

Eloisa Helena da Luz Silva

POLIMORFOS E CO-CRISTAIS ATIVOS CLÁSSICOS E ATIVOS EMERGENTES

Mestrado em Química
Departamento de Química
FCTUC

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eloisa Helena da Luz Silva

POLIMORFOS E CO-CRISTAIS
ATIVOS CLÁSSICOS E ATIVOS EMERGENTES

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

Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio

Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage

Setembro 2017

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

A realização desta dissertação não teria sido possível sem o apoio dos orientadores, colegas, família e amigos, a quem eu deixo o mais sincero agradecimento.

Começo por agradecer aos meus orientadores, a Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e o Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage, pelo privilégio de fazer parte do grupo de investigação, pelo conhecimento transmitido, pela orientação, compreensão, dedicação e apoio.

Um especial agradecimento ao Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e à Professora Doutora Teresa Margarida Roseiro Estronca pela disponibilidade e ajuda prestada.

Agradeço à Professora Doutora Manuela Ramos Silva pelo apoio nos estudos efetuados por difração de raios-X.

Ao Professor Doutor Manuel E. Minas da Piedade e ao grupo de investigação da Faculdade de Ciências da Universidade Lisboa, agradeço pela colaboração neste trabalho.

Ao Doutor António Osvaldo Lima Évora, agradeço pela ajuda prestada e pelo apoio durante a realização do mestrado.

Aos colegas e amigos, que de alguma forma contribuíram e ajudaram na concretização deste projeto.

À minha família, em especial à minha mãe e aos meus filhos, pelo carinho e apoio incondicional.

Índice

Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	xiii
Abrevituras	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. Introdução	1
1.1. Polimorfismo	2
1.2. Co-cristais.....	4
1.3. Fenilbutazona	8
1.3.1 Formas sólidas da fenilbutazona	9
1.4. Roxadustate.....	12
2. Objetivo	13
2.1. Co-formadores utilizados neste trabalho	15
3. Materiais e métodos	19
3.1 Materiais	19
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Cristalização em solvente	20
3.2.2 Mecanoquímica.....	21
3.2.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)	21
3.2.5 Termomicroscopia com luz polarizada (PLTM)	22
3.2.6 Espetroscopia de infravermelho	22
3.2.7 Difração de raios-X.....	22
4. Resultados e Discussão	25
4.1 Fenilbutazona: caracterização da forma sólida de partida.....	25
4.2 Fenilbutazona: investigação da cristalização de fundidos	28
4.3 Fenilbutazona: cristalização a partir de solução.....	36
4.3.1. Cristalização em metanol, etanol, acetona e acetato de etilo	37
4.3.2. Cristalização em diclorometano	46
4.4. Roxadustate	48
4.4.1. Caraterização do composto de partida e pesquisa de polimorfos.....	48
4.4.2. Investigação da formação de co-cristais de roxadustate.....	55

5. Conclusão.....	75
6. Referências bibliográficas	77
7. Apêndice.....	89

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema de dois empacotamentos cristalinos distintos de um API ¹⁹	2
Figura 2 – Representação esquemática de sistemas cristalinos multicomponentes: a) solvato; b) co-cristal; c) sal ⁴²	5
Figura 3 – Sobreposição de classes de cristais multicomponentes ²¹	6
Figura 4 – Síntões supramoleculares mais comuns em co-cristais ⁴²	7
Figura 5 – Estrutura molecular da fenilbutazona, FBZ.....	9
Figura 6 – Empacotamento cristalino do polimorfo α da fenilbutazona, CCDC 755086 ⁸⁴	10
Figura 7 – Estrutura molecular do roxadustate.....	12
Figura 8 – Estrutura molecular do roxadustate, evidenciando grupos que podem participar em ligações de hidrogénio.....	14
Figura 9 – Difractogramas de raio-X de pó da fenilbutazona: a) experimental para a amostra de partida; b) simulado (forma α).....	25
Figura 10 – Curvas de DSC de aquecimento da amostra de fenilbutazona de partida, polimorfo δ : 1. $\beta = 2$ °C/min; 2. $\beta = 10$ °C/min; 3. $\beta = 20$ °C/min.....	26
Figura 11 – Difractogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. amostra de fenilbutazona de partida a 18 °C; 2. aquecimento a 100 °C, $\beta = 6$ °C/min.....	27
Figura 12 – Fenilbutazona, imagens obtidas por PLTM: aquecimento da amostra de partida, de 25 °C a 115 °C, $\beta=10$ °C/min, ampliação 200x.....	27
Figura 13 – Espectro de infravermelho de fenilbutazona de partida, polimorfo δ	28
Figura 14 – Fenilbutazona, curvas de DSC de arrefecimento do fundido: A e D a $\beta = -10$ °C/min; B e E a $\beta = -5$ °C/min; C e F a $\beta = -2$ °C/min, precedidos por aquecimento a: a) $\beta = 10$ °C/min; b) $\beta = 20$ °C/min.....	29
Figura 15 – Fenilbutazona, curvas de DSC de aquecimento dos sólidos obtidos a partir do arrefecimento do fundido, $\beta = 10$ °C/min. O arrefecimento precedente foi realizado a diferentes velocidades de varrimento: A e D a $\beta = -10$ °C/min; B e E a $\beta = -5$ °C/min; C e F a $\beta = -2$ °C/min.....	30
Figura 16 – Fenilbutazona: curvas de DSC de aquecimento, $\beta = 10$ °C/min, de amostras obtidas a partir do arrefecimento do fundido a $\beta = -50$ °C/min.....	32
Figura 17 – Fenilbutazona, imagens obtidas por PLTM: aquecimento do fundido, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x. No arrefecimento precedente não ocorreu recristalização.....	33

Figura 18 – Fenilbutazona, imagens obtidas por PLTM: aquecimento do fundido, $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, precedido de arrefecimento em que não ocorreu recristalização, ampliação 200x.	34
Figura 19 – Fenilbutazona, difratogramas de raios-X de pó dos sólidos obtidos a partir do arrefecimento do fundido: 1. arrefecimento $\beta = -6^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 2. arrefecimento $\beta = -1^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 3. arrefecimento rápido. 4. amostra de partida da fenilbutazona, polimorfo δ . (difratograma recolhido a $T \sim 20^{\circ}\text{C}$).	35
Figura 20 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: a) simulado, polimorfo α ; b) amostra de partida, polimorfo δ ; c) sólido obtido a partir da cristalização do fundido, polimorfo β , arrefecimento a $\beta = -6^{\circ}\text{C}/\text{min}$	35
Figura 21 – Fenilbutazona, difratogramas de raios-X de pó obtidos no aquecimento do polimorfo β : 1. 20°C ; 2. 50°C ; 3. 101°C ; 4. 104°C , $\beta = 6^{\circ}\text{C}/\text{min}$	36
Figura 22 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona: 1. Amostra de partida; 2. sólido obtido por cristalização em etanol; 3. sólido obtido por cristalização em metanol.	38
Figura 23 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona. 1. amostra de partida; sólido obtido por cristalização em: 2. acetato de etilo; 3. Acetona (esferulite); 4. etanol; 5. metanol.	39
Figura 24 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona. 1. amostra de partida; sólido obtido por cristalização em: 2. acetona (2ª solução); 3. acetato de etilo (2ª solução); 4. acetona (1ª solução); 5. acetato de etilo (1ª solução).	40
Figura 25 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona. 1. amostra de partida; sólido obtido por cristalização em acetona: 2. acículas; 3. esferulites.	41
Figura 26 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. sólido obtido a partir da cristalização em acetona; 2. simulado (forma α); 3. amostra de partida (forma δ); 4. polimorfo β ; *contaminante.	42
Figura 27 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. sólido obtido a partir da cristalização em acetato de etilo; 2. simulado (forma α); 3. amostra de partida (forma δ); 4. polimorfo β ; *contaminante.	42
Figura 28 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. sólido obtido a partir da cristalização em etanol; 2. simulado (forma α); 3. amostra de partida (forma δ); 4. polimorfo β ; *contaminante.	43
Figura 29 – Curvas de DSC de aquecimento dos sólidos obtidos por cristalização da fenilbutazona em: 1; 1'. acetato de etilo; 2; 2'. acetona; 3; 3'. etanol; 4. metanol, $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Os valores de temperatura indicados dizem respeito ao onset dos picos.	43

Figura 30 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em etanol, polimorfo α , de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.	44
Figura 31 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em metanol, polimorfo α , de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.	45
Figura 32 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em acetona, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.	45
Figura 33 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em acetato de etilo, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.	46
Figura 34 – Curvas de DSC de aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em diclorometano: 1. cápsula fechada; 2. Capsula fechada perfurada, $\beta = 10$ °C/min.	47
Figura 35 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em diclorometano, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.	48
Figura 36 – Curva de DSC de aquecimento de roxadustate de partida, $\beta = 10$ °C/min.	49
Figura 37 – Curvas de TG / DSC registadas no aquecimento de roxadustate de partida; $\beta = 10$ °C/min; $m = 14,22$ mg, atmosfera de azoto.	49
Figura 38 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento da amostra do roxadustate de partida, de 25 °C a 230 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.	50
Figura 39 – Espectro de infravermelho do roxadustate.	50
Figura 40 – Espectros de infravermelho de roxadustate: 1. Amostra de partida; sólidos obtidos por cristalização em diferentes solventes: 2. etanol; 3. 1,4-dioxano; 4. 1-propanol.	52
Figura 41 – ORTEP da estrutura do roxadustate mostrando a numeração dos átomos (elipsoides desenhados ao nível de 50 % de probabilidade); T = 293 K, CCDC 1469842.	52
Figura 42 – a) Célula unitária da roxadustate, mostrando as ligações de hidrogénio; b) A molécula de roxadustate, na estrutura CCDC 1469842, evidenciando a planaridade da parte central; c) Dímeros centrossimétricos de roxadustate na estrutura, CCDC 1469842.	54
Figura 43 – Difractogramas de raios-X de pó do roxadustate: 1. experimental para a amostra de partida; 2. simulado para a estrutura CCDC 1469842.	55
Figura 44 – Difractogramas de raios-X de pó experimental de roxadustate para: 1. amostra obtida por moagem com adição de 10 μ L de etanol; 2. amostra de partida.	56
Figura 45 – Curvas de DSC de aquecimento para roxadustate: 1. amostra de partida; 2. amostra obtida por moagem com adição de 10 μ L de etanol, $\beta = 10$ °C/min.	56
Figura 46 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. isonicotinamida, I; 2. mistura roxadustate e isonicotinamida obtida por moagem na proporção 1:1 com adição de 10 μ L de etanol; 3. mistura	

roxadustate e isonicotinamida obtido por moagem na proporção 1:1 sem adição de solvente	4.
roxadustate. $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	57
Figura 47 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e isonicotinamida obtido por moagem na proporção 1:1; 3. isonicotinamida, I.	58
Figura 48 – Curvas de DSC de aquecimento: 1. roxadustate; 2. mistura roxadustate e nicotinamida (1:1); 3. nicotinamida. $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	59
Figura 49 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e nicotinamida obtido por moagem na proporção 1:1; 3. nicotinamida.	59
Figura 50 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. roxadustate; 2. mistura roxadustate e picolinamida (1:1); 3. picolinamida, II. $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	60
Figura 51 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida obtido por moagem na proporção 1:1; 3. picolinamida, II.	61
Figura 52 – Difrátogramas de raios-X de pó experimentais para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida (1:1); 3. picolinamida, II.	62
Figura 53 – Difrátogramas de raios-X de pó experimentais para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida (2:1); 3. mistura de roxadustate e picolinamida (1:1); 4. mistura de roxadustate e picolinamida (1:2); 5. picolinamida, II.	62
Figura 54 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida (3:1); 3. mistura de roxadustate e picolinamida (2:1); 4. mistura de roxadustate e picolinamida (1:1); 5. mistura de roxadustate e picolinamida (1:2); 6. Mistura de roxadustate e picolinamida (1:3); 7. Picolinamida, II, $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	63
Figura 55 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e pirazinamida 1:1, obtido por moagem; 3. pirazinamida, polimorfo α .	64
Figura 56 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. pirazinamida, α ; 2. mistura roxadustate e pirazinamida (1:1); 3. roxadustate. $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	64
Figura 57 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e cafeína obtido por moagem na proporção 1:1; 3. cafeína, α .	65
Figura 58 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. Roxadustate; 2. mistura roxadustate e cafeína (1:1); 3. cafeína, α . $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$	66
Figura 59 – Difrátogramas de raios-X de pó experimentais para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e cafeína (1:1); 3. cafeína, α .	66

Figura 60 – Difractogramas de raios-X de pó experimental para: 1. roxadustate; 2. misrura de roxadustate e cafeína (2:1); 3. mistura de roxadustate e cafeína (1:1); 4. misrura de roxadustate e cafeína (1:2); 5. cafeína, α .	67
Figura 61 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. roxadustate; 2. misrura de roxadustate e cafeína (2:1); 3. mistura de roxadustate e cafeína (1:1); 4. misrura de roxadustate e cafeína (1:2); 5. cafeína, α , $\beta = 10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.	67
Figura 62 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e teofilina obtido por moagem na proporção 1:1; 3. teofilina.	68
Figura 63 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. teofilina; 2. mistura roxadustate e teofilina (1:1); 3. roxadustate. $\beta = 10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.	69
Figura 64 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e ácido benzoico obtido por moagem na proporção 1:1; 3. ácido benzoico.	69
Figura 65 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. ácido benzóico; 2. mistura de roxadustate e ácido benzóico (1:1); 3. roxadustate. $\beta = 10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.	70
Figura 66 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. ácido tartárico; 2. mistura roxadustate e ácido tartárico (1:1); 3. roxadustate. $\beta = 10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.	71
Figura 67 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e ácido tartárico obtido por moagem na proporção 1:1; 3. ácido tartárico.	71

Índice de tabelas

Tabela 1 – Parâmetros cristalográficos do polimorfo α da fenilbutazona CCDC 755086 ⁸⁴	10
Tabela 2 – Reflexões relevantes no padrão de difração de raios-X de pó de alguns polimorfos da fenilbutazona ^{83,85,86,87,88}	11
Tabela 3 – Co-formadores utilizados neste trabalho, evidenciando possíveis pontos de interação para formação de co-cristais.....	14
Tabela 4 – Origem dos compostos utilizados e informações do fornecedor.....	19
Tabela 5 – Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.....	20
Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do primeiro aquecimento da amostra de fenilbutazona de partida, $\beta = 10$ °C/min., 20 °C/min e 2 °C/min.....	26
Tabela 7 – Fenilbutazona, parâmetros obtidos a partir das curvas de DSC de arrefecimento do fundido, de 115 °C a 25 °C, a diferentes velocidades de varrimento.....	29
Tabela 8 – Fenilbutazona: temperaturas de <i>onset</i> dos diferentes eventos registados nas curvas de DSC de aquecimento dos sólidos gerados a partir do arrefecimento do fundido, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min.....	30
Tabela 9 – Fenilbutazona: temperaturas de onset dos eventos registados nas curvas de DSC de aquecimento ($\beta = 10$ °C/min) de amostras obtidas por arrefecimento do fundido, após arrefecimento rápido ($\beta = -50$ °C/min).....	32
Tabela 10 – Caracterização morfológica dos sólidos obtidos nos processos de cristalização da fenilbutazona em diferentes solventes, observação sob luz polarizada, ampliação 200x.....	37
Tabela 11 – Caracterização morfológica dos sólidos obtidos no processo de cristalização do roxadustate em diferentes solventes, observação sob luz polarizada, ampliação 200x.....	51
Tabela 12 – Parâmetros cristalográficos para o monocristal de roxadustate obtido por cristalização em etanol a $T = 20$ °C, CCDC 1469842.....	53
Tabela 13 – Geometria das ligações de hidrogénio no cristal de roxadustate, CCDC 1469842.....	53

Abrevituras

AINE	Anti-inflamatório não-esteróide
API	do inglês <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
ATR	do inglês <i>Attenuated Total Reflection</i>
BA	do inglês <i>Benzoic Acid</i>
BCS	do inglês <i>Biopharmaceutical Classification System</i>
Caf	Cafeína
CCDC	do inglês <i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CSD	do inglês <i>Cambridge Structural Database</i>
DSC	do inglês <i>Differential scanning calorimetry</i>
EAFUS	do inglês <i>Everything added to food in US</i>
EAG	do inglês <i>Ethanol Assisted Grinding</i>
EMA	do inglês <i>European Medicines Agency</i>
ESA	do inglês <i>Erythropoiesis-stimulating Agent</i>
endo	Endotérmico
FBZ	Fenilbutazona
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	do inglês <i>Fourier Transform Infra Red</i>
GRAS	do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i>
HIF-PF	do inglês <i>Hypoxia-Inducible Factor Prolyl hydroxylase</i>
ICH	do inglês <i>International Conference on Harmonization</i>
INA	Isonicotinamida
LAG	do inglês <i>Liquid Assisted Grinding</i>
NA	Nicotinamida
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORTEP	do inglês <i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program</i>
PA	Picolinamida
PLTM	do inglês <i>Polarized Light Thermal Microscopy</i>
PZA	Pirazinamida
Roxa	Roxadustate
RTVMS	do inglês <i>Real Time Measurement System</i>
SCXRD	do inglês <i>Single Crystal X-Ray Diffraction</i>
ssNMR	do inglês <i>Solid-state nuclear magnetic resonance</i>
WADA	do inglês <i>World Anti-Doping Agency</i>
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
TA	do inglês <i>Tartaric Acid</i>
TGA	do inglês <i>Thermogravimetric analysis</i>
TG	Termogravimetria
Teof	Teofilina
XRPD	do inglês <i>X-Ray Powder Diffraction</i>

Resumo

O lançamento de um novo medicamento no mercado é um processo de custo elevado que pode levar 10-15 anos de trabalho árduo, desde a síntese e caracterização, passando por diferentes fases de ensaios. O desenvolvimento de novas formulações a partir de novas formas sólidas de ingredientes farmacêuticos ativos (API) pode trazer uma oportunidade única para o desenvolvimento de produtos confiáveis e mais eficazes com custo e intervalo de tempo limitado. A investigação de ocorrência de polimorfismo e a pesquisa de co-cristais como forma de otimizar as propriedades físico-químicas de APIs são de elevada relevância para encontrar a melhor forma de um API pouco solúvel, quer para ativos clássicos quer para ativos emergentes.

Nesta dissertação foi feita a investigação de formas sólidas de dois ativos farmacêuticos, a fenilbutazona e o roxadustate. A primeira parte do trabalho foi dedicada ao estudo de polimorfos da fenilbutazona, um anti-inflamatório não-esteróide bem estabelecido, atualmente usada em medicina veterinária. A molécula de fenilbutazona apresenta elevada flexibilidade conformacional, e diferentes formas polimórficas e vários solvatos estão referenciadas na literatura. Contudo, os resultados apresentados nos vários estudos sobre são pouco claros. Neste trabalho foi efetuada uma investigação sistemática das formas polimórficas de fenilbutazona obtido em diferentes condições experimentais, tendo sido possível estabelecer condições reprodutíveis para obtenção de alguns dos polimorfos desse composto e caracterizá-los inequivocamente por difração de raio-X e espectroscopia de infravermelho.

A segunda parte do trabalho foi dirigida à investigação de polimorfos e à pesquisa de co-cristais do roxadustate, um ativo recente, inibidor do HIF-PH (fator indutor de prolil hidroxilase), em fase III de ensaios clínicos. A investigação de polimorfismo do roxadustate não revelou novas formas sólidas, mas permitiu resolver a estrutura cristalina por difração de raios-X de monocristal, a partir de cristais obtidos por cristalização em etanol.

Para a pesquisa de co-cristais foram selecionados diversos co-formadores com grupos funcionais complementares aos do roxadustate, possibilitando a formação de diferentes sintões supramoleculares. Como método de preparação das misturas binárias foi usado a mecanoquímica com assistência de solvente (etanol). Os sólidos obtidos foram caracterizados por calorimetria diferencial de varrimento, termomicroscopia com luz polarizada, espectroscopia de infravermelho e difração de raios-X de pó. Foram identificados dois co-cristais de roxadustate com os co-formadores picolinamida e a cafeína, na proporção (1:1). Com os outros co-formadores, nicotinamida, isonicotinamida, pirazinamida, teofilina, ácido tartárico e ácido benzóico, não ocorreu formação de co-cristais, nas condições utilizadas. Os resultados globais desta pesquisa de co-cristais são de grande utilidade para investigação futura de efeitos de competição entre sintões na formação de co-cristais.

Palavras-chave: Fenilbutazona, roxadustate, polimorfismo, co-cristal farmacêutico, sínteses supramoleculares, piridinacarboxmidas, cafeína, teofilina.

Abstract

The launch of a new drug on the market is a costly process that can take 10-15 years of hard work, from synthesis and characterization, to different stages of testing. The development of new formulations from new solid forms of active pharmaceutical ingredients (APIs) can bring a unique opportunity for the development of reliable and more effective products with limited cost and time. Polymorphism research and the search for co-crystals as a way of optimizing the physico-chemical properties of APIs are of great relevance in finding the best form of a poorly soluble API, both for classical and emerging active.

In this thesis, we investigated the solid forms of two active pharmaceutical ingredients, phenylbutazone and roxadustat. The first part was dedicated to the study of polymorphs of phenylbutazone, a well-established anti-inflammatory non-steroid, currently used in veterinary medicine. The phenylbutazone molecule presents high conformational flexibility, and different polymorphic forms and several solvates are referenced in the literature. However, the results presented in the various studies are unclear. In this work a systematic investigation of the polymorphic forms of phenylbutazone, obtained in different experimental conditions, was carried out and it was possible to establish reproducible conditions to obtain some of the polymorphs of this compound and to characterize them unequivocally by X-ray diffraction and infrared spectroscopy.

The second part was directed to the investigation of polymorphs and to the co-crystals research of roxadustat, a recent active, inhibitor of HIF-PH (hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibitor) in Phase III clinical trial. The polymorphism investigation of the roxadustat did not reveal new solid forms, but allowed to solve the crystalline structure by X-ray diffraction of mono-crystal, from crystals obtained by crystallization in ethanol.

For the co-crystals research, several co-formers with functional groups complementary to those of roxadustat were selected, allowing the formation of different supramolecular synthons. Mechanochemistry with solvent assisted (ethanol) was used as a method of preparation of the binary mixtures. The solids obtained were characterized by differential scanning calorimetry, polarized light thermomicroscopy, infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction. Two co-crystals of roxadustat were identified with the co-formers picolinamide and caffeine in the ratio (1:1). With the other co-formers, nicotinamide, isonicotinamide, pyrazinamide, theophylline, tartaric acid and

benzoic acid, no co-crystals were formed under the used conditions. The overall results of this co-crystals research are of great use for future investigation of competition effects between synthons in the formation of co-crystals.

Keywords: Phenylbutazone, roxadustat, polymorphism, pharmaceutical co-crystal, supramolecular synthons, pyridinecarboxmides, caffeine.

1. Introdução

As propriedades de um material sólido dependem não só da identidade dos seus constituintes, mas também do seu arranjo na estrutura sólida¹. No estado sólido, dependendo do empacotamento interno das unidades constituintes, os materiais podem ser classificados como cristalinos ou amorfos (ou uma combinação de ambos)². Num sólido cristalino há ordem de longo alcance bem definida³, em que os componentes, átomos, moléculas, ou iões, estão dispostos numa ordem regular, repetindo os padrões em três dimensões¹. Os sólidos amorfos não possuem a ordem tridimensional de longo alcance característica dos cristais, mas podem exibir ordem de curto alcance⁴.

O sólido cristalino é constituído por unidades estruturais base, denominadas células unitárias, que se repetem regular e indefinidamente em três dimensões no espaço⁵. A célula unitária tem uma forma e orientação definidas, configurando sete sistemas cristalinos: cúbico, tetragonal, ortorrômbico, romboédrico, monoclinico, triclinico e hexagonal⁶. Alguns destes sistemas, podem ter, para além da célula primitiva, uma célula de corpo centrado, de face centrada ou de base centrada. Assim numa distribuição espacial a três dimensões há 14 tipos de células unitárias distintas, as chamadas redes de Bravais⁷.

É bastante comum um único constituinte existir em mais do que um arranjo cristalino¹, o que pode representar mudança nas suas propriedades físico-químicas, como energia de superfície, densidade, compressibilidade, ponto de fusão, solubilidade, estabilidade física e química e comportamento biofarmacêutico (dissolução, biodisponibilidade)². A diversidade de formas no estado sólido, para uma mesma molécula, é modulada por interações não covalentes tais como ligação de hidrogénio, forças de van der Waals, interações $\pi - \pi$ e interações electrostáticas^{8,9}. Essas interações intermoleculares são responsáveis pela associação de tais sistemas em estruturas supramoleculares¹⁰.

A maioria dos ingredientes farmacêuticos activos (API) são sólidos cristalinos à temperatura ambiente e são normalmente administrados sob a forma de dosagens orais sólidas, tais como comprimidos, cápsulas, etc.¹¹, em grande parte, devido às vantagens combinadas de facilidade de fabrico, custos mais baixos, fácil manuseamento e vida útil (na prateleira) mais longa¹². Além disso, proporcionam uma maneira estável e conveniente de caracterizar, transportar, armazenar, etc.¹³, em comparação com formas líquidas ou injectáveis. Frequentemente, as formas cristalinas de um API exibem baixa solubilidade aquosa¹⁴, classes II e IV do sistema de classificação biofarmacêutica, BCS¹⁵, que limita a biodisponibilidade oral¹⁶, e pode ser apropriado usar uma forma amorfa mais solúvel¹⁷ como forma de aumentar o potencial terapêutico^{11,18}. Contudo, a necessidade de satisfazer

as especificações em termos de estabilidade termodinâmica, pureza e processamento faz com que a forma cristalina seja geralmente preferida¹⁹, pois tende a ser mais estável, reproduzível e passível de purificação²⁰.

Um fármaco pode existir em mais do que uma forma sólida (cristalina ou amorfa), podendo apresentar propriedades físicas e químicas significativamente diferentes^{21,13}, incluindo cor, morfologia, higroscopicidade, estabilidade, dissolução, biodisponibilidade e solubilidade²². Neste contexto, a capacidade de administrar o fármaco ao doente de uma forma segura, eficaz e rentável depende, em grande parte, das propriedades físico-químicas do estado sólido do API²³ e é científica e clinicamente imperativo a identificação da melhor forma de um candidato farmacêutico²⁴. É também importante para perspectivas legais e reguladoras²⁰.

Compreender, caracterizar e controlar as propriedades químicas e físicas dos APIs sólidos é crucial para o desenvolvimento de cada fármaco e processos de produção farmacêutica. Assim, o desenvolvimento de metodologias que facilitem a geração de formas sólidas de forma reproduzível e a contribuição para o conhecimento da química do estado sólido é essencial na indústria farmacêutica^{10,22} e em todos os outros domínios onde diferenças na forma sólida podem influenciar as propriedades do material.

1.1. Polimorfismo

O polimorfismo, amplamente estudado em ingredientes farmacêuticos activos (API), é a capacidade de um composto existir em mais de uma forma cristalina e tem atraído muita atenção nas ciências farmacêuticas²⁵.

A primeira referência foi feita pelo químico alemão Mitcherlich, em 1822, mas a primeira definição moderna²⁶ é provavelmente a de McCrone, que definiu o polimorfismo como “uma fase cristalina sólida de um dado composto resultante da possibilidade de pelo menos dois arranjos cristalinos das moléculas desse composto no estado sólido”²⁷, Figura 1.

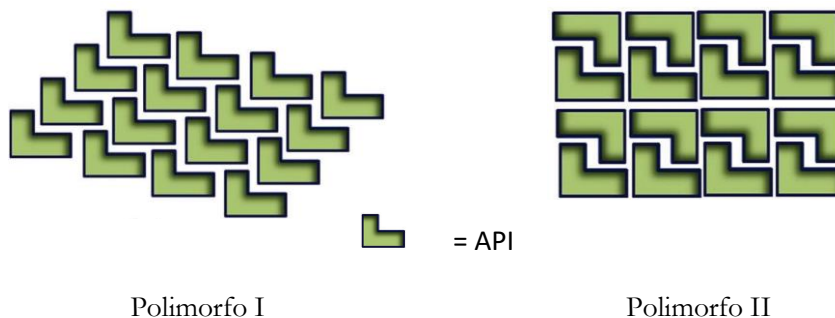


Figura 1 – Esquema de dois empacotamentos cristalinos distintos de um API¹⁹.

Por sua vez, a FDA, (*Food and Drug Administration*) a agência reguladora dos EUA que supervisiona a indústria farmacêutica, classifica os polimorfos como “diferentes formas cristalinas da mesma substância”. Inclui produtos de solvatação ou hidratação, também conhecidos como pseudopolimorfos, e formas amorfas. Diferenças nestas formas podem, em alguns casos, afetar a qualidade ou o desempenho dos novos medicamentos. Nos casos em que existem diferenças que demonstrem afetar o desempenho do fármaco, biodisponibilidade ou estabilidade, deve ser especificado o estado sólido apropriado²⁸. De acordo com o esquema regulatório atual, diferentes formas polimórficas são consideradas como os mesmos ingredientes ativos²¹.

Acredita-se que mais de 50 % dos APIs existem em mais de uma forma polimórfica²⁵.

Os polimorfos refletem a interação de empacotamento próximas e interações intermoleculares em cristais orgânicos²⁹. Embora idênticos na composição química, polimorfos podem diferir em biodisponibilidade, solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade química, estabilidade física, ponto de fusão, cor, densidade, fluidez e muitas outras propriedades^{27,30}.

No passado, várias falhas clínicas surgiram durante as fases de comercialização, em alguns casos com graves repercussões para a indústria farmacêutica, como a obrigação de retirar ou reformular o produto³¹. Exemplo disso, foram os célebres casos Zantac³² e Ritonavir³¹, ocorridos na década de 1990. Nos últimos anos, organismos reguladores como o FDA e o ICH pressionaram a indústria farmacêutica a adotar metodologias e técnicas analíticas inovadoras que deveriam proporcionar uma melhor compreensão do fenômeno do polimorfismo para cada fármaco em desenvolvimento e permitir que os departamentos de controle de qualidade avaliem adequadamente o estado sólido dos lotes produzidos³³, uma vez que pode afetar a qualidade, segurança e eficácia do medicamento²².

Os polimorfos oferecem uma oportunidade única para estudar as relações estrutura-propriedade do mesmo composto formado em diferentes ambientes supramoleculares³⁴. Geralmente, o polimorfismo pode ser dividido em duas categorias principais: polimorfismo conformacional, e polimorfismo de empacotamento^{30,35}. O polimorfismo conformacional refere-se à ocorrência de diferentes conformações moleculares em diferentes polimorfos, enquanto polimorfos de empacotamento diferem no empacotamento cristalino tridimensional total³⁴. Embora as estatísticas possam servir de orientação, cada composto representa um novo sistema e ainda não há meios para saber, sem experimentação apropriada, quantas formas cristalinas podem existir, como preparar essas formas cristalinas desconhecidas, ou uma vez preparadas, quais serão as suas propriedades. O polimorfismo é imprevisível com base na estrutura molecular³⁶.

A flexibilidade ou tamanho molecular parece não ter correlação com a capacidade de um composto apresentar polimorfos. As moléculas quirais são menos propensas a polimorfismo do que as suas contrapartes aquirais e os compostos capazes de ligação a hidrogénio exibem apenas uma propensão ligeiramente mais elevada para polimorfismo do que aqueles que não o fazem³⁶.

Como a nucleação de cristais é o passo primário de um processo de cristalização, pois determina as características do produto resultante, tais como a distribuição do tamanho do cristal e o polimorfismo, o controle da qualidade do produto de materiais cristalinos passa pelo controle da nucleação do cristal³⁷. Além da cristalização, durante o processo de formulação do fármaco, outros passos do procedimento podem levar a alterações polimórficas, tais como os processos de micronização, granulação húmida, secagem e compressão, pelo que, durante o período de validade de um fármaco, as formas menos estáveis podem converter-se nas mais estáveis³⁸.

O estudo de polimorfos de um fármaco deve passar por uma caracterização completa, incluindo estabilidade termodinâmica e cinética^{39,5}.

Vários métodos analíticos têm sido utilizados para caracterizar a forma cristalina do fármaco durante as várias etapas de processamento e desenvolvimento⁵. As técnicas convencionalmente usadas incluem, principalmente, difração de raios-X de monocristal (SCXRD), difração de raios-X de pó (PXRD), métodos térmicos como calorimetria de varrimento diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA), métodos microscópicos, métodos espectroscópicos (espectroscopia de infravermelho⁴⁰, espectroscopias Raman e ressonância magnética nuclear de estado sólido (ssNMR)¹⁹).

De acordo com a estabilidade termodinâmica, os polimorfos podem ser classificados como monotrópicos ou enantiotrópicos. No caso de dois sistemas cristalinos monotrópicos uma forma é mais estável do que a outra, em toda a gama de temperaturas, à pressão considerada. Para os polimorfos enantiotrópicos há uma temperatura de transição sólido-sólido, reversível, abaixo das temperaturas de fusão; acima e abaixo da temperatura de transição a ordem de estabilidade termodinâmica inverte-se⁴.

1.2. Co-cristais

A co-cristalização de ingredientes farmacêuticos activos na presença de co-formadores farmacologicamente aceitáveis emergiu como uma técnica viável para melhorar a solubilidade^{9,8, 20, 41} e biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis^{17,42}, sem alterar a bioatividade inerente dos APIs de interesse⁴³. Para além de potenciais melhorias na solubilidade e biodisponibilidade oral, os co-

cristais farmacêuticos melhoram frequentemente outras propriedades essenciais dos APIs tais como higroscopicidade, estabilidade física e química, compressibilidade e fluidez²³.

Relatados pela primeira vez por Wöhler em 1844 durante estudos com quinona¹², os co-cristais são definidos como sistemas multicomponentes, Figura 2, formados por dois ou mais componentes sólidos, quando puros, em condições ambientais, numa relação estequiométrica definida, estabilizados através de interações não-covalentes tais como ligações de hidrogénio, interações π - π ou ligações de halogéneos^{12, 44,45,46}. A ligação de hidrogénio é o tipo de interação mais importante na engenharia de cristal, pois combina a força com a direcionalidade⁴⁷.

A Figura 2 esquematiza a diferença entre três tipos de sólidos multicomponentes envolvendo um API, solvatos, co-cristais e sais.

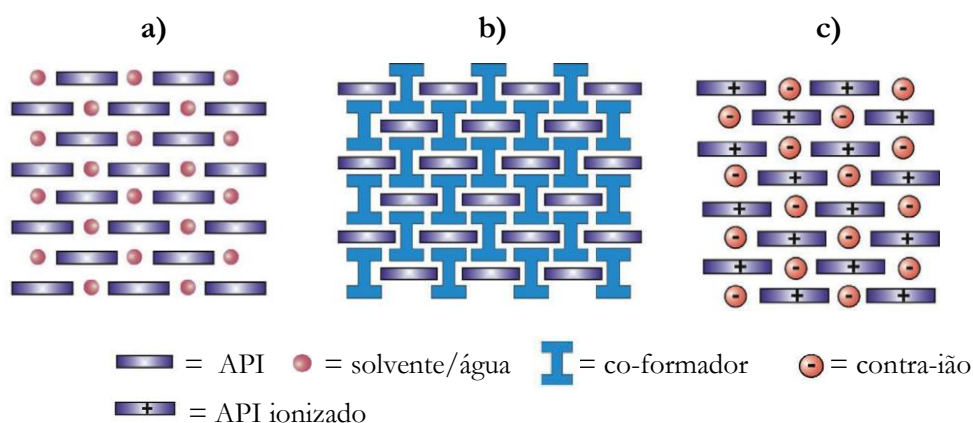


Figura 2 – Representação esquemática de sistemas cristalinos multicomponentes: **a)** solvato; **b)** co-cristal; **c)** sal⁴².

A principal diferença entre os solvatos cristalinos e os co-cristais consiste no estado físico dos seus componentes puros isolados: se um dos componentes é um líquido à temperatura ambiente, os cristais são designados como solvatos/hidratos; se ambos os componentes são sólidos à temperatura ambiente, este sistema é designado por co-cristal^{18, 23, 48}. Tais diferenças podem afetar profundamente a estabilidade, o processamento e as propriedades físicas dos APIs⁸. Os solvatos envolvem inerentemente o risco de dessolvatação espontânea. A formação de co-cristais é mais versátil do que a formação de sal, visto que não requer um centro ionizável no API, e há consideravelmente mais compostos aceitáveis como co-formadores do que contra-íons farmacologicamente aceitáveis^{33, 49}. Esta divisão dos sólidos multicomponentes, no entanto, não é estanque como ilustrado na Figura 3.

