

# ANÁLISIS ESTRUCTURAL NUEVO POLIMORFO DE LA RIFAXIMINA

Análisis Estructural de un Nuevo Polimorfo de la Rifaximina: Caracterización y Comparación Supramolecular con los Polimorfos Alfa y Beta.

Juan José Almeida Calderón

Trabajo de Grado para Obtener el Título de Químico

Director:

Dr. José Antonio Henao Martínez

Codirector:

Dr. Robert Antonio Toro Hernández

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Grupo de Investigación en Química Estructural (GIQUE)

Química

Bucaramanga

2024

**Tabla de Contenido**

Introducción.....	10
1. Planteamiento del Problema.....	11
1.1. Hipótesis.....	12
2. Justificación de la problemática.....	12
3. Antecedentes.....	12
4. Marco Teórico.....	14
4.1. Estado cristalino.....	14
4.2. Polimorfismo.....	15
4.3. Rifaximina.....	17
4.4. Química supramolecular.....	19
4.4.1. Hidratos.....	20
4.4.2. Enlace de Hidrogeno.....	21
4.4.3 Interacciones.....	23
4.5. Solubilidad en equilibrio.....	24
4.6. Técnicas analíticas.....	24
4.6.1. Espectroscopía Ultravioleta.....	24
4.6.2. Espectroscopia Infrarroja.....	25
4.6.3. Ensayos Termoquímicos.....	26
4.6.4. Difracción de Rayos X por polvo (XRPD).....	26
4.6.5. Difracción de Rayos X por monocristal.....	29
4.7. Redes de Energía y Superficies de Hirshfeld.....	31
5. Objetivo General.....	34
6. Objetivos específicos.....	34
7. Metodología.....	34

ANÁLISIS ESTRUCTURAL NUEVO POLIMORFO DE LA RIFAXIMINA	2
7.1. Solubilidad mediante espectroscopia UV-VIS.....	34
7.2. Análisis mediante técnicas vibracionales y termogravimétrica.....	35
7.2.1. Obtención del material.....	35
7.2.2. Obtención de espectros infrarrojo.....	35
7.2.3 Análisis térmico mediante Termogravimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido.....	35
7.3. Caracterización estructural del nuevo polimorfo mediante técnicas de Difracción de Rayos X.....	36
7.3.1. Registro de datos por Difracción de Rayos X de polvo.....	36
7.3.2. Indexado de reflexiones, cálculo de grupo espacial y descomposición del patrón.....	36
7.3.3. Resolución de la estructura mediante Difracción de rayos X de Monocrystal.....	37
7.4. Comparación supramolecular con los polimorfos alfa y beta.....	37
8. Resultados.....	38
8.1. Caracterización por espectroscopia ATR-IR.....	38
8.2. Análisis por difracción de rayos X de polvo.....	39
8.3. Indexado.....	42
8.4. Determinación del grupo espacial.....	42
8.5. Descomposición del patrón de difracción (WPPD).....	42
8.6. Resolución y análisis estructural.....	44
8.7. Análisis supramolecular del polimorfo $\epsilon$ -rifaximina hemihidratado .....	53
8.8. Comparación del $\epsilon$ -rifaximina hemihidratado con los polimorfos $\alpha$ y $\beta$ de rifaximina..	57
8.9. Ensayo de solubilidad.....	59
8.9.1. Análisis térmico por TGA-DSC.....	60

ANÁLISIS ESTRUCTURAL NUEVO POLIMORFO DE LA RIFAXIMINA	3
8.9.2. Análisis por difracción de rayos X de monocristal.....	61
9. Conclusiones.....	64
Referencias Bibliográficas.....	66

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Constantes de celda para los diferentes polimorfos de la rifaximina.	19
Tabla 2. Relaciones entre los espacios directos y recíprocos	28
Tabla 3. Resumen de diferentes funciones de distancia y curvatura graficadas por Superficies de Hirshfeld, donde $k_1$ y $k_2$ son las curvaturas principales y $r^{vdW}$ se refiere al radio atómico de Van de Waals para cada especie (interna o externa).	32
Tabla 4. Interpretación del espectro ATR-IR para la rifaximina.	39
Tabla 5. Valores obtenidos para la descomposición del patrón polvo completo.	43
Tabla 6. Parámetros de confiabilidad del refinamiento de la estructura $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato determinada.	44
Tabla 7. Enlaces de hidrógenos presentes en la estructura de la $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.	45
Tabla 8. Parámetros geométricos de las interacciones C-O $\cdots\pi$ y C-H $\cdots\pi$ presentes en la estructura de $\epsilon$ -rifaximina.	51
Tabla 9. Comparación de los parámetros cristalinos de la muestra comparados con el reportado en la base de datos CSD con código ZEFNOP.	62

**Lista de Figuras**

Figura 1. Empaquetamiento estructural Rifaximina Alfa Anhidro.	14
Figura 2. Polimorfos del acetaminofén, polimorfo I izquierda y polimorfo II derecha.	16
Figura 3. Rifamicina, perteneciente a la familia de las ansamicinas naftalénicas.	18
Figura 4. Diferentes formas del Enlace de Hidrógeno.	22
Figura 5. Tipos de interacciones $\pi$ - $\pi$ , en la izquierda la interacción $\pi$ - $\pi$ cara-cara y a la derecha interacción borde-cara.	23
Figura 6. Esquema típico para un espectro de emisión de rayos X, que indica la presencia de un ruido de fondo y tres longitudes de onda: $K\alpha_1$ , $K\alpha_2$ , y $K\beta$ . La flecha vertical muestra la longitud de onda más corta posible.	27
Figura 7. Ilustración de la geometría usada para la derivación de la ley de Bragg.	28
Figura 8. Patrón de difracción de rayos X polvo (XRPD) del polimorfo $\gamma$ de la rifaximina.	29
Figura 9. Proyección estereográfica para un cristal octaédrico.	30
Figura 10. Espectro IR para el nuevo polimorfo de Rifaximina.	38
Figura 11. Patrón de difracción de la muestra comparados con los reportados en la base de datos CSD.	40
Figura 12. Patrón de difracción de la muestra comparado con el patrón calculado de la forma $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato determinada por datos de polvo de sincrotrón en el artículo de Braga et. Al <sup>[23]</sup> (color rojo) y el reportado para el polimorfo $\epsilon$ .	40

- Figura 13. Inconsistencias estructurales en el polimorfo de  $\epsilon$ -rifaximina reportado en el artículo de Braga et. al. 41
- Figura 14. Descomposición del patrón de polvo completo para la rifaximina. 43
- Figura 15. Unidad asimétrica de la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato. 45
- Figura 16. Enlaces de hidrógenos intramoleculares presentes en la  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato. 46
- Figura 17. Arreglo estructural de los dímeros de moléculas de rifaximina. 47
- Figura 18. (a) Orientaciones espaciales de los anillos de 6-miembros en los polimorfos reportados por Braga y colaboradores y, (b) de la estructura determinada en este estudio. 48
- Figura 19. Enlaces de hidrógeno C86-H86B $\cdots$ O12, C84-H102 $\cdots$ O12 y C43-H43C $\cdots$ O23 paralelos al eje c. Los átomos de hidrógenos fueron removidos para mayor claridad. 49
- Figura 20. Enlaces de hidrógeno C86-H86C $\cdots$ O21 y O13-H4 $\cdots$ O25 en la estructura de la  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato. 49
- Figura 21. Enlace de hidrógeno de la molécula de agua. 50
- Figura 22. Posiciones de las moléculas de agua en la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato reportada por Braga y colaboradores y en este estudio. 51
- Figura 23. Interacciones C-O $\cdots\pi$  y C-H $\cdots\pi$  presentes en la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato. 52
- Figura 24. Cintas en zigzag de moléculas de rifaximina que se extiende a lo largo del eje b. 52
- Figura 25. Superficies de Hirshfeld, índices de forma y curvatura del  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato. 54

- Figura 26. Huellas dactilares para cada fragmento de la unidad asimétrica del  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato, donde se muestran las contribuciones de cada contacto posible al área de la respectiva superficie de Hirshfeld. 56
- Figura 27. Huellas dactilares di (distancia Van der Waals interna) vs de (distancia Van der Waals externa) para el polimorfo  $\alpha$  de rifaximina. 57
- Figura 28. Huellas dactilares di (distancia Van der Waals interna) vs de (distancia Van der Waals externa) para el polimorfo  $\beta$  de rifaximina trihidratado. 58
- Figura 29. Comparación de los promedios de porcentajes de las interacciones presentes en los polimorfos  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato,  $\alpha$ -rifaximina y  $\beta$  de rifaximina trihidrato. 59
- Figura 30. Diagrama térmico obtenido por termogravimetría de la muestra de rifaximina. 60
- Figura 31. Termograma DSC de la muestra de rifaximina en estudio. 61
- Figura 32. Unidad asimétrica del polimorfo  $\delta$ -rifaximina dihidratado presente en la muestra. 62
- Figura 33. Relación entre varias formas cristalina de la rifaximina. 63

### **Dedicatoria**

Al pensar en la razón de este trabajo de grado, me llega a la mente dos personas que me apoyaron incondicionalmente, los guías de mi vida que siempre me dijeron que podía ser más, este trabajo de investigación es fruto del esfuerzo de José Manuel y Maribel, mis dos padres, que con sus consejos, regaños y sobre todo, amor, impulsaron a ese niño rebelde a ser Químico.

A Gabriela Olivares, mujer vital en mi vida, que me apoyó en las ultimas instancias de este trabajo de grado y, que sin ella y su cariño, no podría ser quién soy.

A las dos personas que lideraron este trabajo de investigación, el Dr. José Antonio Henao y el Dr. Robert Antonio Toro, que con su gran paciencia, carisma y su dedicación a la ciencia, me motivan día a día a seguir su ejemplo de vida.

A mis compañeros del Laboratorio de Rayos X que me acompañaron en mis primeros pasos en el mundo de la Química Estructural, especialmente a Christian Rojas, personas muy especiales en mi preparación como químico que siempre quedarán marcadas como los pilares de mi carrera profesional.

A mis amigos y compañeros del campus universitario, que con su capacidad de generar una competencia sana y momentos llenos de valor, me motivaron a seguir construyendo eso que tanto anhela un estudiante.

Y en especial, a todos esos niños que como yo alguna vez sueñan con ser profesionales en el ámbito de las ciencias en Colombia, la vida es larga y la pena es corta, por eso espero que como yo tengan una imagen que los pueda enfocar a un mejor futuro.

## Resumen

**Título:** Análisis Estructural de un Nuevo Polimorfo de la Rifaximina: Caracterización y Comparación Supramolecular con los Polimorfos Alfa y Beta\*

**Autor:** Juan José Almeida Calderón\*\*

**Palabras Claves:** Rifaximina; Cristalografía; Farmacología; Difracción de Rayos X; Polimorfo.

### Descripción:

La Rifaximina es un antibiótico oral, semisintético, utilizado para el control de bacterias Grampositivas y Gramnegativas en cualquier tipo de sistema, sea aeróbico o anaeróbico. En este trabajo de investigación se llevará a cabo el estudio estructural de un polimorfo no reportado de la Rifaximina y su comparación con los polimorfos alfa y beta reportados para este compuesto, relacionando las características fisicoquímicas y supramoleculares de estos.

Fue requerido el uso de Espectroscopía Infrarroja ATR para caracterizar adecuadamente los grupos funcionales presentes en el arreglo cristalino. Se realizó la obtención de datos del fármaco utilizando la técnica de Difracción de Rayos X en polvo para la adquisición del patrón de difracción en el equipo D8 Advance con longitud de radiación  $\text{K}\alpha_1 \lambda=1,5406\text{\AA}$  en el rango de  $4^\circ$  a  $70,0^\circ$  ( $2\theta$ ), se realizó el indexado de los máximos de difracción en el patrón de difracción del material donde se calcularon las constantes de celda haciendo uso del programa PreDICT, el cálculo del grupo espacial de la celda unidad fue realizado en el programa EXPO2014 requerido de igual manera para la resolución estructural del fármaco por medio del método de recocido simulado. La obtención de los factores de confiabilidad se realiza utilizando el programa TOPAS, ajustando los valores de constantes de celda y ángulos ideales.

La medición de la solubilidad del material a diferentes concentraciones fue planeada mediante Espectroscopía UV-VIS a diferentes concentraciones, variando el pH del ambiente. Fue indispensable el uso de técnicas complementarias como Termogravimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido para identificar la cantidad de moléculas de agua presentes y el punto de fusión del polimorfo.

---

\*Trabajo de Grado

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Dr. José Antonio Henao.  
Codirector: Dr. Robert Antonio Toro

### Abstract

**Title:** Structural Analysis of a New Rifaximin Polymorph: Characterization and Supramolecular Comparison with Alpha and Beta Polymorphs\*

**Author:** Juan José Almeida Calderón\*\*

**Key Words:** Rifaximin; Crystallography; Pharmacology; X-Ray Diffraction; Polymorphism.

### Description:

Rifaximin is an oral, semisynthetic antibiotic used for the control of Gram-positive and Gram-negative bacteria in any type of system, either aerobic or anaerobic. In this research work, the structural study of an unreported polymorph of Rifaximin and its comparison with the alpha and beta polymorphs reported for this compound will be carried out, relating their physicochemical and supramolecular characteristics.

The use of ATR Infrared Spectroscopy was required to adequately characterize the functional groups present in the crystalline arrangement. Data acquisition of the drug was performed using the Powder X-Ray Diffraction technique for the acquisition of the diffraction pattern in the D8 Advance equipment with radiation length  $\lambda=1.5406\text{\AA}$  in the range of  $4^\circ$  to  $70.0^\circ$  ( $2\theta$ ), the indexing of the diffraction maxima was performed on the diffraction pattern of the material where the cell constants were calculated making use of the PreDICT program, the calculation of the unit cell space group was performed in the EXPO2014 program required in the same way for the structural resolution of the drug through of the simulated annealing method. Obtaining the reliability factors is performed using the TOPAS program, adjusting the values of cell constants and ideal angles.

The measurement of the solubility of the material at different concentrations was planned by UV-VIS spectroscopy at different concentrations, varying the pH of the environment. The use of complementary techniques such as Thermogravimetry and Differential Scanning Calorimetry was indispensable to identify the amount of water molecules present and the melting point of the polymorph.

---

\*Bachelor Thesis

\*\*Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Dr. José Antonio Henao.

Codirector: Dr. Robert Antonio Toro

## Introducción

La Rifaximina es un antibiótico oral, semisintético, utilizado para el control de bacterias Grampositivas y Gramnegativas en cualquier tipo de sistema, sea aeróbico o anaeróbico. La Rifaximina actúa principalmente ligándose a la subunidad beta ARN polimerasa dependiente del ADN de la bacteria, lo cual inhibe la síntesis de ARN y conlleva a que la bacteria detenga su crecimiento celular<sup>[1]</sup>. Este fármaco es utilizado principalmente para tratar la diarrea del turista, aunque también, es ampliamente recomendado para prevenir episodios de encefalopatía hepática. Bacterias tales como la *Helicobacter pylori*, *Salmonella Typhi*, entre otras, son capaces de vulnerar las barreras primigenias del sistema inmunológico encargadas de discriminar entre patógenos y antígenos, ocasionando que la bacteria alojada colonice el tracto gastrointestinal del individuo.

La síntesis de la Rifaximina toma como compuesto de partida la Rifamicina SV<sup>[2]</sup>, compuesto heterocíclico semejante al hidrógeno que forma el compuesto cristalizado.

En el presente trabajo de investigación se llevará a cabo el estudio estructural de un polimorfo no reportado de la Rifaximina y su comparación con los polimorfos alfa y beta reportados para este compuesto, relacionando las características supramoleculares de estos.

## 1. Planteamiento del Problema

El polimorfismo es un fenómeno del estado sólido importante en la industria farmacéutica dado que puede afectar las propiedades fisicoquímicas, biológicas y farmacéuticas de un ingrediente farmacéutico activo (IFA) o medicamento. El estudio del polimorfismo es una herramienta utilizada para obtener información sobre el estado sólido de un dado IFA y/o medicamento. Por otro lado, este fenómeno también se ha convertido en un campo de estudio para la mejora de propiedades intrínsecas del estado sólido de los fármacos y el desarrollo de nuevos productos mediante la ingeniería de cristales.

La rifaximina presenta un gran número de polimorfos reportados, siendo los polimorfos alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) aprobados por la FDA en 2010, bajo el nombre de *Xifaxan*, para ser utilizados para su comercialización. El polimorfo gama ( $\gamma$ ) tiene una baja cristalinidad, ya que gran cantidad del material es amorfo, generando efectos farmacéuticos adversos, por lo que la comercialización de esta forma cristalina es restringida. La mayoría de las modificaciones cristalinas de la rifaximina presentan variación en los grados de hidratación provocando diferencias significativas en las solubilidades y velocidades de disolución. Dada la importancia del estudio de la formación de un nuevo polimorfo de la rifaximina y su adecuada caracterización estructural, con el fin de conocer sus nuevas propiedades, se plantea realizar un estudio comparativo de la nueva estructura cristalina de este IFA con las estructuras comercializadas y de esta manera conocer: ¿Qué diferencias estructurales y supramoleculares presentará el polimorfo no reportado en comparación con las estructuras alfa y beta de la rifaximina?

### **1.1. Hipótesis**

Se podrá establecer la estructura de nuevo polimorfo de la rifaximina y se encontrará la relación supramolecular de sus formas comercializadas alfa y beta.

## **2. Justificación de la Problemática**

La selección de una forma sólida de un IFA para el desarrollo de una formulación está relacionada con algunas propiedades fisicoquímicas de estos materiales tales como solubilidad, velocidad de disolución y estabilidad entre otros. La rifaximina presenta una variedad de polimorfos caracterizados, y las diferentes formas cristalinas de este IFA difieren principalmente en la cantidad de moléculas de agua presentes en la red cristalina y, en consecuencia, estos cristales presentan propiedades fisicoquímicas únicas e independientes entre sí (solubilidad y biodisponibilidad). En la actualidad los polimorfos aceptados para la distribución y comercialización del fármaco son la estructura alfa y/o beta, debido a que estas representan las redes cristalinas más estables termodinámicamente <sup>[4]</sup>. La aparición de un nuevo polimorfo de rifaximina requiere una adecuada caracterización estructural para así determinar si presenta algunas propiedades fisicoquímicas adecuadas y apropiadas para la elaboración de una formulación farmacéutica.

