

Liliana Santos Oliveira

## Novas fases sólidas de salbutamol e de iguratimode

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor João Canotilho Lage e pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Liliana Santos Oliveira

# Novas fases sólidas de salbutamol e de iguratimode

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor João Canotilho Lage e pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

“Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado; a ciência avança, passo a passo e cada homem depende do trabalho de seus predecessores.”

(Ernest Rutherford)





## **Agradecimentos**

A realização pessoal não conta apenas com o esforço próprio, mas também com importantes apoios e incentivos, os quais agradeço de coração.

Começo por agradecer aos Professores Doutores Ermelinda Eusébio e João Canotilho, que foram os meus orientadores ao longo deste ano, e que me aceitaram no seu grupo de trabalho, transmitindo-me todos os conhecimentos necessários, foram sem dúvida o meu grande pilar.

Um obrigado aos Professores Doutores Ricardo Castro e Teresa Roseiro, pela disponibilidade sempre demonstrada e pela partilha de conhecimentos.

Aos colegas do grupo de investigação, Ana Luísa e Ana Margarida pela partilha e ajuda ao longo deste ano e um especial agradecimento ao Osvaldo pela ajuda na execução de alguns ensaios e pela dedicação e preocupação que demonstrou para comigo.

Um obrigado ao Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador pela orientação prestada ao longo destes dois anos e pela oportunidade que me concedeu em poder realizar a minha dissertação numa área de tanto interesse.

Por último um especial agradecimento ao meu marido, Ricardo, que foi sem dúvida uma das pessoas mais importantes ao longo deste ano, sem ele e sem o seu apoio e otimismo nada disto teria sido possível, obrigado por acreditares em mim e me apoiares em todas as minhas decisões, ao meu irmão, Rafael, um enorme obrigado pela disponibilidade de ajuda e por estares disponível sempre que precisei, e aos meus pais que são sem dúvida o meu maior suporte, que estão na base de tudo, que me apoiaram incondicionalmente e que estão sempre presentes nos momentos mais importantes da minha vida, a eles agradeço tudo o que tenho e sou. Todo o trabalho e esforço, e acima de tudo, esta dissertação, são dedicados a vocês os quatro.



# Índice geral

Índice de Figuras .....	i
Índice de Tabelas .....	v
Resumo .....	vii
Abstract .....	ix
Acrónimos e Abreviaturas .....	xi
Capítulo I – Introdução .....	1
1.1 – Polimorfismo .....	4
1.1.1 – Solubilidade .....	8
1.2 – Métodos de obtenção de polimorfos .....	10
1.2.1 – Cristalização a partir de solução .....	10
1.2.2 – Cristalização a partir do fundido .....	12
1.2.3 – Moagem (a seco ou assistida por solvente) .....	12
1.2.4 – Secagem por pulverização .....	13
1.2.5 – Dessolvatação de solvatos .....	13
1.2.6 – Sublimação .....	13
1.3 – Salbutamol .....	14
1.4 – Iguratimode .....	16
Capítulo 2 – Materiais e Métodos .....	19
2.1 – Materiais .....	21
2.2 – Métodos de preparação .....	22
2.2.1 – Cristalização em solventes .....	22
2.3 – Métodos de estudo .....	23
2.3.1 – Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) .....	23
2.3.2 – Termomicroscopia .....	24
2.3.3 – Espectroscopia de Infravermelho .....	25
2.3.4 – Difração de raios-X de pó (PXRD) .....	26
Capítulo 3 – Resultados e Discussão .....	29
3.1 – Salbutamol .....	31
3.1.1 – Estudo sobre a amostra de partida .....	31
3.1.2 – <i>Screening</i> de novas formas sólidas por cristalização a partir de solventes .....	35
3.2 – Iguratimode .....	44
3.2.1 – Estudo sobre a amostra de partida .....	44
3.2.2 – <i>Screening</i> de novas formas sólidas por cristalização em solução .....	48
3.2.3 – Estudo de transições de fase .....	58
3.2.4 – Estudo da cristalização a partir do fundido .....	59

<b>Capítulo 4 – Notas Finais e Perspectivas Futuras .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 5 – Referências Bibliográficas .....</b>	<b>67</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática de polimorfismo de empacotamento e de polimorfismo conformacional.....	4
Figura 2-Diagrama de fases para dois polimorfos com comportamento termodinâmico: a) enantiotrópico; b) monotrópico, a pressão constante.....	6
Figura 3 – Curvas típicas de DSC, a) sistema enantiotrópico, b) sistema monotrópico.....	7
Figura 4 - Estrutura química do sal de cálcio da atorvastatina.....	9
Figura 5 – Estrutura química do salbutamol.....	15
Figura 6 - Estrutura química dos enantiômeros R e S do salbutamol.....	16
Figura 7 - Estrutura química do lgratimode.....	17
Figura 8 - Curvas de DSC de salbutamol comercial, (a) primeiro aquecimento de 25°C até 165°C, (b) primeiro arrefecimento de 165°C até 25°C, (c) segundo aquecimento de 25°C até 165°C, (d) segundo arrefecimento de 25°C até 165°C; $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.....	30
Figura 9 - Imagens de PLTM obtidas no aquecimento de salbutamol comercial entre 25°C e 165°C, $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	32
Figura 10 - Espectro de FTIR-ATR do salbutamol comercial.....	33
Figura 11 - Espectros de FTIR-ATR do salbutamol comercial e espectro representativo dos sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo I.....	36
Figura 12 - Espectros de FTIR-ATR do salbutamol comercial; a) sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo II.....	36
Figura 13 - Salbutamol e curvas de DSC dos sólidos obtidos por a) evaporação lenta de a) metanol e b) etanol, aquecimento de 25°C até 165°C; $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.....	37
Figura 14 - Curvas de DSC do sólido cristalino do salbutamol em i-propanol. Aquecimento de 25°C até 165°C; $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , capsula fechada.....	38
Figura 15 - Imagens de PLTM do aquecimento, num intervalo entre 25°C e 165°C, de salbutamol cristalizado de etanol, $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	38
Figura 16 - Imagens de PLTM do aquecimento, num intervalo entre 25°C e 165°C, de salbutamol cristalizado em metanol, $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	39
Figura 17 - Imagens de PLTM, do aquecimento num intervalo entre 25°C e 165°C de salbutamol cristalizado em <i>iso-propanol</i> , $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	40
Figura 18 - Curvas de DSC do salbutamol cristalizado de a) acetona e b) diclorometano. Aquecimento de 25°C até 165°C; $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.....	41
Figura 19 - Imagens de PLTM, do aquecimento num intervalo entre 27°C e 165°C, de salbutamol cristalizado em acetona, $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	42

Figura 20 - Imagens de PLTM, do aquecimento num intervalo entre 25°C e 165°C, de salbutamol cristalizado em diclorometano, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	43
Figura 21 - Curvas de DSC do iguratimode, a) primeiro aquecimento de 25°C até 245°C; b) primeiro arrefecimento de 245°C até 25°C, c) segundo aquecimento de 25°C até 245°C; $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula de 30 $\mu\text{L}$ fechada.....	44
Figura 22 - Imagens de PLTM do aquecimento num intervalo entre 25°C e 245°C de iguratimode comercial, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	46
Figura 23 - Imagens de PLTM do arrefecimento num intervalo entre 245°C e 25°C de iguratimode comercial, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.....	46
Figura 24 - Espectro de FTIR-ATR do Iguratimode comercial.....	47
Figura 25 - Difractograma de raios-X de pó experimental da amostra de iguratimode comercial.....	48
Figura 26 - Espectro de FTIR-ATR iguratimode comercial, a) cristalizado em solventes do grupo I.....	51
Figura 27 - Espectro de FTIR-ATR, Iguratimode comercial, b) cristalizado em solventes do grupo II.....	51
Figura 28 - Espectro de FTIR-ATR, iguratimode comercial, c) cristalizado em diclorometano.....	52
Figura 29 - Espectro de FTIR-ATR, iguratimode comercial, d) cristalizado em diclorometano à temperatura de 6°C, e) cristalizado em acetato de etilo à temperatura de 10°C.....	53
Figura 30 - Iguratimode: curvas de DSC ds sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo I, a) aquecimento de 25°C até 245°C, a1) arrefecimento de 245°C até 25°C; $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.....	53
Figura 31 - Iguratimode: curvas de DSC do sólido cristalizado em diclorometano, a) aquecimento de 25°C até 245°C, b) arrefecimento de 245°C até 25°C; $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.....	55
Figura 32 -Iguratimode: curva de DSC do aquecimento do sólido obtido por cristalização em solventes do grupo II; $T_i = 25^\circ\text{C}$ até $T_f = 245^\circ\text{C}$ com $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula perfurada de 50 $\mu\text{L}$ ....	56
Figura 33 - Curva de DSC do aquecimento do iguratimode comercial e do sólido cristalizado em a) metanol e b) metanol:etanol (3:2 (v/v)); $T_i = 25^\circ\text{C}$ até $T_f = 105^\circ\text{C}$ com $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula perfurada de 50 $\mu\text{L}$ .....	57
Figura 34 - Difractograma de raio-X de pó, experimental do Iguratimode comercial, a) sólido cristalizado em solventes do grupo II.....	58
Figura 35 - Iguratimode: Exemplo de curvas de DSC de aquecimento dos sólidos cristalizados em solventes, realizados para investigação das transições sólido-sólido, a) aquecimento de 25°C até 200°C, (b) arrefecimento de 200°C até 25°C; $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.....	59
Figura 36 - Espectro de FTIR-ATR do iguratimode comercial, a) amostra cristalizada em clorofórmio após o ciclo de DSC mostrado na figura 35.....	60



Figura 37 - Igaratimode: curvas de DSC do sólido cristalizado em clorofórmio, (a) primeiro aquecimento de 25°C até 245°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (b) arrefecimento de 245°C até 215°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (c) segundo aquecimento de 215°C até 245°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (d) segundo arrefecimento de 245°C até 170°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , (e) terceiro aquecimento de 170°C até 245°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  cápsula 30 $\mu\text{L}$  fechada.....61

Figura 38 - Igaratimode: curvas de DSC do sólido cristalizado em acetato de etilo, a) primeiro aquecimento de 25°C até 245°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , a1) arrefecimento de 245°C até 155°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , a2) segundo aquecimento de 155°C até 245°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , a3) segundo arrefecimento de 245°C até 160°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , a4) terceiro aquecimento de 160°C até 245°C com  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; cápsula 30 $\mu\text{L}$  fechada.....62

Figura 39 - Espectros de FTIR-ATR iguratimode comercial, a) cristalizado de diclorometano; b) cristalização de clorofórmio; c) amostra obtida após cristalização do fundido a  $T=180^{\circ}\text{C}$ , ensaio I; d) amostra obtida após cristalização do fundido a  $T=180^{\circ}\text{C}$ , ensaio II.....63



## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação da solubilidade aquosa de um fármaco pela USP [5, 19].....	9
Tabela 2 - Origem dos compostos utilizados neste trabalho e informações do fornecedor.	21
Tabela 3 - Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.....	21
Tabela 4 - Propriedades dos solventes utilizados nas experiências de cristalização do salbutamol e do iguratimode [49, 50] .....	23
Tabela 5 - Padrões utilizados na calibração em DSC.....	24
Tabela 6 - Temperatura de fusão (Tonset) para quatro amostras de salbutamol comercial (n=4), sujeitas a aquecimento à velocidade $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .....	32
Tabela 7 - Proposta de atribuição de algumas bandas observadas no espectro de infravermelho do salbutamol comercial.....	34
Tabela 8 - Morfologia dos sólidos obtidos nos processos de cristalização do salbutamol em vários solventes.....	35
Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do iguratimode comercial (n=6).....	45
Tabela 10 - Caracterização dos sólidos obtidos nos ensaios de cristalização do iguratimode em vários solventes.....	49
Tabela 11 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do Iguratimode cristalizado dos vários solventes, em vários ensaios.....	53
Tabela 12 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do iguratimode cristalizado em diclorometano, (n=4).....	54
Tabela 13 - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do iguratimode cristalizado em solventes do grupo II.....	56



## Resumo

Os medicamentos podem ver a sua eficácia e segurança comprometida como resultado da presença de diferentes fases sólidas do API, durante o processo de fabrico e de armazenamento. Isto implica a necessidade de investigação do polimorfismo e das suas consequências na qualidade do produto acabado. Por outro lado, a pesquisa de novas formas sólidas constitui, por si só, um desafio para a indústria farmacêutica visando encontrar a melhor solução para a otimização de propriedades físico-químicas no contexto de investigação e desenvolvimento.

Este projeto tem por objetivo a investigação e a caracterização de novas formas polimórficas de dois ativos farmacêuticos, o salbutamol, usado para o tratamento da asma e o iguratimode, útil para o tratamento da artrite reumatoide. Ambos mostraram uma forte dinâmica comercial no mercado global.

Assim, o *screening* de novas formas sólidas é realizado recorrendo à cristalização em solução. O estudo dos sólidos obtidos é feito por espectroscopia de infravermelho, por métodos de análise térmica (calorimetria diferencial de varrimento e termomicroscopia) e, ainda, por difração de raios-X de pó.

O estudo preliminar dos sólidos obtidos por cristalização, permitiu-nos identificar algumas formas sólidas, novas, do iguratimode, sendo uma delas um solvato. No caso do salbutamol foi registada pela primeira vez evidência de uma forma polimórfica.

**Palavras Chave:** salbutamol; iguratimode; polimorfismo; FTIR-ATR; DSC; PLTM; XRPD





## **Abstract**

The medicaments may see their efficacy and safety compromised as a result of the presence of different solid phases of the API, during the process of manufacture and storage. This implies the need for research of polymorphism and of its effect on the quality of the finished product. On the other hand, the search for new solid forms is, in itself, a challenge to the pharmaceutical industry, aimed at finding the best solution for the optimization of physicochemical properties in the context of research and development.

This project aims at investigating and characterizing new polymorphic forms of two active pharmaceutical ingredients, salbutamol, used to treat asthma, and iguratimode, useful for the treatment of rheumatoid arthritis. Both showed strong commercial dynamics in the global market.

Thus, the screening of new solid forms is performed using crystallization from solutions. The study of the obtained solids is made by infrared spectroscopy, thermal analysis methods (differential scanning calorimetry and thermomicroscopy) and also by X-ray powder diffraction.

The preliminary study of the solid samples obtained by crystallization allowed us to identify some new solid forms of iguratimode, one of them a solvate. In the case of salbutamol evidence of a polymorphic form is registered for the first time.

**Keywords:** Salbutamol; Iguratimod; polymorphism; FTIR-ATR; DSC; PLTM; XRPD



## **Acrónimos e Abreviaturas**

API – do inglês “Active Pharmaceutical Ingredient”

ATR – do inglês “Attenuated total reflection”

CCDC – do inglês “Cambridge Crystallographic Data Centre”

COX-2 – Ciclooxigenase – 2

DMARDs – Medicamentos anti-reumáticos modificadores da doença

DSC – do inglês “Differential scanning calorimetry”

FTIR – do inglês “Fourier Transform Infra Red”

IGU – Igaratimode

PLTM – do inglês “Polarized Light Thermal Microscopy”

TA – do inglês “Thermal analysis”

$T_{\text{amost}}$  – Temperatura da amostra

$T_f$  – Temperatura final

THF – Tetra-hidrofurano

$T_i$  – Temperatura inicial

$T_{\text{ref}}$  – Temperatura de referência

$T_{\text{trs}}$  – Temperatura de transição

USP – do inglês “United States Pharmacopeia”

VHI-I – Vírus da Imunodeficiência humana

XRPD – do inglês “X-Ray Powder Difraction”



# Capítulo I

Introdução





## I – Introdução

A maioria dos medicamentos são formas sólidas constituídas por um API (ativo farmacêutico) e por excipientes, no estado cristalino. Geralmente, os API's são mais estáveis no estado sólido do que em solução, onde a degradação ocorre mais rapidamente. Assim, os sólidos farmacêuticos apresentam os seus próprios desafios. É sabido que no estado sólido as moléculas podem adotar mais do que um arranjo na rede cristalina, o que dá origem ao fenómeno designado por polimorfismo [1, 2, 3].

Historicamente, a indústria farmacêutica não encetava a investigação no domínio do estudo do polimorfismo, mas, o aparecimento súbito de uma nova forma sólida de Ritonavir foi o suficiente para desencadear a necessidade de estudos de polimorfismo [4]. O Ritonavir (denominação comum internacional) é um ativo antirretroviral da classe dos inibidores da protease, utilizado para o tratamento de infeções provocadas por VIH-1. Dois anos após a sua introdução no mercado (NORVIR®), verificou-se, após os testes de dissolução, a presença de uma nova forma polimórfica mais estável, com cerca de metade de solubilidade da forma inicial presente no referido medicamento [5, 4].

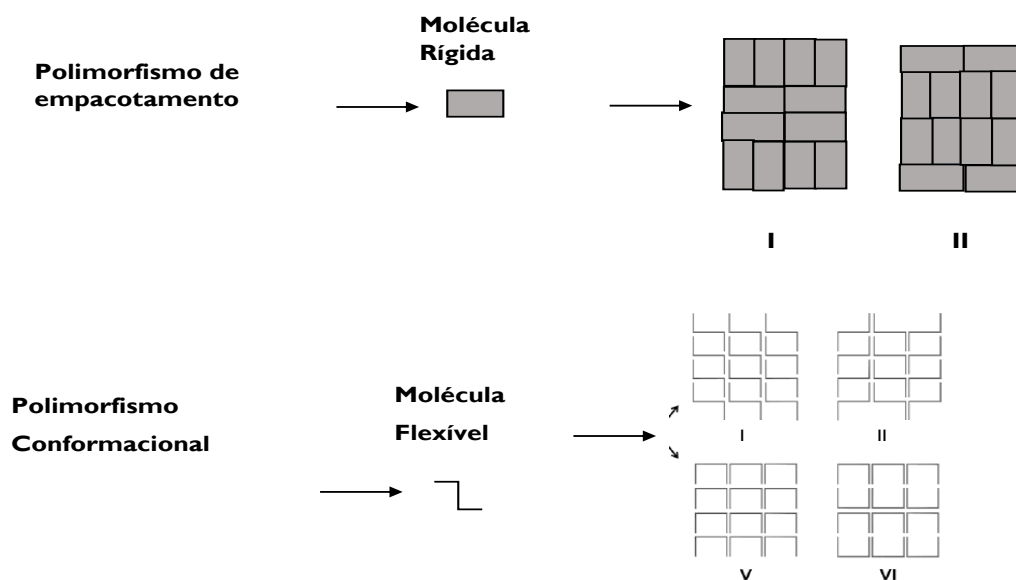
A partir deste marco, as exigências regulamentares para o desenvolvimento e produção de um medicamento sugerem uma pesquisa completa para encontrar a forma sólida ideal, com as melhores características para o desenvolvimento do mesmo, e para isso é necessário o estudo de todas as formas possíveis (polimorfos), implementando uma etapa de pesquisa de polimorfismo durante a fase de pré-formulação [6].

## I.1 – Polimorfismo

O primeiro exemplo documentado da existência de polimorfismo foi devido ao trabalho de Liebig e Wöhler, em 1832, sobre a benzamida [7].

Segundo a definição de Haleblan e McCrone, o polimorfismo é definido como a capacidade de qualquer composto cristalizar em mais do que uma forma cristalina [2]. No entanto, a indústria farmacêutica aceita uma definição mais lata e considera também polimorfos as fases amorfas, os solvatos e os hidratos [6].

No estado cristalino (polimorfos, solvatos/hidratos, co-cristais e sais), as moléculas encontram-se na célula unitária de acordo com uma simetria e um sistema cristalino. Os cristais podem revelar a existência de polimorfismo de empacotamento ou de polimorfismo conformacional [5, 1]. Se observarmos empacotamento de moléculas rígidas com arranjos diferentes, estamos perante polimorfismo de empacotamento. No polimorfismo conformacional a molécula flexível pode adquirir diferentes conformações e cristalizar em diferentes arranjos (figura I). No estado amorfo, a fase condensada mostra desordem a longa distância, e pode resultar de uma manipulação física (introdução de defeitos), ou pode ser da natureza do composto. A forma amorfa é, geralmente, a forma mais solúvel, mas por outro lado é a forma mais instável [8, 9].



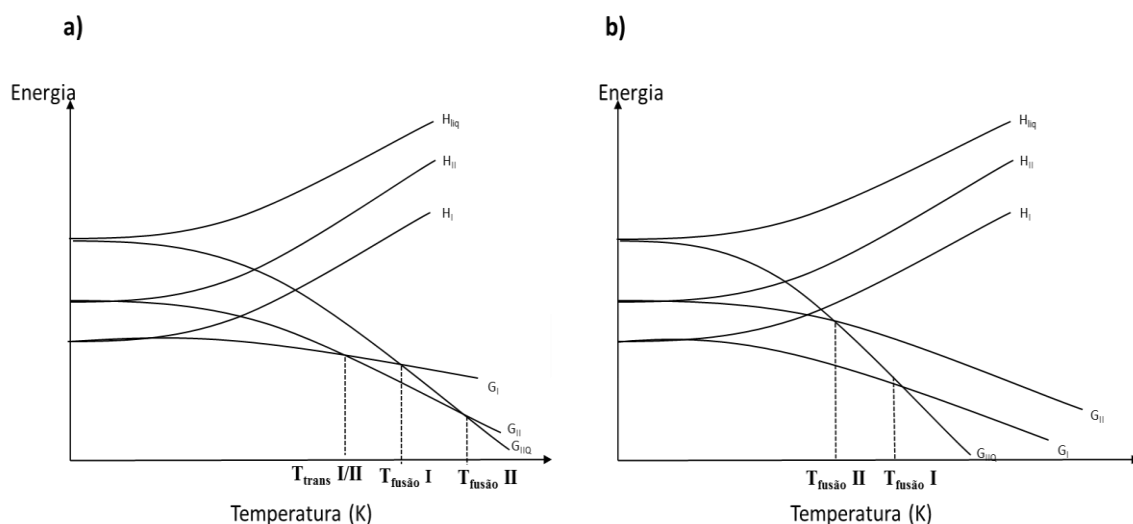
**Figura I** - Representação esquemática de polimorfismo de empacotamento e de polimorfismo conformacional.