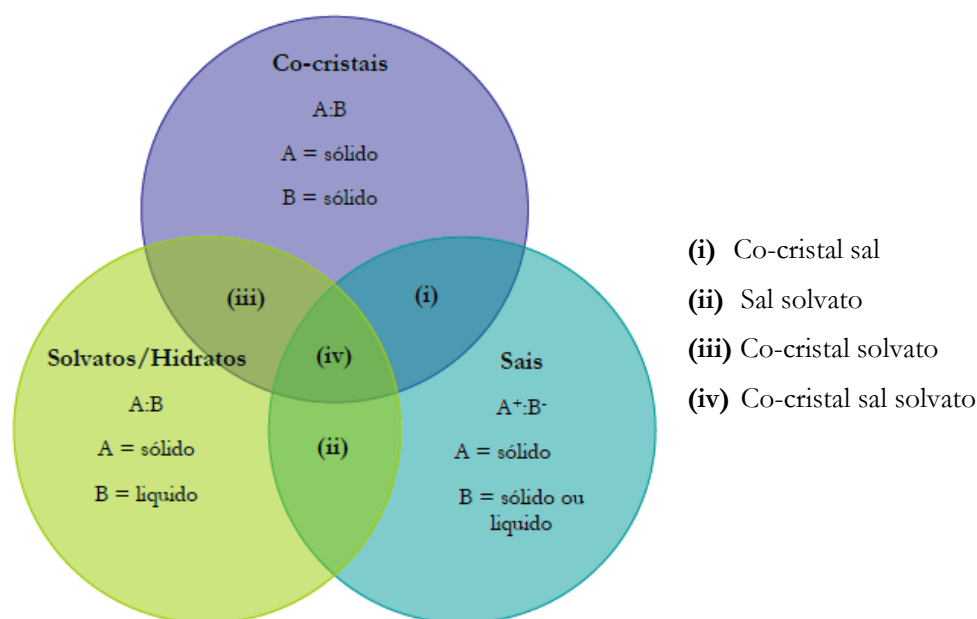


Figura 3 – Sobreposição de classes de cristais multicomponentes²¹.

Os co-cristais apresentam uma oportunidade para manipular a disposição de moléculas no estado sólido usando estratégias de *design* baseadas em sintões supramoleculares^{21, 50}. Desiraju “cunhou”⁵¹ o termo sintão supramolecular e definiu-os como “unidades estruturais dentro das supermoléculas que podem ser formadas e / ou montadas por interações intermoleculares conhecidas ou concebíveis”⁵².

Para implementar uma estratégia de conceção de co-cristais, uma série de co-formadores são cuidadosamente selecionados pela sua capacidade de formar sintões supramoleculares com a molécula alvo¹⁹. Dependendo do tipo de grupos funcionais envolvidos nas ligações de hidrogénio que conduzem ao arranjo supramolecular, os sintões foram divididos por Walsh et al.⁵³ em homossintão, entre os mesmos grupos funcionais complementares, por exemplo dímeros ácido carboxílico–ácido carboxílico e amida–amida, e heterossintão, entre grupos funcionais diferentes, mas complementares, como ácido–azoto aromático e ácido–amida, Figura 4.

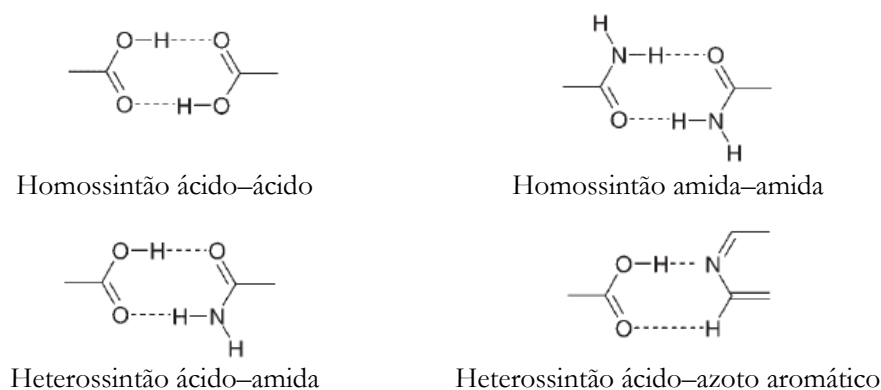


Figura 4 – Sintões supramoleculares mais comuns em co-cristais⁴².

Uma análise sistemática, recorrendo à Cambridge Structural Database (CSD), permite identificar os sintões supramoleculares mais confiáveis e é fundamental para a seleção de co-formadores^{8, 54}. Por exemplo, se uma molécula contém um grupo de ácido carboxílico, com base na frequência de ocorrência na CSD, as interações ácido carboxílico-azoto aromático através da ligação de hidrogénio O-H...N, são as mais prováveis, e a ordem de preferência de grupos funcionais no co-formador é azoto aromático > amida > ácido.

A abordagem de sint supramolecular tem falhas, pois embora a formação de sintões supramoleculares possa ser favorável, a própria supermolécula pode não empacotar numa estrutura cristalina ordenada, pois não são considerados fatores tais como por exemplo, a competição entre os diferentes grupos funcionais presentes no API^{42, 55} e no co-formador.

Existe um grande número de potenciais co-formadores considerados não tóxicos, entre os quais se incluem aditivos alimentares, conservantes, excipientes farmacêuticos, vitaminas, aminoácidos e outras biomoléculas, assim como outros APIs⁵⁶. Podem ser escolhidos entre as mais de 3000 substâncias incluídas nas listas EAFUS⁵⁷ (*Everything Added to Food in the US*) ou GRAS⁵⁸ (*Generally Regarded as Safe*)⁵⁹.

Tendo seleccionado co-formadores putativos, várias abordagens para a obtenção do co-cristal são possíveis⁴². A cristalização a partir de solução⁶⁰, ou a moagem mecânica^{61, 62} são algumas das técnicas utilizadas. Na cristalização de solução⁶³, o API e co-formador, numa quantidade estequiométrica apropriada, são dissolvidos num solvente. Todos os componentes necessitam de ser solúveis no solvente, ou mistura de solventes seleccionados⁴². Porém, os métodos em solução são susceptíveis de falhar no rastreio de co-cristais de APIs de baixa solubilidade, uma vez que ocorre frequentemente separação do API sólido, sendo o co-formador mais solúvel retido em solução⁴⁹. A

competição de fatores cinéticos, associada à etapa de nucleação do processo de cristalização, também deve ser levada em consideração⁶⁴.

Uma abordagem alternativa é a moagem em estado sólido, na qual dois sólidos são triturados juntos usando um almofariz ou num moinho de mistura (ex: moinho de bolas) para induzir a formação de co-cristais⁶³. A mecanoquímica⁵⁶ foi recentemente redescoberta para atender a procura de processos limpos e reações ambientalmente amigáveis, sem adição de solvente ou somente de quantidades residuais^{8, 49, 63, 65}. A moagem com quantidades muito pequenas de líquido adicionado (denominada LAG – *liquid assisted grinding*, *solvent drop grinding* ou *kneading*) pode acelerar as reações de co-cristalização e dar produtos de maior grau de cristalinidade⁵⁰ em comparação com a moagem pura (*neat grinding*)⁶⁶. O método mecanoquímico parece ser mais eficiente para o *screening* do que os métodos de cristalização em solução⁴² e pode proporcionar um meio bem sucedido de controlar o resultado da co-cristalização^{63, 67}, nomeadamente a formação de solvatos⁵⁰.

A co-cristalização em solução, no entanto, pode permitir obter monocristais⁶⁸, quando obtidos com características específicas, a partir dos quais pode ser possível determinar a estrutura cristalina, por difração de raios-X de monocristal⁵, o que não é possível por mecanoquímica.

Para além da cristalização em solução e moagem, outros métodos tais como cristalização a partir da fusão, sublimação, fluidos supercríticos, compressão húmida ou a seco, ou ainda moagem assistida por polímeros⁶⁹ têm sido usados na pesquisa de co-cristais^{8, 34, 42}.

Os co-cristais têm, também, grande potencial na indústria farmacêutica, no que diz respeito a proteção da propriedade intelectual e a extensão dos ciclos de vida de APIs⁴⁴, pois satisfazem bem os critérios de patenteabilidade de novidade, não-evidência e utilidade²⁴. Embora a formação de co-cristais farmacêuticos possa ser guiada pelo conceito de sintões supramoleculares, esta não é uma metodologia exata, como se disse, e as propriedades físico-químicas do material resultante não podem ser prontamente previstas²⁴.

1.3. Fenilbutazona

A fenilbutazona, 1,2-difenil-4-*n*-butilpirazolidin-3,5-diona, Figura 5, é um anti-inflamatório não-esteróide, AINE, com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, sintetizado pela primeira vez nos laboratórios de investigação da J. R. Geigy em Basel, Suíça⁷⁰.

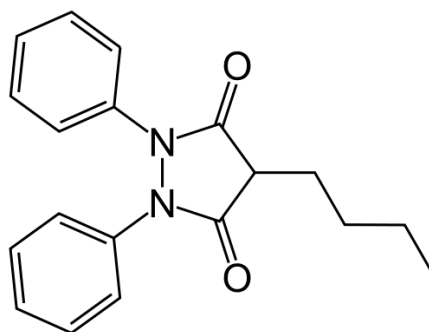


Figura 5 – Estrutura molecular da fenilbutazona, FBZ.

A sua primeira aplicação clínica foi numa mistura em partes iguais com a aminopirina (4-dimetilaminoantipirina), de forma a promover a solubilidade da aminopirina para administração parental^{71,71}. Foi introduzido na medicina humana em 1949 como uma nova classe de fármaco, agente anti-inflamatório não-esteróide para uso no tratamento de dores inflamatórias agudas e crónicas, nomeadamente, várias formas de artrite^{71,72,73} e em 1952 foi posto no mercado com o nome comercial de Butazolidina, licenciado originalmente pela Farmacêutica Geigy e subsequentemente pela Farmacêutica Novartis^{70, 74}. Provou ser um excelente analgésico, e durante aproximadamente 30 anos, foi usado extensivamente, como fármaco de eleição para o tratamento de artrite reumatóide e gota^{75,74}. Após a identificação de um conjunto de efeitos adversos^{74,76,77,78,79} o seu uso na medicina humana foi limitado, com a licença para uso em humanos revogada no Reino Unido em 1984⁸⁰ e nos Estados Unidos⁷⁴.

Introduzida na medicina veterinária nos anos cinquenta do século passado, tem sido usada em cães, numa escala mais reduzida, e mais extensivamente em cavalos, por mais de 50 anos^{75, 78, 81}. É o AINE mais comumente usado na ortopedia equina em todo o mundo⁸². O uso de FBZ em cavalos de corrida, entre outros AINEs, configura prática de “doping” quando usado intencionalmente para esconder condições patológicas⁸¹.

1.3.1 Formas sólidas da fenilbutazona

A molécula de fenilbutazona, como é evidente da estrutura molecular, Figura 5, não apresenta grupos susceptíveis de associação por ligações de hidrogénio. Tem, no entanto, elevada flexibilidade conformacional o que poderá potenciar diferentes estruturas em fase sólida. De fato, foram identificados, até ao momento, diferentes polimorfos de fenilbutazona, sendo o polimorfo δ o termodinamicamente estável à temperatura ambiente⁸³ e os outros polimorfos, denominados por α , β , γ , e ϵ , metastáveis⁸³. Foi depositada na CSD (*Cambridge Structural Database*), em 2009, uma estrutura cristalina referente ao polimorfo α ⁸⁴, enantiotrópico relativamente a δ e estável a baixas

temperaturas⁸³. A célula unitária de empacotamento cristalino encontra-se representada na Figura 6 e os parâmetros cristalográficos na Tabela 1, respetivamente.

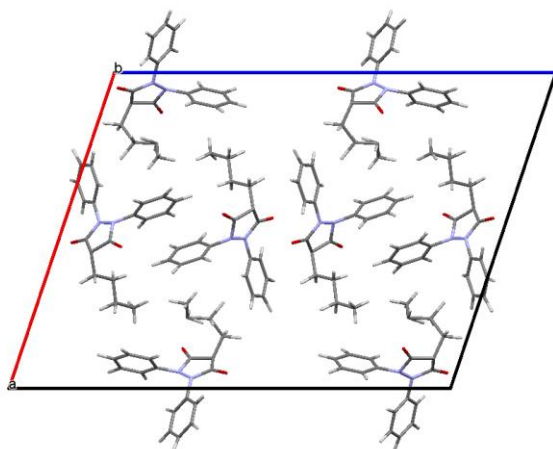


Figura 6 – Empacotamento cristalino do polimorfo α da fenilbutazona, CCDC 755086⁸⁴.

Tabela 1 – Parâmetros cristalográficos do polimorfo α da fenilbutazona CCDC 755086⁸⁴.

Polimorfo α [CCDC 755086]	
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1/c$
$a / \text{Å}$	21,415(4)
$b / \text{Å}$	5,7295(10)
$c / \text{Å}$	27,782(5)
$\alpha / ^\circ$	90
$\beta / ^\circ$	108,068(3)
$\gamma / ^\circ$	90
$V / \text{Å}^3$	3240,68
Z	8

Müller⁸⁵ caracterizou os polimorfos α , β e δ , a partir da diferença no padrão de difração de raios-X de pó, pela posição dos três principais picos no difratograma, Tabela 2. Na tabela inclui-se também comparação das reflexões em difração de raios-X de pó, atribuídas por diferentes autores aos diferentes polimorfos.

Tabela 2 – Reflexões relevantes no padrão de difração de raios-X de pó de alguns polimorfos da fenilbutazona^{83,85,86,87,88}.

Polimorfo	2θ /°				
	Müller ⁸⁵	Madsuda ⁸⁶	Matsumoto ⁸⁸	Kaneniwa ⁸⁷	Grant ⁸³
α	8,7 ± 0,2	6,6	6,7	13,3	6,7
	19,4	19,1	13,3	6,7	8,6
	6,9			8,6	9,0
				9,0	13,3
β	8,35 ± 0,2	16,4	8,6	7,1	
	20,2	20,1		8,4	
	7,05			16,5	
δ	7,09 ± 0,2	7,1	5,1	5,1	8,05
	20,7	21,0	7,3		20,8
	7,05		8,0		
			15,5		
ε			8,2		
			10,7		
			13,5		
ξ			6,7		
			8,4		
			15,8		

Além de diferentes polimorfos, há também referência na literatura a vários solvatos, sendo que os primeiros a ser descritos foram os de ciclo-hexano e isobutanol^{89,85}, porém sem resolução das estruturas cristalinas. Em 2004 foram descritas as estruturas cristalinas de cinco solvatos da fenilbutazona 2:1, com benzeno, ciclo-hexano, 1,4-dioxano, tetra-hidrofurano e tetraclorometano⁹⁰.

Nos vários estudos encontrados na literatura versando a investigação da fenilbutazona, os resultados apresentados por diferentes autores são com frequência confusos, começando pela nomenclatura utilizada e por exemplo, no que diz respeito a efeitos de velocidades de aquecimento/arrefecimento na obtenção de diferentes formas polimórficas e também à caracterização das formas obtidas a partir de diferentes solventes. Este composto constitui, portanto, um desafio e uma oportunidade de obter uma identificação clara e inequívoca das diferentes formas polimórficas.

1.4. Roxadustate

O roxadustate, *n*-[(4-hidroxi-1-metil-7-fenoxi-3-isoquinolina)carbonil]-glicina ou 2-[(4-hidroxi-1-metil-7-fenoxisoquinolina-3-carbonil)amino] ácido acético, Figura 7, conhecido como FG-4592 (*FebroGen's anaemia drug*)⁹³, é uma pequena molécula inibidora do HIF-PH (fator indutor de prolil hidroxilase), encontrando-se em fase III de ensaios clínicos para o tratamento da anemia em pacientes com doença crónica dos rins. Pode tornar-se uma primeira opção no tratamento^{93,94,95} desta doença. A anemia é uma complicação comum em pacientes com doença renal crónica e a prevalência e gravidade da anemia aumenta com a gravidade da doença⁹⁶.

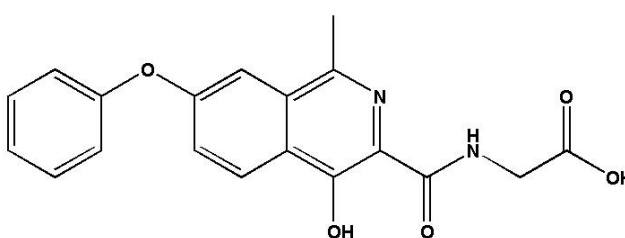


Figura 7 – Estrutura molecular do roxadustate.

Aumentar a capacidade do sangue para o transporte de oxigénio por agentes estimuladores da eritropoiese (ESAs), como é o caso do roxadustate, constitui um processo proibido de melhoria de desempenho, de acordo com a Agência Mundial Anti-Doping (WADA)⁹⁷. Roxadustate pertence a uma nova classe de drogas com alto potencial dopante⁹⁸. A WADA assinalou estabilizadores HIF e roxadustate (FG-4592), em particular, como substâncias proibidas desde 2011⁹⁸.

É um composto recente, com poucos estudos publicados, sendo que o que existe a nível do estado sólido, está descrito em patentes. Foram descritas várias formas sólidas do roxadustate, nomeadamente um hemi-hidrato, alguns solvatos e sais, e uma forma amorfa. Foi apresentada também, a conformação molecular obtida por difração de raios-X e as dimensões da célula unitária, conjuntamente com a curva de DSC, onde é observado um pico endotermico a $T \sim 223$ °C, correspondente à fusão (Ver patentes US 2015/0031721, US 2015/00322015 publicadas a 29 de Janeiro e 12 de Novembro de 2015, respetivamente).

2. Objetivo

O trabalho apresentado nesta tese tem como objetivo a investigação de formas sólidas de dois ativos farmacêuticos, a fenilbutazona e o roxadustate.

Como se referiu a fenilbutazona é um anti-inflamatório não esteróide que, apesar de ter sido usado extensivamente como fármaco de eleição para o tratamento de artrite reumática e gota, por mais 30 anos, viu o seu uso ser limitado na medicina humana, depois da identificação de um conjunto de efeitos adversos. A molécula de fenilburazona tem elevada flexibilidade conformacional e, até ao momento, foram identificadas diferentes formas polimórficas e vários solvatos. Contudo, os resultados apresentados na literatura são confusos.

Neste trabalho é feita a pesquisa de polimorfos de fenilbutazona e uma tentativa de obter uma identificação clara e inequívoca das diferentes formas polimórficas. Apesar de se tratar de um ativo bem estabelecido, o esclarecimento do seu comportamento em estado sólido, é uma contribuição para o conhecimento, mas também para uma eventual melhoria das propriedades físico-químicas, da fenilbutazona, dois objetivos que são sempre atuais, mesmo para ativos clássicos.

O roxadustate, como já foi referido anteriormente, é uma pequena molécula inibidora do HIF-PH e que se encontra na fase III de ensaios clínicos para o tratamento em anemia com doença crónica dos rins. Sendo um fármaco recente, apresenta uma oportunidade de pesquisa de novas formas sólidas. Algumas formas sólidas, nomeadamente vários solvatos e uma forma amorfa estão descritas na literatura, mas nenhum co-cristal foi, até agora, relatado.

Assim, para este ativo, para além da investigação de polimorfos, foi feita também a pesquisa de co-cristais com um conjunto de co-formadores escolhidos com base na probabilidade de formação de interações supramoleculares com os diferentes grupos funcionais do roxadustate, por serem considerados GRAS e/ou por serem ativos farmacêuticos.

Na Tabela 3 encontram-se os co-formadores escolhidos para a pesquisa de co-cristais com o roxadustate, Figura 8, estando evidenciados os grupos que podem participar em ligações de hidrogénio para formação de sintões supramoleculares. Dada a complexidade da molécula de roxadustate, não são de excluir efeitos de competição na formação de heterossintões.

Roxadustate (API)

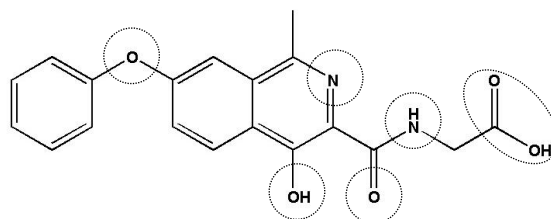
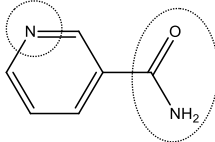
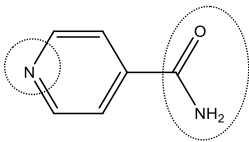
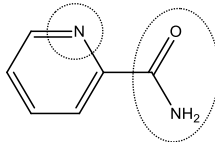
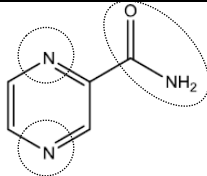
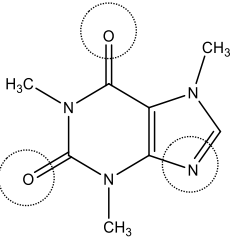
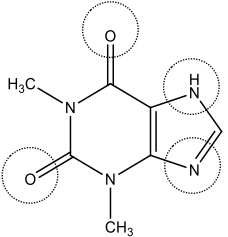
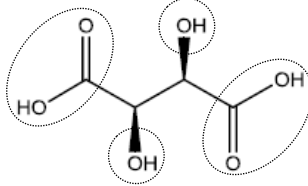
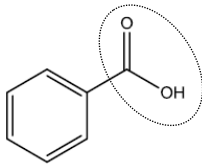


Figura 8 – Estrutura molecular do roxadustate, evidenciando grupos que podem participar em ligações de hidrogénio.

Tabela 3 – Co-formadores utilizados neste trabalho, evidenciando possíveis pontos de interação para formação de co-cristais.

Nicotinamida (NA)	Isonicotinamida (INA)	Picolinamida (PA)	Pirazinamida (PZA)
			
Cafeína (Caf)	Teofilina (Teof)	Ácido tartárico (TA)	Ácido benzóico (BA)
			

As piridinacarboxamidas (nicotinamida, isonicotinamida e picolinamida) possuem um grupo amida com dois grupos dadores e dois aceitadores em ligações de hidrogénio, o grupo carbonilo e o azoto aromático. A pirazinamida, com um anel de pirazina, tem dois átomos de azoto no anel aromático, estando o grupo amida em posição orto relativamente a um deles, como na picolinamida, e meta relativamente ao outro (como na nicotinamida). As interações por ligações de hidrogénio mais prováveis para estas moléculas originam a formação dos heterossintões ácido–amida e/ou ácido–azoto aromático.

As xantinas, cafeína e teofilina, possuem três grupos aceitadores em ligação de hidrogénio, o grupo imidazole, com um átomo de azoto, e dois grupos carbonilo, sendo que a interação mais provável será através do azoto do imidazole formando o heterossintão ácido–imidazole. Além disso,

a teofilina possui um grupo amina que lhe confere capacidade de dador de ligação em hidrogénio, possibilitando a interação através da ligação de hidrogénio N-H...O.

O ácido tartárico e o ácido benzóico, com grupos dadores e aceitadores de ligação de hidrogénio (O-H e carbonilo, respetivamente) permitem explorar a possível formação do homossintão ácido-ácido, dímero ou em cadeia.

Como já foi referido, novas formas sólidas de um API poderão incrementar as suas propriedades, tais como biodisponibilidade oral, e, no caso de co-cristais API-API, poderá, para além disso, ser útil na terapia dual.

2.1. Co-formadores utilizados neste trabalho

As piridinacarboxamidas são amplamente utilizadas como co-formadores^{99,100,101} para a síntese de co-cristais farmacêuticos.

A nicotinamida, piridina-3-carboxamida, é uma das três piridinacarboxamidas isoméricas, um dos componentes da vitamina B¹⁰², designada como vitamina B3, e amplamente utilizada para consumo humano^{23,103}. Pertence ao grupo de substâncias geralmente consideradas como seguras, GRAS⁵⁸. Apresenta elevada solubilidade aquosa e pertence à classe I de acordo com a BCS¹⁰⁴. A nicotinamida I, (Nic1¹⁰⁵) cuja estrutura foi resolvida por Miwa *et al.*¹⁰⁶, é a forma termodinamicamente estável em condições ambientais. Foram referidas três formas polimórficas, II, III e IV, metaestáveis, identificadas em cristalização de fundidos¹⁰². Uma segunda estrutura foi resolvida recentemente, por Li *et al.*, Nic2, durante uma tentativa de co-cristalização da nicotinamida com o isoxil. Nic1 e Nic2 são monotropicamente relacionados¹⁰⁵.

A isonicotinamida (piridina-4-carboxamida), é um dos co-formadores mais populares utilizados na preparação de co-cristais. Dois polimorfos da isonicotinamida foram relatados por Aakeröy *et al.*¹⁰⁷, polimorfos I e II, designados por Li *et al.*¹⁰⁵ como iso2 e iso1, respetivamente, sendo um terceiro identificado recentemente, iso3, durante tentativas de formar um co-cristal com o API isoxil. Iso1 (II) é enantiotropicamente relacionado com Iso2 e Iso3, enquanto Iso2 e Iso3 são monotrópicos¹⁰⁵. No total há cinco diferentes polimorfos conhecidos da INA, sendo a forma II estável à temperatura ambiente³⁷.

A picolinamida, piridina-2-carboxamida, atua como um forte inibidor de poli (ADP-ribose) sintetase e desempenha um papel na redução do dano renal^{108,109}. São conhecidos duas formas polimórficas, polimorfos I e II, enantiotrópicas, cujas estruturas foram resolvidas por difração de raios-X^{100,110}. O polimorfo II, estável à temperatura ambiente, apresenta $T_{\text{fus,II}} = 102,0$ °C e o polimorfo I, $T_{\text{fus,I}} = 106,4$ °C. O polimorfo II apresenta uma transição sólido-sólido que, tipicamente

se estende entre $T \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T \sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, a $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguido por fusão da forma I. A moagem em moinho de bolas do polimorfo II, na ausência de solvente, resulta na conversão em polimorfo I dependendo das condições experimentais. A moagem assistida pela adição de líquido estabiliza o polimorfo II¹⁰⁰. A picolinamida difere da nicotinamida e da isonicotinamida apenas na posição do grupo amida em relação ao azoto do anel (orto, meta e para, respectivamente em PA, NA e INA)¹⁰⁰. O hidrogénio da amida e o azoto heterocíclico da picolinamida estão em estreita proximidade, pelo que os seus potenciais eletrostáticos associados se cancelam significativamente, reduzindo assim a tendência de formação de ligações de hidrogénio¹¹¹, o que faz com que a picolinamida, em princípio, seja menos propensa a formar co-cristais¹¹².

A pirazinamida (pirazina-2-carboxamida), é um fármaco antituberculose que consta da Lista de Medicamentos Essenciais da OMS (*WHO*)¹¹³, o mais eficaz contra a infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis*¹¹⁴. É uma molécula relativamente rígida conformacionalmente⁴³, com quatro polimorfos relatados (formas α , β , γ e δ) e um possível quinto polimorfo, α' , semelhante a α ^{32, 115}. A pirazinamida possui múltiplos locais de ligação de hidrogénio, incluindo um grupo amida primário e um heterociclo aromático contendo dois átomos de azoto, orto e meta⁴⁴.

A cafeína (1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona) é um estimulante do sistema nervoso central e também atua como relaxante muscular¹⁷ e é comumente utilizado com aditivo na formulação de analgésicos¹¹⁶. É um dos compostos alcalóides, do grupo da xantina, mais consumidos e está presente em muitas plantas. Encontramos a cafeína no café, chá preto, cacau e bebidas energéticas¹¹⁷. São conhecidas duas formas polimórficas anidras¹¹⁸, enantiotrópicas, e um hidrato cristalino¹⁷. O polimorfo II (β) da cafeína, estável à temperatura ambiente, transforma-se na fase cristalina I (α) no processo de aquecimento, fundindo esta a $T \sim 235\text{ }^{\circ}\text{C}$ ¹¹⁷. Uma nova forma polimórfica III foi, recentemente, identificada¹¹⁹.

Vários co-cristais de cafeína têm sido descritos na literatura^{116,17,120}. A cafeína possui três locais que podem atuar como aceitadores de ligação de hidrogénio: um átomo de azoto de grupo imidazole e dois átomos de oxigénio dos grupos carbonilo¹²⁰. Um levantamento da base de dados estrutural de Cambridge (CSD) de todos os co-cristais de cafeína-ácido carboxílico indica que a interação se dá tipicamente entre o azoto do imidazole da cafeína e o grupo carboxílico através de uma ligação de hidrogénio O-H \cdots N¹²⁰.

A teofilina, 1,3-dimetilpurina-2,6-diona, é um derivado da xantina, um composto farmacologicamente activo utilizado para o tratamento de asma e doença cardiopulmonar para o qual existem cinco polimorfos anidros previamente identificados¹²¹. As formas I a IV foram descritas por Seton *et al.*¹²² e uma forma adicional (Forma V) foi identificada por Roy *et al.*¹²³ por cristalização a partir de CO₂ supercrítico. Estruturas cristalinas foram descritas para as formas I, II e IV^{124,125,126}.

Do ponto de vista físico-químico, a teofilina representa um desafio para os formuladores pelo facto das formas cristalinas anidras se converterem no mono-hidratado em função da humidade relativa. A sua capacidade de ligação de hidrogénio inclui os vários aceitadores de ligações de hidrogénio, em tudo igual à cafeína (dois oxigénios carbonílicos e um azoto aromático), mas além disso, possui menos um grupo metilo do que a cafeína, o que lhe confere capacidade de dador em ligação de hidrogénio N-H. A presença de grupos dadores e aceitadores na teofilina adiciona um elemento extra de complexidade ao considerar o *design* de co-cristais⁵⁹.

O ácido tartárico (ácido 2,3-dihidroxiбутanodióico) é um dos ácidos principais no vinho, e para além das uvas encontra-se nas bananas e nos tamarindos. O ácido tartárico natural é o ácido L-(R,R) - (+) tartárico. O ácido D- (S, S) - (-) -tartárico e o ácido mesotartárico, podem ser produzidos sinteticamente¹²⁷.

O ácido benzóico é um composto com propriedades antifúngicas, amplamente utilizado como conservante alimentar. Ocorre naturalmente em muitas espécies vegetais e é pouco solúvel em água. A temperatura de fusão é $T = (122,3 \pm 0,02) \text{ }^\circ\text{C}$ ¹²⁸. Apresenta um grupo carboxílico que lhe confere um carácter dador e aceitador de ligações de hidrogénio.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

A origem dos compostos utilizados nas experiências, bem como o peso molecular, ponto de fusão e grau de pureza, de acordo com a informação do fornecedor, encontram-se indicados na Tabela 4.

Tabela 4 – Origem dos compostos utilizados e informações do fornecedor.

Composto	Laboratório	M / gmol^{-1}	$T_{\text{fus}} / ^\circ\text{C}$	Pureza / %
Fenilbutazona	a)	308,36	105,9*	> 99
Roxadustate	Boc Sciences	352,34	223,5*	98
Nicotinamida	Sigma - Aldrich	122,13	128 - 131	99,5
Isonicotinamida	Sigma - Aldrich	122,13	256	99,5
Picolinamida	Sigma - Aldrich	122,13	106,4	98
Pirazinamida	Fluka	123,12	189-191	99
			233 – 238	
Cafeína	Fluka	194,19	234 – 236,5	≥ 99
Teofilina	Sigma - Aldrich	180,15	271	99
Ácido benzóico	Sigma - Aldrich	122,12	122,1	$\geq 99,5$
Ácido L-tartárico	Fluka	150,9	166 - 170	$\geq 99,5$

a) Amostra cedida pelo Prof. Doutor Manuel Minas da Piedade, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

* Temperatura obtida experimentalmente, neste trabalho.

Na Tabela 5 estão apresentados os diferentes solventes utilizados nas experiências de cristalização, a respetiva origem e grau de pureza.

Tabela 5 – Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.

Solvente	Laboratório	Pureza / %
Acetona	Lab-Scan	99,5
Acetato de etilo	Fluka	99,8
Etanol	Merck	99
Metanol	Fluka	99,8
Tetra-hidrofurano	Panreak	99,5
1,4-Dioxano	Lab-Scan	99,8
1-Propanol	Merck	99,5
2-Butanol	May & Barker	99
Tolueno	Merck	99,5

3.2 Métodos

A cristalização a partir de solução e métodos mecanoquímicos de moagem, foram os métodos usados na investigação de polimorfismo e na síntese de co-cristais. Para avaliação dos resultados obtidos foram usadas várias técnicas analíticas, tais como calorimetria diferencial de varrimento, espectroscopia de infravermelho, termomicroscopia com luz polarizada, e difração de raios-X.

3.2.1 Cristalização em solvente

Para a recristalização da fenilbutazona foram preparadas soluções de 10 – 15 mg da amostra de partida em 4 mL de solvente. A recristalização do roxadustate foi feita preparando soluções de aproximadamente 10 mg da amostra de partida em, aproximadamente, 5 – 6 mL de solvente. As soluções foram filtradas para caixas de Petri, usando filtro de papel, e deixadas, tapadas, à temperatura ambiente, para evaporação lenta do solvente.

Para o sistema binário roxadustate + picolinamida foram preparadas soluções, em etanol, a partir das misturas 1:1 obtidas por mecanoquímica. As soluções foram também filtradas para caixas de Petri, usando filtro de papel, e deixadas, tapadas, para evaporação lenta do solvente, à temperatura ambiente.

3.2.2 Mecanoquímica

A pesquisa de co-cristais realizada neste trabalho, foi feita por moagem de misturas binárias usando um moinho de bolas Retsch MM 400, em vasos de 10 mL em aço inoxidável com duas esferas de 7 mm de diâmetro, também em aço inoxidável. As experiências foram realizadas com uma frequência de vibração de 15 Hz, durante 30 minutos. Foi utilizada uma massa total de aproximadamente 40 mg, na maior parte dos casos com adição de 10 μ L de etanol.

3.2.3 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

As experiências realizadas em DSC foram feitas utilizando um calorímetro de potência compensada, Perkin-Elmer DSC7, com refrigeração ajustada -8 °C (*intracooler* com circulação da mistura etilenoglicol/água (1:1) (v/v)). Como gás de purga foi utilizado azoto, de pureza N50, com fluxo de circulação de 20 mL/min.

O calorímetro foi calibrado com padrões certificados de elevada pureza. Para a calibração da temperatura foi utilizado índio¹²⁸ (Perkin Elmer, x = 99,99 %), $T_{\text{fus}} = 156,60$ °C, $\Delta_{\text{fus}}H_m = 3286$ J.mol⁻¹ e bifênolo¹²⁸ (LGC 2610), $T_{\text{fus}} = (68,93 \pm 0,03)$ °C, $\Delta_{\text{fus}}H_m = 18,60$ kJ.mol⁻¹. Para a calibração da entalpia foi utilizado índio¹²⁸. As amostras com massa compreendida entre 1 mg e 2 mg foram preparadas em cápsulas de alumínio de 30 μ L (Perkin Elmer) e seladas hermeticamente. Como referência foi usada uma cápsula igual vazia. Os ensaios foram realizados com diferentes velocidades de varrimento (β).

3.2.4 Termogravimetria (TG)

A análise das amostras foi feita numa balança termogravimétrica da Perkin-Elmer STA 6000, um sistema de TG/DSC, com circuito de refrigeração a 15 °C. Neste equipamento TG encontra-se hifenado com DSC e, deste modo, para o mesmo evento, foi possível a visualização de fenómenos de perda de massa, conjuntamente com os fenómenos observados nas curvas de DSC. Uma amostra de aproximadamente 15 mg foi colocada num cadinho de alumina, numa atmosfera de azoto, e submetida a uma velocidade de varrimento de 10 °C.min⁻¹, numa gama de temperatura entre 50 a 800 °C.

3.2.5 Termomicroscopia com luz polarizada (PLTM)

Nas experiências realizadas por PLTM, uma célula de vidro de 7 mm de diâmetro contendo a amostra, coberta com tampa do mesmo material, foi colocada numa placa de aquecimento Linkam DSC600, ligada a uma interface CI94, que controla a temperatura nas etapas de aquecimento/arrefecimento. A refrigeração é controlada por uma unidade LNP94/2 através da circulação de ar e a temperatura do forno monitorizada por sensores de Pt100.

