



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Inês Caria Santos

**INVESTIGAÇÃO DE FORMAS SÓLIDAS  
MULTICOMPONENTE DO ANTIBACTERIANO  
NORFLOXACINA**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, área de  
especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente, orientada  
pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e pelo  
Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage e apresentada ao  
Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra.**

Outubro de 2021



Inês Caria Santos

**Investigação de formas sólidas  
multicomponente do antibacteriano  
norfloxacina**

**Dissertação apresentada a prova de Mestrado em Química, Área de  
especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente**

Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio

Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage

**Outubro 2021**

**Universidade de Coimbra**



*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King



# Agradecimentos

O resultado final desta dissertação não seria possível sem a colaboração de um conjunto de entidades, que foram fundamentais durante todo este processo. Assim, manifesto o meu sincero agradecimento a todos os que me acompanharam ao longo desta caminhada.

À Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio, que desempenhou um papel fulcral no desenvolvimento deste projeto, pela orientação, conhecimento transmitido e toda a dedicação e disponibilidade ao longo destes dois anos, que contribuíram para o meu desenvolvimento não só a nível académico, mas também humano.

Ao Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage por todo o apoio e ensinamentos prestados de forma a atingir os objetivos propostos.

Ao Professor Ricardo António Esteves de Castro, pela orientação aquando da Licenciatura que me permitiram manter no caminho certo e encarar este novo desafio com mais conhecimento e experiência.

Aos meus colegas de grupo, pelo acolhimento e partilha de conhecimento, em especial ao João Baptista, por toda a disponibilidade, apoio técnico e científico, imprescindíveis ao longo destes dois anos.

À Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, UCQFarma, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela colaboração na caracterização por XRPD.

Aos meus amigos de longa data, em especial à minha grande amiga Maria Costa pelo apoio incondicional nos bons e maus momentos.

Aos da Universidade, Ana Marques, Ana Rita Leirião, Andreia Amaro, Beatriz Gonçalves, Beatriz Simões, Carolina Quinteiro, Luís Vaz, Margarida Cordeiro e Margarida Susana, por todo companheirismo, força e apoio ao longo deste meu percurso académico.

Por último, o meu maior agradecimento a toda a minha família, particularmente ao meu pai, António Santos, à minha mãe, Helena Caria, e à minha irmã, Ana Júlia Santos, por todas as palavras de encorajamento nos momentos certos. Nada teria sido possível sem a vossa presença constante e apoio incondicional.





# Índice

Índice de Tabelas .....	ix
Abreviaturas .....	xi
Resumo .....	xiii
Abstract.....	xv
<b>Capítulo 1 - Introdução .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Antibióticos e resistência a antibióticos.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Formas sólidas e a indústria farmacêutica: co-cristais.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Polimorfismo.....	9
1.3 Quinolonas.....	12
1.3.1 Norfloxacin.....	14
1.4 Flavonóides .....	17
1.4.1 Quercetina .....	18
1.4.2 Catequina.....	19
1.4.3 Miricetina .....	19
1.5 Amidas .....	20
1.5.1 Benzamida.....	20
1.5.2 Salicilamida.....	21
1.5.3 Etenzamida.....	22
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....</b>	<b>27</b>
2.1 Materiais .....	27
2.2 Métodos .....	28
2.2.1 Mecanoquímica .....	28
2.2.2 Espectroscopia de infravermelho .....	29
2.2.3 Calorimetria Diferencial de Varrimento .....	31
2.2.4 Difração de raios-X.....	33
2.2.5 Termogravimetria .....	34
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Investigação sobre formas sólidas de norfloxacin.....</b>	<b>39</b>
3.1.1. Investigação do comportamento térmico dos dois tipos de amostras obtidos por LAG.....	42
3.1.2 Investigação do comportamento térmico da NOR obtida por NG .....	46
3.1.3 Investigação do comportamento térmico da NOR de partida.....	48

<b>3.2 Caracterização das formas sólidas dos co-formadores utilizados neste trabalho</b> .....	51
<b>3.2.1 Co-formadores: flavonóides</b> .....	51
<b>3.2.2 Co-formadores: amidas</b> .....	55
<b>3.3 Investigação de formas sólidas multicomponente: sistemas binários Norfloxacin + Flavonóides</b> .....	59
<b>3.3.1 Norfloxacin + Quercetina</b> .....	59
<b>3.3.2 Norfloxacin + Catequina</b> .....	64
<b>3.3.3 Norfloxacin + Miricetina</b> .....	67
<b>3.4 Investigação de formas sólidas multicomponente: sistemas binários Norfloxacin + Amidas</b> .....	69
<b>3.4.1 Norfloxacin + Benzamida</b> .....	69
<b>3.4.2 Norfloxacin + Salicilamida</b> .....	76
<b>3.4.3 Norfloxacin + Etenzamida</b> .....	82
<b>Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras</b> .....	89
<b>Referências bibliográficas</b> .....	91
<b>Anexos</b> .....	105

# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Formação de um co-cristal.....	5
<b>Figura 2.</b> Diferentes formas sólidas de ativos farmacêuticos [40]. .....	7
<b>Figura 3.</b> Representação de homo e heterosintões supramoleculares: a) homosintão ácido-ácido; b) homosintão ácido-amida; c) heterosintão ácido-amida; d) heterosintão ácido-azoto heterocíclico. ....	8
<b>Figura 4.</b> Esquema de duas estruturas cristalinas diferentes de um ativo farmacêutico.....	10
<b>Figura 5.</b> Diagrama de energia em função de temperatura, a pressão constante, num sistema dimórfico enantiotrópico [71]......	11
<b>Figura 6.</b> Diagrama de energia em função da temperatura, a pressão constante, para um sistema dimórfico monotrópico [71]......	12
<b>Figura 7.</b> Estrutura Química de: a) ácido nalidíxico e b) farmacóforo dos antibióticos do tipo fluoroquinolonas. ....	13
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da norfloxacin a) neutra e b) forma zwitteriônica [7]......	14
<b>Figura 9.</b> Estrutura cristalina da Forma A, CCDC 617104 [88]. .....	15
<b>Figura 10.</b> Difratogramas de raios-X de pó das formas anidras A, B e C da norfloxacin [6] [1] .....	15
<b>Figura 11.</b> Estrutura molecular: a) flavona e b) geral dos flavonóides.....	18
<b>Figura 12.</b> Estrutura molecular da quercetina.....	18
<b>Figura 13.</b> Estrutura molecular da catequina. ....	19
<b>Figura 14.</b> Estrutura molecular da miricetina. ....	20
<b>Figura 15.</b> Estrutura molecular da benzamida.....	21
<b>Figura 16.</b> Estrutura molecular da salicilamida.....	22
<b>Figura 17.</b> Estrutura molecular da etenzamida.....	22
<b>Figura 18.</b> Conformação da molécula de etenzamida: a) no cristal de composto puro; b) no co-cristal com o ácido 3,5-diclorobenzóico [197]. .....	24
<b>Figura 19.</b> Representação esquemática dos componentes do ATR-FTIR: (a) Interferómetro; (b) unidade de ATR.....	30
<b>Figura 20.</b> Diagrama esquemático de um DSC de potência compensada. A- amostra; R – referência.....	32
<b>Figura 21.</b> Representação esquemática do fenómeno de difração de Raios-X.....	34
<b>Figura 22.</b> Difratogramas de raios-X de pó da NOR de partida (a), obtida por NG (moagem sem solvente) a 15Hz (b) e a 30Hz (c) e os difratogramas da forma A (d), das formas sesquihidratadas 1.5 H <sub>2</sub> O (e) e 3H <sub>2</sub> O (f), das formas hidratadas 1.125 (g) e 1.25 (h) e da forma dihidratada (i) simulados a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com os números 617104 [88], 720746 [7], 720747 [7], 719474 [92], 719473 [92] e 153910 [91], respetivamente. ....	39
<b>Figura 23.</b> Norfloxacin: Difratogramas de raios-X de pó representativos dos dois tipos de sólidos obtidos por LAG (a) e (b) e os difratogramas simulados da forma A (c), das formas sesquihidratadas 1.5 H <sub>2</sub> O (d) e 3H <sub>2</sub> O (e), das formas hidratadas 1.125 (f) e 1.25 (g) e da forma dihidratada (h) a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com os números 617104 [88], 720746 [7], 720747 [7], 719474 [92], 719473 [92] e 153910 [91], respetivamente. ....	40
<b>Figura 24.</b> Termogramas DSC de aquecimento da NOR de partida, m= 2,09 mg (a), obtida por NG, m = 1,16 mg (b) e das duas formas de NOR obtida por LAG: da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O, m= 1,50 mg (c) e da mistura da forma NOR·1.5 H <sub>2</sub> O com a forma C, m = 1,14 mg (d), $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . .....	41

<b>Figura 25.</b> Espectros de IV da NOR de partida (a), obtida por moagem sem solvente (NG) (b) e dos dois sólidos obtidos por moagem assistida por 10 µL de etanol (LAG): a NOR·1.5 H <sub>2</sub> O (c) e a mistura da forma NOR·1.5 H <sub>2</sub> O com a forma C (d). .....	41
<b>Figura 26.</b> i) Termogramas DSC de aquecimento de NOR·1.5 H <sub>2</sub> O: a) 1 <sup>o</sup> aquecimento, b) arrefecimento e c) 2 <sup>o</sup> aquecimento,  β  = 10 °C min <sup>-1</sup> ; ii) Termogramas DSC de aquecimento de NOR·1.5 H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C, m = 1,56 mg (b), 190 °C, m = 1,58 mg (c) e 212 °C, m = 1,66 mg (d), β = 10 °C min <sup>-1</sup> .....	42
<b>Figura 27.</b> Difrátogramas de raios-X de pó da NOR 1.5 H <sub>2</sub> O (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (b), 190 °C (c) e 212 °C (d), simulado da forma A, a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas na CCDC (e).....	43
<b>Figura 28.</b> Espectros de IV de NOR·1.5 H <sub>2</sub> O (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C ou 190 °C, forma B (b) e até 212 °C, forma A (c).....	44
<b>Figura 29.</b> Termogramas DSC de aquecimento da NOR obtida por LAG, correspondente à mistura das formas NOR·1.5 H <sub>2</sub> O e C, m = 1,14 mg (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C, m = 1,68 mg (b), 190 °C, m = 1,73 mg (c) e 212 °C, m = 1,29 mg (d) e aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas, m = 2,13 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> .....	44
<b>Figura 30.</b> Difrátogramas de raios-X de pó da mistura das formas NOR·1.5 H <sub>2</sub> O e C (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (b), 190 °C (c) e 212 °C (d), aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (e) e simulado da forma A, a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada na CCDC (f). .....	45
<b>Figura 31.</b> Espectros de IV da mistura das formas NOR·1.5 H <sub>2</sub> O e C (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C, forma C (b), 190 °C, forma C (c) e 212 °C, forma A (d) e aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (e).....	45
<b>Figura 32.</b> Análise termogravimétrica de norfloxacin, forma C, obtida por aquecimento da mistura de NOR·1.5 H <sub>2</sub> O com a forma C em estufa, a 150 °C durante 3 horas. ....	46
<b>Figura 33.</b> Termogramas DSC de aquecimento da NOR obtida por NG, m = 1,16 mg (a), obtida por NG aquecida até 140 °C, m = 2,34 mg (b), 170 °C, m = 2,62 mg (c) e 210 °C, m = 2,71 mg (d), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	47
<b>Figura 34.</b> Difrátogramas de raios-X de pó da NOR obtida por NG (a), aquecida até 140 °C (b), 170 °C (c) e 210 °C (d) e das formas A (e), B (f) e C (g). ....	47
<b>Figura 35.</b> Espectros de IV da NOR obtida por NG (a), aquecida até 140 °C (b), 170 °C (c) e 210 °C (d) e das formas A (e), B (f) e C (g).....	48
<b>Figura 36.</b> Difrátogramas de raios-X da NOR de partida (a), da forma NOR·1.5 H <sub>2</sub> O (b), da forma A (c), da forma B (d) e da forma C (e). ....	48
<b>Figura 37.</b> Termogramas DSC de aquecimento da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), aquecida até 140 °C, m = 1,86 mg (b), 190 °C, m = 2,18 mg (c) e 212 °C, m = 2,78 mg (d) e aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas, 1,89 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	49
<b>Figura 38.</b> Difrátogramas de raios-X de pó da NOR de partida (a), da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O (b), da NOR de partida aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (c), 190 °C (d) e 212 °C (e), da NOR de partida aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (f) e das formas A (g), B (h) e C (i). ....	50
<b>Figura 39.</b> Difrátogramas de raios-X de pó da NOR de partida aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (a), da NOR de partida aquecida com recurso ao DSC até 190°C e da NOR obtida por NG aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (b) e 170 °C (c). ....	50
<b>Figura 40.</b> Espectros de IV da NOR de partida (a), da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O (b), da NOR de partida aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (c), 190 °C (d) e 212 °C (e), da NOR de partida aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (f) e das formas A (g), B (h) e C (i). ....	51
<b>Figura 41.</b> Difrátogramas de raios-X de pó da QUE de partida (a) em comparação com os difratogramas do composto obtido por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c), obtido por LAG (d) e com os difratogramas da QUE dihidratada (e) e monohidratada (f) simulados a partir dos ficheiros CIF	

das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 1153851 [115] e 814511 [118], respetivamente.....	52
<b>Figura 42.</b> Espetros de IV da QUE de partida (a), obtida por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c) e obtida por LAG (d).....	53
<b>Figura 43.</b> Difratogramas de raios-X de pó da CAT de partida ((+)-hidratada) (a) em comparação com os difratogramas do composto obtido por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c), obtido por LAG (d) e com o difratograma da forma (+)-hidratada (e) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 779636 [136]. .....	53
<b>Figura 44.</b> Espetros de IV da CAT de partida (a), obtida por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c) e obtida por LAG (d).....	54
<b>Figura 45.</b> Difratogramas de raios-X de pó da MYR de partida (a) em comparação com os difratogramas do composto obtido por NG a 15Hz (b), obtido por LAG (c) e com o difratograma da forma monohidratada (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 1409763 [153]. .....	54
<b>Figura 46.</b> Espetros de IV da MYR de partida (a), obtida por NG a 15Hz (b) e obtida por LAG (c).....	55
<b>Figura 47.</b> Termogramas DSC de aquecimento de: CAT, m = 1,96 mg (a), QUE, m = 3,07 mg (b) e MYR, m = 1,45 mg (c), $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . .....	55
<b>Figura 48.</b> Difratogramas de raios-X de pó da BEN de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c) e o difratograma da BEN (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 131499 (registado a $T = 123 \text{ K}$ ) [272].....	56
<b>Figura 49.</b> Espetros de IV da BEN de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c).....	56
<b>Figura 50.</b> Difratogramas de raios-X de pó da SA de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c) e o difratograma da SA (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 751100 [183].....	57
<b>Figura 51.</b> Espetros de IV da SA de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c).....	57
<b>Figura 52.</b> Difratogramas de raios-X de pó da ETZ de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c) e o difratograma da ETZ (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 760137 [273].....	58
<b>Figura 53.</b> Espetros de IV da ETZ de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c). .....	58
<b>Figura 54.</b> Termogramas DSC da BEN de partida, m = 2,25 mg (a), da SA de partida, m = 1,44 mg (b) e da ETZ de partida, m = 1,14 mg (c), $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ .....	59
<b>Figura 55.</b> Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da QUE dihidratada (d), da QUE obtida por NG a 30Hz (e), da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 15Hz (f) e a 30Hz (g). .....	60
<b>Figura 56.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da QUE dihidratada (d), da QUE obtida por NG a 30Hz (e), da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 15Hz (f) e a 30Hz (g).....	60
<b>Figura 57.</b> Análise termogravimétrica da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 30Hz. ....	61
<b>Figura 58.</b> Termogramas DSC dos aquecimentos e arrefecimento da NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 30Hz, no dia da realização da moagem, m = 3,10 mg (a) e passados 3 meses, m = 2,02 mg (b), $\beta = 30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e $\beta = 20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , respetivamente. ....	62
<b>Figura 59.</b> Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H <sub>2</sub> O (d), da QUE dihidratada (e) e da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por LAG, etanol (f). .....	62
<b>Figura 60.</b> Análise termogravimétrica da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por LAG. ....	63
<b>Figura 61.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H <sub>2</sub> O (d), da QUE dihidratada e da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por LAG, etanol (f). .....	63

<b>Figura 62.</b> Difrátogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da CAT de partida (d) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por NG a 15Hz (e) e a 30Hz (f).....	64
<b>Figura 63.</b> Difrátogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H <sub>2</sub> O (d), da CAT obtida por LAG (e) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por LAG, etanol (f).....	65
<b>Figura 64.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da CAT de partida (d) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por NG a 15Hz (e) e a 30Hz (f).....	65
<b>Figura 65.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H <sub>2</sub> O (d), da CAT obtida por LAG (e) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por LAG, etanol (f).....	66
<b>Figura 66.</b> Termogramas DSC dos aquecimentos e arrefecimento da NOR:CAT (1:1) obtida por NG a 30Hz, no dia da realização da moagem, m = 3,42 mg (a) e passados 3 meses, m = 1,91 mg (b), β = 30 °C min <sup>-1</sup> e β = 20 °C min <sup>-1</sup> , respetivamente. ....	66
<b>Figura 67.</b> Difrátogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da MYR (d) e da mistura NOR:MYR (1:1) obtida por NG (e).....	67
<b>Figura 68.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da MYR (d) e da mistura NOR:MYR (1:1) obtida por NG (e).....	67
<b>Figura 69.</b> Difrátograma de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H <sub>2</sub> O da NOR (d), da MYR (e) e das misturas 1:2 (f) e 1:1 (g) de NOR e MYR obtidas por LAG.....	68
<b>Figura 70.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H <sub>2</sub> O da NOR (d), da MYR (e) e das misturas 1:2 (f) e 1:1 (g) de NOR e MYR obtidas por LAG. ....	68
<b>Figura 71.</b> Análise termogravimétrica da NOR:MYR (1:1) obtida por LAG. ....	69
<b>Figura 72.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m= 2,09 mg (a), da NOR·1.5H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), da BEN, m = 2,25 mg (c) e de misturas de NOR e BEN na proporção 1:1 - obtida por NG, representada a azul, m = 1,05 mg, e obtida por LAG, representada a vermelho; m = 1,78 mg); β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	70
<b>Figura 73.</b> Difrátogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H <sub>2</sub> O (d) da NOR, da BEN (e) e de misturas de NOR e BEN na proporção 1:1 - obtida por NG, representada a azul, e obtida por LAG, representada a vermelho.....	70
<b>Figura 74.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H <sub>2</sub> O (d) da NOR, da BEN (e) e de misturas de NOR e BEN na proporção 1:1 - obtida por NG, representada a azul, m = 1,05 mg, e obtida por LAG, representada a vermelho. ....	71
<b>Figura 75.</b> Difrátogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H <sub>2</sub> O (d) da NOR, da BEN (e) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho.....	72
<b>Figura 76.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H <sub>2</sub> O (d) da NOR, da BEN (e) e das misturas de NOR e BEN nas proporções 2:3, sendo que a mistura obtida por NG está representada a azul e a mistura obtida por LAG está representada a vermelho. ....	72
<b>Figura 77.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m= 2,09 mg (a), da NOR·1.5H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), da BEM, m = 2,25 mg (c) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul (2:1, m = 1,50 mg; 1:1, m = 1,05 mg; 2:3, m = 1,63 mg; 1:2, m = 2,13 mg) e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho (2:1, m = 1,73 mg; 1:1, m = 1,78 mg; 2:3, m = 2,03 mg; 1:2, m = 2,38 mg), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	73
<b>Figura 78.</b> a) Análise termogravimétrica da NOR:BEN (2:3) obtida por NG; b) Análise termogravimétrica da NOR:BEN (2:3) obtida por LAG. ....	74
<b>Figura 79.</b> Termograma DSC da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), da NOR·1.5H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), das misturas de NOR com BEN na proporção de 2:3 obtidas por NG, m = 2,43 mg (c) e LAG, m = 2,50 mg (d) e da BEN de partida, m = 2,25 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	75

<b>Figura 80.</b> Difractogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da BEN (d) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, aquecidas no DSC até 140 °C, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho. ....	75
<b>Figura 81.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da BEN (d) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, aquecidas no DSC até 140 °C, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho. ....	76
<b>Figura 82.</b> Difractogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5 H <sub>2</sub> O (d) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da SA de partida (g).....	77
<b>Figura 83.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), das misturas de NOR com SA, na proporção de 1:1, obtidas por NG, m = 1,99 mg (c) e por LAG, m = 2,25 mg (d) e da SA de partida, m = 1,44 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	78
<b>Figura 84.</b> a) Análise termogravimétrica da amostra NOR:SA (1:1) obtida por NG; b) Análise termogravimétrica da amostra NOR:SA (1:1) obtida por LAG. ....	79
<b>Figura 85.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), das misturas de NOR com SA, na proporção de 1:1, obtidas por NG, 2,02 mg (c) e por LAG, m = 2,31 mg (d) e da SA de partida, m = 1,44 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	80
<b>Figura 86.</b> Difractogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtida por NG aquecida até 125 °C (d) e obtida por LAG aquecida até 125 °C (e) e até 175 °C (f) e da SA de partida (g). ....	81
<b>Figura 87.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtida por NG aquecida até 125 °C (d) e obtida por LAG aquecida até 125 °C (e) e até 175 °C (f) e da SA de partida (g). ....	81
<b>Figura 88.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), das misturas de NOR e SA na proporção de 2:1, m = 2,13 mg (b), 1:1, m = 1,99 mg (c) e 1:2, m = 1,93 mg (d) obtidas por NG e da SA de partida, m = 1,44 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	82
<b>Figura 89.</b> Difractogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5 H <sub>2</sub> O (d) da NOR, das misturas de NOR e ETZ na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da ETZ de partida (g). ....	82
<b>Figura 90.</b> Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5 H <sub>2</sub> O (d) da NOR, das misturas de NOR e ETZ na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da ETE de partida (g). ....	83
<b>Figura 91.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), das misturas de NOR e ETZ na proporção de 1:1 obtidas por NG, m = 2,22 mg (c) e LAG, m = 1,64 mg (d) e da ETZ de partida, m = 1,14 mg (e), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	83
<b>Figura 92.</b> Diagrama de fases binário sólido-líquido do sistema NOR com ETZ, à pressão atmosférica. (■ e ■ resultados experimentais).....	84
<b>Figura 93.</b> Termogramas DSC da NOR de partida, m = 2,09 mg (a), da NOR·1.5 H <sub>2</sub> O, m = 1,50 mg (b), da mistura de NOR e ETE na proporção de 1:7,3, m = 1,85 mg (c) e da ETZ de partida, m = 1,14 mg (d), β = 10 °C min <sup>-1</sup> . ....	85





# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1. Compostos utilizados e informações sobre os mesmos dadas pelo fornecedor.</b> .....	27
<b>Tabela 2. Temperaturas dos eventos térmicos observados nas curvas DSC de aquecimento de misturas de NOR e BEN em diferentes proporções.</b> .....	73
<b>Tabela 3. Temperaturas dos eventos térmicos observados nas curvas DSC de aquecimento das misturas de NOR e SA, na proporção de 1:1, obtidas por NG e LAG. ..</b>	78



# Abreviaturas

DNA – do inglês *Deoxyribonucleic acid*

RNA – do inglês *Ribonucleic acid*

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

EUA – Estados Unidos da América

API – do inglês *Active Pharmaceutical Ingredient*

GRAS – do inglês *Generally Recognized as Safe*

CSD – do inglês *The Cambridge Structural Data Base*

LAG – do inglês *Liquid Assisted Grinding*

NOR – Norfloxacin

CCDC – do inglês *The Cambridge Crystallographic Data Centre*

QUE – Quercetina

CAT – Catequina

MYR – Miricetina

BEN – Benzanida

SA – Salicilamida

ETZ – Etenzanida

NSAIDs – do inglês *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*

BCS – do inglês *Biopharmaceutics Classification System*

TCI – Tokyo Chemical Industry

ATR-FTIR – do inglês *Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

DSC – do inglês *Differential Scanning Calorimetry*

XRPD – do inglês *X-Ray Powder Diffraction*

TGA – do inglês *Thermogravimetric analysis*

NG – do inglês *Neat Grinding*

IV – Infravermelho

DTA – do inglês *Differential thermal analysis*

RMN – Ressonância magnética nuclear



# Resumo

O trabalho apresentado nesta dissertação tem como objetivo a investigação do estado sólido da norfloxacin, um antibiótico de larga utilização, e também de novas formas multicomponente deste ativo, com relevo para co-cristais, utilizando como co-formadores flavonóides, com potencial para atividade antimicrobiana sinérgica, e amidas. Atualmente, a norfloxacin é usada para tratar gonorreia, infeções da próstata, urinárias, biliares e do trato respiratório. O composto tem sido objeto de diversos estudos dada a sua relevância a nível de aplicações e a necessidade de melhorar algumas das suas propriedades, nomeadamente a baixa solubilidade aquosa e a higroscopicidade. Os flavonóides são uma classe de compostos polifenólicos naturais, que se encontram em diversos alimentos, sendo usados como nutracêuticos ou suplementos alimentares. Possuem ação antibacteriana e efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticoagulantes, anti-hipertensivos, anti tumorais e cardioprotetores. Os flavonóides utilizados na realização deste trabalho são a quercetina, a catequina e a miricetina.

Uma vez que as publicações referindo co-cristais de norfloxacin são escassas e dizem respeito à associação com ácidos carboxílicos, investigou-se também a formação de co-cristais com co-formadores contendo o grupo amida, por forma a explorar outro tipo de sintão supramolecular na formação de co-cristais deste ativo. Portanto, estudaram-se também como co-formadores amidas, nomeadamente a benzamida, a salicilamida e a etenzamida. Entre elas, possuem uma complexidade estrutural crescente, permitindo também analisar o efeito da complexidade estrutural do co-formador na possibilidade de formação de co-cristais. Quer a salicilamida quer a etenzamida são também ativos farmacêuticos, abrindo a possibilidade de preparação de formas sólidas multicomponente para terapia dual.

Foi possível identificar métodos para obtenção reprodutível de 3 polimorfos de norfloxacin, as formas A, B e C, e dum sesquihidrato. Os resultados apontam para uma relação de enantiotropia entre as formas A e B, e A e C da norfloxacin, sendo a Forma A o polimorfo estável a temperaturas próximas da de fusão. Foi identificado que na forma C a molécula de norfloxacin existe como zwitterião, o que tinha, até agora, sido observado apenas em solvatos.

A investigação de formas sólidas multicomponente foi levada a cabo por mecanoquímica. No estudo da associação de norfloxacin e flavonóides foi possível identificar co-amorfos para os sistemas norfloxacin + quercetina e norfloxacin + catequina, este último de baixa estabilidade. Os resultados apontam também para a associação de norfloxacin e quercetina e de norfloxacin e miricetina em duas estruturas supramoleculares obtidas por LAG, co-cristais equimolares que se encontram solvatados. Estes co-cristais e o co-amorfo com quercetina poderão ser úteis em termos de aplicação farmacêutica pelo que deverão ser alvo de investigação adicional.

Foram obtidos co-cristais de norfloxacin quer com a benzamida (na proporção 2:3), quer com a salicilamida. Com este último co-formador a estequiometria do co-cristal é de (1:1), tendo sido identificados dois polimorfos. Com a etenzamida, a mecanoquímica resultou em misturas físicas dos dois compostos.

Todos os sólidos investigados durante este projeto foram caracterizados através de técnicas complementares: espectroscopia por refletância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), difração de raios-X de pó (XRPD) e termogravimetria (TGA).



# Abstract

The work presented in this dissertation aims to investigate the solid-state of norfloxacin, a widely used antibiotic, and also new multi-component forms of this active, with emphasis on co-crystals, using flavonoids as co-formers, with potential for synergistic antimicrobial activity, and amides. Currently, norfloxacin is used to treat gonorrhoea, prostate, urinary, biliary, and respiratory tract infections. This compound has been the subject of several studies due to its relevance in terms of applications and the need to improve some of its properties, namely its low aqueous solubility and hygroscopicity. Flavonoids are a class of natural polyphenolic compounds found in many foods and used as nutraceuticals or food supplements. They have antibacterial action as well as antioxidant, anti-inflammatory, anticoagulant, antihypertensive, anti-tumor, and cardioprotective effects. The flavonoids used in this work are quercetin, catechin, and myricetin.

Since publications referring to norfloxacin co-crystals are scarce and concern the association with carboxylic acids, the formation of co-crystals with co-formers containing the amide group was also investigated to explore another type of supramolecular synthon in the formation of co-crystals of this asset. Therefore, amides, namely benzamide, salicylamide and etenzamide, were also studied as co-formers. In addition, by using amides with increasing structural complexity, we were able to analyze the effect of the co-former structural complexity on the co-crystals formation. Both salicylamide and etenzamide are also active pharmaceuticals, opening up the possibility for dual therapy by preparing multi-component solid forms.

It was possible to identify methods to reproducibly obtain 3 polymorphs of norfloxacin, forms A, B and C, and a sesquihydrate. The results point to an enantiotropic relationship between forms A and B, and forms A and C of norfloxacin, with form A being the stable polymorph at temperatures close to melting temperatures. It was also identified that in the C form the norfloxacin molecule exists as a zwitterion, which has, until now, been observed only in solvates.

The investigation of multicomponent solid forms was carried out by mechanochemistry. In the study of the association between norfloxacin and flavonoids, it was possible to identify co-amorphous for the systems norfloxacin + quercetin and norfloxacin + catechin, the latter with low stability. The results also point to the association of norfloxacin and quercetin and of norfloxacin and myricetin in two supramolecular structures obtained by LAG, equimolar co-crystals that are solvated. These co-crystals and the co-amorphous with quercetin have the potential to be used in pharmaceutical applications and should therefore be further investigated.

Norfloxacin co-crystals were obtained with either benzamide (2:3 ratio) or salicylamide. With this last co-former, the stoichiometry of the co-crystal is (1:1), having been identified two polymorphs. With etenzamide, the mechanochemistry resulted in physical mixtures of the two compounds.

All solids investigated during this project were characterized using complementary techniques: Fourier transform infrared attenuated total reflectance spectroscopy (ATR-FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD), and thermogravimetry (TGA).





# **Capítulo 1**

## **Introdução**



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Antibióticos e resistência a antibióticos

As infecções causadas por agentes bacterianos são uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Os antibióticos representam uma das descobertas mais importantes da história da medicina para o tratamento bem-sucedido dessas mesmas infecções. O uso de antibióticos como agentes terapêuticos, iniciado pela primeira vez na primeira metade do século XX, permitiu um tratamento eficaz de infecções bacterianas complicadas e potencialmente fatais, poupando milhões de vidas, e representando ferramentas importantes na medicina moderna. Assim, os antibióticos também revolucionaram as possibilidades de intervenção médica para ajudar a aumentar a qualidade da vida humana [1].

Os antibióticos representam uma primeira linha de defesa de diversos microrganismos, que produzem e usam os antibióticos para combater inimigos naturais ou concorrentes por recursos nutricionais no seu ambiente próximo. Portanto, para a atividade antimicrobiana, a natureza inventou uma grande variedade de mecanismos de ação que envolvem a perturbação de estruturas bacterianas essenciais ou vias de biossíntese de macromoléculas, como a parede celular bacteriana, DNA, RNA ou proteínas, ameaçando assim o estilo de vida microbiano específico e, eventualmente, até a sobrevivência. No entanto, juntamente com modos altamente inventivos de ação antibiótica, a natureza também desenvolveu um conjunto comparável de mecanismos de resistência que ajudam as bactérias a contornar a ação antibiótica. Os microrganismos desenvolveram respostas adaptativas específicas que permitem reagir adequadamente à presença de agentes antimicrobianos, garantindo a sobrevivência durante o stress antimicrobiano, ou seja, as bactérias neutralizaram a pressão dos antibióticos e desenvolveram ou adquiriram resistências que tornam inativos os medicamentos anteriormente eficazes [1].

Posto isto, a resistência aos antibióticos, comumente usados, constitui um grave problema no tratamento das doenças infecciosas, sendo, atualmente, uma realidade a nível global e um dos principais desafios enfrentados pela medicina moderna em todo o mundo.

As últimas décadas testemunharam um rápido progresso na compreensão dos múltiplos fatores que afetam o surgimento e a disseminação da resistência a antibióticos ao nível da população e de cada paciente [2]. Esta resistência foi impulsionada por um conjunto diversificado de fatores, incluindo prescrições inadequadas de antibióticos, utilização excessiva e incorreta dos antibióticos (falha na toma, doses inadequadas, interrupção do tratamento prescrito pelo médico, uso de “sobras” sem indicação médica, por exemplo), uso de antibióticos fora do setor de saúde e fatores genéticos intrínsecos a bactérias [3]. Isto leva a uma diminuição do seu efeito e, por vezes, há uma necessidade de aumento das doses terapêuticas, o que promove

uma maior resistência, ou seja, favorece a propagação de bactérias resistentes, tornando-se uma ameaça para a saúde pública no mundo inteiro.

Em tempos de rápido desenvolvimento e disseminação de multiresistência a antibióticos é necessário explorar novas estratégias de anti resistência para combater infecções bacterianas. De duas vias possíveis, uma passa pelo desenvolvimento de antibióticos com novos mecanismos de ação e a outra por incrementar a eficácia de antibióticos de classes estabelecidas.

Portanto, a melhor maneira de combater essas infecções seria desenvolver uma nova classe de agentes antibacterianos potentes, uma abordagem extremamente cara e demorada devido a certas características do mercado de antibióticos que provavelmente dificultam o investimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos medicamentos. Além disso, a probabilidade de sucesso é bastante discutível. Por isso é que é tão importante o desenvolvimento de abordagens alternativas para combater a ameaça da resistência aos antibióticos que incluem novos métodos de identificação de medicamentos antibacterianos ou encontrar compostos naturais que possam melhorar o efeito antibacteriano dos antibióticos comumente usados, através de efeitos sinérgicos entre os mesmos [3].

Por todas estas razões e por todas as razões mencionadas anteriormente, existe também um grande interesse em diminuir a dosagem de antibióticos sintéticos.

A co-cristalização é uma importante estratégia a explorar para a preparação de antibióticos com atividade incrementada, por via de formação de co-cristais cujo co-formador mostra atividade antimicrobiana sinérgica. Poderá ser também usada para melhorar a biodisponibilidade oral do ativo, e assim reduzir a dosagem na formulação.

O trabalho apresentado nesta tese tem como objetivo a investigação de novas formas multicomponente, com relevo para co-cristais de um antibiótico de larga utilização, norfloxacin [4] [5] [6], utilizando como co-formadores flavonóides com potencial para atividade antimicrobiana sinérgica [7] [8] [9]. Uma vez que as publicações de norfloxacin que identificam co-cristais, são escassas e dizem respeito à associação com ácidos carboxílicos [10], investigou-se também a formação de co-cristais com co-formadores contendo o grupo amida, por forma a explorar outro tipo de sintão supramolecular na formação de co-cristais deste ativo.

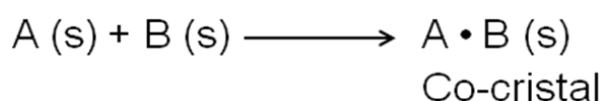
## **1.2 Formas sólidas e a indústria farmacêutica: co-cristais**

O *design* e síntese de cristais multicomponente, tais como co-cristais, despertaram o interesse da indústria farmacêutica, com a introdução de diretrizes regulatórias pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA como resultado de um portfólio expandido de patentes [11]. O artigo de Almarsson e Zaworotko, em 2004 [12], marca o início formal dos co-cristais farmacêuticos como uma classe distinta de novos materiais cristalinos que podem ser úteis na formulação de medicamentos orais. Os mesmos possuem características que se revelam vantajosas relativamente a outras estratégias amplamente estudadas, nomeadamente as suas propriedades estruturais, devido à capacidade destas formas sólidas alterarem e otimizarem as propriedades do sólido, para aplicações farmacêuticas, comparativamente à substância original e a grande variedade de formadores que podem ser incorporados na sua constituição [13] [14].

Apesar da recente popularidade generalizada dos co-cristais, ainda não existe uma definição universalmente aceita na comunidade científica para este tipo de compostos. No entanto, é aceitável definir-se co-cristais farmacêuticos como estruturas supramoleculares, sólidos cristalinos, constituídos por duas ou mais substâncias neutras ou iônicas (API e co-formador), os quais quando puros, são sólidos à temperatura e pressão ambiente, ligadas entre si numa estrutura cristalina única, com estequiometria bem definida e que interagem entre si, normalmente por ligações não-covalentes e não iônicas complementadas por outras interações intermoleculares mais fracas, sem transferência de prótons [15]. Estes têm sido relevantes na indústria farmacêutica devido ao seu potencial para melhorar propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de ativos sólidos, nomeadamente a estabilidade, morfologia, tamanho das partículas, ponto de fusão, forma física, higroscopicidade, solubilidade, velocidade de dissolução intrínseca, permeabilidade, biodisponibilidade oral, toxicidade e propriedades mecânicas (como o escoamento, a compressibilidade e compactação) de APIs [13] [16] [17] [18]. Podem permitir, também, a redução dos efeitos colaterais e o aumento da efetividade do medicamento [19].

O termo co-cristal farmacêutico, aplica-se quando pelo menos uma das substâncias é um ativo farmacêutico (API), que se associa a um aditivo benigno, designado de co-formador [20] [21], geralmente considerado seguro para consumo humano, selecionado da lista de compostos *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*), aprovada pela FDA ou um outro ativo farmacêutico [19] [22] [23]. Juntos podem conferir propriedades melhoradas e o co-cristal do API será seguro para uso em novas formulações [24].

A interação que leva à formação de um co-cristal encontra-se representada na Figura 1, em que A representa um API e B um co-formador. Assim, um co-cristal farmacêutico resulta da interação de um API com um co-formador.



**Figura 1.** Formação de um co-cristal.

Embora a diversidade de possíveis arranjos de empacotamento de cristais torne difícil prever as propriedades a partir das de um API e do co-formador [25], Aakeroëy *et al.* relataram que os co-formadores podem ser selecionados para alterar sistematicamente as propriedades das formas sólidas, demonstrando que o aumento do comprimento da cadeia de carbono dos co-formadores leva a reduções previsíveis na solubilidade [26]. Este conceito pode ser aplicado para alterar a farmacocinética de um API, o que pode resultar em ativos previamente rejeitados que chegam novamente a ensaio clínico. Além disso, como a forma co-cristal pode permitir maior solubilidade e subsequente absorção do API, pode-se provar que é necessário menos API presente no medicamento, como é o caso do Entresto® [27].

Outra forma de melhorar as propriedades físico-químicas é fazer pesquisa de formas polimórficas [28] [29] [30] [31] [32]. No entanto, existem algumas reservas quanto à sua utilização, uma vez que estas podem sofrer transformações noutros polimorfos termodinamicamente mais estáveis, como é o caso de alguns medicamentos que passado alguns anos, depois do seu lançamento, são retirados do mercado devido à sua transformação num polimorfo que pode, por exemplo, reduzir a biodisponibilidade oral do fármaco ou afetar qualquer outra propriedade físico-química [33]. Os co-cristais também podem exibir

polimorfismo, e assim possuir diferentes propriedades físico-químicas, entre as diferentes formas cristalinas [13] [18] [34] [35].

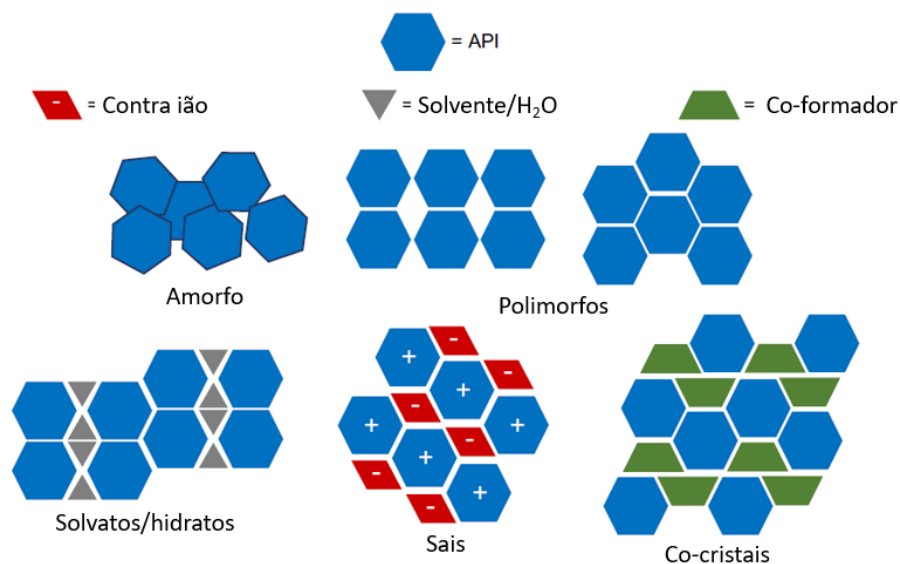
A formação de sais é uma outra abordagem à síntese de candidatos no estado sólido utilizados, também, para a modificação das propriedades físicas dos APIs, resolvendo a fraca solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade oral [28] [29] [32] [36] [37]. Um sal resulta de uma reação ácido-base entre o API e uma substância que seja um ácido ou base, como tal, tem uma limitação pois o API deve possuir um local ionizável (básico ou ácido) apropriado. Os co-cristais têm a vantagem de, em relação aos sais, utilizar compostos não iônicos, uma vez que nem todos os compostos possuem grupos funcionais básicos ou ácidos o suficiente para dar origem a sais [38] [39]. Além disso, existe um maior número de potenciais co-formadores de co-cristal não tóxicos que podem ser incorporados numa reação de co-cristalização, do que ácidos e bases considerados como aceitáveis no desenvolvimento de formulações [18] [39].

Pode-se ainda tentar obter solvatos, que se podem formar no processo de cristalização quando o solvente é retido e incorporado como parte da estrutura cristalina [28] [29] [32] [37]. As moléculas do solvente na estrutura do cristal podem diminuir o espaço vazio no mesmo ou, por exemplo, servirem de ponte em ligações de hidrogénio entre as moléculas do API. No entanto, a maioria dos solventes, são biologicamente tóxicos; como resultado, a maioria dos cristais contendo solvente são evitados no desenvolvimento da forma sólida de um API, pois pode afetar profundamente a estabilidade do mesmo [40] [38]. Uma exceção importante é a subclasse de hidratos, que são bem conhecidos em produtos farmacêuticos. Algumas moléculas farmacêuticas são capazes de formar hidratos. Como resultado de tensões induzidas pelo processo, como mudanças na temperatura, pressão ou humidade relativa, os hidratos convertem-se, frequentemente, em formas de cristal anidro. Esta conversão de hidrato em anidrato pode resultar em mudanças significativas nas propriedades físicas e pode apresentar problemas importantes, por exemplo, durante o armazenamento, onde a conversão de hidrato pode comprometer a aparência e integridade da forma farmacêutica [32].

Os co-cristais tendem a ser mais estáveis do que os solvatos ou os hidratos, pois os solventes tendem a tornar os sistemas mais dinâmicos, e mostram uma pressão de vapor mais elevada, sendo comum observar dessolvatação/desidratação em formas farmacêuticas sólidas. Assim, a perda de solvente conduz, frequentemente, ao aparecimento de fases amorfas, que quimicamente, são menos estáveis podendo evoluir para formas cristalinas menos solúveis. Por oposição, a maioria dos formadores de co-cristal não são suscetíveis de se evaporar a partir das formas sólidas, evitando-se a separação de fases e outras alterações físicas menos desejáveis [29].

Quanto aos compostos amorfos, estes podem evoluir para a estrutura cristalina do composto em causa, mais estável termodinamicamente [41] [42]. A tecnologia co-amorfa foi introduzida recentemente para estabilizar ativos no estado amorfo para o desenvolvimento de novos medicamentos. O estado co-amorfo é um estado amorfo no qual um ativo é misturado com outros fármacos ou com um composto de baixo peso molecular, como seja um excipiente. Não há limitação no número de componentes num estado co-amorfo. Alguns estudos relataram que a estabilidade física de um ativo é melhorada após a formação de um sistema co-amorfo em comparação com a forma amorfa dos compostos constituintes. Além de melhorar a estabilidade física, a formação de sistemas co-amorfos melhora, também, o perfil de dissolução do ativo [43].

Assim sendo, os co-cristais têm vindo a ganhar peso na investigação de novas formas cristalinas de ativos farmacêuticos, surgindo como alternativa às estratégias acima referidas e apresentadas na Figura 2, que envolvem o uso de polimorfos, sais ou solvatos e hidratos, promovendo melhorias nas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, como as referidas anteriormente, evitando a quebra ou a formação de ligações covalentes [38] e não comprometendo a bioatividade do API [44] [45].



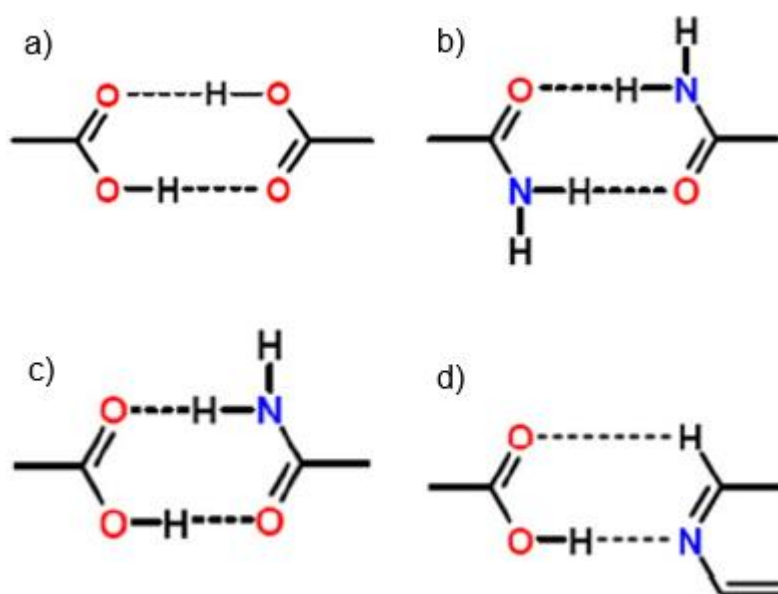
**Figura 2.** Diferentes formas sólidas de ativos farmacêuticos [39].

Nos co-cristais podem estabelecer-se vários tipos de interações intermoleculares: ligações de hidrogénio, interações  $\pi$ - $\pi$  e interações de van der Waals [16] [18] [40]. As ligações de hidrogénio são interações intermoleculares com forte carácter direcional, que ocorrem entre um átomo de hidrogénio e dois átomos bastante eletronegativos (N, O, F) de forma que o hidrogénio sirva de ligação entre os átomos com os quais interage. São as interações intermoleculares mais fortes do ponto de vista energético e do ponto de vista de distâncias interatómicas. As ligações de hidrogénio fracas também têm sido referidas como tendo um papel importante na elaboração das estruturas cristalinas de co-cristais. A interação  $\pi$ - $\pi$  pode ocorrer, por exemplo, entre compostos orgânicos que contêm grupos aromáticos. São causadas por sobreposição intermolecular de orbitais p em sistemas conjugados  $\pi$ . São tanto mais fortes quanto maior for o número de eletrões  $\pi$ . Nas interações de van der Waals, estão englobadas as forças de London ou dipolo-instantâneo, dipolo-induzido, as interações dipolo permanente-dipolo induzido e dipolo permanente-dipolo permanente [46]. Estas são as interações intermoleculares disponíveis para uma variada gama de funcionalidades e topologias que resultam numa ampla gama de oportunidades de formação de novas estruturas em fase sólida.

As interações mais importantes que levam à formação de um co-cristal são as ligações de hidrogénio intermoleculares. Numa fase inicial dever-se-á ter em conta quais os grupos funcionais presentes na molécula do API para posteriormente selecionar os possíveis co-formadores que devem ter grupos funcionais complementares aos do API em causa [18] [19] [28].

Uma compreensão detalhada da química supramolecular dos grupos funcionais presentes numa dada molécula é, portanto, um pré-requisito fundamental para a formação de um co-cristal, uma vez que facilita a seleção de co-formadores apropriados para que estabeleçam com o API sintões supramoleculares viáveis [30] [38]. Deste modo, como já referido anteriormente, é fundamental que existam grupos funcionais específicos, complementares no API e no co-formador.