Os sólidos cristalinos que contêm na célula unitária ou rede cristalina moléculas de solvente são designados de solvatos. Os solvatos, em que a água é o solvente, são designados por hidratos. Os hidratos são comuns, devido ao facto de a água estar presente na maioria dos solventes utilizados durante a cristalização. Além disso, a capacidade de participar tanto como dador ou como aceitador de protão, e o tamanho reduzido da molécula de água, permite que esta seja facilmente incorporada na célula unitária funcionando como estabilizador do sistema cristalino, por via de formação de ligações de hidrogénio [5, 1].

Quando um API existe em várias formas, no estado sólido, é importante conhecer a respetiva estabilidade termodinâmica relativa, as condições de pressão e temperatura a que ocorrem transições de fase e quanto tempo irá ser necessário para que uma forma metastável evolua para a forma mais estável [7, 10, 11]. Com base nas diferenças da energia de Gibbs molar, os polimorfos são classificados como enantiotrópicos ou monotrópicos dependendo da possibilidade de uma forma se poder transformar reversivelmente noutra ou não [12]. Uma forma polimórfica pode transitar para outra, a uma dada temperatura e pressão, assumindo-se aquela temperatura como, temperatura de transição. Quando a transição de um polimorfo para o outro é reversível estamos perante um sistema enantiotrópico, mas quando essa transição não é reversível estamos perante um sistema monotrópico [12, 11].

Durante a pesquisa de polimorfismo de um ativo é importante identificar a forma que é mais estável à temperatura ambiente e determinar que transições polimórficas podem ocorrer dentro da gama de temperaturas usada nos estudos de estabilidade e durante o processamento (secagem, moagem, etc.). Assim, um composto que apresenta polimorfismo pode ser caracterizado recorrendo-se a diagramas de fases, tais como: energia de Gibbs vs temperatura, pressão vs temperatura, solubilidade vs temperatura. Em geral, esses diagramas reúnem uma grande quantidade de informação e fornecem uma visão sumária e facilmente interpretável das complexas relações entre os polimorfos [13].

Na figura que se segue estão representados os diagramas de energia vs temperatura para os sistemas referenciados.

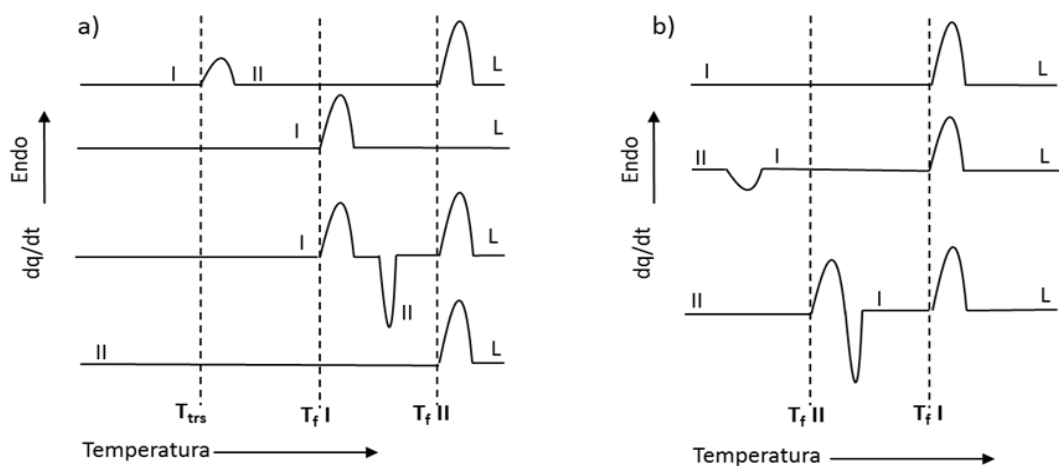


**Figura 2** - Diagrama de fases para dois polímeros com comportamento termodinâmico: a) enantiotrópico; b) monotrópico, a pressão constante.

No diagrama a) e b) da figura 2,  $G$  representa a energia de Gibbs e  $H$  a entalpia. No sistema enantiotrópico, figura 2a, para os polímeros I e II, as curvas de  $G_I$  e  $G_{II}$  cruzam-se num ponto a que se chama ponto de transição ( $T_{trs} I/II$ ) que se encontra abaixo do ponto de fusão de ambos os polímeros. Podemos assim, nesse ponto, ter os dois polímeros como uma mistura em equilíbrio, sendo ambos estáveis. Como descrito anteriormente, neste sistema existe uma transição reversível de um polímero no outro. A curva  $G_{liq}$  representa a fase líquida, e a sua interseção com as curvas  $G_I$  e  $G_{II}$  representa, respetivamente o ponto de fusão desses polímeros. Neste caso, o polímero I é o mais estável abaixo do ponto de transição, ou seja, tem uma menor energia de Gibbs, e o polímero II é estável acima dessa temperatura, até à fusão. No que diz respeito ao sistema monotrópico, figura 2b, não existe ponto de transição abaixo do ponto de fusão dos polímeros, o que é confirmado pela ausência do cruzamento das curvas  $G_{II}$  e  $G_I$ , sendo que nestas condições o polímero I nunca se transformará no polímero II, sendo o polímero I mais estável em toda a gama de temperatura, até à fusão [11].

Existem três regras propostas por Burger e Ramberger para a identificação de relações de enantiotropia e monotropia, em que para duas delas, que usam a entalpia de transição e a entalpia de fusão, são usadas medidas calorimétricas realizadas por DSC [14]. Se a uma determinada temperatura é observada uma transição endotérmica entre as formas cristalinas, então existe uma temperatura de transição abaixo da temperatura de fusão, ou seja, as formas polimórficas relacionam-se enantiotropicamente, (figura 3a). Se apenas for observada uma transição exotérmica a uma dada temperatura e se não ocorrer nenhuma

transição a uma temperatura mais elevada então os dois polimorfos relacionam-se monotropicamente, figura 3b.



**Figura 3** - Curvas típicas de DSC, a) sistema enantiotrópico, b) sistema monotrópico.

Quanto às entalpias de fusão, no sistema enantiotrópico, o polimorfo que tem um ponto de fusão mais elevado tem uma entalpia de fusão mais baixa, o que não acontece no sistema monotrópico, pois nesse caso o polimorfo que tem o ponto de fusão mais elevado também apresenta uma entalpia de fusão superior. No caso de os pontos de fusão diferirem em mais do que 30°C, a regra não é válida e o polimorfo com o ponto de fusão superior poderá ter entalpia de fusão mais elevada num sistema enantiotrópico. Embora a termodinâmica permita estudar a estabilidade das várias formas sólidas, uma vez encontrada uma forma metaestável é necessário recorrer a estudos cinéticos para determinar o procedimento de obtenção a seguir e o tempo e condições em que aquela forma se mantém como metaestável [7].

Tendo em conta que nas diferentes estruturas cristalinas estão presentes várias interações inter- e intramoleculares, tais como as devidas a forças de van de Waals, ligações de hidrogénio,  $\pi - \pi$ , diferentes polimorfos apresentam diferentes energias de Gibbs e por consequência diferentes propriedades físicas, tais como a solubilidade, a capacidade calorífica, as temperaturas de sublimação e de fusão, a densidade, a higroscopicidade, a condutividade, a entropia, e a pressão de vapor [15]. A caracterização dos diferentes polimorfos bem como em particular, o estudo das transições de fase entre polimorfos é fundamental para perceber as propriedades do API. Uma vez que as formas polimórficas, diferem na sua estrutura interna, um API que exista em várias formas polimórficas pode apresentar diferentes taxas

de solubilidade e dissolução aquosa. Estas diferenças têm um efeito muito significativo sobre a biodisponibilidade oral do medicamento [16].

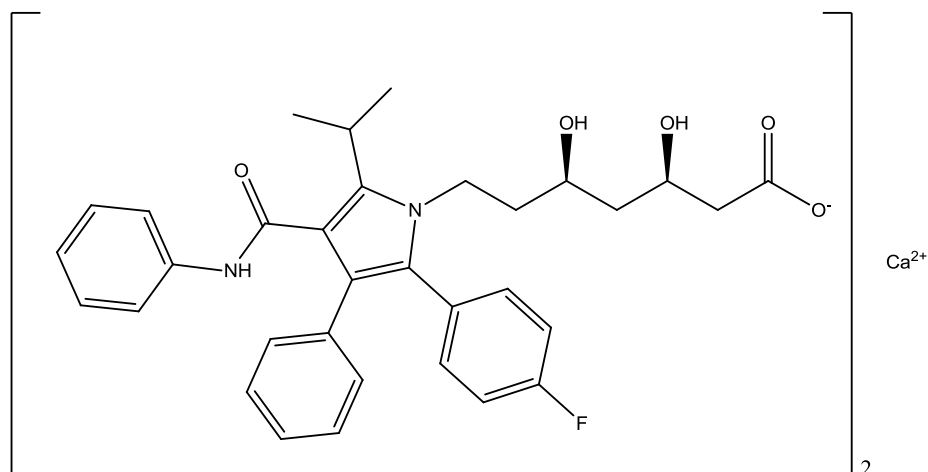
### **1.1.1 – Solubilidade**

Atualmente o polimorfismo tem sido alvo de muito interesse na indústria farmacêutica, em particular a diferença da solubilidade aquosa observada para os vários polimorfos, sendo a sua investigação de carácter obrigatório [17]. A solubilidade aquosa é um dos parâmetros físico-químicos mais críticos e que influencia a biodisponibilidade oral do ativo farmacêutico, isto é, a capacidade de um fármaco estar disponível numa concentração apropriada no local de ação, independentemente da forma farmacêutica e da via de administração [5, 17]. A solubilidade aquosa de polimorfos metaestáveis é mais elevada do que a de um polimorfo termodinamicamente mais estável.

Muitos polimorfos mostram uma baixa solubilidade e uma velocidade de dissolução lenta, em soluções aquosas. Como resultado, a biodisponibilidade oral desses API's é muito baixa [18].

Um caso prático que ilustra o problema da solubilidade aquosa é o do sal de cálcio da atorvastatina, figura 4, um inibidor da 3-hidroxi-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, com uma forte capacidade de reduzir o colesterol no sangue. É a molécula eleita (o seu sal de cálcio) entre as estatinas e é o API utilizado pela Pfizer para produzir o medicamento Lipitor® [19]. Verificou-se que o sal de cálcio da atorvastatina era instável, originando a forma hidroxiácido que é convertida, na forma de comprimidos, granulados ou cápsulas, para lactona, que é 15 vezes menos solúvel que o hidroxiácido. Isto conduziu a baixa solubilidade e é a principal causa para a baixa biodisponibilidade oral do fármaco, após a sua administração ser de apenas, 14% [5,19]. Pelo menos 60 formas polimórficas/solvatos/hidratos do sal de cálcio da atorvastatina foram patenteadas e várias empresas desenvolveram medicamentos genéricos baseados em diferentes polimorfos [5].





**Figura 4** - Estrutura química do sal de cálcio da atorvastatina.

Como foi referido, a melhoria da solubilidade dos ativos farmacêuticos com baixa solubilidade aquosa é uma estratégia a seguir na pesquisa e no desenvolvimento farmacêutico. A transformação de um API cristalino na sua forma amorfa, leva muitas vezes a um aumento da solubilidade e a um aumento da taxa de dissolução, sendo este um caminho que pode ser seguido.

A solubilidade aquosa é o principal indicador da solubilidade nos fluídos gastrointestinais e da sua potencial contribuição para a biodisponibilidade do ativo sólido [5, 20]. A Farmacopeia Americana (USP) divide a solubilidade aquosa em 7 categorias diferentes, como se apresenta na Tabela I:

**Tabela I** - Classificação da solubilidade aquosa de um fármaco pela USP [5,19].

Classificação da solubilidade	Intervalo de Solubilidade / mg mL <sup>-1</sup>
<i>Muito solúvel</i>	>1,0
<i>Livremente solúvel</i>	100-1,0
<i>Solúvel</i>	33-100
<i>Moderadamente solúvel</i>	10-33
<i>Fracamente solúvel</i>	1-10
<i>Muito fracamente solúvel</i>	0,1-1
<i>Praticamente insolúvel</i>	<0,1

Esta classificação permite-nos conhecer o intervalo de solubilidade, em mg/ml, tornando mais fácil a classificação dos API's.

Os API's que apresentam solubilidades aquosas baixas, forçam a investigação e o desenvolvimento de formulações com o objetivo de ultrapassar esta propriedade crítica e assegurar uma biodisponibilidade oral ótima.

## **1.2 – Métodos de obtenção de polimorfos**

A última década viu nascer vários métodos para a preparação e controlo de polimorfos, bem como métodos de caracterização e estudo dos mesmos [18]. Geralmente, a pesquisa de polimorfos envolve uma grande variedade de métodos, tais como: cristalização a partir de solução e adição de um anti-solvente; cristalização por arrefecimento e evaporação do solvente; cristalização a partir de fundidos; moagem (a seco ou assistida por solvente); secagem por pulverização; sublimação; difusão de vapor; dessolvatação de solvatos e liofilização [21, 22].

### **1.2.1 – Cristalização a partir de solução**

A cristalização é o método de escolha mais eficiente e económico para a obtenção e purificação de compostos orgânicos. Enquanto alguns compostos formam cristais, outros podem mostrar dificuldades em cristalizar [18, 23]. O arranjo molecular no cristal impõe, de certa forma, as propriedades físico-químicas do API (ex.: biodisponibilidade oral, solubilidade, a condutividade, higroscopicidade, etc.). Por isso, o controlo preciso da nucleação e do crescimento cristalino, é importante para a obtenção de cristais altamente funcionais [24].

A cristalização é descrita em duas etapas distintas, a nucleação que corresponde à formação dos núcleos cristalinos, e o crescimento cristalino que consiste no crescimento desses núcleos originando cristais, sendo que a morfologia resultante é a consequência da relação cinética entre estas duas fases do processo [5, 18]. A nucleação e o crescimento cristalino são os passos que determinam a natureza do polimorfo que se forma na solução. Contudo a nucleação é o passo mais crítico [23]. Os cristais (forma única ou concomitante) podem ser obtidos recorrendo-se ao uso de diferentes solventes de cristalização, ao uso de aditivos, à manipulação da relação de sobressaturação da solução ou através de modificações da geometria dos cristalizadores e a fatores externos como arrefecimento brusco da temperatura da solução, adição de anti-solvente, radiação infravermelha ou ultra-sons [25, 26, 18, 24].

A cristalização a partir de solventes é muito utilizada por várias razões, primeiro porque podemos obter um grande número de solvatos e de polimorfos devido à alteração do solvente, em segundo lugar porque os sólidos farmacêuticos são muitas vezes expostos a diferentes solventes durante o seu processamento, e assim os solvatos/hidratos que o composto tem tendência a formar deve ser estudado a fim de ajudar a definir os processos de fabrico. Em terceiro lugar, a dessolvatação ou a desidratação é outra técnica muito útil e por vezes a única que nos permite descobrir polimorfos [6]. Assim sendo, a cristalização deve incorporar um conjunto diversificado de solventes e misturas de solventes que abranja uma ampla gama de propriedades tais como: aceitadores/dadores de próton, polaridade, momento dipolar, constante dielétrica e viscosidade. O solvente pode promover ou inibir a formação de ligações de hidrogénio em cristais moleculares, dirigindo assim a nucleação e o crescimento cristalino de uma forma específica através do reconhecimento molecular [1, 27].

Os fatores que mais afetam a cristalização são a temperatura e a sobressaturação [24]. A sobressaturação é a variável termodinâmica chave na cristalização, pois perturba a cinética de nucleação e o crescimento cristalino. A relação de sobressaturação influencia não só a nucleação, mas também a taxa de crescimento. Geralmente, os polimorfos estáveis demoram mais tempo a nuclear e tendem a precipitar a baixas sobressaturações [1]. A temperatura, considerada a segunda variável mais importante, induz variações termodinâmicas e cinéticas, principalmente em polimorfos enantiotrópicos que alteram a solubilidade perto da temperatura de transição. Em suma, a cristalização, a uma dada temperatura pode produzir um polimorfo sendo que a outra temperatura distinta pode produzir um outro distinto [6].

Por outro lado, os processos de cristalização lenta favorecem fases termodinamicamente estáveis, e as formas cinéticas são mais propensas a nucleação em processos em que a cristalização ocorre de imediato. A maioria dos processos de cristalização são passíveis de tecnologia automatizada de alto rendimento, o que leva a que várias experiências de cristalização sejam realizadas usando pequenas quantidades de API, num curto espaço de tempo [6].

## **1.2.2 – Cristalização a partir do fundido**

A cristalização a partir do fundido é, uma opção, apenas quando o fundido é estável termicamente.[16].

Este método é semelhante à cristalização a partir de material amorfo. A forma amorfa, em comparação com materiais cristalinos correspondentes, é termodinamicamente instável, e tende a cristalizar numa forma mais estável. Geralmente, a cristalização a partir de material amorfo torna-se problemática uma vez que, pode resultar na alteração das propriedades físico-químicas do API. No entanto, utiliza-se esta técnica para produzir formas polimórficas desejadas [28].

A cristalização a partir do fundido pode gerar diferentes formas polimórficas com diferentes arranjos cristalinos e, em certos casos torna-se o único método para a obtenção de formas polimórficas de um composto [16, 29].

## **1.2.3 – Moagem (a seco ou assistida por solvente)**

A moagem tem sido muito usada para a formação de co-cristais, mas também é muito útil na investigação de formas polimórficas [30].

A moagem é um processo mecânico geralmente utilizado na indústria farmacêutica para a redução do tamanho do API. Contudo, devido à força exercida nas partículas sólidas, os altos níveis de energia mecânica podem induzir modificações na estrutura cristalina levando à formação de polimorfos [14].

Este método pode ser realizado a seco ou assistido por algumas gotas de solvente. Neste caso, o solvente aumenta a cinética da transição, dirigindo assim a cristalização para um polimorfo desejado. Podemos utilizar o método mecânico através de um moinho de bolas, ou manualmente, com a ajuda de um almofariz [31].

A moagem é também útil pois fornece informações acerca da estabilidade e do comportamento do pó quando sujeito a forças mecânicas [30].

#### **1.2.4 – Secagem por pulverização**

A tecnologia de secagem por pulverização, conhecida como *spay drying*, e a secagem rápida a partir de uma solução concentrada (por vezes uma suspensão) por exposição a um ambiente aquecido, baseia-se na evaporação do solvente através da pulverização da solução para uma câmara que recebe, em contra corrente, ar aquecido, promovendo assim uma secagem rápida. Mais detalhadamente, esta técnica consiste em quatro etapas: atomização da solução contendo a amostra, mistura da solução com o gás de secagem, evaporação da fase líquida e separação das partículas secas do gás [16].

Esta técnica é muitas vezes usada para a obtenção de fases amorfas. Nem sempre se torna o mais desejado, uma vez que durante o prazo de validade do medicamento podem ocorrer transformações, uma vez que a fase amorfa tende a evoluir para formas termodinamicamente mais estáveis, e desta forma a qualidade do medicamento pode ser afetada [8].

#### **1.2.5 – Dessolvatação de solvatos**

Um outro método para produção de polimorfos é a dessolvatação de solvatos, por exemplo por meio de aquecimento, a pressão reduzida.

Quando a dessolvatação ocorre, os solvatos podem sofrer transição de fase, portanto, perdendo cristalinidade e passando à forma amorfa. Noutros casos, o solvente abandona os cristais sem afetar a estrutura cristalina do solvato. Geralmente, o processo de dessolvatação é conduzido a uma humidade relativa baixa ou a baixa pressão de vapor [28].

Mudanças de fase devidas à solvatação / dessolvatação de compostos farmacêuticos durante o processamento ou no produto final podem resultar num sistema instável que perturba a biodisponibilidade do API [8].

#### **1.2.6 – Sublimação**

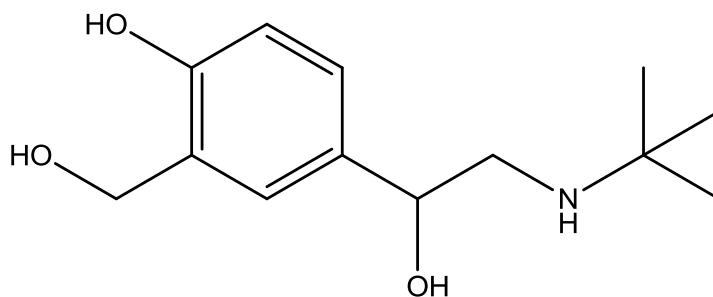
A sublimação é uma das técnicas que pode ser usada para a obtenção de polimorfos. O composto é sublimado a uma determinada temperatura e pressão e em seguida a fase

gasosa é condensada a uma temperatura mais baixa. O solvente não interfere neste processo [30].

A técnica de sublimação pode ser executada, por exemplo, com uma placa de aquecimento elétrica, uma placa de vidro e um vidro de relógio: coloca-se a quantidade do material que desejamos sublimar sobre a superfície plana de vidro e colocamos o vidro de relógio por cima, de modo a cobrir a amostra. O sistema é aquecido, fazendo com que a amostra sublime e condense, resultando na deposição de material cristalino ou amorfo na superfície do vidro de relógio. O controle da temperatura da placa e do vidro de relógio pode ser manipulado de modo a modificar as condições termodinâmicas e/ou cinéticas que favorecem ou não a cristalização de um ou outro polimorfo. McCrone e Haleblan explicam que pequenas diferenças de temperatura tendem principalmente a produzir o polimorfo estável, enquanto grandes diferenças de temperatura tendem a produzir polimorfos metastáveis [32, 30].

