

Sara Cristina Tavares Machado

**ESTUDO SOBRE O LEVETIRACETAM  
DIVERSIDADE POLIMÓRFICA E DISCRIMINAÇÃO QUIRAL DE  
ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES POR CO-CRISTALIZAÇÃO**

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Sara Cristina Tavares Machado

**ESTUDO SOBRE O LEVETIRACETAM**  
**Diversidade polimórfica e discriminação quiral de**  
**anti-inflamatórios não-esteróides por co-cristalização**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de especialização em  
Controle de Qualidade e Ambiente

Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio

Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage

Setembro de 2015

Universidade de Coimbra



*“Patience and perseverance have a magical effect  
before which difficulties disappear and obstacles vanish.”*

John Quincy Adams

*“If I have seen further,  
it is by standing upon the shoulders of giants”*

Isaac Newton



# AGRADECIMENTOS

O espaço limitado desta seção de agradecimentos tornou-se um desafio, por utilizar apenas uma página, que seguramente não me permite agradecer, devidamente, a todas as pessoas que ao longo do meu percurso académico, no Departamento de Química da Universidade de Coimbra, ajudaram-me direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais uma etapa a nível académico e pessoal. Desta forma a todos deixo aqui o meu profundo e sincero agradecimento.

Começo por agradecer a ambos os meus orientadores Prof. Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e Prof. Doutor João Carlos Canotilho Lage, a oportunidade e o privilégio que tive em fazer parte do grupo de investigação, por compartilharem a sua experiência e conhecimento, pela orientação e confiança, pelo constante apoio, por toda a compreensão e carinho e por todas as palavras de incentivo. Obrigado por contribuírem para o enriquecimento da minha formação científica e por estimularem o meu desejo de querer saber mais e querer fazer o melhor possível.

Aos professores do grupo de investigação Termodinâmica Molecular/Química do Estado Sólido de Composto Orgânicos: Prof. Doutor Ricardo António Esteves de Castro, Prof. Doutor Mário Túlio dos Santos Rosado e Prof. Doutora Teresa Margarida Roseiro Maria Estronca, pela disponibilidade, simpatia e ajuda prestada durante este trabalho.

Ao Prof. Doutor Rui Fausto Martins da Silva Lourenço, Prof. Doutora Manuela Ramos Marques da Silva e Doutor Rui Manadas (UCQFarma – Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra), por disponibilizarem os equipamentos para experiências realizadas no âmbito da minha Tese, agradeço a gentileza, simpatia e disponibilidade.

À *La Familia* que encontrei em Coimbra por estes seis anos! Sempre me disseram que os amigos são a família que escolhemos, não poderia ter escolhido melhor. Não há palavras para descrever o que junto vivemos. Obrigado a todos vocês por todo o companheirismo, apoio, paciência e força recebida ao longo destes anos, bem como o carinho.

Às minhas meninas de Vale de Cambra, obrigada por todo o apoio, amizade e paciência. Nem a distância e falta de tempo conseguem abalar a nossa amizade.

Por último e não menos importante, tendo consciência que sozinha nada disto seria possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais e irmão, pelo seu apoio incondicional, pelos ensinamentos e sabias lições de esperança, por todos os sacrifícios, pela confiança e por acreditarem em mim mesmo quando eu já não acreditava e por todas as palavras de incentivo. Obrigado por estarem ao meu lado e ajudarem-me a alcançar os meus sonhos, sem vocês nada seria possível.

Muito obrigado!



# ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
<b><i>CAPÍTULO 1.....</i></b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1. ESTADO SÓLIDO.....	3
1.1.1. ESTRUTURA CRISTALINA.....	4
1.2. POLIMORFISMO.....	6
1.2.1. POLIMORFISMO: ASPETOS TERMODINÂMICOS E CINÉTICOS.....	9
ASPETOS TERMODINÂMICOS: ENANTIOTROPIA E MONOTROPIA.....	9
ASPETOS CINÉTICOS: NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO DE CRISTAIS.....	11
1.3. CO-CRISTAIS.....	12
1.3.1. PESQUISA DE CO-CRISTAIS.....	15
1.3.2. DIAGRAMAS DE FASE BINÁRIOS.....	17
1.4. LEVETIRACETAM.....	18
CO-CRISTALIZAÇÃO ENANTIOSSELETIVA.....	21
1.4.1. OBJETIVO DO TRABALHO.....	23
CO-FORMADORES: DADOS TERMODINÂMICOS E ESTRUTURAIS.....	24
<b><i>CAPÍTULO 2.....</i></b>	<b>29</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
2.1. MATERIAIS.....	31
2.2. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	31
2.2.1. CRISTALIZAÇÃO EM SOLUÇÃO.....	32
2.2.2. MECANOQUÍMICA.....	32
2.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	33
2.3.1. MÉTODOS DE ANÁLISE TÉRMICA.....	33
TERMOGRAVIMETRIA (TG).....	34
CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC).....	35
TERMOMICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (PLTM).....	36

2.3.2.	MÉTODOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	38
2.3.3.	MÉTODOS DE ESPETROSCOPIA VIBRACIONAL.....	40
	ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	40
	ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR).....	41
	IMAGIOLOGIA DE INFRAVERMELHO.....	42
	IMAGIOLOGIA DE RAMAN.....	43
<b><i>CAPÍTULO 3.</i></b>	<b>.....</b>	<b>45</b>
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
3.1.	INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DE LEVETIRACETAM.....	47
3.1.1.	ESTUDO DO LEVETIRACETAM CRISTALIZADO EM ETANOL.....	50
3.1.2.	ESTUDO DO LEVETIRACETAM CRISTALIZADO EM METANOL.....	55
	3.1.2.1. ESTUDO DO CRISTALIZADO DO FUNDIDO POR IMAGIOLOGIA DE INFRAVERMELHO E DE RAMAN.....	59
3.2.	INVESTIGAÇÃO DE CO-CRISTALIZAÇÃO DE LEVETIRACETAM COM ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES QUIRAIS.....	67
3.2.1.	LEVETIRACETAM:( <i>S</i> )-IBUPROFENO VS LEVETIRACETAM:( <i>R,S</i> )-IBUPROFENO.....	68
	3.2.1.1. SISTEMA LEVETIRACETAM:( <i>S</i> )-IBUPROFENO.....	68
	3.2.1.2. SISTEMA LEVETIRACETAM:( <i>R,S</i> )-IBUPROFENO.....	72
3.2.2.	LEVETIRACETAM:( <i>S</i> )-NAPROXENO VS LEVETIRACETAM:( <i>R,S</i> )-NAPROXENO.....	75
3.2.3.	LEVETIRACETAM:( <i>S</i> )-CETOPROFENO, LEVETIRACETAM:( <i>R,S</i> )-CETOPROFENO E LEVETIRACETAM:( <i>R,S</i> )-FLURBIPROFENO.....	79
3.2.4.	ENSAIOS DE ESTABILIDADE.....	85
<b><i>CAPÍTULO 4.</i></b>	<b>.....</b>	<b>89</b>
	<b>NOTAS FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>
<b><i>ANEXOS.</i></b>	<b>.....</b>	<b>103</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama representativo da importância da química do estado sólido na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, adaptado <sup>1</sup> .....	3
Figura 1.2. Representação esquemática de um sólido cristalino (a) e de um sólido amorfo (b), adaptado <sup>6</sup> .....	4
Figura 1.3. Representação esquemática da célula unitária e respetivos comprimentos axiais e ângulos interaxiais <sup>2</sup> .....	4
Figura 1.4. Representação esquemática de um arranjo monocristalino (a) e policristalino (b), adaptado <sup>9</sup> .....	6
Figura 1.5. Metodologias para a obtenção de novas formas sólidas que mostram a escala de tempo como factor de favorecimento de polimorfos estáveis ou metaestáveis, adaptado <sup>8</sup> .....	8
Figura 1.6. Representação esquemática dos fenómenos que governam as transições em fase sólida, adaptado <sup>17</sup> .....	9
Figura 1.7. Diagrama de fases para dois polimorfos com comportamento termodinâmico: (A) enantiotrópico; (B) monotrópico, a pressão constante, adaptado <sup>19</sup> .....	10
Figura 1.8. Representação esquemática dos diferentes tipos de nucleação.....	11
Figura 1.9. Representação esquemática de formação de co-cristal farmacêutico.....	13
Figura 1.10. Esquema ilustrativo das correlações entre sólidos cristalinos multicomponentes, adaptado <sup>31</sup> .....	14
Figura 1.11. Exemplos de homo e heterossintões supramoleculares envolvendo ligações de hidrogénio, adaptado <sup>32</sup> .....	16
Figura 1.12. Tipos de dominância de adesão que podem ocorrer entre dois compostos em fase sólida, adaptado <sup>43</sup> . É excluída a formação de soluções sólidas.....	16
Figura 1.13. Metodologias usadas para co-cristalização, adaptado <sup>44</sup> .....	17
Figura 1.14. Esquema ilustrativo da obtenção dos valores do <i>solidus</i> e do <i>liquidus</i> numa curva de DSC de aquecimento de uma mistura binária (sistema com formação de eutético).....	18
Figura 1.15. Estrutura molecular do Piracetam <sup>49</sup> , Etiracetam <sup>54</sup> e respetivos enantiómeros (S) <sup>55</sup> e (R) <sup>56</sup> .....	19
Figura 1.16. Estrutura cristalina do Levetiracetam, vista ao longo do eixo <i>a</i> a) e respetivo esquema numérico b) <sup>57</sup> .....	19
Figura 1.17. Representação das moléculas de levetiracetam e dos co-formadores utilizados neste trabalho, evidenciando possíveis pontos de interação para a formação de co-cristais.....	24

Figura 1.18. Representação das estruturas cristalinas do (R,S)-ibuprofeno (monoclínico, P <sub>2</sub> <sub>1</sub> , a=14,397(8)Å , b=7,818(4)Å, c=10,506(6)Å, β=99,70(3)°) <sup>75</sup> e do (S)-ibuprofeno (monoclínico, P <sub>2</sub> <sub>1</sub> , a=12,456(4)Å , b=8,0362(5)Å, c=13,533(3)Å, β=112,86(2)°) <sup>76</sup> , vista ao longo do eixo b.....	25
Figura 1.19. Representação das estruturas cristalinas do (R,S)-naproxeno (ortorrômbica, P <sub>bca</sub> , a=25,8301(13) Å , b=15,4939(4) Å, c=5,9465(2) Å) e do (S)-naproxeno, polimorfo I (monoclínico, P <sub>2</sub> <sub>1</sub> , a=7,73541(1) Å, b=5,7181(8) Å, c=13,3641(18) Å, β=93,737(2)°), vistas ao longo do eixo c e a, respectivamente <sup>77</sup> .....	26
Figura 1.20. Representação da estrutura cristalina do (R,S)-cetoprofeno (triclínico, P <sub>1</sub> , a=3,393(8) Å, b=7,741(3) Å, c=6,136(2) Å, α=89,61(3)°, β=94,56(4)° e γ=88,7814°), vista ao longo do eixo b <sup>80</sup> ...	27
Figura 1.21. Representação da estrutura cristalina do (RS)-flurbiprofeno ( triclínico, P <sub>1</sub> , a=9,315(4)Å, b=12,738(9)Å, c=5,823(2)Å, α=83,0(1)°, β=107,2(1)° e γ=107,0(1)°) <sup>68</sup> .....	28
Figura 2.1. Moinho de bolas (Moinho Retsh MM400), usado na obtenção das misturas binários dos diferentes sistemas estudados.....	33
Figura 2.2. Calorimetria diferencial de varrimento de potência compensada (A- Amostra; R- Material de referência; 1-Sensores de Platina (Pt); 2- Fontes de calor independentes), adaptado <sup>90</sup> .....	35
Figura 2.3. DSC de potência compensada, Perkin-Elmer DSC7 e acessórios: a) sistema de refrigeração; b) calorímetro; b') fornos c) interface. ....	36
Figura 2.4. Equipamento de termomicroscopia: <b>A)</b> Placa de aquecimento; <b>B)</b> Microscópio de luz polarizada; <b>C)</b> Câmara de vídeo; <b>D)</b> Computador; <b>E)</b> Interface Gráfica; <b>F)</b> Sistema de controle de refrigeração; <b>G)</b> Interface de computador; <b>H)</b> Monitor; <b>I)</b> Televisão; <b>J)</b> Gravador de vídeo.....	38
Figura 2.5. Aparelho de FTIR-ATR: A – Cristal de diamante; B – Torre de pressão giratória; C – Ponta de pressão e D – Tampa para líquidos voláteis.....	41
Figura 2.6. Espectrômetro Nicolet IN10 MX. ....	43
Figura 2.7. Espetrômetro Labram Hr Evolution Raman.....	44
Figura 3.1. Levetiracetam: Curvas de DSC de aquecimento do composto comercial e de arrefecimento do fundido (cápsula de 30 μL, fechada, m=1,40 mg) e respectivas imagens obtidas por PLTM (ampliação 200x); β=10 °C.min <sup>-1</sup> .....	47
Figura 3.2. Levetiracetam: Resultados de termogravimetria do composto de partida; β=10°C.min <sup>-1</sup> ; m=13,25 mg, atmosfera de azoto.....	48
Figura 3.3. Levetiracetam: Curvas de DSC obtidas para o sólido cristalizado de clorofórmio. ....	49
Figura 3.4. Levetiracetam: Espetros de FTIR-ATR do material obtido por cristalização em clorofórmio (Lev_CF), metanol (Lev_Metanol) e etanol (Lev_Etanol) e o espectro do material de partida (Lev_TCI), para termo de comparação. ....	50
Figura 3.5. Levetiracetam: Curvas de DSC de aquecimento/arrefecimento do material obtido por cristalização em etanol.....	51

Figura 3.6. Levetiracetam: Curvas de DSC de aquecimento/arrefecimento do material obtido por cristalização em etanol Lev_Etanol_B1: $m= 1,39$ mg; Lev_Etanol_B2: $m= 1,09$ mg (cápsulas fechadas de $30 \mu\text{L}$ ).....	52
Figura 3.7. Levetiracetam: Imagens obtidas por PLTM do material obtido por cristalização em etanol ( $1^\circ\text{Aquecimento}$ e $1^\circ\text{Arrefecimento}$ ), $\beta=10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , ampliação 200x.....	54
Figura 3.8. Levetiracetam: Difratogramas de raios-X de pó com variação de temperatura do material cristalizado do fundido (sólido de partida cristalizado em etanol), e etanol e difratograma simulado a partir da estrutura cristalina resolvida do composto de partida <sup>57</sup> .....	55
Figura 3.9. Levetiracetam: Curvas de DSC de duas cápsulas independentes do material obtido por cristalização em metanol; Lev_Metanol_A: $m=1,65$ mg , Lev_Metanol_B: $m=1,40$ mg (cápsulas de $30\mu\text{L}$ fechadas; $\beta=10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ).....	56
Figura 3.10. Levetiracetam: Difratogramas de raios-X de pó com variação de temperatura do material obtido por cristalização em metanol.....	57
Figura 3.11. Levetiracetam: Imagens obtidas por PLTM, para o material obtido por cristalização em metanol; $\beta=10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , ampliação 200x.....	58
Figura 3.12. Representação esquemática da metodologia seguida para preparar uma dispersão do material cristalizado a partir do fundido.....	59
Figura 3.13. Imagens obtidas por PLTM do cristalizado do fundido preparado em estufa, ampliação 200x.....	60
Figura 3.14. Espectros de FTIR-ATR do material cristalizado do fundido, em estufa.....	61
Figura 3.15. Imagens obtidas por PLTM do cristalizado do fundido preparado em estufa numa célula de fluoreto de cálcio (a amplificação utilizada é indicada em cada imagem).....	61
Figura 3.16. Imagens e espectros de diferentes zonas (Z) do material cristalizado do fundido em estufa numa célula de fluoreto de cálcio obtidas por imagiologia em infravermelho. A identificação das diferentes regiões usa a nomenclatura da Figura 3.15. Z' indica uma região com morfologia idêntica a Z, mas não mostrada na Figura 3.15.....	62
Figura 3.17. Imagens obtidas por PLTM de algumas zonas do material cristalizado do fundido, após acondicionamento durante quinze dias no exsiccador.....	63
Figura 3.18. Espectros e imagens obtidos por imagiologia de Raman dos monocristais de levetiracetam formados por cristalização do fundido (zona I", Figura 3.17).....	64
Figura 3.19. Espectros e imagens obtidos por imagiologia de Raman dos monocristais de levetiracetam formados por cristalização do fundido (zona J", Figura 3.17).....	64
Figura 3.20. Espectros e imagens obtidos por imagiologia de Raman de levetiracetam (zonas C, D' e H, Figura 3.15).....	65
Figura 3.21. Imagiologia de Raman: a) espectro do composto de partida, polimorfo I; b) espectro do líquido sobreaquecido.....	65

Figura 3.22. Levetiracetam: Agrupamento dos espectros obtidos por imagiologia de Raman do material cristalizado do fundido.....	66
Figura 3.23. Curvas de DSC do primeiro aquecimento do composto de partida e dos co-formadores usados na investigação de co-cristais, cápsula de 30 $\mu$ L fechada, $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .....	67
Figura 3.24. Curvas de DSC do primeiro aquecimento de levetiracetam e de (S)-ibuprofeno e de misturas de ambos os compostos obtidas por mecanoquímica, $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsula de 30 $\mu$ L fechada.....	69
Figura 3.25. Diagrama de fase sólido-líquido do sistema binário levetiracetam/(S)-ibuprofeno. As linhas a cheio são guias para orientação visual. ....	70
Figura 3.26. Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, do (S)-ibuprofeno e das misturas Lev:(S)-Ibu de proporção (1:9), (1:4), (1:3), (1:2), (2:3), (1:1,25), (1:1,22), (1:1), (1:0,80), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1), obtidas por mecanoquímica.....	71
Figura 3.27. Difractogramas de raios-X pó do co-cristal Lev:(S)-Ibu (1:1) obtidos a diferentes temperaturas e difractogramas simulados a partir das estruturas cristalinas publicadas dos compostos de partida, Lev <sup>57</sup> e (S)-Ibu <sup>76</sup> . ....	72
Figura 3.28. Curvas de DSC do primeiro aquecimento do Lev, (R,S)-Ibu e das misturas de ambos obtidas em moinho de bolas, $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula de 30 $\mu$ L, fechada. ....	73
Figura 3.29. Diagrama de fase sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/(R,S)-ibuprofeno.....	74
Figura 3.30. Espectros de FTIR-ATR dos compostos de partida, Lev e (R,S)-Ibu, e das misturas de ambos, obtidas em moinho de bolas.....	74
Figura 3.31. Representação das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida levetiracetam, (S)-naproxeno e das misturas de ambos) obtidas por mecanoquímica, $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsula fechada de 30 $\mu$ L. ....	75
Figura 3.32. Representação das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida e das misturas de Lev:(R,S)-Npx obtidas em moinho de bolas, $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsula de 30 $\mu$ L fechada.....	76
Figura 3.33. a) Diagrama de fases sólido-líquido do sistema binário levetiracetam/(S)-naproxeno, b) Diagrama de fase sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/ (R,S)-naproxeno.....	77
Figura 3.34. Espectros de FTIR-ATR dos compostos puros e das misturas Lev:(S)-Npx obtidas por mecanoquímica.....	77
Figura 3.35. Espectros de infravermelho dos compostos de partida e das misturas de Lev:(R,S)-Npx obtidas em moinho de bolas. ....	78
Figura 3.36. Curvas de DSC do primeiro aquecimento de levetiracetam e de (S)-cetoprofeno e das misturas de ambos obtidas em moinho de bola; $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsulas de 30 $\mu$ L, fechadas.....	79

Figura 3.37 Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, de ( <i>S</i> )-cetoprofeno e das misturas de diferentes proporções.....	80
Figura 3.38. Curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros, levetiracetam, ( <i>R,S</i> )-cetoprofeno, e de misturas de ambos obtidas por mecanoquímica; $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula fechada de 30 $\mu\text{L}$ .....	80
Figura 3.39. Curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros levetiracetam, ( <i>R,S</i> )-flurbiprofeno e das misturas de ambos obtidas por mecanoquímica; $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula fechada de 30 $\mu\text{L}$ .....	81
Figura 3.40. a) Diagrama de fases sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/( <i>R,S</i> )-cetoprofeno.....	83
Figura 3.41. a) Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, de ( <i>R,S</i> )-Kp e de diferentes misturas de ambos preparadas por mecanoquímica. b) Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, de ( <i>R,S</i> )-Fbp e de diferentes misturas de ambos preparadas por mecanoquímica.....	84
Figura 3.42. Co-cristal Lev:( <i>S</i> )-Ibu 1:1: (a) Curvas de DSC de primeiro aquecimento, (b) espectros de infravermelho, FTIR-ATR e (c) difratogramas de raios-X de pó do co-cristal, amostra de partida e após ser submetida aos ensaios de estabilidade (durante 2 e 4 meses).....	86





# ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Redes de Bravais e respectivas células unitárias, adaptado <sup>5,8</sup> .....	5
Tabela 1.2. Metodologias clássicas para a pesquisa de polimorfos (e de outras formas sólidas), adaptado <sup>6</sup> .....	8
Tabela 1.3. Algumas definições de co-cristal encontradas na literatura.....	13
Tabela 1.4. Dados cristalográficos da estrutura cristalina publicada para o Levetiracetam <sup>57</sup> .....	20
Tabela 1.5. Parâmetros de geometria das ligações de Hidrogénio (Å, °) na estrutura cristalina publicada do Levetiracetam <sup>57</sup> .....	20
Tabela 1.6. Informações cristalográficas dos co-cristais de levetiracetam reportadas na literatura. ...	22
Tabela 1.7. Parâmetros termodinâmicos da fusão do composto racémico, polimorfos I e II, e do enantiómero (S) do ibuprofeno presentes na literatura.....	24
Tabela 1.8. Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (R,S)-Ibu <sup>75</sup> , e (S)-Ibu <sup>76</sup> .....	25
Tabela 1.9. Parâmetros termodinâmicos de fusão do composto racémico e do enantiómero (S) do Naproxeno, polímorfo I, presentes na literatura.....	26
Tabela 1.10. Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (R,S)-Npx, e (S)-Npx <sup>77</sup> .....	26
Tabela 1.11. Parâmetros termodinâmicos de fusão do (R,S)-cetoprofeno e (S)-cetoprofeno presentes na literatura. ....	27
Tabela 1.12. Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (R,S)-Kp <sup>80</sup> .....	27
Tabela 1.13. Parâmetros termodinâmicos das diferentes formas sólidas de (R,S)-flurbiprofeno reportados na literatura. ....	28
Tabela 1.14. Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (R,S)-Fbp <sup>68</sup> .....	28
Tabela 2.1. Origem dos compostos utilizados neste trabalho e informações do fornecedor.....	31
Tabela 2.2. Laboratório de aquisição e pureza dos solventes utilizados em ensaios de cristalização. ....	31
Tabela 3.1. Levetiracetam: Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC obtidas para o material obtido por cristalização em clorofórmio. ....	50
Tabela 3.2. Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC obtidas no varrimento de quatro cápsulas independentes de levetiracetam obtido por cristalização em etanol.....	53

Tabela 3.3. Levetiracetam: Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC do material obtido por cristalização em metanol. ....	57
Tabela 3.4. Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC de aquecimento do composto de partida e dos co-formadores usados na investigação de co-cristais de levetiracetam. ....	67
Tabela 3.5. Temperaturas de interesse obtidas a partir das curvas de DSC dos primeiros aquecimentos de levetiracetam, e (S)-Ibu e das misturas de ambos os compostos nas proporções (1:9), (1:4), (1:3), (1:2), (2:3), (1:1,25), (1:1,22), (1:1), (1:0,80), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) obtidas por mecanoquímica.....	69
Tabela 3.6. Temperaturas de interesse das curvas de DSC do primeiro aquecimento do Lev, (R,S)-Ibu e das misturas (1:9), (1:4), (3:7), (2:3), (1:1), (3:2), (7:3), (4:1) e (9:1), obtidas em moinho de bolas. ....	73
Tabela 3.7. Temperaturas de interesse obtidas a partir das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida levetiracetam, (S)-naproxeno e das misturas (1:4), (1:2), (1:1), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) obtidas por mecanoquímica.....	75
Tabela 3.8. Temperaturas de interesse das curvas de DSC dos primeiros aquecimentos dos compostos de partida e das misturas de Lev:(R,S)-Npx de proporções de (1:9), (1:4), (3:7), (1:1), (3:2), (7:3), (4:1) e (9:1) obtidas em moinho de bolas. ....	76
Tabela 3.9. Coeficientes de atividade do levetiracetam e (S)-naproxeno calculados para diferentes frações molares de misturæ e respectivas frações molares para o sistema levetiracetam/(S)-naproxeno. ....	78
Tabela 3.10. Temperaturas de interesse das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros levetiracetam, (R,S)-cetoprofeno e de misturas nas proporções (1:9), (1:4), (1:2), (2:3), (1:1), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) obtidas por mecanoquímica. ....	81
Tabela 3.11. Temperaturas de interesse das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros levetiracetam, (R,S)-flurbiprofeno e das misturas na proporção de ((9:1), (4:1), (2:1), (3:2), (1:1), (2:3), (1:2), (1:4) e (1:9) obtidas por mecanoquímica .....	82
Tabela 3.12. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC de aquecimento do co-cristal (1:1) submetido a ensaios de estabilidade, $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula 30 $\mu\text{L}$ , fechada, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \leq T \leq 122\text{ }^{\circ}\text{C}$ . ....	87

# ABREVIATURAS

(R,S)-Fbp	Flurbiprofeno, racemato
(R,S)-Ibu	Ibuprofeno, racemato
(R,S)-Kp	Cetoprofeno, racemato
(R,S)-Npx	Naproxeno, racemato
(S)-Ibu	Enantiómero (S) de Ibuprofeno
(S)-Kp	Enantiómero (S) de Cetoprofeno
(S)-Npx	Enantiómero (S) de Naproxeno
API	do inglês <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
Aq	Aquecimento
Ar	Arrefecimento
BCS	do inglês <i>Biopharmaceutical Classification System</i>
CFisUC	Centro de Física da Universidade de Coimbra
CNT	do inglês <i>Classical Nucleation Theory</i>
CSD	do inglês <i>Cambridge Structural Database</i>
DSC	do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTA	do inglês <i>Diferential Thermal Analysis</i>
DTGS	do inglês <i>Deuterated Triglycine Sulfate</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR-ATR	do inglês <i>Fourier transform infrared-attenuated total reflectance</i> reflectance
GRAS	do inglês <i>Generally Recognized as Safe</i>
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICH	do inglês <i>Internacional Conference on Harmonisation</i>
Lev	Levetiracetam
Lev_CF	Levetiracetam cristalizado em Clorofórmio
Lev_Etanol	Levetiracetam cristalizado em Etanol
Lev_Metanol	Levetiracetam cristalizado em Metanol
Lev_TCI	Levetiracetam comercial, adquirido à firma TCI
MCT	do inglês <i>Mercury Cadmium Telluride</i>
NSAID	do inglês <i>Non-steroidal Anti-Inflammatory Drug</i>
PLTM	do inglês <i>Polarized Light Thermal Microscopy</i>
RH	do inglês <i>Relative Humidity</i>

TG	Termogravimetria
TGA	do inglês <i>Thermogravimetric analysis</i>
$T_{\text{fus}}$	Temperatura de fusão
$T_{\text{máx}}$	Temperatura do máximo
$T_{\text{onset}}$	Temperatura de <i>onset</i>
$T_{\text{trs}}$	Temperatura de transição
u.a.	Unidade arbitrária
UCQFarma	Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
VT-XRD	do inglês <i>Variable Temperature X-ray Diffraction</i>
$x_{\text{Lev}}$	Fração molar de levetiracetam
XRD	do inglês <i>X-ray Diffraction</i>
XRPD	do inglês <i>X-ray Powder Diffraction</i>
$\beta$	Velocidade de varrimento
$\Delta_{\text{fus}}H$	Entalpia de fusão
$\nu_{\text{dif}}$	Frequência dos fotões difundidos
$z$	Número de moléculas contidas numa célula unitária

# RESUMO

Muitos ativos farmacêuticos (APIs) são administrados usando formulações sólidas, por exemplo comprimidos e cápsulas por serem geralmente mais estáveis e seguras. No estado sólido, o mesmo API pode apresentar diferentes formas – polimorfos do composto puro, solvatos, sais e co-cristais – que podem ter diferentes propriedades físico-químicas. Portanto, entender, e se possível controlar, a química do estado sólido de APIs, constitui um importante objetivo no desenvolvimento de formulações farmacêuticas.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação assenta sobre um ativo quiral, o levetiracetam, o enantiómero (*S*) do etiracetam, caracterizado farmacologicamente pela sua atividade anticonvulsivante. O trabalho encontra-se dividido em duas etapas, a primeira das quais incidiu na investigação de polimorfismo do levetiracetam. Não se encontra na literatura, referência a quaisquer polimorfos deste ativo. Foram estudados sólidos obtidos por cristalização do composto em três solventes (clorofórmio, etanol e metanol) e também por arrefecimento de fundidos. Como métodos de estudo foram utilizados a calorimetria diferencial de varrimento (DSC), termogravimetria (TG) termomicroscopia com luz polarizada (PLTM), difração de raios-X de pó (XRPD), espectroscopia de infravermelho com refletância total atenuada (FTIR-ATR), imagiologia de infravermelho e de Raman. Dos resultados obtidos foi possível registrar, pela primeira vez, evidências da existência de polimorfismo, nomeadamente em amostras preparadas por arrefecimento de fundidos.

A segunda etapa deste trabalho incidiu na investigação de co-cristais de levetiracetam. Um co-cristal farmacêutico é composto pelo menos por dois compostos (que quando puros são sólidos à temperatura ambiente), com estequiometria definida, unidos, geralmente por ligações intermoleculares de hidrogénio. Os co-cristais possuem vantagens quando comparados a solvatos e podem ser obtidos, ao contrário dos sais, mesmo que o API não possua grupos ionizáveis, como é o caso do levetiracetam. Foram investigados como co-formadores anti-inflamatórios não-esteróides (NSAIDs), ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno e flurbiprofeno, todos eles pertencentes à classe II do BCS, os quais possuem grupos funcionais capazes de formar heterossintões supramoleculares viáveis com o levetiracetam. Usaram-se quer os racematos dos quatro NSAIDs, quer os enantiómeros *S* dos três primeiros. As misturas binárias levetiracetam:NSAIDs foram obtidas por mecanoquímica, sem adição de solvente. Pretendia-se avaliar a potencialidade desta metodologia para promover co-cristalização enantiosseletiva/diastereosseletiva partindo de racematos do tipo composto racémico usando levetiracetam como agente de resolução. Dada a importância que outras misturas binárias Lev:NSAIDs poderão ter em aplicação farmacêutica (por exemplo, eutéticos),

construíram-se os diagramas de fases binários/pseudo-binários para os sistemas em estudo. Obteve-se no sistema levetiracetam:(S)-ibuprofeno um co-cristal (1:1), com fusão incongruente, identificando-se, também um eutético,  $x_{Lev} = 0,20$ ,  $T_{fus} = 42,0^{\circ}\text{C}$ . Para todos os sistemas investigados (com exceção do (S)-cetoprofeno) foi possível caracterizar misturas eutéticas com potencial para aplicação farmacêutica: Lev:(R,S)-Ibu ( $x_{Lev} = 0,41$ ,  $T_{fus} = 47,2^{\circ}\text{C}$ ); Lev:(S)-Npx ( $x_{Lev} = 0,60$ ,  $T_{fus} = 82,1^{\circ}\text{C}$ ); Lev:(R,S)-Npx ( $x_{Lev} = 0,61$ ,  $T_{fus} = 82,0^{\circ}\text{C}$ ) e Lev:(S)-Kp ( $x_{Lev} = 0,40$ ,  $T_{fus} = 49,8^{\circ}\text{C}$ ).

A mecanoquímica, nas condições utilizadas neste trabalho, não foi eficiente para promover co-cristalização enantiosseletiva/diastereosseletiva partindo dos racematos dos NSAIDs investigados e usando levetiracetam como agente de resolução.

Iniciaram-se ensaios de estabilidade acelerados nas condições indicadas pela *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drugs substances and products Q1A(R2)* sobre o co-cristal 1:1 Lev:(S)-Ibu e sobre a mistura eutética obtida para este sistema. Os resultados indicam que o co-cristal é estável nas condições ensaiadas.

**Palavras-chave:** Levetiracetam, polimorfismo, co-cristal farmacêutico, anti-inflamatórios não-esteróides, co-cristalização enantiosseletiva, DSC, XRPD, FTIR-ATR, PLTM, TG, imagiologia de infravermelho, imagiologia de Raman, ensaios de estabilidade.

# ABSTRACT

Many active pharmaceutical ingredients (API) are administered using solid formulations, such as tablets and capsules, that are, generally, stable and safe. An API may have different solid forms - polymorphs, solvates, salts and co-crystals - which may have different physicochemical properties. Therefore, it is an important goal in pharmaceutical development, to understand and, if possible, to control the solid state chemistry of APIs.

The work presented in this thesis concerns a chiral API, levetiracetam - the *S* enantiomer of etiracetam – which is pharmacologically characterized by its anticonvulsant activity. The thesis is divided in two parts. The first is focused on levetiracetam polymorphism investigation. As far as we are aware, no reference to levetiracetam polymorphs can be found in the literature. Solid samples were prepared by crystallization from three solvents (chloroform, ethanol and methanol) and also by melt crystallization. These samples were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG), polarized light thermomicroscopy (PLTM), X-ray powder diffraction (XRPD), infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR) and by infrared and Raman imaging. From the combined results it was possible to obtain, for the first time, evidence of the existence of polymorphs of levetiracetam, in particular in samples prepared by melt crystallization.

In the second part of this work, research on levetiracetam co-crystals is carried out. A pharmaceutical co-crystal is composed of at least two compounds (which are solids when pure at room temperature), in a defined stoichiometry, joined together usually by intermolecular hydrogen bonds. Co-crystals have advantages when compared to solvates and can be obtained, unlike salts, even if the API does not have ionizable groups (as for levetiracetam). Some nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs, were used as co-formers: ibuprofen, naproxen, ketoprofen and flurbiprofen. All these APIs belong to BCS class II, and have functional groups capable of forming viable supramolecular heterosintons with levetiracetam. Both the racemates of the four NSAIDs and the *S*-enantiomers of first mentioned three substances were used. The NSAIDs + levetiracetam binary mixtures were obtained by neat mechanochemistry. The aim was to evaluate the potential of this methodology to promote enantioselective / diastereoselective co-crystallization, using the NSAIDs racemates (which are all racemic compounds) and levetiracetam as the chiral resolving agent. Attending to the importance that other binary mixtures Lev:NSAIDs may have for pharmaceutical applications (eg. eutectic mixtures), the solid-liquid binary/pseudo-binary phase diagrams for the systems under study were determined. For the levetiracetam:(*S*)-ibuprofen system,

a (1:1) co-crystal with incongruent melting was identified as well as an eutectic mixture,  $x_{Lev} = 0,20$ ,  $T_{fus} = 42,0^{\circ}\text{C}$ . For all the other systems investigated (with the exception of (*S*)-ketoprofen) eutectic mixtures, with potential for pharmaceutical formulations, were also characterized: Lev:(*R,S*)-Ibu ( $x_{Lev} = 0,41$ ,  $T_{fus} = 47,2^{\circ}\text{C}$ ); Lev:(*S*)-Npx ( $x_{Lev} = 0,60$ ,  $T_{fus} = 82,1^{\circ}\text{C}$ ); Lev:(*R,S*)-Npx ( $x_{Lev} = 0,61$ ,  $T_{fus} = 82,0^{\circ}\text{C}$ ) and Lev:(*S*)-Kp ( $x_{Lev} = 0,40$ ,  $T_{fus} = 49,8^{\circ}\text{C}$ ).

Mechanochemistry, under the experimental conditions used in the current work, is not efficient to promote neither enantioselective nor diastereoselective co-crystallization of these NSAIDs racemates and levetiracetam.

Accelerated stability tests were initiated, under conditions stated by ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drugs substances and products Q1A(R2) for the (1:1) Lev:(*S*)-Ibu co-crystal and for the eutectic mixture obtained for this system. The results indicate that the co-crystal is stable under the investigated conditions.

**Keywords:** Levetiracetam, polymorphism, pharmaceutical cocrystal, Nonsteroidal anti-inflammatory, enantioselective crystallization, DSC, XRPD, FTIR-ATR, PLTM, TG, infrared and Raman imaging, stability tests.



# *Capítulo 1*

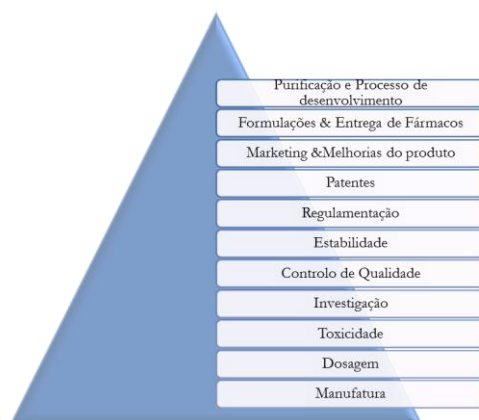
Introdução

---



# INTRODUÇÃO

Grande número de medicamentos são produzidos como formas farmacêuticas sólidas (comprimidos, cápsulas e saquetas), sendo estas compactas e geralmente mais estáveis, quando comparadas com formulações no estado líquido<sup>1-3</sup>. O estudo químico do estado sólido é, assim, uma componente muito importante na investigação e no desenvolvimento farmacêutico, como é evidenciado na Figura 1.1<sup>1</sup>.



**Figura 1.1.** Diagrama representativo da importância da química do estado sólido na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, adaptado<sup>1</sup>.

## 1.1. ESTADO SÓLIDO

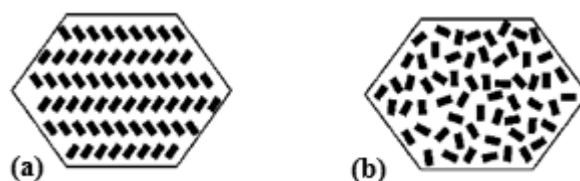
Muitos medicamentos comercializados são compostos por cristais moleculares. O arranjo das moléculas e dos átomos no cristal determina as suas propriedades físicas e, em certos casos, as suas propriedades químicas, influenciando o processamento e a formulação dos ativos farmacêuticos sólidos, bem como a dos excipientes<sup>2,4</sup>. Portanto, é de todo o interesse conhecer a relação estrutura do sólido-propriedade para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas estáveis e biodisponíveis<sup>3,5</sup>.

A noção intuitiva de sólido é a de um corpo rígido em que a separação média entre as unidades constituintes (átomos, moléculas, iões) é pequena, quando comparada à separação média em gases, e onde as posições relativas das unidades constituintes não mudam com o tempo. Num líquido, as distâncias médias entre os átomos/moléculas/iões são da mesma ordem de grandeza das dos sólidos, mas as posições relativas não são fixas.

Consoante a distribuição dos átomos, das moléculas ou dos iões, os sólidos podem ser classificados em sólidos cristalinos ou sólidos amorfos<sup>4</sup>. Uma noção fundamental que permite a

## 1. INTRODUÇÃO

diferenciação entre os sólidos cristalinos e sólidos amorfos é a de ordem de longo alcance <sup>6</sup>. Os sólidos cristalinos, Figura 1.2.a, são compostos por átomos, moléculas ou iões arranjados de uma forma periódica em três dimensões ao longo de direções cristalográficas (longo alcance) <sup>4,6,7</sup>. Nos sólidos amorfos, Figura 1.2.b, as moléculas estão dispostas mais ou menos ao acaso, ou seja, não apresentam ordenação periódica de longo alcance. Exemplos comuns são o vidro e alguns materiais plásticos <sup>4</sup>. Desta forma, o cristal tem uma estrutura caracterizada por uma repetição regular dos componentes, apresentando propriedades de sistemas homogêneos, simétricos e anisotrópicos, enquanto que os sólidos amorfos são homogêneos, isotrópicos e assimétricos.

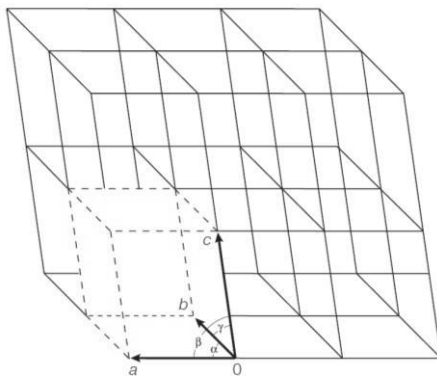


**Figura 1.2.** Representação esquemática de um sólido cristalino (a) e de um sólido amorfo (b), adaptado <sup>6</sup>.

### 1.1.1. ESTRUTURA CRISTALINA

Um cristal ideal é construído pela repetição periódica infinita no espaço de unidades estruturais idênticas. Estas contêm arranjos de moléculas/átomos, mantidos em contacto por interações não-covalentes <sup>5,8</sup>.