## **3. Antecedentes**

Los antecedentes de la Rifaximina se denotan desde el año 1959 con la síntesis de la rifamicina explicada por Sensi y su equipo <sup>[5]</sup>, primogénitos en la síntesis de compuesto de rifamicina con el grupo funcional característico imidazopiridina o rifamicinas SV. En 1982

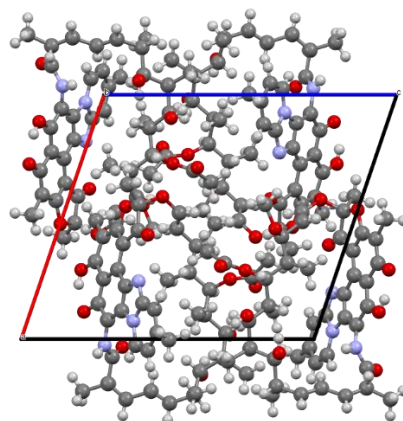
Marchi et al <sup>[6]</sup> formuló un método para la preparación y cristalización de rifamicina en adición del grupo imidazol usando solventes adecuados, siendo esta la primera síntesis patentada para la rifaximina. Transcurridos tres años de este descubrimiento, en 1985, Cannata y su equipo <sup>[7]</sup> compartió otro método más novedoso para la cristalización de Rifaximina, pero no se mencionó las posibles estructuras diferentes de rifaximina, luego de transcurridos 20 años sin ningún trabajo relevante en el campo de la rifaximina, en 2005 el equipo de investigación dirigido por Viscomi <sup>[8]</sup> presentó 3 patrones de difracción correspondientes a los polimorfos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y su índice de disolución, propiedad que es fundamental para categorizar la rifaximina en el grupo IV, conocidos por ser compuestos con bajo índice de disolución y permeabilidad. Poco tiempo después en 2006 Viscomi <sup>[9]</sup> extendió su estudio en la poca cristalinidad que presenta el polimorfo  $\gamma$  ofreciendo una alternativa para cristalizar este material partiendo de los polimorfos alfa y beta. A inicios del 2009 Jahagirdar junto a su equipo de investigación <sup>[10]</sup> desarrolló las primeras sales y mezclas de enantiómeros de rifaximina, aumentando significativamente la retención del fármaco en el tracto gastrointestinal. Si bien, ya el polimorfo  $\gamma$  de rifaximina era bien conocido por su comportamiento pobremente cristalino, no sería sino hasta 2009 que Kothakonda <sup>[11]</sup> y su equipo de la universidad de Montreal desarrolló un método novedoso para formar pastillas de amorfo de rifaximina estable, el cual es el principal objetivo de investigación de los predecesores de la rifaximina, para el cual en el mismo año Rao <sup>[12]</sup> desarrolló una patente que explica la formación de rifaximina cristalina partiendo de su fase amorfa y viceversa, siendo un precursor importante para el inicio de la comercialización de la rifaximina en fase amorfa. En 2011, tres polimorfos más de la rifaximina serían cristalizados por Gushurst y su equipo <sup>[13]</sup>, se trata de los polimorfos  $\zeta$ ,  $\eta$  y  $\iota$  en el cual los polimorfo  $\eta$  y  $\zeta$  presentan una gran cantidad de contenido amorfo, de manera diferente al polimorfo  $\iota$ , siendo este altamente cristalino. Los polimorfos mencionados junto a  $\epsilon$  y  $\kappa$  (en desarrollo) son los diferentes arreglos estructurales conocidos de la rifaximina. Hasta el día de hoy se ha probado

la eficacia de la rifaximina como tratamiento para diferentes patógenos incluido el SARS-CoV-2 [14], por lo que el desarrollo de nuevas formas polimórficas de la rifaximina sigue en auge y resulta un campo de investigación prometedor el cual está a la espera de una estructura altamente soluble con una biodisponibilidad aceptada que cumpla con las funciones farmacológicas que ofrecen las estructuras  $\alpha$  y  $\beta$ .

## 4. Marco Teórico

### 4.1. Estado Cristalino

La gran variación de compuestos que pueden formar estructuras sólidas, y en especial, estructuras cristalinas, genera una amplia cantidad de posibles arreglos con diferentes distribuciones sistemáticas en su ordenamiento. Un cristal de un elemento o compuesto puede ser definido como la construcción estructural de átomos, moléculas o iones, los cuales forman una red cristalina [15]. Es posible definir una red cristalina como la formación de un patrón utilizando las especies implicadas, esta red es usada como punto de referencia para representar las posiciones de los elementos que forman la estructura, a esta red se le conoce como celda unidad (ver **Figura 1**).



**Figura 1.** Empaquetamiento estructural Rifaximina Alfa Anhidro. CCDC 886511.

Las diferentes celdas unidades en la cuales pueden cristalizar los materiales se dividen en 4 grupos, primitiva (P), centrada en las caras (F), centrada en el cuerpo (I), y ubicada en el eje (A, B o C). La celda primitiva (P) solo tiene un punto de red en la celda unidad, por lo cual, solo se presenta un elemento de simetría traslacional característico de la repetición de esta celda en toda la estructura cristalina. En la celda centrada en las caras (F), presenta cuatro puntos de red en cada celda unidad, a diferencia de la celda centrada en el cuerpo (I), la cual tiene dos puntos de red por celda unidad. Para estas redes se pueden generar diferentes sistemas cristalinos los cuales varían debido a las relaciones presentes en sus parámetros de red. Los siete sistemas cristalinos son triclínico, monoclínico, ortorrómbico, romboédrico, tetragonal, hexagonal y cúbico.

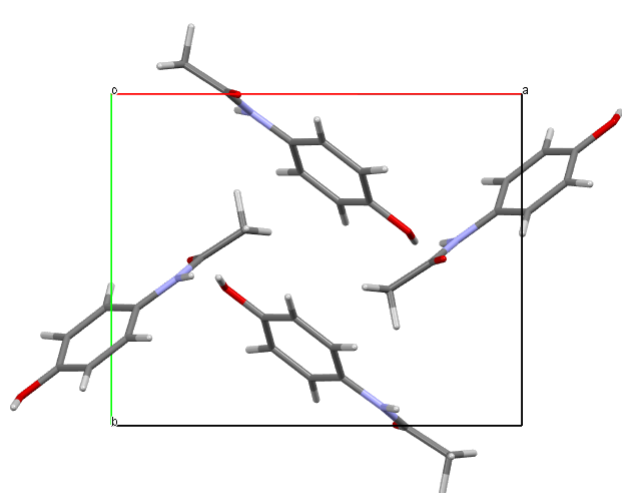
## 4.2. Polimorfismo

El término polimorfismo, proviene etimológicamente de las palabras griegas *poli*: muchas y *morf* definida como formas y se refiere, en el campo de la cristalografía, a la capacidad que posee un compuesto (orgánico o inorgánico) para cristalizar en más de un arreglo cristalino en el estado sólido. El primer uso de la palabra polimorfismo en cristalografía se atribuye a *Mitscherlich* (1822) el cual diferenció las estructuras para las sales de arseniato y fosfato<sup>[16]</sup>. Diversos científicos han complementado esta definición siendo los más destacables *McCrone* (1965) otorgando una definición plausible para este, según *McCrone* un polimorfo es “una fase cristalina sólida de un determinado compuesto resultante de la posibilidad de al menos dos diferentes arreglos moleculares del mismo en estado sólido”. Otras definiciones para este término fueron descritas por *Reinke* (1993) y *Dunitz* (1995), quienes enfocaron este término a un estudio en auge para su época. En la química supramolecular el polimorfismo se define según *Reinke* como “el fenómeno en el que las estructuras supramoleculares, con

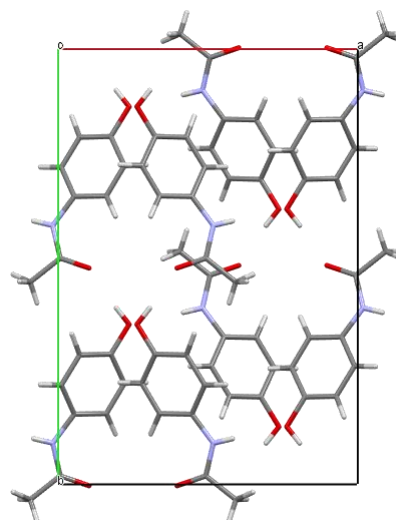
*diferentes propiedades físicas bien definidas pueden formarse, por especies químicamente uniformes tanto en estado líquido como sólido*”, mientras que Dunitz otorgó una definición más concreta:

“si un cristal es una supermolécula, entonces las modificaciones polimórficas son superisómeros y el polimorfismo es una especie de superisomería”. Estas definiciones fueron sumamente acertadas, dando una base para el inicio del estudio en química supramolecular.

En la industria farmacéutica, el polimorfismo es importante debido a que puede afectar las propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas de los principios farmacéuticamente activos y excipientes. Por ejemplo, el acetaminofén (Figura 2) puede cristalizar en tres formas cristalinas conocidas como polimorfos I, II y III. El polimorfo I<sup>[17]</sup> (monoclínico), es usado como fármaco debido a su facilidad para la elaboración de tabletas mientras, que el polimorfo II<sup>[18]</sup> (ortorrómbico), aunque presenta mejores propiedades fisicoquímicas no es adecuado para la elaboración de tabletas; el polimorfo III es una fase metaestable.



Polimorfo I



Polimorfo II

**Figura 2.** Polimorfos del acetaminofén, polimorfo I izquierda y polimorfo II derecha.

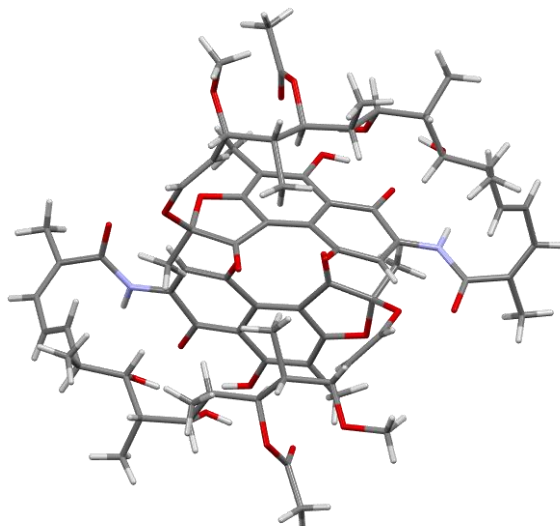
Los polimorfos de un principio activo pueden presentar diferentes propiedades fisicoquímicas y/o farmacocinéticas otorgando características físicas bien definidas en los materiales <sup>[19]</sup>. Estudios recientes han comprobado que compuestos totalmente cristalinos tienden a ser más lipofílicos, hidrofóbicos e insolubles en el sistema del consumidor, lo que conlleva a limitaciones en la biodisponibilidad. Una solución válida para esta problemática es la implementación de formas amorfas o metaestables las cuales poseen solubilidades más altas y tasas de disolución favorables.

Las diferencias que pueden tener los polimorfos de un material van desde la capacidad de formar enlaces entre ellos hasta la orientación en que se encuentran en comparación con otra unidad molecular del mismo compuesto. A principios del siglo XIX la estructura molecular se concebía como puramente topológica o estereoquímica, conceptos que intentaban definir los tipos y la cantidad de átomos que constituyen las moléculas o cristales y la forma en la cual se unen estas especies <sup>[20]</sup>. Para cierto tipo de fármacos, sus polimorfos difieren, principalmente, en el arreglo de las moléculas en el estado sólido, interacciones intermoleculares e intramoleculares, y la presencia de moléculas de agua en sus redes cristalinas, entre otros.

### 4.3. Rifaximina

Las rifamicinas fueron sintetizadas y aisladas en 1959 por *Sensi* y su equipo de investigación como una mezcla de complejos de diversos congéneres de este <sup>[21]</sup>. Los compuestos a base de la rifamicina, farmacóforo mostrado en la **Figura 3**, abarcan un amplio espectro de antibióticos focalizados en patógenos Grampositivos y, en menor medida, bacterias

Gramnegativas. Los diferentes fármacos semisintéticos que utilizan como reactivo primario la rifamicina son: la rifampicina; rifabutina; rifapentina; y la rifaximina, el fármaco de interés para este trabajo de grado.



**Figura 3.** Rifamicina, perteneciente a la familia de las ansamicinas naftalénicas.

La rifaximina es un fármaco antimicrobiano de baja absorción (1% de compuesto si se suministra oralmente, la cual puede aumentar su tiempo de retención agregando micropartículas al fármaco <sup>[22]</sup>) con una alta acción *in vitro* frente a bacterias Grampositivas, Gramnegativas y anaerobias. Los rangos de concentración mínima para que el fármaco inhiba el 90% de los patógenos bacterianos está entre 32 a 64  $\mu\text{g/ml}$  <sup>[23]</sup>. Diferentes estudios cristalográficos <sup>[16]</sup> han confirmado que este principio activo presenta una variedad de polimorfos y grados de hidratación. Estudios *in vitro* han demostrado diferentes tasas de solubilidad para los polimorfos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y, estudios *in vivo* realizados en canes, dilucidaron diferentes patrones farmacocinéticos mostrando una mayor biodisponibilidad sistémica para los polimorfos  $\gamma$  y  $\delta$  <sup>[24]</sup>. En la **Tabla 1** se muestran los parámetros cristalográficos y la cantidad de moléculas de agua para los diferentes polimorfos de la rifaximina, exceptuando el polimorfo

γ el cual presenta una estructura cristalina pobremente definida.

**Tabla 1.** Constantes de celda para los diferentes polimorfos de la rifaximina.

	<i>Rifaximina α</i>	<i>Rifaximina β</i>	<i>Rifaximina δ</i>	<i>Rifaximina ε</i>
# CCDC	886509	886513	886515	-
Formula	$C_{43}H_{52}N_3O_{11}$	$C_{43}H_{57}N_3O_{14}$	$C_{43}H_{55}N_3O_{13}$	$C_{43}H_{53}N_3O_{12}$
Hidratación	0	3	4	1
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$
<i>a</i> (Å)	14.401(4)	13.796(8)	13.7595(1)	13.475(8)0
<i>b</i> (Å)	19.662(4)	19.944(4)	20.2557(1)	20.629(1)
<i>c</i> (Å)	16.153(4)	16.607(6)	16.3472(1)	15.997(7)
β (°)	111.00(3)	92.180(10)	106.706(1)	107.223(1)
Z	4	4	4	4
Volumen (Å <sup>3</sup> )	4268.6(17)	4566.1(19)	4363.8	4247.4(7)

#### 4.4. Química Supramolecular

Actualmente la química supramolecular es denotada aun como una joven disciplina que data de los años 1960, donde se han expuesto diferentes conceptos y sistemas los cuales recuerdan a lo afrontado en los principios de la química convencional donde se ampliaba la perspectiva en términos académicos y científicos. El estado del arte para la química supramolecular empieza en 1810 donde Sir Humphry Davy descubrió el hidrato de cloro, para que posteriormente en 1823, Michael Faraday dilucidara la fórmula de este compuesto. Estudios recientes de investigadores galardonado con el premio nobel tales como el descubrimiento de canales de agua y la caracterización de canales catiónicos y aniónicos, muestran como la química supramolecular es un campo de análisis de interés que está tomando fuerza para resolver inconsistencias estructurales y cristalográficas.

El término de química supramolecular fue propuesto por el ganador del Premio Nobel en 1987, *Jean-Marie Lehn*, el cual trabajó en química molecular y sus ensambles

intermoleculares. La química supramolecular se le conoce coloquialmente como la química después de la molécula, de ahí su nombre. Originalmente la química supramolecular fue concebida en términos de interacciones no covalentes entre un hospedador y una especie receptora <sup>[25]</sup>. La química supramolecular toma inspiración significativa de la naturaleza, debido a que toma como base las interacciones entre pequeñas moléculas y la forma en que estas se unen en ensamblajes moleculares, estas interacciones van desde enlaces de hidrógeno, hasta interacciones hidrofóbicas y electroestáticas <sup>[26]</sup>.

#### **4.4.1. Hidratos**

Una de las particularidades de la molécula de agua es la capacidad de ordenarse sistemáticamente entre sí o con otras moléculas y formar solvatos conocidos principalmente como hidratos. Aproximadamente un tercio de los ingredientes farmacológicamente activos o API son capaces de formar estructuras cristalinas hidratadas. Estos materiales son importantes, como por ejemplo, para conocer y controlar el equilibrio entre el material anhidro y su estructura cristalina hidratada para favorecer la formación del material deseado entre otros.

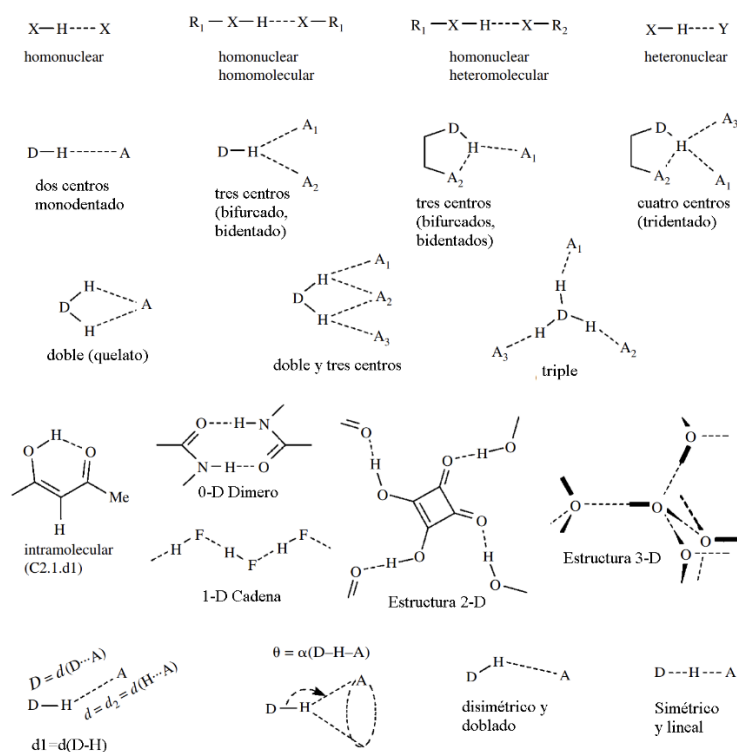
El agua es el tipo de compuesto que mayoritariamente está presente en compuestos orgánicos con propiedades farmacológicas <sup>[27]</sup>. Algunos procesos utilizados para la manufacturación de compuestos farmacológicos utilizan el agua como, por ejemplo: medio de síntesis, purificación, recristalización del material y elaboración de una formulación utilizando métodos húmedos entre otros. La cantidad de moléculas de agua en una estructura cristalina determina en gran parte la estabilidad del fármaco <sup>[28]</sup>, un fármaco anhidro presentará una estabilidad menor debido a que su energía libre de Gibbs es mayor, por lo que, el compuesto hidratado será menos soluble. En compuesto farmacéuticos pueden estar presentes la clase de hidratos conocidos como hidratos de sitio aislados, en el cual los enlaces de hidrógeno que

involucran las moléculas de agua es homomolecular por lo que, las moléculas de agua nunca estarán en contacto con otras moléculas de distinta naturaleza (heteromolecular).

Cada compuesto orgánico reacciona de diferente manera a la formación de hidratos en su arreglo estructural por lo que, una generalización para predecir la adición de hidratos en el cristal no es posible <sup>[29]</sup>, aunque estudios cristalográficos <sup>[30]</sup> han confirmado que ciertos grupos funcionales como el COOH son causales de una afinidad mayor a la formación de estructuras hidratadas.

#### ***4.4.2. Enlace de Hidrógeno.***

El concepto de enlace de hidrógeno abarca una amplia cantidad de investigadores por lo que este término no puede ser atribuido a una sola persona <sup>[31]</sup>, el primero en hablar de este concepto se estima que fue Alfred Werner, que sugirió que las propiedades de las moléculas en sales de amonio pueden ser explicadas asumiendo que el protón “recae” entre la molécula de amoniaco y el anión, lo que llamó como una situación de enlace de segunda valencia. El concepto que se tiene del enlace de hidrógeno actual concibe a este como una relación entre un donador y un receptor que puede combinarse en diferentes maneras siguiendo la terminología tradicional derivada por Jeffrey (1997), o desde un punto de vista diferente, se pueden clasificar como enlaces homonucleares, lo que se refiere a enlaces entre mismas especies, o heteronucleares, entre diferentes especies, y a su vez estos se dividen entre enlaces homomoleculares, definidos como enlaces a una misma molécula o grupo químico ordenado y heteromoleculares, entre diferentes grupos químicos. En la **Figura 4**, se explica las diferentes formas en las que se pueden presentar este tipo de enlaces.



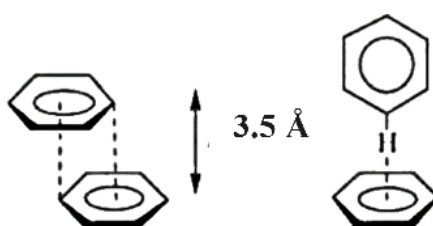
**Figura 4.** Diferentes formas del Enlace de Hidrógeno.