### 1.3– Salbutamol

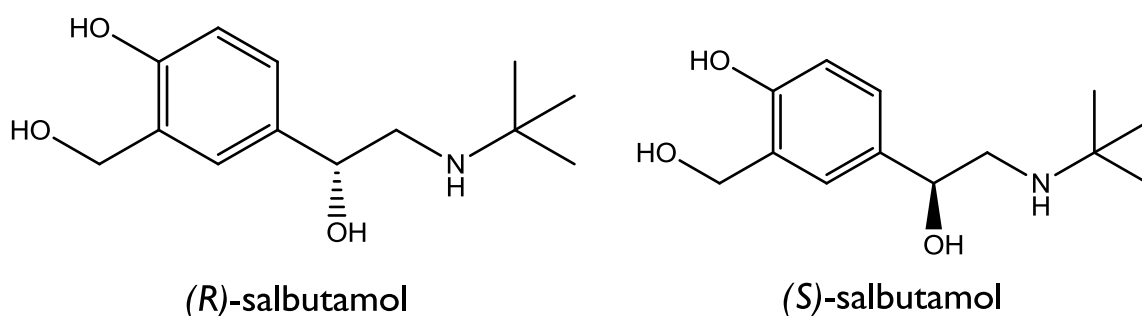
O salbutamol, também conhecido como albuterol, é um agonista adrenérgico  $\beta_2$ , figura 5, [33]. Este composto pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como álcoois benzílicos. O salbutamol foi desenvolvido para o tratamento da asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e outras doenças alérgicas associadas às vias respiratórias e, a sua ligação aos recetores adrenérgicos  $\beta_2$ , nos pulmões, resulta no relaxamento dos músculos lisos bronquiais [34, 35]. É normalmente utilizado sob a forma de sal, sulfato, em medicamentos para o uso humano/veterinário, mas também foi usado ilegalmente como agente de dopagem na alimentação animal com a finalidade de aumentar a produção de carne. Devido ao seu efeito anabólico, o Comité Olímpico Internacional incluí o salbutamol na lista das substâncias proibidas na prática de desporto [36, 37].



**Figura 5** - Estrutura química do salbutamol.

Os inaladores contendo agonistas adrenérgicos  $\beta_2$  estão entre os medicamentos mais utilizados. São os broncodilatadores mais eficazes no tratamento da asma, inibindo os efeitos de todos os estímulos broncoconstrutores.

O albuterol tem sido usado, há mais de quarenta anos, como uma mistura racémica de enantiómeros. A forma ativa é o (*R*)-albuterol, tendo o (*S*)-albuterol sido caracterizado como inerte (figura 6). Recentemente, é sintetizado e utilizado um único enantiómero, o (*R*), uma vez que o racemato foi considerado menos desejável, por se ter verificado que o enantiómero (*S*)-albuterol induz efeitos secundários. Assim, a seleção deste medicamento está dependente de alguns fatores que por vezes são menos favoráveis, como por exemplo o custo associado a síntese de apenas um dos enantiómeros, o (*R*)-albuterol. Isto leva a que, atualmente, ainda se use, em grande quantidade a mistura racémica para o tratamento de casos de asma aguda [38, 39].



**Figura 6** - Estrutura química dos enantiómeros *R* e *S* do salbutamol.

Recentemente, tem sido dedicada especial atenção à caracterização do estado sólido e ao desenvolvimento de sais e polimorfos, com o objetivo final de melhorar a sua eficácia terapêutica e características biofarmacêuticas. As propriedades térmicas do sulfato de salbutamol foram investigadas utilizando calorimetria diferencial de varimento. Os autores registaram uma série de eventos endotérmicos que foram atribuídos à fusão do cristal, seguida por degradação ou a várias fases do processo de degradação do ativo [40]. No entanto, não existem estudos sobre polimorfismo documentados, nem formas polimórficas registadas de salbutamol base.

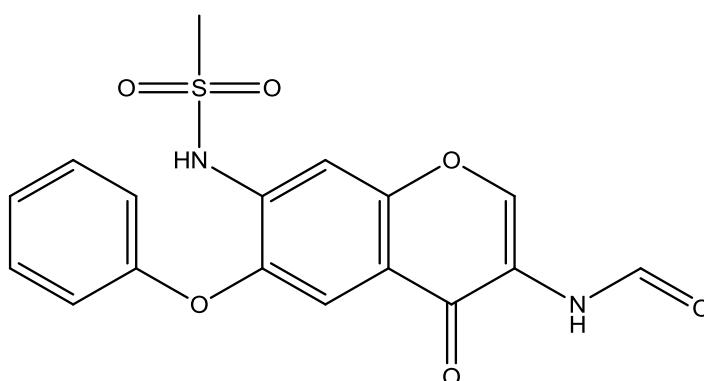
O salbutamol base apresenta uma baixa solubilidade em água, o que é um fator limitante para a biodisponibilidade oral, e deste modo é importante o estudo de novas formas polimórficas com a finalidade de melhorar esta propriedade.

Como resultado, entendemos desenvolver um plano de investigação que contempla o estudo do polimorfismo do salbutamol.

#### 1.4 – Iguratimode

Um outro ativo, o iguratimode, faz também parte do plano de investigação desenvolvido nesta tese, sendo efetuada a pesquisa de diferentes formas sólidas, recorrendo aos métodos atrás descritos.

O iguratimode ou T-614 (Figura7), é um API utilizado no tratamento da artrite reumatóide, e com atividade na inibição da produção de citocinas e imunoglobulinas [41]. A molécula de iguratimode é uma metano-sulfonânida e foi sintetizada por Toyama Chemical Co. Ltd em 1980, mas só foi aprovado pela farmacopeia do estado chinês em agosto de 2011, e pela entidade reguladora do Japão em 2012 [42, 43, 44].



**Figura 7** - Estrutura química do iguratimode.

A artrite reumatóide é uma doença auto-imune que provoca a inflamação das articulações, levando à destruição da cartilagem, osso e tendão, e é considerada grave. Com o avanço da ciência, o tratamento da artrite reumatóide mudou drasticamente. Os tratamentos atuais usam medicamentos anti-inflamatórios não esteróides ou medicamentos anti-reumáticos modificadores da doença (DMARDs), uma classe de agentes terapêuticos que tem como potencial a minimização ou impedimento da lesão articular [41, 45, 46].

O íguratimode inibe a ciclooxigenase-2 (cox-2), o que proporciona uma ação sinérgica, de curto prazo, contra a dor e a inflamação, e, pode ainda, suprimir drasticamente



a progressão da doença e proteger, deste modo, as articulações afetadas devido à destruição da cartilagem [47, 44].

O iguratimode é um composto praticamente insolúvel em água, sendo assim necessário o estudo de várias formas polimórficas para ultrapassar essa propriedade crítica. Em 9 de outubro de 2005 foi apresentada uma patente chinesa, tendo sido publicada a 11 de abril de 2007, onde estão mencionadas cinco formas cristalinas do iguratimode [48], todas elas solvatos. Entendemos encetar o desafio de investigar novas formas polimórficas deste ativo.



# Capítulo 2

Materiais e Métodos



## 2.1 – Materiais

Os compostos utilizados estão resumidos na tabela 2, onde consta o fornecedor, peso molecular, ponto de fusão e o grau de pureza.

Foram ainda utilizados diferentes solventes nas experiências de cristalização, realizadas com a finalidade de encontrar novas formas sólidas. Na tabela 3 podemos observar a respectiva origem e grau de pureza. Para além dos solventes mencionados na tabela 3, utilizou-se, ainda, água proveniente de um sistema Millipore, Milli-Q Academic, com resistência específica  $\geq 18 \Omega \text{cm}^{-1}$ .

**Tabela 2** - Origem dos compostos utilizados neste trabalho e informações do fornecedor.

<b>Composto</b>	<b>Origem</b>	<b>M / g.mol<sup>-1</sup></b>	<b>T<sub>fusão</sub> / °C</b>	<b>Pureza / %</b>
<b>Salbutamol</b>	SIGMA	239.31	157-159°C	≥96%
<b>Iguratimode</b>	BOC Sciences	374.368	236-238°C	≥98%

**Tabela 3** - Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.

<b>Solvente</b>	<b>Origem</b>	<b>Pureza / %</b>
<b>Etanol</b>	Panreak	99.8
<b>Metanol</b>	Fluka	99.8
<b>i-propanol</b>	Merck	99.5
<b>Acetona</b>	Lab-scan	99.5
<b>Acetato de Etilo</b>	Romil Chemicals	≥ 99,8
<b>Diclorometano</b>	Merck	99.5
<b>1,4-Dioxano</b>	Lab-scan	99.8
<b>Cloroformio</b>	Fischer Chemical	99.99
<b>THF</b>	Panreak	99.5

## 2.2 – Métodos de preparação

Foi utilizada a cristalização a partir de solventes para o *screening* de polimorfos. Na cristalização em solução, o solvente evaporou lentamente efetuando-se ensaios em temperaturas diferentes. Foram usadas, também, várias técnicas analíticas de forma a identificar/caracterizar as diferentes formas sólidas obtidas: calorimetria diferencial de varrimento (DSC), termomicroscopia (PLTM), espectroscopia de infravermelho – refletância total atenuada (FTIR-ATR) e difracção de raios-X de pó (XRPD).

### 2.2.1 – Cristalização em solventes

A cristalização a partir de solução é o método mais utilizado para a obtenção e purificação de sólidos orgânicos.

Nos ensaios efetuados a cristalização resultou de evaporação lenta do solvente.

Para o salbutamol as amostras foram colocadas em caixas de Petri e deixadas tapadas, em repouso, à temperatura ambiente (temperatura constante do laboratório, de aproximadamente 24°C). A relação do volume de solvente e massa de salbutamol era de aproximadamente de 2 mL para 7 mg.

No caso do iguratimode, algumas amostras foram submetidas a evaporação lenta do solvente quando colocadas em caixas de Petri e deixadas tapadas, em repouso, à temperatura ambiente (temperatura constante do laboratório, de aproximadamente 24°C). Outras amostras foram colocadas em caixas de Petri e submetidas a evaporação lenta do solvente no frigorífico, a uma temperatura de 6°C e outras foram colocadas em fracos num banho seco (incubadora) à temperatura constante de 10°C até a evaporação total do solvente. A relação do volume de solvente e massa de API era de aproximadamente 4ml para 16mg, apenas diferindo na amostra cristalizada do co-solvente etanol:metanol, (3:2 (v/v)), em que se utilizou 4ml de etanol e 6ml de metanol com 20 mg de substância.

Na tabela 4 são referenciadas algumas propriedades dos solventes utilizados nas cristalizações de modo a que seja mais fácil perceber o que os distingue nas interações com os solutos em estudo, e como pode condicionar os sólidos formados na cristalização. As propriedades citadas são a temperatura de ebulição, o momento dipolar, ( $\mu$ ), a

polarizabilidade electrónica, a constante dieléctrica, ( $\epsilon$ ), e os parâmetros de Kamlet e Taft,  $\pi^*$ , parâmetro de polaridade/polarizabilidade, e  $\alpha$  e  $\beta$  relativos à capacidade dos solventes de ativar como dador ou como aceitador em ligações de hidrogénio.

**Tabela 4** - Propriedades dos solventes utilizados nas experiências de cristalização do salbutamol e do iguratimode [49, 50].

Solvente	Tebulição /°C	$\mu$ /D	Polarizabilidade eletrónica /( $10^{-30} \text{ m}^3$ )	$\epsilon^a$	$\alpha$	$\beta$	$\pi^*$
Etanol	78.37	1.66	5.1	24.55	0.86	0.75	0.54
Metanol	64.7	2.87	3.3	32.66	0.98	0.66	0.60
i-propanol	82.6	1.66	7.0	19.92	0.76	0.84	0.48
Acetona	56	2.69	6.4	20.56	0.08	0.48	0.62
Acetato de Etilo	77.1	1.78	8.8	6.02	0.00	0.42	0.49
Diclorometano	39.6	1.14	6.5	8.93	0.13	0.10	0.82
1,4-Dioxano	101	0.45	8.6	2.21	0.00	0.37	0.49
Cloroformio	61.2	1.15	8.5	4.89	0.20	0.10	0.58
THF	66	1.75	7.9	7.58	0.00	0.55	0.55

a)  $T = 298,15\text{K}$

## 2.3 – Métodos de estudo

### 2.3.1 – Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A análise térmica (TA) é um conjunto bem estabelecido de técnicas para obtenção de informação qualitativa e quantitativa sobre as transformações físicas/químicas provocadas num API devido à variação da temperatura [51]. O ciclo de aquecimento/arrefecimento é realizado em condições rigorosamente controladas e pode revelar as mudanças na estrutura e outras propriedades importantes tais como: temperatura de fusão/cristalização, entalpias de transição, capacidade calorífica, massa e coeficiente térmico de expansão. Serve ainda para estudar processos que ocorrem no estado sólido, como a decomposição térmica, transições de fase e para determinar diagramas de fase [52].

A calorimetria diferencial de varrimento é amplamente utilizada para a investigação do comportamento em fase sólida de um API, e para a discriminação de polimorfos [53].

A calorimetria diferencial de varrimento de compensação de potência, regista o fluxo de energia calorífica associado às transições observadas nos materiais em função da

temperatura. A amostra em estudo e a referência são submetidas a um mesmo programa de aquecimento/arrefecimento, rigorosamente controlado, e o diferencial de temperaturas permanece nulo ( $T_{amostra} = T_{ref}$ ). Assim, quando é detetada uma diferença nas temperaturas é adicionada energia térmica ( $\partial H/\partial t$ ) a uma das células, por forma a manter a igualdade de temperatura. São estas diferenças de energia calorífica fornecida que são usadas para o cálculo da variação entálpica. Eventos térmicos observados que resultam numa diferença de temperatura entre a amostra e a referência, podera ser endotérmica (ex: fusão) ou exotérmica (ex: cristalização) [16].

Neste trabalho foi utilizado o calorímetro de potência compensada, Perkin-Elmer DSC7, com refrigeração ajustada a  $-7,8^{\circ}\text{C}$  (*intracooler* com circulação da mistura etilenoglicol/água (1:1) (v/v)). O azoto, utilizado como gás de purga, circulou com um fluxo de 20 mL/min. Algumas amostras, com massa aproximada de 2 mg, foram seladas em cápsulas de alumínio perfuradas de 50  $\mu\text{L}$  e como referência foi utilizada uma cápsula igual, mas vazia. Outras amostras com, aproximadamente, 2 mg foram seladas em cápsulas não perfuradas de 30  $\mu\text{L}$  e foi usada uma referência igual, mas vazia. Os varrimentos efetuados ocorreram a uma velocidade de aquecimento de  $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , sendo que no arrefecimento a velocidade variou, tomando como valores  $\beta = 10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ,  $\beta = 20^{\circ}\text{C min}^{-1}$  e  $\beta = 5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Utilizaram-se vários compostos para a calibração da temperatura e da entalpia.

A tabela 5 mostra os calibrantes usados para a calibração da temperatura. Para a calibração da entalpia utilizou-se o índio  $\Delta_{fus}H = (3286 \pm 13) \text{ J g}^{-1}$ .

**Tabela 5** - Padrões utilizados na calibração em DSC.

Calibrante	$T_{fusão} / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta_{fus}H / \text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
Bifenilo (CRM LGC 2610)	68.7	120.2
Índio (Padrão Perkin-elmer)	156.6	28.5
Estanho (Padrão Perkin- Elmer)	231.9	59.5

### 2.3.2 – Termomicroscopia

A termomicroscopia (PLTM) é um método de grande utilidade na medida que complementa a informação obtida por calorimetria diferencial de varrimento. É uma técnica analítica que combina as melhores propriedades de microscopia e da análise térmica, para



permitir a caracterização de materiais em estado sólido em função da temperatura. Os estudos de APIs no estado sólido são essenciais para uma caracterização completa de produtos farmacêuticos. A estrutura do estado sólido de um API não só influencia diretamente o próprio processo de fabrico, mas, também, pode perturbar a estabilidade e a velocidade de dissolução do medicamento, o que leva a alterações da qualidade, da segurança e da eficácia do mesmo.

Historicamente, o microscópio era usado apenas para obter informação básica acerca da morfologia do API. No entanto, a introdução de programas de ciclos de aquecimento e arrefecimento durante a análise, permitiu observar fenómenos, tais como, a dessolvatação, transições de fase sólido-sólido, a fusão e a decomposição por exemplo [54].

Deste modo, os sólidos obtidos foram caracterizados por PLTM utilizando uma placa de aquecimento Linkam, modelo DSC600, com um bloco central, constituído por uma unidade CI94, cuja função é controlar a temperatura nas etapas de aquecimento/arrefecimento, uma unidade LNP94/2 que controla a refrigeração, uma unidade VTO232 e um computador, que controla todo o sistema. A temperatura do forno é controlada por sensores de Pt100. É ainda utilizado, para observação ótica, um microscópio Leica DMRB, uma câmara de vídeo Sony CCD-IRIS/RB de modelo DXC-151 AP, um monitor Sony HR Trinitron modelo PVM-2053MD e um DVDR 520H/00. Na análise de imagem utilizou-se o *software* da Linkam systems com RTVMS (sistema de medição em tempo real). As imagens foram obtidas por utilização combinada de luz polarizada e de compensadores, o que confere à imagem de fundo uma cor única e não negra, utilizando ampliação de 200X.

Os ensaios foram realizados à velocidade de 10°C/min.

### **2.3.3 – Espectroscopia de Infravermelho**

A espectroscopia de infravermelho é uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas na indústria farmacêutica para a caracterização do estado sólido [55].

Neste método, as transições vibracionais desde o estado fundamental e, normalmente, até o primeiro estado vibracional excitado ocorrem com a absorção de radiação, pelos compostos, na região do infravermelho do espectro. Observar-se-á uma banda no espectro se o modo vibracional resultar em mudança do momento dipolar. Cada molécula possui um espectro de absorção único. Pela posição e intensidade das bandas no espectro de infravermelho, esta técnica dá-nos informações sobre a estrutura e a conformação molecular adotada no estado sólido [56].

O método de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) permite-nos adquirir espectros de grande qualidade o que aumenta a relação sinal-ruído. Este método faz uso de todas as frequências em simultâneo (em vez de sequencialmente, como acontece nos métodos de varrimento) o que leva a uma diminuição do tempo de aquisição do espectro [55].

A técnica de espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada (ATR) tem vantagens, relativamente a métodos de transmissão usando pastilhas de KBR, na caracterização do estado sólido. Nesta técnica a amostra é colocada em contacto com um elemento refletor de diamante, por exemplo, de elevado índice de reflexão. O feixe de infravermelho é dirigido através do refletor, penetrando a superfície da amostra, obtendo, assim, a informação espectral da superfície.

Uma das vantagens desta técnica é a ausência de preparação prévia da amostra, sendo a mesma colocada diretamente no elemento refletor de diamante. O único cuidado a ter é garantir a limpeza do mesmo entre as várias amostras a estudar [57].

Os espectros dos sólidos foram registados à temperatura ambiente num ThermoNicolet FT-IR 380, com resolução de  $1\text{cm}^{-1}$ , entre os comprimentos de onda de  $4000$  a  $400\text{cm}^{-1}$ . Foi usado um acessório ATR SmartOrbit, modelo ATR Diamond, para o trabalho experimental em curso.

#### **2.3.4 – Difração de raios-X de pó (PXRD)**

A técnica de difração de raios-X (XRD), mostra as diferenças na estrutura cristalina e é uma das principais técnicas para a caracterização microestrutural. A difração de raios-X pode ser dividida nos métodos de policristais (pó) e no método de monocristal [58, 59].

Os métodos acima referidos, envolvem a difração de raios-X de um único comprimento de onda pelos planos do sólido cristalino. O fenómeno de difração está diretamente relacionado com a distância que separa os planos de um cristal, obedecendo à lei de Bragg,  $n\lambda = 2d \sin \theta$ , onde  $n$  é a ordem de reflexão,  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios-X,  $d$  é o espaço interplanar num cristal e  $\theta$  é o ângulo de incidência dos raios-X. Esta equação descreve a difração de feixes de raios-X monocromáticos que colidem num plano de átomos (do material cristalino) [55, 53]. Quando um feixe de raios-X incide sobre um cristal constituído por planos atômicos sucessivos, é difratado, gerando um padrão característico de interferências construtivas e destrutivas. Os planos de difração e as respetivas distâncias interplanares, bem como a densidade dos átomos ou dos eletrões ao

longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada cristal, da mesma forma que é único o padrão de difração gerado [60].

A difração de raios-X de pó (PXRD) é muito utilizada na identificação qualitativa de fases ou de misturas de fases e é uma das técnicas mais importantes para a caracterização e quantificação de polimorfos.

As experiências de difração de raios-X de pó foram realizadas num difractómetro INEL CPS ( $\lambda_{\text{CuK}\alpha 1} = 1,54056\text{\AA}$ ) equipado com um detetor sensível a uma posição de curvatura de  $120^\circ$ . As amostras foram colocadas em capilar de vidro ( $\varnothing = 0,3\text{ mm}$ ), sob rotação, de modo a garantir uma correta intensidade relativa das reflexões, e ausência de orientação preferencial, sendo a recolha de dados efetuada por períodos que podem exceder as 24h. Na preparação de algumas amostras, colocou-se o material no exterior do capilar, envolto em vaselina, a fim de ultrapassar a dificuldade de enchimento do capilar.



# **Capítulo 3**

Resultados e Discussão

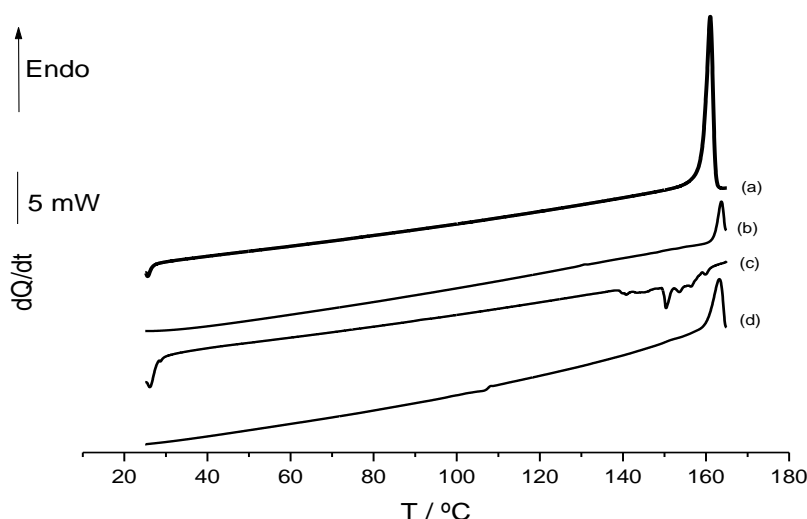


### 3.1 – Salbutamol

#### 3.1.1 – Estudo sobre a amostra de partida

A investigação do salbutamol base iniciou-se pela realização de ciclos de aquecimento e arrefecimento por calorimetria diferencial de varrimento, sobre o composto comercial adquirido à Sigma-Aldrich, cuja estrutura está representada na figura 5.