Foi utilizado um microscópio Leica DMRB com uma ampliação de 200x, para observação ótica, com uma câmara de vídeo acoplado Sony CCD-IRIS/RGB de modelo DXC-151 AP, para captação de imagem. Na análise de imagem utilizou-se o software fornecido pela Linkam systems, com RTVMS (sistema de medição em tempo real). Os ensaios foram realizados com velocidades de varrimento $\beta = |2|$ °C/min, $\beta = |10|$ °C/min e $\beta = |20|$ °C/min.

3.2.6 Espetroscopia de Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram registados à temperatura ambiente, num espectrómetro com transformada de Fourier ThermoNicolet FT-IR 380, com uma resolução de 2 cm^{-1} , na gama de comprimento de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Foi usado um acessório de refletância total atenuada com cristal de diamante (ATR SmartOrbit, modelo ATR Diamond).

3.2.7 Difração de raio-X

Difração de raios-X de pó

Os estudos por difração de raios-X de pó foram realizados num difratómetro ENRAF-NONIUS equipado com um detetor CPS 120° da INEL. As amostras foram colocadas em capilares de vidro ($\phi = 3\text{ mm}$) e como radiação incidente foi utilizada $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,540598\text{ \AA}$). De modo a garantir uma correta intensidade relativa das reflexões, o capilar é colocado sob rotação, sendo a recolha de dados efetuada por períodos que podem variar entre 15 minutos a 4 horas. Algumas amostras foram analisadas com difractor Rigaku MiniFlex 600, utilizando radiação monocromática, $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54188\text{ \AA}$) e detetor D/teX Ultra com recolha de dados entre 10 e 15 minutos. Foi feito um scan entre 3° e 50° . Os difratogramas de raios-X de pó simulados a partir do CIF, foram obtidos utilizando o programa PLATON, A.L.Spek, versão 161008.

Difração de raios-X de monocristal

Os estudos por difração de raios-X de monocristal foram realizados num difratómetro Bruker-Nonius Kappa Apex II CCD, sendo os dados obtidos à temperatura ambiente, com radiação incidente Mo K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$, monocromador de grafite). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos e refinadas por métodos de mínimos quadrados (SHEXS-97). Todos os átomos, à exceção do hidrogénio, foram refinados anisotropicamente.

4. Resultados e Discussão

4.1 Fenilbutazona: caracterização da forma sólida de partida

Os difratogramas de raios-X de pó experimental da amostra de partida de fenilbutazona e o simulado para o polimorfo α , o único cuja estrutura cristalina foi resolvida, como se disse, encontram-se representados na Figura 9. A amostra de fenilbutazona usada no presente trabalho foi identificada como sendo o polimorfo δ , Tabela 2.

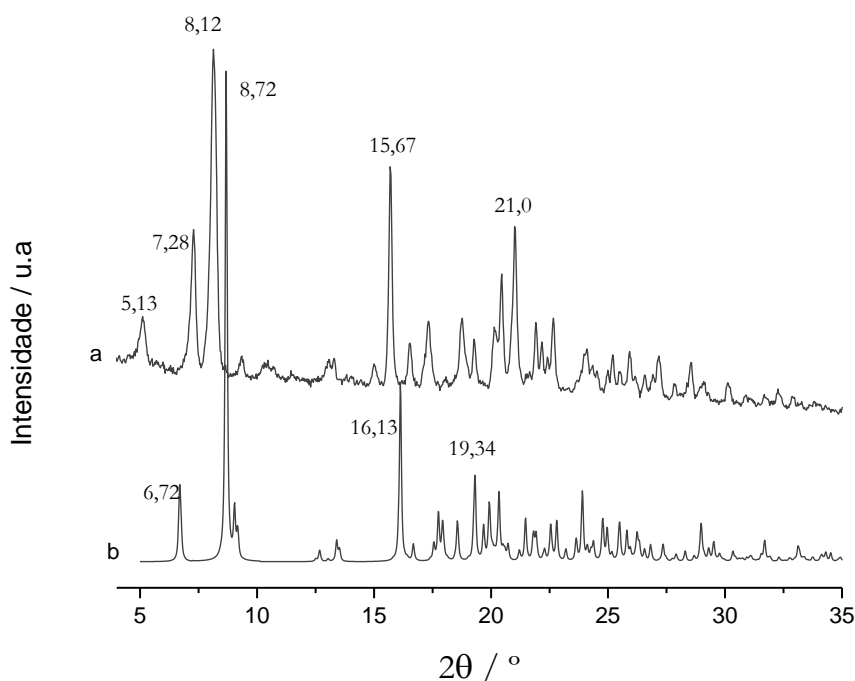


Figura 9 – Difratogramas de raio-X de pó da fenilbutazona: a) experimental para a amostra de partida; b) simulado (forma α).

Foi estudado o comportamento térmico da amostra de fenilbutazona de partida com recurso a calorimetria diferencial de varrimento, em processos de aquecimento entre 25 °C a 115 °C, utilizando velocidades de varrimento $\beta = 2$ °C/min, $\beta = 10$ °C/min e $\beta = 20$ °C/min.

A Figura 10 mostra curvas típicas de DSC obtidas com estas diferentes condições de varrimento e na Tabela 6 encontram-se especificados os parâmetros termodinâmicos referentes aos ensaios realizados. É observado um pico estreito, endotérmico, de alta energia referente à fusão do polimorfo δ , a $T_{\text{fus}} = (105,9 \pm 0,2)$ °C com $\Delta_{\text{fus}}H = (27,0 \pm 1,1)$ kJ.mol⁻¹. Como pode verificar-se dos resultados da Tabela 6, contrariamente ao referido no estudo feito por Forni e colaboradores¹²⁹, a velocidade usada durante o aquecimento não tem influência nos parâmetros termodinâmicos, temperatura e entalpia de fusão.

Nalgumas das experiências, as curvas de DSC apresentam picos endotérmicos de baixa energia a $T = (92 - 93) ^\circ\text{C}$ e $T = (96 - 97) ^\circ\text{C}$, o que indica que a amostra não é polimorficamente pura, contendo quantidades residuais das formas $\alpha^{85,86}$ e $\beta^{85,86}$, respetivamente, abaixo do limite de detecção de XRPD. Na Figura 11 mostram-se difractogramas de raios-X de pó da amostra de partida a $18 ^\circ\text{C}$ e o obtido a $100 ^\circ\text{C}$ por aquecimento desta amostra, não sendo visíveis alterações.

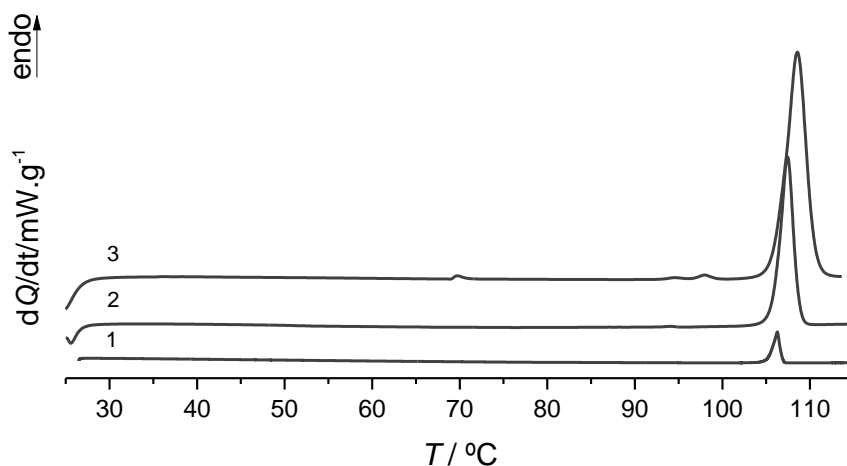


Figura 10 – Curvas de DSC de aquecimento da amostra de fenilbutazona de partida, polimorfo δ : 1. $\beta = 2 ^\circ\text{C}/\text{min}$; 2. $\beta = 10 ^\circ\text{C}/\text{min}$; 3. $\beta = 20 ^\circ\text{C}/\text{min}$.

Tabela 6 – Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC do primeiro aquecimento da amostra de fenilbutazona de partida, $\beta = 10 ^\circ\text{C}/\text{min}$., $20 ^\circ\text{C}/\text{min}$ e $2 ^\circ\text{C}/\text{min}$

Amostra	m / mg	$\beta / ^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}.\text{mol}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{kJ}.\text{mol}^{-1}$
A	2,02	10	105,9	27,7	93,0	0,4
B	2,52	10	106,0	27,1		
C	2,21	10	105,7	27,9		
D	2,42	20	106,3	27,2	96,7	0,3
E	2,47	20	105,9	27,1	96,7	0,3
F	1,91	20	106,2	27,6	96,3	0,6
G	2,25	10	106,1	24,6	96,1	0,3
H	2,16	10	105,7	25,7	96,0	0,4
I	2,27	10	106,2	26,8	92,6	
J	1,94	2	105,4	26,6		
K	4,0	2	105,7	28,3		
Média			$105,9 \pm 0,3$	$27,0 \pm 1,1$		

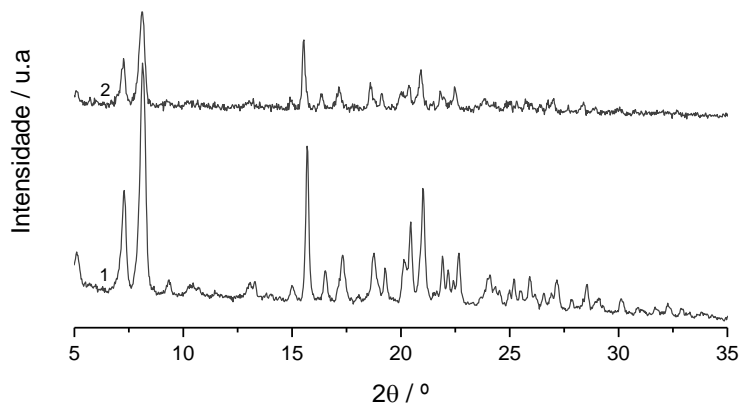


Figura 11 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. amostra de fenilbutazona de partida a 18 °C; 2. aquecimento a 100 °C, $\beta = 6$ °C/min.

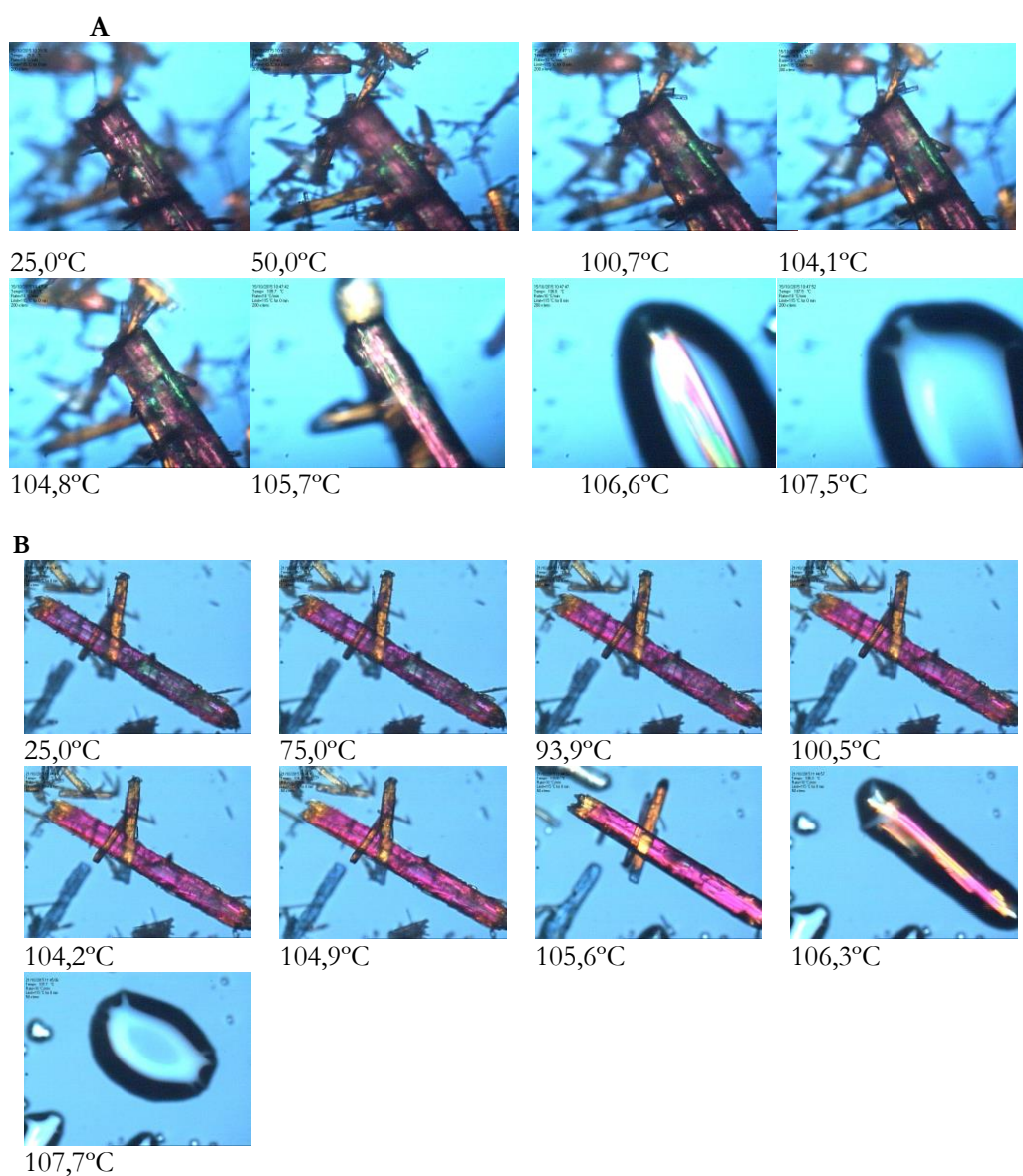


Figura 12 – Fenilbutazona, imagens obtidas por PLTM: aquecimento da amostra de partida, de 25 °C a 115 °C, $\beta=10$ °C/min, ampliação 200x.

As imagens de PLTM mostradas na Figura 12 ilustram 2 ensaios de aquecimento realizados sobre a amostra de partida. Na Figura 12A apenas é evidente a fusão do composto a $T \sim 106$ °C. Na Figura 12B, a observação de mudança de cor a cerca de 94 °C, conjugada com informação de XRPD e DSC, é compatível com fusão de uma quantidade residual de um outro polimorfo que estará depositado sobre o cristal da forma δ .

Na Figura 13 encontra-se o espectro de infravermelho da fenilbutazona de partida, polimorfo δ . É possível na região 3000–2800 cm^{-1} bandas características das vibrações de alongação –C–H. Encontram-se a 1749/1715 cm^{-1} as bandas características da alongação do grupo C=O e a 1595/1485 cm^{-1} as vibrações atribuíveis ao anel aromático. A banda a 1295 cm^{-1} e que se estende a, aproximadamente, 1030 cm^{-1} , corresponde a vibrações de alongação –C–N. As duas bandas a 754 cm^{-1} e 693 cm^{-1} são características de benzenos monossustituídos^{70,130}.

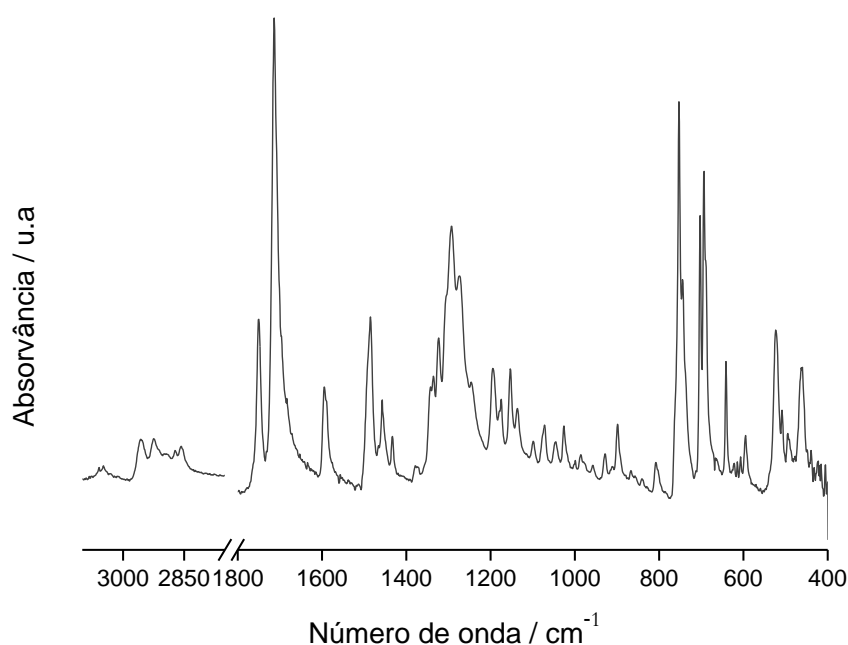


Figura 13 – Espectro de infravermelho de fenilbutazona de partida, polimorfo δ .

4.2. Fenilbutazona: investigação da cristalização de fundidos

Após fusão, as amostras foram arrefecidas, de 115 a 25 °C, com diferentes velocidades de varrimento de forma a verificar a influência deste parâmetro no sólido que se obtém a partir do fundido. As amostras A e D foram arrefecidas a $\beta = -10$ °C/min, B e E a $\beta = -5$ °C/min e C e D a $\beta = -2$ °C/min. As curvas de DSC, representadas na Figura 14, mostram picos exotérmicos, mais largos a velocidades mais elevadas e que são mais estreitos, como se esperaria, à medida que a velocidade de arrefecimento diminui. Os parâmetros termodinâmicos encontram-se na Tabela 7.

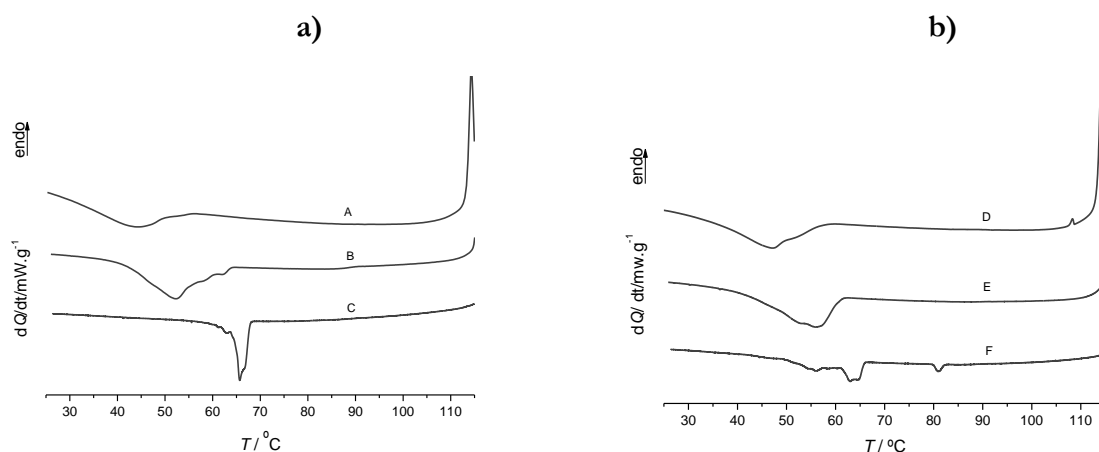


Figura 14 – Fenilbutazona, curvas de DSC de arrefecimento do fundido: A e D a $\beta = -10$ °C/min; B e E a $\beta = -5$ °C/min; C e F a $\beta = -2$ °C/min, precedidos por aquecimento a: a) $\beta = 10$ °C/min; b) $\beta = 20$ °C/min.

Tabela 7 – Fenilbutazona, parâmetros obtidos a partir das curvas de DSC de arrefecimento do fundido, de 115 °C a 25 °C, a diferentes velocidades de varrimento.

Amostra	m /mg	β /°C.min ⁻¹	T_{onset} /°C	ΔH /kJ.mol ⁻¹
A	2,02	-10	50,3	-8,7
B	2,52	-5	55,6	-22,5
C	2,21	-2	66,3	-19,9
D	2,42	-10	53,8	-10,1
E	2,47	-5	59,8	-16,8
F	1,91	-2	65,6	-19,9

Depois de arrefecidas, todas as amostras foram sujeitas a um segundo aquecimento, de 25 a 115 °C a $\beta = 10$ °C/min, Figura 15. Na Tabela 8 encontram-se sumariados os valores de temperaturas de *onset* dos diferentes eventos observados nas curvas de DSC correspondentes a estes varrimentos.

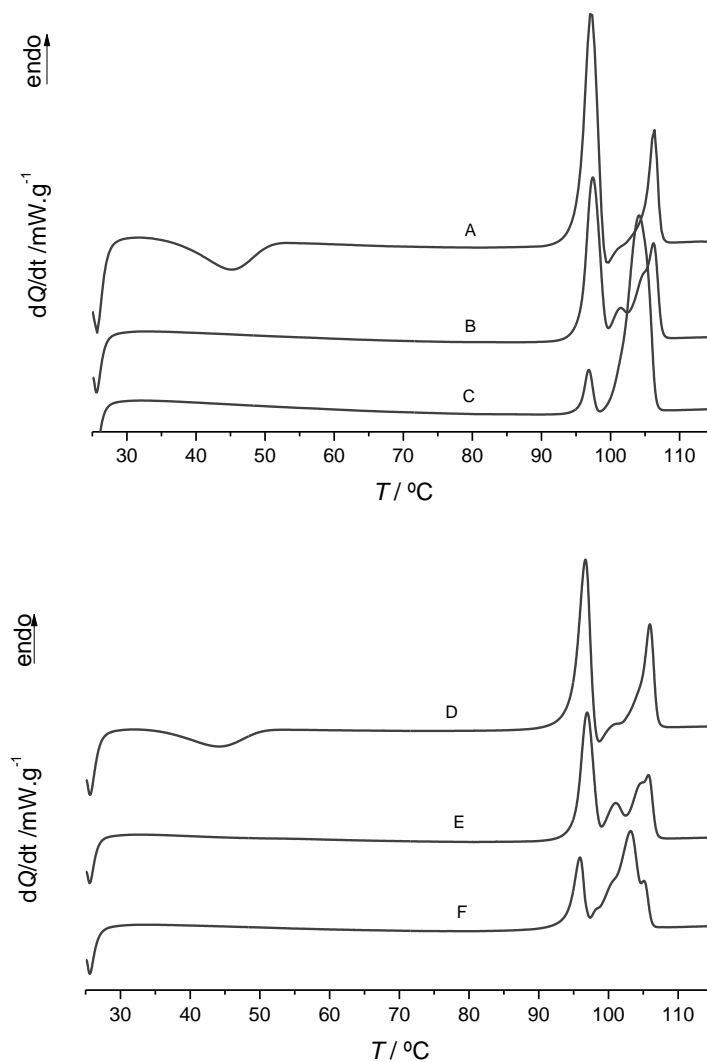


Figura 15 – Fenilbutazona, curvas de DSC de aquecimento dos sólidos obtidos a partir do arrefecimento do fundido, $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. O arrefecimento precedente foi realizado a diferentes velocidades de varrimento: A e D a $\beta = -10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; B e E a $\beta = -5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; C e F a $\beta = -2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Tabela 8 – Fenilbutazona: temperaturas de *onset* dos diferentes eventos registados nas curvas de DSC de aquecimento dos sólidos gerados a partir do arrefecimento do fundido, de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $115 \text{ }^\circ\text{C}$, $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Amostra	<i>m</i> /mg	<i>T</i> / $^\circ\text{C}$	<i>T</i> _{onset} / $^\circ\text{C}$	<i>T</i> / $^\circ\text{C}$	<i>T</i> / $^\circ\text{C}$
A ^a	2,02	37,7	95,1		104,5
B ^b	2,52		95,7	100,0	104,1
C ^c	2,21		95,6	101,2	
D ^a	2,42	36,8	94,7		104,3
E ^b	2,47		95,3	99,3	105,2
F ^c	1,91		94,3	99,4	103,2

- a) Precedido de arrefecimento do fundido a $\beta = -10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.
b) Precedido de arrefecimento do fundido a $\beta = -5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.
c) Precedido de arrefecimento do fundido a $\beta = -2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

As curvas de DSC, Figura 15, mostram que a velocidade de arrefecimento, nestas condições de ensaio, influencia claramente a natureza da amostra sólida que se obtém a partir do arrefecimento do fundido. As amostras arrefecidas à mesma velocidade apresentam curvas de DSC de aquecimento muito semelhantes entre si e significativamente diferentes das obtidas com velocidades de arrefecimentos diferentes. As amostras A e D, para as quais $\beta = -10$ °C/min, são as únicas que apresentam um pico exotérmico no aquecimento a $T \sim 37$ °C e $\Delta H \sim -6$ kJ.mol⁻¹, o que indica que num processo de arrefecimento mais rápido, nestas condições, o fundido não cristaliza totalmente, completando-se o processo no aquecimento subsequente. Os termogramas apresentam um pico endotérmico de energia elevada correspondendo à fusão do polimorfo β , $T_{\text{fus}} \sim 95,4$ °C⁸⁵, seguido de um pico exotérmico, o que indica que ocorre recristalização pelo menos parcial do fundido, seguida de outro pico endotérmico de energia mais baixa a $T \sim 105$ °C, fusão do polimorfo δ , Tabela 8. Os resultados apontam para uma predominância de formação do polimorfo β na cristalização do fundido, com eventual mistura com a forma δ .

Para velocidades de arrefecimentos $\beta = -5$ °C/min e $\beta = -2$ °C/min a cristalização é completa no arrefecimento. As amostras B e E, arrefecidas a $\beta = -5$ °C/min, mostram no aquecimento um primeiro pico endotérmico de alta energia a $T_{\text{fus}} \sim 95,4$ °C, que indica fusão do polimorfo β , seguindo-se um outro pico endotérmico de baixa energia a $T \sim 100$ °C e um último pico endotérmico $T \sim 105$ °C. O pico intermédio poderá indicar a presença de uma outra forma polimórfica, para além dos polimorfos β e δ . Forni *et al.*¹²⁹ e Ibrahim⁸⁹ detetaram também esta ocorrência.

As curvas de DSC de aquecimento das amostras C e F mostram que, o arrefecimento do fundido a $\beta = -2$ °C/min, dá origem a uma mistura de polimorfos, com o polimorfo β em menor quantidade em relação a formas de temperatura de fusão mais elevada.

Por último, todas as amostras foram arrefecidas, rapidamente, à mesma velocidade nominal de $\beta = -50$ °C/min e aquecidas de seguida a $\beta = 10$ °C/min. Nas curvas de DSC, Figura 16, observa-se cristalização a $T = (43,7 \pm 0,6)$ °C com $\Delta H = (-18,2 \pm 0,5)$ kJ.mol⁻¹, a fusão do polimorfo β , $T_{\text{fus}} = (94,9 \pm 0,4)$ °C, alguma recristalização do fundido seguida de um pico endotérmico de baixa energia a $T = (102,2 \pm 0,2)$ °C e um último pico endotérmico a $T = (105,0 \pm 0,3)$ °C, correspondendo à fusão do polimorfo δ . As temperaturas relevantes encontram-se na Tabela 9.

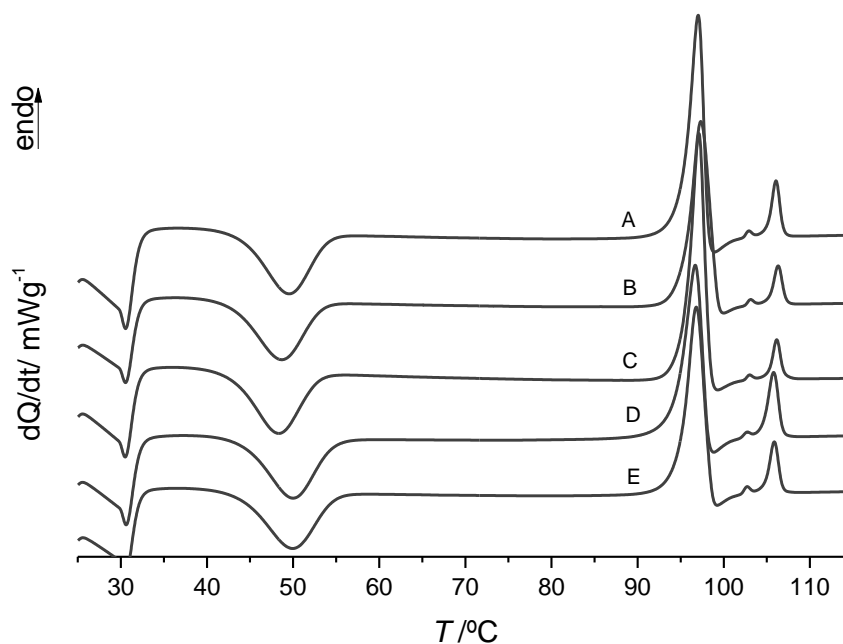


Figura 16 – Fenilbutazona: curvas de DSC de aquecimento, $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, de amostras obtidas a partir do arrefecimento do fundido a $\beta = -50 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Tabela 9 – Fenilbutazona: temperaturas de *onset* dos eventos registados nas curvas de DSC de aquecimento ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) de amostras obtidas por arrefecimento do fundido, após arrefecimento rápido ($\beta = -50 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$).

Amostra	m / mg	$T / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$T / ^\circ\text{C}$	$T / ^\circ\text{C}$
A	2,02	44,0	95,0	102,1	105,1
B	2,52	43,0	95,2	102,5	105,3
C	2,21	42,9	95,3	102,4	105,3
D	2,42	44,2	94,2	102,0	104,4
E	2,47	44,1	94,7	102,1	104,8
Média		$43,7 \pm 0,6$	$94,9 \pm 0,4$	$102,2 \pm 0,2$	$105,0 \pm 0,3$

Na Figura 17 encontram-se imagens do aquecimento do fundido, obtidas por PLTM. A cristalização do fundido, observada apenas no aquecimento, para as velocidades de arrefecimento utilizadas (-2, -5, -10 $^\circ\text{C}/\text{min}$) tem início a $T \sim 39^\circ\text{C}$ prolongando-se por uma gama longa de temperatura. O sólido obtido funde a $T \sim 95^\circ\text{C}$. O sólido cristalizado a partir do fundido, nestas condições, é maioritariamente o polimorfo β . O material sólido que se observa a 97°C poderá ter-se formado aquando da cristalização de β ou formar-se após fusão a 95°C . Podemos ainda ver a recristalização a partir do fundido que ocorre a $T \sim 98^\circ\text{C}$. Parte do material obtido funde a 103°C e um processo de fusão ocorre a $T \sim 106^\circ\text{C}$, referente ao polimorfo δ .

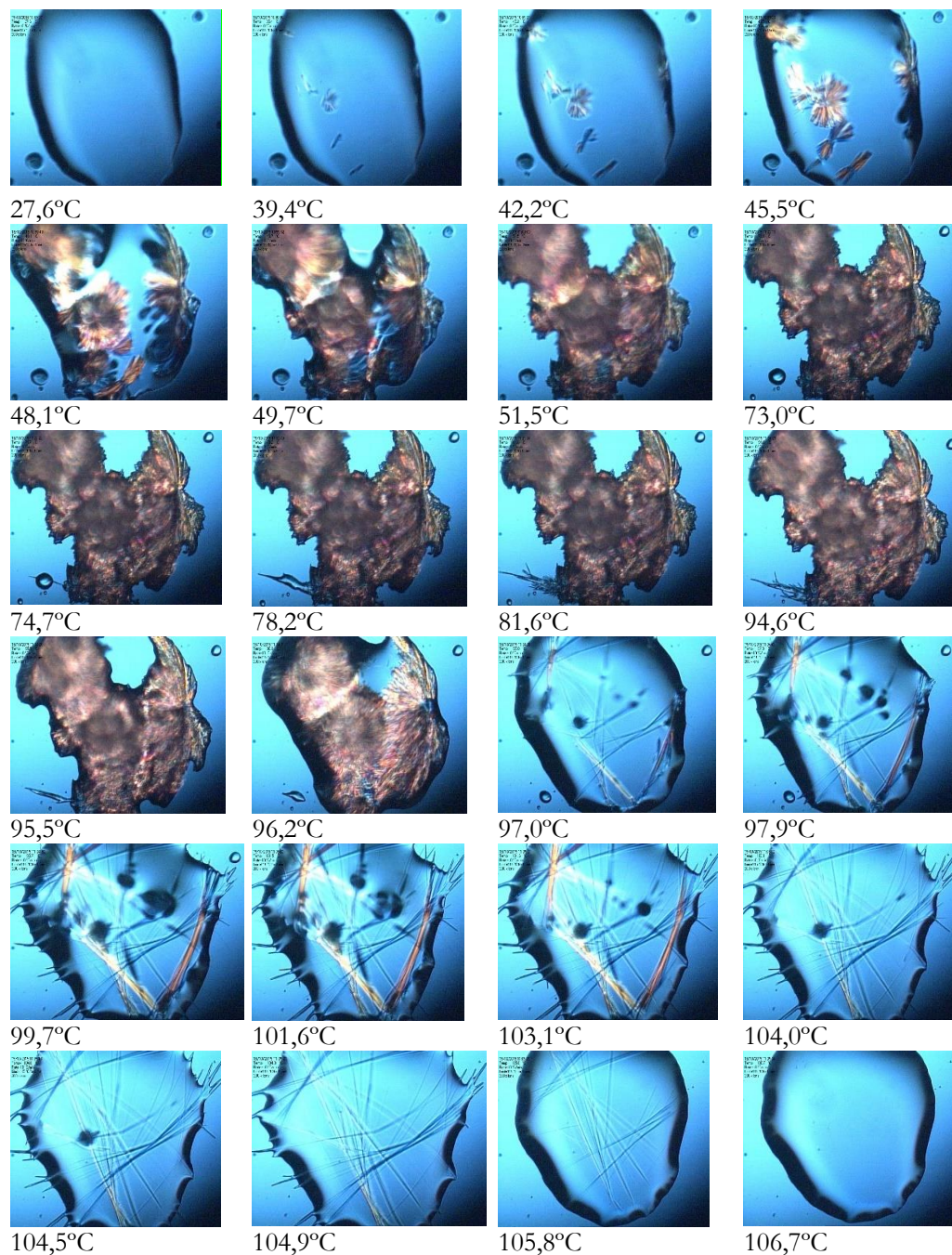


Figura 17 – Fenilbutazono, imagens obtidas por PLTM: aquecimento do fundido, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$, ampliação 200x. No arrefecimento precedente não ocorreu recristalização.

Este comportamento foi observado nos vários ensaios de arrefecimento / aquecimento do fundido realizados por PLTM. Na Figura 18 mostram-se imagens de um outro ensaio. Não ocorreu recristalização durante o proceso de arrefecimento rápido que precedeu o aquecimento. A recristalização do fundido ocorreu no aquecimento com início a $T \sim 39^\circ\text{C}$. A fusão ocorre a $T \sim 95$

°C, polimorfo β , seguida recristalização a $T \sim 97$ °C e nova fusão a $T \sim 103$ °C e por último a fusão de pequenas acículas a $T \sim 105$ °C, polimorfo δ .