La característica principal para la formación de uno o más enlaces de hidrógeno que hace la diferencia entre otras interacciones donador-aceptor, es la unión por un protón entre el enlace hidrógeno-donador y la interacción hidrógeno-aceptor. En palabras más técnicas el concepto de enlace de Hidrógeno formulado por Pimentel y McClellan <sup>[32]</sup> en 1960 resulta muy llamativo, en su libro titulado *The Hydrogen Bond* definen un enlace entre una especie A y B donde  $[A-H \cdots B]$  existe entre un grupo funcional A-H y un átomo o grupo de átomos de B heteromolecular o homomolecularmente cuando hay evidencia de una formación de enlace por asociación o quelación y hay evidencia que un nuevo enlace A-H a B envuelve específicamente el átomo de hidrógeno ya unido a la especie A.

#### 4.4.3. Interacciones

En general, la química supramolecular comprende las interacciones como efectos de enlace no covalente, siendo un término que abarca un enorme rango de efectos de repulsión y atracción [33].

Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  o conocidas también como interacciones apiladas  $\pi$ - $\pi$ , ocurren entre anillos aromáticos donde la regla principal de la química estructural predomina, una especie rica en electrones se ve favorecida por la interacción frente a otra que posee una pobre densidad electrónica. En un cristal de un determinado compuesto aromático ocurren dos principales interacciones  $\pi$ - $\pi$ , la primera donde dos anillos benzoicos se encuentran de frente, esto es conocido como interacción  $\pi$ - $\pi$  cara-cara, pero también es posible que el anillo aromático, que se encuentre en un hipotético plano, interactúe heteromolecularmente con una especie en un plano perpendicular, esto se conoce como interacción borde-cara, en la **figura 5** se ejemplifica este comportamiento.



**Figura 5.** Tipos de interacciones  $\pi$ - $\pi$ , en la izquierda la interacción  $\pi$ - $\pi$  cara-cara y a la derecha interacción borde-cara.

#### 4.5. Solubilidad en Equilibrio

La solubilidad en equilibrio de un compuesto se define como la máxima cantidad en la que una sustancia puede ser completamente disuelta a una presión y temperatura dada para un solvente definido siendo así un ensayo termodinámicamente válido cuando se cumple el equilibrio entre el sólido y la solución en saturación.

La solubilidad de un determinado compuesto genera indicios fundamentales para el índice de control y la absorción farmacológica como también de su disponibilidad en el sistema <sup>[34]</sup>. Para los fármacos de solubilidad baja en agua, como la rifaximina <sup>[35]</sup>, la disolución en fluidos gastrointestinales es un factor limitante para la presencia *in vivo* después de la ingesta del fármaco, por lo que estos medicamentos tienden a ser considerados como placebo, es decir, su retención no es muy alta en el organismo de ahí su clasificación.

La rifaximina pertenece a la clase de fármaco IV debido a su baja solubilidad en agua, pero diferentes estudios enfocados en solubilidad <sup>[36]</sup> demuestran una alta disolución en solventes orgánicos tales como etanol, dimetilformamida y DMSO.

#### 5.6. Técnicas Analíticas

##### 5.6.1. Espectroscopía Ultravioleta.

La mayoría de los estudios enfocados en solubilidad para compuesto de baja permeabilidad se realizan mediante espectroscopía ultravioleta siendo una de las técnicas espectrofotométricas más eficaces en comparación a diferentes procedimientos para el control

de procesos de disolución. El principio de la técnica <sup>[37]</sup> es la excitación electrónica entre niveles energéticos procedentes de la muestra irradiada con una longitud de onda específica considerando el espectro UV desde los 10 a 400 nm y la luz visible desde los 400 a 800nm.

La ley de Lambert-Beer describe la relación lineal entre la absorbancia del haz de luz y la concentración de las especies irradiadas, esta igualdad se muestra en la **ecuación 1** siendo  $I$  la intensidad de luz después de ser incidida la muestra  $I_0$  es la intensidad antes de irradiar,  $k$  hace referencia a al coeficiente de absorción o absorbancia molar,  $l$  es la longitud de la cámara o la distancia que atraviesa la luz desde el emisor hasta el receptor, y  $c$  la concentración de la sustancia absorbente.

$$I = I_0 e^{-klc} \quad \text{Ecuación 1. Ley de Lambert Beer.}$$

#### **4.6.2. Espectroscopia Infrarroja**

La espectroscopia IR <sup>[38]</sup> mide las vibraciones moleculares asociadas al cambio de momento dipolar en la molécula debido a irradiación de baja intensidad en la muestra. Para el estudio de fármacos (y compuestos orgánicos en general), con capacidad para la formación de hidratos, se utiliza mayormente la región cercana del infrarrojo entre 700 a 2500  $\text{cm}^{-1}$  debido a que intensidades mayores pueden provocar vibraciones de grupo OH procedente de las moléculas de agua. En la región de infrarrojo cercano se presentan las vibraciones por estiramiento de los grupos OH, CH, NH y SH por lo que este estudio es fundamental con esta técnica para la caracterización de compuestos farmacológicos como la rifaximina.

#### ***4.6.3. Ensayos Termoquímicos.***

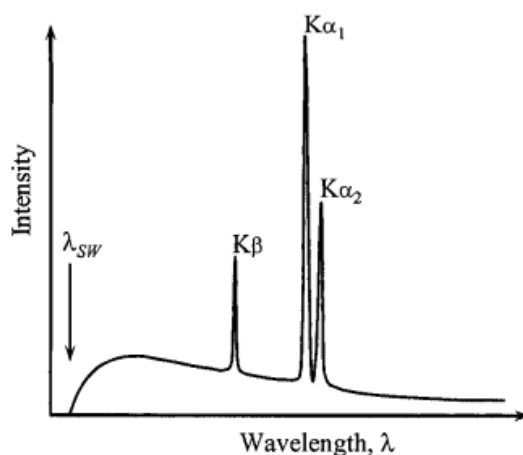
Para una comprensión de la estabilidad térmica de la rifaximina es necesario complementar la investigación con estudios térmicos como calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). La calorimetría diferencial de barrido es el método más extendido para el análisis térmico en el área farmacéutica, el principio básico de este ensayo es el calentamiento de la muestra para así observar la diferencia de energía de los posibles eventos que se puedan presentar en un rango de temperatura y tiempo determinado [39]. Usualmente el rango típico para estudios de calorimetría de barrido es de aproximadamente 120 °C a 600 °C. Estudios en DSC son muy comunes para diferentes ámbitos, desde caracterización de polímeros hasta farmacología.

La información obtenida en cada experimento termogravimétrico (TGA), es una serie de mediciones de pérdida o ganancia de masa, tiempo y temperatura resultantes de cambios químicos y físicos presentes en cada muestra sometida a un calentamiento constante o condiciones térmicas programadas. Este análisis representa un complemento de los resultados obtenidos por diferentes técnicas desde espectroscopia IR, UV-VIS hasta ensayos supramoleculares como redes energéticas o superficies de Hirshfeld.

#### ***4.6.4. Difracción de Rayos X por Polvo (XRPD)***

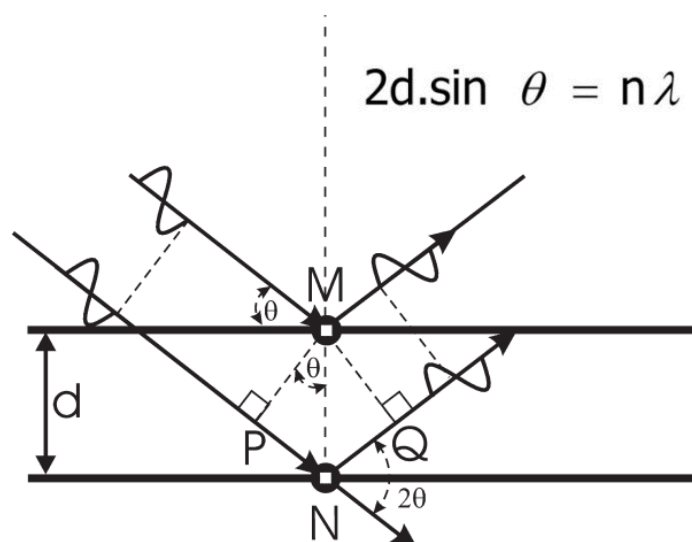
Los rayos X son un tipo de radiación ionizante la cual es emitida por una fuente altamente energizada que comúnmente está constituida de un metal de transición, los metales más comunes van desde el cobre al molibdeno, para que ocurra el fenómeno de difracción es necesario, primeramente, conocer como los rayos X incididos interaccionan con la muestra y

la información que se obtiene de esto. Al emitir rayos X de una fuente es común encontrarse con un espectro energético, de este solamente es importante la radiación  $K\alpha_1$  cuando se habla de difracción, debido a que esta es la más intensa por lo que es la que conforma mayormente las bandas en un patrón de difracción. En la **Figura 6** se muestra el espectro de emisión para un haz de rayos X.



**Figura 6.** Esquema típico para un espectro de emisión de rayos X, que indica la presencia de un ruido de fondo y tres longitudes de onda:  $K\alpha_1$ ,  $K\alpha_2$ , y  $K\beta$ . La flecha vertical muestra la longitud de onda más corta posible <sup>[40]</sup>.

Cuando un haz es incidido sobre una superficie plana ocurre el fenómeno de difracción, este mismo puede ser descrito por la ecuación de Bragg, esta fue propuesta por W.L. Bragg en 1912 y dictamina el principio para la difracción de rayos X en términos de la reflexión del haz por las redes que se forman internamente en la muestra <sup>[41]</sup>. Los planos de red son planos cristalográficos caracterizados por un triplete que recibe el nombre de índices de Miller, los cuales se denotan por las letras hkl. En realidad, los rayos X no son reflejados, pero si son dispersados por los enlaces electrónicos de los átomos. De ahí se obtiene la famosa ecuación de Bragg, el principio básico de esta se muestra en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Ilustración de la geometría usada para la derivación de la ley de Bragg.

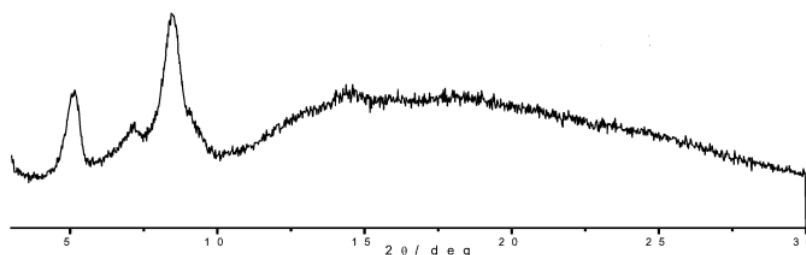
Utilizando el vector obtenido, la longitud de onda emitida por la fuente, las constantes de celda y los valores recíprocos de hkl los cuales se muestra en la **Tabla 2**, es posible derivar una expresión que relacione la ley de Bragg con un ángulo  $2\theta$  para la reflexión de cada plano cristalográfico [42].

**Tabla 2.** Relaciones entre los espacios directos y recíprocos

<i>Sistema</i>	$a^*$	$b^*$	$c^*$
<i>Ortogonal</i>	$a^* = \frac{1}{a}$	$b^* = \frac{1}{b}$	$c^* = \frac{1}{c}$
<i>Hexagonal</i>	$a^* = \frac{1}{a \text{ sen}(\gamma)}$	$b^* = \frac{1}{b \text{ sen}(\gamma)}$	$c^* = \frac{1}{c}$
<i>Monoclínico</i>	$a^* = \frac{1}{a \text{ sen}(\beta)}$	$b^* = \frac{1}{b}$	$c^* = \frac{1}{c \text{ sen}(\beta)}$
<i>Triclínico</i>	$a^* = \frac{bc \text{ sen}(\alpha)}{V}$	$b^* = \frac{ac \text{ sen}(\beta)}{V}$	$c^* = \frac{ab \text{ sen}(\gamma)}{V}$

Con esta información podemos obtener diferentes patrones de polvo ya sea para moléculas altamente ordenadas como para compuestos que exponen un comportamiento más amorfo o policristales.

La implementación de XRPD es primordial por lo que este estudio otorga un diagrama molecular inicial del arreglo cristalino presente en el compuesto sin la necesidad de cristalizar el material. Al intentar cristalizar un compuesto orgánico complejo como la rifaximina, es posible obtener un polimorfo no esperado de este, debido a que este tipo de fármacos presentan un comportamiento cristalino metaestable. En la **Figura 8** se muestra un patrón de polvo para un polimorfo de la rifaximina.



**Figura 8.** Patrón de difracción de rayos X polvo (XRPD) del polimorfo  $\gamma$  de la rifaximina.

#### ***4.6.5. Difracción de Rayos X por Monocristal***

El fenómeno de difracción puede ocurrir en cualquier tipo de muestra, aunque se debe asegurar que la interferencia entre las ondas que ocurren como resultado de la interacción entre los electrones presentes en los átomos de una superficie y los rayos emitidos (sin ningún cambio energético). Si se favorece esto la difracción puede ocurrir en un periodo de tiempo específico dispersando los diferentes planos cristalográficos separados por una distancia similar a la longitud de onda similar a la radiación emitida, de aproximadamente 100 pm, como ocurre en

cristales. En la **Figura 9** se muestra un ejemplo de dispersión de luz para un monocristal.



**Figura 9.** Proyección estereográfica para un cristal octaédrico.

Utilizando la ley de Bragg es posible obtener una imagen de las posiciones en las cuales el haz de rayos X fue dispersado o, en otras palabras, lugares presentes en el compuesto cristalino con un orden de arreglo atómico que ocasiona una configuración de difracción máxima, a esto se le conoce como patrón de difracción, donde cada máximo o reflexión, representa un ángulo específico que conlleva una lugar de separación de planos atómicos  $d$ , en el cristal, por lo que diferentes arreglos estructurales conllevan a diferentes patrones de difracción únicos para cada especie variando una serie de constantes presentes en la forma simétrica más reducida para la especie conocida también como celda unidad. Cuando se requiere caracterizar compuestos o arreglos estructurales es usual la implementación de difracción de rayos X a un cristal singular descomponiendo su patrón de difracción, obteniendo diferentes valores en los ejes de la celda unidad ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) y en la disposición espacial de los ángulos para este arreglo ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) obteniendo así una imagen única para este compuesto <sup>[43]</sup>, la cual otorga una comparativa clara de las diferentes reflexiones ocasionadas por la incidencia de una serie de haces de rayos X al material en cuestión.

#### 4.7. Redes de Energía y Superficies de Hirshfeld.

En los últimos años, la química orgánica del estado sólido ha tenido un gran impacto debido a la relación entre las interacciones que se presentan en la estructura cristalina con las propiedades físicas de un material potencialmente activo, para esto, el estudio de redes de energía ofrece una perspectiva innovadora del compuesto a caracterizar, siendo un ensayo indispensable al momento de comparar estructuras similares entre sí, pero con ligeras diferencias en sus arreglos moleculares, como es el caso de los polimorfos de un compuesto orgánico. Las redes de energías permiten visualizar la arquitectura molecular de estructuras cristalinas <sup>[44]</sup>. Estudios complementarios como las interacciones representadas en las superficies de Hirshfeld permiten la visualización del comportamiento intermolecular de los compuestos en diferentes entornos <sup>[45]</sup>. Haciendo uso de refinamientos en el volumen de cristal, optimización del espacio intercristalino, en específico ligeros vacíos intermoleculares, es posible reflejar el comportamiento del potencial fármaco a desarrollar. En esencia, las superficies de Hirshfeld se diferencian de otros sistemas de representación cristalina por la cuantificación ofrecida de estos en sus tamaños y formas moleculares, lo que se define comúnmente como esféricos fusionados de Van de Waals <sup>[46]</sup>.

La globularidad y la asfericidad de una molécula son términos que emergen con el estudio de las superficies de Hirshfeld, la globularidad <sup>[47]</sup> (G) es una medida del grado en que el área superficial difiere de una forma esférica ideal de igual volumen, por lo que, entre menor sea el valor de globularidad más complejo y estructurado será el compuesto. La asfericidad <sup>[48]</sup> ( $\Omega$ ) es una medida de la anisotropía molecular y está en el rango de 0 a 1, respectivamente de menos a más comprimida la estructura, haciendo referencia a los momentos de inercia de la molécula. La combinación de la globularidad y la asfericidad otorgan información sobre la

figura molecular de las especies en el cristal. Las superficies de Hirshfeld garantizan que cualquier espacio en el cristal, desde intersecciones moleculares o vacancias por solventes indefinidos, sean visualizados en el diagrama superficial <sup>[49]</sup>, esto resulta de gran utilidad para resolver diferencias sutiles debido a la omisión por desorden molecular del solvente en estructuras con características similares, como es el caso de los polimorfos.

Las superficies de Hirshfeld ofrecen una serie de información que se resume en la **tabla 3**. El índice de forma es la propiedad más útil en la que se grafican huecos complementarios o también conocidos como vacíos electrónicos, en color rojo, y las abolladuras o espacios con gran densidad electrónica, en color azul. La curvatura es una función de la raíz cuadrada de la estructura superficial donde se ven largas regiones de color verde, lo que significa un ensanchamiento relativo, separado por bordes de color azul oscuro indicando una curvatura eficiente en la molécula. La combinación de las distancias externas e internas más cercanas al núcleo desde la superficie de Hirshfeld otorgan otro tipo de gráfico conocido como esquema por distancias de contacto normalizadas o “dnorm”, el cual usa la combinación de colores rojo, blanco y azul para distinguirse de otros diagramas superficiales, cuando los contactos o interacciones son menores que la separación de Van de Waals o “vdW” se denota un área en color rojo mientras que en un contacto mayor a este valor mostrará una superficie de color azul.

**Tabla 3.** Resumen de diferentes funciones de distancia y curvatura graficadas por Superficies de Hirshfeld <sup>[50]</sup>, donde  $k_1$  y  $k_2$  son las curvaturas principales y  $r^{vdW}$  se refiere al radio atómico de Van de Waals para cada especie (interna o externa).

<i>Función</i>	<i>Símbolo y Definición</i>	<i>Rango cartográfico</i>
<i>Distancia desde un punto en la superficie hacia el núcleo más cercano fuera de la superficie</i>	$d_e$	<i>Rojo para distancias cortas y entre verde a azul para largas distancias</i>
<i>Distancia desde un punto en la superficie hacia el núcleo más cercano dentro de la superficie</i>	$d_i$	<i>Rojo para distancias cortas y entre verde a azul para largas distancias</i>
<i>Índice de forma, S, medida del tipo de forma molecular expresada</i>	$S = \frac{2}{\pi} \tan^{-1} \left( \frac{k_1 + k_2}{k_1 - k_2} \right)$	<i>-1.0 para formas cóncavas, 0 para la superficie mínima y +1.0 para convexas</i>
<i>Curvatura, C, medida de la cantidad de la forma molecular</i>	$C = \frac{2}{\pi} \ln \sqrt{k_1^2 + k_2^2 / 2}$	<i>-4.0 para superficies planas 0.0 para unidades esféricas y +0.4 para singularidades</i>
<i>Distancias de contacto normalizada</i>	$d_{norm} = \frac{d_i - r_i^{vdW}}{r_i^{vdW}} + \frac{d_e - r_e^{vdW}}{r_e^{vdW}}$	<i>Rojo para distancias menores que la suma del radio vdW, y entre blanco y azul para distancias mayores al radio vdW</i>

Otra forma de representar las superficies de Hirshfeld son los gráficos de huellas dactilares los cuales otorgan una gran información inmediata debido a que su representación se da en dos dimensiones, muy útil cuando se visualiza en papel impreso o en un monitor, esta gráfica dactilar se crea a partir de la unión de las distancias internas y externas más cercanas hacia el núcleo que parten desde la superficie de Hirshfeld que esencialmente formarían un pixel por cada coordenada atómica superficial, yendo desde el color azul, lo que representaría puntos bajos o baja presencia, hasta verde a rojo, representando una gran cantidad de puntos. Este diagrama dactilar es una herramienta única para la diferenciación de polimorfos de un determinado compuesto <sup>[51]</sup>.

