.3.1. <i>DSC de fluxo de calor</i>	40
3 OBJETIVOS	41
3.1. Objetivo Geral	41

3.2. Objetivos Específicos	41
4 METODOLOGIA	42
4.1. Obtenção e tratamento prévio	42
4.2. Técnicas de caracterização	43
<i>4.2.1. Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP) em função da temperatura</i>	<i>43</i>
<i>4.2.2. Espectroscopia Raman com variação de temperatura</i>	<i>44</i>
<i>4.2.3. Caracterizações térmicas</i>	<i>45</i>
<i>4.2.3.1. Termogravimetria e análise térmica diferencial simultâneas (TG-DTA)</i>	<i>45</i>
<i>4.2.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i>	<i>45</i>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Caracterização do material de partida	47
<i>5.1.1. Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP)</i>	<i>47</i>
<i>5.1.2. Espectroscopia Raman</i>	<i>48</i>
<i>5.1.3. Caracterizações térmicas</i>	<i>52</i>
<i>5.1.3.1. Termogravimetria (TG), Termogravimetria derivativa (DTG) e Análise térmica diferencial (DTA) simultâneas</i>	<i>52</i>
<i>5.1.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	<i>55</i>
5.2. Caracterizações espectroscópicas em função da temperatura	56
<i>5.2.1. Difração de Raios-X do pó (DRXP) em função da temperatura</i>	<i>56</i>
<i>5.2.2. Espectroscopia Raman</i>	<i>61</i>
<i>5.2.2.1. Região de 20 a 750 cm⁻¹</i>	<i>61</i>
<i>5.2.2.2. Região de 750 a 1300 cm⁻¹</i>	<i>65</i>
<i>5.2.2.3. Região de 1150 a 1600 cm⁻¹</i>	<i>67</i>
<i>5.2.2.4. Região de 1600 a 2000 cm⁻¹</i>	<i>69</i>
<i>5.2.2.5. Região de 2700 a 3100 cm⁻¹</i>	<i>71</i>
<i>5.2.2.6. Região de 3140 a 3525 cm⁻¹</i>	<i>73</i>
6 CONCLUSÕES	76

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

77

REFERÊNCIAS

78

1 INTRODUÇÃO

O interesse no estudo do polimorfismo de estruturas cristalinas presentes no cotidiano da humanidade vem aumentando com o tempo. Isso ocorre, pelo fato do homem sentir a necessidade de conhecer as características intrínsecas dos materiais e o quão as possíveis variações nessas características podem afetá-lo, positiva ou negativamente.

O polimorfismo (*poli* – muito e *morfo* – forma) é a capacidade que um dado material tem de se apresentar de variadas formas em seu estado cristalino. Este fenômeno pode ocorrer por diversas causas, sendo dependente principalmente dos fatores pelos quais o material é submetido. Entre estes fatores podemos citar as variações de temperatura, pressão, polaridade de solvente, umidade e etc.[1,2].

Essas mudanças na estrutura cristalina podem conferir diferentes propriedades a cada polimorfo do material (dureza, solubilidade, condutividade)[3]. Portanto, conhecer a estrutura do material e suas possíveis alterações ao longo de variações que possam ocorrer no meio em que este estará inserido é de suma importância para o entendimento de suas propriedades e aplicações, bem como de suas condições de produção, armazenamento e transporte[4,5].

De forma análoga, para os fármacos, materiais que estão intimamente ligados à saúde dos seres vivos, faz-se necessário conhecer suas especificidades, uma vez que isso pode afetar diretamente no resultado de tratamentos de enfermidades. Assim, estudar o polimorfismo nesses materiais é de grande valia, pois com a mudança de fase, o medicamento pode sofrer alterações significativas em sua solubilidade, biodisponibilidade, absorção e consequentemente em seu tempo e espectro de ação [1,6–8].

Dentre os fármacos que possuem polimorfismo destaca-se a azitromicina (AZM) por ser amplamente utilizada no tratamento de infecções bacterianas e possuir algumas fases polimórficas já conhecidas. A AZM é um antibiótico da classe dos macrolídeos, que é obtida de maneira semissintética e deriva da eritromicina. Essa derivação garantiu uma maior estabilidade da AZM ao meio ácido, provocando um ganho de espaço comercial por ocasionar menores efeitos adversos ao sistema gástrico e que também trouxe melhorias nas suas propriedades farmacocinéticas [9,10].

Podemos então citar os polimorfos da AZM, que em sua grande maioria correspondem de seus hidratos[11]. A fase mais estável à temperatura ambiente e amplamente comercializada, tanto em fármacos como na forma pura, é a azitromicina dihidratada (AZM-DH), $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$. Existem também, fármacos de azitromicina monohidratada (AZM-

MH), $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot H_2O$, a qual ainda apresenta polimorfos dependentes do solvente (solvatos).

Outro hidrato relatado para a AZM é a sua fase sesqui-hidratada (AZM-SH), $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 1,5H_2O$. Por fim, tem-se a fase da AZM anidra, ou, *glass azitrhomicyn* (AZM-A), que se encontra com arranjo estrutural amorfo e tem fórmula molecular $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ [12–14]. Comercialmente o fármaco pode ser encontrado na forma de comprimidos, pó hidratado e pó anidro para suspensão. [15–17].

Apesar de alguns trabalhos já terem sido publicados envolvendo o estudo das formas polimórficas da AZM [17–19], até o momento, não foram relatados trabalhos que investigam os aspectos estruturais deste composto em função da variação da temperatura. Assim, este trabalho objetivou realizar um estudo inédito de investigação estrutural da AZM-DH em função da temperatura, por meio de caracterizações espectroscópicas no estado sólido. Para tanto, utilizaram-se a Termogravimetria (TG), a Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), com a finalidade de compreender as propriedades térmicas do material e traçar a rotina de experimentos espectroscópicos. A Difractometria de Raios-X (DRXP) e a Espectroscopia Raman (RE) foram empregadas a fim de identificar as possíveis formas polimórficas e/ou transformações de fase da AZM-DH, podendo os resultados, servir como mecanismo de controle de qualidade na cadeia produtiva deste fármaco e também como recurso de pesquisa à comunidade científica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Azitromicina

Dentro da gama de fármacos conhecidos, destaca-se a classe dos macrolídeos, medicamentos antibióticos usados em diversos tratamentos de enfermidades provocadas por bactérias. Esse grupo tem como principal característica a presença de um anel macrocíclico lactona em sua estrutura química, sendo, inclusive, a quantidade de membros desse anel, que pode variar de 13 a 17, um dos fatores de diferenciação entre os medicamentos do grupo. Além disso, esses princípios ativos possuem inúmeros relatos de polimorfismo, onde, dentro dessa classe, é possível enfatizar a eritromicina, a claritromicina e a azitromicina [9,20–23]. Destes destacamos a azitromicina, pois é um dos antibióticos mais empregados no mundo e se encontra na relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) [24].

Asíntese da AZM ocorre de forma semissintética derivando-se da eritromicina A estabilizada em meio ácido. Essa estabilização promove a inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactona deixando-o com 15 membros, um a mais que na eritromicina A. A AZM também é considerada como o primeiro membro da classe dos azalídeos. A sua nomenclatura IUPAC é dada por: (2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11-[[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi]-2-etil-3,4,10-trihidroxi-13-[[[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroxi-4-metoxi-4,6-dimetiloxan-2-il]oxi]-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-1-oxa-6-azaciclopentadecan-15-ona [9,12,13]. Seu arranjo químico é representado na Figura 1.

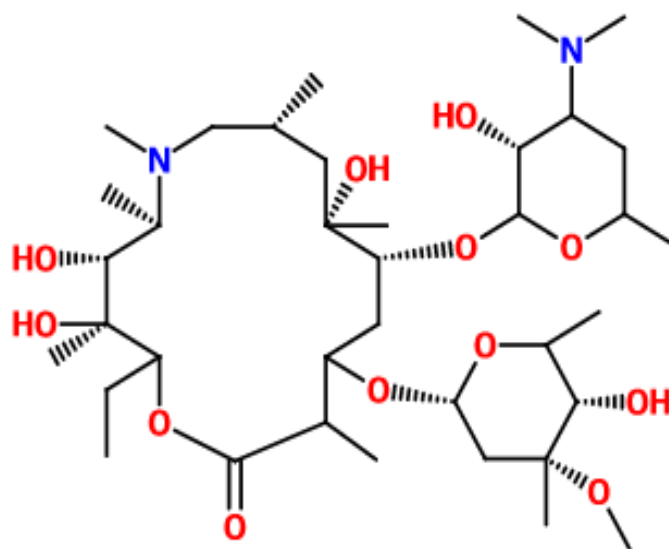


Figura 1 – Estrutura química da molécula de azitromicina. [12]

Como os demais macrolídeos, a AZM é um antibiótico, porém exibe algumas melhorias quando comparada ao seu precursor, no que diz respeito ao espectro de ação e efeitos colaterais, principalmente, no sistema gastrointestinal[25]. Possui eficácia bactericida tanto contra organismos Gram positivos, quanto em Gram negativos atuando no ribossomo da célula de modo a inibir a síntese de proteínas durante a translocação. Mediante esses fatos a AZM é amplamente empregada no tratamento de doenças do trato respiratório, doenças sexualmente transmissíveis, infecções cutâneas e dos tecidos moles [10,13,26].

Tendo em vista essas características, a AZM se torna um material com grande potencialidade para estudos, sendo uma dessas vertentes, o estudo do polimorfismo. Dentre os polimorfos mais comumente citados para a AZM, apresenta-se as suas formas hidratadas, azitromicina dihidratada (AZM-DH), azitromicina monohidratada (AZM-MH), azitromicina sesqui-hidratada (AZM-SH) e a forma anidra (AZM-A) [12,13,17,27,28]. Além desses, outros polimorfos relatados se tratam dos solvatos da AZM-MH, sendo um etanoico e dois isopropanóis[27,29]

Sobre a AZM-DH, esta possui fórmula química $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$. Se trata de um cristal semissintético, cuja cristalização ocorre com 4 moléculas por célula unitária. A estrutura desses cristais é ortorrômbica (grupo espacial $P2_12_12_1$), seus parâmetros de rede são: $a = 14.735 (5) \text{ \AA}$, $b = 16.844 (7) \text{ \AA}$, $c = 17.810 (1) \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [12,13]. As Figuras 2 e 3 representam a estrutura molecular da AZM-DH, que é o material alvo deste estudo, e sua célula unitária, respectivamente.

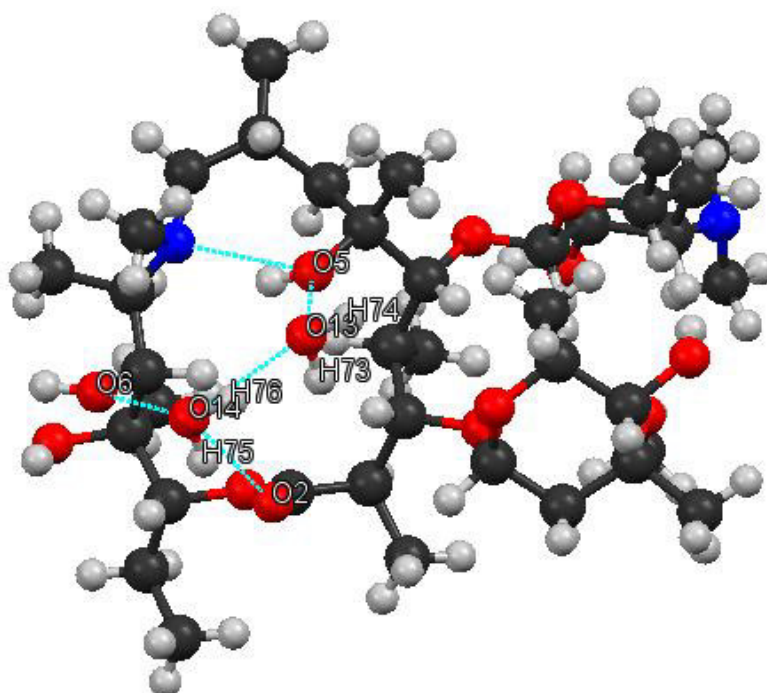


Figura 2 – Estrutura molecular tridimensional da azitromicina dihidratada. Em destaque as moléculas de água e suas principais interações intramoleculares (traçado azul).[13]

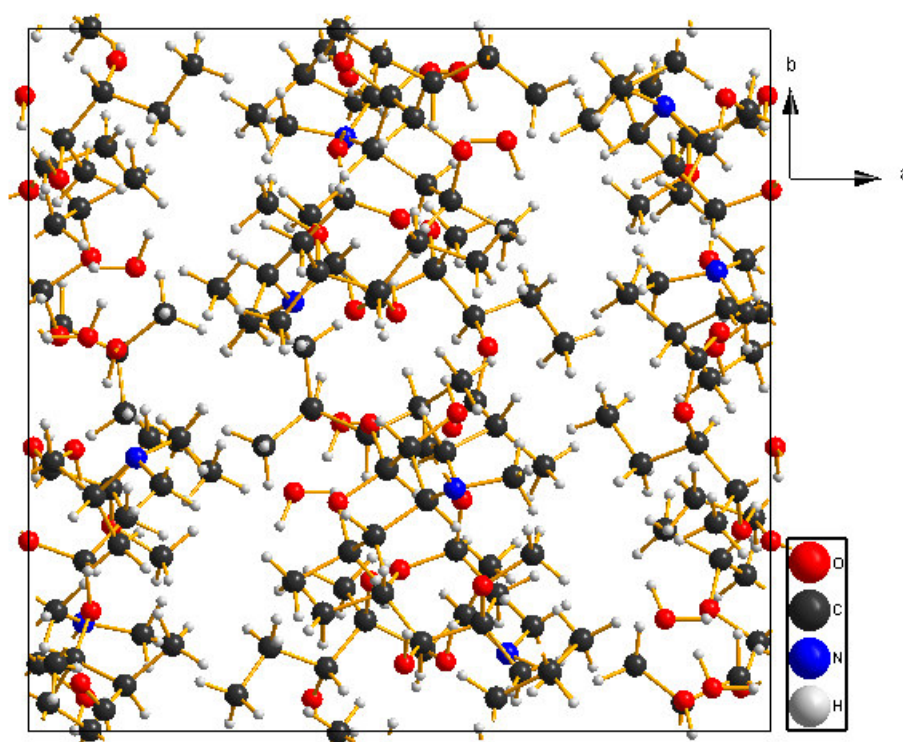


Figura 3 – Arranjo da célula unitária de um cristal de azitromicina dihidratada.[13]

Partindo do modelo disposto para a AZM-DH, encontrado nos estudos de Krobehel et al. [13] ao desenvolverem técnicas de síntese para a azitromicina dihidratada, é possível estimar as ligações de hidrogênio, com as quais a molécula de água se conecta ao material. Uma vez que a AZM-DH é constituída, basicamente, por grupos metil (CH_3), hidroxilas (OH) e possui duas moléculas de água de hidratação em sua estrutura, estudar e conhecer essas ligações é importante no estudo de mudanças de fases de um material, pois a partir do rearranjo dessas ligações durante o processo é que ocorrem, preferencialmente, essas modificações. A Figura 4 representa as possíveis ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e as moléculas de AZM da célula unitária. A Tabela 1 apresenta as distâncias estimadas para essas ligações com as respectivas numerações dos átomos envolvidos e os grupos funcionais em que ocorrem, conforme relatado por Krobehel et al. [13].

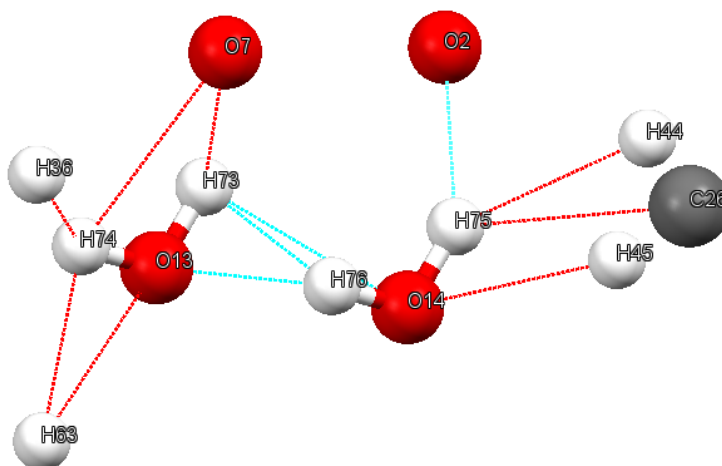


Figura 4 - Arranjo molecular das ligações de hidrogênio entre a água e a azitromicina na célula unitária de azitromicina dihidratada. Em vermelho as ligações intermoleculares e em azul as intramoleculares[13].

Tabela 1 - Principais ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e moléculas de AZM na célula unitária de um cristal de azitromicina dihidratada

Átomo 1	Átomo 2	Distância A-H...B(Å)	Grupo funcional
^A H ₇₄	^C H ₆₃	2,254	CH ₃
^A H ₇₃	^C O ₇	2,351	OH
^A H ₇₄	^C O ₇	2,718	OH
^A O ₁₃	^C H ₆₃	2,624	CH ₃
^A H ₇₄	^C H ₃₆	2,268	CH ₃
^B H ₇₅	^D O ₂	2,000	C=O
^B H ₇₅	^C C ₂₆	2,789	CH ₃
^B H ₇₅	^C H ₄₄	2,317	CH ₃
^B O ₁₄	^C H ₄₅	2,700	CH ₃
^B H ₇₆	^A O ₁₃	1,845	H ₂ O ... H ₂ O
^A H ₇₃	^B O ₁₄	2,524	H ₂ O ... H ₂ O
^A H ₇₃	^B H ₇₆	1,670	H ₂ O ... H ₂ O

(^A): Molécula de água mais ligada; (^B): Molécula de água menos ligada; (^C): AZM externa; (^D): AZM interna.

Assim como a fase dihidratada, a fase monohidratada da AZM (C₃₈H₇₂N₂O₁₂·H₂O) também é um cristal semissintético e a diferença principal entre esses polimorfos é o solvente utilizado na cristalização, enquanto a AZM-DH é cristalizada com uma mistura equimolar de acetona e água, a AZM-MH é obtida pela mistura água e etanol 1:1[27,28]. Os parâmetros cristalográficos do monohidratado também exibem algumas similaridades com o dihidrato, tais como, grupo espacial P2₁2₁2₁, sendo uma estrutura ortorrômbica e o fato de possuir 4 moléculas por célula unitária. Os parâmetros de rede para a AZM-MH são, $a = 8.809 (3) \text{ \AA}$, $b = 12.475 (8) \text{ \AA}$, $c = 45,590 (3) \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ [12,13,18,27].

Outro hidrato da AZM é sua fase sesqui-hidratada, $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 1,5H_2O$. Sua cristalização ocorre na forma monoclinica ($P2_1$), com 4 moléculas por célula unitária. Sua síntese é descrita como sendo o resultado da recristalização de AZM-DH utilizando um solvente orgânico (acetona, metanol, acetonitrila, etanol ou isopropanol) em proporção de 1:1 com água sob aquecimento (45-55°C) por 4 a 6 horas para completa dissolução, onde a precipitação ocorre durante o resfriamento para a temperatura ambiente. Para a AZM-SH os parâmetros de rede são $a = 16.407$ (8) Å, $b = 16.292$ (8) Å, $c = 18,383$ (9) Å e $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 110,212$ (2) e $\gamma = 90^\circ$ [12,18].

Tem-se ainda a forma anidra do fármaco (AZM-A), cuja fórmula química é simplesmente $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ e tem característica estrutural amorfa. Essa forma vem sendo alvo crescente de estudos para o desenvolvimento de novos medicamentos [30–33]. Isso ocorre devido sua solubilidade aquosa e seu poder de penetração de membrana serem relativamente maiores que das demais formas, tornando a dosagem requerida no tratamento menor, porém, sua estabilidade é reduzida uma vez que seu índice de higroscopicidade é relativamente alto [19,32,33].

2.2. Polimorfismo

A palavra polimorfismo, origina-se de polimorfo que do grego quer dizer, *poli* – vários e *morfo* – forma, ou seja, várias formas. Por diversas vezes na história da ciência se tornou difícil a análise do que seria o polimorfismo em materiais, principalmente ao se comparar com isomerismos e outras alterações moleculares. Assim, essas definições foram alvo de debates no meio científico [1,2].

Diante disso, para fim deste estudo, será utilizada a definição mais aceita no meio acadêmico. Essa designação refere-se à capacidade que alguns materiais cristalinos têm de modificar sua rede estrutural sem que haja a modificação de sua forma química e/ou estado físico, desse modo a alteração ocorrerá somente no estado sólido permanecendo inalterado, o material, no estado líquido ou gasoso. Essa mudança morfológica da rede cristalina de um material, geralmente é dependente das características do meio em que este se encontra [1,2].

Variações na pressão, temperatura, umidade (hidratos), gás da atmosfera circundante ou mesmo na maneira como este cristal foi sintetizado, sendo esta, relacionada principalmente ao solvente de cristalização, são os principais fatores ligados a indução de mudanças de fase em materiais sólidos [1,2]. No caso dos solvatos, fase em que o material possui o solvente de cristalização inserido em sua rede cristalina, a extração dessa parcela de solvente

(desolvatação), pode ocasionar transformações de fase, as quais, geralmente, são denominadas de pseudopolimorfismo [2].