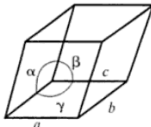
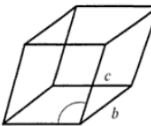
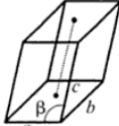
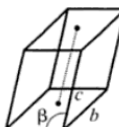
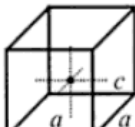
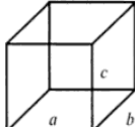
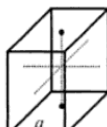
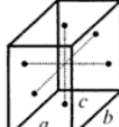
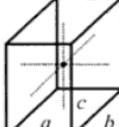

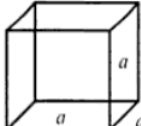
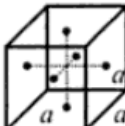
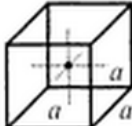
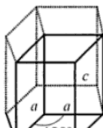
A unidade regular que se repete no cristal por translação e apresenta a mais alta simetria, corresponde à célula unitária. Cada célula unitária é do mesmo tamanho e contém o mesmo número de moléculas ou iões arranjados de forma idêntica <sup>2,5</sup>. As dimensões da célula unitária são caracterizadas por seis grandezas: três valores axiais ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ) que representam o comprimento dos lados e três ângulos interaxiais ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), Figura 1.3 <sup>2</sup>.



**Figura 1.3.** Representação esquemática da célula unitária e respectivos comprimentos axiais e ângulos interaxiais <sup>2</sup>.

As células unitárias podem ser classificadas em sete sistemas cristalinos: triclinico, monoclinico, tetragonal, ortorrômbico, trigonal, cúbico e hexagonal. De acordo com o tipo de preenchimento da célula, estes sistemas também podem ser classificados em primitivo (P), base centrada (C), fase centrada (F) ou corpo-centrado (I) <sup>5,8</sup>. É possível encontrar células de base centrada nos sistemas monoclinico e ortorrômbico, células de fase-centrada em sistemas cúbico e ortorrômbico e células de corpo-centrado em sistemas cúbico, tetragonal e ortorrômbico. Desta forma, é possível obter arranjos de catorze modos diferentes, designados por Redes de Bravais, em homenagem a Auguste Bravais, Tabela 1.1. <sup>2,7,8</sup>.

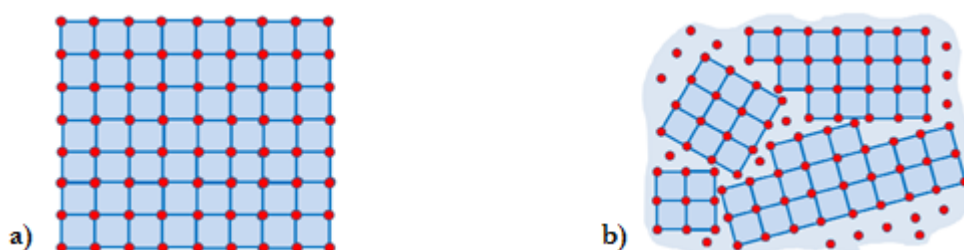
**Tabela 1.1.** Redes de Bravais e respectivas células unitárias, adaptado <sup>5,8</sup>.

Sistema	Parâmetros da célula	Tipos de Rede			
		Primitiva (P)	Base-Centrada (C)	Fase-Centrada (F)	Corpo-Centrado (I)
Triclinico	$a \neq b \neq c \neq 90^\circ$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$				
Monoclinico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta \neq 90^\circ$				
Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
Trigonal	$a = b = c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma \neq 90^\circ$				
Cúbico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$				
Hexagonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$				

## 1. INTRODUÇÃO

No caso específico dos ativos farmacêuticos, as células unitárias mais predominantes pertencem aos sistemas triclínico, monoclínico e ortorrômbico <sup>5</sup>.

Num sólido cristalino, quando o arranjo periódico e repetido de unidades constituintes for perfeito ou se estender a toda a amostra sem interrupção, o resultado é um monocristal: todas as células unitárias se interligam da mesma maneira e possuem a mesma orientação. Os monocristais, Figura 1.4.a, existem na natureza, mas também podem ser produzidos em laboratório, nem sempre com facilidade, pois o seu crescimento necessita de um ambiente cuidadosamente controlado. Por outro lado, as amostras policristalinas são formadas por monocristais dispostos em orientações cristalográficas aleatórias, conforme representado na Figura 1.4.b <sup>9</sup>.



**Figura 1.4.** Representação esquemática de um arranjo monocristalino (a) e policristalino (b), adaptado <sup>9</sup>.

## 1.2. POLIMORFISMO

A palavra polimorfo deriva do grego e significa várias formas. A criação do termo “polimorfismo” é atribuída ao alemão Eilhard Mitscherlich, que em 1822 a usou para descrever diferentes estruturas cristalinas do mesmo composto, nomeadamente, alguns arsenatos e fosfatos <sup>10</sup>. No entanto, o conhecimento do fenómeno já remonta a 1788 quando o químico alemão Martin Heinrich Klaproth observou que a calcite e aragonite são formas cristalinas diferentes do carbonato de cálcio <sup>10,11</sup>. Em 1832, Friedrich Wöhler e Justus von Liebig mostraram pela primeira vez evidência de polimorfismo de um composto molecular, a benzamida <sup>12</sup>.

Os trabalhos de McCrone são considerados marcos históricos em estudos de polimorfismo <sup>13</sup>. McCrone definiu polimorfismo como a possibilidade de um composto cristalizar em duas ou mais fases cristalinas com diferentes arranjos, podendo apresentar a mesma conformação ou conformações diferentes das moléculas <sup>13</sup>. Esta é a definição de polimorfismo mais citada na literatura. Desta forma, cada polimorfo terá uma estrutura cristalina distinta, apresentando propriedades químicas e físicas diferentes, tais como: temperaturas de fusão e sublimação,

capacidade calorífica, condutividade, volume, densidade, viscosidade, dureza do cristal, hábitos cristalinos, cor, solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade, higroscopicidade, entre outros <sup>5,14,15</sup>.

O estudo do polimorfismo é de grande importância em domínios onde diferenças de propriedades resultantes da estrutura cristalina afetam a estabilidade e/ou características do produto final. Merecem destaque as indústrias farmacêutica, agroquímica, de alimentos, de pigmentos e de explosivos <sup>6</sup>.

O polimorfismo é comum em compostos farmacêuticos. Embora o fenômeno não seja suficientemente bem compreendido para permitir a previsão dos ativos que apresentarão polimorfismo, há fortes evidências de que alguns são mais suscetíveis que outros <sup>5</sup>.

A indústria farmacêutica requer um elevado controle das formas polimórficas dos diferentes ativos. O exemplo que segue é muito conhecido por demonstrar as consequências dessa falta de controle. O Ritonavir, também conhecido como Norvir<sup>®</sup>, é um fármaco usado para o tratamento de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana-1, HIV-1, atuando através da inibição de HIV-1 protease. O Ritonavir foi descoberto pela primeira vez no final de 1992, na forma polimórfica I. Nessa altura, não foram encontradas outras formas cristalinas e em 1996 o fármaco foi aprovado e introduzido no mercado em cápsulas “gelatinosas” e em soluções orais. No início de 1998 alguns dos lotes deste fármaco não foram aprovados nos testes de dissolução. Investigação deste fenômeno revelou uma nova forma cristalina de Ritonavir. Esta nova forma, denominada forma II, é menos solúvel, e por conseguinte, termodinamicamente mais estável. A baixa solubilidade da forma II quando comparada com o polimorfo I, resultou na precipitação do fármaco e na diminuição da taxa de dissolução relativamente à forma inicialmente usada na formulação. Deste modo, o fármaco foi retirado do mercado e após um esforço e uma despesa consideráveis, uma nova formulação do Ritonavir foi desenvolvida e apresentada à *US Food and Drug Administration*, FDA, sendo esta última aprovada e introduzida no mercado <sup>2</sup>.

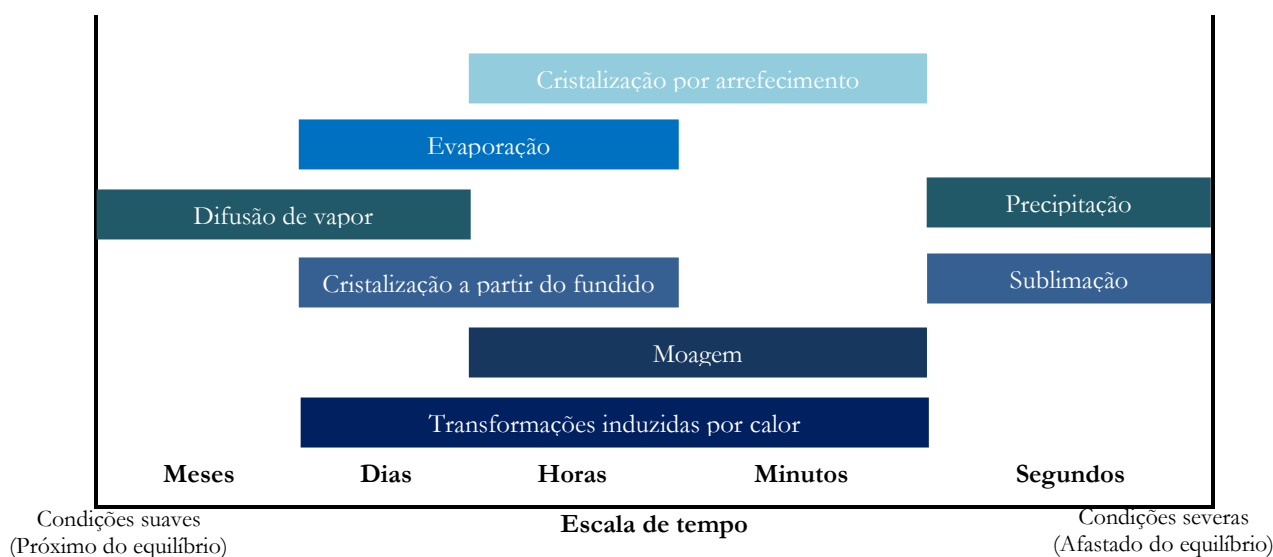
Assim, nos últimos anos, observou-se um interesse acrescido em métodos para a pesquisa e preparação de polimorfos e de outras formas sólidas, que foi impulsionado pela tomada de consciência da importância do polimorfismo (e da diversidade de novas formas sólidas), e pela obrigação de identificar o maior número possível de formas sólidas de uma substância de interesse, de modo consistente e confiável <sup>8</sup>. É de todo o interesse usar diferentes metodologias na pesquisa de diferentes polimorfos, uma vez que o método influencia consideravelmente a forma que é produzida. Alguns métodos de obtenção de polimorfos, que podem também ser usados na pesquisa de outras formas sólidas, são apresentados na Tabela 1.2, juntamente com os respectivos graus de liberdade <sup>6,8</sup>.

## 1.INTRODUÇÃO

**Tabela 1.2.** Metodologias clássicas para a pesquisa de polimorfos (e de outras formas sólidas), adaptado <sup>6</sup>.

Metodologia	Graus de liberdade
(i) Cristalização por arrefecimento de solução	Solvente ou mistura de solventes, perfil de arrefecimento, temperatura inicial e final, concentração.
(ii) Evaporação	Solvente ou misturas de solventes, concentração inicial, velocidade de evaporação, temperatura, pressão, humidade relativa, área de superfície do recipiente de evaporação.
(iii) Precipitação	Solvente, anti-solvente, velocidade de adição, ordem de mistura, temperatura.
(iv) Difusão de vapor	Solvente, temperatura, concentração.
(v) Equilíbrio de suspensão (“ <i>slurry ripening</i> ”)	Solvente ou mistura de solventes, temperatura, solubilidade, programas de temperatura, tempo de incubação
(vi) Cristalização a partir do fundido	Programas de temperatura (min., máx., gradientes)
(vii) Transformações induzidas por calor	Programas de temperatura.
(viii) Sublimação	Gradiente de temperatura, pressão, tipo de superfície.
(ix) Desolvatação de solvatos	(a) Secagem: temperatura, pressão. (b) Em suspensão: ver (v).
(x) Moagem	Tempo de moagem, frequência de vibração, adição de solvente.
(xi) Mudança de pH	Temperatura, velocidade de mudança, relação ácido/base conjugado.
(xii) Liofilização	Solvente, concentração inicial, programas de temperatura e pressão.

Como princípio geral, metodologias de processamento mais lento favorecem a formação de polimorfos cristalinos estáveis, enquanto que metodologias de processamento mais rápido são mais propensas a produzir polimorfos metaestáveis, formas cristalinas instáveis e sólidos amorfos, Figura 1.5 <sup>16</sup>.



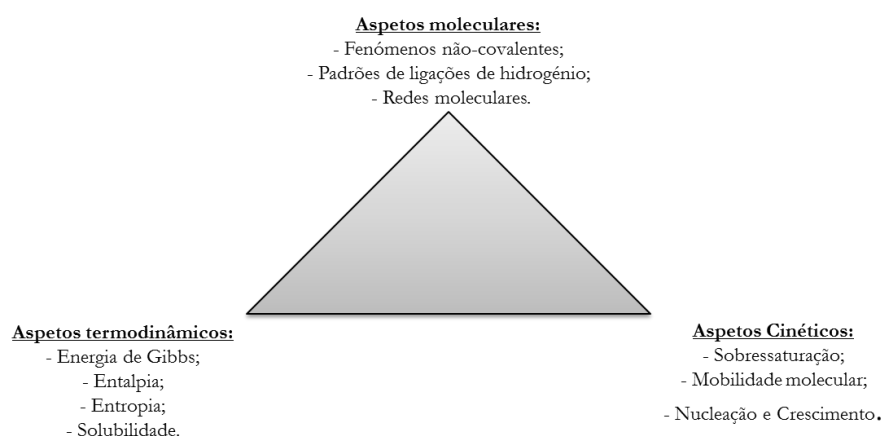
**Figura 1.5.** Metodologias para a obtenção de novas formas sólidas que mostram a escala de tempo como factor de favorecimento de polimorfos estáveis ou metaestáveis, adaptado <sup>8</sup>.



Atualmente o método mais usado na indústria farmacêutica para a preparação de novas formas cristalinas é a cristalização a partir de solução, uma vez que, por exemplo, se pode obter, em muitos casos, diferentes polimorfos por mudança do solvente. A cristalização a partir dos fundidos, que também será abordada neste trabalho, pode ser limitada pela estabilidade térmica do ativo farmacêutico, e pela quantidade pequena que poderá ser produzida <sup>8</sup>.

### 1.2.1. POLIMORFISMO: ASPETOS TERMODINÂMICOS E CINÉTICOS

As reações em fase sólida podem ser classificadas em transformações físicas e químicas. As transformações físicas compreendem reações de solvatação/desolvatação, cristalização/amorfização e mudanças polimórficas. A ocorrência destas transições envolve aspetos termodinâmicos, cinéticos e moleculares, conforme ilustrado na Figura 1.6 <sup>17</sup>.



**Figura 1.6.** Representação esquemática dos fenómenos que governam as transições em fase sólida, adaptado <sup>17</sup>.

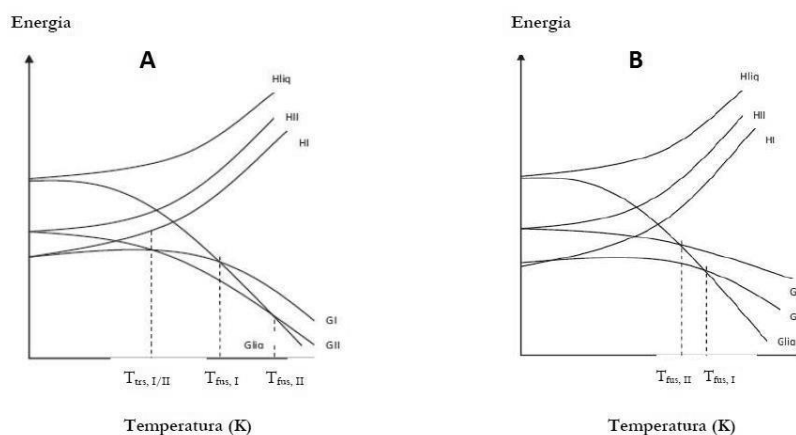
### ASPETOS TERMODINÂMICOS: ENANTIOTROPIA E MONOTROPIA

O facto dos polimorfos de uma dada substância apresentarem diferentes arranjos das moléculas no retículo cristalino, resulta em que tenham diferentes energias de interação no estado sólido e diferentes energias de Gibbs. Sob um dado conjunto de condições de pressão e temperatura, a forma polimórfica de menor energia de Gibbs é mais estável termodinamicamente e as outras tendem a transformar-se nela.

Em termos de estabilidade termodinâmica, Lehmann, em 1888, cunhou os termos enantiotropia e monotropia para distinguir dois tipos diferentes de comportamento polimórfico <sup>18</sup>.

## 1. INTRODUÇÃO

Considera-se um sistema enantiotrópico quando a mudança de uma forma cristalina para outra é de caráter reversível, abaixo das temperaturas de fusão. Por outro lado, um sistema é monotrópico se a mudança de uma forma cristalina para outra não tiver caráter reversível. Os diagramas de fase de energia de Gibbs-temperatura, a pressão constante, para sistemas enantiotrópico e monotrópico encontram-se ilustrados na Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Diagrama de fases para dois polimorfos com comportamento termodinâmico: (A) enantiotrópico; (B) monotrópico, a pressão constante, adaptado <sup>19</sup>.

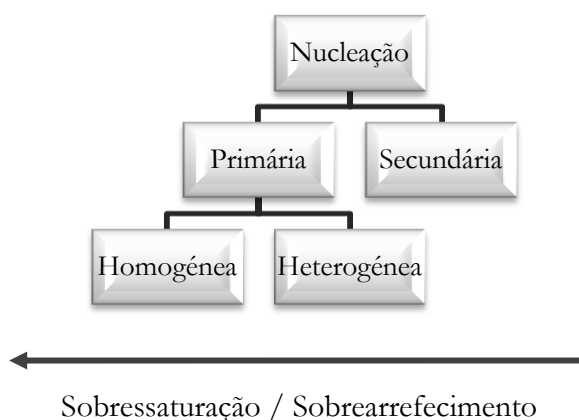
Na Figura 1.7,  $G$  representa a energia de Gibbs,  $H$  a entalpia,  $T_{\text{trs}}$  a temperatura de transição e  $T_{\text{fus}}$  a temperatura de fusão. A Figura 1.7 (A) representa um sistema enantiotrópico para dois polimorfos I e II: as curvas  $G_I$  e  $G_{II}$  cruzam-se no ponto de transição ( $T_{\text{trsl/II}}$ ) que se localiza abaixo da temperatura de fusão dos dois polimorfos, sendo que neste ponto o polimorfo I e o polimorfo II podem coexistir como misturas em equilíbrio ( $G_I = G_{II}$ ), tendo a mesma estabilidade. A curva de  $G_{\text{liq}}$  representa a fase líquida. A sua interseção com  $G_I$  e  $G_{II}$ , corresponde aos pontos de fusão do polimorfo I ( $T_{\text{fusI}}$ ) e do polimorfo II ( $T_{\text{fusII}}$ ), respetivamente, à pressão considerada. Assim, antes da transição a forma termodinamicamente estável é a I ( $G_I < G_{II}$ ) e depois da transição é a forma II ( $G_{II} < G_I$ ), até a sua temperatura de fusão. No sistema monotrópico, Figura 1.7 (B), apenas um polimorfo é estável abaixo da temperatura de fusão, forma I, ou seja  $G_I$  é sempre inferior a  $G_{II}$ . As curvas de energia de Gibbs das formas I e II em função da temperatura nunca se cruzam antes da fusão e não se observa a transformação reversível entre as duas formas. A forma II, termodinamicamente metaestável poderá transformar-se espontaneamente em I, dependendo da cinética do processo, a qualquer temperatura abaixo do seu ponto de fusão, enquanto que a transformação inversa nunca ocorrerá <sup>6</sup>.

Do ponto de vista farmacêutico, a forma mais estável termodinamicamente não é sempre a mais desejada, uma vez que tendo estabilidade termodinâmica superior será menos solúvel e, por conseguinte, terá menor biodisponibilidade oral <sup>6</sup>.

## ASPETOS CINÉTICOS: NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO DE CRISTAIS

Na indústria farmacêutica, diferentes polimorfos são como se referiu, muitas vezes preparados por recristalização a partir de soluções, empregando diferentes solventes e diferentes condições experimentais. A cristalização a partir de soluções e de fundidos, por exemplo, é bem descrita como um processo em duas etapas que incluem a nucleação e o crescimento de cristais, as quais determinam a natureza do polimorfo obtido. No entanto, a nucleação é normalmente, a etapa mais importante na formação de um dado polimorfo <sup>5,6</sup>.

A nucleação é a formação de núcleos (embriões ou sementes) numa solução sobressaturada ou num fundido sobrearrefecido, por exemplo, que podem atuar como centros de cristalização. A nucleação pode ser classificada como nucleação primária, quando inicialmente não existem cristais do sólido de interesse presentes no meio, e nucleação secundária. Neste caso a nucleação é induzida por cristais do material desejado pré-existentes na solução ou que são deliberadamente adicionados como sementes <sup>6</sup>. A nucleação primária pode ser subdividida em homogénea, quando os núcleos de cristalização se geram espontaneamente, ou heterogénea se os núcleos de cristalização são formados nas interfaces ou superfícies, tais como partículas de pó ou paredes do recipiente, Figura 1.8. Na prática, a nucleação heterogénea e/ou nucleação secundária são as mais comuns <sup>17</sup>.



**Figura 1.8.** Representação esquemática dos diferentes tipos de nucleação.

A Teoria Clássica de Nucleação (CNT) permite interpretar transições de primeira ordem que envolvem a nucleação homogénea de cristais de uma solução sobressaturada/fundido sobrearrefecido. Esta teoria é baseada no trabalho de Gibbs, Becker, Doring e Volmer. A nucleação envolve a formação de agregados que excedam um tamanho crítico, sendo desta forma considerados estáveis, o que ocorrerá para um determinado valor de sobressaturação/sobrearrefecimento. A relação de sobressaturação/sobrearrefecimento é uma medida do afastamento do equilíbrio experimentado pelo sistema. A velocidade de nucleação de cristais,  $J$ , é o número de núcleos cristalinos que se formam a partir de um meio sobressaturado por unidade de tempo e área. De acordo com a CNT a velocidade de nucleação de cristais é expressa pela equação  $J = A \exp(-B/\ln^2 S)$ , onde  $A$  e  $B$  são considerados os parâmetros cinético e termodinâmico, respetivamente e  $S$  a relação de sobressaturação. O parâmetro  $B$  inclui fatores que dependem do meio, nomeadamente a tensão interfacial.

A sobressaturação / sobrearrefecimento pode ser atingida por vários métodos tais como o arrefecimento a partir do fundido, sublimação, evaporação de solvente ou arrefecimento da solução, alteração do pH da solução, bem como com a presença ou adição de aditivos ou reação química que mude a natureza do soluto <sup>5,6</sup>.

Quando o núcleo cristalino se forma e é estável, inicia-se o processo de crescimento, e eventualmente, torna-se num cristal visível. A cinética da cristalização depende da velocidade de formação do núcleo, e da velocidade de crescimento dos cristais. A forma e o tamanho dos cristais dependem da relação destes dois factores. Assim, por exemplo, quanto mais lento for o arrefecimento, maiores serão os cristais, e quanto mais rápido o arrefecimento menores serão os cristais <sup>17,20,21</sup>.

### 1.3. CO-CRISTAIS

Na literatura académica o conceito de co-cristal tem sido expresso de diferentes modos ao longo do tempo, Tabela 1.3. No entanto, todos concordam que co-cristais são materiais cristalinos constituídos pelo menos por dois componentes diferentes. Na definição da FDA, 2013 <sup>22</sup>, que adotamos, co-cristais são sólidos formados por dois ou mais componentes, em proporções estequioméricas, os quais são sólidos quando puros à temperatura ambiente e não interatuam para formar sais.

Tabela 1.3. Algumas definições de co-cristal encontradas na literatura.

Autor	Definição de co-cristal	Ano	Referência
	- Compostos construídos a partir de espécies moleculares neutras (todos os sólidos contendo iões, incluído os iões metais de transição, são excluídos).		
Aakerøy, C. B.	- Feitos a partir de reagentes que são sólidos à temperatura ambiente; - Materiais cristalinos estruturalmente homogêneos que contêm dois ou mais blocos de construção neutros que estão presentes em quantidades estequiométricas.	2005	23
Jones, W.	Complexo cristalino de dois ou mais constituintes moleculares neutros, ligados entre si por interações não-covalentes, normalmente ligações de hidrogénio.	2006	24
Zaworotko, M. J.	São formados entre um API molecular ou iónico e um co-formador, que é um sólido sob condições ambientais.	2006	25
Bond, A.	Sinónimo de cristal molecular multicomponente.	2007	26
Childs, S. L.	Material cristalino composto por dois ou mais componentes usualmente numa proporção estequiométrica, sendo cada componente um átomo, um composto iónico ou uma molécula.	2007	27
Stahly, G. P.	Complexo molecular que contém duas ou mais moléculas diferentes na mesma estrutura do cristal.	2007	28
Nangia, A.	Compostos multicomponentes no estado sólido que se mantêm ligados através de interações intermoleculares.	2008	29

Um co-cristal farmacêutico é composto por um API e por um composto neutro ou iónico (também referido como co-formador). A interação que leva à formação de um co-cristal encontra-se esquematizada na Figura 1.9: um co-cristal (neste caso, farmacêutico) resulta da interação de um API com um co-formador, sem transferência de protão, o que o diferencia de um sal <sup>22</sup>. A FDA sugere que a formação de sal será excluída se a diferença de pKa do componente básico ( $pK_{a_{base}}$ ) e do componente ácido ( $pK_{a_{ácido}}$ ) for inferior a 1. De referir que o número de contra-iões aceitáveis para formação de sais de APIs é muito menor do que o de co-formadores que é possível utilizar na pesquisa de co-cristais.

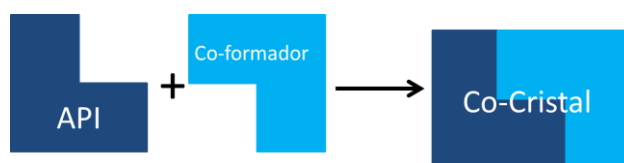
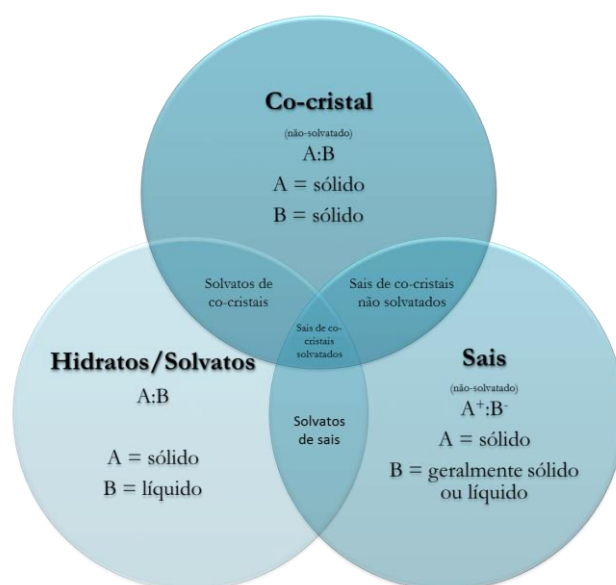


Figura 1.9. Representação esquemática de formação de co-cristal farmacêutico.

## 1.INTRODUÇÃO

Na Figura 1.10 está esboçada uma correlação entre sólidos cristalinos multicomponentes, evidenciando as diferenças entre co-cristais e hidratos/solvatos e sais. A principal diferença entre solvatos e co-cristais é o estado físico dos componentes puros: se uma das substâncias se apresenta líquida à temperatura ambiente, os cristais são designados como solvatos; se ambas as substâncias são sólidas à temperatura ambiente, os cristais são designados por co-cristais. Esta diferença pode parecer insignificante, mas pode bastar para afetar profundamente a estabilidade, a formulação e as propriedades físicas de um API. Os co-cristais tendem a ser mais estáveis do que solvatos ou hidratos <sup>25,30,31</sup>. De facto, uma vez que os co-formadores são sólidos e não são suscetíveis de evaporação após formulação farmacêutica, a separação de fases e outras alterações físicas são menos prováveis de ocorrer <sup>32</sup>.



**Figura 1.10.** Esquema ilustrativo das correlações entre sólidos cristalinos multicomponentes, adaptado <sup>31</sup>.

Os co-cristais tem um elevado interesse na indústria farmacêutica porque permitem modificar e melhorar propriedades químicas e físicas de um API, tais como estabilidade física e química, incremento da solubilidade, fluidez do pó, compressibilidade e higroscopicidade, sem que ocorra quebra de ligações covalentes <sup>8,25</sup>.

Outra vantagem valiosa do uso de co-cristais é o aumento do ciclo de vida de antigos APIs, com a possibilidade de criação de novas patentes e proteção da propriedade intelectual <sup>25,33,34</sup>. Os co-cristais também são potencialmente vantajosos em terapia dual, também conhecida por terapia de combinação, junção de dois ou mais fármacos numa só dosagem. Esta abordagem pode ser vantajosa no que diz respeito a doenças crónicas, uma vez que permite a redução do número de tomas que o paciente tem de ingerir. Terá obviamente, de ser confirmado que a combinação dos dois APIs não afeta a sua atividade farmacológica <sup>35,36</sup>.

### 1.3.1. PESQUISA DE CO-CRISTAIS

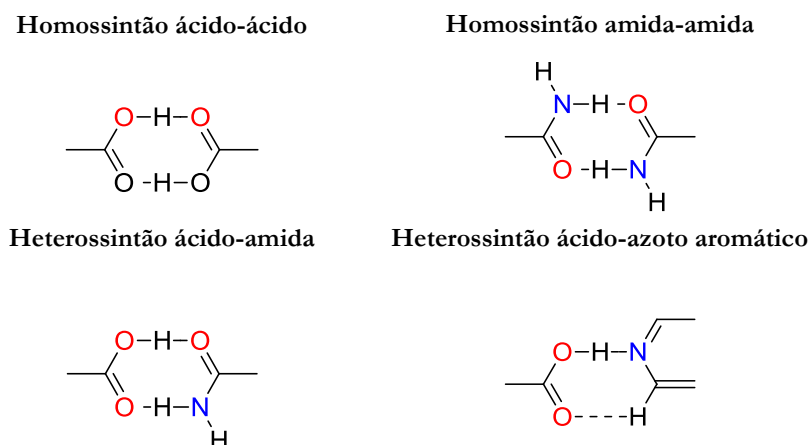
Pepinsky introduziu o conceito de engenharia de cristais em 1955<sup>37</sup>, o qual foi implementado por Schmidt no contexto das reações fotoquímicas no estado sólido orgânico<sup>38</sup>. Desiraju, posteriormente, definiu engenharia de cristais como a compreensão das interações moleculares no contexto de empacotamento cristalino e a utilização desse conhecimento na conceção de novos sólidos com propriedades químicas e físicas desejadas<sup>39</sup>.

Um co-cristal farmacêutico pode ser concebido através da engenharia de cristais com a intenção de melhorar as propriedades do estado sólido do API, sem afetar a sua atividade intrínseca. A engenharia de cristais oferece um paradigma para o desenvolvimento rápido de co-cristais farmacêuticos.

Nos co-cristais podem estabelecer-se diferentes tipos de interações intermoleculares (ligações de hidrogénio, interações  $\pi$ - $\pi$ , interações de van der Waals). As ligações de hidrogénio são as interações mais importantes na formação de co-cristais, uma vez que possuem um forte carácter direcional: as ligações mais fortes ocorrem entre um átomo de hidrogénio e dois átomos bastantes electronegativos (N, O, F), de modo que o hidrogénio sirva de “elo” entre os átomos com os quais interage<sup>30,32</sup>.

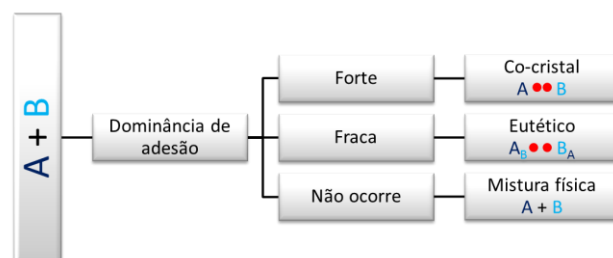
Numa fase inicial deve-se ter em atenção os grupos funcionais presentes na molécula do API para posteriormente seleccionar os possíveis co-formadores que tenham funcionalidades complementares. Mas temos de ter em atenção que os co-cristais farmacêuticos são usados pelo Homem, e portanto o co-formador não deve ser prejudicial: terá de ser reconhecido pela FDA como seguro. Compostos classificados como GRAS, *Generally Recognized as Safe*, e outros APIs são candidatos privilegiados a co-formadores<sup>40,41</sup>.

A unidade estrutural que liga as duas moléculas e leva à formação do co-cristal designa-se por sintão supramolecular. Portanto, os co-cristais são estruturas supramoleculares formadas por homo ou heterosintões supramoleculares, que resultam de ligações entre moléculas que possuem grupos funcionais complementares<sup>32,42</sup>. Na Figura 1.11 apresentam-se dois exemplos de homossintões (ácido-ácido e amida-amida) e também dois exemplos de heterossintões (ácido-amida e ácido-azoto aromático).



**Figura 1.11.** Exemplos de homo e heterossintões supramoleculares envolvendo ligações de hidrogénio, adaptado <sup>32</sup>.

Mesmo escolhendo os co-formadores de modo a originar com o ativo sintões supramoleculares viáveis, por vezes não se obtém um co-cristal, mas sim um eutético ou uma mistura física simples, Figura 1.12. Isto resulta das interações que são estabelecidas. No caso dos co-cristais a dominância de adesão é forte, enquanto que nos eutéticos é fraca (há miscibilidade apenas em fase líquida) e na mistura física simples não ocorre qualquer tipo de interação. Poderá haver também, obviamente, a formação de soluções sólidas <sup>43</sup>.



**Figura 1.12.** Tipos de dominância de adesão que podem ocorrer entre dois compostos em fase sólida, adaptado <sup>43</sup>. É excluída a formação de soluções sólidas.

Até à data, foram relatadas várias metodologias para síntese de co-cristais. Os métodos de formação mais comuns baseiam-se na cristalização por evaporação lenta do solvente e na moagem, como se mostra na Figura 1.13 <sup>44</sup>.

O método de cristalização por evaporação lenta do solvente é de grande importância, uma vez que é o mais propício à formação de monocristais, mas não satisfaz os critérios de “tecnologia verde”, devido ao elevado consumo de solventes. É também recomendado o conhecimento do



diagrama de fases ternário – ativo, co-formador, solvente – para garantir a obtenção do co-cristal puro. A moagem a seco ou assistida por uma quantidade vestigial de líquido é muito usada, uma vez que o uso de solvente é mínimo e o tempo de formação de co-cristal é mais curto em comparação com a cristalização por evaporação lenta do solvente <sup>25,30,32</sup>.

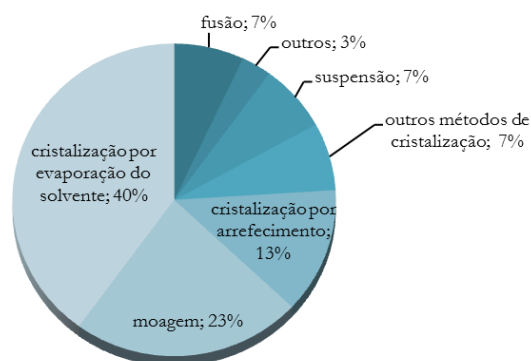


Figura 1.13. Metodologias usadas para co-cristalização, adaptado <sup>44</sup>.

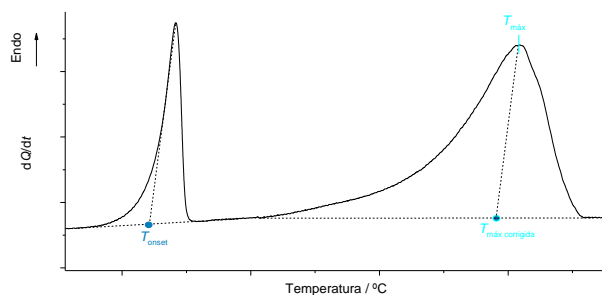
### 1.3.2. DIAGRAMAS DE FASE BINÁRIOS

A investigação da formação de co-cristais é enriquecida com o mapeamento de diagramas de fase sólido-líquido dos dois componentes em análise. Os diagramas de fase binários do API e potenciais co-formadores são de extrema importância, uma vez que fornecem provas conclusivas da formação de co-cristal, caso aconteça, e da sua estequiometria, e também permitem a identificação de outras composições binárias potencialmente úteis em aplicações farmacêuticas, tais como misturas eutéticas. <sup>5,46</sup>.

Um diagrama de fase sólido-líquido de um sistema binário, a pressão constante, é um gráfico que apresenta as condições termodinâmicas, temperatura, composição, em que fases sólidas e líquidas podem ocorrer no estado de equilíbrio. No diagrama de fase sólido-líquido merecem destaque as duas linhas de equilíbrio: (i) *liquidus*, é a curva que separa as áreas onde não há sólido presente daquelas nas quais sólido e líquido coexistem, e indica, a cada temperatura, a composição de fase líquida em equilíbrio com o sólido. É a curva que define o fim da fusão de um sólido; (ii) *solidus*, representa a divisão entre as áreas onde estão presentes sólido e líquido e aquela onde existe apenas sólido, representando, portanto o início da fusão do sólido. No intervalo entre o *liquidus* e o *solidus*, fases líquida e sólida encontram-se em equilíbrio. Os diagramas de fase normalmente são obtidos pela análise das curvas de DSC de aquecimento de misturas dos dois compostos de

## 1. INTRODUÇÃO

diferentes composições <sup>46</sup>. A linha do *solidus* é obtida pelo  $T_{\text{onset}}$  da curva de DSC e o *liquidus* pela  $T_{\text{máx}}$  do último pico de fusão corrigido da mesma curva. Na Figura 1.14 exemplifica-se a determinação numa curva de aquecimento para uma mistura binária, em que se observa um ponto invariante eutético. Obviamente, cada curva deve ser analisada caso a caso para interpretação correta dos fenómenos observados.



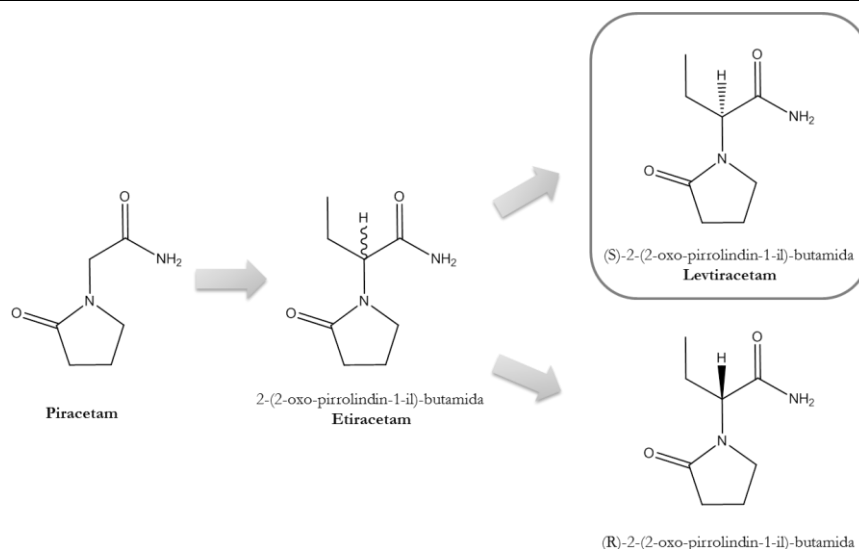
**Figura 1.14.** Esquema ilustrativo da obtenção dos valores do *solidus* e do *liquidus* numa curva de DSC de aquecimento de uma mistura binária (sistema com formação de eutético).