## 5. Objetivo General

Caracterizar un posible polimorfo de rifaximina y establecer una comparación supramolecular con las formas polimórficas alfa y beta.

## 6. Objetivos Específicos.

1. Comparar la solubilidad en equilibrio del material con los polimorfos  $\alpha$  y  $\beta$ .
2. Analizar por medio de técnicas vibracionales y termoquímicas el nuevo polimorfo de la rifaximina.
3. Resolver el arreglo cristalino del nuevo polimorfo de rifaximina haciendo uso de programas especializados en técnicas estructurales.
4. Comparar estructural y supramolecularmente el nuevo polimorfo de rifaximina contra las estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  reportadas en la literatura.

## 7. Metodología.

### *7.1. Solubilidad Mediante Espectroscopía UV VIS*

Para el análisis de solubilidad por Espectroscopía UV-VIS, se registró la absorción de la muestra y se determinó la solubilidad en diferentes solventes mediante el uso de la Ley de Lambert-Beer. La preparación de las diferentes muestras se realizó utilizando una disolución 1/100 como punto máximo disminuyendo su concentración gradualmente, se dejó sedimentar la muestra por 24 horas y luego se separó por decantación, se tomó de 3 a 6 alícuotas de la solución en saturación y se midió la absorción en un espectrofotómetro EVOLUTION 220 de ThermoScientific, esto hasta que se formó una curva favorable para su comparación.

## **7.2. Análisis Mediante Técnicas Vibracionales y Termogravimétricas.**

### ***7.2.1. Obtención del Material***

La materia prima de rifaximina cristalina fue proporcionada por una empresa farmacéutica nacional, el material fue estudiado sin someterlo a recristalización o algún otro proceso químico.

### ***7.2.2. Obtención de Espectros Infrarrojo***

Mediante espectrometría IR se determinó los posibles cambios para el momento dipolar de los diferentes grupos funcionales, relacionando así los posibles cambios estructurales presentes en el material. Los espectros se registraron con el método de reflexión total atenuada (ATR) en el espectrómetro ALPHA II FT IR, de los grupos de investigación: Grupo de Investigación en Compuestos Orgánicos de Interés Medicinal (CODEIM) y el Grupo de Investigación en Química Estructural (GIQUE).

### ***7.2.3 Análisis Térmico Mediante Termogravimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido***

Se determinó la estequiometría de los hidratos formados, las transiciones de fase y el punto de fusión por medio del análisis de pérdidas de masa en los termogramas obtenidos y la diferencia de calor que fue emitida por el polimorfo de rifaximina. Los análisis térmicos se realizaron en el equipo TA Instrument Q10 de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

### **7.3. Caracterización Estructural del Nuevo Polimorfo Mediante Técnicas de Difracción de Rayos X**

#### ***7.3.1. Registro de Datos por Difracción de Rayos X de Polvo.***

La muestra fue sometida a molturación con parafina en un mortero de ágata para el montaje por medio de llenado frontal en un portamuestras de polimetilmetacrilato (PMMA). El patrón de polvo se midió utilizando el equipo Bruker D8 ADVANCE con geometría Da Vinci ubicado en el laboratorio de Rayos X del Parque Tecnológico Guatiguara-UIS. Los patrones fueron registrados a temperatura ambiente usando radiación  $K\alpha_1$   $\lambda=1,5406\text{\AA}$ , en el rango de  $4^\circ$  a  $70,0^\circ$  ( $2\theta$ ) con un paso de  $0,02035^\circ$  ( $2\theta$ ) a  $0,6\text{s/paso}$ , con condiciones de voltaje  $40\text{ kV}$  y amperaje de  $30\text{mA}$ . El difractómetro cuenta con un detector LynxEye con una apertura de  $2,93^\circ$ , una rejilla divergente de  $0,6\text{ mm}$ , dos ventanas soller axiales, una primaria y otra secundaria de  $2,5^\circ$  cada una y un filtro de níquel.

#### ***7.3.2. Indexado de Reflexiones, Cálculo de Grupo Espacial y Descomposición del Patrón.***

Se realizó el estudio comparativo de las reflexiones presentes en el patrón de difracción de polvo haciendo uso, en primera estancia del programa PREDICT (Blanton, 2019) que utiliza el algoritmo DICVOL14, donde se obtuvo información acerca de las constantes y ángulos de celda del polimorfo, como también del volumen que ocupa el arreglo cristalino. Con el programa EXPO2014 (Altomare et al, 2013) se resolvió el grupo espacial haciendo uso de los valores obtenidos anteriormente para las constantes de celda, volumen y posible estructura molecular en el cristal. La descomposición del patrón de difracción se realizó mediante el método de Rietveld obteniendo valores favorables para el material, hasta obtener una estructura

cristalina acorde.

### ***7.3.3. Resolución de la Estructura Mediante Difracción de rayos X de Monocristal.***

Los cristales fueron inspeccionados en un microscopio de luz polarizada y se seleccionó las especies con mejor calidad para el registro de datos de difracción por monocristal. Este registro de datos se llevó a cabo a temperatura ambiente usando el difractor Rigaku XTA Lab P200-DS, ubicado en el Laboratorio de Rayos X del Parque Tecnológico Guatiguará-UIS. El equipo trabaja con un tubo de Cobre con radiación CuK $\alpha$   $\lambda=1,5418$  Å y un monocromador de grafito. Las imágenes se registraron utilizando un goniómetro Euleriano de 3 círculos equipado con un detector de área Rigaku Pilatus 200K. El programa CrysAlisPro (Baker, 2013) fue utilizado para la reducción e integración de los datos obtenidos resolviendo la estructura por métodos directos utilizando el programa ShelXT (Sheldrick, 2015) y refinando la estructura cristalina por el método de mínimos cuadrados en el programa ShelXL (Sheldrick, 2008).

### **7.4. Comparación Supramolecular con los Polimorfos Alfa y Beta**

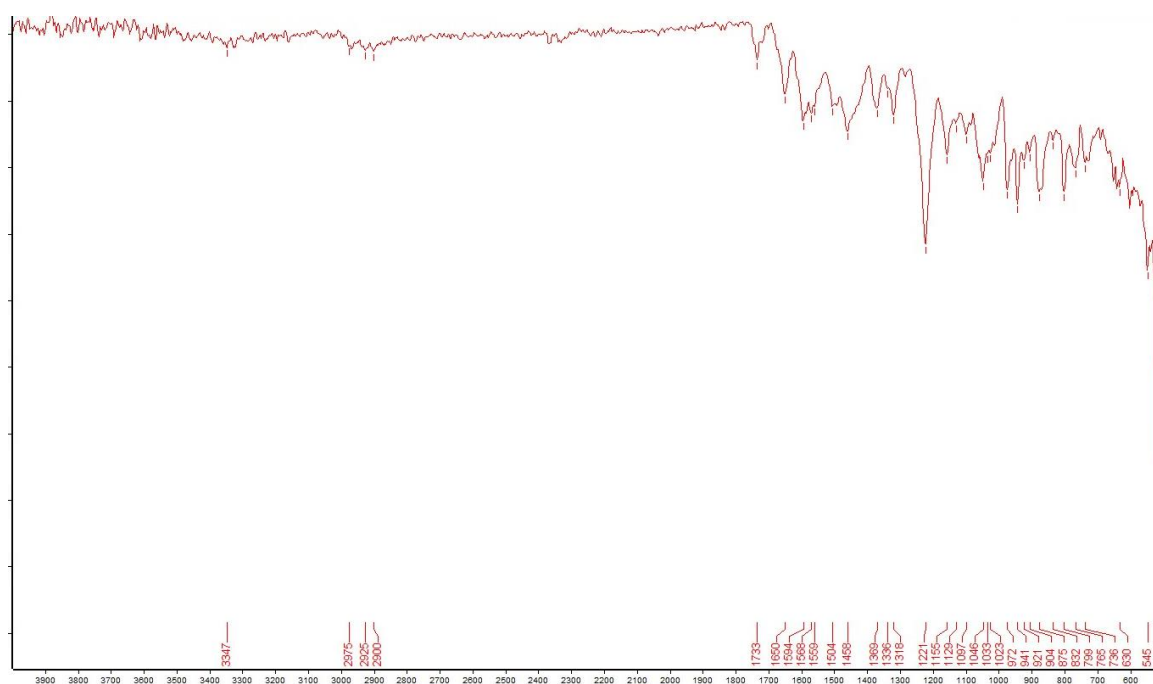
Después de la resolución de la estructura, se utilizó el programa CrystalExplorer (Spackman, 2021) para representar las diferentes interacciones presentes en los empaquetamientos cristalinos, obteniendo las figuras del índice de forma, curvatura, esquemas por distancias de contacto normalizado, y gráficos de huellas dactilares; representando las diferentes fuerzas que intervienen en la estructura. Usando el programa CrystalExplorer se representó las redes de energía en el material, lo cual representó una herramienta fundamental para la visualización de las interacciones energéticas por medio de diagramas cilíndricos donde

se representó la fuerza de cada interacción en el cristal.

## 8. Resultados

### 8.1. Caracterización por espectroscopia ATR-IR

El material presenta el espectro ATR-IR mostrado en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Espectro IR para el nuevo polimorfo de Rifaximina.

En este espectro se pueden destacar las bandas en  $1221\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión del grupo fenol, en  $941\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a flexión en el plano del grupo C-H aromático y en el área comprendida desde  $1650\text{ cm}^{-1}$  hasta  $1550\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión nitrógeno hidrogeno de la amina secundaria de la rifaximina, también en el área desde  $3500$  a  $3100\text{ cm}^{-1}$  donde se suelen dar sobretonos de los grupos OH característicos de la molécula de rifaximina, también es posible observar acentuaciones pequeñas como la mostrada

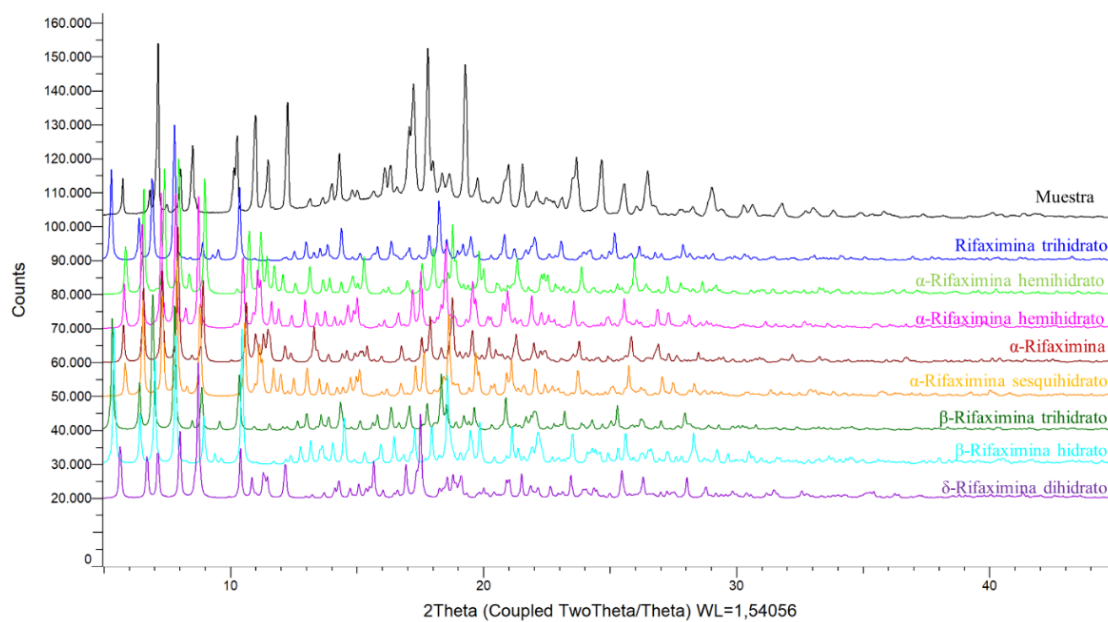
en  $1733\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo éster. En la **tabla 4** se muestran las principales bandas con su respectivo movimiento resonante.

**Tabla 4.** Interpretación del espectro ATR-IR para la rifaximina.

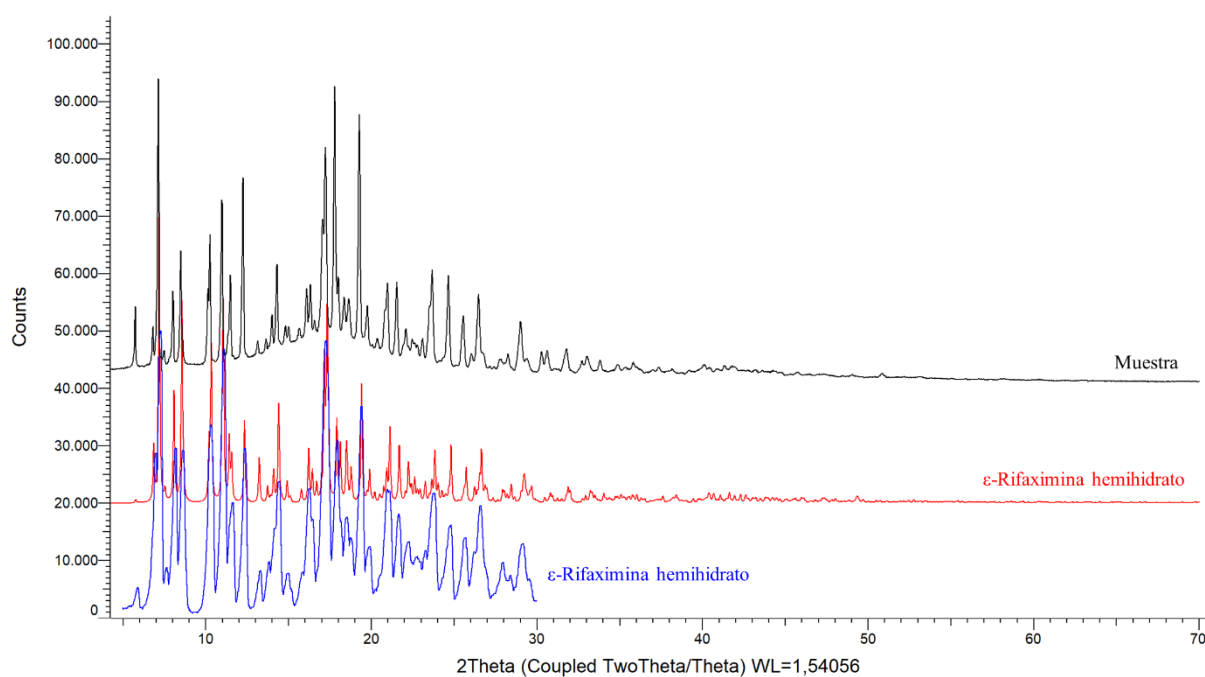
<i>Modo vibracional</i>	<i>Frecuencia en espectro (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</i>	<i>Frecuencia esperada (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</i>
<i>OH, flexión fuera del plano</i>	545	720-590
<i>C-H aromático, flexión fuera del plano</i>	875	900-670
<i>C-H aromático, flexión dentro del plano</i>	941	1225-950
<i>C-O alcohol primario, estrechamiento</i>	1046	1050
<i>C-O-C éter, ensanchamiento asimétrico</i>	1097	1150-1050
<i>C-N amina, ensanchamiento</i>	1155	1190-1130
<i>C-O fenol, flexión</i>	1336-1221	1410-1310; 1200
<i>C-N amina terciaria, ensanchamiento</i>	1318	1360-1310
<i>C=C aromático, ensanchamiento</i>	1594	1600-1500
<i>N-H amina secundaria, flexión</i>	1650	1650-1550
<i>C-O éster</i>	1733	1725-1705
<i>C-H <math>sp^3</math>, ensanchamiento</i>	2900	3000-2800
<i>C-H grupo vinilo fuera del anillo</i>	2975	3100-3000
<i>OH hidroxilo, tensión</i>	3347	3500-3100
<i>OH agua, flexión</i>	-	3600-3200; 600-300

## 8.2. Análisis por Difracción de Rayos X de Polvo

La comparación del patrón de difracción de polvo de la muestra con los patrones calculados a partir de los datos de monocristal reportados del base de datos CSD (**Figura 11**), no se encontró coincidencia en las posiciones de los máximos de difracción, por lo tanto, se puede descartar la presencia de algunas de estas fases en la muestra. Por otro lado, al comparar el patrón de polvo registrado con el patrón calculado de la forma  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato determinada por datos de polvo de sincrotrón en el artículo de Braga et. Al <sup>[23]</sup> (color rojo, **figura 12**) y el reportado para el polimorfo  $\epsilon$  (Color azul, **Figura 12**), se encontró que estos son similares.



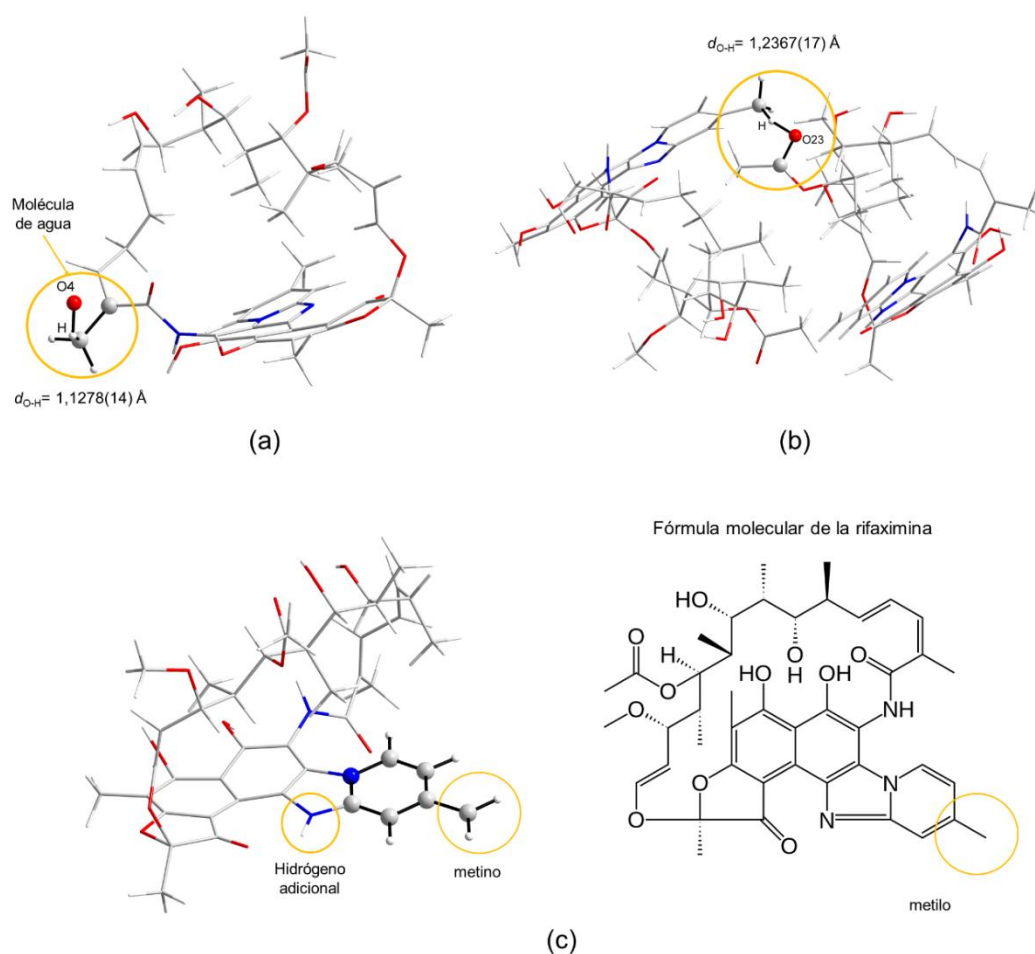
**Figura 11.** Patrón de difracción de la muestra comparados con los reportados en la base de datos CSD.