Tais modificações no cristal, apesar de não alterarem a fórmula química, são o bastante para conferir mudanças nas propriedades do composto sólido, como por exemplo, propriedades físicas, químicas e físico-químicas [1,3]. Desta maneira, cada fase estrutural terá características particulares, as quais podem ou não, favorecer o homem e suas necessidades. Diante desse impasse a comunidade científica tem se preocupado cada vez mais em entender o polimorfismo, as condições que ocasionam esse fenômeno e as propriedades relevantes de cada polimorfo dos materiais em estudo [4,5].

2.3. Polimorfismo em fármacos

O polimorfismo ocorre comumente em fármacos e tem sido objeto de muitos estudos publicados em periódicos científicos[1,6–8]. Isso pode ser atribuído à complexidade das moléculas, que ocasiona a ocorrência de inúmeros tipos de interações moleculares, em sua maioria ligações de hidrogênio, para a formação da estrutura sólida. Essas interações podem ser modificadas ao longo do processo de produção pelo emprego das operações unitárias. Portanto, por se tratar de uma classe de materiais que exerce grande influência na vida dos seres humanos, os medicamentos requerem grande atenção no que diz respeito ao caso do estudo de seus polimorfos [1,3,8,34].

Haja vista que diferentes estruturas cristalinas (polimorfos), ao se tratar de substâncias medicamentosas, exibem também diferenças em suas propriedades farmacocinéticas, o estudo do polimorfismo nesse caso é ainda mais relevante. Essas propriedades distintas podem ser, por exemplo, os níveis de solubilidade e biodisponibilidade, que por sua vez, podem culminar acarretando em alterações no espectro de ação da droga e na eficácia de tratamentos de enfermidades, gerando assim transtornos à sociedade [3,4,8]. Esse fenômeno ressalta a importância do estudo polimórfico em insumos farmacêuticos para a comunidade em geral.

2.4. Técnicas de caracterização

2.4.1. Difração de Raios-X

Difração é um fenômeno físico, caracterizado como o desvio sofrido pelas ondas ao atravessarem uma fenda ou contornarem algo cuja dimensão, seja da mesma ordem de grandeza que o seu comprimento de onda [35].

A descoberta dos Raios-X, ocorreu em meados do ano de 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen, que observou esse novo tipo de radiação e ganhou o prêmio Nobel de física em 1901 por tal feito. Após contribuições de Blarka, Einstein e Bragg, essa nova radiação foi descrita como sendo ondas eletromagnéticas de comprimentos na ordem de angstroms (Å). Assim, Max von Laue e seus colaboradores perceberam, que a rede estrutural de cristais poderia agir como rede de difração de Raios-X. Walter Friedrich e Paul Knipping, alunos de Loue, realizaram o experimento que de fato demonstrou a validade de sua hipótese, sendo no ano de 1912, desenvolvida a teoria de von Loue para explicar a difração de Raios-X[36].

Portanto, a difração de Raios-X representa o fenômeno de interação entre um feixe incidente de fótons de Raios-X e os elétrons dos átomos componentes de um material, que dispersam ou espalham esse feixe em todas as direções, sendo posteriormente detectados os fótons difratados, que constituem o feixe difratado. O alvo principal da difração de Raios-X de materiais, é conhecer a condição particular em que os Raios-X espalhados pelos átomos e os Raios-X incidentes, estejam ordenados de maneira coerente ou completamente em fase e reforcem um ao outro para produzir um feixe de difração detectável[37].

2.4.1.1. *Lei de Bragg*

Willian Henry Bragg e seu filho Willian Laurence Bragg, se dedicaram ao estudo aprofundado do fenômeno de difração de Raios-X. E apesar de jovem, Laurence conseguiu expressar matematicamente uma equação para a difração de Raios-X. Bragg propôs que ao se considerar dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de Raios-X vão depender da diferença de caminho percorrida por esses raios e o comprimento de onda da radiação incidente. Essa condição é expressa pela Lei de Bragg apresentada na Equação 1:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (1)$$

n corresponde a um número inteiro (ordem de difração), λ ao comprimento de onda da radiação incidente, d à distância interplanar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller)

da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência medido entre o feixe dos Raios-X e os planos cristalinos. O esquema proposto por Bragg é representado na Figura 5[38].

A medida da direção de espalhamento dos feixes difratados e suas intensidades, permite a determinação de propriedades fundamentais de materiais no estado cristalino. Tem-se como exemplo disso, a verificação da simetria do grupo espacial a qual o cristal pertence, bem como a quantificação dos parâmetros de rede. É possível verificar ainda, a ausência de cristalinidade para materiais sólidos amorfos [39].

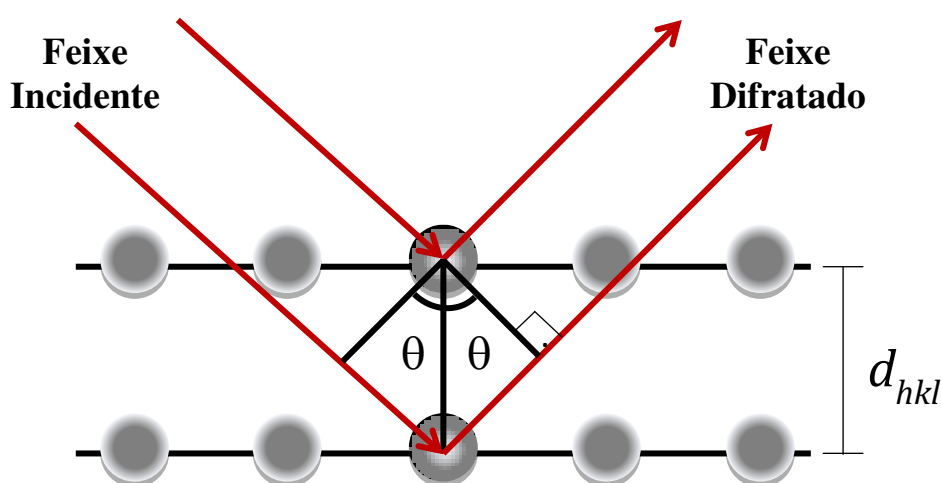


Figura 5 - Esquema proposto por Bragg para a difração de Raios-X[38].

2.4.1.2. Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP)

Nem sempre os materiais cristalinos são obtidos na forma de monocristais. A caracterização utilizada para esses casos é a difração de Raios-X de amostras policristalinas ou método do pó (DRXP). Com isso o feixe de Raios-X incide sobre a amostra na forma de pó, sendo que a distribuição dos cristalitos ocorre de forma aleatória. Um feixe é difratado pelos cristalitos que estão orientados na condição de formar esse desvio de maneira construtiva. Os “raios” incidentes formam um ângulo θ com os planos atômicos difratantes e 2θ com o detector, condizendo com a lei de Bragg[40].

O registro das intensidades difratadas é então coletado pelo detector, que por sua vez fornece o difratograma, uma “impressão digital” do material cristalino. Esse tipo de medida possibilita a obtenção de informações estruturais de grande importância para o estudo de materiais cristalinos[35]. Também é possível obter a certeza da natureza amorfa de materiais não cristalinos, bem como analisar o padrão de bandas característico a essa classe [38].

2.4.1.3. *DRXP em função da temperatura*

Na DRXP há a possibilidade de ser realizada em função da temperatura. Desta maneira, é possível investigar, por meio da leitura dos picos de Bragg, o comportamento térmico da estrutura de materiais cristalinos e, na ausência de picos, observar possíveis alterações no difratograma de materiais amorfos. Para tal, é necessário que se façam modificações no aparelho de medida, que basicamente se resumem no acoplamento de um aparato que permita esse aquecimento ou resfriamento de forma controlada. De maneira que, acessórios como fornos resistivos ou por radiação que podem ou não atuar como câmaras criogênicas, são vendidos por inúmeros fabricantes de difratômetros e se mostram boas opções para tal incremento [35].

Por se tratar de uma técnica capaz de avaliar os parâmetros cristalográficos, sua utilização simultânea ao aquecimento ou resfriamento do material, permite que se entenda fenômenos como o polimorfismo ocasionado por esses fatores extrínsecos. Assim, ao realizar o monitoramento da estrutura da amostra em uma rampa de temperatura, é permitido que se conheça os pontos críticos de mudanças de fases desse analito. É possível ainda, com auxílio da ferramenta de refinamento de Rietveld, monitorar os parâmetros de rede do material ao ser submetido a variação de temperatura e observar os níveis de dilatação ou contração da célula unitária do cristal [35].

Portanto, a DRXP com incremento de temperatura, se mostra como uma poderosa ferramenta no estudo de mudanças de fase em materiais, ocasionadas por mudanças na temperatura. Isso pode ser evidenciado pelo crescente número de trabalhos que reportam o emprego dessa técnica [21,34,41–43]

2.4.2. *Método de Rietveld*

O refinamento de Rietveld consiste em um modelo matemático comparação de dados estruturais de materiais cristalinos. Possui grande abrangência no estudo de estruturas cristalinas, pois permite que se utilize parâmetros dispostos em bancos de dados conceituados, como padrões para as principais fases de inúmeros cristais, isso torna o método uma robusta ferramenta de análise. Tendo sido primeiramente desenvolvido para refinamentos de dados de difratogramas de nêutrons, logo recebeu adaptações que permitiram sua aplicação, também, em difratogramas de Raios-X, obtendo assim seu amplo reconhecimento pela academia. [44].

Uma vez que se tenha o conhecimento das possíveis fases estruturais presentes no material, o refinamento de Rietveld se torna o método de quantificação dessas fases, com maior relação de confiabilidade. Assim, nas últimas décadas, esse método vem sendo massivamente empregado no estudo estrutural de fases cristalinas, bem como no estudo de mudanças ocorridas nessas fases (polimorfismo) [34,41–43,45–47]. Com isso, seu emprego nas áreas de Ciência e Engenharia de Materiais, Física, Química, Geologia, bem como outras que tratem do estudo de cristais, tem se firmado [46].

O refinamento de Rietveld diz respeito então, ao ajuste matemático dos parâmetros da estrutura cristalina, entre um difratograma padrão conhecido para as principais fases do material em análise e o difratograma obtido experimentalmente. Para a quantificação, caso haja mais de uma fase no material, é necessário a comparação com o difratograma padrão de cada uma das fases. Os parâmetros de coordenadas atômicas, parâmetros de rede, parâmetros isotrópicos e anisotrópicos, além do fator de ocupação, tem seu refinamento realizado por meio do processo de *minimização da soma de quadrados* (método de mínimos quadrados), sendo o procedimento repetido em ciclos até que se obtenha um bom ajuste entre o padrão de difração calculado e o experimental [44].

Para realizar um refinamento de Rietveld é necessário atender algumas exigências experimentais: precisão das intensidades medidas nos intervalos 2θ ; difratograma padrão calculado com a melhor concordância possível com a estrutura do cristal; descrição sistemática dos picos de Bragg abrangendo suas formas, largura e possíveis erros de posição; dados inerentes ao equipamento utilizado [48]. A minimização desses erros é refinada por meio da soma das diferenças das intensidades calculadas e observadas, ponto a ponto nos difratogramas e pode ser descrita como a Equação 2:

$$S_y = \sum_i w_i (y_i - y_{ci})^2 \quad (2)$$

em que $w_i = 1/y_i$, y_i e y_{ci} são, respectivamente, a intensidade observada e a intensidade calculada, para o i -ésimo ponto [46,48].

A Equação 3, que permite o cálculo da intensidade para o i -ésimo ponto é apresentada como:

$$y_i = S \sum_K [L_K |F_K|^2 \Phi(2\theta_i - 2\theta_K) P_K A] + y_{bi} \quad (3)$$

em que S se trata do fator de escala, K dos índices de Miller (h, k, l), L_K é o fator de Lorentz, de polarização e o fator de multiplicidade, F_K o fator estrutural do K -ésimo ponto da reflexão de

Bragg, Φ é a função de perfil do pico, P_K determina a orientação preferencial, A é o fator de absorção, e y_{bi} é a intensidade do background no i -ésimo ponto [46,48]. O fator de estrutura F_K é dado pela Equação 4:

$$F_K = \sum_n N_n \cdot f_n \cdot \exp \left[-\frac{B \cdot \sin^2 \theta}{\lambda^2} \right] \cdot \exp [2\pi i (hX_n + kY_n + lZ_n)] \quad (4)$$

X_n , Y_n e Z_n dizem respeito as posições atômicas, B se tratado parâmetro térmico, N_n do fator de ocupação e f_n do fator de espalhamento para o n -ésimo átomo na célula unitária.

Dessa maneira, a determinação da posição do pico de Bragg é dada por meio das dimensões da célula unitária. É necessário que se leve em consideração o equipamento utilizado na medida e sua fonte de radiação, afim de uma função com maior representatividade sobre o perfil das reflexões. Tem-se, como as principais funções usadas para representar esse perfil na DRXP, estas que seguem [46,48,49]:

Gaussiana:
$$G = \frac{\sqrt{4 \ln(2)}}{H\sqrt{\pi}} \exp \left[-\frac{4 \ln(2)(2\theta_i - 2\theta_k)^2}{H^2} \right] \quad (5)$$

Lorentziana:
$$L = \frac{2}{H\pi} \frac{1}{\left[1 + \frac{4(2\theta_i - 2\theta_k)^2}{H^2} \right]} \quad (6)$$

Pearson VII:
$$P = \frac{2\Gamma(m)(2^{1/m-1})^{1/2}}{\Gamma(m-0,5)H\sqrt{\pi}} \left[1 + 4 \left(2^{1/m-1} \right) \frac{(2\theta_i - 2\theta_k)^2}{H^2} \right]^{-m} \quad (7)$$

Pseudo-Voigt:
$$pV = \eta_p L + (1 - \eta_p) G \quad (8)$$

$\Gamma(m)$ diz respeito a função gama, η_p ao parâmetro que estabelece o peso de cada função considerada, e H é a largura do pico à meia altura, que é dada pela Equação 9:

$$H = \sqrt{U \tan^2 \theta + V \tan \theta + W} \quad (9)$$

onde U , V e W representam parâmetros refináveis [44,46,48,49].

Para que se obtenha um refinamento de Rietveld satisfatório, deve-se ajustar os parâmetros refináveis no intuito de minimizar a diferença dada pela Equação 2, ou seja, buscar o “melhor ajuste” possível. Para que se tenha controle sobre a satisfação do refinamento e sobre o momento que este sedará por concluído é necessário manter-se atento aos chamados indicadores de confiança ou fatores-R[44,45,48]:

$$\text{R-perfil:} \quad R_p = \frac{\sum |y_{i\text{obs}} - y_{i\text{cal}}|}{\sum y_{i\text{obs}}} \quad (10)$$

$$\text{R-perfil ponderado:} \quad R_{wp} = \sqrt{\frac{\sum w_i (y_{i\text{obs}} - y_{i\text{cal}})^2}{\sum w_i y_{i\text{obs}}^2}} \quad (11)$$

$$\text{R-fator esperado:} \quad R_{\text{exp}} = \sqrt{\frac{(N-P)}{\sum w_i y_{i\text{obs}}^2}} \quad (12)$$

Assim, o índice “obs” retrata o observado e o índice “cal” o calculado, N diz respeito ao número de observações e P o número de parâmetros refinados.

$$\text{Goodness of Fit (GOF):} \quad S = \frac{R_{wp}}{R_{\text{exp}}} \quad (13)$$

Em um refinamento ideal o *goodness-of-fit* (GOF) deve se apresentar o mais próximo de 1,0 quanto possível. É importante ressaltar ainda, que os critérios numéricos possuem grande importância para a avaliação quantitativa, porém é necessário que haja também um bom visual entre os padrões, observando-se a diferença entre as intensidades observadas e calculadas[44–46,48,49].

2.4.3. Método de Le Bail

Em busca da determinação de uma estrutura cristalina, um dos caminhos utilizados são os métodos teóricos *ab initio*, os quais necessitam das intensidades integradas e dos fatores de estrutura das reflexões. Essas intensidades são geralmente determinadas após a deconvolução das reflexões.

Pawley e Le Bail [50,51] sugeriram métodos de decomposição das reflexões para padrões de difração. Armel Le Bail foi o idealizador do método de Le Bail e o fez em 1988. O

método consiste no ajuste entre o padrão de difração calculado e o obtido experimentalmente sem que se tenha um modelo estrutural de comparação. Com a utilização de ciclos de mínimos quadrados, o fator de estrutura vai sendo extraído partindo das intensidades experimentais e após a eliminação da radiação de fundo. Assim, utilizado um método de decomposição semelhante ao de Rietveld, em que as intensidades experimentais observadas em cada ponto do padrão de difração do pó, sofrem uma divisão em reflexões diferentes e proporcionais às intensidades calculadas, a extração pode ser realizada.

Entre os métodos de Rietveld e Le Bail, tem-se que a diferença principal está no cálculo das intensidades. Em Rietveld são utilizadas intensidades calculadas com base no modelo estrutural, já no método de Le Bail as intensidades utilizadas são a do próprio padrão experimental. No início tem-se uma definição arbitrária dos valores das intensidades “calculadas”. Nesse método a decomposição ocorre com a análise por mínimos quadrados das variáveis livres, sendo que o número de variáveis acaba por se tornar independente da radiação de fundo e do número de reflexões. Assim, os refinamentos da função de perfil de pico e dos parâmetros de rede ocorrem a cada ciclo.

A deconvolução (decomposição) do padrão de difração, bem como a determinação das intensidades individuais e fatores de estrutura analisados em cada reflexão, podem ser efetuadas utilizando-se de um software livre. Para esse estudo o software utilizado foi o mesmo empregado no método de Rietveld, o programa GSAS [52].

2.4.4. Espectroscopia Raman

Espectroscopia Raman consiste em uma técnica baseada na interação molecular de uma substância com uma radiação. Ao ser irradiada por uma fonte de origem eletromagnética monocromática, a substância provoca a dispersão elástica e inelástica dessa radiação. Os fótons da radiação incidente são absorvidos pela amostra e, em seguida, reemitidos, porém a frequência desses fótons de luz monocromática pode mudar após a interação com a amostra.

Para tal, a emissão que ocorre na mesma frequência da radiação incidente, ou seja, um espalhamento elástico, é denominado espalhamento Rayleigh. Já a interação que provoca um deslocamento energético, em comparação com a frequência monocromática original, é atribuída ao fenômeno denominado efeito Raman, podendo ocorrer de duas maneiras: espalhamento do tipo Stokes e do tipo anti-Stokes.[53].

Previsto inicialmente de maneira teórica por Adolf Smekal em 1923, efeito Raman foi demonstrado experimentalmente em 1928 pelos indianos Raman e Krishnan. Foram

reportados também estudos sobre esse fenômeno pelos russos Grigory Landsberg e Leonid Mandelstam[54]. A técnica caiu em desuso, devido a dificuldade em não obter interferência do efeito elástico, e em meados da década de 60 experimentou um resurgimento, quando a tecnologia alcançou o desenvolvimento dos lasers que começaram a ser utilizados como fontes de radiação monocromática [54–56].

Assim, descreve-se por efeito Raman do tipo Stokes, a colisão de um fóton incidente com a molécula, aonde esse fóton excita um elétron de um dado estado vibracional para um estado virtual excitado e em seguida o elétron decai para um estado vibracional mais energético, emitindo um fóton com menor energia que o incidente. No tipo anti-Stokes, o fóton encontra o elétron já em um estado vibracional de maior energia, a excitação eleva esse elétron até o estado virtual, porém, nesse caso o elétron decai para um estado vibracional de menor energia que o inicial. O fóton emitido nesse decaimento é então espalhado com maior energia que o fóton incidente[54,57,58].

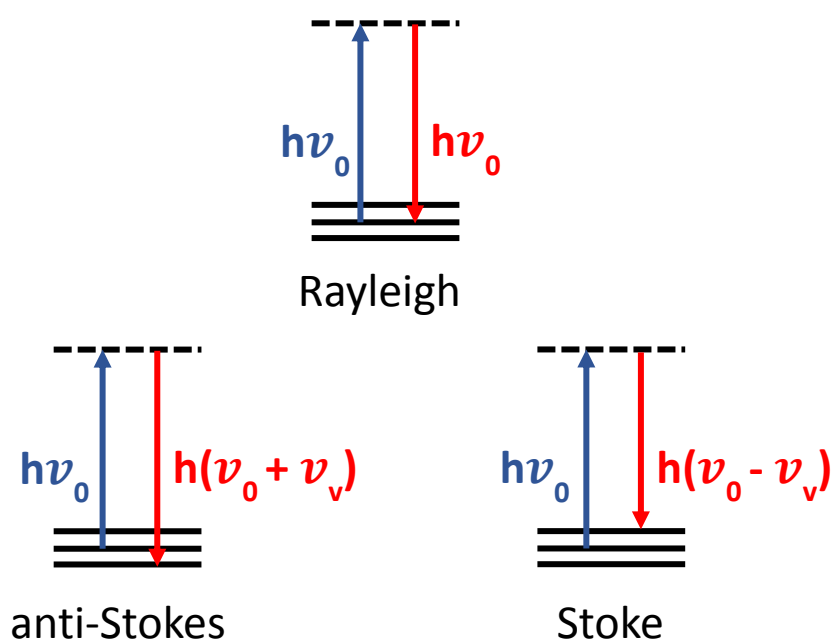


Figura 6 - Representação do modelo quântico das transições ocorridas no efeito Rayleigh, efeito Raman Stokes e anti-Stokes[60].