A unidade estrutural que liga as duas moléculas e leva à formação de um co-cristal designa-se por sintão supramolecular [30] [38], que pode ser formado por operações de síntese que envolvem interações intermoleculares [47]. Observando a composição estrutural de co-cristais conhecidos, é fácil concluir que estes são o exemplo perfeito de supermoléculas, uma vez que são constituídos, precisamente, por moléculas ligadas por interações intermoleculares que dão origem a uma rede cristalina, e, portanto, não é de estranhar que esta designação tenha sido adotada. Estes sintões podem ainda ser divididos em dois tipos, homo e heterosintões [12] [48]. Os homosintões representam a interação entre grupos funcionais idênticos e complementares que dão origem, por exemplo, a dímeros ou cadeias. Os heterosintões envolvem a interação entre grupos funcionais que, embora diferentes, são também complementares [49] [50]. Na Figura 3 estão representados exemplos de homosintões (ácido carboxílico-ácido carboxílico e amida-amida) e heterosintões (ácido carboxílico-amida e ácido carboxílico-heterocíclico) [51] [52]. Alguns destes sintões são relevantes, tendo em conta os grupos funcionais do API e dos co-formadores escolhidos neste trabalho, devido à capacidade destes grupos funcionais para participarem em ligações de hidrogénio como dadores ou como aceitadores.



**Figura 3.** Representação de homo e heterosintões supramoleculares: a) homosintão ácido-ácido; b) homosintão amida-amida; c) heterosintão ácido-amida; d) heterosintão ácido-azoto heterocíclico.



No entanto, a abordagem de formação de sintões supramoleculares pode ter desvantagens, uma vez que não é quantitativa: embora a formação do sintão (formação do sistema multicomponente) possa ser favorável, pode não ser possível o seu empacotamento numa estrutura cristalina ordenada [18] [31]. Quando vários grupos funcionais estão presentes numa molécula, como é frequente para muitos APIs, a CSD raramente contém informação suficiente para estabelecer a hierarquia dos possíveis sintões supramoleculares [38] [53]. Além disso, a abordagem não considera fatores como a competição entre os diferentes grupos funcionais presentes no API ou no co-formador, nem o impedimento estéreo entre os grupos dadores ou aceitadores de próton das ligações de hidrogénio, podendo condicionar a associação API:co-formador [18] [31].

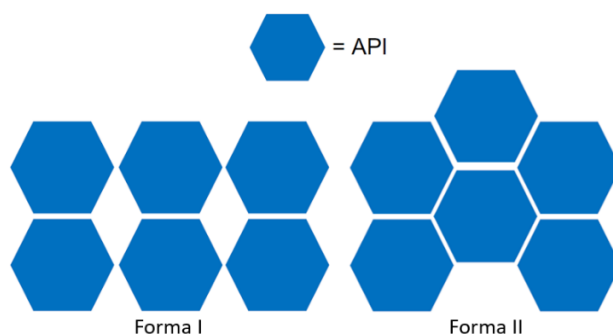
As metodologias de preparação de co-cristais, incluem moagem a seco, técnicas de moagem assistida por solvente e cristalização em solução, entre outras [54]. A cristalização em solução, requer conhecimento da solubilidade dos componentes da unidade e geralmente é rastreada usando diagramas de fase ternários, sendo determinada por vários fatores, incluindo a solubilidade diferencial dos componentes da unidade, escolha apropriada do solvente, pH final após a dissolução dos componentes, sobressaturação, temperatura, taxas de evaporação ou arrefecimento e presença de impurezas [55]. É um dos métodos utilizados, mas com o avançar dos anos, surgiram novas técnicas de co-cristalização de extrema importância sobretudo para combater a elevada utilização de solventes, de acordo com os princípios da química verde [56] [57]. Estas técnicas, apelidadas de *solvent free*, têm como característica a redução drástica da utilização de solventes, apresentando, ao mesmo tempo, resultados semelhantes, ou mesmo mais satisfatórios, quando comparadas com técnicas tradicionais. Um exemplo deste tipo de técnicas é a moagem a seco ou assistida por líquido (LAG), de especial relevância para este projeto [56] [32] [58]. Os co-cristais desenvolvidos podem ser caracterizados com sucesso usando várias técnicas analíticas e podem ser avaliados através das suas propriedades físico-químicas.

Em conclusão, uma vez que os co-cristais farmacêuticos são formas cristalinas diferentes do API, aumentam a gama de formas sólidas disponíveis para a formulação. Os co-cristais representam um novo paradigma no domínio da formulação de medicamentos possibilitando a proteção da propriedade intelectual com a possibilidade de registo de novas patentes [59] [60] [61].

### 1.2.1 Polimorfismo

A administração de medicamentos por via oral recorrendo a formulações sólidas é a forma mais conveniente, eficaz, segura, de baixo custo, e, portanto, a mais comum. Uma vez que a eficácia terapêutica dos APIs está diretamente relacionada com as suas características estruturais (polimorfismo), com o hábito cristalino (morfologia) e com o tamanho das partículas [62] [63], o controlo da estrutura dos APIs ou das suas formas polimórficas é uma das exigências farmacêuticas [62] [64]. Portanto, o polimorfismo, atualmente, é considerado um desafio na investigação da química do estado sólido, na engenharia de cristais e, conseqüentemente, uma propriedade a estudar durante a fase de pré-formulação [65].

O polimorfismo é definido como a capacidade de um composto cristalizar em diferentes formas ou estruturas cristalinas, cada uma delas tendo a mesma estrutura química, mas arranjos (polimorfismo de empacotamento) ou conformações (polimorfismo conformacional) diferentes das moléculas na rede cristalina: um composto apresenta estruturas cristalinas diferentes, tal como está representado na Figura 4, diferentes interações intermoleculares e consequentemente diferentes energias de Gibbs [32] [31]. Assim, o polimorfismo pode influenciar as propriedades físico-químicas, uma vez que, diferentes polimorfos exibem diferentes propriedades físico-químicas como, hábito cristalino, dureza, densidade, solubilidade, velocidade de dissolução intrínseca, biodisponibilidade oral, estabilidade química e física e ponto de fusão, entre outras propriedades [63] [64] [66] [30].



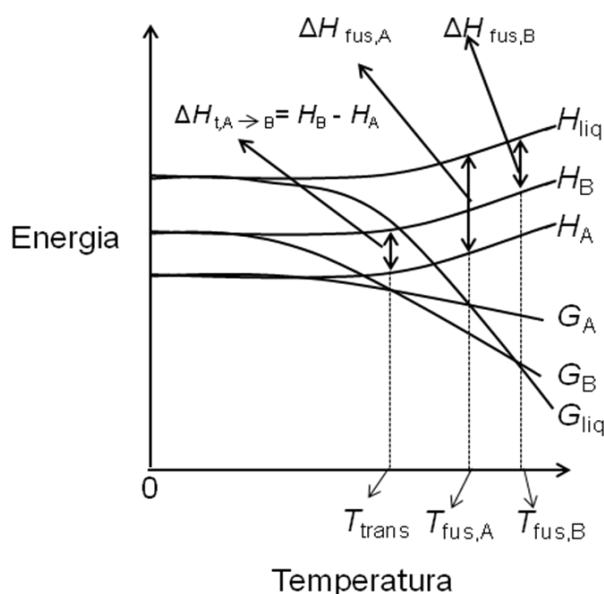
**Figura 4.** Esquema de duas estruturas cristalinas diferentes de um ativo farmacêutico.

Como as diferenças entre polimorfos podem alterar a qualidade e a eficácia terapêutica de um medicamento, a pesquisa (identificação, caracterização e controle) dos mesmos é obrigatória na indústria farmacêutica, assegurando a garantia de qualidade dos medicamentos produzidos. Por vezes, o polimorfo mais estável é de difícil síntese ou uma forma metaestável tem propriedades favoráveis. Independentemente da forma escolhida para o desenvolvimento, é da maior importância para a indústria farmacêutica garantir processos confiáveis e robustos. Atualmente, conhecemos alguns medicamentos que tiveram de ser retirados do mercado porque surgiram novos polimorfos desses medicamentos que possuem propriedades físico-químicas diferentes, como por exemplo, menor solubilidade que, por consequência, influenciará a biodisponibilidade oral do medicamento, alterando, assim, a sua eficácia e segurança terapêutica [66] [67] [68]. Portanto, é de grande interesse para a indústria farmacêutica estudar quais os polimorfos mais adequados e que apresentam melhores propriedades para serem comercializados. As formas polimórficas metaestáveis são mais solúveis, promovendo maior biodisponibilidade. No entanto, as formas polimórficas metaestáveis possuem baixa estabilidade termodinâmica, podendo ser necessário adicionar outros compostos à formulação para garantir a estabilidade [66].

Atualmente, é possível identificar e monitorizar a formação de diferentes formas polimórficas porque, dependendo da metodologia utilizada para obtenção das diferentes formas cristalinas, esta pode gerar polimorfos diferentes consoante as condições experimentais utilizadas, ou seja, determinadas condições podem gerar um polimorfo e outras condições diferentes podem gerar outro polimorfo do mesmo API. Pode acontecer, também, obter-se o mesmo polimorfo em condições diferentes [64] [69].

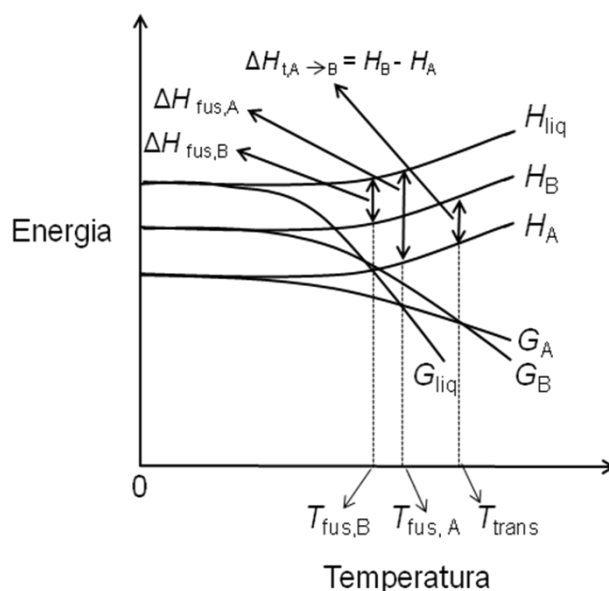
A capacidade de um polimorfo específico cristalizar é geralmente determinada por fatores termodinâmicos e cinéticos. Esses fatores devem ser bem compreendidos para explorar e controlar o comportamento polimórfico de uma substância. A estabilidade relativa dos polimorfos depende das suas energias de Gibbs e sob condições experimentais definidas, o polimorfo termodinamicamente mais estável a uma dada pressão e temperatura tem a menor energia de Gibbs, sendo que os outros polimorfos são designados de formas metaestáveis. Sob interpretação termodinâmica, o cristal passa de uma forma menos estável para uma forma mais estável. Na perspectiva farmacêutica, a forma mais estável nem sempre é a mais desejada, porque como possui uma maior estabilidade termodinâmica é menos solúvel e, por conseguinte, poderá mostrar menor biodisponibilidade oral. A transformação de uma forma polimórfica noutra mais estável é explicada pelos diagramas de energia em função da temperatura, estes ditam se as modificações polimórficas se podem transformar de forma reversível (enantiotropia) ou irreversível (monotropia) à pressão atmosférica [61].

Na Figura 5 está representado o diagrama de energia em função de temperatura, a pressão constante de duas formas polimórficas A e B. Inicialmente a forma A é a mais estável visto que possui menor energia de Gibbs. É possível observar, também, que antes da fusão de ambos os polimorfos, ocorre uma transição sólido-sólido do polimorfo A para o polimorfo B. A temperatura de transição pode ser definida como a temperatura à qual os dois polimorfos apresentam a mesma energia de Gibbs. Acima da temperatura de transição, o polimorfo B é o mais estável visto que apresenta menor energia relativamente ao polimorfo A. A fusão da forma A é definida através da interseção da curva  $G_{liq}$  com a curva  $G_A$  e a fusão da forma B é definida pela interseção da curva  $G_{liq}$  com a curva  $G_B$ . As entalpias de transição  $\Delta H_{trans}$  e de fusão  $\Delta H_{fus}$  são calculadas para o valor de temperatura da respetiva transição, sendo o valor de  $\Delta H_{trans A \rightarrow B}$  obtido pela diferença de valor entre as curvas de entalpia dos dois polimorfos à temperatura de transição. Este tipo de diagramas de energia em função da temperatura caracteriza polimorfos enantiotrópicos [70].



**Figura 5.** Diagrama de energia em função de temperatura, a pressão constante, num sistema dimórfico enantiotrópico [70].

É possível que um dos polimorfos seja sempre o mais estável até atingir o seu ponto de fusão. Um comportamento deste tipo representa um sistema monotrópico, cujo diagrama de energia em função da temperatura está representado na Figura 6. Neste caso a transição de um polimorfo noutro ocorre para temperaturas superiores aos pontos de fusão de cada um dos dois polimorfos. Assim, antes da temperatura de fusão de ambos os polimorfos não é possível ocorrer uma transição sólido-sólido reversível [70].



**Figura 6.** Diagrama de energia em função da temperatura, a pressão constante, para um sistema dimórfico monotrópico [70].

Concluindo, os polimorfos podem ser classificados como enantiotrópicos ou monotrópicos, consoante as diferenças de estabilidade termodinâmica e da possibilidade de uma forma poder, ou não, transformar-se reversivelmente na outra. Num sistema enantiotrópico a transição reversível entre polimorfos ocorre antes da temperatura de fusão de ambos os polimorfos, enquanto que num sistema monotrópico isto já não se verifica, ou seja, no caso da monotropia, a forma de temperatura fusão superior é sempre a forma termodinamicamente estável enquanto que na enantiotropia, a forma de ponto de fusão inferior é a forma termodinamicamente estável em temperaturas abaixo do ponto de transição, e a forma de ponto de fusão superior é a forma termodinamicamente estável em temperaturas acima do ponto de transição [70].

### 1.3 Quinolonas

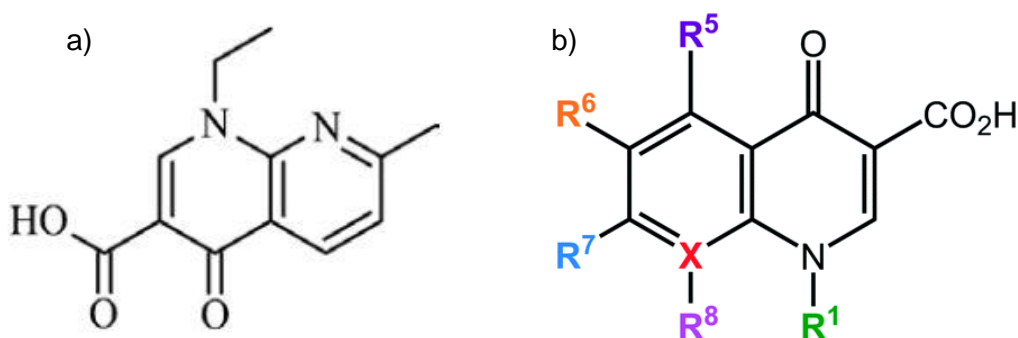
As quinolonas são agentes antibacterianos sintéticos, estruturalmente relacionados com o ácido nalidíxico (Figura 7a) que surgiram no início dos anos 60 [71], com os primeiros exemplos dotados de um espectro estreito de atividade antimicrobiana e com propriedades físico-químicas desfavoráveis. Com o tempo, o desenvolvimento de novas quinolonas levou a análogos com um espectro de atividade largo e de alta eficácia [72] [73] [74] [75] [76].

As quinolonas são escolhidas como antibióticos há mais de cinco décadas devido à sua elevada potência, amplo espectro de atividade, biodisponibilidade oral favorável, formulações convenientes e altas concentrações séricas, além de uma incidência, comparativamente, baixa de efeitos colaterais [77]. Com base no seu espectro de atividade, as quinolonas são classificadas em quatro gerações [78] [79]. O desenvolvimento de quinolonas de geração em geração para obter uma atividade de espectro mais amplo prosseguiu pela adição de diferentes substituintes em posições diferentes no farmacóforo (Figura 7b) [72] [73]. As alterações estruturais têm como objetivo aumentar a atividade antibacteriana, melhorar as propriedades farmacocinéticas, nomeadamente a solubilidade aquosa das mesmas e também têm sido estudadas novas formulações, com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica e reduzir a frequência de administração. Por exemplo, o átomo de flúor e o anel piperazínico nas posições 6 e 7 (Figura 7b) ampliam consideravelmente a faixa de atividade e melhoram o perfil farmacocinético das quinolonas [72] [73] [76] [80].

Atualmente, as quinolonas são amplamente utilizadas no tratamento de infeções. São antibióticos de largo espectro e ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo micobactérias e anaeróbios. Destacam-se como um grupo de compostos específicos que atuam sobre duas enzimas essenciais na replicação do DNA bacteriano, a DNA *girase* e *topoisomerase IV*, inibindo-as. Esta capacidade está na base da sua atividade bactericida [81] [82]. No entanto, as bactérias adquiriram resistência às quinolonas, semelhantes a outros agentes antibacterianos, devido ao uso excessivo desses medicamentos [76] [77] [80].

As quinolonas, como ilustrado na Figura 7b, possuem vários grupos funcionais dadores (amina e ácido carboxílico) e aceitadores (oxigénio carbonílico) em ligações de hidrogénio, podendo originar sintões suscetíveis de originar formas polimórficas, bem como sólidos multicomponente tais como complexos, co-cristais, sais e hidratos/solvatos cristalinos.

Para a investigação de co-cristais será importante selecionar co-formadores contendo grupos complementares para a ligação de hidrogénio com estes grupos. As fluoroquinolonas têm grupos funcionais que podem ser protonados ou desprotonados em pH fisiológico. Em soluções aquosas, um equilíbrio dinâmico de várias formas protolíticas (aniónica, neutra, zwitteriónica e catiónica) pode ser encontrado. A presença de vários grupos funcionais nas suas estruturas cristalinas, passíveis de protonação, pode influenciar fortemente as propriedades das fluoroquinolonas, nomeadamente a sua biodisponibilidade oral [83].

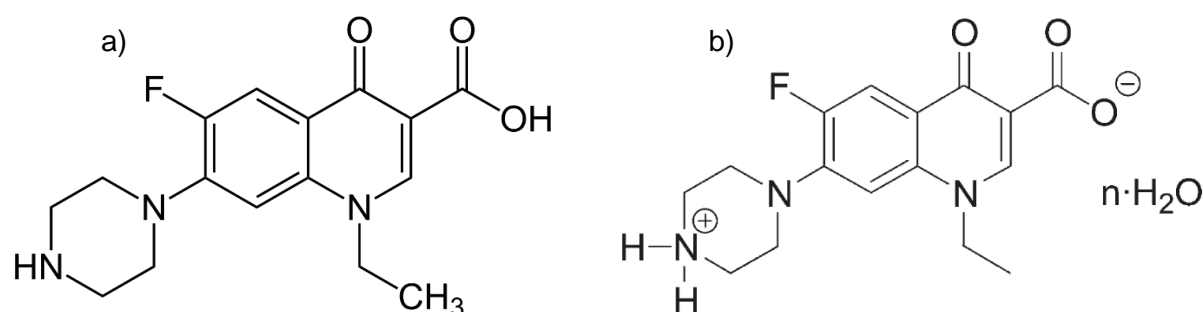


**Figura 7.** Estrutura Química de: a) ácido nalidíxico e b) farmacóforo dos antibióticos do tipo fluoroquinolonas.

Neste trabalho foi investigada a norfloxacina, NOR, uma fluoroquinolona de segunda geração pertencente à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, portanto possuindo baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade [84].

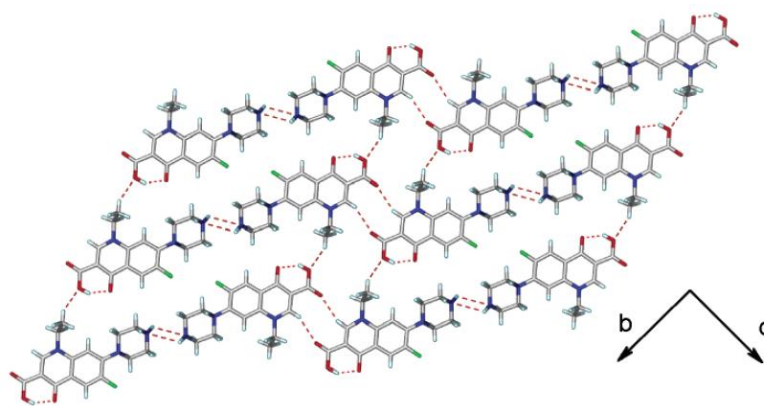
### 1.3.1 Norfloxacina

A NOR é uma fluoroquinolona sintética descoberta no final dos anos setenta, patenteada em 1978 e foi a primeira fluoroquinolona a receber a aprovação FDA dos EUA. A sua potência foi aumentada pela introdução de um átomo de flúor na posição R6 e um grupo piperazina na posição R7. A sua estrutura está representada na Figura 8. Atualmente, é usada para tratar gonorreia, infecções da próstata, urinárias, biliares e do trato respiratório [82] [85]. O composto tem sido objeto de diversos estudos dada a sua relevância a nível de aplicações e a necessidade de melhorar algumas das suas propriedades, nomeadamente a baixa solubilidade aquosa e a higroscopicidade.

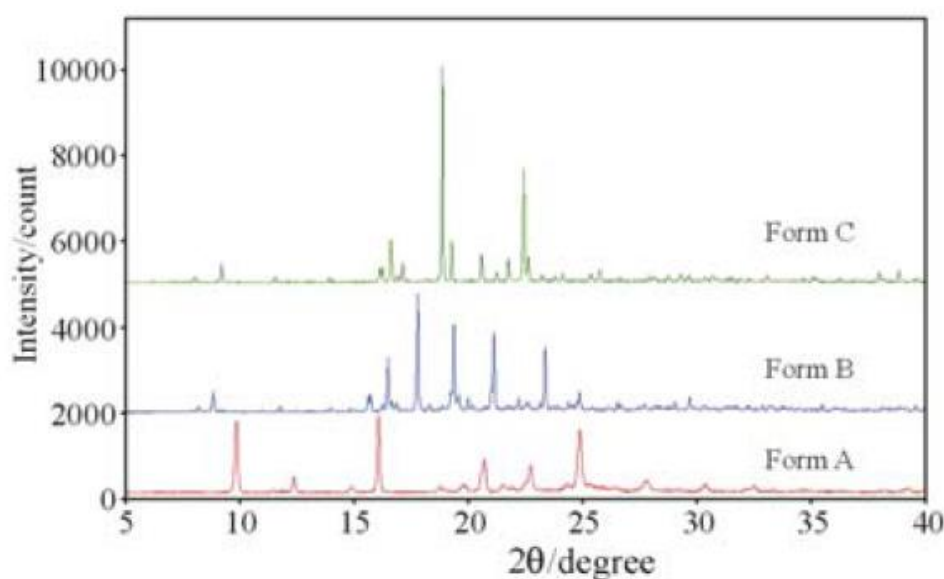


**Figura 8.** Estrutura química da norfloxacina a) neutra e b) forma zwitteriônica [6].

Estão reportadas na literatura três formas anidras de norfloxacina, identificadas por forma A [86] [4] [87], forma B [4] e forma C [88] sendo também indicada a obtenção de um amorfo por *spray drying*. [86] Apenas é conhecida a estrutura cristalina da Forma A, Figura 9, não zwitteriônica, um resultado que foi alvo de controvérsia [4] [5] [87] que foi esclarecido pelos próprios autores [4]. Os difratogramas de pó das três formas anidras são apresentados na Figura 10 [4] [88] [5]. Sustar *et al.* atribuíram uma relação de monotropia às formas A e B, sendo A a forma termodinamicamente estável o que foi contestado mais tarde por Barbas *et al.* [4] que propôs a relação de enantiotropia sendo A a forma estável antes da fusão. A relação de enantiotropia é proposta por Barbas *et al.* [5] entre as formas A e C (A estável a temperatura elevada), a qual deve ser encarada com cautela dada a identificação incorreta da forma A.



**Figura 9.** Estrutura cristalina da Forma A, CCDC 617104 [87].



**Figura 10.** Difratogramas de raios-X de pó das formas anidras A, B e C da norfloxacina [4] [5] [88].

A NOR anidra capta umidade rapidamente sob condições ambientais para formar diferentes hidratos. Estão descritos vários hidratos: dihidrato [89] [90] [91], hidrato 1.25 e o hidrato 1.125 [92] e um sesquihidrato que possui duas formas, a Forma I ( $1.5\text{H}_2\text{O}$ ) mais estável à temperatura ambiente que se transforma num outro polimorfo, a Forma II ( $3\text{H}_2\text{O}$ ), mais estável a uma temperatura baixa ( $-40\text{ }^\circ\text{C}$ ) [6] [87] para os quais as estruturas cristalinas estão resolvidas. Também estão descritos os hidratos: hemipentahidrato, trihidrato e pentahidrato, para os quais a estrutura cristalina não foi resolvida [93]. O dihidrato foi descrito como a forma termodinamicamente estável à temperatura e umidade ambiente [89] [90].

A hidratação desempenha um papel importante na alteração da solubilidade e estabilidade dos medicamentos e cerca de um terço dos medicamentos são capazes de formar hidratos, o que frequentemente altera a sua propriedade farmacológica, perfil de taxa de dissolução e estabilidade da formulação. Os hidratos de norfloxacina têm em comum a natureza

zwiteriônica do composto, que tem como consequência uma maior solubilidade aquosa das formas hidratadas, contrariamente ao que é habitual. A disponibilidade de estruturas cristalinas de raios-X adicionais confirma o estado zwiteriônico da NOR em todas as formas hidratadas e isso poderia explicar a maior solubilidade dos hidratos em comparação com a forma anidra triclinica (forma A) [89].

Dada a relevância da norfloxacinina como ativo farmacêutico, vários investigadores têm procurado obter sólidos multicomponente deste ativo com o objetivo de incrementar o seu desempenho biofarmacêutico. Um conjunto vasto de sais é referido na literatura [87] [94] [95] [10] [96] [97] [98] [99] [100] por exemplo com ácidos orgânicos como os ácidos succínico, malónico e maleico [87], ácidos oxálico, tartárico e benzóico [10] e com ácido fumárico [100]. Foram também identificados um sacarinato de norfloxacinina, resultante de interações iônicas entre a amida de sacarina e a piperazina da fluoroquinolona [95] e um outro sal com o edulcorante acesulfame [96]. Sete novos sais moleculares de NOR com vários ácidos orgânicos (ácido adípico, ácido múcico, ácido benzóico, ácido naftaleno-1,5-dissulfônico e ácido naftaleno-2-sulfônico) foram sintetizados e as suas estruturas cristalinas determinadas por Xu *et al.* [97]. A formação de hidratos foi comumente observada entre estes sais de NOR, exceto para o adipato que existe na forma anidra com solubilidade 100 vezes maior e taxa de dissolução intrínseca 20 vezes superior à da NOR em solução aquosa.

Alguns autores têm procurado sintetizar sólidos multicomponente, envolvendo a norfloxacinina e um outro ativo farmacêutico. Neste contexto, um novo sal de combinação antibacteriano/antimicrobiano hidratado de NOR e sulfatiazol (antimicrobiano) foi preparado por Gopi *et al.* [98] e mostrou maior inibição de espécies bacterianas e fúngicas, como resultado da difusão conjunta e aumento da solubilidade. Três novos sais multiativo e um sal hidratado da NOR com quatro anti-inflamatórios não-esteróides, diclofenac, diflunisal, ácido mefenâmico e indometacina (que formou o sal hidratado), foram preparados por moagem assistida por líquido tendo sido observada uma melhoria significativa da solubilidade da NOR, juntamente com o aumento da permeabilidade para algumas destas novas formas [99].

Recentemente, foram obtidos sais orgânicos e líquidos iônicos, baseados em NOR, como anião, em combinação com hidróxidos catiónicos orgânicos, com incremento da biodisponibilidade [101]. Os mesmos autores já tinham obtido sais orgânicos de NOR, usada como catião, com diferentes contra-íões biocompatíveis, como mesilato, gluconato e glicolato. [102] Todas estas novas formas revelaram melhoria das propriedades, sendo uma ferramenta muito promissora para a preparação de novas formulações eficazes para esses medicamentos.

As publicações identificando co-cristais de norfloxacinina são, no entanto, muito escassas. Vitorino *et al.* [103] obtiveram e caracterizaram pela primeira vez um co-cristal na proporção de 1:1 resultante da heteroassociação entre a norfloxacinina e a ciprofloxacina no estado sólido. Basavoju *et al.* [87], obtiveram um co-cristal solvatado de norfloxacinina e isonicotinamida, por cristalização em  $\text{CHCl}_3$  (solvato de  $\text{CHCl}_3$ ). Provaram, também, que neste solvato a NOR existe na forma zwiteriônica sem quaisquer moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ . Recentemente, foi resolvida a estrutura cristalina de um co-cristal (1:1) de norfloxacinina + ácido nicotínico [104].



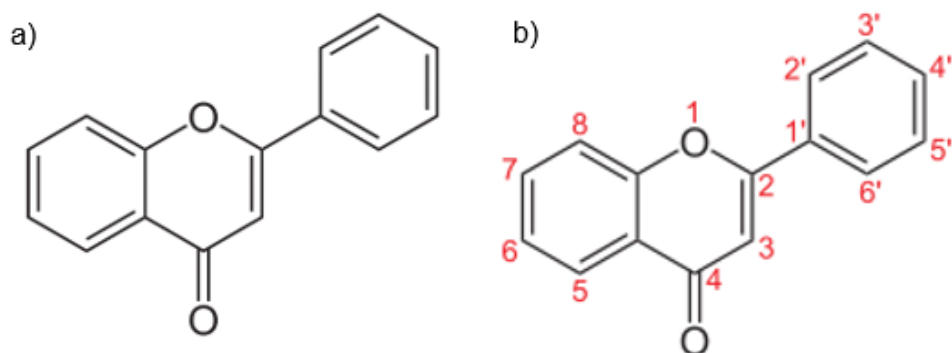
## 1.4 Flavonóides

Os flavonóides têm sido estudados extensivamente devido à observação de que dietas ricas nesses compostos estão associadas à menor incidência de muitas doenças, tendo sido indicados para promover uma vida saudável, em estudos epidemiológicos [105]. Os flavonóides são uma classe de compostos polifenólicos naturais, que se encontram em hortaliças, frutas, cereais, chás, café, cacau, vinho, cerveja, vinagre e soja, sendo usados como nutracêuticos ou suplementos alimentares. São derivados do composto original, flavona, cuja estrutura se encontra representada na Figura 11a. Para os flavonóides, também está descrita ação antibacteriana, possuindo uma concentração mínima inibitória na faixa de 0,02 a 10 mg/mL, entre outros efeitos, como por exemplo, o de antioxidantes, anti-inflamatórios, anticoagulantes, anti-hipertensivos, anti tumorais e cardioprotetores, apresentado, portanto inúmeros benefícios para a saúde [106] [107].

A eficácia dos flavonóides contra uma grande variedade de bactérias pode ser atribuída à sua permeabilidade através da parede celular e à forte ligação às purinas na membrana externa das bactérias - parece provável que os compostos possam bloquear as cargas dos aminoácidos existentes nas purinas [108]. A atividade dos flavonóides também pode ser devida à sua capacidade de se associar com as proteínas extracelulares da parede bacteriana. Os mesmos autores também sugerem que os flavonóides mais lipofílicos podem perturbar as membranas microbianas [109].

Uma vez que os flavonóides têm demonstrado propriedades antimicrobianas contra um amplo espectro de microrganismos, podem ser uma alternativa à terapia convencional, podendo contribuir para o combate a bactérias multirresistentes. Como substratos, inibidores e indutores, eles interagem com uma variedade de sistemas enzimáticos. Em estudos recentes foi provado que os flavonóides, nomeadamente os que vão ser usados neste trabalho, podem potenciar a atividade das quinolonas, pois exibiram atividade sinérgica quando combinados com várias destas, nomeadamente com a NOR [7] [8] [9].

No entanto, as aplicações terapêuticas dos flavonóides têm sido bastante limitadas devido à baixa solubilidade aquosa e baixa biodisponibilidade oral. Mas, recentemente, uma melhoria significativa na biodisponibilidade oral de flavonóides foi alcançada pela formação de co-cristais [19] [110] [111] [112]. A estrutura molecular dos flavonóides têm anéis aromáticos substituídos com mais do que um grupo hidroxilo, e outros grupos funcionais, como ilustrado nas Figuras 11b, 12, 13 e 14, que podem atuar como aceitadores e doadores de próton, altamente suscetíveis a formação de ligações de hidrogénio com funcionalidades complementares e, portanto, bastante promissores para a formação de co-cristais.

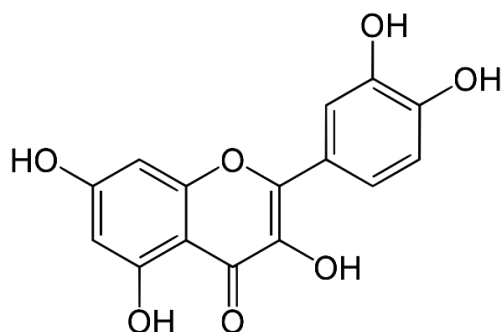


**Figura 11.** Estrutura molecular: a) flavona e b) geral dos flavonóides.

Os flavonóides utilizados na realização deste trabalho são a quercetina (QUE), a catequina (CAT) e a miricetina (MYR).

### 1.4.1 Quercetina

A quercetina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 12, é um dos flavonóides dietéticos mais estudado, abundante e comum no reino vegetal, de extrema importância biológica [113] [114], existindo na forma anidra e em várias formas hidratadas (dihidrato e monohidrato) e solvatadas (solvato de quercetina e dimetilsulfóxido) [115] [116] [117] [118] [119] [120].



**Figura 12.** Estrutura molecular da quercetina.

A maior parte do trabalho relatado sobre a QUE, consiste em estudos em relação à sua atividade antitumoral, visto que a mesma inibe o crescimento das células tumorais, inibindo uma série de enzimas envolvidas nesse mesmo crescimento e há evidências experimentais para uma série de mecanismos [121]. Foi identificada bioatividade terapêutica *in vitro*, no entanto, a sua eficácia *in vivo* na forma pura é limitada pela baixa biodisponibilidade, principalmente devido à sua baixa solubilidade aquosa e conseqüente baixa absorção no intestino. Como tal, a QUE é um bom candidato para a co-cristalização e com o objetivo de melhorar as suas propriedades têm sido obtidos alguns co-cristais nomeadamente com cafeína, isonicotinamida, teobromina dihidratada, nicotinamida, ácido picolínico, 4,4'-bipiridina, isoniazida e com antioxidantes naturais, vitaminas e aminoácidos tais como: ácidos fenólicos, prolina, ureia, N-acetilcitosina, carnitina, dacarbazina, diflunisal, ácido kójico, lactamida, baclofen, pirazol, edaravone, salicilamida, O-acetilsalicilamida, 2-imidazolidinona, alopurinol, dipiridamol, ácido 5-sulfossalicílico e o ácido 4-sulfobenzoico [122] [123] [124] [125] [126] [127].

## 1.4.2 Catequina

A catequina, cuja estrutura se encontra representada na Figura 13, também possui um amplo espectro de atividades terapêuticas, tendo um papel como um fator capaz de aumentar a atividade antibacteriana de antibióticos selecionados *in vivo* através de efeitos sinérgicos da CAT com os mesmos [128]. No entanto, tem uma baixa solubilidade aquosa, má absorção intestinal e uma biodisponibilidade oral pobre (<5%) devido à baixa permeabilidade da membrana e alta taxa de biotransformação, restringindo a aplicação clínica. Decompõe-se facilmente durante a formulação, processamento e armazenamento, mostrando estabilidade reduzida na presença de oxigênio, espécies reativas e pHs alcalinos [129] [130]. Algumas estratégias já foram relatadas na literatura com o objetivo de melhorar estas propriedades [131] [132] [133] [134].

A co-cristalização com o L-(+)-ácido ascórbico também foi uma abordagem usada para melhorar a solubilidade e o perfil antioxidante da CAT [135].

Na literatura, encontra-se relatada uma forma hidratada [136] e previsões computacionais de algumas formas hidratadas e solvatadas da CAT [137] [138].

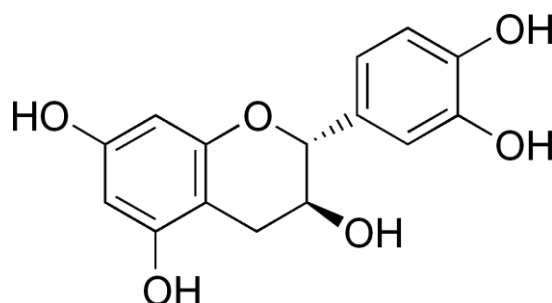
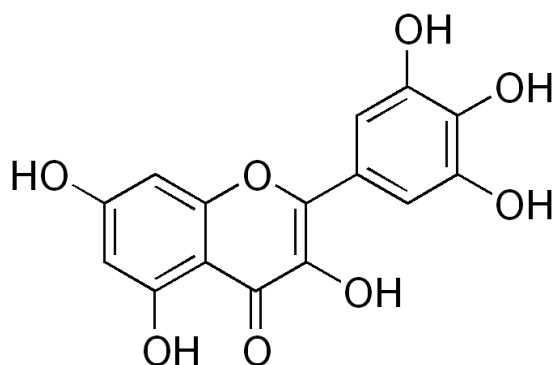


Figura 13. Estrutura molecular da catequina.

## 1.4.3 Miricetina

A miricetina, Figura 14, também possui um grande potencial terapêutico pois exibe uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas. Possui atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antidiabéticas, imunomoduladoras, cardioprotetoras, anti-hipertensivas anticancerígenas, anti-infeciosas, antimicrobianas e contra a doença de Alzheimer [139] [140] [141] [142] [143]. No entanto, possui baixa solubilidade aquosa, baixa biodisponibilidade oral e baixa estabilidade com dificuldade de formulação, restringindo a sua aplicação na medicina e como nutracêutico [144] [145] [146]. Os benefícios terapêuticos potenciais da MYR continuam a ser explorados com abordagens para melhorar estas propriedades, tais como a formação de complexos com ciclodextrinas e co-cristais com cafeína, nicotinamida, isonicotinamida, 4-cianopiridina, piracetam, prolina, acetamida e cloreto de berberina [144] [147] [148] [149] [150] [151] [152] [153] [154].



**Figura 14.** Estrutura molecular da miricetina.

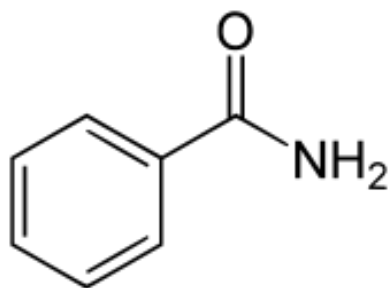
Franklin *et al.* [155] identificaram quatro formas cristalinas diferentes da MYR, dois hidratos e duas formas metaestáveis, todas com baixa solubilidade aquosa e rápida degradação. Muresan-Pop *et al.* [156] relataram a síntese de cristais monohidratados de MYR.

## 1.5 Amidas

Um outro objetivo desta investigação é o estudo de sólidos multicomponentes de norfloxacina utilizando diferentes co-formadores com a possibilidade de formação de diferentes sintões. Assim para além dos flavonóides mencionados anteriormente, estudaram-se, também, como co-formadores amidas, nomeadamente a benzamida (BEN), a salicilamida (SA) e a etenzamida (ETZ). Estas amidas são estruturalmente mais simples que os flavonóides, o que poderá ser uma característica para a formação de heterosintões. Entre elas, possuem uma complexidade estrutural crescente, permitindo também analisar o efeito da complexidade estrutural do co-formador na possibilidade de formação de co-cristais.

### 1.5.1 Benzamida

A benzamida (BEN), é um importante composto orgânico, amplamente utilizado no fabrico de produtos farmacêuticos e medicamentos. [157] A benzamida, cuja estrutura molecular se encontra representada na Figura 15, foi o primeiro cristal molecular para o qual foi relatado polimorfismo, em 1832 [158]. A forma estável (forma I) foi amplamente estudada ao longo dos anos e a sua estrutura de cristal monoclinico foi determinada em 1959 [159]. A existência de uma forma metaestável parece ter sido amplamente esquecida. Após 173 anos a estrutura cristalina de um novo polimorfo metaestável (forma II) foi determinada [160]. Noutro artigo, subsequente, mostraram que a transformação de estado sólido da forma II altamente metaestável para a forma I é fácil e completa em 3h e, portanto, a forma II é uma estrutura metaestável transitória [161]. Após o relato de polimorfismo na BEN, uma segunda fase metaestável (forma III) foi caracterizada [162] [163] [164]. Recentemente, em 2020, foi obtida a forma IV [165]. As quatro formas foram estudadas por diversos autores em diversos artigos [166] [167] [168].



**Figura 15.** Estrutura molecular da benzamida.

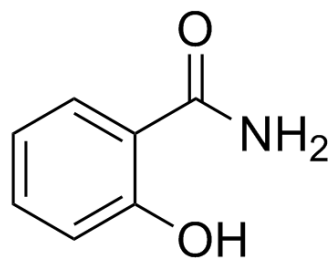
A BEN é frequentemente usado como co-formador [169] [170] [171]. Possui um único grupo funcional, a amida, capaz de participar em ligações de hidrogénio e, portanto, favorável à formação de sintões supramoleculares sendo possível a formação de co-cristais. Diversos co-cristais da BEN com ácido benzóico, ácido salicílico, ácido benzóico substituído (onde testaram a competição entre os grupos funcionais adicionais) e teofilina, foram obtidos [172] [173] [174] [175]. A co-cristalização polimórfica de teofilina e BEN, obtida por moagem assistida por solvente, foi investigada por Fischer *et al.* [176] Os solventes polares levaram à cristalização da Forma II, enquanto a adição de solventes não polares ou moagem a seco resultou na formação da Forma I. Assim, demonstraram que a escolha do solvente na síntese de LAG é decisiva para a formação controlada de um produto final polimórfico desejado. Recentemente, Bruni *et al.* [177] [178] relataram a formação de um co-cristal probenecide-benzamida que revelou perfis de solubilidade e dissolução melhores do que o do princípio ativo puro.

Estruturalmente, a BEN é a amida aromática mais simples possível que consiste num anel benzénico contendo apenas um único substituinte, o grupo amida. Sendo um dador e aceitador de ligações de hidrogénio a BEN pode formar um heterosintão ácido-amida tal como está representado na Figura 3c, com a NOR.

### 1.5.2 Salicilamida

A salicilamida (SA), ou 2-hidroxibenzamida, também apresenta um grupo carboxamida tal como a BEN, mas contém um grupo hidroxilo na posição orto, como se pode verificar na Figura 16 podendo formar ligação de hidrogénio quer por um grupo quer pelo outro. É um medicamento anti-inflamatório não-esteróide de venda livre, com propriedades analgésicas e antipiréticas, sendo os seus usos medicinais semelhantes aos da aspirina [179] [180]. A investigação da relação estrutura-atividade de derivados de SA revelou que os grupos amida e hidroxilo são importantes para a atividade anti-gonorreica e, portanto, a SA surgiu como um candidato promissor contra a gonorreia. Foi avaliada contra um painel diverso de isolados clínicos de *N. gonorrhoeae*, tanto isoladamente como em combinação com antibióticos usados para tratar a gonorreia, exibindo uma interação sinérgica com os mesmos [181].

Sasada *et al.* determinaram a estrutura cristalina da SA existindo uma forma monoclinica, estável em condições ambientais. [182] Johnstone *et al.* descobriram uma forma polimórfica obtida sob alta pressão [183].



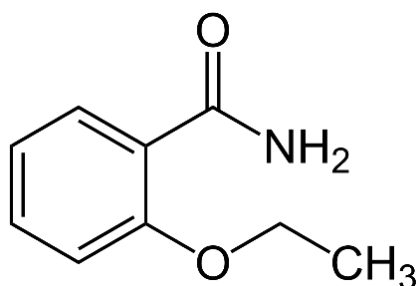
**Figura 16.** Estrutura molecular da salicilamida.

Apesar da promessa da SA como ativo potencial, o seu amplo uso na prática clínica foi impedido pelas suas propriedades físico-químicas, como a baixa solubilidade [180]. Portanto, a melhoria das propriedades físico-químicas da SA é uma área de pesquisa interessante e vital. Como tal, foram obtidos diversos co-cristais da mesma com o ácido 4-acetamidobenzóico (pela formação do heterosintão de ácido-amida), o ácido 3,5-dinitrobenzóico, o ácido oxálico (existindo em duas formas polimórficas) e com o ácido salicílico (o grupo carboxílico do ácido salicílico e o grupo carboxamida da SA são as principais centros para gerar este co-cristal) [184] [185] [186] [187] [188].

### 1.5.3 Etenzamida

No que diz respeito à etenzamida, esta possui, também, o grupo carboxamida e, adicionalmente, um grupo etóxido em posição orto entre si, num anel benzênico, tal como representado na Figura 17. O impedimento estérico devido à presença do grupo etóxido, sendo este um substituinte volumoso, pode dificultar a formação de co-cristais.

A ETZ pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteróides (NSAIDs) pouco solúveis em água, com baixa biodisponibilidade oral (ativo pertencente à classe II do BCS). Tem efeitos analgésicos e antipiréticos, sendo usada principalmente em combinação com outros ativos, para o tratamento de dor leve a moderada, incluindo musculoesquelética e articular, inflamação, febre e reumatismo [189] [190] [191]. Kawano *et al.*, constataram que a ETZ possui um efeito supressor específico no dano gástrico induzido pela aspirina. Tal efeito não pôde ser demonstrado em agentes analgésicos como salicilamida, bucetina, acetaminofeno e fenacetina. A combinação de aspirina com ETZ teve um efeito potenciador da atividade analgésica [192].



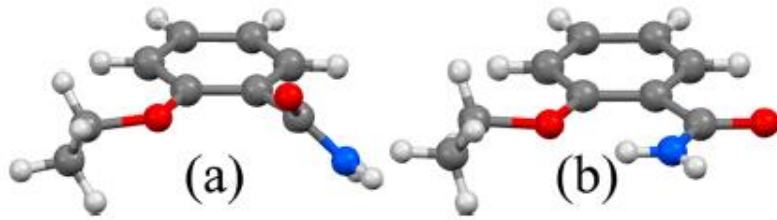
**Figura 17.** Estrutura molecular da etenzamida.

A ETZ foi co-cristalizada com vários formadores de co-cristais e APIs, verificando-se que a maior parte dos co-cristais são polimórficos. Dois polimorfos de um co-cristal de ETZ e sacarina foram preparados e caracterizados. Ambos os cristais são sustentados por heterosintões amida-imida envolvendo ligações de hidrogénio N-H...O. A Forma II, metaestável, foi o único produto obtido nas experiências de moagem pura (NG), enquanto ambos os polimorfos foram obtidos por cristalização em solução [193] [194] [195]. Antipamula *et al.* [196] [197] relataram o primeiro exemplo de um co-cristal trimórfico (três formas polimórficas) envolvendo dois APIs, a ETZ e o ácido gentísico. Todos os co-cristais apresentaram melhores propriedades farmacêuticas, nomeadamente taxa de dissolução, em relação aos APIs separados, especialmente as formas polimórficas metaestáveis. Os mesmos autores obtiveram um solvato de co-cristal de ETZ e ácido gentísico com o ácido acético, através da formação de ligações de hidrogénio N-H...O e O-H...O, formando heterosintões supramoleculares do tipo ácido-amida [198]. Obtiveram um co-cristal de ETZ, com o ácido etilmalónico, que existe em duas formas polimórficas [199] e com o ácido 3,5-dinitrobenzóico que também existe em dois polimorfos e forma uma série de solvatos [200]. Também prepararam e caracterizaram co-cristais farmacêuticos envolvendo a ETZ e co-formadores como ácido salicílico, ácido 2-cloro-4 nitrobenzóico, ácido vanílico, ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido fumárico. Propriedades físico-químicas como a solubilidade e taxa de dissolução da ETZ foram melhoradas. A análise das estruturas cristalinas revelaram que dos seis co-cristais relatados, quatro deles são sustentados por heterosintões supramoleculares do tipo ácido carboxílico-carboxamida (com os co-formadores ácido salicílico, ácido 2-cloro-4 nitrobenzóico, ácido vanílico e ácido fumárico). A estrutura de cristal de ETZ-ácido 4-aminobenzóico apresenta um homosintão amida-amida e a estrutura de cristal de ETZ-ácido 4-hidroxibenzóico representa um exemplo raro em que os homosintões amida-amida e ácido-ácido coexistem [201].

