



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

João Afonso Sêco Vieira Santos

NANOCOCRISTAIS FARMACÊUTICOS
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química, Área de especialização em Química Avançada Industrial variante Desenvolvimento e Estratégia orientada pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Junho de 2020

João Afonso Sêco Vieira Santos

Nanococristais Farmacêuticos: Síntese, Caracterização e Otimização de Processos

Dissertação apresentada para prova de Mestrado em Química, Área de especialização em Química Avançada e Industrial

Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio

Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro

Junho 2020

Universidade de Coimbra

*“Our virtues and our failures are inseparable, like force and matter.
When they separate, man is no more.”*

Nikola Tesla

Agradecimentos

Embora a elaboração de uma tese seja, na sua essência, um trabalho individual, o sucesso na sua conclusão não seria possível sem um conjunto de apoios, que surgem em momentos cruciais ao desenvolvimento dos trabalhos. Assim, deixo nesta secção uma palavra de agradecimento a todos os que me acompanharam nesta caminhada.

À Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio, pela orientação, ensinamentos e toda a dedicação e disponibilidade ao longo destes dois anos. O seu contributo para o meu desenvolvimento a nível académico e humano é inquestionável, por tudo isto, deixo uma palavra de enorme agradecimento.

Ao Professor Ricardo António Esteves de Castro, que desempenhou um papel fulcral no desenvolvimento deste projeto, contribuindo com a sua visão admirável e conhecimento transmitido, que me permitiram manter no caminho certo, de forma a atingir os objetivos propostos.

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

Ao Doutor Pedro Sidónio e à plataforma TAIL pela colaboração nas medidas de SEM.

Aos Engenheiros António Fonseca e Vitor Redondo do Laboratório de Ensaios, Desgaste e Materiais do Instituto Pedro Nunes, pela colaboração com os ensaios de FESEM e difracção com laser.

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

A todos os meus amigos, aos de Coimbra, André Regatia, David Caetano, Diogo Vasco, Gonçalo Dias, João Grilo, Manuel Canelas Pais, Pedro Figueiredo e Tiago Carvalho, que desde cedo me acompanham demonstrando um apoio indiscriminado, mesmo com a minha ausência em momentos importantes. Aos da Universidade, Andreia Melo, Carolina Fernandes, Luís Aspeçada, Maria Pereira, Joana Brás, Rita Neves, Pedro Silva e Rui Santos, por todas as palavras de encorajamento e apoio ao longo do meu percurso académico, e em especial, Amílcar Prata, Rui Frias e Tiago Pinto, que desde o primeiro momento estiveram presentes, sempre com as palavras certas nos momentos certos. A estes e aos restantes, um sincero agradecimento.

A toda a minha família, ao meu pai, João Santos, à minha mãe, Cláudia Vieira, e às minhas irmãs, Margarida Santos e Mariana Santos, nada teria sido possível sem a vossa presença constante e apoio incondicional.

Índice geral

Índice geral	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas.....	vii
Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
Capítulo 1 – Introdução.....	3
1.1 Farmacocinética: importância da absorção para a biodisponibilidade oral.....	3
1.2 Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	4
1.3 Solubilidade e velocidade de dissolução.....	5
1.4 Cocristais.....	7
1.5 Nanocristais e nanotecnologia.....	10
1.5.1 Estabilizadores.....	14
1.6 Nanococristais.....	18
1.6.1 Processos de obtenção de nanococristais.....	18
1.7 Cocristais – modelo a investigar neste projeto.....	20
1.7.1 (S)-Naproxeno, (RS)-Ibuprofeno e Nicotinamida.....	20
1.7.2 Algumas propriedades físico-químicas e estruturais dos APIs e da NIC.....	21
1.7.3 Novos cocristais: complemento de bases de dados.....	26
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	31
2.1 Materiais.....	31
2.2 Métodos.....	32
2.2.1 Preparação de cristais e cocristais nanométricos: Mecanoquímica.....	32
2.2.2 Espectroscopia de infravermelho.....	35
2.2.3 Calorimetria diferencial de varrimento.....	37
2.2.4 Difração de raios-X.....	38
2.2.5 Microscopia eletrônica de varrimento.....	39
2.2.6 Medição do tamanho de partículas.....	41
2.2.7 Técnicas de cristalização em solução: obtenção de monocristais.....	42
Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	47
3.1 Síntese de nanococristais: LAG assistido por surfactante.....	47
3.1.1 LAG: estudos preliminares.....	47
3.1.1.1 Ativos isolados.....	47
3.1.1.2 LAG com formação de cocrystal <i>in situ</i>	51

3.1.1.3 “Top-down” – alternativa a LAG <i>in situ</i>	61
3.1.1.4 Resultados preliminares: problemas identificados.....	65
3.1.2 LAG: (S)NPX-NIC, otimização da formação do cocrystal <i>in situ</i>	67
3.1.2.1 LAG: dependência do tempo de moagem.....	67
3.1.2.2 LAG, formação de cocrystal <i>in situ</i> : mistura de surfactantes.....	69
3.1.2.3 LAG: vasos de óxido de zircônio.....	72
3.2 Síntese de nanocristais: moagem assistida por polímero.....	76
3.2.1 Moagem assistida por polímero: PVP K30.....	76
3.2.2 Moagem assistida por polímero: PEG 6000.....	80
3.3 Síntese de nanocristais: ultrassons e homogeneização mecânica.....	85
3.3.1 Ultrassons.....	85
3.3.2 Homogeneização mecânica.....	90
3.4 Síntese de nanocristais: moagem em suspensão.....	93
3.5 Novos cocrystal: estudos com naproxeno racémico.....	95
Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras.....	107
Referências Bibliográficas.....	109
Anexos.....	125

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do processo de absorção oral de um fármaco.....	3
Figura 2. Representação esquemática do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.	4
Figura 3. Estratégias para aumento de solubilidade de APIs e exemplos da sua aplicação comercial. ¹⁶	6
Figura 4. Representação de homo e heterossintões supramoleculares: a) homossintão ácido-ácido; b) homossintão ácido-amida; c) heterossintão ácido-amida; d) heterossintão ácido-azoto heterocíclico.	8
Figura 5. Representação das estruturas da hidroquinona (1), p-benzoquinona (2) e estrutura cristalina da quinidrona (3). ³¹	8
Figura 6. Representação de exemplos de diagramas de fases ternários, com formação de um composto de adição a temperatura e pressão constante: (a) Congruente; (b) Incongruente. ³⁸	9
Figura 7. Sirolimus - Estrutura molecular.	10
Figura 8. Evolução temporal do fenómeno de <i>Ostwald Ripening</i> . ⁶²	12
Figura 9. Sugestão de Sistema de Classificação Nanotoxicológico. ⁶⁴	13
Figura 10. Representação esquemática dos parâmetros de seleção de estabilizadores. ⁷⁵	15
Figura 11. Representação esquemática dos tipos de estabilizadores conhecidos. ⁷⁵	16
Figura 12. Estrutura molecular: (a) PEG; (b) PVP.	16
Figura 13. Estrutura molecular: (a) Tween 85; (b) Span 85.	17
Figura 14. Técnicas "top-down" e "bottom-up" (Adaptado). ¹⁰⁷	19
Figura 15. (a) Nicotinamida; API com centro quiral identificado (*): (b) Naproxeno, (c) Ibuprofeno.....	20
Figura 16. Mecanismo de inversão quiral do (R)-ibuprofeno. ¹²³	21
Figura 17. Diagrama de empacotamento e ligações de hidrogénio no cocrystal de (S)-naproxeno-nicotinamida. ^{146,147} ..	24
Figura 18. Diagrama de empacotamento e ligações de hidrogénio no cocrystal de (RS)-ibuprofeno e nicotinamida. ^{28,148}	25
Figura 19. Diagramas ternários do cocrystal (RS)IBU-NIC a 298,15 K em (a) etanol, (b) etanol/água. Os números apresentados representam as várias regiões do diagrama: 1- solução; 2- (RS)IBU+solução; 3- NIC+solução; 4- (RS)IBU-NIC+solução; 5- (RS)IBU-NIC+(RS)IBU+soção.	26
Figura 20. Estruturas das piridina-carboxamidas isoméricas e da pirazinamida.	26
Figura 21. Diagrama de empacotamento do cocrystal (RS)NPX-NIC. ¹⁴⁷	27
Figura 22. Impulsores com fluxo: 1-axial; 2-radial. ¹⁷¹	33
Figura 23. Representação do fenómeno de cavitação acústica. ¹⁷⁴	34
Figura 24. Representação esquemática dos componentes do ATR-FTIR: (a) Interferómetro; (b) ATR.....	36
Figura 25. Representação esquemática do fenómeno de difração de Raios-X.....	38
Figura 26. Espectros IV dos APIs de partida em comparação com os espectros dos APIs resultantes das respetivas moagens.	48
Figura 27. Caracterização do tamanho dos cristais de (S)NPX, obtidos por moagem, nas condições indicadas na Tabela 6. Imagens a cores: microscopia com luz polarizada (ampliação: 200 x) dos cristais obtidos após moagem assistida por: (a) 10 µl de etanol; (b) 10 µl 25% Span 85 em etanol; (c) imagens FESEM recolhidas em diferentes zonas da amostra, relativas aos cristais obtidos após moagem assistida por 10 µl 25% Span 85 em etanol (ampliação: 5000x).....	49
Figura 28. Caracterização do tamanho dos cristais de (S)NPX, obtidos por moagem, nas condições indicadas na Tabela 6. Imagens a cores: microscopia com luz polarizada (ampliação: 200 x) dos cristais após moagem assistida por: (a) 10 µl de etanol; (b) 20 µl 25% Span 85 em etanol; (c) 10 µl 50% Span 85 em etanol. Imagens FESEM recolhidas em diferentes zonas da amostra: (d) 20 µl 25% Span 85 em etanol; (e) 10 µl 50% Span 85 em etanol (ampliação: 2000x).....	51
Figura 29. Espectros IV dos sólidos (S)NPX-NIC obtidos por LAG, espectros dos compostos de partida e espectros do cocrystal: --- desvio das elongações assimétrica e simétrica do grupo NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH ⁻ N _{aromático}	53
Figura 30. Comparação dos termogramas DSC dos sólidos (S)NPX-NIC obtidos por LAG com os dos compostos de partida.	54

Figura 31. Comparação entre os difratogramas de raios-X de pó dos compostos de partida e os do sistema (S)NPX-NIC obtidos por moagem.	55
Figura 32. Imagens SEM dos sólidos (S)NPX-NIC, obtidos por LAG assistido por: (a) 10 µl Etanol, SEM; (b) 10 µl 25% Span 85 em etanol, SEM; (c) 20 µl 25% Span 85 em etanol, FESEM; (d) 1º ensaio 10 µl 50% Span 85 em etanol, SEM; (e) 2º ensaio 10 µl 50% Span 85 em etanol, FESEM; (f) 20 µl 50% Span 85 em etanol, FESEM. Ampliação SEM: 25000x; FESEM: 7500x.	56
Figura 33. Espectros IV dos sólidos (RS)IBU-NIC obtidos por LAG e espectros dos cocrystalis de partida: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH···N _{aromático}	58
Figura 34. Comparação entre os termogramas DSC dos compostos de partida e os do sistema (RS)IBU-NIC obtidos por moagem.	58
Figura 35. Difratogramas de raios-X de pó dos cocrystalis de (RS)IBU-NIC e dos compostos de partida que lhes deram origem.	59
Figura 36. Imagens FESEM de amostras de (RS)IBU-NIC obtidas por LAG nas condições da Tabela 9: (a) 20 µl etanol; (b) 20 µl 25% Span 85 em etanol; (c) 20 µl 25% Tween 85 em etanol. Ampliação: 8000x.	60
Figura 37. Diagrama ternário do sistema (RS)IBU-NIC numa solução água/etanol, a 25 °C (percentagem em massa de água de 30%). O ponto a vermelho indica o ponto do diagrama de onde se partiu para a obtenção do cocrystal. ¹⁴⁹	62
Figura 38. Imagens de microscopia de luz polarizada dos cocrystalis obtidos por cristalização em solução (DT): (a) cocrystalis iniciais; (b) após moagem, assistida por 20 µl 25% Span 85 em etanol; (c) após moagem, assistida por 10 µl 50% Span 85 em etanol. Ampliação: 200x.	63
Figura 39. Imagens FESEM dos cocrystalis (RS)IBU-NIC, obtidos por LAG “top-down”, assistido por: (a) 20 µl Etanol; (b) 20 µl 25% Span 85 em etanol (DT); (c) 20 µl 25% Span 85 em etanol (MB); (d) 10 µl 50% Span 85 em etanol (DT); (e) 10 µl 50% Span 85 em etanol (MB). Ampliação: 5000x.	64
Figura 40. Simulação da composição da mistura eutética de (RS)IBU com NIC. T_{fus}^* e $\Delta_{fus}H_m^*$ correspondem à temperatura e entalpia de fusão do composto, respetivamente. ²⁰⁶	66
Figura 41. Comparação entre o termograma DSC do cocrystal (RS)IBU-NIC puro e os termogramas de misturas físicas de (RS)IBU e NIC, aquecidos a velocidades de 2 e 10 °C/min.	66
Figura 42. Imagens obtidas por SEM/FESEM referentes às amostras de cocrystal (S)NPX-NIC, obtidas por LAG com diferentes tempos de moagem: (a) etanol – 30 min; (b) 10 µl Span 85 – 30 min; (c) 10 µl Span 85 – 90 min; (d) 10 µl Tween 85 – 90 min; (e) 10 µl Span 85 – 30 min (2º ensaio). Ampliação SEM: 25000x; FESEM: 5000x.	68
Figura 43. Imagens obtidas por SEM, referentes às amostras de cocrystal (S)NPX-NIC, obtidas por LAG na presença das misturas de surfactante: (a) referência, apenas com etanol; (b) 12,5% Span 85 e Tween 85; (c) 25% Span 85 e Tween 85; (d) 37,5 % Span 85 e Tween 85 Ampliação: 25000x.	70
Figura 44. Imagens obtidas por SEM, referentes às amostras do cocrystal (S)NPX-NIC, obtidas por LAG na presença das misturas de surfactante: (a) 37,5% Span 85 e 20% Tween 85; (b) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85; (c) 37,5% Span 85 e 30% Tween 85. Ampliação: 25000x.	71
Figura 45. Comparação entre as imagens SEM referentes às amostras obtidas por LAG na presença das misturas de surfactante e na presença apenas de Span 85: (a) 37,5% Span 85 e 20% Tween 85; (b) 25% Span 85; (c) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85. Ampliação: 25000x.	72
Figura 46. Comparação entre as imagens SEM referentes aos nanococrystalis de (S)NPX-NIC obtidas por LAG com vasos de aço e com vasos de ZrO: (a) 25% Span 85; (b) 25% Span 85 – ZrO; (c) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85; (d) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85 – ZrO. Ampliações: 25000x.	73
Figura 47. Gráfico da densidade de partículas em volume, em função do seu tamanho para as amostras de nanopartículas de (S)NPX-NIC obtidas por LAG em v. e ZrO, respetivamente estabilizadas por uma solução de Span 85 e por uma mistura de Span 85 + Tween 85.	74
Figura 48. Espectros IV das amostras de (S)NPX-NIC resultantes de moagem assistida por PVP K30: (a) comparação entre os compostos de partida e os produtos finais; (b) espectros dos produtos finais; --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- formação dos sinais correspondentes a pontes de hidrogénio, COOH···N _{aromático} ; --- sinais típicos do PVP K30.	77

Figura 49. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida, com o do estabilizador e dos sólidos de (S)NPX-NIC obtidos por moagem assistida por PVP K30.	78
Figura 50. Difrátogramas de raios-X de pó dos cocrystalis de (S)NPX-NIC, obtidos por moagem assistida por PVP K30, dos compostos de partida que lhes deram origem e do PVP K30.	79
Figura 51. Espectros IV das amostras de (S)NPX-NIC resultantes de moagem assistida por PEG 6000: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- formação dos sinais correspondentes a pontes de hidrogénio, COOH ⁺ N _{aromático} ; --- sinais típicos do PEG 6000.	81
Figura 52. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida, com o do estabilizador e dos sistemas de (S)NPX-NIC obtidos por moagem assistida por PEG 6000.	82
Figura 53. Difrátogramas de raios-X de pó dos cocrystalis de (S)NPX-NIC, dos compostos de partida que lhes deram origem e do PEG 6000, utilizado nas moagens assistidas por polímero.	83
Figura 54. Imagens dos produtos da moagem assistida por PEG 6000: (a) (S)NPX-NIC (2:1), 1% PEG 6000 (SEM); (b) (S)NPX-NIC (2:1), 1% PEG 6000 (SEM) – 2º ensaio; (c) (S)NPX-NIC (2:1), 2,5% PEG 6000 (SEM); (d) (S)NPX-NIC (2:1), 5% PEG 6000 (SEM); (e) (S)NPX-NIC (2:1), 7,5% PEG 6000 (SEM); (f) (S)NPX-NIC (2:1), 10% PEG 6000 (FESEM); (g) (S)NPX-NIC (2:1), 30% PEG 6000 (FESEM). Ampliação: 5000x.	84
Figura 55. Espectros de IV do cocrystal puro, dos seus compostos de partida, e do produto obtido por aplicação de ultrassons: (a) 3500-2500 cm ⁻¹ ; (b) 2000-400 cm ⁻¹ . As setas indicam divergência entre o espectro do cocrystal puro e do que foi sujeito a ultrassons.	86
Figura 56. Representação dos espectros de IV das amostras obtidas, em comparação com o (S)NPX puro e o surfactante utilizado (a) Span 85; (b) Tween 85.	88
Figura 57. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada das amostras de (S)NPX disperso em ciclo-hexano sujeitas a ultrassons (a) 1 %Span 85; (b) 2% Span 85; (c) 1% Tween 85; (d) 2% Tween 85. Ampliação: 50x.	88
Figura 58. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada, das amostras de (S)NPX disperso em água sujeitas a ultrassons (a) 1% Span 85, 30 min; (b) 1% Span 85, 1h; (c) 1% Span 85, 1h 30 min; (d) 2 %Span 85, 30 min; (e) 2% Span 85, 1h; (f) 2% Span 85, 1h 30min. Ampliações: (a), (b),(c) 50x; (d),(e),(f) 200x.	89
Figura 59. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada, das amostras de (RS)IBU disperso em água, sujeitas a homogeneização mecânica: (a) 2% Span 85 (%m/m _{API}); (b) 1% PEG 6000 (%m/m _{dispersante}); (c) 2% Tween 85 (% V/V). Ampliação: (a),(c) – 50x; (b) – 200x.	90
Figura 60. Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada, das amostras de (RS)IBU disperso em água sujeitas a agitação mecânica: (a) 1% Span85 (% V/V), 40 min; (b) Branco 2% Span85 (% V/V); (c) 2% Span85 (% V/V), 60 min; (d) 2% Span85 (% V/V), 60 min - 2º ensaio; (e) 2% Span85 (% V/V), 60 min - 3º ensaio. Ampliação: 50x; (e) 200x.	91
Figura 61. Gráfico da densidade de partículas em volume, em função do seu tamanho para as amostras das emulsões obtidas por agitação mecânica, correspondentes à amostra branco, apenas com Span 85, e à amostra de partículas de (RS)IBU contidas numa emulsão aquosa.	92
Figura 62. Gráfico da densidade de partículas em volume, em função do seu tamanho para a amostra correspondente à nanossuspensão de (S)NPX-NIC estabilizada por uma mistura de Span 85 e Tween 85, obtida por moagem em suspensão.	94
Figura 63. Espectros de IV da PA, polimorfo II; (RS)NPX; (RS)NPX-PA (1:2); (RS)NPX-PA (1:1); (RS)NPX-PA (2:1): (a) 3500-450 cm ⁻¹ ; (b) expansão: 3600 -2500 cm ⁻¹ ; (c) expansão: 700-450 cm ⁻¹	96
Figura 64. Termogramas, DSC, correspondentes a misturas de (RS)NPX com PA, de diferentes composições, submetidas a LAG, em comparação com os compostos de partida.	97
Figura 65. Difrátogramas de raios-X de pó de misturas de (RS)NPX-PA de diferentes composições, submetidas a LAG, e dos compostos de partida.	98
Figura 66. Comparação do espectro de IV do novo cocrystal (RS)NPX-INA com os espectros dos seus compostos de partida.	99
Figura 67. Termogramas, DSC, da mistura de (RS)NPX com INA (1:1), submetida a LAG, em comparação com os seus compostos de partida.	100
Figura 68. Difrátogramas de raios-X de pó da mistura de (RS)NPX-INA (1:1), submetida a LAG, e dos compostos de partida.	101

Figura 69. Espetros IV das amostras recolhida nos processos de cristalização resumidos na Tabela 30, para obtenção dos monocristais de (RS)NPX-INA.	102
Figura 70. Espetros IV das amostras recolhidas nos processos de cristalização resumidos na Tabela 30 para obtenção dos monocristais de (RS)NPX-PA.	102
Figura 71. Monocristais do cocrystal (RS)NPX-INA (1:1) e a respetiva estrutura cristalina, resolvida a partir dos mesmos.	103
Figura 72. Ligações de hidrogénio que compõem a estrutura cristalina do cocrystal (RS)NPX-INA (1:1).	104
Figura A1. Espetros IV correspondentes aos cocrystal (RS)IBU-NIC obtidos via “top-down”: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH··N _{aromático} ; (MB) – moinho de bolas; (DT) – diagrama ternário.....	128
Figura A2. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do cocrystal (RS)IBU-NIC obtidos via “top-down”.	129
Figura A3. Difractogramas de raios-X de pó dos cocrystal (RS)IBU-NIC obtidos via “top-down”, e dos compostos de partida que lhes deram origem.	130
Figura A4. Diagrama de fases sólido-líquido da mistura binária de (RS)IBU+NIC. T_{fus}^* e $\Delta_{fus}H_m^*$; T_{fus}^{cc} e $\Delta_{fus}H_m^{cc}$, correspondem à temperatura e entalpia de fusão dos componentes puros. ²⁰⁶	131
Figura A5. Espetros IV dos cocrystal (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com Span 85 e Tween 85, com aumento do tempo de moagem: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH··N _{aromático}	132
Figura A6. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do sistema (S)IBU-NIC obtidos por LAG, estabilizados com Span 85 e Tween 85, com aumento do tempo de moagem.	132
Figura A7. Espetros IV dos cocrystal (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com misturas de Span 85 e Tween 85: -- - desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH··N _{aromático}	134
Figura A8. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do sistema (S)NPX-NIC obtido por LAG, estabilizado com misturas de Span 85 e Tween 85.	134
Figura A9. Difractogramas de raios-X de pó dos cocrystal (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com misturas de Span 85 e Tween 85.	135
Figura A10. Espetros IV dos cocrystal (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH ₂ ; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH··N _{aromático}	137
Figura A11. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do sistema (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.	138
Figura A12. Difractogramas de raios-X de pó dos cocrystal (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.	139
Figura A13. Comparação entre o difratograma de raios-X de pó do cocrystal de (S)NPX-NIC após eliminação do meio de dispersão e os difratogramas do cocrystal puro e dos compostos de partida.....	141
Figura A14. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada, correspondentes à aplicação do acoplamento de técnicas durante 90 min: (a) 1% Span; (b) 1% Tween 85. Ampliação: (a) 50x, (b) 200x.	144

Índice de Tabelas

Tabela 1. Relação entre propriedades estruturais e propriedades físico-químicas de compostos, utilizada para promover alterações que visam melhorar a solubilidade.	6
Tabela 2. Métodos "top down" e "bottom up".....	19
Tabela 3. Temperatura e entalpia de fusão dos compostos ativos, do coformador e dos respectivos cocristais, utilizados neste trabalho.	22
Tabela 4. Solubilidade dos APIs e da nicotinamida em diferentes solventes, a 25 °C, unidades de solubilidade: mg ml ⁻¹	23
Tabela 5. Compostos utilizados e informação pertinente relativa aos mesmos.....	31
Tabela 6. Condições utilizadas na aplicação de LAG aos APIs investigados. ^{a)}	47
Tabela 7. Condições utilizadas na aplicação de LAG ao sistema binário de (S)-naproxeno + nicotinamida. ^{a)}	52
Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC, nas várias condições estudadas para obtenção de nanocristais.	54
Tabela 9. Condições utilizadas na aplicação de LAG ao sistema binário de (RS)-ibuprofeno + nicotinamida. ^{a)}	57
Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (RS)IBU-NIC, nas várias condições estudadas para obtenção de nanocristais.	59
Tabela 11. Condições utilizadas na aplicação de LAG – “top-down” – ao sistema (RS)IBU-NIC. Cocrystal gerado por LAG. ^{a)}	61
Tabela 12. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG com alteração do tempo de moagem. ^{a)}	67
Tabela 13. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG na presença de percentagens equivalentes de surfactantes em solução. ^{a)}	69
Tabela 14. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG correspondentes à otimização da aplicação da mistura de surfactantes. ^{a)}	71
Tabela 15. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG (30 Hz, 30 min), com utilização de vasos de óxido de zircônio.	73
Tabela 16. Percentis de 10, 50 e 90% do volume total, representativos dos tamanhos de partículas presentes nas amostras.....	75
Tabela 17. Condições para a obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios de moagem assistida por polímero com recurso a PVP K30. ^{a)}	76
Tabela 18. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC estabilizados por PVP K30, bem como dos compostos de partida e do polímero utilizado para obtenção dos nanocristais.....	79
Tabela 19. Condições para obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios de moagem assistida por polímero com recurso a PEG 6000. ^{a)}	80
Tabela 20. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC estabilizados por PEG 6000, bem como dos compostos de partida e do polímero utilizado para obtenção dos nanocristais.....	82
Tabela 21. Condições de preparação das nanossuspensões de (S)NPX, por exposição a ultrassons.	87
Tabela 22. Condições para obtenção das nanossuspensões de (RS) IBU correspondentes aos primeiros ensaios com recurso a homogeneização mecânica.	90
Tabela 23. Percentis de 10, 50, 90 e 100% do volume total, representativos dos tamanhos de partículas presentes nas respetivas emulsões.	92
Tabela 24. Condições de preparação dos ensaios de moagem em suspensão, cocrystal (S)NPX-NIC. ^{a),b)}	94
Tabela 25. Percentis de 10, 50 e 90 % do volume total, representativos dos tamanhos de partículas presentes na nanossuspensão do cocrystal (S)NPX-NIC), obtidos por moagem em suspensão	95
Tabela 26. Condições de pesquisa de novos cocristais (RS)NPX-PA, por LAG. ^{a)}	96
Tabela 27. Propriedades termodinâmicas de fusão de misturas de (RS)NPX-PA, de diferentes composições, submetidas a LAG, e dos respetivos compostos de partida.	98

Tabela 28. Condições de obtenção do novo cocristal (RS)NPX-INA, por moagem assistida por etanol. ^{a)}	99
Tabela 29. Propriedades termodinâmicas de fusão da mistura de (RS)NPX-INA (1:1), submetida a LAG e dos compostos de partida.	100
Tabela 30. Condições utilizadas na realização dos ensaios para obtenção de monocristais de (RS)NPX-INA (1:1) e (RS)NPX-PA (1:1), por cristalização em etanol.	101
Tabela 31. Parâmetros cristalográficos da estrutura cristalina do novo cocristal (RS)NPX-INA (1:1).....	103
Tabela A1. Parâmetros cristalográficos dos modelos de cocristais utilizados. ^{28,146}	125
Tabela A2. Parâmetros geométricos das ligações de hidrogénio dos modelos de cocristal. ^{28,147} O * indica a ligação que se forma em detrimento da anterior.	125
Tabela A3. Imagens SEM correspondentes às amostras de (S)-naproxeno e de (RS)-ibuprofeno, submetidas a LAG..	126
Tabela A4. Imagens SEM do cocristal (S)NPX-NIC obtido por LAG em diferentes condições experimentais.	127
Tabela A5. Imagens FESEM do cocristal (S)NPX-NIC obtidos por LAG em diferentes condições experimentais.....	127
Tabela A6. Imagens FESEM do cocristal (RS)IBU-NIC obtidos por LAG em diferentes condições experimentais.....	128
Tabela A7. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas, DSC, dos sistemas (RS)IBU-NIC, nas várias condições estudadas para obtenção de nanococristais via método “top-down”: MB - moinho de bolas; DT – diagrama ternário.....	129
Tabela A8. Imagens FESEM do cocristal (RS)IBU-NIC obtido via “top-down” em diferentes condições experimentais. (DT) – diagrama ternário; (MB) – moinho de bolas.	130
Tabela A9. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com Span 85 e Tween 85, com aumento do tempo de moagem.	133
Tabela A10. Imagens FESEM e SEM correspondentes aos nanococristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG em diferentes tempos de moagem.	133
Tabela A11. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com misturas de Span 85 e Tween 85.	135
Tabela A12. Imagens SEM correspondentes aos nanococristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com aplicação de misturas em percentagens equivalentes de Span 85 e Tween 85.	136
Tabela A13. Imagens SEM correspondentes aos nanococristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com aplicação de misturas de 75% Span 85 e percentagens variáveis de Tween 85 (% V/V).	137
Tabela A14. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.	138
Tabela A15. Imagens SEM correspondentes aos nanococristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.	139
Tabela A16. Constituição inicial do meio de dispersão preparado. Os valores entre parenteses correspondem às massas a pesar para atingir o ponto de saturação dos respetivos compostos em meio aquoso.....	140
Tabela A17. Imagens SEM correspondentes aos nanococristais de (S)NPX-NIC obtidos por moagem assistida por PEG 6000.....	142
Tabela A18. Imagens FESEM correspondentes aos nanococristais de (S)NPX-NIC moídos com PEG 6000.....	143
Tabela A19. Condições para obtenção das dispersões de (RS) IBU para aplicação de homogeneização mecânica e ultrassons.	143

Abreviaturas

API- *do inglês* “Active Pharmaceutical Ingredient”

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

BCS- *do inglês* “Biopharmaceutics Classification System”

CCDC- *do inglês* “The Cambridge Crystallographic Data Centre”

DLS- *do inglês* “Dynamic Light Scattering”

DSC- *do inglês* “Differential Scanning Calorimetry”

DT- Diagrama Ternário

EHL- Equilíbrio hidrófilo-lipofílico

FDS- *do inglês* “Food and Drug Administration”

FESEM- *do inglês* “Field Emission Scanning Electron Microscopy”

GRAS- *do inglês* “Generally Recognized as Safe”

INA- Isonicotinamida

IV- Infravermelho

LAG- *do inglês* “Liquid Assisted Grinding”

LD- *do inglês* “Laser Diffraction”

MB- Moinho de Bolas

NIC- Nicotinamida

NSAID- *do inglês* “Nonsteroidal anti-inflammatory drug”

PA- Picolinamida

PEG- Polietilenoglicol

PVP- Polivinilpirrolidona

(RS)IBU- (RS)-Ibuprofeno (mistura racémica)

(RS)NPX- (RS)-Naproxeno (mistura racémica)

SCXRPD- *do inglês* “Single Crystal X-Ray Diffraction”

SEM- *do inglês* “Scanning Electron Microscopy”

(S)NPX- (S)-Naproxeno

XRPD- *do inglês* “X-Ray Powder Diffraction”

Resumo

Este trabalho tem por objetivo a investigação da síntese e caracterização de nanocristais farmacêuticos, formas sólidas que, combinando o aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução que se associa à formação de cocristais e à redução do tamanho de partículas, têm potencial para promover o aumento da absorção gastrointestinal e, conseqüentemente, o aumento da biodisponibilidade oral dos APIs. Os cocristais de (*S*)-naproxeno e nicotinamida (2:1) e de (*RS*)-ibuprofeno com o mesmo coformador (1:1) ((*S*)NPX-NIC e (*RS*)IBU-NIC) foram usados como modelos neste estudo. Ambos os compostos ativos são anti-inflamatórios não esteróides que se inserem na Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, apresentando elevada permeabilidade gastrointestinal e baixa solubilidade aquosa.

Foram investigadas três metodologias de síntese de nanocristais, na área da mecanoquímica, testadas para a formação de nanocristais: moagem em moinho de bolas, sonoquímica e homogeneização mecânica. Estas inserem-se num conjunto de métodos denominados “top-down”, nos quais se parte de cristais de grandes dimensões e se procura a redução do seu tamanho, neste caso, através da exposição a forças de cisalhamento. No caso do moinho de bolas, os cocristais foram também gerados *in situ*.

Os estudos realizados permitem identificar a natureza dos compostos em estudo, a natureza e concentração dos estabilizadores e, no caso das nanossuspensões, a escolha do meio de dispersão, como principais desafios na síntese de nanocristais. A estabilização dos nanocristais, alvo de grande atenção ao longo do trabalho, é uma questão que merece especial destaque.

Os resultados obtidos indicam a falta de eficácia de ultrassons e da homogeneização mecânica na formação de nanocristais, provavelmente devido a forças com energia insuficiente para o processo “top-down”, verificando-se o mesmo com o acoplamento das duas técnicas. A moagem em moinho de bolas revelou-se uma técnica de eleição devido à sua versatilidade, promovendo a produção de nanocristais *in situ* e de nanossuspensões, através da aplicação de moagem assistida por líquido (LAG) e de moagem em suspensão. A otimização das técnicas permitiu definir uma mistura de surfactantes constituída por Span 85 e Tween 85 como ideal para a estabilização de nanocristais de (*S*)NPX-NIC.

Todos os sólidos trabalhados durante este projeto foram caracterizados através de técnicas complementares: espectroscopia por reflectância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR), calorimetria diferencial de varrimento (DSC) e difração de raios-X de pó (XRPD). O tamanho de partículas foi determinado com recurso a microscopia eletrónica de varrimento (SEM/FESEM) e difração com laser (LD).

Estudos suplementares levaram à obtenção de novos cocristais de (*RS*)-naproxeno com isonicotinamida e com picolinamida, ambos com estequiometria (1:1), por LAG. Devido às suas características, estes cocristais são excelentes candidatos à aplicação das técnicas testadas para a obtenção de nanocristais, de forma a comprovar a sua eficácia.

Abstract

The present work aims at the synthesis and characterization of pharmaceutical nanococrystals, solid forms that can, potentially, increase solubility and dissolution rate of drugs, improving their gastrointestinal permeability and, consequently, their oral bioavailability, through the conjunction of cocrystal formation and particle size reduction. In this work, (*S*)-naproxen with nicotinamide (2:1) and (*RS*)-ibuprofen with nicotinamide (1:1), ((*S*)NPX-NIC and (*RS*)IBU-NIC) were used as cocrystal models. These active compounds are non-steroidal anti-inflammatory drugs, belonging to Class II of Biopharmaceutical System Classification, with high gastrointestinal permeability and low aqueous solubility.

For this study, three mechanochemical methods were studied: ball milling, sonochemistry and mechanical homogenization, which integrate a group of top-down pathways for particle size reduction, inducing it by exposing large crystals to shearing forces. In the ball milling case, *in situ* cocrystal formation was also carried out.

Results identify the compound and stabilizer nature, stabilizer concentration and, for nanosuspensions, the dispersion media choice, as major challenges for the synthesis of nanococrystals, highlighting nanococrystal stabilization as the main obstacle.

Investigation results show the lack of efficiency of sonochemistry and mechanical homogenization methods for particle size reduction, probably, due to the generation of lower energy forces than needed for top-down techniques. Furthermore, the coupling of both techniques didn't show any improvements. Contrariwise, ball milling pathways proved to be a method of choice, revealing versatility with the *in situ* synthesis of nanococrystals and the formulation of nanosuspensions, by liquid assisted grinding (LAG) and wet milling. Through technique optimization, a mixture of surfactants consisting of Span 85 and Tween 85 was defined as ideal for (*S*)NPX-NIC nanococrystals stabilization.

All the solid forms were characterized by Attenuated Total Reflectance – Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and X-ray Powder Diffraction (XRPD). Particle size was determined by electronic microscopy (SEM/FESEM) and Laser Diffraction (LD).

Supplementary studies on (*RS*)-naproxen cocrystals were also carried out, leading to the synthesis of new (*RS*)-naproxen cocrystals with isonicotinamide and picolinamide, both with stoichiometry (1:1), through LAG application. Due to its characteristics, these cocrystals are excellent candidates for particle reduction essays, providing more information about the efficiency of the new developed methods.

Capítulo 1

Introdução

Capítulo 1

Introdução

1.1 Farmacocinética: importância da absorção para a biodisponibilidade oral

O desenvolvimento de fármacos é uma ciência multidisciplinar que envolve a conjugação de várias linhas de investigação, de forma a encontrar um candidato a fármaco com características ideais. Estabelece-se como um bom candidato, aquele que apresentar propriedades aceitáveis a nível de absorção, distribuição, metabolismo, excreção, e, ao mesmo tempo, baixa toxicidade, de modo a ser bem sucedido na primeira fase dos ensaios clínicos farmacológicos.¹ Estas etapas são o alvo de estudo da farmacocinética, que tem como por objetivo a averiguação do tempo de permanência do fármaco e dos seus metabolitos no organismo, desde a administração até à eliminação.²

Um dos principais parâmetros em estudos farmacocinéticos é a biodisponibilidade, que consiste na fração de ativo farmacêutico (API) que é absorvida a partir de uma formulação farmacêutica e que fica disponível na circulação sistémica, isto porque não é possível medir a concentração do API junto dos alvos do fármaco. Este parâmetro é sobretudo afetado pela absorção do fármaco no trato intestinal, após administração oral.³

A absorção caracteriza-se como sendo o movimento do fármaco do local onde foi aplicado para a corrente sanguínea, e corresponde à primeira etapa a ter em conta para estudos farmacocinéticos.⁴ A absorção oral de um fármaco é um processo de extrema complexidade, que pode ser dividido em quatro passos (Figura 1): dissolução do medicamento e consequente libertação do princípio ativo (fármaco); dissolução do API, dependente das suas características físico-químicas; permeabilidade efetiva do API na mucosa intestinal e metabolismo pré-sistémico.⁵

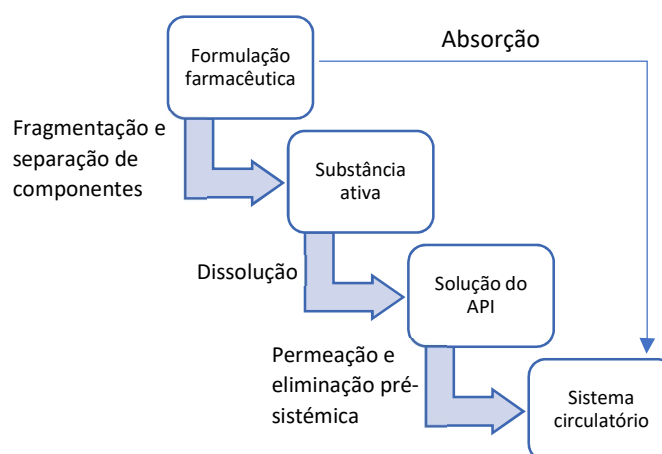


Figura 1. Representação esquemática do processo de absorção oral de um fármaco.

Por sua vez, existem três categorias de fatores que afetam diretamente estes passos, determinando a taxa de absorção do API. A primeira representa as propriedades físico-químicas, que incluem, entre outros, solubilidade, área de superfície e tamanho das partículas. A segunda relaciona-se com fatores fisiológicos, como o pH intestinal e os movimentos gástricos, e por fim, a terceira prende-se com a forma farmacêutica, que passa pela utilização de soluções, comprimidos, cápsulas ou suspensões.⁶

Tendo em conta a importância da absorção para o aumento da biodisponibilidade oral, define-se como foco deste trabalho a modificação das propriedades físico-químicas do API, nomeadamente a solubilidade e o tamanho de partículas, melhorando a sua eficácia para administração oral.