## 1.4. LEVETIRACETAM

O levetiracetam (Lev), (S)-2-(2-oxo-pirrolindin-1-il)-butamida foi recentemente aprovado pela US *Food and Drug Administration* (FDA), sendo comercializado como Keppra<sup>®</sup>. É um medicamento anticonvulsivante usado no tratamento da epilepsia e da dor crónica ou neuropática, mas também possui benefícios para outras condições, psiquiátricas e neurológicas (transtornos bipolares e enxaquecas) <sup>47-49</sup>

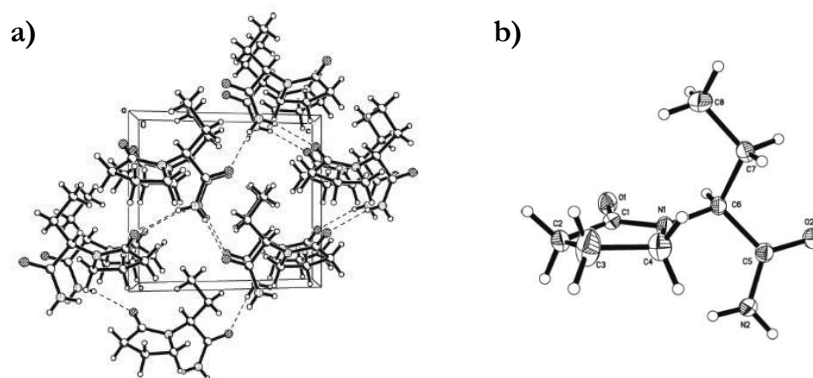
O levetiracetam é o enantiómero de configuração (S) do etiracetam, estruturalmente semelhante ao protótipo piracetam, droga nootrópica, Figura 1.15. Dos dois possíveis enantiómeros do Etiracetam, apenas o de configuração (S), levetiracetam, possui atividade anticonvulsivante <sup>48,50,51</sup>.

O levetiracetam pertence à classe III do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) (elevada solubilidade aquosa e baixa permeabilidade) <sup>52,53</sup>, sendo altamente solúvel em água (104,0 g/100 mL), solúvel em clorofórmio (65,3 g/100 mL) e metanol (53,6 g/100 mL), ligeiramente solúvel em etanol (16,5 g/100 mL), fracamente solúvel em acetonitrilo (5,79 g/100 mL) e insolúvel em *n*-hexano (dados a 25 °C) <sup>50</sup>.



**Figura 1.15.** Estrutura molecular do Piracetam <sup>49</sup>, Etiracetam <sup>54</sup> e respetivos enantiómeros (*S*) <sup>55</sup> e (*R*) <sup>56</sup>.

Na literatura encontra-se descrita uma estrutura cristalina do levetiracetam, representada na Figura 1.16. Na Tabela 1.4 e Tabela 1.5 apresentam-se alguns dados cristalográficos e a geometria das ligações de hidrogénio, respetivamente <sup>57</sup>. O grupo NH<sub>2</sub> da amida está envolvido em ligações de hidrogénio como dador, ligando-se aos grupos carbonilo da amida e do anel de duas outras moléculas de levetiracetam. As outras ligações de hidrogénio indicadas na Tabela 1.5 têm ângulos de ligações pouco favoráveis.



**Figura 1.16.** Estrutura cristalina do levetiracetam, vista ao longo do eixo *a* **a)** e respetivo esquema numérico **b)** <sup>57</sup>.

## 1. INTRODUÇÃO

**Tabela 1.4.** Dados cristalográficos da estrutura cristalina publicada para o Levetiracetam <sup>57</sup>.

Sistema Cristalino	Grupo Espacial	Parâmetros da célula	<i>z</i>
Monoclínico	P2 <sub>1</sub>	$a = 6,272(5)\text{Å}$ $b = 7,993(5)\text{Å}$ $c = 9,199(9)\text{Å}$ $\beta = 108,645(9)^\circ$	2

**Tabela 1.5.** Parâmetros de geometria das ligações de Hidrogénio (Å, °) na estrutura cristalina publicada do Levetiracetam <sup>57</sup>.

D---H...A	D---H	H...A / Å	D...A / Å	D---H...A
N2---H2A...O2	0,86	2,15	2,995(5)	168
N2---H2B...O1	0,86	2,23	3,038(5)	156
N2---H2B...N1	0,86	2,39	2,771(5)	107
C6---H6...O1	0,98	2,39	2,840(5)	107
C8---H8C...N1	0,96	2,39	2,919(6)	100

Vários estudos têm sido feitos na investigação de novas formas sólidas de levetiracetam, não tendo sido encontrada na literatura qualquer informação sobre a identificação de polimorfos deste composto.

Relativamente à formação de co-cristais, até ao momento existem vinte e dois co-cristais conhecidos. Numa primeira referência foram identificados co-cristais com os co-formadores ácido D-tartárico (DTA), ácido 2,4-dihidroxibenzóico (2,4 DHBA), ácido (*S*)-mandélico (SMA) e o ácido mandélico racémico ((*R,S*)MA) <sup>55</sup>. Os catorze co-cristais identificados noutra trabalho possuem como co-formadores o ácido 2,2-dimetilsuccínico (DMSA), ácido 2,4-dihidroxibenzóico (DHBA), ácido 3-nitrobenzóico (3NBA), ácido 4-nitrobenzóico (4NBA), ácido 5-nitroisoftálico (9), ácido 5-hidroxisoftálico (10), ácido citracónico (11), ácido oxálico (OXA), ácido oxaloacético (13), 3,4,5-trihidroxibenzoato de metilo (14), acetoacetamina (15), 3-metilbutamida (16), 4-clorobenzaldeído (17) e ácido gálico etil éster (18) <sup>58</sup>. Os quatro co-cristais referidos recentemente possuem como co-formadores ácido (*R*)-metilsuccínico (*R*<sub>5</sub>), o ácido (*S*)-metilsuccínico (*S*<sub>5</sub>), o (*S*)-ibuprofeno (*S*<sub>9</sub>) e o (*R*)-flurbiprofeno (*R*<sub>10</sub>) <sup>59</sup>.

Na Tabela 1.6 encontram-se as informações cristalográficas dos co-cristais de levetiracetam encontradas na literatura e metodologia usada para a sua obtenção.

---

## CO-CRISTALIZAÇÃO ENANTIOSSELETIVA

A resolução quiral é uma prática comum na indústria biomédica e farmacêutica devido ao elevado número de candidatos a fármacos que são quirais. Apesar dos avanços significativos efetuados em síntese assimétrica, uma proporção elevada de moléculas quirais ainda são sintetizadas na forma de mistura racémica <sup>60</sup>. Na maioria dos casos, apenas um enantiómero possui atividade biológica enquanto que o outro não possui ação fisiológica ou, no pior dos casos, tem efeitos indesejados ou até mesmos tóxicos <sup>61</sup>.

Um método de resolução amplamente utilizado, quando o composto de interesse é uma base ou um ácido, é a cristalização através da formação de um par de sais diastereoméricos. Partindo do racemato é adicionado um ácido (ou base), enantiomericamente puro designado por agente de resolução <sup>62</sup>. Os sais diastereoméricos, não estão relacionados simetricamente, apresentando diferentes propriedades físicas, tais como solubilidade. Sob condições apropriadas (natureza do solvente, quantidade do agente de resolução e temperatura) poderá ser possível cristalizar um produto com elevado excesso enantiomérico do composto de interesse <sup>63,64</sup>.

A formação de co-cristais diastereosseletivos envolvendo um ativo racémico e um agente de resolução quiral, é uma via alternativa à formação de sais, particularmente interessante quando a molécula não possui grupos ácidos ou básicos. Obviamente, poderá ocorrer co-cristalização enantiosseletiva: o agente de resolução quiral só co-cristaliza com um dos enantiómeros do racemato de interesse <sup>65</sup>.

Pesquisa bibliográfica usando a *Cambridge Structural Database* (CSD) aponta para que a co-cristalização enantiosseletiva seja muito mais comum do que a diastereosseletiva <sup>59</sup>. T. Leyssen e colaboradores foram bem sucedidos em experiências de resolução quiral por co-cristalização enantiosseletiva em solução <sup>65</sup>, usando levetiracetam como agente de resolução. O levetiracetam co-cristaliza de forma eficaz com os enantiómeros de configuração (*S*) dos ácidos mandélico e tartárico, levando à formação de co-cristal. Já com os enantiómeros de configuração (*R*) não há formação de co-cristal, demonstrando, assim, que a co-cristalização em solução pode ser enantiosseletiva.

## 1. INTRODUÇÃO

Tabela 1.6. Informações cristalográficas dos co-cristais de levotiracetam reportados na literatura.

Co-formador	Fracção molar	Ponto de fusão/°C	Sistema Cristalino	Grupo Espacial	Parâmetros da célula unitária						Metodologia de pesquisa		
					a(Å)	b(Å)	c(Å)	$\alpha$ (°)	$\beta$ (°)	$\gamma$ (°)		V(Å <sup>3</sup> )	Z
1)DTA	1:1	121	ortorrômbico	P2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub>	5,9162(2)	12,9700(6)	20,0643(9)	90	90	90	1539,6	4	Mecanotômica assistida por líquido (40µL)
2)2,4 DHBA	1:1	97	ortorrômbico	P2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub>	6,62318(12)	13,0236(3)	18,4931(3)	90	90	90	1595,17	4	Mecanotômica assistida por líquido (40µL metanol); T tempo=90 min.; Freqüência=30 Hz
3)SMA	1:1	96	monoclínico	P2 <sub>1</sub>	11,9394(11)	5,6442(5)	13,2328(12)	90	109,936(10)	90	838,3	2	T tempo=90 min.; Freqüência=30 Hz
4)(R,S)MA	1:1	n.a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55.
5)DMSA	1:1	n.a	monoclínico	P2 <sub>1</sub>	6,2828(3)	13,3843(6)	18,7984(8)	90	96,638(4)	90	817,544	2	
6)DHBA	1:1	n.a	ortorrômbico	P2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub>	6,60584(3)	13,11919(7)	18,80723(8)	90	90	90	1629,9	4	
7)3NBA	1:2	n.a	ortorrômbico	P2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub>	8,0511(4)	13,0536(6)	23,0243(9)	90	90	90	2419,76	4	
8)4NBA	1:2	n.a	triclínico	P1	7,0988(9)	7,3613(10)	12,1428(13)	12,1428(13)	77,496(10)	88,250(10)	595,906	1	
9)	1:1	n.a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10)			Co-cristal identificado através de diagrama de fase, a sua estrutura não se encontra resolvida.										
11)			Co-cristal identificado, mas a sua estrutura não está resolvida.										
12)OXA	1:1	n.a	monoclínico	P2 <sub>1</sub>	5,7646(4)	19,8963(14)	11,0690(8)	90	99,331	90	1252,75	4	T tempo=90 min.; Freqüência=30 Hz
13)	1:1	n.a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14)			Co-cristal identificado, mas a sua estrutura não está resolvida.										
15)			Co-cristal identificado, mas a sua estrutura não está resolvida.										
16)			Co-cristal identificado, mas a sua estrutura não está resolvida.										
17)			Co-cristal identificado, mas a sua estrutura não está resolvida.										
18)			Co-cristal identificado, mas a sua estrutura não está resolvida.										
19)(R) <sub>5</sub>	1:1	n.a	monoclínico	P2 <sub>1</sub>	5,9628(4)	11,5797(8)	22,5983(18)	90	95,615(8)	90	1350,84	4	Mecanotômica assistida por líquido (10µL metanol); T tempo=90 min.; Freqüência=30 Hz
20)(S) <sub>5</sub>	1:1	n.a	monoclínico	P2 <sub>1</sub>	12,0408(5)	5,9067(8)	12,1169(8)	90	113,961(8)	90	787,505	2	T tempo=90 min.; Freqüência=30 Hz
21)(S) <sub>9</sub>	1:1	n.a	ortorrômbico	P2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub> -2 <sub>1</sub>	7,351(2)	9,780(3)	29,993(5)	90	90	90	2156,28	4	59.
22)(R) <sub>10</sub>			Identificada por raios-X de pó, mas a sua estrutura não está resolvida.										

### 1.4.1. OBJETIVO DO TRABALHO

Esta dissertação de Mestrado tem por objetivo a investigação de novas formas sólidas do anticonvulsivante levetiracetam.

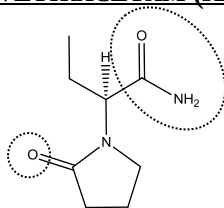
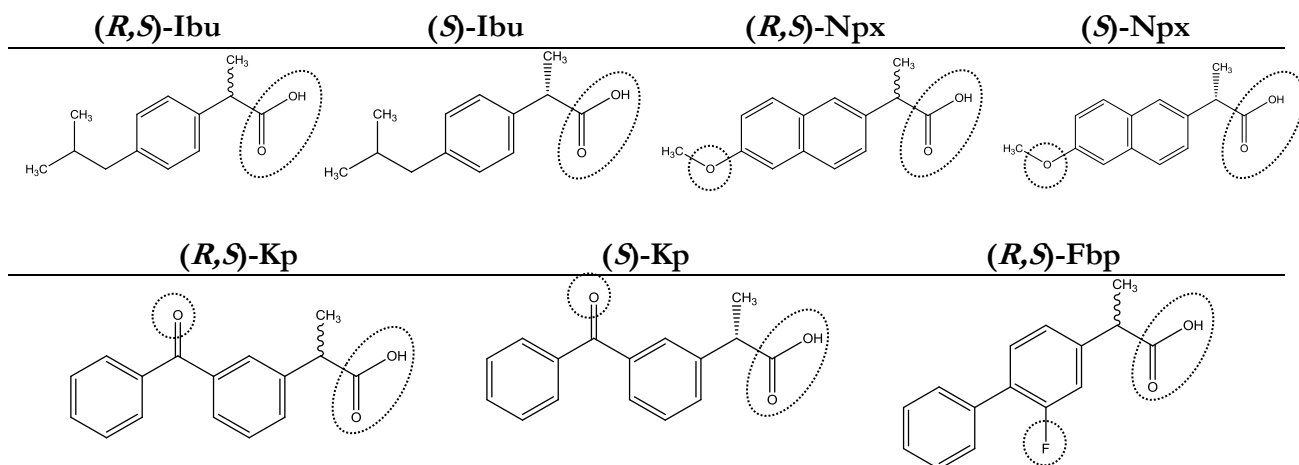
Pretende-se efetuar a pesquisa de polimorfos, uma vez que na indústria farmacêutica é de todo o interesse conhecer o maior número possível deste tipo de formas sólidas dos ativos e não há qualquer referência na literatura à identificação de polimorfos do levetiracetam.

É também investigada a formação de co-cristais (e de outras misturas sólidas com relevância em aplicações farmacêuticas) entre o levetiracetam e um conjunto de co-formadores quirais selecionados anteriormente. O estabelecimento de diagramas de fase binários sólido-líquido foi usado com o objetivo de auxiliar a identificação de co-cristais e de outras composições binárias de interesse.

Escolheram-se como co-formadores os anti-inflamatórios não-esteróides (NSAIDs), indicados na Figura 1.17, nomeadamente os racematos de ibuprofeno (Ibu), naproxeno (Npx), cetoprofeno (Kp) e flurbiprofeno (Fbp) e os enantiómeros de configuração (*S*) dos três primeiros. Como veremos, todos os racematos são compostos racêmicos. Como método de síntese foi usada a mecanoquímica, na ausência de solvente. Esta escolha permite investigar a propensão de dois compostos ativos quirais (Lev e co-formador) co-cristalizarem enantiosseletivamente/diasteriosseletivamente, usando uma metodologia ambientalmente favorável.

Como está evidenciado na Figura 1.17, é previsível a interação do grupo amida do levetiracetam com o grupo ácido carboxílico dos co-formadores, com a formação do mesmo heterossintão, amida-ácido, Figura 1.11. Este é o heterossintão mais provável. Obviamente que o grupo carbonilo do anel aromático de pirrolidona poderá, também, formar ligações de hidrogénio com o grupo carboxílico dos co-formadores. O grupo funcional amida do levetiracetam poderá ainda interagir com o éter do (*S*)/(*R,S*)-naproxeno, com o grupo cetona do (*S*)/(*R,S*)-cetoprofeno, e com o flúor do (*R,S*)-flurbiprofeno.

Os NSAIDs escolhidos têm em comum a capacidade de controlar a inflamação, reduzir a dor e a febre, sendo também usados no tratamento de osteoartrose, artrite reumatóide<sup>66-68</sup>. A sua associação com o levetiracetam poderá ser útil numa perspetiva de terapia dual. Todos eles pertencem à classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (BCS), ou seja, possuem baixa solubibilidade aquosa, apesar de terem elevada permeabilidade<sup>52,66,69</sup>. Há portanto todo o interesse, também, na identificação de novos sólidos que permitam incrementar a biodisponibilidade oral destes NSAIDs.

**LEVETIRACETAM (API)****CO-FORMADORES**

**Figura 1.17.** Representação das moléculas de levetiracetam e dos co-formadores utilizados neste trabalho, evidenciando possíveis pontos de interação para a formação de co-cristais.

**CO-FORMADORES: DADOS TERMODINÂMICOS E ESTRUTURAIS**

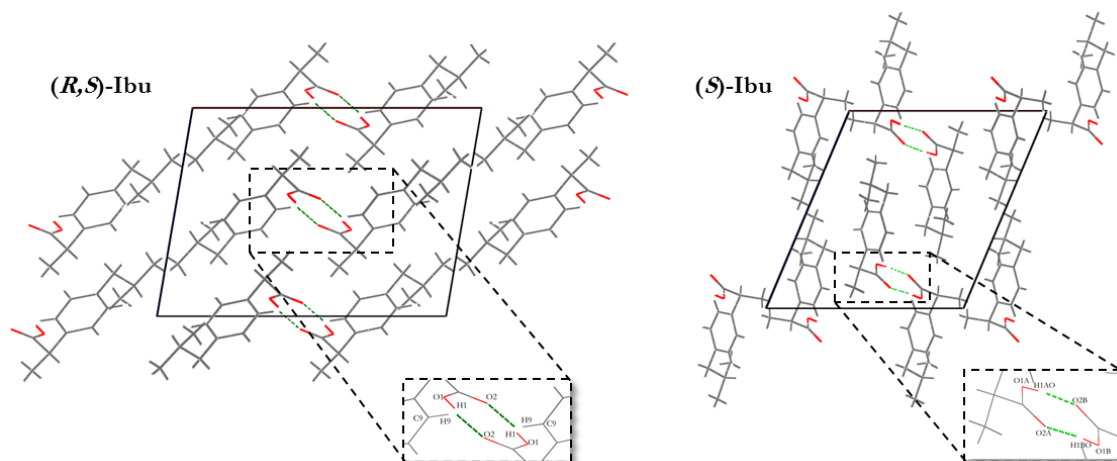
O diagrama de fases sólido-líquido de misturas binárias de enantiômeros do ibuprofeno, Figura A.1 em anexo, foi resolvido por Dwivedi, S.K.<sup>70</sup>, Burguer, A.<sup>71</sup> e por Codan, L.<sup>72</sup>. Os parâmetros termodinâmicos da fusão do composto racêmico, polimorfo I, e do enantiômero (*S*), encontram-se na Tabela 1.7, onde foram também incluídos dados para o polimorfo II do (*R,S*)-ibuprofeno recentemente identificado (metaestável em relação ao polimorfo I)<sup>73</sup>.

**Tabela 1.7.** Parâmetros termodinâmicos da fusão do composto racêmico, polimorfos I e II, e do enantiômero (*S*) do ibuprofeno presentes na literatura.

		Polimorfo I				Polimorfo II
		1992_ <sup>70</sup>	1993_ <sup>74</sup>	1996_ <sup>71</sup>	2012_ <sup>72</sup>	2008_ <sup>73</sup>
<b>(<i>R,S</i>)-Ibu</b>	$T_{\text{fus}} / ^\circ\text{C}$	71	75,5	75,5	$77,1 \pm 0,1$	17
	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-	29,7	25,7	$25,5 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,5$
<b>(<i>S</i>)-Ibu</b>	$T_{\text{fus}} / ^\circ\text{C}$	46	51,1	52,3	$52,8 \pm 0,1$	-
	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	-	22,9	18,7	$18,5 \pm 0,1$	-



As estruturas cristalinas encontram-se resolvidas quer para o composto racémico, polimorfo I, usado neste trabalho, quer para o enantiômero (*S*), e são apresentadas na Figura 1.18. Em ambas as estruturas há ligações de hidrogénio, Tabela 1.8, entre os grupos ácido carboxílico, originando dímeros cíclicos.



**Figura 1.18.** Representação das estruturas cristalinas do (*R,S*)-ibuprofeno (monoclínico,  $P2_1$ ,  $a=14,397(8)\text{Å}$ ,  $b=7,818(4)\text{Å}$ ,  $c=10,506(6)\text{Å}$ ,  $\beta=99,70(3)^\circ$ )<sup>75</sup> e do (*S*)-ibuprofeno (monoclínico,  $P2_1$ ,  $a=12,456(4)\text{Å}$ ,  $b=8,0362(5)\text{Å}$ ,  $c=13,533(3)\text{Å}$ ,  $\beta=112,86(2)^\circ$ )<sup>76</sup>, vista ao longo do eixo *b*.

**Tabela 1.8.** Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (*R,S*)-Ibu<sup>75</sup>, e (*S*)-Ibu<sup>76</sup>.

	D---H...A	D---H	H...A / Å	D...A / Å	D---H...A
<b>(<i>R,S</i>)-Ibu</b>	O1---H1...O2	0,963(10)	1,664(10)	2,627(7)	179,5(11)
	C9---H9...O2	1,078(10)	2,459(10)	3,231(6)	127,6(7)
<b>(<i>S</i>)-Ibu</b>	O1B---H1BO...O2A	1,07(5)	1,58(5)	2,634(4)	168(4)
	O1A---H1AO...O2B	0,94(6)	1,72(6)	2,651(4)	169(6)

O diagrama de fases sólido-líquido dos enantiômeros de naproxeno também se encontra resolvido na literatura por Braun, D. E. e colaboradores, Figura A. 2 em anexo<sup>77</sup>. Os parâmetros termodinâmicos de fusão do (*R,S*)-naproxeno e do (*S*)-naproxeno, polimorfo I, usado neste trabalho, encontram-se na Tabela 1.9.

Recentemente foi referida a existência de três outros polimorfos de (*S*)-naproxeno, II, III e IV, com temperaturas de fusão de 76 °C, 140 °C e 148,2 °C, respetivamente<sup>66</sup>. Foi observado que as formas II e IV se transformam na forma I quando armazenadas à temperatura ambiente, confirmando a sua natureza metaestável, nessas condições, relativamente à forma I. Para a forma III, segundo os autores do estudo, no período de um mês não foi observada qualquer alteração<sup>66</sup>.

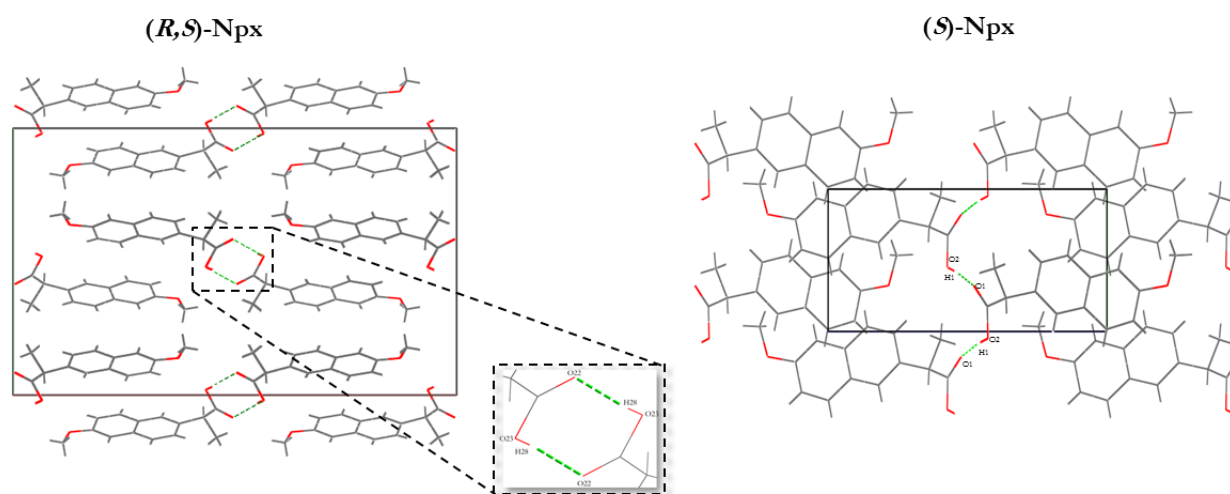
As estruturas cristalinas do naproxeno racémico e do enantiômero de configuração (*S*), polimorfo I, foram resolvidas e são ilustradas na Figura 1.19. Em ambas as estruturas é possível

## 1.INTRODUÇÃO

observar ligações de hidrogénio, Tabela 1.10, mas só no (*R,S*)-naproxeno há formação de dímeros cíclicos com o heterossintão ácido-ácido.

**Tabela 1.9.** Parâmetros termodinâmicos de fusão do composto racémico e do enantiómero (*S*) do naproxeno, polimorfo I, presentes na literatura.

	<i>(R,S)</i> -Npx		<i>(S)</i> -Npx	
	$T_{fus}/^{\circ}C$	$\Delta_{fus}H / kJ.mol^{-1}$	$T_{fus}/^{\circ}C$	$\Delta_{fus}H / kJ.mol^{-1}$
1993_ <sup>74</sup>	155,4	33,5	157,3	32,5
1997_ <sup>78</sup>	-	-	154,4	31,5 ± 0,7
2010_ <sup>79</sup>	-	-	158,1	-
2011_ <sup>77</sup>	155,8 ± 0,3	33,2 ± 0,3	156,2 ± 0,1	31,7 ± 0,1
2011_ <sup>66</sup>	-	-	156,2	-



**Figura 1.19.** Representação das estruturas cristalinas do (*R,S*)-naproxeno (ortorrômbica,  $P_{bca}$ ,  $a=25,8301(13) \text{ \AA}$ ,  $b=15,4939(4) \text{ \AA}$ ,  $c=5,9465(2) \text{ \AA}$ ) e do (*S*)-naproxeno, polimorfo I (monoclínico,  $P2_1$ ,  $a=7,73541(1) \text{ \AA}$ ,  $b=5,7181(8) \text{ \AA}$ ,  $c=13,3641(18) \text{ \AA}$ ,  $\beta=93,737(2)^{\circ}$ ), vistas ao longo do eixo  $c$  e  $a$ , respetivamente <sup>77</sup>.

**Tabela 1.10.** Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (*R,S*)-Npx, e (*S*)-Npx <sup>77</sup>.

	D---H...A	D---H	H...A / $\text{\AA}$	D...A / $\text{\AA}$	D---H...A
<i>(R,S)</i> -Npx	O23---H28...O22	0,898(2)	1,948(3)	2,819(3)	163,0(3)
<i>(S)</i> -Npx	O2---H1...O1	0,88(2)	1,79(2)	2,671(2)	174(3)

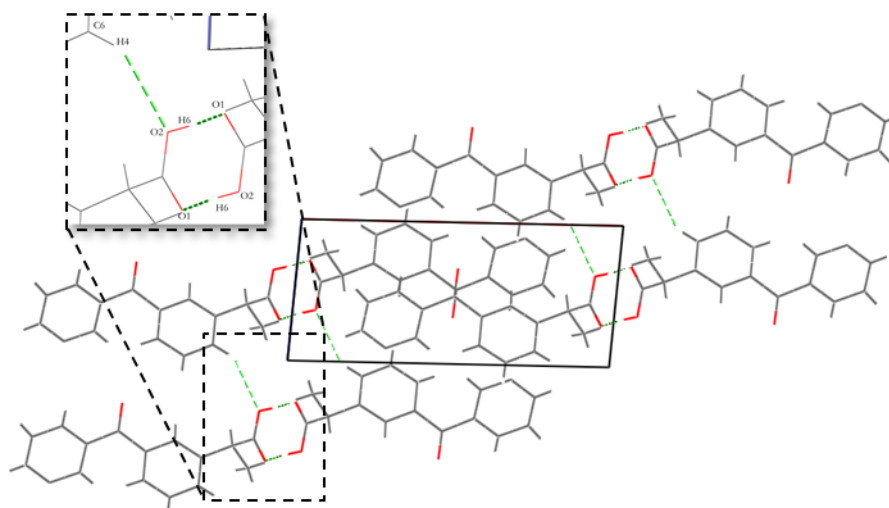
O cetoprofeno é comercializado na forma racémica, apesar da atividade biológica se dever ao enantiómero (*S*), enquanto que o enantiómero (*R*) é terapeuticamente inativo. O diagrama de fases sólido-líquido da mistura binária de enantiómeros do cetoprofeno, Figura A. 3 em anexo, foi resolvido por Thirumala, R. e colaboradores em 1998, e por Lu *et al* em 2004 <sup>80,81</sup>. O racemato é também um composto racémico. Thirumala propôs que os enantiómeros são parcialmente miscíveis

na estrutura cristalina do racemato. Os parâmetros termodinâmicos da fusão do (*R,S*)-cetoprofeno e do enantiômero de configuração (*S*), encontram-se na Tabela 1.11.

**Tabela 1.11.** Parâmetros termodinâmicos de fusão do (*R,S*)-cetoprofeno e (*S*)-cetoprofeno presentes na literatura.

		1998_ <sup>81</sup>	2004_ <sup>82</sup>	2012_ <sup>80</sup>	2013_ <sup>67</sup>	2014_ <sup>69</sup>
<b>(<i>R,S</i>)-Kp</b>	$T_{\text{fus}} / ^\circ\text{C}$	$93,9 \pm 1,3$	94,5	96,1	96,6	96,4
	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$14,7 \pm 0,3$	-	-	18,1	-
<b>(<i>S</i>)-Kp</b>	$T_{\text{fus}} / ^\circ\text{C}$	$72,1 \pm 0,1$	75,4	77,6	-	-
	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$21,0 \pm 0,2$	-	-	-	-

Na literatura apenas se encontra a estrutura cristalina do (*R,S*)-cetoprofeno, Figura 1.20. A estrutura tem também ligações de hidrogénio, Tabela 1.12, entre os grupos ácido carboxílico com formação dos dímeros cíclicos típicos de estruturas de ácidos carboxílicos, complementadas com ligações mais fracas<sup>80</sup>.



**Figura 1.20.** Representação da estrutura cristalina do (*R,S*)-cetoprofeno (triclínico,  $P_1$ ,  $a=3,393(8)$  Å,  $b=7,741(3)$  Å,  $c=6,136(2)$  Å,  $\alpha=89,61(3)^\circ$ ,  $\beta=94,56(4)^\circ$  e  $\gamma=88,7814^\circ$ ), vista ao longo do eixo  $b$ <sup>80</sup>.

**Tabela 1.12.** Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (*R,S*)-Kp<sup>80</sup>.

D---H...A	D---H	H...A / Å	D...A / Å	D---H...A
O2---H6...O1	1,02	1,68	2,630(6)	153
C6---H4...O2	1,06	2,42	2,882(9)	105

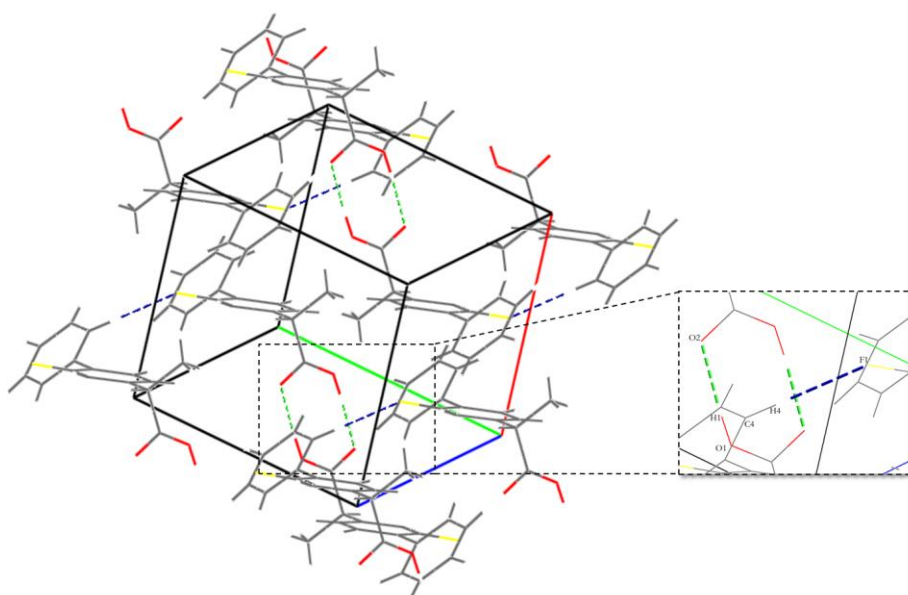
São conhecidas três formas polimórficas do flurbiprofeno racémico. Os parâmetros termodinâmicos dos respetivos processos de fusão encontram-se na Tabela 1.13. Os polimorfos II e

## 1.INTRODUÇÃO

III são monotrópicos relativamente à forma I <sup>83</sup>. Na estrutura cristalina do (*R,S*)-flurbiprofeno, forma I, utilizada neste trabalho, um composto racémico, mais uma vez é de registar a formação de dímeros cíclicos, ácido-ácido e também ligações fracas CH...F e CH...O, Figura 1.21. Na Tabela 1.14. estão representados os parâmetros geométricos de ligação de hidrogénio da estrutura cristalina do (*R,S*)-Fbp.

**Tabela 1.13.** Parâmetros termodinâmicos das diferentes formas sólidas de (*R,S*)-flurbiprofeno reportados na literatura.

( <i>R,S</i> )-flurbiprofeno	$T_{fus}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta_{fus}H / \text{kJ.mol}^{-1}$	Referência
Forma I	$113,5 \pm 0,2$	$26,7 \pm 2$	84
	115,0	29,1	83
Forma II	91,5	28,1	83
Forma III	55,3	22,4	83



**Figura 1.21.** Representação da estrutura cristalina do (*R,S*)-flurbiprofeno ( triclínico,  $P_1$ ,  $a=9,315(4)\text{\AA}$ ,  $b=12,738(9)\text{\AA}$ ,  $c=5,823(2)\text{\AA}$ ,  $\alpha=83,0(1)^{\circ}$ ,  $\beta=107,2(1)^{\circ}$  e  $\gamma=107,0(1)^{\circ}$ ) <sup>68</sup>.

**Tabela 1.14.** Parâmetros geométricos de ligações de hidrogénio nos cristais de (*R,S*)-Fbp <sup>68</sup>.

D...H...A	D...H	H...A / $\text{\AA}$	D...A / $\text{\AA}$	D...H...A
O1...H1...O2	1,29	1,36	2,64	174
C4...H4...F1	1,09	2,43	3,48	162

# *Capítulo 2*

Materiais e Métodos

---



## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAIS

Os compostos usados na realização deste trabalho estão resumidos na Tabela 2.1, onde são indicados o peso molecular, o laboratório onde foram adquiridos e o respectivo grau de pureza. Foram usados diferentes solventes para a investigação de novas formas polimórficas recorrendo a cristalização em solução. A Tabela 2.2 resume os solventes utilizados, a respetiva proveniência e o grau pureza.

**Tabela 2.1.** Origem dos compostos utilizados neste trabalho e informações do fornecedor.

Composto	Laboratório	Pureza / %	$M/g.mol^{-1}$	$T_{fusão} / ^{\circ}C$
Levetiracetam, (Lev)	TCI	$\geq 98$	170,21	$116,3 \pm 0,3$ este trabalho
( <i>S</i> )-ibuprofeno, ( <i>S</i> )-Ibu	Sigma-Aldrich	99	206,28	46-53 <sup>70-72,74</sup>
( <i>R,S</i> )-ibuprofeno, ( <i>R,S</i> )-Ibu	Sigma-Aldrich	$\geq 98$	206,28	71-77 <sup>70-74</sup>
( <i>S</i> )-naproxeno, ( <i>S</i> )-Npx	Fluka	98	230,26	154-158 <sup>66,74,77-79</sup>
( <i>R,S</i> )-naproxeno, ( <i>R,S</i> )-Npx	Sigma-Aldrich	$\geq 98$	230,26	155-156 <sup>74,77</sup>
( <i>S</i> )-cetoprofeno, ( <i>S</i> )-Kp	Sigma-Aldrich	99	254,28	72-78 <sup>80-82</sup>
( <i>R,S</i> )-cetoprofeno, ( <i>R,S</i> )-Kp	Sigma-Aldrich	$\geq 98$	254,28	94-97 <sup>67,69,80-82</sup>
( <i>R,S</i> )-flurbiprofeno, ( <i>R,S</i> )-Fbp	Sigma-Aldrich	-	244,27	113-115 <sup>83,84</sup>

**Tabela 2.2.** Laboratório de aquisição e pureza dos solventes utilizados em ensaios de cristalização.

Solvente	Laboratório	Pureza / %
Clorofórmio	Fisher Chemical	99,99
Etanol	Fisher Chemical	99,99
Metanol	Fluka	$\geq 99,8$

### 2.2. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Na pesquisa de novas formas sólidas, como já referimos anteriormente, existem diversas metodologias possíveis. Neste trabalho, na pesquisa de polimorfos de levetiracetam foi utilizada a cristalização em solução, e o arrefecimento do fundido. Na investigação de co-cristais usou-se a mecanoquímica sem adição de solvente.

### 2.2.1. CRISTALIZAÇÃO EM SOLUÇÃO

A cristalização em solução é um dos processos mais usados na indústria farmacêutica. Por definição, cristalização é a formação de cristais a partir de uma solução homogênea. Para além de ser um método de purificação química muito utilizado potencia, também, a formação de polimorfos, conduzindo muitas vezes a resultados diferentes por variação de condições experimentais, como por exemplo a natureza do solvente <sup>8,85</sup>.

Dissolveram-se cerca de 35 mg de levetiracetam em 4,0 mL de diferentes solventes escolhidos, nomeadamente clorofórmio, etanol e metanol. As amostras foram submetidas a ultrassons para facilitar a solubilização, à temperatura de 25°C. De seguida, filtrou-se cada solução para uma caixa de *Petri*, posteriormente tapada para minimizar a presença de partículas sólidas (poeiras), como núcleos de cristalização. O solvente evaporou à temperatura do laboratório ( $T \approx 24^\circ\text{C}$ ).

### 2.2.2. MECANOQUÍMICA

O primeiro co-cristal obtido por moagem foi sintetizado por Wöhler em 1844: o co-cristal era uma mistura equimolar de quinona:hidroquinona <sup>86</sup>. Os métodos mecanoquímicos são uma alternativa a outros métodos de formação de co-cristais, nomeadamente à evaporação lenta do solvente, uma vez que a mecanoquímica é um processo muito mais rápido, que minimiza a utilização de solvente <sup>86</sup>.

A mecanoquímica atua no comportamento químico dos materiais por efeito de forças mecânicas, manualmente, em almofariz, ou mecanicamente, recorrendo a um moinho <sup>87</sup>. Em alternativa ao método de moagem pura, ou seja, sem solvente, pode adicionar-se uma pequena quantidade de um líquido, que funciona como catalisador, à mistura que vai ser submetida a moagem: moagem assistida por líquido <sup>88</sup>.

Ambos os processos foram estabelecidos como métodos altamente eficientes de pesquisa de co-cristais, sais e formas polimórficas de ativos farmacêuticos. No entanto, alguns estudos demonstram que a moagem assistida por líquido, permite obter uma maior produtividade e maior cristalinidade do produto final do que a moagem pura <sup>88</sup>.

Neste trabalho usou-se um Moinho Retsh MM400, Figura 2.1, com células de aço inoxidável de 10 mL e duas esferas de aço, também inoxidável, de 7 mm de diâmetro para a obtenção de



misturas binárias com diferentes proporções molares de levetiracetam com cada co-formador. As experiências foram realizadas com frequência de vibração de 15 Hz e tempo de moagem de 30 minutos, sem qualquer adição de solvente.



**Figura 2.1.** Moinho de bolas (Moinho Retsh MM400), usado na obtenção das misturas binárias dos diferentes sistemas estudados.

## 2.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Inúmeras técnicas analíticas estão disponíveis para caracterizar o estado sólido de compostos farmacêuticos. Este subcapítulo irá centra-se nas técnicas utilizadas neste trabalho: métodos térmicos, calorimetria diferencial de varrimento (DSC), termogravimetria (TG) e termomicroscopia com luz polarizada (PLTM), técnicas de caracterização cristalográfica como a difração de raios-X de pó (XRPD). Para além destas técnicas, metodologias de espectroscopia vibracional foram também usadas, nomeadamente espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – refletância total atenuada (FTIR-ATR), imagiologia de infravermelho e de Raman.

### 2.3.1. MÉTODOS DE ANÁLISE TÉRMICA

Desde de 1970 que os métodos de análise térmica são aplicados na área farmacêutica, pelas Universidades e pelos laboratórios de investigação <sup>89</sup>. Por definição a análise térmica é um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou dos seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida a uma variação de temperatura controlada e programada, numa atmosfera também controlada <sup>90</sup>.

Os métodos térmicos são usados para monitorar processos endotérmicos como a fusão, ebulição, sublimação, vaporização, desolvatação, transições sólido-sólido e degradação química, e

também processos exotérmicos, por exemplo, cristalização, algumas transições sólido-sólido e decomposição oxidativa <sup>8</sup>.