Hariprasad *et al.* [202] obtiveram co-cristais farmacêuticos de ETZ com ácido gálico, ácido 2-nitrobenzóico, ácido 3-nitrobenzóico, ácido 2,4-dinitrobenzóico e 3 ácido-toluico. A análise por difração de raios-X revelou que todos os co-cristais sintetizados foram formados através de um heterosintão supramolecular robusto do tipo ácido-amida, exceto o co-cristal de ETZ-ácido gálico, onde as moléculas interagiram através da ligação de hidrogénio O-H...O envolvendo -OH do ácido gálico e o oxigénio do grupo amida da molécula ETZ.

Foram também reportados co-cristais com vários outros ácidos carboxílicos aromáticos [194] [203] [204] [205] [206] e com ácidos dicarboxílicos alifáticos, como os ácidos glutárico, malónico e maleico [207] [208], alguns dos quais com propriedades físico-químicas melhoradas, ou seja, maior solubilidade e melhor estabilidade. É de realçar que outro co-cristal de ETZ trimórfico foi obtido com o ácido 2,4-dihidroxibenzóico [205].

Foi resolvida uma estrutura cristalina de ETZ pura, na qual a molécula apresenta uma conformação inesperada/incomum de alta energia em comparação com a dos seus co-cristais e a moléculas semelhantes encontradas no CSD, Figura 18a. A conformação não obedece às regras de Etter em relação à formação da ligação de hidrogénio intramolecular e, adicionalmente, coloca dois oxigénios em proximidade desfavorável. Na maioria das estruturas resolvidas de co-cristais da ETZ a conformação é a mais esperada, Figura 18b [209].



**Figura 18.** Conformação da molécula de etenzamida: a) no cristal de composto puro; b) no co-cristal com o ácido 3,5-diclorobenzóico [197].



# **Capítulo 2**

## **Materiais e Métodos**



# Capítulo 2

## Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

Na Tabela 1, estão apresentadas informações como o peso molecular, o grau de pureza e a temperatura de fusão, segundo a informação do fornecedor, dos compostos utilizados na realização do trabalho experimental. Os mesmos foram adquiridos com o maior grau de pureza possível, dentro dos produtos comercializados e de acordo com a exigência associada a este tipo de investigação.

**Tabela 1. Compostos utilizados e informações sobre os mesmos dadas pelo fornecedor.**

Composto	Fornecedor	Pureza %	M / g mol <sup>-1</sup>	T <sub>fus</sub> / °C
Norfloxacina	Sigma-Aldrich	≥ 98	319,33	220-221
Miricetina	TCI	> 97	318,24	≈ 357
Quercetina hidratada	TCI	> 97	301,24	< 300
(+)-Catequina hidratada	Sigma-Aldrich	≥ 98	290,27	175-177
Benzamida	Sigma-Aldrich	99	121,14	125-128
Salicilamida	Sigma-Aldrich	99	137,14	140-144
2-Etoxibenzamida	Sigma-Aldrich	97	165,19	132-134

Os ensaios de LAG envolveram a utilização de etanol (99,8 %), do laboratório Fluka.

## 2.2 Métodos

Para o *screening* de polimorfos e de co-cristais recorreu-se à mecanoquímica e para a caracterização das diferentes formas sólidas obtidas foram utilizadas várias técnicas experimentais: espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo ATR (ATR-FTIR), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), difração de raios-X de pó (XRPD) e termogravimetria (TGA).

### 2.2.1 Mecanoquímica

A moagem, que tem vindo a ser bem-sucedida na síntese de co-cristais [59], consiste na ação mecânica por superfícies duras num material, normalmente para quebrar o material e reduzir o seu tamanho de partícula. Portanto, pode referir-se a métodos manuais, utilizando o almofariz e pilão, ou métodos não manuais, recorrendo a um moinho de bolas, por exemplo [32] [59] [210].

A mecanoquímica é, genericamente, definida como reação química ou supramolecular, em estado sólido, que é mecanicamente induzida [211]. A entrada/absorção de energia mecânica pode ocorrer por cisalhamento, alongamento, compressão, fricção ou outros tipos de ação mecânica. [212] Embora a química por moagem seja considerada mediada por criação de novos locais de reação (fraturas e deformações dos reagentes sólidos), com consequente diminuição do tamanho de partículas, devido à ativação mecânica [213] [214] [215], há visões conflitantes sobre o que de facto ocorre durante a agitação mecânica, não havendo conclusões abrangentes e firmes sobre os mecanismos da mecanoquímica [216]. No entanto, é um método que está a ser intensamente estudado, em parte porque pode promover reações entre sólidos de forma rápida e quantitativa, sem adição de solvente ou apenas em quantidades nominais, [211] evitando solventes a granel, tornando as reações mais ecológicas e eliminando desperdício [217]. Como tal, atualmente, a mecanoquímica é vista como um excelente método de Química Verde, oferecendo uma maneira de reduzir ou mesmo evitar completamente o uso de solventes [218], uma vez que a dependência atual dos mesmos parece cada vez mais insustentável [219] [220] [221], pois desperdiça materiais de origem fóssil. Por exemplo, 85% dos produtos químicos usados na indústria farmacêutica são solventes e mesmo que as taxas de recuperação típicas de reciclados sejam de 50-80% [220], o seu uso é ambientalmente problemático, perigoso e consumidor de energia, nos processos produção, purificação e reciclagem. Os processos por mecanoquímica são conduzidos em temperaturas amenas, exigindo menor entrada de energia [222]. Evitar solventes a granel também significa que as limitações de solubilidade podem ser contornadas [210], tornando acessível uma variedade de materiais de partida alternativos, e isso geralmente está associado à redução de custo.

A mecanoquímica tem sido um método de eleição na produção de sólidos orgânicos multicomponente (por exemplo, solvatos, sais e co-cristais) [59] [217] [223] [224] [225] [226]. Isso é particularmente valioso na triagem e na síntese de novas formas sólidas de ativos farmacêuticos (APIs) [225].

Outra terminologia está associada à moagem de sólidos na presença de líquidos. A moagem assistida por líquido (LAG do inglês) [59] [210] consiste na adição de quantidades

catalíticas de solvente à mistura que vai ser submetida a moagem [227], para acelerar as reações, funcionando tanto como aditivo catalítico, como para habilitar e direcionar transformações que não correm por moagem pura. Isso fornece um ambiente fechado no qual o aditivo e as condições de moagem são controláveis e podem incluir frequência de moagem, tempo, luz [228] [229], temperatura [230] e pressão com um gás [231]. O aditivo líquido não melhora apenas a cinética da reação, induzindo transformações estruturais e químicas, como também permite a otimização da reatividade (otimiza as reações de estado sólido) para rendimentos quantitativos, mitiga os problemas de amorfização do produto encontrados na moagem pura, proporcionando um melhoramento da cristalinidade dos compostos obtidos [232] [233] e permite a obtenção de nanocristais [224] [234]. A alta eficiência do LAG foi demonstrada na triagem de co-cristais [56], sais [235], solvatos [236], polimorfos [237] [238] e na mecanoquímica orgânica [239] [240].

#### Procedimento experimental:

As moagens dos compostos foram feitas num moinho de bolas da Retsch MM400, durante 30 minutos com frequências de 15 Hz e 30 Hz. Utilizaram-se vasos de aço inoxidável de 10 mL com 2 esferas de 7 mm de diâmetro. Usou-se uma massa total de amostra de 70 mg. As moagens foram utilizadas na ausência de solvente (NG) e assistidas por líquido (LAG), utilizando-se 10  $\mu$ L de etanol. Todas as amostras foram guardadas em frascos rolhados e em exsiccador com sílica gel.

### **2.2.2 Espectroscopia de infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho é uma das técnicas analíticas mais importantes à disposição dos cientistas, sendo muito utilizada na indústria farmacêutica para a caracterização do estado sólido [241] [242] [243].

A radiação na zona do IV abrange números de onda entre os 14000 e os 40  $\text{cm}^{-1}$  sendo que a região mais utilizada corresponde ao intervalo entre os 4000 e os 400  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho médio) [244] [245].

A energia da radiação no infravermelho médio não é suficiente para causar transições eletrônicas, mas é suficiente para causar mudanças vibracionais nas moléculas. Portanto, o princípio básico da espectroscopia de infravermelho é a medição da quantidade de radiação eletromagnética na região do infravermelho, que é absorvida pela molécula em função do número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Desta forma, esta técnica espectroscópica permite a identificação dos grupos funcionais das amostras, identificando os modos vibracionais das moléculas [244]. Esta identificação só é possível quando a molécula absorve radiação com energia igual à da diferença de energia entre níveis vibracionais de um modo de vibração, que tem necessariamente de se traduzir numa variação de momento dipolar [241] [246] [247].

Portanto, o espectro de infravermelho é obtido quando a radiação infravermelha passa através da amostra, que absorve radiação eletromagnética, excitando modos de vibração moleculares cada um dependente especificamente de massas atômicas, forças de ligação e interações intra e intermoleculares, determinando qual fração da radiação incidente é absorvida numa determinada frequência. Ou seja, essa absorção relaciona-se precisamente com a

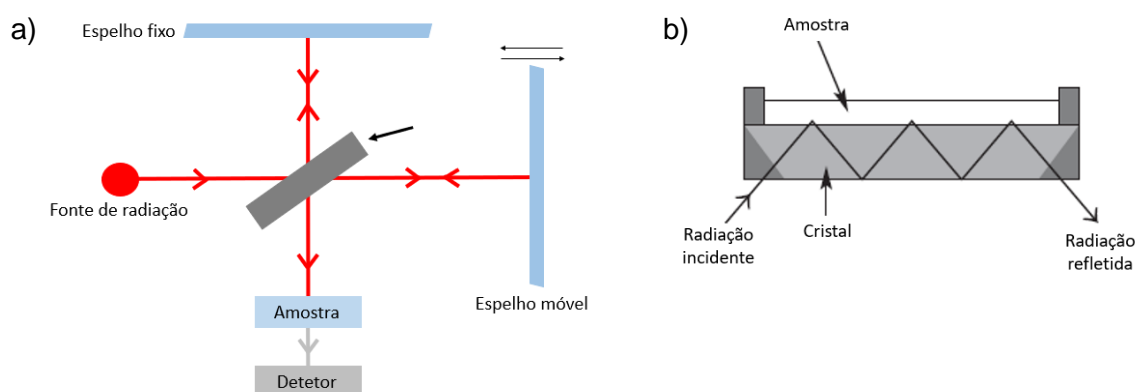
natureza das ligações na molécula [245]. Como consequência, o espectro de IV de um composto possui características únicas, funcionando como uma impressão digital, que pode ser facilmente distinguida do padrão de absorção de IV de outros compostos, incluindo isómeros. [241] [246]

Esta técnica é muito útil em estudo de estado sólido principalmente na detecção da formação de novas pontes de hidrogénio intermoleculares, que se traduzem por exemplo, em desvio das frequências de elongação de grupos carbonilo e da elongação simétrica e assimétrica de grupos amina e amida, observados nos espetros de absorvância/transmitância em função do comprimento de onda [244].

Neste projeto utilizamos o ATR-FTIR que é constituído por uma fonte de radiação IV, um interferómetro, o acessório do ATR onde é colocada a amostra, um detetor, um processador de sinal e um computador que possibilita a leitura. A fonte gera radiação que passa pelo interferómetro, incide na amostra e chega ao detetor. Por último, a radiação passa para o processador, onde é convertida num sinal em função do tempo (interferograma). Este, posteriormente, é convertido através da transformada de Fourier, para a obtenção do sinal em função do número de onda, i.e., os espetros de infravermelho como os conhecemos [245].

Num interferómetro (Figura 19a), depois da radiação passar por uma lente colimadora, os feixes paralelos seguem para um divisor onde metade da radiação é dividida entre um espelho fixo e espelho móvel. A radiação é novamente refletida dos espelhos para o divisor onde é recombinada num único feixe, criando-se um padrão de interferências construtivas e destrutivas. O feixe único deixa o interferómetro, interage com a amostra e finalmente atinge o detetor. [245]

No acessório ATR (Figura 19b), a amostra é colocada em contacto com um cristal com elevado índice de refração, onde vai incidir a radiação com um ângulo de incidência  $\theta$  superior ao ângulo crítico, o que provoca reflexões internas. Em cada ponto de reflexão interna, é produzida uma onda evanescente, que penetra na amostra e promove a absorção de radiação, alterando o interferograma que chega ao detetor [248]. A qualidade dos espetros é bastante alta e ainda diminui o tempo de aquisição dos mesmos porque as amostras examinadas por ATR-FTIR geralmente requerem mínima ou nenhuma preparação [242] [243]. Antes da análise da amostra, o espectro de fundo, característico do instrumento e do ambiente de medição, é registado para evitar bandas atribuídas à contaminação do ar e do vapor de água [245].



**Figura 19.** Representação esquemática dos componentes do ATR-FTIR: (a) Interferómetro; (b) unidade de ATR.

### Procedimento experimental:

Os espectros foram adquiridos com 64 acumulações e resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  num espectrofotômetro de infravermelho Thermo Nicolet 380 FTIR com acessório de refletância total atenuada (ATR) - Smart Orbit com cristal de diamante, no qual a amostra foi colocada em quantidades reduzidas, mas de forma a preencher a janela do ATR, permitindo a obtenção de espectros de boa qualidade.

### **2.2.3 Calorimetria Diferencial de Varrimento**

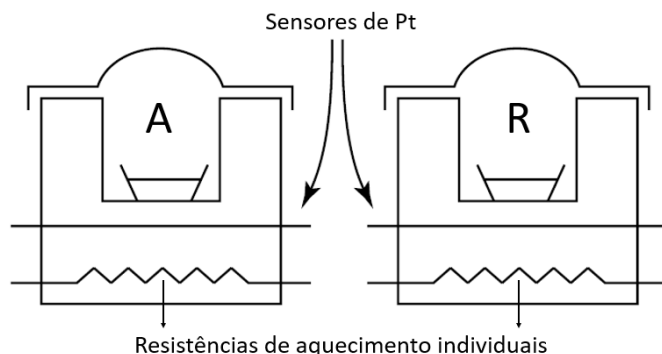
A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica de análise térmica muito utilizada no estudo de sólidos farmacêuticos, uma vez que permite a caracterização de fenómenos físico e/ou químicos através do registo de variações de entalpia ou da capacidade calorífica de uma amostra que muda em função da temperatura e do tempo.

Esta técnica é, portanto, usada para medir o fluxo de calor ( $dQ/dt$ ), na qual a diferença na taxa de fluxo de calor (ou potência) para a amostra e para a referência é monitorada em função do tempo enquanto as amostras são expostas a um programa de temperatura pré-programado, numa atmosfera controlada [249].

A calorimetria diferencial de varrimento pode ser utilizada para o estudo de eventos de fusão, dessolvatação, transição sólido-sólido e cristalização, medição de cinética de reação e/ou decomposição, determinações de pureza e identificação de transições vítreas, que são eventos acompanhados por trocas de calor [246] [250] [251] [252] [253]. Apesar do DSC ser a técnica de eleição para obter dados de ponto de fusão abrangentes e dados térmicos adicionais, como a entalpia de fusão, esta técnica também é uma ferramenta útil para o *screening* rápido de cocristais e para o estudo das suas propriedades térmicas [254] [255] [16].

Existem dois tipos de instrumentação para obter dados de calorimetria diferencial de varrimento: calorímetros de fluxo de calor e potência compensada, dependendo do modo de ação [256].

Neste trabalho foi utilizado o DSC de potência compensada, onde a amostra e a referência são colocados em dois fornos individuais (Figura 20), separados e isolados termicamente, com temperatura controlada por termómetros de resistência de platina [249] [255]. Devido a fenómenos de absorção/emissão de energia que ocorrem na amostra durante os processos de aquecimento e arrefecimento, regista-se uma diferença de energia fornecida a ambos os fornos,  $dQ/dt$  (fluxo de calor), necessária para manter os fornos à mesma temperatura, que é representada em função da temperatura ou do tempo de ensaio [256] [255] [257].



**Figura 20.** Diagrama esquemático de um DSC de potência compensada. A- amostra; R – referência.

Quando a amostra passa por uma transformação física, como transições de fase, mais (ou menos) energia precisará de fluir para ela do que para a referência no sentido de manter ambas à mesma temperatura. Se mais ou menos energia deve fluir para a amostra depende de se o processo é endotérmico ou exotérmico [255]. Se o processo for endotérmico, correspondente à absorção de energia que origina um sinal positivo sendo necessário mais energia para a amostra para aumentar a sua temperatura na mesma taxa que a da referência. Se o processo for exotérmico, correspondente à liberação de energia que origina um sinal negativo sendo necessário menos calor para aumentar a temperatura da amostra [258]. Assim, ao observar a diferença no fluxo de calor entre a amostra e a referência, os calorímetros diferenciais de varrimento são capazes de medir a quantidade de energia absorvida ou liberada durante tais transições.

Em geral, as amostras DSC são analisadas em pequenas cápsulas, de metal, projetadas para condutividade térmica ideal e reação mínima com as amostras (por exemplo, alumínio, platina, aço inoxidável e prata). As cápsulas podem ser abertas, perfuradas, cobertas ou vedadas e são usadas em combinação com uma cápsula de referência de configuração idêntica preenchida com um material inerte (por exemplo, alumina ou ar). As cápsulas fechadas são utilizadas quando é importante evitar a liberação induzida pelo calor da amostra ou de um dos seus produtos de reação. As cápsulas perfuradas são usadas para contenção moderada de amostras e indicadas no estudo de solvatos, por exemplo. As massas de amostra de DSC de 3-5 mg são comuns para materiais farmacêuticos e muitas vezes podem ser obtidos resultados razoáveis com menos de 1 mg de amostra [256]. Portanto, uma das vantagens da análise por DSC é o requisito mínimo de amostra e o tempo total de análise curto [253].

Procedimento experimental:

As curvas de DSC foram registadas em dois calorímetros de potência compensada da PerkinElmer, DSC7 e Pyris 1, utilizando banhos termostatzados a -7,8 °C e -20 °C, respetivamente, ambos com intracooler com circulação de uma mistura de etilenoglicol:água 1:1 (V/V). Os aquecimentos foram efetuados a uma velocidade de 10, 20 e 30 °C/min, usando cápsulas de alumínio hermeticamente fechadas de 30 µL ou cápsulas perfuradas de 50µL. O gás de purga utilizado foi o azoto com um fluxo de 20 mL/min. Na cápsula da amostra foram pesados entre 0,5 e 2 mg do sólido em análise, enquanto que cápsulas vazias, obrigatoriamente



iguais à da amostra, foram utilizadas como referência. A calibração da temperatura foi realizada com recurso a materiais de referência certificados, nomeadamente bifenilo ( $T_{fus} = 68,93 \text{ °C}$ ) e cafeína ( $T_{fus} = 235,9 \text{ °C}$ ), e a calibração de entalpia utilizando índio  $\Delta H_{fus} = (3286 \pm 13) \text{ J g}^{-1}$ . [253] [259]

## 2.2.4 Difração de raios-X

A difração de raios-X é uma técnica que permite analisar uma ampla gama de amostras, fornecendo informações sobre as suas estruturas cristalinas ou amorfas, distâncias internucleares e pureza. Esta técnica é utilizada em diversos campos do conhecimento, nomeadamente, na indústria farmacêutica (permitindo identificar polimorfos de produtos farmacêuticos e analisar formas de dosagem farmacêutica) [251] [260] [261] [262] [263], na ciência forense, na geologia (permitindo a identificação de minerais), na indústria de microeletrónica, aeroespacial e do vidro [264].

A difração de raios-X de pó tem como vantagens, ser um método rápido, de fácil análise, usar quantidades muito pequenas de amostra e podendo a mesma ser recuperada, uma vez que é uma técnica não destrutiva [260]. Permite a identificação de estruturas cristalinas de forma inequívoca, bem como a deteção da existência de defeitos na rede cristalina e a avaliação do grau de cristalinidade, sendo que a sua utilização envolve alguns cuidados, nomeadamente com a sobreposição de sinais e os limites de deteção [264].

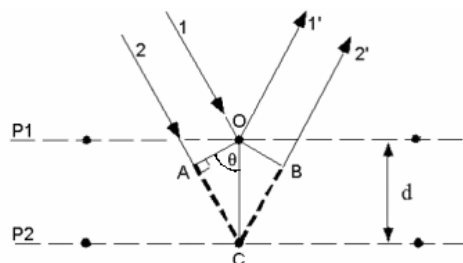
A difração de raios-X baseia-se na incidência de feixes monocromáticos colimados de radiação raios-X que se difundem em várias direções, através da superfície cristalina da substância em estudo, devido à simetria do agrupamento de átomos. Os feixes podem ser refletidos por um plano atómico superficial ou sofrer difração e penetrar na rede cristalina, sendo dispersos ao colidir com planos adjacentes, dando origem a um padrão de interferências construtivas. Estas ao serem detetadas dão origem a padrões de difração (resultantes do espaçamento entre os planos de distribuição dos átomos), específicos para cada amostra. Para que as interferências construtivas ocorram, é necessário que os feixes estejam em fase, condição que está dependente do ângulo crítico de incidência, característico para determinada distância interplanar.

A intensidade dos raios-X refletidos é registada, quando a geometria dos raios-X incidentes que incidem sobre a amostra satisfaz a lei de Bragg, ocorrendo interferência construtiva. Portanto, os valores de espaçamento para os diferentes planos do cristal podem ser calculados de acordo com a lei de Bragg (Equação 1):

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (1)$$

onde  $n$  corresponde à ordem de reflexão (número inteiro),  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios-X (radiação incidente),  $d$  é a distância interplanar para um conjunto de planos da estrutura cristalina (expressa em unidades angström) e  $\theta$  o ângulo de incidência dos raios-X [265]. Esta lei foi retratada pela primeira vez em 1913 por William Henry Bragg e William Laurence Bragg que comprovaram a relação entre o comprimento de onda e a distância entre planos constituídos por átomos de uma rede cristalina, por observação de fenómenos de reflexão, em que os planos atómicos paralelos funcionam como espelho [266] [267].

Na Figura 21 onde está representado o processo de difração descrito, observa-se que o feixe 2C' irá percorrer um caminho maior que o feixe 1O1', sendo que a diferença corresponde à soma das distâncias AC e BC. Recorrendo à trigonometria e sabendo que os feixes têm de estar em fase, pela lei de Bragg, pode-se deduzir que soma destas distâncias terá de ser igual a um múltiplo do comprimento de onda da radiação incidente.



**Figura 21.** Representação esquemática do fenómeno de difração de Raios-X.

Assim, obtém-se um gráfico de intensidade versus o ângulo de difração ( $2\theta$ ). Uma vez conhecido o comprimento de onda da radiação,  $\lambda$ , incidente bem como o ângulo  $\theta$  é possível calcular a distância interplanar,  $d$ , para cada ângulo em que é detetado um sinal correspondente a interferência construtiva [266] [268].

#### Procedimento experimental:

A difração de raios-X de pó foi realizada na Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos (UCQFarma) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Usou-se um difratómetro da Rigaku-Mini-Flex 600, com uma geometria Bragg-Brentano, que possui um detetador D/teX Ultra. A radiação usada foi de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,541862 \text{ \AA}$ ) com um filtro  $\text{K}\beta$ .

A amostra foi acomodada no centro do porta amostras, de forma a obter difratogramas de qualidade, e em quantidade suficiente para obter uma intensidade de sinal ótima. Os difratogramas foram obtidos com recolha de dados durante aproximadamente 15 min, em porta amostras com superfícies de silício especialmente preparadas para evitar difração provocada pelo mesmo.

## 2.2.5 Termogravimetria

Na termogravimetria, a massa da amostra é monitorizada à medida que é submetida a um programa controlado de temperatura, numa atmosfera bem definida [255]. A atmosfera é controlada e pode incluir condições oxidantes (oxigénio/ar) ou inertes (árgon, nitrogénio, hélio, etc.). É muitas vezes medida a variação de massa da amostra submetendo-a a aquecimento para forçar reações físico-químicas que ocorrem, em faixas de temperatura e taxas de aquecimento específicas [269]. O estudo pode também ser feito em condições isotérmicas. Obtém-se, portanto, informação quantitativa da variação de massa em materiais associados a transições de fase e a degradação térmica (que normalmente é acompanhada por libertação de produtos voláteis) [247] [255]. Assim, esta técnica regista a variação de massa em processos de desidratação, dessolvatação, sublimação, decomposição e oxidação de uma amostra em função da temperatura ou do tempo [246] [255].

### Procedimento experimental:

A análise termogravimétrica (TGA) em amostras de pó ( $\approx 10\text{mg}$ ) foi realizada utilizando uma balança termogravimétrica da Perkin-Elmer STA 6000 a um sistema TG/DTA, TG 209 F3, a uma velocidade de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  e numa gama de temperatura entre  $30\text{ }^\circ\text{C}$  e  $600\text{ }^\circ\text{C}$  sob atmosfera de  $\text{N}_2$  e atmosfera protetora, ambas com fluxo de  $25\text{ mL}/\text{min}$ . Foram utilizadas cápsulas de alumina. Na cápsula da amostra foram pesados entre 8 e 10 mg do sólido. A calibração da temperatura foi realizada com recurso a materiais de referência certificados, nomeadamente índio ( $T_{\text{fus}} = 156,6\text{ }^\circ\text{C}$ ), estanho ( $T_{\text{fus}} = 231,9\text{ }^\circ\text{C}$ ), bismuto ( $T_{\text{fus}} = 271,4\text{ }^\circ\text{C}$ ), zinco ( $T_{\text{fus}} = 419,5\text{ }^\circ\text{C}$ ), alumínio ( $T_{\text{fus}} = 660,3\text{ }^\circ\text{C}$ ) e prata ( $T_{\text{fus}} = 961,8\text{ }^\circ\text{C}$ ). Neste equipamento, o TG encontra-se hifenado com análise térmica diferencial (DTA) e, assim, para a mesma temperatura, foi possível a visualização de fenómenos de perda de massa, conjuntamente com os fenómenos observados nas curvas de DTA.



# **Capítulo 3**

## **Resultados e**

## **Discussão**



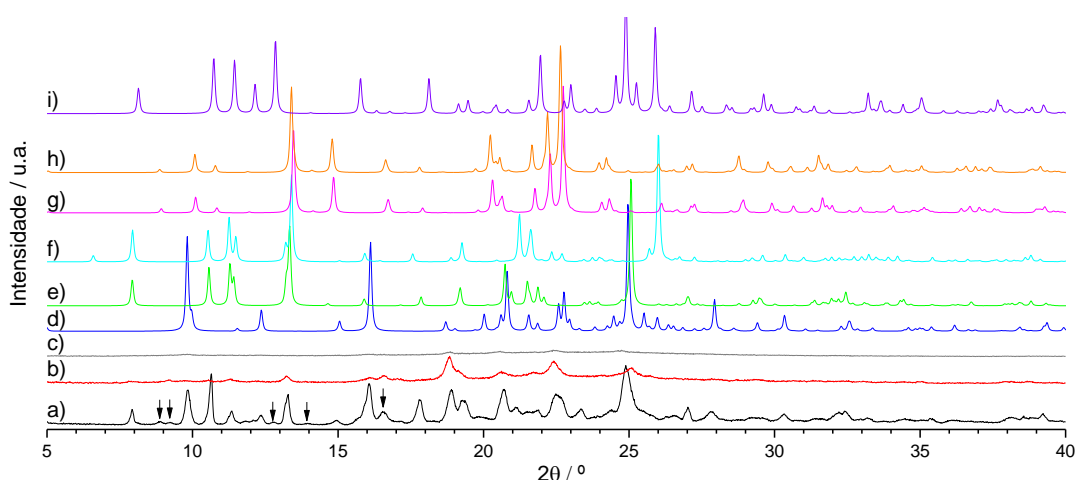
# Capítulo 3

## Resultados e Discussão

### 3.1 Investigação sobre formas sólidas de norfloxacina

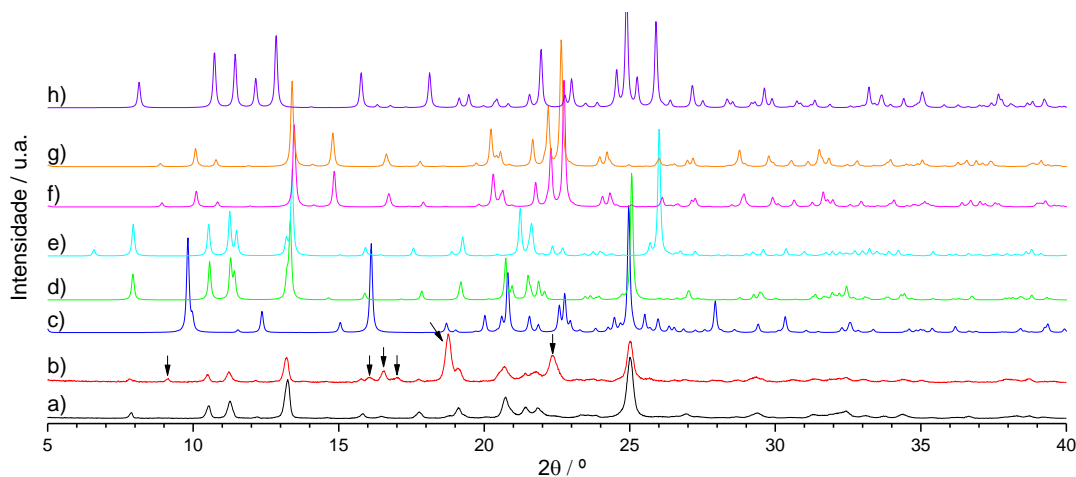
Inicia-se o trabalho com a caracterização da amostra de norfloxacina adquirida comercialmente e a investigação do efeito dos processos de moagem, nas condições usadas neste trabalho, na estrutura do sólido.

Na Figura 22 podemos comparar os difratogramas da NOR de partida e das amostras obtidas por NG com os difratogramas simulados para as estruturas de norfloxacina e respetivos hidratos depositadas na Cambridge Structural Database. O difratograma da amostra de NOR de partida, Figura 22a, indica que esta não corresponde à forma anidra (forma A), pura, da NOR, Figura 22d, sendo com elevada probabilidade uma mistura dessa forma com a forma sesquihidratada, NOR·1.5H<sub>2</sub>O, Figura 22e. Algumas reflexões, nomeadamente a  $2\theta = 8.8^\circ$ ,  $9.1^\circ$ ,  $12.7^\circ$ ,  $13.9^\circ$  e  $16.5^\circ$ , indicam ainda a presença de outra forma, que poderá ser a forma C, referida por Barbas *et al.* [5] e Chattah *et al.* [88] e cujo difratograma de raios-X de pó se encontra representado na Figura 10 (as reflexões atribuídas a esta forma estão assinaladas na Figura). A NOR de partida quando sujeita a mecanoquímica (15Hz e 30Hz durante 30 minutos) sem solvente, Figuras 22b e 22c, amorfiza parcialmente.



**Figura 22.** Difratogramas de raios-X de pó da NOR de partida (a), obtida por NG (moagem sem solvente) a 15Hz (b) e a 30Hz (c) e os difratogramas da forma A (d), das formas sesquihidratadas 1.5 H<sub>2</sub>O (e) e 3H<sub>2</sub>O (f), das formas hidratadas 1.125 (g) e 1.25 (h) e da forma dihidratada (i) simulados a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com os números 617104 [87], 720746 [6], 720747 [6], 719474 [92], 719473 [92] e 153910 [91], respetivamente.

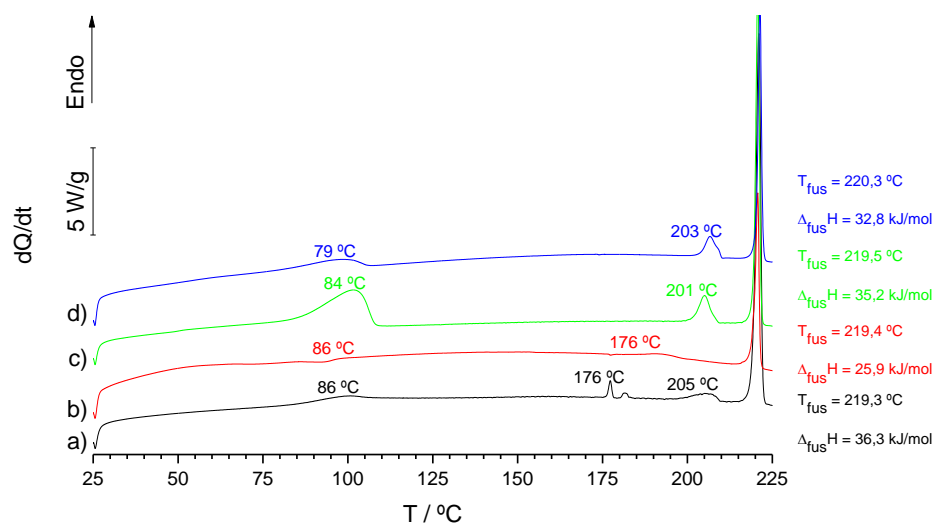
Através da moagem com assistência de 10 $\mu$ L de etanol e nas mesmas condições de utilização (15Hz, 30 minutos) podem ser obtidos dois sólidos diferentes, um correspondente à forma sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O da NOR como se comprova pela sobreposição dos respectivos difratogramas, Figura 23a e 23d, enquanto que o outro sólido, Figura 23b, parece ser a mistura da forma sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O da NOR com a forma C.



**Figura 23.** Norfloxacina: Difratogramas de raios-X de pó representativos dos dois tipos de sólidos obtidos por LAG (a) e (b) e os difratogramas simulados da forma A (c), das formas sesquihidratadas 1.5 H<sub>2</sub>O (d) e 3H<sub>2</sub>O (e), das formas hidratadas 1.125 (f) e 1.25 (g) e da forma dihidratada (h) a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com os números 617104 [87], 720746 [6], 720747 [6], 719474 [92], 719473 [92] e 153910 [91], respetivamente.

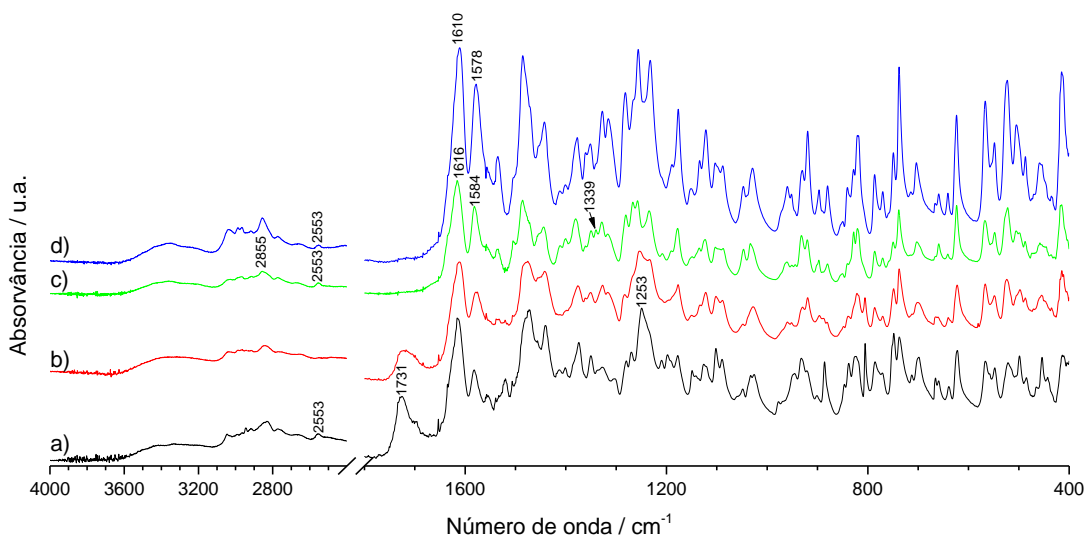
Como se esperava, a curva de DSC de aquecimento da NOR de partida, Figura 24a, apresenta uma transição endotérmica,  $T_{onset} = 86$  °C, referente à perda de moléculas de água, tal como a NOR obtida por LAG,  $T_{onset} = 84$  °C e  $79$  °C, Figuras 24c e 24d. A NOR obtida por NG nessa faixa de temperatura, Figura 24b, revela um processo exotérmico atribuível à cristalização da NOR parcialmente amorfa. Em todos os termogramas são observados eventos endotérmicos de energia mais baixa antes da fusão, compatíveis com transições sólido-sólido, a  $T \approx 200$  °C, no caso da NOR de partida e das amostras obtidas por LAG e a  $T \approx 176$  °C para a NOR obtida por NG. Em todos os casos a fusão ocorre a  $T_{fus} \approx 219$  °C, em concordância com a literatura [90].





**Figura 24.** Termogramas DSC de aquecimento da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), obtida por NG,  $m = 1,16$  mg (b) e das duas formas de NOR obtida por LAG: da NOR·1.5 H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (c) e da mistura da forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O com a forma C,  $m = 1,14$  mg (d),  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.

O sesquihidrato é zwitteriônico [87] [270], uma vez que a incorporação da água induz a transferência de prótons do -COOH para o -NH<sub>2</sub> resultando no desaparecimento de bandas vibracionais associadas ao -COOH (1731 e 1253 cm<sup>-1</sup>) e o aparecimento de bandas vibracionais do íon carboxilato -COO<sup>-</sup> (1584 e 1339 cm<sup>-1</sup>), tal como podemos observar na Figura 25c [93].

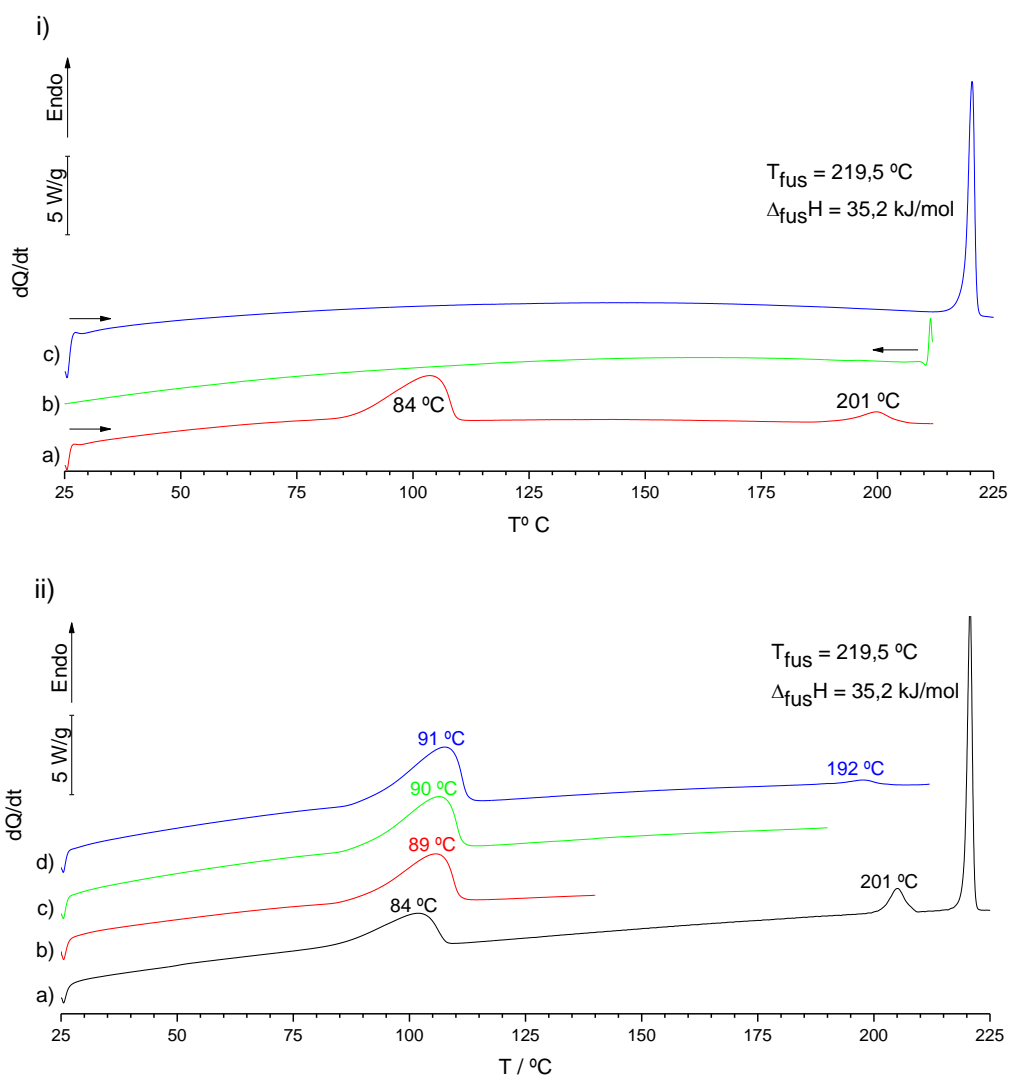


**Figura 25.** Espectros de IV da NOR de partida (a), obtida por moagem sem solvente (NG) (b) e dos dois sólidos obtidos por moagem assistida por 10  $\mu$ L de etanol (LAG): a NOR·1.5 H<sub>2</sub>O (c) e a mistura da forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O com a forma C (d).

### 3.1.1. Investigação do comportamento térmico dos dois tipos de amostras obtidos por LAG

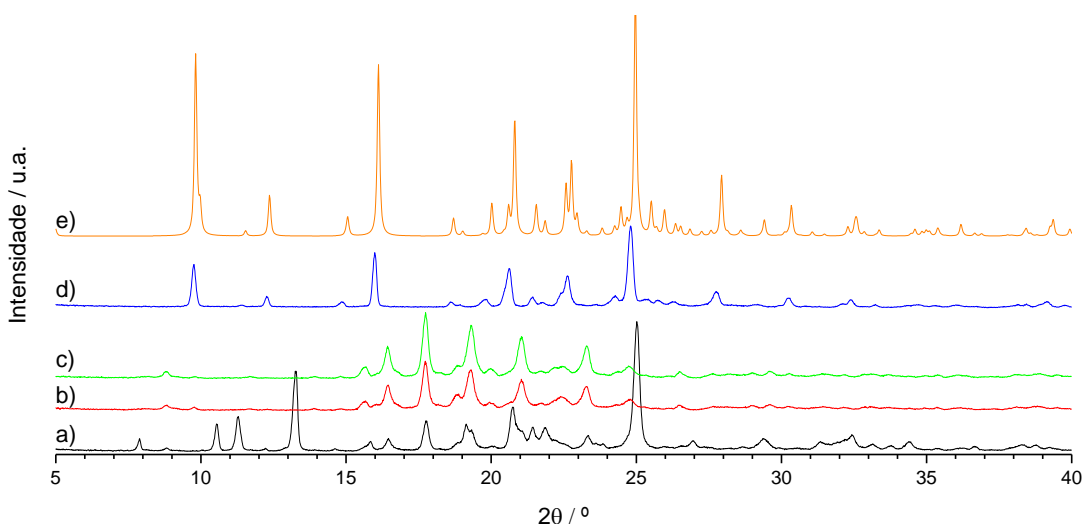
Uma vez identificada a forma sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O da NOR, obtida por LAG nas condições usadas neste trabalho, começamos por caracterizar esta forma. Para avaliar a natureza da mudança de fase a  $T \approx 200$  °C, a forma sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O da NOR foi aquecida logo acima da temperatura de transição, arrefecida e aquecida novamente até ao ponto de fusão, tal como representado na Figura 26i. Não se verificaram quaisquer eventos nesta sequência arrefecimento/aquecimento para além da fusão a  $T = 219$  °C.

Assim sendo, foram analisadas amostras obtidas por aquecimento até 140 °C, 190 °C e 212 °C, ou seja, até depois da desidratação, antes do evento a  $T \approx 200$  °C e depois deste evento, recorrendo ao DSC, como mostrado nas Figuras 26iib, 26iic e 26iid, respetivamente.



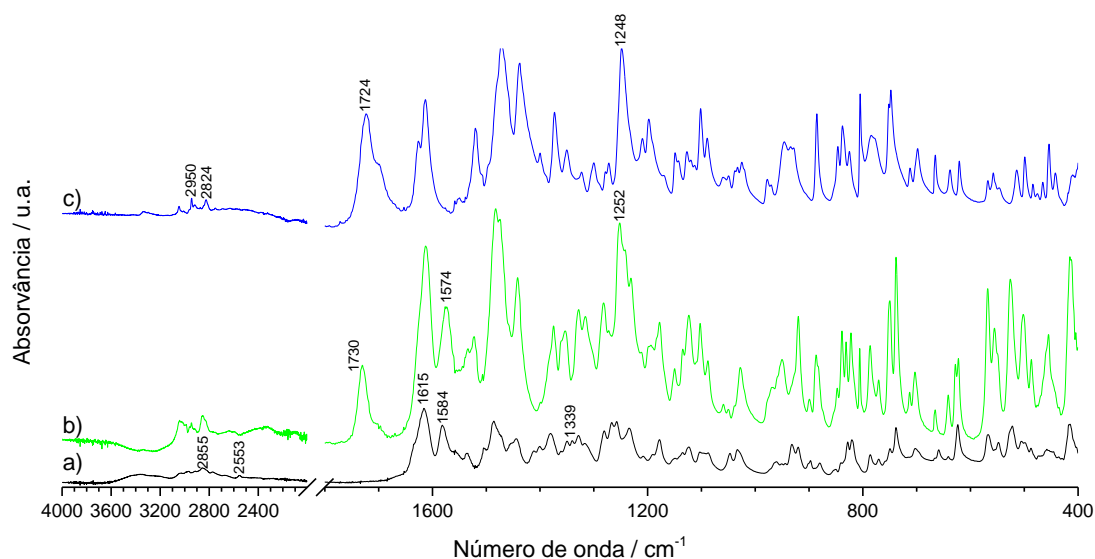
**Figura 26.** i) Termogramas DSC de aquecimento de NOR·1.5 H<sub>2</sub>O: a) 1º aquecimento, b) arrefecimento e c) 2º aquecimento,  $|\beta| = 10 \text{ °C min}^{-1}$ ; ii) Termogramas DSC de aquecimento de NOR·1.5 H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C,  $m = 1,56$  mg (b), 190 °C,  $m = 1,58$  mg (c) e 212 °C,  $m = 1,66$  mg (d),  $\beta = 10 \text{ °C min}^{-1}$ .

A partir da Figura 27 podemos confirmar que a desidratação de NOR·1.5 H<sub>2</sub>O com recurso ao DSC (Figura 27b e 27c) origina uma forma sólida distinta da forma A (Figura 27e) e que identificamos como a forma B descrita por Barbas *et al.* [4] [5] e Sustar *et al.* [86], cujo difratograma de raios-X de pó se encontra representado na Figura 10. A forma B quando aquecida em DSC até 212 °C dá origem à forma A, Figura 27d e 27e. O perfil do evento observado em DSC é de uma transição sólido-sólido concordante com o valor apresentado por Barbas *et al.* [4] [5] e Sustar *et al.* [86] A transição sólido-sólido endotérmica é compatível com a relação de estabilidade enantiotrópica referida por Barbas *et al.* [4] [5] para estes dois polimorfos.



**Figura 27.** Difratogramas de raios-X de pó da NOR 1.5 H<sub>2</sub>O (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (b), 190 °C (c) e 212 °C (d), simulado da forma A, a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas na CCDC (e).