**Figura 12.** Patrón de difracción de la muestra comparado con el patrón calculado de la forma  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato determinada por datos de polvo de sincrotrón en el artículo de Braga et. Al <sup>[23]</sup> (color rojo) y el reportado para el polimorfo  $\epsilon$ .

El análisis de la estructura determinada por Braga y colaboradores usando datos de sincrotrón, revelan algunas inconsistencias. En el arreglo cristalino del nuevo polimorfo de  $\epsilon$ -rifaximina se observó una serie de errores estructurales tales como:

- a) La molécula de agua (O14, **Figura 13a**), presenta un contacto corto con el hidrógeno del metilo del carbono  $\alpha$  de la amida, generando la formación de un enlace formal;
- b) El carbonilo del metil éster también presenta un enlace hidrógeno-oxígeno irregular, debido a un contacto corto como se ilustra en la **Figura 13b**.
- c) En el fragmento de pirido-benzimidazol, la estructura reportada presenta un hidrógeno adicional en uno de los átomos de nitrógeno y un metino terminal cuando debería corresponder a un grupo metilo (ver **Figura 13c**).



**Figura 13.** Inconsistencias estructurales en el polimorfo de  $\epsilon$ -rifaximina reportado en el artículo de Braga et. al.

Dado que la estructura presenta algunos errores en la determinación, y en vista de la importancia de la adecuada caracterización estructural de los principios farmacéuticos, se llevó a cabo la re-determinación de la estructura de la forma  $\varepsilon$ -rifaximina hemihidrato.

### 8.3. Indexado

El indexado del patrón experimental se llevó a cabo usando el programa DICVOL mediante la interfaz gráfica PreDICT. El indexado de un total de 56 picos de difracción sugiere que el material cristaliza en un arreglo cristalino de monoclinico con constantes de celda  $a=16,094(7)$  Å,  $b= 20,86(2)$  Å,  $c=13,561(6)$  Å,  $\beta= 107,07(4)^\circ$  y  $V= 4353(5)$  Å<sup>3</sup>, con figura de méritos asociada de  $M_{(20)}= 10,3$  y  $F_{(20)}= 30,9$  (0.0141, 46).

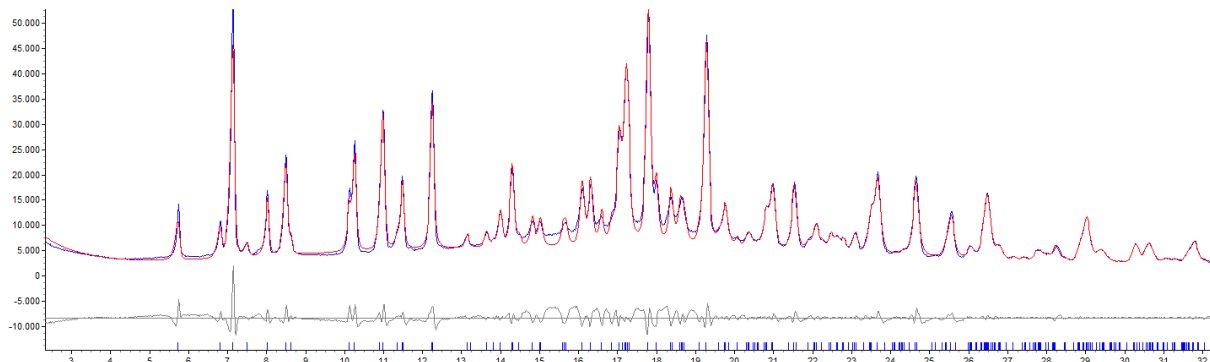
### 8.4. Determinación del grupo espacial

La determinación del grupo espacial del polimorfo de rifaximina se realizó usando el programa EXPO2014 a través del análisis de las ausencias sistemáticas para el cálculo de una serie de grupos espaciales adecuados para el diseño molecular en cuestión. El grupo espacial seleccionado fue el  $P2_1$  (4) para el sistema monoclinico.

### 8.5. Descomposición del Patrón de Difracción (WPPD)

Se realizó el ajuste punto a punto del patrón de difracción mediante el programa TOPAS con los parámetros obtenidos del proceso de indexado y el grupo espacial determinado. En la **figura 14** se observa el resultado del ajuste, en color azul se observa el patrón experimental, en color rojo el patrón calculado y en gris la diferencia entre ambos patrones. Se puede observar

que todos los máximos de difracción registrados están contenidos en el patrón calculado, indicando que la celda obtenida en el indexado corresponde a la estructura del material.



**Figura 14.** Descomposición del patrón de polvo completo para la rifaximina.

Adicionalmente, los valores de los factores de confiabilidad mostrados en la **tabla 5** se encuentran en los rangos internacionalmente aceptados corroborando que la celda determinada es la que mejor representación de la estructura del polimorfo.

**Tabla 5.** Valores obtenidos para la descomposición del patrón polvo completo.

<i>Factor de confiabilidad</i>	<i>Valor obtenido</i>	<i>Valor aceptado</i>
<i>Residual de perfil esperado (R<sub>exp</sub>)</i>	0.88	-
<i>Residual de perfil ponderado (R<sub>wp</sub>)</i>	4.22 %	menor 10 %
<i>Residual de perfil (R<sub>p</sub>)</i>	2.81 %	-
<i>Bondad de ajuste (GOF)</i>	4.80	Cercano a 1

## 8.6. Resolución y análisis estructural

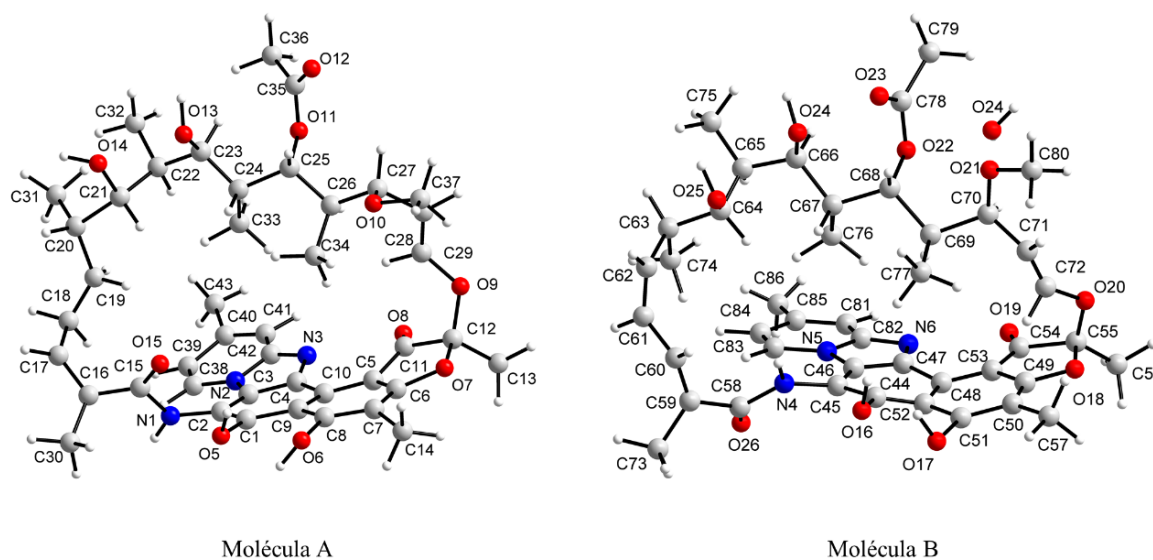
La estructura del polimorfo  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato se determinó utilizando el método de “recocido simulado” mediante el programa EXPO2014. Como resultado se obtuvo una estructura con función de costo de “12,183” lo cual indica que la estructura obtenida es una aproximación adecuada del polimorfo en estudio. Se realizaron 12 ensayos de determinación estructural de 10 corridas cada uno con un tiempo promedio de 76 horas por corrida. En el primer ensayo se modeló sin restricciones geométricas mientras que en los otros se llevaron a cabo con restricciones de ángulos de torsión, ángulos de enlaces, “antichoque” (distancia mínima entre dos moléculas) y orientación preferencial. El mejor resultado corresponde a la estructura determinada haciendo restricción de los ángulos de torsión de los grupos metil éster y metoxilos, orientación preferencial del plano 001 y antichoque: H-H, H-O, H-C, O-O y C-O.

El refinamiento de la estructura se llevó a cabo mediante el método de Rietveld utilizando el programa TOPAS. Los parámetros de confiabilidad mostrados en la **tabla 6** sugieren que la estructura determinada es la más adecuada para el material.

**Tabla 6.** Parámetros de confiabilidad del refinamiento de la estructura  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato determinada.

<i>Factor de confiabilidad</i>	<i>Valor obtenido</i>	<i>Valor aceptado</i>
<i>Residual de perfil esperado (R<sub>exp</sub>)</i>	1.08	-
<i>Residual de perfil ponderado (R<sub>wp</sub>)</i>	9.34 %	menor 10 %
<i>Residual de perfil (R<sub>p</sub>)</i>	7.07 %	-
<i>Bondad de ajuste (GOF)</i>	8.63	Cercano a 1

La unidad asimétrica de la  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato consta de dos moléculas cristalográficamente independientes de rifaximina (molécula 1 y 2) y una molécula de agua como se muestra en la **Figura 15**; los errores observados en la estructura determinada por Braga y colaboradores no se observan en la determinación en este estudio. La estructura cristalina se encuentra gobernada por enlaces de hidrógenos (**Tabla 7**) e interacción  $H\cdots\pi$ . En el empaquetamiento están presentes 8 enlaces de hidrógenos intramoleculares mostrados en la **Figura 16**.



**Figura 15.** Unidad asimétrica de la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.

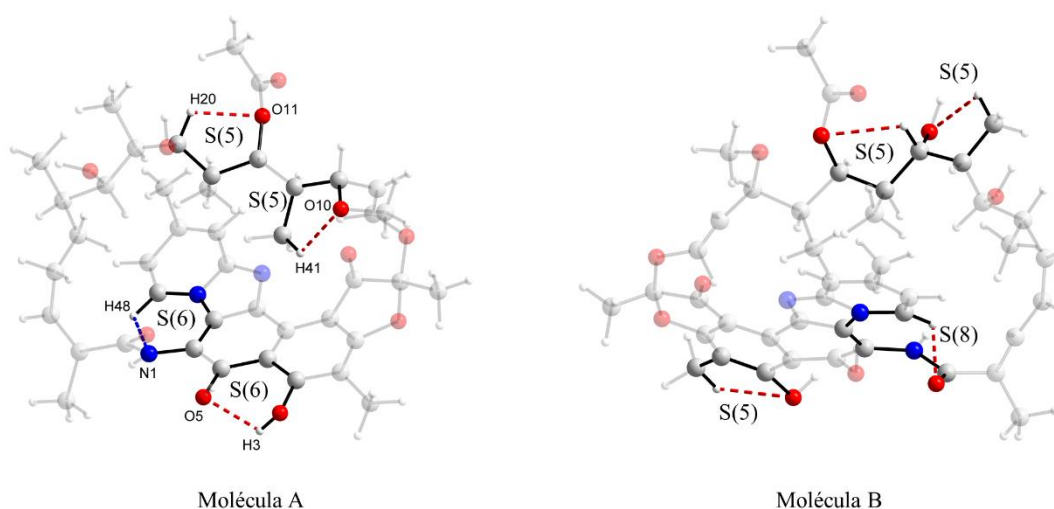
**Tabla 7.** Enlaces de hidrógenos presentes en la estructura de la  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.

	D-H $\cdots$ A	D-H (Å)	H $\cdots$ A (Å)	D $\cdots$ A (Å)	D-H $\cdots$ A ( $^{\circ}$ )
Intramoleculares	O6-H3 $\cdots$ O5	1.00	2.07	2.5941	110
	C23-H20 $\cdots$ O11	1.10	2.25	2.8361	111
	C34-H41 $\cdots$ O10	1.10	2.16	2.7285	109
	C38-H48 $\cdots$ N1	1.10	2.39	3.0263	116
	C57-H65 $\cdots$ O17	1.10	2.52	3.0765	110
	C66-H72 $\cdots$ O22	1.10	2.59	2.9934	101
	C75-H85 $\cdots$ O24	1.10	2.46	2.8928	102
	C83-H101 $\cdots$ O26	1.10	1.85	2.5794	120

Continuación Tabla 7.

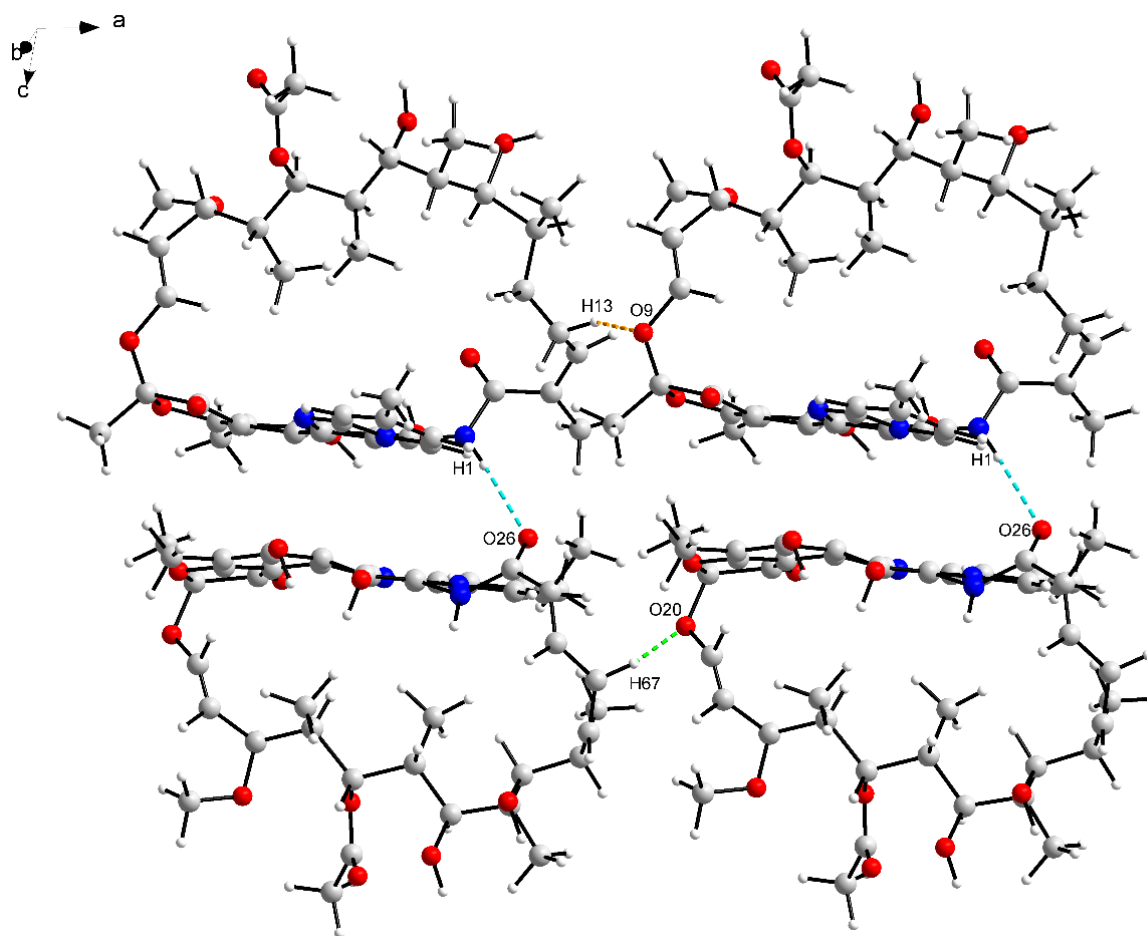
	D-H...A	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)
Intermoleculares	N1-H1...O26	1.02	2.50	3.5202	177
	O13-H4...O25	1.00	1.88	2.5373	120
	C18-H13...O9	1.10	2.12	3.0953	147
	C43-H43C...O23	0.97	1.93	2.8328	153
	C36-H44...O20	1.10	2.14	2.8972	124
	C56-H61...O7	1.10	2.59	3.6031	153
	C61-H67...O20	1.10	1.72	2.8065	169
	C73-H81...O18	1.10	2.22	3.0542	131
	C86-H86B...O12	0.97	2.39	3.2774	152
	C86-H86C...O21	0.97	2.43	2.8286	104
	C79-H96...O24	1.10	2.14	2.7528	113
	C84-H102...O12	1.10	2.38	3.3422	145

Los enlaces de hidrógenos intermoleculares más frecuentes son los descritos por el símbolo grafo S(5) seguido del S(6).



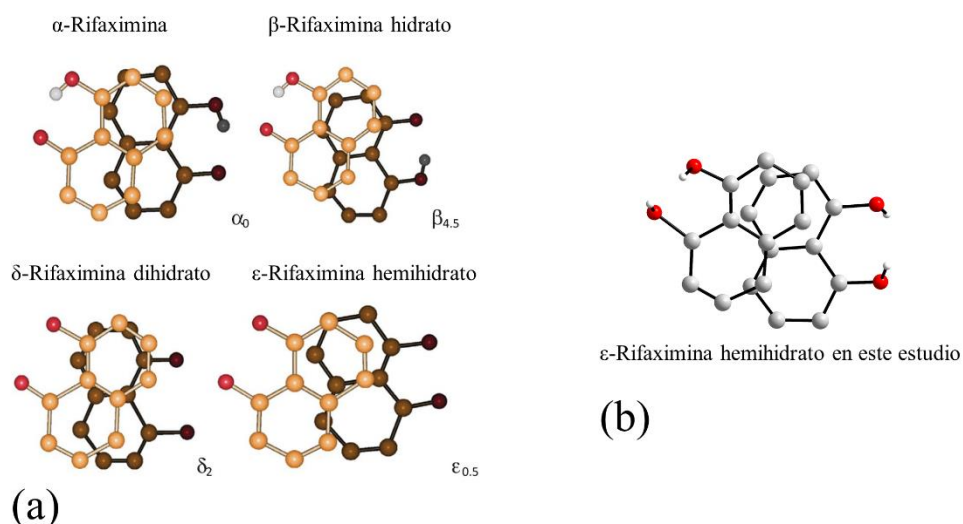
**Figura 16.** Enlaces de hidrógenos intramoleculares presentes en la  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.

Las moléculas empaquetan en forma de dímeros de moléculas cristalográficamente independientes conectadas por el fuerte enlace de hidrógeno N1-H1...O26 (**Figura 17**). Este contacto origina que los anillos estén orientados con la geometría “cara a cara desplazada” como se observa en la mayoría de los polimorfos de la rifaximina.