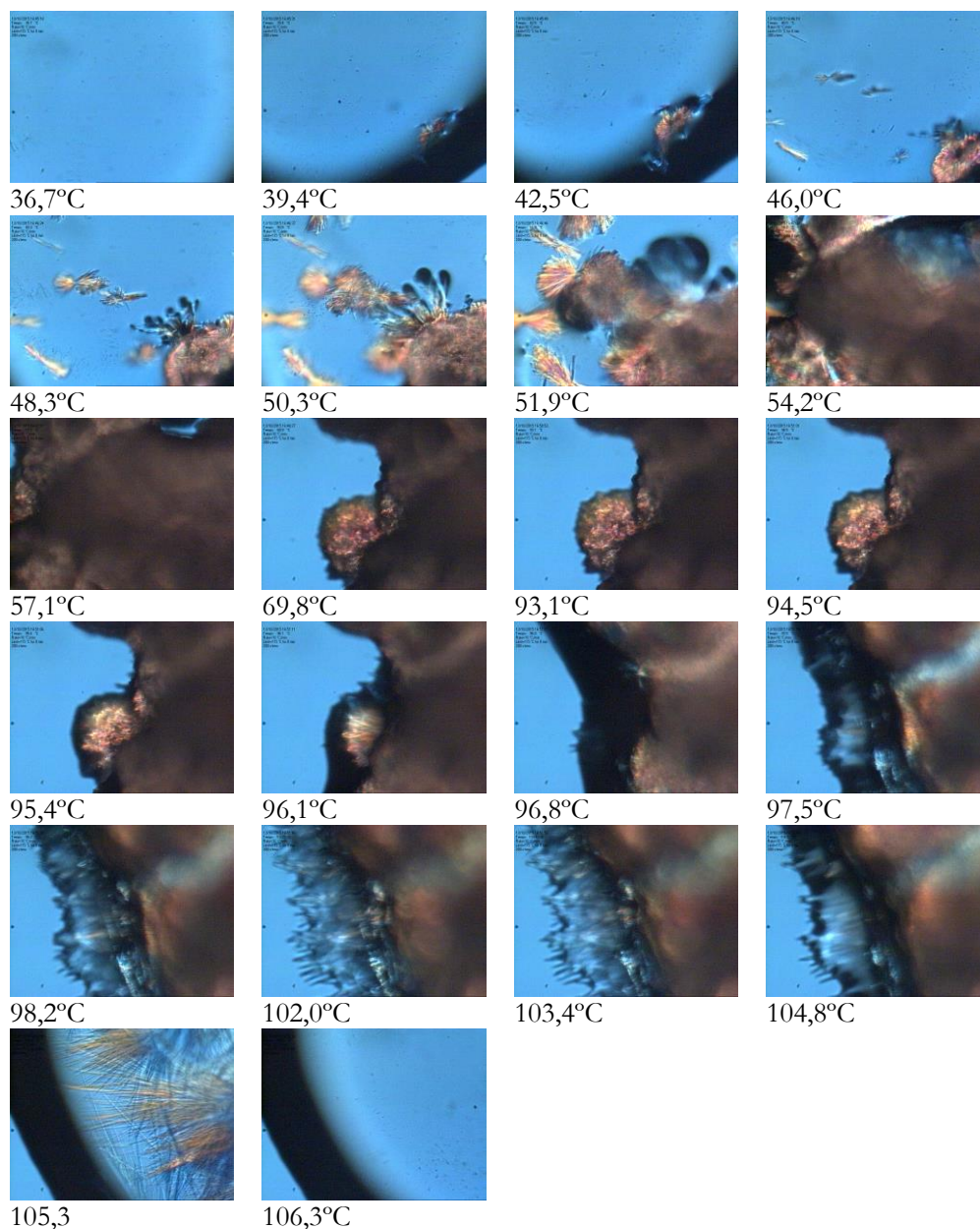


Figura 18 – Fenilbutazona, imagens obtidas por PLTM: aquecimento do fundido, $\beta = 10$ °C/min, precedido de arrefecimento em que não ocorreu recristalização, ampliação 200x.

No estudo feito por difração de raios-X de pó com variação de temperatura, é observada cristalização no arrefecimento e os difratogramas, Figura 19, mostram que a velocidade de arrefecimento do fundido influencia o sólido que se obtém. Um arrefecimento controlado, $\beta = -6$ °C/min ou $\beta = -1$ °C/min, origina o polimorfo β , enquanto que num arrefecimento rápido se obtém uma mistura dos polimorfos β e δ . Na figura 20 estão representados os difratogramas dos polimorfos α , β e δ assinalando as reflexões mais relevantes para a respetiva diferenciação.

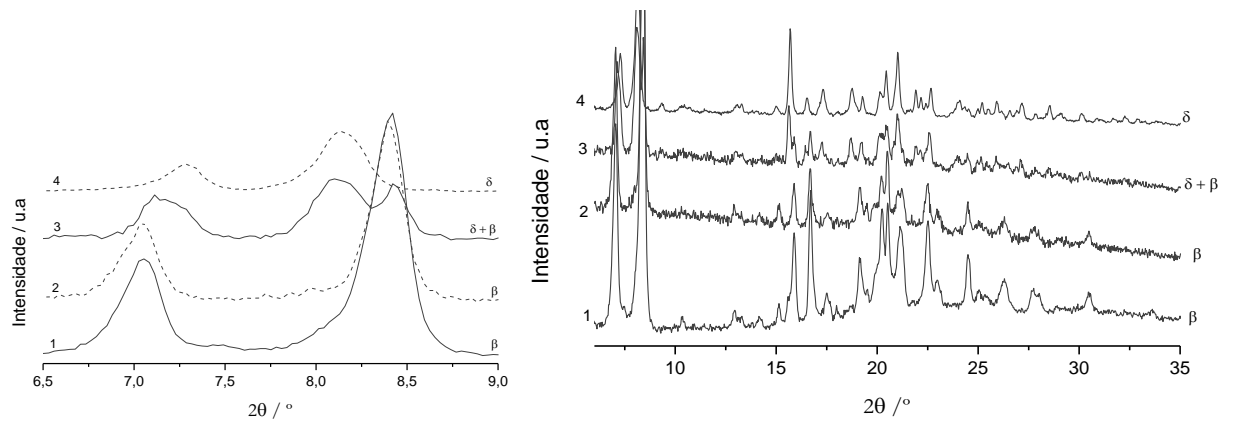


Figura 19 – Fenilbutazona, difratogramas de raios-X de pó dos sólidos obtidos a partir do arrefecimento do fundido: 1. arrefecimento $\beta = -6$ °C/min; 2. arrefecimento $\beta = -1$ °C/min; 3. arrefecimento rápido. 4. amostra de partida, polimorfo δ . (difratograma recolhido a $T \sim 20$ °C).

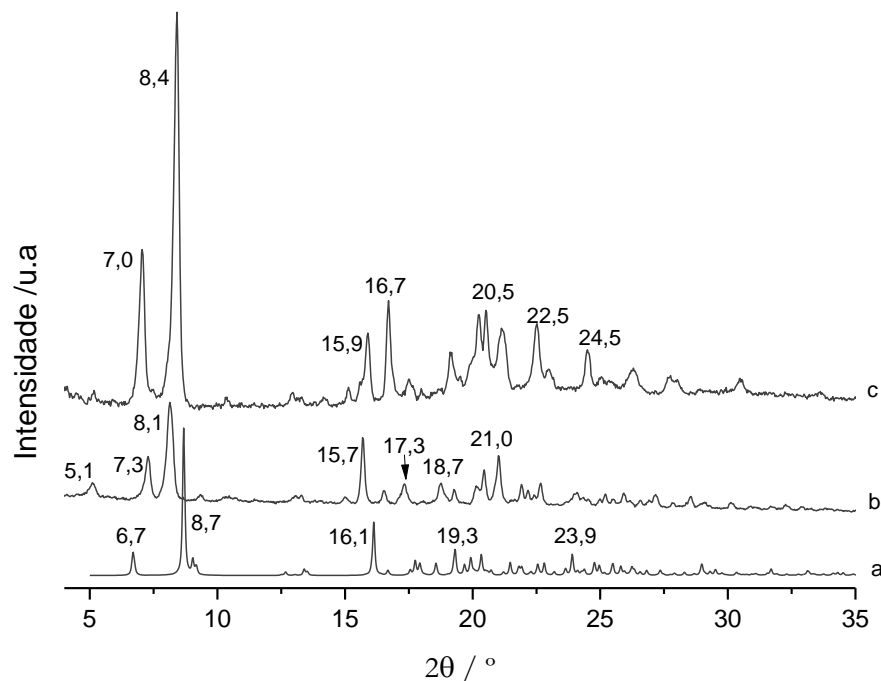


Figura 20 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: a) simulado, polimorfo α ; b) amostra de partida, polimorfo δ ; c) sólido obtido a partir da cristalização do fundido, polimorfo β , arrefecimento a $\beta = -6$ °C/min.

O difratograma de raios-X de pó, mostra que o sólido que se obtém a partir do o fundido, arrefecendo a velocidade controlada $\beta = -6$ °C/min ou $\beta = -1$ °C/min, corresponde ao polimorfo β^{85} , o que poderá sugerir que as outras formas polimórficas observadas, em DSC e PLTM durante a fusão do sólido obtido a partir do fundido, para além do polimorfo β , advêm da recristalização que ocorre durante/após o processo de fusão de β . Difratogramas de raios-X de pó obtidos durante o aquecimento do polimorfo β , a diferentes temperaturas, mostram que este se transforma no

polimorfo δ durante o processo de aquecimento. Este comportamento é ilustrado na Figura 21, pelos difratogramas registrados no processo de aquecimento às temperaturas de 50 °C, 101 °C e 104 °C.

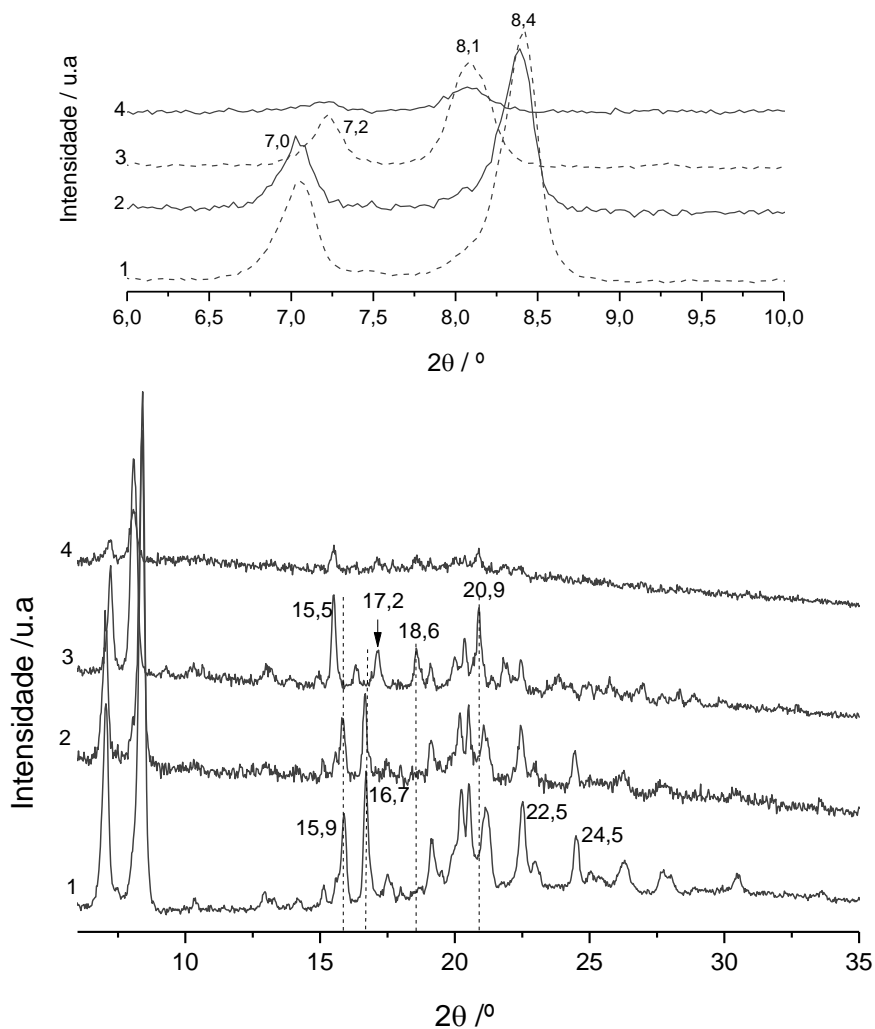
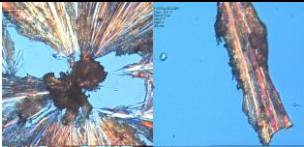






Figura 21 – Fenilbutazona, difratogramas de raios-X de pó obtidos no aquecimento do polimorfo β : 1. 20 °C; 2. 50 °C; 3. 101 °C; 4. 104 °C, $\beta = 6$ °C/min.

4.3. Fenilbutazona: cristalização a partir de solução

Foi também investigada a cristalização da fenilbutazona em diferentes solventes. Na Tabela 5 estão indicados os diferentes solventes usados na cristalização, bem como a respetiva origem e grau de pureza. A cristalização foi realizada por evaporação do solvente à temperatura ambiente. Os sólidos obtidos apresentam diferentes hábitos cristalinos, Tabela 10, tais como aglomerados de acículas, esferulites e placas.

Tabela 10 – Caracterização morfológica dos sólidos obtidos nos processos de cristalização da fenilbutazona em diferentes solventes, observação sob luz polarizada, ampliação 200x.

Solvente	Imagem	Hábito cristalino
Acetato de etilo		Esferulite + placas
Acetona		Aglomerado de acículas + esferulite
Diclorometano		Esferulite
Etanol		Aglomerado de acículas + esferulite
Metanol		Placas

4.3.1. Cristalização em metanol, etanol, acetona e acetato de etilo

Após a evaporação do solvente, os sólidos foram analisados, numa primeira abordagem, por espectroscopia de infravermelho. Podemos verificar que, os espectros apresentam diferenças, ainda que pequenas, em relação ao composto de partida. Apesar das moléculas de fenilbutazona não poderem estar envolvidas em ligações de hidrogénio, diferenças conformacionais poderão resultar da formação dos diferentes arranjos cristalinos. Ibrahim⁸⁹ considerou que diferenças na região da vibração de alongação do carbonilo, especificamente de 1760 a 1700 cm^{-1} , e na região 750-650 são característicos de cada forma e podem ser usadas para identificação de diferentes fases cristalinas. Já Tuladhar¹³¹, considera que as pequenas diferenças observadas na região de 1500-1450 cm^{-1} , 1425-1300 cm^{-1} e 750-640 cm^{-1} não são muito úteis para diferenciar as formas cristalinas da fenilbutazona.

A análise dos espectros de infravermelho obtidos indica que sólidos cristalizados em solventes diferentes apresentam semelhanças entre si. É o caso dos sólidos obtidos por cristalização em etanol e metanol, e em acetona e acetato de etilo, respetivamente. Na Figura 22 e na Figura A1 estão

representados os espectros dos sólidos obtidos em etanol e metanol, bem como o espectro do composto de partida, polimorfo δ .

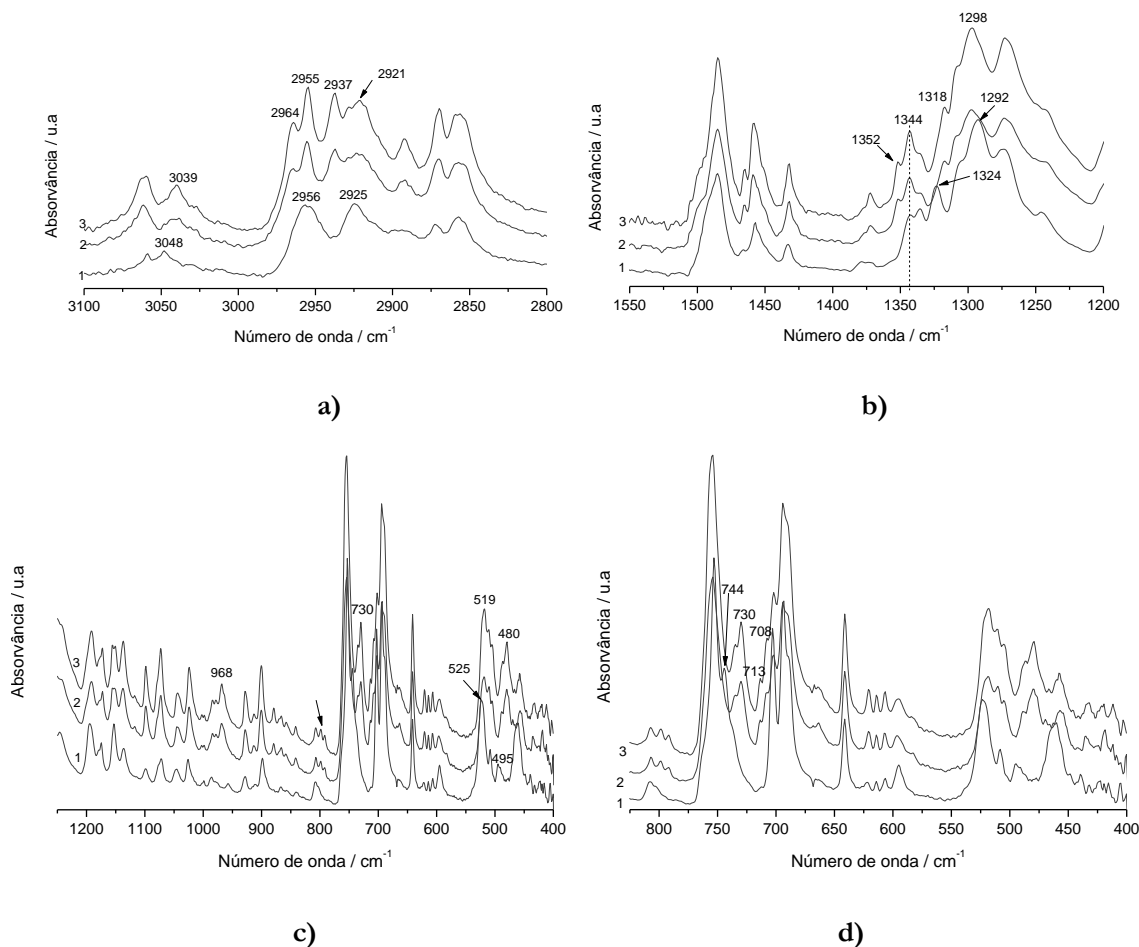


Figura 22 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona: 1. Amostra de partida; 2. sólido obtido por cristalização em etanol; 3. sólido obtido por cristalização em metanol.

Os espectros dos sólidos cristalizados em etanol e em metanol são semelhantes e apresentam diferenças em relação ao composto de partida, nomeadamente alterações das bandas entre 3000-2800 cm^{-1} referentes à vibração de elongação C-H, entre 1360-1030 cm^{-1} referente à elongação -C-N, aos 800 cm^{-1} , 770-730 cm^{-1} e 710-690 cm^{-1} atribuíveis a deformação angular =C-H de benzenos monosubstituídos.

Por sua vez os espectros dos sólidos cristalizados em acetona (esferulites) e acetato de etilo, Figuras 23 e 24, são semelhantes entre si e, apesar de terem bandas semelhantes às do composto de partida, apresentam algumas diferenças em relação a este. De notar a existência de pequenas alterações na região dos 3000-2800 cm^{-1} , aos 1449 cm^{-1} , na região entre 1360-1030 cm^{-1} e ainda entre os 1050-800 cm^{-1} . Também é interessante que, as amostras obtidas nestes solventes, em ensaios

independentes, apresentam espectros de infravermelho que têm pequenas diferenças, Figura 24, ao contrário do que se observa em metanol e etanol, Figura A1.

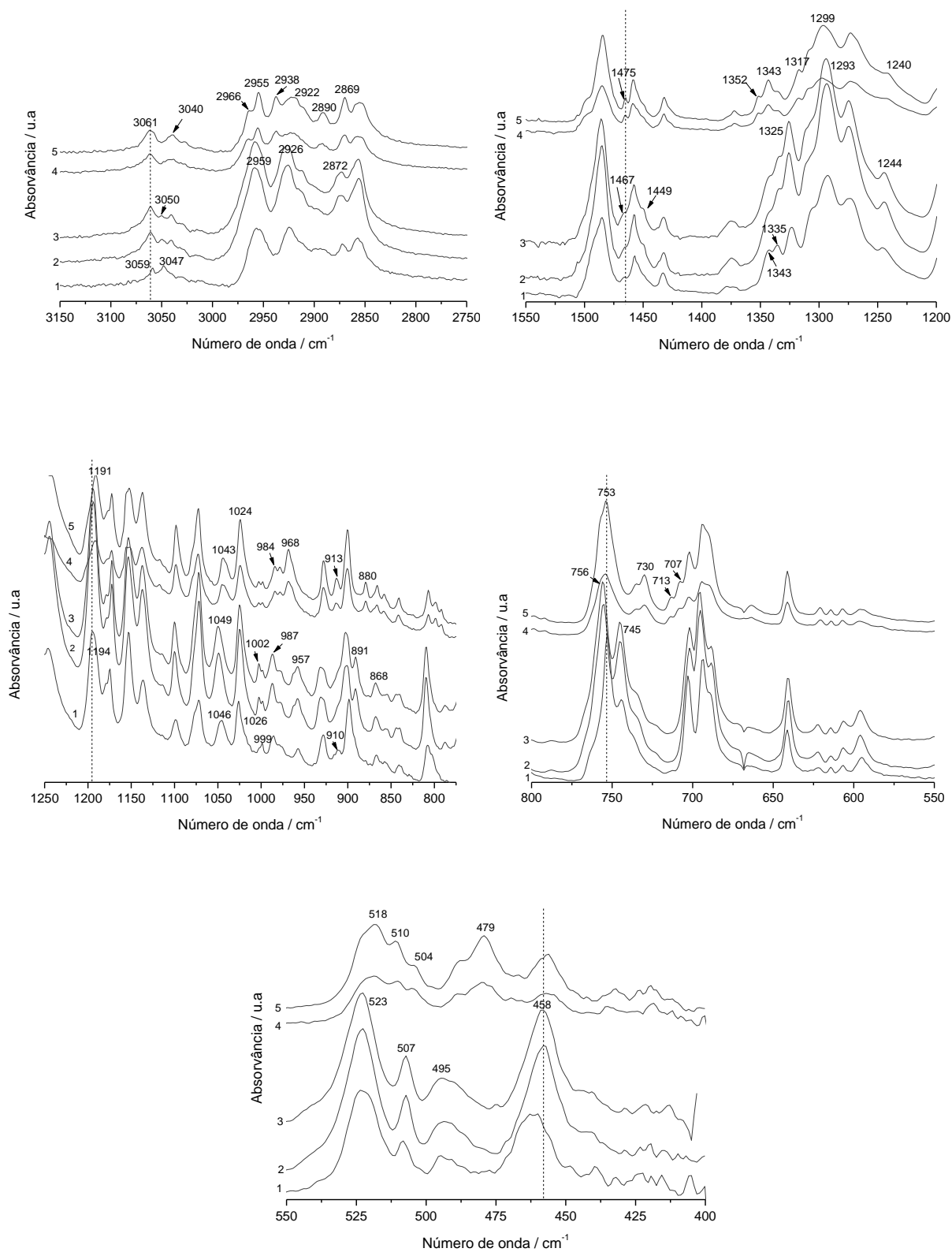


Figura 23 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona. 1. amostra de partida; sólido obtido por cristalização em: 2. acetato de etilo; 3. Acetona (esferulite); 4. etanol; 5. metanol.

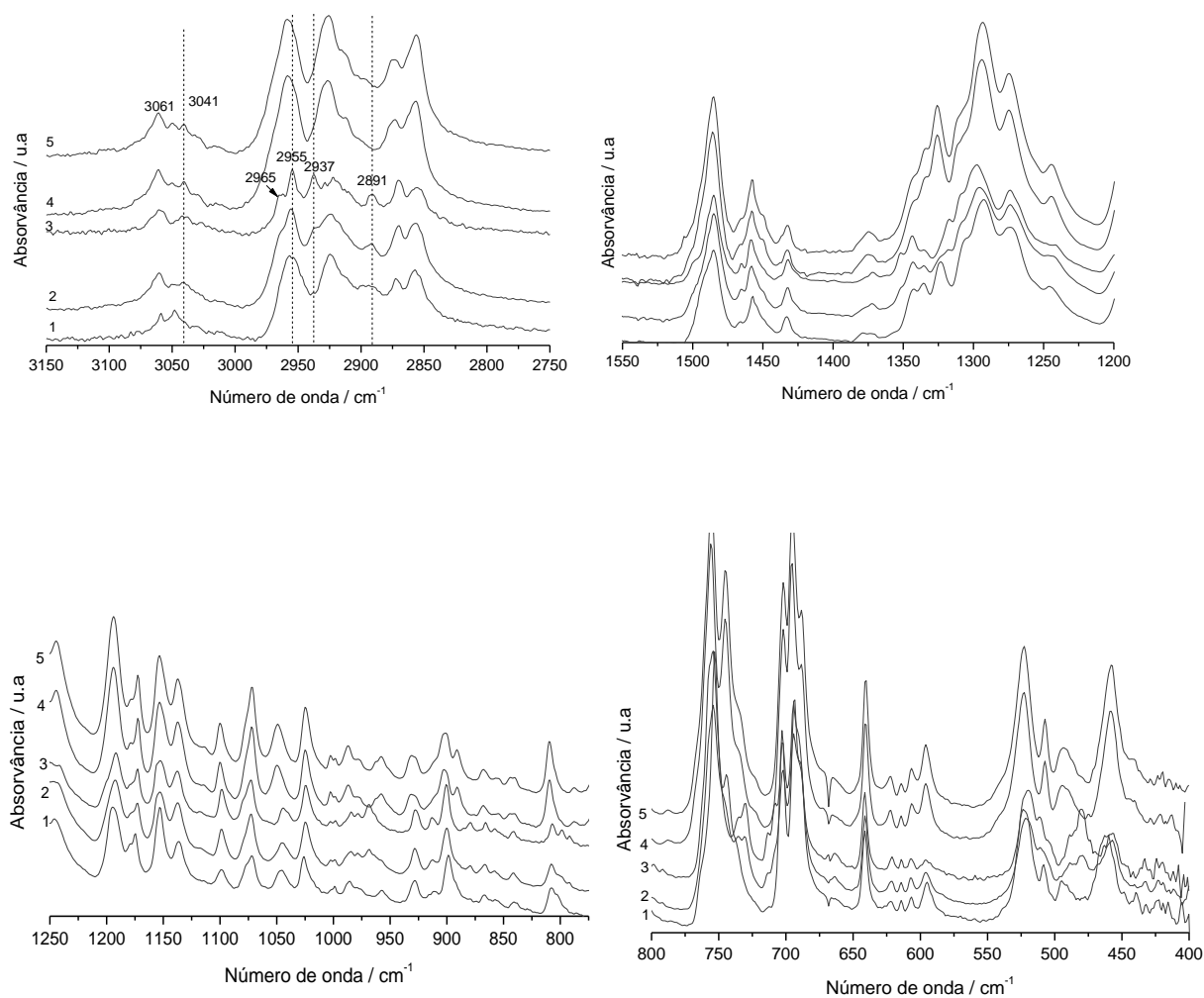


Figura 24 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona. 1. amostra de partida; sólido obtido por cristalização em: 2. acetona (2ª solução); 3. acetato de etilo (2ª solução); 4. acetona (1ª solução); 5. acetato de etilo (1ª solução).

É interessante verificar ainda que os cristais obtidos em acetona, com hábitos cristalinos diferentes, acículas e esferulites, têm espectros de infravermelho com algumas diferenças, Figura 25.

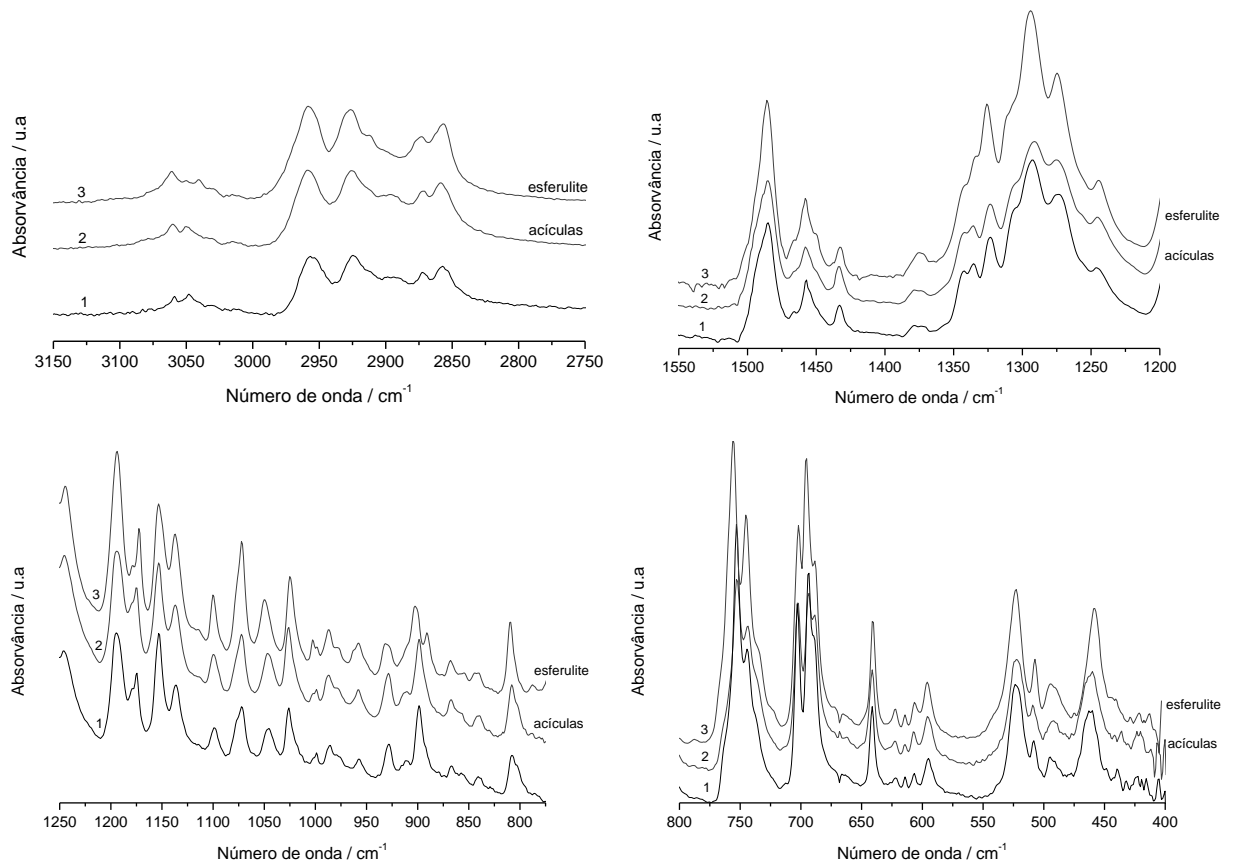


Figura 25 – Espectros de infravermelho de fenilbutazona. 1. amostra de partida; sólido obtido por cristalização em acetona: 2. acículas; 3. esferulites.

Os difratogramas de pó apresentados nas Figuras 26 a 28 indicam que em etanol e em metanol se obteve o polimorfo α , enquanto que em acetona, apesar desta ser também a forma sólida dominante, há cristalização concomitante da forma δ . Em acetato de etilo a forma α é também maioritária apesar de, pelo reultados do infravermelho se poder antecipar contaminação com outro polimorfo.

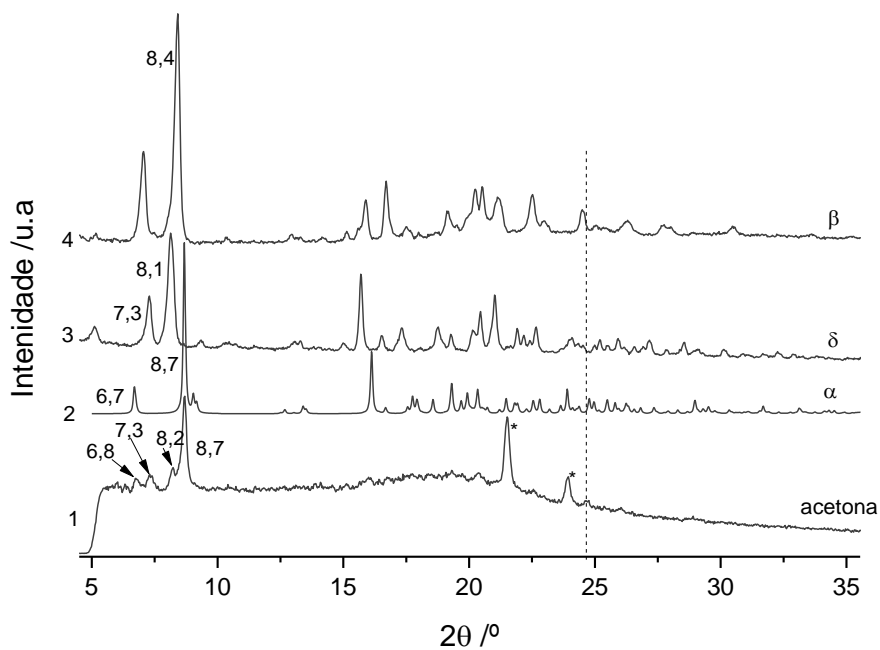


Figura 26 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. sólido obtido a partir da cristalização em acetona; 2. simulado (forma α); 3. amostra de partida (forma δ); 4. polimorfo β ; *contaminante.

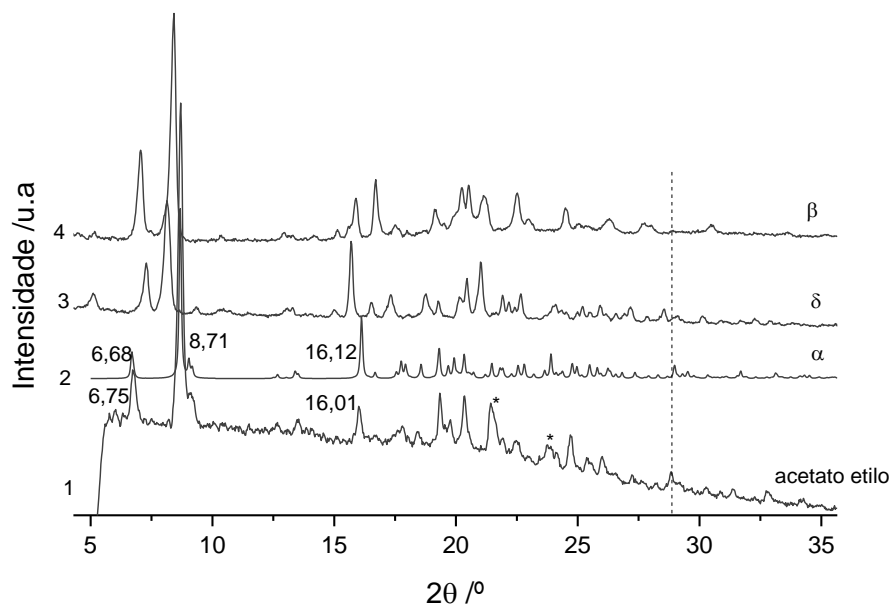


Figura 27 – Difratogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. sólido obtido a partir da cristalização em acetato de etilo; 2. simulado (forma α); 3. amostra de partida (forma δ); 4. polimorfo β ; *contaminante.

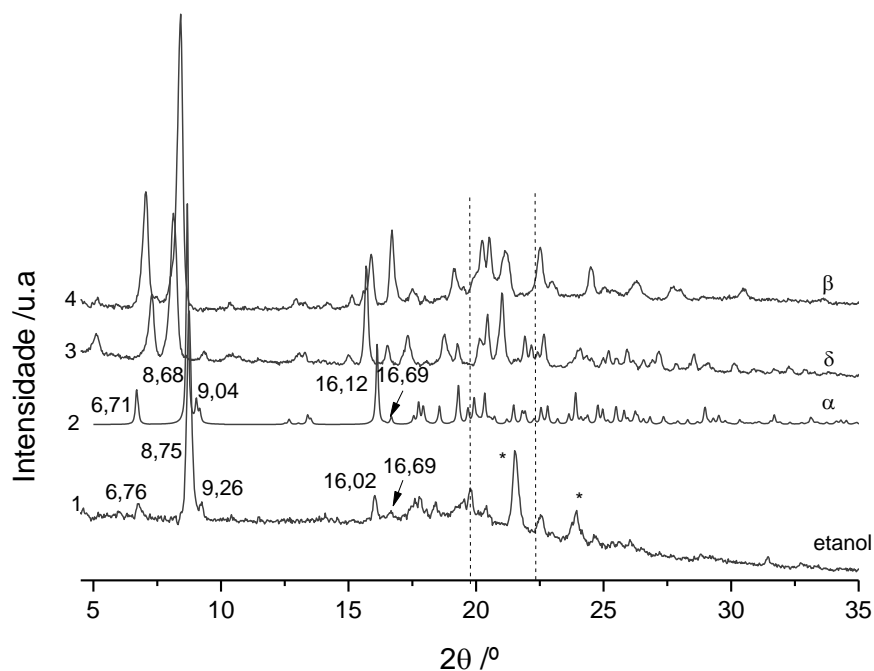


Figura 28 – Difratoogramas de raios-X de pó da fenilbutazona: 1. sólido obtido a partir da cristalização em etanol; 2. simulado (forma α); 3. amostra de partida (forma δ); 4. polimorfo β ; *contaminante.

Curvas de DSC obtidos para os sólidos cristalizados nestes 4 solventes estão ilustradas na Figura 29.