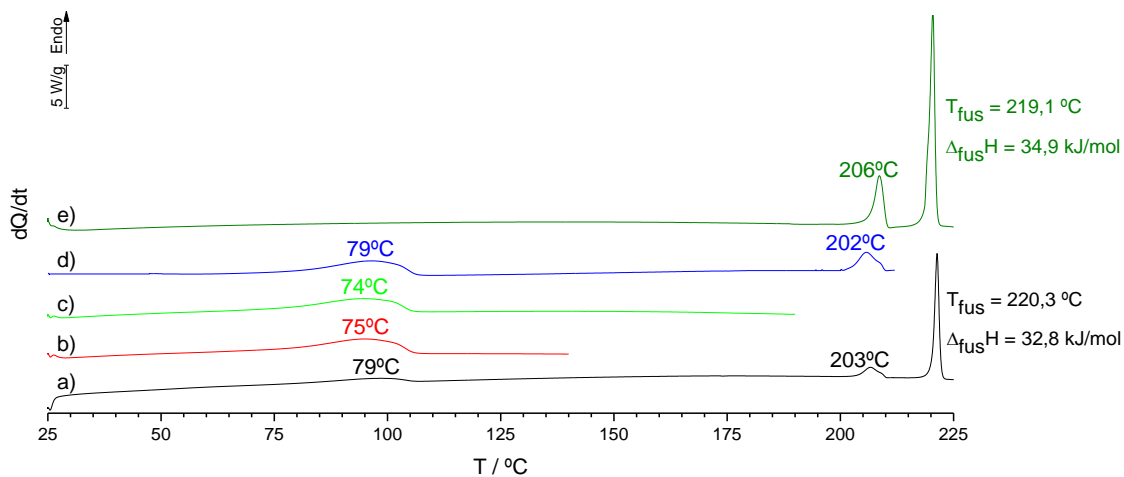
Na Figura 28 estão assinalados, nos respetivos espetros de infravermelho, os máximos característicos de bandas vibracionais das formas NOR·1.5H<sub>2</sub>O, B e A. O espetro da forma B parece ser a soma das formas NOR·1.5H<sub>2</sub>O e A, no entanto é muito semelhante aos espetros de infravermelho da forma B apresentados em literatura [4] [86].



**Figura 28.** Espectros de IV de NOR·1.5 H<sub>2</sub>O (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C ou 190 °C, forma B (b) e até 212 °C, forma A (c).

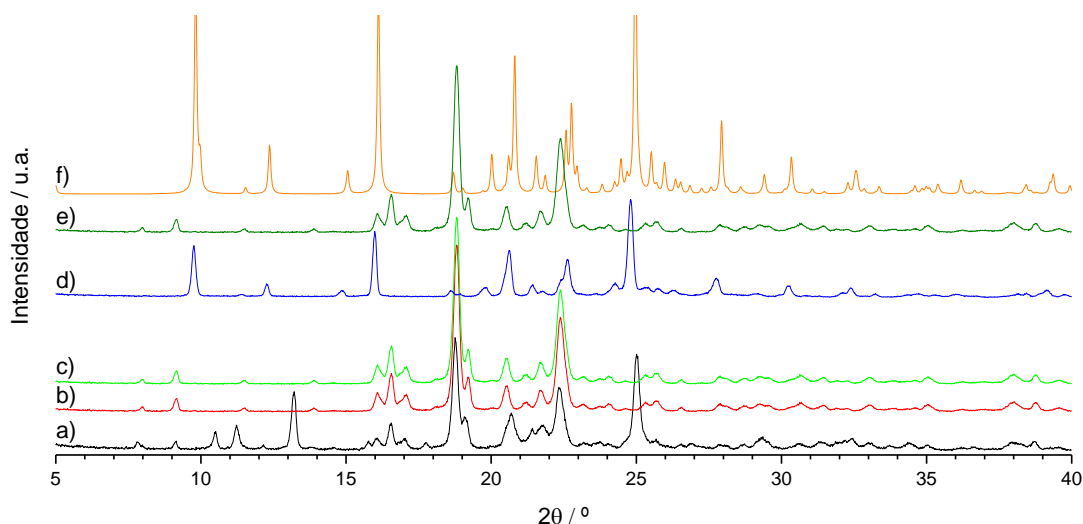
Seguidamente caracterizamos a outra amostra sólida obtida por LAG nas condições usadas neste trabalho, que corresponde à mistura da forma sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O da NOR e da forma C.

Esta amostra também foi submetida a aquecimento até 140 °C, 190 °C e 212 °C, ou seja, até depois da desidratação, antes do evento a  $T = 203$  °C e depois deste evento, recorrendo ao DSC, como mostrado nas Figuras 29b, 29c e 29d, respetivamente. Foi também preparada uma amostra que foi mantida durante 3 horas numa estufa a 150 °C, cujo termograma se encontra representado na Figura 29e.



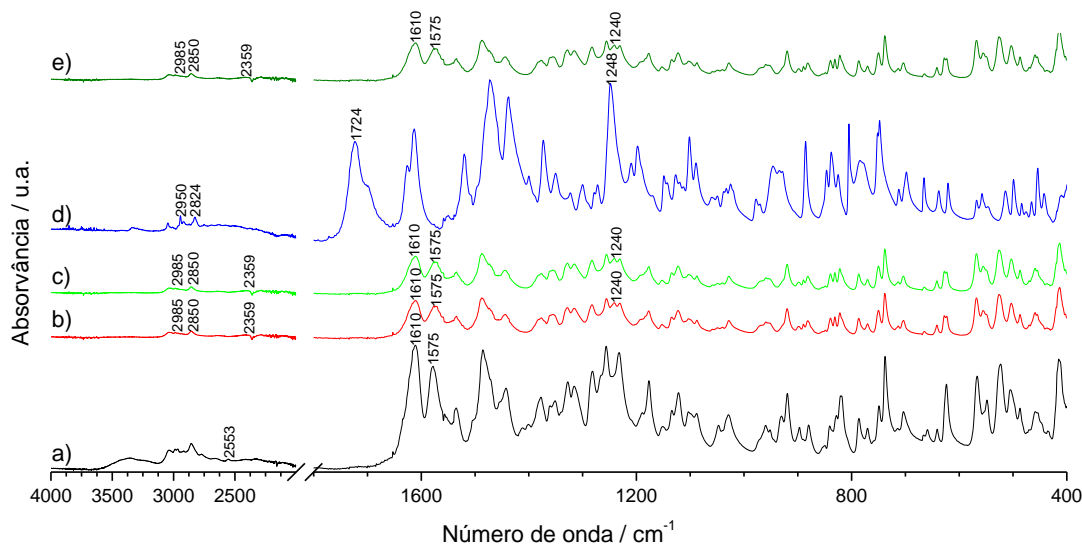
**Figura 29.** Termogramas DSC de aquecimento da NOR obtida por LAG, correspondente à mistura das formas NOR·1.5 H<sub>2</sub>O e C,  $m = 1,14$  mg (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C,  $m = 1,68$  mg (b), 190 °C,  $m = 1,73$  mg (c) e 212 °C,  $m = 1,29$  mg (d) e aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas,  $m = 2,13$  mg (e),  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.

A partir da Figura 30 podemos confirmar que a desidratação da mistura das formas NOR·1.5 H<sub>2</sub>O e C com recurso ao DSC (Figuras 30b e 30c) dá origem à forma C. Quando a mistura é aquecida em DSC até 212 °C dá origem à forma A, Figura 30d. A amostra aquecida em estufa deu origem à forma C, Figura 30e, tal como esperado.



**Figura 30.** Difratogramas de raios-X de pó da mistura das formas NOR·1.5 H<sub>2</sub>O e C (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (b), 190 °C (c) e 212 °C (d), aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (e) e simulado da forma A, a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada na CCDC (f).

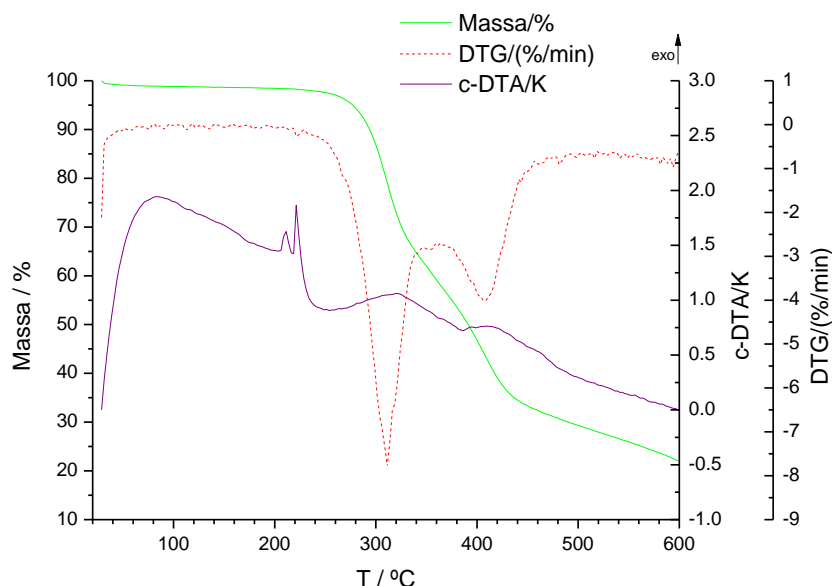
Na Figura 31 estão assinalados, nos respetivos espectros de infravermelho, os máximos característicos de bandas vibracionais da mistura das formas NOR·1.5H<sub>2</sub>O e C, da forma C e da forma A.



**Figura 31.** Espectros de IV da mistura das formas NOR·1.5 H<sub>2</sub>O e C (a), aquecida com recurso ao DSC até 140 °C, forma C (b), 190 °C, forma C (c) e 212 °C, forma A (d) e aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (e).

A curva termogravimétrica mostrada na Figura 32 confirma a forma C como uma forma anidra, que de acordo com o espectro de infravermelho, Figuras 31b, 31c e 31e é zwitteriônica. Para assegurar que não houve evolução da forma sólida foram recolhidos espectros de infravermelho e difratogramas de raios-X de pó para a amostra antes e depois da realização dos ensaios de termogravimetria. Portanto, é a primeira vez que é identificada inequivocamente uma forma anidra de norfloxacin de esta natureza.

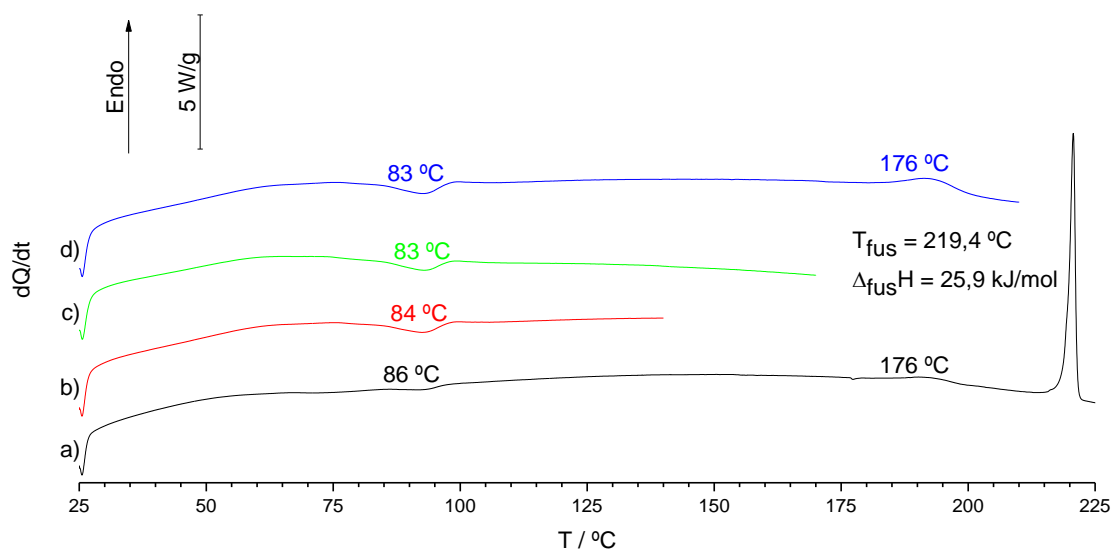
Na curva DSC, Figura 29e, o perfil do evento com  $T_{onset} = 206\text{ °C}$  é de uma fusão seguida de cristalização dando origem à forma A. A temperatura de fusão da forma C está em concordância com o valor reportado por Barbas *et al.* [5].



**Figura 32.** Análise termogravimétrica de norfloxacin, forma C, obtida por aquecimento da mistura de NOR·1.5 H<sub>2</sub>O com a forma C em estufa, a 150 °C durante 3 horas.

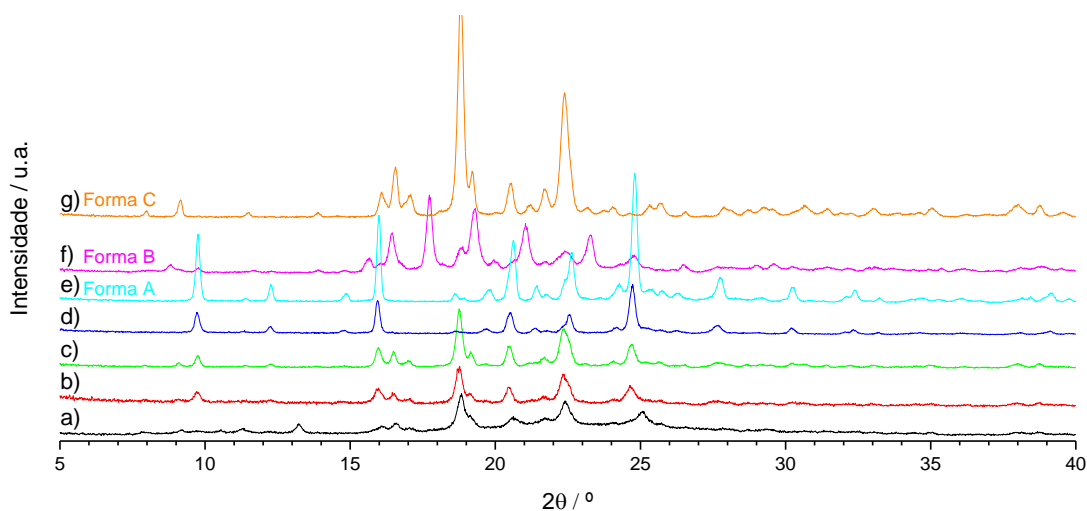
### 3.1.2 Investigação do comportamento térmico da NOR obtida por NG

Depois da caracterização da NOR obtida por LAG, que corresponde predominantemente à forma sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O, segue-se a caracterização da NOR obtida por NG. Esta amostra foi submetida a aquecimento até 140 °C, 170 °C e 210 °C, como indicado na Figura 33, ou seja, até depois do evento exotérmico, Figura 33b, antes da transição sólido-sólido, Figura 33c, e depois da transição sólido-sólido, Figura 33d, respetivamente, recorrendo ao DSC. Obtiveram-se os difratogramas de raios-X de pó e espectros de IV que se apresentam nas Figuras 34 e 35. Nas Figuras é feita a comparação com os difratogramas e espectros de infravermelho das formas anidras A, B e C.

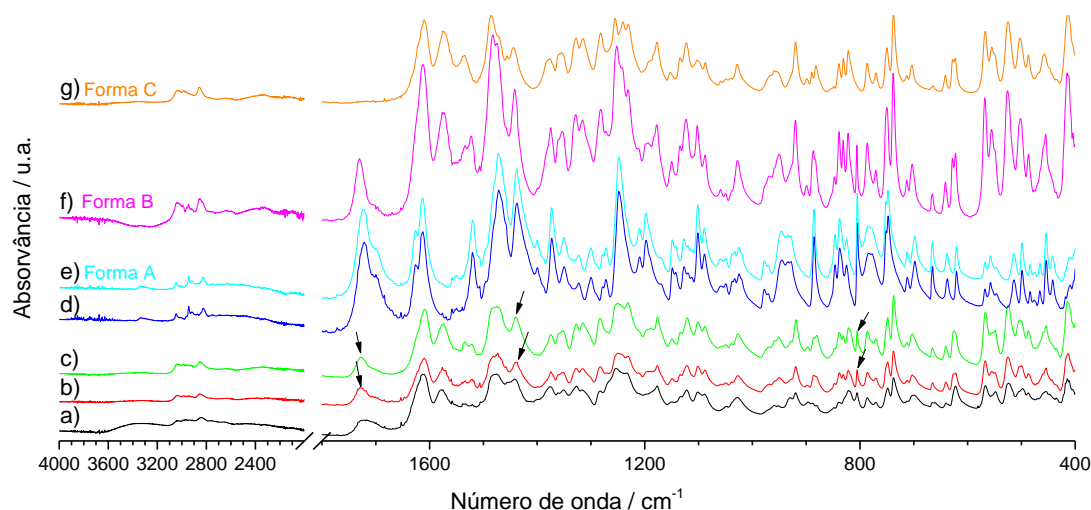


**Figura 33.** Termogramas DSC de aquecimento da NOR obtida por NG,  $m = 1,16$  mg (a), obtida por NG aquecida até  $140$  °C,  $m = 2,34$  mg (b),  $170$  °C,  $m = 2,62$  mg (c) e  $210$  °C,  $m = 2,71$  mg (d),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

Dos resultados, podemos confirmar que se obtém a forma A aquecendo esta amostra até  $210$  °C, com recurso ao DSC, enquanto que aquecendo até  $140$  °C e  $170$  °C se obtém uma mistura das formas A e C. A transição de fase endotérmica  $C \rightarrow A$  aponta para uma relação enantiotrópica entre as duas formas em concordância com o que foi proposto por Barbas *et al.* [5].



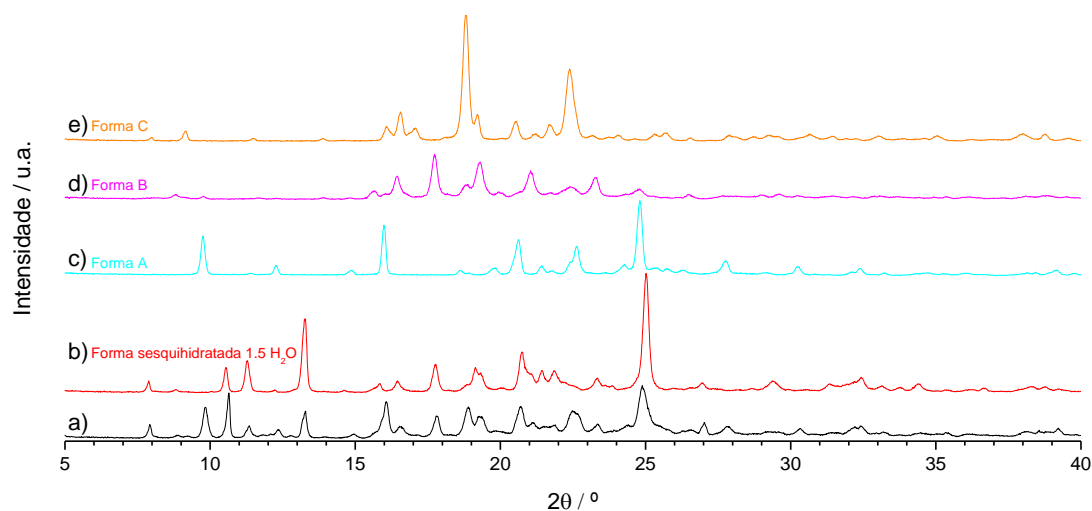
**Figura 34.** Difratogramas de raios-X de pó da NOR obtida por NG (a), aquecida até  $140$  °C (b),  $170$  °C (c) e  $210$  °C (d) e das formas A (e), B (f) e C (g).



**Figura 35.** Espectros de IV da NOR obtida por NG (a), aquecida até 140 °C (b), 170 °C (c) e 210 °C (d) e das formas A (e), B (f) e C (g).

### 3.1.3 Investigação do comportamento térmico da NOR de partida

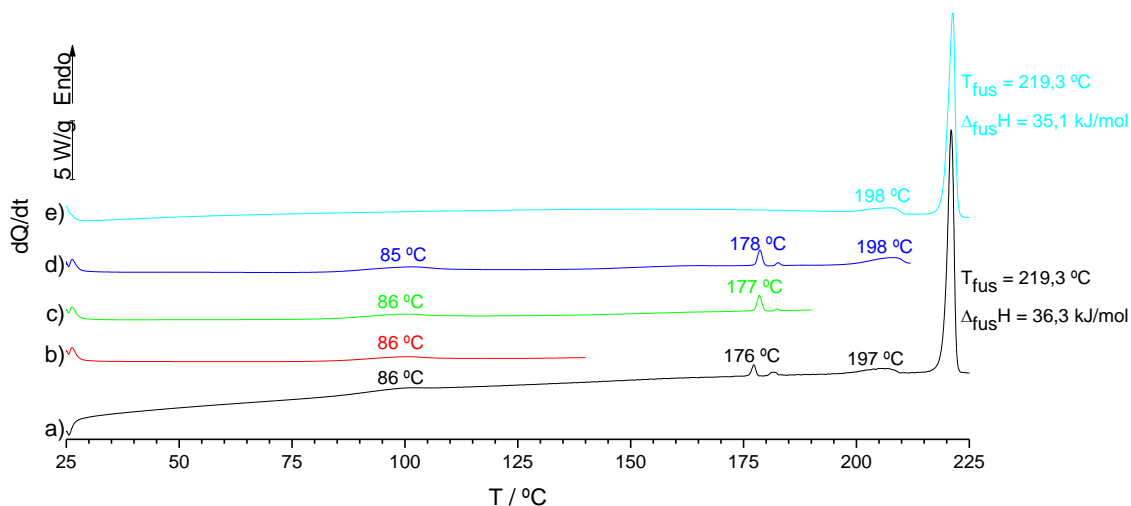
O mesmo procedimento de investigação foi aplicado à amostra de partida, que como referimos é uma mistura de forma A com NOR.1.5 H<sub>2</sub>O, com alguma contribuição também do polimorfo C, como se pode avaliar na Figura 36, onde se usaram os difratogramas obtidos neste trabalho.



**Figura 36.** Difratogramas de raios-X da NOR de partida (a), da forma NOR.1.5 H<sub>2</sub>O (b), da forma A (c), da forma B (d) e da forma C (e).

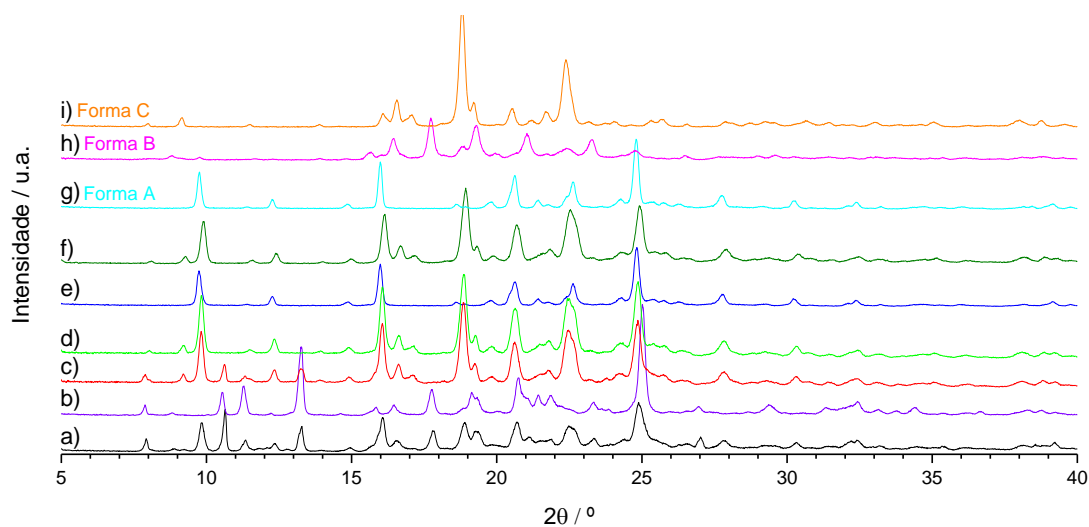


Efetuu-se aquecimento faseado da amostra de partida por calorimetria diferencial de varrimento (até 140 °C, 190 °C e 212 °C, ou seja, até depois de cada um dos eventos observados na Figura 37a). Foi também analisada uma amostra mantida na estufa a 150 °C durante 3 horas. A curva DSC de aquecimento desta amostra é apresentada na Figura 37e observando-se apenas um evento endotérmico antes da fusão. Os difratogramas de raios-X de pó e os espectros de IV das amostras sujeitas aos diferentes tratamentos térmicos são mostrados nas Figuras 38, 39 e 40.

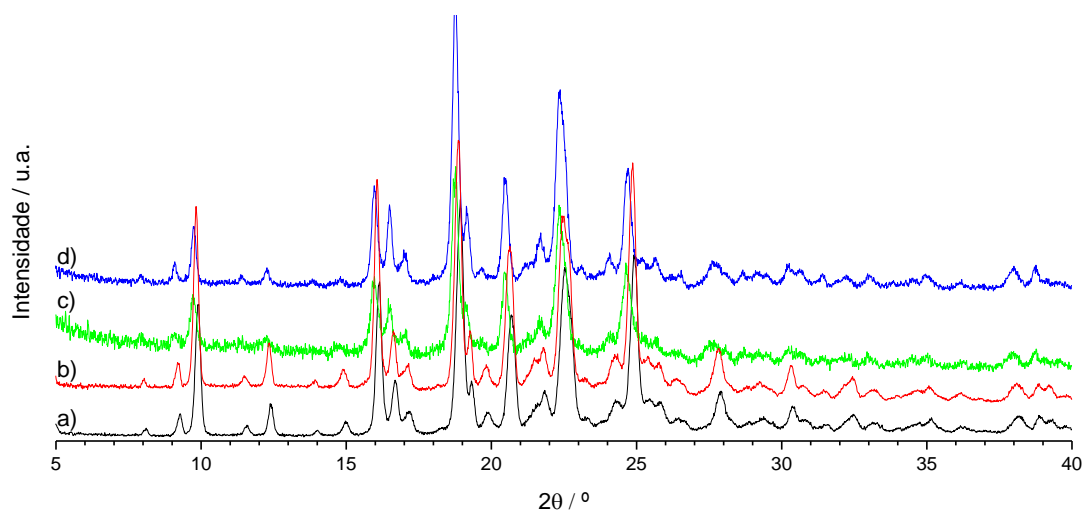


**Figura 37.** Termogramas DSC de aquecimento da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), aquecida até 140 °C,  $m = 1,86$  mg (b), 190 °C,  $m = 2,18$  mg (c) e 212 °C,  $m = 2,78$  mg (d) e aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas, 1,89 mg (e),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

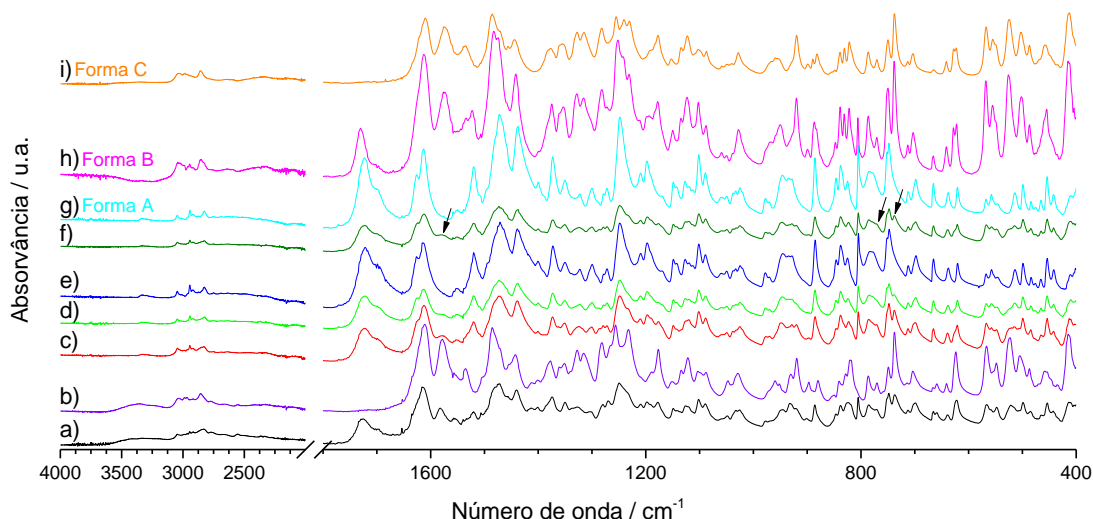
Os resultados permitem concluir que a forma A, pura, é obtida aquecendo o composto de partida até 212 °C, com recurso ao DSC, Figura 38e. Aquecendo até 140 °C ainda se obtém uma mistura da forma sesquihidratada  $1.5 \text{ H}_2\text{O}$ , com a forma A e com a forma C, Figura 38c. O tratamento térmico na estufa ou o aquecimento em DSC até 190 °C dão origem a uma mistura da forma A com a forma C, Figura 38d, tal como o aquecimento em DSC até 140 °C e 170 °C da NOR obtida por NG, Figura 39b e 39c. Estas conclusões também podem ser confirmadas pela Figura 40. O evento com  $T_{onset} = 198$  °C é atribuível à transição da forma C para a forma A.



**Figura 38.** Difratogramas de raios-X de pó da NOR de partida (a), da NOR·1.5 H<sub>2</sub>O (b), da NOR de partida aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (c), 190 °C (d) e 212 °C (e), da NOR de partida aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (f) e das formas A (g), B (h) e C (i).



**Figura 39.** Difratogramas de raios-X de pó da NOR de partida aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (a), da NOR de partida aquecida com recurso ao DSC até 190 °C e da NOR obtida por NG aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (b) e 170 °C (c).



**Figura 40.** Espectros de IV da NOR de partida (a), da NOR·1.5 H<sub>2</sub>O (b), da NOR de partida aquecida com recurso ao DSC até 140 °C (c), 190 °C (d) e 212 °C (e), da NOR de partida aquecida na estufa a 150 °C durante 3 horas (f) e das formas A (g), B (h) e C (i).

Os difratogramas de todas formas sólidas puras obtidas neste trabalho (NOR 1.5 H<sub>2</sub>O, formas anidras A, B e C) foram reunidos na Figura 36.

Sintetizando, a forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O pura foi obtida através da moagem da NOR de partida assistida por 10 µL de etanol, 15Hz, 30 minutos. A forma A pura foi obtida através do aquecimento até 212 °C com recurso ao DSC quer da NOR de partida, quer do sesquihidrato NOR·1.5 H<sub>2</sub>O, e também do sólido obtido por NG. A forma B pura foi obtida por aquecimento da forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O até 140 °C ou 190 °C com recurso ao DSC. Por último a forma C pura foi obtida por aquecimento da mistura da forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O e da forma C, também obtida através da moagem da NOR de partida assistida por 10µL de etanol, 15Hz, 30 minutos, até 140 °C ou 190 °C.

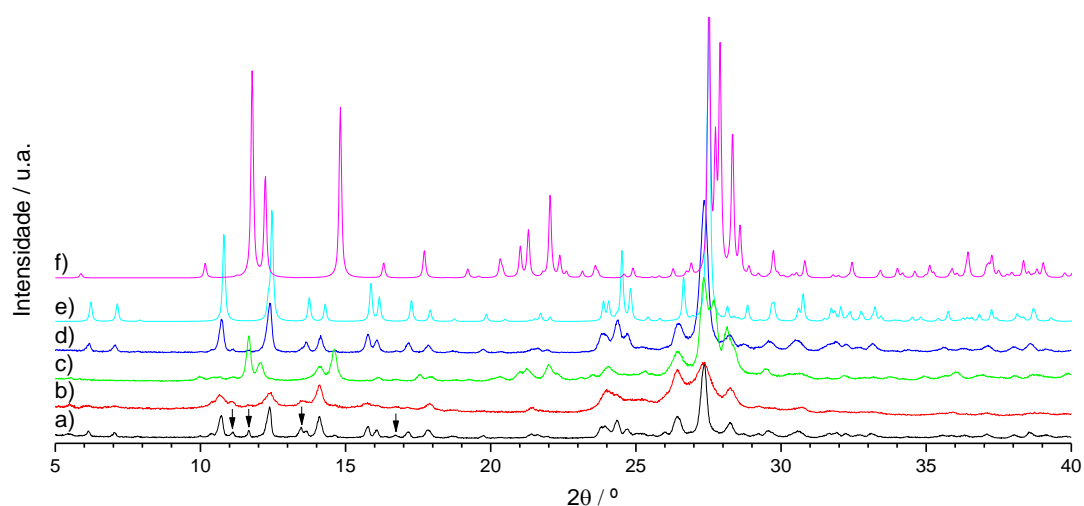
Foi pela primeira vez identificada inequivocamente a natureza zwitteriônica da forma anidra C. As formas B e A e C e A têm relação enantiotrópica, sendo a forma A o polimorfo estável a temperatura elevada (antes da fusão).

## 3.2 Caracterização das formas sólidas dos co-formadores utilizados neste trabalho

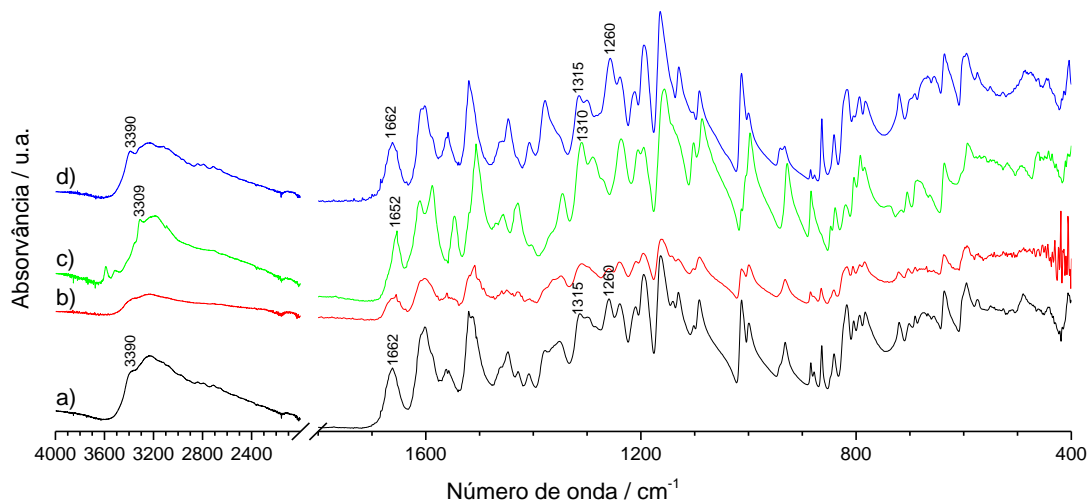
### 3.2.1 Co-formadores: flavonóides

Para a realização deste trabalho é necessário caracterizar as formas sólidas dos co-formadores de partida e após serem submetidos, quando puros, aos processos de moagem, nas condições que vão ser usadas na pesquisa de co-cristais.

Através das Figuras 41 e 42 podemos verificar que a moagem sem solvente (NG) realizada a 15Hz, Figura 41b e 42b, e assistida por solvente (LAG), Figura 41d e 42d, não alteraram a forma sólida de partida da quercetina, Figura 41a e 42a, que corresponde essencialmente à forma dihidratada (difratograma simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada na CCDC com o número 1153851), Figura 41e, devido à possibilidade de sobreposição dos respetivos difratogramas e espetros. Algumas reflexões adicionais foram assinaladas na Figura 41a que não se encontram no difratograma da forma dihidratada. Podemos também confirmar que a QUE moída sem solvente (NG) a 30Hz, Figuras 41c e 42c, é uma mistura da forma dihidratada com a forma monohidratada (difratograma simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada na CCDC com o número 814511), Figuras 41e e 42f.

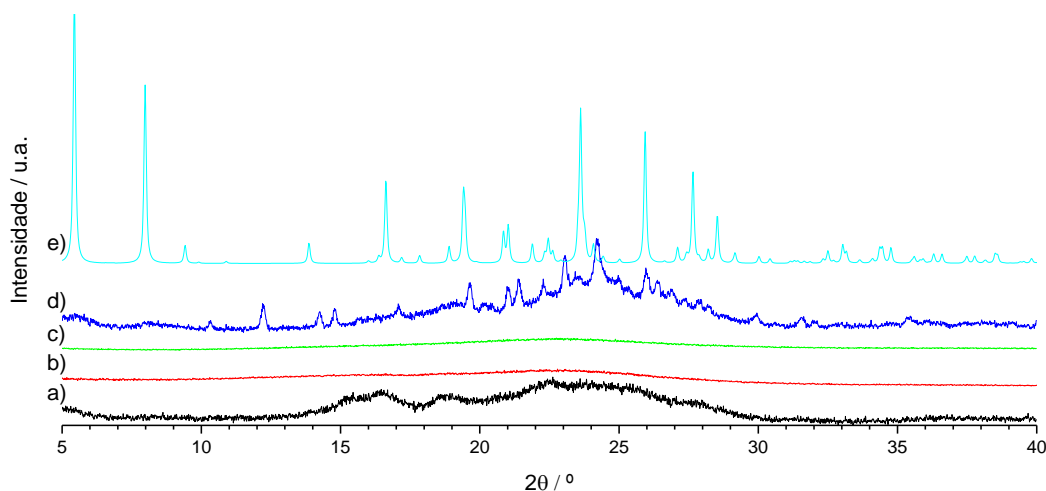


**Figura 41.** Difratogramas de raios-X de pó da QUE de partida (a) em comparação com os difratogramas do composto obtido por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c), obtido por LAG (d) e com os difratogramas da QUE dihidratada (e) e monohidratada (f) simulados a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 1153851 [115] e 814511 [118], respetivamente.

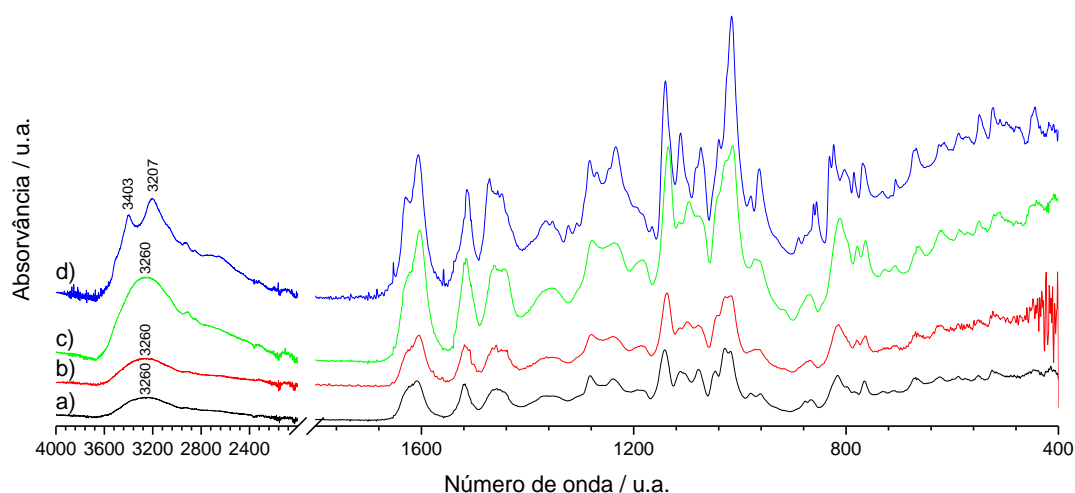


**Figura 42.** Espectros de IV da QUE de partida (a), obtida por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c) e obtida por LAG (d).

Nas Figuras 43 e 44 podemos verificar que a catequina de partida é amorfa e mantém-se amorfa quando sujeita a mecanoquímica na ausência de solvente (NG) em ambas as frequências utilizadas, Figuras 43b, 43c, 44b e 44c. Quando submetida a moagem assistida por etanol (LAG) ganha alguma cristalinidade, Figuras 43d e 44d. As reflexões registadas não têm correspondência com as observadas no difratograma simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no CCDC com o número 1409763, Figura 43e. O aspeto dos espectros de IV das Figuras 44a, 44b e 44c, é o que se espera para um amorfo, havendo maior definição das bandas nos espectros de IV da Figura 44d, concordante com o aumento de cristalinidade observado no difratograma de raios-X de pó.

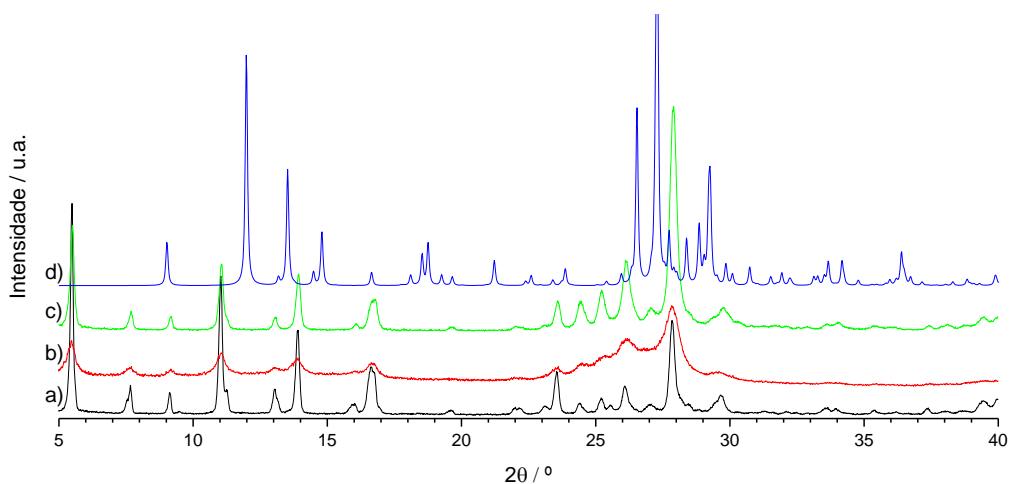


**Figura 43.** Difratogramas de raios-X de pó da CAT de partida ((+)-hidratada) (a) em comparação com os difratogramas do composto obtido por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c), obtido por LAG (d) e com o difratograma da forma (+)-hidratada (e) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 779636 [136].

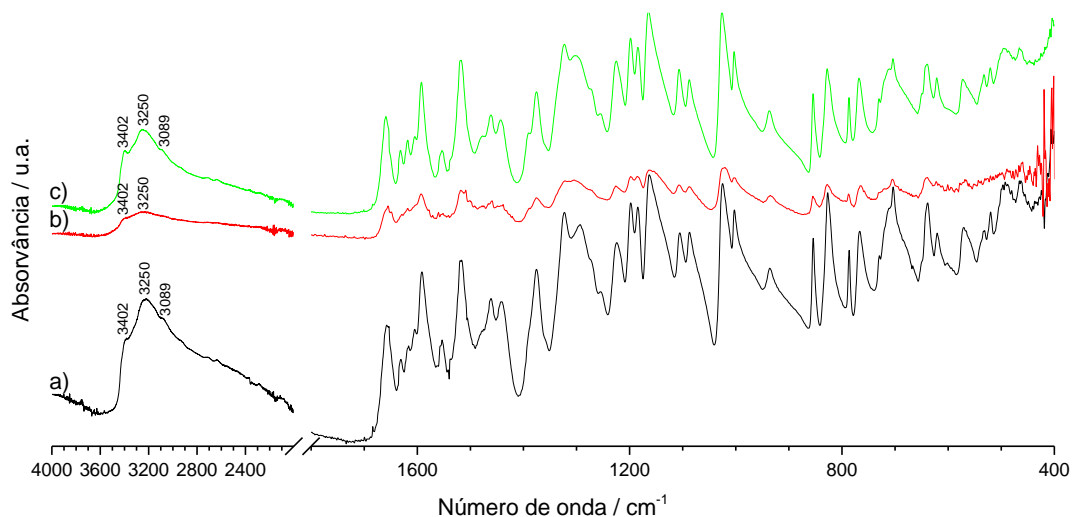


**Figura 44.** Espectros de IV da CAT de partida (a), obtida por NG a 15Hz (b) e a 30Hz (c) e obtida por LAG (d).

No que diz respeito à miricetina, a análise das Figuras 45 e 46 permite concluir que não ocorreu qualquer tipo de alteração, após moagem sem solvente (NG) realizada a 15Hz e assistida por etanol (LAG), apesar de amorfização parcial na moagem sem solvente. Conclui-se também que a MYR de partida não corresponde à forma monohidratada, cuja estrutura está depositada na CCDC com o número 1409763, mas corresponde à forma descrita como monohidratada por Li *et al.* [154], cujo difratograma está representado em Anexo na Figura A1. O espectro de IV da Figura 46b possui bandas mais alargadas devido à amorfização parcial, havendo maior definição das bandas nos espectros de IV das Figuras 46a e 46c.

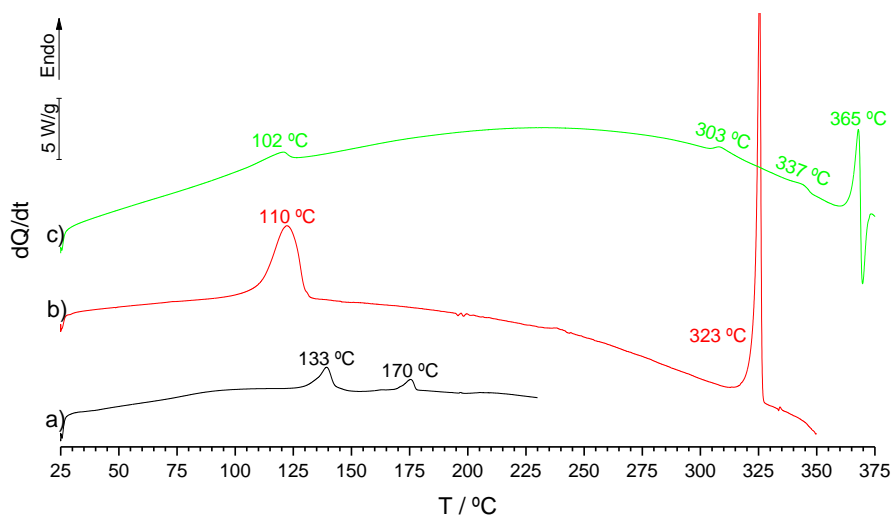


**Figura 45.** Difratogramas de raios-X de pó da MYR de partida (a) em comparação com os difratogramas do composto obtido por NG a 15Hz (b), obtido por LAG (c) e com o difratograma da forma monohidratada (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 1409763 [153].



**Figura 46.** Espectros de IV da MYR de partida (a), obtida por NG a 15Hz (b) e obtida por LAG (c).

As temperaturas às quais ocorrem os eventos térmicos, registados nas curvas de DSC de aquecimento, na CAT, na QUE e na MYR, representados na Figura 47, estão de acordo com o relatado em literatura [154] [135] [119] [271] [120].

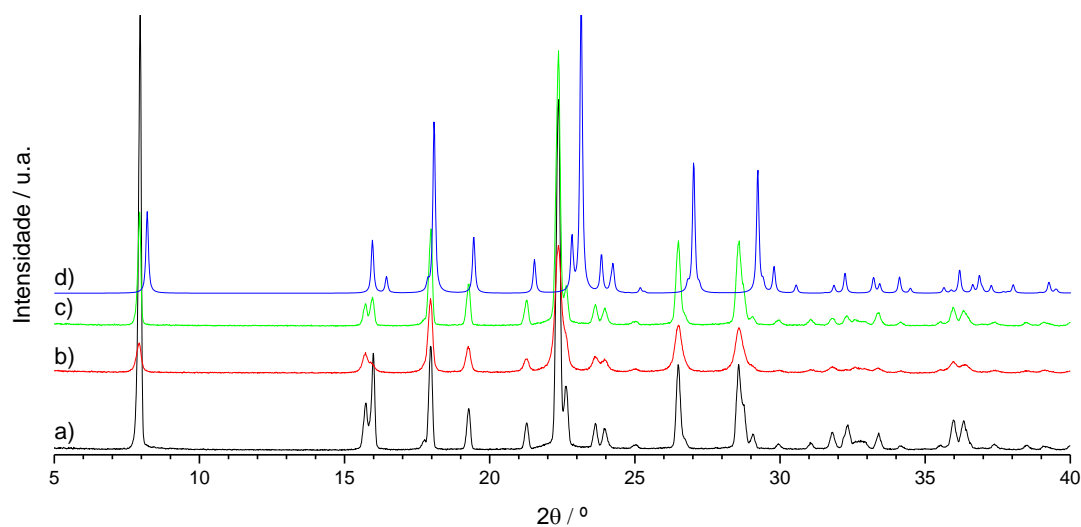


**Figura 47.** Termogramas DSC de aquecimento de: CAT,  $m = 1,96$  mg (a), QUE,  $m = 3,07$  mg (b) e MYR,  $m = 1,45$  mg (c),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

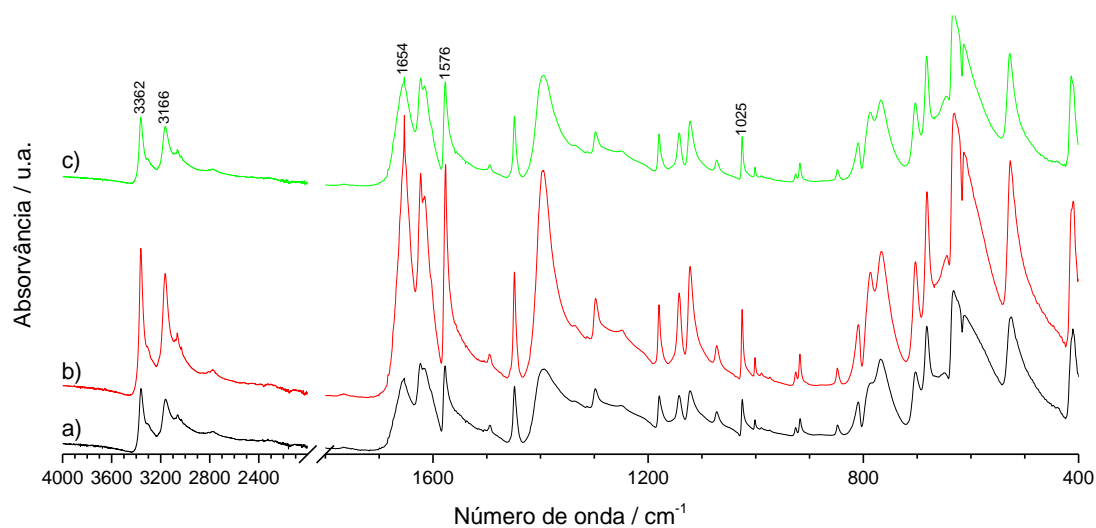
### 3.2.2 Co-formadores: amidas

Tal como para os flavonóides, foi caracterizada a forma sólida comercial de três amidas como potenciais co-formadores e investigado o efeito dos processos mecanoquímicos aplicados neste trabalho, na forma sólida de partida.