1.2. Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Provada a importância da solubilidade e da permeabilidade para a determinação da biodisponibilidade de um fármaco e justificada a relevância destes parâmetros farmacocinéticos para o desenvolvimento de fármacos viáveis, surgiu a necessidade de estabelecer um sistema que permitisse classificar os compostos de acordo com estes fatores, de forma a facilitar a seleção e aprovação de formulações farmacêuticas, através de uma previsão do seu desempenho. Nasce, assim, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).⁷

Devido à sua simplicidade e viabilidade, este sistema foi adotado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e as vantagens da sua aplicação são globalmente reconhecidas, com a sua utilização durante o desenvolvimento de vários fármacos potencialmente eficazes.^{8,9}

Este sistema divide os fármacos em quatro classes distintas, consoante a sua solubilidade aquosa e permeabilidade gastrointestinal (Figura 2).¹⁰

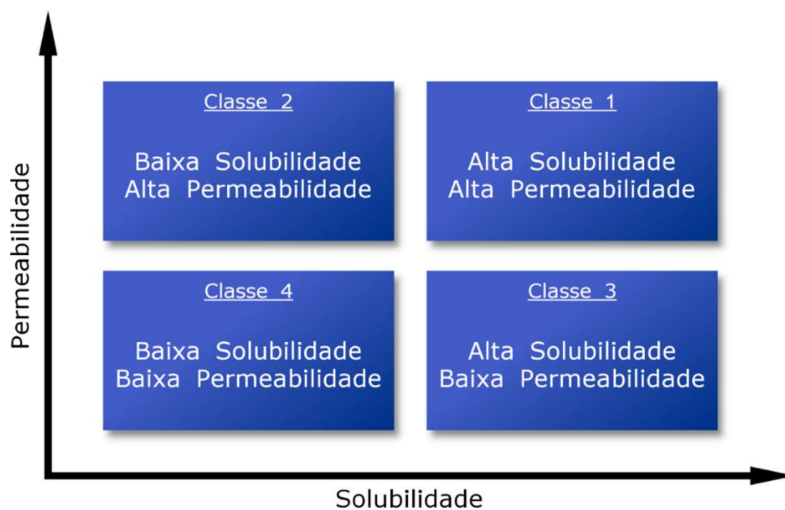


Figura 2. Representação esquemática do Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

Na classe I estão inseridos os fármacos que apresentam elevada solubilidade e permeabilidade. Estes são os fármacos com absorção ideal, que não necessitam de ser trabalhados através de estratégias que visam o aumento destas propriedades.

Nas classes II e III encontram-se os fármacos que necessitam de períodos de absorção mais longos, no primeiro caso devido à baixa solubilidade dos compostos em meio aquoso, e no segundo, devido à baixa permeabilidade gastrointestinal apresentada pelos fármacos, demonstrando, neste caso, um perfil de dissolução semelhante aos fármacos da classe I.

No caso da classe IV deste sistema, estão envolvidos os fármacos que apresentam baixa solubilidade e permeabilidade, pelo que apresentam grandes dificuldades em termos de absorção oral, o que constitui uma barreira comprometedora ao desenvolvimento de fármacos a partir destes compostos.^{5,9,10}

São de interesse para este estudo, os fármacos inseridos na classe II do BCS, sendo o nosso objetivo aumentar a solubilidade e a velocidade de dissolução através da aplicação de estratégias que visam esses objetivos, aproximando-os dos compostos que se inserem na classe I, com comportamento ideal.

1.3. Solubilidade e velocidade de dissolução

Define-se solubilidade como a concentração máxima de uma substância que pode ser completamente dissolvida num dado solvente, sob determinadas condições.¹¹ Uma vez que a permeação na membrana gastrointestinal apenas é possível para compostos em solução, a solubilidade apresenta-se como sendo um fator limitante para a absorção.¹²

Abordando a matéria do ponto de vista termodinâmico, a solubilidade traduz-se no equilíbrio entre uma fase sólida pura, constituída pela substância em estudo, e a solução saturada da mesma, com igualdade de energias de Gibbs parciais molares (potenciais químicos) do composto nas duas fases. Tomando o exemplo de um composto A, podemos então obter a seguinte igualdade (1):

$$\mu_A^{soln} = \mu_A^{S*} \quad (1)$$

Tendo em conta a igualdade (1), estamos em condições de afirmar que é válida a equação (2):

$$\mu_A^{S*} = \mu_A^{l*} + RT \ln(\gamma_A x_A), \quad (2)$$

onde μ_A^{S*} e μ_A^{l*} correspondem aos potenciais químicos do composto A no estado puro, em fase sólida e líquida, respetivamente; μ_A^{soln} , presente na igualdade (1), representa o potencial químico de A numa solução de concentração x_A ; R é a constante de gases, T corresponde à temperatura em Kelvin, e, finalmente, γ_A , corresponde ao coeficiente de atividade de A, parâmetro termodinâmico que permite ter em conta desvios ao comportamento ideal de compostos em solução. Obviamente que, aproximando-nos do comportamento ideal, este coeficiente iguala-se à unidade, e, portanto, o potencial químico passa apenas a estar dependente da concentração molar do soluto.^{13,14}

Existe uma relação de dependência entre solubilidade e propriedades físico-químicas dos compostos, que por sua vez estão intimamente ligadas com as propriedades estruturais dos mesmos, quer a nível molecular, quer a nível de organização em fase sólida (Tabela 1). Assim, promovendo alterações estruturais no composto ou na estrutura da fase sólida, é possível modificar a solubilidade de forma a melhorar o seu desempenho.¹⁵

Tabela 1. Relação entre propriedades estruturais e propriedades físico-químicas de compostos, utilizada para promover alterações que visam melhorar a solubilidade.

Propriedades físico-químicas	Propriedades estruturais
Lipofilicidade	Interações de van der Waals; dipolo-dipolo; pontes de hidrogénio e interações iónicas
Tamanho pKa	Peso molecular; configuração Grau de ionização dos grupos funcionais
Energia de rede cristalina	Empacotamento; ponto de fusão

Como foi realçado em secções anteriores, a baixa solubilidade de candidatos a API é um grande obstáculo ao desenvolvimento de fármacos, afetando a absorção destes compostos. Tendo em conta a informação descrita na Tabela 1 e variáveis que afetam a solubilidade, como o ambiente no trato gastrointestinal, foram desenvolvidas estratégias que levam ao aumento da solubilidade dos API, por alteração da forma sólida, sem que estes percam as suas propriedades farmacêuticas (Figura 3).



Figura 3. Estratégias para aumento de solubilidade de APIs e exemplos da sua aplicação comercial.¹⁶

Um outro fator que, a par da solubilidade, influencia diretamente absorção de fármacos, é a velocidade de dissolução desses compostos. Esta caracteriza-se como sendo a velocidade a que um composto no estado sólido se dissolve, de forma a obter-se uma solução do mesmo.¹⁶

Em 1897, Noyes e Whitney determinaram que a dissolução de um fármaco em solução teria um comportamento semelhante à da difusão de compostos em solução, já conhecida. Assim, partindo de equações de difusão simples já definidas, obtiveram uma equação (3), que permite calcular a velocidade de dissolução de um composto:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C), \quad (3)$$

onde $\frac{dC}{dt}$ corresponde à velocidade de dissolução, C_s à solubilidade da substância, C à concentração da substância no instante t , e K a uma constante, que pode ser obtida por integração da equação (3), sendo que para tal a solubilidade da substância tem de ser conhecida.¹⁷

Demonstrada a relação entre estas duas propriedades, torna-se óbvio que de nada nos serve aumentar a solubilidade de um API se este apresentar baixa velocidade de dissolução, uma vez que isto implicaria a necessidade de um grande intervalo de tempo para que o composto se dissolvesse, e, portanto, iria afetar a absorção, acabando por inviabilizar o sucesso do projeto em causa.

Assim, temos como objetivo deste trabalho a aplicação de duas estratégias em simultâneo, visando melhorar quer a solubilidade aquosa quer a velocidade de dissolução: a obtenção de cocristais e a redução do tamanho de partículas até à escala nanométrica, dando origem a novas partículas conhecidos por nanococristais.

1.4. Cocristais

Na secção anterior discutiu-se o problema da baixa solubilidade de APIs em água, como entrave ao desenvolvimento de fármacos. Sabe-se ainda que tanto a solubilidade como a velocidade de dissolução estão diretamente relacionados com propriedades do composto, entre elas, a sua estrutura cristalina.¹⁸

Os cocristais são reconhecidos como estratégia para resolução deste problema uma vez que possuem características que se revelam vantajosas relativamente a outras estratégias amplamente estudadas, nomeadamente as suas propriedades estruturais e a grande variedade de formadores que podem ser incorporados na sua constituição.¹⁹

Até à data, não existe nenhuma definição universalmente aceite na comunidade científica para este tipo de compostos, no entanto, é aceitável definirem-se cocristais farmacêuticos como estruturas supramoleculares constituídos por um API e um coformador, ambos sólidos quando puros, à temperatura e pressão ambiente, estabilizados por interações intermoleculares, não iónicas, formando uma rede cristalina única, com estequiometria definida. Estes são extremamente apelativos para a indústria farmacêutica, uma vez que permitem a alteração de propriedades físico-químicas de um API, evitando a quebra ou formação de ligações covalentes.²⁰

Para além de serem constituídos por um composto ativo de interesse farmacêutico, para que um cocrystal se insira na classe dos farmacêuticos, necessita ainda de ter um coformador farmacologicamente aceitável, isto é, que seja seguro para consumo humano, por exemplo, da lista de compostos *Generally Recognized as Safe* (GRAS) aprovada pela FDA.²¹

Assim sendo, os cocristais têm vindo a ganhar espaço na investigação de novas estruturas cristalinas de ativos farmacêuticos, uma vez que surgem como alternativa a outras estratégias apresentadas na Figura 3, como sais, polimorfos ou solvatos, promovendo melhorias em propriedades físico-químicas como solubilidade, estabilidade, permeabilidade, biodisponibilidade e propriedades mecânicas, sem comprometer a bioatividade do API.²²

Comparando os cocristais com os sais, existe a vantagem óbvia da utilização de compostos não iónicos, uma vez que nem todos os compostos possuem grupos funcionais básicos ou ácidos o suficiente para dar origem a sais.²⁰

No caso dos compostos amorfos, estes tendem a evoluir para a estrutura cristalina do composto em causa, termodinamicamente mais estável. Também diferentes polimorfos podem ser utilizados para o mesmo efeito, no entanto, existem algumas reservas quanto à sua utilização, uma vez que estes podem sofrer transformações noutros polimorfos termodinamicamente mais estáveis, como demonstrado no caso do ritonavir, que, dois anos depois do seu lançamento, foi retirado do mercado devido à sua transformação num polimorfo que reduzia a biodisponibilidade oral do fármaco.²³

Em 1995, Desiraju definiu sintões supramoleculares como unidades estruturais de supermoléculas, que podem ser formadas por operações de síntese que envolvem interações intermoleculares.²⁴ Observando a composição estrutural de cocrystalis conhecidos, é fácil concluir que estes são o exemplo perfeito de supermoléculas, uma vez que são constituídos, precisamente, por moléculas ligadas por interações intermoleculares que dão origem a uma rede cristalina, e, portanto, não é de espantar que esta designação tenha sido adotada. Estes sintões podem ainda ser divididos em dois tipos, homo e heterossintões.^{25,26}

Homossintões são constituídos por grupos funcionais idênticos e complementares que dão origem, por exemplo, a dímeros ou cadeias. Grupos como os ácidos carboxílicos, relevantes para este trabalho, são exemplos de possíveis constituintes de homossintões, devido à sua capacidade para participar em ligações de hidrogénio (Figura 4. a,b).

Já no caso dos heterossintões, estamos perante estruturas constituídas por grupos funcionais que, embora diferentes, são também complementares. Neste trabalho, é possível depararmo-nos com sintões deste tipo constituídos por um ácido carboxílico e uma amida e ainda por interações entre um azoto heterocíclico e um ácido carboxílico (Figura 4. c,d).^{27,28}

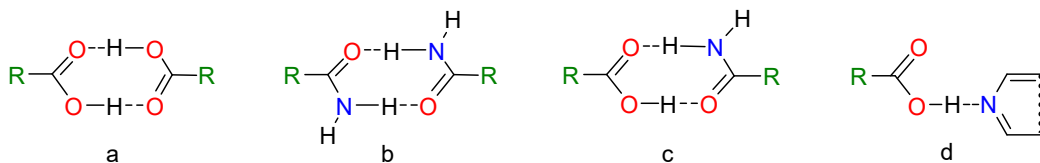


Figura 4. Representação de homo e heterossintões supramoleculares: a) homossintão ácido-ácido; b) homossintão ácido-amida; c) heterossintão ácido-amida; d) heterossintão ácido-azoto heterocíclico.

Em 1844, Wöhler documentou o primeiro sólido binário, constituído por *p*-benzoquinona (1) e hidroquinona (2), a partir de cristalização em solvente (Figura 5). Este viria a ser conhecido como o primeiro cocrystal (3), apesar de a sua estrutura ter sido resolvida apenas em 1958, com o início da utilização da difração de raio-X para determinação da estrutura cristalina.²⁹⁻³¹

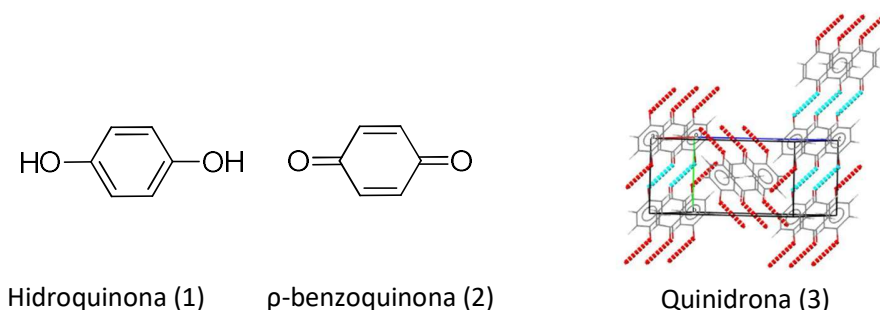


Figura 5. Representação das estruturas da hidroquinona (1), *p*-benzoquinona (2) e estrutura cristalina da quinidrona (3).³¹

Com o avançar dos anos, surgiram novas técnicas de cocristalização de extrema importância sobretudo para combater a elevada utilização de solventes que se verificava aquando a obtenção de cocristais, de acordo com os princípios da química verde.³² Estas técnicas, apelidadas de “solvent free”, têm como característica a redução drástica da utilização de solventes, apresentando, ao mesmo tempo, resultados semelhantes, ou mesmo mais satisfatórios, quando comparadas com técnicas tradicionais. Um exemplo deste tipo de técnicas é a moagem assistida por líquido (LAG), de especial relevância para este projeto.^{33,34}

Apesar de serem menos poluentes e de apresentarem bons resultados em termos de formação de cocristais, as técnicas “solvent free” não podem ainda suprimir completamente a utilização de técnicas baseadas em solventes. Exemplo disso é a necessidade de utilização de métodos de cocristalização em solvente, quer por variação de temperatura, quer por evaporação, para obtenção de monocristais que permitam a resolução de estruturas cristalinas de novos sólidos.^[33] Também para obtenção de nanococristais, é importante selecionar métodos que permitam trabalhar nas duas vertentes, tanto na formação do cocristal, como na diminuição do tamanho das partículas, pelo que a utilização de métodos de cocristalização em solvente ganha peso, não podendo, de todo, ser descartada.

Com a utilização de métodos profundamente dependentes de solvente, surge um problema relacionado com a interação entre o solvente e os compostos de partida. Em cocristais binários cujos sólidos de partida apresentam solubilidades muito diferentes, existe a possibilidade de cristalização dos compostos de partida após dissolução do cocristal, o que se traduz no aparecimento de impurezas ou mesmo na inviabilização de obtenção do cocristal binário pretendido.³⁵

Para solucionar esta questão, é importante o conhecimento de diagramas de fase ternários para o sistema constituído pelos componentes do cocristal e o solvente. A obtenção destes diagramas implica estudos de solubilidade a temperatura e pressão controladas, nos solventes pretendidos, e permite retirar algumas informações importantes, entre as quais: (1) congruência da dissolução; (2) estequiometria ideal da solução de partida para obtenção de cocristal; (3) perceção das áreas do diagrama ternário correspondentes aos valores de fração molar para os quais é possível obter cocristal puro.³⁶

Na Figura 6 estão representados dois diagramas de fases ternários, como exemplo do que se espera observar no caso de se verificar congruência (a), e no que se poderá observar caso a dissolução não seja congruente (b), onde L corresponde a uma solução dos dois compostos no solvente, D ao API sólido, C ao coformador sólido e D-C ao cocristal formado entre os dois.

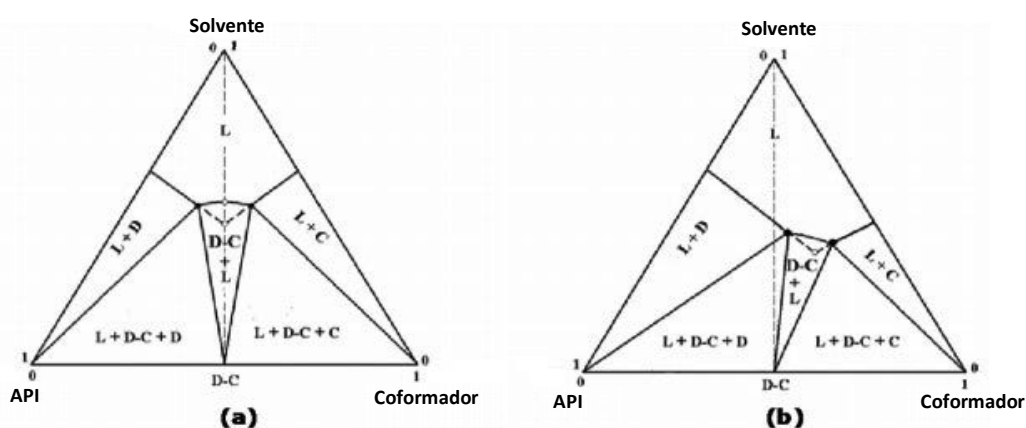


Figura 6. Representação de exemplos de diagramas de fases ternários, com formação de um composto de adição a temperatura e pressão constante: (a) Congruente; (b) Incongruente.³⁸

No primeiro caso, a zona delimitada pelos dois pontos negros, correspondentes a pontos eutéticos ternários (pontos que definem, à temperatura e pressão consideradas, a composição da solução em equilíbrio com as duas fases sólidas),³⁷ inclui a linha que representa uma composição estequiométrica (1:1, no exemplo) do cocrystal, dando origem a um diagrama simétrico característico de sistemas congruentes. Contrariamente, no diagrama (b), nota-se a perda de simetria com desvio da zona correspondente ao cocrystal puro em direção ao eixo do coformador, uma vez que este é mais solúvel no solvente em questão.³⁸

1.5. Nanocristais e nanotecnologia

A palavra “nanotecnologia” deriva do latim *nano*, que se traduz para “anão”, sendo aplicada no desenvolvimento de materiais com tamanhos inferiores ao micrómetro, utilizados em variadas áreas científicas.³⁹ Em 1959, o físico Richard Feynman protagonizou aquela que é para muitos, a primeira referência à teoria que rodeia a diminuição do tamanho de partículas, numa comunicação oral intitulada “There’s Plenty of Room at the Bottom”. Esta impulsionou estudos que giram em torno da miniaturização de bases de dados com novas técnicas de escrita e leitura, os quais deram origem a um novo ramo da ciência, a nanotecnologia.^{40,41}

Apesar de todos os esforços da comunidade científica, apenas nos anos 90 começaram a ser observados os primeiros frutos da investigação nanotecnológica, no que diz respeito a ativos farmacêuticos.⁴² Surge então, em 2000, o *Rapamune*, introduzido pela Wyeth Pharmaceuticals, como o primeiro produto que contém na sua constituição nanocristais. Este fármaco tem como composto ativo o *Sirolimus* (Figura 7), uma lactona macrocíclica que atua como imunossupressor, sendo principalmente utilizado no controlo da rejeição de enxertos em transplantes, embora também seja indicado para doenças cardiovasculares, degenerativas e do foro metabólico e oncológico. É produzido com recurso a um método “top down”, através de choques mecânicos provocados por um moinho, na presença de solvente.⁴³ Nos anos seguintes surgiram novos fármacos como o *Emend* e o *Tricor*, um antiemético e um antilipidémico, que deram seguimento ao crescimento destas novas formulações no mercado.⁴⁴

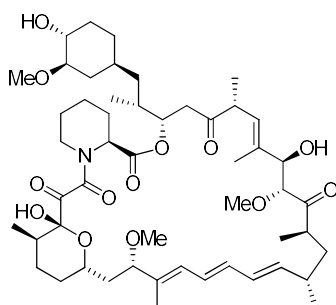


Figura 7. Sirolimus - Estrutura molecular.

Com o desenvolvimento desta tecnologia, torna-se evidente a necessidade de se estabelecer um padrão para aquilo que é considerado como sendo um nanocristal. Apesar da falta de consenso, define-se nanocristal farmacêutico como partículas constituídas apenas pelo API puro, com uma pequena percentagem de estabilizadores necessários à manutenção da estabilidade dos cristais, com tamanhos entre 1 e 1000 nm.

Estas partículas apresentam ainda como vantagem a ausência da necessidade de utilização de transportadores para o transporte até ao alvo farmacológico.^{45,46}

Apesar de estar implícita a necessidade destes compostos apresentarem estruturas cristalinas, por vezes, ocorre amorfização durante o processo de diminuição do tamanho de partículas, pelo que o conceito de nanocristais é alargado de forma a abranger também fármacos amorfos na escala nanométrica.⁴⁷

Neste capítulo inserem-se também as nanossuspensões, caracterizadas pela presença de partículas do API com tamanhos inferiores a 1000 nm, dispersas num meio (normalmente aquoso), estabilizadas por surfactantes ou polímeros aprovados pela FDA (GRAS).⁴⁸

Em secções anteriores expôs-se a relação entre as propriedades físico-químicas de compostos e a sua solubilidade. Solubilidades mais elevadas são obtidas para polimorfos com energias de Gibbs mais elevadas, portanto, metaestáveis.^{49,50} Partículas amorfas obtidas em processos de homogeneização, apresentam, também, melhorias significativas na solubilidade de um API devido ao aumento da energia interna, associado à perda de organização da estrutura cristalina, típica dos cristais destes compostos.⁵¹

A solubilidade é também afetada pelo tamanho de partículas. A equação de Ostwald-Freundlich, análoga à equação de Kelvin, estabelece uma relação direta entre o limite de solubilidade e o tamanho de partículas em solução, para um sólido em equilíbrio numa solução saturada.⁵² Esta equação pode ser representada por:

$$\ln \frac{S}{S_0} = \frac{2\gamma V}{rRT} = \frac{2\gamma M}{\rho rRT}, \quad (4)$$

onde S corresponde à solubilidade de saturação de uma partícula esférica de raio r, S₀ à solubilidade dessas partículas quando o raio tende para infinito, ρ à densidade do sólido, γ à energia interfacial, V ao volume molar, R à constante de gases ideais e T à temperatura absoluta. Através da equação (4) é facilmente observável a dependência direta da solubilidade com o raio das partículas, concluindo-se que uma diminuição deste tem como consequência direta o aumento da propriedade pretendida.^{49,53}

O efeito da diminuição do tamanho de partículas começa a ter impacto ao atingir-se tamanhos inferiores a 1 μm, ganhando especial relevo à medida que a redução do raio atinge valores mais baixos.^{54,55}

Partindo da equação de Noyes-Whitney (equação (3)) é também possível estabelecer uma relação matemática que prova que a velocidade de dissolução depende da diminuição do tamanho das partículas. Esta relação ficou conhecida pela equação de Nernst-Burnner:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DA}{Vh} (C_s - C), \quad (5)$$

onde $\frac{dC}{dt}$ corresponde à velocidade de dissolução, D ao coeficiente de difusão do composto, A à área de superfície, V ao volume do meio de dissolução, h à espessura da camada de difusão, C_s à solubilidade de saturação e C à solubilidade no instante t. Nesta equação, verifica-se que a um aumento da área de superfície (resultado da diminuição exponencial do tamanho das partículas), corresponde um aumento da velocidade de dissolução.⁵⁶

Outra vantagem resultante da utilização da nanotecnologia na indústria farmacêutica, prende-se com o aumento da adesão do fármaco ao epitélio de absorção, devido ao aumento da sua área de superfície. No entanto, como estas partículas não teriam, à partida, a capacidade de passar pela parede do intestino no estado sólido, e com a sua dissolução e consequente absorção são extremamente rápidas, este efeito não deverá ser significativo.⁵⁷

No que toca à administração dos fármacos, a diminuição do tamanho de partículas permite a utilização de vias evasivas ao metabolismo pré-sistémico, que de outra forma representariam perigo para o

doente alvo de tratamento. Exemplo disso é a administração de fármacos por via intranasal, onde a utilização de nanocristais permite a absorção do API na mucosa.⁵⁸ A via intravenosa, beneficia também da utilização destes compostos, uma vez que com a diminuição do tamanho de partículas, são evitadas embolias causadas pelas partículas de maiores dimensões, devido à obstrução dos vasos sanguíneos.⁵⁹

A grande desvantagem da utilização desta tecnologia relaciona-se com a dificuldade de manutenção da estabilidade das partículas na escala nanométrica. No entanto, apesar dos nanocristais serem conhecidas pela facilidade de agregação ao longo do tempo, estas acabam por ser mais fáceis de estabilizar do que as fases amorfas.⁶⁰ Para além da grande tendência para formação de aglomerados, explicada pela elevada energia resultante do aumento da área de superfície, e ainda, de processos de cristalização secundários e eventuais alterações polimórficas, há ainda a ter em conta o efeito denominado *Ostwald Ripening*.⁶¹

Na Figura 8, encontra-se esquematicamente representado o efeito deste fenómeno em nanocristais. Observa-se que este ocorre tendencialmente em amostras com grande heterogeneidade de tamanhos, e está intimamente ligado à grande diferença de solubilidade entre as partículas de maiores e menores dimensões.

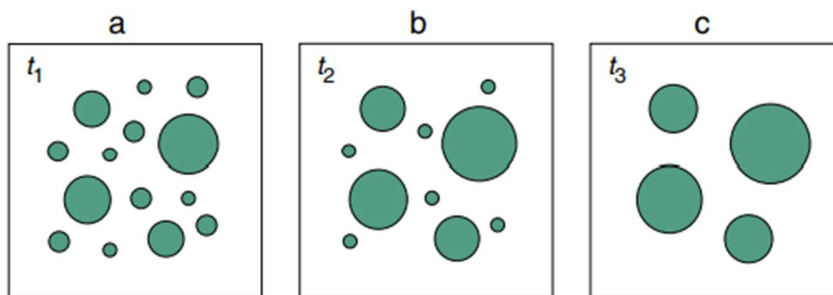


Figura 8. Evolução temporal do fenómeno de *Ostwald Ripening*.⁶²

Verifica-se então que, de *a* para *c*, ocorre uma diminuição no número de partículas de pequenas dimensões, juntamente com o aumento do diâmetro das partículas de maiores dimensões, inferindo-se que aquelas se dissolveram na superfície das grandes partículas, levando ao aumento do tamanho médio dos constituintes da amostra.^{61,62}

Numa tentativa de controlo destes problemas associados à utilização de cristais nanométricos, são utilizados estabilizadores, já referidos, bem como uma otimização dos processos de obtenção de nanopartículas que visa o aumento da homogeneidade de tamanhos na amostra. Para além disso é ainda realizado um controlo a nível do limite de dose dos fármacos, de forma a evitar a agregação dos cristais.⁶³

Com o crescimento da tecnologia relacionada com as nanopartículas, surgem também preocupações no que toca à sua toxicidade. A nanotoxicidade surge como assunto amplamente debatido não só pela comunidade científica como também pelo público em geral. Numa tentativa de elucidar ambas as partes, Cornelia Keck e Rainer Müller desenvolveram um sistema, baseado no esquema de cores do semáforo, capaz de sumariar de forma simples a relação entre o tamanho das partículas e a sua toxicidade, nascendo assim o Sistema de Classificação Nanotoxicológico (Figura 9).

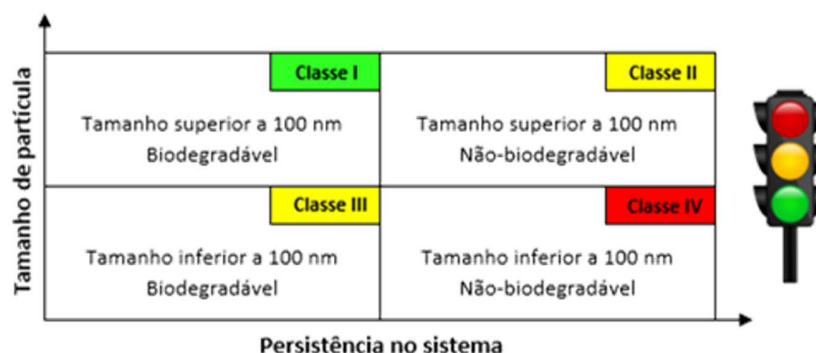


Figura 9. Sugestão de Sistema de Classificação Nanotoxicológico.⁶⁴

No sistema apresentado, são identificadas quatro classes distintas, com base no tamanho das partículas e na sua biodegradabilidade. Na classe I, representada a verde, e que, portanto, de acordo com o semáforo será a classe dos nanocristais que não representam riscos, estão englobados aqueles com tamanhos superiores a 100 nm e que se revelam biodegradáveis, evitando permanência em circulação a longo prazo, que poderá provocar respostas do sistema imunitário. As classes II e III, a amarelo, são classes que representam perigo, devido aos tamanhos inferiores a 100 nm ou à não-biodegradabilidade, respetivamente. A classe IV, a vermelho, recorrendo de novo à analogia com o semáforo, representa paragem obrigatória no que toca à investigação com os nanocristais em causa, uma vez que estes apresentam tamanhos inferiores a 100 nm, não sendo biodegradáveis.

O valor de 100 nm utilizado como referência para este sistema é um valor regulatório, que representa o tamanho abaixo do qual as partículas seguramente passarão pelo processo de endocitose, penetrando nas células e aumentando o risco de toxicidade. No entanto, é difícil perceber qual o limiar de tamanhos a partir dos quais as partículas apenas podem ser fagocitadas por macrófagos, limitando a sua distribuição pelo corpo, pelo que estudos terão de ser realizados de forma a verificar este fator para cada caso. Também as vias de administração e a dose administrada terão de ser tidas em conta devido à variação da biodisponibilidade com consequente variação de células e órgãos a que as nanopartículas terão acesso.⁶⁴

A biodegradabilidade relaciona-se com a capacidade do corpo de eliminar corpos estranhos ao sistema. Partículas com baixa biodegradabilidade poderão ser potencialmente tóxicas, caso interajam com o sistema imunitário e causem irritação, não esquecendo que os produtos da degradação poderão também representar perigo de toxicidade. Assim sendo, é ainda importante ter em conta a biocompatibilidade, definida como a habilidade de um material para atuar com uma resposta adequada, numa aplicação específica.⁶⁵ Consequentemente, o sistema ficará mais completo ao englobar este conceito, especificando-se cada classe como biocompatível (B) ou não-biocompatível (NB).⁶⁴

Há ainda autores que consideram a toxicidade dos nanocristais como sendo a mesma do material no estado *bulk*, uma vez que, quando um composto ativo é oralmente administrado no tamanho original, irá diminuir de tamanho durante a dissolução, atingindo tamanhos na escala nanométrica antes da dissolução completa. Assim sendo, a determinação da toxicidade será feita de acordo com o material utilizado.⁶⁶

Tendo em conta as vantagens associadas aos cocrystal e aos nanocristais no que toca ao aumento da absorção e, consequentemente, da biodisponibilidade oral, devido ao aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução, é fácil de perceber o potencial envolto na obtenção de nanocristais, partindo da premissa de que estas propriedades se mantêm intactas ao utilizar as duas estratégias em simultâneo.

1.5.1 Estabilizadores

Na definição da nanocristais farmacêuticos apresentada, dá-se a conhecer os estabilizadores como fator de extrema importância no desenvolvimento desta tecnologia. Deste modo, é importante conhecer estes compostos, de forma a tirar partido das suas potencialidades.

Como será discutido na secção 1.6.1, existem várias vias de obtenção de nanocristais, que partem de princípios distintos, o que facilita a sua síntese. O grande desafio prende-se com a manutenção da estabilidade, afetada por vários fatores, entre os quais a energia de superfície, hidrofobicidade, solubilidade, viscosidade e grupos funcionais que se encontram expostos à superfície. Todos estes fatores fazem da escolha dos estabilizadores um processo crítico no desenvolvimento destas partículas.⁶⁷

Suhdir Verma e colaboradores, confirmaram a complexidade da escolha e impacto dos estabilizadores, num estudo que comprovou que a eficácia destes na síntese de nanossuspensões de ibuprofeno varia de acordo com a via de obtenção.⁶⁸

Para enfrentar esta questão tão complexa, é necessário entender os mecanismos de estabilização de nanocristais, baseados em duas vias básicas, estabilização eletrostática e estabilização estérea, que podem ser utilizadas em simultâneo.^{67,69} A primeira advém da repulsão de partículas de carga equivalente, resultante da formação de uma dupla camada elétrica na superfície dos nanocristais, e está dependente das forças iónicas envolvidas e da concentração de iões adsorvidos na superfície das partículas.⁷⁰ Apesar da sua simplicidade e baixo custo, esta via apresenta algumas fragilidades, nomeadamente a necessidade da manutenção de um meio aquoso, a sensibilidade a variações na força iónica e temperatura, e a dificuldade de aplicação em sistemas com fases múltiplas, uma vez que cada sólido gera potenciais elétricos diferentes.⁷¹⁻

74

A segunda via, consiste no processo através do qual surfactantes ou polímeros não iónicos são adsorvidos pelas partículas, provocando uma repulsão estérea forte entre estas, originada pela mistura desfavorável das camadas de estabilizador adsorvidas por ambas e pela redução da entropia de configuração. É então uma barreira física que contorna alguns dos problemas verificados com a via anterior, o que se revela extremamente importante para este trabalho.^{75,76}

Na Figura 10 encontram-se especificados parâmetros a ter em conta para a seleção de estabilizadores. Estes estão divididos em três grupos diferentes, de acordo com a sua relação com o fármaco, o estabilizador ou o meio de dispersão (caso se trate de uma nanossuspensão).⁷⁵

Apesar de elucidativos, alguns parâmetros envolvem termos técnicos que carecem de uma breve explicação. Começando pelos parâmetros relacionados com fármacos, o potencial zeta corresponde ao potencial eletrónico na camada que envolve as nanopartículas, ou seja, é uma unidade de medida para a variação de carga superficial, que permite controlar as interações eletrostáticas.^{77,78} Nos parâmetros relacionados com o estabilizador, destaca-se a afinidade com o fármaco, o peso molecular, a hidrofobicidade e a concentração do mesmo.

O peso molecular é o parâmetro de análise mais direta e de fácil compreensão: um maior peso molecular leva a um aumento da repulsão estérea aquando da adsorção da parte hidrofóbica do estabilizador ao fármaco. Pesos moleculares muito baixos levam a forças repulsivas mais fracas do que as interações de van der Waals, o que leva a agregação, enquanto que pesos moleculares demasiado elevados podem levar à adsorção de várias partículas em simultâneo, que terá também um efeito negativo na manutenção do tamanho pretendido.⁷⁹



Figura 10. Representação esquemática dos parâmetros de seleção de estabilizadores.⁷⁵

Obviamente, a afinidade do estabilizador para com o fármaco afeta a sua eficácia, uma vez que se este não for adsorvido, não poderá formar a barreira que irá impedir os fenômenos envolvidos no crescimento dos cristais. Da mesma forma, a hidrofobicidade, com o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL), é também um parâmetro de extrema importância, uma vez que, teoricamente, estabilizadores mais lipofílicos (baixo EHL) terão maior afinidade com fármacos hidrofóbicos.^{68,80}

A concentração do estabilizador é, talvez, o parâmetro mais desafiante de todos os que foram apresentados. Concentrações muito baixas não serão suficientes para criar uma barreira em torno de todas as nanopartículas, o que leva a agregação e efeito de *Ostwald ripening*.⁸¹ Por outro lado, o aumento para concentrações excessivamente elevadas é também prejudicial à estabilidade das nanopartículas, não só porque facilita a ocorrência do efeito de *Ostwald ripening*, como também porque, no caso dos surfactantes, ao atingir-se a concentração micelar crítica, as micelas formadas poderão competir com a adsorção do estabilizador.^{79,82,83}

Outro fator interessante relativamente a este parâmetro é a utilização de concentrações de estabilizadores extremamente baixas no desenvolvimento otimizado de nanocristais, que se deve, como demonstrado por Bernice Akpınar e colaboradores, aos valores nanométricos extremamente baixos para a espessura da camada de estabilizador.⁸⁴

Conhecidas as vias de estabilização de nanocristais e alguns parâmetros a ter em conta na sua aplicação, resta apenas dar a conhecer os estabilizadores disponíveis no mercado. Estes são apresentados na Figura 11, sendo classificados de acordo com o seu tipo e natureza.⁷⁵

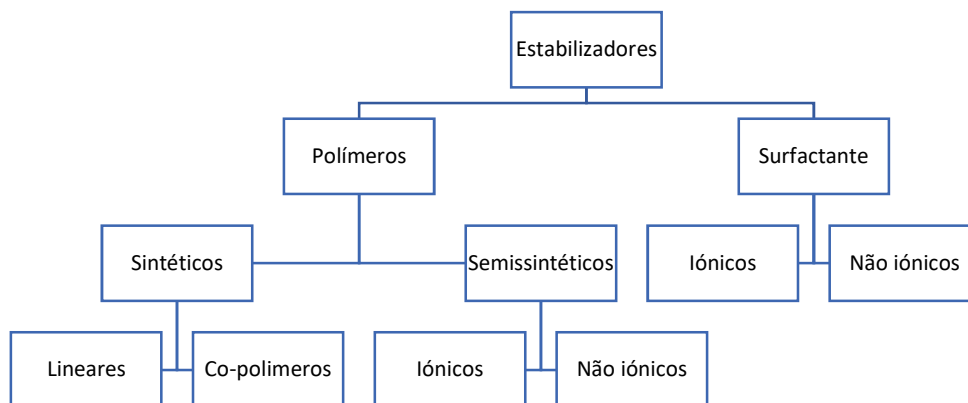


Figura 11. Representação esquemática dos tipos de estabilizadores conhecidos.⁷⁵

Definem-se polímeros como um conjunto de unidades estruturais que se repetem ao longo da cadeia, ligadas por ligações covalentes, sendo que são vários os exemplos que podem ser encontrados em literatura relativamente à sua aplicação na estabilização de nanocristais.⁸⁵⁻⁸⁷ De forma a abranger ambas as famílias de polímeros, selecionou-se a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG), representados na Figura 12, como exemplares de polímeros sintéticos e semissintéticos.



Figura 12. Estrutura molecular: (a) PEG; (b) PVP.