A interação que ocorre no efeito Raman, diz respeito à interferência do campo elétrico da radiação eletromagnética na distribuição da nuvem eletrônica das moléculas da amostra. Esse campo da radiação incidente, induz um momento de dipolo P na nuvem eletrônica das moléculas. Essa relação é dada pela Equação 14:

$$P = \alpha \cdot E \quad (14)$$

α é então, o tensor polarizabilidade da nuvem eletrônica, esse fator trata a facilidade de deformação dessa nuvem na presença do campo elétrico. Dessa forma o parâmetro que determina o grau de espalhamento quando a radiação incide sobre a matéria é a polarizabilidade [54,57].

A magnitude do momento de dipolo induzido pode ser calculada por meio da Equação 15:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_V)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_V)t] \} \quad (15)$$

E_0 é a amplitude do campo elétrico, t o tempo, q_0 é a amplitude do deslocamento, ν_0 é a frequência da radiação incidente e ν_V a frequência de vibração do sistema.

Podem ser observados três termos, os quais representam o espalhamento da radiação. No primeiro termo tem-se somente a frequência correspondente a radiação incidente, se tratando do espalhamento Rayleigh ou espalhamento elástico. No segundo e terceiro termos aparecem as radiações espalhadas com frequência $\nu_0 - \nu_V$ e $\nu_0 + \nu_V$, que são respectivamente inerentes aos espalhamentos inelásticos do tipo Stokes e anti-Stokes. A Figura 6 representa o esquema quântico proposto para as transições ocorridas no efeito Rayleigh, efeito Raman Stokes e anti-Stokes [54,59,60].

Por consequência, essa técnica permite que se colem informações acerca dos comportamentos vibracionais ocorridos nas moléculas, tais como estiramentos, rotações e torções. Pode ser empregada no estudo de amostras sólidas, líquidas e gasosas. No caso específico de sólidos o espalhamento Raman permite também o estudo dos modos vibracionais da rede estrutural do material ao analisar a região de baixa frequência ($< 250 \text{ cm}^{-1}$), além de permitir caracterizar grupos estruturais e tipos de ligação do material [61].

2.4.4.1. Espectroscopia Raman

De maneira análoga ao que ocorre com a DRXP, a espectroscopia Raman pode também ser realizada utilizando o emprego da modificação da temperatura durante o experimento. Neste caso é necessário também que se monte um aparato de aquecimento ou resfriamento, acoplado ao instrumento de medição. Com isso, será possível então, tomar

medidas vibracionais em conjunto com a variação de temperatura do material analisado. Sendo assim, a análise por meio da espectroscopia Raman em função da temperatura permite que seja verificado o comportamento dos modos vibracionais da molécula a medida que esta sofre variação em sua temperatura[62].

Desse modo, é possível avaliar a estabilidade térmica desses modos, bem como os pontos críticos em que estes sofrem alterações. Se tratando especificamente dos modos vibracionais de baixas frequências (até aproximadamente 250 cm^{-1}), os quais são atribuídos as vibrações ocorridas na rede estrutural do material, permite-se admitir que alterações ocorridas nessa região indiquem mudanças de fase na amostra em função da temperatura. Para os modos encontrados acima de 250 cm^{-1} , são atribuídas as vibrações referentes a grupos moleculares e a interações e ligações interatômicas. De encontro a isso, tem-se também que mudanças nos modos internos (acima de 250 cm^{-1}), indiquem alterações em ligações e/ou interações moleculares (principalmente ligações de hidrogênio), que, estão também relacionadas a conformação estrutural do analito [62].

Portanto, essa técnica se trata de outra importante ferramenta, que pode ser empregada no estudo do polimorfismo em função da temperatura, de sólidos cristalinos ou não. Mais uma vez, a crescente gama de trabalhos científicos que apresentam essa técnica, evidencia a relevância que seus resultados podem vir a oferecer ao pesquisador e a comunidade em geral [41–43,47,63,64].

2.4.5. Caracterizações térmicas

A análise térmica de um material, permite a observação das mudanças nas características da amostra em função da variação de temperatura. Essas análises empregam técnicas que consistem em monitorar uma propriedade da amostra em função do tempo e/ou da temperatura. Desta maneira, obtém-se dados do comportamento do material que podem indicar a ocorrência de fenômenos químicos e/ou físicos no mesmo [65].

Assim, se pode realizar o experimento de dois modos, no modo estático ou no modo dinâmico. Para a situação estática a variação dos parâmetros atuantes independe do tempo, já o caso dinâmico tem-se um controle destes parâmetros sobre a amostra através de um programa temporal pré-determinado. Dessa maneira, é possível, ainda, empregar métodos diferenciais, realizando a comparação do parâmetro de interesse entre a amostra e uma referência, empregando os mesmos critérios analíticos e medindo esta diferença entre o material estudado e o padrão referencial [65,66]. Com isso, para este trabalho, o modo dinâmico foi o escolhido.

Dentre as técnicas que utilizam o modo dinâmico em sua execução destacam-se a Análise Termogravimétrica (TGA), a Análise Térmica Diferencial (DTA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Estas análises são amplamente empregadas no estudo térmico de materiais, dentre estas linhas de pesquisa tem-se o polimorfismo em função da temperatura [18,20,67,68]. Isso ocorre por características como a relativa facilidade de execução, necessidade de pouca quantidade de amostra, entre outras que serão dispostas a seguir.

2.4.5.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

O conhecimento da massa de uma dada amostra consiste em uma das técnicas mais comumente utilizadas desde os primórdios da ciência. Assim, a Análise Termogravimétrica (TGA) ou Termogravimetria (TG), constitui-se em uma técnica que tem como base verificar perdas ou ganhos de massa no analito em função da temperatura e/ou do tempo tomando esses dados para a construção da curva de TGA. Essa técnica é bastante empregada no estudo de materiais e se trata de uma técnica com inúmeras citações na literatura [19,34,69,70].

Dentre as aplicações possíveis para a TG, cita-se as seguintes:

- Estudo da decomposição térmica de materiais orgânicos e inorgânicos.
- Estudo da evaporação de líquidos e da sublimação de sólidos.
- Estudos sobre corrosão de metais em atmosferas controladas, em faixas muito amplas de temperatura.
- Complemento no estudo de transições ou transformações de fases e transições vítreas.

Para a TGA o parâmetro fundamental constitui no controle da temperatura, isso devido a aspectos como os meios de troca de calor com a amostra, a metodologia empregada nos pontos críticos de temperatura (temperatura inicial e final, por exemplo) e a interação entre esses dois aspectos, ou seja, como a temperatura é controlada enquanto ocorre essas trocas de calor e como elas ocorrem [65,66,71].

Atualmente já se pode contar com equipamentos de ponta, que apresentam grande eficiência. Os fornos podem promover o aquecimento por resistência elétrica ou até mesmo por radiação (infravermelho) e os controladores de temperatura com modernos softwares permitem minimizar significativamente os erros instrumentais [70,71]. A Figura 7 representa alguns dos principais eventos observados em uma curva TG e suas respectivas atribuições.

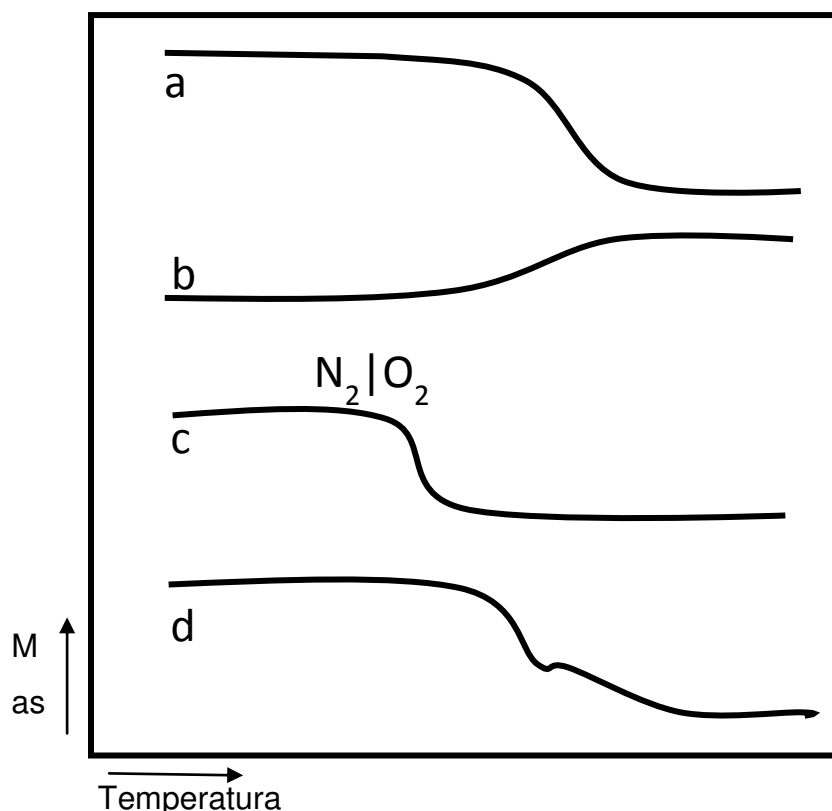


Figura 7 - Curvas TGA de diferentes reações químicas. (a) Decomposição térmica. (b) Corrosão ou oxidação (óxidos não voláteis). (c) combustão de carbono negro em comutação de N₂ para O₂. (d) Decomposição por etapas.[66]

2.4.5.2. Análise Térmica Diferencial (DTA)

A Análise Térmica Diferencial, diz respeito a uma técnica que consiste em medir as temperaturas do objeto de amostra, em comparação com um material de referência termicamente inerte. Essa diferença térmica, é avaliada continuamente por um programa de temperatura controlado de ritmo linear [$dT/dt = Cte$]. As modificações apresentadas pela amostra, podem ocorrer devido a perdas ou ao consumo de calor, porém a referência permanece inalterada. Como consequência desse fato, o registro da temperatura do objeto de estudo será diferente comparado à referência podendo apresentar-se maior ou menor, caracterizando assim, um evento endotérmico ou exotérmico, respectivamente, e registrando picos na curva DTA correspondentes a essas alterações[43,65].

Apesar de exercerem o mesmo princípio, aparelhos diferentes podem apresentar curvas DTA distintas para o mesmo material estudado. Essas diferenças são principalmente dependentes de alguns fatores experimentais, que podem acarretar discrepâncias consideráveis, devendo assim, serem controlados de forma a minimizar tais erros. É possível citar como principais fatores:

- **Aquecimento/resfriamento do forno:** a velocidade com a qual o forno aquece ou resfria, pode provocar deslocamento nos valores de registro dos picos. Por exemplo, com o aumento da taxa de aquecimento os picos aparecem em valores mais baixos de temperatura, suas alturas aumentam e o tempo da reação é então diminuído;
- **Natureza, localidade e dimensionamento dos termopares diferenciais:** os materiais de fabricação, sua reatividade química, máxima temperatura de operação e o tempo de resposta são alguns dos fatores que devem ser considerados ao se escolher os termopares de trabalho;
- **Material de referência:** a medida diferencial da temperatura entre a amostra e a substância inerte, irá depender de fatores como a condutividade térmica, capacidade térmica e densidade de ambos os materiais utilizados;
- **Acondicionamento da amostra:** a transferência de calor entre o forno, a amostra e a referência e os termopares, é influenciada pela compactação da amostra e da referência, pois isso modifica a condutividade térmica entre esses materiais. Esse fator pode interferir também no fluxo de gases dentro e fora da amostra. Ambos os fatos podem acabar por provocar mudanças na curva DTA;
- **Atmosfera do forno:** a atmosfera circundante tem efeito sobre as reações químicas que ocorrem na amostra durante o emprego da temperatura, podendo favorecer, retardar ou mesmo forçar que essas reações ocorram. Portanto, dependendo do gás atmosférico empregado, bem como de seu fluxo, podem ocorrer alterações nos picos de DTA;
- **Granulometria das partículas da amostra:** o tamanho dos grãos da amostra analisada exerce influência na posição dos picos da curva de DTA. Isso ocorre devido ao fato de que, quanto menor o tamanho de grão maior será a área de contato do material, ou seja, mais área disponível para reações e maior facilidade de atingir os centros do grão. Dessa maneira os eventos térmicos tendem a se apresentar em menores temperaturas e com tempo de reação também reduzido [65,71].

Assim, a técnica de DTA vem sendo empregada para verificar a temperatura de ocorrência dos eventos térmicos, caracterizá-los como endotérmicos ou exotérmicos, reversíveis ou irreversíveis, de transição de primeira ordem ou de segunda ordem. Isso faz com que a técnica tenha grande valia na determinação de diagramas de fase, bem como em

estudos de degradação, recristalização e como indicativo de mudanças de fase em materiais sólidos[70].

2.4.5.3. *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), assim como a DTA, é considerada uma técnica diferencial, porém, nesse caso, a diferença mensurada é a da energia, ou calor, fornecida para a amostra e o material de referência para que permaneçam dentro de uma programação controlada de temperatura[41,65,71]. Essa técnica, possibilita analisar os eventos energéticos ocorridos na amostra e associá-los com mudanças físicas ou reações químicas do material, tais como transições de fase (fusão, sublimação, modificações na rede cristalina), estudos de desidratação, dissociação, decomposição, oxidação, corrosão e demais reações sensíveis a variações na entalpia[65,71].

Assim, a verificação dessas diferenças de energia permite ao usuário analisar e medir as alterações na entalpia da amostra e observar a temperatura onde essas mudanças ocorrem. Além disso, possibilita cálculos quantitativos dessa absorção ou liberação de energia, que são expressos nas curvas de DSC como eventos endotérmicos ou exotérmicos, respectivamente[66]. Na Figura 8 é possível observar uma curva idealizada para uma análise de DSC onde se encontram alguns dos principais eventos térmicos observados por essa técnica.

A técnica DSC tem como vantagens principais:

- Determinações relativamente rápidas;
- Necessidade de pouca quantidade de amostra;
- Possibilidade de analisar sólidos ou líquidos;
- Aplicabilidade em processos com resfriamento e medidas com variação de pressão;
- Estuda variada gama de reações químicas.

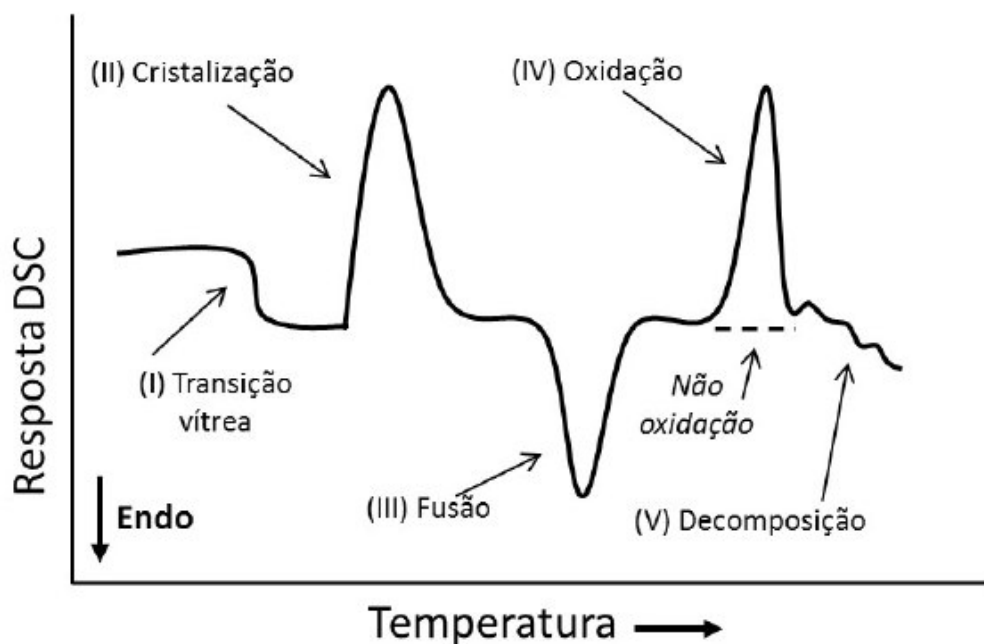


Figura 8 - Curva genérica para um experimento DTA/DSC. (I) Mudança de linha de base. (II) Pico Exotérmico atribuído a cristalização. (III) Pico endotérmico atribuído a fusão. (IV) Pico exotérmico atribuído a oxidação. (V) Curva ruidosa atribuída a decomposição.[42]

2.4.5.3.1. DSC de fluxo de calor

Assemelhando-se ao DTA, estes equipamentos utilizam apenas um forno como fonte de calor. A substância e o material de referência, contidos cada um em uma base de suporte, são dispostos sobre um disco metálico e o aquecimento ocorre pelo mesmo sistema de fornecimento de energia[65]. Havendo assim uma reação na amostra, é estabelecido um fluxo de energia entre os cadinhos por meio da base em que se encontram (geralmente platina)[66].

Dessa forma, a resposta ocorre na forma de potencial elétrico [μV], que corresponde ao aumento de temperatura de ambos os cadinhos no interior do forno, sendo que esse aquecimento deve ocorrer linear e simetricamente.[66]. O fluxo entre os recipientes é então medido por meio de termopares acondicionados sob cada cadinho. O sinal obtido diz respeito então a diferença da capacidade térmica entre o material estudado e o material de referência. A curva de DSC é registrada em termos do fluxo de calor [miliwatts (mW)] versus temperatura ($^{\circ}\text{C}$) ou tempo em minutos).[66,71].

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho objetivou realizar um estudo espectroscópico no estado sólido do polimorfismo de AZM em função da temperatura.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a amostra por meio da difração de Raios-X com a finalidade de compreender qual a fase inicial do material de estudo, comprovada por meio de refinamento de Rietveld;
- Compreender as propriedades térmicas da AZM por meio das técnicas TG-DTA simultâneas e DSC, para traçar os ensaios em função da temperatura, além de complementar a caracterização do material;
- Realizar caracterização da amostra por difração de raios X em função da temperatura e investigar as mudanças estruturais que caracterizam polimorfismo no material, bem como suas condições de ocorrência;
- Caracterizar a amostra com o emprego da espectroscopia Raman em função da temperatura e investigar a relação de mudanças estruturais com possíveis variações nos modos vibracionais.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados, em sua maioria, na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais (UPCM) do PPGCM da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Imperatriz – MA. Entretanto, a Espectroscopia Raman com variação de temperatura, foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Vibracional do Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Pará (UFPA), em Belém – PA, que é parceiro do PPGCM - UFMA. Na Figura 9, é apresentado o fluxograma que representa as etapas de análises experimentais nas quais o trabalho foi constituído.

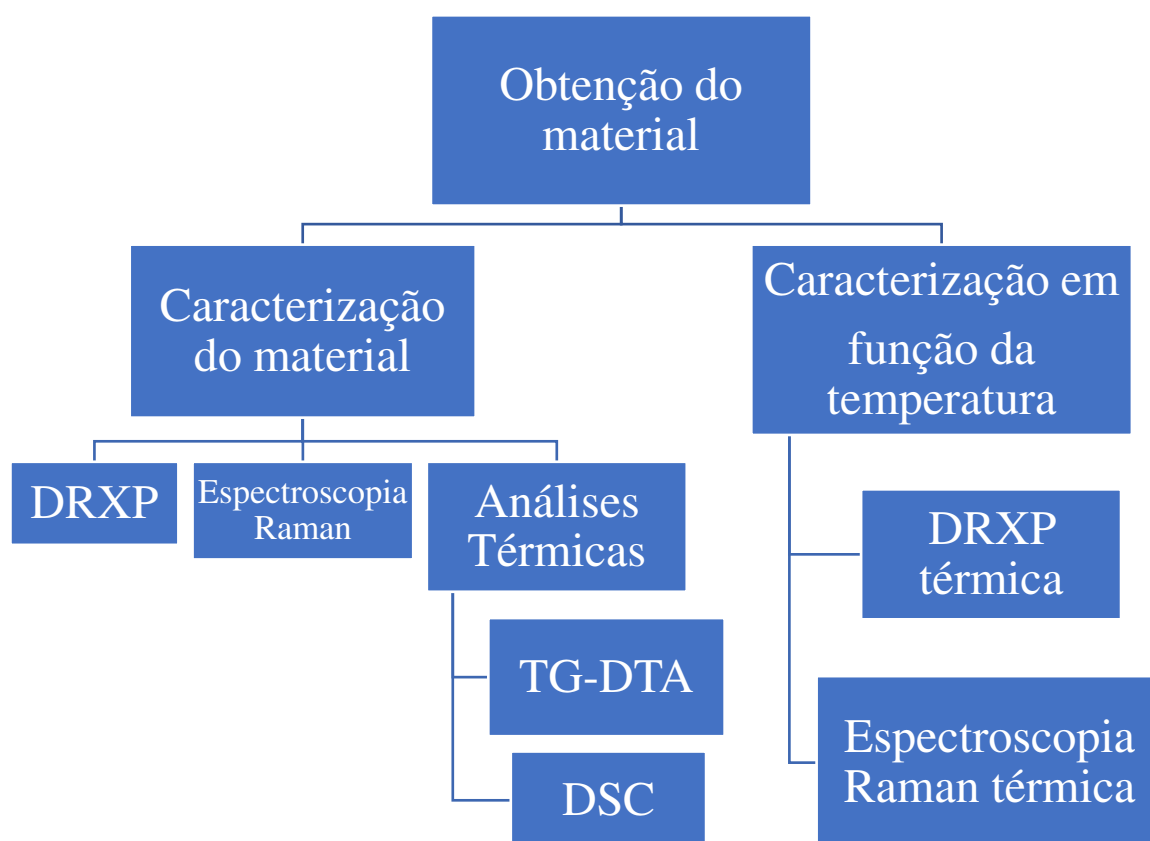


Figura 9 - Fluxograma das etapas de análises utilizadas no experimento.