**Figura 17.** Arreglo estructural de los dímeros de moléculas de rifaximina.

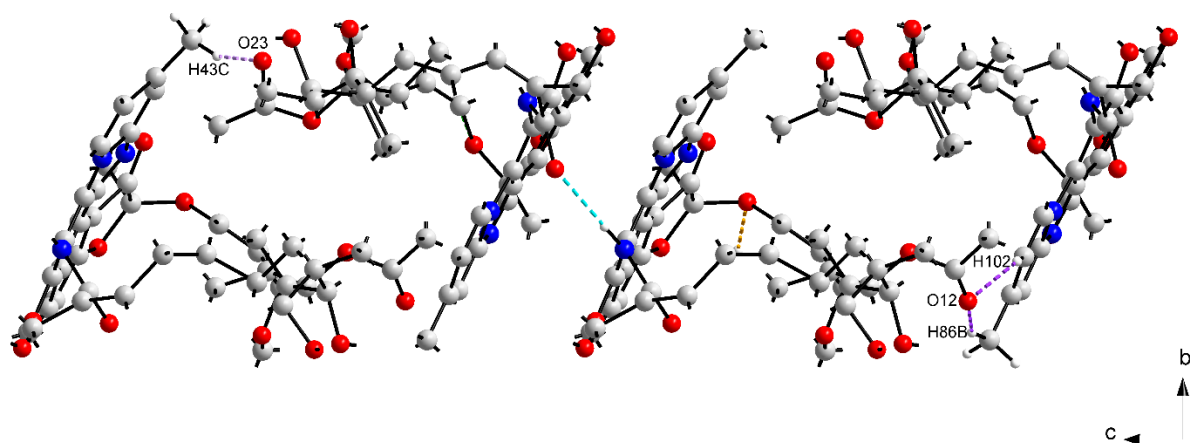
La geometría cara a cara desplazada observada en los anillos de seis miembros presenta ligeras diferencias comparada con la disposición espacial mostrada para esta forma cristalina en el artículo de Braga y colaboradores (**Figura 18**). Este resultado refleja que la estructura determinada en este estudio posee algunas diferencias que representan un mejor modelo estructural para el polimorfo  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.



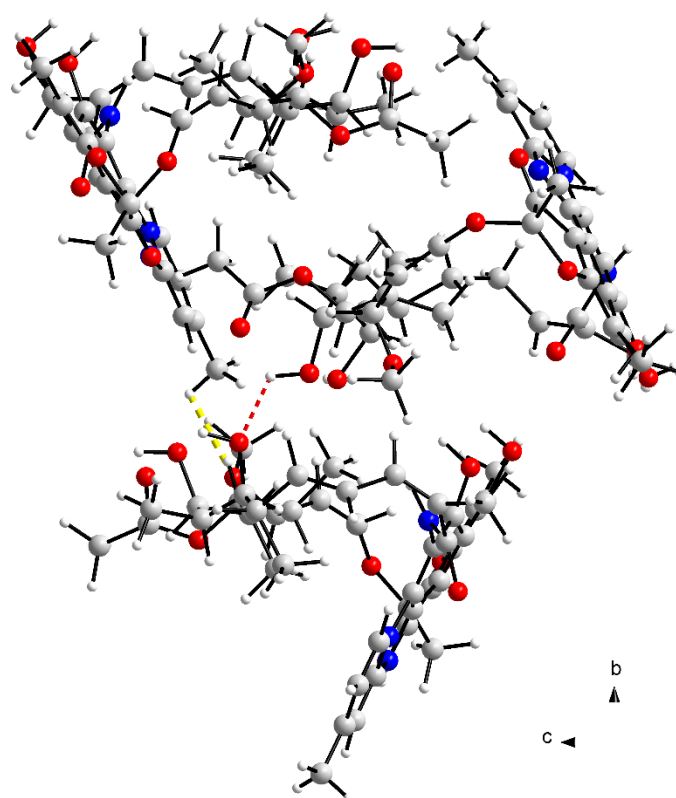
**Figura 18.** (a) Orientaciones espaciales de los anillos de 6-miembros en los polimorfos reportados por Braga y colaboradores y, (b) de la estructura determinada en este estudio.

Los dímeros están conectados entre sí a lo largo del eje  $a$  por los enlaces de hidrógenos no convencionales  $C18-H13 \cdots O9$  y  $C61-H67 \cdots O20$  generando una especie de red bidimensional que se extiende por el plano  $ac$  de la celda (ver **figura 17**). A lo largo del eje  $c$  los dímeros se conectan a través de enlace de hidrógeno bifurcado  $C86-H86B \cdots O12$ ,  $C84-H102 \cdots O12$  y el enlace  $C43-H43C \cdots O23$  generando cadenas que se extiende de forma paralela al eje  $c$  (ver **Figura 19**); a lo largo de  $b$  se unen por los enlaces  $C86-H86C \cdots O21$  y  $O13-H4 \cdots O25$  (**Figura 19**).

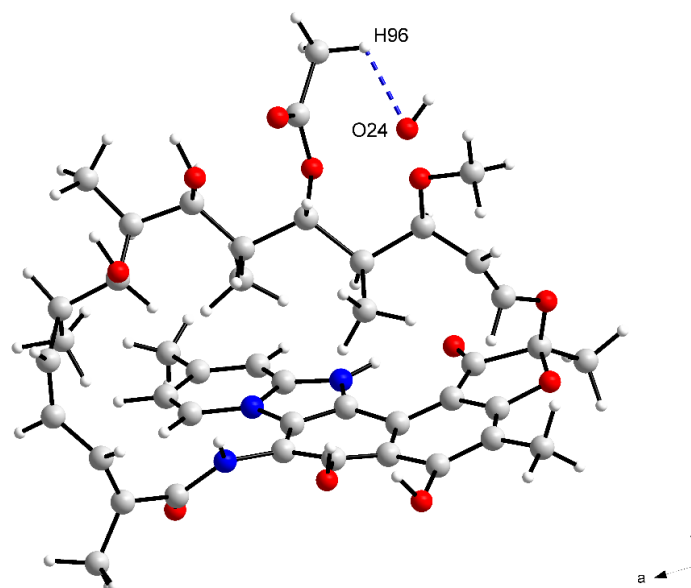
La molécula de agua forma un único enlace de hidrógeno no convencional y finito con la molécula 2 de rifaximina como se muestra en la **Figura 21**.



**Figura 19.** Enlaces de hidrógeno C86-H86B...O12, C84-H102...O12 y C43-H43C...O23 paralelos al eje c. Los átomos de hidrógenos fueron removidos para mayor claridad.



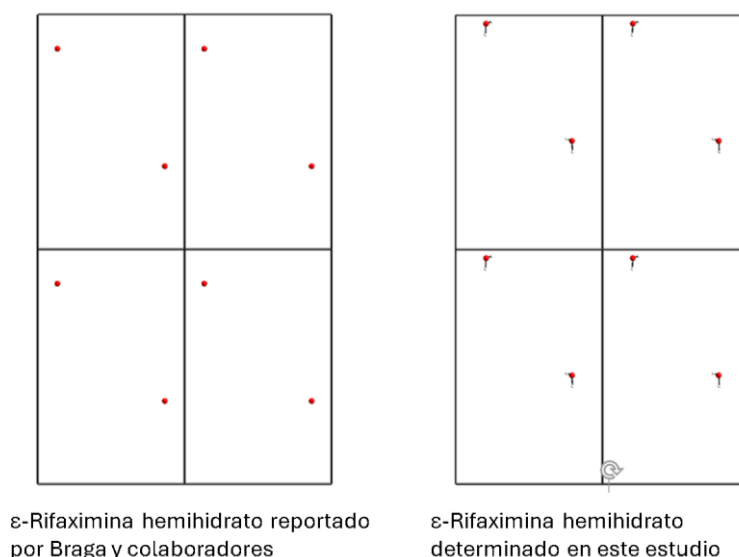
**Figura 20.** Enlaces de hidrógeno C86-H86C...O21 y O13-H4...O25 en la estructura de la  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.



**Figura 21.** Enlace de hidrógeno de la molécula de agua.

En el artículo de Braga y colaboradores, los autores indican que en todas las formas cristalinas hidratadas estudiadas de la rifaximina (polimorfos  $\alpha$  y  $\beta$ ), existe un “nicho”, un lugar común en las estructuras donde las moléculas de agua pueden acomodarse de forma "suelta". Este criterio fue utilizado para intentar localizar la molécula de agua en las formas  $\delta$  y  $\epsilon$  debido al hecho de que las estructuras se resuelven a partir de los datos del polvo y resulta mucho más difícil modelar la posición de la molécula de agua.

En la estructura determinada en este estudio la molécula de agua queda contenida entre las dos moléculas cristalográficamente independiente de rifaximina mientras que en la reportada por Braga et. al. está conectada a una de las moléculas cristalográficamente independientes. La posición de la molécula de agua obtenida en la estructura determinada varía con respecto a la reportada por Braga tal como se muestra en la **Figura 22**.



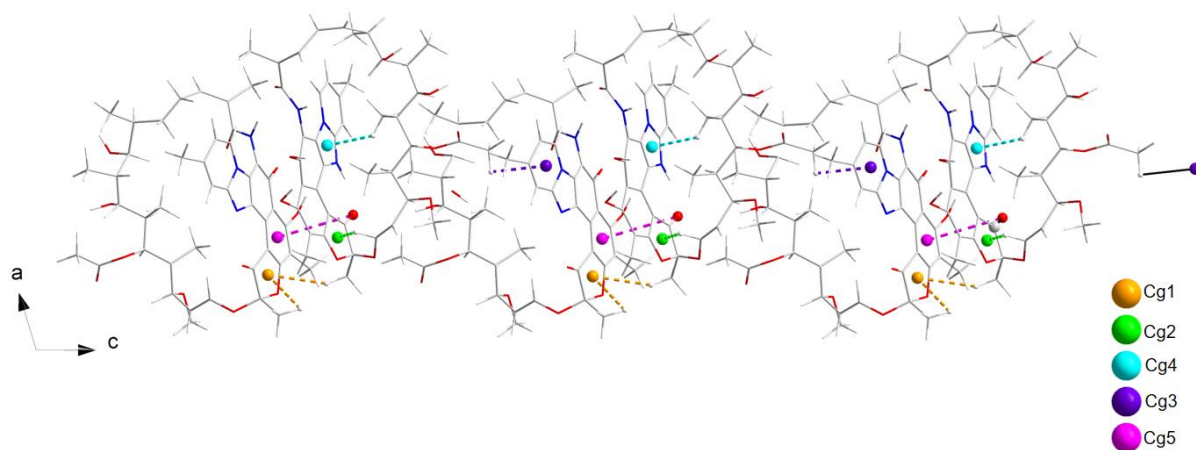
**Figura 22.** Posiciones de las moléculas de agua en la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato reportada por Braga y colaboradores y en este estudio.

La estructura también revela la presencia de una interacción C-O $\cdots$  $\pi$  y varias del tipo C-H $\cdots$  $\pi$  (**Tabla 8**); las interacciones  $\pi$  se representan con los centroides de los anillos. Estos contactos cortos contribuyen a la formación de los dímeros de las moléculas de rifaximina y a su vez mantienen unidos los dímeros a lo largo del eje c como se muestra en la **Figura 23**.

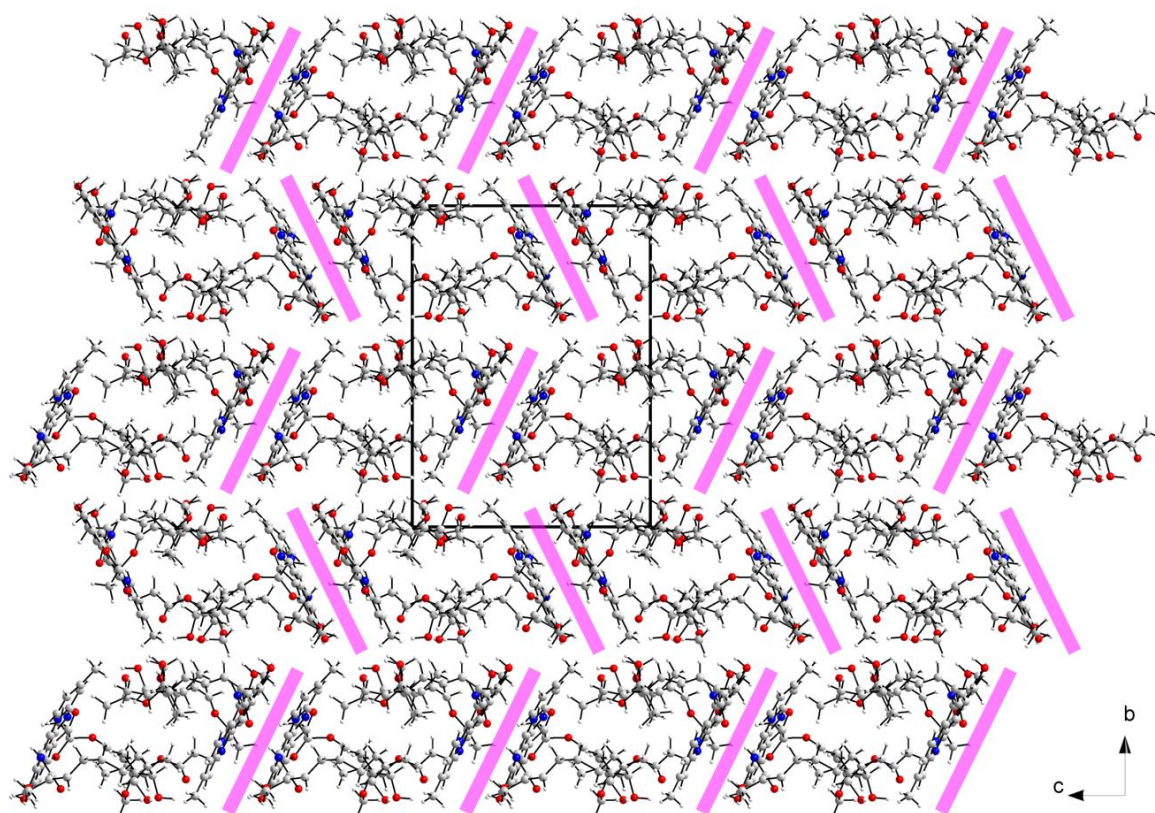
**Tabla 8.** Parámetros geométricos de las interacciones C-O $\cdots$  $\pi$  y C-H $\cdots$  $\pi$  presentes en la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina.

Y-X $\cdots$ Cg	X $\cdots$ Cg (Å)	X(H,O)-Perp (Å)	$\gamma$ (°)	X-H $\cdots$ Cg (°)	X $\cdots$ Cg (Å)	Y-X, Pi (°)
C54-O19 $\cdots$ Cg5 <sup>i</sup>	3.9841	3.870	13.74	73	3.8036	3.71
C13-H6 $\cdots$ Cg1 <sup>ii</sup>	2.68	2.13	37.36	71	2.5385	45
C56-H61 $\cdots$ Cg1 <sup>ii</sup>	2.93	2.45	33.02	150	3.9173	43
C72-H78 $\cdots$ Cg2 <sup>ii</sup>	2.15	1.81	32.53	94	2.4853	29
C76-H90 $\cdots$ Cg4 <sup>ii</sup>	2.78	2.75	8.41	128	3.5596	37
C79-H96 $\cdots$ Cg3 <sup>ii</sup>	2.74	-2.32	32.39	90	2.9556	5

Códigos de simetría: i: x, y, -1+z; ii: x, y, z. La geometría de los contactos es definida por los siguientes parámetros: X $\cdots$ Cg = distancia H $\cdots$ Cg/O $\cdots$ Cg;  $\gamma$  = ángulo entre el vector Cg-H/ Cg-O y la normal del anillo; X-Perp = distancia perpendicular del H/O al aplano del anillo; X-H $\cdots$ Cg = ángulo X-H-Cg; X-Y  $\cdots$ Cg = ángulo X-O-Cg; X $\cdots$ Cg = distancia de X a Cg; X-Y,  $\pi$  = ángulo del enlace X-H/X-O con el plano  $\pi$ .



**Figura 23.** Interacciones C-O $\cdots\pi$  y C-H $\cdots\pi$  presentes en la estructura de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.



**Figura 24.** Cintas en zigzag de moléculas de rifaximina que se extiende a lo largo del eje b.

En la estructura determinada de  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato, los enlaces de hidrógenos y las interacciones  $C-O \cdots \pi$  y  $C-H \cdots \pi$  originan el arreglo cristalino en forma de cintas en zigzag que se extienden a lo largo del eje b de manera similar a la reportada por Braga y colaboradores (ver **Figura 24**).

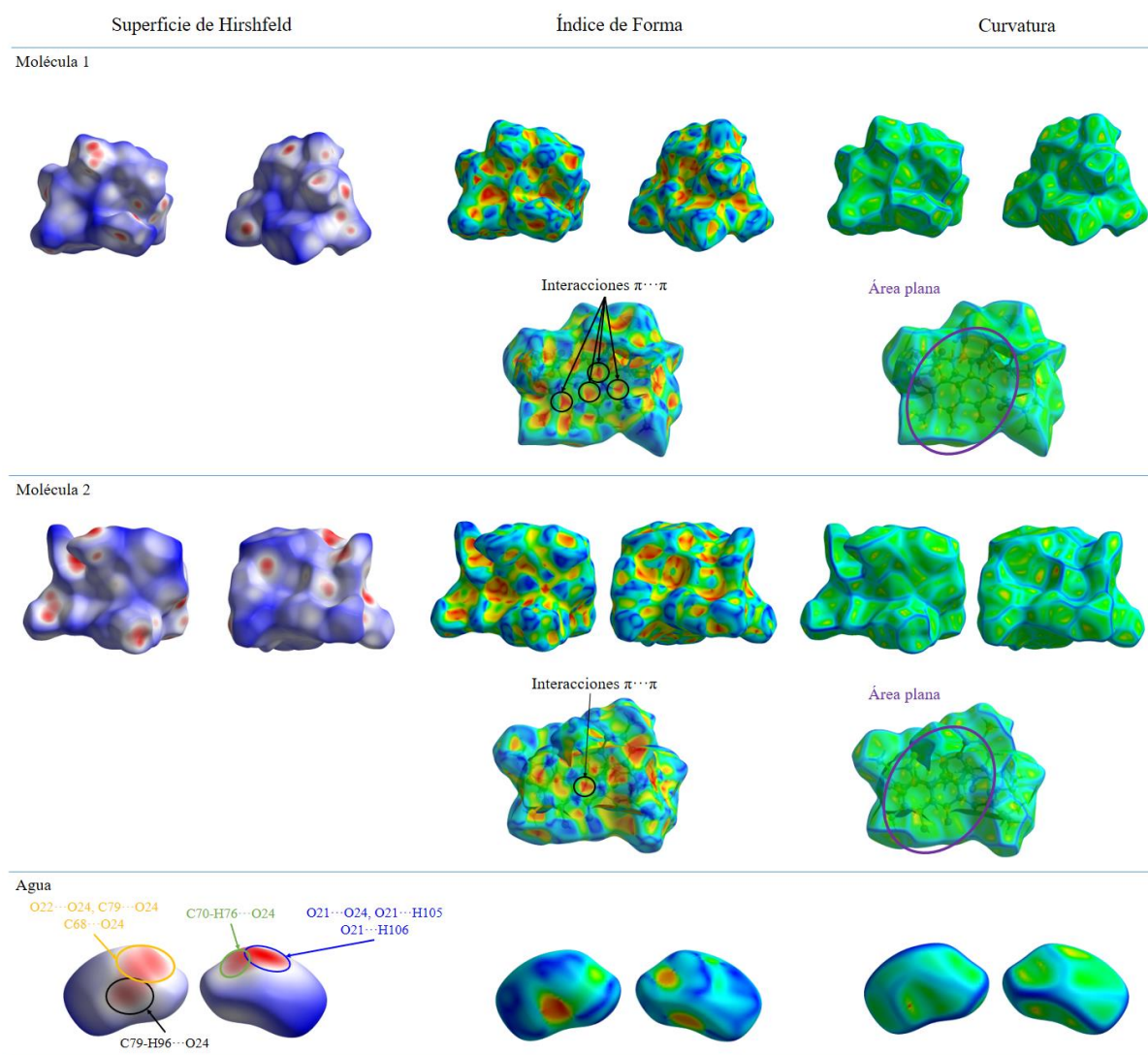
### 8.7. Análisis supramolecular del polimorfo $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato

El volumen total de las superficies de Hirshfeld para las moléculas es  $2145,2 \text{ \AA}^3$ , correspondiente al 98,5% del volumen de la celda, lo que indica que las moléculas se empaquetan con pocos intersticios. La superficie de Hirshfeld (HS) del compuesto con mapeado con  $d_{\text{norm}}$  revela la presencia de importantes interacciones moleculares (**Figura 25**). Se observan dos puntos rojos muy intensos y complementarios correspondientes a los enlaces de hidrógenos e interacción mostrados anteriormente.