A partir dos dados apresentados, Figuras 48 a 53, podemos verificar que não ocorreu qualquer tipo de alteração nos compostos de partida (benzamida, salicilamida e etenzamida) após serem submetidos a moagens nas condições usadas neste trabalho. Confirma-se também que as estruturas dos compostos de partida correspondem às simuladas a partir dos ficheiros CIFs de estruturas depositadas na CCDC.

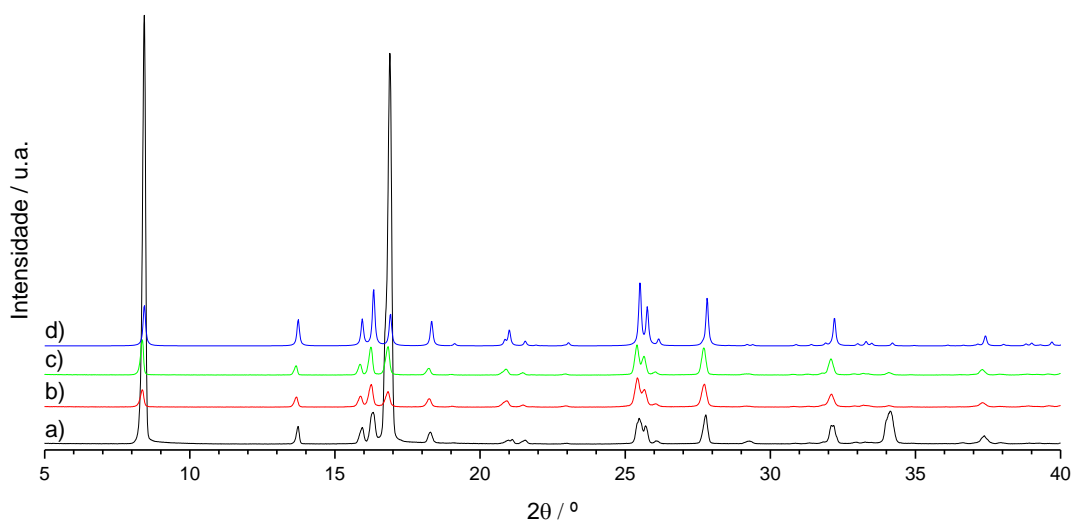


**Figura 48.** Difratogramas de raios-X de pó da BEN de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c) e o difratograma da BEN (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 131499 (registado a  $T = 123$  K) [272].

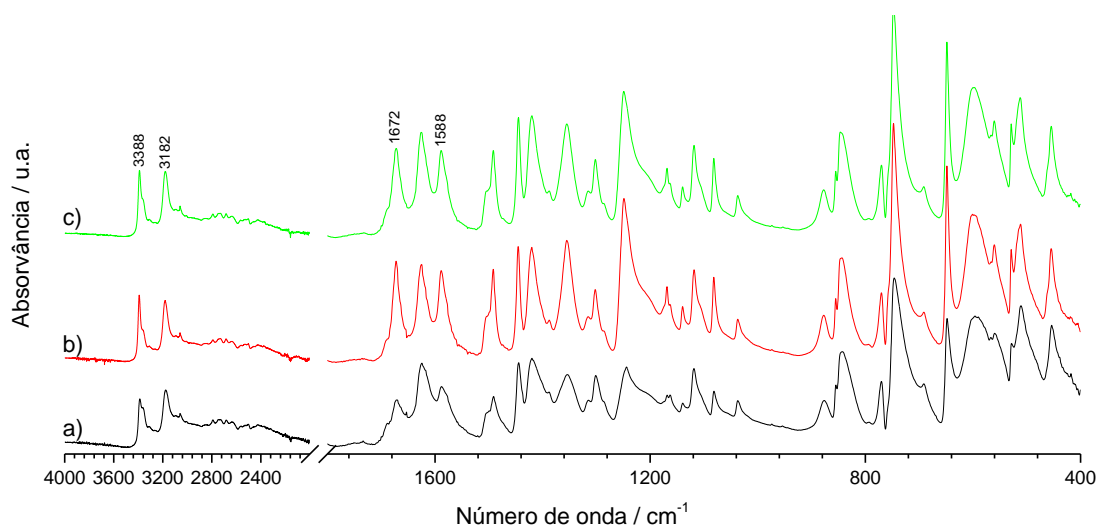


**Figura 49.** Espectros de IV da BEN de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c).

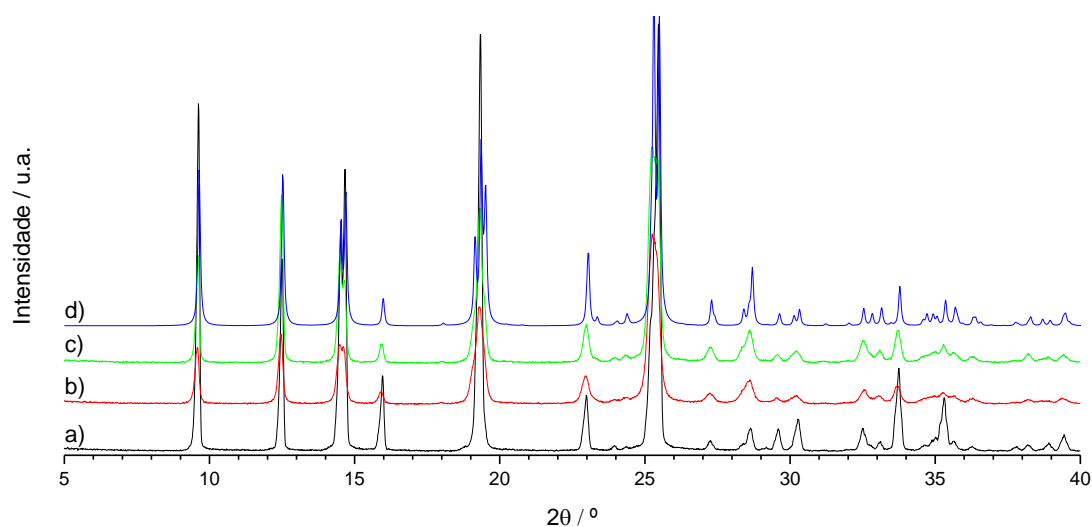




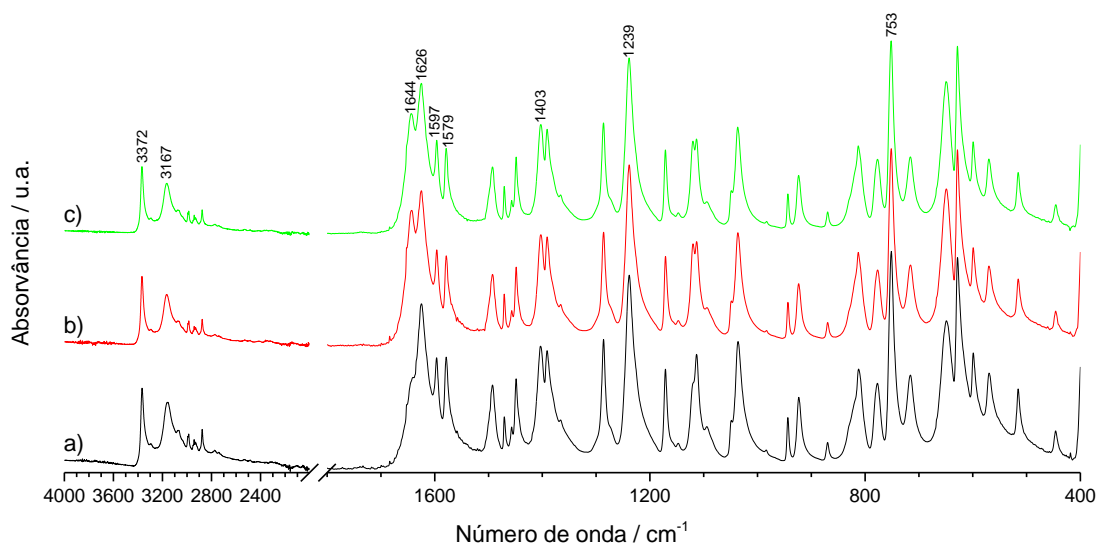
**Figura 50.** Difratogramas de raios-X de pó da SA de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c) e o difratograma da SA (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 751100 [183].



**Figura 51.** Espectros de IV da SA de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c).

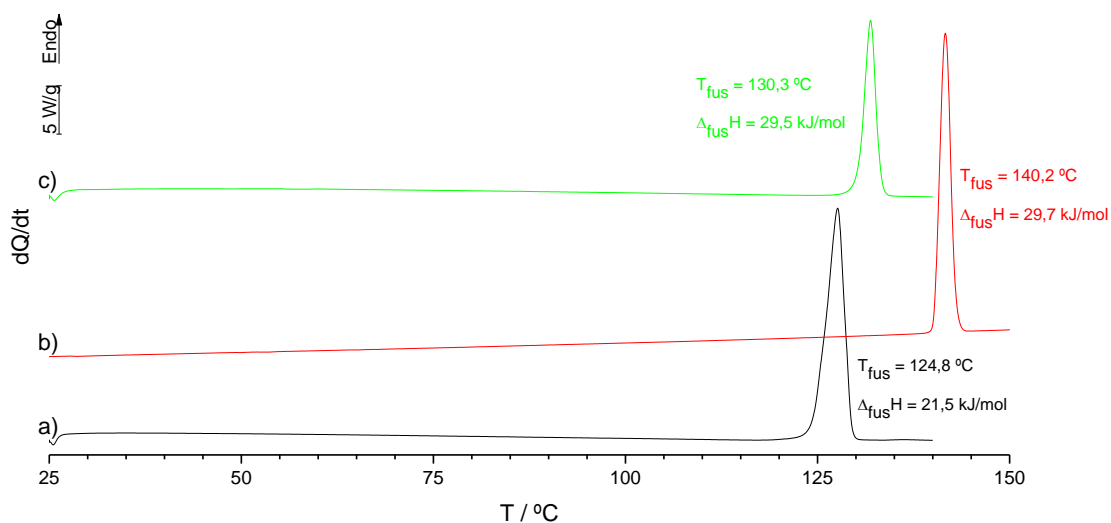


**Figura 52.** Difratogramas de raios-X de pó da ETZ de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c) e o difratograma da ETZ (d) simulado a partir do ficheiro CIF da estrutura depositada no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com o número 760137 [273].



**Figura 53.** Espectros de IV da ETZ de partida (a), obtida por NG (b) e por LAG (c).

Na Figura 54 estão representados os termogramas de DSC da BEN, da SA e da ETZ, com os respetivos pontos de fusão, que estão de acordo com os registados em literatura [174] [188] [205].

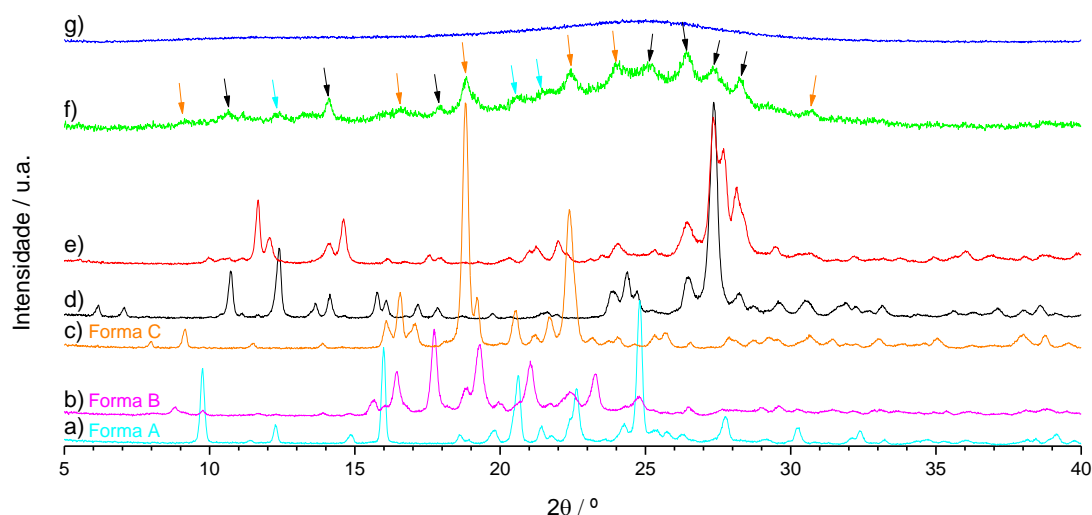


**Figura 54.** Termogramas DSC da BEN de partida,  $m = 2,25$  mg (a), da SA de partida,  $m = 1,44$  mg (b) e da ETZ de partida,  $m = 1,14$  mg (c),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

### 3.3 Investigação de formas sólidas multicomponente: sistemas binários Norfloxacina + Flavonóides

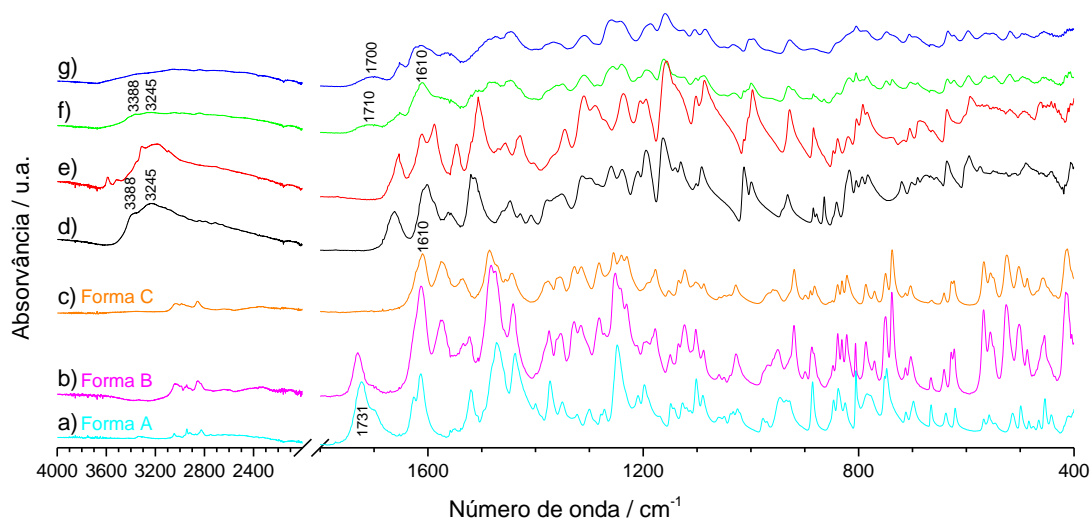
#### 3.3.1 Norfloxacina + Quercetina

Nas Figuras 55 e 56 podemos verificar que não ocorreu associação entre a NOR e a QUE, na proporção de 1:1, quando submetidas a moagem sem solvente durante 30 minutos (NG) a 15Hz e que, a 30 Hz a mistura amorfizou. Na mistura obtida com a frequência de 15Hz, parcialmente amorfa, observam-se, Figura 55, reflexões de QUE  $2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e reflexões atribuíveis às formas C e A de norfloxacina. De recordar que a moagem de norfloxacina na ausência de solvente não altera a forma de partida, obtendo-se também algum material amorfo.



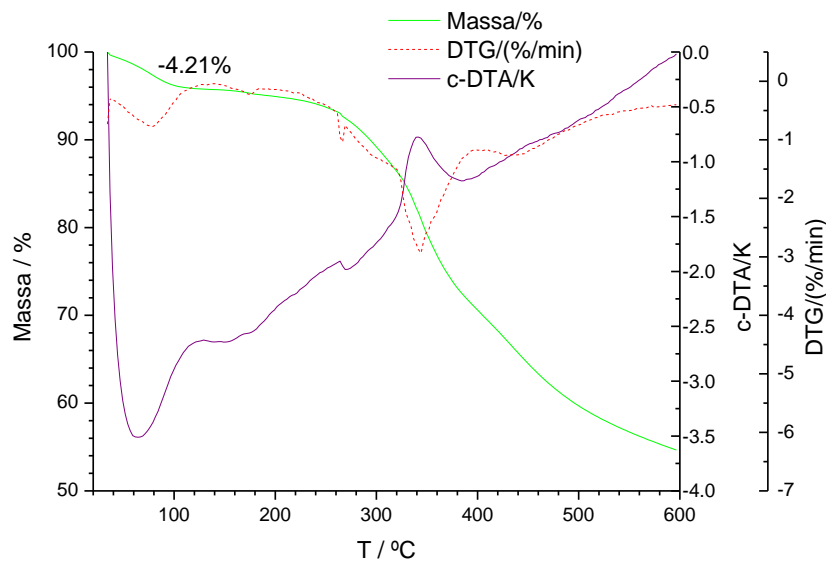
**Figura 55.** Difractogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da QUE dihidratada (d), da QUE obtida por NG a 30Hz (e), da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 15Hz (f) e a 30Hz (g).

Os espectros de infravermelho, Figura 56f, são característicos de amostras com baixo grau de cristalinidade sendo notória, apesar da baixa intensidade, a banda de alongação do -COOH a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , desviado do valor observado na forma A, como não é de estranhar num material amorfo.



**Figura 56.** Espectros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da QUE dihidratada (d), da QUE obtida por NG a 30Hz (e), da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 15Hz (f) e a 30Hz (g).

A curva termogravimétrica da mistura obtida a 30Hz apresentada na Figura 57 confirma a presença de solvente no sólido obtido. Atendendo às condições de preparação, este solvente deverá ser água correspondendo a perda de massa a 1.5 moléculas de solvente.

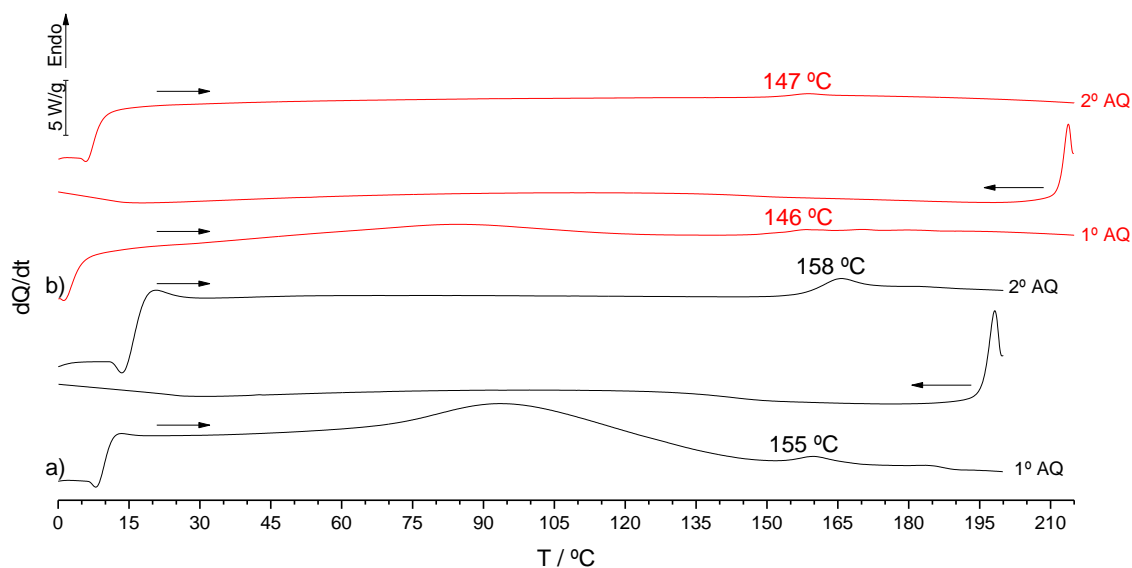


**Figura 57.** Análise termogravimétrica da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 30Hz.

Esta amostra obtida por mecanoquímica, 30Hz, que corresponde a um co-amorfo dos dois compostos foi avaliada por calorimetria diferencial de varrimento, em cápsulas perfuradas, tendo-se registado as curvas indicadas na Figura 58a. No primeiro aquecimento é observada uma primeira transição que é atribuível à perda de água, seguindo-se a transição vítrea a  $T_g \approx 155$  °C. No segundo aquecimento, como esperado, apenas a transição vítrea é registada. A mistura manteve-se em estado amorfo, quando guardada em exsiccador com sílica, pelo menos por um período de 3 meses, como provamos com os resultados que se mostram na Figura 58b, com o perfil das curvas de DSC, similar ao registado logo após a moagem, Figura 58a.

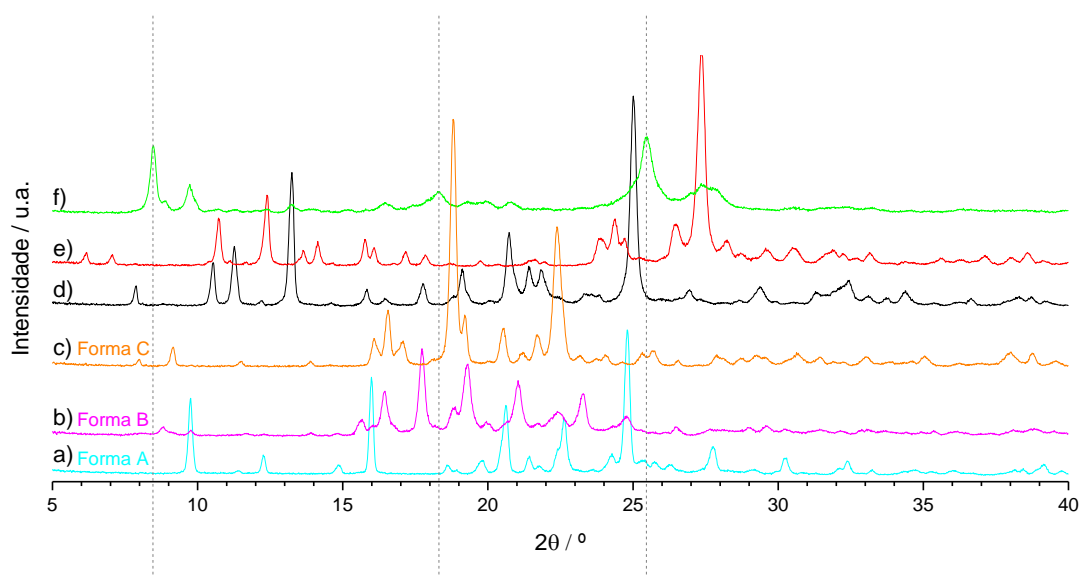
Este co-amorfo deverá ser alvo de estudo adicional, para avaliar a sua estabilidade, tanto em termos de forma física como de conteúdo de água, em condições especificadas de armazenamento.

Adicionalmente, será também de todo o interesse a preparação e avaliação de estabilidade do co-amorfo obtido após desidratação, observada a  $T \approx 108$  °C nas curvas de DSC e TGA.



**Figura 58.** Termogramas DSC dos aquecimentos e arrefecimento da NOR:QUE (1:1) obtida por NG a 30Hz, no dia da realização da moagem,  $m = 3,10$  mg (a) e passados 3 meses,  $m = 2,02$  mg (b),  $\beta = 30$  °C  $\text{min}^{-1}$  e  $\beta = 20$  °C  $\text{min}^{-1}$ , respetivamente.

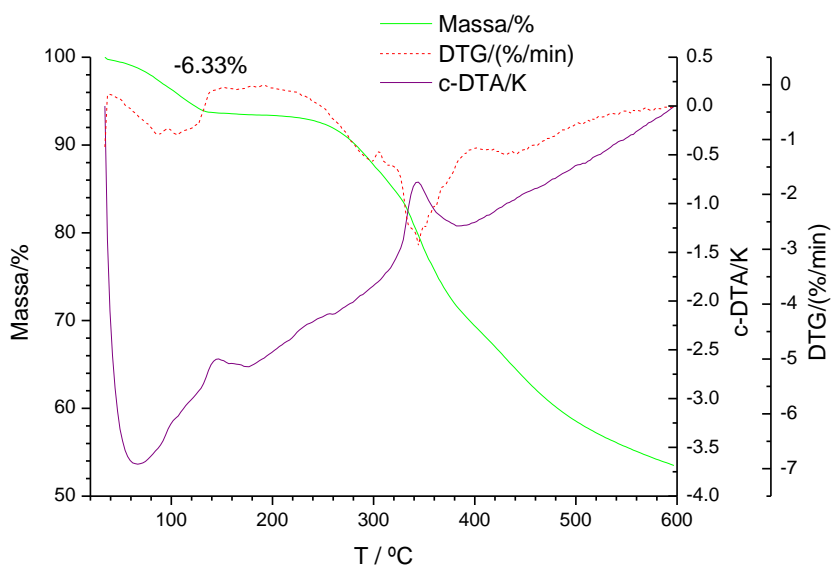
A moagem dum a mistura equimolar dos dois compostos, 15Hz, 30 minutos, assistida por etanol conduziu a resultados muito diferentes. Na Figura 59 podemos observar novos planos de reflexão, que apontam para que tenha ocorrido associação entre a NOR e a QUE, numa nova estrutura supramolecular. Não se observa excesso de qualquer uma das formas conhecidas dos compostos de partida.



**Figura 59.** Difratoformas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H<sub>2</sub>O (d), da QUE dihidratada (e) e da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por LAG, etanol (f).

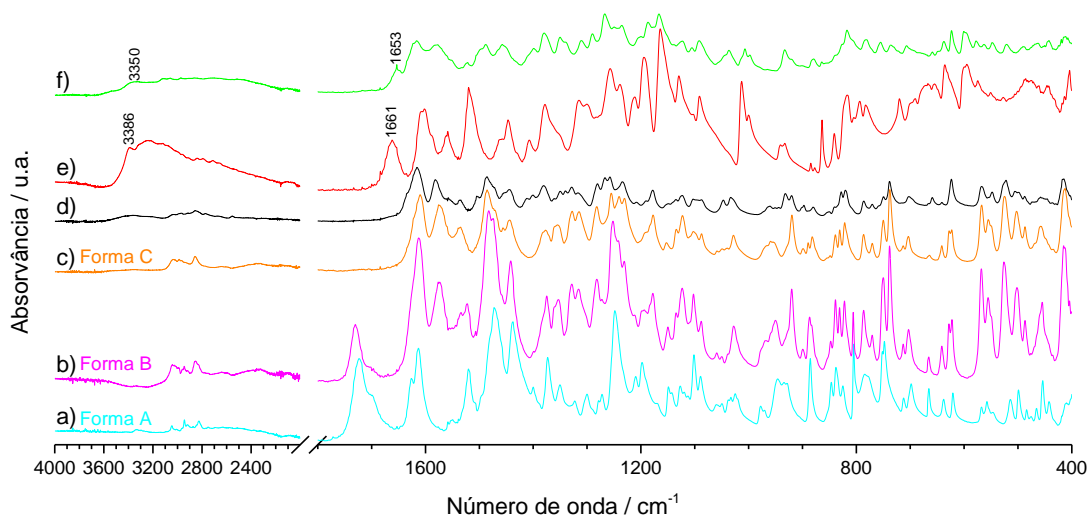
Na Figura A2 está representado o difratograma de raios-X de pó da NOR:QUE (1:1) obtida por LAG e os difratogramas de raios-X de pó de todas as outras formas hidratadas da

NOR e QUE, não se verificando coincidência com qualquer um deles. A presença de solvente no sólido obtido é evidente na curva termogravimétrica apresentada na Figura 60. A perda de massa observada é compatível com a perda de 2.5 moléculas de água ou de 1 molécula de etanol.



**Figura 60.** Análise termogravimétrica da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por LAG.

O espectro de infravermelho, Figura 61, é de realçar a ausência da elongação C=O, característica do COOH de norfloxacinina o que indicará que esta se encontra na forma zwitteriônica, e o deslocamento do máximo da banda de elongação C=O da quercetina, de 1661  $\text{cm}^{-1}$  para 1653  $\text{cm}^{-1}$ .

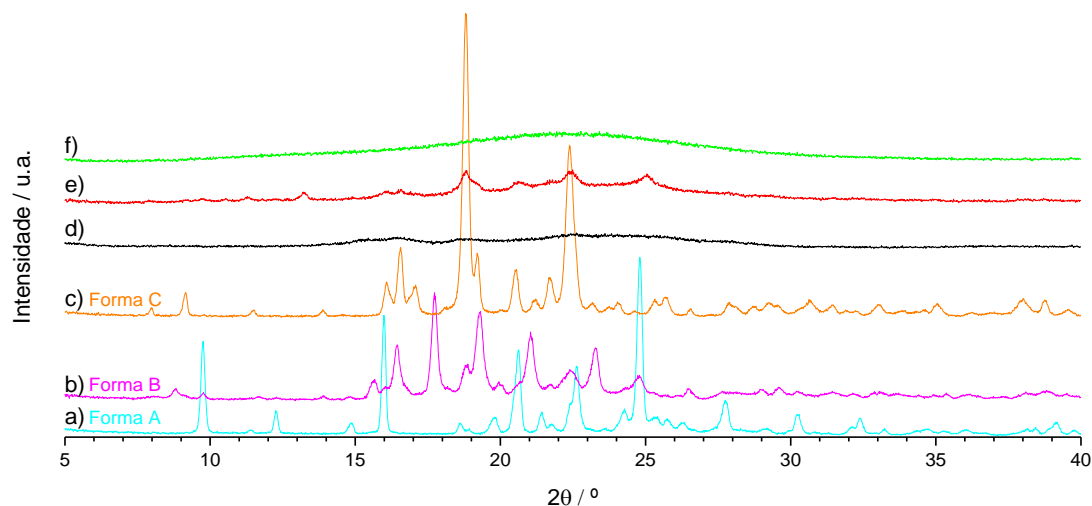


**Figura 61.** Espectros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H<sub>2</sub>O (d), da QUE dihidratada (e) e da mistura NOR:QUE (1:1) obtida por LAG, etanol (f).

Os resultados apontam para formação de uma estrutura supramolecular e solvatada entre a quercetina e a norfloxacin. A calorimetria diferencial de varrimento não se revelou útil na análise deste sistema. Poderá tentar-se em trabalho futuro, usar RMN no estado sólido para obter informação adicional. Várias experiências de cristalização em solução foram já levadas a cabo na tentativa de obter cristais da nova estrutura supramolecular, para resolução da estrutura cristalina, mas, como não é incomum, até agora sem sucesso.

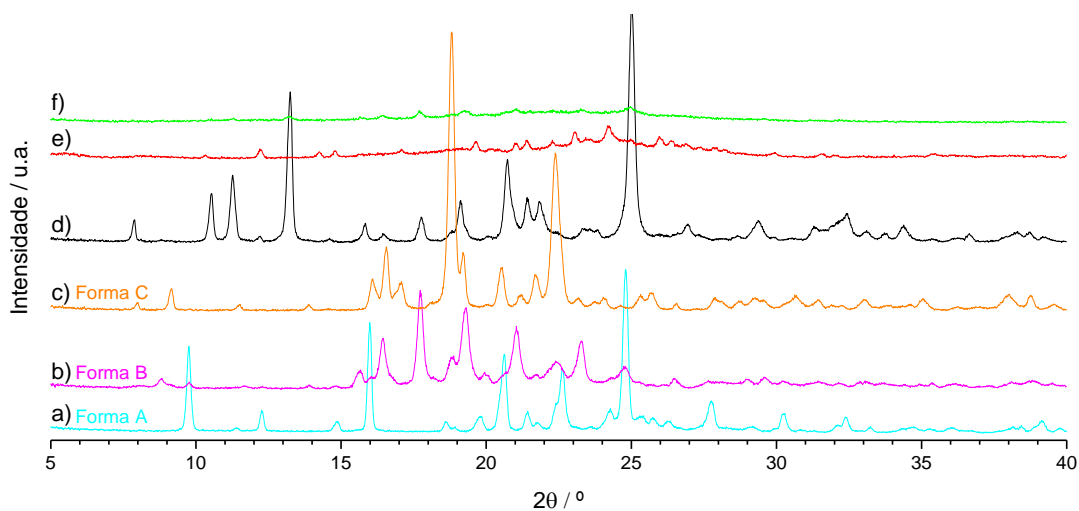
### 3.3.2 Norfloxacin + Catequina

A investigação de misturas equimolares de norfloxacin e catequina submetidas a mecanoquímica, sem solvente (15Hz) e com assistência de 10 $\mu$ L de etanol, conduzem a resultados com alguma semelhança entre si. É obtido material parcialmente amorfo quer por moagem sem solvente a 15Hz, quer por LAG, Figuras 62e e 63f, o que não será de estranhar dada a tendência da catequina para amorfizar. Na Figura 62e são visíveis reflexões atribuíveis às formas C (predominantemente) e A da norfloxacin. Na Figura 63f, amostra obtida por LAG, as reflexões residuais, são atribuíveis à forma sesquihidratada da NOR.



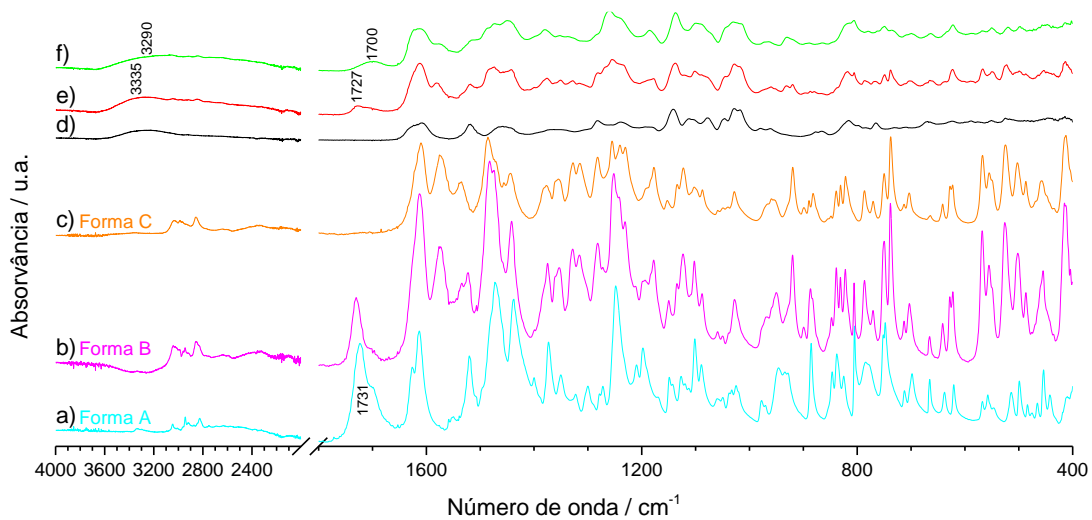
**Figura 62.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da CAT de partida (d) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por NG a 15Hz (e) e a 30Hz (f).



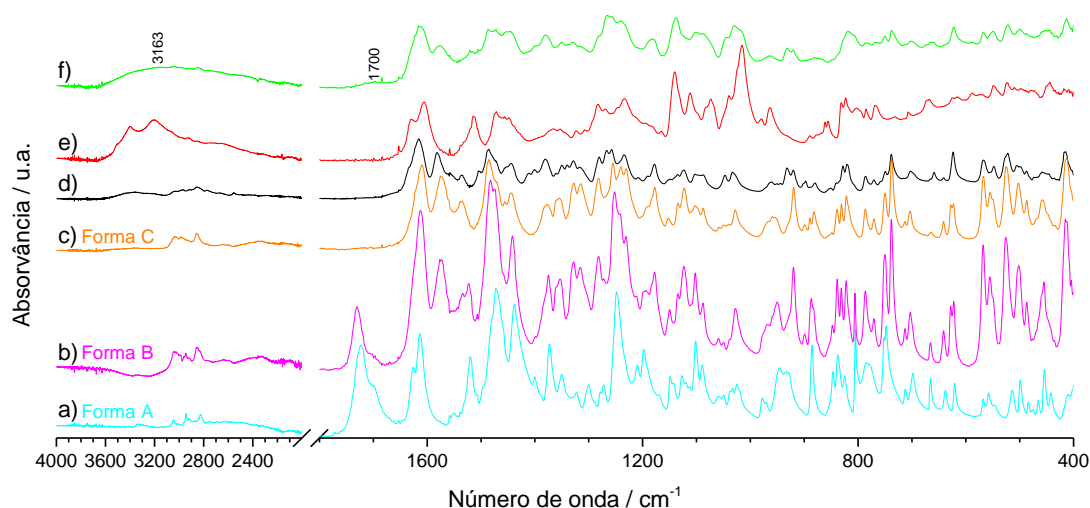


**Figura 63.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H<sub>2</sub>O (d), da CAT obtida por LAG (e) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por LAG, etanol (f).

Os espectros de infravermelho, Figuras 64e e 65f, estão de acordo com a interpretação apresentada acima.

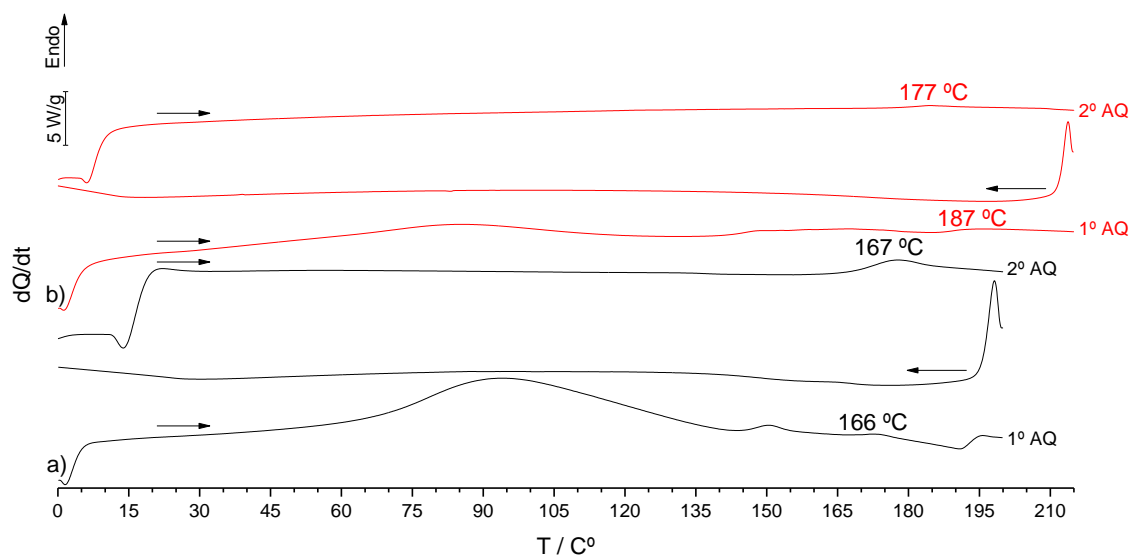


**Figura 64.** Espectros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da CAT de partida (d) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por NG a 15Hz (e) e a 30Hz (f).



**Figura 65.** Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e NOR·1.5H<sub>2</sub>O (d), da CAT obtida por LAG (e) e da mistura NOR:CAT (1:1) obtida por LAG, etanol (f).

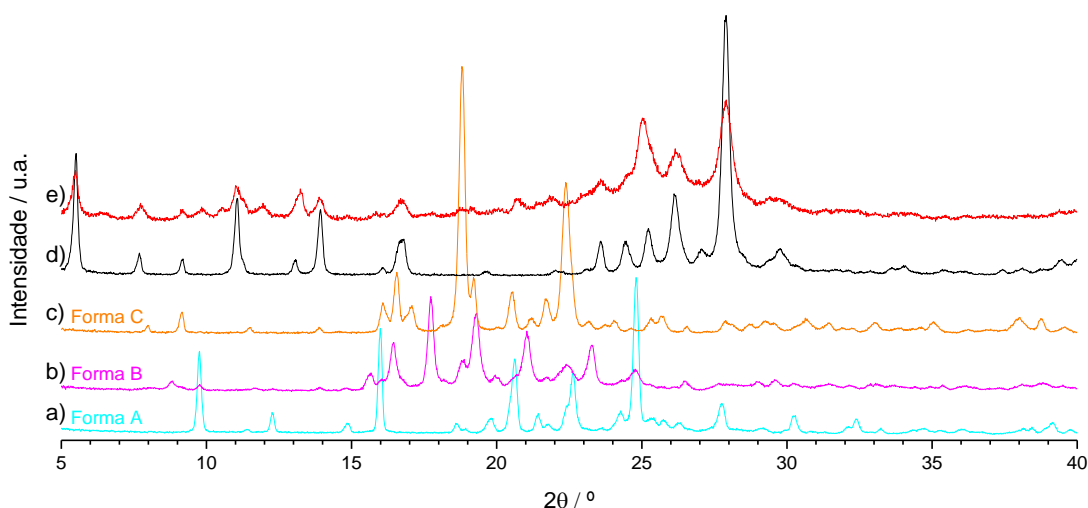
O processo de mecanoquímica a 30Hz, 30 minutos, sem solvente originou uma mistura amorfa, Figura 62f, que poderá ser de interesse. Os termogramas obtidos para a mistura recém preparada, após 3 meses de armazenamento, mostram alterações de algum relevo no perfil e nos parâmetros registrados, Figura 66b.



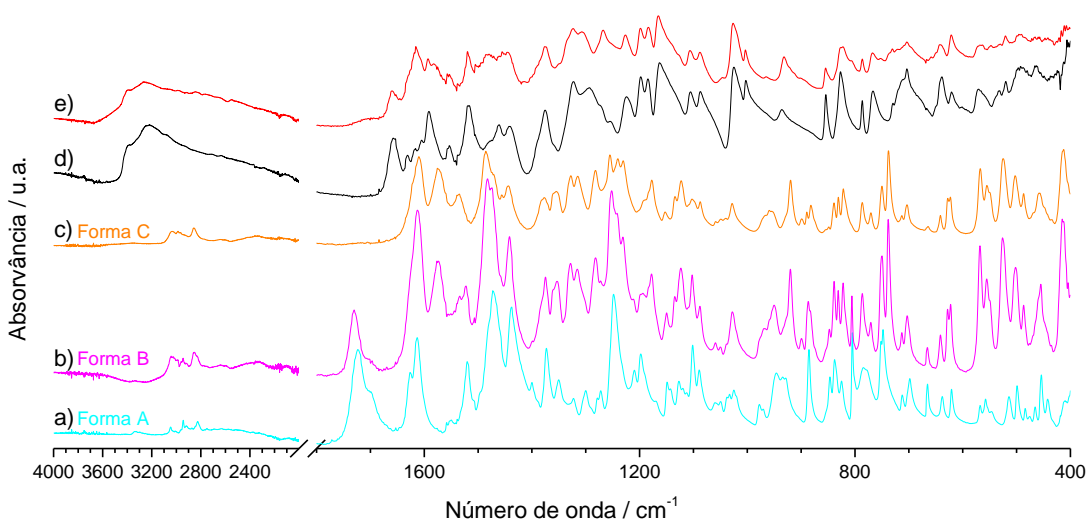
**Figura 66.** Termogramas DSC dos aquecimentos e arrefecimento da NOR:CAT (1:1) obtida por NG a 30Hz, no dia da realização da moagem,  $m = 3,42$  mg (a) e passados 3 meses,  $m = 1,91$  mg (b),  $\beta = 30$  °C min<sup>-1</sup> e  $\beta = 20$  °C min<sup>-1</sup>, respetivamente.

### 3.3.3 Norfloxacin + Miricetina

Por mecanoquímica na ausência de solvente numa mistura equimolar de NOR+MYR obtém-se uma mistura física, sendo claramente visível no difratograma da Figura 67e as reflexões de miricetina de partida e reflexões da forma A de norfloxacin. No espetro de infravermelho, Figura 68, não é registada qualquer alteração nas bandas associadas à miricetina de partida.

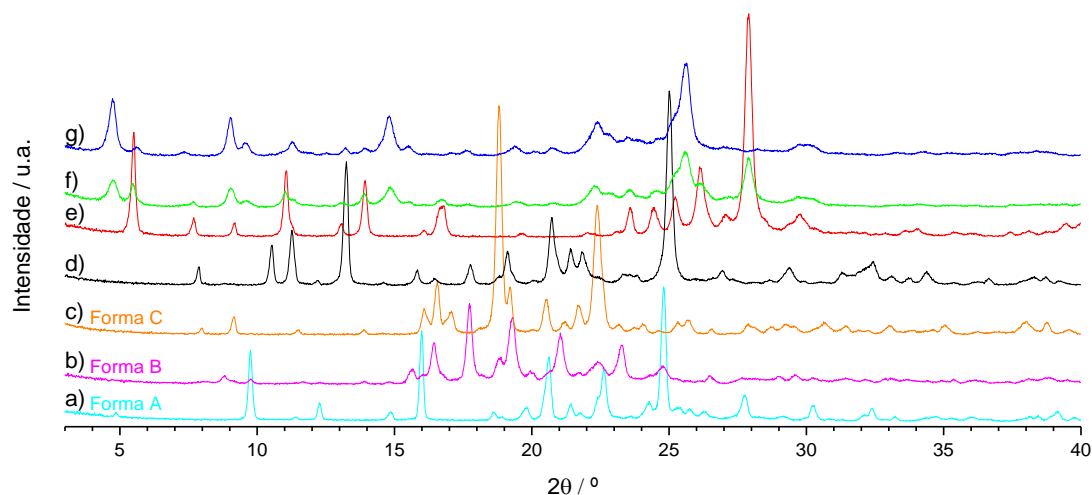


**Figura 67.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da MYR (d) e da mistura NOR:MYR (1:1) obtida por NG (e).

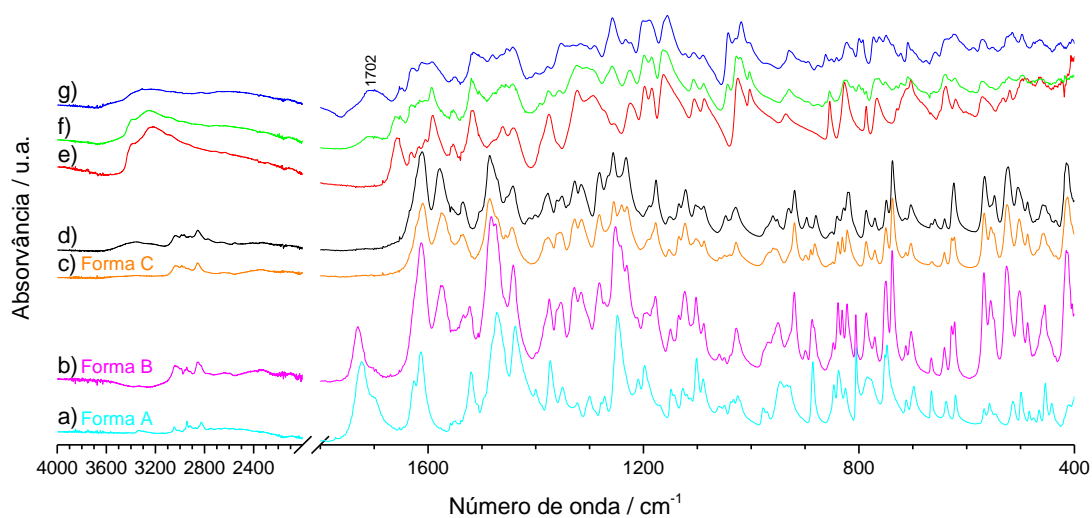


**Figura 68.** Espectros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da MYR (d) e da mistura NOR:MYR (1:1) obtida por NG (e).