### **TERMOGRAVIMETRIA (TG)**

A termogravimetria, TG, também conhecida como análise termogravimétrica ou TGA, tornou-se ao longo dos anos uma importante ferramenta na área farmacêutica devido, principalmente, à diversidade de informações físicas e químicas obtidas a partir da sua utilização. Este facto tornou esta técnica imprescindível em muitas etapas do desenvolvimento de produtos, no controle de qualidade de fármacos <sup>8,89</sup>.

A termogravimetria mede a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo numa atmosfera controlada, enquanto a amostra é submetida a um programa de variação de temperatura. A amostra é colocada num cadinho que fica numa balança posicionada no interior de um forno, podendo desta forma trabalhar em diferentes tipos de atmosferas envolvente <sup>90</sup>. A técnica de análise termogravimétrica é basicamente quantitativa no que se refere a perda ou ganho de massa<sup>91</sup>. Entretanto, a mudança de temperatura na qual ocorre o evento é qualitativa, pois dependerá do instrumento, das características da amostra e das condições em que é analisada.

O equipamento é constituído por uma balança analítica sensível, capaz de fornecer informação quantitativa sobre amostras com massas entre 5-20 mg, por um forno e um sistema de gás de purga, normalmente azoto ou argon, de modo a fornecer uma atmosfera inerte e prevenir a oxidação das amostras <sup>90,92</sup>.

Na aplicação a ativos farmacêuticos a análise termogravimétrica é particularmente útil na identificação de solvatos e no estabelecimento de condições de estabilidade térmica.

#### **Condições experimentais:**

Neste trabalho utilizou-se um equipamento da Perkin-Elmer STA 6000, um sistema de TG/DTA, com refrigeração por circulação de fluido refrigerante a 15 °C. Neste equipamento TG encontra-se hifenado com DTA e, deste modo, para o mesmo evento, foi possível a visualização de fenómenos de perda de massa, conjuntamente com os fenómenos observados nas curvas de DTA.

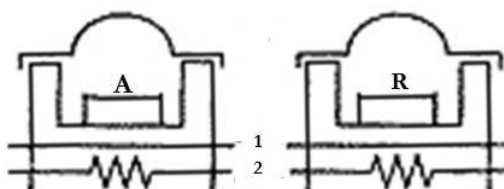
A amostra foi colocada num cadinho de alumina (massa da amostra ente 10 e 15 mg), numa atmosfera de azoto, e os ensaios realizados com velocidade de varrimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , numa gama de temperatura de 25 a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento, DSC, do inglês “*Differential Scanning Calorimetry*” é o método térmico mais usado no domínio farmacêutico para a caracterização de sólidos, fornecendo informação qualitativa e quantitativa em processos endotérmicos, exotérmicos, também quando ocorre variação de capacidade calorífica, permitindo desta forma obter informações relativas a alterações de propriedades físicas e químicas da amostra<sup>90,91,93</sup>.

Há inúmeros benefícios associados a este método, tais como a quantidade diminuta de amostra que é necessária (1-3 mg), a vasta gama de temperatura acessível, geralmente  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e a simplicidade e a rapidez de execução<sup>93</sup>.

A calorimetria diferencial de varrimento é um método de variação entálpica, no qual a diferença de fornecimento de energia calorífica entre a substância e o material de referência é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a um mesmo programa de temperatura, rigorosamente controlado<sup>92,93</sup>. Neste trabalho utilizou-se um calorímetro de potência compensada, Figura 2.2. Neste calorímetro, os fornos onde se colocam a amostra e a referência encontram-se equipados individualmente com um sensor de temperatura e uma resistência de aquecimento. Quando é detetada uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência, é ajustada a energia térmica ( $\partial H/\partial t$ ) a fornecer de modo a garantir que a diferença de temperatura entre a amostra e a referência seja nula ( $T_{\text{amostra}} = T_{\text{referência}}$ )<sup>92</sup>.

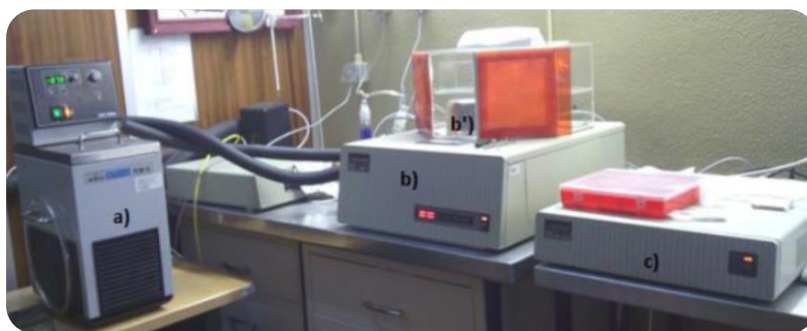


**Figura 2.2.** Calorimetria diferencial de varrimento de potência compensada (**A**- Amostra; **R**- Material de referência; 1-Sensores de Platina (Pt); 2- Fontes de calor independentes), adaptado<sup>90</sup>.

### Condições experimentais:

Neste trabalho utilizaram-se dois calorímetros, Perkin-Elmer DSC 7, Figura 2.3, e Perkin-Elmer Pyris1, estando ambos equipados com sistemas de refrigeração ajustados a  $-7,8\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, sendo o fluido de refrigeração uma mistura etilenoglicol/água (1:1, (v/v)). Utilizou-se o azoto como gás purga, com fluxo de  $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . As amostras, com cerca de 1-3 mg, foram preparadas em cápsulas de alumínio de  $30\text{ }\mu\text{L}$  hermeticamente fechadas, e como referência foi usada uma cápsula idêntica, mas vazia. No estudo de polimorfismo de levetiracetam os varrimentos efetuados foram realizados, em geral, a uma velocidade  $\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sendo utilizadas em alguns casos assinalados no texto, outras velocidades. Na investigação de co-cristais de levetiracetam os ensaios foram realizados com velocidade de varrimento  $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Em ambos os estudos foi varrido o intervalo de temperatura 25-122  $^{\circ}\text{C}$ .

A calibração foi efectuada para diferentes velocidades de varrimento com recurso a padrões de elevado grau de pureza. Para a calibração da temperatura utilizaram-se os seguintes compostos: bifenilo (material certificado, LGC 2610,  $T_{\text{fus}}=68,93\text{ }^{\circ}\text{C}$ )<sup>94</sup>; naftaleno (material de referência certificado, LGC 2401,  $T_{\text{fus}}=80,20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )<sup>94</sup>; ácido benzóico (material certificado, LGC 2606,  $T_{\text{fus}}=122,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )<sup>94</sup>; índio (material de referência certificado Perkin-Elmer, 99,999%  $T_{\text{fus}}=156,60\text{ }^{\circ}\text{C}$ )<sup>94</sup>. Para a calibração da entalpia foi usado o índio  $\Delta_{\text{fus}}H=28,6\text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>94</sup>.



**Figura 2.3.** DSC de potência compensada, Perkin-Elmer DSC7 e acessórios: **a)** sistema de refrigeração; **b)** calorímetro; **b')** fornos **c)** interface.

### **TERMOMICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA (PLTM)**

A termomicroscopia (PLTM, também conhecida como microscopia “*hot/cold stage*” e/ou microscopia de fusão), é sem dúvida a técnica microscópica mais utilizada para a caracterização das propriedades do estado sólido de compostos orgânicos, especialmente na investigação de polimorfos de compostos farmacêuticos <sup>6</sup>.

Esta técnica consiste na observação microscópica das amostras que são submetidas a aquecimento ou arrefecimento, utilizando um microscópio de luz polarizada. As transformações que ocorrem na amostra em estudo podem ser observadas diretamente no microscópico ou no monitor, fornecendo uma perspectiva única sobre os acontecimentos induzidos termicamente, tais como fusão, cristalização, transições sólido-sólido, entre outras. Estas informações são registadas por meio de uma câmara de vídeo, sendo gravadas, podendo de seguida ser estudadas pormenorizadamente

6,95

Por termomicroscopia com microscópio de luz polarizada é possível obter informação de cariz estrutural. Conforme o comportamento ótico, as substâncias podem ser classificadas como anisotrópicas ou isotrópicas. As substâncias anisotrópicas apresentam um índice de refração que varia com a direção de propagação da luz na rede cristalina. Por outro lado, as substâncias isotrópicas possuem o mesmo índice de refração em todas as direções da propagação da luz (exemplo: sólidos amorfos e sólidos cristalinos com arranjos cúbicos).

### **Condições experimentais:**

Neste trabalho usou-se um equipamento, ilustrado na Figura 2.4, constituído por uma placa de aquecimento DSC600 da Linkam, sendo a temperatura controlada por sensores de platina (Pt100). O equipamento ainda possui um bloco central com várias unidades com diversas funções: a unidade CI94 (*computer interface*) tem como função controlar o programa de temperatura, a unidade LNP94/2 (*Liquid Nitrogen Pump*) que controla a refrigeração e uma unidade VTO232 (*Video Text*). Um computador controla todo o sistema.

Para observar a amostra, utilizou-se um microscópio de transmissão de luz polarizada, DMRB adquirido à empresa Leica. A experiência é fotografada e filmada pela câmara Sony CCD-IRIS/RGB modelo DXC-151 AP, um monitor Sony HR Triniton modelo PVM-2053 MD e um gravador de vídeo Sony SVO-1500 VHS VCR.

Os programas de temperatura usados, as velocidades de varrimento e a ampliação são descritos ao longo do trabalho.



**Figura 2.4.** Equipamento de termomicroscopia: **A)**Placa de aquecimento; **B)**Microscópio de luz polarizada; **C)**Câmara de vídeo; **D)**Computador; **E)**Interface Gráfica; **F)**Sistema de controlo de refrigeração; **G)**Interface de computador; **H)**Monitor; **I)**Televisão; **J)**Gravador de vídeo.

Em suma, as três técnicas de análise térmica utilizadas, a termogravimetria (TG), a calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e a termomicroscopia com luz polarizada (PLTM), não são técnicas competitivas, mas técnicas complementares entre si.

### 2.3.2. MÉTODOS DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A difração de raios-X (XRD) é uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos. É usada tanto em engenharia e ciências de materiais, como também na área da química e da farmácia <sup>6,96</sup>.

A difração de raios-X é uma técnica que parte da incidência de um feixe monocromático, na gama de raios-X, através de um cristal da amostra em estudo. Por difração, o feixe dá lugar a um padrão de intensidades que pode interpretar-se segundo a distribuição dos átomos no cristal, aplicando a lei de Bragg. Se considerarmos dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios-X, com interferência construtiva ou numa mesma fase vão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios-X e do comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg, eq.2.1.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{eq.2.1})$$

Na lei de Bragg  $n$  corresponde à ordem de difração,  $\lambda$  é o comprimento de onda de radiação incidente,  $d$  é a distância interplanar num conjunto de planos da estrutura cristalina e  $\theta$  o ângulo de incidência dos raios-X <sup>90,97</sup>.

Na difração de raios-X há dois métodos de estudo de sólidos moleculares: o método de monocristal ou o método de pó (quando se trata de uma amostra policristalina), obtendo-se diferentes resultados nos dois métodos. A difração de raios-X de monocristal permite obter de forma precisa as posições atômicas e parâmetros da célula unitária, mas é necessário um cristal único com tamanho e características propícias.

A maioria das substâncias são obtidas na forma de pós microcristalinos. Neste caso utiliza-se o método de difração de raios-X de pó, o qual dá indicações das distâncias interplanares características da estrutura em estudo obtendo-se um difratograma típico, geralmente, suficiente para estabelecer a forma física do sólido. Estes difratogramas são de grande utilidade em termos de comparação qualitativa de diferentes amostras <sup>6,8,97</sup>. Por vezes é necessário usar a análise de difração de raios-X de pó com variação de temperatura (VT-XRD), realizando processos de aquecimento/arrefecimento na amostra em estudo de forma a poder obter informação sobre possíveis transições de fase numa dada gama de temperatura. Convém, no entanto, ter em mente que as condições espaciais e temporais numa experiência de VT-XRD são diferentes das usadas em DSC, por exemplo <sup>8</sup>.

### **Condições experimentais:**

Os estudos por difração de raios-X de pó (XRPD) e por difração de raios-X com variação de temperatura (VT-XRD) foram realizados no Centro de Física da Universidade de Coimbra (CFisUC), do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Geralmente para proceder à análise por esta técnica, os compostos são moídos numa almofariz e o pó é inserido num capilar de vidro. No nosso caso, como estamos a estudar novas formas sólidas, a moagem pode provocar alterações nos compostos para análise, deste modo, a amostra é colocado diretamente no capilar de vidro.

Utilizou-se um difratómetro de raios-X de pó de Enraf-Nonius com geometria de difração Debye-Sherrer, equipado com um detetor CPS 120° Inel. A radiação usada foi de Cu K $\alpha$ 1 ( $\lambda = 1,540598 \text{ \AA}$ ). Na difração de raios-X com variação de temperatura (VT-XRD) usou-se o mesmo equipamento com um sistema de aquecimento/arrefecimento Oxford Cryosystems com auxílio de azoto líquido. A velocidade de varrimento é de aproximadamente  $6 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 2.3.3. MÉTODOS DE ESPETROSCOPIA VIBRACIONAL

Para além das técnicas de análise térmica e de difração de raios-X, o uso de espectroscopia vibracional é extremamente importante na caracterização do estado sólido de compostos farmacêuticos, nomeadamente técnicas como a espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de Raman <sup>8</sup>.

A espectroscopia de infravermelho e a de Raman fornecem informações sobre níveis de energia vibracionais e sobre a estrutura molecular de uma amostra em estudo. Estes dois métodos são uma excelente ferramenta de análise qualitativa, uma vez que cada composto é uma combinação única de átomos, ou seja não existem dois compostos distintos com o mesmo espectro de infravermelho/Raman. Assim os espectros funcionam como impressão digital para cada amostra <sup>6,90</sup>.

Neste trabalho usou-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em refletância total atenuada (FTIR-ATR), imagiologia de infravermelho e imagiologia de Raman.

### ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia de infravermelho resulta da interação de radiação electromagnética de comprimentos de onda da região do infravermelho com a matéria. Esta região corresponde à zona do espectro electromagnético que se situa entre 12800 e 10  $\text{cm}^{-1}$ . O espectro de infravermelho é convenientemente dividido em próximo (12800-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), médio (4000-200  $\text{cm}^{-1}$ ) e longínquo (200-10  $\text{cm}^{-1}$ ), sendo mais comum a utilização do infravermelho médio. A radiação de infravermelho médio é pouco energética para causar transições eletrónicas, podendo resultar em excitação vibracional. Para absorver radiação no infravermelho a molécula necessita sofrer uma variação de momento de dipolo como consequência do movimento vibracional e, obviamente, a energia de radiação deve ser igual à diferença de energia entre dois níveis vibracionais <sup>90</sup>. A espectroscopia de infravermelho é particularmente útil para avaliar as alterações de ligações de hidrogénio intermoleculares em sólidos, como é comum entre polímeros e em co-cristais, relativamente aos compostos de partida <sup>17</sup>.



- **ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLETÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)**

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier permite obter espectros de grande qualidade, com relação sinal-ruído melhorada relativamente a técnicas dispersivas, o que torna possível a análise de espectros complexos. Além disso, diminui o tempo de aquisição do espectro, medindo a informação para as frequências da região do infravermelho, simultaneamente<sup>90,98</sup>.

Com a aquisição do espectro em modo de refletância total atenuada, consegue-se obter espectros de infravermelho de amostras difíceis de manipular como pós, pastas, adesivos, filmes, por exemplo. No caso do estudo de polimorfos, a preparação de pastilhas, necessárias à aquisição em modo de transmissão, implica a moagem do composto e este procedimento pode causar transformação polimórfica da substância que queremos analisar. Assim, a utilização de refletância total atenuada é de grande utilidade pois temos maior garantia da integridade da amostra<sup>99</sup>.

#### **Condições experimentais:**

Neste estudo usou-se um espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR) Thermo Scientific Nicolet 380, Figura 2.5, com resolução de  $1\text{ cm}^{-1}$ . O equipamento tem um detector DTGS. Foi utilizado um acessório de ATR, Smart Orbit Diamond ATR da Thermo Scientific Nicolet, com um cristal de diamante que permite uma gama espectral no intervalo de  $10000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ , sendo a área onde se coloca a amostra, cerca de  $13\text{ mm}^2$ .

Nesta análise coloca-se uma pequena quantidade de composto na área ativa do ATR, de seguida baixa-se a torre da pressão para selar o composto. A aquisição dos dados foi realizada com o software EZ OMINIC 6.1., sendo os espectros adquiridos com 64 scans, numa gama espectral entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 2.5.** Aparelho de FTIR-ATR: **A** – Cristal de diamante; **B** – Torre de pressão giratória; **C** – Ponta de pressão e **D** – Tampa para líquidos voláteis.

- **IMAGIOLOGIA DE INFRAVERMELHO**

A imagiologia de infravermelho possui muitas vantagens relativamente à espectroscopia de infravermelho convencional. Permite uma análise rápida de diferentes regiões de uma amostra, não sendo necessário uma prévia preparação da mesma. Através da imagiologia química de infravermelho é possível obter informações espectrais e espaciais de amostras complexas e heterogêneas, respondendo a questões como a identificação da composição química de uma amostra, dando indicação da dimensão e localização dos seus diferentes constituintes. É considerado um método não destrutivo com elevada resolução espacial<sup>100,101</sup>. O aparecimento da imagiologia química por infravermelho aumentou muito o domínio de aplicabilidade da espectroscopia de infravermelho, estendendo-a, por exemplo, à investigação de polímeros de uma dada amostra heterogênea<sup>17</sup>.

Os aparelhos podem trabalhar em modo de transmissão, ATR (reflexão total atenuada) ou refletância difusa. Geralmente usa-se a análise em transmissão, porque a reflexão acarreta desvantagens, uma vez que tem uma pior relação sinal/ruído, pode apresentar distorção espectral e pior reprodutibilidade<sup>102</sup>.

### **Condições experimentais:**

Usou-se um espectrómetro Nicolet IN10 MX, Figura 2.6, com resolução espectral de 16 cm<sup>-1</sup>, resolução espacial de 25 μm x 25 μm e efetuando 64 scans. Os estudos foram realizados em modo de transmissão: a amostra foi colocada numa célula de fluoreto de cálcio, sendo a célula inserida no porta amostras que é encaixado no equipamento. A partir deste passo, o processo é todo controlado informaticamente, obtendo-se uma imagem ótica (3x3 mm) de uma zona da amostra, podendo ser deslocada para qualquer outra zona e ser ajustada através de zoom. É recolhido um espectro de cada zona selecionada. Entre cada recolha de espectros, registou-se um *background* que foi subtraído ao espectro da amostra. Neste estudo usou-se o detetor MCT, arrefecido com azoto líquido. Os espectros foram recolhidos entre 4000-1000 cm<sup>-1</sup>.



Figura 2.6. Espectrômetro Nicolet IN10 MX.

## IMAGIOLOGIA DE RAMAN

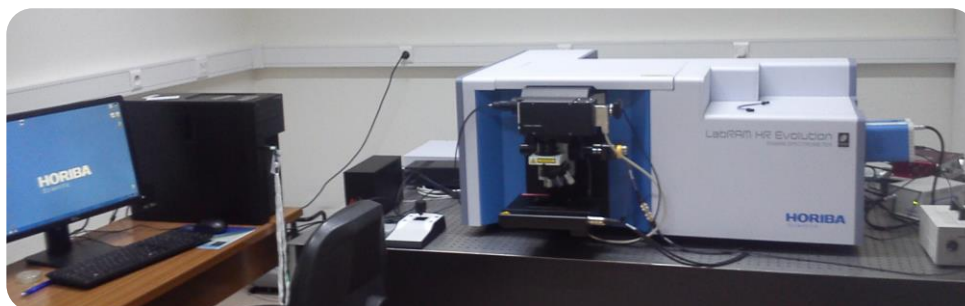
Os espectros de Raman são obtidos irradiando-se a amostra com uma fonte potente de radiação monocromática, um laser, no visível ou no infravermelho, com frequência  $\nu_o$ , superior às frequências vibracionais, mas inferior à frequência associada a transições eletrônicas. A colisão fóton-molécula resulta em dispersão da radiação, tendo a maioria dos fótons difundidos energia idêntica à de radiação incidente: o espalhamento elástico ou espalhamento Rayleigh, que não é de interesse. Entretanto, o mais importante é o efeito inelástico, também conhecido como efeito Raman: alguns fótons difundidos têm energia inferior  $\Delta E = h(\nu_o - \nu_{dif})$  (bandas de Stokes) à radiação incidente, resultante de troca de energia entre os fótons e as moléculas aquando de colisão ( $\nu_{dif}$  é a frequência de fótons difundidos). Outros poderão ter energia superior (bandas anti-Stokes). Os desvios observados relativamente à frequência de radiação incidente são idênticos às frequências dos modos normais de vibração. No estudo do estado sólido, são as bandas de Stokes que são registadas. Para que um modo vibracional seja ativo em espectroscopia de Raman deve ter associada uma variação de polarizabilidade de molécula <sup>90</sup>.

Em suma, os espectros de Raman e os espectros de absorção no infravermelho de uma determinada amostra assemelham-se muito. Há, no entanto, diferenças entre os tipos de grupos que são ativos no infravermelho e no Raman, o que torna estas duas técnicas complementares em vez de competitivas <sup>6,90</sup>.

A imagiologia química em Raman pode permitir o estudo de áreas de até 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro e é uma ferramenta útil na diferenciação de polimorfos numa amostra heterogênea. Tem como vantagem importante a possibilidade de utilização de suporte de vidro para a amostra <sup>17,103</sup>.

### Condições experimentais:

Neste trabalho utilizou-se o espectrômetro Labram Hr Evolution Raman, Figura 2.7. Os espectros foram obtidos com radiação de 633 nm, numa gama espectral 3500-200  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 16  $\text{cm}^{-1}$  e um tempo de aquisição de 5 segundos. O procedimento começa pela colocação de uma pequena porção da amostra numa lamela de vidro, focalizando-se com um microscópio focalizar-se as zonas de interesse da amostra. A ampliação usada na obtenção de imagem ótica foi de 100x.



**Figura 2.7.** Espectrômetro Labram Hr Evolution Raman.

# *Capítulo 3*

Resultados e Discussão

---



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

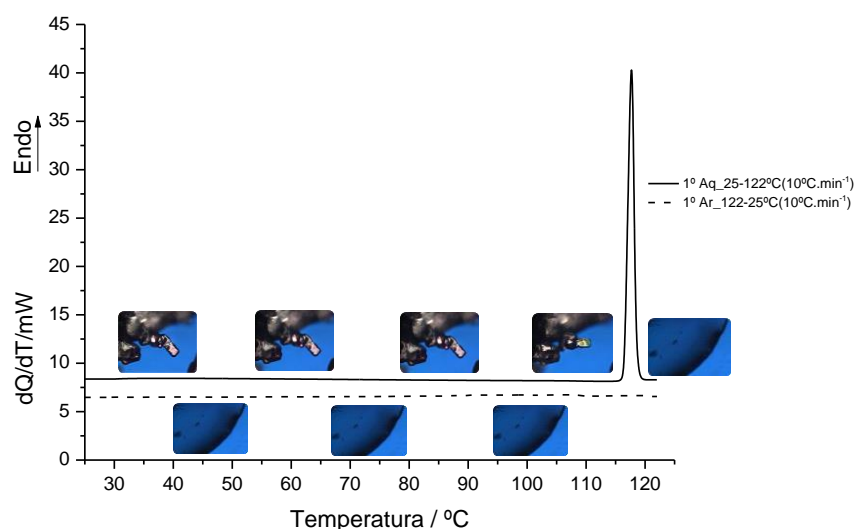
### 3.1. INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO DE LEVETIRACETAM

O composto de partida, levetiracetam do Lot:7EEKH-60 foi identificado por difração de raios-X de pó, como a forma sólida I, cuja estrutura foi resolvida por Song *et al.*<sup>57</sup>.

Na investigação sobre o composto de partida, obteve-se por calorimetria diferencial de varrimento (DSC), no processo de aquecimento, sempre e só um sinal endotérmico, independentemente da velocidade de varrimento, como exemplificado na Figura 3.1. As velocidades de varrimento ensaiadas foram de 10 °C.min<sup>-1</sup>, 5 °C.min<sup>-1</sup> e 2 °C.min<sup>-1</sup>, tendo-se obtido os valores de  $T_{\text{onset}} = (116,3 \pm 0,3)$  °C e  $\Delta_{\text{fus}}H = (27,0 \pm 0,5)$  kJ.mol<sup>-1</sup> (n=6). Estes valores estão em concordância com os encontrados na literatura<sup>54</sup>.

Os ensaios por termomicroscopia com luz polarizada (PLTM) indicam que a amostra é policristalina e confirmam a transição observada como a fusão do composto, num processo rápido, como se espera de uma substância pura, Figura 3.1.

Em todos os ensaios efetuados, o arrefecimento do fundido, com velocidade  $\beta = -10$  °C.min<sup>-1</sup> e  $\beta = -2$  °C.min<sup>-1</sup>, não conduziu a cristalização do composto, Figura 3.1.

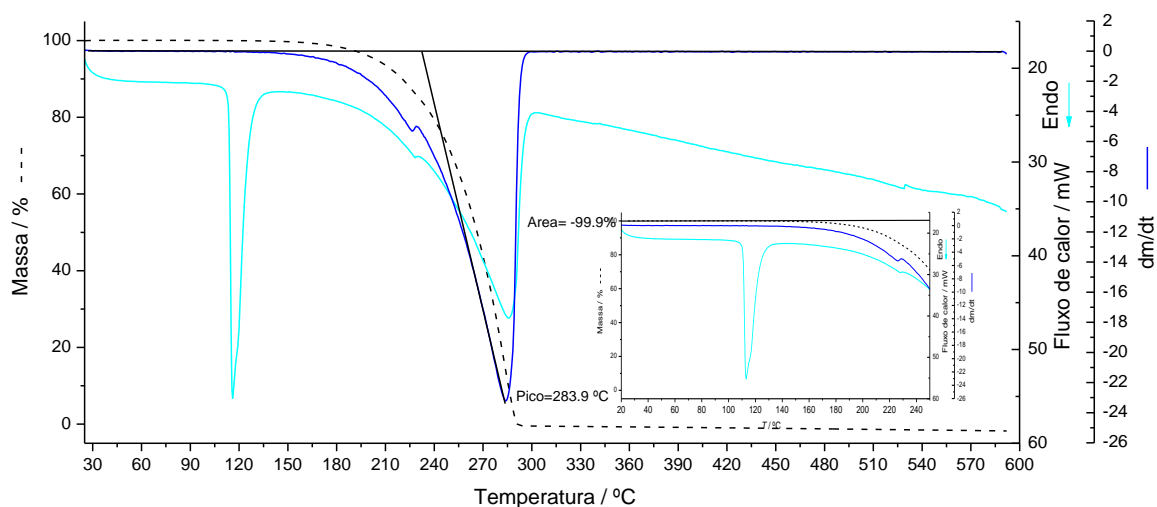


**Figura 3.1.** Levetiracetam: Curvas de DSC de aquecimento do composto comercial e de arrefecimento do fundido (cápsula de 30  $\mu$ L, fechada,  $m=1,40$  mg) e respetivas imagens obtidas por PLTM (ampliação 200x);  $\beta=10$  °C.min<sup>-1</sup>.

A análise por termogravimetria confirmou que o composto é estável até depois da fusão, uma vez que não ocorre perda de massa até pelo menos 130 °C. A variação de massa de 100 % ocorre no intervalo de 130-300 °C, Figura 3.2. Portanto, todos os ensaios realizados por DSC e

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PLTM foram efetuados até uma temperatura máxima de 130 °C, na generalidade das experiências até 122 °C (imediatamente após o final do processo de fusão).



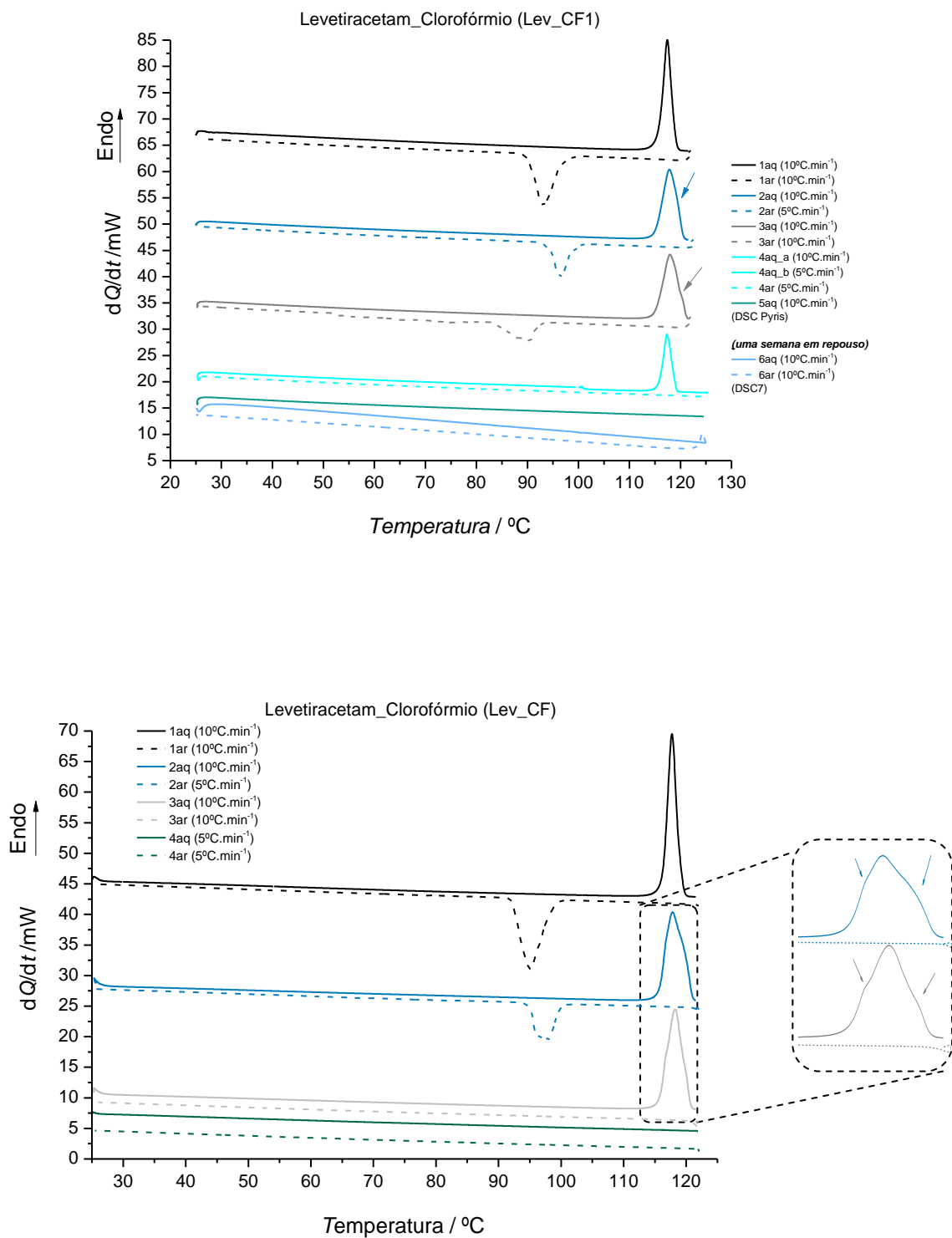
**Figura 3.2.** Levetiracetam: Resultados de termogravimetria do composto de partida;  $\beta=10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $m=13,25$  mg, atmosfera de azoto.

A cristalização de um composto em diversos solventes é uma metodologia importante, uma vez que as diferentes interações soluto/solvente e soluto/soluto induzidas pelo solvente podem potenciar a formação de polimorfos. Após um estudo preliminar de investigação de cristalização do levetiracetam<sup>104</sup> escolheram-se três solventes, um apolar, clorofórmio, e dois polares próticos, etanol e metanol.

Na Figura 3.3 são apresentados os termogramas exemplificativos dos resultados obtidos para os sólidos cristalizados em clorofórmio. Os parâmetros de fusão do primeiro aquecimento, Tabela 3.1, são idênticos aos obtidos para a amostra comercial e, como se esperaria, os espectros de infravermelho são também indistinguíveis, Figura 3.4. As diferenças são, contudo, evidentes quando se arrefece o fundido: nas amostras cristalizadas em clorofórmio foi observada cristalização no arrefecimento em vários dos ensaios realizados, o que não se regista nos estudos efetuados sobre o composto de partida. Os valores termodinâmicos dos picos de fusão das amostras geradas por cristalização do fundido  $T_{\text{onset}} = (115,4 \pm 0,4)$  °C e  $\Delta_{\text{fus}}H = (26,4 \pm 1,3)$  kJ.mol<sup>-1</sup> (n=5) são idênticos aos da amostra comercial, apresentando, no entanto, um perfil notoriamente assimétrico. O perfil assimétrico da curva de DSC pode resultar da falta de homogeneidade da amostra na cápsula de DSC ou, o que é mais plausível, da sobreposição de eventos térmicos muito próximos.

As amostras cristalizadas nos solventes próticos etanol e metanol serão alvo de estudo mais pormenorizado.



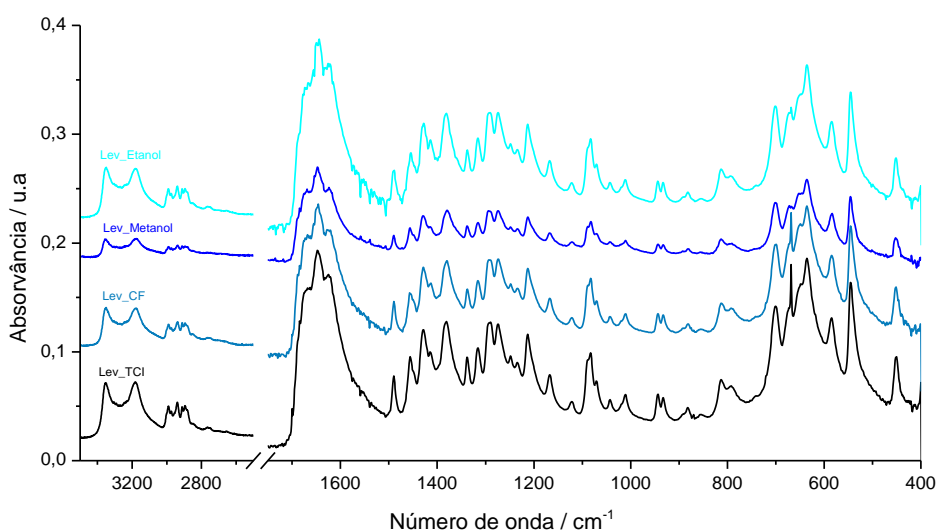


**Figura 3.3.** Levetiracetam: Curvas de DSC obtidas para o sólido cristalizado de clorofórmio.  
 Lev\_CF1:  $m=1,74$  mg; Lev\_CF2:  $m=1,80$  mg (cápsulas de  $30 \mu\text{L}$  fechadas).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 3.1.** Levetiracetam: Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC obtidas para o material obtido por cristalização em clorofórmio.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$		$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
<b>Lev_CF_1</b>					
1°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,8	25,5	1°Ar 122°C-25°C(10°C.min <sup>-1</sup> )	96,0	-24,0
2°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,1	25,6	2°Ar 122°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	98,6	-24,2
3°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,3	25,2	3°Ar 122°C-25°C(10°C.min <sup>-1</sup> )	91,5	-22,2
4°Aq_a 25°C-100°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-		-	-
4°Aq_b 100°C-125°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	115,9	25,3	4°Ar 125°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
<b>A cápsula esteve em repouso durante uma semana e voltou a ser varrida mas nada foi registrado.</b>					
<b>Lev_CF_2</b>					
1°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	116,3	27,6	1°Ar 122°C-25°C(10°C.min <sup>-1</sup> )	98,3	-24,6
2°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,7	27,2	2°Ar 122°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	99,4	-24,0
3°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,8	26,8	3°Ar 122°C-25°C(10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
4°Aq_a 25°C-122°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	-	-	4°Ar 122°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
5°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-			
<b>A cápsula esteve em repouso durante uma semana e voltou a ser varrida mas nada foi registrado.</b>					

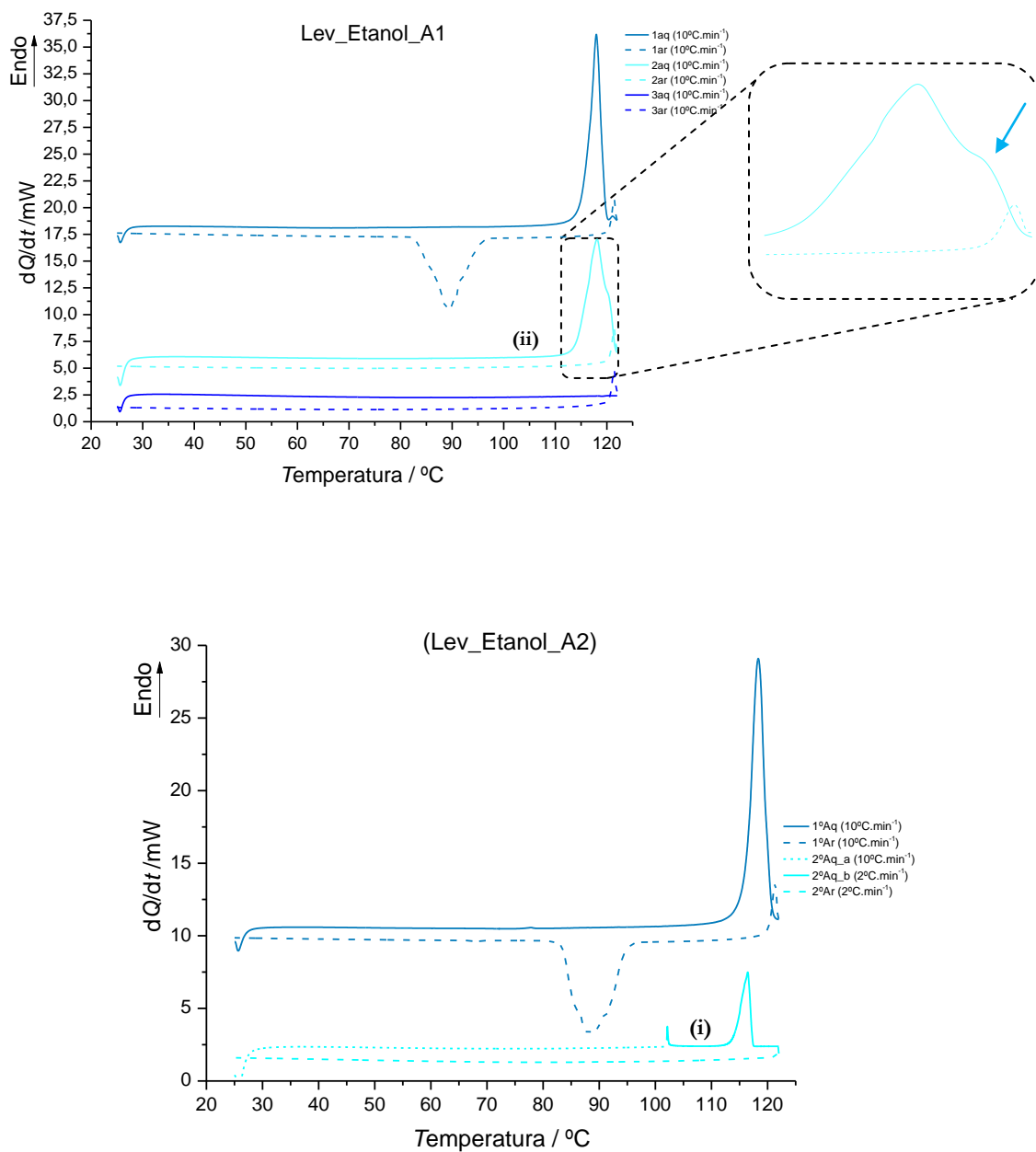


**Figura 3.4.** Levetiracetam: Espectros de FTIR-ATR do material obtido por cristalização em clorofórmio (Lev\_CF), metanol (Lev\_Metanol) e etanol (Lev\_Etanol) e o espectro do material de partida (Lev\_TCl), para termo de comparação.