El índice de forma es sensible a pequeños cambios en la superficie y se diferencia por el color azul que indica "protuberancias" asociadas con los átomos de hidrógenos donados de una interacción intermolecular (o cualquier otro átomo donado) y el color rojo que representa "agujeros" asociados con los aceptores; Las áreas amarillo-rojas indican interacciones intermoleculares débiles. En las superficies de índice de forma se observan las manchas en forma de triángulos característicos de las interacciones  $\pi \cdots \pi$  en una de las caras de los anillos indicando la presencia de estos contactos y las cuales también son responsables de las orientaciones espaciales de los anillos de 6-miembros mostradas en la **Figura 18**.

La superficie de curvatura muestra poca planaridad, sin embargo, en las caras de los anillos de las moléculas de rifaximina se observan zonas planas donde se producen las

interacciones  $\pi \cdots \pi$  indicando el apilamiento cara-cara paralelo de las moléculas.

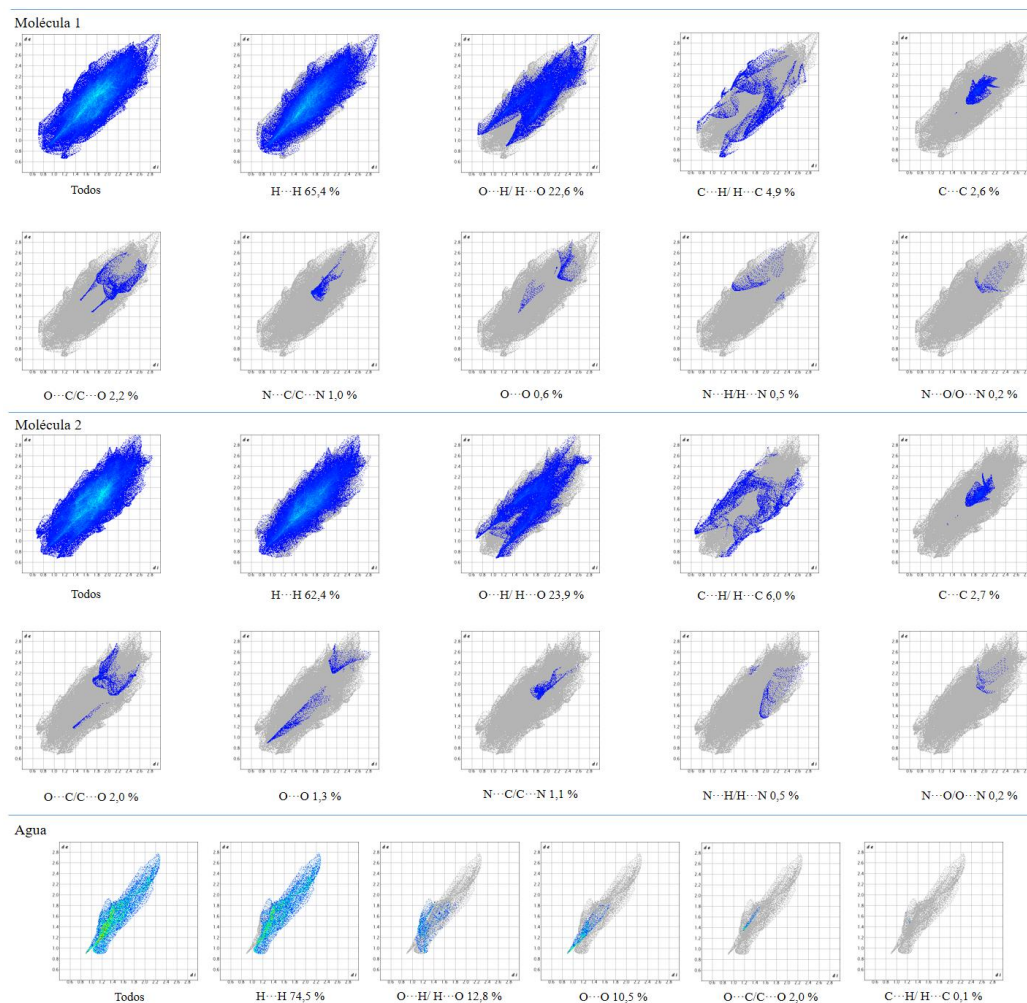


**Figura 25.** Superficies de Hirshfeld, índices de forma y curvatura del  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato.

La molécula de agua presenta la mancha roja intensa del enlace de hidrógeno C79-H96...O24 mostrado en la **Figura 20**. Adicionalmente, se observan otras interacciones cortas originadas por otros contactos del átomo O24 del agua con los átomos de oxígeno del grupo metoxilo y del metil éster de la molécula 2 de rifaximina (azul, verde y naranja, **Figura 25**); también están presentes contactos con los átomos de hidrógeno del agua con estos grupos.

El análisis de las huellas dactilares (**Figura 26**) muestra que las moléculas cristalográficamente independientes presentan los mismos contactos siendo los de mayor contribución las interacciones  $H\cdots H$  y  $O\cdots H$  debidas a las fuerzas dispersivas y a los enlaces de hidrógeno (convencional y no convencional) respectivamente. Las distribuciones de los porcentajes de las interacciones son un poco similares en cada una de las moléculas, sin embargo, los contactos  $O\cdots O$  en la molécula 1 son mucho menores (0,6 %) que los observados en la molécula 2 (1,3 %) debido al mayor número de interacciones presentes con el átomo O24 de la molécula de agua que posee un valor de 10,5 % de estos contactos.

Los gráficos de huellas dactilares indican que la estructura está dominada por fuerzas de van der Waals con 65,4%, 62,4 % y 74,5 % de interacciones  $H\cdots H$  mientras que en las moléculas de rifaximina las interacciones  $O\cdots H/H\cdots O$  representan el 22,6 % y 23,9 %. Por otro lado, los contactos  $C\cdots H/H\cdots C$  (que involucran las  $C-H\cdots\pi$ ), contribuyen de forma importante con el 4,9% y 6,0 %. Los contactos  $C\cdots C$  (incluyendo las interacciones  $\pi\cdots\pi$ ) y  $C\cdots O$  muestran una pequeña contribución en la superficie.

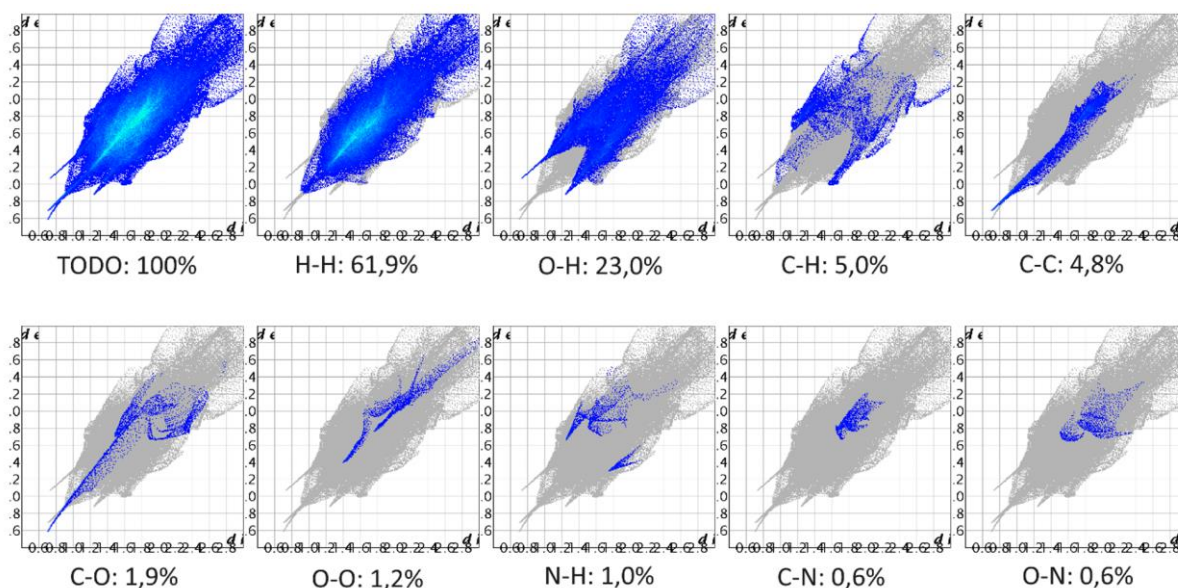


**Figura 26.** Huellas dactilares para cada fragmento de la unidad asimétrica del  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato, donde se muestran las contribuciones de cada contacto posible al área de la respectiva superficie de Hirshfeld.

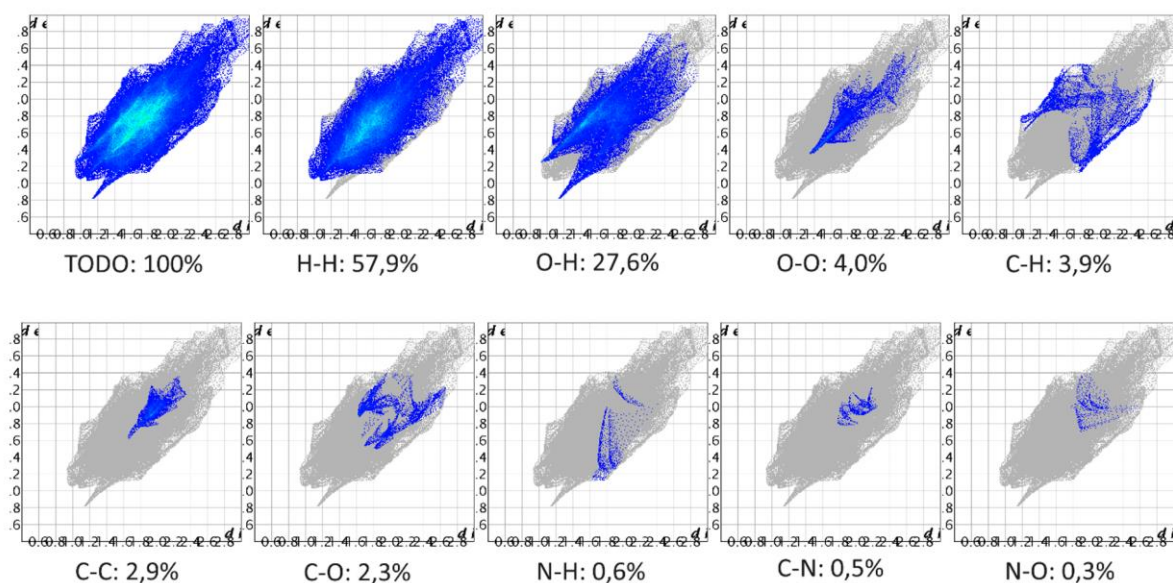
### 8.8. Comparación del $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato con los polimorfos $\alpha$ y $\beta$ de rifaximina

La comparación de la forma  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato con los polimorfos  $\alpha$  y  $\beta$  de rifaximina se llevó a cabo usando los archivos contenidos en la base de datos CSD con código ZEFMUU (forma  $\alpha$ ) y ZEFNEF (forma  $\beta$  trihidratado).

Las huellas dactilares de los polimorfos  $\alpha$  y  $\beta$  (**Figuras 27 y 28** respectivamente), en promedio poseen distribuciones de las interacciones similares entre ellas indicando que también deben presentar similitudes en las interacciones intermoleculares. Por esta razón, estas formas cristalinas de la rifaximina son las aceptadas por la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) para la producción de medicamentos, ya que poseen comportamientos de solubilidades similares sin provocar riesgos secundarios.

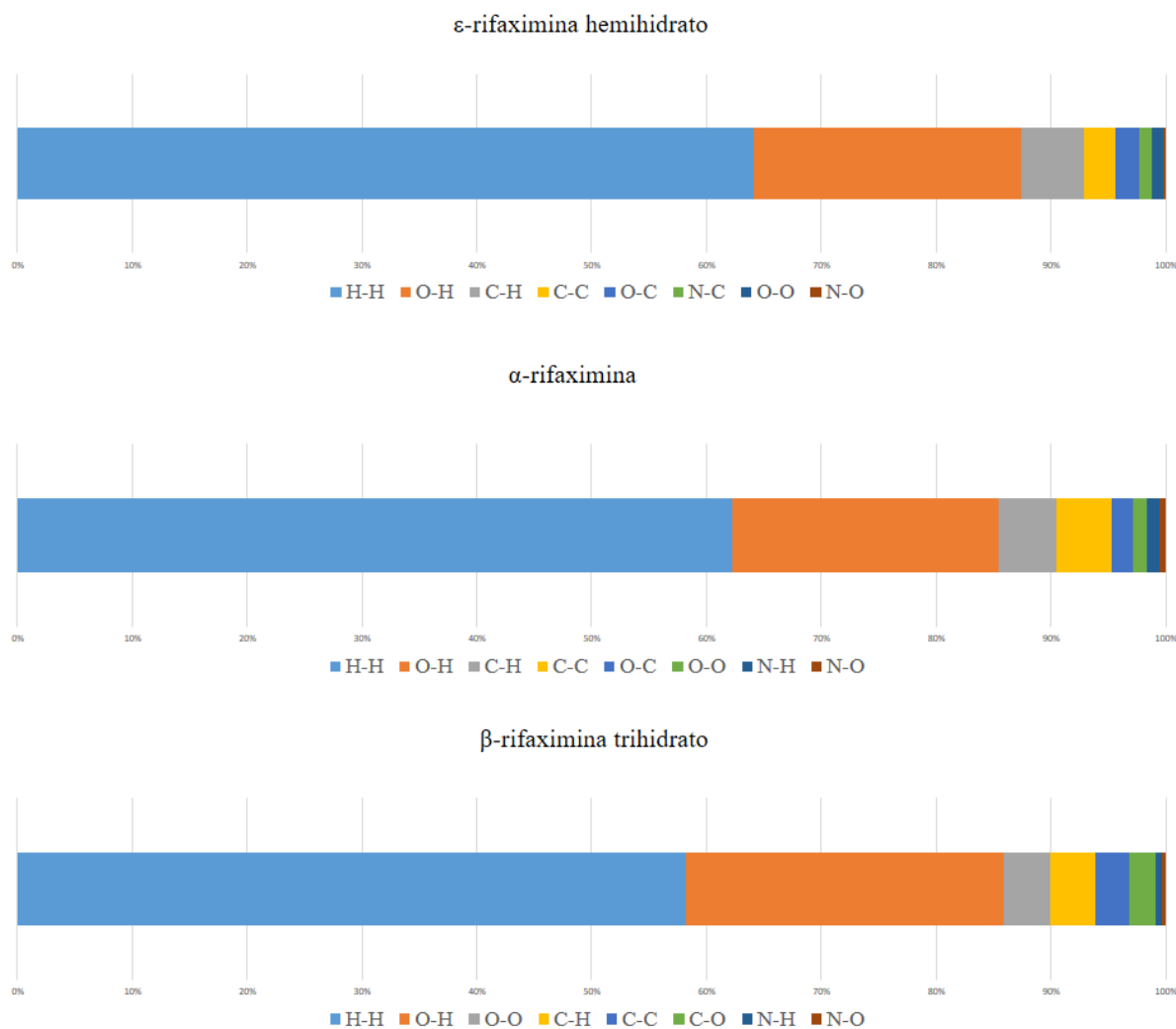


**Figura 27.** Huellas dactilares  $d_i$  (distancia Van der Waals interna) vs  $d_e$  (distancia Van der Waals externa) para el polimorfo  $\alpha$  de rifaximina.



**Figura 28.** Huellas dactilares di (distancia Van der Waals interna) vs de (distancia Van der Waals externa) para el polimorfo  $\beta$  de rifaximina trihidratado.

Al comparar estos porcentajes de interacciones con el promedio obtenido para las moléculas de rifaximina de la forma  $\epsilon$  (**Figura 29**), se observa una distribución análoga para las tres estructuras. Esto sugiere que las interacciones intermoleculares de la estructura determinada en este trabajo también deben ser similares y, por lo tanto, puede ser que algunas de sus propiedades fisicoquímicas también presenten similitudes.



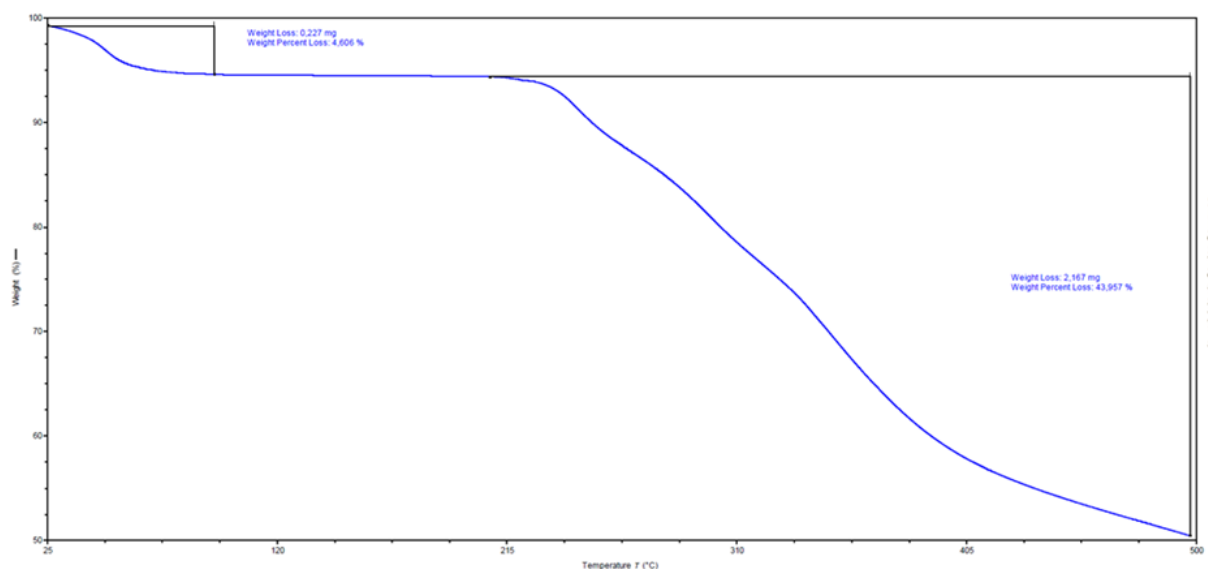
**Figura 29.** Comparación de los promedios de porcentajes de las interacciones presentes en los polimorfos  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato,  $\alpha$ -rifaximina y  $\beta$  de rifaximina trihidrato.

## 8.9. Ensayo de solubilidad

Antes de realizar los ensayos de solubilidad se llevó a cabo la caracterización del material mediante métodos térmico y difracción de rayos X de monocristal. Estos análisis se realizaron debido a que la rifaximina, indistintamente del polimorfo presente, es higroscópica y tiende a modificar su arreglo cristalino durante el tiempo de almacenamiento.