Observa-se, por PLTM, que após o primeiro aquecimento o composto sofre degradação, razão pela qual todos os ensaios posteriores foram realizados até à temperatura de fusão.



**Figura 8** - Curvas de DSC de salbutamol comercial, (a) primeiro aquecimento de 25°C até 165°C, (b) primeiro arrefecimento de 165°C até 25°C, (c) segundo aquecimento de 25°C até 165°C, (d) segundo arrefecimento de 25°C até 165°C;  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

Após o primeiro aquecimento o composto foi arrefecido, curva b, observando-se que o composto não cristaliza, sendo que o comportamento no segundo aquecimento, curva c, sugere a degradação do mesmo, o que se confirma posteriormente, por termomicroscopia, obtendo-se um líquido de cor amarela a partir dos 165°C. Assim, uma vez definidas as condições limite, as amostras foram sujeitas a aquecimento até 165°C.

A Tabela 6 mostra os valores da  $T_{\text{fusão}}$  obtidas para quatro ensaios independentes realizados sobre a amostra comercial ( $n=4$ ).  $T_{\text{fusão}}=(159.1\pm 0.4)^\circ\text{C}$ .

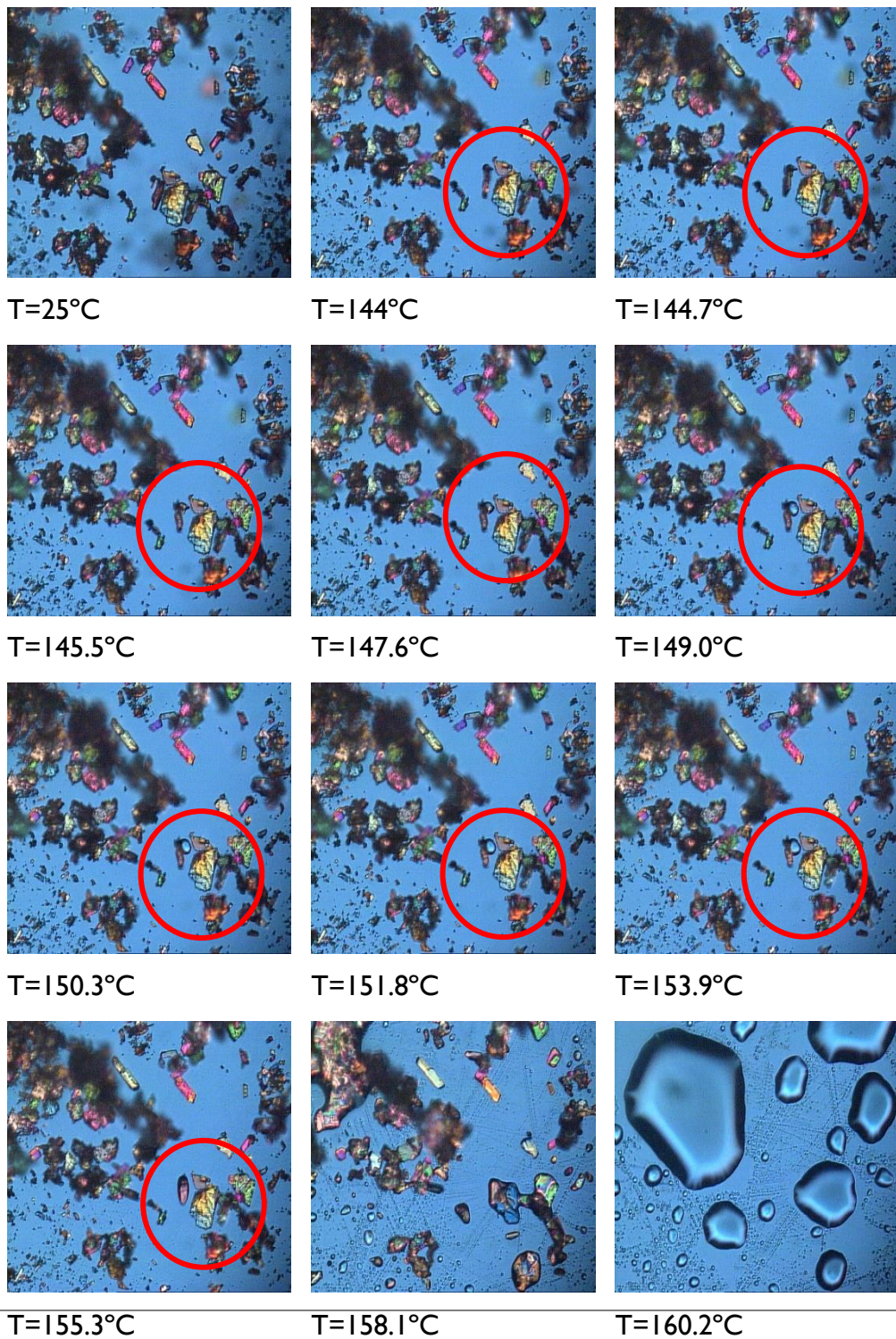
**Tabela 6** - Temperatura de fusão ( $T_{\text{onset}}$ ) para quatro amostras de salbutamol comercial ( $n=4$ ), sujeitas a aquecimento à velocidade  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

<b>Amostra</b>	<b>Massa / mg</b>	<b>Evento</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> / <math>^{\circ}\text{C}</math></b>
<b>1</b>	1.77	Aquecimento - $25^{\circ}\text{C}$ até $165^{\circ}\text{C}$ , $ \beta =10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	159.1
<b>2</b>	2.16	Aquecimento - $25^{\circ}\text{C}$ até $165^{\circ}\text{C}$ , $ \beta =10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	159.0
<b>3</b>	1.37	Aquecimento - $25^{\circ}\text{C}$ até $165^{\circ}\text{C}$ , $ \beta =10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	159.7
<b>4</b>	1.32	Aquecimento - $25^{\circ}\text{C}$ até $165^{\circ}\text{C}$ , $ \beta =10^{\circ}\text{C}/\text{min}$	158.9
			$159.2 \pm 0.4$

Utilizou-se a técnica de PLTM, sujeitando a amostra apenas a aquecimento até  $165^{\circ}\text{C}$ , com o objetivo de visualizar a fusão do composto e detetar a existência de eventuais transformações durante o aquecimento, até à fusão. As imagens obtidas num destes ensaios estão reunidas na Figura 9. O composto de partida é de natureza policristalina, com partículas de dimensões reduzidas e heterogéneas.

O ensaio mostra que a cerca de  $144^{\circ}\text{C}$  se inicia a fusão de um pequeno cristal, mantendo-se todos os outros inalterados até à temperatura  $T=155^{\circ}\text{C}$ . O líquido, resultante da fusão do cristal recristaliza e a  $158^{\circ}\text{C}$  inicia-se a fusão de toda a amostra. A fusão está completa a  $160^{\circ}\text{C}$ .

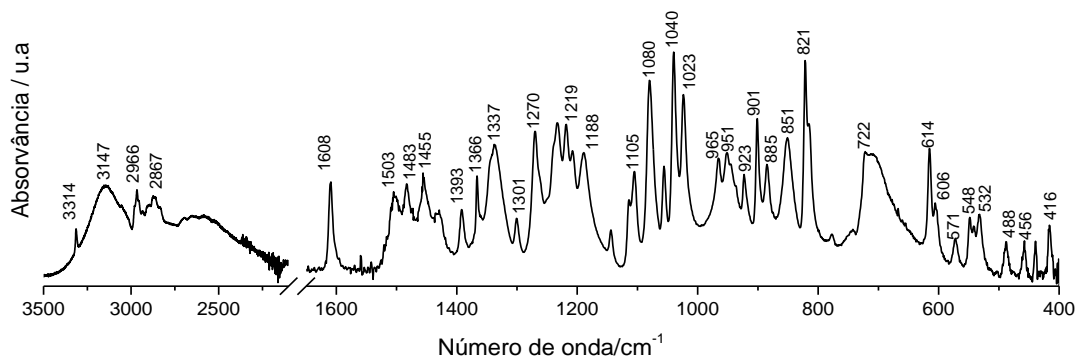




**Figura 9** - Imagens de PLTM obtidas no aquecimento de salbutamol comercial entre 25°C e 165°C,  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

A fusão precoce do cristal a cerca de 144°C, seguida de recristalização e fusão concomitante com o restante material, indica a presença de uma outra forma polimórfica na amostra, Não foi possível, no entanto, isolar esta forma.

Na figura 10 apresenta-se o espectro de infravermelho do composto de partida, salbutamol.



**Figura 10** - Espectro de FTIR-ATR do salbutamol comercial.

O espectro de infravermelho de salbutamol, figura 10, foi dividido em três regiões. Na região entre 3500-2200  $\text{cm}^{-1}$  merecem destaque as bandas com máximos a 3314  $\text{cm}^{-1}$ , 3147  $\text{cm}^{-1}$ , 2966  $\text{cm}^{-1}$  e 2867  $\text{cm}^{-1}$ . Na região entre 1800-1100  $\text{cm}^{-1}$  são evidentes máximos a 1608, 1503, 1483, 1455, 1393, 1366, 1337, 1301, 1270, 1219, 1188, e 1105  $\text{cm}^{-1}$ . Na região entre 1100-400  $\text{cm}^{-1}$  observam-se bandas centradas em 1080, 1040, 1023, 965, 951, 923, 901, 885, 851, 821, 722, 614, 606, 571, 548, 532, 488, 456 e 416  $\text{cm}^{-1}$ .

Na tabela que se segue foram atribuídas algumas bandas com base na atribuição feita para o espectro de infravermelho do hemissulfato do salbutamol [61].

**Tabela 7** - Proposta de atribuição de algumas bandas observadas no espectro de infravermelho do salbutamol comercial.

IR experimental / $\text{cm}^{-1}$	IR [61] / $\text{cm}^{-1}$	Modo vibracional proposto
3314	3474	$\nu(\text{OH})$
3147	3162	$\nu[62]$
2966	2982	$\nu(\text{CH}_3)$
2867	2954	$\nu(\text{CH}_3)$
1608	1616	Vibração do anel fenilo (C=C)
1503	1507	$\delta(\text{CH}_2)$
1483	1468	$\delta(\text{CH}_2\text{-N})$
1395 - 1366	1386 - 1362	$\delta(\text{CH}_2)$ $\delta(\text{CHOH})$
1188	1126	$\delta(\text{COH})$ and $\delta(\text{CH}_2\text{OH})$

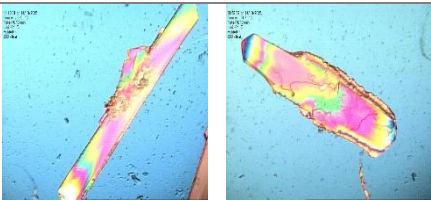
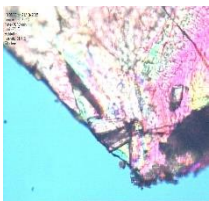
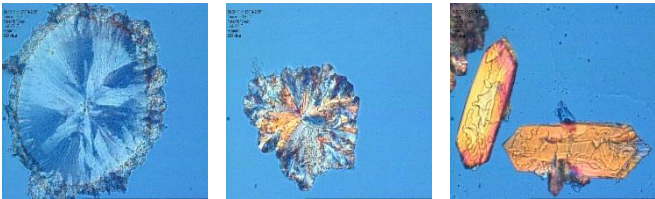
### 3.1.2 – Screening de novas formas sólidas por cristalização a partir de solventes

Foram efetuados vários ensaios de cristalização utilizando vários solventes com o objetivo de gerar novas formas sólidas de salbutamol. Os solventes utilizados estão referidos na Tabela 4.

Desta forma, esperava-se que o salbutamol cristalizasse no seio da solução em diferentes arranjos moleculares, e com isto, poderíamos obter novas formas polimórficas ou solvatos.

Após evaporação do solvente, os sólidos resultantes foram analisados. Numa primeira fase, foram observados em microscópio sob luz polarizada, onde foram fotografados os vários hábitos cristalinos, tabela 8 e, posteriormente, foram feitas análises por espectroscopia de Infravermelho (FTIR-ATR).

**Tabela 8** - Morfologia dos sólidos obtidos nos processos de cristalização do salbutamol em vários solventes.

<b>Solvente</b>	<b>Imagem*</b>	<b>Hábito Cristalino</b>
<b>Etanol</b>		<b>Prismas</b>
<b>Metanol</b>		<b>Placas</b>
<b>iso-propanol</b>		<b>Esferulites + Prismas</b>

<b>Acetona</b>		Placas + Aglomerado de prismas
<b>Diclorometano</b>		Prismas + Acículas
<b>1,4- Dioxano</b>		Amorfo, não cristalizou

\*Observação sob luz polarizada; ampliação: 200X;

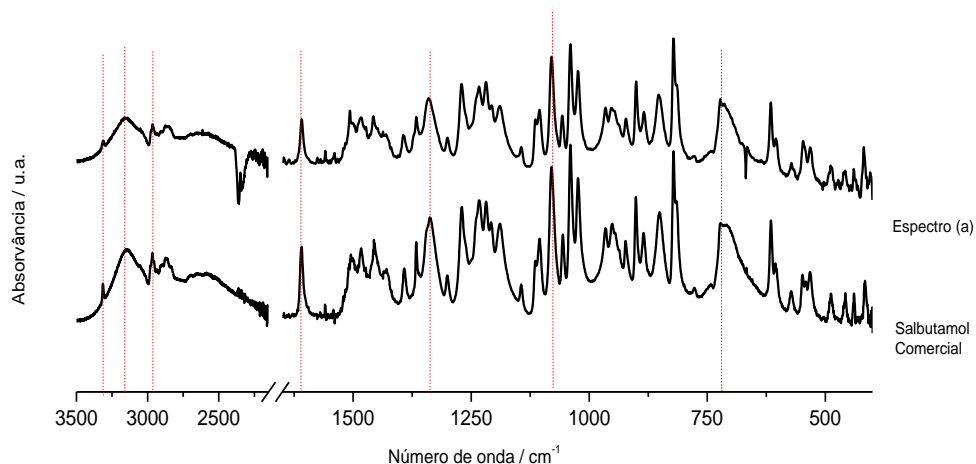
Os sólidos obtidos de diferentes solventes apresentam hábitos cristalinos distintos. Os hábitos mais comuns são os prismas e as acículas, no entanto observam-se esferulites que apresentam forma típica constituída por uma fase de baixa cristalinidade (sólidos obtidos em *iso*-propanol).

Os espectros de infravermelho dos sólidos obtidos foram analisados em dois grupos, segundo as características dos solventes. Os solventes utilizados podem ser caracterizados como polares apróticos, polares próticos e apolares. Solventes polares próticos contêm átomos de hidrogénio ligados a elementos eletronegativos (F-H, -O-H, -N-H, etc.) e são, portanto, dadores de protão útil para o estabelecimento de ligações de hidrogénio. Solventes polares apróticos não são dadores de protão, mas possuem alta permitividade relativa e, maiores valores de momento dipolar. Apesar de não estabelecerem interações por ligação de hidrogénio, pois as suas ligações C-H não são suficientemente polarizadas, eles são geralmente dadores de pares de eletrões [63].

Assim, foram agrupados os espectros dos sólidos obtidos em metanol, etanol e *iso*-propanol, solventes polares próticos, no grupo I, representando-se apenas um espectro, uma vez que os espectros dos sólidos obtidos nesses solventes são iguais. Noutra análise foram agrupados os espectros dos sólidos obtidos em acetona e em diclorometano, solvente polar aprótico e apolar, grupo II, apresentando-se um espectro representativo dos mesmos, visto apresentarem muitas semelhanças entre si.

Foi comparado o espectro de infravermelho do salbutamol comercial com o espectro do sólido obtido nos solventes do grupo I, figura I I.

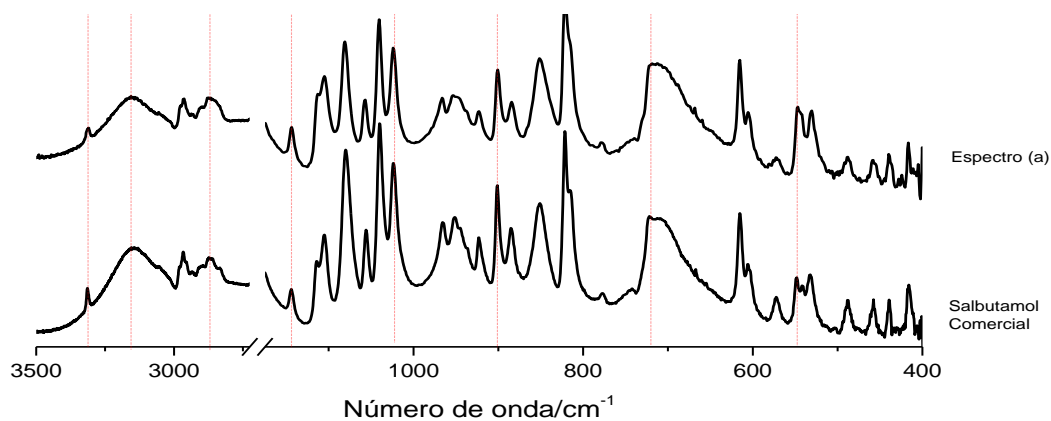




**Figura 11** - Espectros de FTIR-ATR do salbutamol comercial e espectro representativo dos sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo I.

Da análise dos espectros de infravermelho podemos concluir que as diferenças entre eles são mínimas ou mesmo nulas. Os espectros dos sólidos cristalinos obtidos a partir dos solventes do grupo I não nos permitem confirmar a presença de uma nova fase.

De igual forma, comparámos o espectro de FTIR-ATR do salbutamol de partida com o espectro dos sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo II, figura 12.



**Figura 12** - Espectros de FTIR-ATR do salbutamol comercial; a) sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo II.

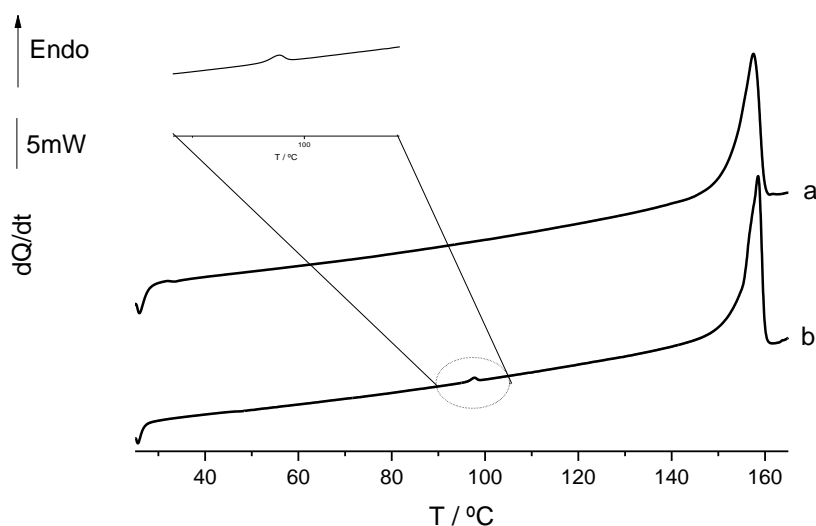
Da análise dos espectros da figura 12, concluímos que os espectros são idênticos, não apresentando diferenças significativas.

Foram, ainda, realizados estudos preliminares por análise térmica dos diferentes sólidos obtidos por cristalização, por evaporação lenta do solvente, de forma a compreender o seu comportamento ao nível de transformações/transições de fase. Utilizaram-se dois métodos de análise térmica – DSC e PLTM.

Nas figuras 13 e 14 apresentam-se as curvas de DSC de aquecimento, dos sólidos obtidos nas condições anteriores, e nas figuras 15, 16 e 17 as imagens registadas por PLTM, também, durante o aquecimento.

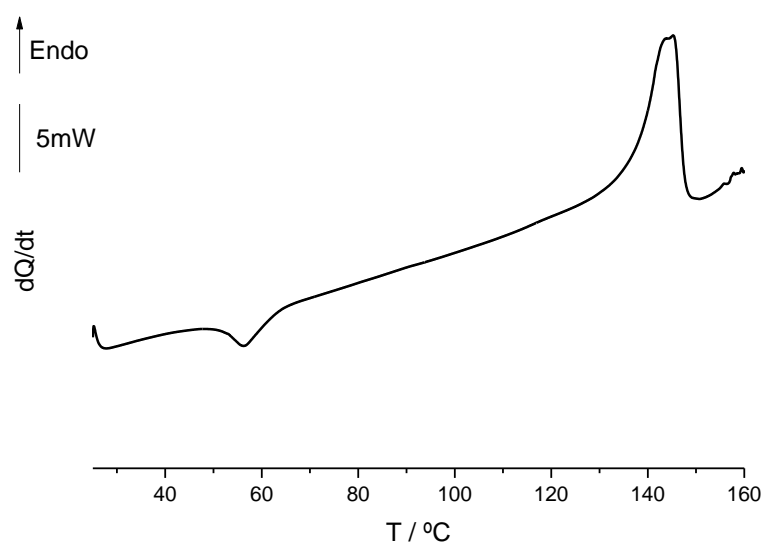
Para o sólido cristalizado por evaporação lenta de metanol observamos que a curva de aquecimento de DSC revela um único pico endotérmico a  $T_{\text{onset}} = 152.4^{\circ}\text{C}$ .

No sólido cristalizado por evaporação lenta de etanol (fig 13b), é observada uma transição a  $T_{\text{onset}} = 96.4^{\circ}\text{C}$  e a fusão a  $T_{\text{onset}} = 158.5^{\circ}\text{C}$ . O perfil do pico de fusão indica-nos que poderá haver uma fusão prévia, de outra forma cristalina, a uma temperatura muito próxima da registada.