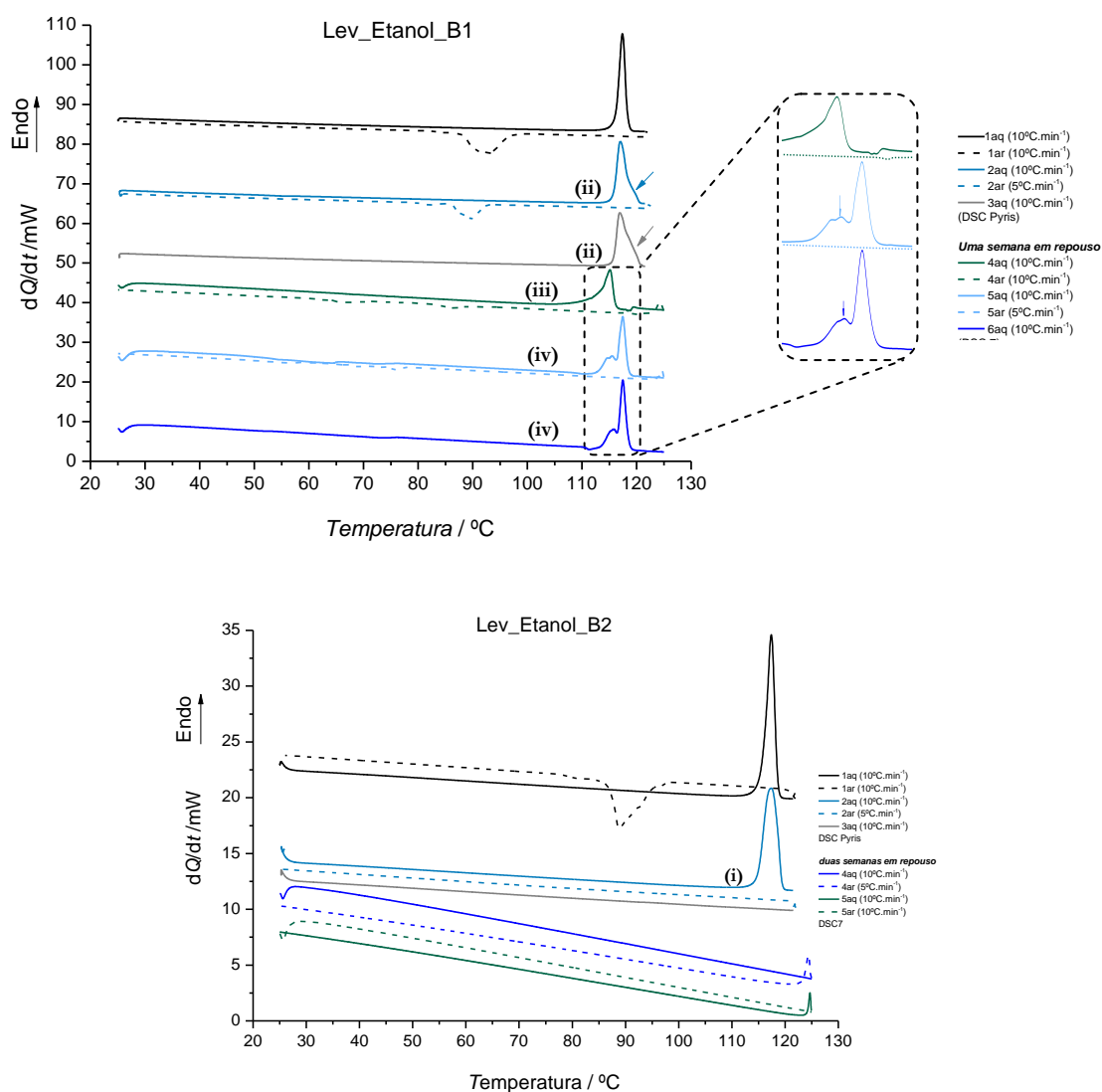
#### 3.1.1. ESTUDO DO LEVETIRACETAM CRISTALIZADO EM ETANOL

Na Figura 3.5, estão representadas as curvas de DSC obtidas em vários ciclos de aquecimento/arrefecimento de duas cápsulas independentes da mesma amostra de material obtido numa das experiências de cristalização em etanol, A. A Figura 3.6 mostra as curvas de DSC do

material produzido num segundo ensaio de cristalização neste solvente, B. A Tabela 3.2, sumaria os respectivos parâmetros termodinâmicos.



**Figura 3.5.** Levetiracetam: Curvas de DSC de aquecimento/arrefecimento do material obtido por cristalização em etanol Lev\_Etanol\_A1:  $m=1,76$  mg; Lev\_Etanol\_A2:  $m=1,89$  mg (cápsulas de 30  $\mu\text{L}$  fechadas).



**Figura 3.6.** Levetiracetam: Curvas de DSC de aquecimento/arrefecimento do material obtido por cristalização em etanol Lev\_Etanol\_B1:  $m = 1,39$  mg; Lev\_Etanol\_B2:  $m = 1,09$  mg (cápsulas fechadas de 30  $\mu\text{L}$ ).

No primeiro aquecimento, mais uma vez, só existe um sinal endotérmico simétrico, tendo como valor de  $T_{\text{onset}} = (116,0 \pm 0,1)$  °C que não é distinto do observado para o material de partida, verificando-se o mesmo com os valores de  $\Delta_{\text{fus}}H = (26,7 \pm 1,2)$  kJ.mol<sup>-1</sup>. O espectro de infravermelho do sólido cristalizado em etanol não apresenta, também, diferenças significativas relativamente ao composto de partida, Figura 3.4. A cristalização em etanol, tal como em clorofórmio, parece conduzir ao polimorfo original, forma I.

Merece destaque também o fundido gerado nestas experiências, o qual cristaliza em muitos ensaios de arrefecimento, mas não em todos, dando origem no aquecimento subsequente a curvas com perfil muito diversificado: um único pico endotérmico e simétrico (curvas i) com temperatura de fusão inferior à do composto de partida,  $T_{\text{onset}} = 114,7$  °C, assimetria do ramo superior da curva

(curvas ii); a amostra B1 arrefecida rapidamente em DSC e deixada à temperatura ambiente durante uma semana funde a  $T_{onset} = 113,0$  °C (curva iii) e nos aquecimentos subsequentes (curvas iv) podem identificar-se dois eventos endotérmicos, um primeiro com  $T_{onset} \approx 113$  °C e um segundo com  $T_{onset} \approx 116$  °C, indistinguível do valor do composto de partida. O perfil das curvas de arrefecimento que precedem estes ensaios (um a  $10$  °C.min<sup>-1</sup> e o outro a  $5$  °C.min<sup>-1</sup>) são diferentes dos observados noutras experiências.

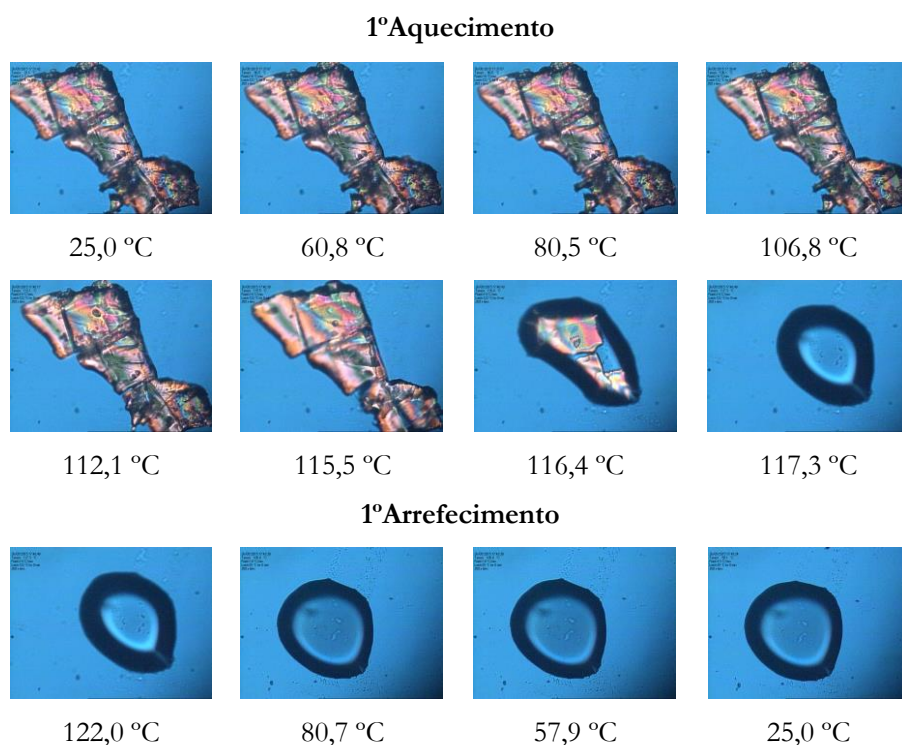
**Tabela 3.2.** Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC obtidas no varrimento de quatro cápsulas independentes de levetiracetam obtido por cristalização em etanol.

	$T_{onset}$ / °C	$\Delta H$ / kJ·mol <sup>-1</sup>		$T_{onset}$ / °C	$\Delta H$ / kJ·mol <sup>-1</sup>
<b>Lev_Etanol_A1</b>					
1ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,9	25,9	1ºAr 122°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	92,6	-25,3
2ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	114,9(ii)	26,7	2ºAr 122°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
3ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-	3ºAr 122°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
<b>Lev_Etanol_A2</b>					
1ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	116,1	27,6	1ºAr 122°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	94,5	-25,8
2ºAq(a) 25°C-102°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-			
2ºAq(b) 102°C-122°C (2°C.min <sup>-1</sup> )	114,5(i)	26,9	2ºAr 122°C-25°C (2°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
<b>Lev_Etanol_B1</b>					
1ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	116,2	26,9	1ºAr 122°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	96,0	-23,7
2ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,8(ii)	26,3	2ºAr 122°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	92,1	-23,3
3ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,8(ii)	25,8	-	-	0,0
<b>A cápsula esteve em repouso durante uma semana e voltou a ser varrida.</b>					
4ºAq 25°C-125°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	112,9(iii)	20,4	4ºAr 125°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	89,2	-18,2
5ºAq 25°C-125°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	112,7(iv) 116,3	23,4	5ºAr 125°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	77,7	-16,5
6ºAq 25°C-125°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	113,3(iv) 116,5	23,4			
<b>Lev_Etanol_B2</b>					
1ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,8	26,5	1ºAr 122°C-25°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	94,1	-23,8
2ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	114,8(i)	25,6	2ºAr 122°C-25°C (5°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
3ºAq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-
<b>A cápsula esteve em repouso durante duas semanas e voltou a ser varrida, e nada foi registado.</b>					

Em suma, os resultados obtidos por DSC dão indicação que a cristalização do fundido poderá dar origem a novas formas polimórficas, com o resultado a depender da existência de condições apropriadas para o processo de nucleação. Por exemplo, as imagens obtidas por PLTM para o material obtido por cristalização em etanol, submetido a um ciclo de aquecimento/arrefecimento num intervalo de 25-122 °C à velocidade de varrimento de  $10$  °C.min<sup>-1</sup>,

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

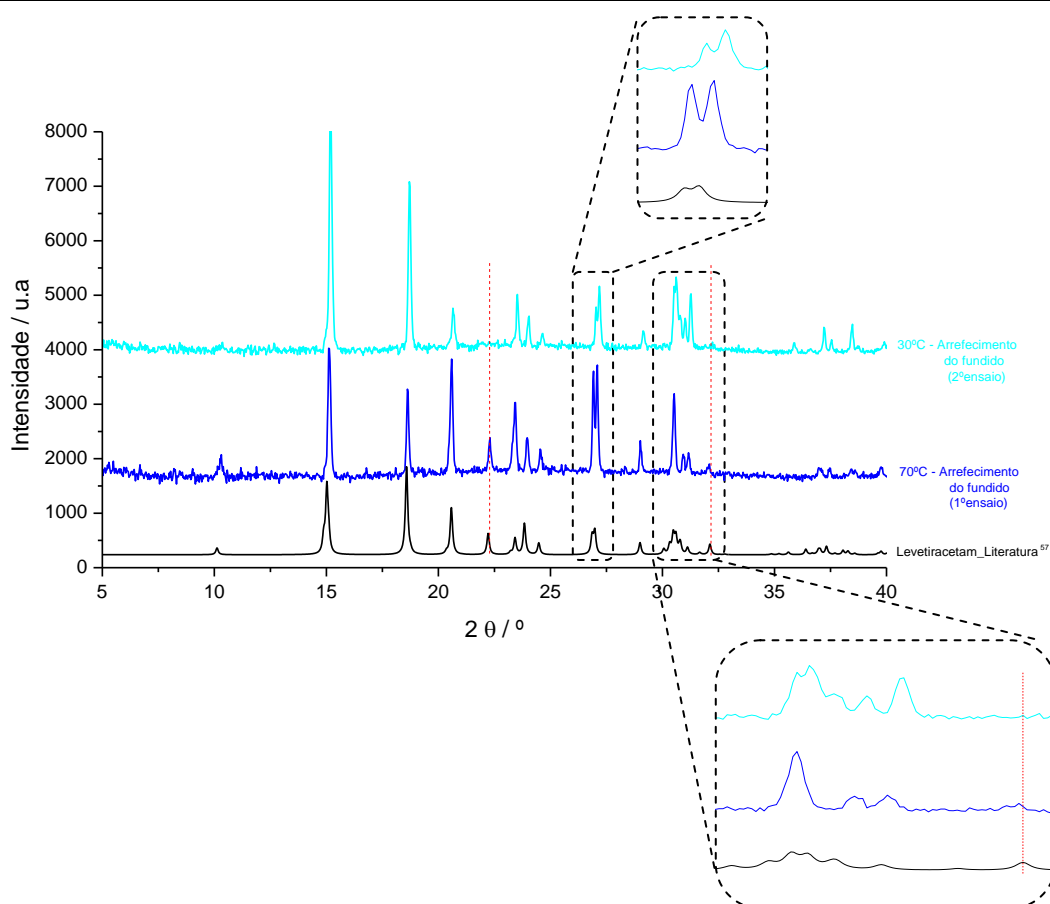
Figura 3.7, confirmam que, no primeiro aquecimento, não se observa qualquer alteração para além da fusão, um processo rápido com início a 115 °C e que termina por volta dos 117 °C. No processo de arrefecimento do fundido, nestas condições experimentais, a nucleação não ocorre e não foi observada cristalização em nenhum dos ensaios realizados.



**Figura 3.7.** Levetiracetam: Imagens obtidas por PLTM do material obtido por cristalização em etanol (1ºAquecimento e 1ºArrefecimento),  $\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , ampliação 200x.

Realizou-se um estudo por difração de raios-X de pó, com variação de temperatura, para complementar a informação obtida. Os resultados obtidos e o difratograma simulado a partir da estrutura cristalina resolvida do composto de partida, Lev, encontram-se ilustrados na Figura 3.8.

Nas duas experiências realizadas não são observadas, no cristalizado do fundido, reflexões em valores de  $2\theta$  que difiram dos do polimorfo de partida<sup>57</sup>, apesar do perfil dos picos ser distinto, sobretudo entre 26-28° e 30-32°. Os resultados não são, contudo, conclusivos quanto à detecção de novos polimorfos, podendo as diferenças resultar de orientação preferencial dos cristalitos.



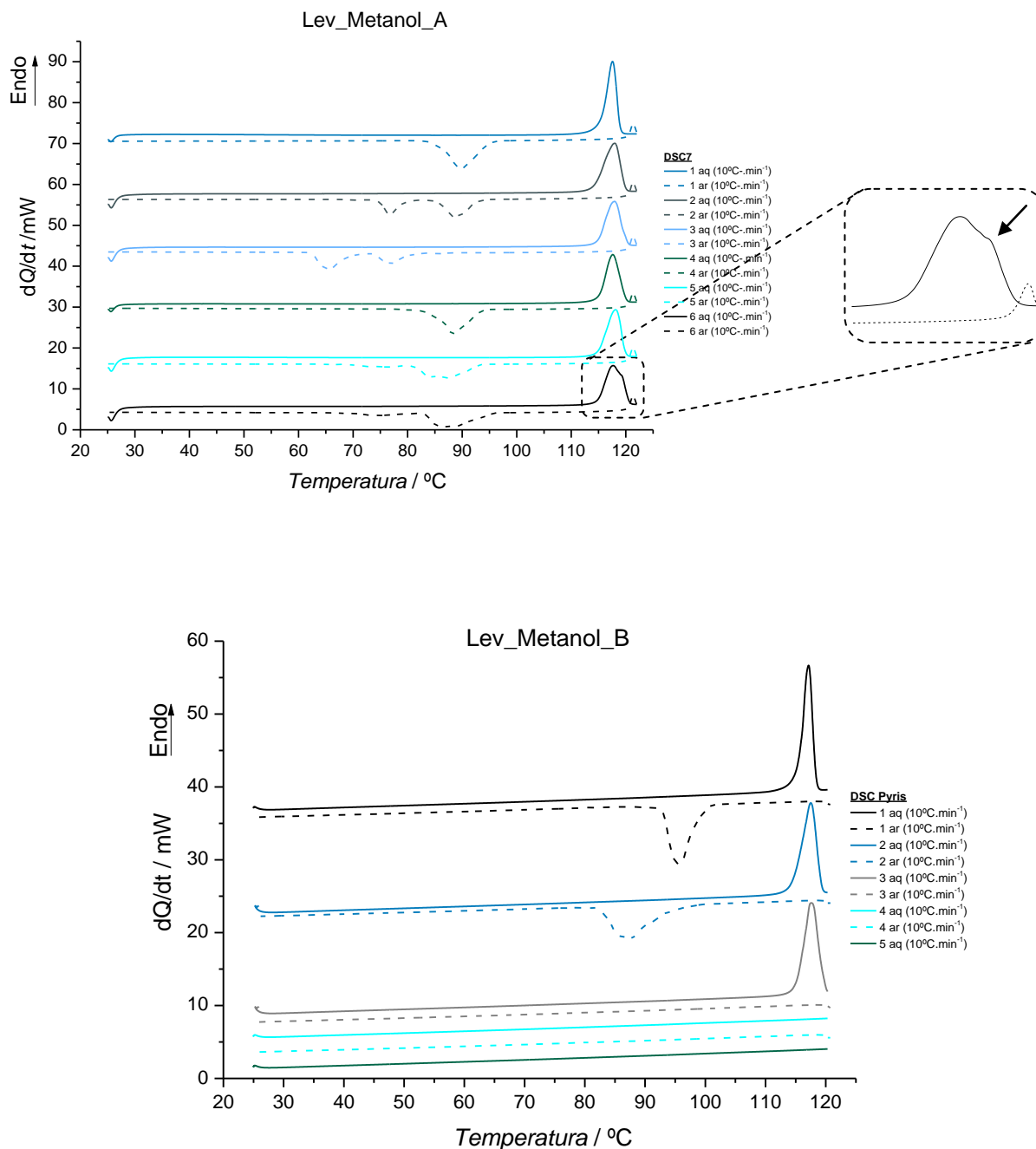
**Figura 3.8.** Levetiracetam: Difratogramas de raios-X de pó com variação de temperatura do material cristalizado do fundido (sólido de partida cristalizado em etanol), e difratograma simulado a partir da estrutura cristalina resolvida do composto de partida <sup>57</sup>.

### 3.1.2. ESTUDO DO LEVETIRACETAM CRISTALIZADO EM METANOL

As curvas obtidas nos vários ciclos de aquecimento/arrefecimento realizados por DSC sobre o material obtido por cristalização em metanol são apresentadas na Figura 3.9. A Tabela 3.3 resume os respectivos parâmetros termodinâmicos, sendo a temperatura e a entalpia de fusão no primeiro aquecimento indistinguíveis das do composto de partida. A comparação dos espectros de FTIR-ATR, Figura 3.4, e dos difratogramas de raios-X de pó, Figura 3.10, desta amostra e do composto de partida, indicam tratar-se da mesma estrutura cristalina. No entanto, nas imagens de termomicroscopia relativas ao primeiro aquecimento, mostradas na Figura 3.11, são notórias alterações por volta de 112 °C, o que poderá resultar da fusão de uma quantidade residual do polimorfo que foi observado nas experiências de arrefecimento do fundido registadas na Figura 3.6, com  $T_{fus} \approx 113$  °C, e que denominamos polimorfo II.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sólido cristalizado de metanol deverá ser constituído maioritariamente pelo polimorfo de partida, I, e por uma quantidade residual de II, abaixo do limite de detecção de FTIR e XRPD (tipicamente 5%), e da capacidade de detecção em DSC. Este resultado corrobora a importância de conjugação de vários métodos de análise na investigação de polimorfismo.



**Figura 3.9.** Levetiracetam: Curvas de DSC de duas cápsulas independentes do material obtido por cristalização em metanol; Lev\_Metanol\_A:  $m=1,65$  mg, Lev\_Metanol\_B:  $m=1,40$  mg (cápsulas de  $30\mu\text{L}$  fechadas;  $\beta=10$  °C.min<sup>-1</sup>).

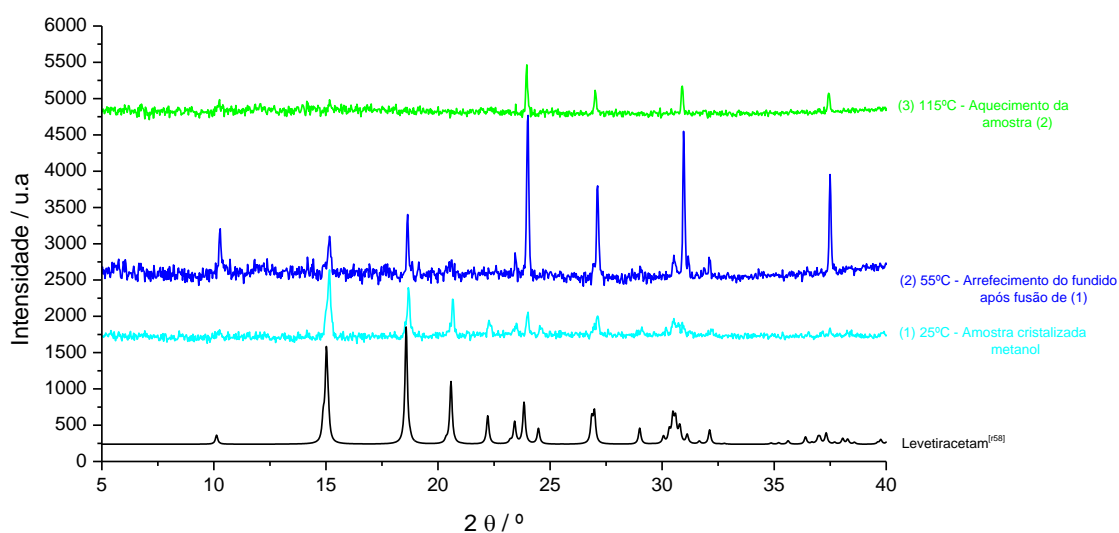


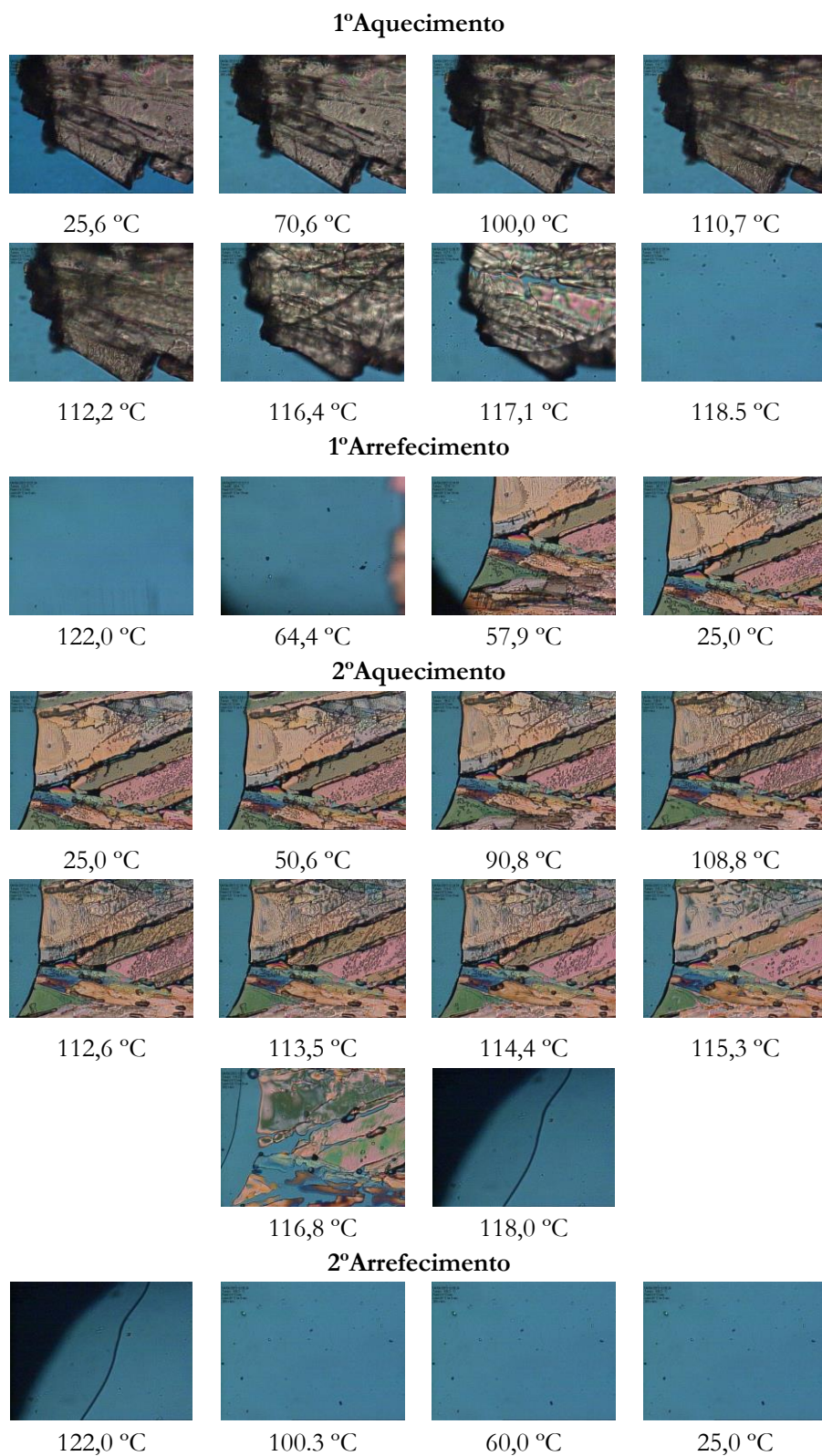
**Tabela 3.3.** Levetiracetam: Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC do material obtido por cristalização em metanol.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$		$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
<b>Lev_Metanol_A</b>					
1°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,4	26,2	1°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	95,0	-24,3
2°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	114,2	25,8	2°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	92,3	-20,7
3°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	114,9	22,0	3°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	69,0	-20,0
4°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,1	22,0	4°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	93,4	-20,7
5°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,0	22,4	5°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	92,8	-20,5
6°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	114,8	22,3	6°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	94,7	-20,8
<b>Lev_Metanol_B</b>					
1°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,5	25,3	1°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	98,6	-23,7
2°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	114,7	25,6	2°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	90,1	-24,6
3°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	115,4	25,4	3°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
4°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-	4°Ar 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-
5°Aq 25°C-122°C (10°C.min <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-

Mais uma vez é frequente a ocorrência de cristalização no arrefecimento do fundido, Figura 3.9 e Figura 3.11, com a observação ocasional de assimetria do pico de fusão subsequente. Os valores de temperatura de fusão e também as respectivas entalpias são, na amostra A, inferiores às do composto comercial ( $T_{\text{fus}} = 114,6 \pm 0,5$ ) °C e  $\Delta_{\text{fus}}H = 23,9 \pm 2,7$  kJ.mol<sup>-1</sup>; polimorfo III ?)

Para acompanhar os efeitos visíveis em calorimetria diferencial de varrimento, o material obtido por cristalização em metanol foi também analisado por difração de raios-X de pó com variação de temperatura, Figura 3.10.

**Figura 3.10.** Levetiracetam: Difratomogramas de raios-X de pó com variação de temperatura do material obtido por cristalização em metanol.



**Figura 3.11.** Levetiracetam: Imagens obtidas por PLTM, para o material obtido por cristalização em metanol;  $\beta=10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , ampliação 200x.

Como já referido, o difratograma do material obtido por cristalização em metanol (Lev\_Metanol) é idêntico ao difratograma simulado para a estrutura descrita na literatura, indicando

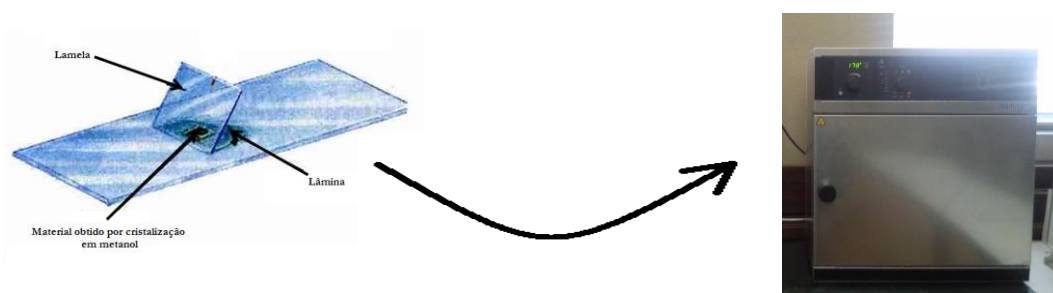
que se trata maioritariamente da mesma forma polimórfica, em concordância com a curva de DSC do primeiro aquecimento e com o espectro de infravermelho. Após a fusão do composto procedeu-se ao arrefecimento do líquido até 25 °C. Neste processo foi registado um difratograma à temperatura de 55 °C, o qual apresenta a generalidade das reflexões em ângulos idênticos aos observados na amostra comercial mas com relação de intensidades diferente: observa-se a intensificação das reflexões a 24°, 27°, 31° e 37° e desaparecimento de algumas. Este resultado pode dever-se a orientação preferencial ou à presença de uma mistura de polimorfos de estrutura muito próxima. Realizou-se o aquecimento deste sólido tendo-se obtido um difratograma à temperatura de 115 °C, onde é possível observar o desaparecimento de todas as outras reflexões com exceção das que situam a 24°, 27°, 31° e 37°.

A interpretação destes resultados exige a realização de ensaios adicionais que permitam excluir definitivamente a ocorrência de orientação preferencial.

### 3.1.2.1. ESTUDO DO CRISTALIZADO DO FUNDIDO POR IMAGIOLOGIA DE INFRAVERMELHO E DE RAMAN

Os resultados apresentados na secção anterior evidenciam que o material cristalizado do fundido poderá ser uma mistura de polimorfos.

Para dar suporte adicional a esta conclusão, preparou-se uma amostra como a seguir se descreve. Dispersou-se o material obtido por cristalização em metanol numa lâmina de vidro, e por cima desta colocou-se uma lamela. O conjunto foi colocado numa estufa a 118 °C, Figura 3.12. Atingida esta temperatura, o material funde e a temperatura da estufa foi baixada para 50 °C, para tentar a cristalização do fundido. Acompanhou-se o arrefecimento da amostra, e a cerca de 87 °C o fundido tinha voltado a cristalizar, tendo-se retirado a amostra da estufa. A velocidade de arrefecimento foi aproximadamente 0,5 °C.min<sup>-1</sup>.

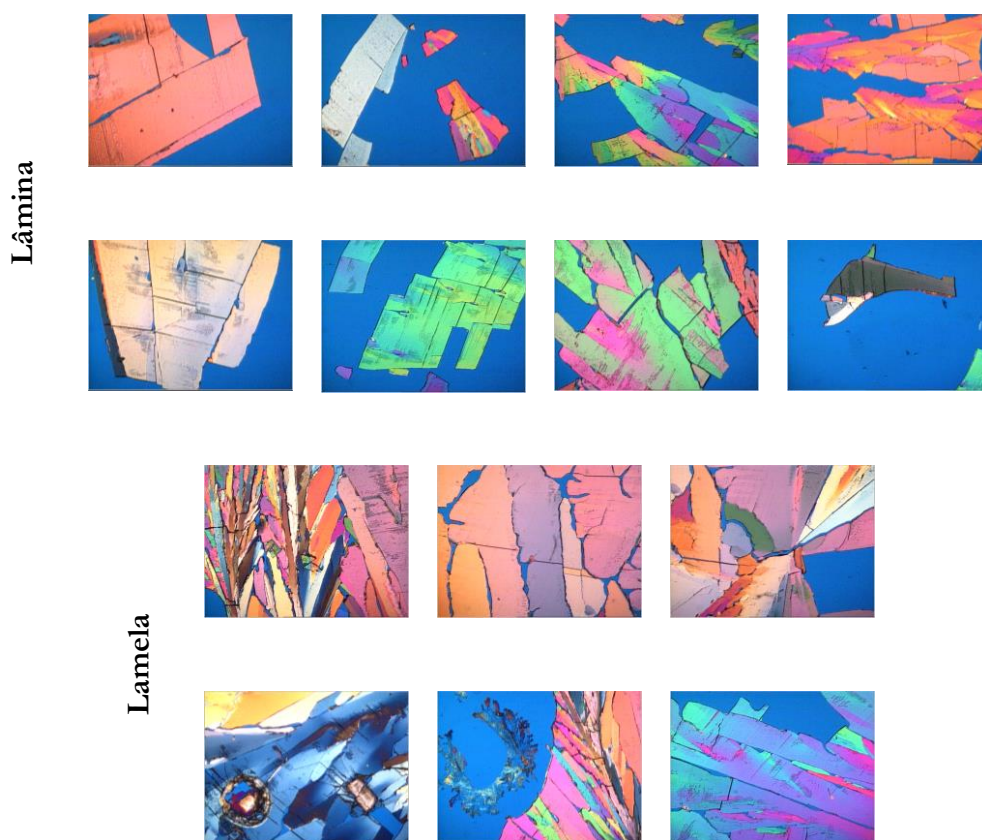


**Figura 3.12.** Representação esquemática da metodologia seguida para preparar uma dispersão do material cristalizado a partir do fundido.

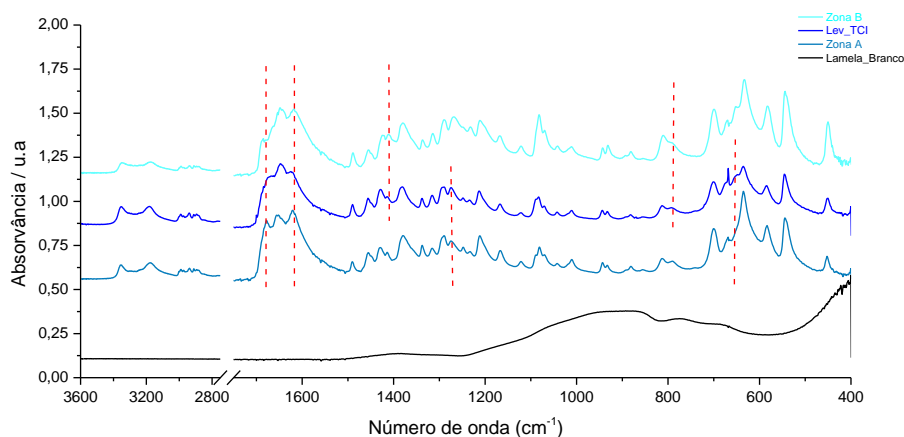
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação desta amostra foi feita por PLTM e por FTIR-ATR. Na Figura 3.13, são apresentadas as imagens obtidas por termomicroscopia com luz polarizada em diferentes zonas do material cristalizado do fundido em estufa.

As imagens obtidas por PLTM mostram que existem zonas com morfologias diferentes o que é compatível com uma possível mistura de polimorfos (mas não condição suficiente nem necessária). Os espectros de FTIR-ATR do material cristalizado do fundido foram obtidos em duas zonas distintas da lamela e comparados com o material de partida, Figura 3.14. Observamos diferenças significativas na banda de elongação C=O/deformação angular NH<sub>2</sub> em ambas as zonas da lamela analisadas, relativamente ao composto comercial. Na Zona A são também observadas diferenças aos 1268 cm<sup>-1</sup> e numa banda centrada a aproximadamente 640 cm<sup>-1</sup>. Na Zona B verificam-se aos 1415 e 791 cm<sup>-1</sup> diferenças relativamente ao composto de partida. O espectro de infravermelho da lamela (branco) foi obtido com o objetivo de verificar se interferia nos resultados, concluindo-se que tal não acontece. Desta forma, os resultados apontam claramente para a presença de uma mistura de polimorfos.



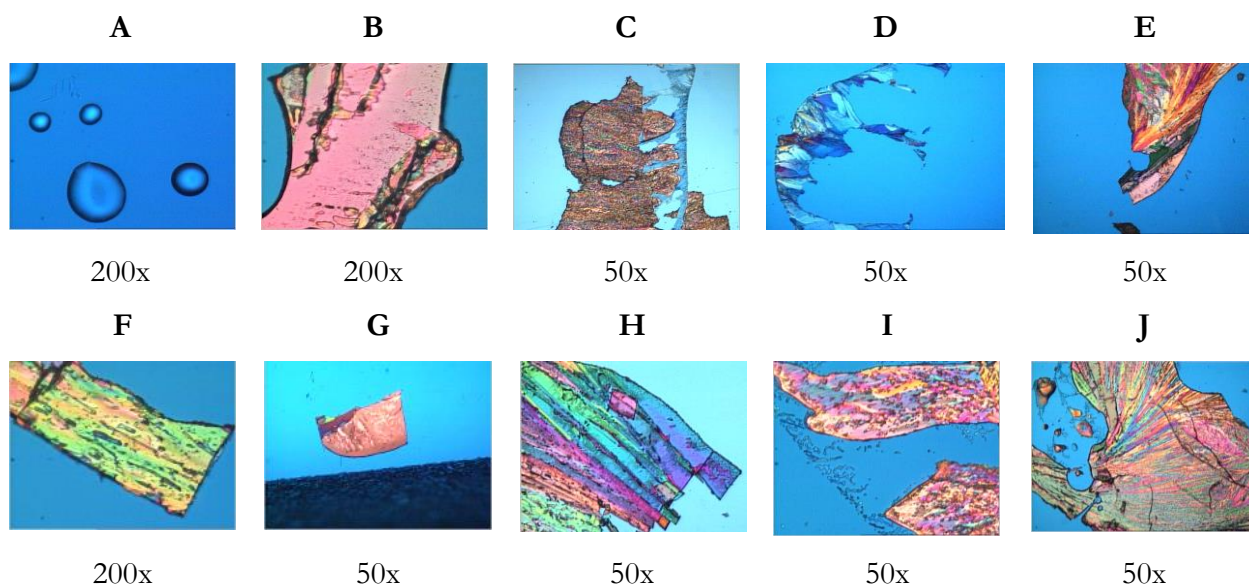
**Figura 3.13.** Imagens obtidas por PLTM do cristalizado do fundido preparado em estufa, ampliação 200x.



**Figura 3.14.** Espectros de FTIR-ATR do material cristalizado do fundido, em estufa.

A metodologia para preparar a dispersão do material cristalizado a partir do fundido, foi repetida numa célula de fluoreto de cálcio. Os sólidos obtidos foram analisados por PLTM, imagiologia de infravermelho e seguidamente por imagiologia de Raman.