4.1. Obtenção e tratamento prévio

A amostra de AZM-DH na forma de pó, foi obtida do fornecedor Pharma Nostra, sendo sua origem de fabricação chinesa e apresentando grau de pureza analítico (99,0%). O tratamento prévio à cada análise, ocorreu por meio de uma pulverização da amostra em

almofariz de Agatha, para que se promovesserelativa homogeneidade ao tamanho das partículas do material e permitisse maior área superficial para as reações de aquecimento.

4.2. Técnicas de caracterização

4.2.1. *Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP) em função da temperatura*

Utilizou-se um difratômetro de Raios-X da marca PANalytical modelo Empyrean, utilizando radiação Cu K α ($\lambda=1,5418$ Å), acoplado com câmara de temperatura Anton-Paar, modelo TTK 450 e detector pixcell 3D. O difratômetro emprega geometria de Bragg-Brentano (θ - 2θ) e monocromador de grafite pirolítico. O equipamento descrito é semelhante ao representado na Figura 10.



Figura 10 - Difratômetro de Raios-X da marca PANalytical modelo Empyrean. Fonte da imagem: http://img.directindustry.com/pt/images_di/photo-g/14669-12069849.jpg

O equipamento operou com passo angular de $0,02^\circ$ e tempo de aquisição de 2 segundos em uma faixa de 5 a 50° (2θ). A câmara de temperatura acoplada foi ajustada para o aquecimento na faixa da temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) a 150°C . Os dados de DRXP foram refinados pelo método de Rietveld, afim de comparar os padrões estruturais dos polimorfos, com os resultados obtidos e concluir a cerca das possíveis alterações da

estrutura cristalina em função do aumento de temperatura. O difratograma obtido em temperatura ambiente foi analisado utilizando-se o método de Rietveld para a caracterização estrutural do material de partida, com finalidade de verificar possíveis misturas de fase decorrentes da fabricação do fármaco. Para o refinamento de Rietveld foi utilizado o software GSAS [52].

4.2.2. Espectroscopia Raman com variação de temperatura

As análises de espectroscopia Raman, foram oriundas de um sistema micro-Raman disposto na geometria de retroespalhamento, composto por um espectrômetro triplo da Jobin-Yvon modelo T64000, equipado com detector CCD (dispositivo sensível à carga) resfriado a ar. Um laser (Ar^+) operando na linha de 514 nm e potência de saída de 20 mW foi utilizado como fonte de excitação. O tempo de acumulação foi de 90 s, com 5 acumulações. A visualização da amostra ocorreu mediante uso de um microscópio da marca Olympus modelo BX40, lente de 20x, abertura de 0.25 e foco de 26.5. O aquecimento ocorreu por meio de um forno resistivo que integrou o aparato. Na Figura 11 tem-se a ilustração de espectrômetro triplo da Jobin-Yvon modelo T64000.



Figura 11 - Espectrômetro triplo da Jobin-Yvon modelo T64000. Fonte da imagem: <http://nytek.ru/upload/iblock/2f9/t64000.jpg>.

O equipamento teve suas fendas ajustadas para a obtenção de uma resolução espectral de 2 cm^{-1} . O intervalo espectral de medidas foi de 100 a 3600 cm^{-1} com intervalo

entre 1800 e 2400 cm^{-1} e o aquecimento empregado compreendeu a faixa de 27 a 130 $^{\circ}\text{C}$. Uma medida após o resfriamento da amostra, retorno a temperatura ambiente, também foi realizada sendo indicada por espectros de cor azul e com a marcação 27* (temperatura de estabilidade). Para a caracterização do material de partida, o espectro obtido em temperatura ambiente foi analisado, sendo seus modos vibracionais atribuídos aos respectivos grupos vibracionais.

4.2.3. Caracterizações térmicas

4.2.3.1. Termogravimetria e análise térmica diferencial simultâneas (TG-DTA)

O equipamento empregado para essas medidas, foi um analisador termogravimétrico modelo DTG-60 da empresa Shimadzu, que realiza as análises de TG-DTA simultaneamente e está apresentado na Figura 12. A amostra foi acondicionada em cadinho de α -alumina aberto etendo as condições de trabalho com razão de aquecimento 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, a atmosfera utilizada foi a de nitrogênio e a vazão do gás foi de 50 mL min^{-1} . A faixa de temperatura analisada foi de 25 a 400 $^{\circ}\text{C}$ e a massa inicial da amostra de 3,73 mg.



Figura 12 - Analisador termogravimétrico Shimadzu modelo DTG-60. Fonte da imagem: <https://www.shimadzu.com/an/sites/default/files/ckeditor/an/thermal/qn50420000005wcg-img/qn50420000005wdf.jpg>.

4.2.3.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para a análise de DSC, foi utilizado um calorímetro modelo DSC-60 da marca Shimadzu, calibrado com padrão de índio puro (99,99%). As análises seguiram as seguintes condições de reação semelhantes as utilizadas em DTA com razão de aquecimento $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, atmosfera circundante com gás de nitrogênio e fluxo de gás igual a 50ml min^{-1} . A faixa de temperatura utilizada no experimento foi de 25 a 180°C , tendo como massa inicial $\sim 2,00\text{ mg}$. O recipiente utilizado foi um cadinho de alumínio selado, uma vez que desta maneira obteve-se curvas com melhores diferenciação entre os eventos. Uma ilustração do equipamento utilizados é representada na Figura 13.



Figura 13 - Calorímetro Shimadzu modelo DSC-60. Fonte da imagem: <http://www.tai-zhun.com/upload/20110323/20110323002043463.gif>.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do material de partida

5.1.1. Difração de Raios-X pelo método do pó (DRXP)

A caracterização por meio da DRXP permitiu a construção do difratograma apresentado na Figura 14, cujo refinamento de Rietveld foi realizado e atendeu os parâmetros de confiabilidade R_{wp} , R_p e $GOF (S)$, bem como a concordância visual entre o padrão e o experimento. Este refinamento permitiu a constatação de que a fase inicial do material é referente à AZM-DH, uma vez que não puderam ser observadas outras fases. O difratograma padrão utilizado como referência para este refinamento, foi proposto por Djokic et al. [14] ao estudarem formas de síntese da azitromicina.

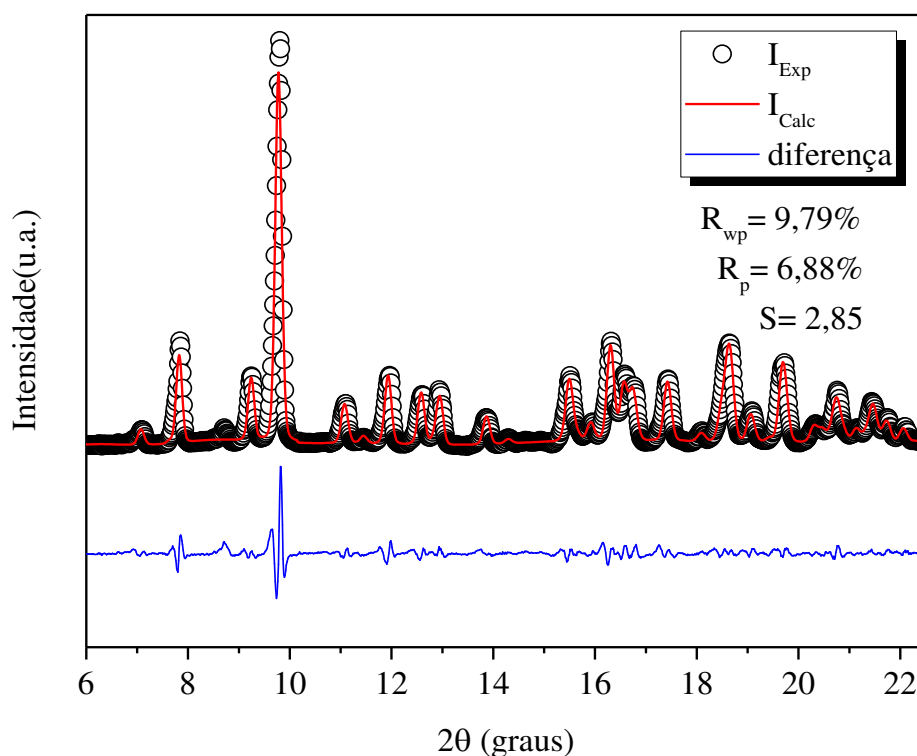


Figura 14 – Difratograma com o refinamento de Rietveld da difração de Raios-X pelo método do pó a 30 °C do fármaco azitromicina dihidratada.

Gandhi et al. [18] em seus estudos com comprimidos de AZM obtiveram resultados semelhantes de DRXP para as amostras contendo AZM-DH e difratogramas diferentes para

fármacos com a forma monohidratada da AZM em suas composições, isso reforça a certeza de que o material se encontra unicamente na fase cristalina dihidratada. Foram descritos resultados, também análogos, por Sundaramurthi e Surayanarayanan [17], em seus estudos com hidratos de AZM, para a fase dihidratada, também sendo relatados difratogramas para a fase monohidratada e sesqui-hidratada, apresentando diferença visual para com a fase dihidratada. Na Tabela 2 são apresentados os dados obtidos com o refinamento de Rietveld e os dados relatados na síntese da fase dihidratada [14].

Tabela 2 - Dados cristalográficos da azitromicina dihidratada.

Fórmula Molecular	Azitromicina dihidratada $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$	
	A partir da DRXP	Djokic et al. [14]
Parâmetros da célula unitária	$a = 17,863 (3) \text{ \AA}$	$a = 17,860 (5) \text{ \AA}$
	$b = 16,909 (3) \text{ \AA}$	$b = 16,889 (7) \text{ \AA}$
	$c = 14,765 (4) \text{ \AA}$	$c = 14,752 (1) \text{ \AA}$
Volume da célula	$V = 4459,701 (5)$	$V = 4420,376 (4)$
Sistema	Ortorrômbico ($\alpha = \beta = \gamma$)	Ortorrômbico ($\alpha = \beta = \gamma$)
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$

É possível perceber que as diferenças dos valores, entre o experimento e o padrão utilizado, para os parâmetros de rede, bem como para o volume da célula unitária são ínfimas e que o sistema estrutural e o grupo espacial entre estes são idênticos. Isso reforça o resultado e a afirmação, que o material em estudo é de fato a AZM em sua forma cristalina dihidratada.

5.1.2. Espectroscopia Raman

A Figura 15 corresponde ao espectro Raman obtido em temperatura ambiente na região de 20 a 1850 cm^{-1} . Desta região destaca-se o espectro de 20 a 250 cm^{-1} , que corresponde aos modos vibracionais da rede estrutural do material. Analisando essa região, pôde-se verificar modos ativos, demonstrando, desta maneira, que através da técnica é possível observar, caso haja, alterações na estrutura do material na medida que se modificam com a mudança nos parâmetros como pressão e temperatura, sendo esse último o alvo do presente estudo.

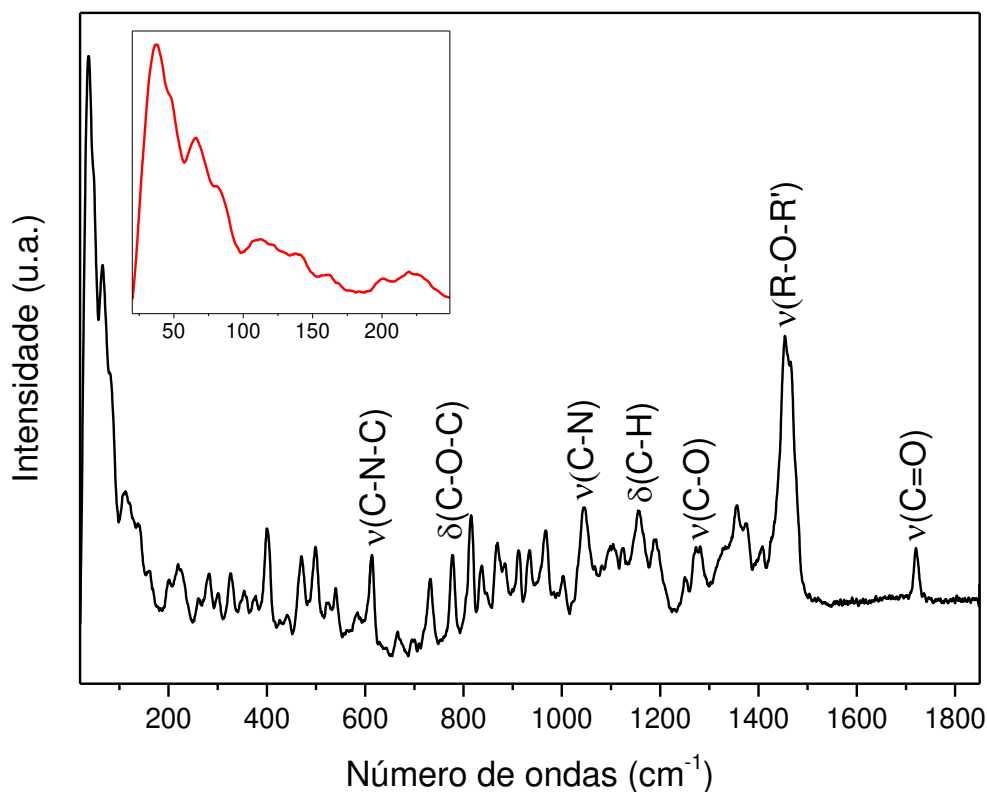


Figura 15 - Espectro Raman da azitromicina dihidratada na região de 20 a 1800 cm^{-1} . Em destaque a região de 100 a 250 cm^{-1} , atribuída a modos vibracionais de rede. δ : *bending* (dobramento); ν : *stretching* (estiramento).

Para a região de 250 a 400 cm^{-1} tem-se atribuição aos modos de flexão dos grupos C-C de cadeias alifáticas, ou seja, cadeias carbônicas longas. Esse resultado é satisfatório e esperado, pois a AZM possui inúmeras cadeias carbônicas longas e cíclicas em sua estrutura, como observado nas Figuras 1 e 2. Já a região acima de 400 até 750 cm^{-1} , são atribuídos os modos de estiramento de grupos CNC e CC [72], também esperados por fazerem parte de grupos constituintes do material.

Na faixa espectral de 750 a 1300 cm^{-1} , observa-se os modos correspondentes aos estiramentos dos grupos CCO e estiramentos e flexões dos grupos COC [73], grupos também formadores do fármaco e observados em sua estrutura química. Observa-se a predominância de um pico em aproximadamente 1454 cm^{-1} , o qual é atribuído a estiramentos nos grupos éter (R-O-R') [72]. Por fim, a última banda observada na figura, corresponde aos estiramentos de grupos C=O e tem centro em cerca de 1720 cm^{-1} [74,75]. Todas as atribuições vão de encontro ao que é observado nas Figuras 1 e 2, que ilustram a estrutura química e o arranjo espacial da molécula de AZM, respectivamente.

O espectro Raman da região de 2700 a 3700 cm^{-1} obtido em temperatura ambiente é apresentado na Figura 16. É possível verificar bandas bem definidas na região de 2700 a 3050 cm^{-1} . Estas bandas são atribuídas aos modos vibracionais de grupos C-H, sendo que estes possuem predominância na molécula de AZM-DH, como observado nas Figuras 1 e 2[76].

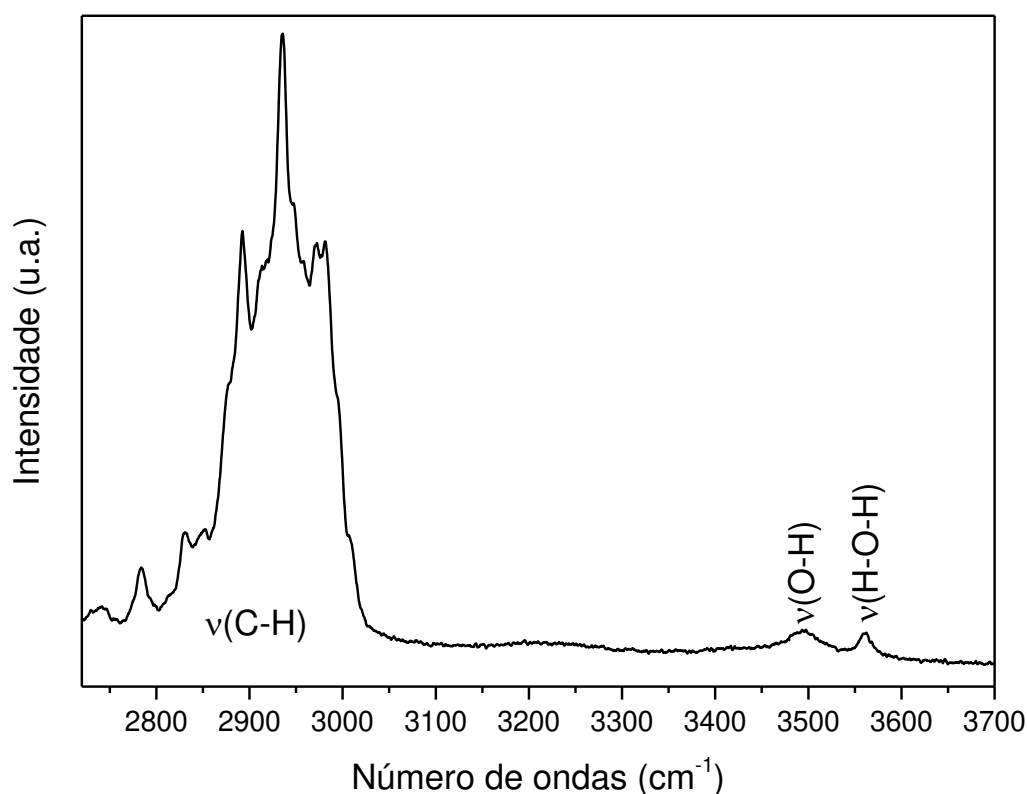


Figura 16 - Espectro Raman da azitromicina dihidratada na região de 2700 a 3700 cm^{-1} . ν : *stretching* (estiramento).

É possível identificar ainda duas bandas de menor intensidade nesta região, uma em 3494 e outra em 3558 cm^{-1} . Bandas em aproximadamente 3200 cm^{-1} , são comumente atribuídas a vibração de grupos NH_2 [41,43,64], porém na AZM-DH não ocorrem esses grupos funcionais, como observado nas Figuras 1 e 2. Segundo Horiba Jobin Yvon[77], bandas dispostas nessa faixa (3200 a 3600 cm^{-1}), também podem ser associadas a vibrações de moléculas de água presentes no material. Kotecha, Bhadra e Rajesh [75] ao estudarem formulações de AZM relatam que picos de FTIR em 3496 e 3558 cm^{-1} foram atribuídos a vibrações de moléculas de água. Assim, encontra-se que a banda em 3494 cm^{-1} indicam modos de estiramento da hidroxila da água, enquanto a banda em aproximadamente 3558 cm^{-1} é associada a estiramentos de grupos H-O-H. Resultados semelhantes foram

observados por estudos com outros materiais cristalinos hidratados [41,43,64,78]. Vale ressaltar, que devido a baixa intensidade dessas bandas e o nível de interferência encontrado algumas vezes nessa região, existem poucos trabalhos disponíveis com investigação desses modos por espectroscopia Raman. Na Tabela 3 estão reportadas as bandas encontradas no presente estudo e suas atribuições segundo a literatura.