O PEG é um polímero semissintético não iónico, sintetizado a partir de derivados do petróleo, com pesos moleculares de aproximadamente 200 g mol^{-1} , até valores na casa dos milhares, dependendo do tamanho da cadeia molecular do polímero. PEG com massas moleculares até valores que rondam os 700 g mol^{-1} encontram-se no estado líquido, enquanto que os restantes se encontram no estado sólido com temperaturas de fusão que vão até aos 68°C . Devido ao baixo ponto de fusão e à anfifilicidade intrínseca à sua estrutura, com partes hidrofóbicas com afinidade para os compostos pouco solúveis em água, e uma parte hidrofílica solúvel em água, este polímero é um candidato com provas dadas no que toca à sua utilização como estabilizador de nanocristais da classe II do BCS.⁸⁸⁻⁹¹

A PVP é um polímero sintético linear, obtido através de reações de polimerização radicalar em solução, com pesos moleculares entre os 2500 e $1000000 \text{ g mol}^{-1}$. Apresenta transição vítrea por volta dos 175°C , que pode baixar até aos 100°C com a diminuição do peso molecular, o que implica que estará no estado amorfo à temperatura ambiente. Este polímero apresenta algumas características interessantes, nomeadamente a sua solubilidade em água e ainda a possibilidade de desenvolver uma estrutura reticulada do mesmo, o que diminui a sua solubilidade em água e aumenta a mesma em solventes orgânicos.⁹² Na

estrutura representada na Figura 12b, é de notar a presença de uma parte hidrofílica com o anel da pirrolidona, e uma parte hidrofóbica representada pela cadeia alquílica, o que faz deste um polímero anfifílico muito utilizado como estabilizador no desenvolvimento de nanocristais.⁹³

Um surfactante é uma substância química que ao ser adsorvida na fronteira entre duas fases imiscíveis, altera as propriedades na interface, reduzindo a tensão superficial e estabilizando a mistura. São moléculas anfifílicas, com partes hidrofóbicas e partes hidrofílicas, o que pode levar à formação de estruturas micelares em meio aquoso, de forma a reduzir a energia livre do sistema.⁹⁴ Devido a estas propriedades, são reconhecidos como excelentes estabilizadores em vários estudos descritos na literatura.⁹⁵⁻⁹⁷ Como já foi verificado, contrariamente ao caso dos surfactantes iónicos, a utilização de surfactantes não iónicos não está dependente de um meio aquoso, pelo que serão dois surfactantes desta família que estarão no centro dos estudos, o Span 85 e o Tween 85, representados na Figura 13.

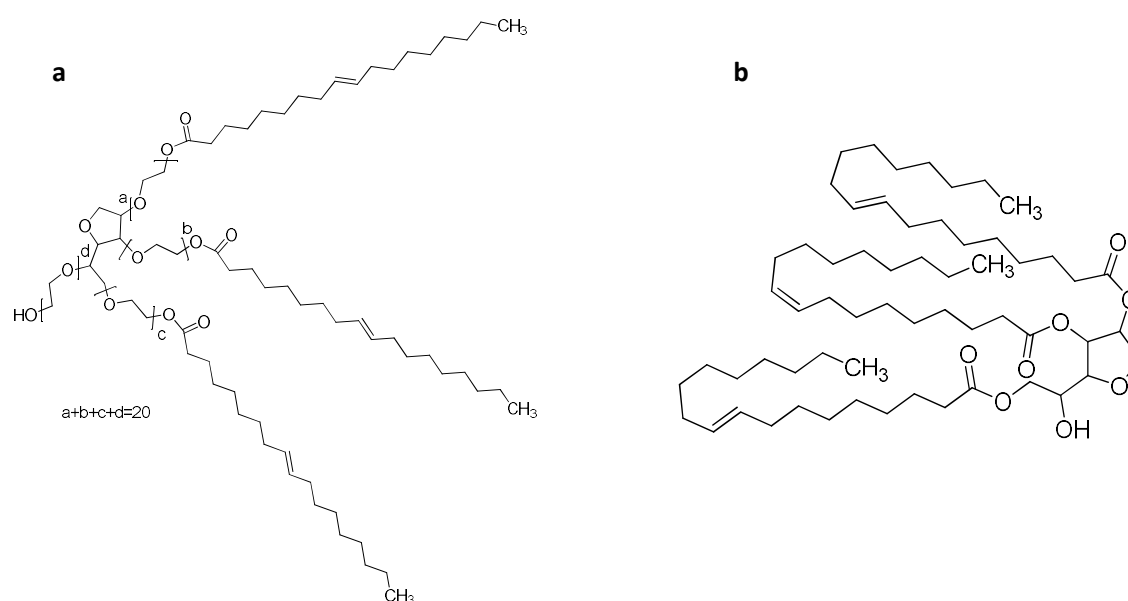


Figura 13. Estrutura molecular: (a) Tween 85; (b) Span 85.

O Tween 85 (Figura 13a) é um surfactante da família dos polissorbitatos, derivados dos sorbitanos, enquanto que o Span 85 (Figura 13b) é da família dos sorbitanos, ambos comercializados em solução. Por observação direta das suas estruturas, distinguem-se facilmente as três caudas apolares ligadas à cabeça polar, demonstrando a anfifilicidade característica dos estabilizadores. A grande diferença entre estes dois compostos prende-se com o valor do EHL, indicador de que o Span 85 (EHL = 1,8) é extremamente lipofílico, enquanto que o Tween 85 (EHL = 11) é mais hidrofílico.⁹⁸

Apesar da grande diferença entre os dois, é possível encontrar na literatura provas da utilidade de ambos na estabilização de nanocristais, o que, juntamente com as suas características, justifica a sua adição ao leque de estabilizadores propostos para obtenção dos nanocristais pretendidos.^{99,100}

1.6 Nanocristais

Apresentadas as estratégias da utilização de cocristais e nanocristais para a melhoria de características físico-químicas de APIs pouco solúveis em água, e com o avanço da tecnologia no desenvolvimento de fármacos, surge naturalmente a engenharia de nanocristais, em crescimento exponencial, e que tem revelado grande potencial na área farmacêutica.¹⁰¹

A formulação de nanocristais resulta da combinação da síntese de nanocristais com a obtenção de cocristais, de forma a tirar proveito do aumento da solubilidade e velocidade de dissolução, proporcionados por ambas as técnicas. Desta forma estaremos, teoricamente, a aumentar a absorção gastrointestinal, aumentando a biodisponibilidade oral de APIs pouco solúveis em água, tal como pretendido.¹⁰²

Fruto de avanços científicos numa área que se encontra a dar os primeiros passos na comunidade científica, surgiram nos últimos 10 anos os primeiros cocristais nanométricos, com melhorias relevantes nas propriedades em foco, embora sejam escassos os estudos no que toca a métodos e processos de obtenção.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Assim, apesar de ser uma área de investigação ainda jovem, esta apresenta um enorme potencial, pelo que despertou o nosso interesse e desencadeou todo o projeto apresentado.

1.6.1 Processos de obtenção de nanocristais

A obtenção de nanocristais terá de estar intimamente relacionada com métodos de obtenção de cocristais e de nanocristais, que terão de ser combinados de forma a permitir sintetizar o material pretendido. Assim sendo, é crucial conhecer os métodos de obtenção de cristais nanométricos, de modo a definir métodos de preparação para o composto pretendido.

Existem duas vias antagónicas que permitem a obtenção de nanocristais, denominadas técnicas “top-down” ou “bottom-up”, sendo que as primeiras são substancialmente mais utilizadas devido à facilidade de passagem da escala laboratorial para a escala industrial.^{105,106}

Na Figura 14 estão esquematicamente representadas as técnicas de obtenção de nanocristais, tendo em conta que, como já foi discutido anteriormente, o processo de amorfização dos cristais poderá vir associado a este tipo de técnicas, e, portanto, é também considerado.

Por análise direta da informação exposta, é facilmente perceptível a diferença entre as duas técnicas. Definem-se então as técnicas “top-down” como técnicas que partem de partículas com tamanhos na escala do micrómetro ou superior, obtendo-se nanopartículas através da aplicação de forças mecânicas de elevada intensidade. Por outro lado, técnicas “bottom-up” são técnicas em que se parte de uma solução com o API dissolvido, sendo a nucleação e o crescimento das partículas controlado de forma a não atingir tamanhos na escala dos micrómetros.^{107,108}

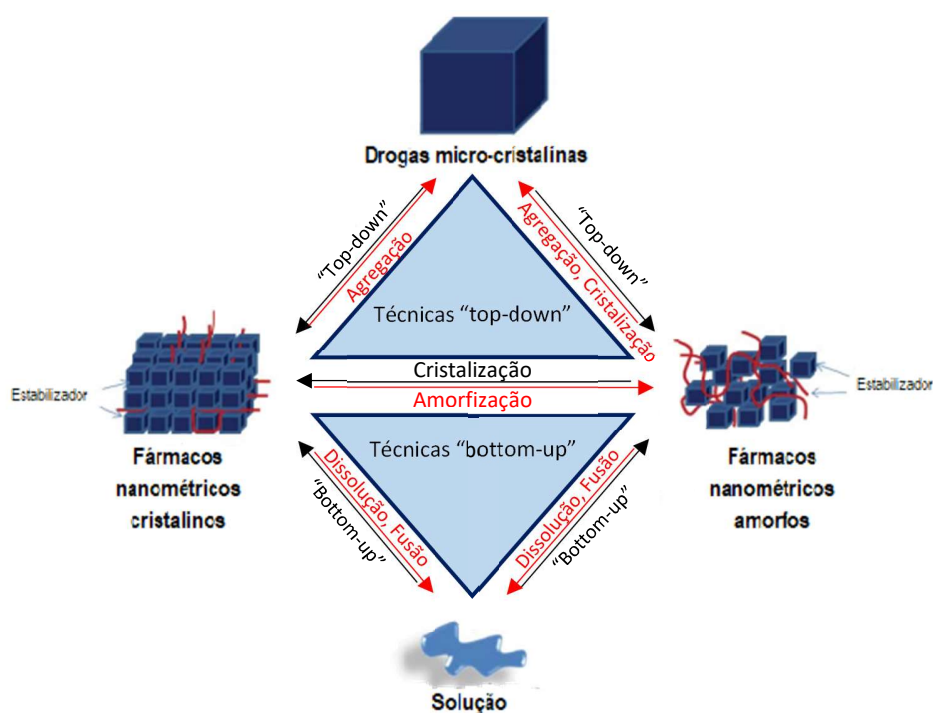


Figura 14. Técnicas "top-down" e "bottom-up" (Adaptado).¹⁰⁷

Assim, como ambas as técnicas são muito abrangentes, é possível encontrar vários exemplos de métodos utilizados na aplicação da respetiva via (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos "top down" e "bottom up".

"Top-Down"	Referência	"Bottom-up"	Referência
Moagem	109	Precipitação (antissolvente)	110
Homogeneização a pressão elevada	111,112	<i>Spray drying</i>	113
Ultrassons	83	Liofilização	114
Fragmentação a laser	115		

Devido à sua versatilidade, estes métodos podem ainda ser acoplados, de forma a tirar partido das potencialidades de vários métodos em simultâneo.¹¹⁶

Como foi discutido na secção 1.4, a grande diferença de solubilidade entre o API e o coformador, que compõem os cocrystalis, poderão causar problemas à estabilidade dos mesmos, o que, transpondo para a síntese de nanocristais, representa um problema para a aplicação de métodos associados à via "bottom-up", implicando cuidados redobrados na escolha de um solvente em que se garanta que os nanocristais sintetizados correspondam à fase termodinamicamente estável.

Para além de contornarem o problema da estabilidade do cocrystal em solução, devido à facilidade de *scale up* revelada pelos métodos "top-down", estes serão de extrema importância para o desenvolvimento dos trabalhos, com especial relevo para a moagem assistida por líquido, método de eleição na obtenção de

cocristais, e que poderá ser uma via de extremo interesse na obtenção de nanococristais, com a cocrystalização a decorrer durante o processo de diminuição do tamanho de partículas (*in situ*).³³

Acresce ainda o facto de esta ser a única técnica que possibilita a obtenção de nanococristais em pó, uma vez que as restantes levam, necessariamente, à obtenção de nanossuspensões.

1.7 Cocristais – modelo a investigar neste projeto

O primeiro passo para o desenvolvimento deste projeto consiste na escolha dos modelos de cocristais a utilizar. Recorrendo ao CCDC, é possível identificar milhares de estruturas deste tipo, com uma grande diversidade de APIs e coformadores envolvidos.¹¹⁷ A escolha destes modelos teria de ter como bases fundamentais a acessibilidade aos APIs em causa e ainda a possibilidade da utilização do mesmo coformador para a obtenção dos cocristais, de forma a reduzir ao máximo o número de variáveis a ter em conta.

Definidas as premissas, decidiu-se pela utilização de dois cocristais como ponto de partida: (*RS*)-ibuprofeno – nicotinamida e (*S*)-naproxeno – nicotinamida, com estequiometrias (1:1) e (2:1), respetivamente, devido à vasta experiência deste grupo de investigação relativamente à sua síntese e caracterização.

Com estes cocristais como ponto de partida, foi possível manter a nicotinamida como coformador, e utilizar como APIs dois anti-inflamatórios não esteroides, NSAID estruturalmente relacionados, o naproxeno e o ibuprofeno.

1.7.1 (*S*)-Naproxeno, (*RS*)-Ibuprofeno e Nicotinamida

O naproxeno ((*S*)-(+)-2-(6-metóxi-2-naftil) ácido propanóico), e o ibuprofeno ((*RS*) 2-(4-(2-metilpropil) fenil) ácido propanóico), Figura 15, são fármacos da família dos NSAIDs, apresentando, como tal, efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, antipiréticos, e ainda propriedades anticoagulantes.^{118,119}

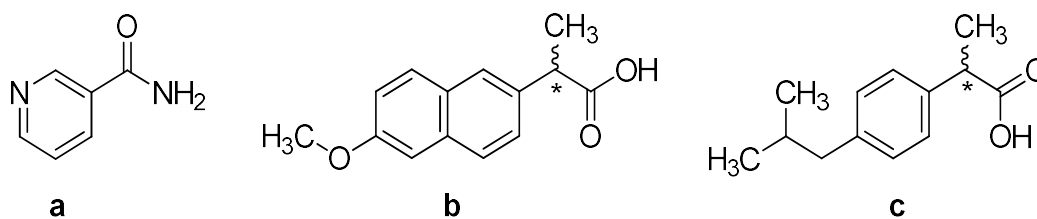


Figura 15. (a) Nicotinamida; API com centro quiral identificado (*): (b) Naproxeno, (c) Ibuprofeno.

Da mesma forma que os outros NSAID, estes fármacos têm como função a inibição das enzimas prostaglandina endoperóxido sintetase, também conhecidas por COX, responsáveis pela produção de prostanoídes, entre os quais prostaglandinas, que posteriormente atuam como indutoras do processo inflamatório, bem como no reconhecimento da dor e no processo de desregulação da temperatura no hipotálamo.¹²⁰

Em ambos os casos, verifica-se a presença de um centro quiral, com conseqüente existência de dois enantiómeros. No caso do naproxeno, apenas o enantiómero *S* é comercializado, uma vez que o enantiómero *R* apresenta elevada toxicidade.¹²¹ Já para o ibuprofeno, o enantiómero *S* é também o composto ativo,

atuando como inibidor da COX, enquanto que o enantiómero *R* está envolvido nas vias de metabolismo lipídico, apresentando, portanto, características farmacológicas e perfis metabólicos diferentes, que dariam origem a compostos ativos diferentes.¹²² No entanto, devido à atuação de ligases (acil-CoA sintetase) e de isomerases (2-arylpropionil-CoA epimerase), o enantiómero *R* passa por uma inversão quiral, ocorrendo uma transformação de 50 a 60% deste em (*S*)-ibuprofeno (Figura 16).^{123,124}

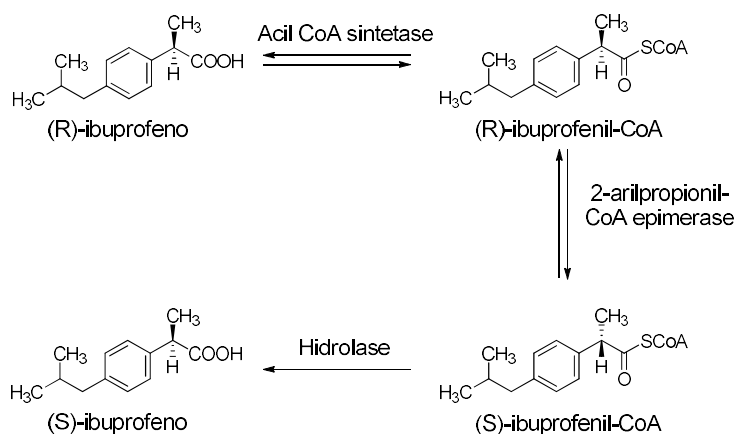


Figura 16. Mecanismo de inversão quiral do (*R*)-ibuprofeno.¹²³

Com a verificação da reversão quiral do (*R*)-ibuprofeno no sistema metabólico humano e devido ao elevado custo envolvido na separação dos enantiómeros, o ibuprofeno tem sido comercializado na forma de mistura racêmica, nos últimos 30 anos.¹²¹ O fármaco está disponível sob a forma de comprimidos, pó, granulado e suspensão para administração oral, e ainda em supositórios para administração retal, com dosagens entre os 200 e os 600 mg.¹²⁵

Quanto ao naproxeno, está disponível sob a forma de um ácido ou um sal de sódio, com o segundo a apresentar maior velocidade de absorção. É administrado por via oral ou retal, em pó ou granulado, com dosagens entre os 250 e os 500 mg.¹¹⁸

Uma vez que ambos os APIs estão inseridos na classe II do BCS, ambos são excelentes candidatos à aplicação das técnicas apresentadas, sendo, portanto, um bom ponto de partida para o trabalho de investigação que se seguiu.^{126,127}

A nicotinamida (Figura 15a) é a forma ativa da vitamina B3, precursora do NAD e NADH, com um papel importante em várias reações enzimáticas, incluindo a formação de ATP.¹²⁸ Como obedece às condições estabelecidas inicialmente, foi selecionada como coformador, permitindo assim a definição dos modelos a utilizar durante a realização do trabalho experimental.

1.7.2 Algumas propriedades físico-químicas e estruturais dos APIs e da NIC

Para um bom entendimento dos modelos escolhidos, é essencial conhecer as suas propriedades físico-químicas, termodinâmicas e estruturais, bem como as propriedades dos seus compostos de partida.

Existe apenas uma estrutura conhecida para o (*S*)-naproxeno, com 6 entradas referentes a esta no CCDC (código: COYRUD).¹²⁹ Mais tarde, Jung-Soon Song e Young-Taek Sohn reportaram a descoberta de outras três formas deste API, obtidas sob condições de cristalização extremas.¹²⁷

Quanto ao (*RS*)-ibuprofeno, encontram-se diversas entradas no CCDC referentes à estrutura cristalina deste API. No entanto, a grande maioria refere-se ao mesmo cristal, com diferentes morfologias cristalinas (hábito, tamanho, área de superfície). Existem, então, apenas duas estruturas distintas descritas para este racemato, atribuíveis aos dois polimorfos conhecidos (Códigos CCDC: Fase I- IBPRAC; Fase II, metaestável-IBPRAC04).¹³⁰⁻¹³²

Uma vez que ambos os APIs possuem polimorfos obtidos em condições extremamente difíceis de reproduzir, tomamos como referência as propriedades dos polimorfos mais estáveis. Assim, na Tabela 3 apresentam-se os valores aproximados da temperatura e entalpia de fusão para cada um.

Tabela 3. Temperatura e entalpia de fusão dos compostos ativos, do coformador e dos respectivos cocrystalis, utilizados neste trabalho.

	$T_{fus} / ^\circ C$	$\Delta_{fus}H / kJ mol^{-1}$	Referências
(S)NPX	155,5	33,3	133
(RS)IBU	75,5	25,7	133,134
NIC I	126-128	25,4	
NIC II	112-117	19,7	
NIC III	107-111	19,3	135
NIC IV	101-103	12,7	
(S)NPX-NIC	125,6 ± 0,4	75,0 ± 1	33
(RS)IBU-NIC	89,9 ± 0,4	45,4 ± 0,8	136

Como foi visto anteriormente, estes APIs estão inseridos na classe II do BCS, com uma solubilidade aquosa muito baixa, no entanto, são solúveis em solventes orgânicos, o que pode ter importância para o estudo das estruturas pretendidas. Na Tabela 4 apresenta-se a solubilidade destes compostos em vários solventes, bastante comuns em estudos que envolvem cristalização.

Tabela 4. Solubilidade dos APIs e da nicotinamida em diferentes solventes, a 25 °C, unidades de solubilidade: mg ml⁻¹.

	(S)NPX	Referências	(RS)IBU	Referências	NIC	Referências
Água	1,590E-2	137	2,100E-2	137	500,0	138
Etanol	59,19	139	600,1	140	95,40	138
Acetona	180,4	139	682,7	140	32,36	141
Acetato de etilo	86,70	142	1063	142	14,17	141

No caso da nicotinamida, estão identificadas quatro formas polimórficas, a Forma I, correspondente à forma termodinamicamente estável, e as Formas II, III IV, obtidas através de processos de aquecimento e arrefecimento do fundido.¹³⁵ Destas, apenas a Forma I e II têm a sua estrutura cristalina resolvida (Códigos: NICOAM e NICOAM04, respetivamente).¹⁴³

Nas Tabelas 3 e 4 são também apresentadas as propriedades termodinâmicas do processo de fusão e as solubilidades deste coformador em diferentes solventes.

Apresentadas as características essenciais dos compostos de partida, estamos em condições de discutir as propriedades termodinâmicas e estruturais dos modelos de cocrystal, uma vez que o conhecimento destas é indispensável ao entendimento dos resultados obtidos.

Apresenta-se também na Tabela 3, as propriedades termodinâmicas dos processos de fusão dos mesmos, que são de extrema importância uma vez que permitem perceber se o cocrystal se formou e manteve intacto ao longo dos trabalhos. Ambos os cocrystal foram obtidos no grupo de investigação, por moagem assistida por etanol.

Apesar de não existirem valores das solubilidades dos cocrystal em água, estudos indicam que, tal como previsto pela teoria que rodeia a utilização deste tipo de materiais, a solubilidade e velocidade de dissolução do API sofreram melhorias significativas, o que implica que a biodisponibilidade oral deste também aumentou de acordo com o pretendido.^{144,145}

A nível estrutural, estudos mais aprofundados foram desenvolvidos, de forma a perceber a formação destas estruturas cristalinas. Começando pelo cocrystal de naproxeno, existe apenas uma estrutura resolvida, identificada no CCDC com o código HEGGAD. Esta estrutura foi inicialmente determinada por Shingeru Ando e colaboradores,¹⁴⁶ num estudo baseado na investigação anteriormente realizada por Ricardo Castro e colaboradores,³³ e complementada por Clémence Neurohr e colaboradores,¹⁴⁷ que utilizaram métodos de evaporação e recristalização tradicionais e com adição de CO₂ como antissolvente, utilizando ATR-FTIR, XRPD e SCXRPD para caracterização da estrutura cristalina. Os parâmetros cristalográficos desta estrutura encontram-se, em anexo, na Tabela A1 (Anexo I).

A unidade assimétrica constituinte deste cocrystal é composta por duas moléculas de (*S*)-naproxeno e uma de nicotinamida. A estrutura apresenta quatro ligações de hidrogénio, divididas em dois sintões, ambos heterossintões. Na Figura 17 está representado o diagrama de empacotamento deste cocrystal, juntamente com os heterossintões referidos, bem como as ligações de hidrogénio que os formam. Um dos heterossintões é constituído por duas interações, por ponte de hidrogénio, entre o ácido carboxílico do naproxeno e o grupo amida da nicotinamida ($O3-H11\cdots O7$; $N2-H33\cdots O2$), dando origem a um dímero cíclico, e ainda uma terceira ponte de hidrogénio que se forma entre o azoto do grupo amida da nicotinamida e o oxigénio do ácido carboxílico de outra molécula de naproxeno ($N2-H34\cdots O5A/O5B$), que pode variar na sua posição ($O5A$, $O5B$).

O outro heterossintão é constituído por interações do mesmo tipo entra o azoto aromático e o ácido carboxílico do naproxeno ($O6-H25\cdots N1$). Os padrões geométricos das ligações de hidrogénio encontram-se em anexo na Tabela A2 (Anexo I).^{33,147}

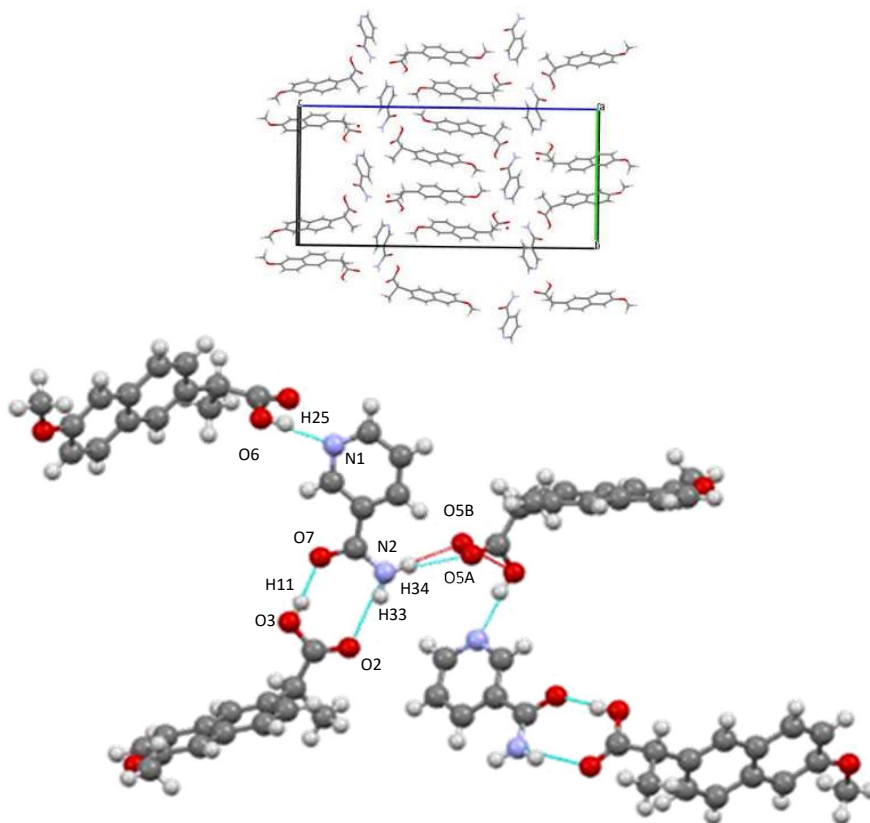


Figura 17. Diagrama de empacotamento e ligações de hidrogénio no cocrystal de (*S*)-naproxeno-nicotinamida.^{146,147}

Em 2008, David Berry e colaboradores¹⁴⁸ publicaram aquela que seria a primeira estrutura resolvida para o cocrystal (*RS*)-ibuprofeno-nicotinamida (código CCDC: SODDIZ), num trabalho em que os cocristais foram obtidos por um método de contacto, no qual um dos compostos, de maior ponto de fusão, é aquecido e arrefecido, permitindo a sua recristalização. Posteriormente, o segundo composto, de ponto de fusão mais baixo, é aquecido até à fusão, entrando em contacto com o primeiro quando no estado líquido, de forma a originar uma zona de mistura entre os dois, após recristalização. Para além deste método foram ainda

utilizados métodos de cristalização em solução sem semente, e métodos de evaporação lenta com semente, recorrendo a vários solventes. Noutro estudo, Solhe Alshahateet²⁸ resolveu de novo a estrutura cristalina do cocrystal, obtido por moagem manual durante 15 minutos e por métodos de evaporação lenta, com análise do produto obtido por espectroscopia de IV, XRPD e SCXRPD. Os parâmetros cristalográficos desta estrutura encontram-se, em anexo, na Tabela A1 (Anexo I).

Com base nestes estudos, podemos então observar que, neste caso, a unidade assimétrica é constituída por quatro moléculas, duas de (*RS*)-ibuprofeno e duas de nicotinamida, que dão origem a três sintões distintos, um homo e dois heterossintões, representados na Figura 18, juntamente com o diagrama de empacotamento do cocrystal.

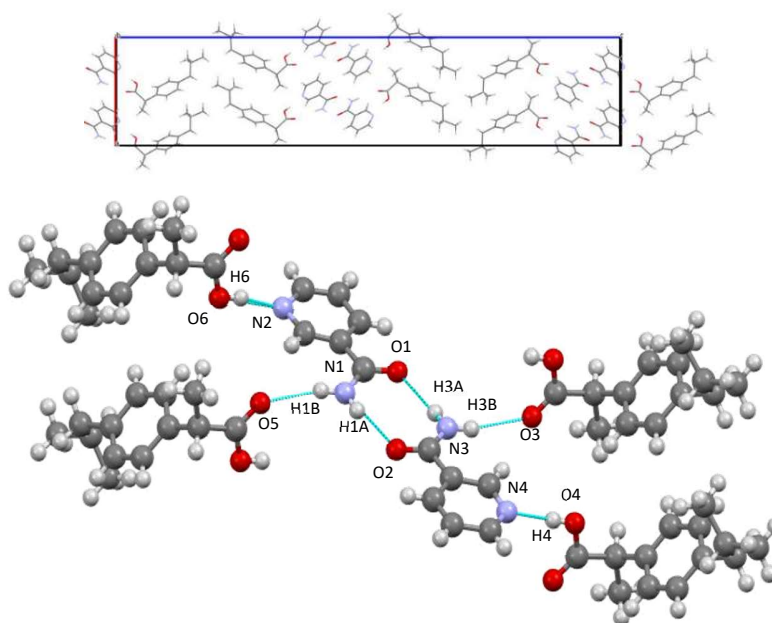


Figura 18. Diagrama de empacotamento e ligações de hidrogénio no cocrystal de (*RS*)-ibuprofeno e nicotinamida.^{28,148}

O homossintão é formado por ligações de hidrogénio entre os grupos amida das moléculas de nicotinamida, dando origem a um dímero cíclico ($N3-H3A \cdots O1$; $N1-H1A \cdots O2$), enquanto que os heterossintões são formados pela ligação de hidrogénio entre o azoto aromático da nicotinamida e o ácido carboxílico do (*RS*)-ibuprofeno ($O6-H6 \cdots N2$; $O4-H4 \cdots N4$) e pela ligação de hidrogénio entre o grupo amida da nicotinamida e o ácido carboxílico do (*RS*)-ibuprofeno ($N1-H1B \cdots O5$; $N3-H3B \cdots O3$), com um dos H do grupo amida a participar na ligação. Os padrões geométricos das ligações de hidrogénio encontram-se em anexo na Tabela A2 (Anexo I).^{28,148}

Xiaowei Sun e colaboradores determinaram também os diagramas ternários para este cocrystal em etanol e numa mistura de etanol/água (fração em massa de água: 0,3), representados na Figura 19.¹⁴⁹

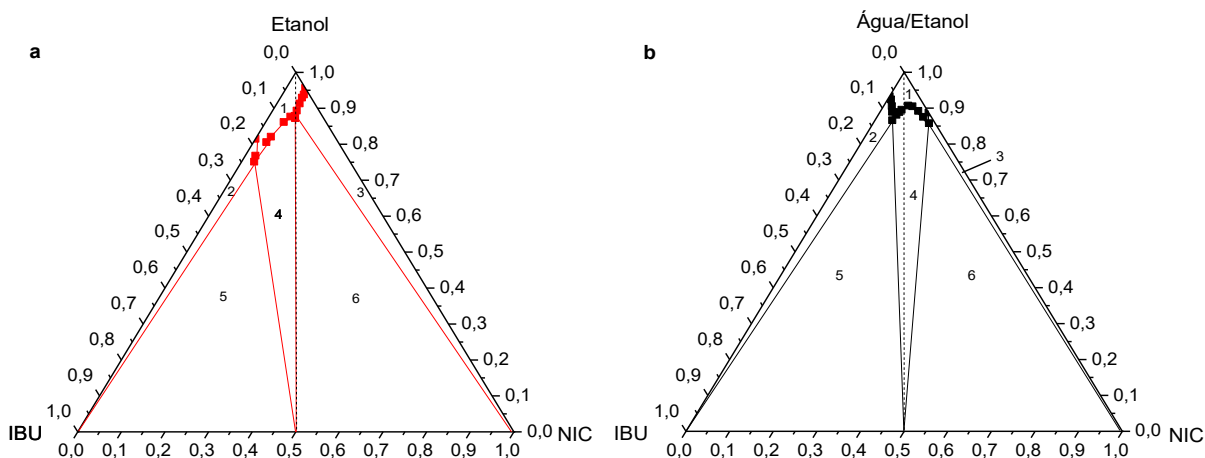


Figura 19. Diagramas ternários do cocrystal (RS)IBU-NIC a 298,15 K em (a) etanol, (b) etanol/água. Os números apresentados representam as várias regiões do diagrama: 1- solução; 2- (RS)IBU+solução; 3- NIC+solução; 4- (RS)IBU-NIC+solução; 5- (RS)IBU-NIC+(RS)IBU+soção.

1.7.3. Novos cocristais: complemento de bases de dados

Durante a pesquisa de modelos de cocristais, várias famílias de compostos foram analisadas, uma vez que a investigação neste ramo exige uma pesquisa exaustiva de forma a identificar os modelos que mais se adequam ao projeto. Com foco nas famílias de cocristais de naproxeno e ibuprofeno com isômeros de piridina-carboxamida, observaram-se algumas lacunas no que toca ao conhecimento de estruturas cristalinas destes compostos.

Na procura de desenvolver este tema, de forma a explorar ao máximo as suas potencialidades, a pesquisa de coformadores para utilização nos modelos de cocristais mereceu especial cuidado. Inicialmente, a atenção prendeu-se na pirazinamida, Figura 20, uma vez que esta é um fármaco antituberculostático, pelo que seria possível obter estruturas cristalinas constituídas por sólidos com propriedades farmacêuticas complementares, desconhecidas de momento.¹⁵⁰

No entanto, Ricardo Castro e colaboradores demonstraram não existir afinidade para a formação de uma rede cristalina entre o (*S*)-naproxeno e este coformador, obtendo uma mistura física com ponto de fusão único e mais baixo do que os pontos de fusão dos sólidos de partida (mistura eutética).³³ Estes estudos revelaram ainda novos cocristais de (*S*)-naproxeno com os isômeros de piridina-carboxamida, apresentados na Figura 20.

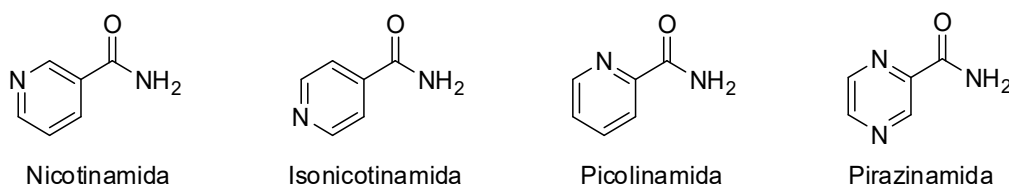


Figura 20. Estruturas das piridina-carboxamidas isoméricas e da pirazinamida.

A isonicotinamida é um precursor da isoniazida, um antituberculostático de primeira linha, enquanto que a picolinamida atua como inibidor da poli(ADP-ribose) sintetase, envolvida em processos como a reparação do ADN.^{151,152}

Também no caso do (*RS*)-naproxeno há grandes lacunas no que toca ao conhecimento da formação de cocrystalis com estes coformadores e, uma vez que este composto está relacionado com um dos APIs em estudo, a sua utilização para a síntese de cocrystalis que sirvam como modelo poderá, também, ser interessante.

Dos isómeros discutidos anteriormente, apenas a nicotinamida apresenta um cocrystalis com o (*RS*)-naproxeno ((*RS*)NPX-NIC (2:1)), com estrutura resolvida (código CCDC: JULJEH, Figura 21), ficando em falta a isonicotinamida e a picolinamida para completar este ramo da família de cocrystalis.¹⁴⁷

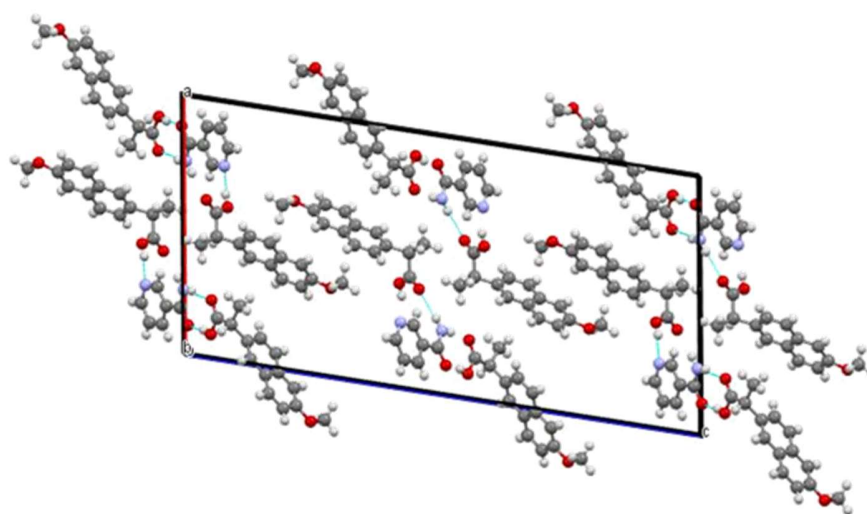


Figura 21. Diagrama de empacotamento do cocrystalis (*RS*)NPX-NIC.¹⁴⁷

Tal como nos casos previamente discutidos, a investigação envolve cuidados redobrados com questões de polimorfismo associadas aos compostos de partida, bem como um conhecimento aprofundado das propriedades termodinâmicas e estruturais dos mesmos.

O (*RS*)-naproxeno apenas tem uma forma conhecida, com uma entrada no CCDC (PAPTUX), que funde aproximadamente a 155,4 °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 33,2 \text{ kJ mol}^{-1}$.^{153,154} Já a isonicotinamida apresenta 6 formas polimórficas, sendo a forma II (EHOWIH02) aquela que é termodinamicamente estável à temperatura ambiente; $T_{\text{fusão}} = 156,0 \text{ °C}$.^{139,155–157}

Para a picolinamida, existem dois polimorfos descritos, ambos com estruturas resolvidas, em que, a forma II, que funde a 102,0 °C, é também a forma termodinamicamente mais estável à temperatura ambiente.^{158,159}

Dada a necessidade de ter à disposição um leque alargado de modelos, define-se como objetivo secundário a obtenção e caracterização do cocrystalis do racemato de naproxeno com os respetivos isómeros de piridina-carboxamida.

Capítulo 2

Materiais e

Métodos

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Durante o desenvolvimento do projeto foram utilizados compostos adquiridos com o maior grau de pureza que nos foi possível, de acordo com a exigência associada a este tipo de investigação. Na Tabela 5 estes encontram-se discriminados, com a informação do fornecedor, propriedades relevantes e forma polimórfica, identificada por XRPD.

Tabela 5. Compostos utilizados e informação pertinente relativa aos mesmos.