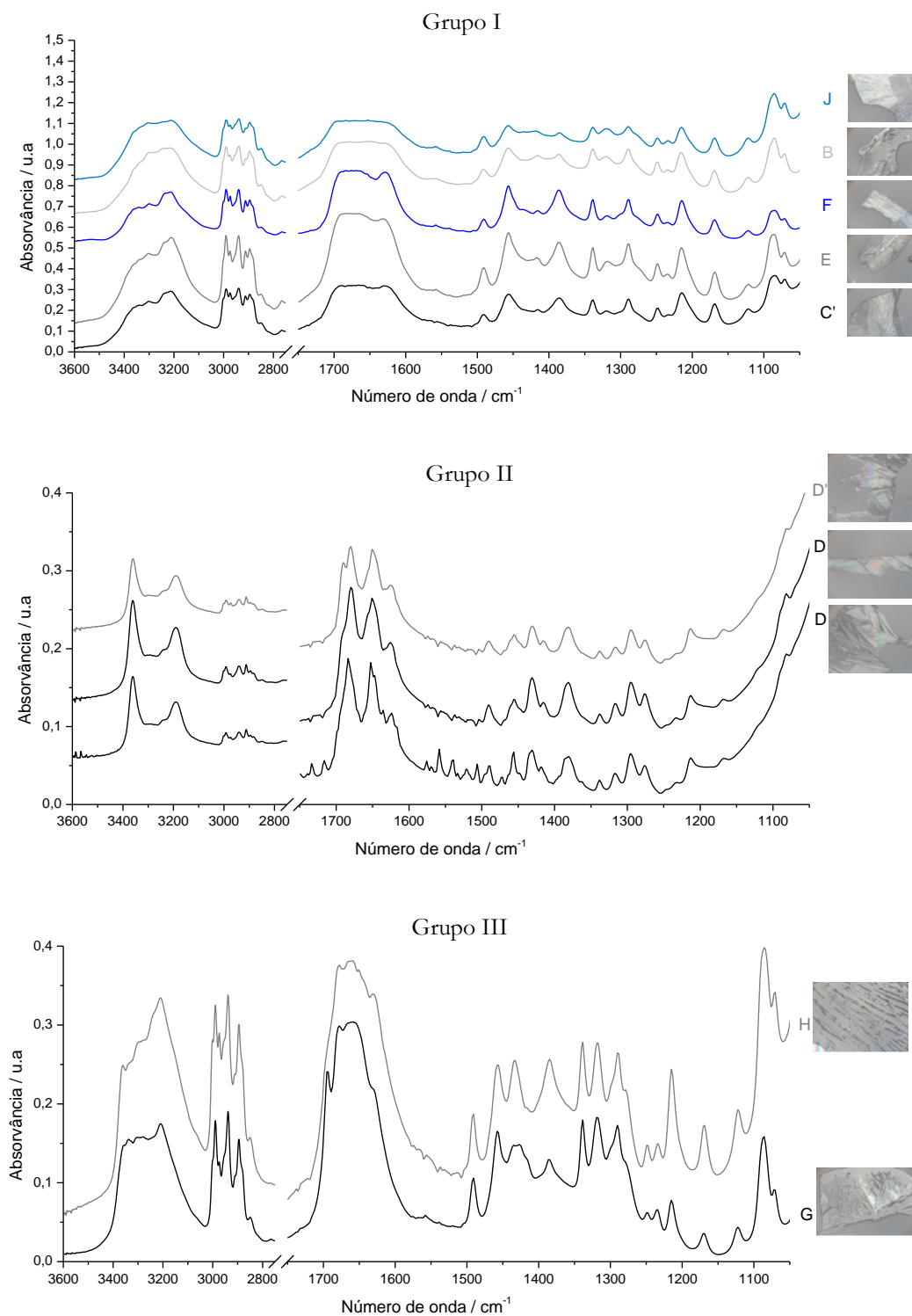
Mais uma vez, as imagens obtidas por PLTM, Figura 3.15, evidenciam diferentes morfologias e também a presença de material que não cristalizou.



**Figura 3.15.** Imagens obtidas por PLTM do cristalizado do fundido preparado em estufa numa célula de fluoreto de cálcio (a ampliação utilizada é indicada em cada imagem).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por imagiologia de infravermelho foi possível obter os espectros de algumas das regiões mostradas na Figura 3.15, os quais estão representados na Figura 3.16. Apesar da nítida saturação nalguns espectros na região de elongação de  $\text{NH}_2$  e do  $\text{C}=\text{O}$ , foi possível distinguir três padrões distintos.

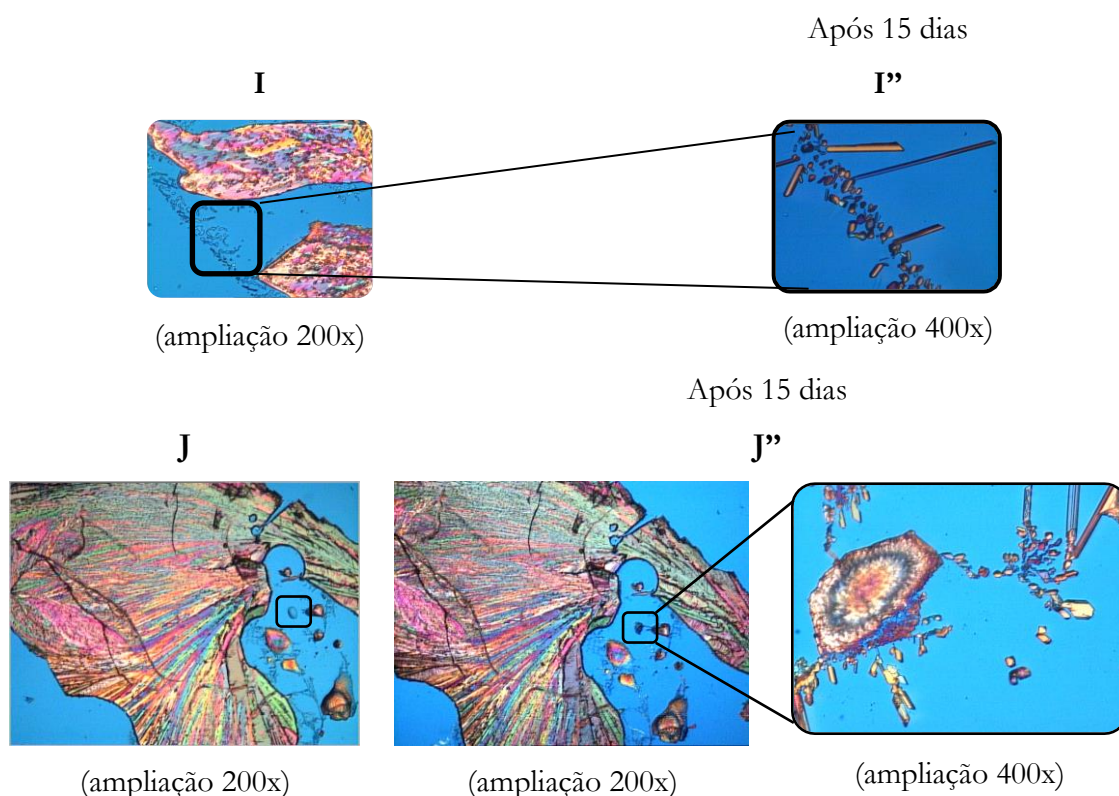


**Figura 3.16.** Imagens e espectros de diferentes zonas (Z) do material cristalizado do fundido em estufa numa célula de fluoreto de cálcio, obtidas por imagiologia em infravermelho. A identificação das diferentes regiões usa a nomenclatura da Figura 3.15. Z' indica uma região com morfologia idêntica a Z, mas não mostrada na Figura 3.15.

A análise de partículas separadas, que é possível com a imagiologia, permite afirmar que estamos perante uma mistura de polimorfos gerados por arrefecimento do fundido, uma vez que existem diferenças notórias nos espectros de infravermelho individuais, tanto nas bandas de elongação  $\text{NH}_2$  e na  $\text{C=O}$ , como também no intervalo de  $1500\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ .

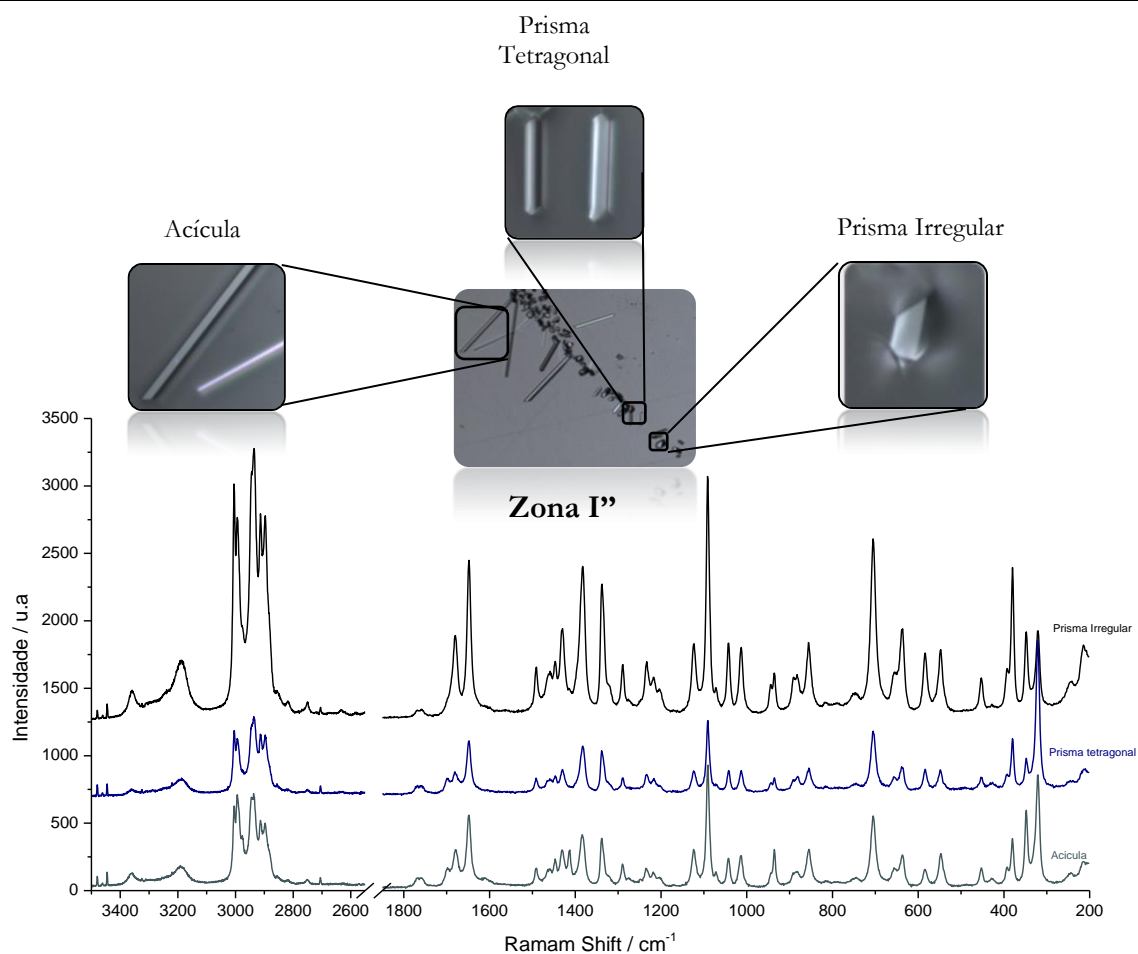
A amostra foi posteriormente investigada por imagiologia de Raman. Por questões de disponibilidade de equipamento estes ensaios foram realizados após quinze dias, durante os quais a amostra permaneceu num exsiccador, sobre gel de sílica.

Da observação por PLTM de diferentes zonas do material cristalizado do fundido, antes e após acondicionamento por quinze dias em exsiccador, verificou-se que ocorreu cristalização de algumas gotas, como se pode observar na Figura 3.17, zonas em I' e J'', tendo-se formado monocristais com diferentes morfologias. Decidiu-se dar prioridade à análise destes monocristais por imagiologia de Raman, tendo sido também possível observar algumas das outras regiões analisadas anteriormente por imagiologia de infravermelho.

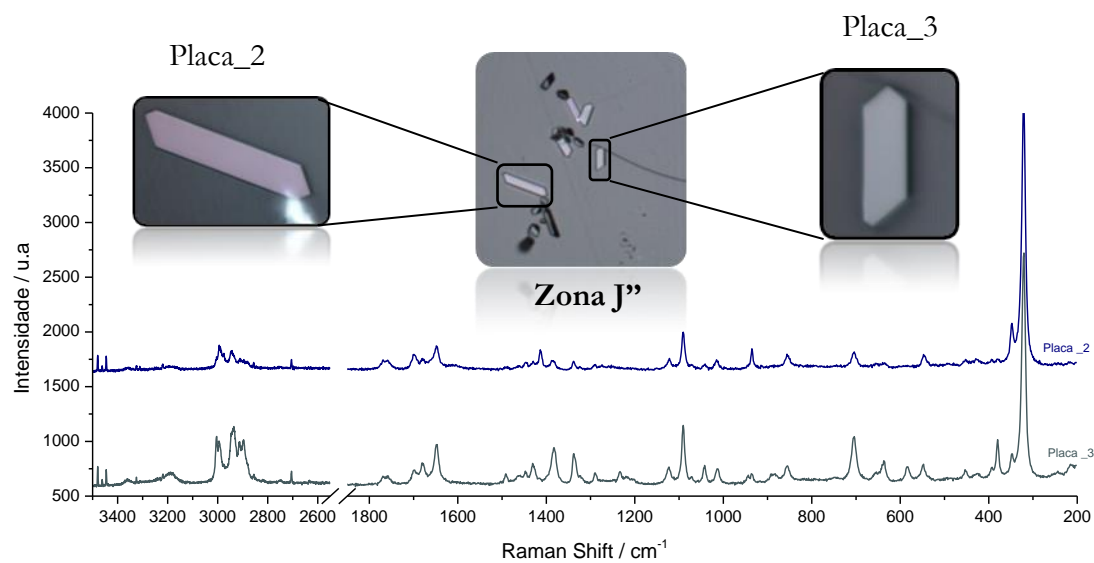


**Figura 3.17.** Imagens obtidas por PLTM de algumas zonas do material cristalizado do fundido, após acondicionamento durante quinze dias no exsiccador.

Nas Figura 3.18 e Figura 3.19 apresentam-se os espectros obtidos para os monocristais formados nas zonas I'' e J'', respetivamente.



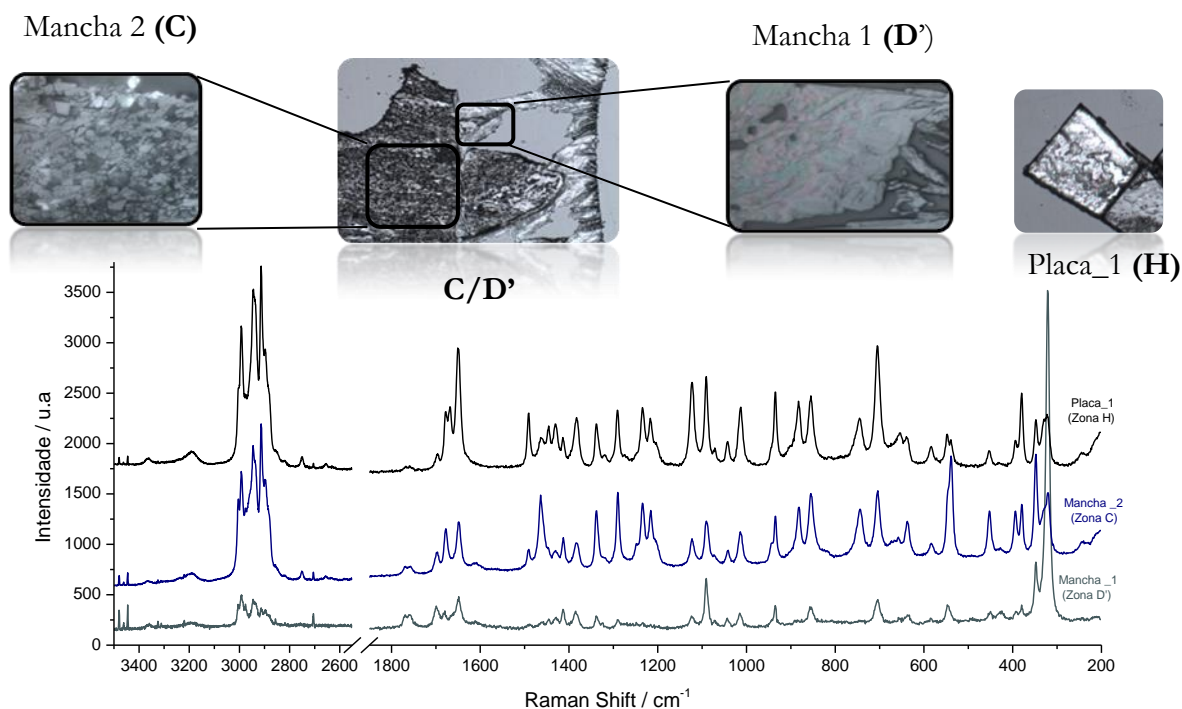
**Figura 3.18.** Espectros e imagens obtidos por imagiologia de Raman dos monocristais de levamisole formados por cristalização do fundido (zona I', Figura 3.17).



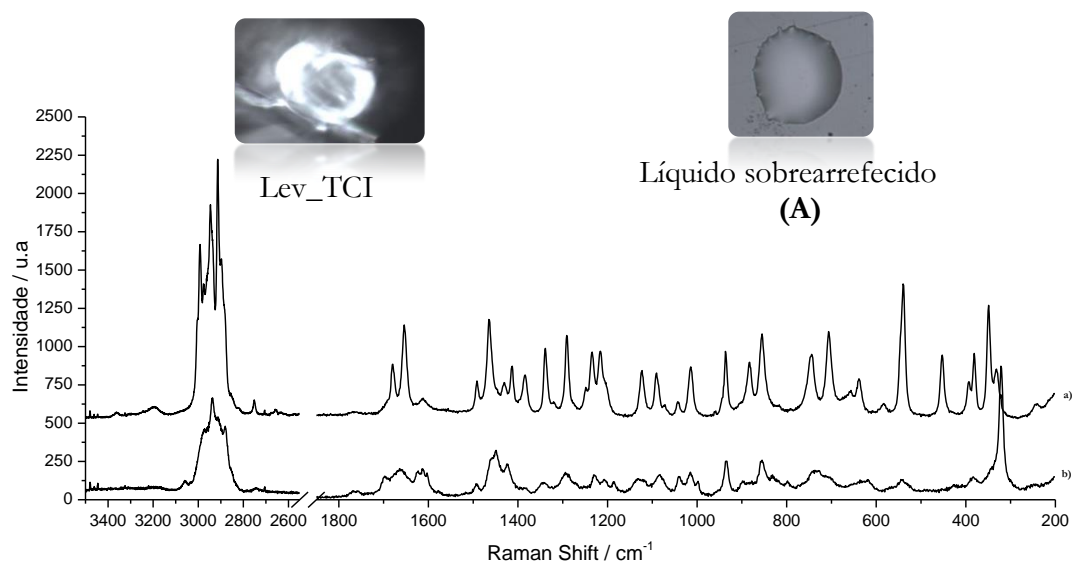
**Figura 3.19.** Espectros e imagens obtidos por imagiologia de Raman dos monocristais de levamisole formados por cristalização do fundido (zona J', Figura 3.17).



Na Figura 3.20 apresentam-se os espectros obtidos nas zonas C, D' e H identificadas na Figura 3.15. Os espectros do composto de partida, Lev\_TCI, e do líquido sobrearrefecido estão coligidos na Figura 3.21.



**Figura 3.20.** Espectros e imagens obtidos por imagiologia de Raman de levetiracetam (zonas C, D' e H, Figura 3.15).



**Figura 3.21.** Imagiologia de Raman: a) espectro do composto de partida, polimorfo I; b) espectro do líquido sobrearrefecido.

Após uma análise detalhada, e comparando os espectros do composto de partida, Lev\_TCI, e do líquido sobrearrefecido com os demais, é possível agrupar os espectros em três grupos distintos,

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

que se mostram na Figura 3.22. O grupo A engloba os espectros que mais se aproximam do polimorfo I. O espectro da zona H, apesar de incluído neste grupo, apresenta algumas diferenças, como assinalado. Está prevista a realização de ensaios adicionais para excluir qualquer efeito de orientação preferencial.

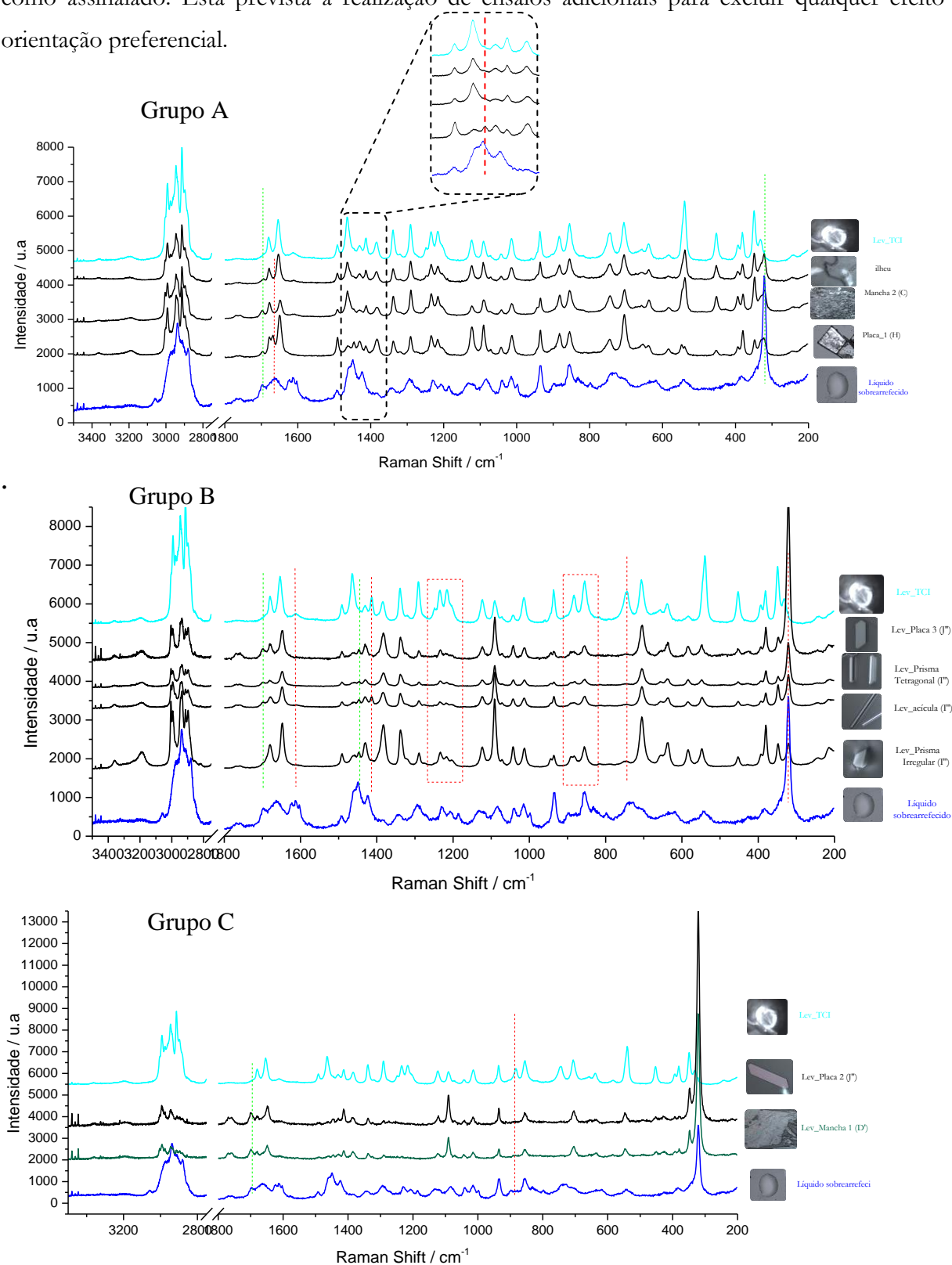
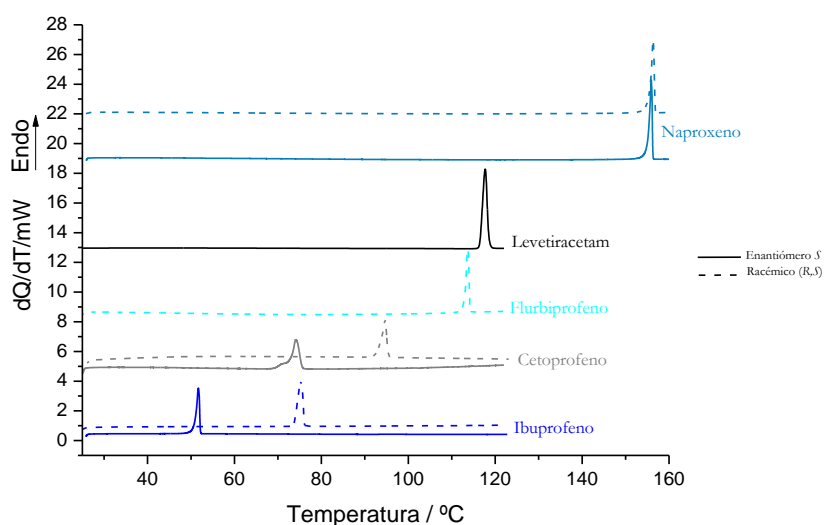


Figura 3.22. Levetiracetam: Agrupamento dos espectros obtidos por imagiologia de Raman do material cristalizado do fundido.

### 3.2. INVESTIGAÇÃO DE CO-CRISTALIZAÇÃO DE LEVETIRACETAM COM ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO-ESTERÓIDES QUIRAIS

Na investigação de co-cristais, o composto de partida e os co-formadores foram inicialmente caracterizados por calorimetria diferencial de varrimento. As curvas de DSC do primeiro aquecimento do composto de partida e dos co-formadores, encontram-se representadas na Figura 3.23 e os respectivos parâmetros termodinâmicos na Tabela 3.4.



**Figura 3.23.** Curvas de DSC do primeiro aquecimento do composto de partida e dos co-formadores usados na investigação de co-cristais, cápsula de 30 $\mu$ L fechada,  $\beta=2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Tabela 3.4.** Parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC de aquecimento do composto de partida e dos co-formadores usados na investigação de co-cristais de levetiracetam.

	$T_{\text{onset}} / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	n
levetiracetam	$116,3 \pm 0,3$	$27,0 \pm 0,5$	6
(S)-Ibu	$50,9 \pm 0,4$	$18,1 \pm 0,5$	3
(R,S)-Ibu	$73,8 \pm 0,3$	$26,7 \pm 0,5$	3
(S)-Kp	72,8 / 73,7	23,1 / 23,7	2
(R,S)-Kp	93,6 / 93,2	27,6 / 28,3	2
(R,S)-Fbp	113,0 / 113,8	27,2 / 27,5	2
(S)-Npx	$154,4 \pm 0,3$	$30,7 \pm 0,3$	3
(R,S)-Npx	$154,8 \pm 0,2$	$33,2 \pm 0,2$	3

Como se referiu, os racematos de todos os co-formadores escolhidos são compostos racêmicos. No caso do ibuprofeno e do cetoprofeno, estes compostos têm temperaturas de fusão

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

superiores às dos respectivos enantiômeros. Já no caso do naproxeno, os valores de temperatura de fusão dos enantiômeros e do racemato são indistinguíveis. Para além destas diferenças, o naproxeno tem temperatura de fusão superior à do levetiracetam em cerca de 40 °C, e no caso do cetoprofeno e do ibuprofeno, quer os enantiômeros quer os racematos, fundem abaixo do composto base deste trabalho (uma diferença de cerca de -60 °C no caso do (*S*)-ibuprofeno). O (*R,S*)-flurbiprofeno por sua vez, tem temperatura de fusão muito próxima da do levetiracetam.

Na generalidade das estruturas cristalinas resolvidas, quer de enantiômeros quer de compostos racémicos, como referimos na introdução deste trabalho, há formação de dímeros cíclicos ácido-ácido. A estrutura cristalina dos enantiômeros do naproxeno constitui uma exceção.

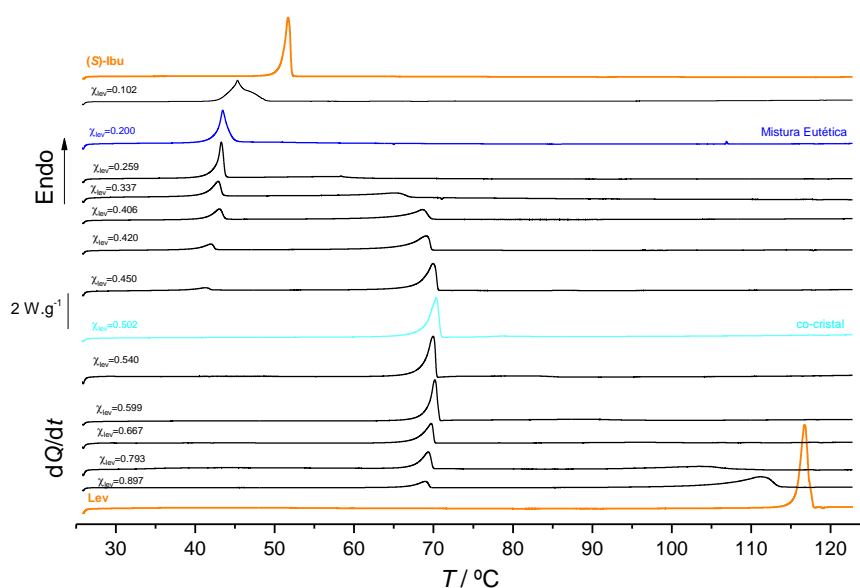
Selecionou-se, assim, um conjunto de pares de potenciais co-formadores quirais e racémicos, com a mesma natureza dos racematos, com potencialidade de formação de sintões supramoleculares semelhantes com o levetiracetam, mas com diferenças significativas, nos detalhes de estrutura cristalina e, também, no que diz respeito à temperatura de fusão. Uma vez que era objetivo do trabalho avaliar a capacidade de discriminação enantiosseletiva do levetiracetam na formação de co-cristais, usando a mecanoquímica como método de síntese, prepararam-se por este método na ausência de solvente, misturas binárias de diferentes composições, do composto com cada um dos racematos e com um dos enantiômeros dos co-formadores investigados.

As misturas foram avaliadas por calorimetria diferencial de varrimento e por FTIR-ATR. Os dados de DSC são usadas para estabelecer os diagramas de fase binários (ou pseudo-binários), que permitem identificar co-cristais e outras misturas de interesse.

#### 3.2.1. LEVETIRACETAM:(*S*)-IBUPROFENO VS LEVETIRACETAM:(*R,S*)-IBUPROFENO

##### 3.2.1.1. SISTEMA LEVETIRACETAM:(*S*)-IBUPROFENO

Na Figura 3.24, são apresentadas as curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos puros e das misturas de ambos nas proporções de (1:9), (1:4), (1:3), (1:2), (2:3), (1:1,25), (1:1,22), (1:1), (1:0,80), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1). As curvas foram traçadas com velocidade de varrimento de 2°C.min<sup>-1</sup>. As misturas, como referido no capítulo 2, foram obtidas por mecanoquímica sem solvente, com frequência de vibração de 15 Hz e tempo de moagem de 30 minutos. As temperaturas de interesse de cada curva de DSC são apresentadas na Tabela 3.5.



**Figura 3.24.** Curvas de DSC do primeiro aquecimento de levetiracetam e de (*S*)-ibuprofeno e de misturas de ambos os compostos obtidas por mecanoquímica,  $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsula de 30  $\mu\text{L}$  fechada.

**Tabela 3.5.** Temperaturas de interesse obtidas a partir das curvas de DSC dos primeiros aquecimentos de levetiracetam, e (*S*)-Ibu e das misturas de ambos os compostos nas proporções (1:9), (1:4), (1:3), (1:2), (2:3), (1:1,25), (1:1,22), (1:1), (1:0,80), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) obtidas por mecanoquímica.

	$x_{Lev}$	$T_{onset} / ^{\circ}\text{C}$	$T_{m\acute{a}x} / ^{\circ}\text{C}$
( <i>S</i> )-Ibu	0	$50,9 \pm 0,4$ (n=3)	
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:9)	0,102	44,2	46,8
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:4)	0,200	$42,0 \pm 0,3$ (n=3)	-
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:3)	0,259	42,6	58,3
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:2)	0,337	41,3	65,2
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (2:3)	0,406	41,5	68,6
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:1,25)	0,420	40,1	69,1
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:1,22)	0,450	39,34	69,9
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:1)	0,502	$68,7 \pm 0,3$ (n=5)	-
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (1:0,80)	0,540	68,6	82,6
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (3:2)	0,599	69,2	88,6
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (2:1)	0,667	68,0	96,6
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (4:1)	0,793	67,7	103,3
Lev:( <i>S</i> )-Ibu (9:1)	0,897	67,0	111,1
Lev	1	$116,3 \pm 0,3$ (n=6)	-

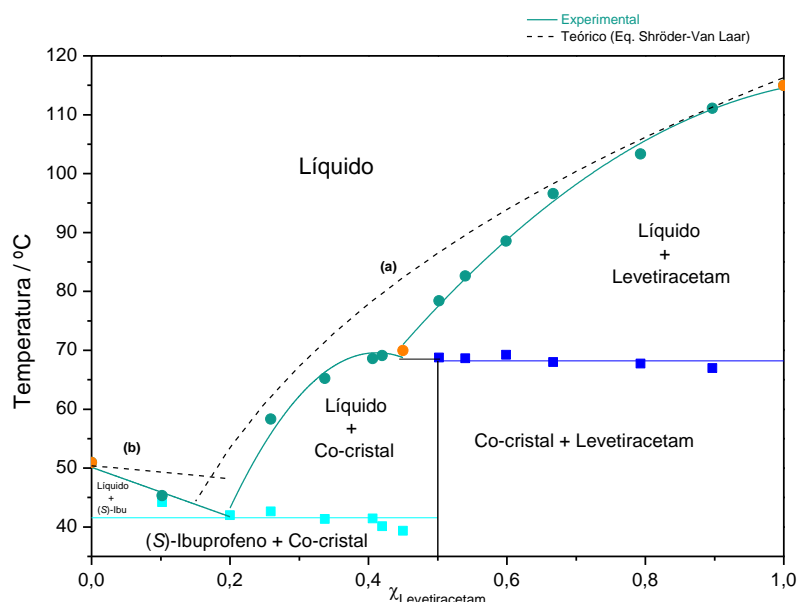
Por análise das curvas de DSC, é possível identificar dois pontos invariantes, um deles com temperatura de fusão inferior a ambos os compostos,  $T_{fus} = (41,6 \pm 1,7) ^{\circ}\text{C}$  e um outro a  $T_{fus} = (68,1 \pm 0,8) ^{\circ}\text{C}$  superior portanto à temperatura de fusão do (*S*)-ibuprofeno. Este

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

comportamento é indicativo de formação de um composto de adição, co-cristal, entre os dois componentes.

Na Figura 3.25, está apresentado o diagrama de fases sólido-líquido do sistema binário levetiracetam/(*S*)-ibuprofeno, construído com base nos valores apresentados na Tabela 3.5 e complementado com informação obtida por FTIR e XRPD.

O diagrama aponta para a formação de um co-cristal (1:1) com fusão incongruente. No espectro de FTIR da mistura (1:1), apresentado na Figura 3.26, verifica-se um deslocamento notório do modo vibracional de elongação assimétrica do grupo  $\text{NH}_2$ , que no espectro de levetiracetam, composto de partida, se apresenta a  $3353\text{ cm}^{-1}$  e surge deslocado para um número de onda de  $3367\text{ cm}^{-1}$ . Também o modo vibracional de elongação  $\text{C}=\text{O}$ , que no espectro de (*S*)-ibuprofeno se encontra a  $1701\text{ cm}^{-1}$ , nesta mistura aparece deslocado para  $1715\text{ cm}^{-1}$ . Não há evidência da presença de excesso de qualquer um dos componentes de partida. Desta forma, os resultados indicam formação de um co-cristal, na proporção 1:1. Os espectros de todas as outras misturas apresentam as bandas do co-cristal e excesso de um dos compostos de partida. Nos espectros de infravermelho das misturas de (1:9), (1:3), (1:2), (2:3), (1:1,25), (1:1,22), há evidência de excesso de (*S*)-ibuprofeno, por exemplo, a  $1701, 945, 475$  e  $425\text{ cm}^{-1}$ . Nas misturas (1:0,80), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) há evidências de excesso de levetiracetam, por exemplo a  $3184$  e  $1370\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 3.25.** Diagrama de fase sólido-líquido do sistema binário levetiracetam/(*S*)-ibuprofeno. As linhas a cheio são guias para orientação visual.

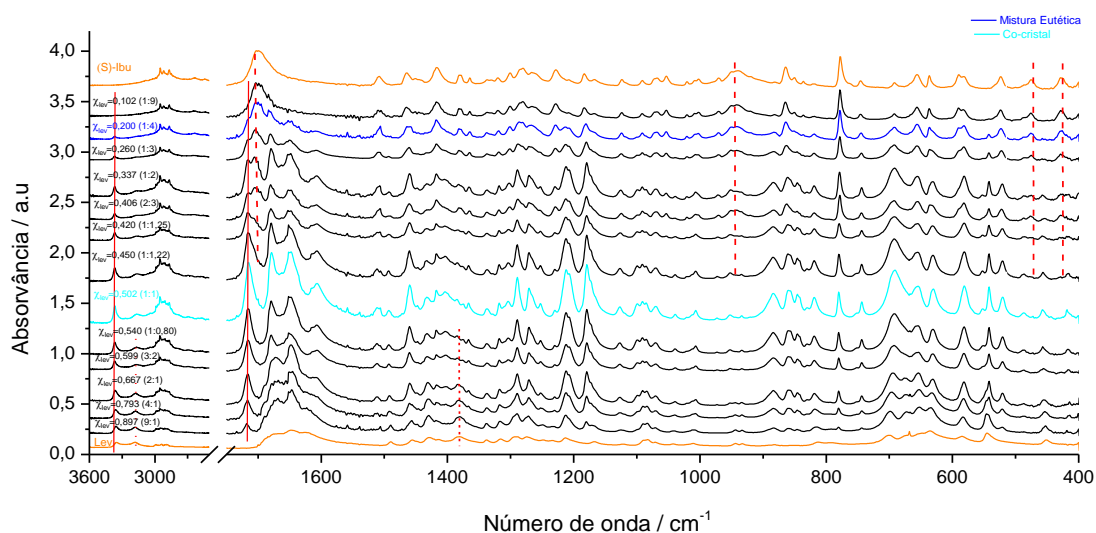
O diagrama de fases binário levetiracetam/(*S*)-ibuprofeno permite identificar um eutético a  $x_{Lev} = 0,20$ ;  $T_{fus, eut} = 41,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  e um peritético a  $T_{fus} = 68,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . É ainda possível observar que o

sistema não possui comportamento ideal, uma vez que o *liquidus* na região de excesso de cada um dos componentes de partida seria representado pelas linhas a tracejado que foram obtidas por aplicação da equação de Schröder-Van Laar (eq.3.1). No diagrama, pela letra (a) está representada a previsão obtida por esta equação na vizinhança do levetiracetam e por (b) previsão na vizinhança (S)-ibuprofeno.

No diagrama de fases sólido-líquido de um sistema binário, o *liquidus* pode ser previsto teoricamente através da equação de Schröder-Van Laar (eq.3.1) na vizinhança de cada um dos compostos em estudo, se a solução for ideal, os compostos imiscíveis em fase sólida e  $\Delta_{fus}H$  independente da temperatura.

$$R \ln x_C \approx \Delta \bar{H}_{fus,C} \left( \frac{1}{T_C^*} - \frac{1}{T} \right) \quad (\text{eq.3.1})$$

Onde  $R$  corresponde à constante de gás ideal  $x_C$  é a fração molar do composto mais abundante na mistura,  $\Delta \bar{H}_{fus,C}$  e  $T_C^*$  são a entalpia e a temperatura de fusão do composto puro, respectivamente e  $T$  será a temperatura de fusão do composto para cada fração molar, neste caso a incógnita. A entalpia e a temperatura de fusão dos compostos puros são obtidas através da análise por DSC, sob as mesmas condições experimentais, Tabela 3.5.

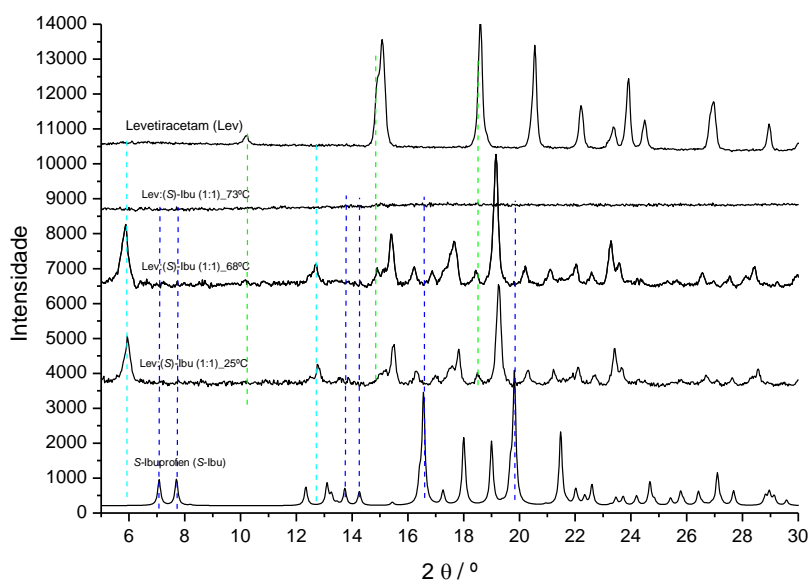


**Figura 3.26.** Espetros de FTIR-ATR de levetiracetam, do (S)-ibuprofeno e das misturas Lev:(S)-Ibu de proporção (1:9), (1:4), (1:3), (1:2), (2:3), (1:1,25), (1:1,22), (1:1), (1:0,80), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1), obtidas por mecanoquímica.