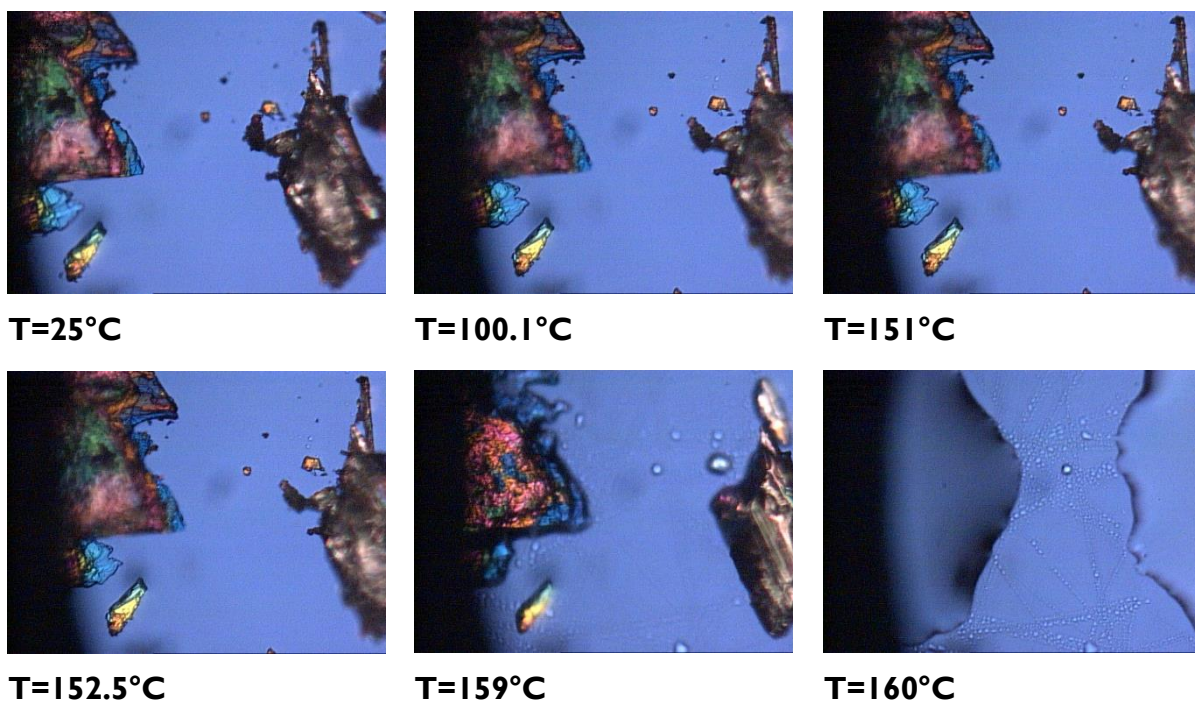
**Figura 13** - Salbutamol e curvas de DSC dos sólidos obtidos por evaporação lenta de a) metanol e b) etanol, aquecimento de  $25^{\circ}\text{C}$  até  $165^{\circ}\text{C}$ ;  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

Para o sólido cristalizado de *iso*-propanol (Figura 14) observamos um comportamento diferente da curva de aquecimento. A cerca de  $51^{\circ}\text{C}$  surge um evento exotérmico que poderá corresponder a uma cristalização, que é comprovada mais à frente pelas imagens de PLTM obtidas para a mesma amostra. A  $T_{\text{onset}} = 138.3^{\circ}\text{C}$  é observado um pico endotérmico correspondente à fusão. O pico mostra um perfil que nos leva a concluir que houve a fusão de duas formas polimórficas com temperaturas muito próximas.



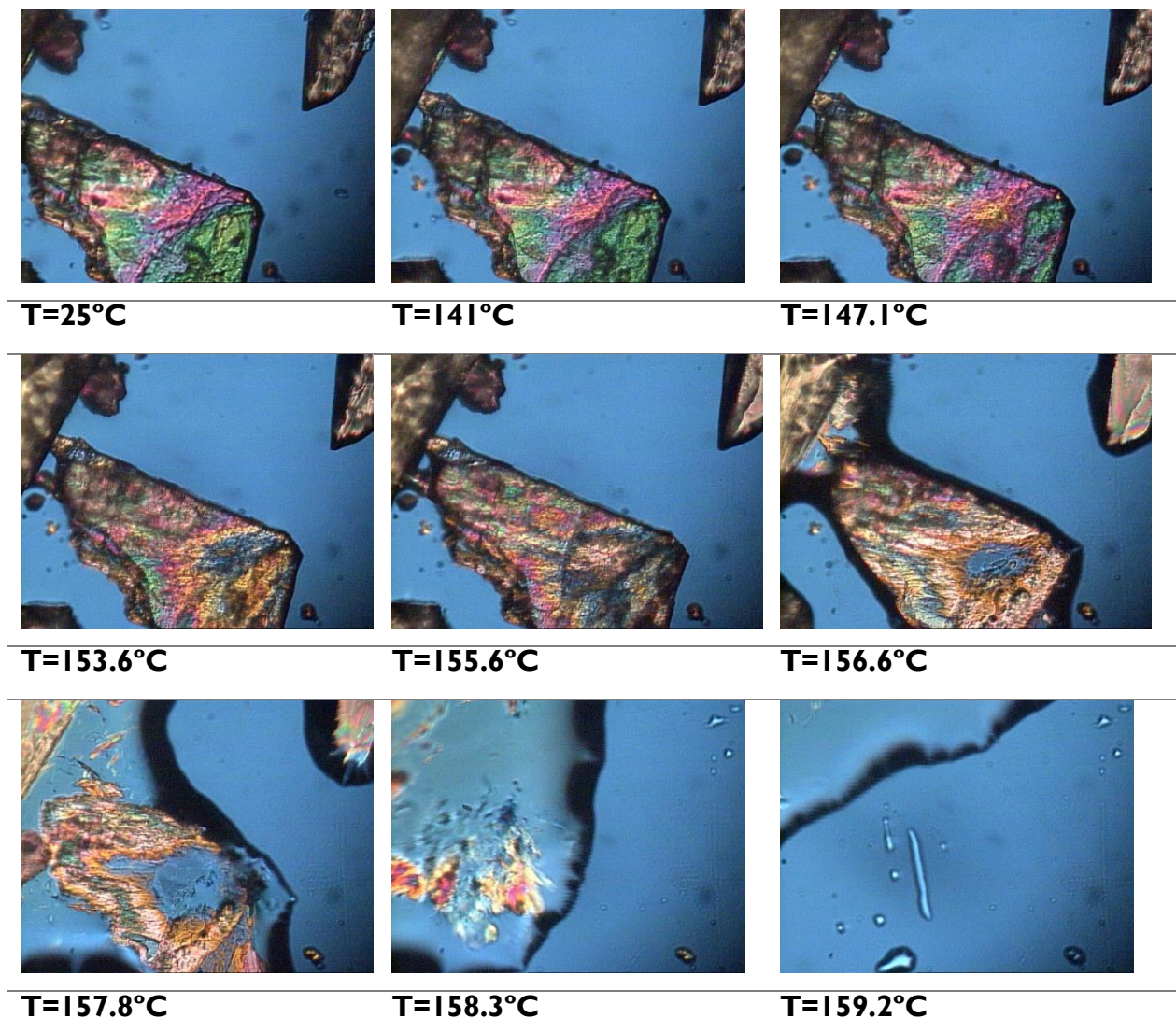
**Figura 14** - Curvas de DSC do sólido cristalino do salbutamol em i-propanol. Aquecimento de 25°C até 165°C;  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

As imagens de PLTM obtidas para o sólido cristalizado de etanol revelam o início da fusão a  $T=159^\circ\text{C}$ . Não foi observada pelas imagens qualquer transição a cerca de  $96^\circ\text{C}$ .



**Figura 15** - Imagens de PLTM do aquecimento, num intervalo entre 25°C e 165°C, de salbutamol cristalizado de etanol,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

Da análise do sólido cristalizado em metanol, por PLTM, (Figura 16), é possível observar uma mudança de cor no cristal por volta dos 142°C, o que poderá indicar uma transformação sólido-sólido. O sólido funde posteriormente, à temperatura de 155°C, o que não corresponde à temperatura de fusão do composto comercial [ $T_{\text{fus}} = (159.2 \pm 0.4) ^\circ\text{C}$ ].

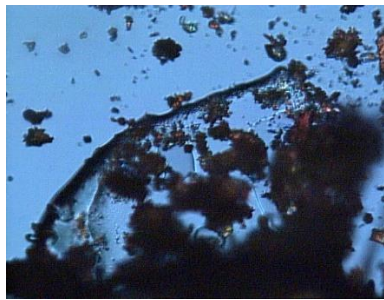


**Figura 16** - Imagens de PLTM do aquecimento, num intervalo entre 25°C e 165°C, de salbutamol cristalizado em metanol,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

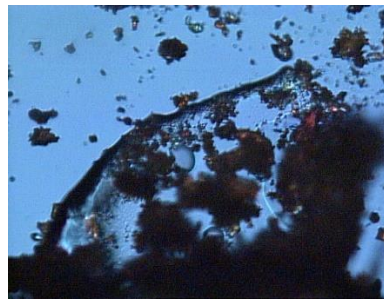
Por outro lado, o sólido cristalizado de *iso*-propanol, quando observado por PLTM, (Figura 17), revela a presença de uma fase vítrea/amorfa e de uma fase cristalina. No aquecimento observámos que, por volta dos 42°C inicia-se a cristalização de uma fase, também observada na curva de DSC da figura 14. A cristalização termina por volta dos 100°C, e a amostra começa a fundir aos 147.5°C e termina aos 155°C. O valor da temperatura de fusão observada é muito abaixo da temperatura registada para a fusão do



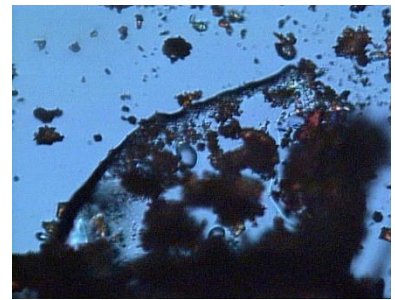
salbutamol comercial, o que indica que podemos estar na presença de uma outra forma polimórfica.



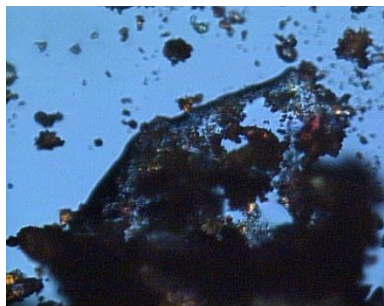
**T=25°C**



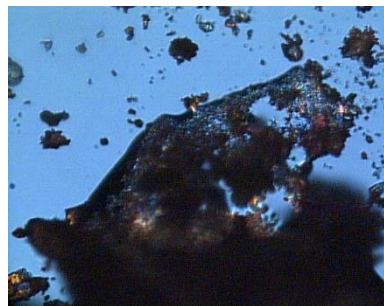
**T=38.1°C**



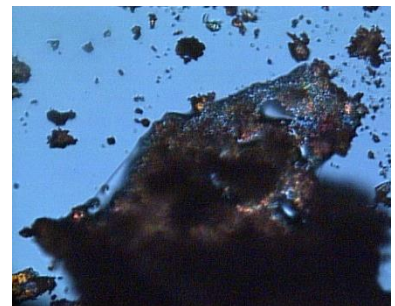
**T=41.6°C**



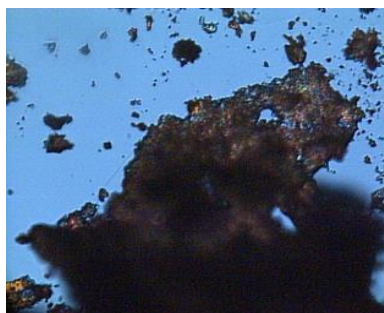
**T=62.3°C**



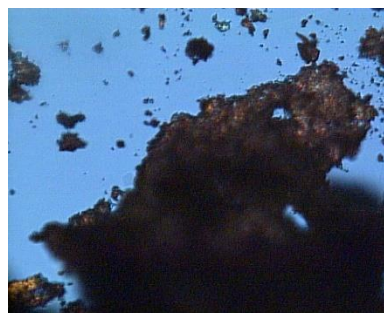
**T=74.1°C**



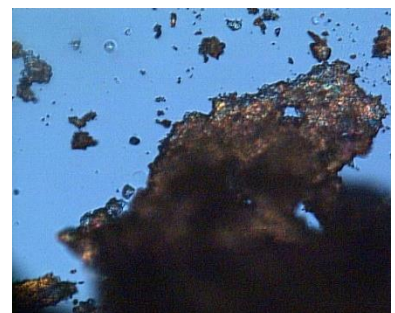
**T=82.8°C**



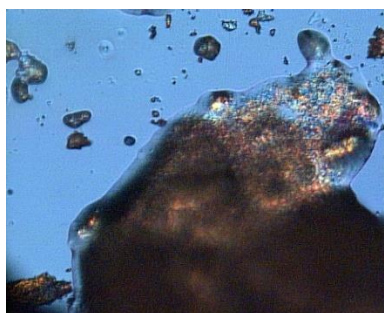
**T=90.2°C**



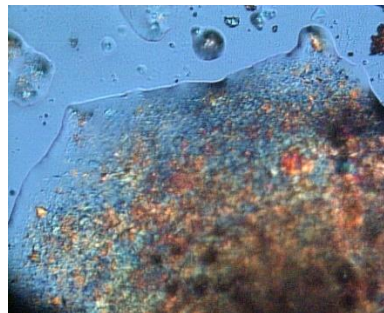
**T=145.2°C**



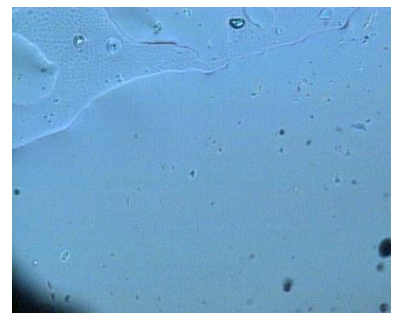
**T=147.5°C**



**T=150.4°C**



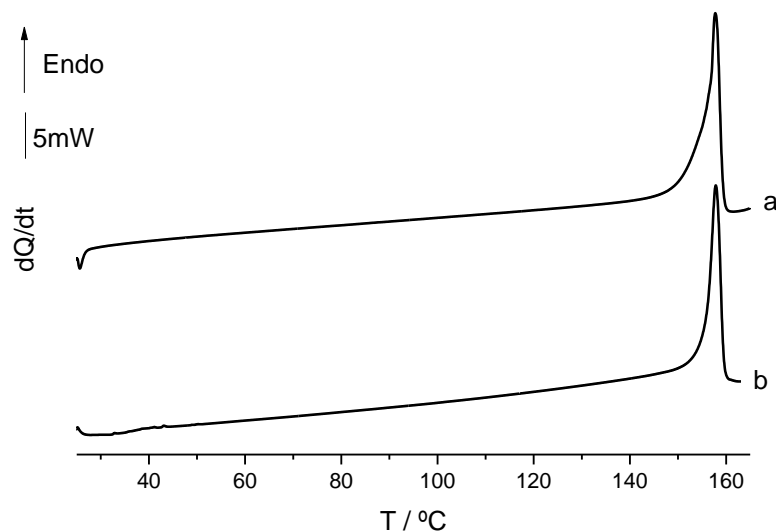
**T=151.8°C**



**T=164.3°C**

**Figura 17** - Imagens de PLTM, do aquecimento num intervalo entre 25°C e 165°C de salbutamol cristalizado em iso-propanol,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

A figura 18 mostra as curvas de DSC relativas ao aquecimento do salbutamol cristalizado de acetona e de diclorometano.

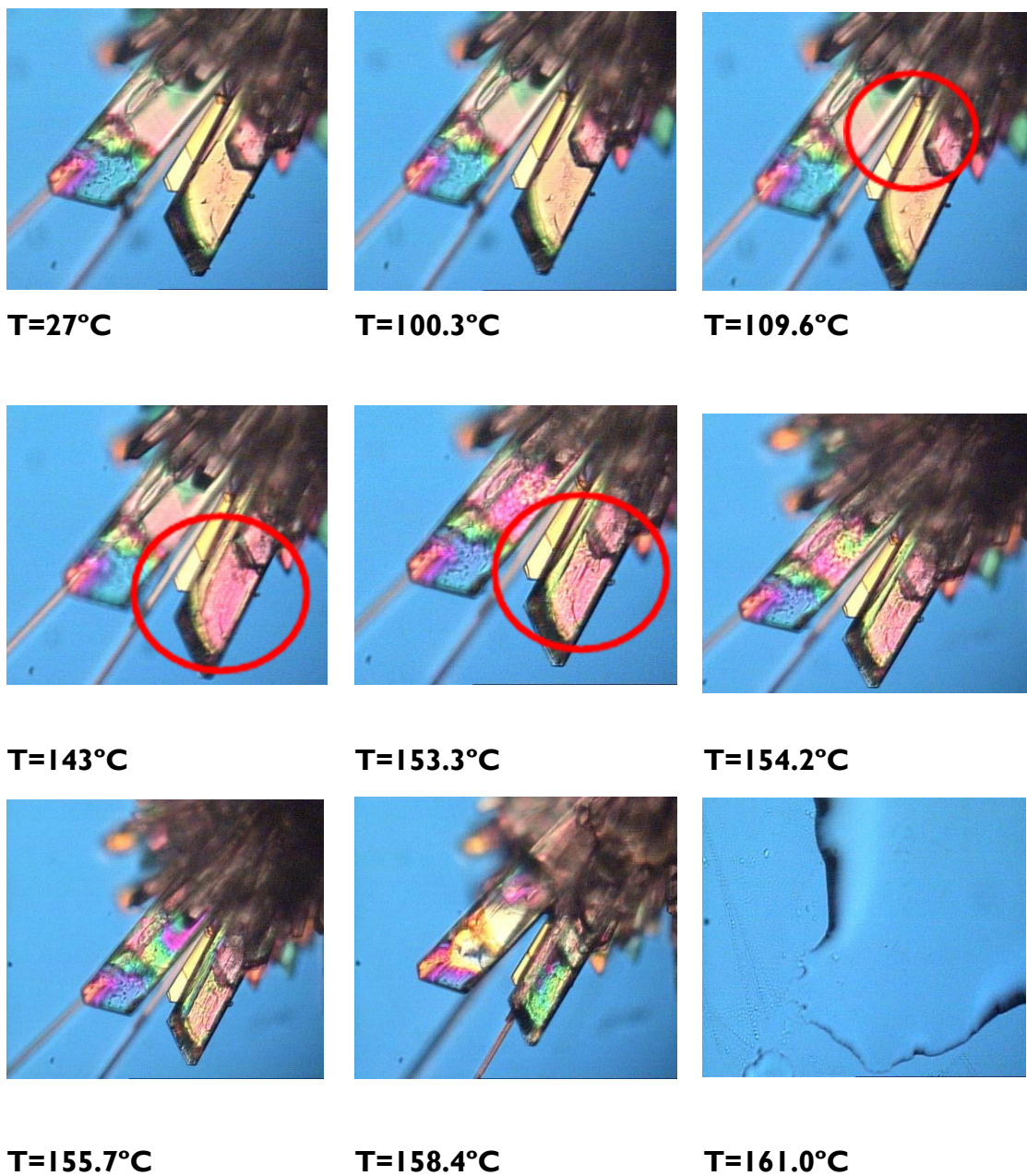


**Figura 18** - Curvas de DSC do salbutamol cristalizado de a) acetona e b) diclorometano. Aquecimento de 25°C até 165°C;  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

O estudo, do salbutamol cristalizado de acetona, por DSC, revela que a curva de aquecimento apresenta um pico endotérmico com  $T_{\text{onset}}=155^\circ\text{C}$ . O perfil do pico indica-nos a presença de uma forma que funde a uma temperatura próxima daquela.

Para o salbutamol cristalizado em diclorometano a curva de DSC de aquecimento revela um pico endotérmico com  $T_{\text{onset}}=156^\circ\text{C}$ .

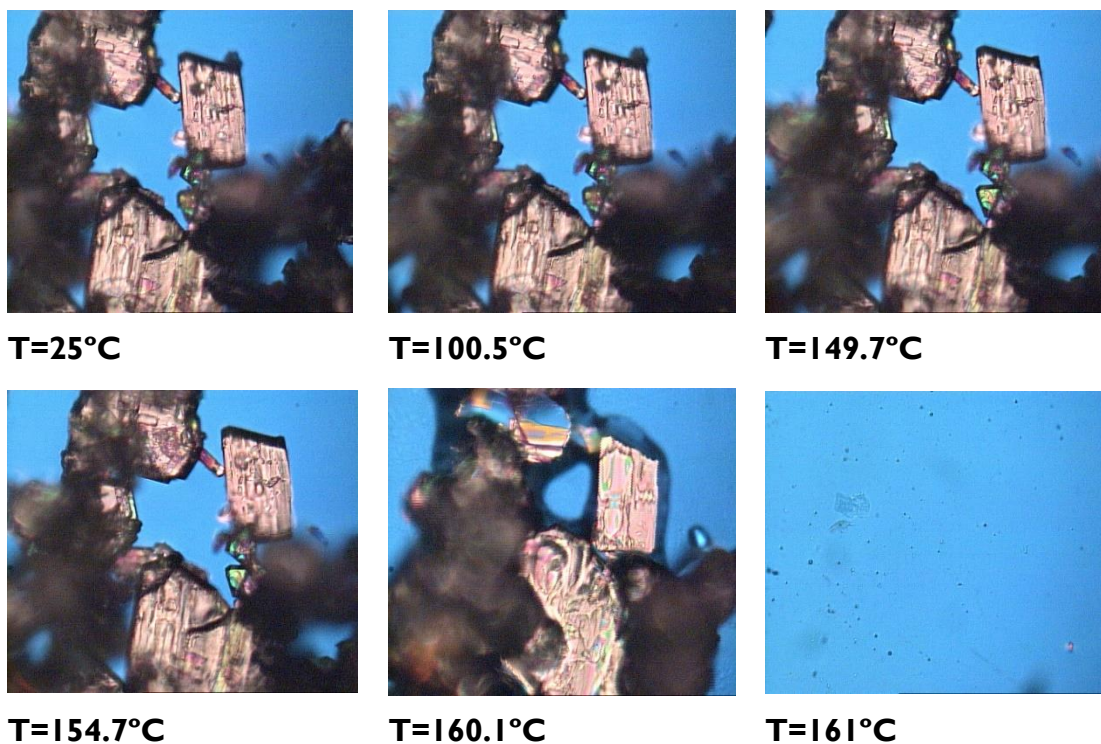
A análise das imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização em acetona, figura 19, revela um alastramento da cor rosa num dos cristais por volta dos  $109.6^\circ\text{C}$ . Esta mudança da cor decorreu até à temperatura de cerca de  $143^\circ\text{C}$  o que poderá indicar uma transformação sólido-sólido. O sólido funde, posteriormente, à temperatura de  $158.4^\circ\text{C}$ .