Composto	Forma polimórfica	Fornecedor	M / g mol ⁻¹	T _{fus} / °C	Pureza %
(S) NPX	I	Fluka	230,27	152-154	98
(RS) NPX	-	Fluka	230,26	154-159	98
(RS) IBU	I	Sigma-Aldrich	206,3	77-78	98
NIC	I	Sigma-Aldrich	122,12	128-131	≥99,5
INA	II	Sigma-Aldrich	122,12	155-157	99
PA	II	Sigma-Aldrich	112,12	110	98
Span 85	-	Sigma-Aldrich	957,52	-	-
Tween 85	-	Sigma-Aldrich	~1839	-	-
PEG 6000	-	Sigma-Aldrich	5000-7000	60-63	-
PVP K 30	-	Sigma-Aldrich	~40000	-	-

A realização dos ensaios de LAG envolveram a utilização de soluções de Span 85 e Tween 85, preparadas com recurso a etanol (99,8 %), do laboratório Fluka. As suspensões realizadas ao longo da investigação foram obtidas através da utilização de água ultrapura, obtida num sistema Millipore Milli-Q Plus.

A solução utilizada para a obtenção de cocrystal de (RS)IBU-NIC por cristalização tinha na sua constituição 30 % (fração em massa) de água Milli-Q e 70 % do mesmo etanol utilizado para os ensaios de LAG.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação de cristais e cocrystal nanométricos: Mecanoquímica

Genericamente, o termo mecanoquímica é atribuído à ocorrência de reações químicas ou supramoleculares mecanicamente induzidas.¹⁶⁰ A criação de fraturas e deformações em sólidos, com consequente diminuição do tamanho de partículas, aumenta a capacidade de participação nos processos referidos, devido à ativação mecânica.^{161,162}

Dentro deste ramo científico, existem três áreas que promovem indução de forças mecânicas: moagem ou homogeneização mecânica, sonoquímica e manipulação individual de moléculas.¹⁶³ Ao serem cruzadas com as vias “top-down” apresentadas, sobressaem as duas primeiras, utilizadas neste trabalho com diferentes abordagens.

a) Moagem – LAG, moagem assistida por polímeros e moagem em suspensão

Os processos de moagem são os mais associados à mecanoquímica, e têm sido métodos de eleição na síntese de cocrystal.^{163,164} Consistem na aplicação manual, ou com recurso a um moinho, de ações mecânicas, entre as quais forças de cisalhamento, compressão e fricção. A aplicação desta variedade de ações, atribui a estes processos a peculiaridade de permitir a criação de nanococrystal *in situ*, uma vez que forças de cisalhamento são maioritariamente atribuídas à diminuição do tamanho de partículas, enquanto que forças de compressão estão associadas à formação de estruturas supramoleculares.¹⁶⁴

Recentemente, surgiu um método de moagem que difere do procedimento tradicional pela adição de quantidades catalíticas de solvente, denominada moagem assistida por líquido (LAG do inglês) ou pela adição de polímeros com a mesma função. Inicialmente esta metodologia foi desenvolvida com o objetivo de melhorar o rendimento e tempo de reação na obtenção de cocrystal. Posteriormente, verificou-se que esta técnica não só proporciona um melhoramento da cristalinidade dos compostos obtidos, como também pode ser utilizada para obtenção de nanocristais, o que corrobora a teoria da formação de nanococrystal *in situ*.^{165,166}

Outra abordagem à utilização da moagem é a produção de nanossuspensões, em que são aplicadas forças de cisalhamento para desintegração das micro em nanopartículas, da mesma forma que acontece na moagem assistida por líquido. A grande diferença reside na quantidade de solvente utilizada, que faz com que este deixe de ter função catalítica e passe a atuar como meio de dispersão. Sendo assim, esta técnica deixa de permitir a produção *in situ*, e passa a ser uma técnica “top-down” pura.⁶⁷

a1) LAG e moagem assistida por polímeros: procedimento experimental

Nas experiências que envolvem a aplicação de LAG, utilizou-se um moinho Retsch MM400 com vasos de aço de 10 ml, onde se colocaram 2 esferas de aço de 7mm de diâmetro, ou de óxido de zircónio de 10 ml, com 18 esferas de 5mm de diâmetro também deste material. Estas atividades experimentais realizaram-se com frequências que variam entre os 15 e os 30 Hz e tempos de reação entre os 30 e os 90 min, de acordo com o pretendido.

As nanopartículas foram obtidas por adição de massas entre os 50 e os 70 mg de composto e entre 10 e 20 µl de uma solução de etanol, com percentagens variadas de estabilizador, sendo que para a moagem assistida por polímeros, o estabilizador foi aplicado em seco. No caso dos cocrystal, adicionaram-se quantidades estequiométricas dos sólidos de partida, de forma a obter o cocrystal *in situ* com a estequiometria correta, perfazendo os 70 mg de massa total no interior dos vasos.

a2) Moagem em suspensão: procedimento experimental:

As nanossuspensões foram produzidas com recurso ao mesmo moinho, apenas com os vasos de óxido de zircónio de 10 ml, onde se inseriram as 18 esferas de 5mm. Neste caso, apenas foram utilizadas frequências de 30 Hz, com tempos de reação que vão até aos 60 min.

A dispersão de nanopartículas foi obtida por adição de 70 mg do cocrystal, previamente preparado por LAG, num meio de dispersão, de modo a perfazer um terço do volume do vaso (3,3 ml). Foram ainda adicionadas quantidades de estabilizador ao sistema numa tentativa de impedir os fenómenos que promovem o crescimento das partículas em suspensão.

b) Homogeneização por agitação

Apesar de menos comuns do que a moagem, existem outro tipo de métodos aplicados na diminuição do tamanho de partículas por ativação mecânica. Estes são processos de homogeneização baseados na agitação de uma dispersão, em que podem ser utilizados magnetes, ou um braço com um impulsor na ponta, ligado a um motor.¹⁶⁷

Existem alguns problemas associados com a utilização da agitação magnética, sobretudo em grande escala, uma vez que se podem encontrar dificuldades para iniciar a rotação do magnete e longos períodos de agitação com rotação elevada podem danificar o balão que contém a dispersão. Deste modo, a agitação com o braço mecânico ganha preponderância.¹⁶⁸

Esta técnica tem como potencialidade a criação de dois tipos de fluxo, axial e radial. O fluxo axial (Figura 22-1) tem como características uma grande eficácia na transferência de massa e efeitos de mistura mais pronunciados, o que favorece a nucleação e será útil em processos “bottom-up”, enquanto que o fluxo radial (Figura 22-2) produz locais de circulação múltiplos, propícios ao choque entre partículas.¹⁶⁹ Desta forma, para processos “top-down”, a escolha dos impulsores vai de encontro à obtenção de fluxos radiais capazes de produzir força suficiente para quebrar as partículas e reduzir o seu tamanho.¹⁷⁰

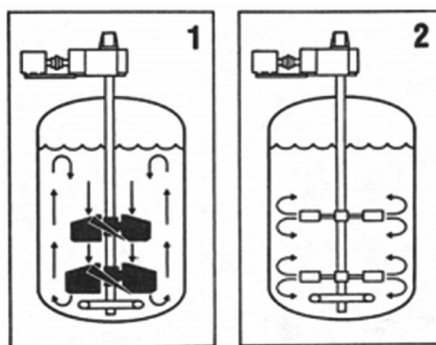


Figura 22. Impulsores com fluxo: 1-axial; 2-radial.¹⁷¹

Procedimento experimental:

O objetivo do conjunto de estudos com esta técnica seria perceber a eficácia da mesma, bem como a sua otimização tanto a nível da constituição do meio de dispersão, como na quantidade, no tipo de estabilizador e no tempo de aplicação. Para isso utilizou-se um agitador mecânico RZR da Heidolph, com um impulsor TR 20 de fluxo radial, da mesma marca e agitação de 1020 rpm.

Foram dispersos entre 50 e 70 mg de (RS)IBU em água Milli-Q suficiente para cobrir o impulsor, num copo, posteriormente posicionado no agitador de forma a impedir que o aparelho danificasse o vidro ao tocá-lo durante a agitação. Foram ainda adicionadas quantidades variadas de estabilizador, numa tentativa de otimização do processo.

c) Sonoquímica – aplicação de ultrassons

Recentemente, a sonoquímica surgiu como alternativa às metodologias tradicionalmente associadas à mecanoquímica. A grande diferença desta para as restantes já descritas, reside na aplicação do efeito mecânico, que deixa de ser palpável e passa a ser efetuado a partir de ondas sonoras, através do processo de cavitação acústica, representado na Figura 23.¹⁷²

Ao submeter um líquido a ondas sonoras, a sua propagação cria ciclos de compressão e rarefação, que leva ao aparecimento de pequenas bolhas, provocadas pela baixa pressão induzida no líquido durante o ciclo de rarefação. Durante os ciclos de compressão, ocorre o processo de cavitação, em que as bolhas colapsam instantaneamente, provocando um grande aumento de pressão e temperatura.¹⁷³

Este processo de cavitação acústica tem dois efeitos associados, produção de radicais por sonólise e ação mecânica. Esta ação é provocada por ondas de choque e microjatos formados pelo colapso das bolhas, que dão origem a grandes forças de cisalhamento. Desta forma, o interesse da aplicação de ultrassons tem crescido exponencialmente para obtenção de nanocristais.¹⁷²



Figura 23. Representação do fenómeno de cavitação acústica.¹⁷⁴

Procedimento experimental:

Tal como no caso da homogeneização por agitação, pretende-se testar a técnica e todos os parâmetros envolvidos. Para tal, utilizou-se um banho de ultrassons Sonorex Digitec, 35 kHz.

Um copo selado foi inserido no interior do banho, onde se adicionou previamente 50 mg de sólido, dispersos em volumes de dispersante que variam entre os 2,5 e os 5 ml, diversificando as quantidades do estabilizador adicionado. A frequência manteve-se constante por exigência do aparelho, e a temperatura foi controlada de forma a manter-se entre os 20 e os 30 °C, através da adição de gelo ao banho.

d) Técnicas acopladas: homogeneização por agitação e sonoquímica

A combinação de métodos de obtenção de nanopartículas tem também ganho alguma relevância na investigação nanotecnológica, quer através da combinação de métodos “top-down” e “bottom-up”, quer através da combinação de métodos da mesma família.¹⁷⁵

Neste caso, propomos o acoplamento da agitação anteriormente descrita, com a exposição da dispersão a ondas sonoras, que permite tirar partido não só do fluxo radial proporcionado pelo braço mecânico, como também do efeito da cavitação provocado pelas ondas sonoras do meio líquido utilizado como dispersante.

Procedimento experimental:

O acoplamento das duas técnicas implica o manuseamento de ambos os aparelhos de forma a que haja condições para que trabalhem em simultâneo. Desta forma, num copo de vidro, adicionou-se 70 mg de composto e meio dispersante em quantidade suficiente para que o impulsor fique completamente coberto.

Neste caso, foram utilizadas percentagens de 1% (% V/V) de estabilizadores, sendo que após a adição de todos os componentes, o copo foi selado de forma a evitar perdas de volume, embora com a necessidade de um orifício de maneira a permitir a passagem do braço do agitador. Tal como anteriormente, a temperatura foi controlada com adição de gelo ao banho dos ultrassons e todos os cuidados relativos a ambas as técnicas, foram aplicados.

2.2.2 Espectroscopia de infravermelho

Os sólidos obtidos foram caracterizados por várias técnicas experimentais por forma a confirmar a obtenção da forma sólida pretendida. Para isso recorreu-se em primeiro lugar à espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).

O ATR-FTIR é constituído por uma fonte de radiação IV, um interferómetro, o acessório do ATR onde é colocada a amostra, um detetor, um processador de sinal e um computador para possibilitar a leitura. Neste aparelho, a radiação que sai da fonte, passa pelo interferómetro e incide no acessório de ATR onde amostra é colocada, permitindo retirar informação sobre a mesma. Ao chegar ao detetor, a radiação passa para o processador, onde é convertida num sinal em função do tempo (interferograma), que é depois tratado com a transformada de Fourier para obtenção do sinal em função do número de onda, *i.e.*, os espectros de infravermelho como os conhecemos.

Existem, então, dois passos de extrema importância e que carecem de alguma explicação durante este processo. O primeiro, resume-se à função do interferómetro (Figura 24a), em que a radiação passa por uma lente colimadora, tornando os seus feixes paralelos, e segue para um divisor onde metade dos feixes são transmitidos para um espelho fixo e outra metade é refletida para um espelho móvel. Dos espelhos, a radiação é de novo refletida para o divisor onde é recombinada, criando-se um padrão de interferências construtivas e destrutivas, dirigindo-se o feixe depois para o acessório de ATR.¹⁷⁶

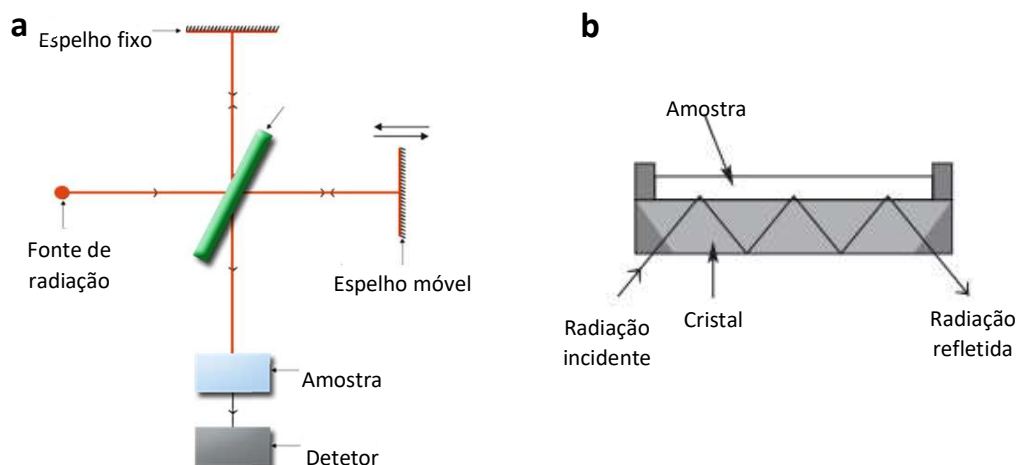


Figura 24. Representação esquemática dos componentes do ATR-FTIR: (a) Interferômetro; (b) ATR.

No acessório de ATR (Figura 24b), a radiação incide num cristal de elevado índice de refração onde a amostra se encontra posicionada, com um ângulo de incidência θ superior ao ângulo crítico, o que provoca reflexões internas. Em cada ponto de reflexão interna, é produzida uma onda de evanescente, que penetra na amostra e promove a absorção de radiação, alterando o interferograma que chega ao detetor.¹⁷⁷

Desta forma, esta técnica espectroscópica permite a identificação de modos vibracionais de moléculas, com base na absorção de radiação com energia igual à da diferença de energia entre níveis vibracionais de um modo de vibração, que tem necessariamente de se traduzir numa variação de momento dipolar. Para isso, é utilizada radiação na zona do IV, com comprimentos de onda entre os 14000 e os 40 cm^{-1} , sendo que o intervalo entre os 4000 e os 400 cm^{-1} (infravermelho médio) corresponde à região mais utilizada.¹⁷⁶

Esta técnica é especialmente útil na deteção da formação de pontes de hidrogénio, de desvios das elongações de grupos carbonilo e elongações simétricas e assimétricas de grupos amina e amida, observados nos espectros de absorvância / % transmitância em função do comprimento de onda obtidos através de todo o processo descrito.

Procedimento experimental:

As análises ATR-FTIR realizaram-se com recurso a um espectrómetro Thermo Nicolet IR300, com um acessório ATR com cristal de diamante, 32 acumulações e resolução de 2 cm^{-1} .

A amostra foi colocada sobre o cristal, em quantidades reduzidas, mas de forma a preencher a janela do ATR, permitindo a obtenção de espectros de boa qualidade.

2.2.3 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica de análise térmica de extrema importância para as ciências farmacêuticas, nomeadamente no estudo de APIs e compostos derivados destes, uma vez que permite a caracterização de fenómenos físico e /ou químicos através do registo de variações de entalpia ou da capacidade calorífica de uma amostra. Desta forma, as suas principais aplicações incluem a deteção de polimorfismo, identificação de transições vítreas, medição de cinética de reação e/ou de decomposição e determinações de pureza.¹⁷⁸

Dependendo do modo de ação, existem dois tipos de DSC: fluxo de calor e potência compensada. Neste caso, as análises foram realizadas com recurso a um DSC de potência compensada, em que a amostra e uma referência são colocadas em dois fornos diferentes, termicamente isoladas, com temperatura controlada por termómetros de resistência de platina. Devido a fenómenos de absorção/emissão de energia que ocorrem na amostra durante os processos de aquecimento e arrefecimento, regista-se uma diferença de energia fornecida a ambos os fornos, dQ/dT (fluxo de calor), necessária para manter os fornos à mesma temperatura, que é representada em função da temperatura.

Por convenção, define-se que os picos endotérmicos correspondentes a absorção de energia originam um sinal positivo, enquanto que emissão de energia corresponderá a um fenómeno exotérmico com sinal negativo.¹⁷⁹

No caso específico da formação de cocristais com fusão congruente, como os estudados neste projeto, deve observar-se apenas um sinal endotérmico referente à fusão do cocrystal, tendo em conta que um pico único poderá também corresponder à mistura eutética dos sólidos de partida.¹⁸⁰ Outro fator a ter em conta neste estudo é a possibilidade de desvios na temperatura de fusão para valores mais baixos, indicador da presença de partículas na escala nanométrica com valores extremamente baixos de diâmetro.¹⁸¹

Procedimento experimental:

Os termogramas foram obtidos com recurso a dois calorímetros de potência compensada, um PerkinElmer DSC-7 com refrigeração ajustada para -10 °C, e um PerkinElmer Pyris 1, com refrigeração ajustada para -20 °C, ambos com *intracooler* com circulação de uma mistura de etilenoglicol:água 1:1 (V/V).

Foi utilizado azoto como gás inerte de purga, com fluxo de 20 ml/min na análise de todas as amostras, preparadas com recurso a cápsulas hermeticamente fechadas de 30 µl ou cápsulas perfuradas de 50 µl. Na cápsula da amostra foram pesados entre 0,5 e 2 mg do sólido em análise, enquanto que cápsulas vazias, obrigatoriamente iguais à da amostra, foram utilizadas como referência.

A calibração da temperatura foi realizada com recurso a materiais de referência certificados, nomeadamente bifenilo ($T_{fus}=68,93$) e cafeína ($T_{fus}=235,9$), e a calibração de entalpia utilizando índio $\Delta_{fus}H = (3286 \pm 13) \text{ J g}^{-1}$.^{182,183}

2.2.4 Difração de raios-X

A difração de raio X é uma técnica extremamente útil no estudo de estruturas cristalinas e distâncias internucleares, que permite a análise de um grupo bastante alargado de amostras, com aplicações que vão desde a indústria farmacêutica até à microeletrónica, aeroespacial, entre outras.

Esta apresenta-se como sendo extremamente vantajosa uma vez que consiste num método rápido, de fácil análise e que necessita de pequenas quantidades de amostra, recuperáveis no final do procedimento experimental, possibilitando, entre outros, a identificação de estruturas cristalinas de forma inequívoca, bem como a deteção da existência de defeitos na rede cristalina e a avaliação do grau de cristalinidade.

A aplicação de raios-X neste âmbito, baseia-se na produção de interferências construtivas através da interação entre a radiação incidente e a amostra, sendo que a sua utilização envolve alguns cuidados, nomeadamente com a sobreposição de sinais e os limites de deteção.¹⁸⁴

A interação descrita foi retratada pela primeira vez em 1913 por William Henry Bragg e William Laurence Bragg, num estudo que comprovou a relação entre o comprimento de onda e a distância entre planos constituídos por átomos de uma rede cristalina, por observação de fenómenos de reflexão, em que os planos atómicos paralelos funcionam como espelho.¹⁸⁵

Ao fazer incidir feixes monocromáticos colimados de radiação raios-X numa superfície cristalina, estes podem ser refletidos por um plano atómico superficial, ou sofrer difração e penetrar na rede cristalina, sendo dispersos ao colidir com planos adjacentes. Este processo de difração dá origem a interferências construtivas, que ao serem detetadas dão origem a padrões de difração, específicos para cada amostra.

De forma a ocorrer as referidas interações, é necessário que os feixes estejam em fase, condição que está dependente do ângulo crítico de incidência, característico para determinada distância interplanar.

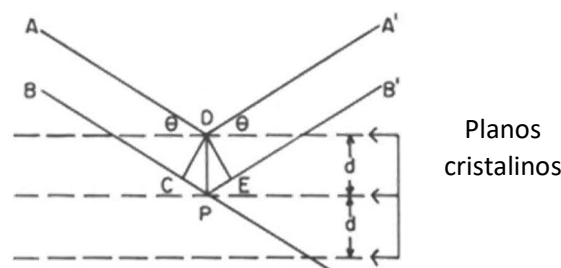


Figura 25. Representação esquemática do fenómeno de difração de Raios-X.

Na Figura 25 encontra-se esquematicamente representado o processo de difração descrito. Observa-se que o feixe BPB' irá percorrer um caminho superior ao do feixe ADA', com a diferença a corresponder à soma dos valores das distâncias CP e EP. Recorrendo a leis trigonométricas e sabendo que é necessário que os feixes estejam em fase, obtém-se a equação da lei de Bragg (8), em que se deduz que a soma destas distâncias terá de ser igual a um múltiplo do comprimento de onda da radiação incidente, de forma a que se verifica a interação desejada:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (8)$$

Assim, conhecido o comprimento de onda da radiação, λ , incidente bem como o ângulo θ é possível calcular a distância interplanar, d , para cada ângulo em que é detetado um sinal correspondente a interferência construtiva.^{185,186}

Devido às suas características, a difração de raios-X apresenta duas aplicações distintas, baseadas no mesmo princípio, a difração de raios-X de monocristal e a difração de raios-X de pó.

A difração de raios-X de monocristal permite obter toda a informação relativa a uma estrutura cristalina de qualquer amostra, desde que se obtenha um monocristal de tamanho e qualidade apropriados à sua análise, o que se revela um desafio de extrema dificuldade. Desta forma, surge como alternativa a difração de raios-X de pó, que não necessita de monocristal e permite a obtenção de um padrão de difração de forma mais rápida e fácil.

Enquanto que o monocristal permite retirar informação a três dimensões, o pó apenas permite obter informação referente a uma dimensão, devido à sobreposição de sinais. Assim sendo, enquanto que na primeira se obtém toda a informação estrutural da amostra, na segunda observa-se um gráfico da intensidade do sinal em função do ângulo de incidência, que por convenção é representado sob a forma 2θ .¹⁸⁷

Procedimento experimental:

A difração de raios-X de pó foi realizada na Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos (UCQFarma) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, com recurso ao aparelho MiniFlex 600 (Rigaku, Japão), utilizando radiação K_{α} ($\lambda = 1,541862 \text{ \AA}$) com um filtro K_{β} .

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

A difração de raios-X de monocristal foi realizada com recurso a um aparelho Bruker-Nonius Kappa Apex II CCD, com um monocromador de grafite e radiação K_{α} por decaimento de molibdénio ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). As estruturas foram resolvidas por métodos diretos (SHELXS-97), e refinadas com uma matriz de mínimos quadrados através do mesmo programa. Com exceção dos átomos de hidrogénio, todos foram anisotropicamente refinados.

Os átomos de hidrogénio, passíveis de localização através de um mapa de Fourier, foram refinados por ligação aos restantes átomos, recorrendo aos padrões do programa SHELXL-9741, com fatores térmicos isotrópicos equivalentes aos dos átomos adjacentes.¹⁸⁸

2.2.5 Microscopia eletrónica de varrimento

Um indivíduo comum tem a capacidade de distinguir dois pontos afastados por 0,2 mm de distância, correspondentes ao poder de resolução do olho humano. Resoluções superiores a esta apenas podem ser observadas com recurso a processos de ampliação, que levaram ao aparecimento de técnicas microscópicas. Estas técnicas podem ser divididas em duas categorias, microscopia ótica e microscopia eletrónica, que diferem na fonte.

A microscopia ótica utiliza, como o próprio nome indica, luz visível, enquanto que a microscopia eletrónica se baseia na incidência de feixes de eletrões acelerados, pelo que a segunda terá obrigatoriamente uma resolução superior. Mais uma vez esta divide-se em duas técnicas, microscopia eletrónica de transmissão

e de varrimento (TEM e SEM do inglês), com a segunda a despertar especial interesse para a realização deste trabalho.

O SEM é um microscópio de alta resolução, extremamente versátil, que permite a obtenção de informações qualitativas de natureza diversa, incluindo topografia, morfologia, composição e informação cristalográfica, relativamente à superfície de uma amostra. Apresenta como características de especial relevo a facilidade de obtenção de informação relativa à forma, tamanho e textura de sólidos, essencial no estudo de nanopartículas.¹⁸⁹

O aparelho manuseado na aplicação desta técnica é constituído por um emissor de eletrões, que emite um feixe dos mesmos sob vácuo. Estes são depois acelerados por uma diferença de voltagem entre um cátodo e um ânodo, e passam por um conjunto de lentes magnéticas, também chamadas de condensadores, que têm por objetivo focar o feixe de eletrões, com uma área de incidência dependente do número de lentes e da distância focal. A última lente deste conjunto, também chamada de objetiva, permite direcionar o feixe de eletrões para a área em foco, de forma a obter imagens da mesma.

Ao colidir com a amostra, os eletrões podem interagir com a sua superfície de diferentes formas, todas passíveis de utilização para obtenção de imagem. O processo mais simples é o da retrodispersão, que resulta da reflexão direta de eletrões provenientes do feixe na superfície da amostra, correspondentes aos eletrões mais energéticos que chegam ao detetor.

Um outro fenómeno que ocorre fruto da interação do feixe de eletrões com a amostra é o efeito de Auger, caracterizado pela emissão de um eletrão de um nível de valência mais interno, que por sua vez leva ao decaimento de um eletrão mais exterior. Isto provoca emissão de radiação com comprimento de onda na zona do raio-X, que pode ser absorvida e provocar a emissão de um outro eletrão (eletrão de Auger).

Por último, estão presentes os eletrões secundários, que resultam da emissão direta de eletrões superficiais, por absorção de energia resultante do embate dos eletrões do feixe com a amostra. Estes eletrões são os mais frequentemente utilizados para obtenção de imagens com esta técnica, cuja resolução está dependente da energia do feixe e do material que compõe a amostra.

Independentemente do tipo de eletrão em causa, estes são detetados à medida que o *scan* da amostra ocorre, dando origem a um mapa de intensidades que irá originar a imagem pretendida.¹⁹⁰

Recentemente, surgiu a microscopia eletrónica de varrimento por emissão de campo, que difere do SEM convencional no emissor que é utilizado para criar o feixe de eletrões. Enquanto que o SEM convencional recorre a filamentos de tungsténio, o FESEM tem como emissor um canhão de emissão de campo, que cria um feixe de eletrões mais intenso, o que permite uma área de foco extremamente reduzida mantendo uma quantidade de eletrões primários suficiente de forma a gerar sinais com a qualidade necessária à obtenção de boas imagens.¹⁹¹

Esta característica permite o aumento de resolução comparativamente ao SEM tradicional, pelo que a sua utilização é uma mais valia para a análise de nanopartículas.

Procedimento experimental:

As imagens adquiridas com recurso a SEM foram obtidas através de um microscópio eletrónico de varrimento Tescan Vega3 SBH com corrente de aceleração de feixes de 5 kV e ampliações entre as 1000x e as 50000x, com deteção de eletrões secundários. Os ensaios foram realizados no Trace Analysis and Imaging Laboratory, da Universidade de Coimbra. A amostra foi fixada num suporte de alumínio e revestida com pulverização de paládio-ouro sob atmosfera de argón, de forma a aumentar a condução de eletrões nas amostras orgânicas.

Relativamente ao FESEM, foi utilizado um microscópio eletrónico de varrimento de emissão de campo Zeiss – Gemini II, no Laboratório de Ensaio Desgaste & Materiais do Instituto Pedro Nunes. As imagens foram adquiridas em eletrões secundários com corrente de aceleração de feixe de 2kV e com ampliações semelhantes às utilizadas em SEM.

Tal como no caso anterior, as amostras foram revestidas, desta vez com uma camada monométrica de ouro, por deposição física de vapor (PVD).

2.2.6 Medição do tamanho de partículas

As técnicas microscópicas permitem-nos obter informação qualitativa relativamente a uma dada amostra, no entanto, para caracterização completa de nanopartículas, esta não é suficiente. De forma a colmatar a análise das amostras, são necessárias outras técnicas, que ofereçam informação quantitativa, tendo por base o tamanho das partículas. Surgem então a dispersão dinâmica de luz e a difração com laser, técnicas rotinadas para este efeito.¹⁹²

A dispersão dinâmica de luz é uma técnica não invasiva que se baseia no conceito de movimento Browniano para a medição do tamanho de partículas dispersas em meio líquido. Este movimento corresponde ao percurso aleatório percorrido pelas partículas da amostra na dispersão, provocado pela colisão entre estas e com as moléculas do líquido dispersante.

Tendo em conta este movimento, o tamanho das partículas associa-se à velocidade de difusão das mesmas, com as partículas mais pequenas a descreverem movimentos mais rápidos. Obtida a velocidade, definida por um coeficiente de difusão (D), é possível calcular o diâmetro de uma dada partícula através da equação de Stokes-Einstein (9):

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (9)$$

Onde, k corresponde à constante de Boltzman, T à temperatura absoluta, η à viscosidade e d ao diâmetro de uma partícula esférica com coeficiente de difusão equivalente ao da partícula em causa, o que implica que para uma dada partícula com forma não esférica, o valor obtido vai depender da orientação da mesma aquando a medição da velocidade de difusão.

O princípio de funcionamento desta técnica é extremamente simples, um laser incide sobre a amostra, a qual provoca a dispersão da radiação, que é detetada e traduzida num gráfico de intensidade de radiação dispersa em função do tempo. A variação da intensidade da radiação é provocada por interações construtivas e destrutivas entre as ondas de radiação dispersas, sendo que a velocidade da variação está diretamente dependente da velocidade a que as partículas se movimentam no meio.

Os sinais que originam o gráfico descrito são depois tratados por um correlator, originando uma função de autocorrelação em que se observa a evolução da intensidade da radiação em diferentes tempos. Através desta, obtém-se o coeficiente de difusão, traduzido depois em tamanho da partícula.¹⁹³

Ao contrário do DLS, a difração com laser não depende de movimentos Brownianos das partículas, mas sim das variações do ângulo e intensidade da radiação dispersa. Fazendo incidir um feixe de radiação coerente e monocromática numa amostra, as ondas vão interagir com os limites das partículas, dando origem a ondas difratadas. Tal como anteriormente, estas ondas passam por processos de interação construtiva e destrutiva, que dão origem a um padrão de dispersão.

Ao ocorrer dispersão, os feixes passam por uma lente que foca a radiação num ponto do detetor. Quanto maior for a partícula, menor será o ângulo de dispersão, o que vai diminuir a área iluminada no

detetor, e mais intensa será a radiação. Os sinais detetados são depois tratados por uma transformada de Fourier, de forma a obter uma relação entre os padrões de dispersão e o tamanho das partículas.

Existem duas abordagens distintas para obter esta relação, sendo que em ambas se considera a aproximação da forma das partículas a uma esfera rígida com comportamento semelhante à da partícula em análise. A primeira corresponde à teoria de Fraunhofer, mais simples, em que se estabelece uma relação direta entre os padrões de difração e o tamanho. No entanto, quando numa dispersão o tamanho das partículas é pequeno comparado com o comprimento de onda da radiação incidente, e/ou a razão entre os índices de refração do sólido e do líquido dispersante são muito próximos da unidade, esta teoria perde peso, e passa a utilizar-se a teoria de Mie, que tem estas variáveis em conta.

A aplicação desta técnica tem as vantagens da rapidez e facilidade de aplicação, bem como do grande leque de tamanhos que consegue detetar. No entanto, apresenta as desvantagens do erro associado às medições, uma vez que, se os resultados forem dados em número de partículas em função do tamanho, as populações de diâmetro inferior terão um peso maior, enquanto que se forem dados em volume, as partículas maiores terão obrigatoriamente mais peso. Para além disso há que ter em conta o nível de obscuração, que pode obrigar a diluições que afetem a estabilidade da amostra, de forma a que seja otimizada a interação do laser com as partículas.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

Procedimento experimental:

As medições de DLS foram realizadas na Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, com um analisador de tamanho de partículas Zetasizer -Nano S, marca Malvern, a 25 °C, tendo em conta que este permite detetar tamanhos entre os 0,3 nm a 10 µm.

A difração de laser foi realizada no Laboratório de Ensaio Desgaste & Materiais do Instituto Pedro Nunes, com recurso a um espectrómetro de difração laser da marca Malvern, modelo Mastersizer 3000, que proporciona medições numa gama entre 0,01 e 3500 µm. Este aparelho funciona com base na teoria de Mie, pelo que se procedeu à medição do índice de refração da solução utilizada na dispersão, e considerou-se que o índice de refração do sólido seria igual ao do material no estado *bulk*.

No caso dos nanocristais, foi necessário identificar um meio de suspensão no qual o cocrystal fosse a fase termodinamicamente estável.

Como as medições do tamanho de partículas por DLS depende do movimento Browniano destas no meio de dispersão, a sua aplicação terá de ser feita com a utilização de um meio que não só garanta a estabilidade do cocrystal e o impedimento da agregação das nanopartículas, como também contrarie a tendência para a sua sedimentação. Não conseguindo ultrapassar o segundo problema referido, os resultados estão comprometidos, pelo que, apenas serão apresentados resultados referentes à aplicação de difração com laser.

2.2.7 Técnicas de cristalização em solução: obtenção de monocristais

Monocristais são cristais constituídos por uma rede cristalina contínua, sem defeitos e sem fronteiras, como seria de esperar num policristal. Deste modo, é constituída por uma célula unitária que sofre processos translacionais, dando origem a uma rede cristalina perfeita.¹⁹⁷ Na secção 2.2.4, discutiu-se a sua importância

para a resolução de estruturas cristalinas, pelo que a sua obtenção será extremamente relevante para este trabalho.

Dentro dos métodos de cristalização conhecidos, a cristalização em solução foi a metodologia utilizada, com a sobressaturação a ser conseguida por evaporação do solvente e por diminuição de temperatura, sendo que a segunda teve especial impacto neste trabalho.^{33,198}

Quando se trata de cocristais, a cristalização em solução, está dependente da congruência do sistema, devido às diferenças de solubilidade dos compostos de partida, e, para além disso, são necessárias condições experimentais que conduzam a um número reduzido de núcleos de cristalização, por forma a originar cristais com características que os distingam como monocristais.^{33,199,200}

Por vezes recorre-se ainda à utilização de suportes sólidos, de forma a induzirem a cristalização, uma vez que diferentes superfícies podem dar origem a núcleos de cristalização diferentes e que facilitem e acelerem o processo de obtenção de monocristais.^{200,201}

Procedimento experimental:

Foram realizadas experiências de cristalização com o objetivo de obter monocristais dos cocristais de (RS)NPX-INA e (RS)NPX-PA.

O procedimento utilizado foi baseado no processo de obtenção do monocristal de (S)-naproxeno com isonicotinamida, tendo em conta que as solubilidades do enantiómero e da mistura racémica, bem como dos coformadores, são semelhantes e que as estequiometrias dos cocristais são equivalentes.^{154,202} As massas a utilizar foram calculadas tendo em conta as suas solubilidades, de maneira a permanecer na região de estabilidade dos cocristais.³³

Tal como no caso do cocrystal referido, foi preparada uma solução de 0,183 g de (RS)NPX e 0,270 g do coformador (1:1), em 5 ml de etanol, tanto para o caso da INA como para o da PA. As soluções foram, depois, seladas e homogeneizadas num agitador magnético a 40 °C, até que se verificasse dissolução completa, e posteriormente colocadas à temperatura ambiente para que se estabelecesse o equilíbrio térmico. Por fim, foram colocadas numa câmara frigorífica a 7 °C até que se verificasse precipitação dos cristais.³³

Foram utilizados suportes sólidos como tiras de nylon, teflon ou a superfície de ímãs, numa tentativa de induzir a cristalização, de forma a obter monocristais propícios à sua análise. No caso do ímã, este não foi retirado da solução após homogeneização, enquanto que os restantes suportes foram adicionados logo após este processo, o mais rápido possível para evitar perdas de volume por evaporação.

Capítulo 3

Resultados e

Discussão

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Síntese de nanocristais: LAG assistido por surfactante

3.1.1 LAG: estudos preliminares

A obtenção de nanocristais envolve o controlo do tamanho das partículas de sistemas binários complexos, dependente de um conjunto alargado de variáveis. Logicamente, sendo uma área jovem e com mecanismos com grande margem de investigação, o primeiro passo terá de passar pela determinação da eficácia dos métodos de redução de tamanho de partículas envolvidos neste estudo.

3.1.1.1 Ativos isolados

Os ensaios que se apresentam nesta secção, permitiram a perceção da eficácia do LAG como via “top-down” direta em sistemas cristalinos mais simples, apenas constituídos por um API, e ainda a determinação do efeito dos surfactantes na estabilização dos mesmos.

Na Tabela 6 apresentam-se as condições de moagem utilizadas para ambos os APIs investigados neste trabalho, (*S*)-naproxeno e (*RS*)-ibuprofeno. As quantidades de solução foram escolhidas de acordo com estudos anteriormente realizados neste laboratório, aplicando frequências de 30 Hz durante 30 min, enquanto que as percentagens de surfactante foram determinadas de acordo com informação recolhida da literatura.⁶⁷

Tabela 6. Condições utilizadas na aplicação de LAG aos APIs investigados.^{a)}

API / g	Volume de solução/dispersão de surfactante em etanol / μ l	Surfactante / % V/V
(S)NPX – 0,0701 ^{b)}	10	-
(S)NPX – 0,0697	10	25% Span 85
(RS)IBU – 0,0699 ^{b)}	10	-
(RS)IBU – 0,0695	20	25% Span 85
(RS)IBU – 0,0703	10	50% Span 85

a) Vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min; b) moagem assistida com etanol.

Caracterização das amostras dos sólidos obtidos por LAG

Contrariamente ao caso dos nanocristais, o estudo de nanocristais não implica a formação de estruturas cristalinas binárias, pelo que o único cuidado a ter prende-se com a verificação de uma eventual indução de uma transformação polimórfica por ação mecânica e influência do solvente. Desta forma, não se justifica uma caracterização tão completa como aquela que se terá de realizar para a observação da formação dos cocristsais.

ATR-FTIR

Neste caso, recorreu-se apenas aos espectros de IV dos APIs antes e após a moagem, representados na Figura 26.

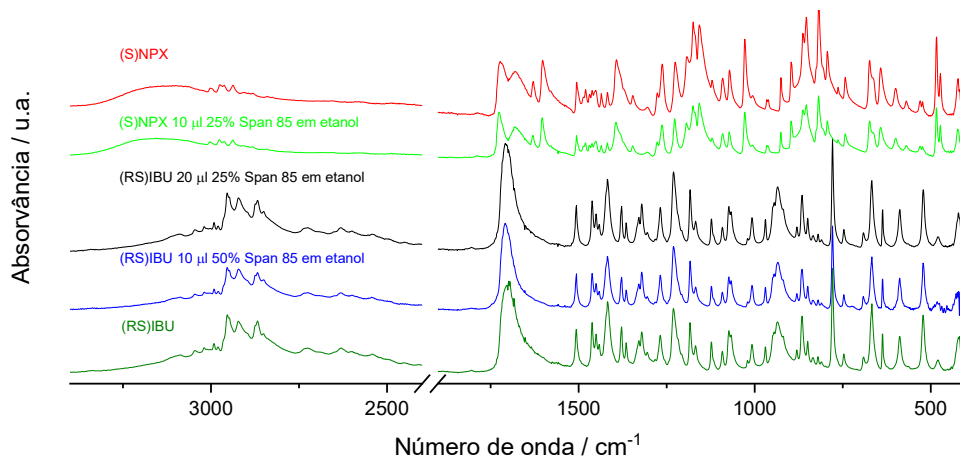


Figura 26. Espectros IV dos APIs de partida em comparação com os espectros dos APIs resultantes das respetivas moagens.