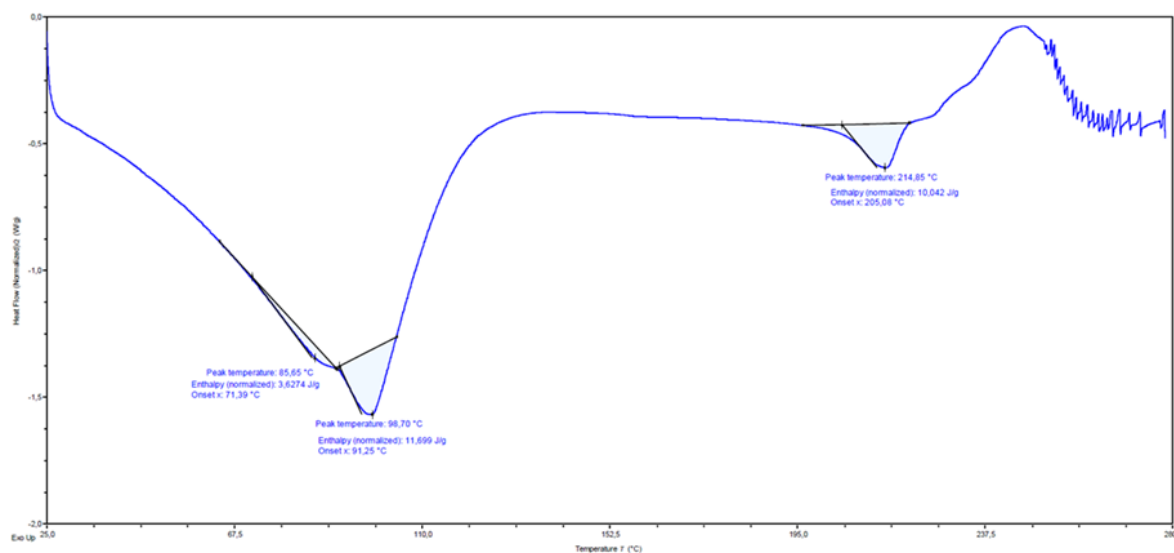
### 8.9.1 Análisis térmico TGA-DSC

La curva obtenida por termogravimetría mostrada en la **figura 30**, presenta información de gran importancia sobre la estructura de la rifaximina en estudio. La pérdida de masa de 4.606 % observada desde 35 hasta 100° C corresponde a la pérdida de moléculas de agua presentes en la estructura cristalina. La proporción de pérdida por deshidratación corresponde a dos moléculas de agua. Posteriormente, el diagrama presenta una reducción de masa considerable la cual se asume a la descomposición del material en una temperatura de 215° C aproximadamente.



**Figura 30.** Diagrama térmico obtenido por termogravimetría de la muestra de rifaximina.

En la **figura 31** se muestra el termograma obtenido por DSC, donde el material muestra una pérdida de agua en el rango de 25 hasta 100° C aproximadamente con un pico endotérmico máximo en 96,70° C. En la figura también se puede deducir el punto de fusión del material el cual fue de 214,85° C, temperatura donde se presentó la última transición endotérmica del diagrama. En el trabajo de Kogawa y colaboradores <sup>[4]</sup> se muestran los resultados por DSC para diferentes mezclas de los polimorfos  $\alpha$  y  $\beta$  de la rifaximina, en la cual se muestran transiciones endotérmicas entre 60-100° C similares a la obtenida en la muestra en estudio de rifaximina.

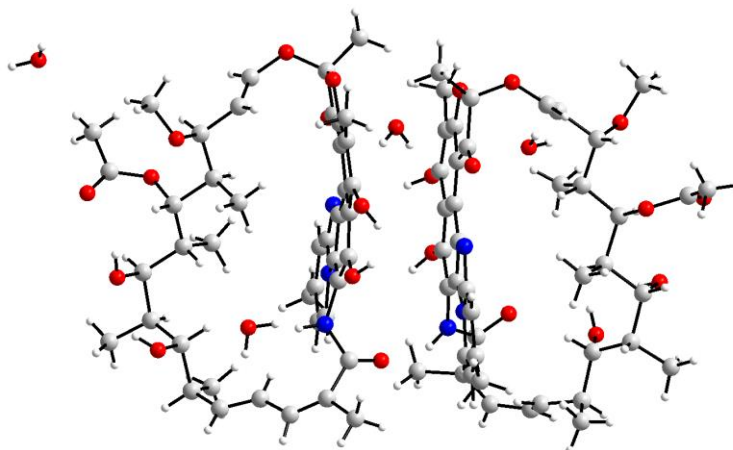


**Figura 31.** Termograma DSC de la muestra de rifaximina en estudio.

### 8.9.2. Análisis por difracción de rayos X de monocristal

En la muestra luego del almacenamiento de 5 a 6 meses se observó la presencia de monocristales en forma de placas. Algunos cristales se inspeccionaron bajo un microscopio de luz polarizada y se seleccionó un cristal para el registro de datos de intensidad en el difractómetro de rayos X de monocristal. Los datos se registraron a temperatura ambiente en un difractómetro Rigaku XTALAB usando radiación  $\text{MoK}\alpha$  con el difractómetro operando a 50 kV y 40 mA.

La integración y reducción de datos indican que el material presenta una estructura cristalina monoclinica con grupo espacial  $P2_1$  y parámetros de celda  $a= 13,738(4) \text{ \AA}$ ,  $b= 20,240(6) \text{ \AA}$ ,  $c= 16,335(9) \text{ \AA}$ ,  $\beta= 106,54(4)^\circ$ ,  $V= 4354(3) \text{ \AA}^3$  y  $Z= 4$ . La unidad asimétrica (**Figura 32**) es consistente con la fórmula molecular  $\text{C}_{43}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{11}\cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ . La estructura del material corresponde al polimorfo  $\delta$ -rifaximina dihidratado y coincide con la reportada en la base de datos CSD con código ZEFNOP (ver **Tabla 9**).

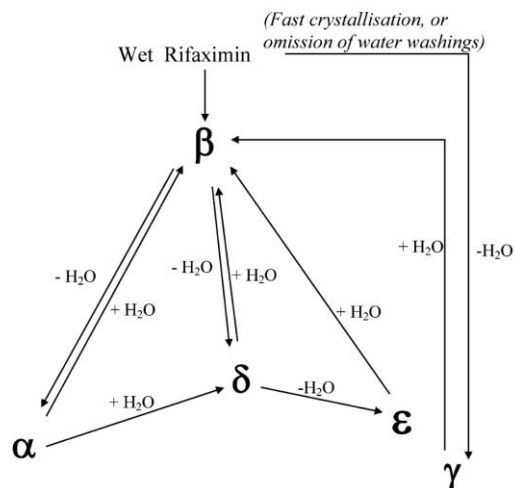


**Figura 32.** Unidad asimétrica del polimorfo  $\delta$ -rifaximina dihidratado presente en la muestra.

**Tabla 9.** Comparación de los parámetros cristalinos de la muestra comparados con el reportado en la base de datos CSD con código ZEFNOP.

Muestra	MUESTRA DE RIFAXIMINA	$\delta$ -RIFAXIMINA DIHIDRATO (Código: ZEFNOP)	
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	
Constantes de celda unidad	$a$ (Å)	13,738(4)	13,760(0)
	$b$ (Å)	20,240(6)	20,256(0)
	$c$ (Å)	16,335(9)	16,347(0)
	$\alpha$ (°)	90	90
	$\beta$ (°)	106,54(4)	106,71(0)
	$\gamma$ (°)	90	90
	Volumen (Å <sup>3</sup> )	4354(3)	4363,798
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_1$	

Las transformaciones de fase de la rifaximina han sido documentadas y son promovidas por la ganancia o pérdidas de moléculas de agua como se ilustra en la **Figura 33**.



**Figura 33.** Relación entre varias formas cristalina de la rifaximina. [8]

Los resultados obtenidos por el análisis térmico y difracción de rayos X de monocristal sugieren que, en la muestra, luego del almacenamiento, hay presencia de varias fases cristalinas de la rifaximina por lo tanto, no se realizó el ensayo de solubilidad dado que el resultado correspondería a una mezcla de fases del principio activo y no únicamente de la forma  $\epsilon$ .

## 9. Conclusiones

La estructura del polimorfo de rifaximina obtenida en este estudio corresponde al polimorfo  $\epsilon$  hemihidrato que anteriormente ha sido reportada por Braga y colaboradores, presentando un patrón de difracción en polvo idéntico al reportado en la literatura.

El arreglo cristalino reportado por Braga y colaboradores presenta una serie de inconsistencias estructurales resueltas en este estudio, obteniendo así una mejor resolución de la estructura para el polimorfo  $\epsilon$  de rifaximina hemihidrato.

La estructura del  $\epsilon$ -rifaximina hemihidrato se encuentra gobernada por enlaces de hidrógenos, interacciones C-O $\cdots\pi$ , C-H $\cdots\pi$  y  $\pi\cdots\pi$ .

Las moléculas cristalográficamente independientes de rifaximina empaquetan en forma de dímeros conectados por enlaces de hidrógenos y contactos C-H $\cdots\pi$  y  $\pi\cdots\pi$  que se extiende paralelos al eje  $b$ . A su vez los dímeros se unen a través de enlaces de hidrógeno e interacciones C-H $\cdots\pi$  a lo largo de los ejes  $c$  y  $a$ .

El análisis supramolecular a través de las Superficies de Hirshfeld y los gráficos de huellas dactilares indican que la estructura está dominada por fuerzas de van der Waals con 65,4%, 62,4 % y 74,5 % de interacciones H $\cdots$ H mientras que en las moléculas de rifaximina las interacciones O $\cdots$ H/ H $\cdots$ O representan el 22,6 % y 23,9 %.

Los porcentajes de contribución de las interacciones de las moléculas de rifaximina de la forma  $\epsilon$  con y los polimorfos  $\alpha$  y  $\beta$ , presentan una distribución análoga para las tres estructuras. Esto sugiere que las interacciones intermoleculares de la estructura determinada en

este trabajo también deben ser similares a las formas  $\alpha$  y  $\beta$  y, por lo tanto, puede ser que algunas de sus propiedades fisicoquímicas también presenten similitudes.

Las técnicas de análisis térmico TGA-DSC y difracción de rayos X de monocristal confirman la presencia de varias fases cristalina de rifaximina luego de un tiempo de almacenamiento, por lo cual no fue posible realizar el estudio de solubilidad.

### Referencias Bibliográficas

1. Scarpignato, C., & Pelosini, I. (2005). Rifaximin, a poorly absorbed antibiotic: Pharmacology and clinical potential. *Chemotherapy*.  
<https://doi.org/10.1159/000081990>
2. Mazzola, D., Moiana, S., Coppi, G. (2012). New process for the synthesis of rifaximin and a new pseudo-crystalline form of rifaximin obtained thereby. WO2012155981. FRIULCHEM SpA
3. Sensi, P. (1983). History of the Development of Rifampin. *Reviews of Infectious Diseases*, Volume 5. [https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement\\_3.S402](https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement_3.S402)
4. Kogawa, A., Gutierrez, S., & Nunes, R. (2019). Characterization of Polymorphic Forms of Rifaximin. *Journal of AOAC International*, Volume 99. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0053>
5. Sensi P, Margalight P, Timbal MT. Rifomycin, a new antibiotic; preliminary report. *Farmaco Sci.* 1959;14(2):146-7. PMID: 13639988.
6. Marchi, E., Montecchi, L. (1982). Imidazo-Rifamycin derivatives with antibacterial utility. US4341785. Alfa Farmaceutici S.p.A
7. Cannata, V., Tamagnone, G. (1985). Process for the synthesis of pyrido-imidazo rifamycins. US4557866. Alfa Farmaceutici S.p.A
8. Viscomi, G., Campana, M., Braga, D., Confortini, D., Cannata, V., Righi, P., Rosini, G. (2005). Polymorphic forms of rifaximin, processes for their production and uses thereof. US2005/0272754A1. Alfa Wassermann S.p.A
9. Viscomi, G., Campana, M., Braga, D., Confortini, D., Cannata, V., Severini, D., Righi, P., Rosini, G. (2006). Polymorphous forms of rifaximin, processes for their production and use thereof in medicinal preparations. US7045620B2. Alfasigma SpA
10. Jahagirdar, H., Kulkarni, R., Kulkarni, S. (2009). Pharmaceutical compositions of

- rifaximin. US2009/0028940A1. Lupin LTD
11. Kothakonda, K., Che, D. (2009). Amorphous form of rifaximin and processes for its preparation. US2009/0082558A1. Apotex Pharmachem Inc
  12. Rao, D., Kankan, R., Phull, M., Ghagare, M. (2009). Rifaximin. US2009/0312357A1. CIPLA Limited
  13. Gushurst, K., Yang, D., Roe, M., Schultheiss, N., Vlahova, P., Stults, J., Houston, T. (2011). Forms of rifaximin and uses thereof. US8067429 B2. Salix Pharmaceuticals, Ltd
  14. Barakat, M., Franklin, H., Heimanson, Z., Ramakrishna, T., Vittitow, J. (2021). Methods of treating Covid-19 with rifaximin. WO2021/191312A1. Bausch Health Ireland Limited
  14. Censi, R., & Martino, P. (2015). Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules*, 20. <https://doi.org/10.3390/molecules201018759>
  15. Atkins, P. (2010). Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry (5th ed.). OUP Oxford.
  16. Haisa, M., Kashino, S., Kawai, R., & Maeda, H. (1976). The Monoclinic Form of p-Hydroxyacetanilide. *Acta Cryst.* <https://doi.org/10.1107/S0567740876012223>
  17. Haisa, M., Kashino, S., & Maeda, H. (1974). The orthorhombic form of p-hydroxyacetanilide. *Acta Cryst.* <https://doi.org/10.1107/S0567740874007473>
  18. Bernstein, J. (2020). *Polymorphism in Molecular Crystals* (2nd ed.). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199655441.001.0001>
  19. Brittain, H. G. (2009). *Polymorphism in Pharmaceutical Solids* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.3109/9781420073225>
  20. Karanje, R., Bhavsar, Y., Jahagirdar, K., & Bhise, K. (2013). Formulation and Development of Extended-Release Micro Particulate Drug Delivery System of Solubilized Rifaximin. *AAPS PharmSciTech.* <https://doi.org/10.1208/s12249-013-9949-x>

21. Huang, D., & Dupont, H. (2005). Rifaximin: A novel antimicrobial for enteric infections. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.05.019>
22. Braga, D., Grepioni, F., Chelazzi, L., Campana, M., Confortini, D., & Viscomi, G. (2012). The structure–property relationship of four crystal forms of rifaximin. *CrystEngComm*. <https://doi.org/10.1039/C2CE25920F>
23. Braga, D., Grepioni, F., Campana, M., Confortini, D., Viscomi, G., Barbanti, M., Polito, M., Rosini, G., Righi, P., & Cannata, V. (2008). Crystal forms of rifaximin and their effect on pharmaceutical properties. *CrystEngComm*. <https://doi.org/10.1039/B717887E>
24. Steed, J., & Atwood, J. (2013). *Supramolecular Chemistry* (2nd ed.). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470740880>
25. Matyjaszewski, K., & Möller, M. (2012). *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. Elsevier Science. ISBN 978-0-08-087862-1
26. Tian, F., Qu, H., Zimmermann, A., Munk, T., Jørgensen, A., & Rantanen, J. (2010). Factors affecting crystallization of hydrates. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01186.x>
27. Desiraju, G., & Steiner, T. (2001). *The Weak Hydrogen Bond: In Structural Chemistry and Biology*. Oxford University Press.
28. Infantes, L., Fábian, L., & Motherwell, W. (2007). Organic crystal hydrates: What are the important factors for formation. *CrystEngComm*. <https://doi.org/DOI>  
<https://doi.org/10.1039/B612529H>
29. Sozzani, P., Comotti, A., Bracco, S., & Simonutti, R. (2003). A family of supramolecular frameworks of polyconjugated molecules hosted in aromatic nanochannels. *Angewandte Chemie International Edition*, 43. <https://doi.org/10.1002/anie.200353479>
30. Dannenberg, J. (2010). *The Nature of the Hydrogen Bond: Outline of a Comprehensive*

- Hydrogen Bond Theory. Journal of the American Chemical Society.  
<https://doi.org/10.1021/ja100200z>
31. Pimentel, G., & McClellan, A. (1960). The Hydrogen Bond. W.H Freeman.  
<https://doi.org/10.1177/004051756003001217>
32. Meyer, A. (1986). The size of molecules. Chemical Society Reviews, 15, 449-474.  
<https://doi.org/DOI> <https://doi.org/10.1039/CS9861500449>
33. Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J., Kim, H., Cho, J., Yun, G., & Lee, J. (2014). Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 9.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.05.005>
34. Bremmell, K., & Prestidge, C. (2018). Enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs with mesoporous silica based systems: Opportunities and challenges. Drug Development and Industrial Pharmacy, 45.  
<https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1542709>
35. Kogawa, A., Peltonen, L., Gutierrez, S., Regina, H., & Salgado, N. (2019). Submission of Rifaximin to Different Techniques: Characterization, Solubility Study, and Microbiological Evaluation. AAPS PharmSciTech. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1329-8>
36. Akash, M., & Rehman, K. (2020). Essentials of Pharmaceutical Analysis. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7>
37. Jørgensen, A., Strachan, C., Pöllänen, K., Koradia, V., Tian, F., & Rantanen, J. (2009). An insight into water of crystallization during processing using vibrational spectroscopy. Journal of Pharmaceutical Sciences, 98. <https://doi.org/10.1002/jps.21735>
38. Craig, D., & Reading, M. (2006). Thermal Analysis of Pharmaceuticals (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420014891>

39. Percharsky, V., & Zavaliji, P. (2009). *Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials* (2nd ed.). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-09579-0>
40. Dinnebier, R., & Billinge, S. (2008). *Powder Diffraction: Theory and Practice*. RSC Publishing. <https://doi.org/10.1039/9781847558237>
41. Jenkins, R., & Snyder, R. (1996). *Introduction to X-ray Powder Diffractometry*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118520994>
42. Waseda, Y., Matsubara, E., & Shinoda, K. (2011). *X-Ray Diffraction Crystallography* (1st ed.). Springer Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16635-8>
43. Spackman, M., & Jayatilaka, D. (2009). Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm*. <https://doi.org/10.1039/B818330A>
44. McKinnon, J., Mitchell, A., & Spackman, M. (1998). Hirshfeld Surfaces: A New Tool for Visualising and Exploring Molecular Crystals. *Chemistry - A European Journal*, 4. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19981102\)4:11<2136::AID-CHEM2136>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19981102)4:11<2136::AID-CHEM2136>3.0.CO;2-G)
45. Turner, M., Thomas, S., Shi, M., Jayatilaka, D., & Spackman, M. (2015). Energy frameworks: Insights into interaction anisotropy and the mechanical properties of molecular crystals. *Chemical Communications*. <https://doi.org/10.1039/C4CC09074H>
46. Vippagunta, S., Brittain, H., & Grant, D. (2001). Crystalline solids. *Adv Drug Deliv Rev*. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00097-7](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00097-7)
47. Rudnick, J., & Gaspari, G. (1987). The shapes of random walks. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.237.4813.384>
48. Fabbiani, F., Byrne, L., McKinnon, J., & Spackman, M. (2007). Solvent inclusion in the structural voids of form II carbamazepine: Single-crystal X-ray diffraction, NMR spectroscopy and Hirshfeld surface analysis. *CrystEngComm*, 9, 728-731.

<https://doi.org/10.1039/B708303N>

49. Spackman, M., & McKinnon, J. (2002). Fingerprinting intermolecular interactions in molecular crystals. *CrystEngComm*, 4, 378-392. <https://doi.org/10.1039/B203191B>
50. McKinnon, J., Fabbiani, F., & Spackman, M. (2007). Comparison of polymorphic molecular crystal structures through Hirshfeld surface analysis. *Crystal Growth & Design*, 7(4), 755-769. <https://doi.org/10.1021/cg060773k>