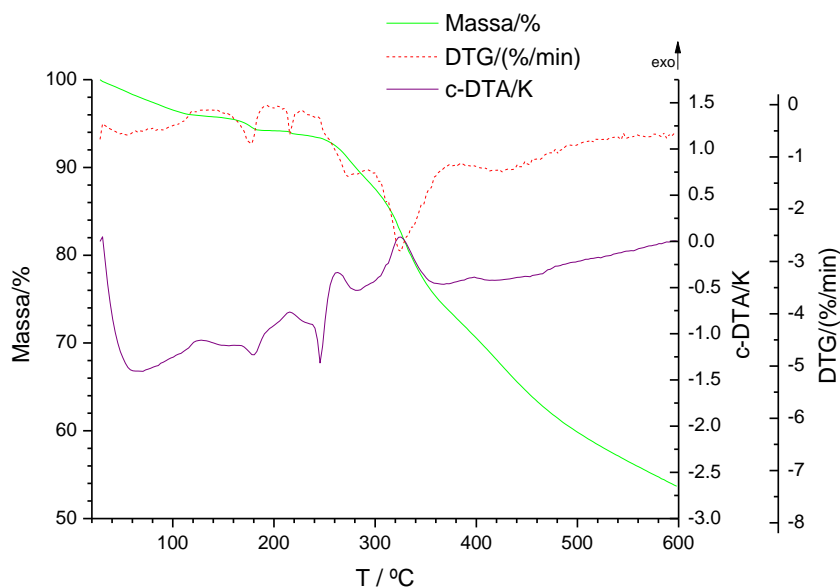
A moagem dum a mistura equimolar de NOR+MYR assistida por etanol, pelo contrário, originou um difratograma, Figura 69g com reflexões únicas quando comparadas com todas as formas conhecidas dos dois compostos, Figura 69 e A3. No difratograma dum a mistura (1:2) NOR:MYR e também no espectro de infravermelho Figura 70f é claramente visível o excesso de miricetina. A curva termogravimétrica da mistura 1:1, Figura 71, tem um registo complexo de perda de massa de solvente antes do início da degradação a  $T \approx 240$  °C.



**Figura 69.** Difratograma de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada  $1.5H_2O$  da NOR (d), da MYR (e) e das misturas 1:2 (f) e 1:1 (g) de NOR e MYR obtidas por LAG.



**Figura 70.** Espectros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada  $1.5H_2O$  da NOR (d), da MYR (e) e das misturas 1:2 (f) e 1:1 (g) de NOR e MYR obtidas por LAG.



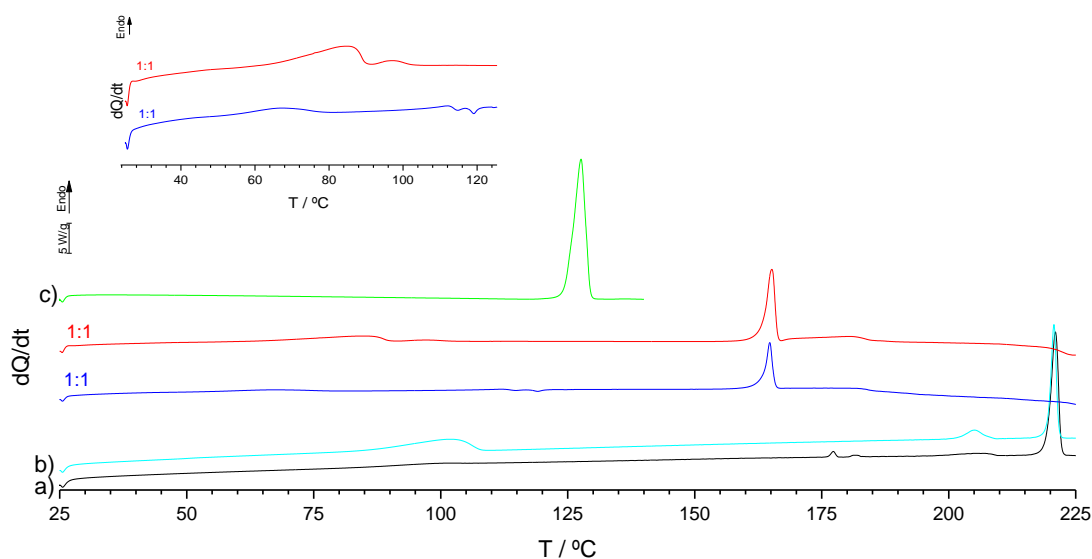
**Figura 71.** Análise termogravimétrica da NOR:MYR (1:1) obtida por LAG.

Os resultados apontam para a associação de miricetina e de norfloxacin numa estrutura supramolecular equimolar que se encontra solvatada.

### 3.4 Investigação de formas sólidas multicomponente: sistemas binários Norfloxacin + Amidas

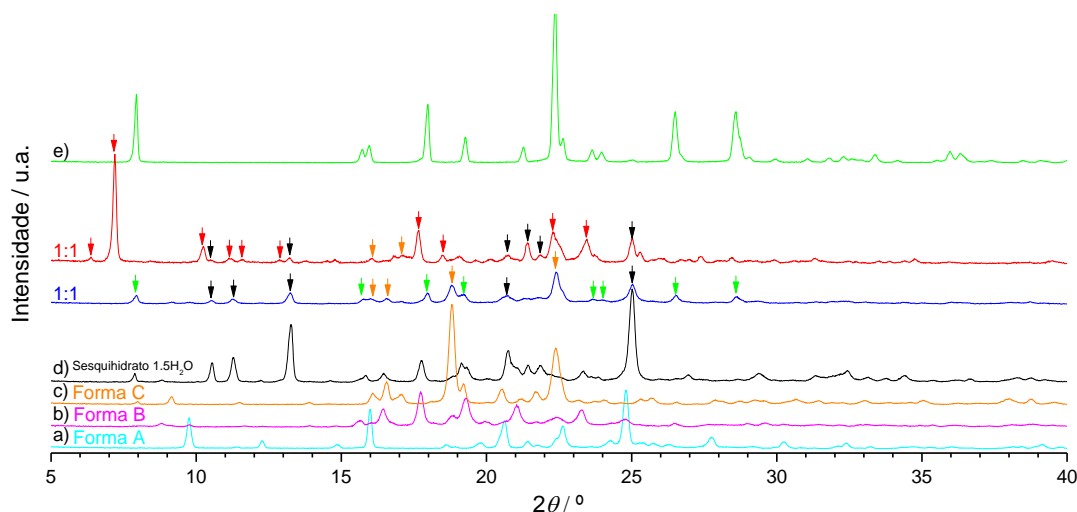
#### 3.4.1 Norfloxacin + Benzamida

Preparam-se misturas de NOR com BEN, na proporção de 1:1 por NG e LAG, etanol. Nos termogramas DSC que se encontram representados na Figura 72 e também nas Figuras A4 e A5 é visível um pico endotérmico de elevada energia atribuível a fusão que tem temperatura de onset  $T = 163\text{ °C}$ , valor que se situa entre os valores de temperatura de fusão de benzamida e norfloxacin. Esta observação é indicativa de que ocorreu associação entre os dois compostos numa nova estrutura supramolecular. Em ambas as curvas são visíveis eventos de baixa energia antes do pico principal (ver expansão na Figura 72).



**Figura 72.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da NOR·1.5H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (b), da BEN,  $m = 2,25$  mg (c) e de misturas de NOR e BEN na proporção 1:1 - obtida por NG, representada a azul,  $m = 1,05$  mg, e obtida por LAG, representada a vermelho;  $m = 1,78$  mg;  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.

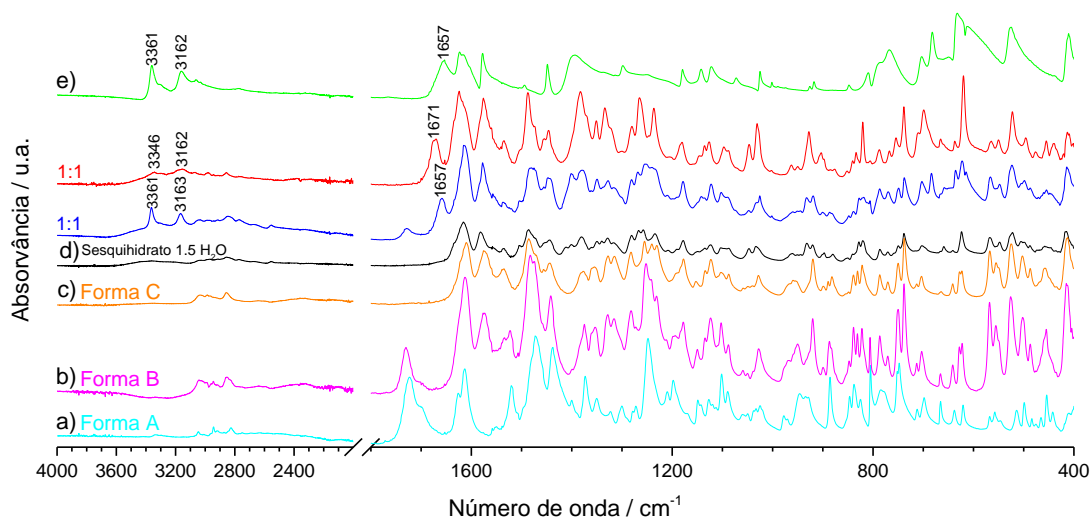
Contudo, os difratogramas de raios-X de pó, como mostra a Figura 73, indicam que os sólidos obtidos pelas duas vias de mecanoquímica não são iguais. A amostra obtida por NG apresenta todas as reflexões da benzamida e reflexões atribuíveis a NOR·1.5H<sub>2</sub>O, não sendo de excluir a presença de outras formas. Na amostra obtida por LAG, as reflexões de benzamida estão ausentes, reflexões atribuíveis a NOR·1.5H<sub>2</sub>O são visíveis e reflexões novas são observadas.



**Figura 73.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H<sub>2</sub>O (d) da NOR, da BEN (e) e de misturas de NOR e BEN na proporção 1:1 - obtida por NG, representada a azul, e obtida por LAG, representada a vermelho.

Estas conclusões são corroboradas pelos espectros de infravermelho, Figura 74. Confirma-se que a amostra obtida por NG é uma mistura física de benzamida com norfloxacinina mostrando evidência da presença também de uma forma não zwitteriônica. O sólido obtido por LAG apresenta um espectro que não é resultante da soma das contribuições das formas sólidas dos componentes puros.

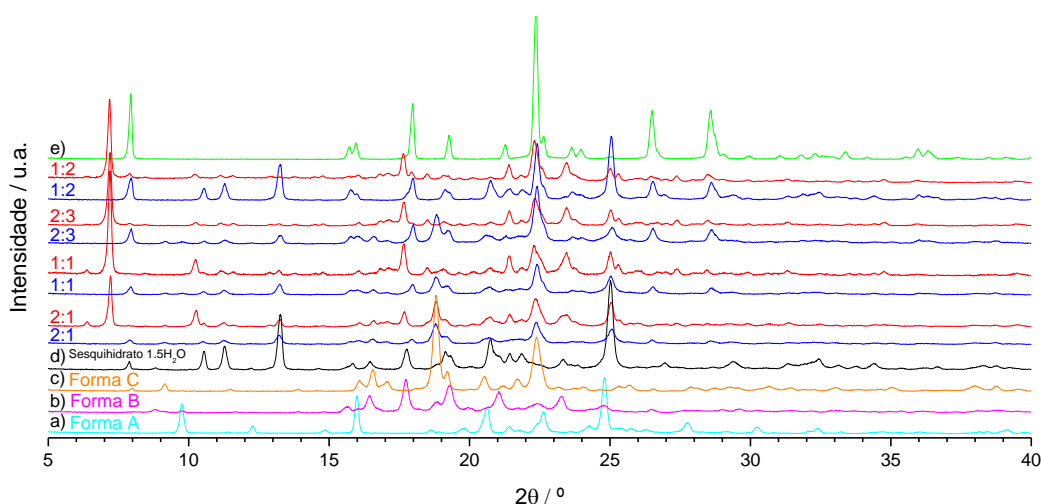
Os resultados apontam para a associação supramolecular entre a norfloxacinina e a benzamida, quando é utilizada moagem assistida por etanol, uma nova entidade, que pode ser um co-cristal solvatado. A proporção molar de norfloxacinina nessa nova entidade deverá ser inferior a 50%.



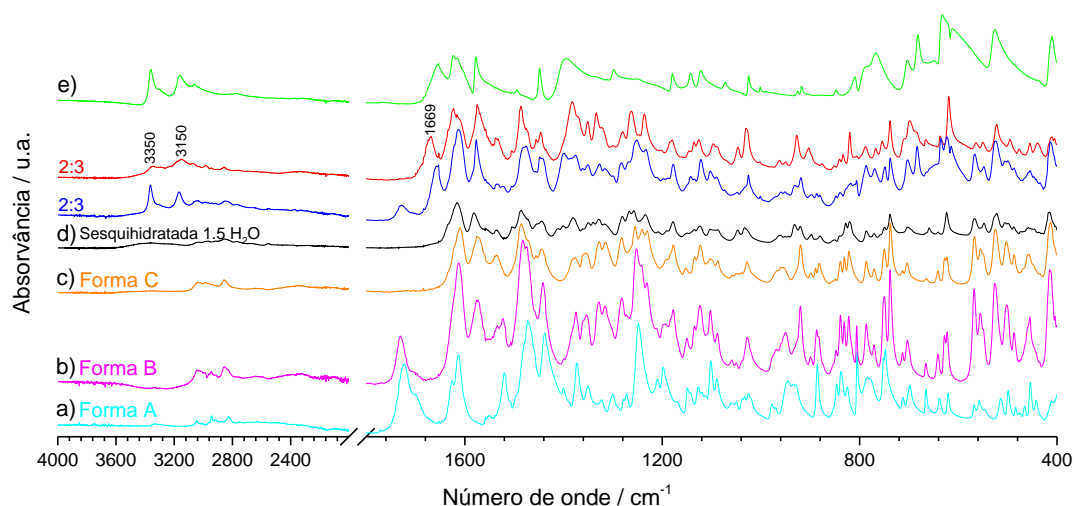
**Figura 74.** Espectros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5H<sub>2</sub>O (d) da NOR, da BEN (e) e de misturas de NOR e BEN na proporção 1:1 - obtida por NG, representada a azul,  $m = 1,05$  mg, e obtida por LAG, representada a vermelho.

Para testar esta hipótese, prepararam-se misturas de diferentes proporções por LAG, assistido por etanol, e também por NG. Os difratogramas obtidos são apresentados na Figura 75. Confirma-se a obtenção de misturas físicas na moagem sem assistência de solvente. Na mistura de composição (2:3) NOR:BEN, obtida por LAG, não são visíveis reflexões atribuíveis a excesso dos compostos de partida, o que identifica esta proporção como a estequiometria do novo co-cristal.

Nos espectros de IV das misturas (2:3) NOR:BEN apresentados na Figura 76 são indicados os valores de número de onda de algumas bandas porque apresentam deslocamento relativamente aos dos compostos de partida. Os espectros de todas as misturas são apresentados na Figura A4.



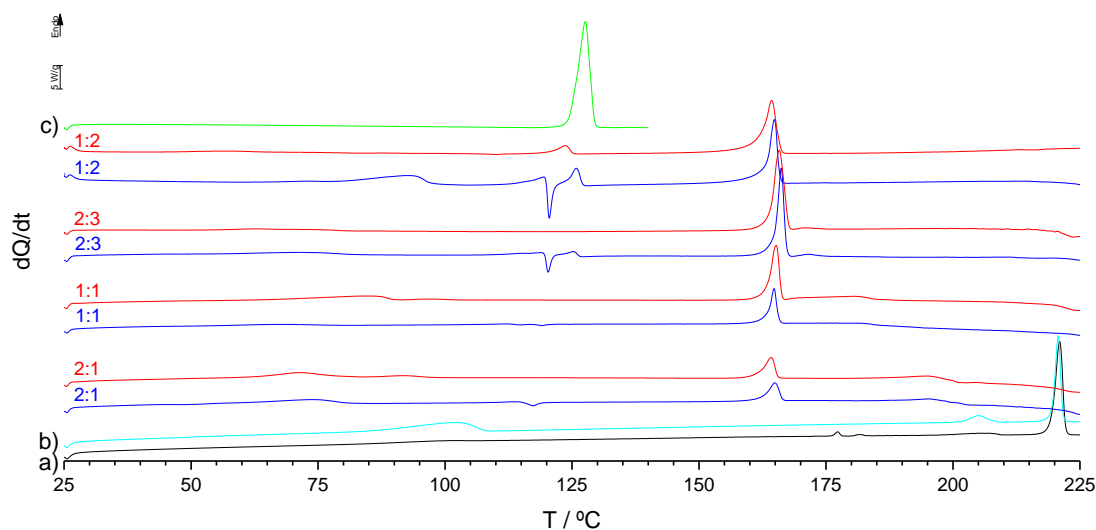
**Figura 75.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada  $1.5H_2O$  (d) da NOR, da BEN (e) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho.



**Figura 76.** Espetros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada  $1.5H_2O$  (d) da NOR, da BEN (e) e das misturas de NOR e BEN nas proporções 2:3, sendo que a mistura obtida por NG está representada a azul e a mistura obtida por LAG está representada a vermelho.

As curvas de DSC de aquecimento das várias misturas são apresentadas na Figura 77 e os valores de temperaturas dos eventos observados na Tabela 2. O perfil das curvas das amostras obtidas por NG, misturas físicas dos componentes, é mais complexo do que o das obtidas por LAG. Observam-se eventos endotérmicos atribuíveis à dessolvatação e eventos exotérmicos que são atribuíveis à associação entre os dois compostos, antes da fusão que é registada em valores de temperatura idênticos aos das misturas obtidas por LAG. Para a mistura (2:3) NOR:BEN a fusão é observada a  $T = 164\text{ }^{\circ}C$ .





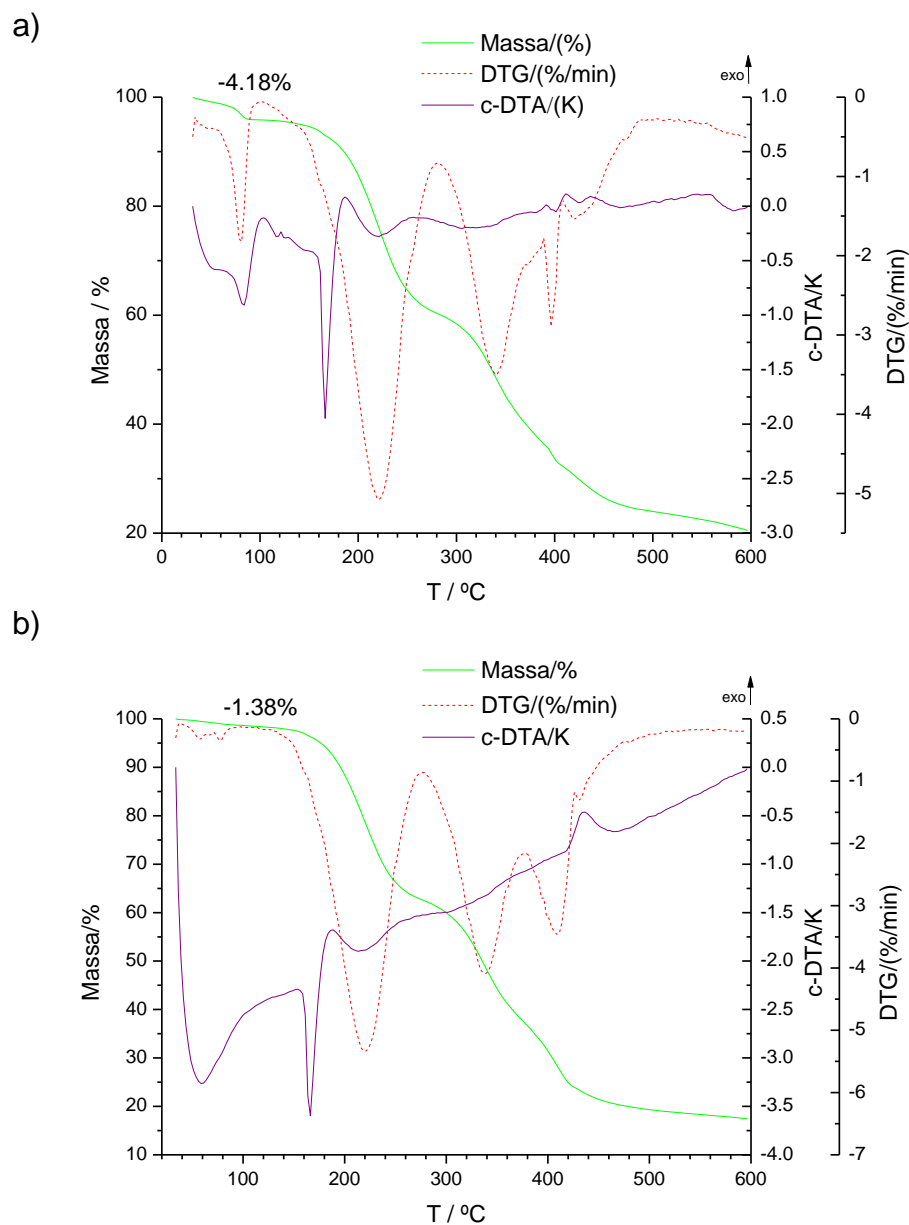
**Figura 77.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da  $\text{NOR} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $m = 1,50$  mg (b), da BEM,  $m = 2,25$  mg (c) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul (2:1,  $m = 1,50$  mg; 1:1,  $m = 1,05$  mg; 2:3,  $m = 1,63$  mg; 1:2,  $m = 2,13$  mg) e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho (2:1,  $m = 1,73$  mg; 1:1,  $m = 1,78$  mg; 2:3,  $m = 2,03$  mg; 1:2,  $m = 2,38$  mg),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

**Tabela 2.** Temperaturas dos eventos térmicos observados nas curvas DSC de aquecimento de misturas de NOR e BEN em diferentes proporções.

Amostra		$T / ^\circ\text{C}$					
		$T_a$	$T_b$	$T_c$	$T_d$	$T_e$	$T_f$
NOR:BEN (2:1)	NG	61,4		115,5		161,6	188,8
	LAG	62,9	82,4			162,4	187,5
NOR:BEN (1:1)	NG	72,4		113,6		162,6	181,6
	LAG	64,2	90,4	117,7		162,6	179,6
NOR:BEN (2:3) <sup>i</sup>	NG	58,8		119,6	123,0	164,8	169,0
	LAG	57,8				163,9	169,0
NOR:BEN (2:3) <sup>ii</sup>	NG	56,3		119,6	122,6	160,9	169,2
	LAG	55,3				160,0	168,3
NOR:BEN (1:2)	NG	81,7	114,8	119,8	123,8		163,1
	LAG	47,9				120,5	162,0

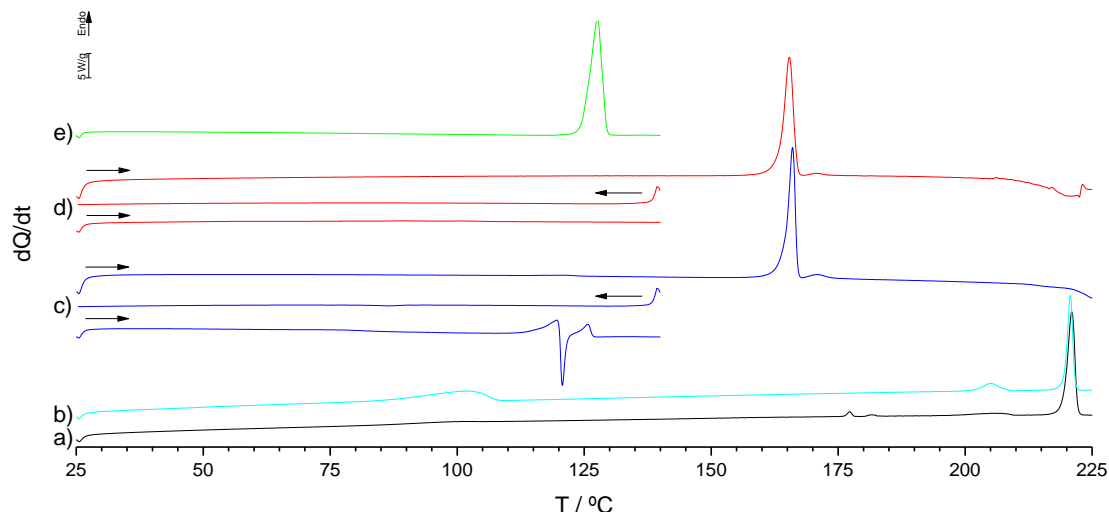
*i* – valores relativos à Figura 77; *ii* – valores relativos à Figura 79.  $T_a$  pico endotérmico (perda de solvente);  $T_c$  picos exotérmicos;  $T_b$  e  $T_d$  picos endotérmicos;  $T_e$  e  $T_f$  picos endotérmicos.

As curvas termogravimétricas obtidas para as misturas de (2:3) NOR:BEN, NG e LAG, Figura 78 a) e b), respetivamente, confirmam perda de solvente no processo de aquecimento, que no caso da mistura preparada por LAG é apenas solvente adsorvido.



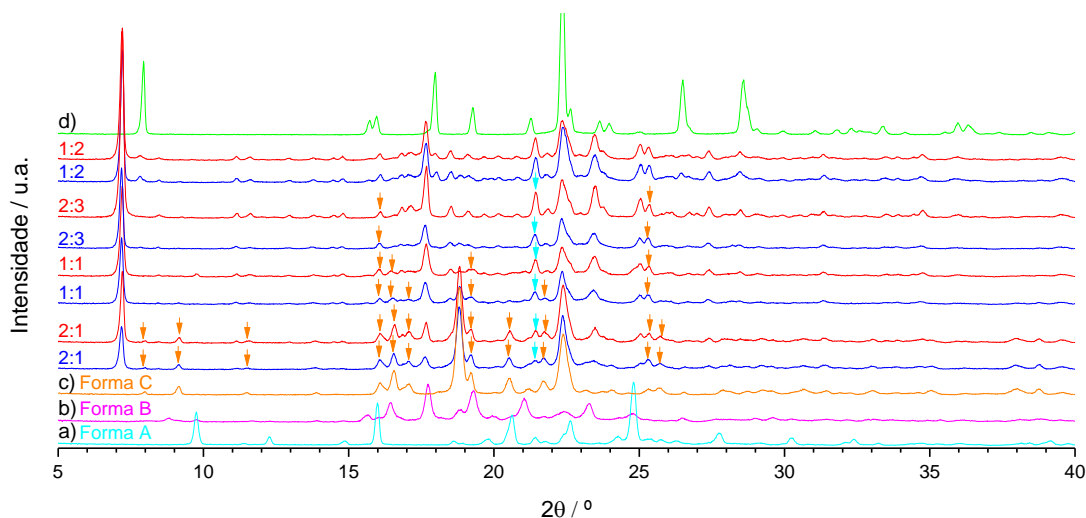
**Figura 78.** a) Análise termogravimétrica da NOR:BEN (2:3) obtida por NG; b) Análise termogravimétrica da NOR:BEN (2:3) obtida por LAG.

As misturas de 2:3 obtidas por NG e LAG foram submetidas, com recurso ao DSC, a um programa de aquecimento/arrefecimento/aquecimento, tal como se pode observar na Figura 79. Foram analisadas para estas misturas e para todas as outras investigadas, amostras obtidas após aquecimento até 140 °C.

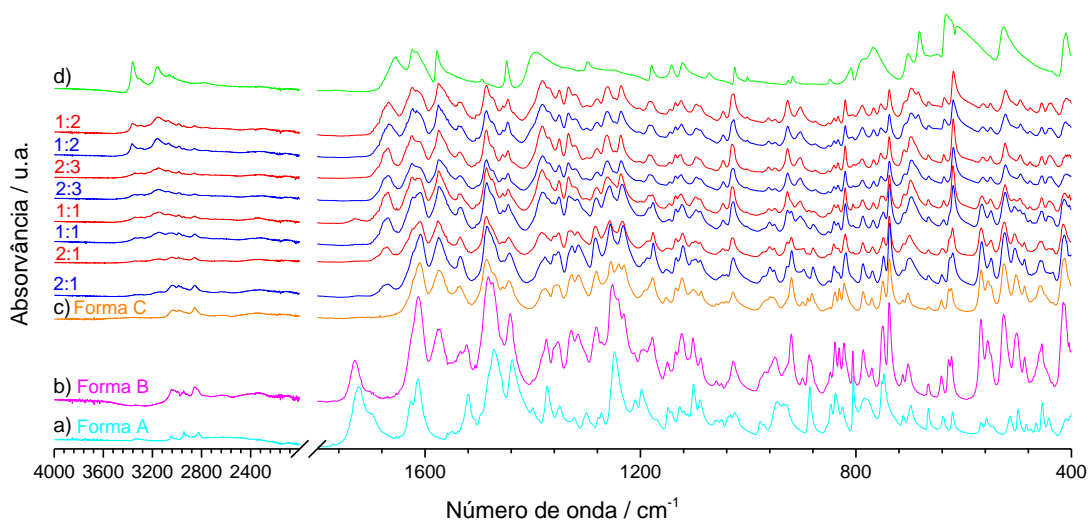


**Figura 79.** Termograma DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da  $\text{NOR} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $m = 1,50$  mg (b), das misturas de NOR com BEN na proporção de 2:3 obtidas por NG,  $m = 2,43$  mg (c) e LAG,  $m = 2,50$  mg (d) e da BEN de partida,  $m = 2,25$  mg (e),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

Os difratogramas, representados na Figura 80, como se esperava, são agora semelhantes para misturas da mesma composição (tal como os espectros de infravermelho, Figura 81). Registam-se excessos de norfloxacina nas misturas (2:1) NOR:BEN relativamente ao difratograma de mistura de composição (2:3) NOR:BEN e excesso de benzamida na mistura 1:2.



**Figura 80.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da BEN (d) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, aquecidas no DSC até 140 °C, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho.

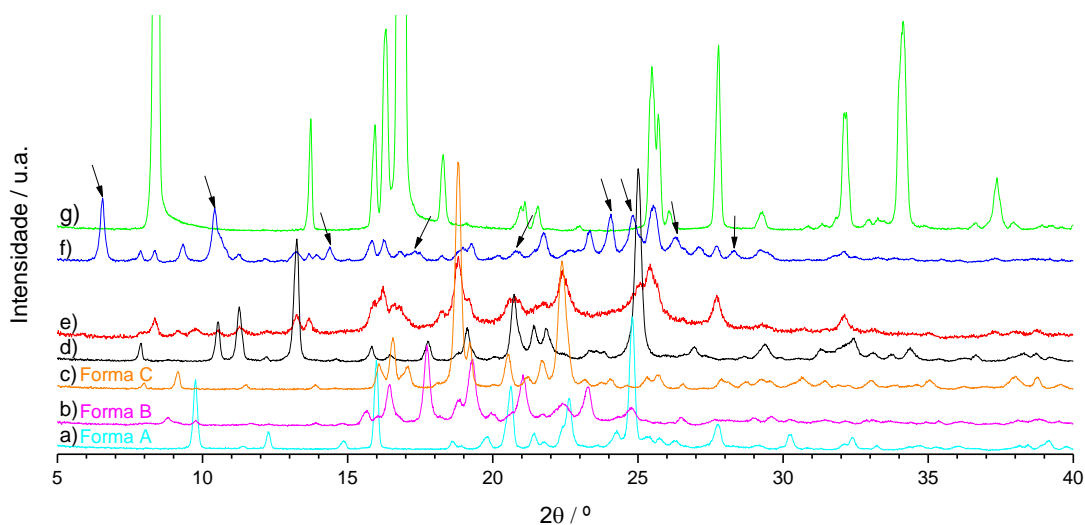


**Figura 81.** Espectros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, da BEN (d) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, aquecidas no DSC até 140 °C, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho.

### 3.4.2 Norfloxacin + Salicilamida

Seguidamente, prepararam-se misturas de NOR com SA na proporção de 1:1, por NG e por LAG, assistido por etanol.

Os difratogramas de raios-X de pó destas misturas são comparados com os dos compostos de partida na Figura 82 (os respetivos espectros de infravermelho são apresentados em anexo, Figura A7). O difratograma da mistura preparada por moagem sem solvente aparenta ter contribuição da salicilamida de partida e das formas C e sesquihidratada da norfloxacin. No difratograma da mistura preparada por LAG foram assinaladas reflexões ausentes nas formas sólidas dos compostos de partida mostradas na figura, e não há evidência de excesso dos compostos de partida.



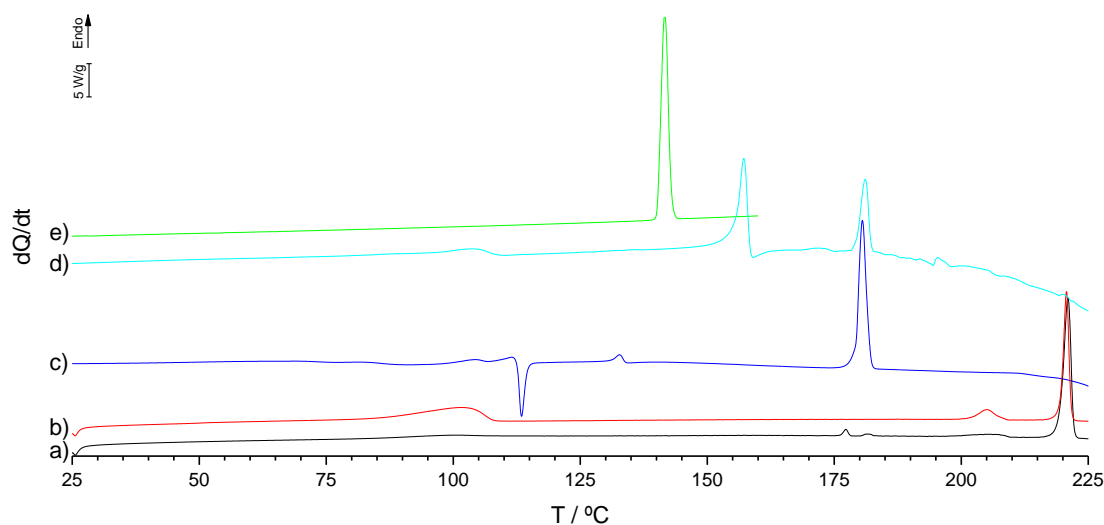
**Figura 82.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O (d) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da SA de partida (g).

Os termogramas DSC de aquecimento encontram-se representados na Figura 83 e as temperaturas dos eventos térmicos observados são apresentadas na Tabela 3i.

As duas amostras têm comportamento térmico distinto, sendo comum em ambas, processos atribuíveis a perda de solvente, 83 e 108 °C (NG) e 94 °C (LAG). As curvas termogravimétricas da Figura 84 confirmam a presença de solvente nas duas amostras, embora com perfis de perda de massa diferentes.

Na mistura obtida por NG é notório, na curva de DSC, um processo exotérmico por volta de 110 °C. O pico de maior energia observado no termograma desta amostra, atribuível a fusão, é registado com temperatura de *onset*  $T = 179$  °C, um valor superior à temperatura de fusão da salicilamida, o que é indicativo de formação de uma nova estrutura supramolecular envolvendo a norfloxacinina e a salicilamida.

Na mistura obtida por LAG são registados dois picos endotérmicos a temperatura superior à de fusão da salicilamida, o primeiro a  $T = 155$  °C, sendo notório que um processo de cristalização é observado concomitantemente, e o segundo à mesma temperatura registada para amostra obtida por NG. Estes resultados apontam para polimorfismo do co-cristal formado.

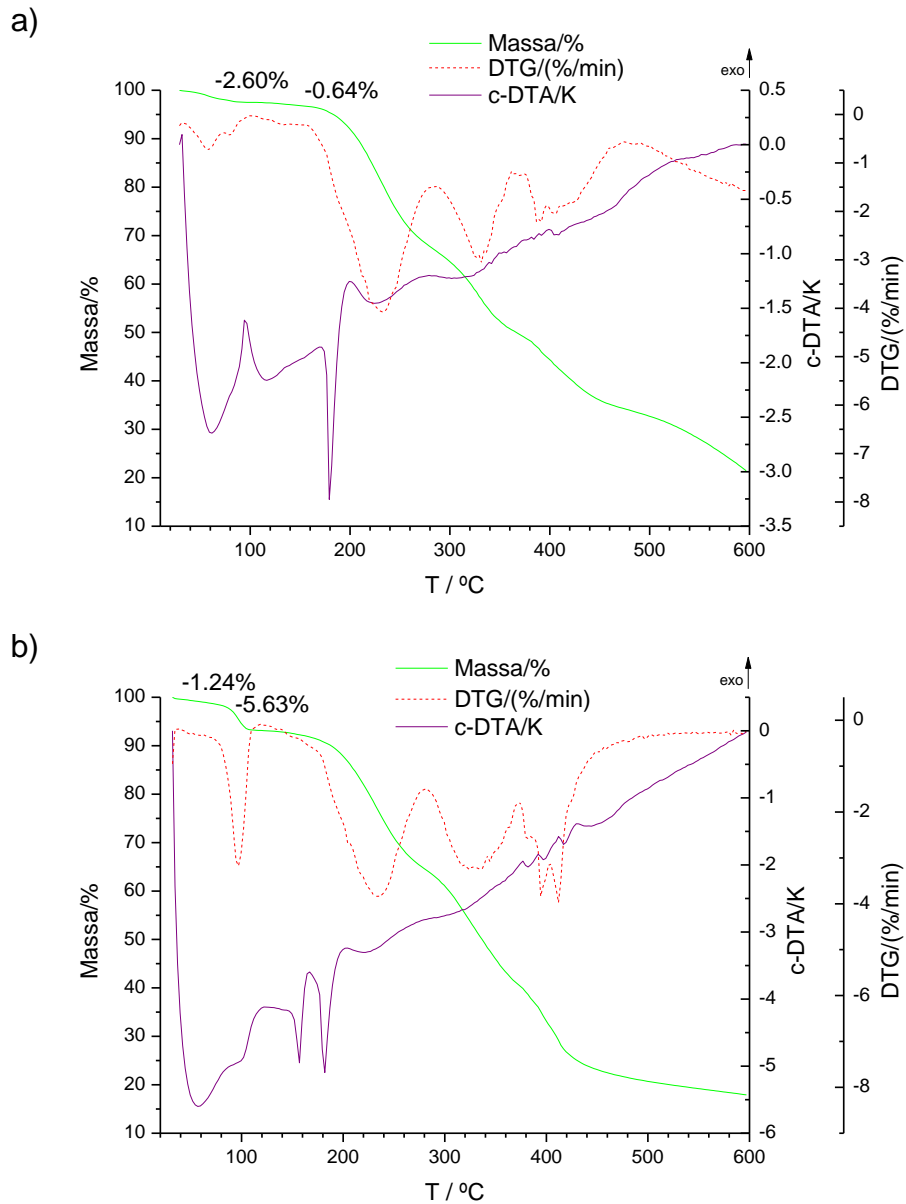


**Figura 83.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da NOR·1.5 H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (b), das misturas de NOR com SA, na proporção de 1:1, obtidas por NG,  $m = 1,99$  mg (c) e por LAG,  $m = 2,25$  mg (d) e da SA de partida,  $m = 1,44$  mg (e),  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.** Temperaturas dos eventos térmicos observados nas curvas DSC de aquecimento das misturas de NOR e SA, na proporção de 1:1, obtidas por NG e LAG.

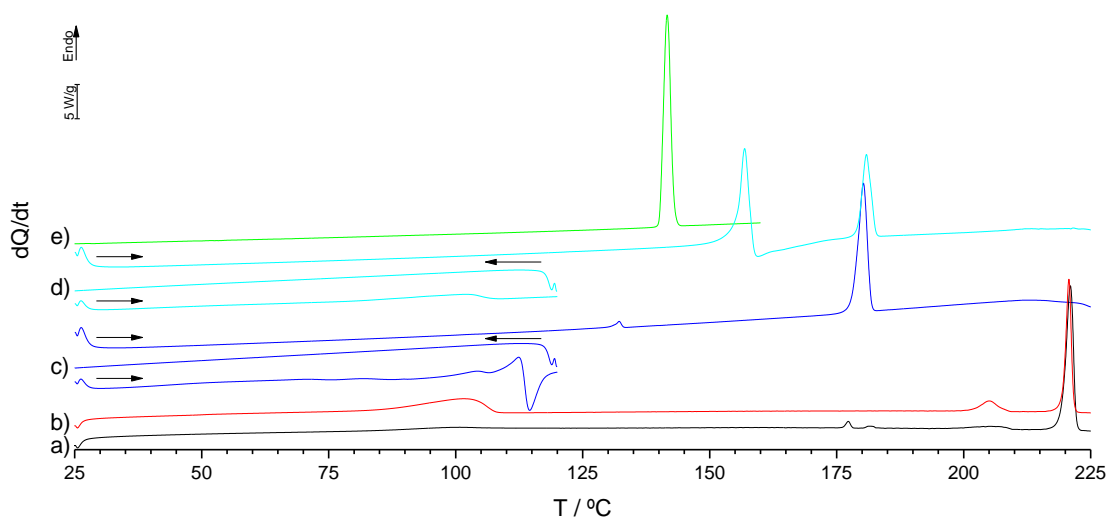
Amostra		T / °C					
		$T_a$	$T_b$	$T_c$	$T_d$	$T_e$	$T_f$
NOR:SA (1:1) <sup>i</sup>	NG	82,9	108,2	112,5	131,0		179,2
	LAG	94,2				155,3	179,3
NOR:SA (1:1) <sup>ii</sup>	NG	91,8	107,1	112,6	130,1		178,0
	LAG	95,0				154,9	178,9

*i* – valores relativos à Figura 83; *ii* – valores relativos à Figura 85.  $T_a$  e  $T_b$  picos endotérmicos (perda de solvente);  $T_c$  pico exotérmico;  $T_d$  pico endotérmico;  $T_e$  e  $T_f$  picos endotérmicos.



**Figura 84.** a) Análise termogravimétrica da amostra NOR:SA (1:1) obtida por NG; b) Análise termogravimétrica da amostra NOR:SA (1:1) obtida por LAG.

As misturas foram submetidas a um programa de aquecimento/arrefecimento/aquecimento, com recurso ao DSC, tendo-se obtido os termogramas DSC representados na Figura 85.

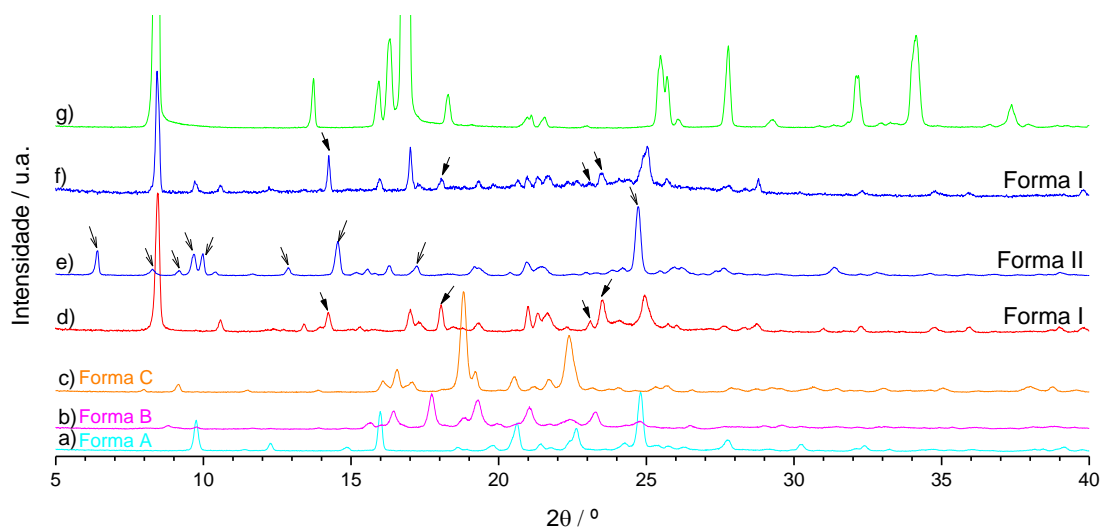


**Figura 85.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da  $\text{NOR} \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $m = 1,50$  mg (b), das misturas de NOR com SA, na proporção de 1:1, obtidas por NG, 2,02 mg (c) e por LAG,  $m = 2,31$  mg (d) e da SA de partida,  $m = 1,44$  mg (e),  $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ .

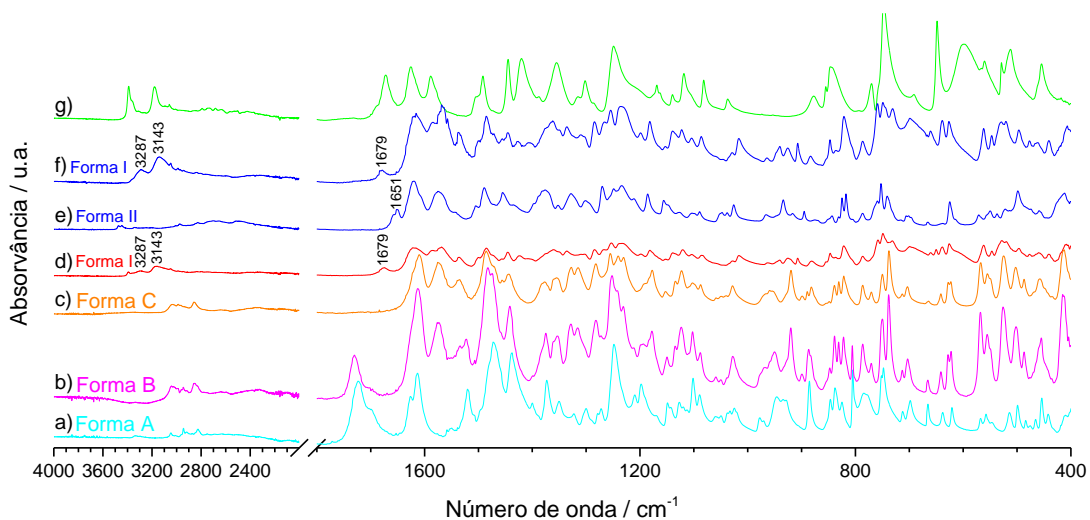
Os resultados corroboram a proposta de formação de um co-cristal 1:1 com duas formas polimórficas (forma I e II), uma com ponto de fusão por volta aos  $155 \text{ }^\circ\text{C}$  (forma II) e outra com ponto de fusão de  $179 \text{ }^\circ\text{C}$  (forma I). A partir da moagem de NOR:SA (1:1) obtida por NG obtemos apenas a forma I e a partir da moagem da mesma mistura obtida por LAG é obtida a forma II que após fusão dá origem ao polimorfo I.

Com o objetivo de obter os difratogramas de raios-X de pó e os espectros de IV das duas formas polimórficas (Figuras 86 e 87), submeteu-se a amostra NOR:SA (1:1) NG a aquecimento/arrefecimento, recorrendo ao DSC, até  $125 \text{ }^\circ\text{C}$ , como indicado na Figura 85c (obtendo-se a forma I) e a amostra NOR:SA (1:1) LAG a aquecimento até  $125 \text{ }^\circ\text{C}$ , Figura 85d (obtendo-se a forma II) e até  $175 \text{ }^\circ\text{C}$  (obtendo-se a forma I). Os resultados estão de acordo com o que antecipámos por análise das curvas de DSC. Os difratogramas obtidos não apresentam evidência de excesso de nenhum dos compostos de partida, pelo que esta é a estequiometria dos dois co-cristais.