A comparação dos espectros de IV correspondentes aos APIs antes e após a moagem, indicam que os sinais que se observam em cada uma das amostras provenientes do moinho não apresentam alterações relativamente aos do seu predecessor. Conclui-se que, devido à possibilidade de sobreposição dos espectros do composto de partida com os espectros após moagem, não ocorreu transformação polimórfica em nenhum dos casos, e que, portanto, todas as amostras contêm o polimorfo mais estável do respetivo API, à temperatura e pressão ambiente.

Tamanho de partículas

Os compostos de partida e os APIs resultantes das moagens foram, numa primeira fase, analisados por microscopia de luz polarizada, com recurso a um microscópio ótico Leica DMRB, através da aquisição de imagens com ampliações de 200 vezes, representadas nas Figuras 27a e b e 28a, b e c, comprovando o efeito da moagem e do surfactante no tamanho das partículas, por comparação dos cristais moídos na presença e na ausência de surfactante.

As amostras foram posteriormente analisadas por FESEM, com o cuidado de verificar várias áreas de forma a comprovar a uniformidade da mesma. As imagens obtidas para as amostras de (S)NPX correspondem a ampliações de 5000x, enquanto que as de (RS)IBU correspondem a ampliações de 2000x, e encontram-se representadas nas Figuras 27 e 28, respetivamente. As restantes ampliações utilizadas durante a análise das amostras em causa, encontram-se expostas em anexo na Tabela A3 (Anexo II).

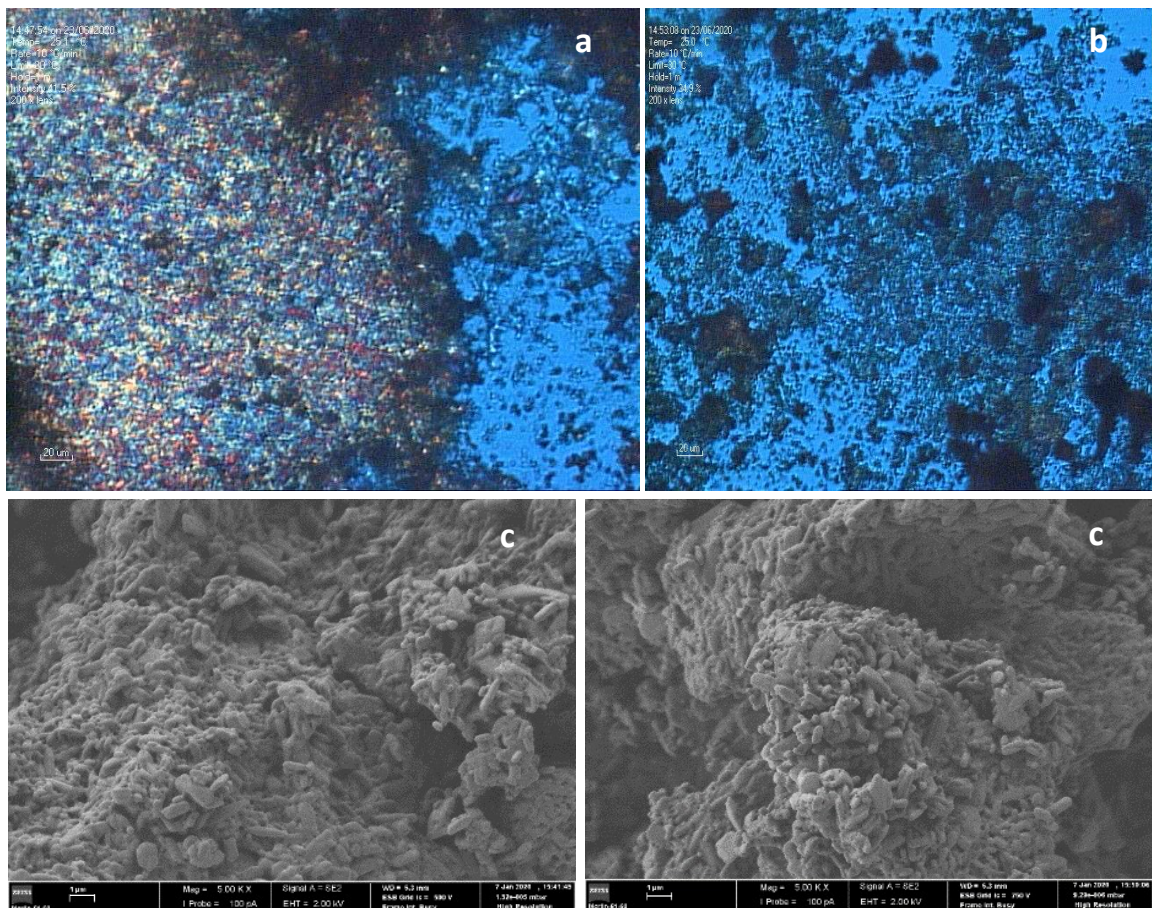
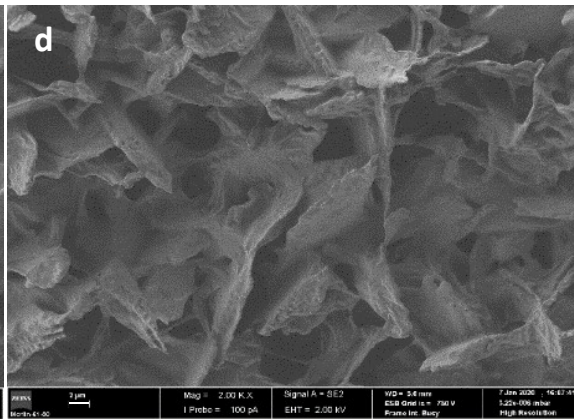
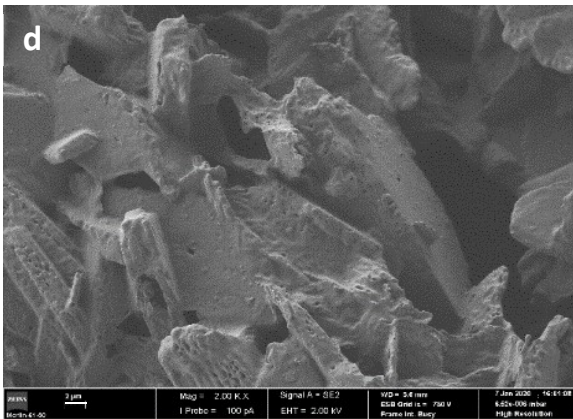
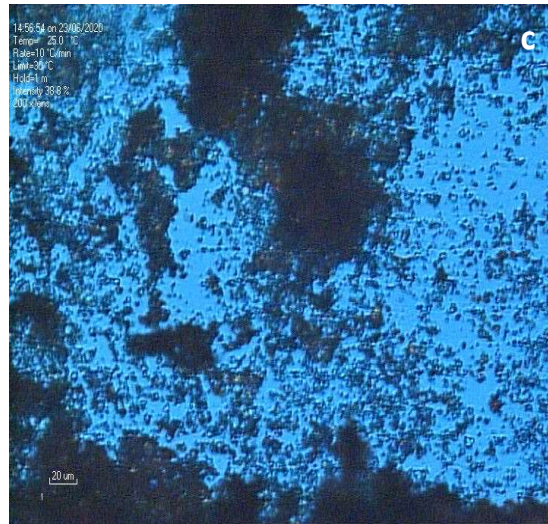
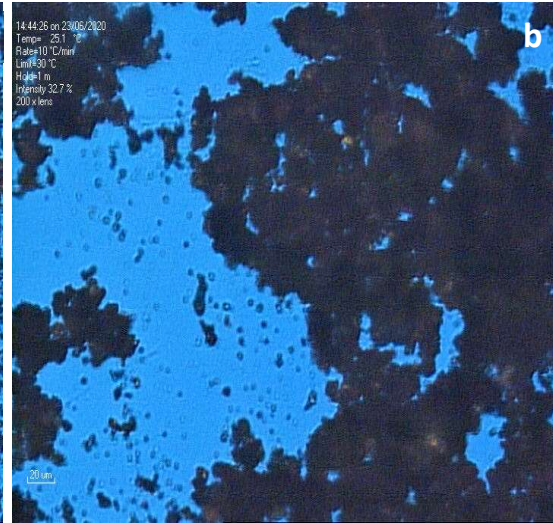
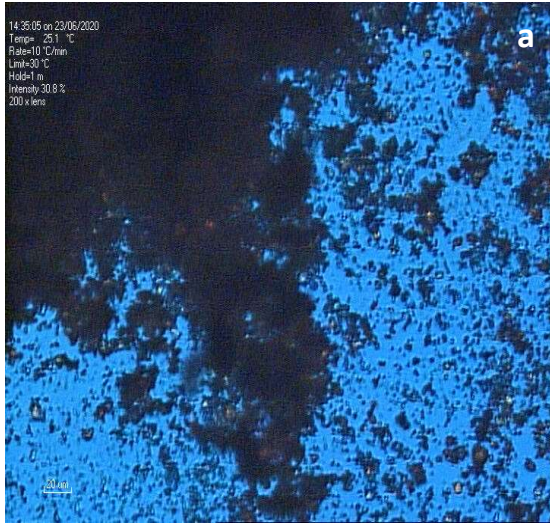


Figura 27. Caracterização do tamanho dos cristais de (S)NPX, obtidos por moagem, nas condições indicadas na Tabela 6. Imagens a cores: microscopia com luz polarizada (ampliação: 200 x) dos cristais obtidos após moagem assistida por: (a) 10 µl de etanol; (b) 10 µl 25% Span 85 em etanol; c) imagens FESEM recolhidas em diferentes zonas da amostra, relativas aos cristais obtidos após moagem assistida por 10 µl 25% Span 85 em etanol (ampliação: 5000x).

As imagens (c) da Figura 27, relativas às amostras de (S)NPX, mostram partículas de tamanhos reduzidos misturadas com partículas de maiores dimensões, evidenciando heterogeneidade de tamanhos em ambos os casos.



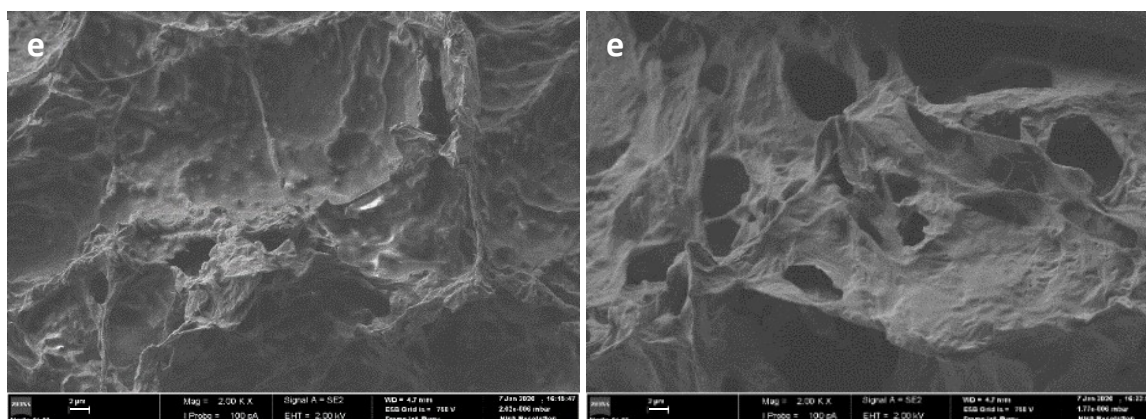


Figura 28. Caracterização do tamanho dos cristais de (RS)IBU, obtidos por moagem, nas condições indicadas na Tabela 6. Imagens a cores: microscopia com luz polarizada (ampliação: 200 x) dos cristais após moagem assistida por: (a) 10 µl de etanol; (b) 20 µl 25% Span 85 em etanol; (c) 10 µl 50% Span 85 em etanol. Imagens FESEM recolhidas em diferentes zonas da amostra: (d) 20 µl 25% Span 85 em etanol; (e) 10 µl 50% Span 85 em etanol (ampliação: 2000x).

Através das imagens de SEM das amostras de (RS)IBU (Figura 28), é possível retirar informações que servem de referência para o resto do projeto. Observa-se que, para ambas as concentrações de surfactante utilizadas, ocorre a formação de uma película que envolve toda a amostra e que promove a agregação das partículas do API, o que sugere um excesso de surfactante.

Este estudo preliminar determina o potencial do LAG para a redução do tamanho de partículas, com a obtenção de tamanhos na ordem dos nanómetros, tal como pretendido. Evidencia-se ainda a necessidade de otimização de condições de moagem, numa tentativa de controlo da heterogeneidade observada.

3.1.1.2 LAG com formação do cocrystal *in situ*

(S)-Naproxeno – Nicotinamida

O estudo preliminar prosseguiu com a aplicação da técnica ao cocrystal (S)NPX-NIC, de forma a verificar a eficácia da LAG na obtenção deste composto supramolecular, e ainda, averiguar o potencial para a diminuição do tamanho das partículas, necessário à obtenção de nanocristais.

Na Tabela 7 encontram-se discriminadas as condições utilizadas no estudo deste sistema, nomeadamente massa dos compostos iniciais, volume de solvente e quantidade de estabilizador.

As massas apresentadas dizem respeito à quantidade necessária para obedecer à estequiometria 2:1 do modelo em estudo.

Tabela 7. Condições utilizadas na aplicação de LAG ao sistema binário de (*S*)-naproxeno + nicotinamida.^{a)}

Sólidos de partida / g	Volume de solução/dispersão de surfactante em etanol / μ l	Span 85 / % V/V
(S)NPX – 0,0409 NIC – 0,0111	10	25
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0152	20	25
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0150	10	50
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0150	10	50
(S)NPX – 0,0542 NIC – 0,0148	20	50

a) Vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

Escolheu-se o Span 85 como estabilizador devido à sua lipofilicidade, uma vez que, apesar dos planos de clivagem de redes cristalinas serem um assunto de extrema complexidade, tendo em conta os sintões formados pela estrutura deste cocrystal (Figura 17 da secção 1.7.2), tomamos como ponto de partida a hipótese de que são as moléculas de (*S*)-naproxeno que se encontram na superfície do cocrystal, e portanto são estas que vão interagir com o surfactante em causa.²⁰³ As percentagens referidas dizem respeito ao volume de solvente, neste caso o etanol, utilizado devido ao conhecimento prévio da possibilidade de obtenção do cocrystal através desta técnica, com recurso ao mesmo.³³

Caracterização dos sólidos obtidos

ATR-FTIR

Na Figura 29, apresentam-se os espetros de IV obtidos para o sistema (S)NPX-NIC. Foi elaborada uma comparação entre os resultados dos sólidos obtidos nas condições apresentadas na Tabela 7, os compostos de partida, e o espetro do cocrystal descrito na literatura, de forma a determinar se ocorreu formação do mesmo.³³

Por observação dos espetros, é possível concluir que os pós obtidos não correspondem à mistura dos compostos de partida, confirmando-se a presença do cocrystal. Os espetros de IV desta estrutura apresentam sinais característicos, desde logo pelo aparecimento de duas bandas por volta dos 2522 e dos 1991 cm^{-1} , destacadas na caixa retangular, que se atribuem à formação de pontes de hidrogénio entre o grupo carboxílico do naproxeno e o azoto aromático da nicotinamida. Observam-se ainda desvios dos sinais da elongação assimétrica do grupo NH_2 , de 3353 para 3369 cm^{-1} ; da elongação simétrica do mesmo grupo, de 3142 para 3192 cm^{-1} e da elongação do grupo carbonilo, que passa de 1699 para 1725 cm^{-1} .

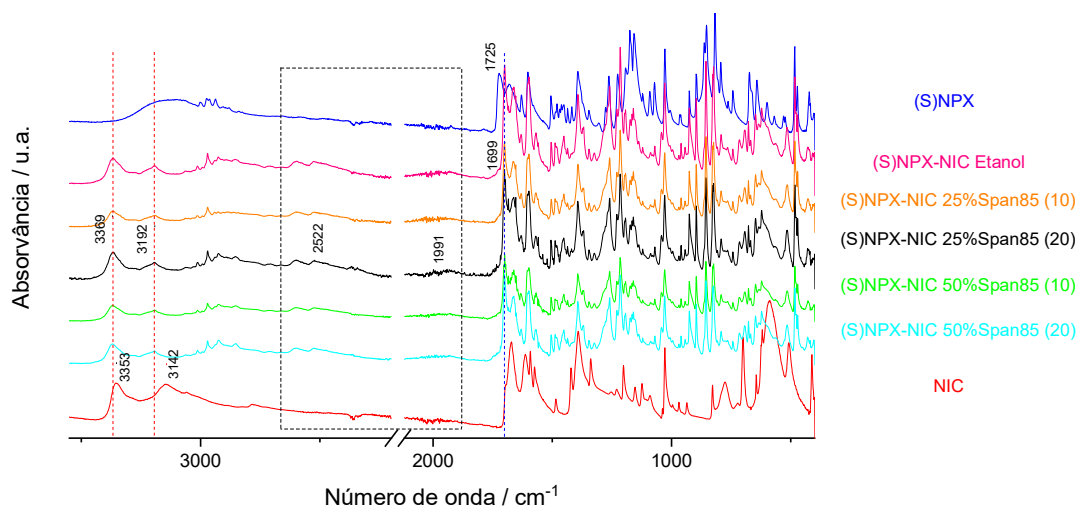


Figura 29. Espectros IV dos sólidos (S)NPX-NIC obtidos por LAG, espectros dos compostos de partida e espectros do cocrystal: --- desvio das elongações assimétrica e simétrica do grupo NH₂; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogênio, COOH \cdots N_{aromático}.

Os sinais correspondentes aos surfactantes não são observáveis devido à capacidade de detecção do aparelho, uma vez que as quantidades utilizadas são extremamente baixas.

DSC

Na Figura 30 estão representados os termogramas dos sólidos obtidos por moagem, bem como dos respectivos compostos de partida. Estes foram utilizados como análise complementar ao IV, de forma a determinar se ocorreu cocrystalização completa, ou se por outro lado se verificam excessos de algum dos compostos iniciais, por comparação com o termograma do (S)NPX-NIC obtido em etanol, presente na literatura.³³ Na Tabela 8 apresentam-se os respectivos parâmetros termodinâmicos.

Os dados apresentados revelam a presença de sinais endotérmicos únicos, indicadores da ausência de excessos dos compostos de partida. As temperaturas de fusão das misturas de (S)NPX com NIC diferem da dos compostos de partida, pelo que, complementando estes dados com os fornecidos pelos espectros de IV, é possível afirmar com alguma certeza que estamos perante a formação do cocrystal pretendido.

Observa-se ainda a ausência de variações significativas nas temperaturas e entalpias de fusão com a variação das percentagens de Span 85, o que indica que o processo de moagem não originou uma diminuição do tamanho das partículas para valores extremamente baixos, e que o Span 85 não se encontra em quantidade suficiente para ser detetado.

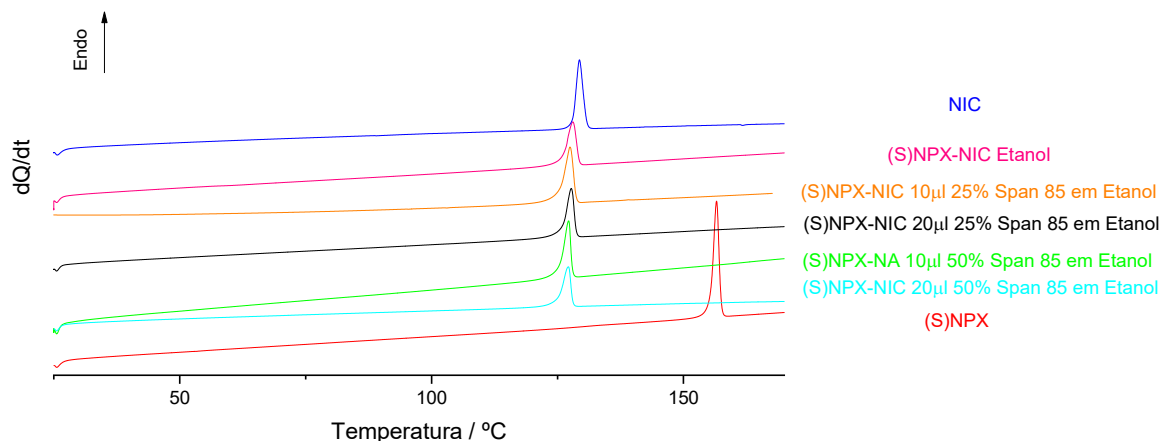


Figura 30. Comparação dos termogramas DSC dos sólidos (S)NPX-NIC obtidos por LAG com os dos compostos de partida.

Tabela 8. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC, nas várias condições estudadas para obtenção de nanocristais.

	$T_{fus} / ^\circ C$	$\Delta_{fus}H / J g^{-1}$
NIC	128,1	190
(S)NPX-NIC Etanol	126,1	128
(S)NPX-NIC 10 μ l 25% Span 85 em Etanol	125,2	122
(S)NPX-NIC 20 μ l 25% Span 85 em Etanol	125,9	126
(S)NPX-NA 10 μ l 50% Span 85 em Etanol	125,3	121
(S)NPX-NIC 20 μ l 50% Span 85 em Etanol	125,1	120
(S)NPX	155,3	142

XRPD

O sucesso da obtenção do cocristal correspondente ao modelo em estudo revela-se essencial ao desenvolvimento de todo o projeto, pelo que uma caracterização completa do mesmo é de extrema importância.

Assim, na Figura 31 apresenta-se uma comparação entre os difratogramas correspondentes ao (S)NPX, à NIC e aos cocristais formados a partir dos mesmos.

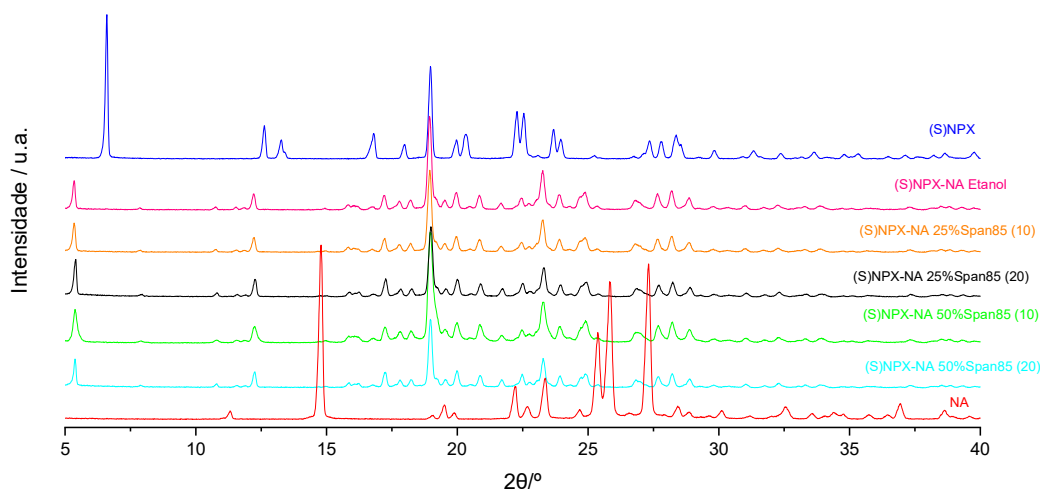


Figura 31. Comparação entre os difratogramas de raios-X de pó dos compostos de partida e os do sistema (S)NPX-NIC obtidos por moagem.

A comparação direta dos padrões de difração do (S)NPX e da NIC com os padrões de todos os sistemas preparados, permite detetar o aparecimento de novos sinais nos mesmos, o que implica que apesar de estarem relacionados, estes não resultam da soma dos padrões dos compostos de partida, excluindo definitivamente a hipótese de formação de uma mistura eutética. Observa-se ainda que as diferenças da quantidade de solvente, bem como da percentagem de surfactante, não têm qualquer efeito nos padrões de difração obtidos.

Confirma-se então, inequivocamente, a obtenção do cocrystal correspondente ao modelo em estudo.

Tamanho de partículas

Confirmada a formação do cocrystal, estamos em condições de averiguar a eficácia desta técnica na formação de nanopartículas. Na Figura 32 apresentam-se algumas imagens recolhidas com recurso a SEM e a FSEM, relativas ao modelo em causa, nas condições descritas.

As imagens foram recolhidas recorrendo a um aparelho SEM convencional com ampliação de 25000 vezes, e um FESEM com ampliação de 7500, sendo que foram analisadas áreas diferentes da amostra de forma a garantir que estas são representativas.

Por comparação direta da imagem (a) (imagem do cocrystal, obtido por LAG, assistido por etanol) com as restantes, é possível concluir que a moagem na presença do surfactante induz uma redução no tamanho de partículas relativamente ao que se observa na imagem (a), uma vez que, apesar da heterogeneidade, a percentagem de partículas na escala nanométrica aumenta significativamente.

A imagem (b) corresponde à amostra com melhores resultados, onde, apesar da alguma heterogeneidade de tamanhos, se verifica que os 10 µl da solução de 25% de Span 85 em etanol promovem menor aglomeração e agregação de partículas, com tamanhos extremamente promissores. Os ensaios (d) e (e) demonstram a reprodutibilidade da técnica, com a obtenção de resultados semelhantes para pós obtidos nas mesmas condições.

Encontram-se em anexo nas Tabelas A4 e A5 (Anexo III) as imagens relativas às restantes ampliações utilizadas em ambos os aparelhos.

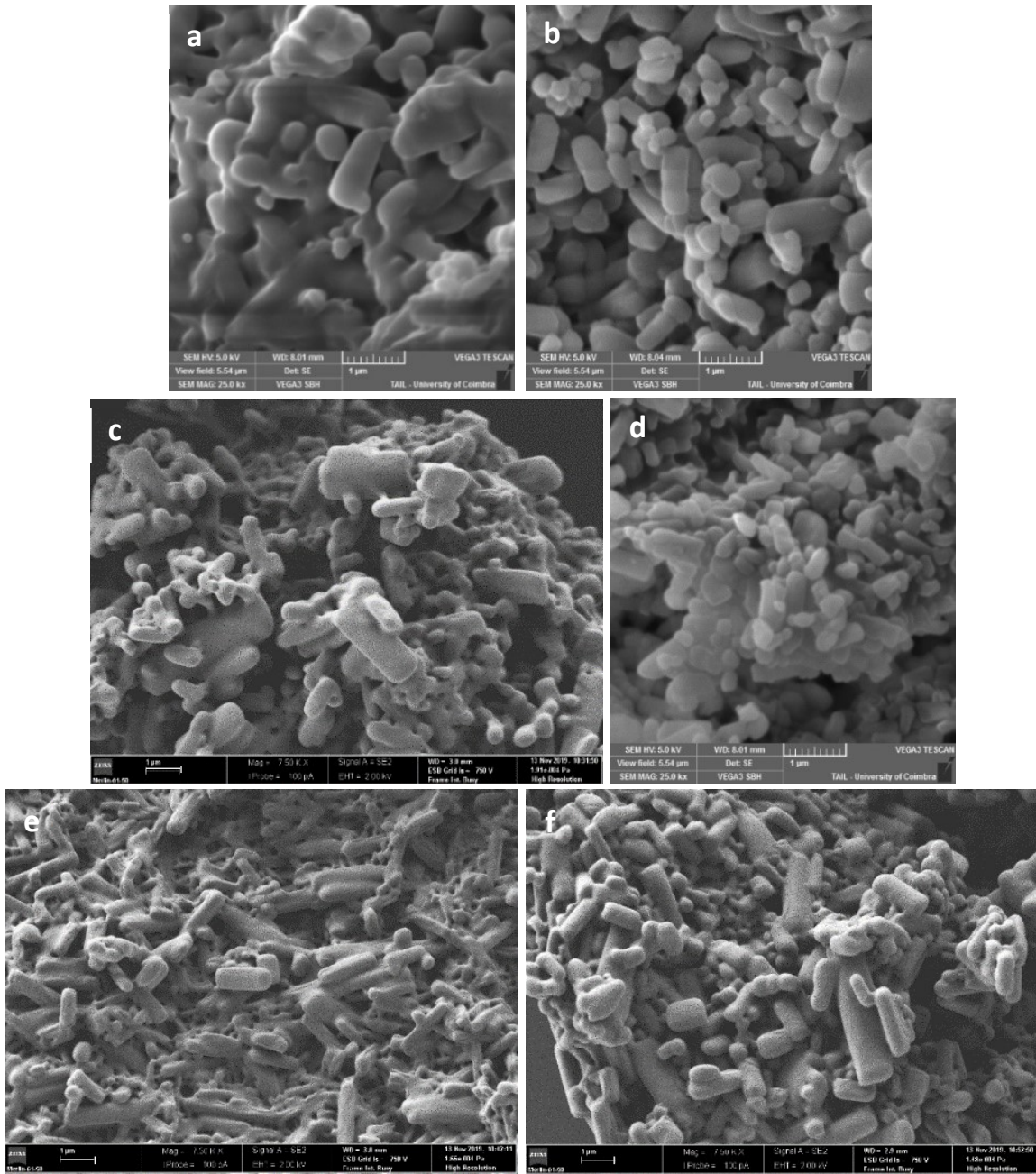


Figura 32. Imagens SEM dos sólidos (S)NPX-NIC, obtidos por LAG assistido por: (a) 10 µl Etanol, SEM; (b) 10 µl 25% Span 85 em etanol, SEM; (c) 20 µl 25% Span 85 em etanol, FESEM; (d) 1º ensaio 10 µl 50% Span 85 em etanol, SEM; (e) 2º ensaio 10 µl 50% Span 85 em etanol, FESEM; (f) 20 µl 50% Span 85 em etanol, FESEM. Ampliação SEM: 25000x; FESEM: 7500x.

(RS)Ibuprofeno – Nicotinamida

O segundo modelo de cocrystal foi introduzido neste projeto de forma a permitir uma melhor compreensão dos problemas relacionados com as técnicas de redução do tamanho de partículas, uma vez que se espera que a modelos diferentes estejam associados comportamentos diferentes.

Assim, tal como no caso anterior, procurou-se obter nanocristais de (RS)IBU-NIC por moagem, nas condições discriminadas na Tabela 9.

Tabela 9. Condições utilizadas na aplicação de LAG ao sistema binário de (RS)-ibuprofeno + nicotinamida.^{a)}

Sólidos de partida / g	Volume de solução/dispersão de surfactante em etanol / μ l	Surfactante / % V/V
(RS)IBU – 0,0440 ^{b)} NIC – 0,0270	20	-
(RS)IBU – 0,0440 NIC – 0,0261	20	25% Span 85
(RS)IBU – 0,0440 NIC – 0,0261	20	25% Tween 85

a) Vasos e esferas de aço, 15 Hz, 30 min; b) moagem assistida com etanol.

O cocrystal em causa apresenta uma estequiometria de 1:1, portanto, as massas foram pesadas de forma perfazer os 70 mg de massa total, com as proporções corretas dos compostos de partida.

Embora a hipótese colocada para a escolha do surfactante no caso anterior seja aplicável também a este modelo, determinou-se a utilização de surfactantes de naturezas opostas, possibilitando a perceção da influência dessa característica na formação dos nanocristais.

Mais uma vez, o etanol foi selecionado como solvente devido ao conhecimento prévio da formação do cocrystal por moagem assistida nestas condições, e as soluções de surfactante foram preparadas de forma semelhante ao que se verifica nos ensaios anteriores. Também a frequência de moagem foi alterada, uma vez que ocorre formação completa dos cocrystal a 15 Hz, mantendo-se os mesmos 30 min.²⁰⁴

Caracterização dos sólidos obtidos

ATR-FTIR

Na Figura 33 apresentam-se os espetros de IV dos sólidos obtidos por LAG nas condições referidas na Tabela 9, e estabelece-se uma comparação entre estes e os espetros dos compostos de partida, de forma a elaborar uma primeira caracterização dos compostos obtidos.

Ao comparar estes espetros com os correspondentes aos compostos de partida, observa-se que ocorreu a formação de novas estruturas, uma vez que estes não correspondem à soma dos espetros dos seus precursores. Por comparação com os espetros do cocrystal conhecidos da literatura, conclui-se que ocorreu formação da estrutura pretendida.²⁰⁴

Uma análise mais cuidada permite detetar o aparecimento das bandas atribuíveis à formação de pontes de hidrogénio entre o azoto aromático da NIC e o ácido carboxílico do (RS)IBU nos 2471 e 1940 cm^{-1} .

Devido à formação desta interação, detetam-se também, tal como se verificava no caso do modelo anterior, desvios na banda da elongação assimétrica do NH_2 , de 3345 para 3395 cm^{-1} , na banda da elongação simétrica do mesmo grupo, de 3150 para 3178 cm^{-1} , e da banda correspondente à elongação do grupo carbonilo presente no ácido carboxílico de 1701 para 1710 cm^{-1} .

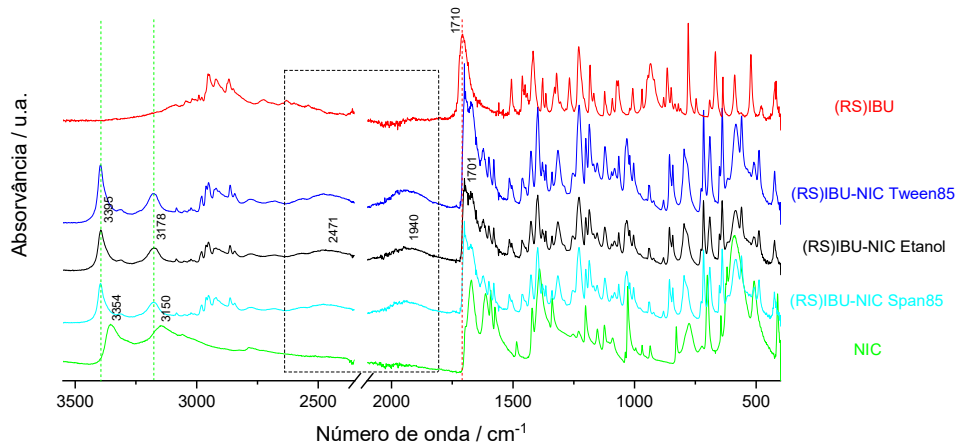


Figura 33. Espectros IV dos sólidos (RS)IBU-NIC obtidos por LAG e espectros dos cocrystal de partida: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH_2 ; --- desvio da elongação do grupo $\text{C}=\text{O}$; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, $\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{aromático}}$.

DSC

A Figura 34 reúne os termogramas correspondentes aos sólidos analisados anteriormente por IV, de forma a complementar a informação até agora adquirida. Na Tabela 10 encontram-se resumidos os parâmetros termodinâmicos relativos a cada um dos compostos analisados.

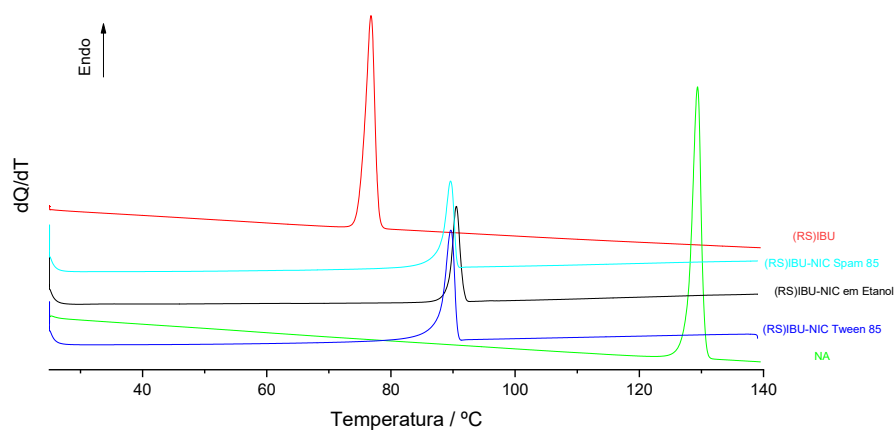


Figura 34. Comparação entre os termogramas DSC dos compostos de partida e os do sistema (RS)IBU-NIC obtidos por moagem.

Tabela 10. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (RS)IBU-NIC, nas várias condições estudadas para obtenção de nanocristais.

	$T_{fus} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{fus}H / \text{J g}^{-1}$
(RS)IBU	74,9	128
(RS)IBU-NIC Etanol	89,1	138
(RS)IBU-NIC 20 μl 25% Span 85 em Etanol	87,6	123
(RS)IBU-NIC 20 μl 25% Tween 85 em Etanol	86,9	117
NIC	128,1	190

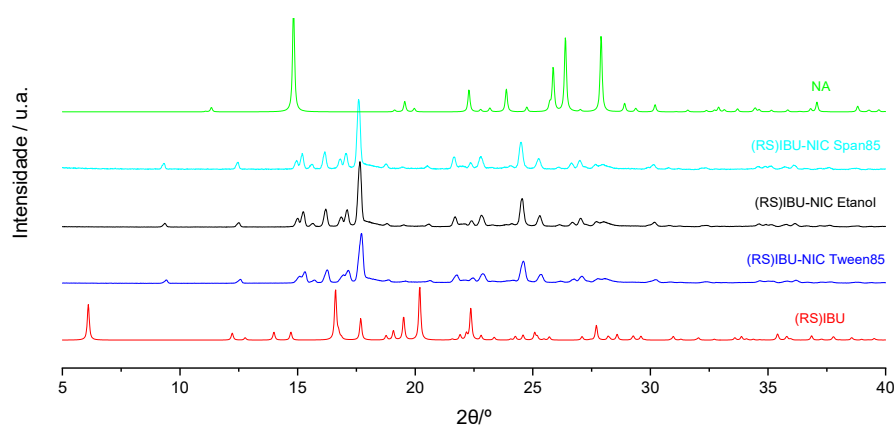
As pequenas variações verificadas entre os parâmetros termodinâmicos das amostras correspondentes aos cocrystalis poderão estar relacionadas com a presença do surfactante, que, sendo uma impureza, pode ter influência nos mesmos, apesar das pequenas quantidades contidas em cada um dos pós.

Mais uma vez, para além das diferenças típicas da introdução de impurezas, não se verificam desvios significativos na temperatura de fusão, o que poderá ser indicativo da ausência de partículas com tamanhos toxicologicamente preocupantes.

XRPD

De forma a completar a caracterização dos cocrystalis de (RS)IBU-NIC, falta apenas analisar os dados obtidos por XRPD.

Assim sendo, no Figura 35 expõem-se os difratogramas das amostras em causa, bem como os dos compostos que lhes deram origem.


Figura 35. Difratogramas de raios-X de pó dos cocrystalis de (RS)IBU-NIC e dos compostos de partida que lhes deram origem.

Os padrões dos cocrystal obtidos por moagem assistida por soluções de surfactante em etanol são sobreponíveis com o do cocrystal obtido apenas nesse solvente, o que confirma a presença do cocrystal em todas as amostras, sem excessos de nenhum dos compostos iniciais.

Tamanho de partículas

O tamanho de partículas foi analisado com recurso a FESEM, obtendo-se as imagens apresentadas na Figura 36, com ampliações de 8000 vezes. As restantes ampliações são apresentadas em anexo na Tabela A6 (Anexo III).