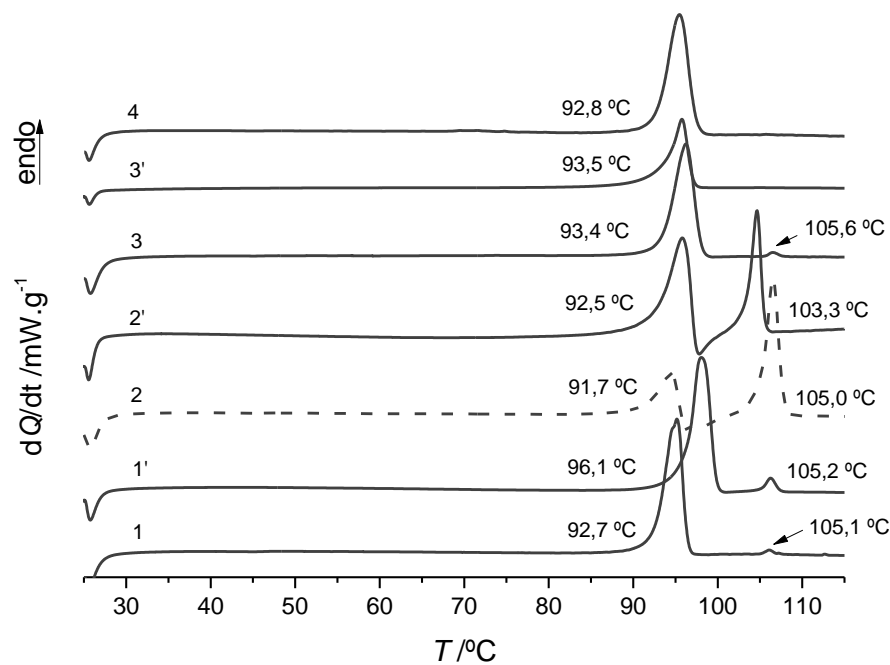


Figura 29 – Curvas de DSC de aquecimento dos sólidos obtidos por cristalização da fenilbutazona em: 1; 1'. acetato de etilo; 2; 2'. acetona; 3; 3'. etanol; 4. metanol, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$. Os valores de temperatura indicados dizem respeito ao onset dos picos.

O comportamento térmico do polimorfo α , obtido por cristalização em metanol e etanol, registado por termomicroscopia está ilustrado nas Figuras 30, 31 e A2.

Nas imagens de PLTM para cristais obtidos em acetona, Figura 32, podemos ver cristais com dois tipos de morfologia, um que inicia a fusão a $T_{\text{fus}} \sim 93^{\circ}\text{C}$, polimorfo α , com recristalização do fundido a $T \sim 97^{\circ}\text{C}$. Os cristais com hábito de agulhas finas, só iniciam a fusão a $T \sim 104^{\circ}\text{C}$. A fusão do recristalizado ocorre no mesmo valor de temperatura, o que indica que deverá ser a mesma forma sólida, δ .

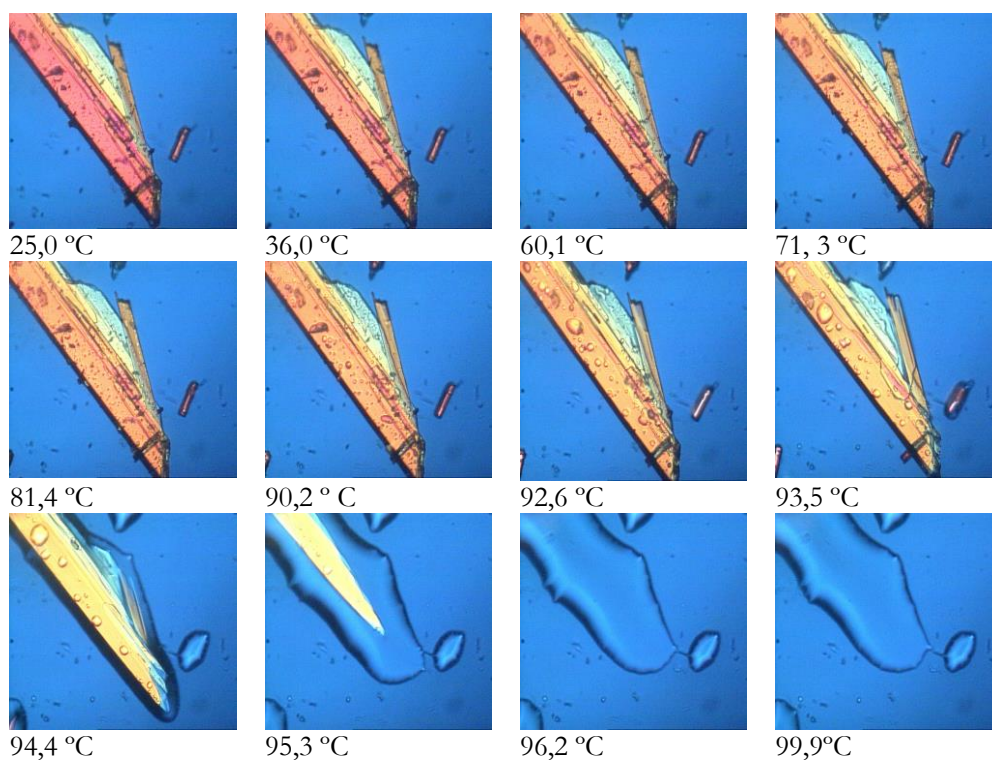


Figura 30 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em etanol, polimorfo α , de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ampliação 200x.

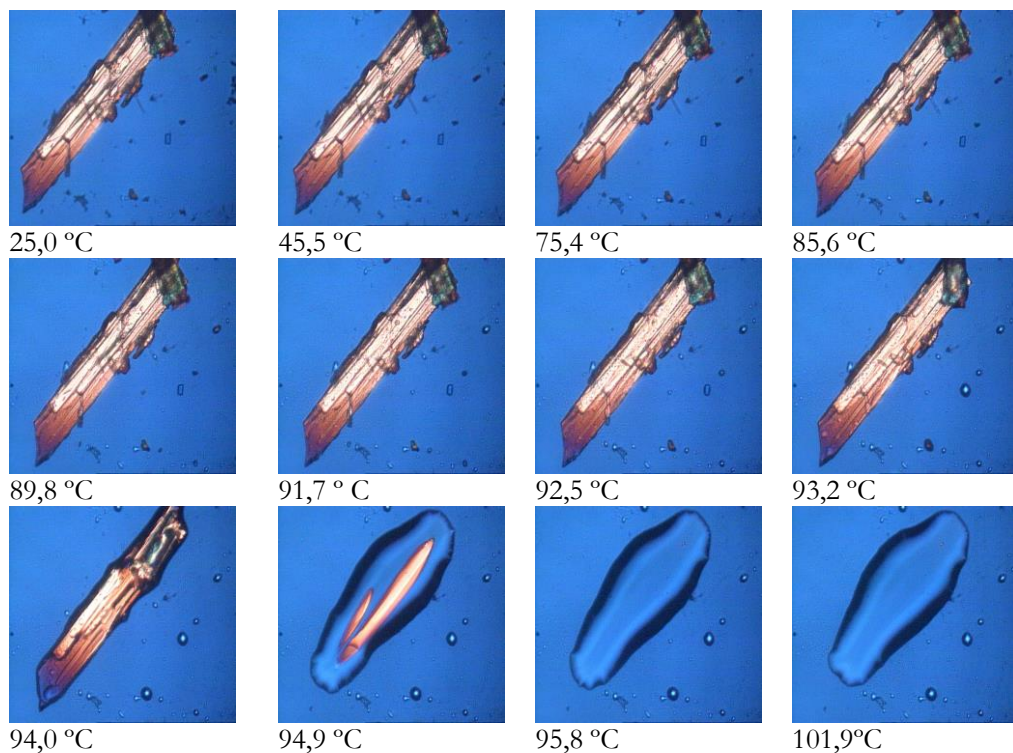


Figura 31 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em metanol, polimorfo α , de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.

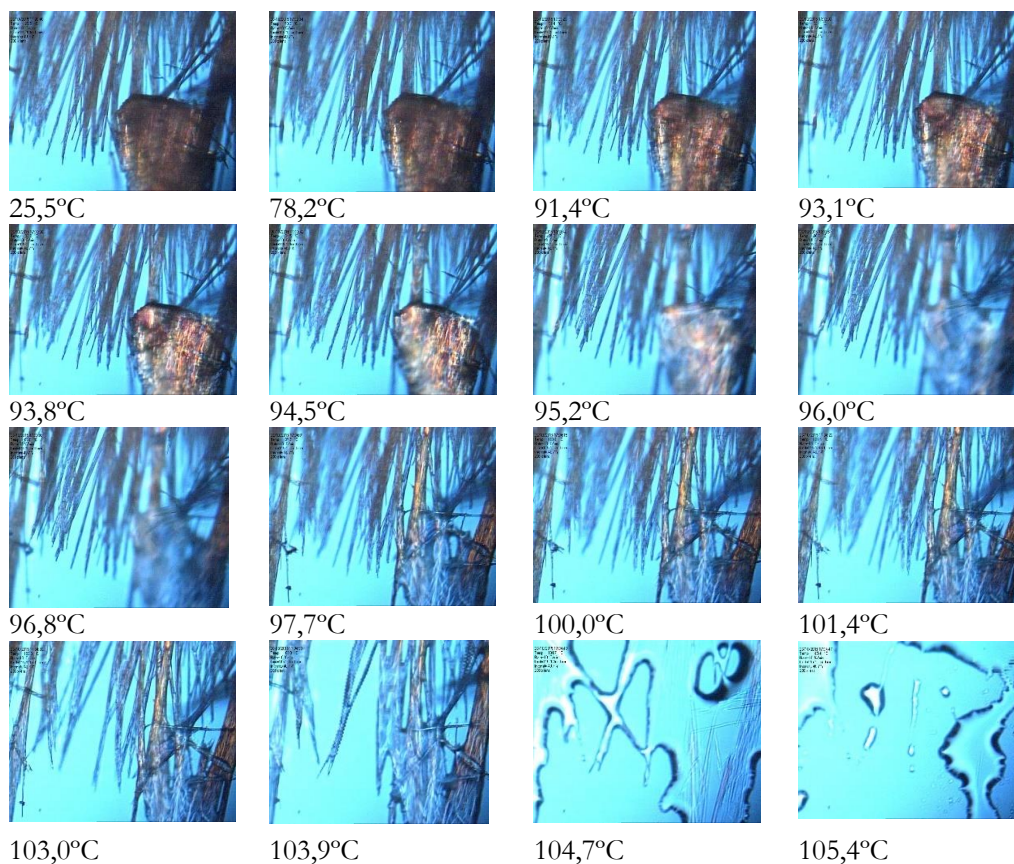


Figura 32 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em acetona, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.

Estudos complementares feitos por PLTM sobre o sólido obtido por cristalização em acetato de etilo mostram a fusão de uma única forma sólida com temperatura de fusão $T_{fus} \sim 93^{\circ}\text{C}$, polimorfo α , Figura 33. Noutro ensaio, Figura A4, uma outra forma sólida, recristaliza do fundido ou, em caso de já existir concomitantemente com a que funde primeiro a $T \sim 93^{\circ}\text{C}$, cresce sobre o fundido e funde posteriormente a $T \sim 105^{\circ}\text{C}$.

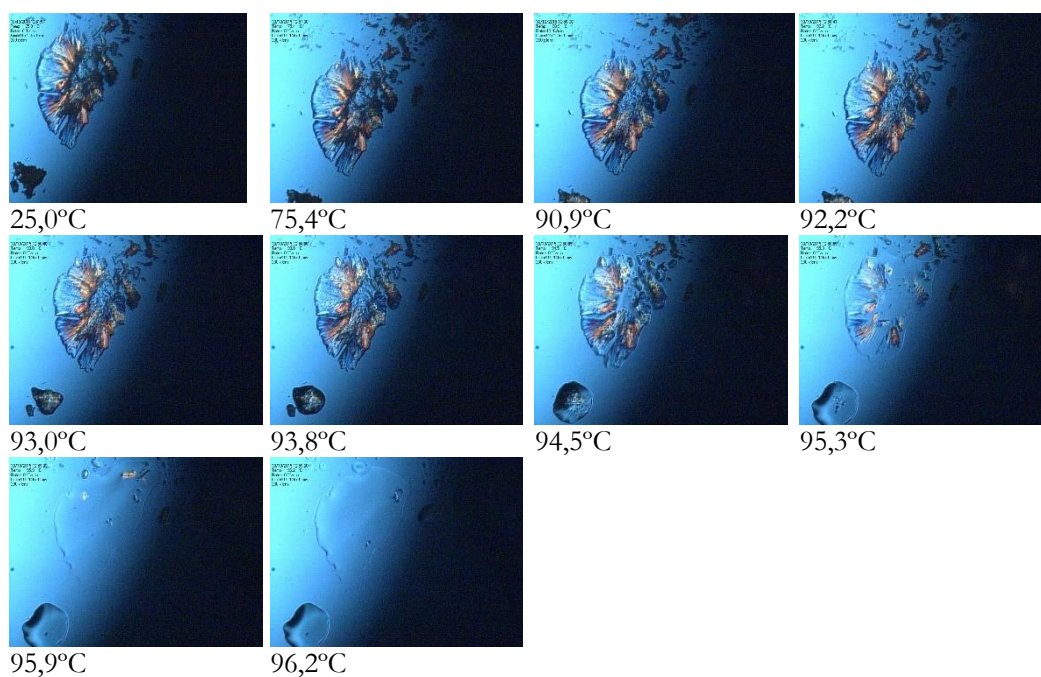


Figura 33 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em acetato de etilo, de 25°C a 115°C , $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ampliação 200x.

4.3.2. Cristalização em diclorometano

Foi realizado apenas um estudo exploratório para este sistema, que merece, no entanto, ser referido. Na figura 34 encontra-se a representação de curvas de DSC para o sólido obtido por cristalização em diclorometano. A análise por DSC em cápsula fechada revelou uma curva muito complexa, curva 1, indicação de provável formação de solvato. Uma cápsula perfurada foi usada para uma segunda análise, obtendo-se uma curva muito diferente da primeira, curva 2, com um primeiro pico endotérmico de baixa energia a $T = 84^{\circ}\text{C}$ e um segundo pico endotérmico de maior energia a $T = 100^{\circ}\text{C}$. Outros estudos seriam necessários para confirmação, mas tudo indica formação de um solvato de fenilbutazona com diclorometano.

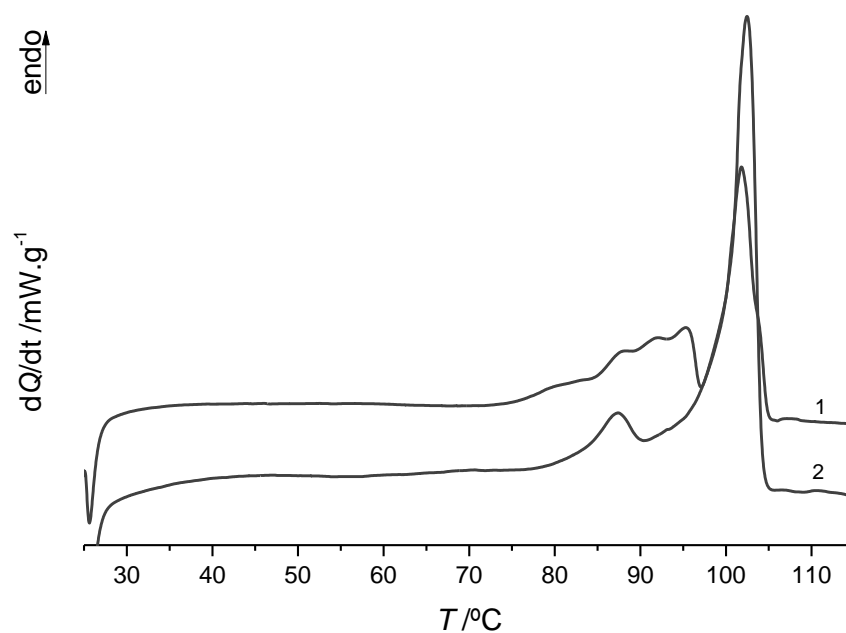


Figura 34 – Curvas de DSC de aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em diclorometano: 1. cápsula fechada; 2. Capsula perfurada, $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$.

Imagens PLTM do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em diclorometano, Figura 35, mostram um primeiro processo de fusão a $T \sim 88^\circ\text{C}$. Este processo termina a $T = 95,0^\circ\text{C}$, ficando um pequeno cristal intacto, assinalado na Figura a $T = 95,4^\circ\text{C}$. Podemos ver também, pequenas “agulhas” no fundido, que poderiam já existir concomitantemente com a forma sólida que fundiu anteriormente, ou ter-se formado a partir do fundido. A fusão do pequeno cristal inicia-se a $T \sim 96^\circ\text{C}$, consistente com a forma β , e as pequenas agulhas são as últimas a fundir a $T = 102^\circ\text{C}$. Evidência desta forma sólida, com $T_{\text{fus}} = 102^\circ\text{C}$, distinto da forma δ e, obviamente das formas α e β foi registada, por exemplo, nas Figuras 15 e 16 (e Tabela 9).

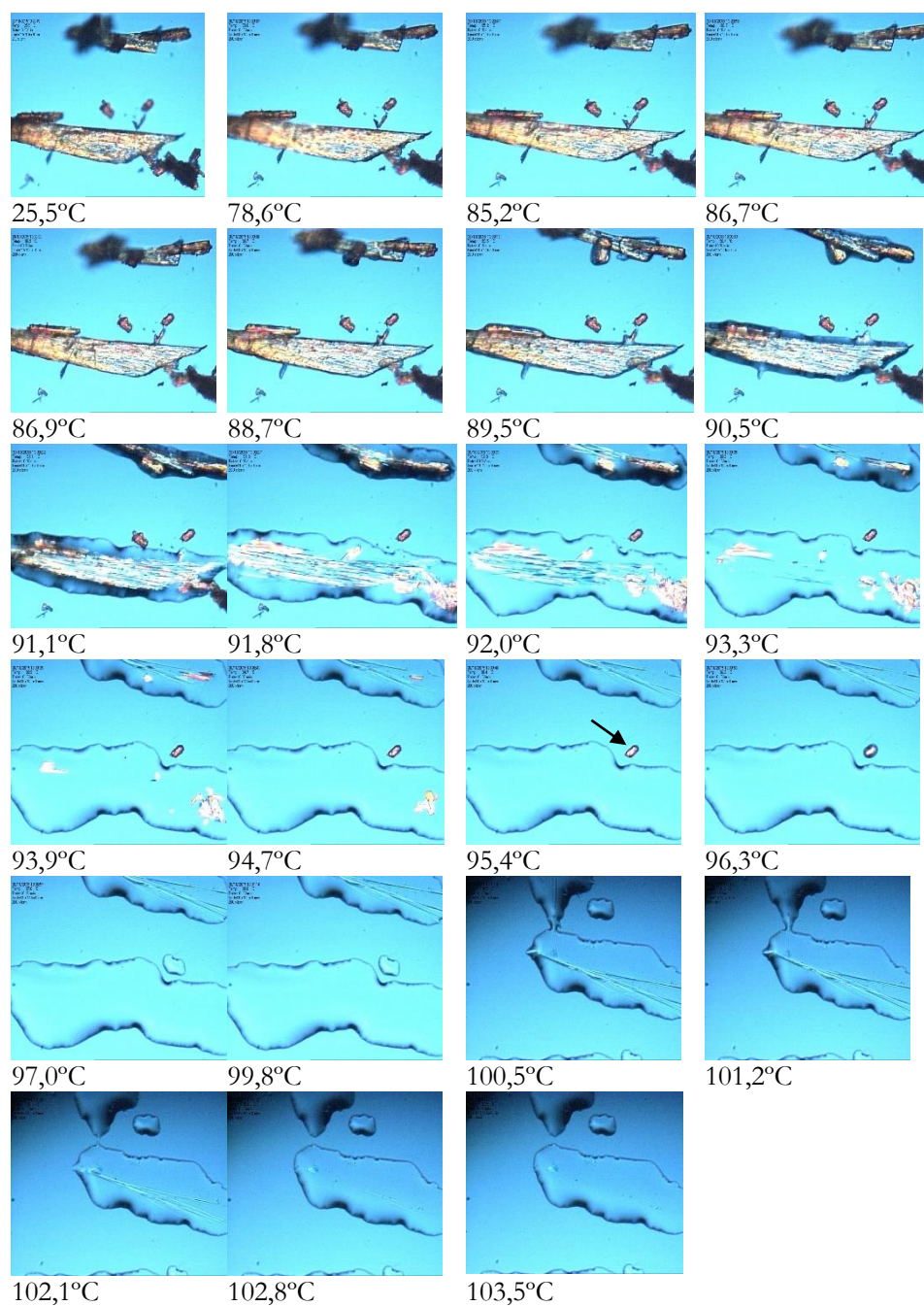


Figura 35 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em diclorometano, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.

4.4. Roxadustate

4.4.1. Caracterização do composto de partida e pesquisa de polimorfos

O comportamento térmico da amostra de roxadustate de partida foi caracterizado por calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e por TG/DSC. As amostras foram sujeitas a ciclos de aquecimento / arrefecimento, ocorrendo degradação da amostra logo após a fusão, confirmado por

TG/DSC na Figura 37, pelo que o estudo foi limitado somente a ciclos de aquecimento entre os 25 °C e os 230 °C, com velocidade de varrimento de $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Na Figura 36 encontra-se exemplificada uma curva de DSC, que apresenta um pico estreito endotérmico de energia elevada referente à fusão do composto, a $T_{\text{fus}} = (223,5 \pm 0,6) \text{ }^\circ\text{C}$ e entalpia de fusão $\Delta_{\text{fus}}H = (47,0 \pm 1,0) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($n = 5$).

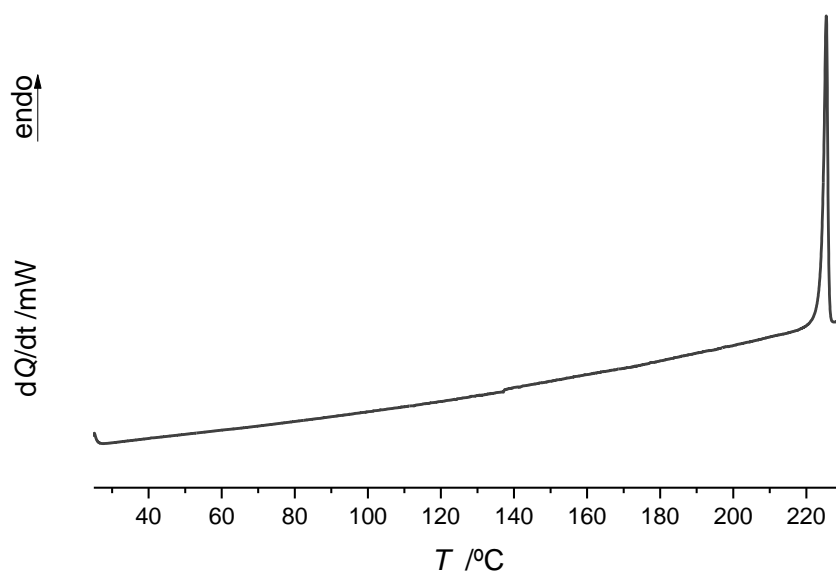


Figura 36 – Curva de DSC de aquecimento de roxadustate de partida, $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

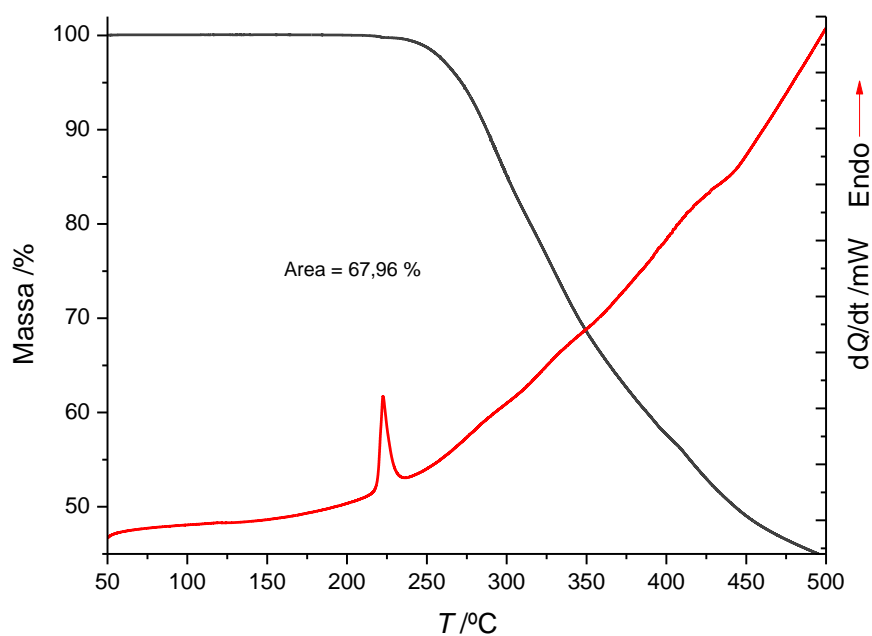


Figura 37 – Curvas de TG / DSC registadas no aquecimento de roxadustate de partida; $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$; $m = 14,22 \text{ mg}$, atmosfera de azoto.

No processo de aquecimento não ocorre qualquer outro evento para além da fusão, como mostra a imagem obtida por PLTM, Figura 38.

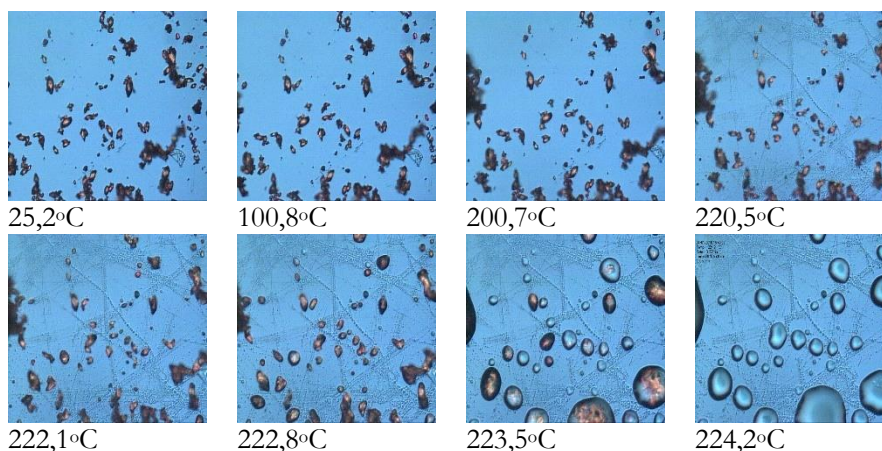


Figura 38 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento da amostra do roxadustate de partida, de 25 °C a 230 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.

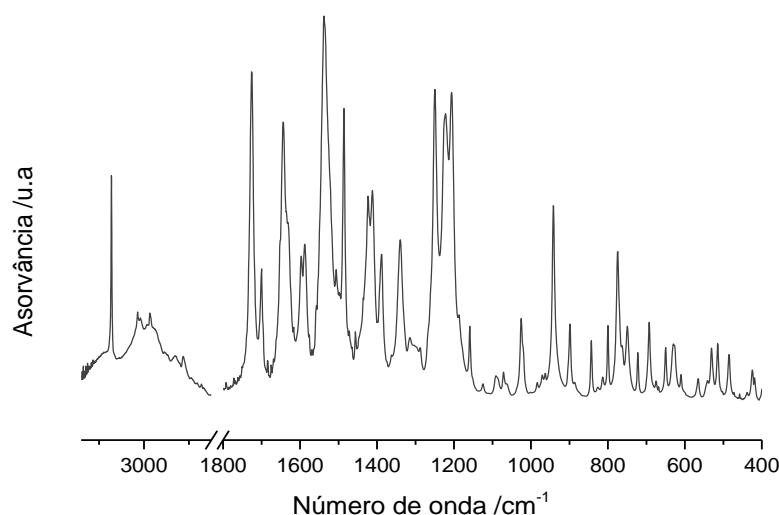


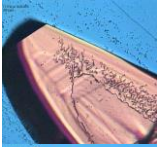
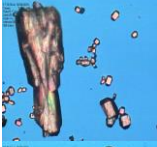

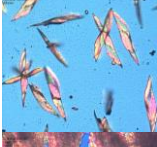
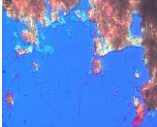


Figura 39 – Espectro de infravermelho do roxadustate, amostra de partida.

A amostra de partida do roxadustate foi analisada por espectroscopia de infravermelho, apresentando-se o espectro na Figura 39. Podemos ver que o espectro do roxadustate apresenta uma banda larga na região 3600-3200 cm^{-1} característica da elongação do OH do álcool. Entre os 3200-2400 cm^{-1} encontra-se a banda característica da elongação do OH do grupo carboxílico, a 3362 cm^{-1} a referente à elongação do NH do grupo amina, a 1724/1700 cm^{-1} a banda característica da elongação do grupo C=O e a banda referente à vibração do anel entre 1586-1486 cm^{-1} . As duas bandas entre 1275-1200 cm^{-1} e 1075-1020 cm^{-1} são característicos de ésteres aromáticos (C-O-C). A banda a 941 cm^{-1} é referente à deformação O-H...O, característica de dímeros de ácidos carboxílicos¹³⁰.

Com o intuito de pesquisar novas formas sólidas do roxadustate, foram feitos ensaios de cristalização em alguns solventes, etanol, metanol, acetona, *n*-propanol, 1,4-dioxano, acetonitrilo, diclorometano, por evaporação lenta do solvente à temperatura ambiente. Os sólidos obtidos foram analisados por PLTM, espectroscopia de infravermelho e difração de raios-X. As imagens e o hábito cristalino encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Caraterização morfológica dos sólidos obtidos no processo de cristalização do roxadustate em diferentes solventes, observação sob luz polarizada, ampliação 200x.

Solvente	Imagem	Hábito cristalino
1-propanol		
Acetona		
Acetonitrilo		Placas
Diclorometano		Placas e esferulite
Etanol		
Metanol		Placas
1,4 – dioxano		Esferulite

A análise dos sólidos obtidos por cristalização nos diferentes solventes por FTIR-ATR, exemplificados na Figura 40, para 3 deles, permite concluir que não ocorre qualquer deslocação das bandas características, sendo que os espectros são iguais ao da amostra de roxadustate de partida obtendo-se, portanto, a mesma forma polimórfica em todos os ensaios.

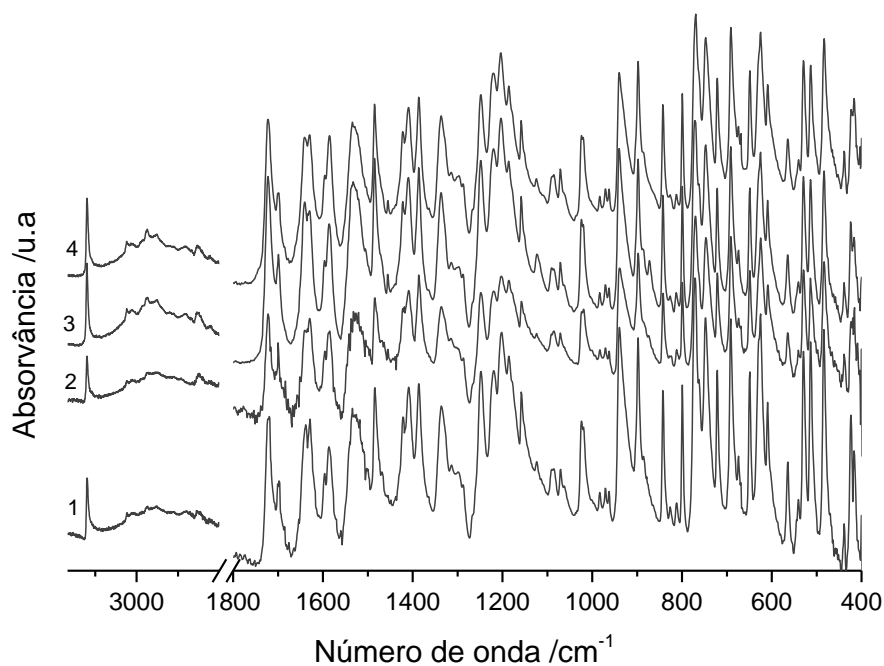


Figura 40 – Espectros de infravermelho de roxadustate: 1. Amostra de partida; sólidos obtidos por cristalização em diferentes solventes: 2. etanol; 3. 1,4-dioxano; 4. 1-propanol.

Em etanol obtiveram-se cristais com qualidade para análise por difração de raios-X de monocristal tendo sido resolvida a estrutura cristalina, que foi depositada na Cambridge Structural Database com o número de registo CCDC 1469842. Os parâmetros cristalográficos não são diferentes dos apresentados por Claudia Witchi *et al.* (ver patente US 2015/0322015 A1). No entanto os autores não fazem qualquer descrição da estrutura cristalina. O diagrama ORTEP, mostrando o esquema de numeração dos átomos de roxadustate, encontra-se na Figura 41, e os parâmetros cristalográficos na Tabela 12.

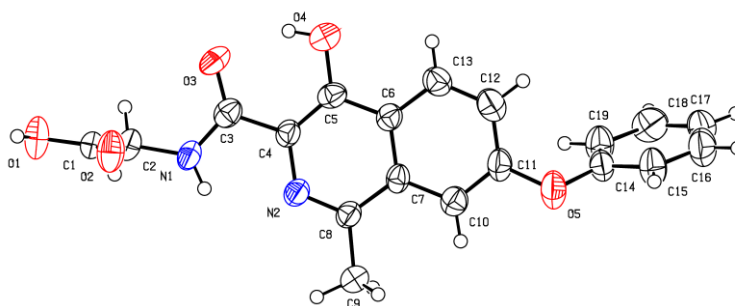


Figura 41 – ORTEP da estrutura do roxadustate mostrando a numeração dos átomos (elipsoides desenhados ao nível de 50 % de probabilidade); T = 20 °C, CCDC 1469842.

Tabela 12 – Parâmetros cristalográficos para o monocristal de roxadustate obtido por cristalização em etanol a $T = 20$ °C, CCDC 1469842.

Roxadustate	
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
a / Å	8,5772(4)
b / Å	9,2702(5)
c / Å	11,3654(7)
α / °	99,140(4)
β / °	108,396(4)
γ / °	102,339(4)
V / Å ³	812,36(8)
Z	2

Tabela 13 – Geometria das ligações de hidrogénio no cristal de roxadustate, CCDC 1469842.

	D...A / Å	D-H...A / °
N(1)–H(1N)···N(2)	2,636(4)	117(3)
O(1)–H(1O)···O(2)*	2,631(3)	174(3)
O(4)–H(4O)···O(3)	2,645(3)	149(3)
C(10)–H(10)···O(3)**	3,447(4)	166

*Operação de simetria 1-x, -y, -1-z

** Operação de simetria: x, 1+y, z

O roxadustate cristaliza num arranjo centro-simétrico numa célula unitária triclínica, Figura 42a. A célula assimétrica contém uma molécula completa de roxadustate. Em cada molécula os 16 átomos centrais partilham o mesmo plano definido pelos dois anéis fundidos. Apenas os grupos localizados nas extremidades, um anel benzénico e um grupo carboxílico, pertencem a planos distintos, Figura 42b. As moléculas agregam-se em pares relacionados por um centro de simetria através de duas ligações de hidrogénio entre dois grupos carboxílicos que se orientam frente a frente, Figura 42c. Existem também duas ligações de hidrogénio intramoleculares entre os dois átomos de nitrogénio e os dois átomos de oxigénio do grupo hidroxilo e do grupo cetona. A célula unitária não contém espaço vazio com tamanho suficiente para acomodar moléculas de solvente.