Tabela 3- Modos ativos Raman do cristal de azitromicina dihidratada em temperatura ambiente, classificados conforme a literatura

Bandas (cm⁻¹) do experimento	Bandas (cm⁻¹) na literatura	Atribuições	Referências
199	199	$\delta(\text{CCC})$	[43]
262	263	$\delta(\text{CCC})$	[43]
373	370	$\delta(\text{OCC}) + \delta(\text{NCC})$	[43]
497	490	$\nu(\text{CC}) + \delta(\text{CCO}) + \nu(\text{CN})$	[41]
523	526	$\delta(\text{CC})$	[41]
582	594	$\nu(\text{CC})$	[43]
612	617	$\nu(\text{CNC})$	[72]
698	705	$\tau(\text{HCCC}) + \tau(\text{CCNC})^*$	[43]
774	782	$\delta(\text{COC})$	[43,73]
866	861	$\nu(\text{CCO})$	[73]
932	927	$\nu(\text{CC})$	[43]
953	954	$\nu(\text{CNC})$	[72]
1043	1045	$\nu(\text{CN})$	[43]
1122	1123	$\nu(\text{CN})$	[43]
1154	1149	$\delta(\text{C-H})$	[43,73]
1277	1283	$\nu(\text{CO})$	[72]
1352	1348	$\delta(\text{HCC}) + \tau(\text{HCCN})$	[43]
1450	1454	$\nu(\text{R-O-R}')$	[72]
1719	1714	$\nu(\text{C=O})$	[74,79]
2736 - 3007	2700 - 3100	$\nu(\text{C-H})$	[43,73,75,77]
3494	3496	$\nu(\text{OH})$	[75,77,79]
3558	3550	$\nu(\text{HOH})$	[41,75,77,79]

δ : *bending* (dobramento); ν : *stretching* (estiramento); τ : *torsion* (torção).

. Diante desses resultados, tem-se que a espectroscopia Raman é uma técnica com boa resolução, haja vista que os principais grupos estruturais do material, bem como a região

de modos de rede puderam ser analisados. Desta maneira, o emprego da temperatura em conjunto com essa técnica permite revelar as alterações sofridas nesses grupos que consequentemente podem corresponder a mudanças estruturais.

5.1.3. Caracterizações térmicas

5.1.3.1. Termogravimetria (TG), Termogravimetria derivativa (DTG) e Análise térmica diferencial (DTA) simultâneas

As curvas de TG, DTG e DTA são representadas na Figura 17. Para a curva TG tem-se dois eventos de perda de massa, o primeiro menos drástico que o segundo. Na curva DTG observa-se duas inflexões decrescentes, correspondentes aos eventos de perda de massa em TG, porém essas inflexões apresentam ombros, o que indica que mais de uma reação ocorre na amostra durante estas perdas. Na DTA, a curva tem comportamento semelhante ao da DTG, apresentando inflexões nas faixas de temperatura em que ocorrem os eventos em TG, entretanto a DTA apresenta picos exotérmicos nestas inflexões.

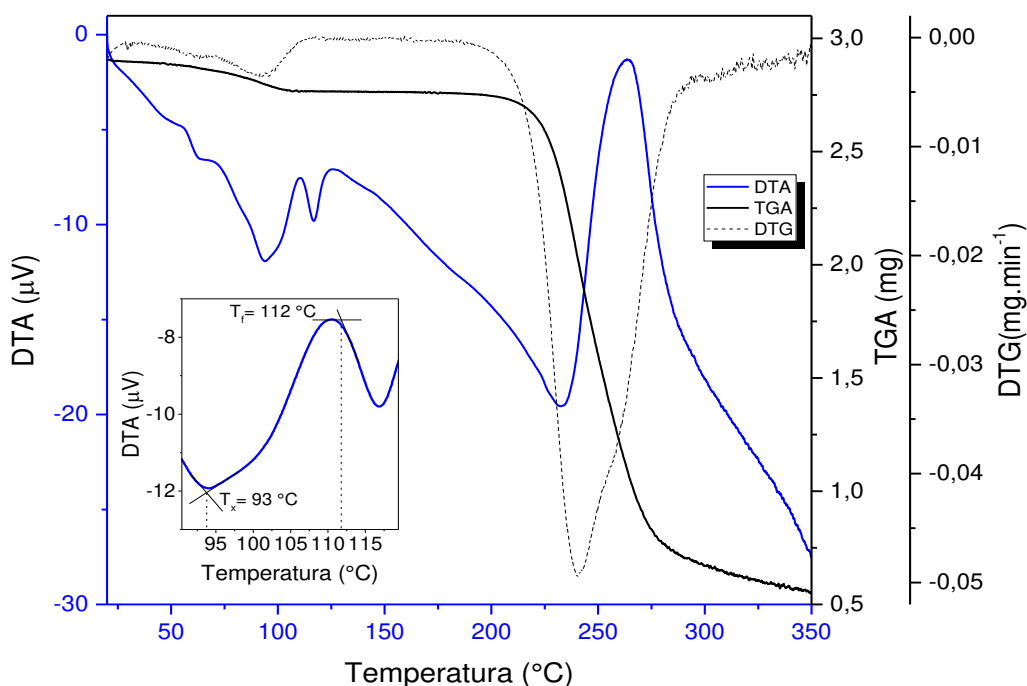


Figura 17 – Curvas de termogravimetria, termogravimetria derivativa e análise térmica diferencial da amostra de azitromicina dihidratada. T_x = Temperatura de cristalização; T_f = Temperatura de fusão.

Na curva de TG, inicialmente é possível observar um evento térmico indicando um decréscimo de massa, que inicia em cerca de 50 °C e finaliza em 105 °C, essa redução é de

aproximadamente 4% da massa inicial da amostra. Esta perda equivale a aproximadamente a massa estequiométrica da água encontrada na molécula e desta forma sugere-se a atribuição desta perda a saída das duas moléculas de água presentes no cristal (desidratação do material). Foi possível verificar um segundo evento de perda de massa na curva TG, com início em 190 °C, sendo esse na ordem de aproximadamente 74%, sendo atribuído a degradação do material.

Estudos de estabilidade térmica de comprimidos de AZM-DH foram realizados por Timoumi et. al.[19] e as curvas TG apresentadas assemelham-se às demonstradas nesse estudo, tendo como resultado da desidratação do material uma perda de massa de 4,38%. Os estudos de caracterização de comprimidos de AZM-DH realizados por Gandhi et al. [18] também vão de encontro aos do presente estudo, porém para comprimidos com AZM-MH a perda equivalente a desidratação foi de apenas 2,29%, enquanto para a AZM-DH foi de 4,58% Sundaramurthi e Suryanarayanan[17]. A Tabela 4 dispõe sobre os dados obtidos na análise de TG.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos pela análise de termogravimetria do material azitromicina dihidratada.

TG	Evento 1	Evento 2
Temperatura inicial	51,43 °C	188,84 °C
Temperatura final	104,64 °C	268,65 °C
Temperatura média	88,35 °C	247,59 °C
Perda de massa	0,156 mg	2,770 mg
Perda %	4,18	74,22

A curva DTG reforça os resultados obtidos em TG, apresentando dois eventos de perda de massa. O primeiro possui temperatura inicial em 52 °C e termina em aproximadamente 105 °C, correspondendo a desidratação do material. Esse evento possui duas inflexões, o que sugere que as moléculas de água saem da AZM-DH em diferentes patamares de temperatura e isso pode ser compreendido pelas diferentes forças de ligação de hidrogênio que atuam sobre essas moléculas. No segundo evento, o início dar-se-á em aproximadamente 190 °C e término em 285 °C. Possui um pico bem definido que apresenta um ombro indicando a ocorrência de dois eventos, sendo esses atribuídos a eventos de degradação do material, tais como oxidação, perda de voláteis e formação de gases.

Na curva de DTA podemos verificar, primeiramente, uma inflexão com um evento endotérmico, o qual apresenta pico máximo em 93°C. Essa inflexão apresenta um ombro bem definido, indicando a ocorrência de mais de uma reação neste evento. Tem-se como

sugestão sua atribuição a saída das duas moléculas de água da rede cristalina, isso pelo fato de ocorrerem na faixa da perda de massa referente a desidratação do material, observada na curva TG. A diferença nas temperaturas de ocorrência das reações, pode ser compreendida com base na Tabela 1.

Uma vez que uma molécula de água realiza cinco ligações de hidrogênio com a AZM e a outra realiza somente quatro, além de estarem ligadas entre si, pressupõe-se, que por possuírem quantidades de ligações diferentes, suas forças de ligação são diferentes e isso acarreta em temperaturas de saída diferentes, porém muito próximas. Outra explicação seria a sobreposição de um evento que indique transformação de fase no material, ocasionada pela desidratação do mesmo.

O segundo evento observado corresponde a um pico exotérmico, que se inicia ao término do evento de desidratação do material. Esse evento pode ser atribuído a uma reação de recristalização ocasionada com a desidratação do material. Essa nova cristalização corresponde a uma forma anidra do material, a qual não foi estabelecida na literatura.

Em seguida a curva DTA apresenta mais um evento endotérmico com pico em 116 °C, para a curva TG nada é observado nessa posição, o que indica um evento característico de fusão do material. Tem-se ainda, um pico endotérmico e um exotérmico com centros em aproximadamente 233 e 266 °C, respectivamente. Esses eventos se encontram em faixa de temperatura semelhante a encontrada em TG e em DTG para a degradação do material. Assim, os eventos podem ser atribuídos a processos de degradação, como a formação de amônia e liberação de CO₂. Na Tabela 5, são dispostos os dados e atribuições obtidos com a DTA.

Tabela 5 - Parâmetros obtidos pela análise térmica diferencial do material azitromicina dihidratada.

DTA	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 4	Evento 5
Temp. inicial	56,38 °C	93,88 °C	111,80 °C	220,38 °C	238,39 °C
Temp. final	110,59 °C	115,86 °C	121,89 °C	253,18 °C	281,01 °C
Temp. de pico	92,33 °C	110,55 °C	116,88 °C	232,36 °C	263,51 °C
Calor de reação	-1,15 J	328,75 mJ	-172,26 mJ	-3,57 J	6,00 J
Calor equivalente	-395,50 J/g	113,09 J/g	-59,26 J/g	-1,23 kJ/g	2,06 kJ/g
Atribuição	Desidrat.	Cristaliz.	Fusão	Voláteis	Oxidação

Gandhi et al.[18] relatam em seus estudos de secagem de comprimidos de AZM-DH curvas para DTA, que apresentam apenas um evento endotérmico, o qual foi atribuído pelos autores à ocorrência simultânea da desidratação e da fusão do material em cerca de 120 °C.

Eles atribuem esse fenômeno, ao emprego de uma taxa de aquecimento elevada ($10^{\circ} \text{ min}^{-1}$) e ao fato de utilizarem o recipiente do experimento aberto. Sundaramurthi e Suryanarayanan[17] ao realizarem medidas de DSC em amostras de AZM-DH, observaram um pico endotérmico referente a fusão do material, com mínimo em cerca de 120° C .

5.1.3.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise da AZM-DH por DSC é apresentada na Figura 18. Deste modo, foi possível observar uma larga inflexão endotérmica com mínimo em aproximadamente 95° C , a qual apresenta um ombro, semelhante ao encontrado na DTA, que indica a ocorrência de duas reações e foram tratados como o primeiro e segundo eventos. A faixa de temperatura é correspondente a desidratação do material, essas reações podem ser atribuídas à saída das duas moléculas de água de hidratação da amostra e a possíveis transformações de fase do material, tal qual na análise de DTA. Há uma diferença de valores entre DTA e DSC, que pode ser atribuída a diferença de massa da amostra, de equipamentos e de cadinhos utilizados nas medidas, uma vez que os demais parâmetros experimentais foram semelhantes.

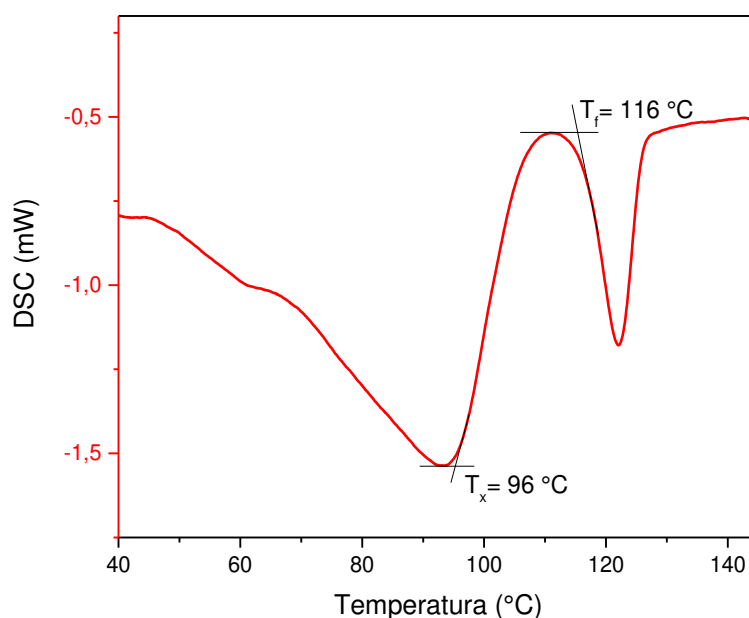


Figura 18 - Curva DSC da amostra de azitromicina dihidratada. T_x = Temperatura de cristalização; T_f = Temperatura de fusão.

O terceiro evento observado na curva de DSC, corresponde a um pico exotérmico com temperatura inicial, ou temperatura de cristalização (T_x), em $\sim 96^{\circ} \text{ C}$. Como visto na

Figura 8, picos com esse perfil podem ser atribuídos a eventos de cristalização ou, como no caso, recristalização do material em análise. Esse resultado corrobora com o que apresentou a DTA, que permitiu a constatação de uma nova fase cristalina formada após a desidratação do material. Assim como na DTA, imediatamente após a recristalização é possível verificar um evento endotérmico com pico centrado em 121°C, o qual se atribui a fusão do fármaco. Na Tabela 6 são apresentados os resultados obtidos por meio da análise de DSC.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos pela análise de DSC do material azitromicina dihidratada

DSC	Evento 1	Evento 2	Evento 3	Evento 4
Temp. inicial	44,87 °C	67,12°C	96,30 °C	116,43 °C
Temp. final	67,24 °C	105,69 °C	121,33 °C	125,98 °C
Temp. de pico	61,11 °C	93,50 °C	110,81 °C	122,17 °C
Calor de reação	-146, 72 mJ	-379,58 mJ	177,21 mJ	-52,97 mJ
Calor equivalente	-102,00 J/g	-164,32 J/g	76,71 J/g	-22,93 J/g
Atribuição	Desidratação	Desidratação	Cristalização	Fusão

Em sua patente de novas formas cristalinas da AZM, Zheng e Andrew [12] atribuíram a fusão da AZM-DH a uma faixa de 119 a 126 °C. Ghandi et. al. [18] atribuiu à fusão do dihidratado de AZM, ao pico de DSC com mínimo em 126 °C. Os resultados de Timoumi et. al. [19] para formulações de fármacos contendo AZM-DH também foram de encontro aos apresentados nesse estudo com temperatura de pico de fusão em 120 °C. Sundaramurthi e Suryanarayanan[17] estudando hidratos de AZM também obtiveram resultados de DSC semelhantes aos apresentados por esse trabalho, encontrando um pico endotérmico de fusão para a AZM-DH em 124 °C. Os trabalhos relatados não explicaram a aparição do pico exotérmico em suas análises.

5.2. Caracterizações espectroscópicas em função da temperatura

5.2.1. Difração de Raios-X do pó (DRXP) em função da temperatura

Partindo dos resultados das análises térmicas foi possível traçar e realizar, um estudo de difração de Raios-X em função da temperatura. O intuito deste estudo foi de observar o comportamento dos picos de Bragg e compreender, estruturalmente, o que ocorre com o material ao ser submetido ao aquecimento, verificando possíveis transições (ou

transformações) de fase, indicadas de maneira não conclusiva pelas análises térmicas. A Figura 19 ilustra os difratogramas obtidos por meio da DRXP em função da temperatura.

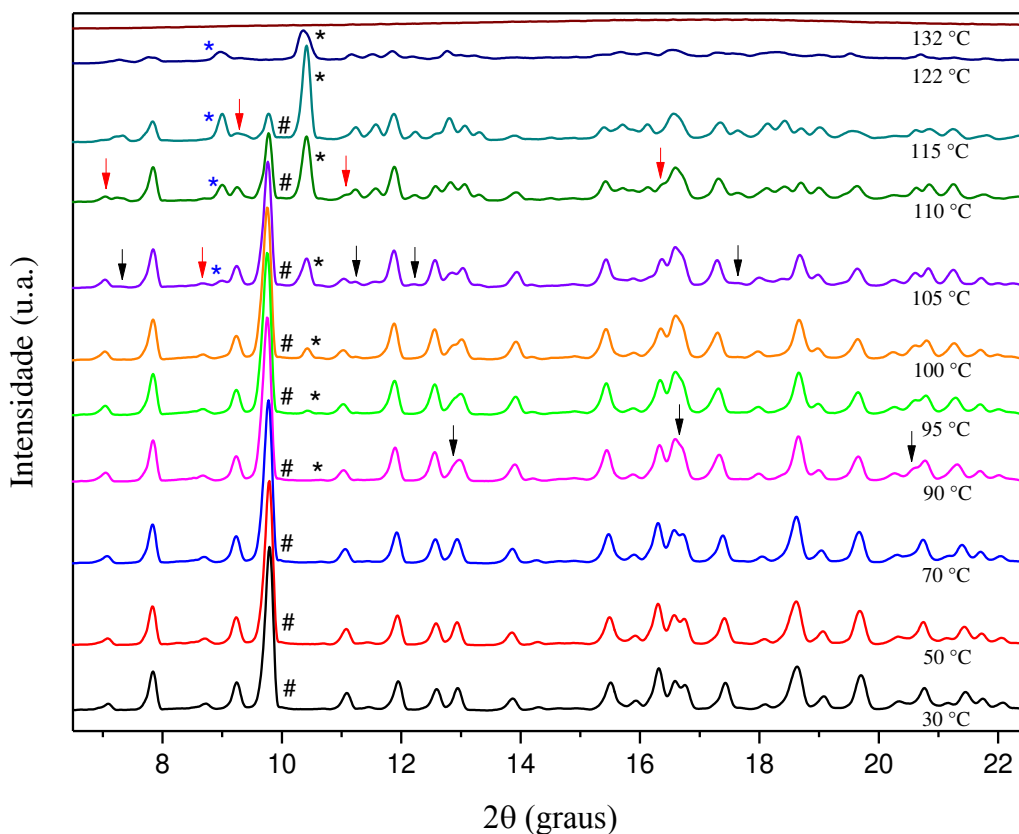


Figura 19 - Curvas de difração de Raios-X da azitromicina dihidratada em função da temperatura. (#) Pico em $9,7^\circ$ (2θ) referente ao plano (2 0 0) da fase AZM-DH. (*) Pico em $10,4^\circ$ (2θ) referente a formação de nova fase. (*) Pico em $8,9^\circ$ (2θ) atribuído a nova fase. (↓) Aparição de novo pico. (↑) Desaparecimento de picos.

Observando os espectros de DRXP em função da temperatura é possível verificar que não ocorrem alterações significativas nas curvas até 70°C , entretanto para as análises térmicas alterações já são percebidas antes dessa temperatura. A partir de 90°C , pode-se notar pequenas alterações no difratograma, como uma maior sobreposição dos picos em aproximadamente $16,5$ e $16,7^\circ$ (2θ) e o alargamento do pico próximo a $12,9^\circ$ (2θ). Já na temperatura de 95°C , além das alterações observadas na temperatura anterior, é perceptível o aparecimento de um novo pico no difratograma em aproximadamente $10,4^\circ$ (2θ).

Sundaramurthi e Suryanarayanan[17], ao verificarem os padrões de DRXP de medicamentos de AZM em função da temperatura, relataram que a AZM-DH ao sofrer aquecimento $\geq 80^\circ\text{C}$ tende a formar um pico em aproximadamente $10,4^\circ$ (2θ), conferido a formação da fase AZM-SH. Essa diferença na temperatura de aparecimento do pico em

questão pode ser atribuída a utilização de equipamentos distintos para as medidas de DRXP e à taxa de aquecimento, uma vez que este trabalho utilizou 5°C/min. enquanto que os autores citados empregaram 10°C/min.

Observa-se que conforme a temperatura é elevada até 115°C a intensidade do pico em 10,4° (2 θ), também aumenta, enquanto que, a intensidade do pico em aproximadamente 9,7° (2 θ) tende a diminuir com o aquecimento, sendo esse último, representante do plano (200) da AZM-DH. Algo semelhante acontece com os picos em aproximadamente 8,9 e 9,2° (2 θ), o primeiro aparece inicialmente em 95°C como um ombro do segundo pico mencionado. À medida que a temperatura aumenta de 95°C até 115°C a intensidade em 8,9° (2 θ) aumenta enquanto que em 9,2° (2 θ) diminui. Isso indica que ocorrem mudanças estruturais na AZM-DH conforme a temperatura de desidratação da mesma é atingida.

Mais uma vez, Sundaramurthi e Suryanarayanan [17], observaram algo relativamente semelhante, porém os autores atribuíram as mudanças principalmente a transformação de AZM-DH para AZM-SH, entretanto não apresentaram cálculos ou dados comprobatórios desta afirmativa. Desta maneira, ao observar que os picos da nova fase se encontram mais intensos no difratograma obtido em 117,5°C, este foi escolhido para análise através do método de Le Bail. O refinamento pelo método de Le Bail é representado na Figura 20.