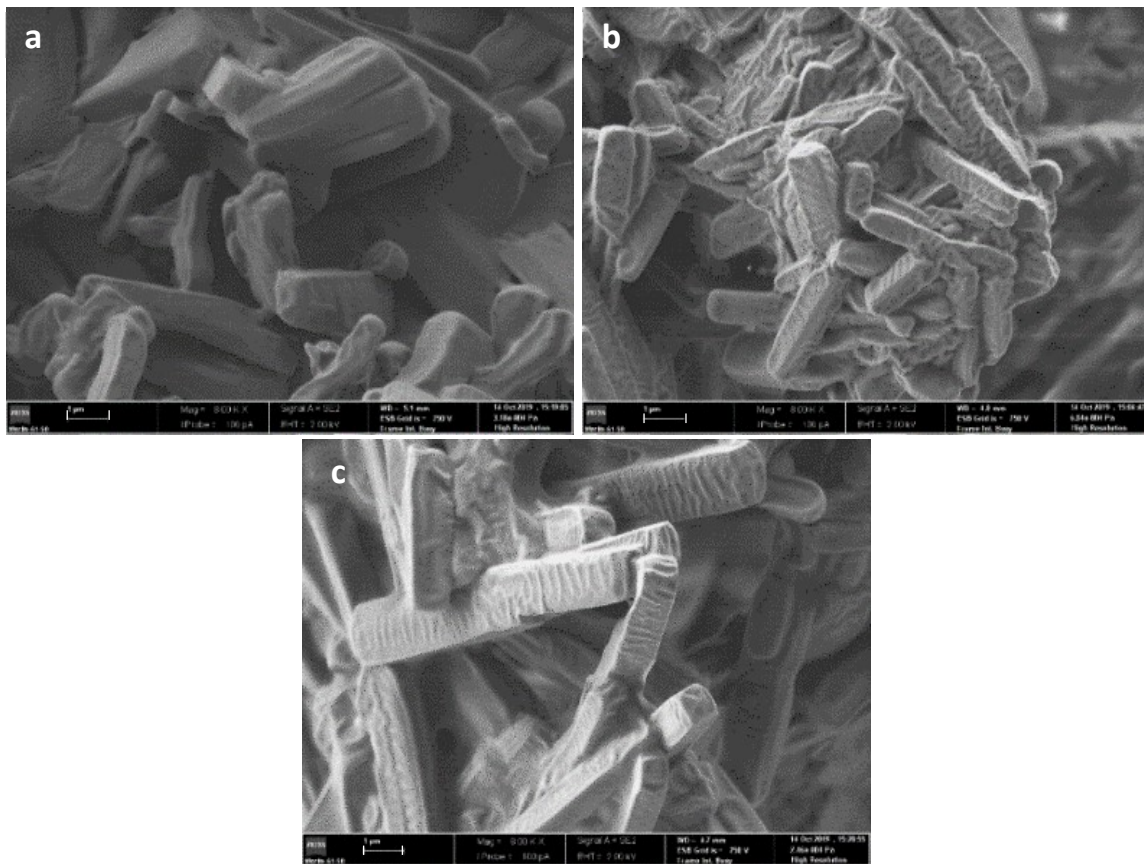


Figura 36. Imagens FESEM de amostras de (RS)IBU-NIC obtidas por LAG nas condições da Tabela 9: (a) 20 µl etanol; (b) 20 µl 25% Span 85 em etanol; (c) 20 µl 25% Tween 85 em etanol. Ampliação: 8000x

No caso deste modelo, a redução do tamanho de partículas não é tão aparente como no caso anterior, tanto com a utilização do Span 85 como com a utilização do Tween 85. No entanto, comparando as imagens de ambas as amostras que contém surfactante com a imagem do cocrystal obtido apenas em etanol (a), verifica-se que na imagem (b), correspondente ao Span 85, estão presentes partículas aparentemente mais pequenas.

Os estudos com o sistema (RS)IBU-NIC chamam a atenção para um problema intrínseco à moagem, que serve de explicação para a diminuição da eficácia na redução do tamanho das partículas. Ao serem submetidos às forças mecânicas induzidas pelo movimento das esferas durante o processo da moagem, os compostos acabaram por fundir no interior dos vasos, encontrando-se no estado líquido no final deste procedimento. Perde-se, então, o efeito das forças de cisalhamento, e o único fator que impede o crescimento exponencial das partículas passa a ser o surfactante presente, que, após a cristalização do material fundido, interage com a superfície do mesmo e impede-o de se expandir.

Desta forma, o processo de fusão da mistura inviabiliza a obtenção de nanocristais deste modelo *in situ*.

A utilização dos surfactantes de características diferentes permite ainda uma outra observação. Comparando as imagens (b) e (c), as partículas aparentam ter uma morfologia diferente, com partículas mais curtas e largas na amostra exposta ao Span 85, e partículas mais compridas e estreitas na amostra exposta a Tween 85. Estas observações poderão estar a ser influenciadas pela orientação das partículas na imagem, que proporcionam essa ilusão, ou, pelo contrário, poderá ser indicativo de uma direção de crescimento preferencial consoante o surfactante que entra em contacto com a superfície das partículas.

3.1.1.3 “Top-down” – alternativa a LAG *in situ*

Propôs-se ainda a utilização da técnica LAG como via “top-down”, para a obtenção de nanocristais, de forma a continuar os estudos relativos à sua eficácia na diminuição do tamanho dos mesmos.

Em primeiro lugar, a aplicação de uma via deste tipo na formação de nanocristais implica a obtenção prévia do cocrystal de partida, para que depois seja possível aplicar a técnica de diminuição do tamanho das partículas. Para tal, foram equacionados dois métodos distintos, moagem ou cristalização em solução.^{149,204} Na Tabela 11 indicam-se as condições de moagem para a via “top-down” em que os cocrystal foram obtidos por LAG.

Tabela 11. Condições utilizadas na aplicação de LAG – “top-down” – ao sistema (RS)IBU-NIC. Cocrystal gerado por LAG.^{a)}

Sólidos de partida / g	1ª moagem, assistida por etanol / μl	Solução (2ª moagem)	
		Volume de solução/dispersão de surfactante em etanol / μl	Span 85 / %V/V
(RS)IBU – 0,0442 NIC – 0,0262	20	20	25
(RS)IBU – 0,0440 NIC – 0,0263	20	10	50

a) Vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

Os cocrystal foram preparados por uma primeira moagem a 30 Hz durante 30 min, seguida de uma segunda moagem, nas mesmas condições, em que se aplicam as soluções de surfactante, numa tentativa de estabilização do sólido, após quebra dos cristais do sistema binário. As soluções utilizadas na segunda moagem foram preparadas de forma a conterem o mesmo número de moles de surfactante em solução,

introduzindo-se, assim, a variável da diluição do estabilizador. Os sólidos obtidos são identificados por MB – moinho de bolas.

Para a segunda metodologia, é necessário conhecer o diagrama ternário do sistema API + cocristal + solvente. Foi escolhido o sistema (RS)IBU-NIC para investigar a aplicação de LAG como via “top-down”, devido ao problema identificado nos ensaios *in situ* e também, porque para este sistema foi publicado por Xiaowei e colaboradores,¹⁴⁹ um diagrama ternário (solvente misto água + etanol, 30% massa de água), apresentado na Figura 37.

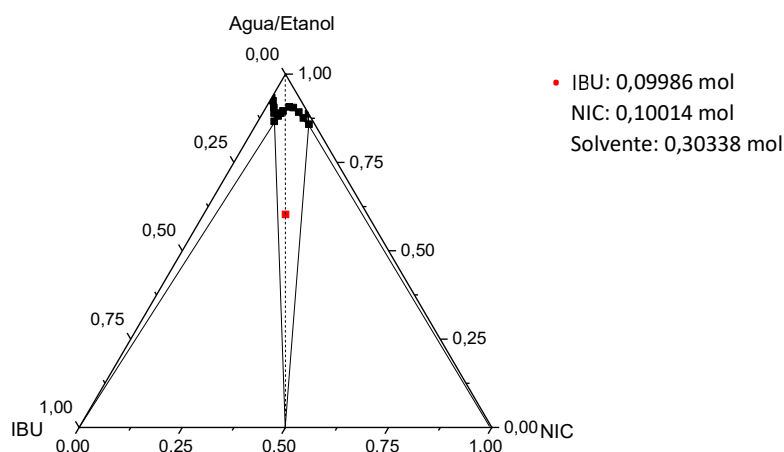


Figura 37. Diagrama ternário do sistema (RS)IBU-NIC numa solução água/etanol, a 25 °C (percentagem em massa de água de 30%). O ponto a vermelho indica o ponto do diagrama de onde se partiu para a obtenção do cocristal.¹⁴⁹

A composição do ponto assinalado a vermelho no diagrama ternário da Figura 37, foi utilizado como ponto de partida para a obtenção do cocristal por cristalização em solução. Para tal, foram pesados 0,4462 g de (RS)IBU, 0,2649 g de NIC e medidos 0,5 ml de solvente.

Os compostos de partida e solvente, foram sujeitos a um período de cerca de 12h de agitação magnética, para promover a formação do cocristal. Posteriormente, uma vez que a pequena quantidade de solvente utilizada não justifica o processo de filtração, secou-se o mesmo numa estufa a 80 °C.

Os cocristais obtidos foram depois sujeitos a LAG, 30 Hz, 30 min, nas mesmas condições aplicadas para a segunda moagem dos cocristais obtidos por LAG (Tabela 11). Ambas as metodologias foram executadas de forma a adquirir o máximo de informação possível relativamente a esta técnica.

Caracterização dos sólidos obtidos

A caracterização dos pós indica a formação do cocristal pretendido, com os resultados das análises a coincidirem com o que se verificou para os compostos trabalhados na secção 3.1.1.2. Os espetros de IV, termogramas e difratogramas, relativos a estes ensaios, encontram-se em anexo nas Figuras A1, A2 e A3, respetivamente. Os seus parâmetros termodinâmicos apresentam-se também em anexo na Tabela A7 (Anexo IV).

Tamanho de partículas

Apresentam-se, na Figura 38, imagens obtidas por microscopia de luz polarizada (ampliação 200x), referentes aos cocrystal obtidos por cristalização em solução. Na Figura 39, apresentam-se as imagens obtidas por FESEM, relativas aos nanococrystal obtidos através das vias descritas, adquiridas com ampliações de 5000x. A imagem dos nanococrystal sintetizados por moagem assistida por etanol na ausência de surfactante, corresponde a uma ampliação de 8000x.

As imagens das restantes ampliações utilizadas durante a análise das respectivas amostras encontram-se em anexo na Tabela A8 (Anexo IV).

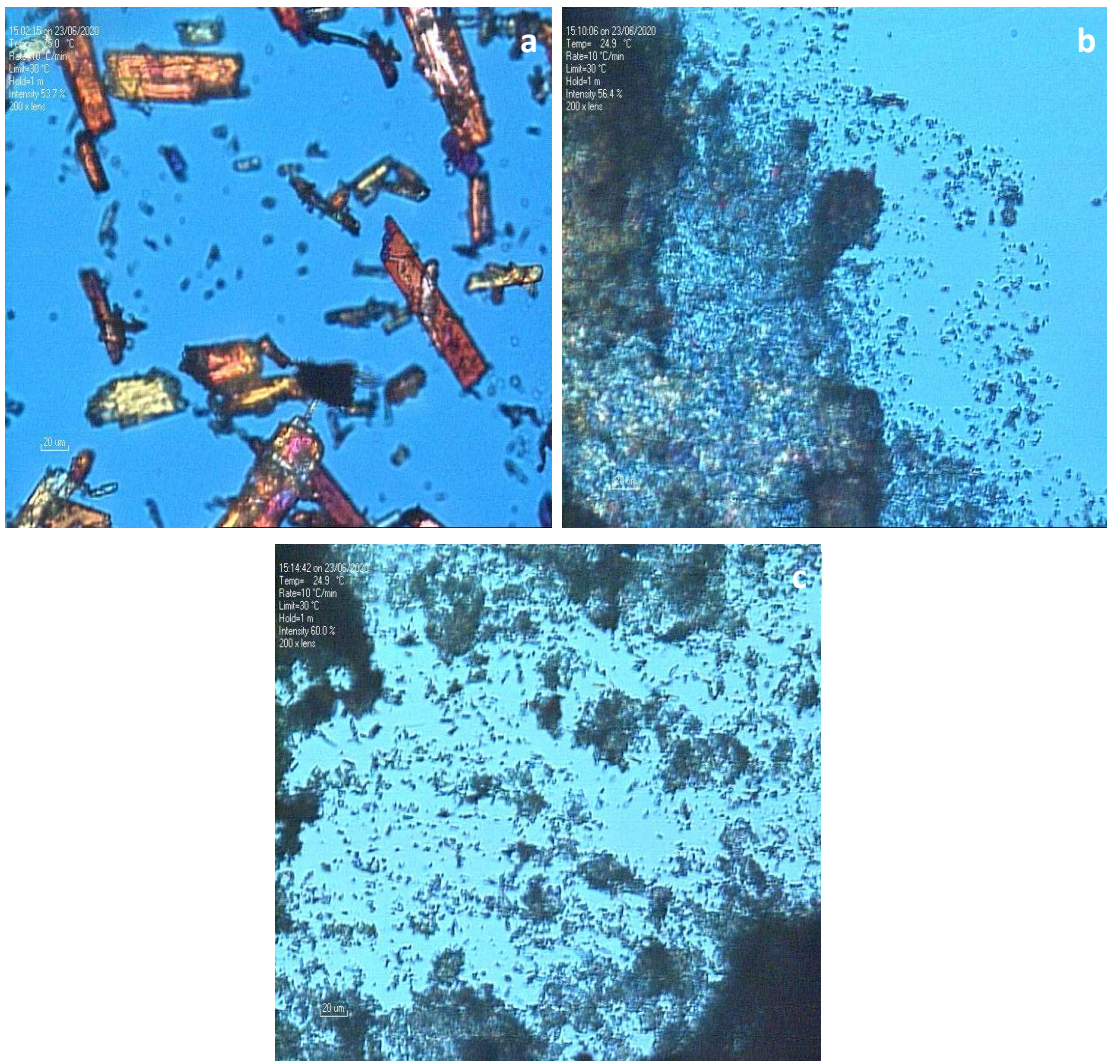


Figura 38. Imagens de microscopia de luz polarizada dos cocrystal obtidos por cristalização em solução (DT): (a) cocrystal iniciais; (b) após moagem, assistida por 20 µl 25% Span 85 em etanol; (c) após moagem, assistida por 10 µl 50% Span 85 em etanol. Ampliação: 200x

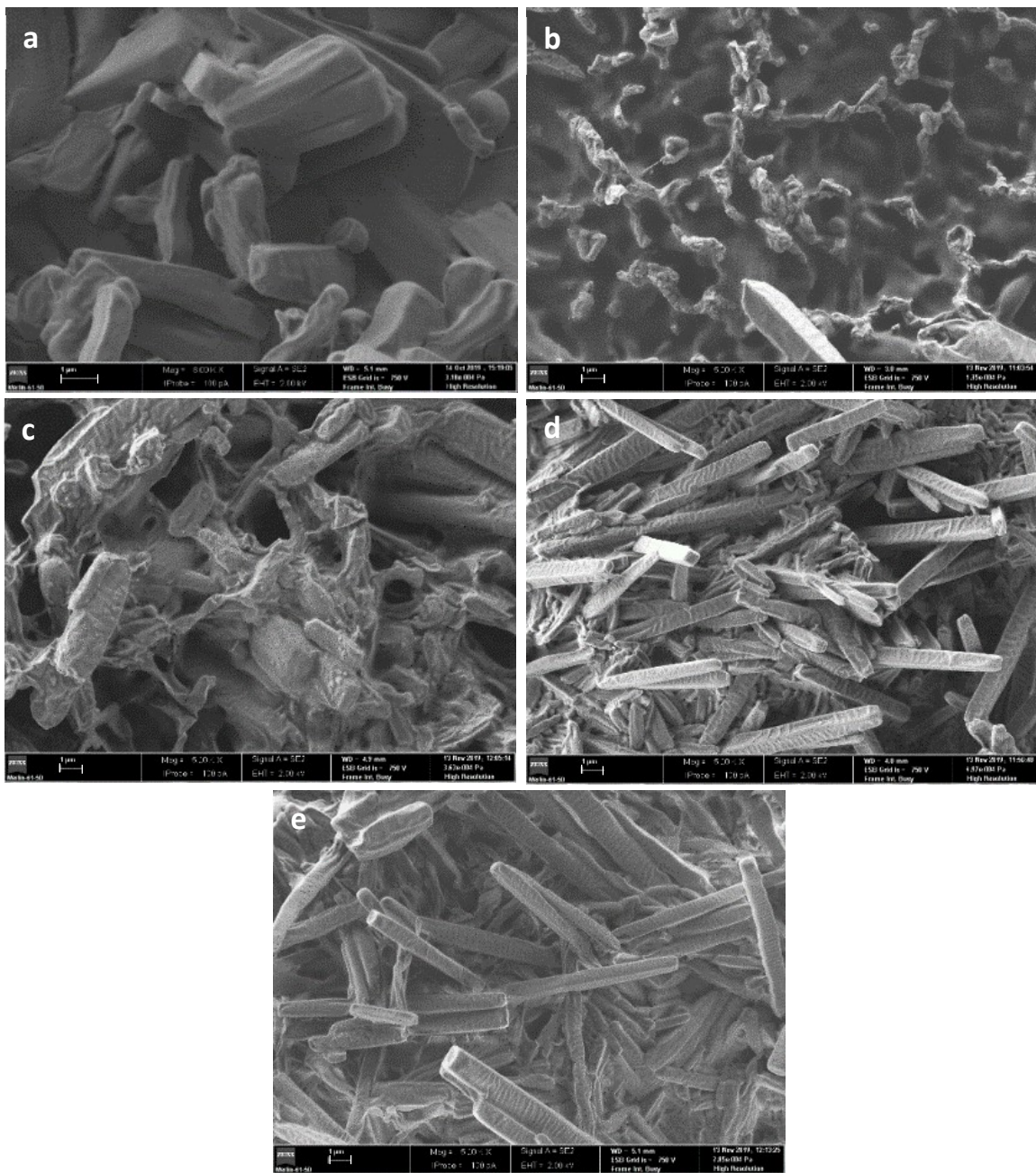


Figura 39. Imagens FESEM dos cocrystalos (RS)IBU-NIC, obtidos por LAG “top-down”, assistido por: (a) 20 μl Etanol; (b) 20 μl 25% Span 85 em etanol (DT); (c) 20 μl 25% Span 85 em etanol (MB); (d) 10 μl 50% Span 85 em etanol (DT); (e) 10 μl 50% Span 85 em etanol (MB). Ampliação: 5000x

As imagens (a), (b) e (c) da Figura 38, correspondem ao caso dos cocrystalos obtidos por cristalização em solução, estabelecendo uma comparação do tamanho das partículas antes e após a aplicação de todo o processo, confirmando-se os efeitos do mesmo.

Na Figura 39, por comparação da imagem (a) com as restantes, notam-se algumas diferenças no que toca aos tamanhos das partículas, o que implica que a aplicação do método “top-down” teve algum efeito na diminuição do tamanho das mesmas. No entanto, apesar de se continuar a observar heterogeneidade de

tamanhos nas amostras, em nenhuma se verificam resultados semelhantes aos observados para o modelo (S)NPX-NIC, onde se distinguia a formação de uma quantidade de nanocristais significativa, concomitantemente com alguns cocristais de maiores dimensões.

As imagens (b) e (c) fornecem informação de extrema importância. Na imagem (b), correspondente aos cocristais obtidos por cristalização em solução (DT) e posteriormente moídos na presença de 20 µl de uma solução de 25% Span 85 em etanol (% V/V), observa-se que, no meio de cocristais extremamente grandes, ocorre a formação de uma estrutura semelhante a uma rede. O mesmo se verifica na imagem (c), em que os cocristais foram obtidos por LAG (MB), em etanol, e remoídos nas mesmas condições utilizadas para a amostra (b), onde se observa a formação de uma rede semelhante, juntamente com a presença de pequenas partículas esféricas e regulares.

Os fenómenos verificados devem-se à aplicação de uma solução em que o surfactante não se encontra em concentração suficiente para cobrir toda a amostra, o que leva à interação de várias partículas de cocristal com a mesma molécula de surfactante, originando estas estruturas, que evoluem no sentido da agregação do cocristal. As partículas esféricas observadas podem ter resultado do mesmo fator, uma vez que, com a concentração insuficiente, a velocidade de adsorção do surfactante poderá ser inferior à da colisão entre partículas, pelo que estas irão corresponder a surfactante que ficou por adsorver.²⁰⁵

Nas amostras (d) e (e), em que foram levadas a cabo moagens para realização do método “top-down” na presença de 10 µl de uma solução de 50% Span 85 em etanol (% V/V), verifica-se uma grande heterogeneidade de tamanhos com uma prevalência significativa de cocristais com dimensões de vários micrómetros, o que demonstram a falta de eficiência da via “top-down”, pelo menos neste caso.

Apesar do número de moles de Span 85 ser equivalente em ambas as soluções, não se verifica agregação provocada pela carência de surfactante com os 10 µl de uma solução de 50% Span 85, o que confirma o peso do grau de diluição do estabilizador na agregação das partículas na amostra.

3.1.1.4 Resultados preliminares: problemas identificados

Os estudos apresentados nas secções anteriores, revelam um conjunto de problemas associados à aplicação da moagem assistida por líquido na obtenção de nanocristais, que merecem ser destacados.

A primeira conclusão a retirar prende-se com os efeitos da técnica aplicada a diferentes modelos, uma vez que estes respondem de maneira diferente à aplicação da ação mecânica, o que poderá resultar da diferença nos planos de clivagem, dependentes da estrutura cristalina de cada um, e também da interação da superfície com o estabilizador presente, que varia de acordo com os grupos funcionais que se encontram disponíveis para estabelecer interações intermoleculares.

Esta questão condiciona ainda o tipo de estabilizador a utilizar, bem como a sua concentração, de forma a impedir a agregação por excesso ou quantidades insuficientes do mesmo. Para além disso, também os tempos de moagem serão uma variável a ter em conta, uma vez que esta permite o controlo da exposição às forças mecânicas, necessárias para a quebra e impedimento do crescimento do tamanho de partículas.

A fusão do cocristal de (RS)IBU-NA durante a formação dos nanocristais *in situ* revela a problemática das propriedades físico-químicas inerentes aos compostos que compõem os modelos de cocristal, com o aparecimento de um eutéctico metaestável durante a moagem, em que a fusão da mistura ocorre devido ao aumento da temperatura no interior do vaso. Assim, o cocristal resultante será obtido a partir da recristalização da mistura líquida, com o tamanho de partículas a ser controlado apenas pela presença do surfactante e não pela sua ação em conjunto com as forças mecânicas envolvida no processo.

O diagrama de fases binário sólido-líquido simulado para a formação de um eutético metaestável, entre o (RS)IBU e a NIC (Figura 40) aponta para uma temperatura de fusão do eutético de 64 °C, o que se confirma com ensaios realizados sobre misturas físicas, preparadas em almofariz, de (RS)IBU+NIC - termogramas obtidos por DSC, apresentados na Figura 41 ($T_{fus} \approx 60$ °C). Detalhes da construção do diagrama são apresentados em anexo (Anexo V).

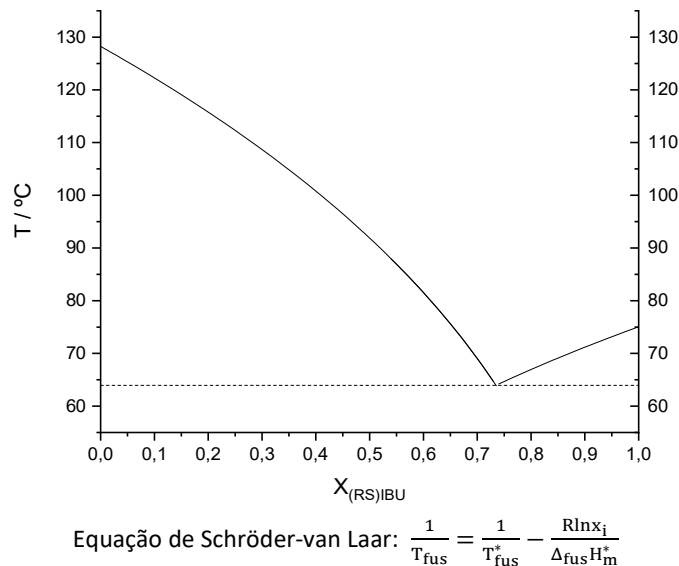


Figura 40. Simulação da composição da mistura eutética de (RS)IBU com NIC. T_{fus}^* e $\Delta_{fus} H_m^*$ correspondem à temperatura e entalpia de fusão do composto, respetivamente.²⁰⁶

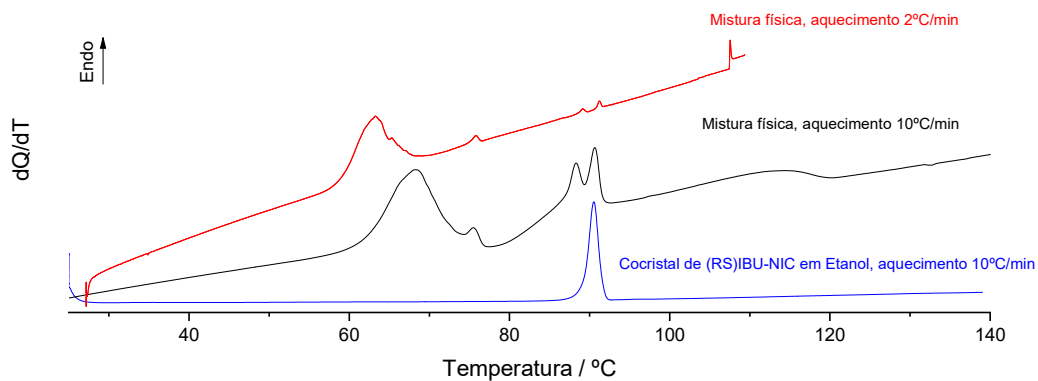


Figura 41. Comparação entre o termograma DSC do cocrystal (RS)IBU-NIC puro e os termogramas de misturas físicas de (RS)IBU e NIC, aquecidos a velocidades de 2 e 10 °C/min.

Os ensaios “top-down” com o cocrystal destacam também o papel da constituição das soluções que contêm o estabilizador, com a variação do seu efeito consoante o grau de diluição.

Este conjunto de observações, permite identificar problemas relacionados com os modelos de cocrystal em estudo e a natureza e concentração dos estabilizadores, como variáveis a ter em conta nos ensaios seguintes. Como veremos na secção seguinte, o tempo de moagem será um outro problema a considerar para a síntese de nanococrystalais.

3.1.2 LAG: (S)NPX-NIC, otimização da formação do cocrystal *in situ*

Os resultados até agora apresentados, tornam óbvia a dependência da aplicação de LAG, no contexto proposto, de um conjunto de variáveis, entre as quais, o tipo e quantidade de estabilizador introduzido nos vasos do moinho, focos centrais dos ensaios anteriores.

Para além destes, também o tempo de duração dos ensaios poderá desempenhar um papel de extrema importância na diminuição do tamanho dos cocrystalis, devido à variação do tempo de exposição a forças de índole mecânica.

3.1.2.1 LAG: dependência do tempo de moagem

O sistema (S)NPX-NIC foi escolhido para os estudos adicionais, devido aos problemas associados à aplicação desta técnica ao sistema (RS)IBU-NIC.

Assim, o intuito dos ensaios apresentados nesta secção, seria determinar o efeito do aumento do tempo de moagem na obtenção de nanococrystalis produzidos *in situ*, com o aumento dos 30 para os 90 min de reação. Definiu-se o modelo naproxeno como ponto de partida para este estudo, de forma a permitir a comparação com os resultados previamente obtidos, apresentando-se as condições utilizadas na Tabela 12.

Tabela 12. Condições de obtenção de nanococrystalis do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG com alteração do tempo de moagem.^{a)}

Sólidos de partida / g	Volume de solução/dispersão de surfactante em etanol / μ l	Estabilizador / % V/V	Tempo / min
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0152	10	25% Span 85	30
(S)NPX – 0,0552 NIC – 0,0150	10	25% Span 85	90
(S)NPX – 0,0551 NIC – 0,0151	10	25% Tween 85	90

a) Vasos e esferas de aço, 30 Hz.

Caracterização dos sólidos obtidos

A caracterização dos compostos obtidos revela a formação dos cocrystalis pretendidos, tal como esperado. Os espetros de IV e os termogramas relativos a estas amostras podem ser observados em anexo nas Figuras A5 e A6, os respetivos parâmetros termodinâmicos encontram-se na Tabela A9 (Anexo VI).

Tamanho de partículas

Na Figura 42 apresentam-se as imagens obtidas por SEM correspondentes aos ensaios com Span e Tween 85, comparando-se as mesmas com as imagens já analisadas referentes à moagem apenas em etanol e aos ensaios de LAG realizados durante 30 min, com a mesma quantidade catalítica da solução de Span 85.

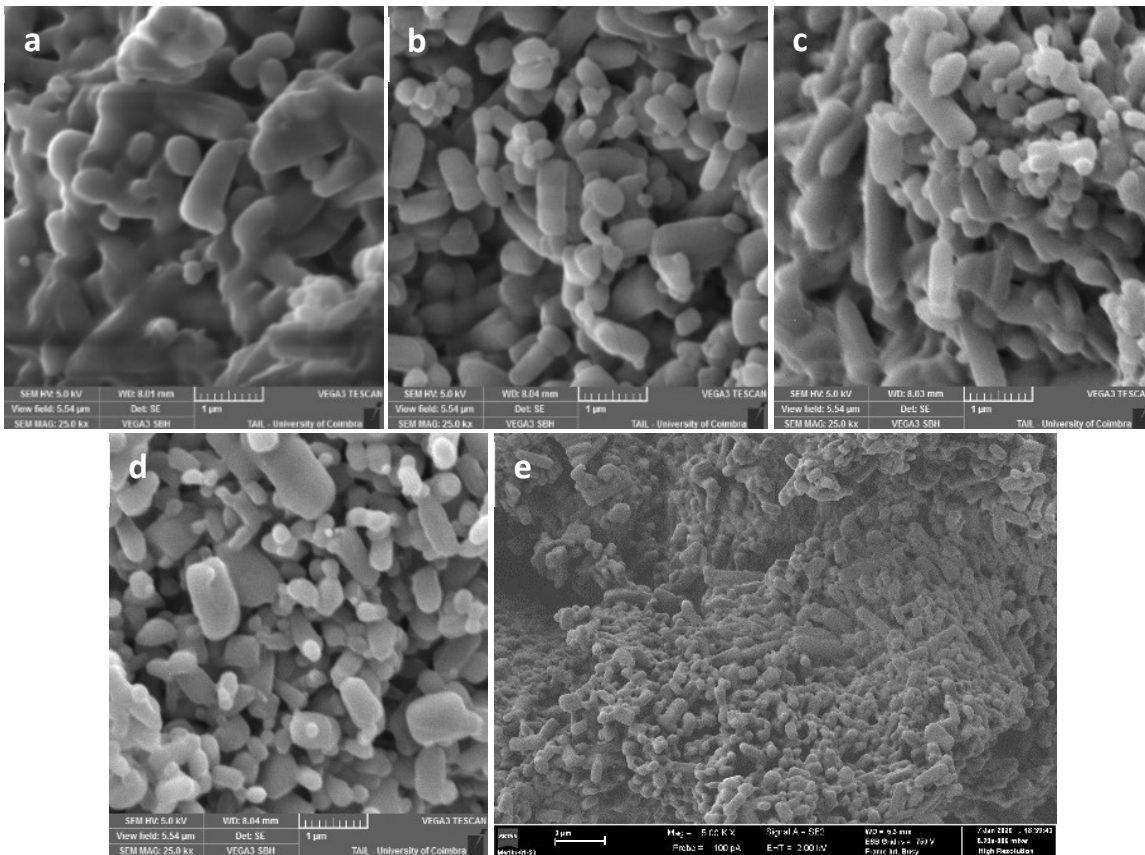


Figura 42. Imagens obtidas por SEM/FESEM referentes às amostras de cocrystal (S)NPX-NIC, obtidas por LAG com diferentes tempos de moagem: (a) etanol – 30 min; (b) 10 µl Span 85 – 30 min; (c) 10 µl Span 85 – 90 min; (d) 10 µl Tween 85 – 90 min; (e) 10 µl Span 85 – 30 min (2º ensaio). Ampliação SEM: 25000x; FESEM: 5000x.

As imagens adquiridas por SEM correspondem a ampliações de 25000x, enquanto que a de FESEM apenas foi ampliada 5000x e possibilita uma visualização mais ampla das partículas presentes na amostra. As restantes ampliações encontram-se retratadas em anexo na Tabela A10 (Anexo VI).

A comparação da imagem (a), representativa dos cocrystal obtidos com recurso a LAG, mas na ausência de surfactante, com as restantes imagens apresentadas, permite confirmar uma redução efetiva do tamanho das partículas das amostras, tal como se esperava, de acordo com os resultados obtidos até ao momento. Do mesmo modo, as imagens (b) e (e) confirmam novamente a reprodutibilidade da técnica, com a obtenção de uma distribuição de tamanhos semelhante para amostras expostas às mesmas condições de moagem, com quantidades catalíticas de uma solução de 25% de Span 85 em etanol.

O aumento do tempo de moagem não apresenta melhorias significativas na redução do tamanho de partículas e na diminuição da sua heterogeneidade, tal como se observa através da comparação entre as imagens (b), (c) e (e), em que a segunda corresponde a uma aplicação de forças mecânicas com um incremento de 60 min em relação às outras duas.

Estas experiências, em que também se alterou a natureza do surfactante, provaram ser bastante úteis para a compreensão do funcionamento da técnica. A observação cuidada das imagens (c) e (d), ambas relativas a moagens de 90 min, mas com surfactantes diferentes, permitem distinguir partículas com

morfologias diferentes, de maneira semelhante ao que se tinha verificado na secção 3.1.1.2, no caso do (RS)IBU-NIC (Figura 36).

Os dados sugerem que, de facto, o Span e o Tween 85 terão efeitos diferentes na estabilização dos nanocristais, com a propensão para o crescimento dos mesmos em orientações preferenciais, o que permite definir como hipótese a mistura destes surfactantes para o bloqueio mais eficiente da agregação e consequente crescimento destas estruturas.

No entanto, não pode ser ignorado o facto de que estas imagens são representações que não permitem a observação de vários ângulos de uma mesma partícula, e que, portanto, não garantem a veracidade das observações mencionadas, pelo que impera a necessidade da realização de testes que permitam a confirmação da teoria proposta.

3.1.2.2 LAG, formação de cocrystal *in situ*: mistura de surfactantes

A questão relativa à utilização de misturas de surfactante para estabilização dos nanocristais abre portas a um conjunto extremamente alargado de possibilidades, no que toca à composição de tais estabilizadores.

De forma a perceber a sua eficácia, era necessário estabelecer um ponto de partida, que permitisse uma evolução gradual na direção da obtenção das condições ótimas para a aplicação desta estratégia. Definiu-se, então, que se iria começar por misturas constituídas por percentagens equivalentes dos surfactantes, mantendo a adição dos 10 µl que tem vindo a ser utilizada, o que deu origem aos sistemas que se apresentam na Tabela 13.

Tabela 13. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG na presença de percentagens equivalentes de surfactantes em solução.^{a)}

Sólidos de partida / g	Span 85 % V/V	Tween 85 / % V/V
(S)NPX – 0,0551 NIC – 0,0151	5 µl 25% em etanol	5 µl 25% em etanol
(S)NPX – 0,0552 NIC – 0,0156	5 µl 50% em etanol	5 µl 50% em etanol
(S)NPX – 0,0551 NIC – 0,0153	5 µl 75% em etanol	5 µl 75% em etanol

a) Vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

A caracterização completa dos compostos obtidos encontra-se em anexo, na Tabela A11 e nas Figuras A7, A8 e A9. Os dados apresentados indicam a formação das estruturas correspondentes ao modelo utilizado, o que viabiliza a obtenção das imagens por microscopia eletrónica, apresentadas na Figura 43, todas correspondentes a ampliações de 25000 vezes. As imagens das restantes ampliações poderão ser observadas em anexo na Tabela A12 (Anexo VII).

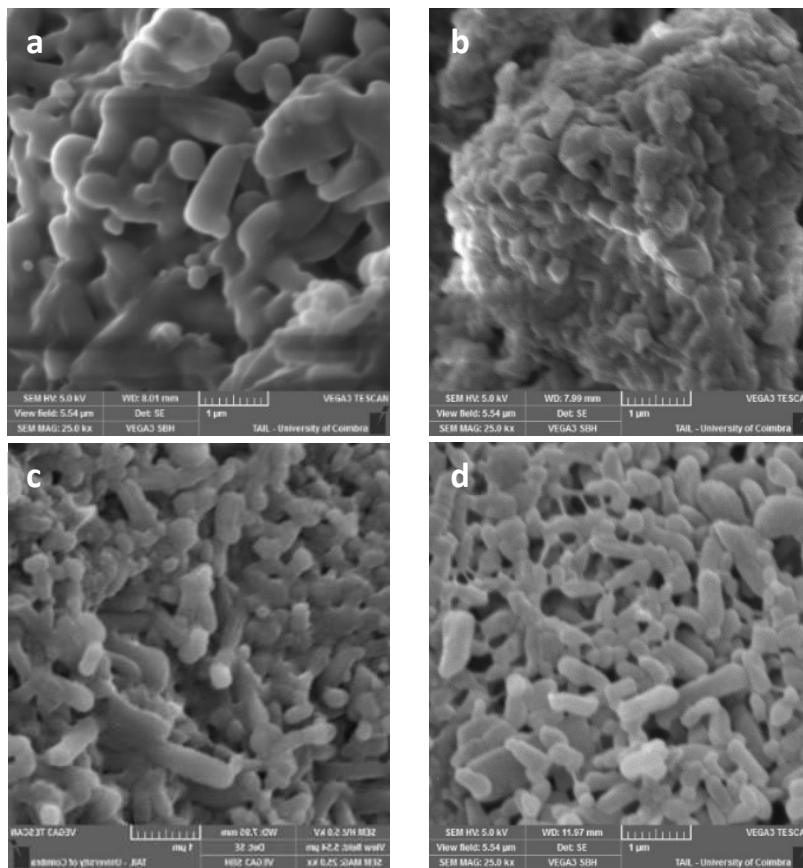


Figura 43. Imagens obtidas por SEM, referentes às amostras de cocristal (S)NPX-NIC, obtidas por LAG na presença das misturas de surfactante: (a) referência, apenas com etanol; (b) 12,5% Span 85 e Tween 85; (c) 25% Span 85 e Tween 85; (d) 37,5 % Span 85 e Tween 85 Ampliação: 25000x

Recorre-se, mais uma vez, à imagem (a) como imagem de referência, para a comparação do efeito da moagem com e sem os estabilizadores em causa, através da qual se percebe uma melhoria clara, sobretudo na agregação das partículas que compõem as amostras representadas nas imagens (c) e (d).

A conclusão a retirar destes ensaios é que a concentração ótima dos surfactantes em causa estará algures entre os 25% e os 37,5% de cada surfactante, uma vez que na imagem (b), correspondente à amostra com adição de 12,5% de cada surfactante, são observados blocos compactos de partículas, e na imagem (d) é possível observar o início da agregação das mesmas, com o aparecimento de pequenos fios de surfactante que as unem, resultantes da adição de 75% em volume de cada um dos estabilizadores.