**Figura 19** - Imagens de PLTM, do aquecimento num intervalo entre 27°C e 165°C, de salbutamol cristalizado em acetona,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

O salbutamol cristalizado em diclorometano foi analisado também por PLTM, figura 20. Observámos a fusão que se inicia a cerca dos 155°C, e que se completa até 161°C.



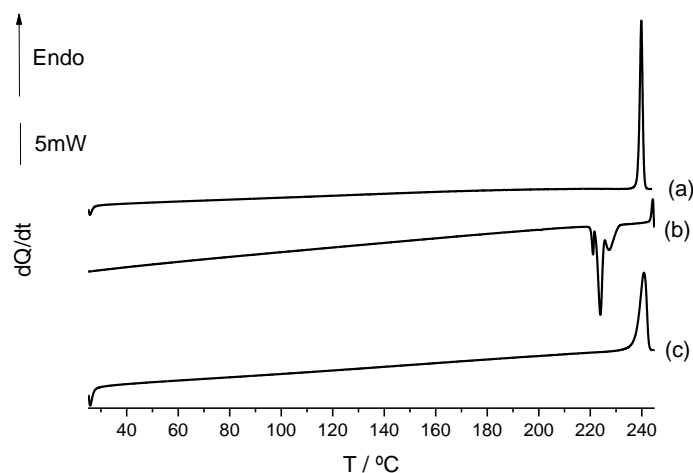


**Figura 20** - Imagens de PLTM, do aquecimento num intervalo entre 25°C e 165°C, de salbutamol cristalizado em diclorometano,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

## 3.2 – Iguratimode

### 3.2.1 – Estudo sobre a amostra de partida

A investigação do iguratimode iniciou-se pela realização de ciclos de aquecimento/arrefecimento por calorimetria diferencial de varrimento, sobre o composto de partida, figura 21.



**Figura 21** - Curvas de DSC do iguratimode, a) primeiro aquecimento de 25°C até 245°C; b) primeiro arrefecimento de 245°C até 25°C, c) segundo aquecimento de 25°C até 245°C;  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula de 30 $\mu\text{L}$  fechada.

No primeiro aquecimento observa-se, apenas, um pico endotérmico relativo à fusão,  $T_{\text{fusão}} = (238 \pm 0.7)^\circ\text{C}$ . Foram realizados vários ensaios para o composto de partida, registrando-se os valores de temperatura e de entalpia na tabela 9 para os diferentes eventos térmicos observados nas curvas de aquecimento e nas curvas de arrefecimento.

**Tabela 9** - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do iguratimode comercial ( $n=6$ ).

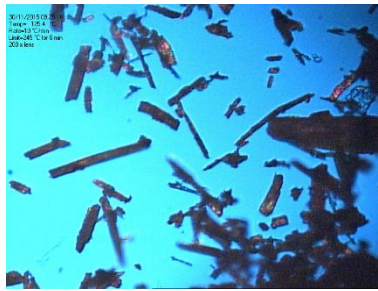
Amostra	Massa / mg	Curva de aquecimento $T_i=25^\circ\text{C}$ , $T_f=245^\circ\text{C}$ , $ \beta =10^\circ\text{C}/\text{min}$		Curva de arrefecimento $T_i=245^\circ\text{C}$ , $T_f=25^\circ\text{C}$ , $ \beta =10^\circ\text{C}/\text{min}$	
		$T_{\text{fusão}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{fusão}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T_{\text{cristalização}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{crist}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
I	2.09	238.2	37.9	229.8	-37.06
II	2.18	239.0	39.2	225.3	-39.0
III	2.06	238.0	39.5	228.0	-35.2
IV	2.03	239.6	41.0	231.9	-39.7
V	2.02	238.0	40.6	228.2	-39.4
VI	1.37	239.3	36.1	228.1	-32.33
		$238.7 \pm 0.7$	$39.9 \pm 1.8$	$228.5 \pm 2.2$	$-37.1 \pm 2.9$

A cristalização ocorre num intervalo de temperatura entre  $210\text{-}230^\circ\text{C}$ . Uma outra amostra foi sujeita a análise por DSC variando a velocidade de arrefecimento, para o valor de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ . Não foi observada alteração no padrão de comportamento da amostra comercial de iguratimode.

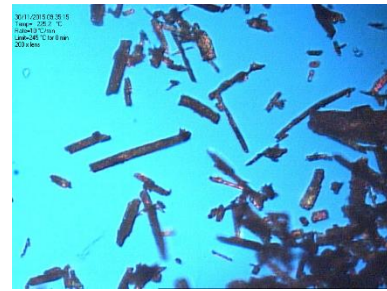
Com o objetivo de visualizar a fusão do composto e a sua cristalização no arrefecimento, bem como eventual existência de transições de fase antes da fusão, sujeitou-se uma amostra de iguratimode a estudos de PLTM, (vide Figura 22 e 23).



**T=25°C**



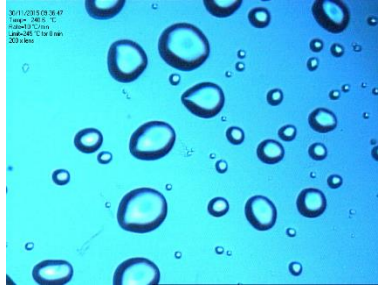
**T=125°C**



**T=225°C**

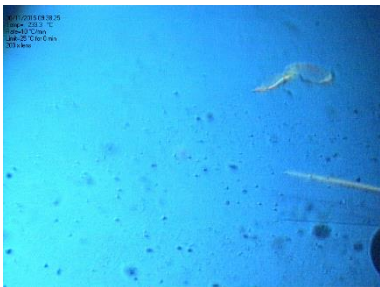


**T=238°C**

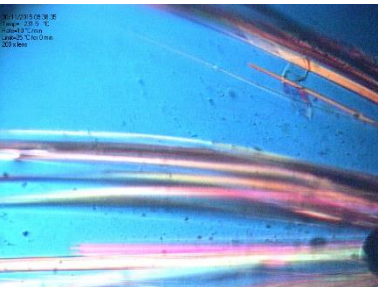


**T=241°C**

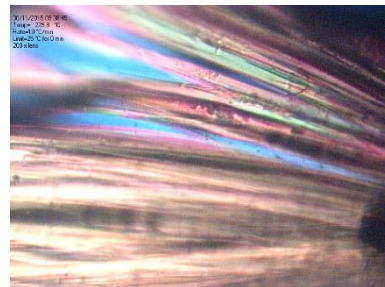
**Figura 22** - Imagens de PLTM do aquecimento num intervalo entre 25°C e 245°C de iguratimode comercial,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.



**T=233°C**



**T=231°C**



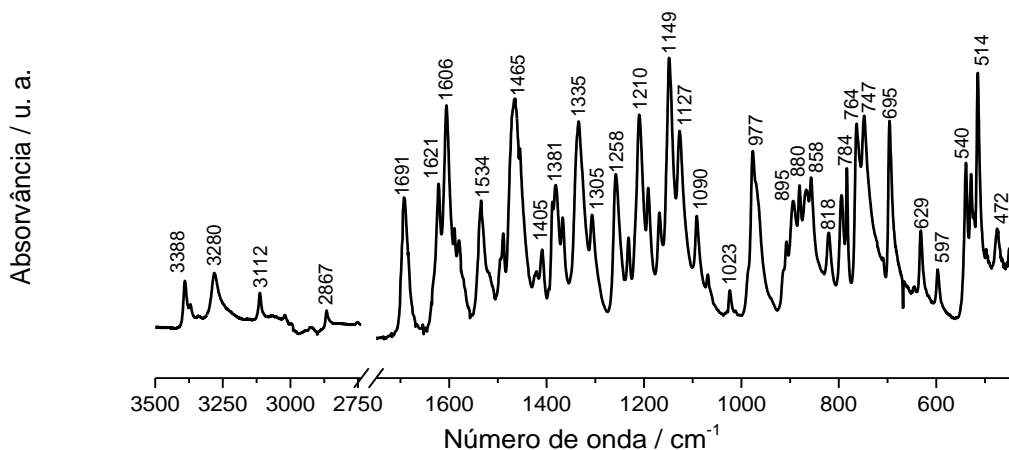
**T=229°C**

**Figura 23** - Imagens de PLTM do arrefecimento num intervalo entre 245°C e 25°C de iguratimode comercial,  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; ampliação 200x.

Observa-se que o sólido se mantém estável e inalterado, sendo que à temperatura de cerca de 200°C ocorre sublimação ténue do composto, visualizando-se o início da fusão à temperatura de 238°C e o fim a 241°C.

A figura 23, mostra a cristalização rápida do composto. Inicia-se à temperatura de 233°C e termina a 229°C, mantendo-se estável até ao fim do arrefecimento (25°C).

Procedeu-se, em seguida, a análise por espectroscopia de infravermelho, do composto em estudo, figura 24.



**Figura 24** - Espectro de FTIR-ATR do Igaratimode comercial.

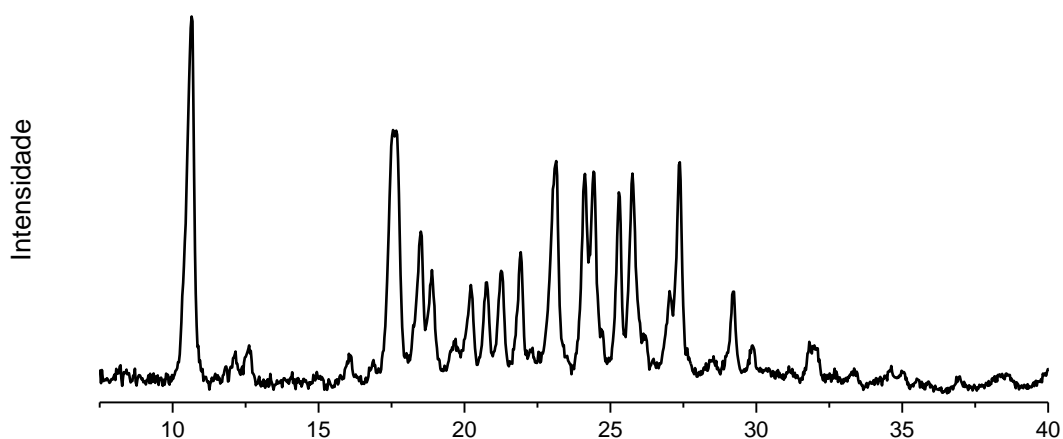
Na região entre 3500-2750  $\text{cm}^{-1}$  observam-se quatro bandas a 3388, 3280, 3113 e 2867  $\text{cm}^{-1}$ .

De acordo com Langenhan J. M., Fisk J.D e Gellman S.H. [62], e Gennari C., Piarulli U., Gude M [64] para as sulfonamidas e carboxamidas secundárias os modos de vibração de alongação N-H da carboxamida e da sulfonamida são observados entre 3430-3460  $\text{cm}^{-1}$  e 3390  $\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, quando o N-H não está envolvido em ligações de hidrogénio.

Quando o grupo N-H está envolvido em ligações de hidrogénio, a vibração de alongação N-H é deslocada para valores de número de onda mais baixos.

É possível observar os modos vibracionais de alongação dos grupos N-H da sulfonamida e da carboxamida a 3390 e 3279  $\text{cm}^{-1}$  no Igaratimode comercial. Assim, a banda com um máximo de absorção a 3390  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração de alongação do N-H da sulfonamida livre e banda a 3279  $\text{cm}^{-1}$  poderá ser atribuída à vibração de alongação do N-H da carboxamida, envolvida em ligação de hidrogénio.

Com o objetivo de completar a caracterização do composto de partida obteve-se o respectivo difractograma de raios-X de pó. O difractograma experimental do Igaratimode esta representado na figura 25.



**Figura 25** - Difractograma de raios-X de pó experimental da amostra de iguratimode comercial.

Da observação do difractograma é possível identificar os principais planos de difração com ângulos  $2\theta = 10.7, 16.6^\circ, 17.6^\circ, 18.5^\circ, 18.9^\circ, 20.2^\circ, 20.7^\circ, 21.3^\circ, 21.9^\circ, 23.1^\circ, 24^\circ, 24.4^\circ, 25.3^\circ, 25.7^\circ, 27.4^\circ, 29.2^\circ$  e  $29.9^\circ$  para a amostra comercial de iguratimode. O difractograma foi obtido experimentalmente. Não foi possível obter qualquer difractograma simulado de raios-X de pó de iguratimode, para comparação de estrutura, a partir da base de dados CCDC, por não se encontrar qualquer depósito naquela base.



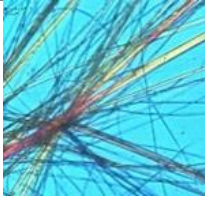

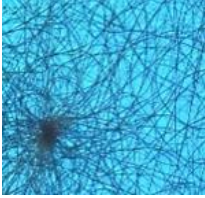
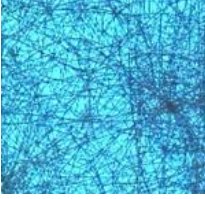
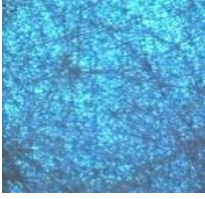
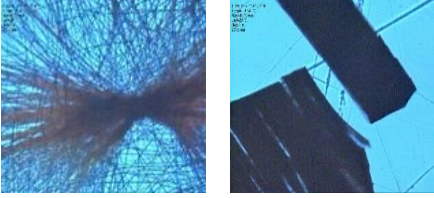
### 3.2.2 - Screening de novas formas sólidas por cristalização em solução

Efetuar-se vários ensaios de cristalização em vários solventes com o objetivo de gerar novas formas sólidas de iguratimode. Os solventes utilizados estão descritos na tabela 4.

Após evaporação dos solventes, os sólidos resultantes foram analisados. Numa primeira fase, foram observados em microscópio sob luz polarizada, mas, devido ao facto de termos um pó cristalino de dimensões muito reduzidas, o que origina imagens pouco nítidas, não nos foi possível estudar o seu comportamento, apenas foram identificados os hábitos cristalinos, tabela 10. Posteriormente, foi feita análise por espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR).



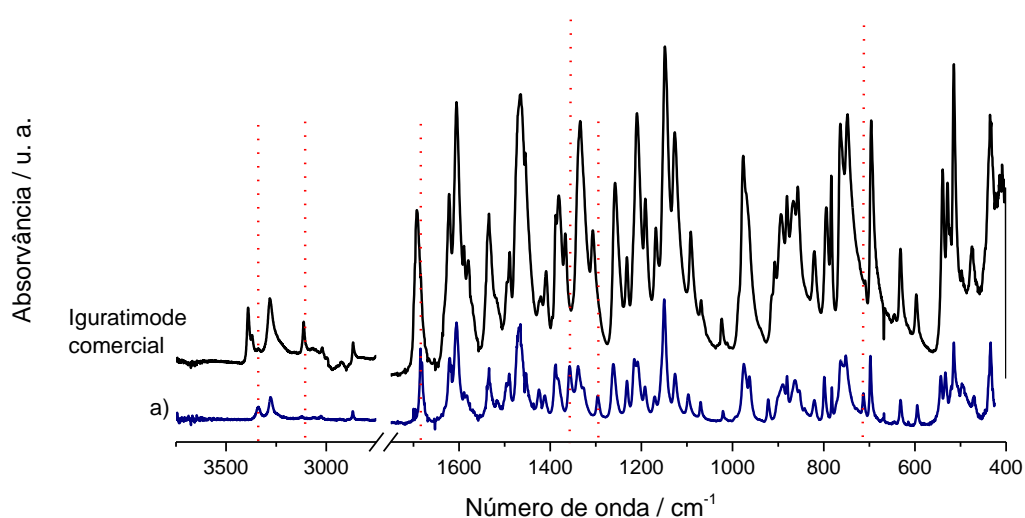
**Tabela 10** - Caracterização dos sólidos obtidos nos ensaios de cristalização do iguratimode em vários solventes.

Solvente	Imagem*	Hábito Cristalino
Clorofórmio		Acículas
Tetrahidrofurano		Aglomerado de Acículas
Acetona		Acículas
Acetato de Etilo		Acículas
Álcool isopropanol		Acículas
Metanol		Acículas
Metanol:etanol 3:2 (v/v)		Acículas
Diclorometano		Aglomerado de Acículas + placas formadas por acículas

\*Observação sob luz polarizada; ampliação: 200X.

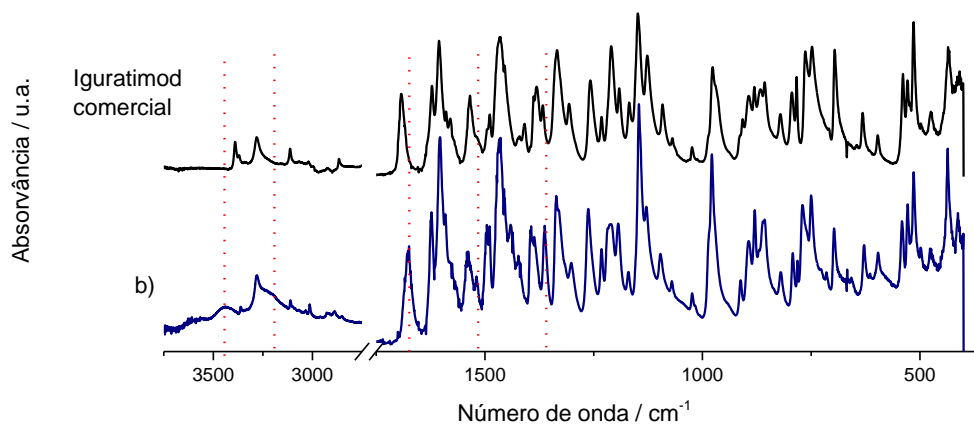
Os sólidos obtidos de diferentes solventes apresentam hábitos cristalinos bastante semelhantes, predominando as acículas de dimensões muito reduzidas, à exceção do sólido obtido em diclorometano que também apresenta placas de acículas aglomeradas.

Os espectros de infravermelho dos sólidos obtidos foram agrupados em três grupos, tendo em conta a semelhança dos mesmos. Desta forma, foram agrupados os espectros dos sólidos obtidos em clorofórmio, tetrahydrofurano, acetona, acetato de etilo e álcool isopropílico, grupo I, num gráfico com representação de um espectro, apenas, figura 26. Os espectros das amostras geradas em metanol e na solução metanol+etanol (3:2 (v/v)) são idênticos, grupo II, figura 27. Por último, em diclorometano obteve-se um sólido com um espectro diferente dos restantes, figura 28.



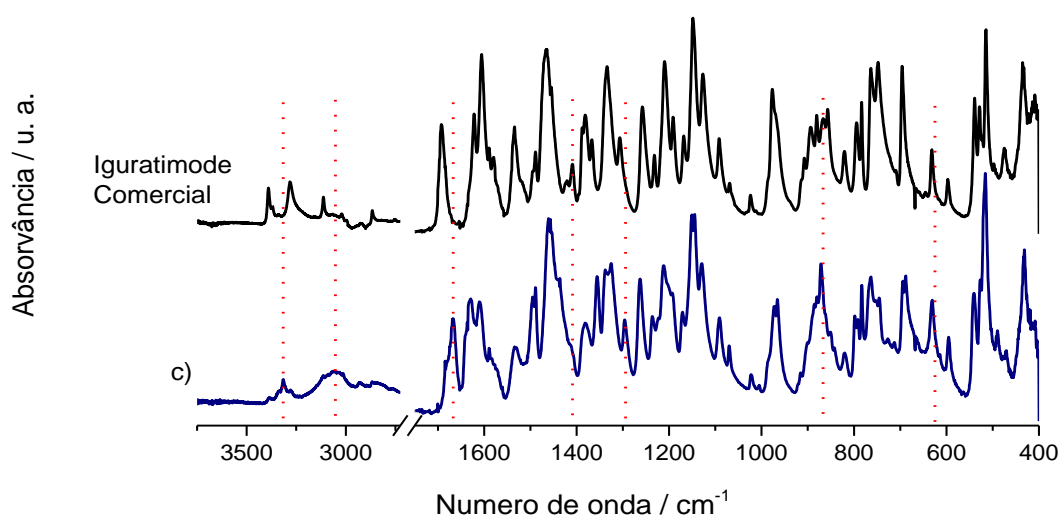
**Figura 26** - Espectro de FTIR-ATR iguratimode comercial, a) cristalizado em solventes do grupo I.

O espectro representativo dos sólidos cristalizados em solventes do grupo I mostra diferenças, quando comparado com o espectro do composto de partida, bem visíveis ao longo do mesmo. Deste modo, a evidência leva-nos a sugerir que estamos perante uma estrutura cristalina diferente da comercial.



**Figura 27** - Espectro de FTIR-ATR, Igaratimode comercial, b) cristalizado em solventes do grupo II.

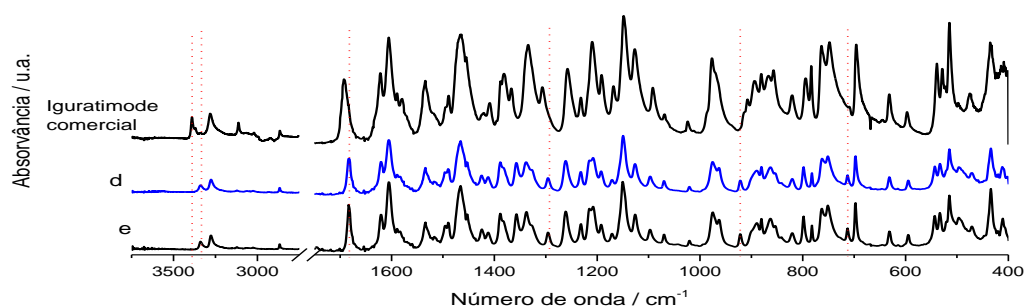
A figura 27 mostra as diferenças entre o espectro de FTIR-ATR da forma comercial e o espectro de FTIR-ATR representativo dos sólidos obtidos de solventes do grupo II, bem evidentes nas regiões de  $3500-2200\text{ cm}^{-1}$  e  $1800-1100\text{ cm}^{-1}$ . As bandas apresentam valores de números de onda muito diferentes por exemplo,  $3388\text{ cm}^{-1}$  no comercial e  $3443\text{ cm}^{-1}$  no sólido cristalizado de solventes do grupo II. O espectro b) da figura 27 apresenta uma banda a,  $1363\text{ cm}^{-1}$  que não se encontra no espectro do iguratimode comercial.