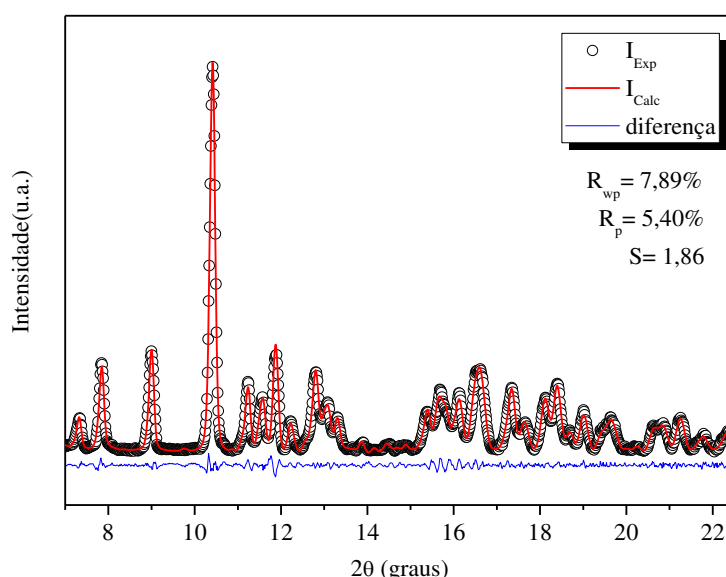


Figura 20 - Difratograma com o refinamento pelo método de Le Bail da DRXP para 117,5 °C do fármaco, atribuído a nova fase.

É possível observar que os parâmetros de controle (R_{wp} , R_p e S) se encontram dentro dos limites de aceitação e confiabilidade, bem como a concordância visual. Os dados cristalográficos da fase encontrada em 117,5 °C se encontram dispostos na Tabela 7 e são comparados com os dados descritos por Zheng e Andrew [12] para a fase sesqui-hidratada da AZM.

Tabela 7- Dados cristalográficos da nova fase encontrada comparados à azitromicina sesqui-hidratada.

Fórmula Molecular	Nova fase de azitromicina $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	Azitromicina sesqui-hidratada $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 1,5 H_2O$
Parâmetros da célula unitária	A partir da DRXP	Zheng e Andrew [12]
	$a = 18.166(4) \text{ \AA}$	$a = 16.406(8) \text{ \AA}$
	$b = 21.067(3) \text{ \AA}$	$b = 16.292(8) \text{ \AA}$
	$c = 14.532(3) \text{ \AA}$	$c = 18.383(9) \text{ \AA}$
Volume da célula	$V = 5190.924(2)$	$V = 4420,376(4)$
Sistema	Triclínico ($\alpha = 93,66^\circ$; $\beta = 90,75^\circ$; $\gamma = 110,63^\circ$)	Monoclínico ($\alpha = \gamma \neq \beta = 110.212^\circ(2)$)
Grupo espacial	P-1	$P2_1$

Nota-se que os parâmetros de rede, bem como o volume da célula unitária, o sistema cristalográfico e o grupo espacial encontrados para a nova fase, não correspondem aos dados descritos para a fase sesqui-hidratada. Com isso, tem-se que a nova fase não corresponde a forma sesqui-hidratada da AZM e sim a uma nova fase cristalina de sistema triclínico, sintetizada a partir da desidratação da AZM-DH.

Na Figura 21 é possível observar o processo de amorfização do material a partir de 122°C. Isto significa dizer, que após essa temperatura, o material começa a perder sua estrutura cristalina e começa a assumir uma desordem molecular semelhante à de um líquido. Esta característica é própria de materiais amorfos.

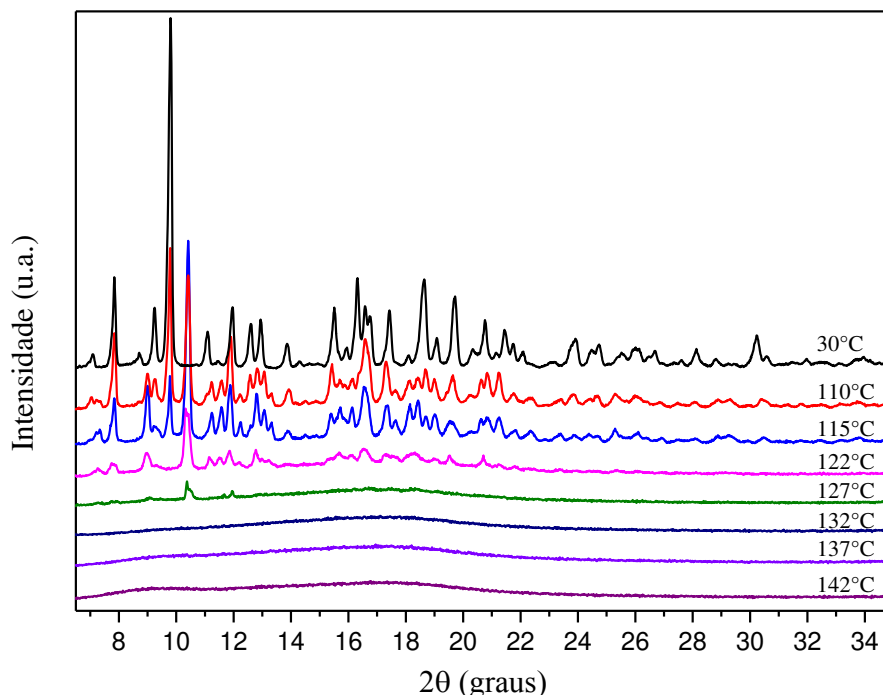


Figura 21 - Difratomogramas da AZM-DH em função da temperatura.

Desta maneira com o aumento da temperatura os picos perdem intensidade, pois seus planos cristalográficos começam a desordenar, gerando alargamento nos picos de Bragg e/ou sobreposição dos mesmos e isso acaba por formar inflexões no difratograma. A passagem da fase anidra cristalina da AZM para a sua fase amorfa pode ser caracterizada como um polimorfismo do material, uma vez que há uma transição de fase e que a faixa de temperatura dessa transição não apresenta eventos na curva TG.

Esse fenômeno se completa em aproximadamente 132 °C. Contudo, somente em 142 °C o difratograma obtido assemelha-se ao relatado por Zheng e Andrew [12] ao patentear várias formas cristalinas da AZM incluindo a forma amorfa da AZM, que segundo os mesmos diz respeito ao AZM amorfo. Além desses, Ghandi et. al. [18], em seus estudos com comprimidos de AZM-DH e AZM-MH, relata que com o aquecimento até a desidratação do material o mesmo, em ambas as formulações torna-se amorfo, podendo ainda, em contato com elevada umidade, retornar a fase dihidratada do fármaco. Timoumi et. al. [19] ao estudarem o efeito da temperatura sobre comprimidos de AZM-DH, descreve também a passagem da fase dihidrata para a fase amorfa após a desidratação dos comprimidos. Sundaramurthi e Suryanarayanan [17] obtiveram difratogramas semelhantes aos do presente estudo para produtos originados após a secagem de hidratos de AZM, em que houve a

passagem das fases hidratadas para a fase amorfa. Em todos estes trabalhos, essas curvas foram atribuídas a fase formada após a perda da água estrutural da AZM-DH, ou seja, à forma anidra do fármaco.

5.2.2. *Espectroscopia Raman*

Neste tópico serão apresentados os espectrogramas Raman para as regiões de 20 a 3700cm^{-1} obtidos para a amostra de AZM-DH em função da temperatura. É importante ressaltar que a região de principal interesse para a espectroscopia Raman durante muito tempo foram os modos vibracionais compreendidos na faixa de 400 a 4000cm^{-1} , que diz respeito aos modos vibracionais internos dos materiais, isso pelo fato de que abaixo dessa região se tornava difícil filtrar a interferência do efeito elástico (efeito Rayleigh)[62,80].

Contudo, a região que corresponde a números de onda principalmente abaixo de 200cm^{-1} , vem sendo intensivamente estudada atualmente, pois com a modernização de técnicas e equipamentos, o efeito elástico vem sendo filtrado com eficiência permitindo medidas precisas na região em que atuam os modos vibracionais externos, os quais dizem respeito a vibração da estrutura de rede dos materiais. Assim, alterações na região desses modos pode indicar alteração nas ligações que formam a rede cristalina do material, as quais, para esse caso, são em grande parte ligações de hidrogênio[42,60,68,81].

5.2.2.1. *Região de 20 a 750cm^{-1}*

As curvas correspondentes aos espectros Raman obtidos em função da temperatura para a amostra de AZM-DH, compreendendo a região tendo número de onda entre 20 e 250cm^{-1} na faixa de temperatura de 27 a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, mais a medida de retorno a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, são apresentadas na Figura 22. Essa faixa espectral compreende também a região característica dos modos de rede. Assim, alterações nesta região significam alterações ocorridas na rede cristalina do material analisado [80].

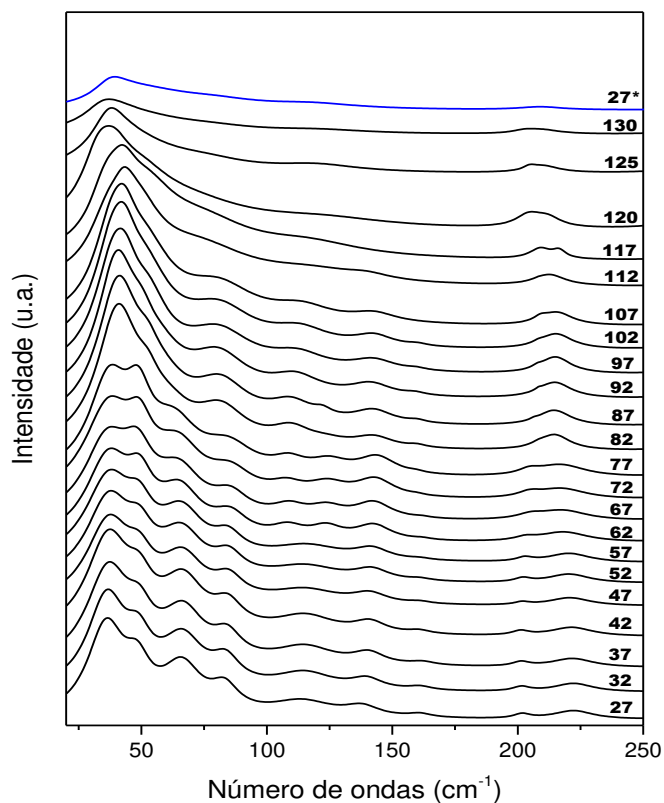


Figura 22 - Espectros Raman em função da temperatura para a azitromicina dihidratada na região de 20 a 250 cm^{-1} .

Desta maneira, analisando os espectros na região dos modos de rede, números de onda abaixo 250 cm^{-1} , verifica-se que até a temperatura de 57°C não ocorrem alterações significativas, ficando estas modificações, restritas principalmente, a diminuição na intensidade dos modos. Esse comportamento indica que a amostra é estável até essa temperatura, ou seja, sua rede cristalina permanece inalterada até essa faixa. Essa temperatura é próxima das temperaturas encontradas nas caracterizações térmicas para o início dos eventos térmicos.

Contudo, a partir do espectro de 77°C é possível verificar alterações mais relevantes, como a fusão do duplete com centros em aproximadamente 201 e 222 cm^{-1} , que se completa em 82°C , formando um singlete em aproximadamente 214 cm^{-1} . Outra modificação nas curvas para essa região dos modos externos, diz respeito a alteração do duplete com centros em aproximadamente 38 e 48 cm^{-1} , que se mantém até cerca de 77°C e se modifica de maneira mais pronunciada a partir de 82°C , com a sobreposição dessas bandas em um singlete com centro em aproximadamente 41 cm^{-1} .

Essas mudanças espectrais na região dos modos externos significam que possíveis modificações estruturais ocorrem no material nessas faixas de temperatura correspondentes. Vale ressaltar, que para as temperaturas acima de 120 °C observa-se uma grande queda na intensidade dos modos bem como o alargamento das bandas, sendo esse comportamento repetido na curva de retorno à temperatura ambiente. O comportamento de alargamento e queda de intensidade é descrito para materiais de morfologia amorfa[34,68]. Este resultado vai de encontro ao que se obteve na DRXP em função da temperatura, em que se observa a amorfização do material após atingir a temperatura de 122 °C

Para a Figura 23, tem-se os espectros de 250 a 600 cm^{-1} e ocorrem as regiões correspondentes aos modos internos do material, que são formados pelas interações entre os átomos da molécula e suas nuvens eletrônicas. Assim, para a região de 250 a 400 cm^{-1} tem-se a atribuição aos modos de flexão dos grupos C-C de cadeias alifáticas. Para a região acima de 400 até 600 cm^{-1} são atribuídos os modos de estiramento dos grupos CCN e CCO [72]. O comportamento relativamente estável até cerca de 70 °C continua a ser observado nessa região dos espectros, sendo a maioria das mudanças, observadas a partir de 82 °C, se acentuam em 97 °C, permanecem até 112°C. Após os 117 °C as intensidades caem e as diferenças, mais uma vez, são mantidas na curva de retorno a 27 °C.

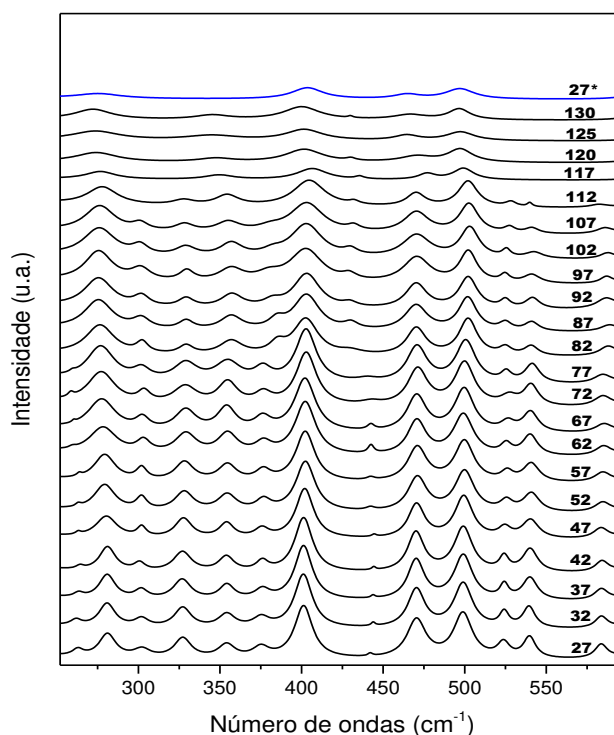


Figura 23 - Espectros Raman em função da temperatura para a AZM-DH na região de 250 a 600 cm^{-1} .

Na Figura 24 tem-se os resultados da análise do comportamento do número de onda em função da temperatura na região de 20 a 620 cm^{-1} . É possível verificar a estabilidade térmica dos modos até cerca de 77 °C, observando a linearidade dos pontos obtidos até essa temperatura. Essa temperatura é próxima das faixas de temperatura referentes aos eventos de desidratação em TG, DTG, DTA e DSC, bem como à faixa de temperatura em que se observou a aparição do pico em $10,4^\circ (2\theta)$, na análise de DRXP em função da temperatura.

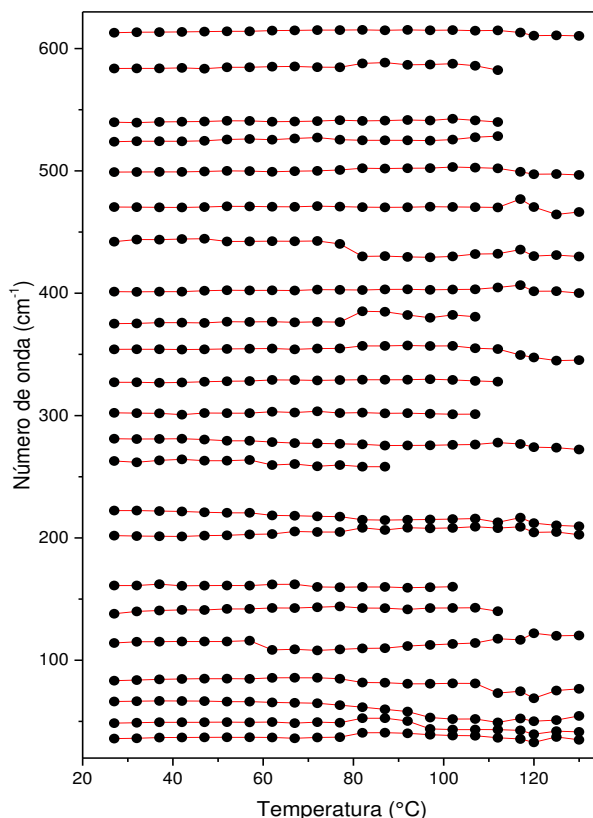


Figura 24 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 20 e 650 cm^{-1} .

Fica evidenciado a fusão do duplete com centros em aproximadamente 201 e 222 cm^{-1} , bem como do duplete 38 e 48 cm^{-1} . Esse comportamento ocorre dentro da faixa atribuída aos modos vibracionais da rede estrutural do material. Desta maneira, é possível relacionar as alterações com a transformação de fase do material, uma vez que, como observado na DRXP, essa mudança provavelmente acontece partindo da desidratação da AZM-DH. As demais modificações, apesar de não esclarecidas, podem ser explicadas por meio de transformações de fases que modificam as interações moleculares (ligações de hidrogênio) provocadas pela variação de temperatura.

Essas mudanças reforçam os resultados obtidos nas análises térmicas e na análise de DRXP, que demonstram estabilidade térmica do material até as temperaturas de início da desidratação do material. A partir da desidratação da AZM, ocorrem transformações de fase no material indicadas na DRXP e que são percebidas nestas alterações dos modos vibracionais da rede do material e nas mudanças sofridas também pelos modos internos da AZM. Isso indica que a espectroscopia Raman corrobora com a sugestão de mudança de fase do material, a partir da desidratação do material e que ocorre também a passagem do cristal para seu estado amorfo.

5.2.2.2. Região de 750 a 1300 cm^{-1}

Na Figura 25 estão representados os espectros Raman da AZM-DH em função da temperatura, os quais compreendem a faixa espectral de 600 a 1150 cm^{-1} e faixa de temperatura de 27 a 130 °C, mais a medida de retorno a 27 °C. Essa região foi atribuída principalmente aos modos internos correspondentes aos estiramentos dos grupos CCO e estiramentos e flexões dos grupos COC[73]. Assim como na Figura 23 verifica-se a estabilidade térmica da amostra até 77°C.

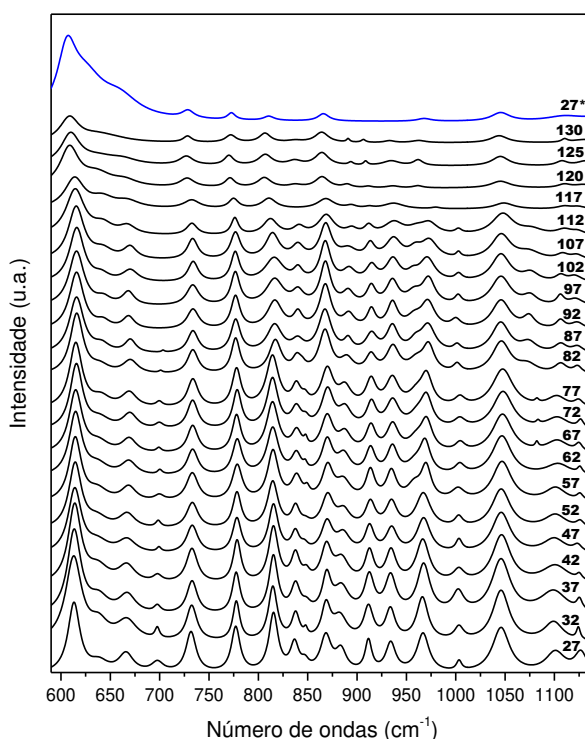


Figura 25 - Espectros Raman em função da temperatura para a AZM-DH na região de 600 a 1150 cm^{-1} .

No entanto, a partir de 82 °C, ocorrem algumas alterações nesses modos vibracionais que se mantêm até 112 °C, perdem intensidade até em 130 °C e são mantidas no espectro de resfriamento a 27 °C. Essas alterações dizem respeito principalmente a perda de intensidade das bandas Raman, além de alguns *upshift* (mudanças do centro da banda para números de onda maiores) como ocorre no ombro da banda em aproximadamente 861 cm⁻¹, atribuída a vibrações do tipo $\nu(\text{CCO})$, que se separa formando uma banda independente centrada em aproximadamente 880 cm⁻¹.

Para tais modificações atribui-se mudanças na rede de ligações de hidrogênio entre os grupos afetados. Com isso, tem-se que o conjunto de modos dispostos nesta região também sofre modificação com a desidratação e reforça o resultado de DRXP em função da temperatura, indicando possível mudança de fase após a saída da água da célula unitária da AZM. Além disso, o caráter de amorfização do material também é percebido nesta região.