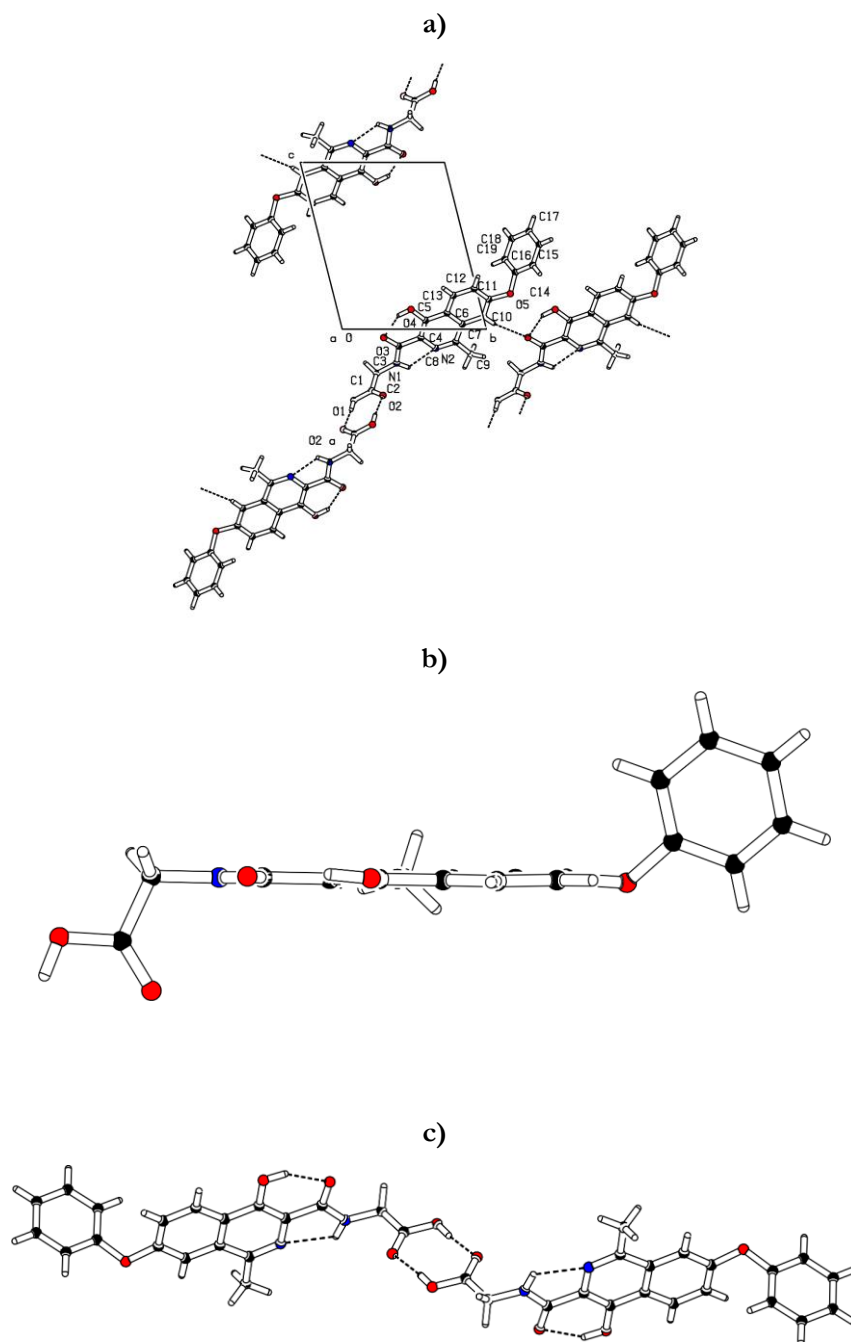


Figura 42 – a) Célula unitária da roxadustate, mostrando as ligações de hidrogénio; **b)** A molécula de roxadustate, na estrutura CCDC 1469842, evidenciando a planaridade da parte central; **c)** Dímeros centrossimétricos de roxadustate na estrutura, CCDC 1469842.

Na Figura 42 apresenta-se a célula unitária do roxadustate, mostrando as ligações de hidrogénio, onde podemos ver que as moléculas formam cadeias de dímeros na rede cristalina, através das ligações de hidrogénio intermoleculares $O(1)-H(1O)\cdots O(2)$. Formam-se também ligações de hidrogénio intramoleculares $N(1)-H(1N)\cdots N(2)$ e $O(4)-H(4O)\cdots O(3)$ e intermoleculares fracas

C(10)–H(10)⋯O(3). Na Tabela 13, encontram-se os parâmetros geométricos das ligações de hidrogénio existentes nesta estrutura cristalina do roxadustate.

Da comparação do difratograma de raios-X de pó experimental para a amostra de partida, Figura 43, com o simulado para a estrutura cristalina resolvida, podemos concluir que o sólido obtido por cristalização em etanol apresenta a mesma forma cristalina que a amostra de partida, como já havia sido referido anteriormente, com base nos espetros de infravermelho, Figura 40. Outros cristais obtidos por cristalização noutros solventes, nomeadamente metanol, 1-propanol e acetonitrilo, foram também analisados por difração de raios-X de monocristal, apresentando todos a mesma estrutura cristalina idêntica à obtida em etanol.

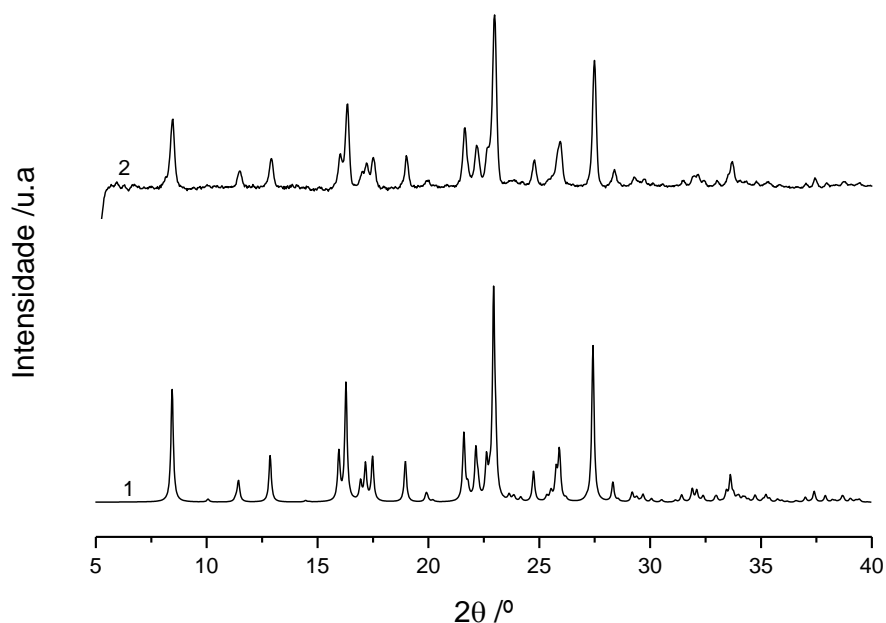


Figura 43 – Difratogramas de raios-X de pó do roxadustate: 1. experimental para a amostra de partida; 2. simulado para a estrutura CCDC 1469842.

4.4.2. Investigação da formação de co-cristais de roxadustate

A investigação de formação de co-cristais do roxadustate foi feita utilizando a mecanoquímica assistida por solvente, como descrito na secção 3.2.2. Como tal, fez-se a moagem do roxadustate, nas mesmas condições, de forma de avaliar o comportamento da amostra de partida quando submetida ao processo de moagem. Na Figura 44, encontram-se os difratogramas experimentais de raios-X de pó das duas amostras.

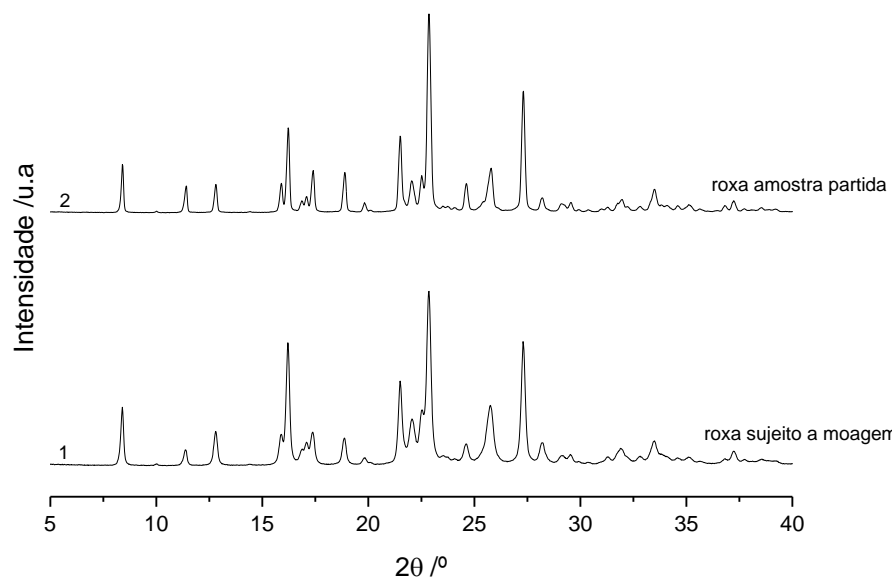


Figura 44 – Difratomogramas de raios-X de pó experimentais de roxadustate para: 1. amostra obtida por moagem com adição de 10 μL de etanol; 2. amostra de partida.

Podemos observar que as reflexões do difratograma 2, correspondente à amostra sujeita a moagem, não apresentam quaisquer alterações em relação à amostra de partida, difratograma 1, concluindo que o composto mantém a mesma estrutura sólida.

Os termogramas obtidos por aquecimento em DSC de 25 °C a 230°C, Figura 45, confirmam que o processo de moagem não altera o comportamento térmico de roxadustate.

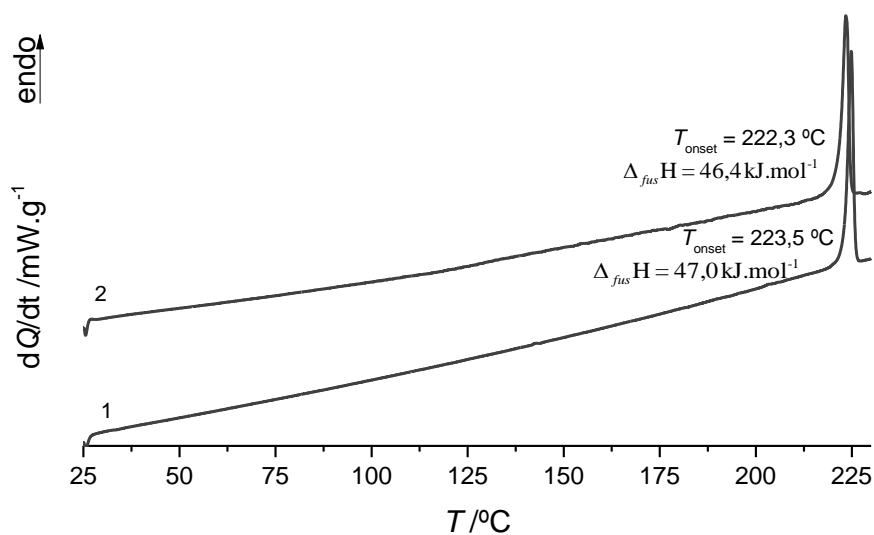


Figura 45 – Curvas de DSC de aquecimento para roxadustate: 1. amostra de partida; 2. amostra obtida por moagem com adição de 10 μL de etanol, $\beta = 10$ °C/min.

A investigação de formação de co-cristais do roxaduste prosseguiu com a moagem em moinho de bolas assistida por solvente de misturas de roxadustate e diferentes co-formadores, na proporção 1:1. Sempre que se justificou, foram estudadas misturas noutras proporções. Para cada mistura, foi feita uma análise preliminar por espectroscopia de infravermelho, FTIR - ATR, e por DSC e posterior análise por difração de raios-X para as misturas em que havia indicação de possível associação entre os compostos.

Roxadustate + Piridinacarboxamidas

Roxadustate + isonicotinamida

Misturas equimolares de roxadustate e isonicotinamida obtidas por moagem em moinho de bolas assistida de etanol, foram analisadas por DSC. Na Figura 46 estão representados os termogramas das misturas obtidos por DSC, bem como os dos compostos puros, roxadustate e isonicotinamida.

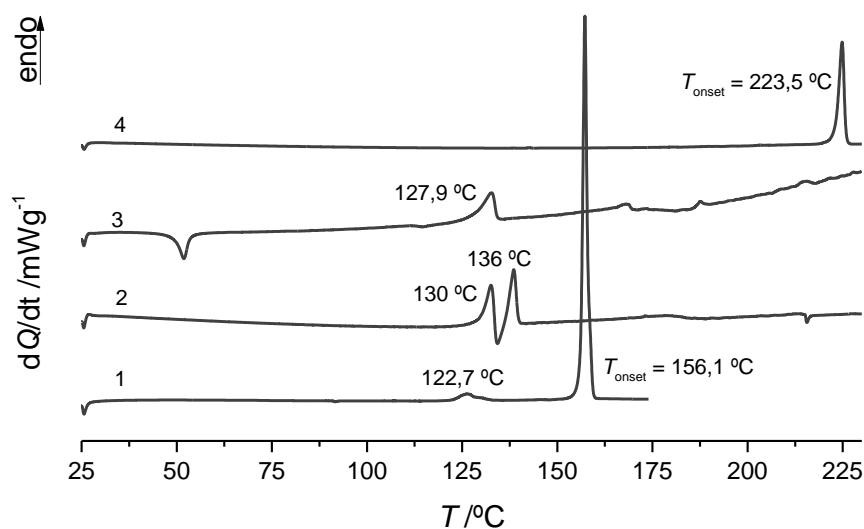


Figura 46 – Curvas de DSC de aquecimento para: **1.** isonicotinamida, I; **2.** mistura roxadustate e isonicotinamida obtida por moagem na proporção 1:1 com adição de 10 μL de etanol; **3.** mistura roxadustate e isonicotinamida obtida por moagem na proporção 1:1 sem adição de solvente **4.** roxadustate. $\beta = 10$ °C/min.

A isonicotinamida, curva 1, apresenta uma transição sólido-sólido a 122,7 °C, correspondente à transição do polimorfo II para o polimorfo I¹⁰⁵ seguida da fusão a 156,1 °C, polimorfo I. O termograma da mistura do roxadustate e isonicotinamida obtida por moagem com adição de solvente, curva 2, apresenta dois picos endotérmicos a 130 °C e a 136 °C, abaixo da temperatura de fusão dos compostos puros, o que poderá ser atribuído à fusão de misturas eutéticas

com diferentes formas polimórficas da isonicotinamida. A isonicotinamida I transforma-se na forma II por moagem assistida por etanol¹⁰¹. A curva 3, referente à mistura de roxadustate e isonicotinamida obtida por moagem sem adição de solvente, apresenta dois picos, um pico exotérmico a $T \sim 50\text{ °C}$ e um outro endotérmico a $127,9\text{ °C}$ referente à fusão da mistura eutética.

A mistura foi também analisada por espectroscopia de infravermelho. O espectro da mistura bem como dos compostos puros, roxadustate e isonicotinamida, são apresentados na Figura 47.

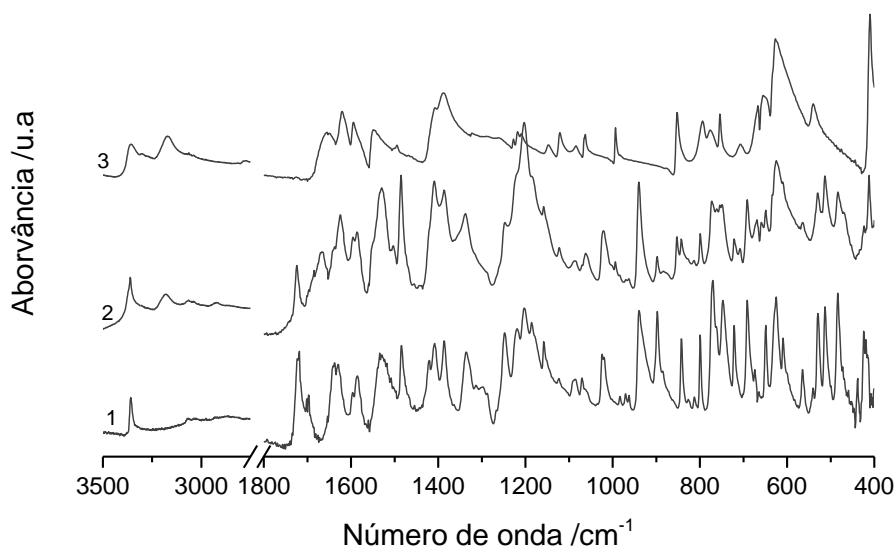


Figura 47 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e isonicotinamida obtida por moagem na proporção 1:1; 3. isonicotinamida, II.

Por análise dos espectros podemos concluir que o espectro da mistura, espectro 2, não apresenta alterações, correspondendo à soma dos espectros dos compostos puros. Podemos concluir que, nas condições utilizadas, não ocorre formação de co-cristal entre os compostos de partida.

Roxadustate + nicotinamida

A mistura de roxadustate e nicotinamida obtida por moagem assistida de etanol, na proporção (1:1) foi analisada por DSC. Na curva de DSC, Figura 48, podemos ver um pico endotérmico a 116 °C , abaixo do ponto de fusão dos compostos puros, o que poderá indicar fusão de uma mistura eutética, seguida de fusão de um excesso de roxadustate.

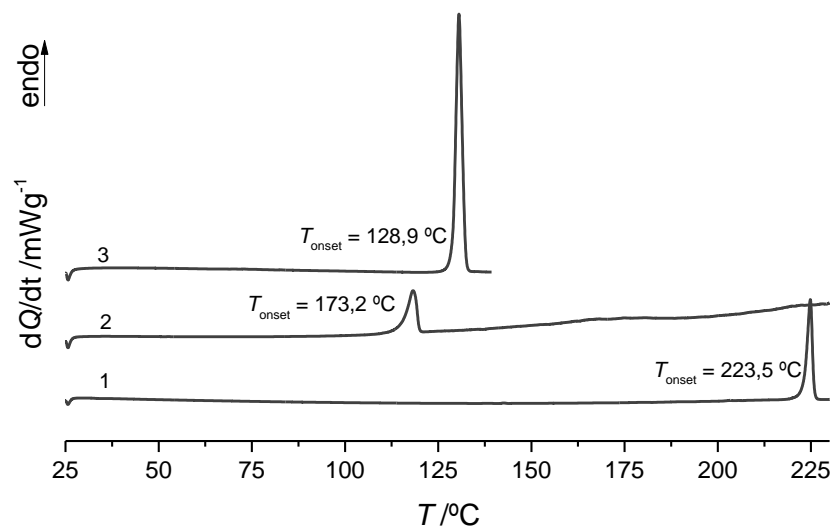


Figura 48 – Curvas de DSC de aquecimento: **1.** roxadustate; **2.** mistura roxadustate e nicotinamida (1:1); **3.** nicotinamida. $\beta = 10^\circ C/min$.

Os espectros de infravermelho que se encontram na Figura 49 confirmam a obtenção, por moagem de uma mistura física dos compostos.

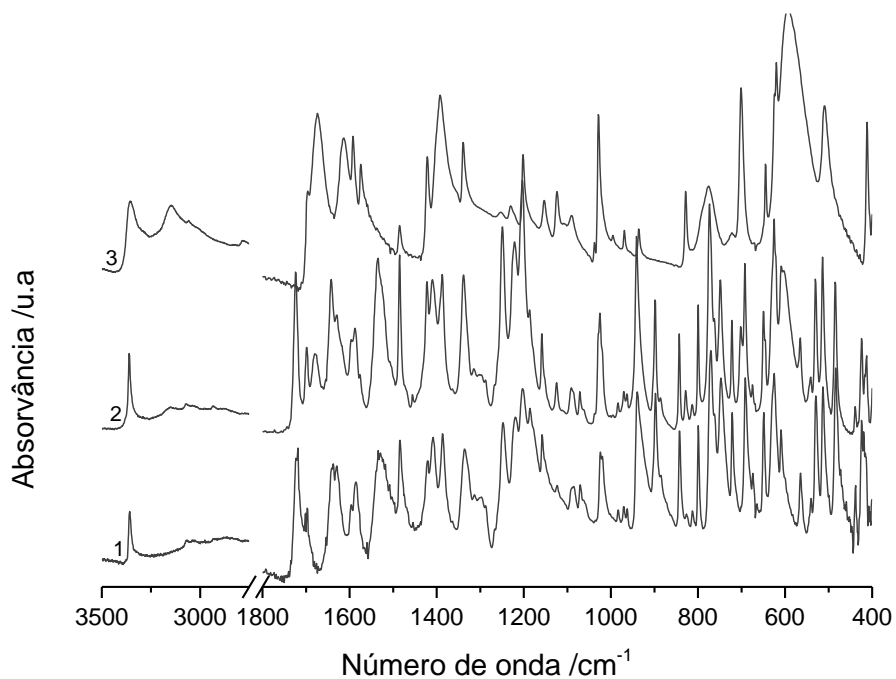


Figura 49 – Espectros de infravermelho de: **1.** roxadustate; **2.** mistura de roxadustate e nicotinamida obtida por moagem na proporção 1:1; **3.** nicotinamida.

Roxadustate + picolinamida

O estudo do sistema roxadustate:picolinamida iniciou-se com a preparação de uma mistura equimolar por moagem em moinho de bolas assistida por 10 μ L de etanol. Na Figura 50 mostram-se as curvas de aquecimento, em DSC, da mistura e dos compostos puros.

Na curva de aquecimento da picolinamida, curva 3, podemos ver a ocorrência de uma transição sólido-sólido entre os 65 °C e os 80 °C, correspondente à transição do polimorfo II para o polimorfo I, seguida de fusão a 106,9 °C, polimorfo I. A presença de etanol no processo de moagem estabiliza o polimorfo II¹³².

A mistura apresenta um pico endotérmico a (151,4 \pm 0,2) °C, com entalpia $\Delta_{\text{fus}}H = (38,0 \pm 0,6)$ kJ.mol⁻¹, diferente dos compostos puros e muito superior à temperatura de fusão da picolinamida.

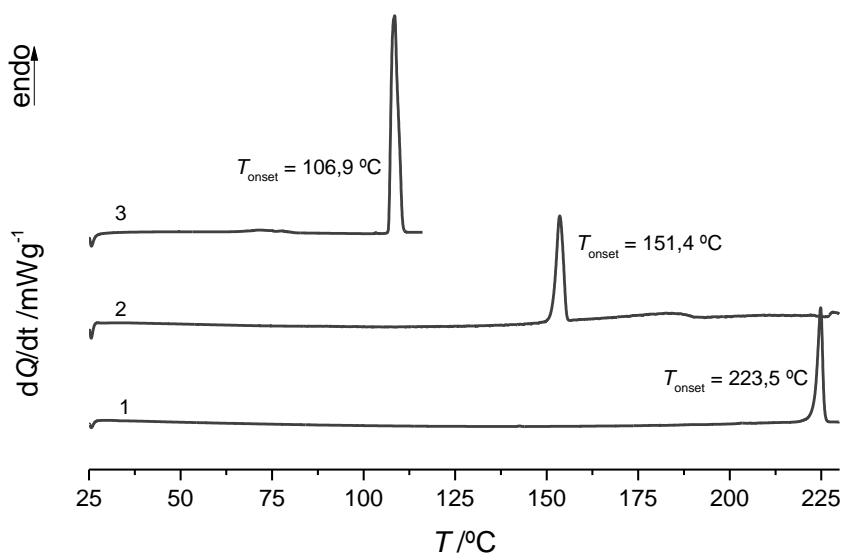


Figura 50 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. roxadustate; 2. mistura roxadustate e picolinamida (1:1); 3. picolinamida, II. $\beta = 10$ °C/min.

Como forma de esclarecer a natureza da mistura roxadustate e picolinamida, a amostra foi analisada por espectroscopia de infravermelho, Figura 51. Podemos ver que o espectro da mistura, espectro 2, apresenta alterações significativas em relação aos compostos puros, e a presença de bandas a 2245 cm⁻¹ e 1897 cm⁻¹, características do heterossintão formado pelos grupos ácido carboxílico e azoto do anel aromático⁴⁰. A elongação assimétrica do NH₂, que no espectro da picolinamida aparece a 3413 cm⁻¹, no espectro da mistura encontra-se deslocada para 3422 cm⁻¹. A elongação simétrica NH₂ desloca-se de 3273/3160 cm⁻¹ na picolinamida para 3310/3260 cm⁻¹ na mistura.

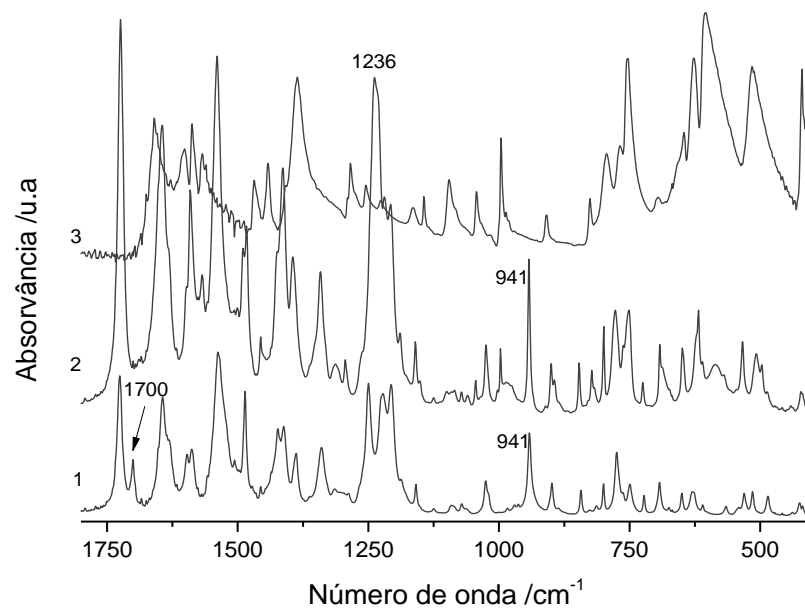
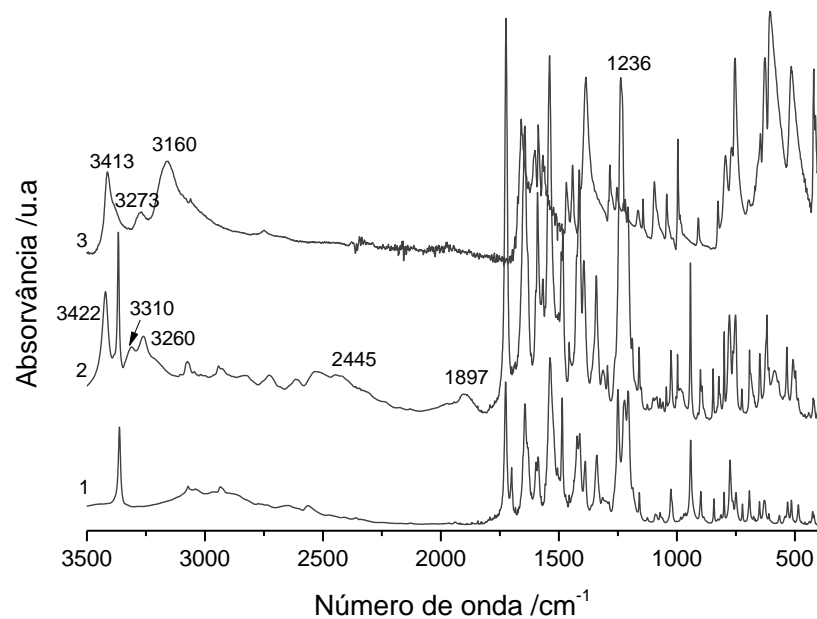


Figura 51 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida obtida por moagem na proporção 1:1; 3. picolinamida, II.

Os difratogramas experimentais de raios-X de pó da mistura de roxadustate e picolinamida estão representados na Figura 52, bem como os dos compostos puros. Podemos identificar novas reflexões no difratograma da mistura que confirmam a presença de um novo arranjo no estado sólido, nomeadamente a $5,9^\circ$, $14,0^\circ$ e $29,1^\circ$. É possível também assinalar reflexões nos compostos puros que deixam de observar-se no difratograma da mistura, tais como as reflexões a $8,3^\circ$ e $27,3^\circ$ para o roxadustate e a $20,7^\circ$ e $28,3^\circ$ para a picolinamida.

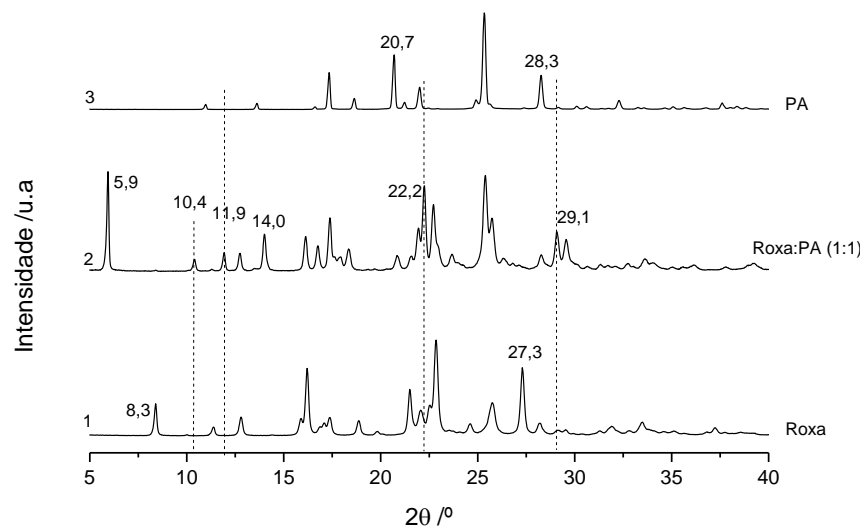


Figura 52 – Difratoformas de raios-X de pó experimentais para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida (1:1); 3. picolinamida, II.

Foram preparadas misturas com excesso de roxadustate ou de picolinamida em relação à proporção (1:1), que foram analisadas por calorimetria diferencial de varrimento e por difração de raios-X de pó. Os difratogramas experimentais de raios-X de pó, Figura 53, mostram na mistura na proporção (2:1) reflexões a 8,3° e a 27,3°, assinaladas com setas, que não são observados na mistura equimolar, indicando excesso de roxadustate. De igual forma podemos ver que a mistura na proporção (1:2) apresenta reflexões a 20,7° e 28,3°, referentes a excesso de picolinamida.

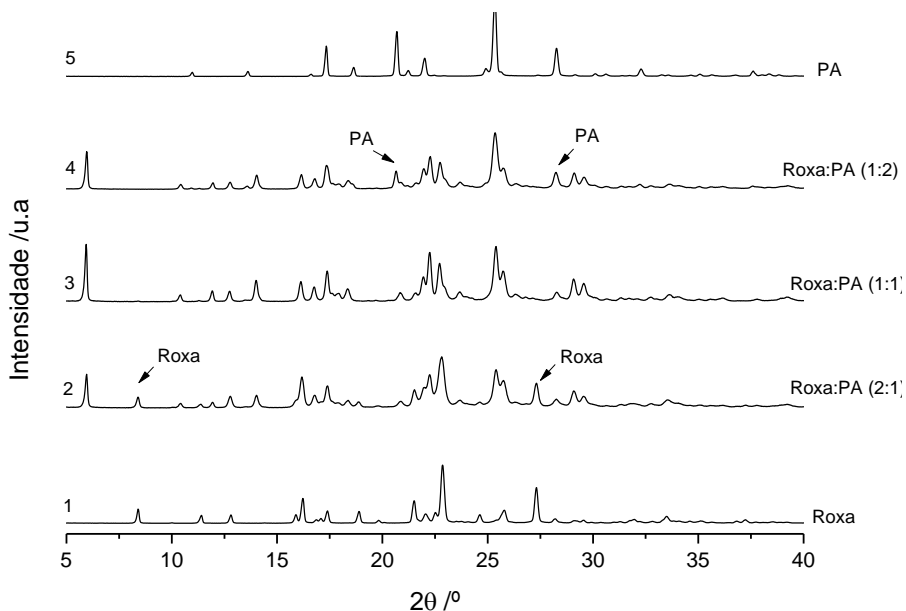


Figura 53 – Difratoformas de raios-X de pó experimentais para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida (2:1); 3. mistura de roxadustate e picolinamida (1:1); 4. mistura de roxadustate e picolinamida (1:2); 5. picolinamida, II.

Na Figura 54, podemos identificar dois pontos invariantes a temperatura inferior à fusão do co-cristal (1:1) para misturas com excesso de picolinamida ou roxadustate, relativamente à mistura equimolar. Um deles a $T \sim 146,0$ °C diz respeito à fusão de uma mistura eutética seguido de um pico largo referente ao excesso de roxadustate. Para as misturas com excesso de picolinamida, as curvas de DSC apresentam um pico endotérmico a $T \sim 98,0$ °C, correspondente à fusão da mistura eutética seguido da fusão do excesso de co-cristal.

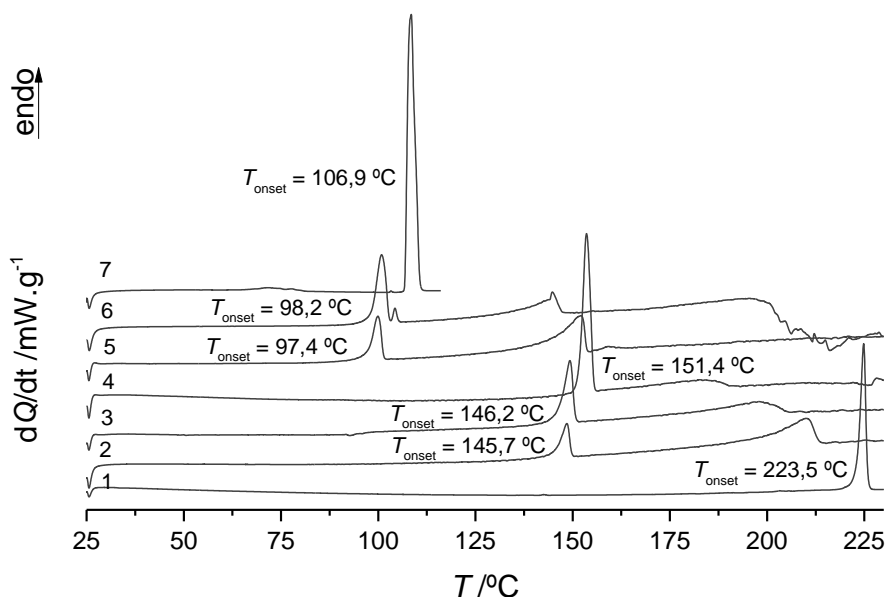


Figura 54 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e picolinamida (3:1); 3. mistura de roxadustate e picolinamida (2:1); 4. mistura de roxadustate e picolinamida (1:1); 5. mistura de roxadustate e picolinamida (1:2); 6. Mistura de roxadustate e picolinamida (1:3); 7. Picolinamida, II, $\beta = 10$ °C/min.

As experiências de cristalização em solução, com semente do co-cristal obtido por mecanoquímica (descritas na secção 3.2.1) não resultaram em formação de co-cristal puro, nem na obtenção de mono-cristais.

Roxadustate + pirazinamida

A investigação de uma mistura equimolar de roxadustate com pirazinamida, preparação por EAG, não conduz a associação supramolecular entre os compostos, como é visível nos espetros de infravermelho representados na Figura 55. O espetro da mistura não apresenta alteração, sendo a soma das contribuições dos compostos puros.

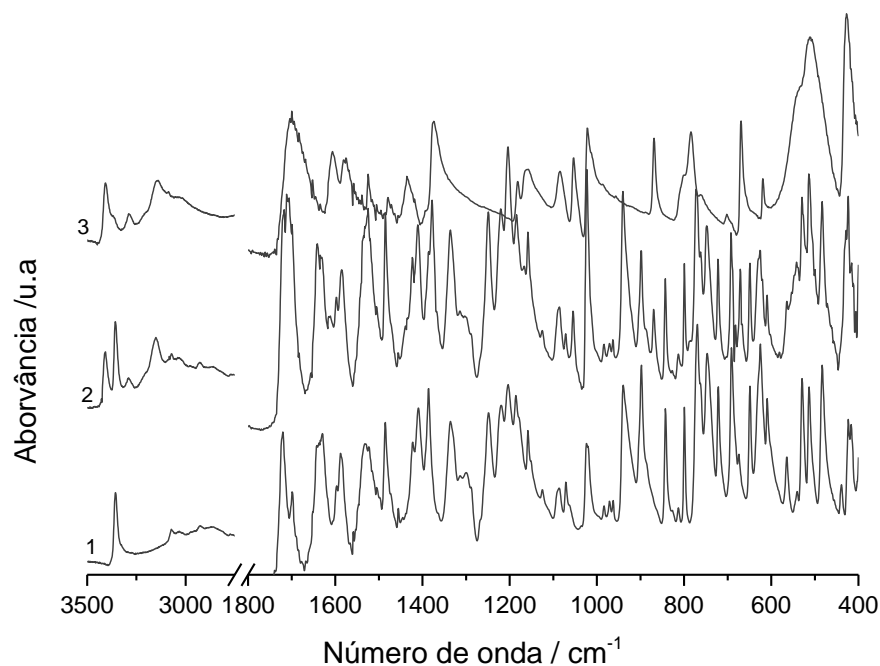


Figura 55 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e pirazinamida 1:1, obtida por moagem; 3. pirazinamida, polimorfo α .