**Figura 28** - Espectro de FTIR-ATR, iguratimode comercial, c) cristalizado em diclorometano.

O espectro de iguratimode cristalizado de diclorometano apresenta, quando comparado com o espectro de iguratimode comercial, diferenças ao longo de toda a gama de números de onda. Temos desta forma um espectro diferente do de iguratimode comercial, o que nos leva a concluir que estamos perante uma nova fase que não a existente no composto de partida.

Para investigar a influência da variação da temperatura no resultado das cristalizações, foram analisados os sólidos obtidos em clorofórmio e em acetato de etilo, solventes do grupo I, por evaporação do solvente às temperaturas de 6°C e 10°C, respetivamente.

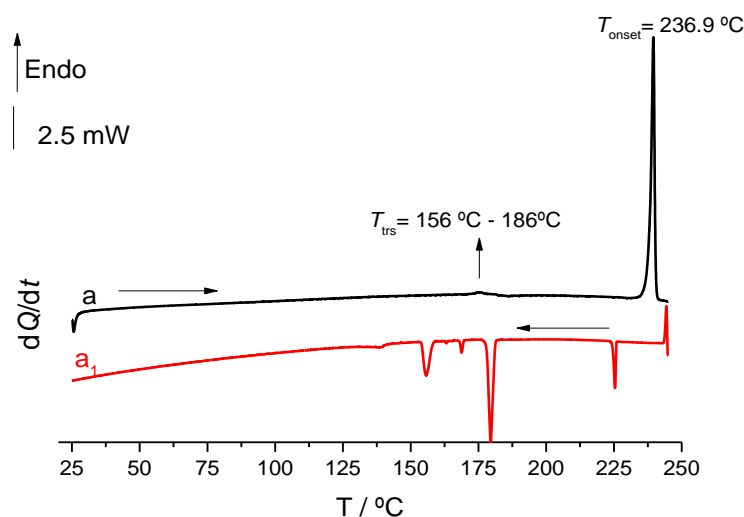


**Figura 29** - Espectro de FTIR-ATR, iguratimode comercial, d) cristalizado em diclorometano á temperatura de 6°C, e) cristalizado em acetato de etilo à temperatura de 10°C.

Podemos concluir, uma vez que os espectros de infravermelho dos sólidos obtidos figura29 são iguais entre si e aos apresentados na figura 26, que a temperatura de cristalização, nestas condições, não influencia a estrutura do sólido final.

Foram, ainda, realizados estudos preliminares, por análise térmica, dos diferentes sólidos obtidos por cristalização por evaporação do solvente, de forma a compreender o seu comportamento ao nível de transformações/transições de fase. Utilizou-se o método de análise térmica – DSC.

Na figura 30 estão representadas as curvas de DSC características do comportamento dos sólidos cristalizados em solventes do grupo I.



**Figura 30** - Igratimode: curvas de DSC ds sólidos obtidos por cristalização em solventes do grupo I, a) aquecimento de 25°C até 245°C, a1) arrefecimento de 245°C até 25°C;  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

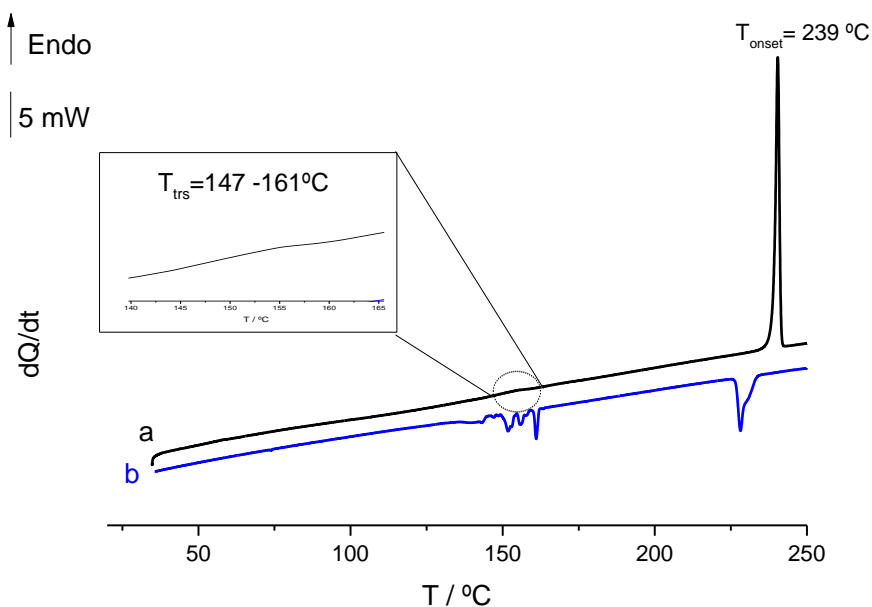
Podemos observar que, na curva relativa ao aquecimento, antes da fusão do composto temos uma transição, possivelmente sólido-sólido, à temperatura de 171°C, ocorrendo a fusão a 236.9°C. A temperatura de fusão obtida experimentalmente encontra-se abaixo da temperatura de fusão para o composto de partida, o que indica que poderemos estar na presença de uma outra forma polimórfica.

Na tabela II, são apresentados os parâmetros termodinâmicos obtidos nos vários ensaios de DSC realizado em sólidos obtidos em solventes do grupo I.

**Tabela II** - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do Igratimode cristalizado dos vários solventes, em vários ensaios.

Curva de aquecimento				
$T_i=25^\circ\text{C}$ , $T_f=245^\circ\text{C}$ , $ \beta =10^\circ\text{C}/\text{min}$				
Amostra	Massa / mg	$T_{\text{trs}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{fusão}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{fusão}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Acetona	1.28	155.9	237.8	35.0
Acetona	1.46	177.0	236.7	33.7
Acetona	2.02	162.4	237.9	37.6
Clorofórmio	1.62	173.4	238.1	36.1
Clorofórmio	2.15	186.1	236.4	37.7
Clorofórmio	2.10	157.8	237.3	35.5
Clorofórmio	2.00	170.8	236.3	32.5
Clorofórmio	1.35	173.5	236.8	35.8
Clorofórmio	1.64	166.8	238.0	40.2
THF	1.52	167.9	237.6	33.7
Acetato de etilo	1.09	157.6	236.8	40.8
Acetato de etilo	2.03	156.3	237.6	37.0
			$237.3\pm 0.6$	$36.3\pm 2.5$

Para o sólido cristalizado em diclorometano, por DSC, figura 31, obteve-se uma curva de aquecimento com um evento endotérmico à temperatura de 147-154°C correspondente a uma transição sólido-sólido. A fusão do composto ocorre a  $T_{\text{onset}}=239^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 31** - Igratimode: curvas de DSC do sólido cristalizado em diclorometano, a) aquecimento de 25°C até 245°C, b) arrefecimento de 245°C até 25°C;  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

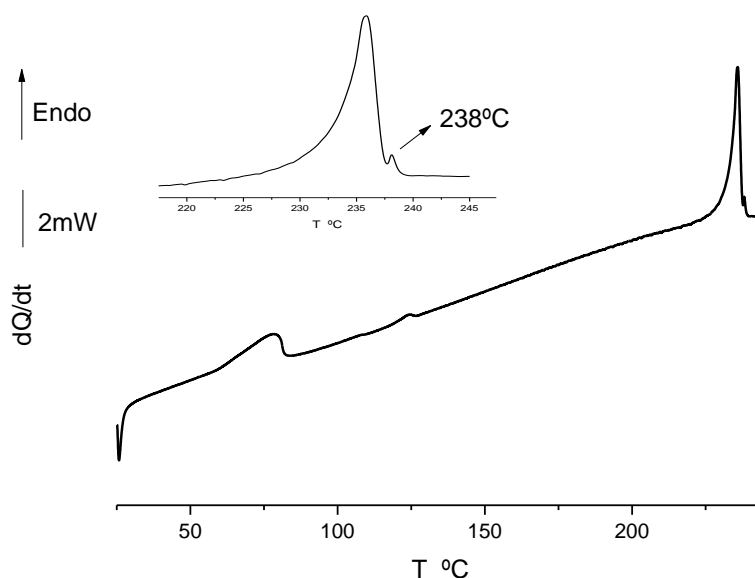
O comportamento do sólido cristalino leva-nos a concluir que estamos perante uma nova forma polimórfica.

Na tabela 12 são apresentados os parâmetros termodinâmicos obtidos em vários ensaios independentes para a amostra cristalizada de diclorometano.

**Tabela 12** - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do iguratimode cristalizado em diclorometano, (n=4).

Amostra	massa / mg	$T_{\text{trs}} / ^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{fusão}} / ^{\circ}\text{C}$	$\Delta_{\text{fusão}}\text{H} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
I	1.21	156.7	238.6	33.7
II	2.23	147.7	239.2	39.2
III	1.87	160.4	238.0	39.3
IV	1.60	160.4	238.0	38.6
			$238.5\pm 0.6$	$37.7\pm 2.7$

O espectro de infravermelho das amostras de iguratimode obtidas em metanol e em metanol+etanol levanta a suspeita de estarmos na presença de um solvato. Foram realizados ensaios de DSC, com cápsula perfurada, para o iguratimode comercial e para a amostra obtida nestes solventes.



**Figura 32** - Iguratomide: curva de DSC do aquecimento do sólido obtido por cristalização em solventes do grupo II;  $T_i=25^\circ\text{C}$  até  $T_f=245^\circ\text{C}$  com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula perfurada de  $50\mu\text{L}$ .

Na curva de aquecimento observamos à temperatura de  $58.9^\circ\text{C}$  um evento endotérmico, seguindo-se um outro com  $T_{\text{onset}}=119.6^\circ\text{C}$ . A fusão do composto ocorre aos  $233.4^\circ\text{C}$ , registando-se após a fusão um novo pico endotérmico a  $T_{\text{onset}}=238^\circ\text{C}$ . Os resultados apontam para a presença de um solvato, que dessolvata e, posteriormente transita, pelo menos parcialmente, para uma nova forma polimórfica. O pico de fusão indica a presença de uma mistura de formas ( uma que funde a  $233^\circ\text{C}$  e outra a  $238^\circ\text{C}$ ).

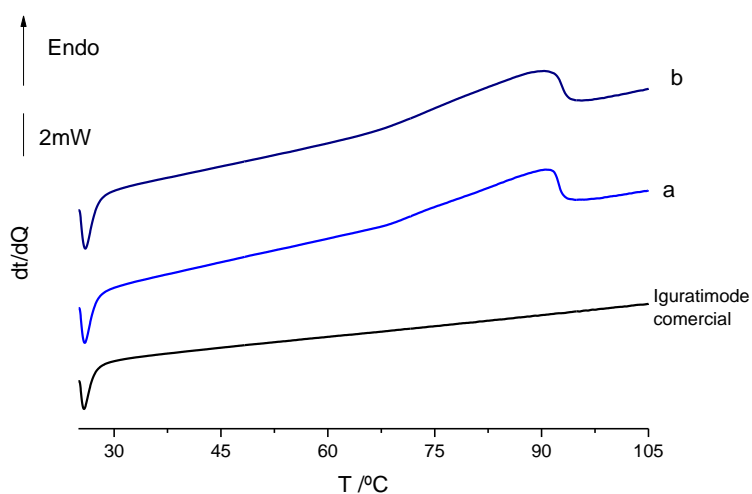
Na tabela seguinte encontram-se os parâmetros relativos aos vários ensaios para os sólidos cristalizados em solventes do grupo II ( metanol e mistura de metanol+etanol (3:2 (v/v)) ).

**Tabela 13** - Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do igratimode cristalizado em solventes do grupo II.

Curva de aquecimento				
$T_i=25^\circ\text{C}$ , $T_f=245^\circ\text{C}$ , $ \beta =10^\circ\text{C}/\text{min}$				
Amostra	Massa / mg	$T_{\text{trs}} / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{fusão}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{fusão}}H / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Metanol	1.12	58.9	233.4	32.2
		119.6		
Metanol	2.14	70.7	232.8	27.0
Metanol:etanol (3:2 (v/v))	1.32	69.1	236.5	31.9
Metanol:etanol (3:2 (v/v))	1.74	174.5	237.4	30.7
Metanol:etanol (3:2 (v/v))	1.61	163.3	236.4	31.8
Metanol:etanol (3:2 (v/v))	1.98	174.6	237.5	37.2
			$235.7\pm 2.0$	$31.8\pm 3.3$

Para confirmar que o primeiro evento é um processo de dessolvatação procedemos ao cálculo de perda de massa por aquecimento.

Foram realizados aquecimentos até depois da transição observada,  $T=105^\circ\text{C}$ , e após os mesmos a cápsula foi pesada e foi registada a sua massa. Este procedimento foi repetido para o igratimode comercial. Os resultados estão apresentados na figura 33.

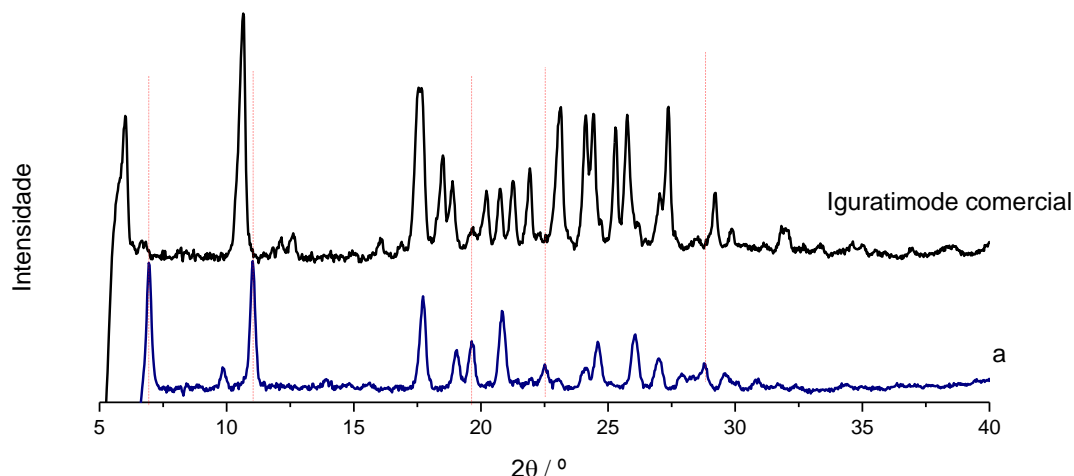


**Figura 33** - Curva de DSC do aquecimento do igratimode comercial e do sólido cristalizado em a) metanol e b) metanol:etanol (3:2 (v/v));  $T_i=25^\circ\text{C}$  até  $T_f=105^\circ\text{C}$  com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , cápsula perfurada de  $50\mu\text{L}$ .



Na curva a) o evento endotérmico ocorre à temperatura de 74.7°C e a perda de massa registada é de 5.1%. Na curva b), referente ao sólido obtido de metanol:etanol, numa proporção de (3:2(v/v)), o evento endotérmico ocorre à temperatura de 67.6°C, tendo-se registado uma perda de massa de 5.7%. Por outro lado, como verificado na análise por DSC, o composto de partida não regista qualquer evento nessa gama de temperaturas, bem como não regista perda de massa. Conclui-se, que poderemos estar perante uma forma solvatada/hidratada (solvato ou hidrato) de iguratimode.

Foram registados difractogramas de raios-X de pó, quando se dispunha de quantidade suficiente de amostra. No caso das amostras cristalizadas em solventes do grupo II, foi possível registar o difractograma que se apresenta na figura 34. Dada a dificuldade de enchimento do capilar, o sólido foi colocado no exterior do capilar com auxílio de vaselina.

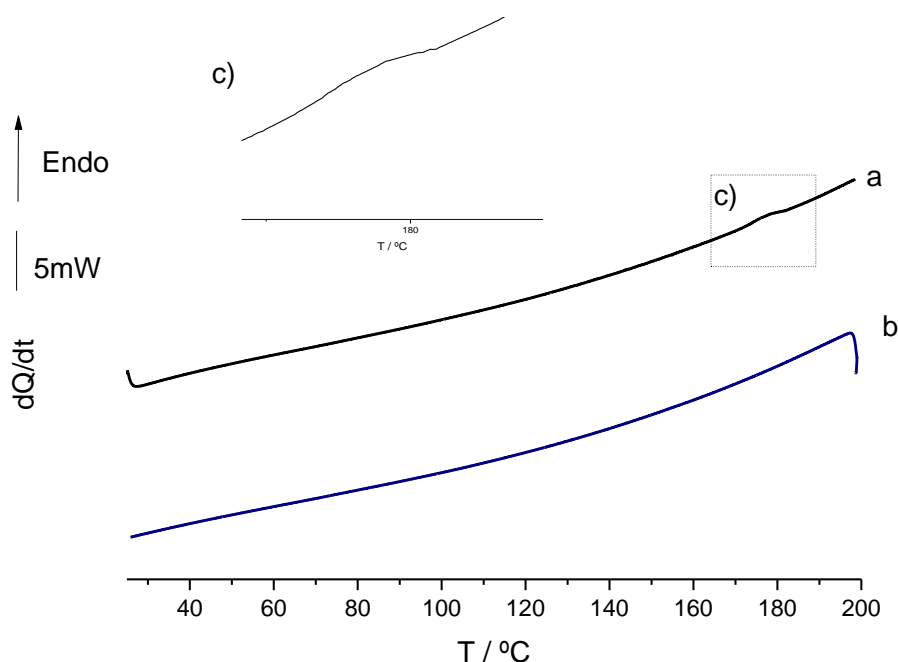


**Figura 34** - Difractograma de raio-X de pó, experimental do Iгурatimode comercial, a) sólido cristalizado em solventes do grupo II.

Apesar da qualidade dos difractogramas não ser a melhor, verifica-se que, para os sólidos gerados em etanol/metanol e metanol o difractograma difere como se esperava, do de iguratimode comercial. Por exemplo, os planos a  $2\theta = 20.2^\circ$ ,  $21.3^\circ$ ,  $21.8^\circ$ ,  $23.1^\circ$ ,  $25.3^\circ$  e  $31.9^\circ$  existem no Iгурatimode comercial, mas estão ausentes no difractograma de Iгурatimode cristalizado nos solventes do grupo II. No sólido obtido em etanol:metanol observa-se o aparecimento de novos planos a  $2\theta = 6.9^\circ$ ,  $11.0^\circ$ ,  $19^\circ$  e  $19.6^\circ$  comparativamente ao difractograma do composto de partida. Estes resultados confirmam a obtenção de uma nova forma sólida do iguratimode.

### 3.2.3 – Estudo de transições de fase

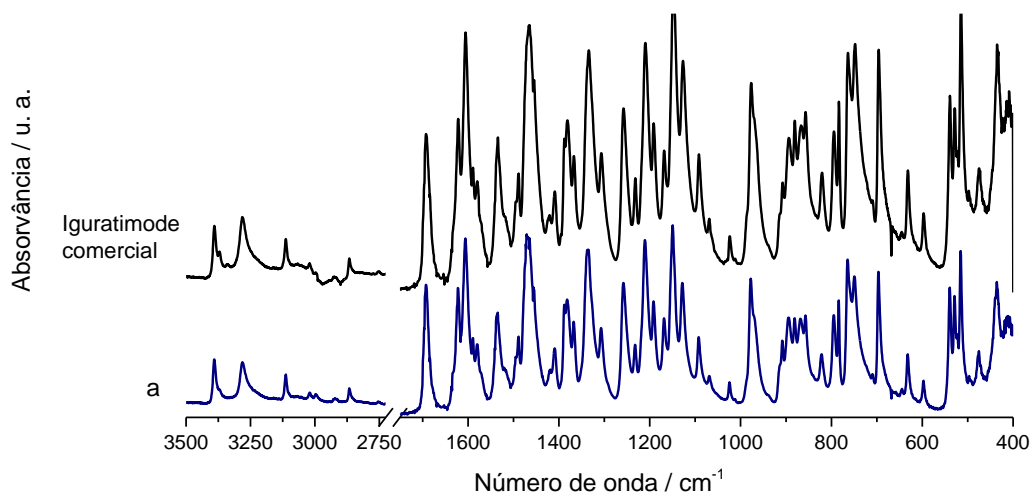
Para o estudo das transições observadas nas curvas de DSC antes da fusão, foram usados vários caminhos. Após análise de todos os sólidos cristalinos em FTIR-ATR( vide figuras 26 à 28) foram realizados ensaios por DSC, levando o aquecimento até à temperatura de 200°C, como exemplificado na figura 35. Após o arrefecimento a cápsula foi aberta e o sólido analisado por FTIR-ATR para comparação com a amostra inicial, figura 36.



**Figura 35** - Igratimode: Exemplo de curvas de DSC de aquecimento dos sólidos cristalizados em solventes, realizados para investigação das transições sólido-sólido, a) aquecimento de 25°C até 200°C, (b) arrefecimento de 200°C até 25°C;  $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , cápsula fechada.

Na curva de aquecimento, curva a), verifica-se um evento endotérmico que neste exemplo ocorre com  $T_{\text{onset}} = 173^{\circ}\text{C}$ , sendo que na curva b, arrefecimento, não é observado qualquer evento, o que nos leva a concluir que o processo não é reversível, pelo menos em termos cinéticos.

A cápsula foi aberta após o ciclo acima referenciado e a amostra foi analisada por espectroscopia de infravermelho.