O comportamento dos números de onda em função da temperatura para a região entre 600 e 1150 cm⁻¹, é apresentado na Figura 26. Observa-se comportamento semelhante ao da Figura 22, em que os modos mantêm estabilidade até cerca de 87 °C, faixa de desidratação do material e transformação de fase. Algumas alterações a partir de 90 °C são observadas, porém suas atribuições não puderam ser reportadas com precisão, estas são verificadas em 987, 1097 cm⁻¹. O modo em 1122 atribuído a vibração $\nu(\text{C-N})$ apresenta mudança de perfil do tipo *upshift* a partir de 112 °C, sendo o comportamento também observado após o resfriamento do material, caracterizando essas mudanças como irreversíveis.

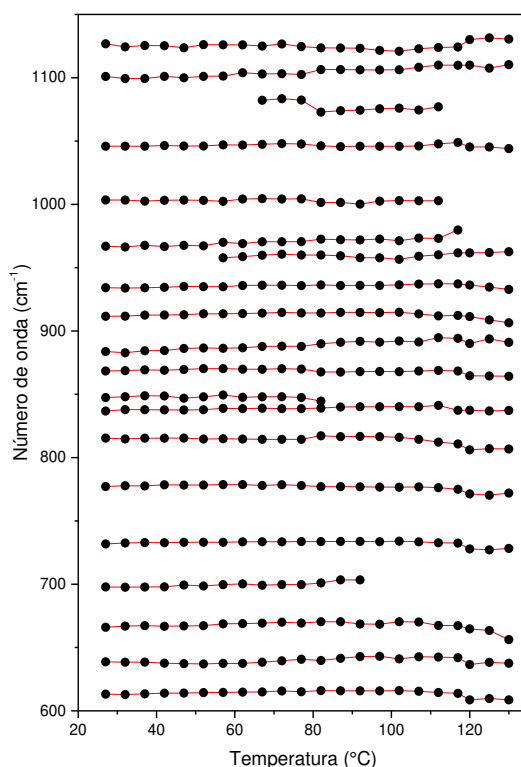


Figura 26- Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 600 e 1150 cm^{-1} .

Após a análise do comportamento da frequência dos modos, fica evidente que, mais uma vez, as modificações iniciam a partir da temperatura de desidratação percebidas nas caracterizações térmicas. Essa faixa de temperatura também condiz com as mudanças percebidas na análise de DRXP e que sugerem a mudança de fase do material. Assim, a espectroscopia Raman indica que as ligações e forças moleculares sofrem abalo e modificações com a desidratação do material e que após 120 °C o material sofre também amorfização.

5.2.2.3. Região de 1150 a 1600 cm^{-1}

A região cujos espectros Raman compreendem a faixa de 1150 a 1600 cm^{-1} , medidos para a amostra de AZM-DH em função da temperatura cuja a faixa foi de 27 a 130 °C, apresentando também o espectro de resfriamento a 27 °C, é ilustrada na Figura 27. Observa-se a predominância de um pico em aproximadamente 1461 cm^{-1} , o qual é atribuído a estiramentos nos grupos éter [72]. Mais uma vez, o comportamento é estável até cerca de 77 °C.

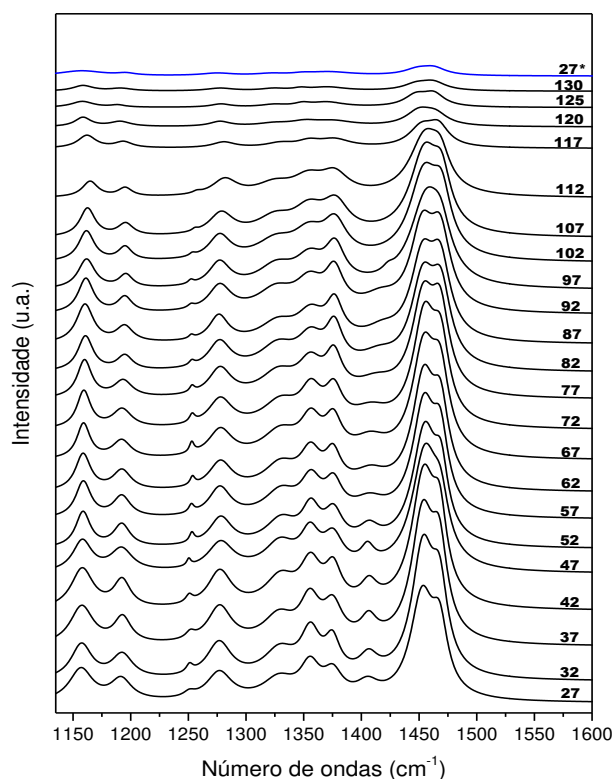


Figura 27 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 1120 a 1600 cm^{-1} .

Entretanto, para temperaturas acima de 82 °C percebe-se modificações nessa região, principalmente no que diz respeito a intensidade das bandas Raman. É possível observar uma troca de predominância de intensidade no duplete em 1461 cm^{-1} .

Na Figura 28 é possível analisar o comportamento dos números de onda em função da temperatura. Mais uma vez é observado a estabilidade dos modos até os 77 °C e após isso o material sofre algumas modificações mais sutis até atingir 112 °C e após isso experimentar novas modificações nos modos que pode ser atribuída a desidratação e com base na DRXP, na formação do novo cristal a partir de 117 °C.

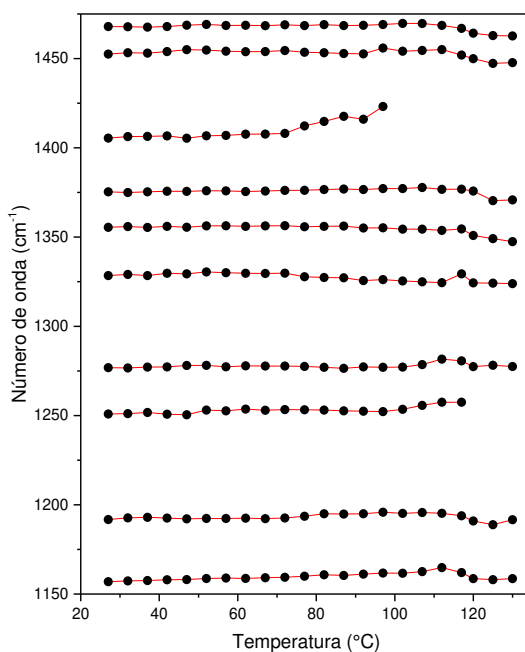


Figura 28 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 1150 e 1500 cm^{-1} .

5.2.2.4. Região de 1600 a 2000 cm^{-1}

Podemos observar na Figura 29, que corresponde a faixa espectral de 1650 a 2000 cm^{-1} , uma mudança peculiar ocorre com a banda centrada em 1721 cm^{-1} , pois para a medida tomada a 77 °C é possível verificar a dissolução dessa banda e o aparecimento de duas novas bandas em aproximadamente 1713 e 1747 cm^{-1} . Para essas bandas foram atribuídos os modos de estiramento C=O e esse comportamento também foi observado por Miroshnyk et al.[74], ao estudarem a indução térmica de mudanças de fase na eritromicina A, sendo tais modificações relacionadas à alteração do grau de liberdade do grupo carbonila durante a desidratação da amostra, já que este grupo faz ligações de hidrogênio com as moléculas de água que formam a rede do material.

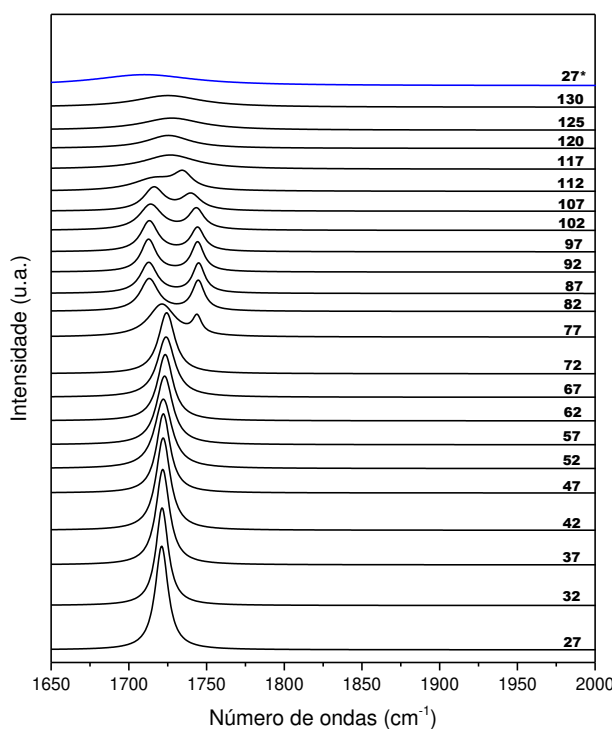


Figura 29 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 1650 a 2000 cm^{-1} .

Analisando os perfis de número de onda dos modos da região de 1650 a 2000 cm^{-1} foi possível construir o gráfico apresentado na Figura 30. Constata-se comportamento semelhante ao das demais regiões, tendo estabilidade até 77 °C. A banda em 1714 cm^{-1} é relacionada a modos vibracionais do tipo $\nu(\text{C}=\text{O})$, verifica-se a divisão da mesma após a temperatura de 82 °C. Com base na Tabela 1 e na Figura 4 é possível atribuir essas modificações às modificações nas ligações de hidrogênio entre a água e o fármaco, decorrentes da desidratação do mesmo.

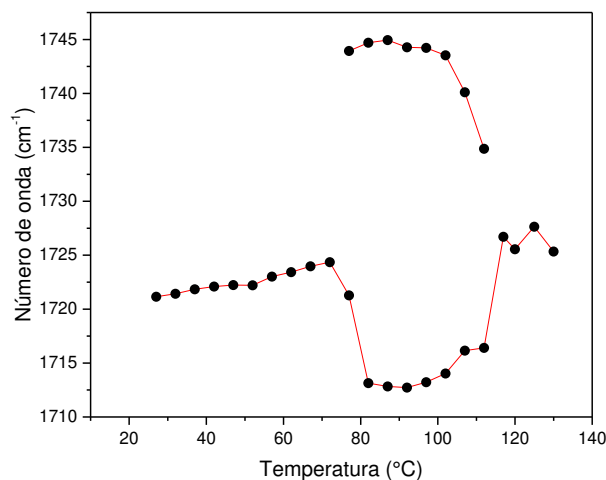


Figura 30 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 1650 a 2000 cm^{-1} .

O comportamento da frequência dos modos vibracionais, sugerem que o mesmo comportamento analisado por Miroshnyk et al.[74] para a eritromicina dihidratada, ocorre com a AZM-DH. Este resultado reforça a sugestão de que as modificações percebidas na DRXP e nos modos Raman estejam relacionadas a desidratação do material. Assim, a região analisada também indica que há modificações no material após sua desidratação e que o mesmo sofre amorfização a partir de 120 °C.

5.2.2.5. Região de 2700 a 3100 cm^{-1}

Para a região entre 2700 a 3100 cm^{-1} tem-se a Figura 31, que representa os espectros dessa região em função da temperatura. Essa faixa de números de onda compreende principalmente os modos correspondentes a vibração de estiramentos de grupos C-H[77].

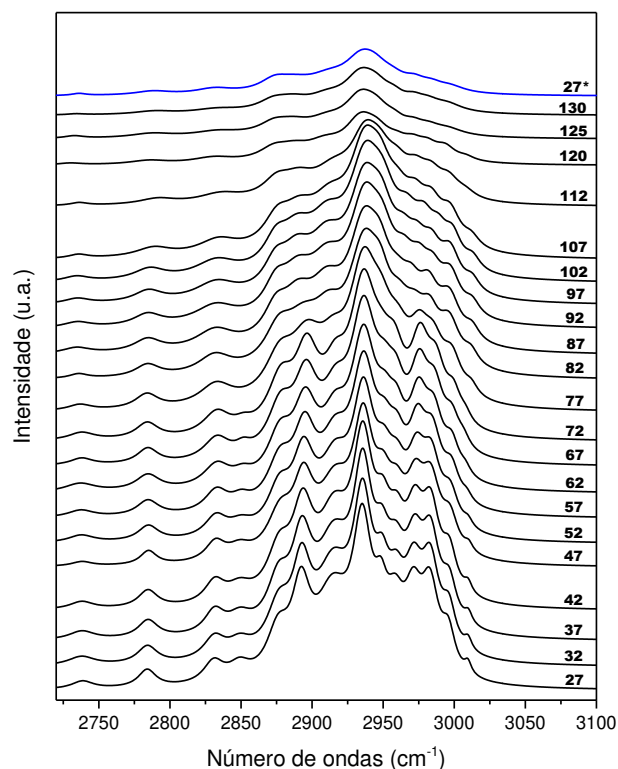


Figura 31 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 2700 a 3100 cm^{-1} .

Observando a Figura 31 é difícil distinguir as alterações decorrentes do aquecimento com clareza. Desta maneira, analisar o perfil de comportamento dos modos se torna mais eficiente para a análise. A Figura 32 ilustra o comportamento dos números de onda em função da temperatura. Assim, é possível observar novamente a estabilidade dos modos até 77 °C (faixa de desidratação), sendo verificado principalmente, eventos de *downshift* em cerca de 2827, 2846 e em 2968 cm^{-1} . Mais uma vez, é possível atribuir essas modificações aos distúrbios na rede ocasionados pela desidratação do fármaco. Essas modificações provocam alterações nas ligações de hidrogênio entre a água e grupos metil, favorecendo as ligações metil-metil.

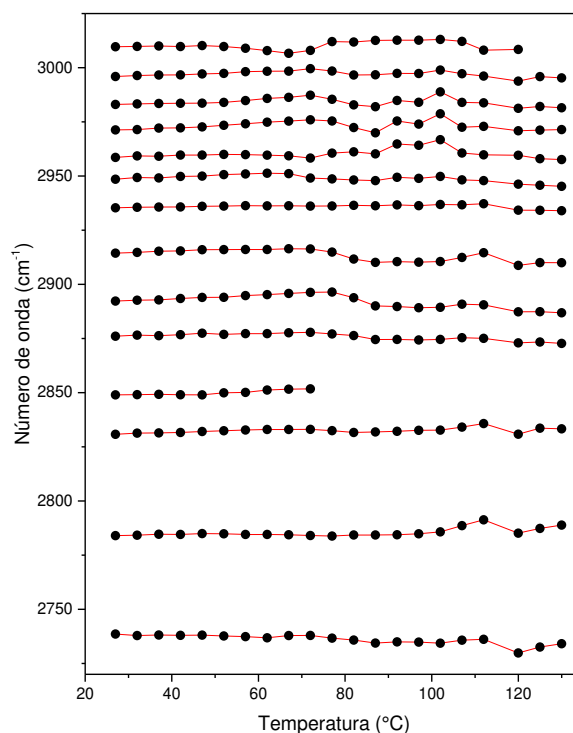


Figura 32 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 2700 e 3100 cm^{-1} .

A análise dos modos vibracionais, bem como do comportamento de suas frequências, remete às mesmas condições observadas nas demais regiões analisadas até aqui. O material sofre modificações em seus modos a partir da faixa de temperatura de desidratação observada nas caracterizações térmicas. Essas mudanças também ocorrem na faixa de transformação de fase observada na DRXP em função da temperatura e indicam também a amorfização após os 120°C.

5.2.2.6. Região de 3140 a 3525 cm^{-1}

Os espectros Raman em função da temperatura da amostra de AZM-DH, medidos no intervalo espectral de 3400 a 3625 cm^{-1} e na faixa de temperatura de 27 a 130 °C mais seu retorno a 27 °C, são apresentados na Figura 33. Essa região, que compreende a faixa espectral de 3100 a 3600 cm^{-1} , é geralmente atribuída, em compostos orgânicos, a vibrações fracas características de moléculas de água presentes na amostra[77,82]. Assim, analisando o comportamento dessa região é possível perceber características de desidratação e/ou hidratação de materiais.

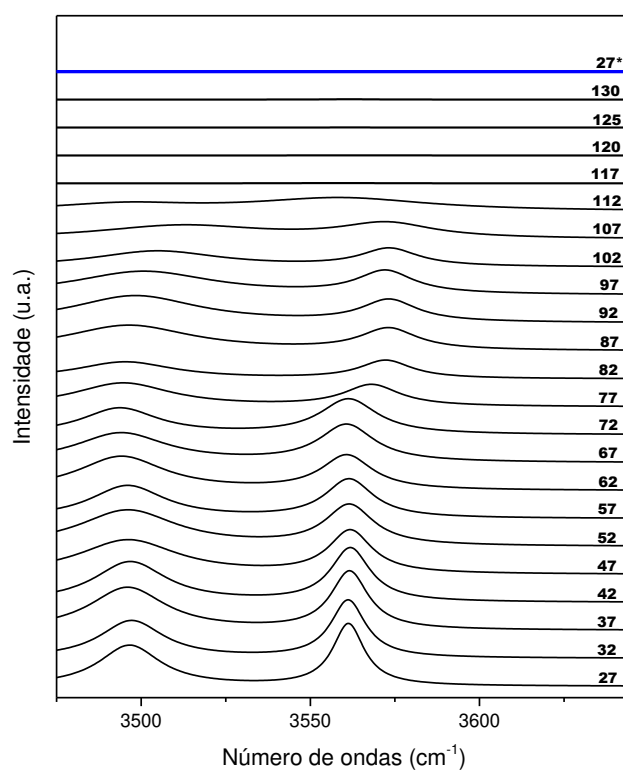


Figura 33 - Espectros Raman em função da temperatura da AZM-DH na região de 3140 a 3525 cm^{-1} .

Desta maneira, analisando a Figura 33, verifica-se, em temperatura ambiente, duas bandas pronunciadas em aproximadamente 3494 e 3558 cm^{-1} . A essas foram atribuídos, respectivamente, modos de estiramento assimétrico e de estiramento simétrico de grupos OH da água [82]. Mais uma vez nota-se um comportamento estável para os espectros até a temperatura de 72 °C.

Para as temperaturas de 77 °C em diante, a principal alteração notada em relação ao espectro de temperatura ambiente ocorre perda de intensidade. Essa mudança espectral é atribuída a possíveis alterações de ligações de hidrogênio entre grupos OH da água. Para a curva obtida à temperatura de 117 °C verifica-se a ausência de bandas nessa região, indicando assim ausência de grupos OH da água, esse comportamento também é verificado para o espectro de retorno da AZM (27 °C).

Já a banda em 3558 cm^{-1} é atribuída a modos de estiramento simétrico HOH e sofrem algo semelhante as bandas de OH da água quando aquecidos, apresentando várias modificações ao longo do processo e desaparecendo após os 117 °C. Bandas em regiões semelhantes do espectro são relatadas por Baldez [43] e Moura [41] em seus estudos com materiais cristalinos hidratados. Isso demonstra que o material sofreu uma possível desidratação [41,43,77,82].

Na Figura 34 encontra-se a representação do comportamento dos modos vibracionais em função da temperatura para a região de 3140 a 3625 cm^{-1} . Ao observar o comportamento desses modos durante o aquecimento do material, depara-se com modificações também a partir de 77 °C. Isso indica que a temperatura tem forte influência sobre este modo. As bandas em 3494 e 3561 cm^{-1} , respectivamente impostas aos modos de estiramento OH e HOH da água e sofrem um *upshift*.

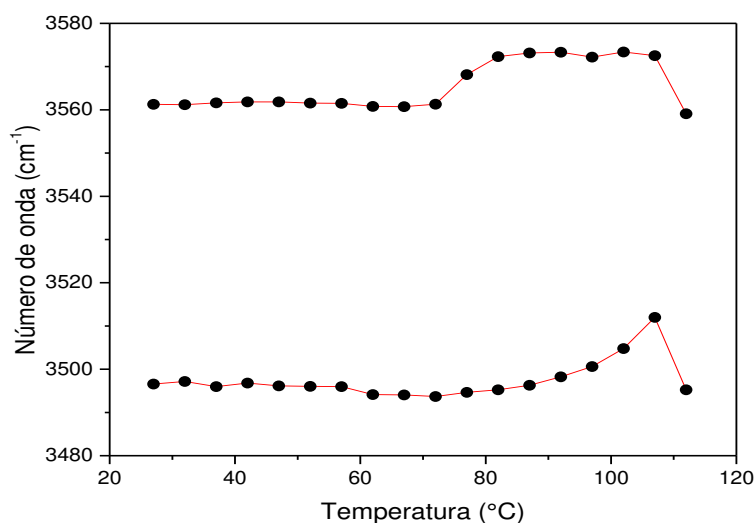


Figura 34 - Comportamento da frequência com a temperatura para modos de vibração do cristal de AZM-DH na região entre 3140 e 3625 cm^{-1} .

Após 112 °C todas as bandas encontradas na região atribuída a modos de vibração da água desaparecem, indicando que a desidratação foi completada. O fato dessas bandas não reaparecerem no espectro de retorno, indica que o fenômeno de desidratação é irreversível, bem como suas contribuições para as alterações na estrutura do material também são, isso, pelo menos durante o tempo da análise. Em seus estudos Ghandi et. al. [18], Timoumi et. al. [19] e Sundaramurthi e Suryanarayanan [17] relatam que após a desidratação a AZM anidra se acondicionada em ambiente com úmido, tende a absorver a umidade e retornar lenta e espontaneamente para a forma dihidratada.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, foi possível chegar às conclusões de que a amostra correspondia, inicialmente, à fase dihidratada do fármaco azitromicina, não apresentando misturas de fase. Ao ser submetido ao aquecimento o material sofreu desidratação, com início em aproximadamente 60 °C. Durante a desidratação a azitromicina dihidratada passa por uma mistura entre as fases dihidratada e anidra da droga.