O comportamento térmico da mistura de roxadustate e pirazinamida foi analisada por DSC. Na Figura 56 encontram-se os termogramas da mistura e dos compostos puros, roxadustate e pirazinamida α . No termograma da pirazinamida, termograma 1, podemos observar uma transição sólido-sólido a 152,0 °C, transição do polimorfo α para γ ¹⁵, seguida da fusão da a 188,8 °C, forma γ . A curva da mistura, curva 2, apresenta transições a 152 e 157 °C atribuíveis a fusão de misturas eutéticas com diferentes polimorfos da pirazinamida.

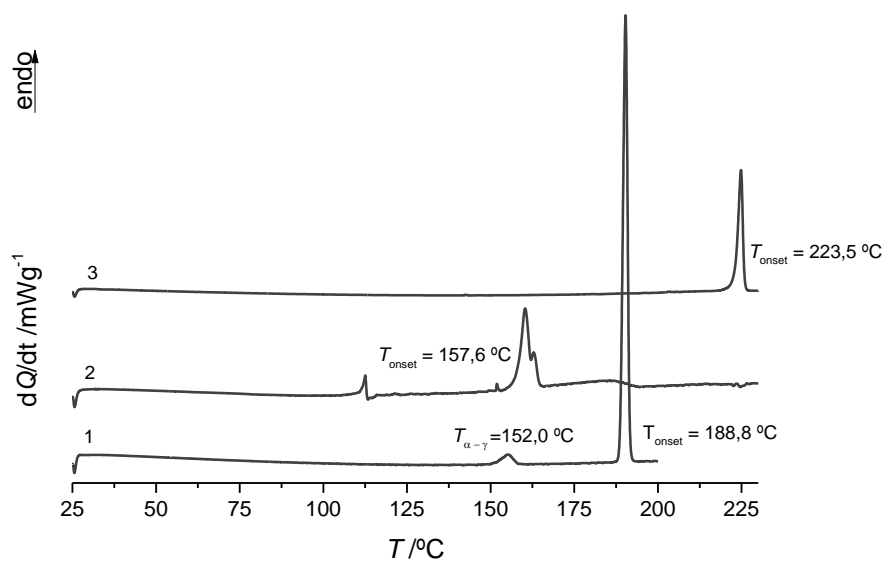


Figura 56 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. pirazinamida, α ; 2. mistura roxadustate e pirazinamida (1:1); 3. roxadustate. $\beta = 10$ °C/min.

Roxadutate + Xantinas

Roxadustate + cafeína

O estudo exploratório do sistema roxadustate:cafeína começou com a preparação de uma mistura 1:1 por mecanoquímica nas condições que temos utilizados. Na figura 57 podemos ver que o espectro da mistura, espectro 2, apresenta alterações relativamente aos espectros dos compostos puros, espectros 1 e 3, referentes ao roxadustate e à cafeína, respetivamente. A mistura apresenta alteração da banda 1690 – 1630 cm^{-1} referente à elongação C=N que na mistura encontra-se deslocada para 1706 cm^{-1} . Pode-se observar também alterações na banda de elongação OH do grupo carboxílico do roxadustate; a banda a 3076 cm^{-1} , no roxadustate, encontra-se deslocado para 3154 cm^{-1} no espectro da mistura.

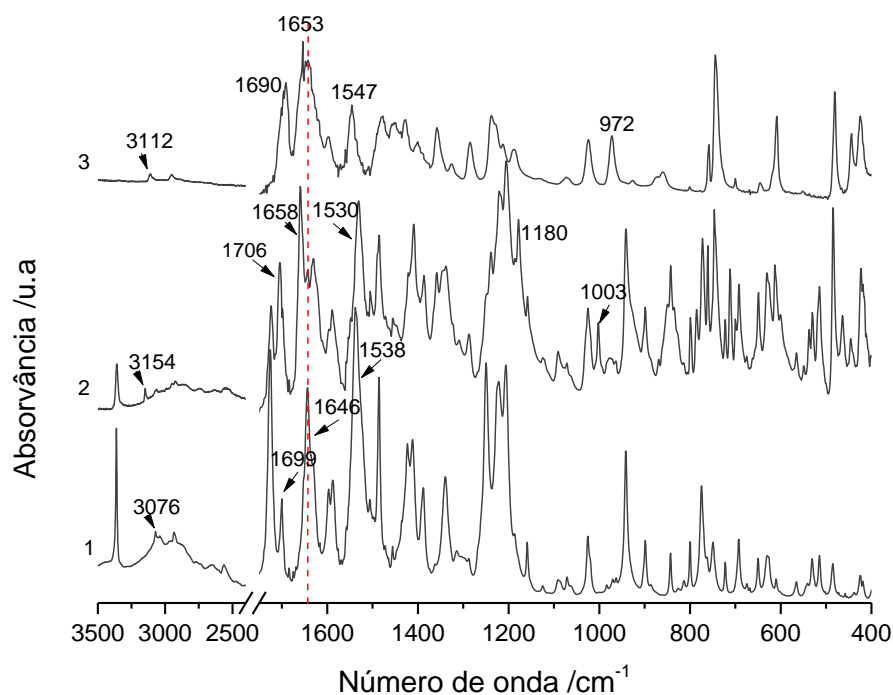


Figura 57 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e cafeína obtida por moagem na proporção 1:1; 3. cafeína, II.

O comportamento térmico da mistura, analisada por DSC, traduz-se no termograma apresentado na Figura 58. A curva de aquecimento da cafeína, termograma 3, apresenta uma transição sólido-sólido a 147,2 $^{\circ}\text{C}$, correspondendo à transição da forma II para a forma I, seguida de fusão a 236,2 $^{\circ}\text{C}$, forma I. A mistura, termograma 2, apresenta um pico endotérmico a (174,5 \pm 0,1) $^{\circ}\text{C}$, correspondendo à fusão, com entalpia $\Delta_{\text{fus}}H = (55,4 \pm 2,6) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Um segundo pico de

menor energia é registado a $T = (179,1 \pm 0,2) \text{ } ^\circ\text{C}$ com uma entalpia de fusão $\Delta H = (2,0 \pm 0,2) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

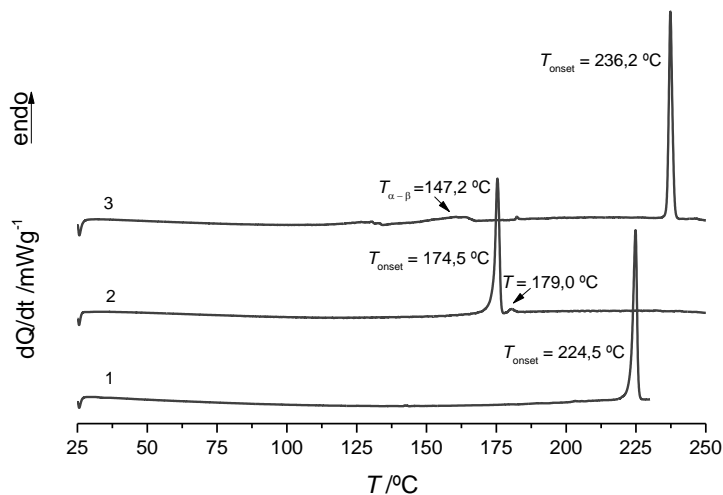


Figura 58 – Curvas de DSC de aquecimento para: **1.** Roxadustate; **2.** mistura roxadustate e cafeína (1:1); **3.** cafeína, II. $\beta = 10 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$.

A mistura foi analisada por difração de raios-X de pó como forma de verificar a natureza da mistura de roxadustate e cafeína. O difratogramas da mistura e dos compostos puros, roxadustate e cafeína, encontram na Figura 59. Verifica-se o aparecimento de reflexões no espetro da mistura, espetro 2, nomeadamente a $10,1^\circ$, $25,0^\circ$ e $26,6^\circ$, indicando que estamos na presença de um novo arranjo cristalino, como se espera quando há formação de co-cristal. De salientar que também há reflexões que desaparecem, como é o caso das reflexões do difratograma do roxadustate, 1, a $16,3^\circ$, $22,8^\circ$ e $27,3^\circ$ que não se observam no espetro da mistura.

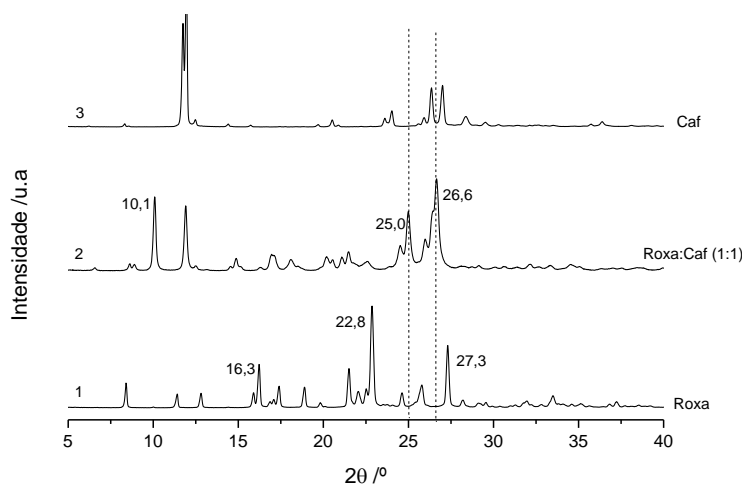


Figura 59 – Difratogramas de raios-X de pó experimentais para: **1.** roxadustate; **2.** mistura de roxadustate e cafeína (1:1); **3.** cafeína, II.

Novas misturas foram preparadas, com excesso de roxadutate e cafeína relativamente à mistura equimolar. As misturas foram analisadas por difração de raios-X de pó e por DSC. Na Figura 60 encontram-se o difratogramas de raios-X de pó dos compostos puros e das misturas nas diferentes proporções. No difratograma 2, referente à mistura na proporção (2:1), podem observar-se reflexões que se encontram ausentes na mistura (1:1), difratograma 3, indicando excesso de roxadutate. Da mesma forma, no difratograma 4 correspondendo à proporção (1:2), podem-se observar reflexões indicando excesso de cafeína, polimorfo II.

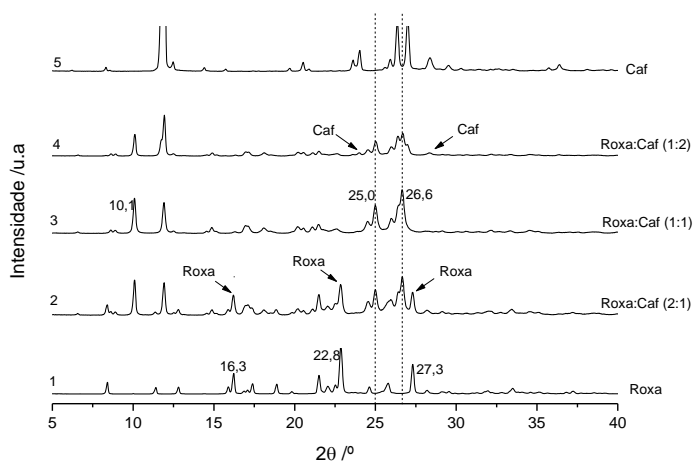


Figura 60 – Difratogramas de raios-X de pó experimental para: 1. roxadutate; 2. mistura de roxadutate e cafeína (2:1); 3. mistura de roxadutate e cafeína (1:1); 4. mistura de roxadutate e cafeína (1:2); 5. cafeína, II.

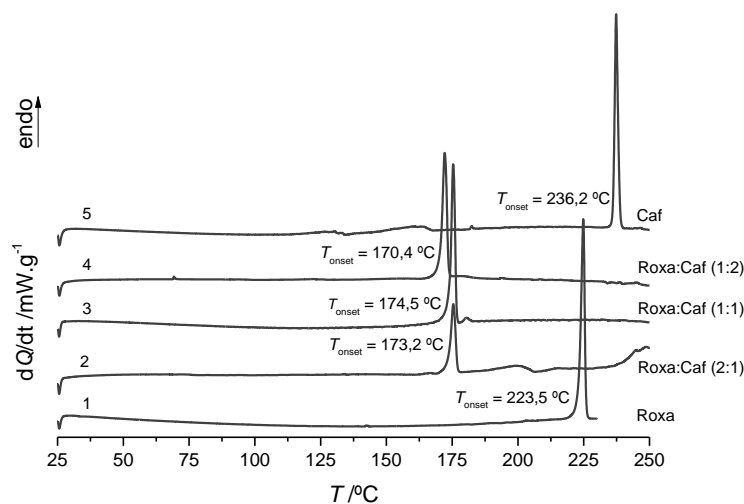


Figura 61 – Curvas de DSC de aquecimento para: 1. roxadutate; 2. mistura de roxadutate e cafeína (2:1); 3. mistura de roxadutate e cafeína (1:1); 4. mistura de roxadutate e cafeína (1:2); 5. cafeína, II, $\beta = 10 ^\circ\text{C}/\text{min}$.

Os termogramas das misturas nas proporções (2:1) e (1:2), termogramas 2 e 4 respetivamente, Figura 61, apresentam um pico endotérmico abaixo da temperatura de fusão do co-

crystal, referente à fusão de uma mistura eutética, e um pico arrastado no termograma 2, referente à fusão do excesso de roxadustate.

Roxadustate + teofilina

A análise por espectroscopia de infravermelho, da mistura de roxadustate e teofilina (1:1), obtida por mecanoquímica, com adição de solvente, Figura 62, permite concluir que o espectro da mistura não apresenta alterações, relativamente aos compostos de partida, sendo a soma das contribuições dos compostos puros.

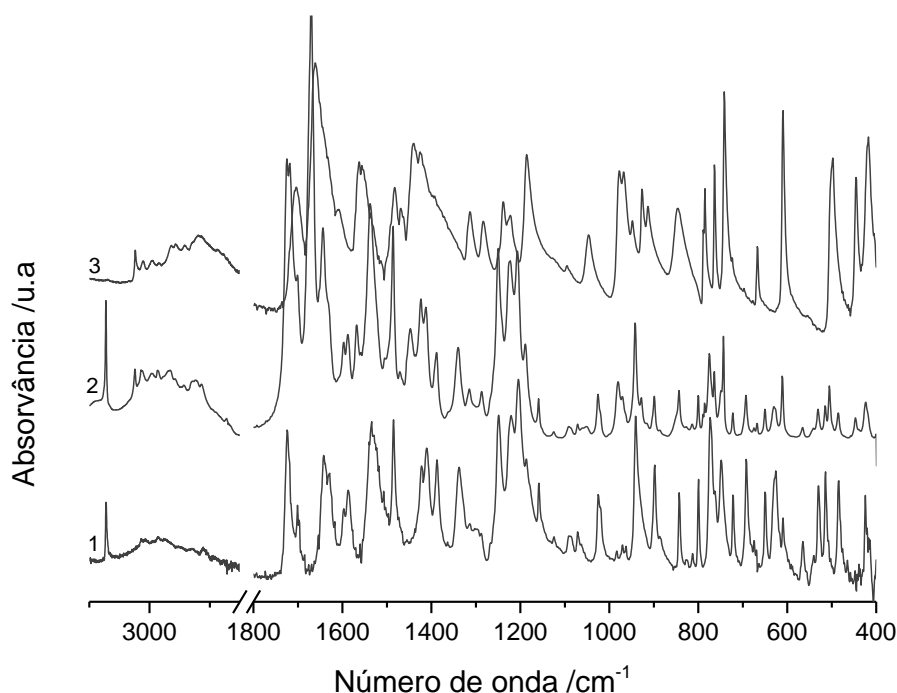


Figura 62 – Espectros de infravermelho de: 1. roxadustate; 2. mistura de roxadustate e teofilina obtida por moagem na proporção 1:1; 3. teofilina.

O termograma 2, Figura 63, correspondente à mistura, apresenta um pico único endotérmico a 191,9 °C, inferior às temperaturas de fusão dos compostos puros, e que é atribuído à fusão de uma mistura eutética. Podemos assim concluir, que nestas condições, não há formação de co-cristal entre o roxadustate e a teofilina.

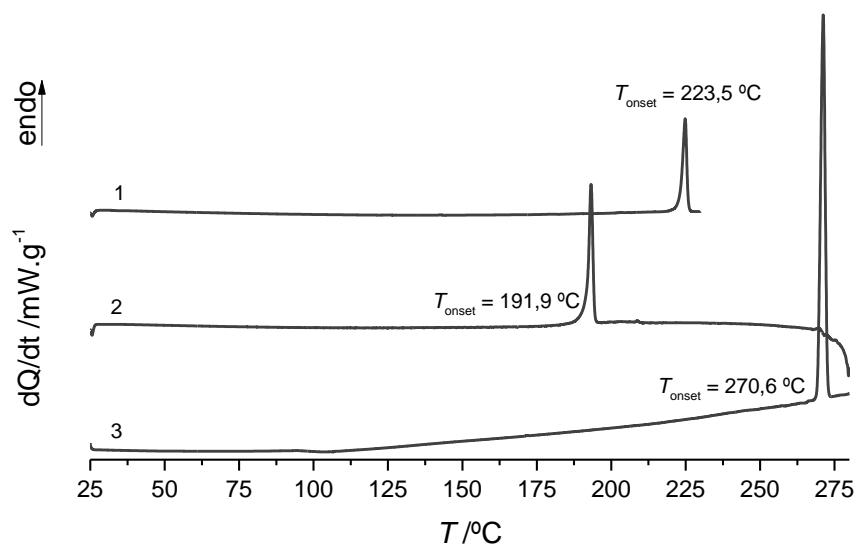


Figura 63 – Curvas de DSC de aquecimento para: **1.** teofilina; **2.** mistura roxadustate e teofilina (1:1); **3.** roxadustate. $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

Roxadustate + ácidos carboxílicos

Roxadustate + ácido benzóico

A mistura equimolar de roxadustate e ácido benzóico foi preparada por mecanoquímica em moinho de bolas com adição de solvente. No espectro de infravermelho, Figura 64, não é visível qualquer deslocamento das bandas observadas na mistura em relação aos compostos puros, sendo o espectro da mistura a soma das contribuições dos compostos puros.

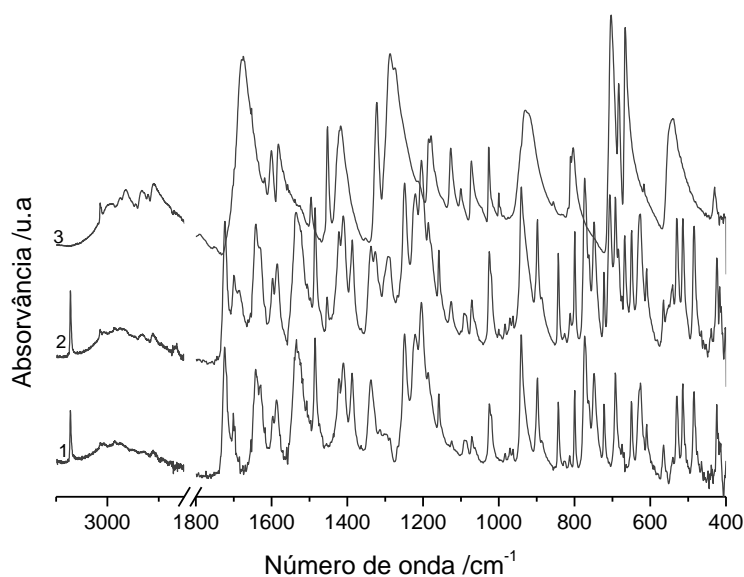


Figura 64 – Espectros de infravermelho de: **1.** roxadustate; **2.** mistura de roxadustate e ácido benzóico obtida por moagem na proporção 1:1; **3.** ácido benzóico.

O termograma da mistura, Figura 65, apresenta um pico endotérmico a $T = 116\text{ °C}$, inferior à temperatura de fusão dos compostos puros, e que é atribuível à fusão de uma mistura eutética. Pode concluir-se que, nas condições utilizadas, não há formação de co-cristal entre roxadustate e ácido benzóico.

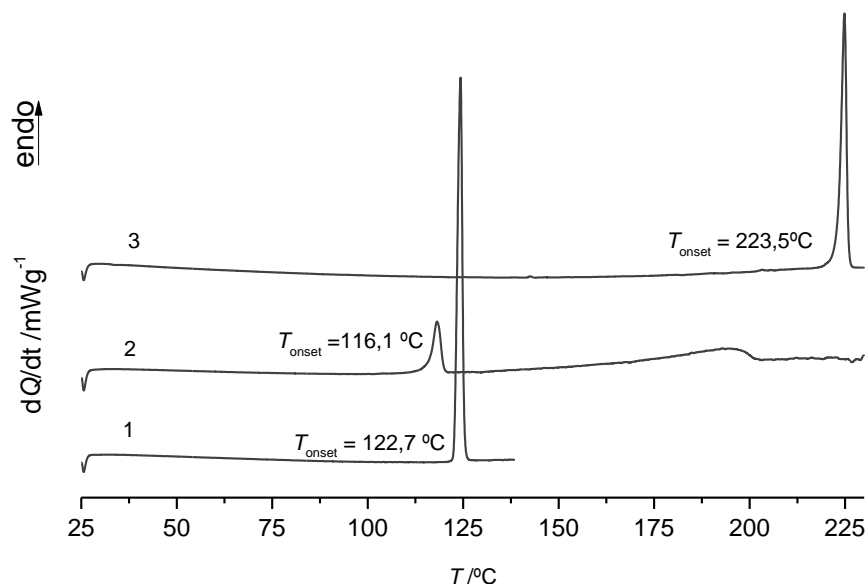


Figura 65 – Curvas de DSC de aquecimento para: **1.** ácido benzóico; **2.** mistura de roxadustate e ácido benzóico (1:1); **3.** roxadustate. $\beta = 10\text{ °C}/\text{min}$.

Roxadustate + Ácido tartárico

O estudo exploratório efetuado para a mistura equimolar de roxadustate e ácido tartárico nas condições utilizadas neste trabalho permite concluir que, também com este ácido não há formação de co-cristais. O termograma da mistura, curva 2, Figura 66, apresenta dois picos endotérmicos, um a $165,7\text{ °C}$ e outro a $206,0\text{ °C}$, correspondentes à fusão da mistura eutética e ao excesso do roxadustate, respetivamente. O espectro de infravermelho, Figura 67, é a soma das contribuições dos compostos puros.

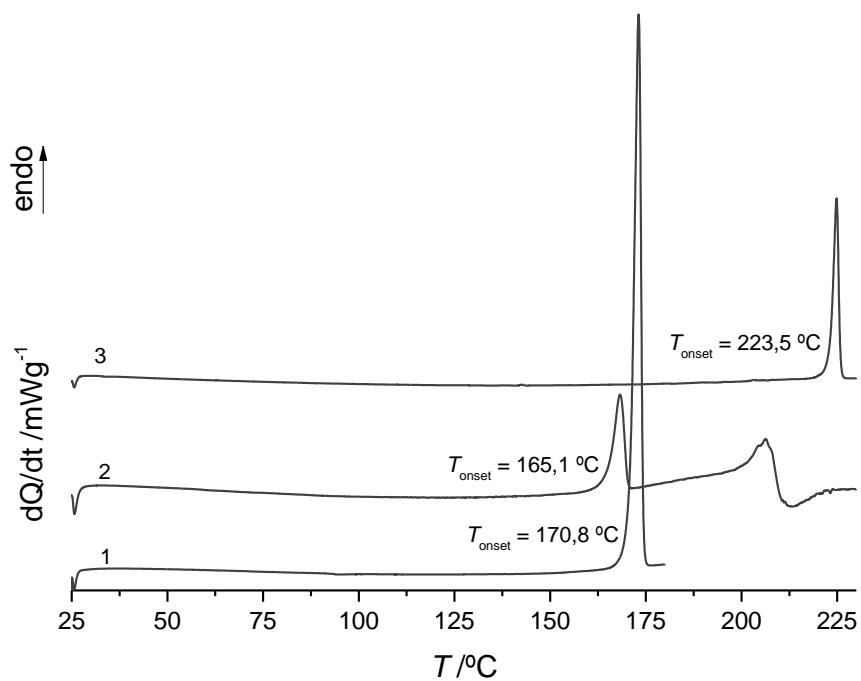


Figura 66 – Curvas de DSC de aquecimento para: **1.** ácido tartárico; **2.** mistura roxadustate e ácido tartárico (1:1); **3.** roxadustate. $\beta = 10 ^\circ C/min$.

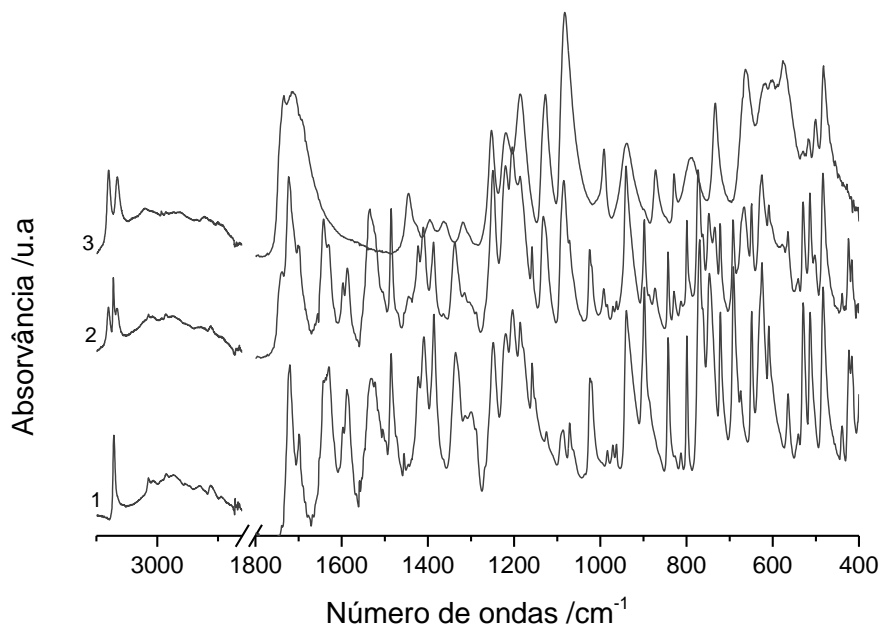


Figura 67 – Espectros de infravermelho de: **1.** roxadustate; **2.** mistura de roxadustate e ácido tartárico obtido por moagem na proporção 1:1; **3.** ácido tartárico.

A Tabela 14 resume os resultados obtidos na pesquisa de co-cristais de roxadustate.

Tabela 14 – Resultados obtidos na pesquisa de co-cristais de roxadustate.

Co-formador	Picolinamida	Nicotinamida	Isonicotinamida	Pirazinamida
Co-cristal	1:1	X	X	X
Co-formador	Cafeína	Teofilina	Ácido Tartárico	Ácido benzóico
Co-cristal	1:1	X	X	X

X – Não ocorreu formação de co-cristal.

É interessante verificar que apenas se obtiveram co-cristais com a picolinamida, que à partida seria, das piridinacarboxamidas, a menos provável, e com a cafeína. Na picolinamida, espera-se que a associação intermolecular envolvendo o azoto aromático seja menos favorecida que nas restantes piridinacarboxamidas. O sintão ácido carboxílico...azoto aromático foi identificado no co-cristal com roxadustate (Figura 51), mas poderá resultar, também, da associação entre moléculas do ativo. A cafeína, como se referiu, ao contrário da teofilina, é apenas aceitador em ligação de hidrogénio.

Na formação de co-cristais a associação na nova estrutura cristalina deve ser favorecida relativamente à associação dos compostos puros¹³³.



Os valores das entalpias de sublimação, compilados para os vários co-formadores na Tabela 15, indicam as contribuições entálpicas para a energia de rede cristalinos co-formadores, inferiores para a picolinamida e para a cafeína.

Tabela 15 – Entalpias de sublimação dos co-formadores utilizados neste trabalho.

Co-formador	$\Delta_{\text{Sub}}H_{\text{m}(298\text{K})}^{\circ} / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
Picolinamida	91,7 ¹³³
Nicotinamida	112,1 ¹³³
Isonicotinamida	109,5 ¹³³
Pirazinamida	112,6 ¹³⁴
Cafeína, II	116–119 ¹³⁵
Teofilina, II	144 ¹³⁵

Este fato, conjugado com o efeito de competições na formação de sintões supramoleculares, menos importante no caso destes dois co-formadores, pode justificar o sucesso na síntese destes co-cristais e o insucesso com os restantes co-formadores.

Este é um tema que será interessante investigar em trabalho futuro.

5. Conclusão

Neste trabalho foi realizada a pesquisa de formas sólidas dos ativos fenilbutazona e roxadustate.

O estudo referente à fenilbutazona incidiu, principalmente, na investigação dos efeitos de velocidades de aquecimento / arrefecimento na obtenção de diferentes formas polimórficas e também na caracterização das formas obtidas por cristalização a partir de diferentes solventes.

Estudos por calorimetria diferencial de varrimento a diferentes velocidades de aquecimento / arrefecimento, $\beta = |2|$ °C/min, $\beta = |10|$ °C/min e $\beta = |20|$ °C/min, mostram que a velocidade usada durante o aquecimento não tem influência nos parâmetros termodinâmicos da amostra de partida, temperatura e entalpia de fusão, sendo observado um pico estreito, endotérmico, de alta energia, referente à fusão do polimorfo δ , a $T_{\text{fus}} = (105,9 \pm 0,2)$ °C com $\Delta_{\text{fus}}H = (27,0 \pm 1,1)$ kJ.mol⁻¹. Já a velocidade de arrefecimento, nas condições usadas, influencia claramente a natureza da amostra sólida que se obtém a partir do arrefecimento do fundido. O estudo por difração de raios-X com gradiente de temperatura vai de encontro aos dados obtidos por DSC.

A partir da cristalização do fundido foi possível identificar, por imagens PLTM e por DSC, a forma β que funde a $T_{\text{fus}} \sim 95$ °C, a forma δ com $T_{\text{fus}} \sim 106$ °C e uma terceira forma a $T_{\text{fus}} \sim 102$ °C.

A forma α foi obtida por cristalização em etanol e metanol, com $T_{\text{fus}} \sim 93$ °C. Outros estudos seriam necessários para confirmação, mas imagens PLTM e DSC indicam formação de um solvato de fenilbutazona por cristalização em diclorometano.

A pesquisa de polimorfos de roxadustate com recurso a cristalização a partir de solventes, com diferentes polaridades, não conduziu com à identificação de novas formas sólidas, mas permitiu obter mono-cristais a partir dos quais foi resolvida a estrutura cristalina por difração de raios-X. Nesta estrutura o roxadustate forma dímeros centro-simétrico entre dois grupos carboxílicos, através de ligações de hidrogénio. Vários ensaios de co-cristalização permitiram sintetizar co-cristais roxadustate:picolinamida e roxadustate:cafeína, na proporção (1:1). É importante referir que, entre as piridinacarboxamidas, a picolinamida é a menos propensa a co-cristalização. O roxadustate forma co-cristal com a cafeína e não com a teofilina, embora estas duas substâncias sejam muito semelhantes a nível molecular, com a diferença de que a teofilina, ao contrário da cafeína, é também dador em ligação de hidrogénio.

Os resultados globais desta pesquisa de co-cristais são de grande utilidade para investigação futura de efeitos de competição entre sintões na formação de co-cristais.

6. Referências bibliográficas

1. Stahly, G. P., Diversity in single- and multiple-component crystals. The search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. *Crystal Growth & Design* **2007**, *7*, 1007-1026.
2. El-Yafi, A. K. E.; El-Zein, H., Technical Crystallization for Application in Pharmaceutical Material Engineering: Review Article. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *10*, 283-291.
3. Elder, D. P.; Patterson, J. E.; Holm, R., The solid-state continuum: a perspective on the interrelationships between different solid-state forms in drug substance and drug product. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2015**, *67*, 757-772.
4. Rodriguez-Spong, B.; Price, C. P.; Jayasankar, A.; Matzger, A. J.; Rodriguez-Hornedo, N., General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 241-274.
5. Vippagunta, S. R.; Brittain, H. G.; Grant, D. J. W., Crystalline solids. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *48*, 3-26.
6. H.G. Brittain, S. R. B., *Structural aspects of polymorphism*. HG Brittain ed.; New York, 1999; Vol. 95.
7. Rocha Gonçalves, A. M. d. A.; Serra, M. E. S.; Euébio, M. E. S., *Estereoquímica*. Imprensa da Universidade de Coimbra ed.; Coimbra, 2011.
8. Vishweshwar, P.; McMahon, J. A.; Bis, J. A.; Zaworotko, M. J., Pharmaceutical co-crystal. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2006**, *95*, 499-516.
9. Aakeroy, C. B.; Salmon, D. J., Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. *Crystengcomm* **2005**, *7*, 439-448.
10. He, G.; Jacob, C.; Guo, L.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H., Screening for cocrystallization tendency: The role of intermolecular interactions. *Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112*, 9890-9895.
11. Sanphui, P.; Kumar, S. S.; Nangia, A., Pharmaceutical Cocrystals of Niclosamide. *Crystal Growth & Design* **2012**, *12*, 4588-4599.
12. Bolla, G.; Nangia, A., Pharmaceutical cocrystals: walking the talk. *Chemical Communications* **2016**, *52* (54), 8342-8360.
13. Aakeroy, C. B.; Fasulo, M. E.; Desper, J., Cocrystal or salt: Does it really matter? *Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4*, 317-322.

14. Takagi, T.; Ramachandran, C.; Bermejo, M.; Yamashita, S.; Yu, L. X.; Amidon, G. L., A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. *Molecular Pharmaceutics* **2006**, *3*, 631-643.
15. Amidon, G. L.; Lennernas, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R., A Theoretical Basis For a Biopharmaceutic Drug Classification - The Correlation of In-Vitro Drug Product Dissolution and In-Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research* **1995**, *12*, 413-420.
16. Surwase, S. A.; Boetker, J. P.; Saville, D.; Boyd, B. J.; Gordon, K. C.; Peltonen, L.; Strachan, C. J., Indomethacin: New Polymorphs of an Old Drug. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10*, 4472-4480.
17. Aitipamula, S.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H., Co-crystals of caffeine and piracetam with 4-hydroxybenzoic acid: Unravelling the hidden hydrates of 1: 1 co-crystals. *Crystengcomm* **2012**, *14*, 2381-2385.
18. Sun, Y.; Zhu, L.; Wu, T.; Cai, T.; Gunn, E. M.; Yu, L., Stability of Amorphous Pharmaceutical Solids: Crystal Growth Mechanisms and Effect of Polymer Additives. *Aaps Journal* **2012**, *14*, 380-388.
19. Duggirala, N. K.; Perry, M. L.; Almarsson, O.; Zaworotko, M. J., Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chemical Communications* **2016**, *52*, 640-655.
20. Shan, N.; Zaworotko, M. J., The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discovery Today* **2008**, *13* (9-10), 440-446.
21. Aitipamula, S.; Banerjee, R.; Bansal, A. K.; Biradha, K.; Cheney, M. L.; Choudhury, A. R.; Desiraju, G. R.; Dikundwar, A. G.; Dubey, R.; Duggirala, N.; Ghogale, P. P.; Ghosh, S.; Goswami, P. K.; Goud, N. R.; Jetty, R.; Karpinski, P.; Kaushik, P.; Kumar, D.; Kumar, V.; Moulton, B.; Mukherjee, A.; Mukherjee, G.; Myerson, A. S.; Puri, V.; Ramanan, A.; Rajamannar, T.; Reddy, C. M.; Rodriguez-Hornedo, N.; Rogers, R. D.; Row, T. N. G.; Sanphui, P.; Shan, N.; Shete, G.; Singh, A.; Sun, C. Q. C.; Swift, J. A.; Thaimattam, R.; Thakur, T. S.; Thaper, R. K.; Thomas, S. P.; Tothadi, S.; Vangala, V. R.; Variankaval, N.; Vishweshwar, P.; Weyna, D. R.; Zaworotko, M. J., Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name? *Crystal Growth & Design* **2012**, *12*, 2147-2152.
22. Bunaciu, A. A.; Aboul-Enein, H. Y.; Hoang, V. D., Vibrational spectroscopy used in polymorphic analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *69*, 14-22.
23. Lu, J.; Rohani, S., Preparation and Characterization of Theophylline-Nicotinamide Cocrystal. *Organic Process Research & Development* **2009**, *13*, 1269-1275.
24. Trask, A. V., An overview of pharmaceutical cocrystals as intellectual property. *Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4*, 301-309.