Na Figura 3.27 apresentam-se os difratogramas experimentais de raios-X de pó para a mistura Lev:(S)-Ibu (1:1) obtidos a diferentes temperaturas (25 °C, 68 °C e 73 °C). Os difratogramas dos compostos puros simulados a partir das estruturas publicadas foram incluídos também na Figura 3.27, com objetivo de comparação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise dos três difratogramas (Lev, (S)-Ibu e da mistura de Lev:(S)-Ibu (1:1)<sub>25°C</sub>, é clara a presença de um novo arranjo cristalino na mistura, comparativamente aos compostos de partida. Na Figura 3.27 estão assinaladas algumas reflexões características de cada difratograma. No difratograma do levetiracetam, estão assinaladas as linhas a 10,21°, 14,9° e 18,6° (linhas a verde). A primeira reflexão está ausente no co-cristal. Relativamente ao difratograma do (S)-ibuprofeno estão assinaladas as reflexões 7,1°, 7,7°, 13,8°, 14,3°, 16,5° e 19,8° (linhas a azul) que não se encontram presentes no difratograma da mistura. No difratograma do co-cristal, Lev:(S)-Ibu (1:1)<sub>25°C</sub>, observam-se novas reflexões, que estão assinaladas a turquesa, a 5,9° e 12,8°.



**Figura 3.27.** Difratogramas de raios-X pó do co-cristal Lev:(S)-Ibu (1:1) obtidos a diferentes temperaturas e difratogramas simulados a partir das estruturas cristalinas publicadas dos compostos de partida, Lev<sup>57</sup> e (S)-Ibu<sup>76</sup>.

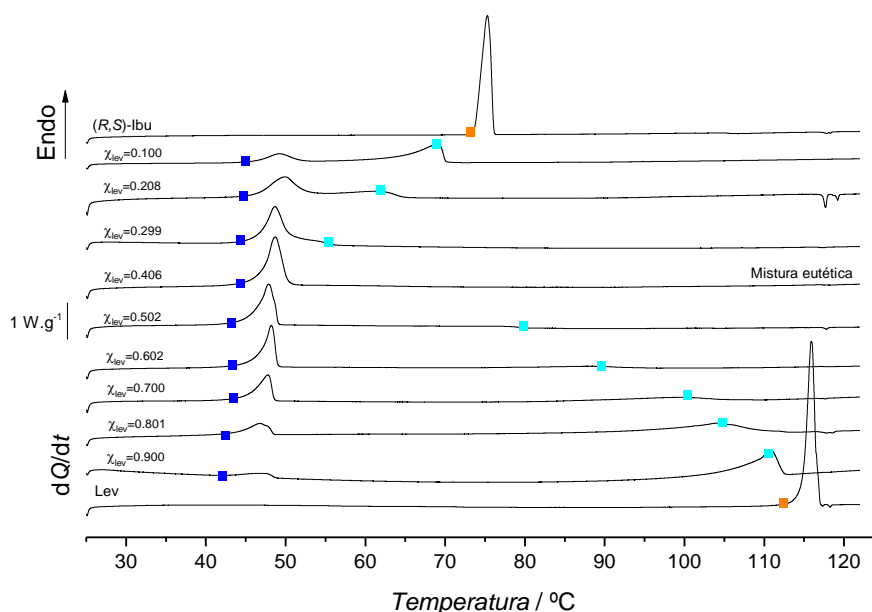
Simultaneamente com a realização deste trabalho, T. Leyssens e colaboradores<sup>59</sup> sintetizaram, também por mecanoquímica, este mesmo co-cristal. As condições de síntese que utilizaram são, no entanto, mais severas: 30 Hz, 90 minutos, 10  $\mu$ L de metanol.

#### 3.2.1.2. SISTEMA LEVETIRACETAM:(R,S)-IBUPROFENO

Na Figura 3.28, estão representadas as curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida e de misturas dos dois compostos nas proporções de (1:9), (1:4), (3:7), (2:3), (1:1), (3:2), (7:3), (4:1) e (9:1), obtidas com velocidade de varrimento de 2 °C.min<sup>-1</sup>. Na Tabela 3.6, apresentam-se as respetivas temperaturas de interesse.



O sistema apresenta um ponto invariante a  $T_{\text{fus}} = (45,8 \pm 1,4) \text{ } ^\circ\text{C}$ . O facto deste valor de temperatura ser inferior às temperaturas de fusão de ambos os compostos puros aponta para que estejamos perante uma mistura eutética. A mistura Lev:(R,S)-Ibu de fração molar de  $x_{\text{Lev}} = 0,41$  apresenta um único pico endotérmico, indicando tratar-se da composição do eutético. As restantes misturas apresentam adicionalmente um outro pico endotérmico que resulta de fusão do excesso de um dos compostos de partida, relativamente à composição do eutético.



**Figura 3.28.** Curvas de DSC do primeiro aquecimento do Lev, (R,S)-Ibu e das misturas de ambos obtidas em moinho de bolas,  $\beta=2 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula de  $30 \text{ } \mu\text{L}$ , fechada.

**Tabela 3.6.** Temperaturas de interesse das curvas de DSC do primeiro aquecimento do Lev, (R,S)-Ibu e das misturas (1:9), (1:4), (3:7), (2:3), (1:1), (3:2), (7:3), (4:1) e (9:1), obtidas em moinho de bolas.

	$x_{\text{Lev}}$	$T_{\text{onset}} / \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{\text{máx}} / \text{ } ^\circ\text{C}$
<b>(R,S)-Ibu</b>	0	$73,8 \pm 0,3$ (n=3)	-
<b>Lev:(R,S)-Ibu (1:9)</b>	0,100	46,4	69,0
<b>Lev:(R,S)-Ibu (1:4)</b>	0,208	46,6	61,8
<b>Lev:(R,S)-Ibu (3:7)</b>	0,299	46,6	54,3
<b>Lev:(R,S)-Ibu (2:3)</b>	0,406	$47,2 \pm 0,5$ (n=5)	-
<b>Lev:(R,S)-Ibu (1:1)</b>	0,502	46,2	76,6
<b>Lev:(R,S)-Ibu (3:2)</b>	0,602	46,7	88,6
<b>Lev:(R,S)-Ibu (7:3)</b>	0,700	45,3	99,8
<b>Lev:(R,S)-Ibu (4:1)</b>	0,801	43,8	104,2
<b>Lev:(S)-Ibu (9:1)</b>	0,900	43,1	110,9
<b>Lev</b>	1	$116,3 \pm 0,3$ (n=6)	-

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estes dados permitem construir o diagrama de fase sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/(R,S)-ibuprofeno, apresentado na Figura 3.29.

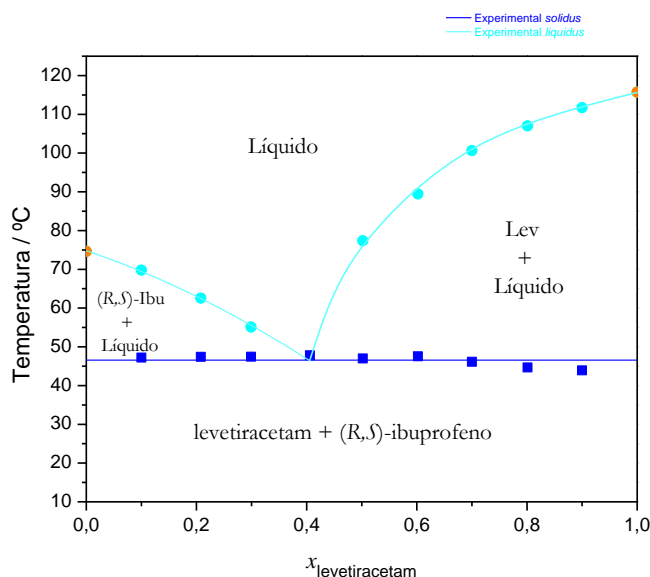


Figura 3.29. Diagrama de fase sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/(R,S)-ibuprofeno.

Por comparação dos espectros dos compostos de partida, Lev e (R,S)-Ibu, e das diferentes misturas, mostrados na Figura 3.30, conclui-se que não há qualquer deslocamento nas bandas observadas: os espectros das misturas são apenas simples soma das contribuições dos compostos de partida. Confirma-se que o racemato de ibuprofeno não é alterado no processo de moagem e que se obteve uma mistura física do Lev:(R,S)-Ibu. Leyssen e colaboradores<sup>59</sup> não conseguiram obter co-cristais entre o levetiracetam e o (R)-ibuprofeno, com as metodologias que empregaram. Nas condições utilizadas no nosso estudo, não foi possível, também, obter o co-cristal com o enantiômero (S), a partir do racemato.

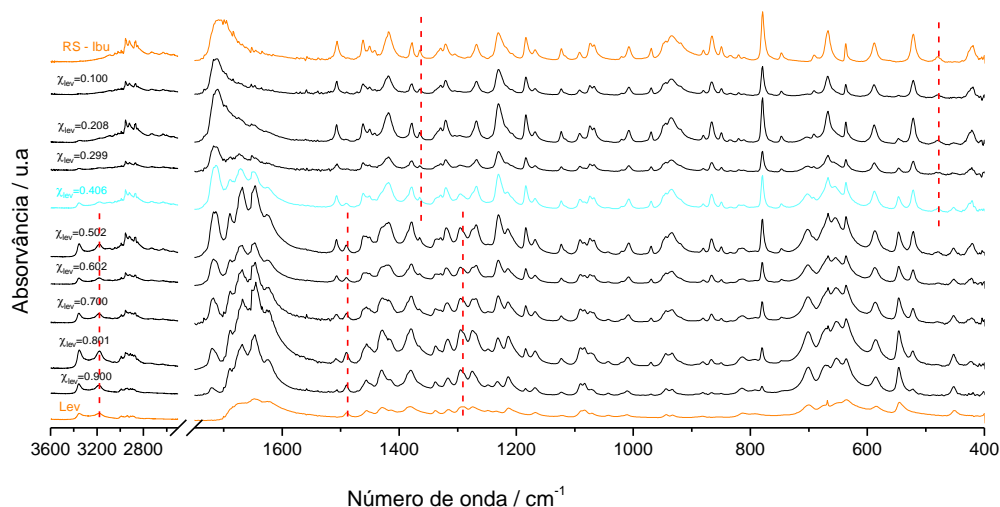
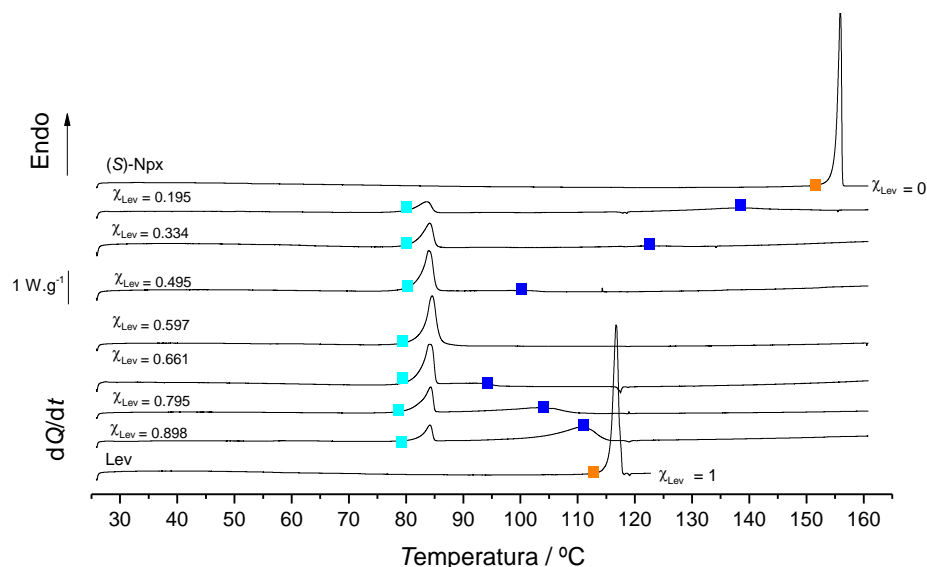


Figura 3.30. Espectros de FTIR-ATR dos compostos de partida, Lev e (R,S)-Ibu, e das misturas de ambos, obtidas em moinho de bolas.

## 3.2.2. LEVETIRACETAM:(S)-NAPROXENO VS LEVETIRACETAM:(R,S)-NAPROXENO

Na Figura 3.31, encontram-se representadas as curvas de DSC ( $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) do Lev, (S)-Npx e das misturas Lev:(S)-Npx obtidas por moagem em moinho de bolas com proporção de (1:4), (1:2), (1:1), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1). Os valores das temperaturas de interesse estão indicados na Tabela 3.7.



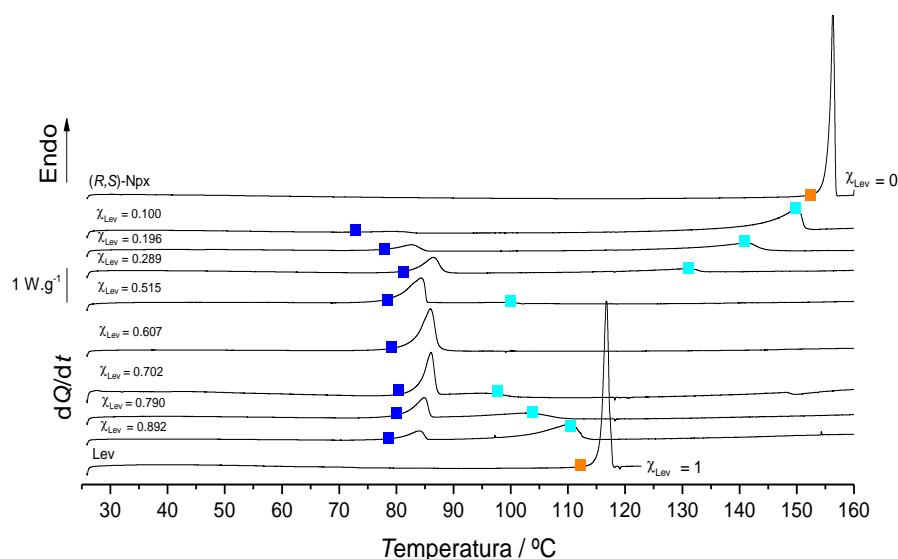
**Figura 3.31.** Representação das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida levetiracetam, (S)-naproxeno e das misturas de ambos) obtidas por mecanoquímica,  $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsula fechada de 30  $\mu\text{L}$ .

**Tabela 3.7.** Temperaturas de interesse obtidas a partir das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida levetiracetam, (S)-naproxeno e das misturas (1:4), (1:2), (1:1), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) obtidas por mecanoquímica.

	$\chi_{Lev}$	$T_{onset} / ^{\circ}\text{C}$	$T_{m\acute{a}x} / ^{\circ}\text{C}$
(S)-Npx	0	154,4 $\pm$ 0,3 (n=3)	-
Lev:(S)-Npx(1:4)	0,195	79,8	135,9
Lev:(S)-Npx(1:2)	0,334	80,8	122,2
Lev:(S)-Npx(1:1)	0,495	81,5	99,1
Lev:(S)-Npx(3:2)	0,597	82,1 $\pm$ 0,3 (n=4)	-
Lev:(S)-Npx(2:1)	0,661	81,7	91,8
Lev:(S)-Npx(4:1)	0,795	81,2	102,1
Lev:(S)-Npx(9:1)	0,898	81,7	110,1
Lev	1	116,3 $\pm$ 0,3 (n=6)	-

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de DSC e as temperaturas de interesse respectivas obtidas para misturas de levetiracetam com o composto racémico (*R,S*)-naproxeno, (1:9), (1:4), (3:7), (1:1), (3:2), (7:3), (4:1) e (9:1), apresentam-se na Figura 3.32 e na Tabela 3.8.



**Figura 3.32.** Representação das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos compostos de partida e das misturas de Lev:(*R,S*)-Npx obtidas em moinho de bolas,  $\beta=2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; cápsula de 30  $\mu\text{L}$  fechada.

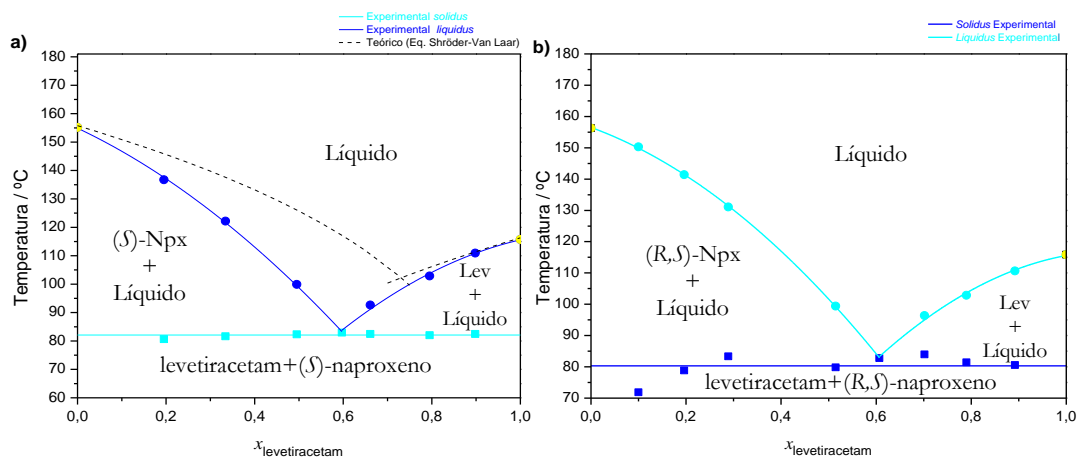
**Tabela 3.8.** Temperaturas de interesse das curvas de DSC dos primeiros aquecimentos dos compostos de partida e das misturas de Lev:(*R,S*)-Npx de proporções de (1:9), (1:4), (3:7), (1:1), (3:2), (7:3), (4:1) e (9:1) obtidas em moinho de bolas.

	$x_{Lev}$	$T_{onset} / ^{\circ}\text{C}$	$T_{m\acute{a}x} / ^{\circ}\text{C}$
<b>(<i>R,S</i>)-Npx</b>	0	$154,8 \pm 0,2$ (n=3)	-
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (1:9)</b>	0,100	71,0	149,5
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (1:4)</b>	0,196	78,0	140,6
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (3:7)</b>	0,289	82,6	130,3
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (1:1)</b>	0,515	79,0	98,6
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (3:2)</b>	0,607	$82,0 \pm 0,2$ (n=3)	-
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (7:3)</b>	0,702	83,1	95,5
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (4:1)</b>	0,790	80,6	102,1
<b>Lev:(<i>R,S</i>)-Npx (9:1)</b>	0,892	79,8	109,9
<b>Lev</b>	1	$116,3 \pm 0,3$ (n=6)	-

Os dados de DSC permitem obter os diagramas de fase sólido-líquido que se apresentam na Figura 3.33.

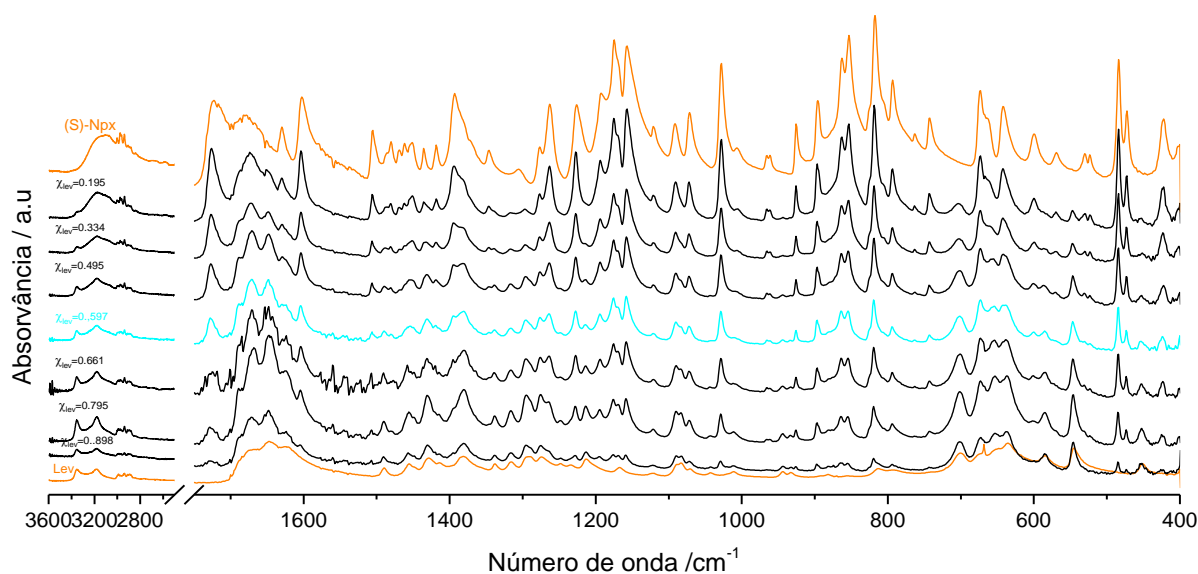
É de assinalar a grande semelhança entre os dois diagramas de fase. Recordemos que, apesar das estruturas cristalinas apresentarem diferenças significativas (com ausência do homossintão ácido-ácido no (*S*)-naproxeno) as temperaturas e entalpias de fusão do composto racémico e dos enantiómeros puros são idênticas.

Os diagramas obtidos são do tipo de eutético simples, com  $T_{\text{eut}} = (81,3 \pm 0,8) \text{ } ^\circ\text{C}$  no caso do sistema Lev/(S)-Npx e  $T_{\text{eut}} = (80,4 \pm 2,0) \text{ } ^\circ\text{C}$  no caso de Lev/(R,S)-Npx. A composição do eutético é, em ambos os casos,  $x_{\text{Lev}} = 0,60$ .

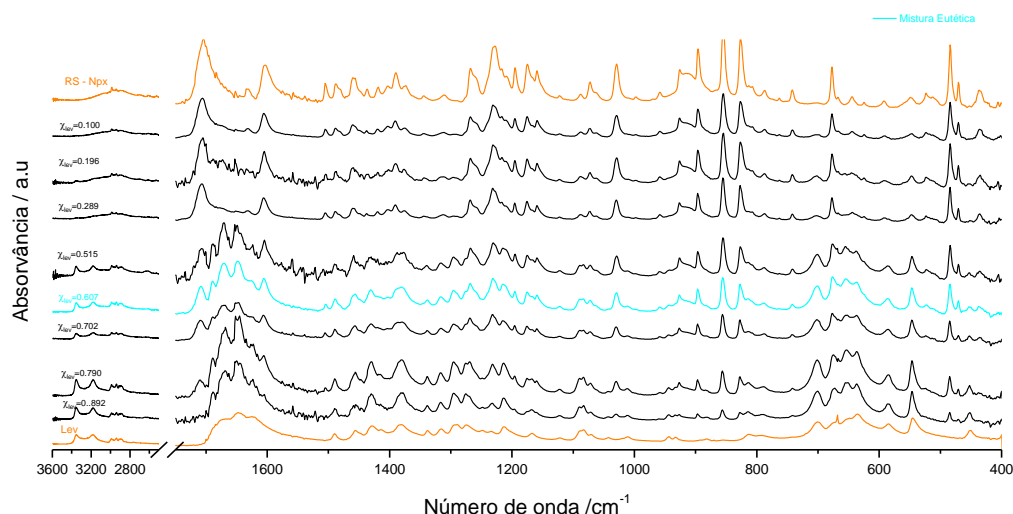


**Figura 3.33.** a) Diagrama de fases sólido-líquido do sistema binário levetiracetam/(S)-naproxeno, b) Diagrama de fase sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/ (R,S)-naproxeno.

Os espectros de infravermelho, Figura 3.34 e Figura 3.35, confirmam que as misturas binárias são misturas físicas de Lev/(S)-Npx e Lev/(R,S)-Npx, respectivamente, soma dos espectros dos compostos de partida.



**Figura 3.34.** Espectros de FTIR-ATR dos compostos puros e das misturas Lev:(S)-Npx obtidas por mecanoquímica.



**Figura 3.35.** Espectros de infravermelho dos compostos de partida e das misturas de Lev:(*R,S*)-Npx obtidas em moinho de bolas.

O sistema Lev/(*S*)-Npx não possui comportamento ideal, apresentando desvios negativos, como é indicado pelos valores de coeficientes de atividade que se apresentam na Tabela 3.9. Os coeficientes de atividade,  $\gamma_i$ , podem ser calculados através da equação de Schröder-Van Laar para um sistema de comportamento não-ideal, (eq. 3.2.) onde  $a_i$ , é a atividade do composto, que se relaciona com a fração molar  $x$ , pela equação 3.3.

$$R \ln a_i \approx \Delta \bar{H}_{fus,i} \left( \frac{1}{T_i^*} - \frac{1}{T} \right) \quad (\text{eq. 3.2.}) \quad a_i = \gamma_i x_i \quad (\text{eq.3.3.})$$

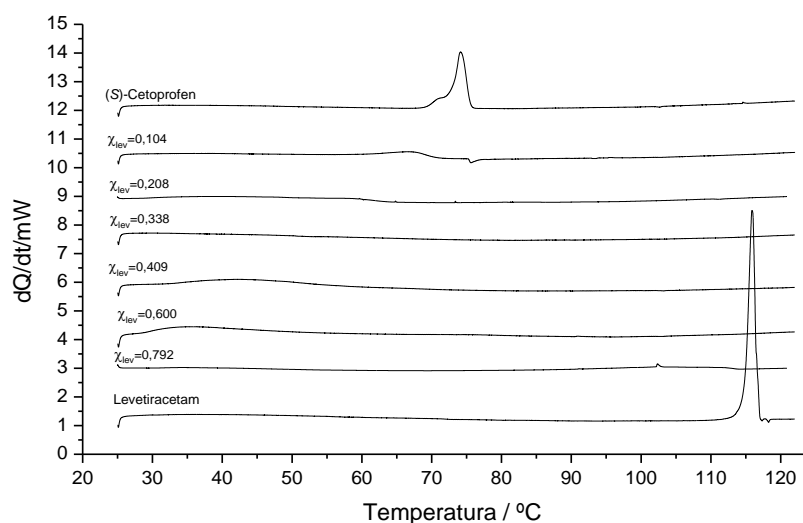
**Tabela 3.9.** Coeficientes de atividade do levetiracetam e (*S*)-naproxeno calculados para diferentes frações molares de mistura e respectivas frações molares para o sistema levetiracetam/(*S*)-naproxeno.

Vizinhança do ( <i>S</i> )-naproxeno		Vizinhança do levetiracetam	
$x_{(S-Npx)}$	$\gamma_{(S-Npx)}$	$x_{(Lev)}$	$\gamma_{(Lev)}$
1	1	0,597	0,78
0,805	0,84	0,661	0,86
0,666	0,74	0,795	0,92
0,505	0,55	0,898	0,97
0,403	0,45	1	1,00

### 3.2.3. LEVETIRACETAM:(S)-CETOPROFENO, LEVETIRACETAM:(R,S)-CETOPROFENO E LEVETIRACETAM:(R,S)-FLURBIPROFENO

Os ensaios de DSC sobre diferentes misturas de levetiracetam e do enantiômero (S) do cetoprofeno originaram as curvas mostradas na Figura 3.36, que não permitem obter conclusões claras.

As amostras foram guardadas em exsiccador, a  $T \sim 25$  °C, e ensaiadas de novo após cerca de três semanas, não se registrando alteração do comportamento observado.



**Figura 3.36.** Curvas de DSC do primeiro aquecimento de levetiracetam e de (S)-cetoprofeno e das misturas de ambos obtidas em moinho de bola;  $\beta=2$  °C.min<sup>-1</sup>; cápsulas de 30  $\mu$ L, fechadas.

Na Figura 3.37 são apresentados os espectros de FTIR-ATR dos compostos de partida levetiracetam, (S)-cetoprofeno e das diferentes misturas de ambos, que não apresentam modificações relativamente aos espectros dos compostos isolados. Não há qualquer deslocamento nas bandas observadas, sendo os espectros em todos os casos, simples soma das contribuições dos compostos puros.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

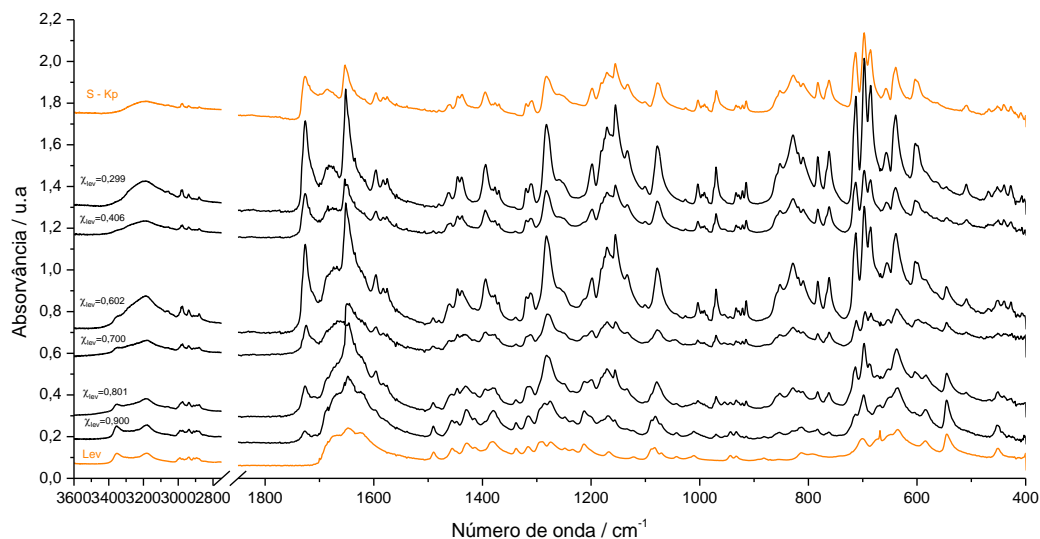


Figura 3.37 Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, de (*S*)-cetoprofeno e das misturas de diferentes proporções.

Os estudos realizados sobre misturas de levetiracetam, e (*R,S*)-Kp,((1:9), (1:4), (1:2), (2:3), (1:1), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1)), deram origem às curvas de DSC mostradas na Figura 3.38, com as temperaturas de interesse apresentadas na Tabela 3.10.

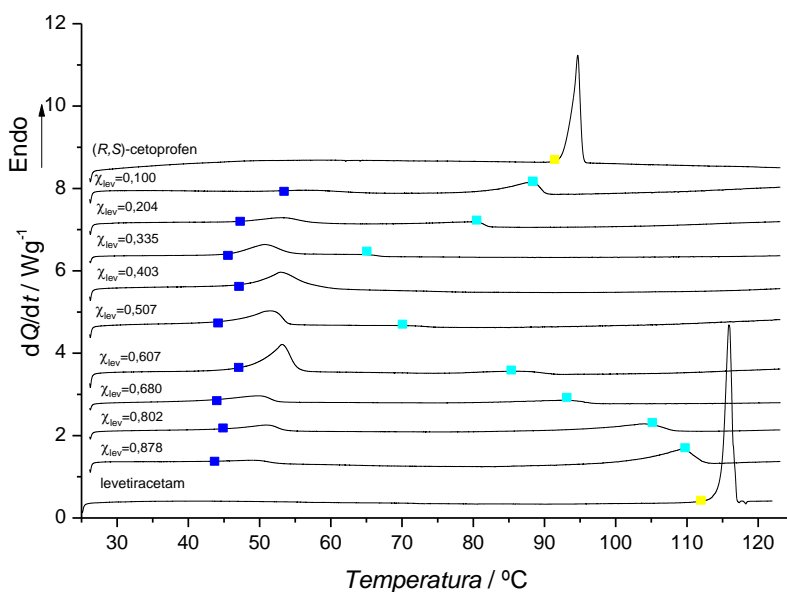


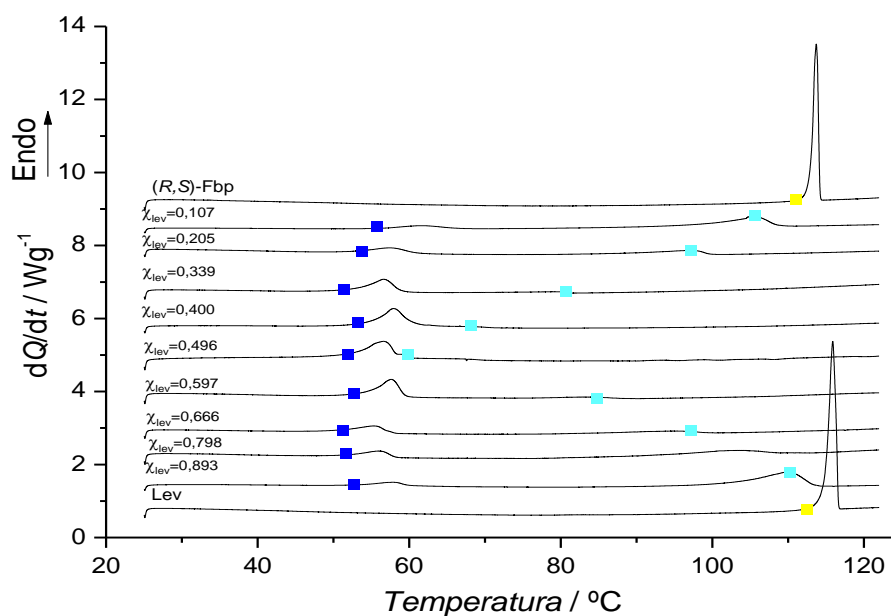
Figura 3.38. Curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros, levetiracetam, (*R,S*)-cetoprofeno, e de misturas de ambos obtidas por mecanoquímica;  $\beta=2$  °C.min<sup>-1</sup>, cápsula fechada de 30  $\mu$ L.



**Tabela 3.10.** Temperaturas de interesse das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros levetiracetam, (R,S)-cetoprofeno e de misturas nas proporções (1:9), (1:4), (1:2), (2:3), (1:1), (3:2), (2:1), (4:1) e (9:1) obtidas por mecanoquímica.

	$x_{Lev}$	$T_{onset} / ^\circ\text{C}$	$T_{m\acute{a}x} / ^\circ\text{C}$
(R,S)-Kp	0	93,6/93,2	-
Lev:(R,S)-Kp (1:9)	0,100	57,2	88,1
Lev:(R,S)-Kp (1:4)	0,204	48,3	80,0
Lev:(R,S)-Kp (1:2)	0,335	46,1	64,5
Lev:(R,S)-Kp (2:3)	0,403	49,8	-
Lev:(R,S)-Kp (1:1)	0,507	47,6	70,9
Lev:(R,S)-Kp (3:2)	0,607	50,1	86,5
Lev:(R,S)-Kp (2:1)	0,680	42,4	92,4
Lev:(R,S)-Kp (4:1)	0,802	47,2	104,0
Lev:(R,S)-Kp (9:1)	0,878	46,9	109,3
Lev	1	116,3 $\pm$ 0,3 (n=6)	-

Os resultados de investigação similar realizada sobre as misturas de levetiracetam e (R,S)-flurbiprofeno são apresentados na Figura 3.39 e Tabela 3.11.



**Figura 3.39.** Curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros levetiracetam, (R,S)-flurbiprofeno e das misturas de ambos obtidas por mecanoquímica;  $\beta=2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula fechada de 30  $\mu\text{L}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

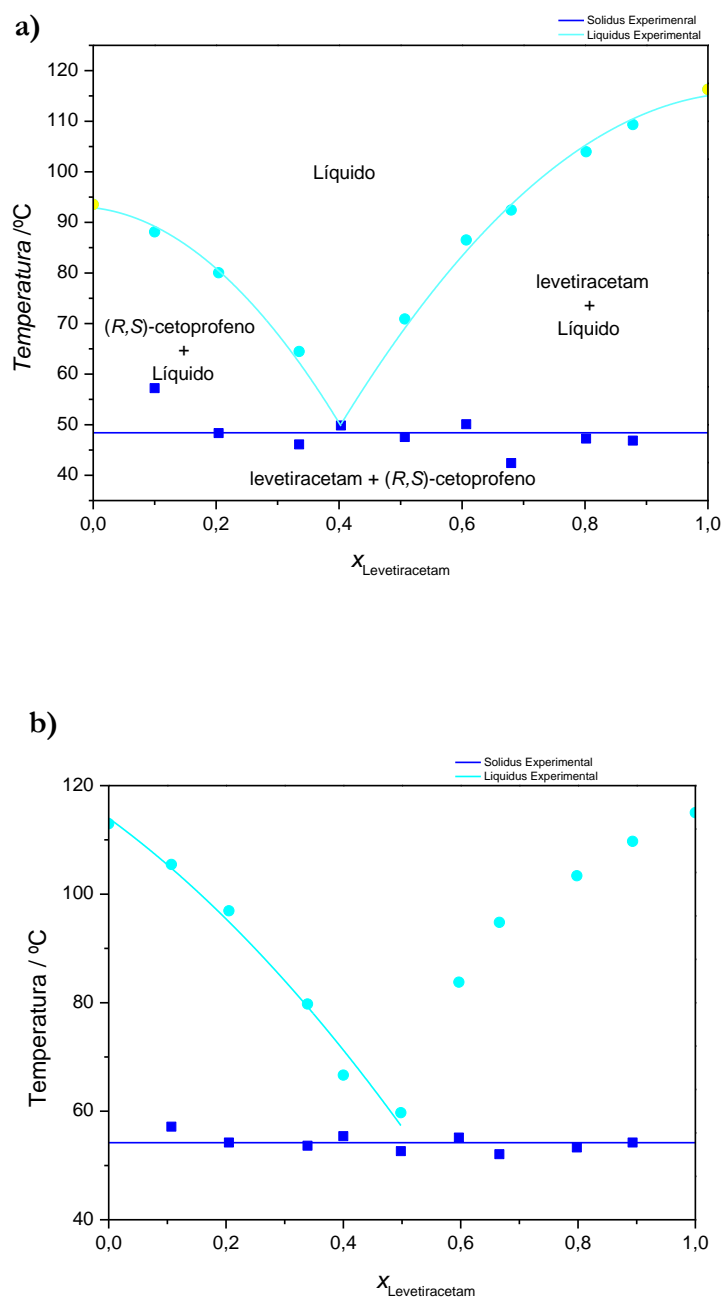
**Tabela 3.11.** Temperaturas de interesse das curvas de DSC do primeiro aquecimento dos componentes puros levetiracetam, (R,S)-flurbiprofeno e das misturas na proporção de ((9:1), (4:1), (2:1), (3:2), (1:1), (2:3), (1:2), (1:4) e (1:9) obtidas por mecanoquímica.

	$x_{Lev}$	$T_{onset} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
<b>(R,S)-Fbp</b>	0	113,0/113,8	-
<b>Lev:(R,S)-Fbp (1:9)</b>	0,107	57,2	105,5
<b>Lev:(R,S)-Fbp (1:4)</b>	0,205	54,2	96,9
<b>Lev:(R,S)-Fbp (1:2)</b>	0,339	53,7	79,8
<b>Lev:(R,S)-Fbp (2:3)</b>	0,400	55,4	66,7
<b>Lev:(R,S)-Fbp (1:1)</b>	0,496	52,6	59,7
<b>Lev:( R,S)-Fbp (3:2)</b>	0,597	55,2	83,8
<b>Lev:(R,S)-Fbp (2:1)</b>	0,666	52,1	94,8
<b>Lev:(R,S)-Fbp (4:1)</b>	0,798	53,3	103,4
<b>Lev:(R,S)-Fbp (9:1)</b>	0,893	54,2	109,7
<b>Lev</b>	1	116 $\pm$ 0,3 (n=6)	-

Os diagramas de fase sólido-líquido dos sistemas pseudo-binários levetiracetam/(R,S)-cetoprofeno e levetiracetam/(R,S)-flurbiprofeno são apresentados na Figura 3.40.