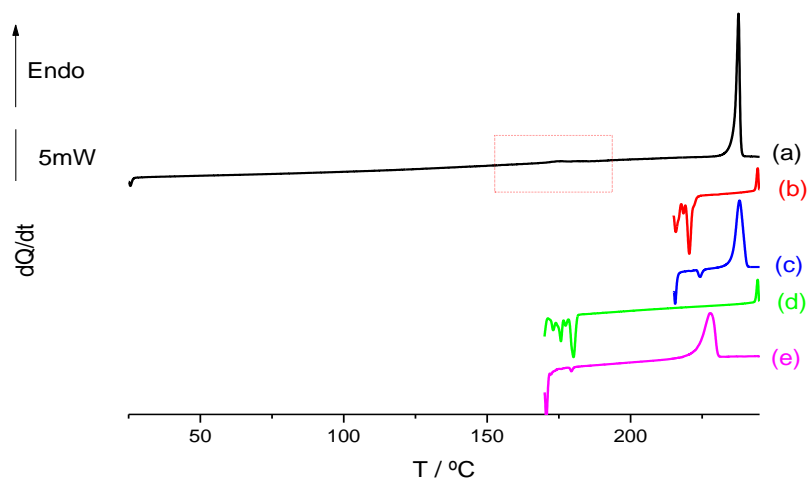
**Figura 36** - Espectro de FTIR-ATR do iguratimode comercial, a) amostra cristalizada em clorofórmio após o ciclo de DSC mostrado na figura 35.

Para os restantes solventes o comportamento foi idêntico, ou seja, após a transição e analisando a amostra, o espectro obtido é igual ao do composto de partida. A transição observada é uma transição sólido-sólido que, nas condições de ensaio transforma a forma polimórfica inicial (figura 26 a 28) no polimorfo comercial.

Foram ainda colocadas pequenas quantidades de cada sólido obtido a partir dos vários solventes, na estufa à temperatura de 180°C, onde permaneceram por cerca de 5 minutos. Foram posteriormente retirados e analisados em FTIR-ATR um a um. O comportamento repetiu-se, ou seja, os espectros obtidos após tratamento na estufa eram iguais ao espectro de iguratimode comercial, como exemplificado na figura 36.

### 3.2.4 – Estudo da cristalização a partir do fundido

Foram ainda realizados estudos a partir de fundidos gerados na fusão de alguns sólidos obtidos nas várias cristalizações. A figura 37 reúne as curvas de DSC ilustrativas dos resultados obtidos em ensaios de arrefecimento do fundido seguido de aquecimento. Neste caso a amostra de partida foi a obtida por cristalização em clorofórmio.

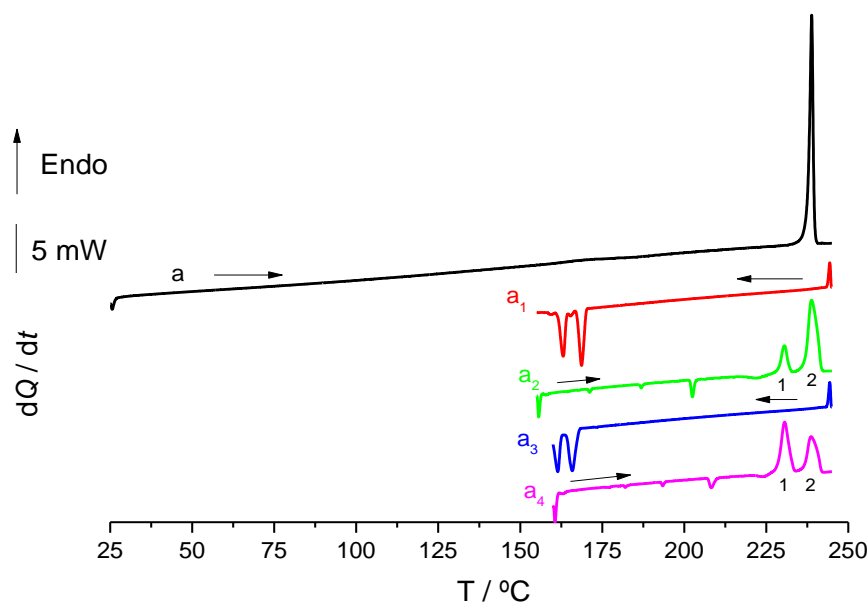


**Figura 37** - Igratimode: curvas de DSC do sólido cristalizado em clorofórmio, (a) primeiro aquecimento de 25°C até 245°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , (b) arrefecimento de 245°C até 215°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , (c) segundo aquecimento de 215°C até 245°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , (d) segundo arrefecimento de 245°C até 170°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , (e) terceiro aquecimento de 170°C até 245°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$  cápsula 30 $\mu\text{L}$  fechada.

Ao contrário do que foi observado quando a amostra de partida é o composto comercial (figura 21 e tabela 9) a cristalização do fundido para estas amostras foi registada em duas gamas de temperaturas:  $210^\circ\text{C} < T < 230^\circ\text{C}$  e  $155^\circ\text{C} < T < 180^\circ\text{C}$ .

Como mostrado na figura 37, após a mínima fusão do sólido, arrefeceu-se até à primeira cristalização que ocorreu a  $T_{\text{onset}}=221^\circ\text{C}$ , efetuando-se o aquecimento imediato e registando a fusão a  $T_{\text{onset}}=238^\circ\text{C}$ , o que corresponde à temperatura de fusão do polimorfo comercial. Após o segundo aquecimento seguiu-se um novo arrefecimento, curva d), e desta vez a cristalização ocorreu a uma temperatura mais baixa,  $T_{\text{onset}}=180^\circ\text{C}$ . No aquecimento seguinte a fusão foi observada a  $T_{\text{onset}}=228^\circ\text{C}$ .

A figura 38 mostra curvas de DSC correspondentes a ciclos de aquecimento e arrefecimento, obtidos noutra ensaio, este realizado utilizando uma amostra cristalizada de acetato de etilo.

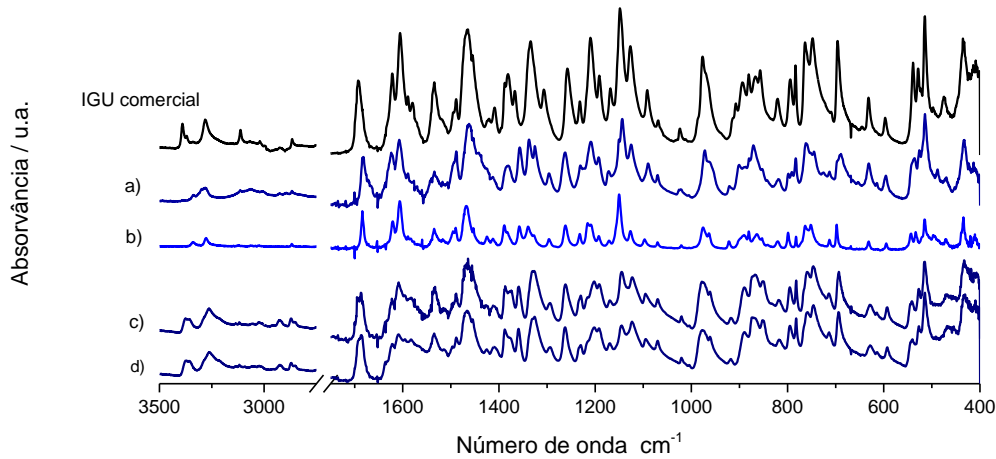


**Figura 38** - Igratimode: curvas de DSC do sólido cristalizado em acetato de etilo, a) primeiro aquecimento de 25°C até 245°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , a<sub>1</sub>) arrefecimento de 245°C até 155°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , a<sub>2</sub>) segundo aquecimento de 155°C até 245°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , a<sub>3</sub>) segundo arrefecimento de 245°C até 160°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ , a<sub>4</sub>) terceiro aquecimento de 160°C até 245°C com  $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; cápsula 30 $\mu\text{L}$  fechada.

Após a primeira fusão, curva a),  $T_{\text{onset}}=237.6^\circ\text{C}$ , a amostra foi arrefecida, curva a<sub>1</sub>, cristalizando a  $T_{\text{onset}}=170^\circ\text{C}$ , tendo sido terminado o arrefecimento e iniciado imediatamente o segundo aquecimento, curva a<sub>2</sub>. Neste passo de aquecimento a curva, apresenta evidências de processos exotérmicos e apresenta dois picos endotérmicos, fusão a  $T_{\text{onset}}=228.7^\circ\text{C}$  e a  $T_{\text{onset}}=237^\circ\text{C}$ , respetivamente. O comportamento repetiu-se no ciclo seguinte de arrefecimento/aquecimento (curvas a<sub>3</sub> e a<sub>4</sub>).

Desta forma podemos concluir que estamos perante mais do que uma forma polimórfica do Igratimode.

Os resultados leva-nos a concluir que, se o fundido cristalizar na gama de temperatura mais baixa obtemos uma forma polimórfica diferente. Para prová-lo, após a fusão aos 228°C o sólido foi arrefecido até à temperatura ambiente e, tendo a cristalização ocorrido entre  $155^\circ\text{C}<T<180^\circ\text{C}$ , foi analisado por FTIR-ATR, figura 39.



**Figura 39** - Espectros de FTIR-ATR iguratimode comercial, a) cristalizado de diclorometano; b) cristalização de clorofórmio; c) amostra obtida após cristalização do fundido a  $T=180^{\circ}\text{C}$ , ensaio I; d) amostra obtida após cristalização do fundido a  $T=180^{\circ}\text{C}$ , ensaio II.

Na figura 39 estão representados os vários espectros de FTIR-ATR obtidos para as possíveis formas polimórficas identificadas. Os espectros c) e d) foram obtidos pelas amostras cristalizadas do fundido a  $155^{\circ}\text{C} < T < 180^{\circ}\text{C}$ . Observamos que estamos perante três espectros diferentes entre si, a), b) e c) ou d), e que estes espectros são diferentes do espectro da forma comercial. Isto leva-nos a concluir que poderemos estar perante quatro formas polimórficas.

# **Capítulo 4**

Notas Finais e Perspetivas Futuras





## Notas Finais e Perspetivas Futuras

Neste trabalho foi efetuada a pesquisa de polimorfos/solvatos de dois ativos de grande relevo, o salbutamol e o iguratimode, por cristalização a partir de solventes com propriedades físico-químicas diferentes, obtendo a sobressaturação das soluções a partir da evaporação lenta do solvente. No caso do iguratimode foi também investigada a cristalização de fundidos.

Para o salbutamol os sólidos obtidos não apresentam grandes diferenças nos espectros de FTIR-ATR, mas foi possível verificar que existe, de facto, a presença de outras formas polimórficas reveladas por DSC e PLTM, formas essas que não nos foi possível isolar.

No que diz respeito ao iguratimode, os sólidos obtidos foram agrupados em três grupos de acordo com a semelhança dos respetivos espectros de infravermelho. Propõe-se que um deles seja um novo solvato obtido de metanol ou da mistura de metanol:etanol na proporção (3:2(v/v)); outro seja uma nova forma polimórfica obtida a partir da cristalização em clorofórmio, THF, acetona, acetato de etilo e álcool isopropílico, outra forma é obtida a partir da cristalização em diclorometano. Propõe-se, ainda, a presença de uma nova forma polimórfica obtida quando a cristalização do fundido ocorre a temperatura compreendida entre 155 e 180°C. Todas estas formas são distintas do polimorfo identificado no composto comercial.

Apesar de várias tentativas, não foi possível caracterizar por difração de raios-X de pó as várias formas polimórficas por nós propostas, bem como, também não nos foi possível analisar as transições por PLTM uma vez que se tratava de cristais de dimensões reduzidas.

Estudos futuros deverão passar por otimização de condições de cristalização por forma a obter formas sólidas em quantidade e se possível com dimensões apropriadas para efetuar estudos de caracterização estrutural por difração de raios-X.

Investigação utilizando microscopia de infravermelho e de raman, se possível com variação de temperatura poderá também ser útil na avaliação das amostras obtidas por cristalização.



# **Capítulo 5**

## Referências Bibliográficas



## Referências Bibliográficas

- 1 LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. - **Crystal polymorphism in chemical process development**. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2 (2011) 259-80.
- 2 MCCRONE, W. - **Physics and chemistry of the organic solid state**. Polymorphism. New York: Wiley Interscience, (1965) 725-76.
- 3 SNIDER, D. A.; ADDICKS, W.; OWENS, W. - **Polymorphism in generic drug product development**. *Adv Drug Deliv Rev*, 56 (2004) 391-5.
- 4 CHEMBURKAR, S. R., *et al.* - **Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development**. *Organic Process Research & Development*, 4 (2000) 413-417.
- 5 CENSI, R.; DI MARTINO, P. - **Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs**. *Molecules*, 20 (2015) 18759-18776.
- 6 AALTONEN, J., *et al.* - **Solid form screening- A Review**. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 71 (2009) 23-37.
- 7 CRUZ-CABEZA, A. J.; REUTZEL-EDENS, S. M.; BERNSTEIN, J. - **Facts and fictions about polymorphism**. *Chemical Society reviews*, 44 (2015) 8619-8635.
- 8 VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAI, H. G.; GRANT, D. J. - **Crystalline solids**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48 (2001) 3-26.
- 9 YU, L. - **Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization**. *Advanced drug delivery reviews*, 48 (2001) 27-42.
- 10 GU, C. H.; YOUNG, V.; GRANT, D. J. - **Polymorph screening: Influence of solvents on the rate of solvent-mediated polymorphic transformation**. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90 (2001) 1878-1890.
- 11 SAIFEE, M., *et al.* - **Drug polymorphism: a review**. *International Journal of Health Research*, 2 (2009) 291-306.
- 12 BERNSTEIN, J. - **Polymorphism in molecular crystals**. Oxford University Press, 2007. 0199236569.
- 13 THIRUVENGADAM, E.; VELLAISAMY, G. - **POLYMORPHISM IN PHARMACEUTICAL INGREDIENTS A REVIEW**. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(2014) 621-633.
- 14 ATKINS, P., *et al.* - **Crystal Polymorphism, Engineering of Crystalline Materials Properties**. Springer Netherlands, 2008.
- 15 BURGER, A.; RAMBERGER, R. - **On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. I**. *Microchimica Acta*, 72 (1979) 259-271.
- 16 HILFIKER, R. - **Polymorphism: in the pharmaceutical industry**. John Wiley & Sons, 2006. 3527607722.
- 17 FDA, G. F. I. - **ANDAs : Pharmaceutical solid Polymorphism 2007**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf>>. consulta: 8 de Junho 2016.
- 18 LLINAS, A.; GOODMAN, J. M. - **Polymorph control: past, present and future**. *Drug Discov Today*, 13 (2008) 198-210.
- 19 PAUS, R.; PRUDIC, A.; JI, Y. - **Influence of excipients on solubility and dissolution of pharmaceuticals**. *International journal of pharmaceutics*, 485 (2015) 277-287.
- 20 KHAN, F. N.; DEGHAN, M. H. - **Enhanced bioavailability of atorvastatin calcium from stabilized gastric resident formulation**. *AAPS PharmSciTech*, 12 (2011) 1077-1086.

- 21 YARNYKH, T.; TOLOCHKO, E.; CHUSHENKO, V. - **Drug synthesis methods and manufacturing technology**. Pharmaceutical Chemistry Journal, 44 (2011) 551-556.
- 22 YU, L.; REUTZEL, S. M.; STEPHENSON, G. A. - **Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy**. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1 (1998) 118-127.
- 23 MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. - **Dissolution studies in vitro as a prognostic tool for oral absorption of modified release pharmaceutical dosage forms**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 38 (2002) 375-399.
- 24 LOHANI, S.; GRANT, D. J. - **Thermodynamics of polymorphs**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- 25 JAMPÍLEK, J.; DOHNAL, J. - **Investigation of Carbohydrates and Their Derivatives as Crystallization Modifiers**. INTECH Open Access Publisher, 2012. 9535108646.
- 26 KITAMURA, M. - **Strategy for control of crystallization of polymorphs**. CrystEngComm, 11 (2009) 949.
- 27 RUECROFT, G., *et al.* - **Sonocrystallization: The Use of Ultrasound for Improved Industrial Crystallization**. Organic Process Research & Development, 9 (2005) 923-932.
- 28 LEE, E. H. - **A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection**. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 9 (2014) 163-175.
- 29 SOUTHIN, R.; CHADWICK, G. - **Crystallization from the melt**. Science Progress, 57 (1969) 353-370.
- 30 MANGIN, D.; PUEL, F.; VEESLER, S. - **Polymorphism in Processes of Crystallization in Solution: A Practical Review**. Organic Process Research & Development, 13 (2009) 1241-1253.
- 31 TRASK, A. V., *et al.* - **Selective polymorph transformation via solvent-drop grinding**. Chemical Communications, (2005) 880-882.
- 32 HALEBLIAN, J.; MCCRONE, W. - **Pharmaceutical applications of polymorphism**. Journal of pharmaceutical sciences, 58 (1969) 911-929.
- 33 VALE, A. -  **$\beta$ 2-Agonists**. Medicine, 44 (2016) 146.
- 34 COLUMBANO, A.; BUCKTON, G.; WIKLEY, P. - **A study of the crystallisation of amorphous salbutamol sulphate using water vapour sorption and near infrared spectroscopy**. International journal of pharmaceutics, 237 (2002) 171-178.
- 35 MILLER, J. M., *et al.* - **Identifying the stable polymorph early in the drug discovery–development process**. Pharmaceutical development and technology, 10 (2005) 291-297.
- 36 FELIX, F. S., *et al.* - **Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions**. Journal of thermal analysis and calorimetry, 95 (2009) 877-880.
- 37 LIBRETTO, S. E. - **A review of the toxicology of salbutamol (albuterol)**. Archives of toxicology, 68 (1994) 213-216.
- 38 AMEREDDES, B. T.; CALHOUN, W. J. - **Levalbuterol versus albuterol**. Current Allergy and Asthma Reports, 9 (2009) 401-409.
- 39 LI, Y., *et al.* - **A sensitive voltammetric sensor for salbutamol based on MWNTs composite nano-Au film modified electrode**. Analytical Methods, 6 (2014) 1928.
- 40 SONVICO, F., *et al.* - **Evolved gas analysis during thermal degradation of salbutamol sulphate**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 120 (2014) 789-794.
- 41 DUAN, X. W., *et al.* - **Efficacy and safety evaluation of a combination of iguratimod and methotrexate therapy for active rheumatoid arthritis**

- patients: a randomized controlled trial. *Clinical rheumatology*, 34 (2015) 1513-9.
- 42 DESAI, M. C. - **Annual reports in medicinal chemistry**. Elsevier, 2013. 0124171516.
- 43 KANAYAMA, Y., *et al.* - **THU0191 Clinical Efficacy of Add-on Iguratimod Therapy in Patients with Active Rheumatoid Arthritis Despite of Methotrexate: 52-Week Results—a Multicenter Registry Study**. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74 (2015) 264-264.
- 44 MUCKE, H. A. - **Iguratimod: a new disease-modifying antirheumatic drug**. *Drugs Today (Barc)*, 48 (2012) 577-86.
- 45 LUO, Q., *et al.* - **A novel disease-modifying antirheumatic drug, iguratimod, ameliorates murine arthritis by blocking IL-17 signaling, distinct from methotrexate and leflunomide**. *Journal of immunology*, 191 (2013) 4969-78.
- 46 TANAKA, K. - **Iguratimod (T-614): A novel disease modifying anti-rheumatic drug**. *Rheumatology Reports*, 1 (2009) 11-15.
- 47 LI, J., *et al.* - **Efficacy and safety of iguratimod for the treatment of rheumatoid arthritis**. *Clinical & developmental immunology*, 2013 (2013) 1-16.
- 48 MEI, L., *et al.* - **Iguratimod crystal form and its composition for use in preparing medicine for rheumatic arthritis contains five crystalline forms**. Disponível em WWW: <<Go to ISI>://DIIDW:2007677133>. CNI944420-A; CNI944420-B
- 49 GU, C.-H., *et al.* - **Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening**. *International journal of pharmaceutics*, 283 (2004) 117-125.
- 50 MARCUS, Y. - **The properties of solvents**. Wiley Chichester, 1998. 0-471-98369-1.
- 51 WEST, A. R. - **Solid state chemistry and its applications**. John Wiley & Sons, 2007. 8126511079.
- 52 MOJUMDAR, S., *et al.* - **Selected thermoanalytical methods and their applications from medicine to construction**. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 90 (2007) 653-662.
- 53 SHAH, B.; KAKUMANU, V. K.; BANSAL, A. K. - **Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids**. *Journal of pharmaceutical sciences*, 95 (2006) 1641-65.
- 54 CHADHA, R., *et al.* - **Thermomicroscopy and its pharmaceuticals applications**. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*, 2 (2012) 1013-1024.
- 55 BRITTAIN, H. G., *et al.* - **Physical characterization of pharmaceutical solids**. *Pharmaceutical research*, 8 (1991) 963-973.
- 56 RODRÍGUEZ-SPONG, B., *et al.* - **General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective**. *Advanced drug delivery reviews*, 56 (2004) 241-274.
- 57 BUGAY, D. E. - **Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48 (2001) 43-65.
- 58 CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. - **An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs**. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 55 (2011) 618-44.
- 59 OCHSENBEIN, P.; SCHENK, K. J. - **Crystallography for polymorphs**. *Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry*, (2006)
- 60 PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. - **Estado Sólido na Indústria Farmacêutica: Uma Breve Revisão**. *Revista Virtual de Química*, 7 (2015) 2080-2112.
- 61 ALI, H. R., *et al.* - **Vibrational spectroscopic study of salbutamol hemisulphate**. *Drug testing and analysis*, 1 (2009) 51-6.

- 62 LANGENHAN, J. M.; FISK, J. D.; GELLMAN, S. H. - **Evaluation of hydrogen bonding complementarity between a secondary sulfonamide and an  $\alpha$ -amino acid residue.** *Organic letters*, 3 (2001) 2559-2562.
- 63 REICHARDT, C.; WELTON, T. - **Solvents and solvent effects in organic chemistry.** John Wiley & Sons, 2011. 3527642137.
- 64 GENNARI, C., *et al.* - **Hydrogen-bonding donor/acceptor scales in b-sulfonamidopeptides.** *Chemistry European Journal*, 2 (1998) 1924-1931.