No seguimento dos ensaios anteriores, foram realizadas moagens em que se adicionou novas misturas dos surfactantes, com o objetivo de otimizar o processo descrito, o que levou à obtenção dos sistemas apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG correspondentes à otimização da aplicação da mistura de surfactantes.^{a)}

Sólidos de partida / g	Span 85 / % V/V	Tween 85 / % V/V
(S)NPX – 0,0549 NIC – 0,0153	5 µl 75% em etanol	5 µl 40% em etanol
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0153	5 µl 75% em etanol	5 µl 50% em etanol
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0153	5 µl 75% em etanol	5 µl 60% em etanol

a) Vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

Optou-se pela manutenção dos 75% de Span 85, uma vez que, ao longo do projeto, este apresentou melhores resultados que o Tween 85, o que implica que, a ter ambos os surfactantes em quantidades diferentes, fará sentido que o primeiro seja o que se apresenta em maiores quantidades. A variação da percentagem de Tween permite, em teoria, a visualização do impacto real deste surfactante nas amostras.

Como não poderia deixar de ser, confirmou-se a presença dos cocristais correspondentes ao modelo escolhido, através das análises por espectroscopia IV, DSC e XRPD, cujos respetivos resultados se apresentam em anexo nas Figuras A7, A8, A9 e na Tabela A11 (Anexo VII), o que permitiu a recolha das imagens destas amostras por microscopia eletrónica, apresentadas na Figura 44.

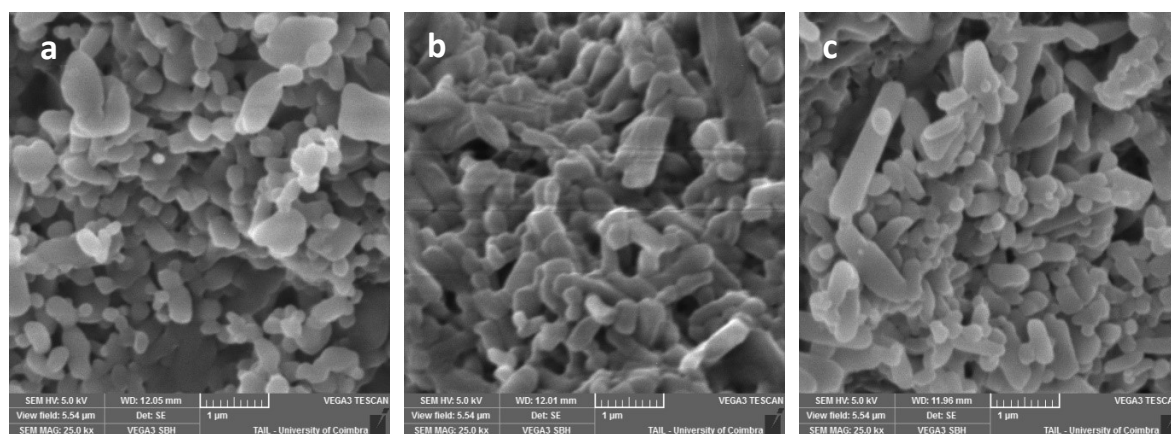


Figura 44. Imagens obtidas por SEM, referentes às amostras do cocristal (S)NPX-NIC, obtidas por LAG na presença das misturas de surfactante: (a) 37,5% Span 85 e 20% Tween 85; (b) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85; (c) 37,5% Span 85 e 30% Tween 85. Ampliação: 25000x.

Estas imagens correspondem a ampliações de 25000 vezes, e para o caso das amostras em que foram adicionados 40% e 60% do segundo surfactante, foram recolhidas 2 meses após a realização do processo de moagem que lhes deu origem, o que comprova a sua estabilidade durante este período de tempo. As restantes ampliações podem ser observadas em anexo na Tabela A13 (Anexo VII).

Comparativamente com as misturas analisadas anteriormente, neste caso a agregação é muito menos significativa, com a presença de partículas com os tamanhos pretendidos perfeitamente distinguíveis

e em boa quantidade nas três imagens, apesar de na imagem (c) já se distinguirem partículas de maiores dimensões, que fazem aumentar a heterogeneidade de tamanhos das mesmas.

Nas imagens (a) e (b) nota-se uma diminuição da heterogeneidade, que tem vindo a ser destacada como um problema intrínseco à aplicação desta técnica. A observação de várias zonas de ambas as amostras aparenta confirmar um número reduzido de partículas com tamanhos superiores a 1000 nm, o que implica o sucesso na síntese de nanocristais deste composto.

Na Figura 45 apresenta-se uma comparação entre as imagens de partículas estabilizadas com estas misturas de surfactantes e de partículas do mesmo modelo, estabilizadas apenas com uma solução de 25% Span 85 em etanol, correspondente à amostra que se tinha revelado extremamente promissora na secção 3.1.1.2.

Conclui-se que de facto, as misturas de surfactante têm um impacto mais significativo na estabilização dos nanocristais de (S)NPX-NIC, impedindo a sua agregação e possibilitando a presença de partículas com tamanhos até aos 1000 nanómetros em grandes quantidades, pelo que, estas serão as melhores condições encontradas para a obtenção dos compostos pretendidos através desta técnica.

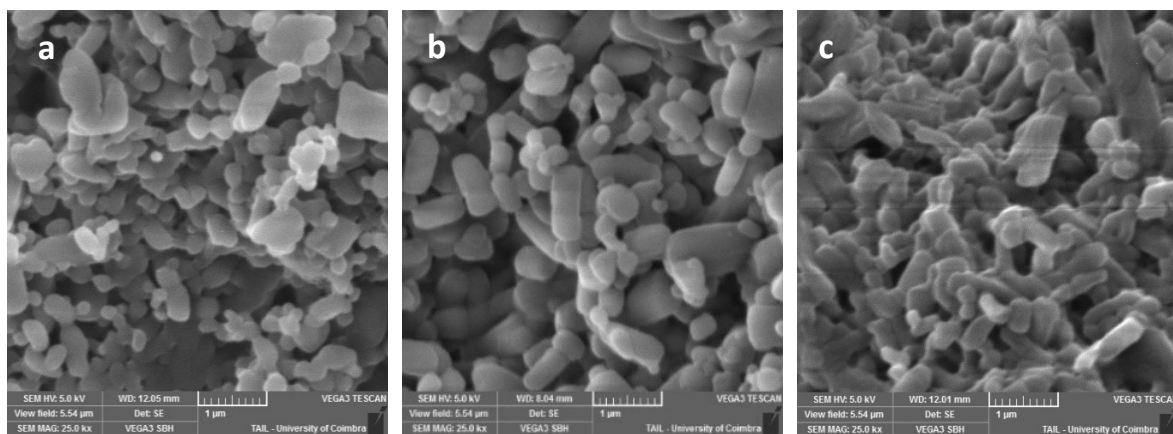


Figura 45. Comparação entre as imagens SEM referentes às amostras obtidas por LAG na presença das misturas de surfactante e na presença apenas de Span 85: (a) 37,5% Span 85 e 20% Tween 85; (b) 25% Span 85; (c) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85. Ampliação: 25000x

3.1.2.3 LAG: vasos de óxido de zircónio

Todos os ensaios realizados até ao momento foram levados a cabo com recurso a vasos de aço, onde foram inseridas esferas do mesmo material. Existe a possibilidade de contaminação das amostras com metal proveniente da degradação destes materiais durante o processo de moagem, pelo que seria vantajoso encontrar outro tipo de vasos que contornassem este problema, mantendo ou mesmo melhorando o processo de síntese de nanocristais.

É com este intuito que surge a hipótese de substituição do aço pelo óxido de zircónio, uma vez que este é um material mais resistente e durador, o que não só reduz o seu nível de degradação ao longo do tempo, como também gera mais força durante o processo de moagem, possibilitando o aumento do rendimento deste processo. A aquisição do equipamento pelo grupo de investigação, foi concretizada durante a realização deste trabalho.

Tendo em conta todos os resultados obtidos, os ensaios foram realizados utilizando o cocrystal (S)NPX-NIC, estabilizado com 10 µl de uma solução de 25% de Span 85 em etanol (secção 3.1.1.2) e do mesmo cocrystal estabilizado com a mistura de surfactantes composta por 5 µl de uma solução de 75% de Span 85 e 5 µl de uma solução de 50% de Tween 85, ambas em etanol (Tabela 15), de forma a tentar reproduzir os resultados obtidos na secção anterior.

Tabela 15. Condições de obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios LAG (30 Hz, 30 min), com utilização de vasos de óxido de zircónio.

Sólidos de partida / g	Span 85 / % V/V	Tween 85 / % V/V
(S)NPX – 0,0553 NIC – 0,0153	10 µl 25% em etanol	-
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0153	5 µl 75% em etanol	5 µl 50 % em etanol

No Anexo VIII, apresenta-se toda a caracterização que confirma a obtenção do cocrystal correspondente a este modelo, nas Figuras A10, A11 e A12 e na Tabela A14. Na Figura 46 observam-se as imagens obtidas por SEM relativas a estas amostras, sendo que todas as ampliações obtidas se encontram representadas em anexo na Tabela A15.

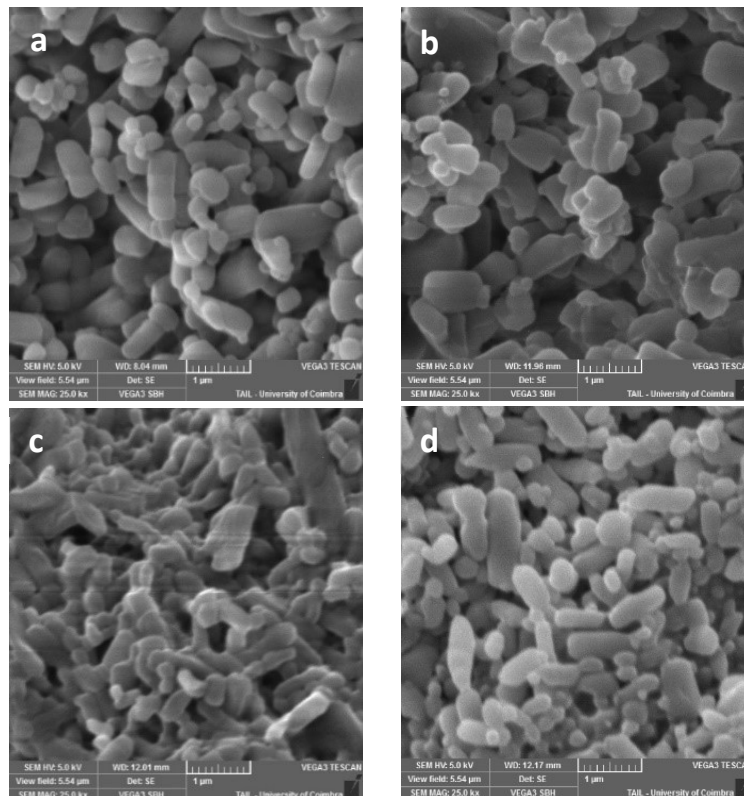


Figura 46. Comparação entre as imagens SEM referentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC obtidas por LAG com vasos de aço e com vasos de ZrO₂: (a) 25% Span 85; (b) 25% Span 85 – ZrO₂; (c) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85; (d) 37,5% Span 85 e 25% Tween 85 – ZrO₂. Ampliações: 25000x.

As imagens comprovam, mais uma vez, uma percentagem superior de nanocristais na amostra em que se utilizou a mistura de surfactantes como estabilizador, o que implica que estes estabilizam, efetivamente, partículas até aos 1000 nm de forma eficiente.

Não se observam diferenças significativas no tamanho das partículas obtidas com a utilização dos vasos de aço e de ZrO, no entanto, este último material pode ser utilizado para evitar a contaminação das amostras devido à sua durabilidade e resistência ao desgaste.

Para confirmar o sucesso da obtenção dos nanocristais e determinar a predominância destes nas amostras, exige-se a realização de análises quantitativas, que permitam a perceção dos tamanhos das partículas sintetizadas. Inicialmente, ponderou-se a aplicação de “dynamic light scattering”, DLS, para este efeito, no entanto, neste caso em concreto, esta técnica apresenta alguns problemas relacionados com o meio de dispersão, nomeadamente a manutenção da estabilidade do cocrystal e o impedimento da sedimentação de partículas do mesmo.

Em alternativa, optou-se pela utilização do método de determinação de tamanhos por difração com laser, LD, uma vez que esta é independente dos movimentos Brownianos, o que evita o problema da sedimentação, isolando a estabilidade do cocrystal como única barreira à sua aplicação. Assim, determinou-se a utilização de uma solução aquosa saturada com nicotinamida e (S)-naproxeno como meio dispersante. O método de preparação desta solução encontra-se explicado no Anexo VIII, juntamente com o difratograma que comprova a estabilidade do cocrystal na mesma.

Os resultados da aplicação desta técnica encontram-se representados na Figura 47. Os dados fornecidos permitem uma perceção da homogeneidade das amostras, através da distribuição por tamanhos, de acordo com o volume ocupado por cada uma das partículas.

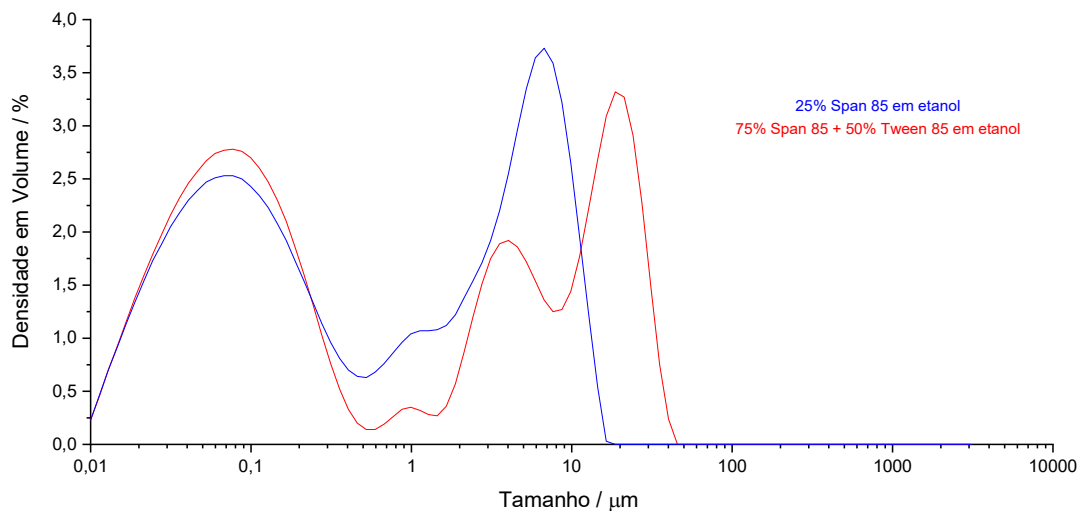


Figura 47. Gráfico da densidade de partículas em volume, em função do seu tamanho para as amostras de nanopartículas de (S)NPX-NIC obtidas por LAG em vasos de ZrO, respetivamente estabilizadas por uma solução de Span 85 e por uma mistura de Span 85 + Tween 85.

Utiliza-se uma escala logarítmica no eixo das abcissas por uma questão de simplificação da análise dos resultados, devido à grande diferença na ordem de grandeza do tamanho das partículas presentes.

A informação complementar a este gráfico expõe-se na Tabela 16, relativamente aos percentis (Dv) de 10, 50 e 90 %, que dizem respeito à distribuição de tamanhos para a respetiva percentagem de volume total.

Tabela 16. Percentis de 10, 50 e 90% do volume total, representativos dos tamanhos de partículas presentes nas amostras.

Percentis	Tamanho de partículas / nm	
	25% Span 85 em etanol	75% Span 85 + 50% Tween 85 em etanol
Dv (10)	31,6	31,1
Dv (50)	408	266
Dv (90)	8560	22000

O conjunto de dados apresentados permite confirmar a síntese de nanocristais, tal como já tinha sido observado com recurso às imagens obtidas por SEM, com uma prevalência de maiores quantidades de partículas de menores dimensões na amostra estabilizada com a mistura de surfactantes. Os valores obtidos para o Dv (50) indicam claramente uma diferença significativa entre os tamanhos máximos das partículas presentes em 50% do volume total da amostra, com vantagem clara para a amostra estabilizada com essa mistura, o que vai de encontro às conclusões retiradas até este momento.

No entanto, contrariamente ao observado nas imagens da Figura 46, são também detetadas partículas de grandes dimensões, sendo que, apesar de se encontrarem em menores quantidades, de acordo com o Dv (90), estas terão maiores dimensões para o caso da mistura de surfactantes, o que significaria que as partículas estabilizadas por Span 85 teriam uma distribuição mais homogénea de tamanhos, facto que é corroborado pelas populações detetadas no gráfico da Figura 47.

Estas observações poderão advir da formação de agregados de partículas de pequenas dimensões na dispersão, que originam blocos de maiores dimensões e que por sua vez são medidos e considerados como uma partícula única. Como a medição do tamanho de partículas foi realizada em função do volume total da amostra, o peso destes agregados é muito superior ao das partículas com diâmetros de ordens de grandeza inferiores, o que promove a observação de sinais com densidade em volume elevada.

É ainda importante ter em conta que, a presença de grandes quantidades de partículas com tamanhos muito pequenos quando comparados com o comprimento de onda da radiação incidente, poderá pôr em causa a aplicação da teoria de Mie para a determinação do tamanho das mesmas, atingindo-se um ponto crítico na utilização do índice de refração do material, que poderá afetar os valores medidos.²⁰⁷

Assim, mesmo que afetada pelo problema da agregação em dispersão, a LD permite, em conjunto com as análises por SEM, confirmar o sucesso na obtenção de nanocristais de (S)NPX-NIC, com vantagens na utilização das misturas de surfactante na estabilização das partículas de pequenas dimensões, obtidas por processos de moagem assistida.

3.2 Síntese de nanocristais: moagem assistida por polímeros

A procura da obtenção de partículas com uma gama mais homogénea de tamanhos na ordem dos nanómetros, levou à ponderação das variáveis referidas nas secções anteriores, de forma a perceber qual a melhor alternativa para a resolução do problema em causa.

Apesar dos problemas detetados, o LAG demonstrou capacidade de redução do tamanho de partículas para dimensões satisfatórias, pelo que o caminho natural seria optar por novos estabilizadores, que permitissem o aumento da estabilidade, e conseqüentemente, amostras mais homogéneas e com os tamanhos pretendidos.

Surgem, então, os polímeros como alternativa aos surfactantes até agora utilizados, com a escolha a recair sobre o PEG e o PVP.

3.2.1 Moagem assistida por polímero: PVP K30

A ideia por trás desta técnica seria substituir a solução de surfactante pela adição do polímero, através de um procedimento idêntico ao utilizado durante os ensaios de produção de nanocristais com recurso a LAG.

O modelo de (S)NPX com NIC foi selecionado para estes ensaios, mantendo-se os mesmos cuidados relativamente aos ensaios anteriores, para a obtenção do cocrystal puro, *in situ*. As percentagens de polímero foram definidas, dentro das gamas indicadas na literatura,²⁰⁸ de forma a abranger um leque suficiente de estabilizador que permitisse uma observação da evolução do sistema em função desta variável, com as massas pesadas a estarem dependentes da massa total de sólido a colocar no interior dos vasos de moagem.

As condições utilizadas para os ensaios de moagem assistida por polímero com recurso ao PVP K30 encontram-se descritas na Tabela 17.

Tabela 17. Condições para a obtenção de nanocristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios de moagem assistida por polímero com recurso a PVP K30.^{a)}

Sólidos de partida / g	PVP K30 / mg (% m/m)
(S)NPX – 0,0547 NIC – 0,0148	0,8 (1)
(S)NPX – 0,0552 NIC – 0,0152	3,4 (5)
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0152	7,1 (10)
(S)NPX – 0,0552 NIC – 0,0148	20,9 (30)

a) Moagem realizada com recurso a vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

Caracterização dos sólidos obtidos

ATR-FTIR

Uma vez que as percentagens de polímero selecionadas abrangem valores que representam massas significativas em comparação com a massa total de composto no interior dos vasos, é necessário proceder à sua caracterização completa, de forma a distinguir possíveis alterações na análise do sistema, provenientes da presença dos mesmos.

Assim, na Figura 48 apresentam-se os espectros de IV relativos aos possíveis nanocristais obtidos, juntamente com os espectros dos compostos de partida e do PVP K30 adicionado como estabilizador.

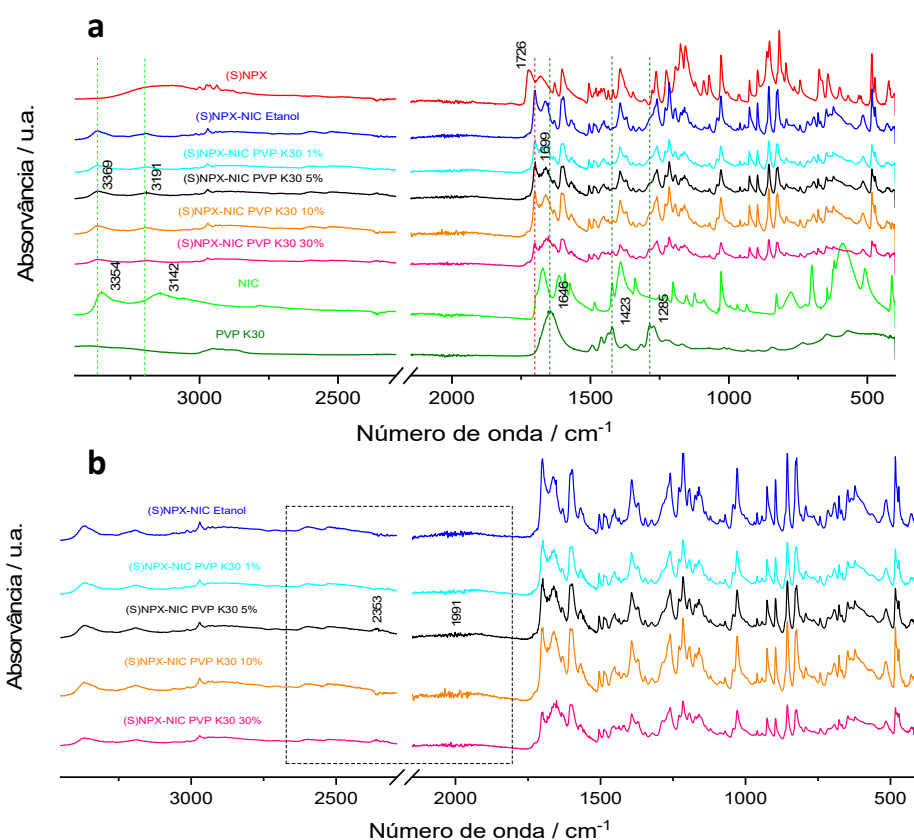


Figura 48. Espectros IV das amostras de (S)NPX-NIC resultantes de moagem assistida por PVP K30: (a) comparação entre os compostos de partida e os produtos finais; (b) espectros dos produtos finais; --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do NH₂; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- formação dos sinais correspondentes a pontes de hidrogénio, COOH...N_{aromático}; --- sinais típicos do PVP K30.

Os espectros apresentados permitem confirmar a formação dos cocrystal pretendidos, com a visualização dos desvios das bandas correspondentes às elongações assimétricas e simétricas do grupo NH₂ da nicotinamida (elongação assimétrica: 3354-3369 cm⁻¹; elongação simétrica: 3354-3369 cm⁻¹), e das bandas correspondentes ao grupo C=O (1726-1699 cm⁻¹), presentes no (S)-naproxeno (Figura 48a). Na Figura 48b observa-se o aparecimento de bandas por volta de 2353 e de 1991 cm⁻¹, característicos da formação de pontes

de hidrogénio entre o azoto aromático da nicotinamida e o grupo C=O do (*S*)-naproxeno, como referido na secção 3.1.1.2.

A Figura 48 permite ainda observar a presença de PVP K30 nas amostras dos cocrystal obtidos por moagem assistida, através da presença de bandas correspondentes aos máximos de 1285, 1423 e 1646 cm^{-1} , característicos do polímero e que não se encontra no espetro do cocrystal puro. Verifica-se ainda, como esperado, o aumento da intensidade relativa destas bandas com o aumento da concentração do estabilizador.

DSC

Os termogramas das amostras em estudo encontram-se representados na Figura 49 juntamente com os dos compostos de partida e o do estabilizador utilizado. Na Tabela 18 reúnem-se os parâmetros termodinâmicos relativos às mesmas.

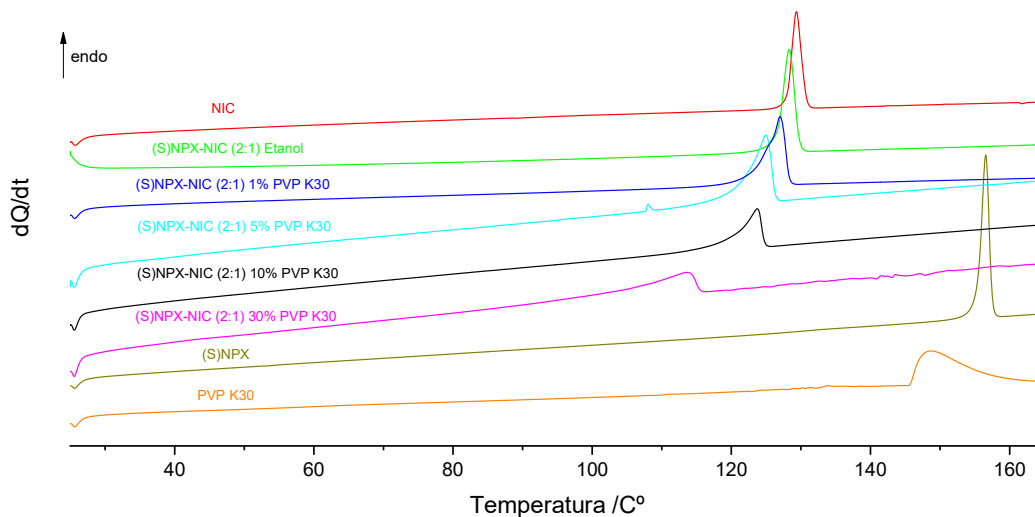


Figura 49. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida, com o do estabilizador e dos sólidos de (*S*)NPX-NIC obtidos por moagem assistida por PVP K30.

Contrariamente ao que tem vindo a ser observado, verificam-se variações nos termogramas, e, consequentemente, nos parâmetros termodinâmicos das amostras em causa, uma vez que, com o aumento da concentração de PVP K30, as temperaturas de *onset* passam para valores mais baixos, e os picos endotérmicos observados alargam.

O abaixamento da temperatura de fusão e alongamento dos picos resulta do PVP K30, que tudo indica estar na forma de hidrato,²⁰⁹ atuar como impureza no sistema.

Tabela 18. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC estabilizados por PVP K30, bem como dos compostos de partida e do polímero utilizado para obtenção dos nanocristais.

	$T_{fus} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{fus}H / \text{J g}^{-1}$
NIC	128,1	190
(S)NPX-NIC Etanol	126,1	128
(S)NPX-NIC 1 % PVP K30	124,5	120
(S)NPX-NIC 5 % PVP K30	121,1	98
(S)NPX-NIC 10 % PVP K30	120,0	96
(S)NPX-NIC 30 % PVP K30	102,9	56
(S)NPX	155,3	142

Esta análise levanta a questão da viabilidade da utilização do PVP K30 como estabilizador ótimo para o controlo da agregação e do crescimento de partículas dos sistemas em causa, uma vez que o hidrato poderá influenciar a estabilidade dos cocristais devido à elevada solubilidade da NIC em água, com a possibilidade de separação dos componentes do cocristal e consequente destruição dos nanocristais sintetizados no processo de moagem.

XRPD

Para concluir a caracterização das amostras, apresentam-se os difratogramas das mesmas na Figura 50, em moldes semelhantes ao que se verifica nas técnicas anteriores.

Espera-se que o difratograma do polímero utilizado seja representativo de uma amostra amorfa ou com um grau de cristalinidade muito baixo. Este fator poderá ter influência nos difratogramas dos produtos obtidos por moagem, justificando possíveis diferenças relativamente aos resultados dos sistemas anteriores.

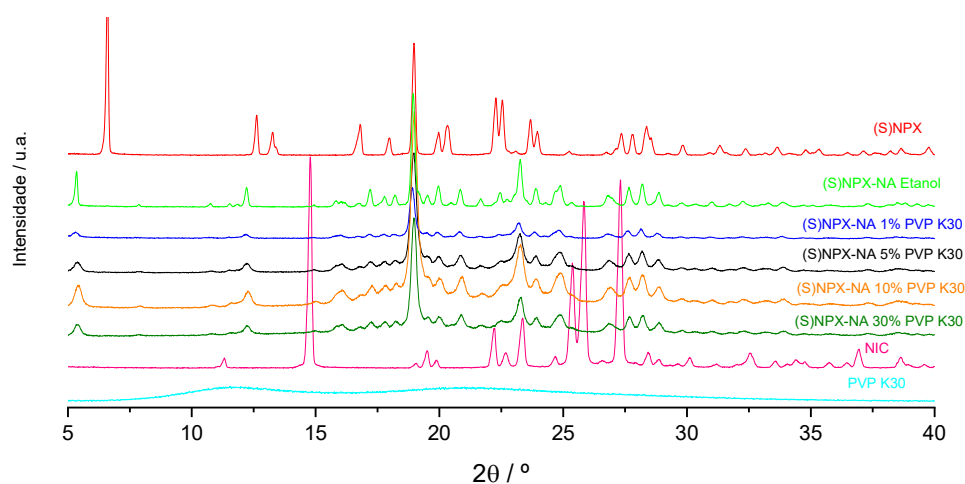


Figura 50. Difratogramas de raios-X de pó dos cocristais de (S)NPX-NIC, obtidos por moagem assistida por PVP K30, dos compostos de partida que lhes deram origem e do PVP K30.

Os difratogramas expostos confirmam o estado maioritariamente amorfo do PVP K30, não se verificando alterações significativas nos difratogramas dos cocristais obtidos por moagem, uma vez que estes são sobreponíveis com o difratograma do cocristal puro.

Os espectros de IV, juntamente com os difratogramas resultantes da aplicação de difração de raios-X, sugerem a formação do cocristal pretendido, sem excessos dos compostos de partida. Deste modo, estaríamos em condições de prosseguir para a obtenção de imagens por microscopia eletrónica, porém, os termogramas sugerem a alteração do sistema devido à presença de um hidrato do polímero, o que poderá ser um problema para a estabilidade do nanococristal.

A utilização do PVP K30 só seria viável após retirar a água presente na sua estrutura, o que se revelou difícil, e, portanto, a sua aplicação foi descartada.

3.2.2 Moagem assistida por polímero: PEG 6000

Apesar dos problemas associados ao PVP K30, este método adivinhava-se promissor, pelo que a utilização dos polímeros não podia, ainda, ser posta em causa. Assim sendo, avançou-se com os trabalhos associados à aplicação de PEG 6000 como estabilizador na moagem assistida. Na Tabela 19 encontram-se, então, as condições utilizadas para o estudo proposto.

Tabela 19. Condições para obtenção de nanococristais do modelo (S)NPX-NIC nos ensaios de moagem assistida por polímero com recurso a PEG 6000.^{a)}

Sólidos de partida / g	Polímero / mg (% m/m)
(S)NPX – 0,0546 NIC – 0,0152	0,8 (1)
(S)NPX – 0,0548 NIC – 0,0151	0,79 (1)
(S)NPX – 0,0551 NIC – 0,0150	1,82 (2,5)
(S)NPX – 0,0550 NIC – 0,0152	3,3 (5)
(S)NPX – 0,0553 NIC – 0,0150	5,15 (7,5)
(S)NPX – 0,0555 NIC – 0,0150	7,6 (10)
(S)NPX – 0,0553 NIC – 0,0156	21,7 (30)

a) Moagem realizada com recurso a vasos e esferas de aço. 30 Hz, 30 min.

Portanto, a ideia por trás da obtenção de nanocristais com recurso a moagem assistida por polímero mantem-se relativamente aos ensaios anteriores, com a aplicação de PEG 6000 como estabilizador em condições semelhantes às utilizadas com o PVP.

Mais uma vez, selecionou-se (S)NPX-NIC como modelo de cocrystal para aplicação desta técnica, de forma a manter a coerência na linha de investigação em causa.

Caracterização dos sólidos obtidos

ATR-FTIR

Os espectros de IV apresentados na Figura 51 permitem a comparação entre os produtos da moagem, com os compostos de partida, bem como com o estabilizador utilizado. Mais uma vez, estes encontram-se expostos por ordem crescente de percentagem de polímero introduzido no sistema, para que seja possível observar o impacto do mesmo na composição do produto final.

A análise do gráfico apresentado permite concluir que ocorreu formação completa dos cocrystal correspondentes aos do modelo selecionado, com a presença dos sinais característicos do mesmo. Observa-se ainda um aumento significativo da intensidade relativa de sinais correspondentes ao PEG 6000 nos espectros dos produtos de moagem, à medida que aumenta a sua percentagem na composição do sistema. Este fenómeno pode ser facilmente detetado através das bandas observadas a 1097 e a 2885 cm^{-1} , identificados no espectro do polímero.

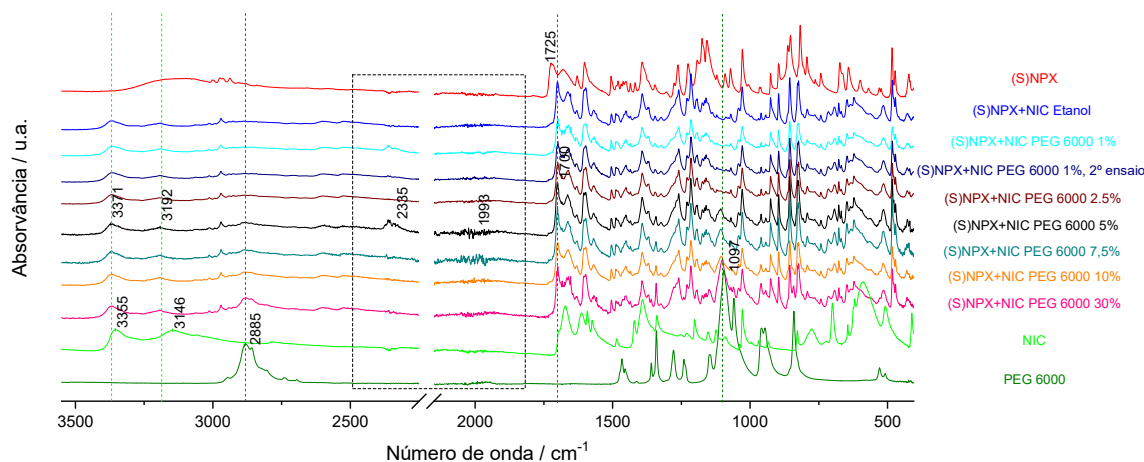


Figura 51. Espectros IV das amostras de (S)NPX-NIC resultantes de moagem assistida por PEG 6000: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do NH_2 ; --- desvio da elongação do grupo C=O ; --- formação dos sinais correspondentes a pontes de hidrogénio, $\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{aromático}}$; --- sinais típicos do PEG 6000.

DSC

Os termogramas obtidos no estudo de moagem assistida por PVP K30 revelaram a importância desta técnica analítica para o desenvolvimento do projeto, pelo que os termogramas relativos aos sistemas estabilizados com PEG 6000, presentes na Figura 52, bem como os parâmetros termodinâmicos correspondentes (Tabela 20), foram alvo de especial atenção.

Os dados apresentados corroboram as conclusões retiradas pela análise dos espectros de IV, verificando-se a formação dos cocrystal pretendidos, por comparação dos parâmetros dos compostos de partida e do cocrystal puro com os dos produtos obtidos por moagem.

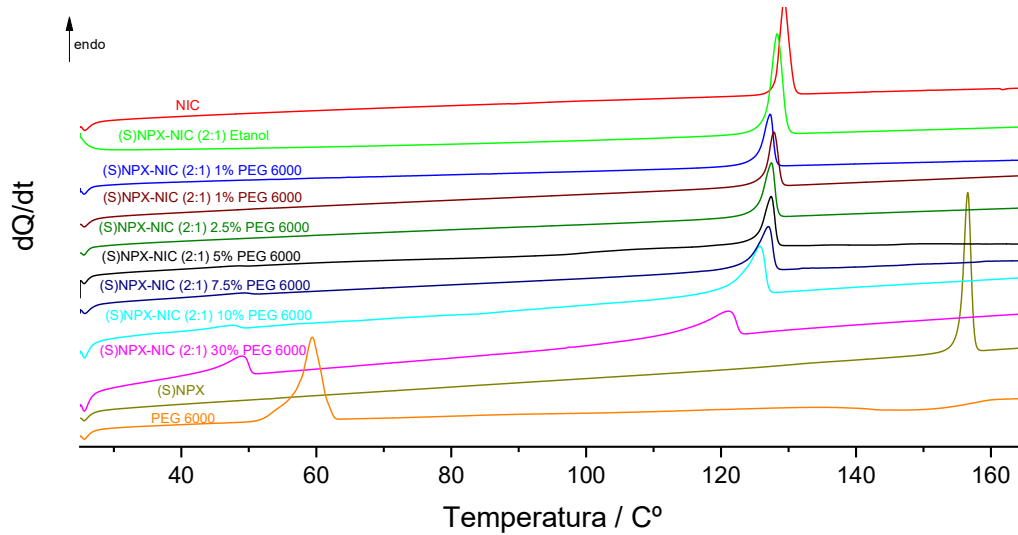


Figura 52. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida, com o do estabilizador e dos sistemas de (S)NPX-NIC obtidos por moagem assistida por PEG 6000.

Tabela 20. Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC estabilizados por PEG 6000, bem como dos compostos de partida e do polímero utilizado para obtenção dos nanococrystal.

	$T_{fus} / ^\circ C$	$\Delta_{fus}H / J g^{-1}$
NIC	128,1	190
(S)NPX-NIC Etanol	126,1	128
(S)NPX-NIC 1 % PEG 6000	125,3	101
(S)NPX-NIC 1 % PEG 6000	126,3	120
(S)NPX-NIC 2,5 % PEG 6000	125,3	123
(S)NPX-NIC 5 % PEG 6000	125,3	195
(S)NPX-NIC 7,5 % PEG 6000	123,8	107
(S)NPX-NIC 10 % PEG 6000	122,0	99
(S)NPX-NIC 30 % PEG 6000	113,3	54
(S)NPX	155,3	142
PEG 6000	56,7	186

Neste caso, os termogramas já não variam muito do esperado devido à presença do PEG 6000, com o estabilizador a atuar como uma impureza que reduz a temperatura de fusão dos cocrystal, alterando os parâmetros termodinâmicos relativamente ao cocrystal puro. Para composições em que a percentagem de polímero é mais elevada, observa-se um pico endotérmico a temperaturas mais baixas, correspondente ao PEG 6000, em concentrações suficientemente altas para ser detetável nas condições experimentais utilizadas.

Deste modo, confirma-se a obtenção da mistura pretendida, constituída pelo cocrystal formado durante a moagem e pelo PEG 6000 como estabilizador dos possíveis nanocristais presentes na amostra.

XRPD

Conclui-se a caracterização dos compostos em análise através da obtenção dos difratogramas correspondentes aos mesmos, por comparação com os compostos que lhes deram origem, apresentados na Figura 53.