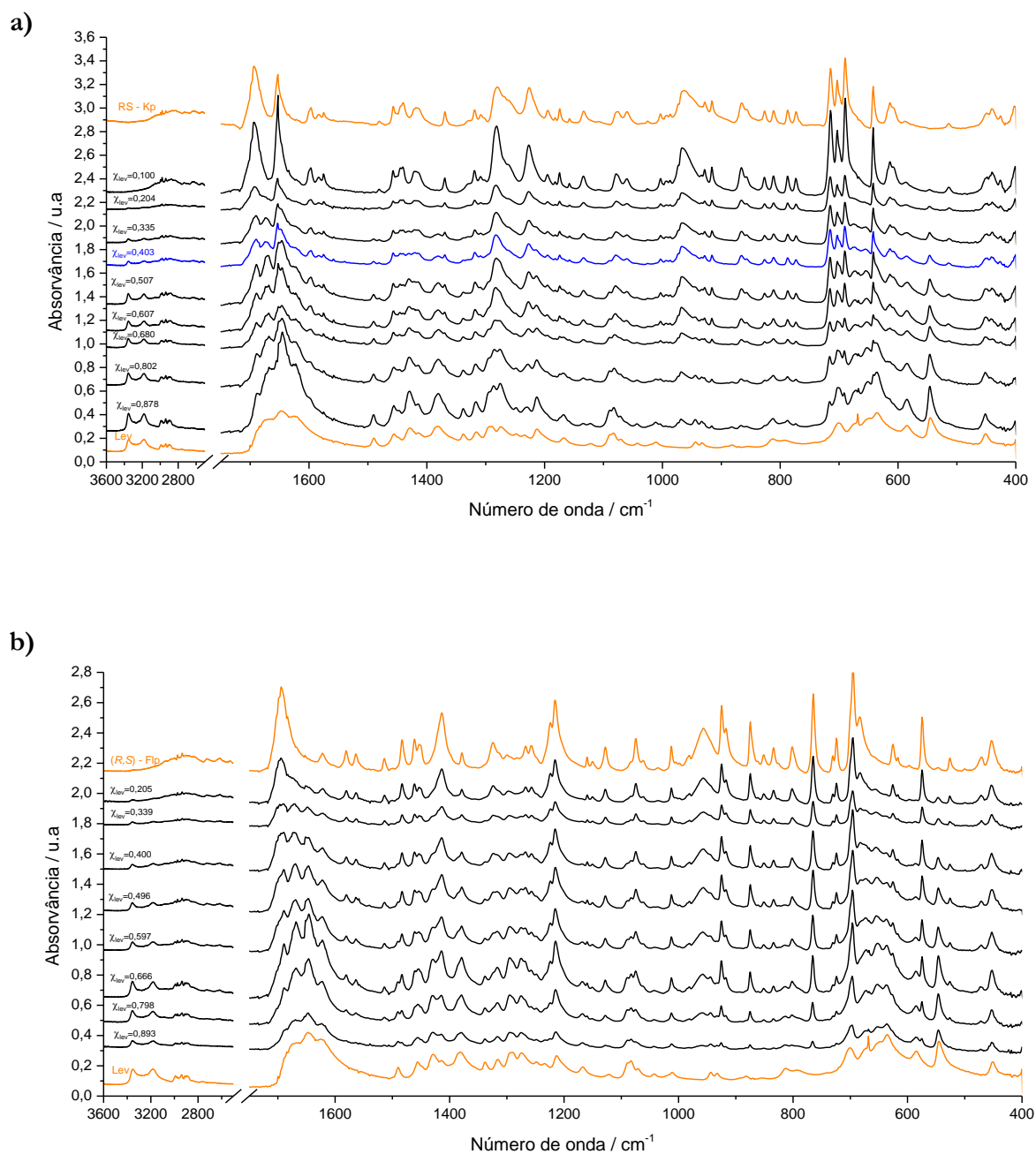
Em ambos os sistemas, os diagramas evidenciam a existência de pontos invariantes, eutéticos, a  $T_{eut} = (48,0 \pm 1,5) ^\circ\text{C}$ , com composição do eutético  $x_{Lev} = 0,40$  no caso do sistema de levetiracetam:(R,S)-cetoprofeno e a  $T_{eut} = (54,2 \pm 1,5) ^\circ\text{C}$  para levetiracetam:(R,S)-flurbiprofeno. A definição de composição do eutético, neste último sistema, implica a realização de ensaios adicionais para misturas com  $0,4 < x_{Lev} \leq 0,6$ .

As misturas sólidas obtidas são, portanto, misturas físicas dos componentes de partida. Os espectros de FTIR-ATR, mostrados na Figura 3.41 confirmam estas conclusões.



**Figura 3.40.** a) Diagrama de fases sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/(R,S)-cetoprofeno.  
b) Diagrama de fases sólido-líquido do sistema pseudo-binário levetiracetam/(R,S)-flurbiprofeno.

Está descrita a formação de um co-cristal entre o (R)-flurbiprofeno e o levetiracetam<sup>59</sup>. A mecanoquímica, nas condições utilizadas neste trabalho, não é eficaz na obtenção desse co-cristal a partir do composto racêmico, (R,S)-flurbiprofeno.



**Figura 3.41. a)** Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, de (R,S)-Kp e de diferentes misturas de ambos preparadas por mecanoquímica. **b)** Espectros de FTIR-ATR de levetiracetam, de (R,S)-Fbp e de diferentes misturas de ambos preparadas por mecanoquímica.

### 3.2.4. ENSAIOS DE ESTABILIDADE

Foram identificadas neste trabalho algumas composições binárias de misturas levetiracetam:anti-inflamatório não-esteróide que têm potencial aplicação farmacêutica.

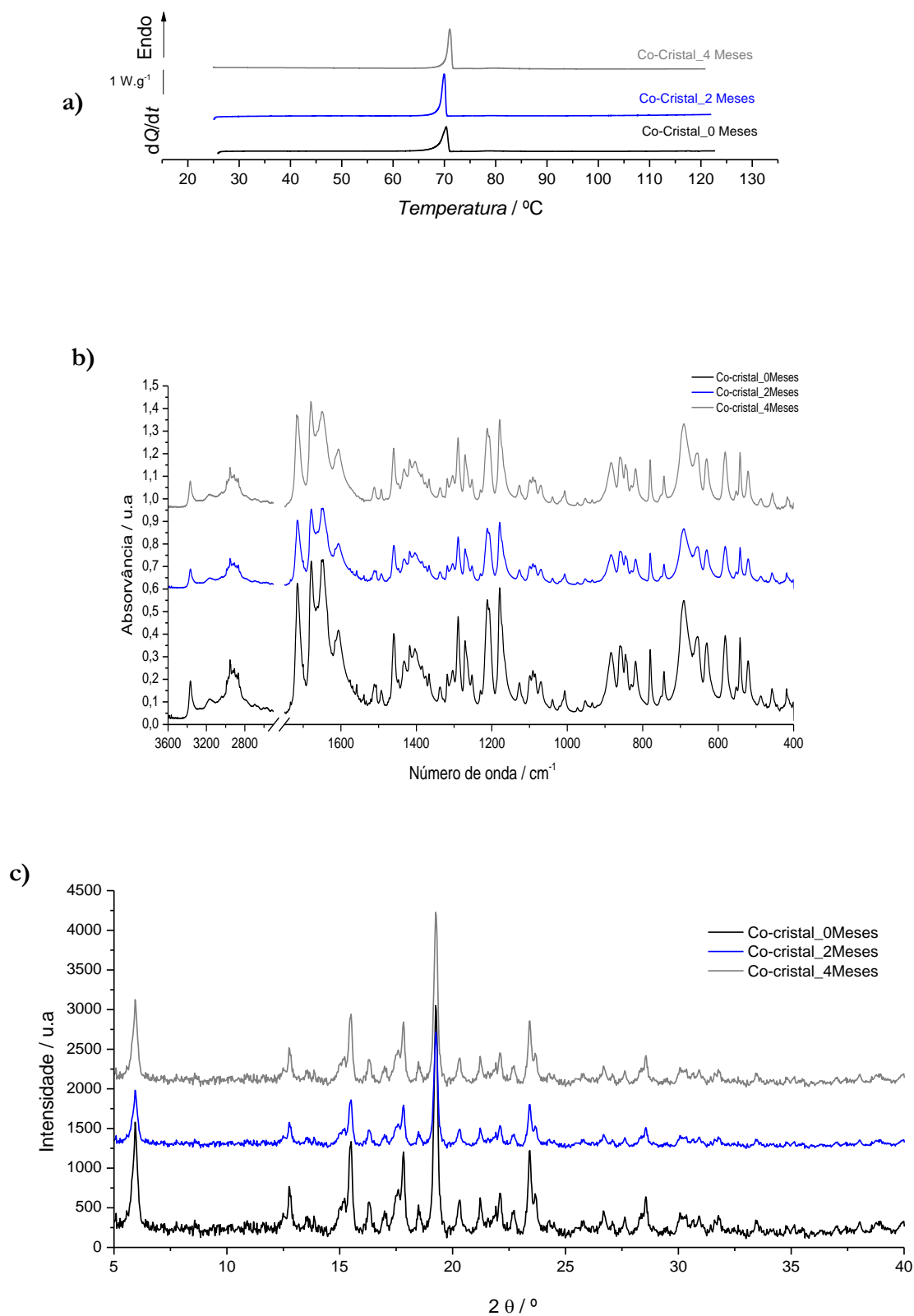
Para o sistema constituído por (S)-ibuprofeno e levetiracetam merecem destaque o co-cristal 1:1 e a mistura eutética com fração molar  $x_{Lev} = 0,20$ , e temperatura de fusão  $T = 42$  °C, cerca de 10 °C inferior à do (S)-ibuprofeno. Três outras misturas eutéticas foram identificadas: com (S)-naproxeno e o (R,S)-naproxeno, os eutéticos têm fração molar  $x_{Lev} = 0,60$  e temperatura de fusão  $T = 81$  °C, inferior em 75 °C à dos NSAIDs; com o (R,S)-cetoprofeno a composição do eutético é  $x_{Lev} = 0,40$ , e a respetiva temperatura de fusão,  $T = 48$  °C, é 45 °C inferior à do cetoprofeno.

Uma primeira etapa importante para a avaliação de viabilidade de aplicação farmacêutica destes sólidos passa pela realização de ensaios de estabilidade. Iniciámos estes estudos com a avaliação dos sólidos de interesse identificados para misturas binárias com (S)-ibuprofeno: o co-cristal 1:1 levetiracetam:(S)-ibuprofeno e a mistura eutética.

Foram realizados testes de estabilidade acelerados de acordo com a “*ICH Harmonised Tripartite Guideline - Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*”<sup>105</sup> a  $T=(40 \pm 2)$  °C e humidade relativa  $RH=(75 \pm 5)$  %, com duração de 6 meses. As amostras (~20 mg) foram mantidas em recipientes de vidro rolhados (1 mL), em câmaras Binder KBF 720, e analisadas de 2 em 2 meses por calorimetria diferencial de varrimento, (ensaios em duplicado), espectroscopia de infravermelho e difração de raios-X de pó. Estes resultados são comparados com os obtidos para as amostras de partida.

Na Figura 3.42 estão apresentados as curvas de DSC, espectros de FTIR-ATR e os difratogramas de raios-X de pó do co-cristal inicial e do material após os quatro primeiros meses de ensaios. Na Tabela 3.12 apresentam-se os parâmetros termodinâmicos das curvas de DSC.

Os resultados indicam que não ocorre qualquer alteração na estrutura do co-cristal, pelo menos nos quatro primeiros meses de ensaios.



**Figura 3.42.** Co-cristal Lev:(S)-Ibu 1:1: **(a)** Curvas de DSC de primeiro aquecimento, **(b)** espectros de infravermelho, FTIR-ATR e **(c)** difratogramas de raios-X de pó do co-cristal, amostra de partida e após ser submetida aos ensaios de estabilidade (durante 2 e 4 meses).

**Tabela 3.12.** Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC de aquecimento do co-cristal (1:1) submetido a ensaios de estabilidade,  $\beta=2\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , cápsula 30  $\mu\text{L}$ , fechada,  $25\text{ }^\circ\text{C} \leq T \leq 122\text{ }^\circ\text{C}$ .

	$T_{\text{onset}}/^\circ\text{C}$	$\Delta H/\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
<b>Co-cristal_0Meses</b>	$68,7 \pm 0,3$	$98,5 \pm 0,4$
<b>Co-cristal_2Meses</b>	68,0/68,3	101,0/98,9
<b>Co-cristal_4Meses</b>	68,5/69,1	99,1/103,0

A mistura eutética não pode ser armazenada nestas condições ( $T=(40 \pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$  e  $\text{RH}=(75 \pm 5)\%$ ) como se poderia antecipar pela respectiva temperatura de fusão,  $T\sim 42\text{ }^\circ\text{C}$ . Ao fim de um mês de ensaio, a amostra tinha sublimado.





# *Capítulo 4*

Notas Finais e Perspetivas Futuras

---



## 4. NOTAS FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Na obtenção de polimorfos de um ativo farmacêutico devem ser usados diversos métodos de preparação de amostras, bem como vários métodos de caracterização. Neste trabalho utilizou-se TG, DSC, PLTM, XRPD, FTIR-ATR, imagiologia de infravermelho e de Raman, uma vez que só um método não é, normalmente, suficiente para obter conclusões seguras e o levetiracetam apresenta um comportamento complexo. Com o uso de vários métodos pretende-se obter um estudo o mais aprofundado e correto possível.

Na investigação de polimorfismo de levetiracetam, caracterizado farmacologicamente pela sua ação antiepiléptica, usamos as metodologias experimentais de cristalização em solventes e por arrefecimento dos fundidos. Os sólidos obtidos nos três solventes usados mostraram em DSC, nos primeiros aquecimentos, um só sinal endotérmico, fusão, a cerca de 116 °C, e os difratogramas de raios-X de pó são idênticos ao da forma cristalina resolvida por Song, L.<sup>57</sup>, polimorfo I. É observada com frequência, nestas amostras, a cristalização do fundido e as curvas de aquecimento subsequentes apresentam, muitas vezes, um perfil assimétrico que poderá resultar da falta de homogeneidade da amostra na cápsula de DSC ou da sobreposição de eventos térmicos muito próximos. A cristalização de fundidos obtidos do sólido cristalizado em etanol, dá indicações, nas curvas de DSC, de uma nova forma polimórfica com temperatura de fusão  $T=113$  °C. Nas imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido cristalizado em metanol observam-se alterações notórias por volta de 113 °C, o que poderá resultar da fusão de uma quantidade residual deste polimorfo não detectável pelos outros métodos de análise. A cristalização dos fundidos obtidos do sólido cristalizado em metanol aponta para a presença de um eventual terceiro polimorfo com  $T_{fus} = (114,6 \pm 0,5)$ °C.

A investigação dos cristalizados do fundido por análise de difração de raios-X de pó, com variação de temperatura, não foi conclusiva uma vez que as diferenças observadas podem resultar de orientação preferencial dos cristalitos. Será de todo o interesse aprofundar os estudos de difração de raios-X. Para tal, após a cristalização do fundido, dever-se-á retirar os cristalitos que se encontram no capilar de vidro e recolocá-los num segundo capilar, para randomizar as orientações, e voltar a analisar, de modo a verificar se os resultados obtidos diferem.

A investigação de partículas isoladas obtidas por cristalização do fundido por FTIR-ATR e por imagiologia de infravermelho e de Raman foram fundamentais para confirmar a existência de vários polimorfos de levetiracetam (os resultados apontam para três). A cristalização do fundido e o

#### 4. NOTAS FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

---

resultado desse processo em termos de polimorfos obtidos parece ser muito dependente das condições de nucleação. Será importante, em trabalho futuro, efetuar uma investigação sistemática, por exemplo, do efeito de diferentes superfícies nas formas sólidas obtidas. A imagiologia de Raman é o método ideal para levar a cabo este estudo.

Na investigação de co-cristais de levetiracetam foram selecionados anti-inflamatórios não-esteróides (NSAIDs) quirais como co-formadores, que possuem grupos funcionais capazes de estabelecer ligações de hidrogénio com o composto de partida, com formação de heterossintões robustos. Todos os racematos escolhidos são compostos racémicos com temperatura de fusão igual ou superior à dos respetivos enantiómeros. O levetiracetam, nas condições experimentais utilizadas, não foi eficaz na discriminação quiral dos enantiómeros destes NSAIDs. Como seguimento deste trabalho, seria interessante alterar as condições do método de preparação, por exemplo, usando mecanoquímica com adição de solvente, aumento do tempo de moagem, bem como a frequência de vibração. Será também interessante estudar compostos racémicos com  $T_{\text{fus}}$  inferior à dos enantiómeros.

A investigação permitiu identificar no sistema Lev:(S)-Ibu um co-cristal na proporção de (1:1), com fusão incongruente, e um eutético (1:4). O co-cristal foi submetido a ensaios de estabilidade acelerados com o intuito de efetuar uma primeira avaliação da sua viabilidade para aplicação farmacêutica. Por DSC, XRPD e FTIR-ATR observou-se que o co-cristal, até ao momento (4 meses), não sofreu nenhuma alteração estrutural. No sistema Lev:(S)-Kp, pela análise de DSC, suspeita-se de amorfização das misturas ou presença de um eutético com fusão a temperatura sub-ambiente. Será interessante aprofundar o estudo em DSC, numa gama de temperatura mais alargada, de modo a testar esta hipótese. Em todos os outros sistemas foram identificadas misturas eutéticas com temperaturas de fusão consideravelmente inferiores às dos NSAIDs e, portanto, também com potencialidade de aplicação farmacêutica.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Byrn, S. R., Zografi, G. and Chen, X. S. "Accelerating Proof of Concept for Small Molecule Drugs Using Solid-State Chemistry". *J. Pharm. Sci.* 99(2010)3665–3675 .
2. Datta, S. and Grant, D. J. W. "Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering". *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(2004)42–57.
3. Morissette, S. L. *et al.* "High-throughput crystallization: Polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(2004)275–300.
4. Melo, M. E. R. and Rivera, M. H. "Estrutura de sólidos amorfos". *Ingenierías* 3(2000)7-14
5. Florence T., A. and Attwood, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia.* (São Paulo:EDUSP, 2003).
6. Petit, S. and Coquerel, G. "*Polymorphism in the Pharmaceutical Industry.* (Wiley-VCH Weinheim, 2006).
7. Cullity, B. D. Elements Of X Ray Diffraction. *Addison-Wesley Metallurgy Series* (1978). disponível: <https://archive.org/stream/elementsofxraydi030864mbp#page/n9/mode/2up>, última consulta:27 Maio 2015.
8. Brittain, H. G. *Polymorphism in pharmaceutical solids.* (Informa healthcare, New York, 2009).
9. Callister, W. and Rethwisch, D. *Materials science and engineering: an introduction. Materials Science and Engineering* , (John Wiley & Sons, New York, 2007).
10. Lima, G. *et al.* "Polimorfismo na produção de medicamentos,". *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(2012)27–36.
11. Silva, G. Da and Iha, K. "Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina". *J. Aerosp. Technol. Manag.* 2(2010)331–338.
12. Thun, J., Seyfarth, L., Senker, J., Dinnebier, R. E. and Breu, J. "Polymorphism in benzamide: Solving a 175-year-old riddle". *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46(2007)6729-6731.
13. McCrone, W. C. "Polymorphism" in *Physical Chemistry of the Organic Solid State* (Interscience, New York, 1965) pags. 725–767.
14. Giron, D. "Investigations of polymorphism and pseudo-polymorphism in pharmaceuticals by combined thermoanalytical techniques,". *J. Therm. Anal. Calorim.*, 64(2001) 37–60.
15. Schultheiss, N. and Newman, A. "Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties". *Cryst. Growth Des.* 9(2009)2950–2967.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

16. Llinàs, A. and Goodman, J. M. "Polymorph control: past, present and future". *Drug Discov. Today*, 13(2008) 98–210.
17. Rodríguez-Spong, B., Price, C. P., Jayasankar, A., Matzger, A. J. and Rodríguez-Hornedo, "General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(2004)241–274.
18. Lehmann, O. *Molekularphysik. Engelmann: Leipzig* 2(1888)398–415.
19. Chen, J., Sarma, B., Evans, J. M. B. and Myerson, A. S. "Pharmaceutical Crystallization Published as part of the Crystal Growth and Design 10th Anniversary Perspective". *Cryst. Growth Des.* 11(2011)887–895.
20. Bernstein, J. "Crystal polymorphism". *NATO Sci. Peace Secur. Ser. B Phys. Biophys.* (2008).87–109.
21. Davey, R. J., Schroeder, S. L. M. and Ter Horst, J. H. "Nucleation of organic crystals - A molecular perspective". *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52(2013)2167–2179.
22. U.S. Department of Health and Services, Food and Drug Administration and (CDER), C. for D. E. and R. Guidance for Industry: Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals. (2013). disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM281764.pdf>, última consulta: 25 Agosto 2015.
23. Aakeröy, C. B. "Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility" *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.* 72(2005)439–448.
24. Jones, W., Motherwell, W. D. S. and Trask, A. V. "Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement". *MRS Bull.* 31(2006)875–879.
25. Vishweshwar, P., McMahon, J. A., Bis, J. A. and Zaworotko, M. J. "Pharmaceutical Co-Crystals". *J. Pharm. Sci.* 95(2006)499–516.
26. Bond, A. D. "What is a co-crystal?" *CrystEngComm.* 9(2007)833–834.
27. Childs, S. L. and Hardcastle, K. I. "Cocrystals of piroxicam with carboxylic acids." *Cryst. Growth Des.* 7(2007)1291–1304.
28. Stahly, G. P. "Diversity in single- and multiple-component crystals. The Search for and prevalence of polymorphs and cocrystals". *Cryst. Growth Des.* 7(2007)1007–1026.
29. Bhogala, B. R. and Nangia, A. "Ternary and quaternary co-crystals of 1,3-cis,5-cis-cyclohexanetricarboxylic acid and 4,4'-bipyridines". *New J. Chem.* 32(2008)800-807.
30. Shan, N. & Zaworotko, M. J. "The role of cocrystals in pharmaceutical science". *Drug Discov. Today*, 13(2008) 440–446.



31. Aitipamula, S. *et al.* "Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?" *Cryst. Growth Des.* 12(2012)2147–2152.
32. Qiao, N. *et al.* "Pharmaceutical cocrystals: An overview". *Int. J. Pharm.* 419(2011)1–11.
33. Schultheiss, N. & Newman, A. "Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties". *Cryst. Growth Des.* 9(2009)2950–2967.
34. Trask, A. V. "An overview of pharmaceutical cocrystals as intellectual property". *Mol. Pharm.* 4(2007)301–309.
35. Pan, F., Chernew, M. E. & Fendrick, a. M. "Impact of fixed-dose combination drugs on adherence to prescription medications". *J. Gen. Intern. Med.* 23(2008)611–614.
36. Frantz, S. "News & analysis". *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(2006)881–882.
37. Pepinsky, R. "Crystal engineering—a new concept in crystallography". *Phys. Rev.* 100(2003)971.
38. Schmidt, G. M. J. "Photodimerization in the solid state". *Pure Appl. Chem.* 27(1971)647-678.
39. Desiraju, G. R. *Crystal engineering: the design of organic solids.* Elsevier Science (1989). disponível em:papers2://publication/uuid/3B35D0B8-BAF0-468A-907E-3BBBE268B818, última consulta: 12 Junho 2015.
40. Najar, A. A. & Azim, Y. "Pharmaceutical co-crystals: A new paradigm of crystal engineering". *J. Indian Inst. Sci.* 94(2014)45–67.
41. Shan, N., Perry, M. L., Weyna, D. R. & Zaworotko, M. J. "Impact of pharmaceutical cocrystals: the effects on drug pharmacokinetics". *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 10(2014)1255–1271.
42. Babu, N. J., Reddy, L. S. & Nangia, A. "Amide N-oxide heterosynthon and amide dimer homosynthon in cocrystals of carboxamide drugs and pyridine N-oxides". *Mol. Pharm.* 4(2007)417–434.
43. Cherukuvada, S. & Guru Row, T. N. "Comprehending the formation of eutectics and cocrystals in terms of design and their structural interrelationships". *Cryst. Growth Des.* 14(2014)4187–4198.
44. Perlovich, G. L. & Manin, a. N. "Design of pharmaceutical cocrystals for drug solubility improvement". *Russ. J. Gen. Chem.* 84(2014)407–414.
45. Dhirendra, K., Lewis, S., Udupa, N. & Atin, K. "Solis dispersions: a review". *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(2009)234–246.
46. Sangster, J. "Phase Diagrams and Thermodynamic Properties of Binary Systems of Drugs". *J. Phys. Chem. Ref. Data* 28(1999)889–930.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

47. Crepeau, A. Z. & Treiman, D. M. "Levetiracetam: a comprehensive review". *Expert Rev. Neurother.* 10(2010)159–171.
48. Li, L. & Si, Y.-K. "Study on the absolute configuration of levetiracetam via density functional theory calculations of electronic circular dichroism and optical rotatory dispersion". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56(2011)465–70.
49. Mujahid, M., Mujumdar, P., Sasikumar, M., Kunte, S. S. & Muthukrishnan, M. "An alternate synthesis of enantiomerically pure levetiracetam (Keppra®)". *Tetrahedron: Asymmetry* 23(2012)1512–1515.
50. Teva Pharmaceutical Industries, Levetiracetam, Assessment report. 44, (2012).
51. Patsalos, P. N. "Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics". *Pharmacol. Ther.* 85(2000)77–85.
52. Takagi, T., Ramachandran, C. & Bermejo, M. "Supporting Information: a provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy" University of Michigan, Ann Arb. *Mol. Pharm.* 3(2006)SI1–SI25.
53. Bergström, C. a S., Andersson, S. B. E., Fagerberg, J. H., Ragnarsson, G. & Lindahl, A. "Is the full potential of the biopharmaceutics classification system reached?" *Eur. J. Pharm. Sci.* 57(2014)224–31.
54. Herman, C., Haut, B., Aerts, L. & Leyssens, T. "Solid-liquid phase diagrams for the determination of the solid state nature of both polymorphs of (RS)-2-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-butyramide". *Int. J. Pharm.* 437(2012)156–61.
55. Springuel, G., Norberg, B., Robeyns, K., Wouters, J. & Leyssens, T. "Advances in Pharmaceutical Co-crystal Screening: Effective Co-crystal Screening through Structural Resemblance". *Cryst. Growth Des.* 12(2012)475–484.
56. ChemSpider Chemistry (Search and share). (R)-Etiracetam., disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.390096.html>, última consulta: 12 Agosto 2015.
57. Song, J., Lou, K.-X., Li, X.-J., Wu, X.-P. & Feng, R.-X. 2-(2-Oxopyrrolidin-1-yl)butyramide". *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online*, 59(2003)1772–1773.
58. George, F. *et al.* "Does chirality influence the tendency toward cocrystal formation?" *Cryst. Growth Des.* 14(2014)2880–2892.
59. Springuel, G., Robeyns, K., Norberg, B., Wouters, J. & Leyssens, T. "Cocrystal formation between chiral compounds: How cocrystals differ from salts". *Cryst. Growth Des.* 14(2014) 3996–4004.
60. Faigl, F., Fogassy, E., Nógrádi, M., Pálovics, E. & Schindler, J. "Strategies in optical resolution: a practical guide". *J. Tetrahedron Asymmetry* 19(2008)519–536.

61. Lorenz, H., Capla, F., Polenske, D., Elsner, M. P. & Seidel-Morgenstern, A. "Crystallization based separation of enantiomers (review)". *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* 42(2007)5–16.
62. Siedlecka, R. "Recent developments in optical resolution". *J. Tetrahedron* 69(2013)6331-6363.
63. Marchand, P. *et al.* "Diastereomeric resolution rationalized by phase diagrams under the actual conditions of the experimental process". *J. Tetrahedron Asymmetry* 15(2004)2455-2465.
64. Quemiard, F., Linol, J., Cartigny, Y. & Coquerel, G. "Study of the quaternary system(+) and (-)5-phenyl-5-trifluoromethyl-imidazolidine-2,4-dione/(-)1-phenylethylamine / ethanol at 20°C under atmospheric pressure". *J. Therm. Anal. Calorim.* 90(2007)359–365.
65. Springuel, G. & Leyssens, T. "Innovative Chiral Resolution Using Enantiospecific Co-Crystallization in Solution". *Cryst. Growth Des.* 12(2012)3374–3378.
66. Song, J. S. & Sohn, Y. T. "Crystal forms of naproxen". *Arch. Pharm. Res.* 34(2011)87–90.
67. Dixit, M., Kulkarni, P. K. & Vaghela, R. S. "Effect of different crystallization techniques on the dissolution behavior of ketoprofen." *Trop. J. Pharm. Res.* 12(2013)317–322.
68. Flippen, J. L. & Gilardi, R. D. "(+)-2-(2-Fluoro-4-biphenyl)propionic acid (flurbiprofen)". *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 31(1975)926–928.
69. IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. (2014).
70. Dwivedi, S. K., Sattari, S., Jamali, F. & Mitchell, a. G. "Ibuprofen racemate and enantiomers: Phase diagram, solubility and thermodynamic studies". *Int. J. Pharm.* 87(1992) 95–104.
71. Burger, A., Koller, K. T. & Schiermeier, W. M. "RS-ibuprofen and S-ibuprofen (dexibuprofen): Binary system and unusual solubility behaviour". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43(1996)142–147.
72. Codan, L., Casillo, S., Bäbler, M. U. & Mazzotti, M. "Phase diagram of a chiral substance exhibiting oiling out. 2. Racemic compound forming ibuprofen in water". *Cryst. Growth Des.* 12(2012)5298–5310.
73. Dudognon, E., Danède, F., Descamps, M. & Correia, N. T. "Evidence for a new crystalline phase of racemic Ibuprofen". *Pharm. Res.* 25(2008)2853–2858.
74. Manimaran, T. & Stahly, G. P. "Optical purification of profen drugs". *Tetrahedron Asymmetry* 4(1993)1949–1954.
75. Shankland, N., Wilson, C. C., Florence, a. J. & Cox, P. J. "Refinement of Ibuprofen at 100K by Single-Crystal Pulsed Neutron Diffraction". *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 53 (1997)951–954.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

76. Hansen, L. K., Perlovich, G. L. & Bauer-Brandl, A. "Redetermination and H-atom refinement of (S)-(+)-ibuprofen". *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* 59(2003)1357–1358.
77. Braun, D. E. *et al.* "Racemic Naproxen: A Multidisciplinary Structural and Thermodynamic Comparison with the Enantiopure Form". *Cryst. Growth Des.* 11(2011)5659–5669.
78. Neau, S. H., Bhandarkar, S. V. & Hellmuth, E. W. "Differential Molar Heat Capacities to Test Ideal Solubility Estimations". *Pharm. Res.* 14(1997)601–605.
79. Sovizi, M. R. "Thermal behavior of drugs: Investigation on decomposition kinetic of naproxen and celecoxib". *J. Therm. Anal. Calorim.* 102(2010)285–289.
80. Gonnade, R. G. *et al.* "Occurrence of spontaneous resolution of ketoprofen with a racemic crystal structure by simple crystallization under nonequilibrium preferential enrichment conditions". *Chem. Commun.* 48(2012)2791.
81. Kommuru, T. R., Khan, M. a. & Reddy, I. K. "Racemate and enantiomers of ketoprofen: Phase diagram, thermodynamic studies, skin permeability, and use of chiral permeation enhancers". *J. Pharm. Sci.* 87(1998)833–840.
82. Lu, Y. H. & Ching, C. B. "Physicochemical properties, binary and ternary phase diagrams of ketoprofen". *Chirality* 16(2004)541–548.
83. Grzesiak, A. L. & Matzger, A. J. "New Form Discovery for the Analgesics Flurbiprofen and Sulindac Facilitated by Polymer-Induced Heteronucleation". *J. Pharm. Sci.* 96(2007)2978–2986.
84. Perlovich, G. L., Hansen, L. K. & Bauer-Brandl, a. "Solvates with anomalous low melting points. Preparation, structural and thermochemical aspects". *J. Therm. Anal. Calorim.* 73(2003)715–725.
85. Aaltonen, J. *et al.* "Solid form screening - A review". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71(2009)23–37.
86. Weyna, D. R., Shattock, T., Vishweshwar, P. & Zaworotko, M. J. "Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution". *Cryst. Growth Des.* 9(2009)1106–1123.
87. Kaupp, G. "Mechanochemistry: the varied applications of mechanical bond-breaking". *CrystEngComm* 11(2009)388-403.
88. Fricié, T. & Jones, W. "Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding". *Cryst. Growth Des.* 9(2009)1621–1637.
89. Giron, D. "Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry". *J. Therm. Anal. Calorim.* 68(2002)335–357.

90. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. (São Paulo: Bookman, **2002**).
91. Mojumdar, S. C., Sain, M., Prasad, R. C., Sun, L. & Venart, J. E. S. "Selected thermoanalytical methods and their applications from medicine to construction: Part I". *J. Therm. Anal. Calorim.* 90(**2007**)653–662.
92. Brown, M. E. *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Application*.(Kluwer, New York, **2001**).
93. Craig, D. Q. M. & Reading, M. *Thermal Analysis of Pharmaceuticals*.( CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca raton, **2007**).
94. Sabbah, R. *et al.* "Reference materials for calorimetry and differential thermal analysis". *Thermochim. Acta* 331 (**1999**)93–204.
95. Charsley, E. L., Stewart, C., Barnes, P. A. & Parkes, G. M. B. "Development and applications of sample controlled thermomicroscopy". 72(**2003**)1087–1090.
96. Chieng, N., Rades, T. & Aaltonen, J. "An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55(**2011**)618–44.
97. Derollez, P. *et al.* "Ab initio structure determination of phase II of racemic ibuprofen by X-ray powder diffraction". *Acta Crystallogr. Sect. B* 66(**2010**)76–80.
98. Brittain, H. G. *et al.* "Physical characterization of pharmaceutical solids". *Pharm. Res.* 8(**1991**)963–973.
99. Jung, G. & Tiebes, D. *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*. (Wiley-VCH, Wienhein, **1999**).
100. Koehler, F. & Lee, E. "Near infrared spectroscopy: the practical chemical imaging solution". *Near Spectrosc.* 3(**2002**)12–16.
101. Baianu, I. C. "Applications of Microspectroscopy , Hyperspectral Chemical Imaging and Fluorescence Microscopy in Chemistry , Biochemistry , Biotechnology , Molecular and Cell Biology". (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA, 2011). disponível em: <http://core.ac.uk/download/pdf/290454.pdf>, última consulta: 27 Julho 2015.
102. Flynn, K., O’Leary, R., Roux, C. & Reedy, B. J. "Forensic analysis of bicomponent fibers using infrared chemical imaging". *J. Forensic Sci.* 51(**2006**)586–596.
103. Khanna, R. K., Stranz, D. D. & Donn, B. "A spectroscopic study of intermediates in the condensation of refractory smokes - Matrix isolation experiments of SiO". 21(**1981**)2108-2115.
104. Machado, S., "Estudo do Polimorfismo do Levetiracetam", *Estágio de Licenciatura*. (Universidade de Coimbra) **2013**.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

105. Process, I. E. W. G. and I. "ICH Harmonised Tripartite Guideline - Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)", **2003**, disponível em: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf), última consulta em: 24 Agosto 2015.

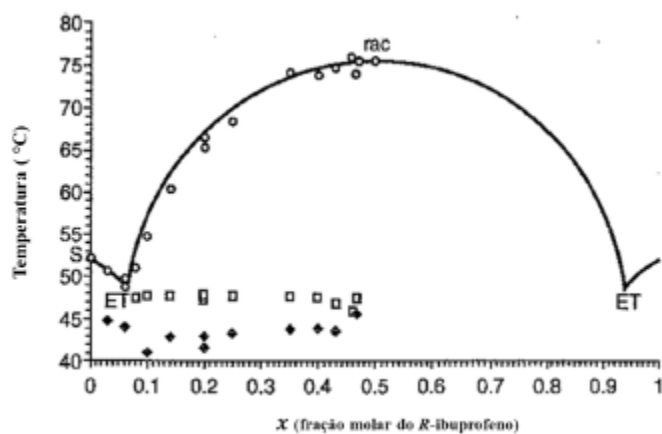
***ANEXOS***

---

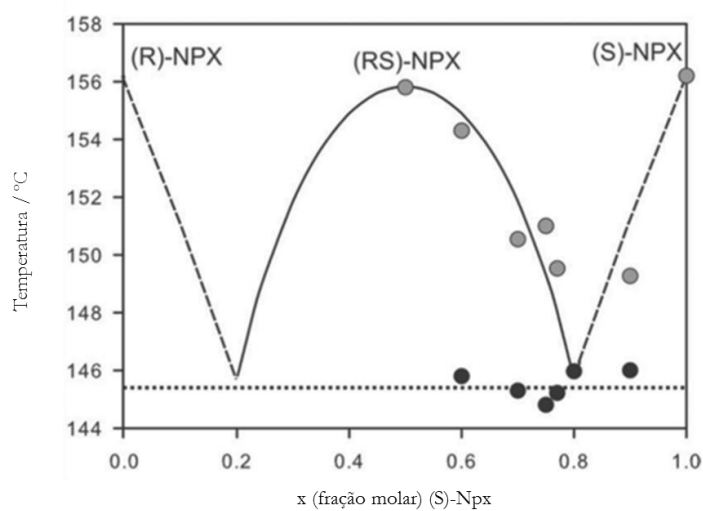




**ANEXO 1** – Diagramas de fase sólido-líquido de misturas binárias de enantiómeros de ibuprofeno, naproxeno e cetoprofeno.



**Figura A.1.** Diagrama de fases sólido-líquido do R- e S-ibuprofeno: (□) fusão do eutético (ET); (♦) fusão do eutético metaestável; (○) *liquidus*, adaptado <sup>71</sup>.



**Figura A. 2.** Diagrama de fases sólido-líquido do R- e S-Naproxeno, adaptado<sup>77</sup>.

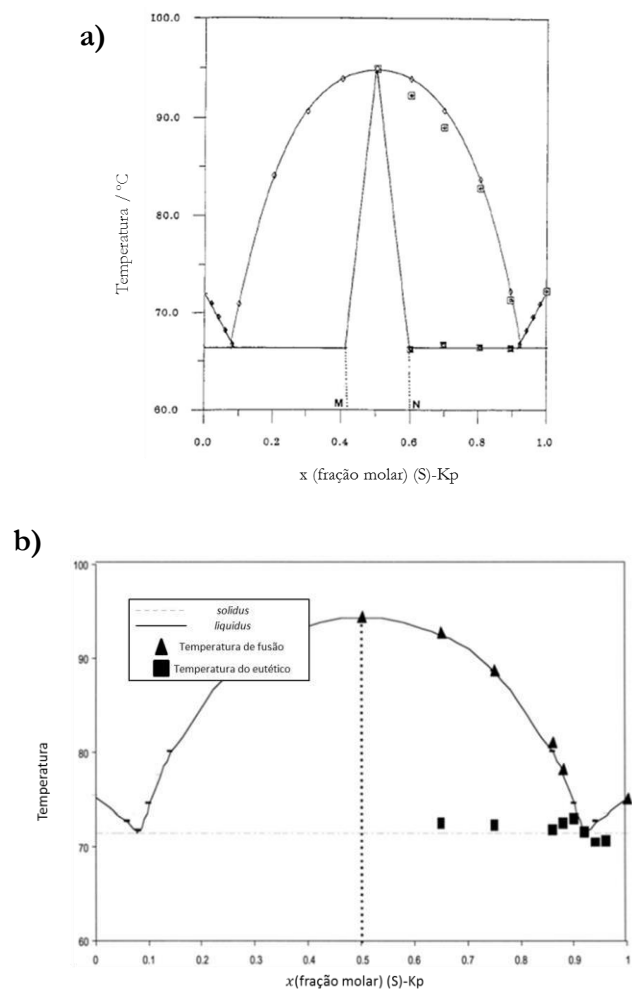
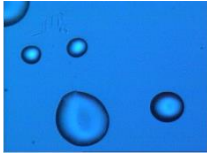


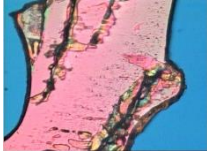

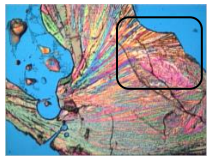

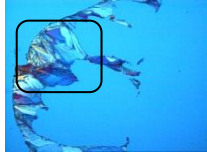

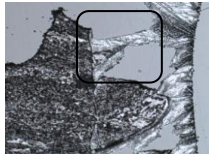
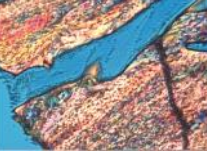
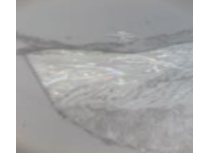
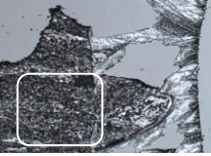
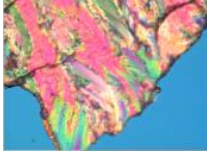







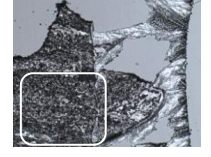
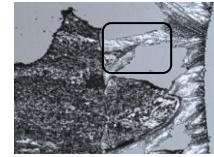
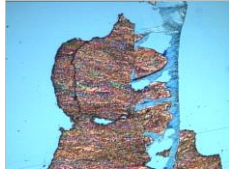


Figura A. 3. Diagrama de fases sólido- líquido do R- e S-Cetoprofeno, a) adaptado <sup>81</sup>.e b) adaptado <sup>82</sup>.

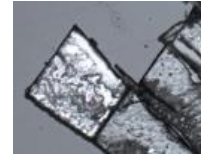
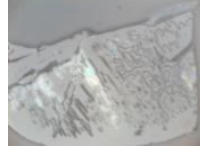
ANEXO 2– Levetiracetam: Imagens ópticas do cristalizado do fundido obtidas por PLTM,  
imagiologia de infravermelho e imagiologia de Raman

Zona	PLTM	Imagiologia de Infravermelho	Imagiologia de Raman
A			
B			
J			
D			
C			
			
E			
F			
			

**C**



**G**



**H**