Ao completar-se a perda da água de hidratação, o material sofre uma recristalização (~96 °C), essa nova fase corresponde ao cristal anidro, que teve seus parâmetros estruturais calculados neste estudo, apresentando sistema do tipo triclinico. A formação desse cristal é seguida de sua amorfização e posterior fusão (~116 °C). A degradação do fármaco ocorre em temperaturas acima de 190 °C. Tanto as caracterizações espectroscópicas (DRXP e Raman), quanto as caracterizações térmicas (TG, DTG, DTA e DSC), empregadas neste trabalho, tiveram resultados satisfatórios e harmônicos. Assim, todos os eventos estruturais e térmicos puderam ser compreendidos e integrados.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho poderá servir como base para a realização de trabalhos futuros como caracterizações da azitromicina dihidratada em função da pressão e/ou em função de baixas temperaturas. Base para estudos de complexação de íons na molécula de azitromicina, bem como de agentes melhoradores de solubilidade como cocristais e coamorfos.

Outras possibilidades são o emprego das técnicas apresentadas como meios de controle de qualidade na linha de produção de medicamentos. A espectroscopia Raman, por exemplo, possui equipamentos portáteis capazes de realizar medidas *in locu*, isso pode vir a possibilitar uma maior padronização na garantia da qualidade do medicamento, dando maior confiabilidade na fase do produto e garantindo a eficiência desejada nos tratamentos. Enfim, este estudo servirá como fonte de pesquisa a todos aqueles que buscarem maiores informações sobre a azitromicina dihidratada e seu comportamento estrutural, vibracional e térmico.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Halebian, W. McCrone, **Pharmaceutical applications of polymorphism.**, J. Pharm. Sci. 58 (1969) 911–29. doi:10.1002/jps.2600580802.
- [2] J. Bernstein, **Polymorphism in Molecular Crystals**, Oxford University Press, 2007. doi:10.1093/acprof:oso/9780199236565.001.0001.
- [3] R. Hilfiker, **Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2006. doi:10.1002/3527607889.
- [4] M. Blanco, D. Valdés, M.S. Bayod, F. Fernández-Marí, I. Llorente, **Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry**, Anal. Chim. Acta. 502 (2004) 221–227. doi:10.1016/j.aca.2003.10.016.
- [5] M. Zhao, G. Li, J. Zheng, L. Li, H. Wang, L. Yang, **Preparation and polymorph-sensitive luminescence properties of BiPO₄:Eu, Part I: room-temperature reaction followed by a heat treatment**, CrystEngComm. 13 (2011) 6251. doi:10.1039/c1ce05629h.
- [6] S.P.F. Miller, A.S. Raw, L.X. Yu, **Scientific Considerations of Pharmaceutical Solid Polymorphism in Regulatory Applications**, in: **Polymorph. Pharm. Ind.**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2006: pp. 385–403. doi:10.1002/3527607889.ch15.
- [7] C. Starbuck, A. Spartalis, L. Wai, J. Wang, P. Fernandez, C.M. Lindemann, G.X. Zhou, Z. Ge, **Process Optimization of a Complex Pharmaceutical Polymorphic System via In Situ Raman Spectroscopy**, Cryst. Growth Des. 2 (2002) 515–522. doi:10.1021/cg025559k.
- [8] F. Giordano, **Polymorphism in pharmaceutical solids**, J. Control. Release. 71 (2001) 354–355. doi:10.1016/S0168-3659(01)00252-8.
- [9] N. Bahal, M.C. Nahata, **The New Macrolide Antibiotics: Azithromycin, Clarithromycin, Dirithromycin, and Roxithromycin**, Ann. Pharmacother. 26 (1992) 46–55. doi:10.1177/106002809202600112.
- [10] C.J. Dunn, L.B. Barradell, **Azithromycin. A review of its pharmacological properties and use as 3-day therapy in respiratory tract infections.**, Drugs. 51 (1996) 483–505. doi:10.2165/00003495-199651030-00013.
- [11] E. Scholar, **Azithromycin**, in: XPharm Compr. Pharmacol. Ref., Elsevier, 2007: pp. 1–6. doi:10.1016/B978-008055232-3.61276-0.
- [12] Z.J. Li, Andrew V. Trask, **Crystal forms of azithromycin**, 2005. doi:10.1145/634067.634234.
- [13] G. Kobrehel, G. Radobolja, Z. Tamburasev, S. Djokic, **11-Aza-10-deoxo-10-dihydroerythromycin A and derivatives thereof as well as a process for their preparation**, 1982. doi:10.1002/chin.198842362.
- [14] S. Djokic, G. Kobrehel, N. Lopotar, B. Kamenar, A. Nagl, D. Mrvos, **Erythromycin**

- series. **Part 13. Synthesis and structure elucidation of 10-dihydro-10-deoxo-11-methyl-11-azaerythromycin A.**, J. Chem. Res. Synopses. (1988).
- [15] C.J. Kremer, **Azithromycin—a new macrolide**, Prim. Care Update Ob. Gyns. 9 (2002) 174–175. doi:10.1016/S1068-607X(02)00112-9.
- [16] S. Mutak, **Azalides from azithromycin to new azalide derivatives.**, J. Antibiot. (Tokyo). 60 (2007) 85–122. doi:10.1038/ja.2007.10.
- [17] P. Sundaramurthi, R. Suryanarayanan, **Azithromycin Hydrates—Implications of Processing- Induced Phase Transformations**, J. Pharm. Sci. 103 (2014) 3095–3106. doi:10.1002/jps.24084.
- [18] R. Gandhi, O. Pillai, R. Thilagavathi, B. Gopalakrishnan, C.L. Kaul, R. Panchagnula, **Characterization of Azithromycin hydrates**, Eur. J. Pharm. Sci. 16 (2002) 175–184. doi:10.1016/S0928-0987(02)00087-8.
- [19] S. Timoumi, D. Mangin, R. Peczalski, F. Zagrouba, J. Andrieu, **Stability and thermophysical properties of azithromycin dihydrate**, Arab. J. Chem. 7 (2014) 189–195. doi:10.1016/j.arabjc.2010.10.024.
- [20] P. V. Allen, P.D. Rahn, A.C. Sarapu, A.J. Vanderwielen, **Physical characterization of erythromycin: Anhydrate, monohydrate, and dihydrate crystalline solids**, J. Pharm. Sci. 67 (1978) 1087–1093. doi:10.1002/jps.2600670816.
- [21] Y. Fukumori, T. Fukuda, Y. Yamamoto, Y. Shigitani, Y. Hanyu, Y. Takeuchi, N. Sato, **Physical characterization of erythromycin dihydrate, anhydrate and amorphous solid and their dissolution properties**, Chem. Pharm. Bull. 31 (1983) 4029–4039. doi:10.1248/cpb.31.4029.
- [22] A. Awan, R.J. Brennan, A.C. Regan, J. Barber, **The conformations of the macrolide antibiotics erythromycin A, azithromycin and clarithromycin in aqueous solution: a ¹H NMR study**, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. (2000) 1645–1652. doi:10.1039/b003000g.
- [23] H.A. Kirst, G.D. Sides, **New directions for macrolide antibiotics: structural modifications and in vitro activity**, Antimicrob. Agents Chemother. 33 (1989) 1413–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2684004>.
- [24] A.N. de V.S. Brasil, **Farmacopeia Brasileira**, Farm. Bras. 5^a Edição. 1 (2010) 1–523. doi:10.1590/S0102-33062006000100002.
- [25] D.E. Amacher, S.J. Schomaker, J.A. Retsema, **Comparison of the effects of the new azalide antibiotic, azithromycin, and erythromycin estolate on rat liver cytochrome P-450**, Antimicrob. Agents Chemother. 35 (1991) 1186–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656856>.
- [26] M. Bayod-Jasanada, R.J. Carbajo, F. López-Ortiz, **Synthesis of 9-deoxo-9a-aza-9a-homoerythromycin A 11,12-Hydrogen Borate and Azithromycin 11,12-Hydrogen Borate. A New Procedure to Obtain Azithromycin Dihydrate**, J. Org. Chem. 62 (1997) 7479–7481. doi:10.1021/jo970776r.

- [27] J.M. Montejo-Bernardo, S. García-Grande, M.S. Bayod-Jasanada, L. Lavona-Díaz, I. Llorente, **X-ray study of the pseudopolymorphism of the azithromycin monohydrate**, Zeitschrift Für Krist. - Cryst. Mater. 218 (2003) 703–707. doi:10.1524/zkri.218.10.703.20761.
- [28] J.M. Montejo-Bernardo, S. Garcia-Granda, M.S. Bayod-Jasanada, L. Llavona-Díaz, I. Llorente, M.M. I, S. Garcí, M.S.B. Ii, **On the solid state conformation of azithromycin monohydrate and dihydrate pseudopolymorphs**, Zeitschrift Für Krist. - Cryst. Mater. 220 (2005) 66–73. doi:10.1524/zkri.220.1.66.58890.
- [29] X. Wang, Y. Qin, T. Zhang, W. Tang, B. Ma, J. Gong, **Measurement and Correlation of Solubility of Azithromycin Monohydrate in Five Pure Solvents**, J. Chem. Eng. Data. 59 (2014) 784–791. doi:10.1021/je400899e.
- [30] D. Zhang, T. Tan, L. Gao, W. Zhao, P. Wang, **Preparation of Azithromycin Nanosuspensions by High Pressure Homogenization and its Physicochemical Characteristics Studies**, Drug Dev. Ind. Pharm. 33 (2007) 569–575. doi:10.1080/03639040600975147.
- [31] Z. Zhang, Y. Zhu, X. Yang, C. Li, **Preparation of azithromycin microcapsules by a layer-by-layer self-assembly approach and release behaviors of azithromycin**, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 362 (2010) 135–139. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.04.006.
- [32] D.R. Jaiswar, D. Jha, P.D. Amin, **Preparation and characterizations of stable amorphous solid solution of azithromycin by hot melt extrusion**, J. Pharm. Investig. 46 (2016) 655–668. doi:10.1007/s40005-016-0248-x.
- [33] M. Aucamp, R. Odendaal, W. Liebenberg, J. Hamman, **Amorphous azithromycin with improved aqueous solubility and intestinal membrane permeability**, Drug Dev. Ind. Pharm. 41 (2015) 1100–1108. doi:10.3109/03639045.2014.931967.
- [34] G.L. Barros de Araujo, **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**, 202f, Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos), Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- [35] R. Das, M.E.E. Ali, S.B.A.S.B.A. Hamid, M. Eaquib Ali, R. Das, S. Bee Abd Hamid, M.E.E. Ali, S.B.A.S.B.A. Hamid, **Current applications of x-ray powder diffraction - A review**, Rev. Adv. Mater. Sci. 38 (2014) 95–109. http://www.ipme.ru/e-journals/RAMS/no_23814/01_23814_das.pdf.
- [36] K.D.M. Harris, P.A. Williams, **Powder Diffraction, in: Struct. from Diffr. Methods**, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2014: pp. 1–81. doi:10.1002/9781118695708.ch1.
- [37] V. Pecharsky, P. Zavalij, **Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials**, Springer US, Boston, MA, 2009. doi:10.1007/978-0-387-09579-0.
- [38] W.D. Callister, **Ciência e Engenharia de Materiais**, 8th ed., John Wiley & Sons Ltd, New York, 2002.

- [39] L.S. Taylor, P. York, **Characterization of the phase transitions of trehalose dihydrate on heating and subsequent dehydration**, J. Pharm. Sci. 87 (1998) 347–355. doi:10.1021/js970239m.
- [40] A. Samanta, D.K. Chanda, P.S. Das, J. Ghosh, A.K. Mukhopadhyay, A. Dey, **Synthesis of Nano Calcium Hydroxide in Aqueous Medium**, J. Am. Ceram. Soc. 99 (2016) 787–795. doi:10.1111/jace.14023.
- [41] G.M. de Moura, **Sais de L-Histidina: crescimento e caracterização por Difração de Raios-X**, 94f, Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2015.
- [42] F.C. da Silva, **Síntese e caracterização de um novo cocristal de gliclazida com trometamina**, 119f, Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2016. <http://tedebc.ufma.br:8080/jspui/handle/tede/1349>.
- [43] T.S. Baldez, **Estudo estrutural, térmico e vibracional do cristal de bis(L- alaninato) de níquel (ii) di-hidratado**, 79f, Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2016.
- [44] G. Will, Powder diffraction: **The rietveld method and the two stage method to determine and refine crystal structures from powder diffraction data**, 2006. doi:10.1007/3-540-27986-5.
- [45] A.S. Fambrini, **Estudo da orientação preferencial pelo método de Rietveld em amostras de ligas de alumínio**, 118f, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) Programa de Pós Graduação em Engenharia de Materiais, Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2010.
- [46] C.O.P. Santos, **Aplicações do Método de Rietveld**, Dissertação (Mestrado em Físico-Química), Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNESP, 2009.
- [47] R. de S.F. Júnior, **Estudo da transformação de fase do cristal de L- isoleucina.HCl.H₂O**, 69f, Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Maranhão, 2016.
- [48] P. Paufler, R. A. Young (ed.). **The Rietveld Method**. International Union of Crystallography. Oxford University Press 1993. 298 p. Price £ 45.00. ISBN 0–19–855577–6, Cryst. Res. Technol. 30 (1995) 494–494. doi:10.1002/crat.2170300412.
- [49] R. a. Young, P.E. Mackie, R.B. von Dreele, **Application of the pattern-fitting structure-refinement method of X-ray powder diffractometer patterns**, J. Appl. Crystallogr. (1977). doi:10.1107/S0021889877013466.
- [50] A. Le Bail, H. Duroy, J.L. Fourquet, **Ab-initio structure determination of LiSbWO₆ by X-ray powder diffraction**, Mater. Res. Bull. (1988). doi:10.1016/0025-5408(88)90019-0.

- [51] G.S. Pawley, **Unit-cell refinement from powder diffraction scans**, J. Appl. Crystallogr. (1981). doi:10.1107/S0021889881009618.
- [52] a C. Larson, R.B. Von Dreele, **General Structure Analysis System (GSAS)**, Structure. (2004). doi:10.1103/PhysRevLett.101.107006.
- [53] Princeton Instruments, **Raman Spectroscopy Basics - Application Note**, Internet: <Http://Content.Piacton.Com/Uploads/Princeton/>. (2012) 1–5. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444531759000106>.
- [54] Laserna Javier J., **An Introduction to Raman Spectroscopy: Introduction and Basic Principles**, (2003) 6.
- [55] P.R. Graves, G. Hua, S. Myhra, J.G. Thompson, **The Raman Modes of the Aurivillius Phases: Temperature and Polarization Dependence**, J. Solid State Chem. (1995). doi:10.1006/jssc.1995.1017.
- [56] D.A. Long, **The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules**. 2002, 2002. doi:10.1002/0470845767.
- [57] C. V. Raman, K.S. Krishnan, **Raman Spectroscopy**, in: Mol. Spectrosc., 2002: pp. 1–34.
- [58] G. Bruno, **Classical Theory of Rayleigh and Raman Scattering**, Raman Eff. A Unified Treat. Theory Raman Scatt. by Mol. (2002). doi:0-470-84576-7.
- [59] C. Raman, K. Krishnan, **A New Class of Spectra due to Secondary Radiation.Part I**, Ind. Jour. Phys. (1928).
- [60] F.J. Holler, D.A. Skoog, S.R. Crouch, **Princípios de análise instrumental**, Porto Alegre:Bookman. (2009) 1056. <http://www.livrariacultura.com.br/p/principios-de-analise-instrumental-2743525>.
- [61] P. Larkin, **Infrared and Raman Spectroscopy; Principles and Spectral Interpretation**, 2011. doi:10.1016/C2010-0-68479-3.
- [62] W. Kiefer, A.P. Mazzolini, P.R. Stoddart, **Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I**, J. Raman Spectrosc. 38 (2007) 1538–1553. doi:10.1002/jrs.
- [63] Y. Li, G. Du, W. Cai, X. Shao, **Classification and Quantitative Analysis of Azithromycin Tablets by Raman Spectroscopy and Chemometrics**, Am. J. Anal. Chem. 2 (2011) 135–141. doi:10.4236/ajac.2011.22015.
- [64] R.S. Ferreira Júnior, G.M. Moura, A.C. Pereira, P.R. da S. Ribeiro, L.M. da Silva, A.O. dos Santos, **Time and temperature induced phase transformation in L-isoleucine hydrochloride monohydrated crystal**, Cryst. Res. Technol. 51 (2016) 738–741. doi:10.1002/crat.201600186.
- [65] M.E. Brown, P.K. Gallagher, Introduction to Recent Advances, **Techniques and Applications of Thermal Analysis and Calorimetry**, in: Handb. Therm. Anal. Calorim., 2008: pp. 1–12. doi:10.1016/S1573-4374(08)80004-0.

- [66] P. Gabbot, Principles and Applications of Thermal Analysis, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2008. doi:10.1002/9780470697702.
- [67] G. Tavares, C. Cervi Pires, J. Dias Souza, L. Tasso, **Avaliação do Polimorfismo e Perfil de Dissolução de Formulações de Carbamazepina**, Sci. Cum Ind. 4 (2016) 161–166. doi:10.18226/23185279.v4iss3p161.
- [68] L.E. McMahon, P. Timmins, A.C. Williams, P. York, **Characterization of dihydrates prepared from carbamazepine polymorphs**, J. Pharm. Sci. 85 (1996) 1064–1069. doi:10.1021/js960117e.
- [69] H.R. Darabi, A. Roozkhosh, M. Jafar Tehrani, K. Aghapoor, H. Sayahi, Y. Balavar, F. Mohsenzadeh, **Characterization of ester- or thioamide-functionalized single-walled carbon nanotube-azithromycin conjugates**, Appl. Surf. Sci. (2014). doi:10.1016/j.apsusc.2013.09.159.
- [70] M.L. Castelló, **Estudo da glicerina por Análises Térmicas**, 99f, Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos), Programa de Pós Graduação em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- [71] M. Ionashiro, Giolito - **Fundamentos da Termogravimetria Análise Térmica Diferencial Calorimetria Exploratória Diferencial**, 1st ed., GIZ, São Paulo, 2005.
- [72] C. Shende, W. Smith, C. Brouillette, S. Farquharson, **Drug stability analysis by Raman spectroscopy**, Pharmaceutics. 6 (2014) 651–662. doi:10.3390/pharmaceutics6040651.
- [73] J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenabeele, L. Moens, **Reference database of Raman spectra of biological molecules**, J. Raman Spectrosc. 38 (2007) 1133–1147. doi:10.1002/jrs.1734.
- [74] I. Miroshnyk, L. Khriachtchev, S. Mirza, J. Rantanen, J. Heinämäki, J. Yliruusi, **Insight into thermally induced phase transformations of erythromycin A dihydrate**, Cryst. Growth Des. 6 (2006) 369–374. doi:10.1021/cg050159t.
- [75] R.K. Kotecha, S. Bhadra, K.S. Rajesh, **Formulation & process development of azithromycin ophthalmic nanosuspension**, Int. J. Pharm. Pharm. Sci. (2013).
- [76] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.B. Fateley, J.G. Graselli, **Characteristic Raman Vibrational Frequencies of Organic Groups**, in: Handb. Infrared Raman Charact. Freq. Org. Mol., Academic Press, Boston, 1991: pp. 1–2.
- [77] Horiba Jobin Yvon, **Raman Spectroscopy for Analysis and Monitoring**, Raman Data Anal. 1 (2017) 1–2. <http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/bands.pdf>.
- [78] R.O. Gonçalves, **L-arginina . HCl . H₂O e estudo da L-arginina . 2 H₂O sob altas pressões e sob altas temperaturas**, 128f, Dissertação (Mestrado em Física), Programa de Pós Graduação em Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

- [79] X. Li, H. Peng, B. Tian, J. Gou, Q. Yao, X. Tao, H. He, Y. Zhang, X. Tang, C. Cai, **Preparation and characterization of azithromycin – Aerosil 200 solid dispersions with enhanced physical stability**, *Int. J. Pharm.* 486 (2015) 175–184. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.03.029.
- [80] P. Larkin, **Infrared and Raman Spectroscopy**, *Infrared Raman Spectrosc.* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-386984-5.10002-3.
- [81] P.J. Larkin, M. Dabros, B. Sarsfield, E. Chan, J.T. Carriere, B.C. Smith, **Polymorph characterization of active pharmaceutical ingredients (APIs) using low-frequency raman spectroscopy**, *Appl. Spectrosc.* 68 (2015) 758–776. doi:10.1366/13-07329.
- [82] R.A. Nyquist, R.O. Kagel, **Infrared spectra of inorganic compounds**, in: *Handb. Infrared Raman Spectra Inorg. Compd. Org. Salts*, 1971: pp. 1–18. doi:10.1016/B978-0-12-523450-4.50005-5.