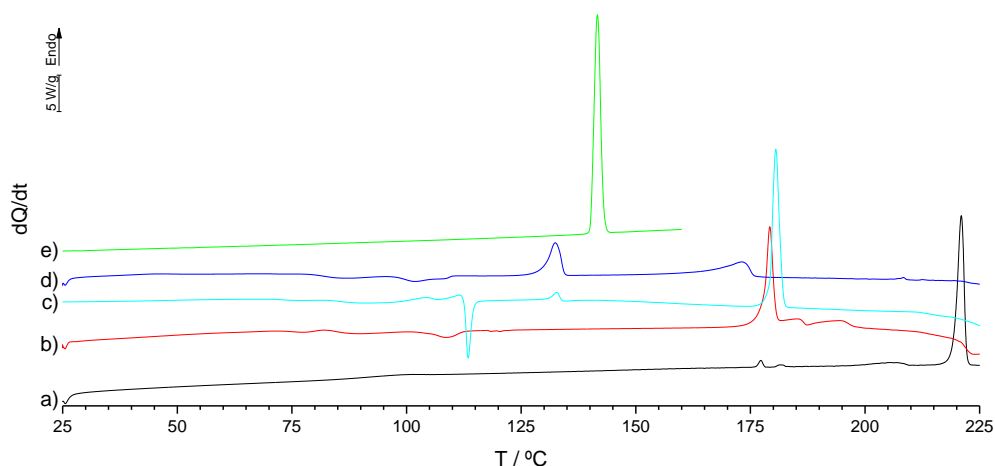


**Figura 86.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtida por NG aquecida até 125 °C (d) e obtida por LAG aquecida até 125 °C (e) e até 175 °C (f) e da SA de partida (g).



**Figura 87.** Espectros de IV das formas A (a), B (b) e C (c) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtida por NG aquecida até 125 °C (d) e obtida por LAG aquecida até 125 °C (e) e até 175 °C (f) e da SA de partida (g).

Na Figura 88 estão representados os termogramas DSC das misturas de NOR e SA nas proporções de 2:1 e 1:2, verificando-se que na proporção de 2:1 a NOR está em excesso e na proporção de 1:2 é a SA que está em excesso.

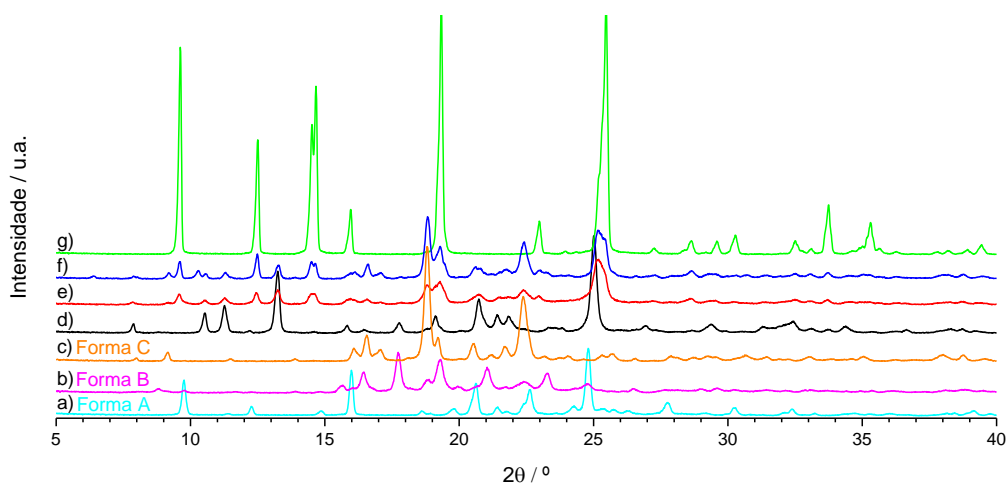


**Figura 88.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), das misturas de NOR e SA na proporção de 2:1,  $m = 2,13$  mg (b), 1:1,  $m = 1,99$  mg (c) e 1:2,  $m = 1,93$  mg (d) obtidas por NG e da SA de partida,  $m = 1,44$  mg (e),  $\beta = 10$  °C  $\text{min}^{-1}$ .

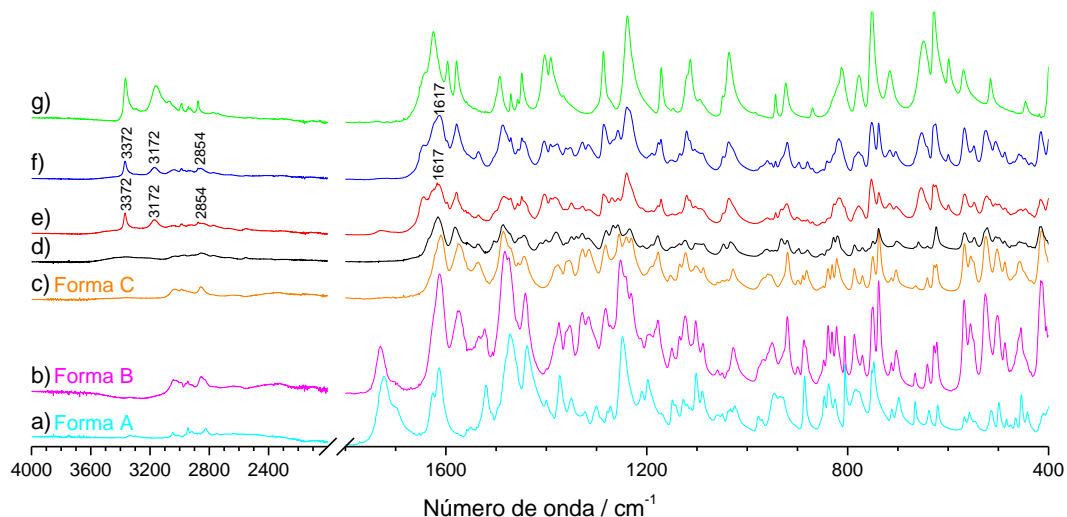
### 3.4.3 Norfloxacin + Etenzamida

Para explorar a associação entre a NOR e a ETZ, realizaram-se moagens das mesmas na proporção de 1:1, sem solvente (NG) e assistida por solvente (LAG). Obtiveram-se os difratogramas de raios-X de pó e espectros de IV, representados nas Figuras 89 e 90, respetivamente.

Nos difratogramas, em ambos os casos podem ver-se todas as reflexões do difratograma de etenzamida e reflexões atribuíveis à forma C e ao sesquihidrato da norfloxacin. Os espectros de infravermelho confirmam que se obteve uma mistura física dos compostos.

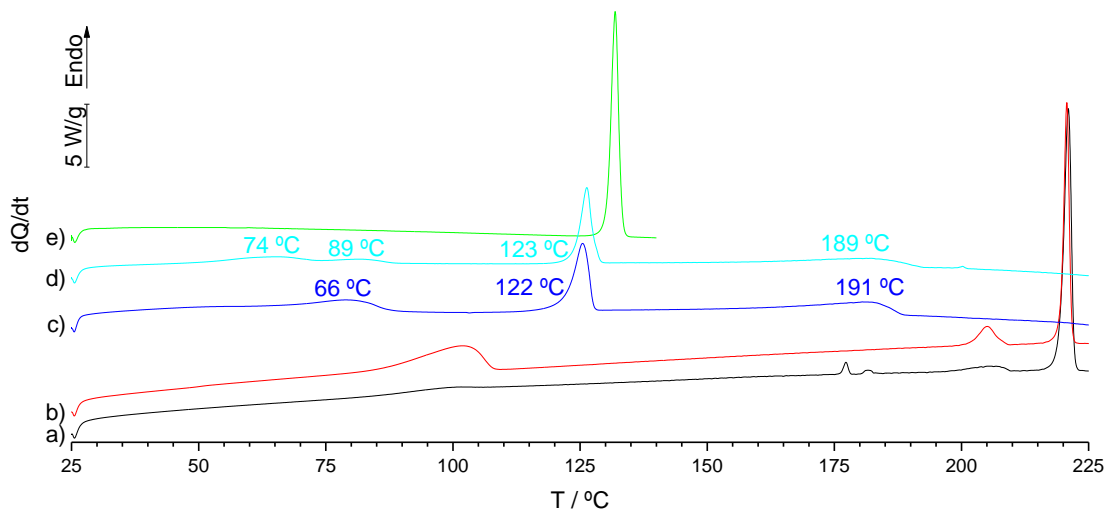


**Figura 89.** Difratogramas de raios-X de pó das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada  $1.5 \text{ H}_2\text{O}$  (d) da NOR, das misturas de NOR e ETZ na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da ETZ de partida (g).



**Figura 90.** Espectros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O (d) da NOR, das misturas de NOR e ETZ na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da ETE de partida (g).

As curvas de DSC, Figura 91, para além de picos atribuíveis à dessolvatação tem o perfil que se espera quando se observa a fusão duma mistura eutética, seguida de fusão do composto em excesso.

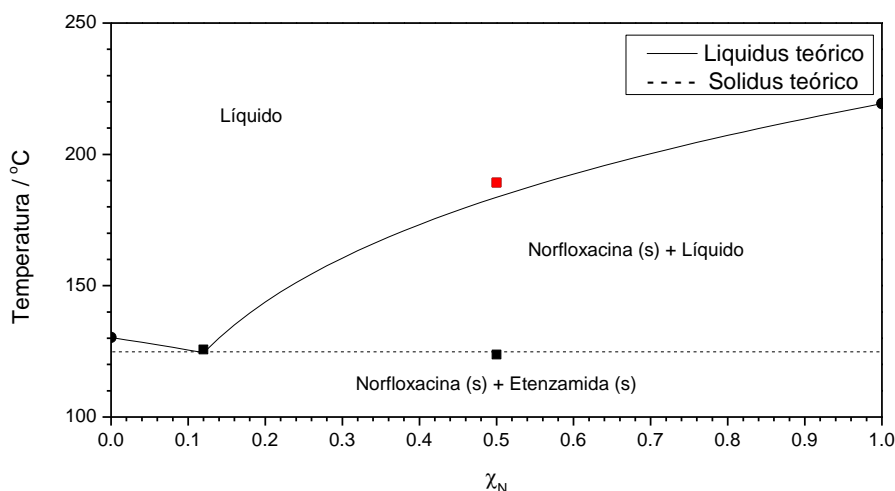


**Figura 91.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da NOR·1.5 H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (b), das misturas de NOR e ETZ na proporção de 1:1 obtidas por NG,  $m = 2,22$  mg (c) e LAG,  $m = 1,64$  mg (d) e da ETZ de partida,  $m = 1,14$  mg (e),  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.

Uma vez que não se obteve nenhum co-cristal, mas sim uma mistura física, com indicação de miscibilidade em fase líquida, procedeu-se à investigação da composição correta da mistura eutética. Para tal, efetuou-se a simulação teórica do diagrama binário sólido-líquido, através da seguinte equação (Equação 2),

$$\frac{1}{T_{fus}} = \frac{1}{T_{fus}^*} - \frac{R \ln x_N}{\Delta_{fus} H_m^*} \quad (2)$$

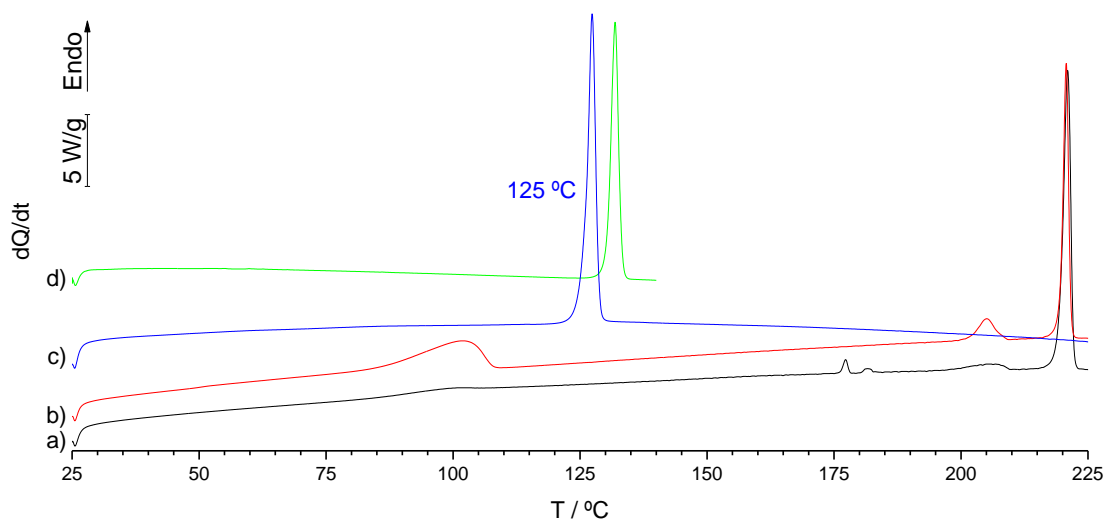
onde  $T_{fus}$  (K) representa a temperatura de fusão da mistura de composição  $x_N$ ,  $T_{fus}^*$  (K) a temperatura de fusão obtida experimentalmente para o composto puro,  $R$  ( $J K^{-1} mol^{-1}$ ) a constante dos gases ideais,  $x_N$  a fração molar do componente e  $\Delta_{fus} H_m^*$  (J/mol) a entalpia de fusão obtida experimentalmente para o composto puro. Para este estudo utilizaram-se os valores de temperatura e entalpia de fusão da NOR,  $T_{fus}^* = 219,3$  °C e  $\Delta_{fus} H_m^* = 113,9$  kJ/mol e da ETZ,  $T_{fus}^* = 130,3$  °C e  $\Delta_{fus} H_m^* = 178,9$  kJ/mol. O diagrama previsto encontra-se representado na Figura 92.



**Figura 92.** Diagrama de fases binário sólido-líquido do sistema NOR com ETZ, à pressão atmosférica. (■ e ■ resultados experimentais)

É de realçar que as misturas eutéticas também têm sido alvo de estudo com o objetivo de melhorar as propriedades do API, nomeadamente a solubilidade aquosa e a velocidade de dissolução [274].

Pela análise do diagrama binário foi possível prever que a fração molar de NOR de 0,120 (proporção 1:7,3) deveria ser a proporção da mistura eutética. A mistura preparada com esta composição tem o termograma DSC que se encontra representado na Figura 93. Os valores experimentais seguem muito de perto a previsão feita pela equação (2).



**Figura 93.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da NOR·1.5 H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (b), da mistura de NOR e ETE na proporção de 1:7,3,  $m = 1,85$  mg (c) e da ETZ de partida,  $m = 1,14$  mg (d),  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.

A dose diária da norfloxacinina é de 800 mg por via oral uma vez ou 400 mg por via oral a cada 12 horas. A dose diária da etenzamida são 1000 mg mas contidos em 4 comprimidos, ou seja, a dose em cada comprimido é 250 mg. Também pode ser 2 comprimidos com 500 mg cada. Uma vez que na constituição estequiométrica da mistura eutética, 319:1205 mg, estão envolvidas quantidades superiores às consideradas na janela terapêutica dos compostos puros, não é viável a sua administração representando um elevado risco toxicológico [275] [192] [276].



# **Capítulo 4**

## **Conclusões e**

### **perspetivas futuras**





## Capítulo 4

# Conclusões e perspectivas futuras

Para combater a ameaça da resistência aos antibióticos é importante o desenvolvimento de abordagens alternativas que incluem novos métodos de identificação de medicamentos antibacterianos ou encontrar compostos naturais que possam melhorar o efeito antibacteriano dos antibióticos comumente usados, através de efeitos sinérgicos entre os mesmos, existindo também um grande interesse em diminuir a dosagem de antibióticos sintéticos. Como tal, a co-cristalização é uma importante estratégia a explorar para a preparação de antibióticos com atividade incrementada, por via de formação de co-cristais cujo co-formador mostra atividade antimicrobiana sinérgica. Poderá ser também usada para melhorar a biodisponibilidade oral do ativo, e assim reduzir a dosagem na formulação.

Neste trabalho, investigou-se o estado sólido de norfloxacin pura e também novas formas multicomponente, com relevo para co-cristais da mesma, utilizando como co-formadores flavonóides com potencial para atividade antimicrobiana sinérgica. Investigou-se também a formação de co-cristais com co-formadores contendo o grupo amida, com a possibilidade de formação de diferentes sintões supramoleculares, sendo possível também analisar o efeito da complexidade estrutural do co-formador na possibilidade de formação de co-cristais uma vez que possuem uma complexidade estrutural crescente entre elas.

Relativamente à caracterização da norfloxacin, os resultados permitiram identificar métodos de obtenção de 3 formas sólidas puras de norfloxacin, as formas A, B e C e também um sesquihidrato. A forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O pura foi obtida através da moagem da NOR de partida assistida por 10 µL de etanol, 15Hz, 30 minutos. A forma A pura foi obtida através do aquecimento até 212 °C com recurso ao DSC quer da NOR de partida (predominantemente forma A), quer do sesquihidrato NOR·1.5 H<sub>2</sub>O. A forma B pura foi obtida por aquecimento da forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O até 140 °C ou 190 °C com recurso ao DSC. Por último, a forma C pura foi obtida por aquecimento da mistura da forma NOR·1.5 H<sub>2</sub>O e da forma C, também obtida através da moagem da NOR de partida assistida por 10µL de etanol, 15Hz, 30 minutos, até 140 °C ou 190 °C. Foi pela primeira vez identificada inequivocamente a natureza zwitteriônica da forma anidra C.

Quanto aos flavonóides, obteve-se um co-amorfo entre a norfloxacin e a quercetina. Este co-amorfo deverá ser alvo de estudo adicional, para avaliar a sua estabilidade, tanto em termos de forma física como de conteúdo de água, em condições especificadas de armazenamento. Adicionalmente, será também de todo o interesse a preparação e avaliação de estabilidade do co-amorfo obtido após desidratação, observada a  $T \approx 108$  °C nas curvas de DSC e TGA. Os resultados também apontam para a formação de uma estrutura supramolecular e solvatada entre a norfloxacin e a quercetina. A calorimetria diferencial de varrimento não se revelou útil na análise deste sistema. Poderá tentar-se em trabalho futuro, usar RMN no estado sólido para obter informação adicional. Várias experiências de cristalização em solução foram levadas a cabo na tentativa de obter cristais da nova estrutura supramolecular, para resolução da estrutura cristalina, mas, como não é incomum, sem sucesso. Obteve-se também um amorfo

pouco estável e, portanto, pouco promissor, entre a norfloxacin e a catequina. Com a miricetina, os estudos indicam associaçã da mesma com a norfloxacin numa estrutura supramolecular, co-cristal, equimolar que se encontra solvatada. Todas as novas estruturas supramoleculares foram obtidas por LAG. Os sistemas norfloxacin + flavonóides foram extremamente difíceis de estudar, pois estes são compostos naturais que já por si são difíceis de obter com elevada pureza, com pontos de fusã muito altos e de fácil degradaçã. A calorimetria diferencial de varrimento revelou não ser o método mais viável para estudar estes sistemas.

Relativamente às amidas, os resultados apontam para a associaçã supramolecular entre a norfloxacin e a benzamida, quando é utilizada moagem assistida por etanol, com obtençã dum co-cristal (2:3, NOR:BEN) solvatado. Obteve-se um co-cristal polimórfico 1:1 da norfloxacin com a salicilamida, sendo identificadas duas formas polimórficas (forma I e II), uma com ponto de fusã por volta dos 155 °C (forma I) e outra com ponto de fusã de 179 °C (forma II). Será útil em trabalho futuro comparar a velocidade de dissoluçã da norfloxacin a partir dos co-cristais com a de norfloxacin pura. Com a etenzamida, a mecanoquímica resultou em misturas físicas dos dois compostos, tendo-se identificado a composiçã da mistura eutética (1:7,3 NOR:ETZ). Nesta mistura estã envolvidas quantidades superiores às consideradas na janela terapêutica dos compostos puros, não sendo viável a sua administraçã representando um elevado risco toxicológico.

# Referências bibliográficas

- [1] Sass, P., *Antibiotics: Precious Goods in Changing Times*. Methods Mol Biol, 2017. **1520**: p. 3-22.
- [2] Andersson, D.I., Balaban, N. Q., Baquero, F., Courvalin, P., Glaser, P., Gophna, U., Kishony, R., Molin, S., Tonjum, T., *Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality*. FEMS Microbiol. Rev., 2020. **44**(2): p. 171-188.
- [3] Marston, H.D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., Fauci, A. S., *Antimicrobial Resistance*. JAMA, 2016. **316**(11): p. 1193-1204.
- [4] Barbas, R., Martí, F., Prohens, R., Puigjaner, C., *Polymorphism of Norfloxacin: Evidence of the Enantiotropic Relationship between Polymorphs A and B*. Cryst. Growth Des., 2006. **6**(6): p. 1463–1467.
- [5] Barbas, R., Prohens, R., Puigjaner, C., *A new polymorph of Norfloxacin. Complete characterization and relative stability of its trimorphic system*. J. Therm. Anal. and Calorim., 2007. **89**(3): p. 687–692.
- [6] Puigjaner, C., Barbas, R., Portell, A., Font-Bardia, M., Alcobé, X., Prohens, R., *Revisiting the Solid State of Norfloxacin*. Cryst. Growth Des., 2010. **10**(7): p. 2948–2953.
- [7] Diniz-Silva, H.T., Magnani, M., de Siqueira, S., de Souza, E. L., de Siqueira, J. P., *Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus that overexpresses norA*. Lwt-Food Sci Technol., 2017. **85**: p. 324-326.
- [8] Gorniak, I., Bartoszewski, R., Kroliczewski, J., *Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids*. Phytochem. Rev., 2019. **18**(1): p. 241-272.
- [9] Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., Jaitak, V., *Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance*. Fitoterapia, 2020. **146**(14): p. 104720.
- [10] Reddy, J.S., Ganesh, S. V., Nagalapalli, R., Dandela, R., Solomon, K. A., Kumar, K. A., Goud, N. R., Nangia, A., *Fluoroquinolone salts with carboxylic acids*. J. Pharm. Sci., 2011. **100**(8): p. 3160-3176.
- [11] Thipparaboina, R., et al., *Multidrug co-crystals: Towards the development of effective therapeutic hybrids*. Drug Discov. Today, 2016. **21**(3): p. 481-490.
- [12] Almarsson, O. and M.J. Zaworotko, *Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines?* Chem. Commun., 2004. **35**(17): p. 1889-96.
- [13] Schultheiss, N., Newman, A., *Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties*. Cryst. Growth Des., 2009. **9**(6): p. 2950–2967.
- [14] Dai, X.-L., Chen, J.-M., Lu, T.-B., *Pharmaceutical cocrystallization: an effective approach to modulate the physicochemical properties of solid-state drugs*. CrystEngComm., 2018. **20**(36): p. 5292-5316.
- [15] Yadav, A.V., Shete, A. S., Dabke, A. P., Kulkarni, P. V., Sakhare, S. S., *Co-crystals: a novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients*. Indian J. Pharm. Sci., 2009. **71**(4): p. 359-70.
- [16] Qiao, N., Li, M. Z., Schlindwein, W., Malek, N., Davies, A., Trappitt, G., *Pharmaceutical cocrystals: An overview*. Int. J. Pharm., 2011. **419**(1-2): p. 1-11.
- [17] Bhupinder Singh, S., *Drug-drug co-crystals*. DARU J. Pharm. Sci., 2012. **20**(1): p. 45.
- [18] Thakuria, R., Delori, A., Jones, W., Lipert, M. P., Roy, L., Rodriguez-Hornedo, N., *Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs*. Int. J. Pharm., 2013. **453**(1): p. 101-25.
- [19] Bolla, G., Nangia, A., *Pharmaceutical cocrystals: walking the talk*. Chem. Commun., 2016. **52**(54): p. 8342-60.
- [20] Yadav, A.V., et al., *Co-crystals: a novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients*. Indian J. Pharm. Sci., 2009. **71**(4): p. 359-70.
- [21] Duggirala, N.K., Perry, M. L., Almarsson, O., Zaworotko, M. J., *Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines*. Chem. Commun., 2016. **52**(4): p. 640-55.
- [22] Steed, J.W., *The role of co-crystals in pharmaceutical design*. Trends Pharmacol. Sci., 2013. **34**(3): p. 185-93.

- [23] Tilborg, A., Norberg, B., Wouters, J., *Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: a brief structural overview of the state-of-art*. Eur. J. Med. Chem., 2014. **74**: p. 411-26.
- [24] Chow, K., Tong, H. H., Lum, S., Chow, A. H., *Engineering of pharmaceutical materials: an industrial perspective*. J. Pharm. Sci., 2008. **97**(8): p. 2855-77.
- [25] Shan, N., et al., *Impact of pharmaceutical cocrystals: the effects on drug pharmacokinetics*. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., 2014. **10**(9): p. 1255-71.
- [26] Aakeroy, C.B., Forbes, S., Desper, J., *Using Cocrystals To Systematically Modulate Aqueous Solubility and Melting Behavior of an Anticancer Drug*. J. Am. Chem. Soc., 2009. **131**(47): p. 17048-+.
- [27] *Health Service Executive (2017) Sacubitril/Valsartan (Entresto®) Clinical and Reimbursement Information*. [cited 3 de Fevereiro de 2021; Available from: <https://www.hse.ie/eng/staff/pccs/circulars/gp/053-2017-gp-circular-reimbursement-of-entresto.pdf>].
- [28] Gadade, D.D., Pekamwar, S. S., *Pharmaceutical Cocrystals: Regulatory and Strategic Aspects, Design and Development*. Adv. Pharm. Bull., 2016. **6**(4): p. 479-494.
- [29] Morissette, S.L., et al., *High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2004. **56**(3): p. 275-300.
- [30] Censi, R., Di Martino, P., *Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs*. Molecules, 2015. **20**(10): p. 18759-76.
- [31] Sarma, B., Chen, J., Hsi, H. Y., Myerson, A. S., *Solid forms of pharmaceuticals: Polymorphs, salts and cocrystals*. Korean J. Chem. Eng., 2011. **28**(2): p. 315-322.
- [32] Jones, W., Motherwell, S., Trask, A. V., *Pharmaceutical cocrystals: An emerging approach to physical property enhancement*. MRS Bull., 2006. **31**(11): p. 875-879.
- [33] Morissette, S.L., Soukasene, S., Levinson, D., Cima, M. J., Almarsson, O., *Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003. **100**(5): p. 2180-4.
- [34] Lemmerer, A., Adsmond, D. A., Esterhuysen, C., Bernstein, J., *Polymorphic Co-crystals from Polymorphic Co-crystal Formers: Competition between Carboxylic Acid...Pyridine and Phenol...Pyridine Hydrogen Bonds*. Cryst. Growth Des., 2013. **13**(9): p. 3935–3952.
- [35] Yan Yan, X.-L.D., Jun-Long Jia, Xing-Hua Zhao, Zhi-Wei Li, Tong-Bu Lu, Jia-Mei Chen, *Crystal Structures, Stability, and Solubility Evaluation of Two Polymorphs of a 2:1 Melatonin–Piperazine Cocrystal*. Cryst. Growth Des., 2020. **20**(2): p. 1079–1087.
- [36] Elder, D.P., Holm, R., Diego, H. L., *Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility*. Int. J. Pharm., 2013. **453**(1): p. 88-100.
- [37] Grothe, E., Meekes, H., Vlieg, E., Horst, J. H., Gelder R., *Solvates, Salts, and Cocrystals: A Proposal for a Feasible Classification System*. Cryst. Growth Des., 2016. **16**(6): p. 3237–3243.
- [38] Vishweshwar, P., McMahon, J. A., Bis, J. A., Zaworotko, M. J., *Pharmaceutical co-crystals*. J. Pharm. Sci., 2006. **95**(3): p. 499-516.
- [39] Cerreia Vioglio, P., Chierotti, M. R., Gobetto, R., *Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges*. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2017. **117**: p. 86-110.
- [40] Shan, N., Zaworotko, M. J., *The role of cocrystals in pharmaceutical science*. Drug Discov. Today, 2008. **13**(9-10): p. 440-6.
- [41] Babu, N.J., Nangia, A., *Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals*. Cryst. Growth Des., 2011. **11**(7): p. 2662-2679.
- [42] Bellantone, R.A., *Fundamentals of Amorphous Systems: Thermodynamic Aspects*. Amorphous Solid Dispersions: Theory and Practice. 2014. 3-34.
- [43] Mizoguchi, R., Waraya, H., Hirakura, Y., *Application of Co-Amorphous Technology for Improving the Physicochemical Properties of Amorphous Formulations*. Mol. Pharm., 2019. **16**(5): p. 2142-2152.
- [44] Emami, S., Siahi-Shadbad, M., Adibkia, K., Barzegar-Jalali, M., *Recent advances in improving oral drug bioavailability by cocrystals*. Bioimpacts, 2018. **8**(4): p. 305-320.
- [45] Kavanagh, O.N., et al., *Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application*. Drug Discov. Today, 2019. **24**(3): p. 796-804.
- [46] Bond, A.D., *What is a co-crystal?* CrystEngComm, 2007(9): p. 833-834.

- [47] Desiraju, G.R., *Supramolecular Synthons in Crystal Engineering - a New Organic-Synthesis*. Angew. Chem. Int. Ed., 1995. **34**(21): p. 2311-2327.
- [48] Saha, S., Desiraju, G. R., *Acid...Amide Supramolecular Synthon in Cocrystals: From Spectroscopic Detection to Property Engineering*. J. Am. Chem. Soc, 2018. **140**(20): p. 6361–6373.
- [49] Shattock, T.R., Arora, K. K., Vishweshwar, P., Zaworotko, M. J., *Hierarchy of Supramolecular Synthons: Persistent Carboxylic Acid center dot center dot center dot Pyridine Hydrogen Bonds in Cocrystals That also Contain a Hydroxyl Moiety*. Cryst. Growth Des., 2008. **8**(12): p. 4533-4545.
- [50] Alshahateet, S.F., *Synthesis and Supramolecularity of Hydrogen-Bonded Cocrystals of Pharmaceutical Model Rac-Ibuprofen with Pyridine Derivatives*. Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2010. **533**: p. 152-161.
- [51] Varughese, S., Sinha, S. B., Desiraju, G. R., *Phenylboronic acids in crystal engineering: Utility of the energetically unfavorable syn,syn-conformation in co-crystal design*. Sci. China Chem., 2011. **54**(12): p. 1909-1919.
- [52] Vener, M.V., Levina, E. O., Koloskov, O. A., Rykounov, A. A., Voronin, A. P., Tsirelson, V. G., *Evaluation of the Lattice Energy of the Two-Component Molecular Crystals Using Solid-State Density Functional Theory*. Cryst. Growth Des., 2014. **14**(10): p. 4997-5003.
- [53] Aakeroy, C.B., Salmon, D. J., *Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility*. CrystEngComm, 2005. **7**(72): p. 439-448.
- [54] Karimi-Jafari, M., Padrela, L., Walker, G. M, Croker, D. M., *Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications*. Cryst. Growth Des., 2018. **18**(10): p. 6370–6387.
- [55] Childs, S.L., Rodriguez-Hornedo, N., Reddy, L. S., Jayasankar, A., Maheshwari, C., McCausland, L., Shipplett, R., Stahly, B. C., *Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine*. CrystEngComm, 2008. **10**(7): p. 856-864.
- [56] Weyna, D.R., Shattock, T., Vishweshwar, P., Zaworotko, M. J., *Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution*. Cryst. Growth Des., 2009. **9**(2): p. 1106-1123.
- [57] Anastas, P., Eghbali, N., *Green Chemistry: Principles and Practice*. Chem. Soc. Rev., 2010. **39**(1): p. 301-312.
- [58] E. Castro, R.A., et al., *Naproxen Cocrystals with Pyridinecarboxamide Isomers*. Cryst. Growth Des., 2011. **11**(12): p. 5396-5404.
- [59] Friscic, T., Jones, W., *Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding*. Cryst. Growth Des., 2009. **9**(3): p. 1621–1637.
- [60] Korotkova, E.I., Kratochvil, B., *Pharmaceutical Cocrystals*. XV International Scientific Conference Chemistry and Chemical Engineering in XXI Century Dedicated to Professor L.P. Kulyov, 2014. **10**: p. 473-476.
- [61] Nangia, A., *Crystal engineering - Inclusion compounds, molecular networks, cocrystals, and polymorphs*. Cryst. Growth Des., 2008. **8**(4): p. 1079-1081.
- [62] Snider, D.A., Addicks, W., Owens, W., *Polymorphism in generic drug product development*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2004. **56**(3): p. 391-5.
- [63] Lee, A.Y., Erdemir, D., Myerson, A. S., *Crystal polymorphism in chemical process development*. Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng., 2011. **2**: p. 259-80.
- [64] Aaltonen, J., Alleso, M., Mirza, S., Koradia, V., Gordon, K. C., Rantanen, J., *Solid form screening-a review*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009. **71**(1): p. 23-37.
- [65] Miller, J.M., Collman, B. M., Greene, L. R., Grant, D. J., Blackburn, A. C., *Identifying the stable polymorph early in the drug discovery-development process*. Pharm. Dev. Technol., 2005. **10**(2): p. 291-7.
- [66] Llinas, A., Goodman, J. M., *Polymorph control: past, present and future*. Drug Discov. Today, 2008. **13**(5-6): p. 198-210.
- [67] Chemburkar, S.R., Bauer, J., Deming, K., Spiwek, H., Patel, K., Morris, J., Henry, R., Spanton, S., Dziki, W., Porter, W., Quick, J., Bauer, P., Donaubauer, J., Narayanan, B. A., Soldani, M., Riley, D., McFarland, K., *Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development*. Org. Process Res. Dev., 2000. **4**(5): p. 413-417.

- [68] Bauer, J., Spanton, S., Henry, R., Quick, J., Dziki, W., Porter, W., Morris, J., *Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism*. *Pharm Res*, 2001. **18**(6): p. 859-66.
- [69] Mitsutaka, K., *Strategy for control of crystallization of polymorphs*. *CrystEngComm* 2009. **11**(6): p. 949–964.
- [70] Nichols, G., in *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*, D.R. Hilfiker, Editor. 2006, Weinheim, Germany. p. 425.
- [71] Leshner, G.Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., Brundage, R. P., *1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents*. *J. Med. Pharm. Chem.*, 1962. **91**: p. 1063-5.
- [72] Andersson, M.I., MacGowan, A. P., *Development of the quinolones*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003. **51 Suppl 1**: p. 1-11.
- [73] Emmerson, A.M., Jones, A. M., *The quinolones: decades of development and use*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003. **51 Suppl 1**: p. 13-20.
- [74] Takahashi, H., Hayakawa, I., Akimoto, T., *[The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents]*. *Yakushigaku Zasshi*, 2003. **38**(2): p. 161-79.
- [75] Andriole, V.T., *The quinolones: past, present, and future*. *Clin. Infect. Dis.*, 2005. **41 Suppl 2**: p. S113-9.
- [76] Emami, S., Shafiee, A., Foroumadi, A., *Quinolones: Recent Structural and Clinical Developments*. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2005. **4**(3): p. 123-136.
- [77] Bisacchi, G.S., *Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story"*. *J. Med. Chem.*, 2015. **58**(12): p. 4874-4882.
- [78] King, D.E., Malone, R., Lilley, S. H., *New classification and update on the quinolone antibiotics*. *Am. Fam. Physician.*, 2000. **61**(9): p. 2741-8.
- [79] Hong, C.Y., *Discovery of gemifloxacin (Factive, LB20304a): a quinolone of a new generation*. *Farmaco*, 2001. **56**(1-2): p. 41-4.
- [80] Pham, T.D.M., Ziora, Z. M., Blaskovich, M. A. T., *Quinolone antibiotics*. *MedChemComm*, 2019. **10**(10): p. 1719-1739.
- [81] Rudin, J.E., Norden, C. W., Shinnors, E. M., *In vitro activity of ciprofloxacin against aerobic gram-negative bacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1984. **26**(4): p. 597-8.
- [82] Holmes, B., Brogden, R. N., Richards, D. M., *Norfloxacin - a Review of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use*. *Drugs*, 1985. **30**(6): p. 482-513.
- [83] Nikaido, H., Thanassi, D. G., *Penetration of Lipophilic Agents with Multiple Protonation Sites into Bacterial-Cells - Tetracyclines and Fluoroquinolones as Examples*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993. **37**(7): p. 1393-1399.
- [84] Breda, S.A., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., Olivera, M. E., *Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives*. *Int. J. Pharm.*, 2009. **371**(1-2): p. 106-13.
- [85] Gadebusch, H.H., Shungu, D. L., *Norfloxacin, the first of a new class of fluoroquinolone antimicrobials, revisited*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1991. **1**(1): p. 3-28.
- [86] Šuštar, B., Bukovec, N., Bukovec, P., *Polymorphism and stability of norfloxacin, (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinocarboxylic acid*. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 1993. **40**(2): p. 475–481.
- [87] Basavoju, S., Bostrom, D., Velaga, S. P., *Pharmaceutical Cocrystal and Salts of Norfloxacin*. *Cryst. Growth Des.*, 2006. **6**(12): p. 2699–2708.
- [88] Chattah, A.K., Mroue, K. H., Pfund, L. Y., Ramamoorthy, A., Longhi, M. R., Garnerio, C., *Insights into Novel Supramolecular Complexes of Two Solid Forms of Norfloxacin and  $\beta$ -Cyclodextrin*. *J. Pharm. Sci.*, 2013. **102**(10): p. 3717-3724.
- [89] Katdare, A.V., Bavitz, J. F., *Hydrate Related Dissolution Characteristics of Norfloxacin*. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1984. **10**(5): p. 789-807.
- [90] Katdare, A.V., Ryan, J. A., Bavitz, J. F., Erb, D. M., Guillory, J. K. , *Characterization of Hydrates of Norfloxacin*. *Microchim. Acta*, 1986. **90**: p. 1-12.
- [91] Florence, A.J., Kennedy, A. R., Shankland, N., Wright, E., Al-Rubayi, A., *Norfloxacin dihydrate*. *Acta Crystallogr. C*, 2000. **56 Pt 11**: p. 1372-3.
- [92] Roy, S., Goud, N. R., Babu, N. J., Iqbal, J., Kruthiventi, A. K., Nangia, A., *Crystal Structures of Norfloxacin Hydrates*. *Cryst. Growth Des.*, 2008. **8**(12): p. 4343–4346.

- [93] Chongcharoen, W., Byrn, S. R., Sutanthavibul, N., *Solid state interconversion between anhydrous norfloxacin and its hydrates*. J. Pharm. Sci., 2008. **97**(1): p. 473-89.
- [94] Lou, B., Bostrom, D., Velaga, S. P., *Monohydrated dihydrogen phosphate salts of norfloxacin and ciprofloxacin*. Acta Crystallogr. C, 2007. **63**(Pt 12): p. o731-3.
- [95] Romanuk, C.B., Manzo, R. H., Linck, Y. G., Chattah, A. K., Monti, G. A., Olivera, M. E., *Characterization of the solubility and solid-state properties of saccharin salts of fluoroquinolones*. J. Pharm. Sci., 2009. **98**(10): p. 3788-801.
- [96] Basavoju S., Boström D., and V.P. S., *Pharmaceutical Salts of Fluoroquinolone Antibacterial Drugs with Acesulfame Sweetener*. Mol. Cryst. Liq. Cryst., 2012. **562**(1): p. 254–264.
- [97] Xu, Y., Jiang, L., Mei, X., *Supramolecular structures and physicochemical properties of norfloxacin salts*. Acta Crystallogr. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater., 2014. **70**(Pt 4): p. 750-60.
- [98] Gopi, S.G., Ganguly, S., Desiraju, G. R., *A Drug–Drug Salt Hydrate of Norfloxacin and Sulfathiazole: Enhancement of in Vitro Biological Properties via Improved Physicochemical Properties*. Mol. Pharm., 2016. **13**(10): p. 3590–3594.
- [99] Bhattacharya, B., Mondal, A., Soni, S. R., Das, S., Bhunia, S., Raju, K. B., Ghosh A., Reddy, C. M., *Multidrug salt forms of norfloxacin with non-steroidal anti-inflammatory drugs: solubility and membrane permeability studies*. CrystEngComm, 2018. **20**(41): p. 6420–6429.
- [100] Surov, A.O., Voronin, A. P., Drozd, K. V., Churakov, A. V., Roussel, P., Perlovich, G. L., *Diversity of crystal structures and physicochemical properties of ciprofloxacin and norfloxacin salts with fumaric acid*. CrystEngComm, 2018. **20**(6): p. 755-767.
- [101] Santos, M.M., Alves, C., Silva, J., Florindo, C., Costa, A., Petrovski, Z., Marrucho, I. M., Pedrosa, R., Branco, L. C., *Antimicrobial Activities of Highly Bioavailable Organic Salts and Ionic Liquids from Fluoroquinolones*. Pharmaceutics, 2020. **12**(8): p. 694.
- [102] Florindo, C., Costa, A., Matos, C., Nunes, S. L., Matias, A. N., Duarte, C. M. M., Rebelo, L. P. N., Branco, L. C., Marrucho, I. M., *Novel organic salts based on fluoroquinolone drugs: Synthesis, bioavailability and toxicological profiles*. Int. J. Pharm., 2014. **469**(1): p. 179-189.
- [103] Vitorino, G.P., Sperandio, N. R., Caira, M. R., Mazzieri, M. R., *A Supramolecular Assembly Formed by Heteroassociation of Ciprofloxacin and Norfloxacin in the Solid State: Co-Crystal Synthesis and Characterization*. Cryst. Growth Des., 2013. **13**(3): p. 1050-1058.
- [104] Ferreira, P.O., de Almeida, A. C., dos Santos, É. C., Junior, R. D., Ferreira, F. F., Kogawa, A. C., Caires, F. J., *A norfloxacin-nicotinic acid cocrystal: Mechanochemical synthesis, thermal and structural characterization and solubility assays*. Thermochemica Acta, 2020. **694**: p. 178782.
- [105] Hertog, M.G., *Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids*. Proc. Nutr. Soc., 1996. **55**(1B): p. 385-97.
- [106] Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., Jabbar, A., *Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates*. Nat. Prod. Rep., 2010. **27**(2): p. 238-254.
- [107] Cushnie, T.P., Lamb, A. J., *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. Int. J. Antimicrob. Agents, 2011. **38**(2): p. 99-107.
- [108] Alvarez, M.A., Debattista, N. B., Pappano, N. B., *Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids*. Folia Microbiol., 2008. **53**(1): p. 23-28.
- [109] Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M., *Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol., 1996. **50**(1): p. 27-34.
- [110] Sa, R.J., Zhang, Y. J., Deng, Y. P., Huang, Y. L., Zhang, M., Lou, B. Y., *Novel Salt Cocrystal of Chrysin with Berberine: Preparation, Characterization, and Oral Bioavailability*. Cryst. Growth Des., 2018. **18**(8): p. 4724-4730.
- [111] Laxmi, P., Varma, A., Pai, A., Sathyanarayana, M. B., *Experimental Data of Fabricated Co-crystals of Doxorubicin HCl with Flavonoids*. Indian J. Pharm. Educ. Res., 2019. **53**(3): p. S225-S230.
- [112] Zhang, Z.J., Li, D. X., Luo, C., Huang, C. X., Qiu, R. C., Deng, Z. W., Zhang, H. L., *Cocrystals of Natural Products: Improving the Dissolution Performance of Flavonoids Using Betaine*. Cryst. Growth Des., 2019. **19**(7): p. 3851-3859.
- [113] D'Andrea, G., *Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?* Fitoterapia, 2015. **106**: p. 256-71.
- [114] Anand David, A.V., Arulmoli, R., Parasuraman, S., *Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid*. Pharmacogn. Rev., 2016. **10**(20): p. 84-89.

- [115] Jin, G.Z., Yamagata, Y., Tomita, K., *Structure of Quercetin Dihydrate*. Acta Crystallogr. C Struct. Chem., 1990. **46**: p. 310-313.
- [116] Nifant'ev, E.E., Koroteev, M. P., Kaziev, G. Z., Uminskii, A. A., Grachev, A. A., Men'shov, V. M., Tsvetkov, Y. E., Nifant'ev, N. E., Bel'skii, V. K., Stash, A. I., *On the problem of identification of the dihydroquercetin flavonoid*. Russ. J. Gen. Chem., 2006. **76**(1): p. 161-163.
- [117] Srinivas, K., King, J. W., Howard, L. R., Monrad, J. K., *Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water*. J. Food Eng., 2010. **100**(2): p. 208-218.
- [118] Domagala, S., Munshi, P., Ahmed, M., Guillot, B., Jelsch, C., *Structural analysis and multipole modelling of quercetin monohydrate - a quantitative and comparative study*. Acta Crystallogr. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater., 2011. **67**(Pt 1): p. 63-78.
- [119] Borghetti, G.S., Carini, J. P., Honorato, S. B., Ayala, A. P., Moreira, J. C. F., Bassani, V. L., *Physicochemical properties and thermal stability of quercetin hydrates in the solid state*. Thermochim. Acta, 2012. **539**: p. 109-114.
- [120] Klitou, P., Pask, C. M., Onoufriadi, L., Rosbottom, I., Simone, E., *Solid-State Characterization and Role of Solvent Molecules on the Crystal Structure, Packing, and Physicochemical Properties of Different Quercetin Solvates*. Cryst. Growth Des., 2020. **20**(10): p. 6573-6584.
- [121] Rossi, M., Rickles, L. F., Halpin, W. A., *The Crystal and Molecular-Structure of Quercetin - a Biologically-Active and Naturally-Occurring Flavonoid*. Bioorg. Chem., 1986. **14**(1): p. 55-69.
- [122] Smith, A.J., Kavuru, P., Wojtas, L., Zaworotko, M. J., Shytle, R. D., *Cocrystals of quercetin with improved solubility and oral bioavailability*. Mol. Pharm., 2011. **8**(5): p. 1867-76.
- [123] Vasisht, K., Chadha, K., Karan, M., Bhalla, Y., Jena, A. K., Chadha, R., *Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization*. CrystEngComm, 2016. **18**(8): p. 1403-1415.
- [124] Zhang, Y.N., Yin, H. M., Zhang, Y., Zhang, D. J., Su, X., Kuang, H. X., *Cocrystals of kaempferol, quercetin and myricetin with 4,4 '-bipyridine: Crystal structures, analyses of intermolecular interactions and antibacterial properties*. J. Mol. Struct., 2017. **1130**: p. 199-207.
- [125] Liu, F., Wang, L. Y., Yu, M. C., Li, Y. T., Wu, Z. Y., Yan, C. W., *A new cocrystal of isoniazid-quercetin with hepatoprotective effect: The design, structure, and in vitro/in vivo performance evaluation*. Eur. J. Pharm. Sci., 2020. **144**.
- [126] Wu, N., Zhang, Y., Ren, J., Zeng, A., Liu, J., *Preparation of quercetin–nicotinamide cocrystals and their evaluation under in vivo and in vitro conditions*. RSC Adv., 2020. **10**(37): p. 21852–21859.
- [127] Veverka, M., Dubaj, T., Gallovic, J., Jorik, V., Veverkova, E., Danihelova, M., Simon, P., *Cocrystals of quercetin: synthesis, characterization, and screening of biological activity*. Monatsh. Chem., 2015. **146**(1): p. 99-109.
- [128] Miklasinska, M., Kepa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Dziedzic, A., Wasik, T. J., *Catechin Hydrate Augments the Antibacterial Action of Selected Antibiotics against Staphylococcus aureus Clinical Strains*. Molecules, 2016. **21**(2).
- [129] Li, N., Taylor, L. S., Ferruzzi, M. G., Mauer, L. J., *Kinetic Study of Catechin Stability: Effects of pH, Concentration, and Temperature*. J. Agric. Food Chem., 2012. **60**(51): p. 12531-12539.
- [130] Zeng, L., Ma, M. J., Li, C., Luo, L. Y., *Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures*. Int. J. Food Prop., 2017. **20**(1): p. 1-18.
- [131] Cuevas-Valenzuela, J., Gonzalez-Rojas, A., Wisniak, J., Apelblat, A., Perez-Correa, J. R., *Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277.6-331.2 K: Fundamental data to design polyphenol extraction processes*. Fluid Ph. Equilibria, 2014. **382**: p. 279-285.
- [132] Aditya, N.P., Aditya, S., Yang, H. J., Kim, H. W., Park, S. O., Lee, J., Ko, S., *Curcumin and catechin co-loaded water-in-oil-in-water emulsion and its beverage application*. J. Funct. Foods, 2015. **15**: p. 35-43.
- [133] Junior, O.V., Dantasa, J. H., Barão, C. E., Zanoeloc, E. F., Cardozo-Filho, L., de Moraes, F. F., *Formation of inclusion compounds of (+)catechin with  $\beta$ -cyclodextrin in different complexation media: Spectral, thermal and antioxidant properties*. J. Supercrit. Fluids, 2017. **121**: p. 10-18.
- [134] Kaur, R., Rajput, R., Nag, P., Kumar, S., Rachana, Singh, M., *Synthesis, characterization and evaluation of antioxidant properties of catechin hydrate nanoparticles*. J. Drug Deliv. Sci. Technol., 2017. **39**: p. 398-407.