25. Aitipamula, S.; Wong, A. B. H.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H., Polymorphism and phase transformations of a cocrystal of nicotinamide and pimelic acid. *Crystengcomm* **2012**, *14*, 8193-8198.
26. Desiraju, G. R., Polymorphism: The same and not quite the same. *Crystal Growth & Design* **2008**, *8*, 3-5.
27. Haleblia, J.; McCrone, W., Pharmaceutical Applications of Polymorphism. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1969**, *58*, 911-&.
28. Guidance for Industry, ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism, disponível em. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072866.pdf>, [Acedido a 25-06-2017].
29. Mukherjee, A.; Desiraju, G. R., Synthron polymorphism and pseudopolymorphism in co-crystals. The 4,4'-bipyridine-4-hydroxybenzoic acid structural landscape. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 4090-4092.
30. Pogoda, D.; Janczak, J.; Videnova-Adrabinska, V., New polymorphs of an old drug: conformational and synthron polymorphism of 5-nitrofurazone. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science Crystal Engineering and Materials* **2016**, *72*, 263-273.
31. Chemburkar, S. R.; Bauer, J.; Deming, K.; Spiwek, H.; Patel, K.; Morris, J.; Henry, R.; Spanton, S.; Dziki, W.; Porter, W.; Quick, J.; Bauer, P.; Donaubaue, J.; Narayanan, B. A.; Soldani, M.; Riley, D.; McFarland, K., Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. *Organic Process Research & Development* **2000**, *4*, 413-417.
32. Cherukuvada, S.; Thakuria, R.; Nangia, A., Pyrazinamide Polymorphs: Relative Stability and Vibrational Spectroscopy. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 3931-3941.
33. Censi, R.; Di Martino, P., Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs. *Molecules* **2015**, *20*, 18759-18776.
34. Aitipamula, S.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H., Polymorphism in cocrystals: a review and assessment of its significance. *Crystengcomm* **2014**, *16*, 3451-3465.
35. Nangia, A., Conformational polymorphism in organic crystals. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 595-604.
36. Cruz-Cabeza, A. J.; Reutzel-Edens, S. M.; Bernstein, J., Facts and fictions about polymorphism. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 8619-8635.
37. Caridi, A.; Kulkarni, S. A.; Di Profio, G.; Curcio, E.; ter Horst, J. H., Template-Induced Nucleation of Isonicotinamide Polymorphs. *Crystal Growth & Design* **2014**, *14*, 1135-1141.

38. Carrer, H.; Cortez, J.; Frare, L. M.; Costa, M. B.; Bittencourt, P. R. S., Thermal characterization of the bromopride recrystallized from different solvents and at different temperature conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2016**, *123*, 927-931.
39. Fischer, F.; Heidrich, A.; Greiser, S.; Benemann, S.; Rademann, K.; Emmerling, F., Polymorphism of Mechanochemically Synthesized Cocrystals: A Case Study. *Crystal Growth & Design* **2016**, *16*, 1701-1707.
40. Mukherjee, A.; Tothadi, S.; Chakraborty, S.; Ganguly, S.; Desiraju, G. R., Synthon identification in co-crystals and polymorphs with IR spectroscopy. Primary amides as a case study. *Crystengcomm* **2013**, *15*, 4640-4654.
41. Jones, W.; Motherwell, S.; Trask, A. V., Pharmaceutical cocrystals: An emerging approach to physical property enhancement. *Mrs Bulletin* **2006**, *31*, 875-879.
42. Thakuria, R.; Delori, A.; Jones, W.; Lipert, M. P.; Roy, L.; Rodriguez-Hornedo, N., Pharmaceutical cocrystals and poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *453*, 101-125.
43. Luo, Y. H.; Sun, B. W., Pharmaceutical Co-Crystals of Pyrazinecarboxamide (PZA) with Various Carboxylic Acids: Crystallography, Hirshfeld Surfaces, and Dissolution Study. *Crystal Growth & Design* **2013**, *13*, 2098-2106.
44. Wang, J. R.; Ye, C. J.; Zhu, B. Q.; Zhou, C.; Mei, X. F., Pharmaceutical cocrystals of the anti-tuberculosis drug pyrazinamide with dicarboxylic and tricarboxylic acids. *Crystengcomm* **2015**, *17*, 747-752.
45. Guidance for Industry, Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals, August 2016, disponível em. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm516813.pdf>, [Acedido a 25-06-2017].
46. EMA, Reflection paper on the use of cocrystals of active substances in medicinal products, disponível em. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/07/WC500189927.pdf, [Acedido em 25-06-2017].
47. Desiraju, G. R., Hydrogen bridges in crystal engineering: Interactions without borders. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35*, 565-573.
48. Perlovich, G. L.; Manin, A. N., Design of pharmaceutical cocrystals for drug solubility improvement. *Russian Journal of General Chemistry* **2014**, *84*, 407-414.

49. James, S. L.; Adams, C. J.; Bolm, C.; Braga, D.; Collier, P.; Friscic, T.; Grepioni, F.; Harris, K. D. M.; Hyett, G.; Jones, W.; Krebs, A.; Mack, J.; Maini, L.; Orpen, A. G.; Parkin, I. P.; Shearouse, W. C.; Steed, J. W.; Waddell, D. C., Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 413-447.
50. Friscic, T.; Childs, S. L.; Rizvi, S. A. A.; Jones, W., The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *Crystengcomm* **2009**, *11*, 418-426.
51. Cherukuvada, S.; Nangia, A., Eutectics as improved pharmaceutical materials: design, properties and characterization. *Chemical Communications* **2014**, *50*, 906-923.
52. Desiraju, G. R., Supramolecular Synthons in Crystal Engineering - A New Organic-Synthesis. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34*, 2311-2327.
53. Walsh, R. D. B.; Bradner, M. W.; Fleischman, S.; Morales, L. A.; Moulton, B.; Rodriguez-Hornedo, N.; Zaworotko, M. J., Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. *Chemical Communications* **2003**, 186-187.
54. Steed, J. W., The role of co-crystals in pharmaceutical design. *Trends in Pharmacological Sciences* **2013**, *34*, 185-193.
55. Desiraju, G. R., Crystal Engineering: From Molecule to Crystal. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 9952-9967.
56. Trask, A. V.; van de Streek, J.; Motherwell, W. D. S.; Jones, W., Achieving polymorphic and stoichiometric diversity in cocrystal formation: Importance of solid-state grinding, powder X-ray structure determination, and seeding. *Crystal Growth & Design* **2005**, *5*, 2233-2241.
57. FDA list of EAFUS substances, disponível em. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=cafuslisting>, [Acedido a 25-06-2016].
58. FDA list of GRAS substances, disponível em. <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm091>, [Acedido em 25-06-2017].
59. Trask, A. V.; Motherwell, W. D. S.; Jones, W., Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *320* (1-2), 114-123.
60. Childs, S. L.; Rodriguez-Hornedo, N.; Reddy, L. S.; Jayasankar, A.; Maheshwari, C.; McCausland, L.; Shipplett, R.; Stahly, B. C., Screening strategies based on solubility and solution

composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. *Crystengcomm* **2008**, *10*, 856-864.

61. Lu, E.; Rodriguez-Hornedo, N.; Suryanarayanan, R., A rapid thermal method for cocrystal screening. *Crystengcomm* **2008**, *10*, 665-668.

62. Delori, A.; Friscic, T.; Jones, W., The role of mechanochemistry and supramolecular design in the development of pharmaceutical materials. *Crystengcomm* **2012**, *14*, 2350-2362.

63. Trask, A. V.; Motherwell, W. D. S.; Jones, W., Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chemical Communications* **2004**, 890-891.

64. Braga, D.; Grepioni, F.; Lampronti, G. I., Supramolecular metathesis: co-former exchange in co-crystals of pyrazine with (R,R)-, (S,S)-, (R,S)- and (S,S/R,R)-tartaric acid. *Crystengcomm* **2011**, *13*, 3122-3124.

65. Braga, D.; Maini, L.; Grepioni, F., Mechanochemical preparation of co-crystals. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 7638-7648.

66. Shan, N.; Toda, F.; Jones, W., Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chemical Communications* **2002**, 2372-2373.

67. Llinas, A.; Goodman, J. M., Polymorph control: past, present and future. *Drug Discovery Today* **2008**, *13* (5-6), 198-210.

68. Leyssens, T.; Tumanova, N.; Robeyns, K.; Candoni, N.; Veessler, S., Solution cocrystallization, an effective tool to explore the variety of cocrystal systems: caffeine/dicarboxylic acid cocrystals. *Crystengcomm* **2014**, *16*, 9603-9611.

69. Hasa, D.; Carlino, E.; Jones, W., Polymer-Assisted Grinding, a Versatile Method for Polymorph Control of Cocrystallization. *Crystal Growth & Design* **2016**, *16*, 1772-1779.

70. Florey, K., *Analytical profiles of drug substances*. Academic Press: San Diego, California, 1982; Vol. 11.

71. Kuzell, W. C.; Schaffarzick, R. W., Phenylbutazone (Butalozolidin) and Butapyrin: A Study of Clinical Effects in Arthritis and Gout. *California Medicine* **1952**, *77*.

72. Snow, W. G., Phenylbutazone: An Evaluation of Its Use. *California Medicine* **1953**, *79*.

73. Huffman, E. R.; Wilson, G. M.; Smith, C. J.; Hill, R., Metabolic effect of Phenylbutazone in gouty and non-gouty arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1954**.

74. Dodman, N.; Blondeau, N.; Marini, A. M., Association of phenylbutazone usage with horses bought for slaughter: A public health risk. *Food and Chemical Toxicology* **2010**, *48*, 1270-1274.

75. Lees, P.; Toutain, P. L., Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, toxicology and residues of phenylbutazone in humans and horses. *Veterinary Journal* **2013**, *196*, 294-303.
76. Lees, P.; Toutain, P. L., Phenylbutazone in horses and man: Properties relevant to safety of humans consuming horse meat containing phenylbutazone and its metabolites. *Equine Veterinary Education* **2013**, *25*, 545-549.
77. Leonard, J. C., Toxic Effects of Phenylbutazone - With Special Reference to Disorders of The Blood. *British Medical Journal* **1953**, *1* (4823), 1311-1313.
78. Fodey, T. L.; Barnes, P.; Crooks, S. R. H., Production of antisera to phenylbutazone and oxyphenylbutazone for use in immunochemical detection assays. *Food and Agricultural Immunology* **2016**, *27*, 288-300.
79. Catterall, R. D., Fatal reaction to phenylbutazone in a patient with reiter's disease. *British Journal of Venereal Diseases* **1968**, *44*, 151.
80. Tobin, T.; Chay, S.; Kamerling, S.; Woods, W. E.; Weckman, T. J.; Blake, J. W.; Lees, P., Phenylbutazone in the horse: A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **1986**, *9*, 1-25.
81. Meucci, V.; Luci, G.; Vanni, M.; Sgorbini, M.; Intorre, L., Withdrawal Time of Phenylbutazone Administered to Healthy Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **2015**, *35* (11-12), 901-906.
82. de Grauw, J. C.; van Loon, J.; van de Lest, C. H. A.; Brunott, A.; van Weeren, P. R., In vivo effects of phenylbutazone on inflammation and cartilage-derived biomarkers in equine joints with acute synovitis. *Veterinary Journal* **2014**, *201*, 51-56.
83. Datta, S.; Grant, D. J. W., Effect of supersaturation on the crystallization of phenylbutazone polymorphs. *Crystal Research and Technology* **2005**, *40*, 233-242.
84. PubChem: Open Chemistry Data Base.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4781#section=Crystal-Structures>.
85. Muller, B. W., Polymorphism of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. 1. Polymorphism and Pseudo-Polymorphism of Phenylbutazone. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **1978**, *53*, 333-340.
86. Matsuda, Y.; Tatsumi, E.; Chiba, E.; Miwa, Y., Kinetic-Study of The Polymorphic Transformations of Phenylbutazone. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1984**, *73*, 1453-1461.
87. Kaneniwa, N.; Ichikawa, J.; Matsumoto, T., Preparation of Phenylbutazone Polymorphs and Their Transformation in Solution. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1063-1073.

88. Matsumoto, T.; Ichikawa, J.; Kaneniwa, N.; Otsuka, M., Effect of Environmental-Temperature on The Polymorphic Transformation of Phenylbutazone During Grinding. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 1074-1085.
89. Ibrahim, H. G.; Pisano, F.; Bruno, A., Polymorphism of Phenylbutazone - Properties and Compressional Behavior of Crystals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1977**, *66*, 669-673.
90. Hosokawa, T.; Datta, S.; Sheth, A. R.; Brooks, N. R.; Young, V. G.; Grant, D. J. W., Isostructurality among five solvates of phenylbutazone. *Crystal Growth & Design* **2004**, *4*, 1195-1201.
91. Domingos, S.; Andre, V.; Quaresma, S.; Martins, I. C. B.; da Piedade, M. F. M.; Duarte, M. T., New forms of old drugs: improving without changing. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2015**, *67*, 830-846.
92. Zencirci, N.; Griesser, U. J.; Gelbrich, T.; Apperley, D. C.; Harris, R. K., Crystal Polymorphs of Barbitol: News about a Classic Polymorphic System. *Molecular Pharmaceutics* **2014**, *11*, 338-350.
93. Besarab, A.; Provenzano, R.; Hertel, J.; Zabaneh, R.; Klaus, S. J.; Lee, T.; Leong, R.; Hemmerich, S.; Yu, K. H. P.; Neff, T. B., Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2015**, *30*, 1665-1673.
94. Besarab, A.; Yu, K. H. P.; Neff, T. B.; Szczech, L., Clinical Experience with Roxadustat, a HIF-PHI, in the treatment of CKD associated anemia. *American Journal of Hematology* **2015**, *90*, E176-E176.
95. Groenendaal-van de Meent, D.; den Adel, M.; Rijnders, S.; Krebs-Brown, A.; Kerbusch, V.; Golor, G.; Schaddelee, M., The Hypoxia-inducible Factor Prolyl-Hydroxylase Inhibitor Roxadustat (FG-4592) and Warfarin in Healthy Volunteers: A Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Drug-Drug Interaction Study. *Clinical Therapeutics* **2016**, *38*, 918-928.
96. Besarab, A.; Chernyayskaya, E.; Motylev, I.; Shutov, E.; Kumbar, L. M.; Gurevich, K.; Chan, D. T. M.; Leong, R.; Poole, L.; Zhong, M.; Saikali, K. G.; Franco, M.; Hemmerich, S.; Yu, K. H. P.; Neff, T. B., Roxadustat (FG-4592): Correction of Anemia in Incident Dialysis Patients. *Journal of the American Society of Nephrology* **2016**, *27*, 1225-1233.
97. Beuck, S.; Schanzer, W.; Thevis, M., Hypoxia-inducible factor stabilizers and other small-molecule erythropoiesis-stimulating agents in current and preventive doping analysis. *Drug Testing and Analysis* **2012**, *4*, 830-845.

98. Buisson, C.; Marchand, A.; Bailloux, I.; Lahaussais, A.; Martin, L.; Molina, A., Detection by LC-MS/MS of HIF stabilizer FG-4592 used as a new doping agent: Investigation on a positive case. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *121*, 181-187.
99. Evora, A. O. L.; Castro, R. A. E.; Maria, T. M. R.; Silva, M. R.; ter Horst, J. H.; Canotilho, J.; Eusebio, M. E. S., Co-crystals of diflunisal and isomeric pyridinecarboxamides - a thermodynamics and crystal engineering contribution. *Crystengcomm* **2016**, *18*, 4749-4759.
100. Evora, A. O. L.; Castro, R. A. E.; Maria, T. M. R.; Rosado, M. T. S.; Silva, M. R.; Canotilho, J.; Eusebio, M. E. S., Resolved structures of two picolinamide polymorphs. Investigation of the dimorphic system behaviour under conditions relevant to co-crystal synthesis. *Crystengcomm* **2012**, *14*, 8649-8657.
101. Castro, R. A. E.; Ribeiro, J. D. B.; Maria, T. M. R.; Silva, M. R.; Yuste-Vivas, C.; Canotilho, J.; Eusebio, M. E. S., Naproxen Cocrystals with Pyridinecarboxamide Isomers. *Crystal Growth & Design* **2011**, *11*, 5396-5404.
102. Hino, T.; Ford, J. L.; Powell, M. W., Assessment of nicotinamide polymorphs by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta* **2001**, *374*, 85-92.
103. Berry, D. J.; Seaton, C. C.; Clegg, W.; Harrington, R. W.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Storey, R.; Jones, W.; Friscic, T.; Blagden, N., Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: A study of nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients. *Crystal Growth & Design* **2008**, *8*, 1697-1712.
104. Lindenberg, M.; Kopp, S.; Dressman, J. B., Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 265-278.
105. Li, J.; Bourne, S. A.; Caira, M. R., New polymorphs of isonicotinamide and nicotinamide. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 1530-1532.
106. Miwa, Y.; Mizuno, T.; Tsuchida, K.; Taga, T.; Iwata, Y., Experimental charge density and electrostatic potential in nicotinamide. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* **1999**, *55*, 78-84.
107. Aakeroy, C. B.; Beatty, A. M.; Helfrich, B. A.; Nieuwenhuyzen, M., Do polymorphic compounds make good cocrystallizing agents? A structural case study that demonstrates the importance of synthon flexibility. *Crystal Growth & Design* **2003**, *3*, 159-165.
108. Kawabata, T.; Ogino, T.; Mori, M.; Awai, M., Effects of Nicotinamide and Its Isomers on Iron-Induced Renal Damage. *Acta Pathologica Japonica* **1992**, *42*, 469-475.

109. Yamamoto, H.; Okamoto, H., Protection by Picolinamide - A Novel Inhibitor of Poly(adenosine) Synthetase, Against Both Streptozotocin-induced Depression of Proinsulin Synthesis and Reduction of Nad Content in Pancreatic-Islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1980**, *95*, 474-481.
110. Takano, T.; Sasada, Y.; Kakudo, M., Crystal and Molecular Structure of Picolinamide. *Acta Crystallographica* **1966**, *21*, 514.
111. Habgood, M.; Deij, M. A.; Mazurek, J.; Price, S. L.; ter Horst, J. H., Carbamazepine Cocrystallization with Pyridine Carboxamides: Rationalization by Complementary Phase Diagrams and Crystal Energy Landscapes. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 903-912.
112. Chan, H. C. S.; Woollam, G. R.; Wagner, T.; Schmidt, M. U.; Lewis, R. A., Can picolinamide be a promising cocrystal former? *Crystengcomm* **2014**, *16*, 4365-4368.
113. Who Model List of Essential Medicines ; World Health Organization, disponível em. http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/17/sixteenth_adult_list_en.pdf, [Acedida a 25-06-2017].
114. Zimic, M.; Fuentes, P.; Gilman, R. H.; Gutierrez, A. H.; Kirwan, D.; Sheen, P., Pyrazinoic acid efflux rate in Mycobacterium tuberculosis is a better proxy of pyrazinamide resistance. *Tuberculosis* **2012**, *92*, 84-91.
115. Castro, R. A. E.; Maria, T. M. R.; Evora, A. O. L.; Feiteira, J. C.; Silva, M. R.; Beja, A. M.; Canotilho, J.; Eusebio, M. E. S., A New Insight into Pyrazinamide Polymorphic Forms and their Thermodynamic Relationships. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 274-282.
116. Trask, A. V.; Motherwell, W. D. S.; Jones, W., Pharmaceutical cocrystallization: Engineering a remedy for caffeine hydration. *Crystal Growth & Design* **2005**, *5*, 1013-1021.
117. Dong, J. X.; Li, Q.; Tan, Z. C.; Zhang, Z. H.; Liu, Y., The standard molar enthalpy of formation, molar heat capacities, and thermal stability of anhydrous caffeine. *Journal of Chemical Thermodynamics* **2007**, *39*, 108-114.
118. Enright, G. D.; Terskikh, V. V.; Brouwer, D. H.; Ripmeester, J. A., The structure of two anhydrous polymorphs of caffeine from single-crystal diffraction and ultrahigh-field solid-state C-13 NMR spectroscopy. *Crystal Growth & Design* **2007**, *7*, 1406-1410.
119. Dichi, E.; Legendre, B.; Sghaier, M., Physico-chemical characterisation of a new polymorph of caffeine. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2014**, *115*, 1551-1561.
120. Bucar, D.-K.; Henry, R. F.; Lou, X.; Duerst, R. W.; MacGillivray, L. R.; Zhang, G. G. Z., Cocrystals of Caffeine and Hydroxybenzoic Acids Composed of Multiple Supramolecular

Heterosynthons: Screening via Solution-Mediated Phase Transformation and Structural Characterization. *Crystal Growth & Design* **2009**, *9*, 1932-1943.

121. Eddleston, M. D.; Hejczyk, K. E.; Bithell, E. G.; Day, G. M.; Jones, W., Determination of the Crystal Structure of a New Polymorph of Theophylline. *Chemistry-a European Journal* **2013**, *19*, 7883-7888.

122. Seton, L.; Khamar, D.; Bradshaw, I. J.; Hutcheon, G. A., Solid State Forms of Theophylline: Presenting a New Anhydrous Polymorph. *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 3879-3886.

123. Roy, C.; Vega-Gonzalez, A.; Subra-Paternault, P., Theophylline formulation by supercritical antisolvents. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *343* (1-2), 79-89.

124. Smith, E. D. L.; Hammond, R. B.; Jones, M. J.; Roberts, K. J.; Mitchell, J. B. O.; Price, S. L.; Harris, R. K.; Apperley, D. C.; Cherryman, J. C.; Docherty, R., The determination of the crystal structure of anhydrous theophylline by X-ray powder diffraction with a systematic search algorithm, lattice energy calculations, and C-13 and N-15 solid-state NMR: A question of polymorphism in a given unit cell. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 5818-5826.

125. Ebisuzaki, Y.; Boyle, P. D.; Smith, J. A., Methylxanthines .1. Anhydrous theophylline. *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications* **1997**, *53*, 777-779.

126. Khamar, D.; Pritchard, R. G.; Bradshaw, I. J.; Hutcheon, G. A.; Seton, L., Polymorphs of anhydrous theophylline: stable form IV consists of dimer pairs and metastable form I consists of hydrogen-bonded chains. *Acta Crystallographica Section C-Structural Chemistry* **2011**, *67*, O496-O499.

127. Derewenda, Z. S., On wine, chirality and crystallography. *Acta Crystallographica Section A* **2008**, *64*, 246-258.

128. Sabbah, R.; An, X. W.; Chickos, J. S.; Leitao, M. L. P.; Roux, M. V.; Torres, L. A., Reference materials for calorimetry and differential thermal analysis. *Thermochimica Acta* **1999**, *331*, 93-204.

129. Forni, F.; Coppi, G.; Iannuccelli, V.; Cameroni, R., Thermal-Behavior of Melt Crystallized Phenylbutazone. *Journal of Thermal Analysis* **1990**, *36*, 35-44.

130. Bechker, H. G. O.; Berger, W.; Domschke, G.; Fanghänel, E.; Faust, J.; Fischer, M.; Gentz, F.; Gewalt, K.; Gluch, R.; Mayer, R.; Müller, K.; Pavel, D.; Schmidt, H.; Schollberg, K.; Schwetlick, K.; Seiler, E.; Günter, Z., *Organikum: Química Orgânica Experimental*. 2^a ed.; Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1997.

131. Thuladhar, M. D.; Carless, J. E.; Summers, M. P., Thermal behaviour and dissolution properties of phenylbutazone polymorphs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1983**.

132. Evora, A. O. L.; Castro, R. A. E.; Maria, T. M. R.; Rosado, M. T. S.; Silva, M. R.; Beja, A. M.; Canotilho, J.; Eusebio, M. E. S., Pyrazinamide-Diflunisal: A New Dual-Drug Co-Crystal. *Crystal Growth & Design* **2011**, *11*, 4780-4788.
133. Zhabina, A. A.; Nagrimanov, R. N.; Emel'yanenko, V. N.; Solomonov, B. N.; Verevkin, S. P., Nicotinamides: Evaluation of thermochemical experimental properties. *Journal of Chemical Thermodynamics* **2016**, *103*, 69-75.
134. Blokhina, S.; Sharapova, A.; Ol'Khovich, M.; Volkova, T.; Perlovich, G., Vapor pressures and thermodynamic sublimation of antitubercular drugs: Pirazynamide and hydrazides isonicotinic acid. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2015**, *120*, 1053-1060.
135. Griesser, U. J.; Szelagiewcz, M.; Hofmeier, U. Ch.; Pitt, C.; Cianferani, S., Vapor pressure and heat of sublimation of crystal polymorphs. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **1999**, *57*, 45-60.

7. Apêndice

Apêndice I

Na Figura A1 estão representados os espectros de infravermelho de sólidos obtidos por cristalização da fenilbutazona em metanol e etanol, com evaporação lenta do solvente, a partir de duas soluções diferentes de cada solvente.

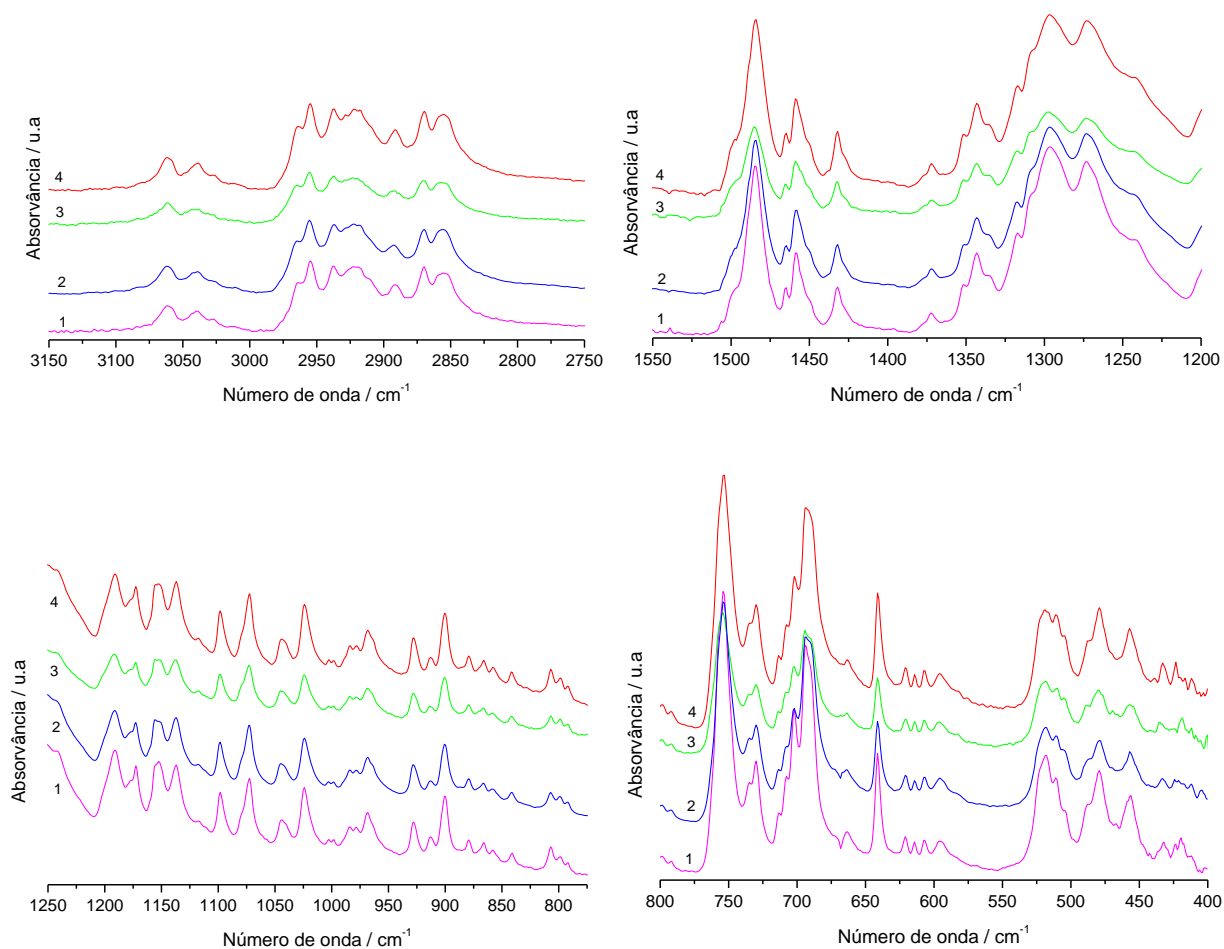


Figura A1 – Espectros de infravermelho do sólido obtido por cristalização de fenilbutazona em: 1. metanol (1^a solução); 2. metanol (2^a solução); 3. etanol (1^a solução); 4. etanol (2^a solução).

Na Figura A2 encontra-se imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em etanol.

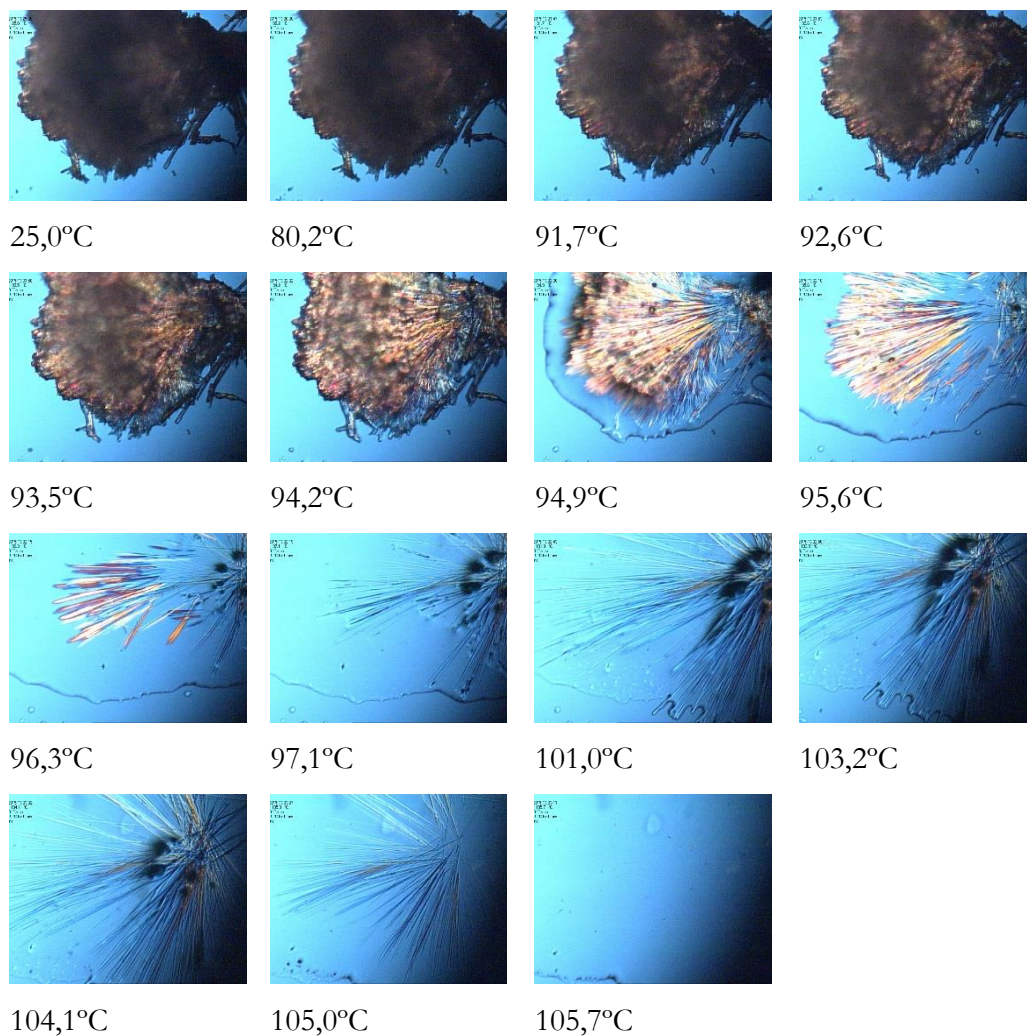


Figura A2 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em etanol, de 25 °C a 115 °C, $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200x.

Na Figura A3 encontram-se imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em acetato de etilo, onde é possível observar uma fusão com início a $T \sim 95$ °C seguida de recristalização e nova fusão a $T \sim 105$ °C

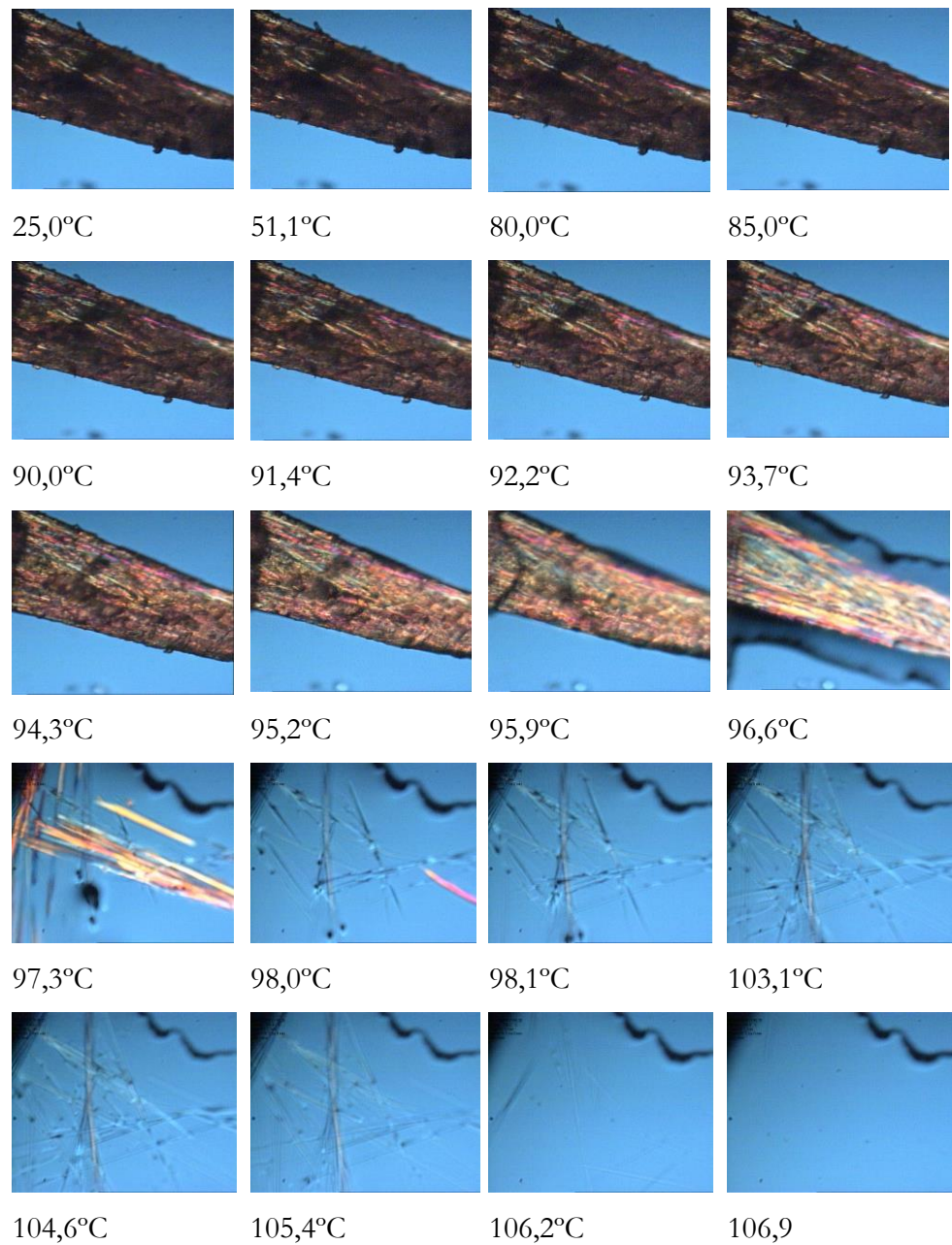


Figura A3 – Imagens obtidas por PLTM no aquecimento do sólido obtido por cristalização da fenilbutazona em acetato de etilo, formato de placas, de 25 °C a 115 °C, $\beta=10^\circ\text{C}/\text{min}$, ampliação 200x.