- [135] Spizzirri, U.G., Carullo, G., De Cicco, L., Crispini, A., Scarpelli, F., Restuccia, D., Aiello, F., *Synthesis and characterization of a (+)-catechin and L-(+)-ascorbic acid cocrystal as a new functional ingredient for tea drinks*. Heliyon, 2019. **5**(8).
- [136] Harper, J.K., Doebbler, J. A., Jacques, E., Grant, D. M., Von Dreele, R. B., *A Combined Solid-State NMR and Synchrotron X-ray Diffraction Powder Study on the Structure of the Antioxidant (+)-Catechin 4.5-hydrate*. J. Am. Chem. Soc., 2010. **132**(9): p. 2928-2937.
- [137] Dudek, M.K., Day, G. M., *Explaining crystallization preferences of two polyphenolic diastereoisomers by crystal structure prediction*. CrystEngComm, 2019. **21**(13): p. 2067-2079.
- [138] Dudek, M.K., Paluch, P., Sniechowska, J., Nartowski, K. P., Day, G. M., Potrzebowski, M. J., *Crystal structure determination of an elusive methanol solvate - hydrate of catechin using crystal structure prediction and NMR crystallography*. CrystEngComm, 2020. **22**(30): p. 4969-4981.
- [139] Park, K.S., Chong, Y., Kim, M. K., *Myricetin: biological activity related to human health*. Appl. Biol. Chem., 2016. **59**(2): p. 259-269.
- [140] Semwal, D.K., Semwal, R. B., Combrinck, S., Viljoen, A., *Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities*. Nutrients, 2016. **8**(2).
- [141] Taheri, Y., Suleria, H. A. R., Martins, N., Sytar, O., Beyatli, A., Yeskaliyeva, B., Seitimova, G., Salehi, B., Semwal, P., Painuli, S., Kumar, A., Azzini, E., Martorell, M., Setzer, W. N., Maroyi, A., Sharifi-Rad, J., *Myricetin bioactive effects: moving from preclinical evidence to potential clinical applications*. BMC Complement. Med. Ther., 2020. **20**(1).
- [142] Devi, K.P., Rajavel, T., Habtemariam, S., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., *Molecular mechanisms underlying anticancer effects of myricetin*. Life Sci., 2015. **142**: p. 19-25.
- [143] Afroze, N., Pramodh, S., Hussain, A., Waleed, M., Vakharia, K., *A review on myricetin as a potential therapeutic candidate for cancer prevention*. 3 Biotech., 2020. **10**(5).
- [144] Hong, C., Xie, Y., Yao, Y. S., Li, G. W., Yuan, X. R., Shen, H. Y., *A Novel Strategy for Pharmaceutical Cocrystal Generation Without Knowledge of Stoichiometric Ratio: Myricetin Cocrystals and a Ternary Phase Diagram*. Pharma. Res., 2015. **32**(1): p. 47-60.
- [145] Dang, Y., Lin, G., Xie, Y., Duan, J., Ma, P., Li, G., Ji, G., *Quantitative determination of myricetin in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its absolute bioavailability*. Drug Res. (Stuttg.), 2014. **64**(10): p. 516-22.
- [146] Yao, Y.S., Lin, G. B., Xie, Y., Ma, P., Li, G. W., Meng, Q. C., Wu, T., *Preformulation studies of myricetin: a natural antioxidant flavonoid*. Pharmazie, 2014. **69**(1): p. 19-26.
- [147] Lucas-Abellan, C., Fortea, I., Gabaldon, J. A., Nunez-Delicado, E., *Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH*. J. Agric. Food Chem., 2008. **56**(1): p. 255-259.
- [148] Yao, Y., Xie, Y., Hong, C., Li, G., Shen, H., Ji, G., *Development of a myricetin/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization, and evaluation*. Carbohydr. Polym., 2014. **110**: p. 329-37.
- [149] Nan, H., Ma, H., Zhang, R., Zhan, R., *Physicochemical Properties of the Complex of Myricetin and Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin*. Trop. J. Pharm. Res., 2014. **13**(11): p. 1791-1796.
- [150] Sowa, M., Slepokura, K., Matczak-Jon, E., *A 1:1 pharmaceutical cocrystal of myricetin in combination with uncommon piracetam conformer: X-ray single crystal analysis and mechanochemical synthesis*. J. Mol. Struct., 2014. **1058**: p. 114-121.
- [151] Liu, M.Y., Hong, C., Yao, Y. S., Shen, H. Y., Ji, G., Li, G. W., Xie, Y., *Development of a pharmaceutical cocrystal with solution crystallization technology: Preparation, characterization, and evaluation of myricetin-proline cocrystals*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2016. **107**: p. 151-159.
- [152] Muresan-Pop, M., Chiriac, L. B., Martin, F., Simon, S., *Novel nutraceutical Myricetin composite of enhanced dissolution obtained by co-crystallization with acetamide*. Compos. B Eng., 2016. **89**: p. 60-66.
- [153] Ren, S.Z., Liu, M. Y., Hong, C., Li, G. W., Sun, J. B., Wang, J. Y., Zhang, L., Xie, Y., *The effects of pH, surfactant, ion concentration, cofomer, and molecular arrangement on the solubility behavior of myricetin cocrystals*. Acta Pharm. Sin. B, 2019. **9**(1): p. 59-73.
- [154] Li, P.Z., Ramaiah, T., Zhang, M., Zhang, Y. J., Huang, Y. L., Lou, B. Y., *Two Cocrystals of Berberine Chloride with Myricetin and Dihydromyricetin: Crystal Structures, Characterization, and Antitumor Activities*. Cryst. Growth Des., 2020. **20**(1): p. 157-166.
- [155] Franklin, S.J., Myrdal, P. B., *Solid-State and Solution Characterization of Myricetin*. AAPS Pharm. Sci. Tech., 2015. **16**(6): p. 1400-8.

- [156] Muresan-Pop, M., Pop, M. M., Borodi, G., Todea, M., Nagy-Simon, T., Simon, S., *Solid dispersions of Myricetin with enhanced solubility: Formulation, characterization and crystal structure of stability-impeding Myricetin monohydrate crystals*. J. Mol. Struct., 2017. **1141**: p. 607-614.
- [157] Jayakumar, C., Gandhi, N. N., *Thermodynamic Study on Hydrotropic Aggregation Behavior of Benzamide*. J. Chem. Eng. Data, 2010. **55**(10): p. 4362-4368.
- [158] Wöhler, F., Liebig, J., *Untersuchungen über das Radikal der Benzoesäure*. Ann. Pharm., 1832. **3**(3): p. 249-282.
- [159] Penfold, B.R., White, J. C. B., *The Crystal and Molecular Structure of Benzamide*. Acta Crystallogr., 1959. **12**(2): p. 130-135.
- [160] David, W.I.F., Shankland, K., Pulham, C. R., Blagden, N., Davey, R. J., Song, M., *Polymorphism in benzamide*. Angew. Chem. Int. Ed., 2005. **44**(43): p. 7032-7035.
- [161] Blagden, N., Davey, R., Dent, G., Song, M., David, W. I. F., Pulham, C. R., Shankland, K., *Woehler and Liebig Revisited: A Small Molecule Reveals Its Secrets*The Crystal Structure of the Unstable Polymorph of Benzamide Solved after 173 Years. Cryst. Growth Des., 2005. **5**(6): p. 2218-2224.
- [162] Thun, J., Seyfarth, L., Senker, J., Dinnebier, R. E., Breu, J., *Polymorphism in benzamide: Solving a 175-year-old riddle*. Angew. Chem. Int. Ed., 2007. **46**(35): p. 6729-6731.
- [163] Thun, J., Seyfarth, L., Butterhof, C., Senker, J., Dinnebier, R. E., Breu, J., *Woehler and Liebig Revisited: 176 Years of Polymorphism in Benzamide - and the Story Still Continues!* Cryst. Growth Des., 2009. **9**(5): p. 2435-2441.
- [164] Butterhof, C., Martin, T., Ectors, P., Zahn, D., Niemietz, P., Senker, J., Nather, C., Breu, J., *Thermoanalytical Evidence of Metastable Molecular Defects in Form I of Benzamide*. Cryst. Growth Des., 2012. **12**(11): p. 5365-5372.
- [165] Fellah, N., Shtukenberg, A. G., Chan, E. J., Vogt-Maranto, L., Xu, W. Q., Li, C., Tuckerman, M. E., Kahr, B., Ward, M. D., *Disorderly Conduct of Benzamide IV: Crystallographic and Computational Analysis of High Entropy Polymorphs of Small Molecules*. Cryst. Growth Des., 2020. **20**(4): p. 2670-2682.
- [166] Thun, J., Schoeffel, M., Breu, J., *Crystal structure prediction could have helped the experimentalists with polymorphism in benzamide*. Mol. Simul., 2008. **34**(10-15): p. 1359-1370.
- [167] Ectors, P., Zahn, D., *Analysis of the molecular interactions governing the polymorphism of benzamide – a guide to syntheses?* Phys. Chem. Chem. Phys., 2013. **15**(23): p. 9219-9222.
- [168] Johansson, K.E., van de Streek, J., *Revision of the Crystal Structure of the First Molecular Polymorph in History*. Cryst. Growth Des., 2016. **16**(3): p. 1366-1370.
- [169] Aitipamula, S., Mapp, L. K., Wong, A. B. H., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Novel pharmaceutical cocrystals of triflusal: crystal engineering and physicochemical characterization*. CrystEngComm, 2015. **17**(48): p. 9323-9335.
- [170] Surov, A.O., Solanko, K. A., Bond, A. D., Bauer-Brandl, A., Perlovich, G. L., *Cocrystals of the antiandrogenic drug bicalutamide: screening, crystal structures, formation thermodynamics and lattice energies*. CrystEngComm, 2016. **18**(25): p. 4818-4829.
- [171] Mapp, L.K., Coles, S. J., Aitipamula, S., *Novel solid forms of lonidamine: crystal structures and physicochemical properties*. CrystEngComm, 2017. **19**(21): p. 2925-2935.
- [172] Brittain, H.G., *Vibrational Spectroscopic Studies of Cocrystals and Salts. 1. The Benzamide-Benzoic Acid System*. Cryst. Growth Des., 2009. **9**(5): p. 2492-2499.
- [173] Ouyang, J.B., Zhou, L. M., Liu, Z. R., Xiao, S. J., Huang, X., Heng, J. Y. Y., *Solubility determination and modelling of benzamide in organic solvents at temperatures from 283.15 K and 323.15 K, and ternary phase diagrams of benzamide-benzoic acid cocrystals in ethanol at 298.15 K*. J. Mol. Liq., 2019. **286**: p. 110885.
- [174] Elbagerma, M.A., Edwards, H. G. M., Munshi, T., Scowen, I. J., *Identification of a new co-crystal of salicylic acid and benzamide of pharmaceutical relevance*. Anal. Bioanal. Chem., 2010. **397**(1): p. 137-146.
- [175] Seaton, C.C., Parkin, A., *Making Benzamide Cocrystals with Benzoic Acids: The Influence of Chemical Structure*. Cryst. Growth Des., 2011. **11**(5): p. 1502-1511.
- [176] Fischer, F., Heidrich, A., Greiser, S., Benemann, S., Rademann, K., Emmerling, F., *Polymorphism of Mechanochemically Synthesized Cocrystals: A Case Study*. Cryst. Growth Des., 2016. **16**(3): p. 1701-1707.

- [177] Bruni, G., Monteforte, F., Maggi, L., Girella, A., Berbenni, V., Milanese, C., Marini, A., *Probenecid and benzamide: DSC applied to the study of an "impossible" pharmaceutical system*. J. Therm. Anal. Calorim., 2020. **145**(2): p. 391–402.
- [178] Bruni, G., Monteforte, F., Maggi, L., Friuli, V., Ferrara, C., Mustarelli, P., Girella, A., Berbenni, V., Capsoni, D., Milanese, C., Marini, A., *Probenecid and benzamide: cocrystal prepared by a green method and its physico-chemical and pharmaceutical characterization*. J. Therm. Anal. Calorim., 2020. **140**(4): p. 1859-1869.
- [179] Afkhami, A., Sarlak, N., *Simultaneous determination of salicylamide and paracetamol by spectrophotometric H-point standard addition method and partial least squares regression*. Acta Chim. Slov., 2005. **52**(1): p. 98-103.
- [180] Nordstrom, F.L., Rasmuson, A. C., *Solubility and melting properties of salicylamide*. J. Chem. Eng. Data, 2006. **51**(5): p. 1775-1777.
- [181] Alhashimi, M., Mayhoub, A., Seleem, M. N., *Repurposing Salicylamide for Combating Multidrug-Resistant Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother., 2019. **63**(12).
- [182] Sasada, Y., Takano, T., Kakudo, M., *Crystal Structure of Salicylamide*. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1964. **37**(7): p. 940-946.
- [183] Johnstone, R.D.L., Lennie, A. R., Parker, S. F., Parsons, S., Pidcock, E., Richardson, P. R., Warren, J. E., Wood, P. A., *High-pressure polymorphism in salicylamide*. CrystEngComm, 2010. **12**(4): p. 1065-1078.
- [184] Manin, A.N., Voronin, A. P., Perlovich, G. L., *Thermodynamic and structural aspects of hydroxybenzamide molecular crystals study*. Thermochim. Acta, 2013. **551**: p. 57-61.
- [185] Manin, A.N., Voronin, A. P., Manin, N. G., Vener, M. V., Shishkina, A. V., Lermontov, A. S., Perlovich, G. L., *Salicylamide Cocrystals: Screening, Crystal Structure, Sublimation Thermodynamics, Dissolution, and Solid-State DFT Calculations*. J. Phys. Chem. B, 2014. **118**(24): p. 6803-6814.
- [186] Singh, M., Rai, R. N., Rai, U. S., *Synthesis, crystal growth and physicochemical studies on a novel organic inter-molecular compound; 3,5-dinitrobenzoic acid and salicylamide system*. J. Cryst. Growth, 2015. **419**(C): p. 114-122.
- [187] Surov, A.O., Manin, A. N., Voronin, A. P., Churakov, A. V., Perlovich, G. L., Vener, M. V., *Weak Interactions Cause Packing Polymorphism in Pharmaceutical Two-Component Crystals. The Case Study of the Salicylamide Cocrystal*. Cryst. Growth Des., 2017. **17**(3): p. 1425-1437.
- [188] Phetmung, H., Musikapong, K., Srichana, T., *Thermal analysis, structure, spectroscopy and DFT calculations of a pharmaceutical cocrystal of salicylic acid and salicylamide*. J. Therm. Anal. Calorim., 2019. **138**(2): p. 1207-1220.
- [189] Aoki, S., Okamoto, A., Danjo, K., Sunada, H., Otuka, A., *Compatibility of ibuprofen and ethenzamide*. Drug Dev. Ind. Pharm., 1997. **23**(6): p. 561-565.
- [190] Uehara, H., Otsuka, H., Izumi, K., *Modifying effects of a mixture of acetaminophen, aspirin, dipyron and ethenzamide on a multiorgan initiation model and its carcinogenicity in male F344 rats*. Cancer Lett., 1999. **135**(1): p. 83-90.
- [191] Aoki, S., Mizutani, T., Danjo, K., *Studies on the number of contacts between Ibuprofen and Ethenzamide using thermal analysis*. Chem. Pharm. Bull., 2000. **48**(1): p. 140-141.
- [192] Kawano, O., Sawabe, T., Misaki, N., Fukawa, K., *Studies on combination dosing (III). Aspirin and ethenzamide*. Jpn J. Pharmacol., 1978. **28**(6): p. 829-35.
- [193] Aitipamula, S., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Dimorphs of a 1:1 cocrystal of ethenzamide and saccharin: solid-state grinding methods result in metastable polymorph*. CrystEngComm, 2009. **11**(5): p. 889-895.
- [194] Tong, Y., Wang, Z. Z., Yang, E. T., Pan, B. C., Dang, L. P., Wei, H. Y., *Insights into Cocrystal Polymorphic Transformation Mechanism of Ethenzamide-Saccharin: A Combined Experimental and Simulative Study*. Cryst. Growth Des., 2016. **16**(9): p. 5118-5126.
- [195] Tong, Y., Wang, Z. Z., Dang, L. P., Wei, H. Y., *Solid-liquid phase equilibrium and ternary phase diagrams of ethenzamide-saccharin cocrystals in different solvents*. Fluid. Phase Equilibria, 2016. **419**: p. 24-30.
- [196] Aitipamula, S., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Trimorphs of a pharmaceutical cocrystal involving two active pharmaceutical ingredients: potential relevance to combination drugs*. CrystEngComm, 2009. **11**(9): p. 1823-1827.

- [197] Sokal, A., Pindelska, E., Szeleszczuk, L., Kolodziejski, W., *Pharmaceutical properties of two ethenzamide-gentisic acid cocrystal polymorphs: Drug release profiles, spectroscopic studies and theoretical calculations*. Int. J. Pharm., 2017. **522**(1-2): p. 80-89.
- [198] Aitipamula, S., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Ethenzamide-gentisic acid-acetic acid (2/1/1)*. Acta Crystallogr. E: Crystallogr. Commun., 2010. **66**(Pt 5): p. O1045-U1540.
- [199] Aitipamula, S., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Conformational and enantiotropic polymorphism of a 1:1 cocrystal involving ethenzamide and ethylmalonic acid*. CrystEngComm, 2010. **12**(11): p. 3691-3697.
- [200] Aitipamula, S., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Polymorphs and Solvates of a Cocrystal Involving an Analgesic Drug, Ethenzamide, and 3,5-Dinitrobenzoic Acid*. Cryst. Growth Des., 2010. **10**(5): p. 2229-2238.
- [201] Aitipamula, S., Wong, A. B. H., Chow, P. S., Tan, R. B. H., *Pharmaceutical cocrystals of ethenzamide: structural, solubility and dissolution studies*. CrystEngComm, 2012. **14**(24): p. 8515-8524.
- [202] Hariprasad, V.M., Nechipadappu, S. K., Trivedi, D. R., *Cocrystals of Ethenzamide: Study of Structural and Physicochemical Properties*. Cryst. Growth Des., 2016. **16**(8): p. 4473-4481.
- [203] Przybyłek, M., Ziolkowska, D., Mroczynska, K., Cysewski, P., *Propensity of salicylamide and ethenzamide cocrystallization with aromatic carboxylic acids*. Eur. J. Pharm. Sci., 2016. **85**: p. 132-140.
- [204] Sarmah, K.K., Boro, K., Arhangelskis, M., Thakuria, R., *Crystal structure landscape of ethenzamide: a physicochemical property study*. CrystEngComm, 2017. **19**(5): p. 826-833.
- [205] Khatioda, R., Bora, P., Sarma, B., *Trimorphic Ethenzamide Cocrystal: In Vitro Solubility and Membrane Efflux Studies*. Cryst. Growth Des., 2018. **18**(8): p. 4637-4645.
- [206] Khatioda, R., Saikia, B., Das, P. J., Sarma, B., *Solubility and in vitro drug permeation behavior of ethenzamide cocrystals regulated in physiological pH environments*. CrystEngComm, 2017. **19**(46): p. 6992-7000.
- [207] Kozak, A., Pindelska, E., *Spectroscopic analysis of the influence of various external factors on ethenzamide-glutaric acid (1:1) cocrystal formation*. Eur. J. Pharm. Sci., 2019. **133**: p. 59-68.
- [208] Kozak, A., P.H. Marek, and E. Pindelska, *Structural Characterization and Pharmaceutical Properties of Three Novel Cocrystals of Ethenzamide With Aliphatic Dicarboxylic Acids*. J. Pharm. Sci., 2019. **108**(4): p. 1476-1485.
- [209] Back, K.R., Davey, R. J., Grecu, T., Hunter, C. A., Taylor, L. S., *Molecular Conformation and Crystallization: The Case of Ethenzamide*. Cryst. Growth Des., 2012. **12**(12): p. 6110-6117.
- [210] Friscic, T., Childs, S. L., Rizvi, S. A. A., Jones, W., *The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome*. CrystEngComm, 2009. **11**(3): p. 418-426.
- [211] James, S.L., Adams, C. J., Bolm, C., Braga, D., Collier, P., Friscic, T., Grepioni, F., Harris, K. D. M., Hyett, G., Jones, W., Krebs, A., Mack, J., Maini, L., Orpen, A. G., Parkin, I. P., Shearouse, W. C., Steed, J. W., Waddell, D. C., *Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis*. Chem. Soc. Rev., 2012. **41**(1): p. 413-447.
- [212] Takacs, L., *The historical development of mechanochemistry*. Chem. Soc. Rev., 2013. **42**(18): p. 7649-7659.
- [213] Schmidt, R., Burmeister, C. F., Baláž, M., Kwade, A., Stolle, A., *Effect of Reaction Parameters on the Synthesis of 5-Arylidene Barbituric Acid Derivatives in Ball Mills*. Org. Process Res. Dev., 2015. **19**(3): p. 427-436.
- [214] Tsuzuki, T., McCormick, P. G., *Mechanochemical synthesis of nanoparticles*. J. Mater. Sci., 2004. **39**(16-17): p. 5143-5146.
- [215] Baláž, P., Achimovičová, M., Baláž, M., Billik, P., Cherkezova-Zheleva, Z., Criado, J. M., Delogu, F., Dutková, E., Gaffet, E., Gotor, F. J., Kumar, R., Mitov, I., Rojac, T., Senna, M., Streletskii, A., Wieczorek-Ciurawa, K., *Hallmarks of mechanochemistry: from nanoparticles to technology*. Chem. Soc. Rev., 2013. **42**(18): p. 7571-637.
- [216] Do, J.L., Friscic, T., *Mechanochemistry: A Force of Synthesis*. ACS Cent. Sci., 2017. **3**(1): p. 13-19.
- [217] Tan, D., Friscic, T., *Mechanochemistry for Organic Chemists: An Update*. Eur. J. Org. Chem., 2018. **2018**(1): p. 18-33.

- [218] Friscic, T., Mottillo, C., Titi, H. M., *Mechanochemistry for Synthesis*. Angew. Chem. Int. Ed., 2020. **59**(3): p. 1018-1029.
- [219] Walsh, P.J., Li, H. M., Parrodi, C. A., *A green chemistry approach to asymmetric catalysis: Solvent-free and highly concentrated reactions*. Chem. Rev., 2007. **107**(6): p. 2503-2545.
- [220] Constable, D.J.C.J.-G., C., Henderson, R. K., *Perspective on solvent use in the pharmaceutical industry*. Org. Process Res. Dev., 2007. **11**(1): p. 133-137.
- [221] Sheldon, R.A., *Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art*. Green Chem., 2005. **7**(5): p. 267-278.
- [222] Bygrave, P.J., Case D. H., Day G. M., *Is the equilibrium composition of mechanochemical reactions predictable using computational chemistry?* Faraday Discuss., 2014. **170**: p. 41-57.
- [223] Hasa, D., Miniussi, E., Jones, W., *Mechanochemical Synthesis of Multicomponent Crystals: One Liquid for One Polymorph? A Myth to Dispel*. Cryst. Growth Des., 2016. **16**(8): p. 4582–4588.
- [224] Hasa, D., Rauber, G. S., Voinovich, D., Jones, W., *Cocrystal Formation through Mechanochemistry: from Neat and Liquid-Assisted Grinding to Polymer-Assisted Grinding*. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2015. **54**(25): p. 7371–7375.
- [225] Tan, D., Loots, L., Friscic, T., *Towards medicinal mechanochemistry: evolution of milling from pharmaceutical solid form screening to the synthesis of active pharmaceutical ingredients (APIs)*. Chem. Commun., 2016. **52**(50): p. 7760-7781.
- [226] Friscic, T., *Supramolecular concepts and new techniques in mechanochemistry: cocrystals, cages, rotaxanes, open metal-organic frameworks*. Chem. Soc. Rev., 2012. **41**(9): p. 3493-3510.
- [227] Halasz, I., Kimber, S. A. J., Beldon, P. J., Belenguer, A. M., Adams, F., Honkimaki, V., Nightingale, R. C., Dinnebier, R. E., Friscic, T., *In situ and real-time monitoring of mechanochemical milling reactions using synchrotron X-ray diffraction*. Nat. Protoc., 2013. **8**(9): p. 1718-1729.
- [228] Hernandez, J.G., *Mechanochemical borylation of aryldiazonium salts; merging light and ball milling*. Beilstein J. Org. Chem., 2017. **13**: p. 1463-1469.
- [229] Strukil, V., Sajko, I., *Mechanochemically-assisted solid-state photocatalysis (MASSPC)*. Chem. Commun., 2017. **53**(65): p. 9101-9104.
- [230] Andersen, J., Mack, J., *Insights into Mechanochemical Reactions at Targetable and Stable, Sub-ambient Temperatures*. Angew. Chem. Int. Ed., 2018. **57**(40): p. 13062-13065.
- [231] Bolm, C., Hernandez, J. G., *Mechanochemistry of Gaseous Reactants*. Angew. Chem. Int. Ed., 2019. **58**(11): p. 3285-3299.
- [232] Karki, S., Friscic, T., Jones, W., *Control and interconversion of cocrystal stoichiometry in grinding: stepwise mechanism for the formation of a hydrogen-bonded cocrystal*. CrystEngComm, 2009. **11**(3): p. 470-481.
- [233] Cincic, D., Friscic, T., Jones, W., *A stepwise mechanism for the mechanochemical synthesis of halogen-bonded cocrystal architectures*. J. Am. Chem. Soc., 2008. **130**(24): p. 7524-+.
- [234] Zhong, X.H., Lu, Y., Luo, F., Liu, Y. W., Li, X. H., Liu, S. X., *A Nanocrystalline POM@MOFs Catalyst for the Degradation of Phenol: Effective Cooperative Catalysis by Metal Nodes and POM Guests*. Chem. Eur. J., 2018. **24**(12): p. 3045-3051.
- [235] Andre, V., Duarte, M. T., Braga, D., Grepioni, F., *Polymorphic Ammonium Salts of the Antibiotic 4-Aminosalicylic Acid*. Cryst. Growth Des., 2012. **12**(6): p. 3082-3090.
- [236] Stilinovic, V., Cincic, D., Zbacnik, M., Kaitner, B., *Controlling Solvate Formation of a Schiff Base by Combining Mechanochemistry with Solution Synthesis*. Croat. Chem. Acta, 2012. **85**(4): p. 485-493.
- [237] Trask, A.V., Shan, N., Motherwell, W. D. S., Jones, W., Feng, S. H., Tan, R. B. H., Carpenter, K. J., *Selective polymorph transformation via solvent-drop grinding*. Chem. Commun., 2005. **21**(7): p. 880-882.
- [238] Braga, D., Grepioni, F., Maini, L., Prosperi, S., Gobetto, R., Chierotti, M. R., *From unexpected reactions to a new family of ionic co-crystals: the case of barbituric acid with alkali bromides and caesium iodide*. Chem. Commun., 2010. **46**(41): p. 7715-7717.
- [239] Hardacre, C., Huang, H. F., James, S. L., Migaud, M. E., Norman, S. E., Pitner, W. R., *Overcoming hydrolytic sensitivity and low solubility of phosphitylation reagents by combining ionic liquids with mechanochemistry*. Chem. Commun., 2011. **47**(20): p. 5846-5848.

- [240] Strukil, V., Igrc, M. D., Eckert-Maksic, M., Friscic, T., *Click Mechanochemistry: Quantitative Synthesis of "Ready to Use" Chiral Organocatalysts by Efficient Two-Fold Thiourea Coupling to Vicinal Diamines*. Chem. Eur. J., 2012. **18**(27): p. 8464-8473.
- [241] Jampilek, J., Dohnal, J., *Investigation of Carbohydrates and Their Derivatives as Crystallization Modifiers*. Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology. 2012. 81-116.
- [242] Brittain, H.G., Bogdanowich, S. J., Bugay, D. E., Devinentis, J., Lewen, G., Newman, A. W., *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*. Pharm. Res., 1991. **8**(8): p. 963-973.
- [243] Chalmers, J.M., Dent, G., *Vibrational Spectroscopic Methods in Pharmaceutical Solid-state Characterization*, in *Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry*, D.R. Hilfiker, Editor. 2006, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. p. 95-138.
- [244] Bunaciu, A.A., Aboul-Enein, H. Y., Fleschin, S., *Application of Fourier Transform Infrared Spectrophotometry in Pharmaceutical Drugs Analysis*. Appl. Spectrosc. Rev., 2010. **45**(3): p. 206-219.
- [245] Khan, S.A., Khan, S.B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., Asiri, A. M., *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization.*, in *Handbook of Materials Characterization*, S. SK, Editor. 2018, Springer International Publishing. p. 317–344.
- [246] Yu, L., Reutzel, S. M., Stephenson, G. A., *Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy*. Pharmaceut. Sci. Tech. Today, 1998. **1**(3): p. 118-127.
- [247] Rodriguez-Spong, B., Price, C. P., Jayasankar, A., Matzger, A. J., Rodriguez-Hornedo, N., *General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2004. **56**(3): p. 241-274.
- [248] Shuttlefield, J.D., Grassian, V. H. , *ATR–FTIR Spectroscopy in the Undergraduate Chemistry Laboratory. Part I: Fundamentals and Examples*. J. Chem. Ed., 2008. **85**(2): p. 279-281.
- [249] Haines, P.J., Wilburn, F. W., *Chapter 5 - Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry*, in *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, B.M.-H.o.T.a. C, Editor. 1998, Elsevier Science B.V.: Amesterdão. p. 279–361.
- [250] Coleman, N.J., Craig, D. Q. M., *Modulated temperature differential scanning calorimetry: A novel approach to pharmaceutical thermal analysis*. Int. J. Pharm., 1996. **135**(1-2): p. 13-29.
- [251] Chieng, N., Rades, T., Aaltonen, J., *An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2011. **55**(4): p. 618-644.
- [252] M., V.I., *Utilization of DSC for Pharmaceutical crystal form quantitation*. J. Therm. Anal. Calorim., 2004. **78**(1): p. 33-45.
- [253] Mathkar, S., Kumar, S., Bystol, A., Olawoore, K., Min, D., Markovich, R., Rustum, A., *The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2009. **49**(3): p. 627-631.
- [254] Lu, E., Rodriguez-Hornedo, N., Suryanarayanan, R., *A rapid thermal method for cocrystal screening*. CrystEngComm, 2008. **10**(6): p. 665-668.
- [255] Mojumdar, S.C., Sain, M., Prasad, R. C., Sun, L., Venart, J. E. S., *Selected thermoanalytical methods and their applications from medicine to construction*. J. Therm. Anal. Calorim., 2007. **90**(3): p. 653-662.
- [256] Clas, S.D., Dalton, C. R., Hancock, B. C., *Differential scanning calorimetry: applications in drug development*. Pharmaceut. Sci. Tech. Today, 1999. **2**(8): p. 311-320.
- [257] Giron, D., *Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1*. Pharmaceut. Sci. Tech. Today, 1998. **1**(5): p. 191-199.
- [258] Freitas, J.C.C., Nunes, E., Passamani, E. C., Larica, C., Kellermann, G., Craievich, A. F., *Structure and melting of Pb nanocrystals produced by mechanical alloying of Fe/Pb powder mixtures*. Acta Mater., 2006. **54**(19): p. 5095-5102.
- [259] Sabbah, R., An, X. W., Chickos, J. S., Leitao, M. L. P., Roux, M. V., Torres, L. A., *Reference materials for calorimetry and differential thermal analysis*. Thermochim. Acta, 1999. **331**(2): p. 93-204.
- [260] Haleblan, J., McCrone, W., *Pharmaceutical applications of polymorphism*. J. Pharm. Sci., 1969. **58**(8): p. 911-29.

- [261] Ochsenbein, P., Schenk, K. J., *Crystallography for Polymorphs*, in *Polymorphism : in the Pharmaceutical Industry*, D.R. Hilfiker, Editor. 2006, Wiley- VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, Germany. p. 139-166.
- [262] Phadnis, N.V., Cavatur, R. K., Suryanarayanan, R., *Identification of drugs in pharmaceutical dosage forms by X-ray powder diffractometry*. J. Pharm. Biomed. Anal., 1997. **15**(7): p. 929-943.
- [263] Derollez, P., Dudognon, E., Affouard, F., Danede, F., Correia, N. T., Descamps, M., *Ab initio structure determination of phase II of racemic ibuprofen by X-ray powder diffraction*. Acta Crystallogr. B, 2010. **66**(Pt 1): p. 76-80.
- [264] Bunaciu, A.A., Udristioiu, E. G., Aboul-Enein, H. Y., *X-ray diffraction: instrumentation and applications*. Crit. Rev. Anal. Chem., 2015. **45**(4): p. 289-99.
- [265] Shah, B., Kakumanu, V. K., Bansal, A. K., *Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids*. J. Pharm. Sci., 2006. **95**(8): p. 1641-65.
- [266] Bragg, W.H., Bragg, W. L. , *The Reflection of X-rays by Crystals*. Proc. R. Soc. Lond., 1913. **88**(605): p. 428-438.
- [267] Newman, A.W., Byrn, S. R., *Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products*. Drug Discov. Today, 2003. **8**(19): p. 898-905.
- [268] Harris, K.D., *Powder diffraction crystallography of molecular solids*. Top. Curr. Chem., 2012. **315**: p. 133-77.
- [269] Giron, D., *Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates*. Thermochem. Acta, 1995. **248**: p. 1-59.
- [270] Ravindra, N.V., Panpalia, G. M., Jagarlapudi, A. R. P. S., *Norfloxacin sesquihydrate*. Acta Crystallogr. E: Crystallogr. Commun., 2009. **65**: p. O303-U1988.
- [271] Setyawan, D., Jovita, R. O., Iqbal, M., Paramanandana, A., Yusuf, H., Lestari, M. L. A. D., *Cocrystallization of quercetin and malonic acid using solvent-drop grinding method*. Trop. J. Pharm. Res., 2018. **17**(6): p. 997-1002.
- [272] Ruble, J.R., Galvao, A., *Electrostatic Potentials from Charge-Density Studies of Benzamide at 123 K*. Acta Crystallogr. B - Struct. Sci., 1995. **51**: p. 835-838.
- [273] Pagola, S., Stephens, P. W., *Herringbone array of hydrogen-bonded ribbons in 2-ethoxybenzamide from high-resolution X-ray powder diffraction*. Acta Crystallogr. C - Struct Chem., 2009. **65**(Pt 11): p. O583-O586.
- [274] Gala, U., Pham, H., Chauhan, H., *Pharmaceutical Applications of Eutectic Mixtures*. J. Dev. Drugs, 2013. **2**(3): p. e130.
- [275] Adhami, Z.N., Wise, R., Weston, D., Crump, B., *The Pharmacokinetics and Tissue Penetration of Norfloxacin*. J. Antimicrob. Chemother., 1984. **13**(1): p. 87-92.
- [276] GRELAN ACE JO. [cited 9 de Setembro de 2021; Available from: [https://search.jsmdb.info/sp\\_en/detail.php?txtID=4987910000086](https://search.jsmdb.info/sp_en/detail.php?txtID=4987910000086).





# **Anexos**



## Anexo I – Secção 3.2.1



Figura A1. Difratoograma de raios-X de pó da MYR [154].

## Anexo II – Secção 3.3.1

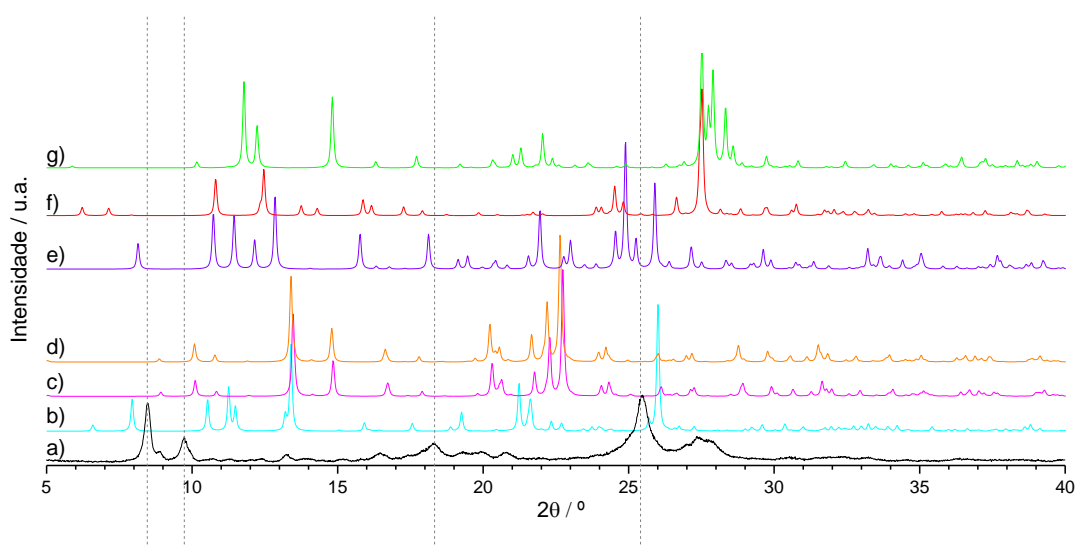
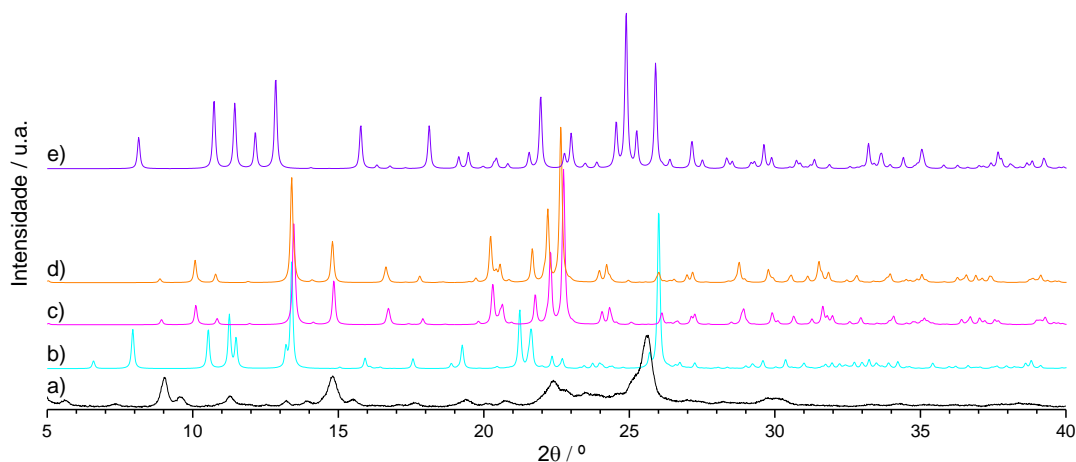


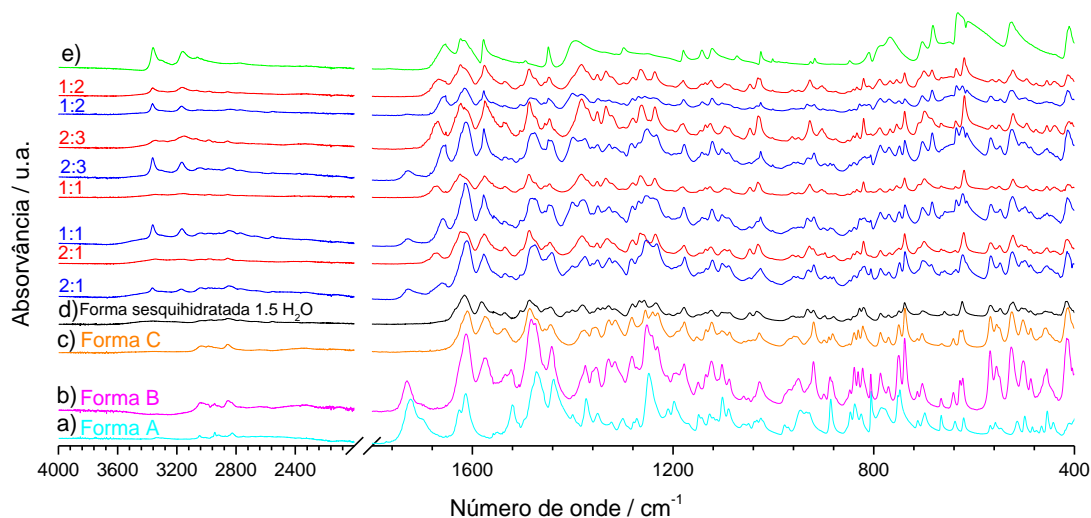
Figura A2. Difratoograma de raios-X de pó da NOR:QUE (1:1) obtida por LAG (a) e os difratogramas da forma sesquihidratada 3H<sub>2</sub>O (b), das formas hidratadas 1.125 (c) e 1.25 (d) e da forma dihidratada (e) da NOR e da forma dihidratada (f) e monohidratada (g) da QUE, SIMULADOS a partir dos ficheiros CIF das estruturas depositadas no Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com os números 720747, 719474, 719473, 153910, 1153851 e 814511, respetivamente.

### Anexo III – Secção 3.3.3

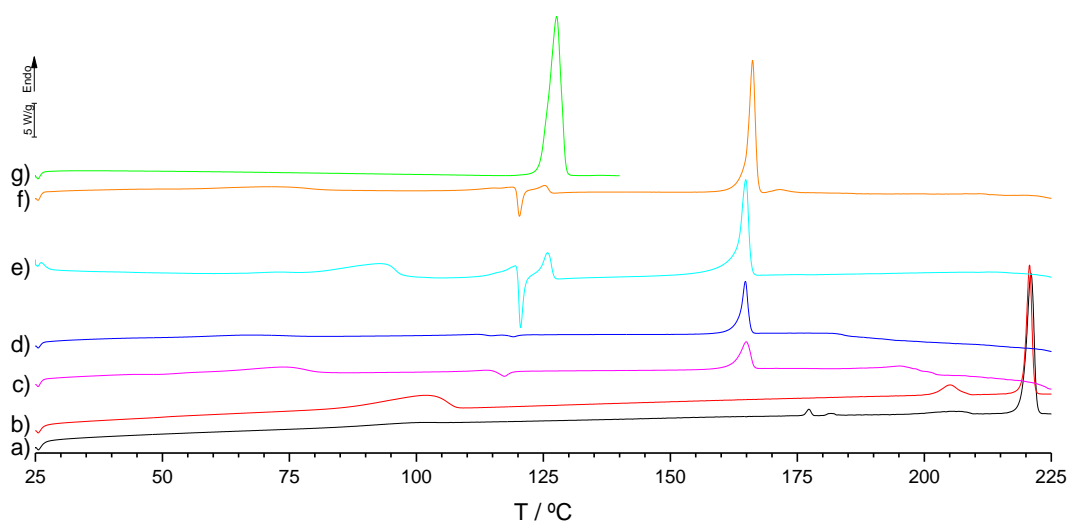


**Figura A3.** Difratograma de raios-X de pó da NOR:MYR (1:1) obtida por LAG (a) e os difratogramas simulados da forma sesquihidratada  $3H_2O$  (b), das formas hidratadas 1.125 (c) e 1.25 (d) e da forma dihidratada (e) a partir dos ficheiros Crystallographic Information File (CIF) das estruturas depositadas na Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) com os números 720747, 719474, 719473 e 153910 respetivamente.

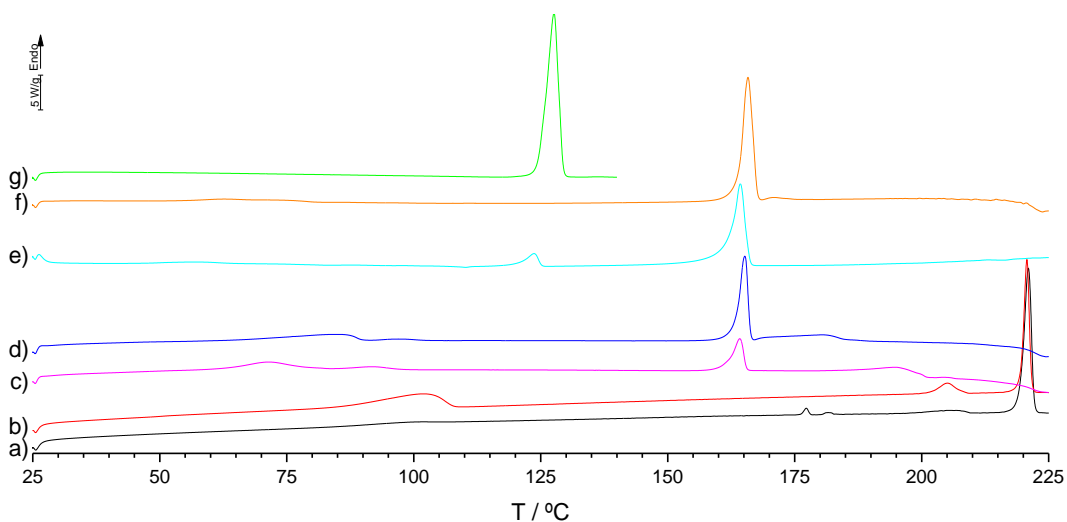
### Anexo IV – Secção 3.3.1



**Figura A4.** Espectros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada  $1.5H_2O$  (d) da NOR, da BEN (e) e das misturas de NOR e BEN nas proporções indicadas, sendo que as misturas obtidas por NG estão representadas a azul e as misturas obtidas por LAG estão representadas a vermelho.

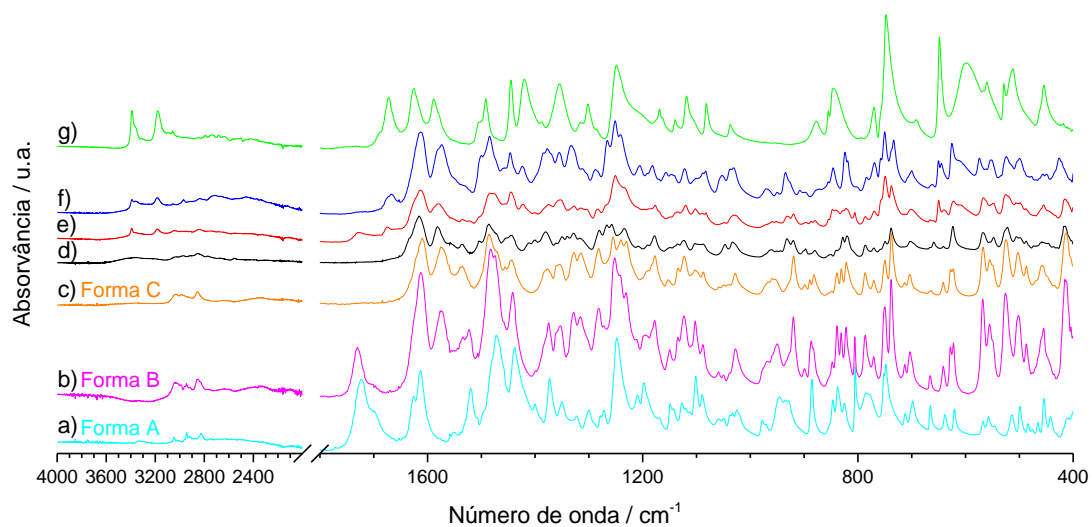


**Figura A5.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da NOR·1.5H<sub>2</sub>O da NOR,  $m = 1,50$  mg (b), da NOR e da BEN obtidas por NG nas proporções de 2:1,  $m = 1,50$  mg (c), 1:1,  $m = 1,05$  mg (d), 1:2,  $m = 2,13$  mg (e) e 2:3,  $m = 1,63$  mg (f) e da BEN de partida,  $m = 2,15$  mg (g),  $\beta = 10$  °C min<sup>-1</sup>.



**Figura A6.** Termogramas DSC da NOR de partida,  $m = 2,09$  mg (a), da NOR·1.5H<sub>2</sub>O,  $m = 1,50$  mg (b), da NOR e da BEN obtidas por LAG nas proporções de 2:1,  $m = 1,73$  mg (c), 1:1,  $m = 1,78$  mg (d), 1:2,  $m = 2,38$  mg (e) e 2:3,  $m = 2,03$  mg (f) e da BEN de partida,  $m = 1,44$  mg (g).

## Anexo V – Secção 3.3.2



**Figura A7.** Espectros de IV das formas A (a), B (b), C (c) e sesquihidratada 1.5 H<sub>2</sub>O (d) da NOR, das misturas de NOR e SA na proporção de 1:1 obtidas por NG (e) e LAG (f) e da SA de partida (g).