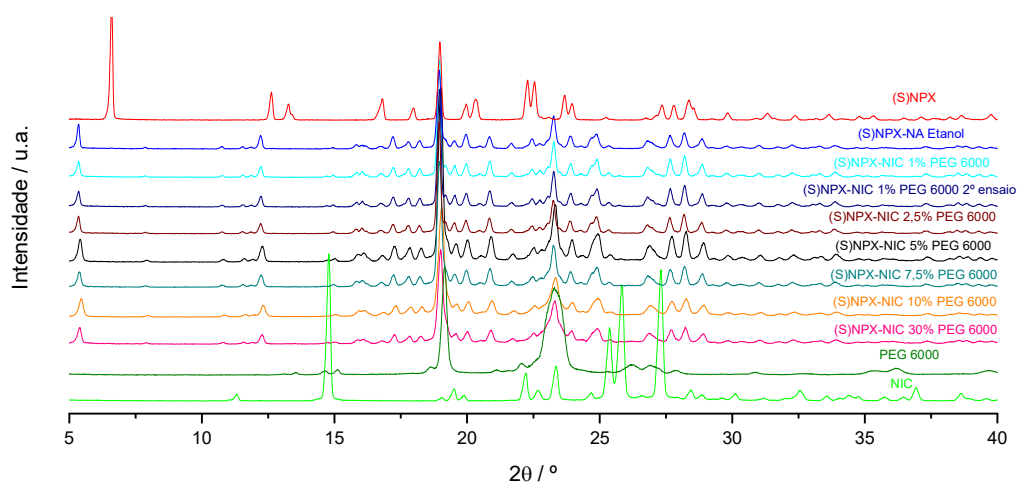


Figura 53. Difratogramas de raios-X de pó dos cocrystal de (S)NPX-NIC, dos compostos de partida que lhes deram origem e do PEG 6000, utilizado nas moagens assistidas por polímero.

De forma semelhante ao que se tem vindo a observar nos difratogramas relativos a este modelo de cocrystal, confirma-se a formação das estruturas pretendidas, através da sobreposição dos padrões de difração provenientes dos pós de cada um dos produtos de moagem.

Neste caso específico, os sinais mais intensos do PEG 6000 correspondem a valores de ângulos que também apresentam sinais nos cocrystal, pelo que é difícil de distinguir a presença do mesmo na composição das amostras.

Contrariamente ao que se verificou no caso do PVP K30, a caracterização completa destas amostras transmite a segurança necessária relativamente à obtenção dos nanocristais pretendidos, com a confirmação da obtenção da mistura do cocrystal com o estabilizador, o que viabiliza o estudo dos tamanhos das partículas nas amostras.

Tamanho de partículas

O largo espectro de concentrações de PEG 6000 utilizado nas moagens realizadas, permite um estudo demonstrativo do efeito do aumento da quantidade deste polímero na estabilização dos nanocristais. Foi com esse objetivo em mente que se procurou obter as imagens de microscopia eletrónica, com recurso a SEM e FESEM, apresentadas na Figura 54.

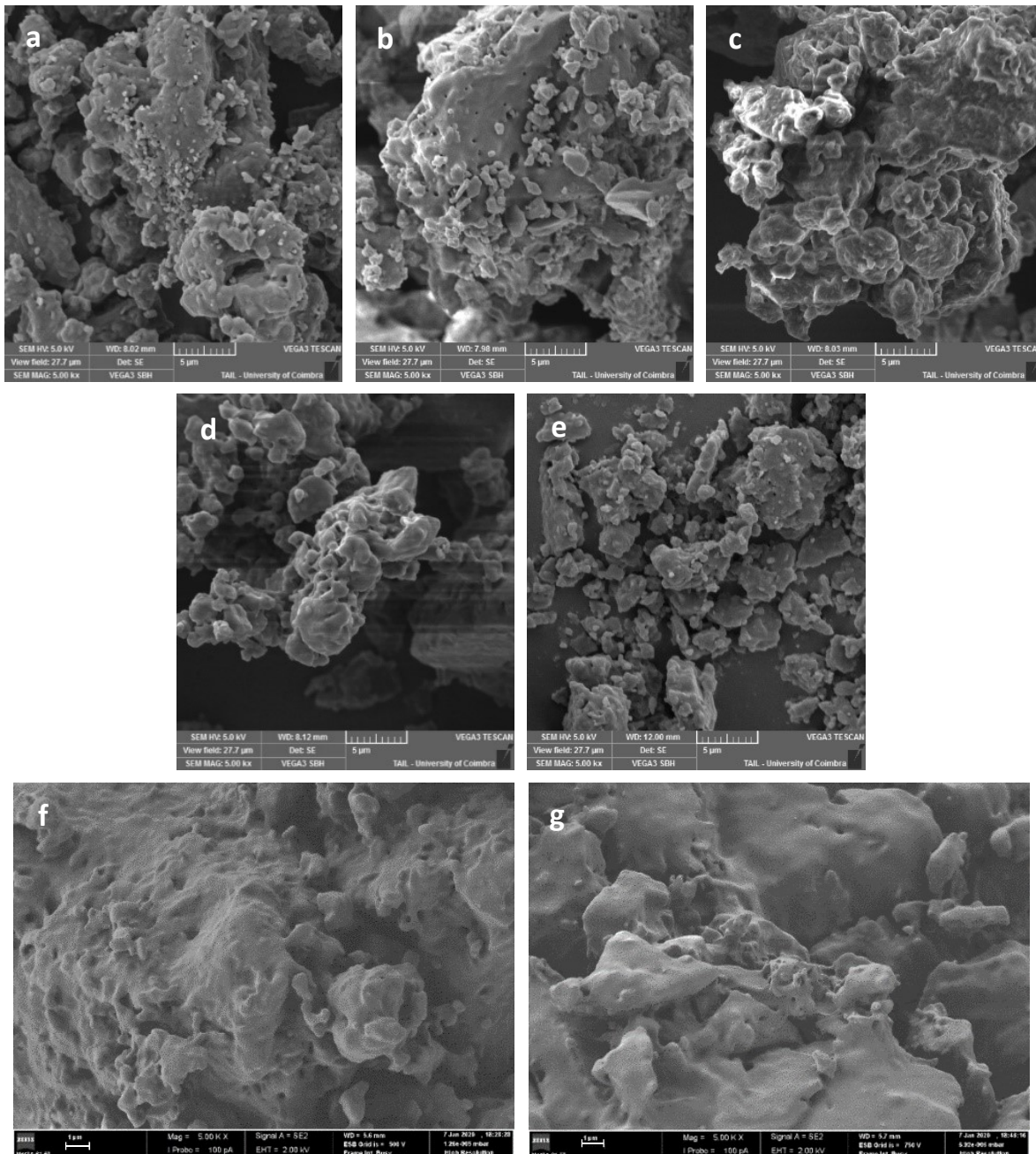


Figura 54. Imagens dos produtos da moagem assistida por PEG 6000: (a) (S/NPX-NIC (2:1), 1% PEG 6000 (SEM); (b) (S/NPX-NIC (2:1), 1% PEG 6000 (SEM) – 2º ensaio; (c) (S/NPX-NIC (2:1), 2,5% PEG 6000 (SEM); (d) (S/NPX-NIC (2:1), 5% PEG 6000 (SEM); (e) (S/NPX-NIC (2:1), 7,5% PEG 6000 (SEM); (f) (S/NPX-NIC (2:1), 10% PEG 6000 (FESEM); (g) (S/NPX-NIC (2:1), 30% PEG 6000 (FESEM). Ampliação: 5000x

As imagens encontram-se ordenadas por ordem crescente de percentagem de PEG 6000 (% m/m) adicionado ao sistema. As duas primeiras foram obtidas com recurso a SEM tradicional, enquanto que para as restantes foi utilizado um aparelho FESEM, sendo que para todas elas se recorreu a ampliações de 5000x. As restantes ampliações adquiridas durante a análise das amostras encontram-se em anexo nas Tabelas A17 e A18 (Anexo IX).

O padrão de evolução de um sistema com variação da percentagem de estabilizador é claramente observado nas imagens. As amostras (a) e (b), que contêm 1% de PEG 6000, permitem confirmar a reprodutibilidade da técnica, e apresentam, claramente, uma agregação pronunciada, com partículas de tamanhos relativamente pequenos a aparecerem misturadas com grandes blocos de composto, o que indica carência de estabilizador. Apesar do aumento para os 2,5% de PEG 6000, observam-se resultados semelhantes na imagem (c), apenas com redução de agregação.

Na imagem (d), a percentagem de PEG adicionada aumenta a redução do efeito da agregação que se tem vindo a observar, sendo que ainda se verifica formação de estruturas com um comportamento semelhante ao que se observou na secção 3.1.1.3 com o surfactante, o que poderá confirmar que o polímero ainda se encontra em quantidades abaixo das ideais, levando à interação de várias partículas com a mesma molécula de estabilizador.

A imagem (e) representa um ponto de viragem no sistema, com a presença de algumas partículas soltas rodeadas por blocos do cocrystal envolto numa camada de polímero, característica de um excesso de estabilizador. Deste modo, o aumento de estabilizador a partir deste ponto, origina estruturas como as que se apresentam nas imagens (f) e (g), onde se observa a formação de uma camada espessa que envolve todas as partículas da amostra e leva à sua agregação, impossibilitando a manutenção de nanocristais que poderiam ter-se formado durante a moagem.

As conclusões retiradas indicam que a percentagem ótima para estabilização das nanopartículas deste sistema com PEG 6000 estará entre os 5 e os 7,5% de estabilizador, relativamente à massa total de cocrystal presente, o que implicaria estudos mais aprofundados que permitissem a sua determinação. Comparando estes resultados com os que se obtiveram nas secções anteriores, facilmente se percebe a vantagem na utilização de surfactantes, nas condições estudadas, pelo que serão estes os melhores candidatos para a síntese de nanocristais com recurso a moagem.

3.3 Síntese de nanocristais: ultrassons e homogeneização mecânica

3.3.1 Ultrassons

Nas secções anteriores analisaram-se diferentes variáveis para obtenção de nanocristais, todas com uma constante em comum: a via de obtenção. No entanto, esta é também uma variável a ter em conta. Até agora, exploraram-se, maioritariamente, métodos de obtenção de nanocristais com a produção dos cocrystal *in situ*, mas há ainda uma grande margem de progressão no que toca ao estudo da aplicação de técnicas “top-down”.

Com esse objetivo em vista, procedeu-se à aplicação de ultrassons para a diminuição do tamanho de partículas, tendo em conta que este é um método em que o produto final será uma nanossuspensão, obrigatoriamente diferente dos pós que têm vindo a ser trabalhados. O método foi testado com o cocrystal (RS)IBU-NIC, para o qual os resultados obtidos por LAG não foram satisfatórios.

Para o primeiro ensaio com esta técnica, utilizaram-se 56 mg de cocristal obtido por cristalização em solução, recorrendo à informação do diagrama ternário (Figura 37, secção 3.1.1.3), dispersos em 5 ml de *n*-hexano. Este solvente foi escolhido devido à elevada pressão de vapor, permitindo a obtenção do pó por evaporação rápida.

A amostra foi colocada no banho de ultrassons, retirando-se uma alíquota da nanossuspensão obtida ao final de 30 min. Esta amostra foi posteriormente analisada por espectroscopia de IV, tendo-se obtido os espectros apresentadas na Figura 55a e b.

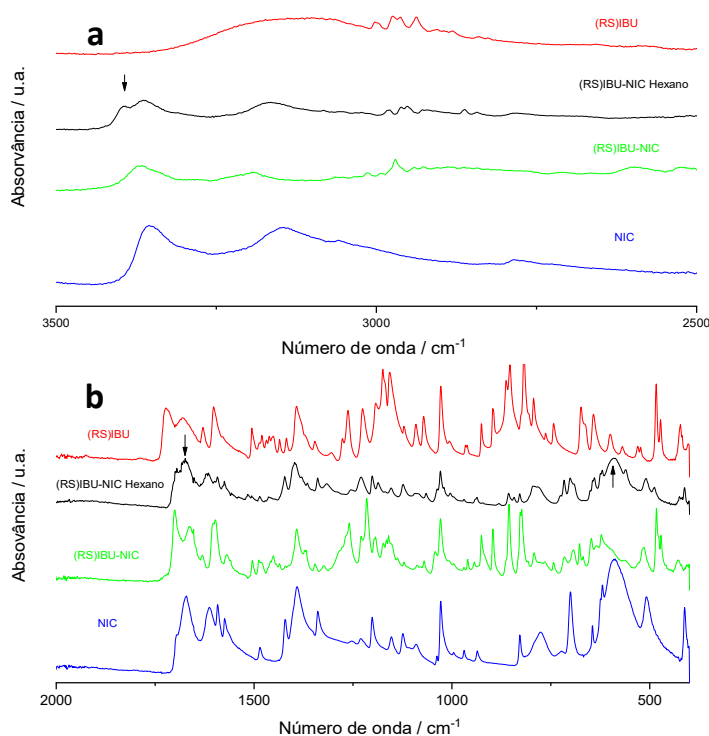


Figura 55. Espectros de IV do cocristal puro, dos seus compostos de partida, e do produto obtido por aplicação de ultrassons: (a) 3500-2500 cm⁻¹; (b) 2000-400 cm⁻¹. As setas indicam divergência entre o espectro do cocristal puro e do que foi sujeito a ultrassons.

A análise destes espectros, permite observar diferenças entre os sinais do espectro do cocristal puro, e os que correspondem aos cocristais expostos a ultrassons em *n*-hexano, identificadas pelas setas. Estas diferenças sugerem separação dos componentes do cocristal, provavelmente por dissolução do (RS)IBU devido à sua natureza apolar, e o conseqüente aparecimento de um excesso de NIC no estado sólido.

A escolha do meio de dispersão é assim identificada como mais um problema na tentativa de redução do tamanho de cocristais devido à sua estabilidade, o que inviabiliza a aplicação desta técnica, até que seja possível encontrar um meio de dispersão que permita manter o cocristal estável durante a aplicação do método. Exclui-se a hipótese de utilização da mistura de solventes conhecida do diagrama ternário deste cocristal, uma vez que esta é suscetível a alterações de composição por evaporação durante o procedimento, o que vai influenciar a estabilidade do cocristal no meio.

Com este problema identificado, a questão crucial relativamente à eficácia da utilização de ultrassons na redução do tamanho de partículas mantém-se. Deste modo, revela-se essencial a realização de ensaios

que permitam contornar o problema da estabilidade das amostras, de forma a analisar o tamanho de partículas obtido.

Achou-se que seria útil testar o método utilizando o API puro, uma vez que, neste caso, o único cuidado a ter na escolha do meio de dispersão passa pela sua capacidade para dissolver o sólido em causa. A ideia seria analisar o efeito da redução do tamanho num sistema mais simples, para depois tentar resolver o problema identificado no caso de cocristais, caso se verificasse potencial da técnica para o objetivo em estudo.

Começou por testar-se o método com (S)-naproxeno, por questões de disponibilidade do composto. Selecionou-se a água e o ciclo-hexano como dispersantes, dois líquidos de polaridades opostas. As condições de preparação das nanossuspensões encontram-se descritas na Tabela 21.

Tabela 21. Condições de preparação das nanossuspensões de (S)NPX, por exposição a ultrassons.

API	Dispersante	Estabilizador (% v/v)
50 mg (S)NPX	2,5 ml Ciclo-hexano	1% Span 85
		2% Span 85
		1% Tween 85
		2% Tween 85
50 mg (S)NPX	10 ml Água	1% Span 85
		2% Span 85

Nos primeiros ensaios, correspondentes à utilização do ciclo-hexano, as amostras foram expostas a ultrassons durante 1h 30min, com evaporação do meio dispersante no final. A ideia seria obter um pó composto por nanopartículas a partir da nanossuspensão obtida, sendo que os estabilizadores introduzidos iriam impedir a agregação do API.

Após evaporação do meio, recolheram-se espetros de IV de cada uma das amostras, apresentados na Figura 56a e b.

Os espetros apresentam algumas diferenças entre as amostras sujeitas a ultrassons e o (S)NPX puro. No entanto, a comparação dos sinais dos mesmos com os sinais dos espetros dos respetivos surfactantes, revelam que as alterações resultam da soma desses sinais, o que exclui a formação de polimorfos quer por influência do ciclo-hexano, quer por indução de alterações pelas ondas de ultrassons.

Tendo em conta estes resultados, torna-se dispensável o cuidado da observação de polimorfos nos ensaios em água, uma vez que se sabe que esta é a forma estável do composto nas condições a que este está exposto na água,²¹⁰ e que se demonstra que os ultrassons não induzem essa transformação.

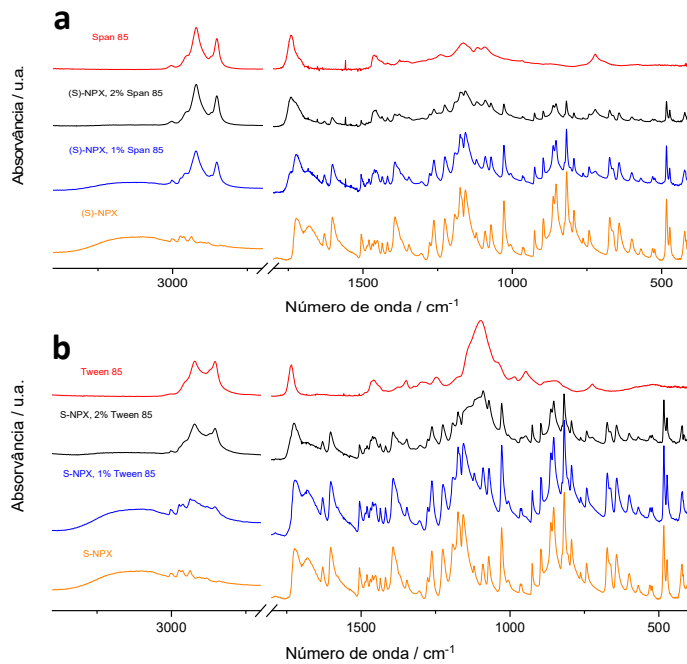


Figura 56. Representação dos espectros de IV das amostras obtidas, em comparação com o (S)NPX puro e o surfactante utilizado (a) Span 85; (b) Tween 85.

Para a determinação da variação do tamanho de partículas, procedeu-se a uma análise preliminar recorrendo a microscopia ótica com luz polarizada, com o objetivo de excluir as amostras em que as ampliações mais baixas deste aparelho permitem a observação de cristais em suspensão.

Na Figura 57 apresentam-se as imagens recolhidas por um microscopia ótica com luz polarizada, ampliação de 50 vezes.

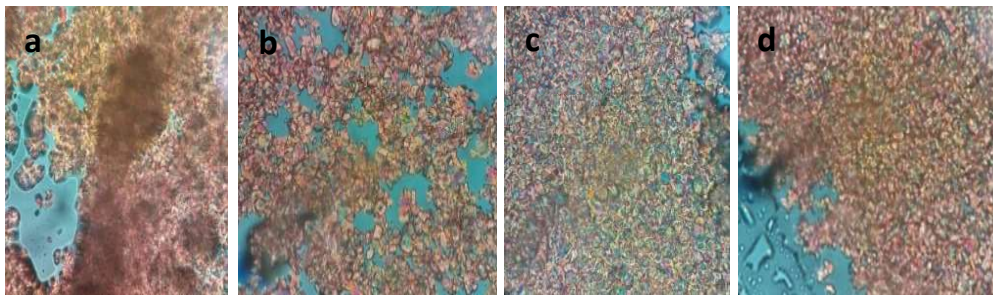


Figura 57. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada das amostras de (S)NPX disperso em ciclo-hexano sujeitas a ultrassons (a) 1 %Span 85; (b) 2% Span 85; (c) 1% Tween 85; (d) 2% Tween 85. Ampliação: 50x.

A análise das imagens demonstra que todas as amostras apresentam partículas de dimensões elevadas, para os objetivos deste trabalho. Este facto poderá dever-se à falta de eficácia do método na redução do tamanho das partículas, à ocorrência de fenômenos de agregação facilitados pela evaporação do dispersante, quer por *Ostwald Ripening* quer pela quantidade inadequadas de surfactante, ou à combinação de ambos os fatores mencionados.

Apesar da elevada quantidade de partículas observáveis, as amostras com Span 85 aparentam apresentar menores níveis de agregação, pelo que os ensaios seguintes, envolveram a utilização deste surfactante. A troca do ciclo-hexano pela água deveu-se à diferença nas pressões de vapor entre ambos, com a água a apresentar menores pressões, benéficas à aplicação da técnica com ausência de evaporação.

Na Figura 58 expõem-se as imagens relativas aos ensaios em água, recolhidas nas mesmas condições. Neste caso, os ensaios foram realizados em três períodos de 30 min, de forma a perceber a evolução da amostra com o tempo de exposição aos ultrassons através da colheita de uma alíquota de nanossuspensão proveniente de cada ensaio.

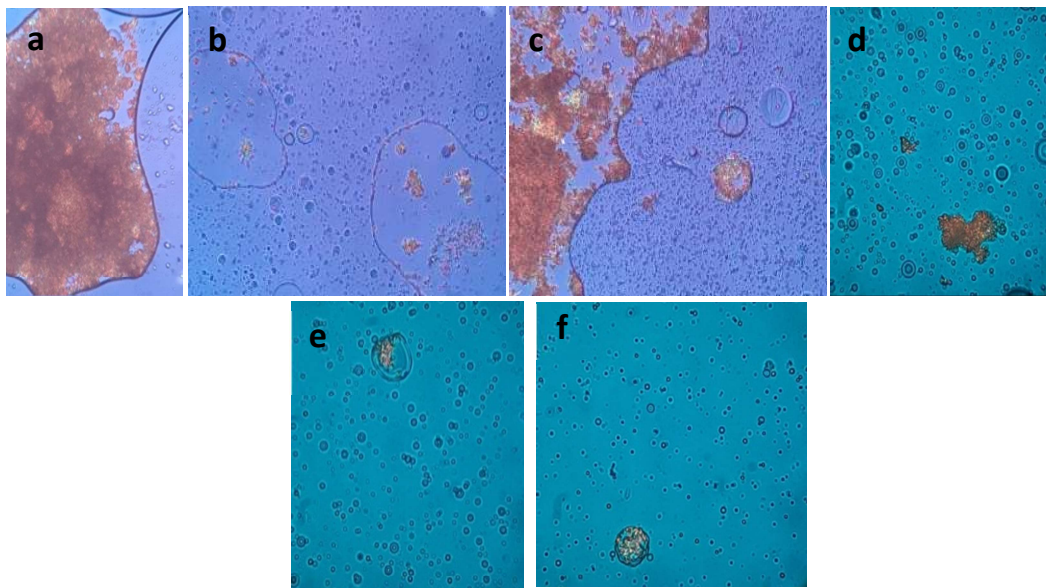


Figura 58. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada, das amostras de (S)NPX disperso em água sujeitas a ultrassons (a) 1% Span 85, 30 min; (b) 1% Span 85, 1h; (c) 1% Span 85, 1h 30 min; (d) 2% Span 85, 30 min; (e) 2% Span 85, 1h; (f) 2% Span 85, 1h 30min. Ampliações: (a), (b),(c) 50x; (d),(e),(f) 200x.

Verifica-se uma diminuição mais pronunciada do tamanho de partículas nas amostras tratadas com ultrassons em que se adicionou 2 % span 85 (% V/V), sendo que tanto num caso como no outro, a maior diferença se verifica do salto dos 30 min para 1h de ensaio (imagem (a) para (b) e (d) para (e), correspondentes às amostras com 1 e 2% de span 85).

As diferenças na evolução das amostras ao longo do tempo, consoante as percentagens de surfactante adicionadas, chamam a atenção para aquele que poderá ser um problema associado a esta abordagem. A comparação das imagens (b) e (c) revelam uma evolução negativa no tamanho de partículas, enquanto que no caso das imagens (e) e (f) o mesmo já não se verifica, o que implicaria que a agregação seria muito mais pronunciada no caso da amostra com 1% de Span 85, e que o tempo ótimo de exposição seria de 1h. No entanto, a colheita da alíquota poderá afetar estas observações, dependendo da quantidade de composto e da zona da amostra que se observa.

Assim, a única conclusão possível de retirar desta análise é que, de facto, a aplicação de ultrassons nas condições testadas, é pouco eficiente na redução do tamanho de partículas ao nível pretendido, o que exige a aplicação de outras técnicas.

3.3.2 Homogeneização mecânica

A homogeneização por agitação mecânica surge como mais uma alternativa de via “top-down”, após os primeiros testes com ultrassons. Sendo também uma técnica em que o produto final será uma nanossuspensão, há que ter em conta os dados adquiridos com os testes já realizados, pelo que o início da sua aplicação terá como objetivo a obtenção de nanopartículas do API puro, de forma a evitar o problema detetado na secção precedente.

Iniciou-se a aplicação desta técnica através de ensaios semelhantes aos realizados para o caso dos ultrassons, sendo que neste caso foi selecionado o (RS)IBU para a obtenção dos respetivos nanocristais, não se procedendo à caracterização do produto obtido uma vez que se sabe que este API se mantém estável nas circunstâncias referidas. As condições de obtenção das nanossuspensões encontram-se descritas na Tabela 22.

Tabela 22. Condições para obtenção das nanossuspensões de (RS) IBU correspondentes aos primeiros ensaios com recurso a homogeneização mecânica.

Sólidos de partida / g	Dispersante	% Estabilizador
(RS)IBU – 0,0702	8 ml Água	2 % Span 85 (% m/m _{API}) Pesado: 1,73 mg (1,5 mg)
(RS) IBU – 0,0703	14,8764 g Água	1% PEG 6000 (%m/m _{dispersante}) Pesado: 0,1482g (0,1488 g)
(RS)IBU – 0,0836	5 ml Água	1 e 2% Span 85 (% V/V)
(RS)IBU – 0,0719	10 ml Água	2% Tween 85 (% V/V)

Primeiramente, utilizou-se Span 85 e PEG 6000 como estabilizadores, nas condições indicadas. As imagens recolhidas por microscopia de luz, polarizada para este caso, correspondem a alíquotas de amostras sujeitas à exposição mecânica durante 1h 30min, e encontram-se dispostas na Figura 59.

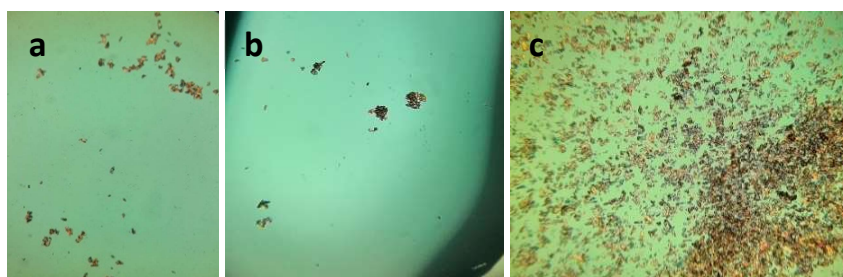


Figura 59. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada, das amostras de (RS)IBU disperso em água, sujeitas a homogeneização mecânica: (a) 2% Span 85 (%m/m_{API}); (b) 1% PEG 6000 (%m/m_{dispersante}); (c) 2% Tween 85 (% V/V). Ampliação: (a),(c) – 50x; (b) – 200x.

Estas imagens, obtidas com ampliações de 50 e 200 vezes, permitem concluir que as partículas não se encontram na escala nanométrica.

Paralelamente, foram realizados testes onde se se aumentou a quantidade de Span 85 e Tween 85, numa tentativa de obtenção de emulsões, com concentrações de surfactante superiores à respetiva concentração micelar crítica. Nestas, verificou-se que, enquanto que no caso do Tween 85 os resultados se assemelham aos observados para as amostras anteriores (Figura 58), com o Span 85 a nanossuspensão apresenta alterações no seu comportamento, formando-se a emulsão pretendida.

No caso deste surfactante, testou-se o efeito da estabilização com recurso a 1 e 2% de surfactante (% V/V), representados pelas imagens apresentadas na Figura 60.

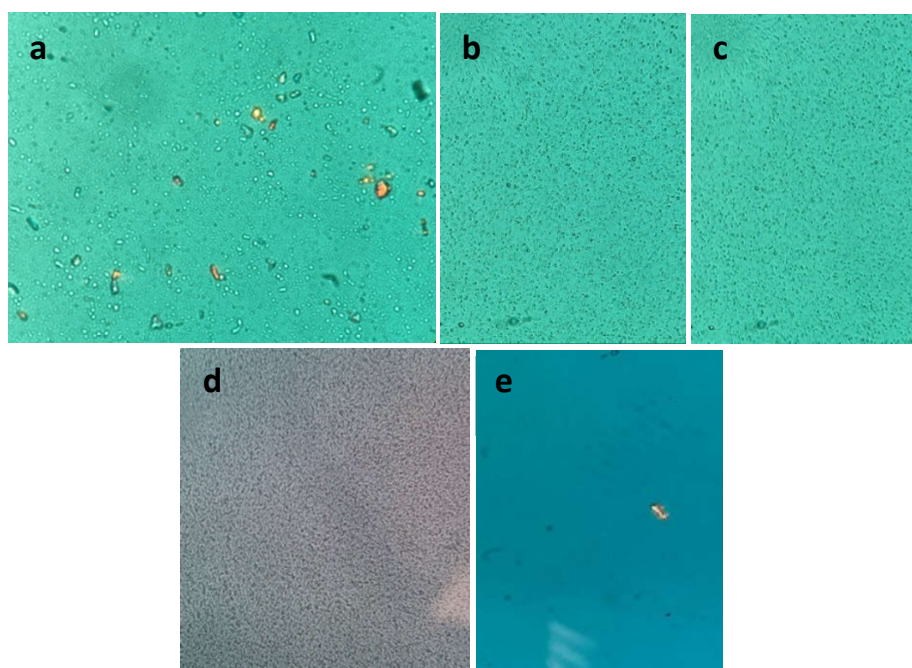


Figura 60. Imagens obtidas por microscopia de luz polarizada, das amostras de (RS)IBU disperso em água sujeitas a agitação mecânica: (a) 1% Span85 (% V/V), 40 min; (b) Branco 2% Span85 (% V/V); (c) 2% Span85 (% V/V), 60 min; (d) 2% Span85 (% V/V), 60 min - 2º ensaio; (e) 2% Span85 (% V/V), 60 min - 3º ensaio. Ampliação: 50x; (e) 200x.

A imagem (a) corresponde à análise de uma alíquota recolhida de uma amostra na qual se aplicou a técnica na presença de 1% de Span 85 (% V/V) durante 40 min, em que se verifica a existência de cristais de (RS)IBU, o que implica que estas condições não permitem a obtenção de nanocristais do API e justifica a adição de mais surfactante, de forma a aumentar a percentagem do estabilizador na dispersão, numa tentativa de fazer evoluir o sistema no sentido da obtenção de nanopartículas.

As imagens (c), (d) e (e) dizem respeito à aplicação da técnica durante 60 min, com 2% de Span 85 (% V/V), estabelecendo-se uma comparação entre estas e a imagem (b), que representa uma amostra na qual se procedeu à homogeneização na ausência de API, equivalente a uma amostra “branco”. Neste caso os resultados são mais animadores, com a ausência completa de cristais de grandes dimensões na primeira e segunda alíquota, colhidas, respetivamente, logo após, (c) e 2 semanas depois da realização do ensaio (d), e

que à partida indicam ausência de partículas de grandes dimensões. Salienta-se que, nessas condições, a concentração micelar crítica do Span 85 foi ultrapassada.

A imagem (e) diz respeito à observação de uma terceira alíquota colhida 1 mês após a realização do ensaio inicial, na qual se observa presença de um cristal do API, o que chama a atenção para um problema relacionado com este método de análise, uma vez que a observação deste cristal poderá estar relacionada com a agregação das partículas de (RS)IBU ao longo do tempo, ou com composição de alíquota recolhida, devido à propensão para a sedimentação que se associa a partículas de maiores dimensões, que poderá dificultar a sua colheita. Assim, estas imagens apenas permitem concluir a presença de partículas de grandes dimensões, e a sua ausência não garante que estas não estejam presentes na amostra.

De forma a esclarecer a dúvida relativamente à eficácia da técnica na diminuição do tamanho de partículas, as emulsões (branco e aplicação da técnica ao API), foram sujeitas a uma análise por LD, expondo-se as informações obtidas na Figura 61 e na Tabela 23.

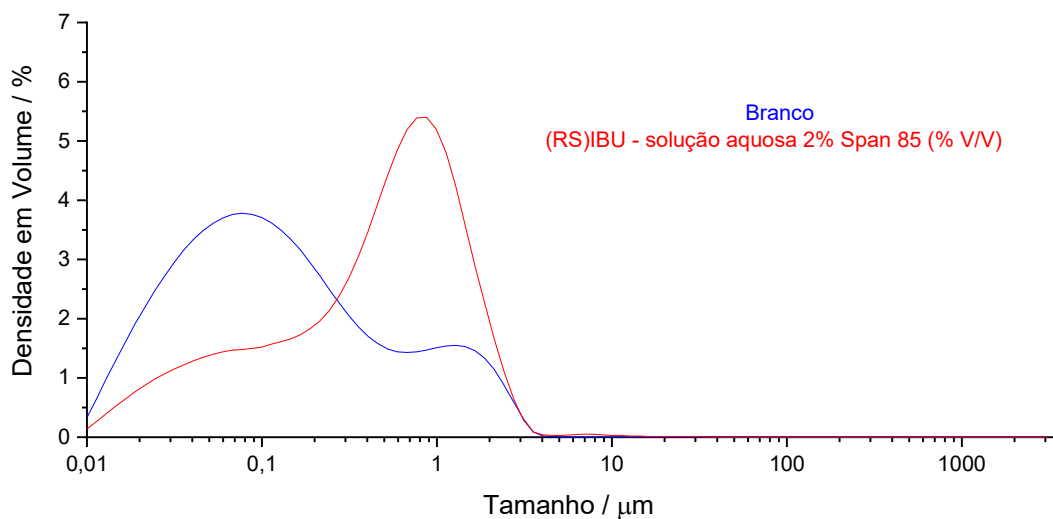


Figura 61. Gráfico da densidade de partículas em volume, em função do seu tamanho para as amostras das emulsões obtidas por agitação mecânica, correspondentes à amostra branco, apenas com Span 85, e à amostra de partículas de (RS)IBU contidas numa emulsão aquosa.

Tabela 23. Percentis de 10, 50, 90 e 100% do volume total, representativos dos tamanhos de partículas presentes nas respetivas emulsões.

Percentis	Tamanho de partículas / nm	
	Branco	(RS)IBU em emulsão de água com 2% Span 85 (%V/V)
Dv (10)	25,7	49,3
Dv (50)	115	561
Dv (90)	1170	1610
Dv (100)	4670	35000

Os dados obtidos por LD refletem apenas a eficácia da técnica “top-down” aplicada, salvo o erro associado à aplicação da teoria de Mie para partículas mais pequenas

Estes resultados sugerem a presença de estruturas micelares na amostra da emulsão correspondente ao branco. Como a emulsão que contém o (RS)IBU foi preparada nas mesmas condições que a emulsão do branco, as estruturas micelares estarão também presentes nesta, pelo que podemos, logo à partida, distinguir a presença de duas populações distintas de partículas presentes na amostra do API.

A grande diferença que se observa nas amostras das emulsões, quer no gráfico, quer nos percentis obtidos, prende-se com a deteção de partículas de maiores dimensões para o caso da emulsão com o API o que implica a presença de grandes blocos do mesmo.

Estas observações poderão ser justificadas pela aplicação insuficiente de forças de cisalhamento, inerente à eficácia da técnica utilizada, e ainda pela competição entre a formação micelar e a adsorção do surfactante, traduzida pela perda de afinidade do estabilizador para adsorção na superfície das partículas, provocada pelo aumento de concentração de surfactante e conseqüente aumento de afinidade entre as moléculas que o compõe, de forma a reduzir a exposição das suas caudas apolares à água, através da formação de micelas.⁸³

Os problemas referidos têm como consequência a redução insuficiente do tamanho de partículas e/ou a indução do seu crescimento através do fenómeno de *Ostwald ripening*, incompatíveis ao sucesso do objetivo proposto, o que implica que a técnica em causa não se revela eficiente, nestas condições, para obtenção de nanopartículas do ativo.

No Anexo X, apresentam-se os resultados relativos ao acoplamento da homogeneização mecânica com aplicação de ultrassons, testada na secção anterior, numa tentativa de tirar partido das potencialidades de ambas as técnicas, de forma a aumentar a sua eficácia. Os resultados obtidos não são promissores.

3.4 Síntese de nanocristais: moagem em suspensão

Na secção 1.6.1 do Capítulo 1, apresenta-se a moagem em suspensão como sendo um dos métodos mais relevantes para a via “top-down”, facto provado pela sua ampla utilização na síntese de nanopartículas.^{48,109,211}

No caso específico da síntese de nanocristais, esta técnica apresenta algumas desvantagens relativamente ao LAG, nomeadamente a impossibilidade da obtenção do cocristal *in situ*, que obriga à divisão do método em dois processos distintos, a preparação do cocristal seguida da aplicação da via “top-down” direta para quebra de partículas, e ainda, a garantia de estabilidade do cocristal no meio de dispersão, problema que já foi abordado na secção 3.1.2.3, e que para além da separação dos compostos de partida que originam o cocristal, poderá ainda induzir alterações polimórficas no mesmo.^{212,213} No entanto, apesar dos problemas associados, os resultados descritos na literatura para a aplicação desta técnica na obtenção de nanopartículas sugerem que esta é, de facto, uma técnica extremamente promissora, e que portanto merece a devida atenção.

Nesta secção, apresentam-se estudos que têm como por objetivo contornar os problemas detetados, inerentes à técnica em causa, bem como testar a sua eficácia na síntese de nanocristais. Para tal, utilizou-se o modelo (S)NPX-NIC, uma vez que os melhores resultados obtidos até este momento envolveram o mesmo, através da aplicação de LAG na presença de uma mistura de surfactantes, permitindo a comparação direta das duas vias.

As condições de realização dos ensaios envolvidos neste estudo encontram-se expostas na Tabela 24.

Tabela 24. Condições de preparação dos ensaios de moagem em suspensão, cocrystal (S)NPX-NIC.^{a),b)}

Sólidos de partida /g	Dispersante	Estabilizador / mg
(S)NPX-NIC – 0,0713	3,3 ml Solução aquosa saturada com (S)NPX e NIC	Span 85 – 22 Tween 85 – 10

a) Moagem realizada com recurso a vasos e esferas de óxido de zircónio, 30 Hz, 60 min.

b) Número de moles de Span 85 e Tween 85, 5 vezes superior ao utilizado nos ensaios de LAG com mistura de surfactante (secção 3.1.2.3).

O objetivo seria utilizar as condições, apresentadas na secção 3.1.2.3, mantendo-se os vasos e esferas de óxido de zircónio, onde foram introduzidos 70 mg de cocrystal, estabilizados por um número de moles de Span 85 e Tween 85 que perfazem aproximadamente 5 vezes o número de moles utilizado na secção referida, numa tentativa de contornar o problema identificado, relativo à agregação das partículas.

Manteve-se também a solução aquosa saturada de ambos os compostos de partida como meio dispersante, correspondendo os 3,3 ml referidos, a um terço do volume do vaso de óxido de zircónio. A utilização desta solução obrigou a cuidados redobrados durante a aplicação da moagem, realizada em 6 períodos de 10 min intervalados com tempo suficiente para manter o sistema à temperatura ambiente, impedindo o aumento da solubilidade dos componentes do sistema, e, conseqüentemente, a dissolução do cocrystal no meio de dispersão.

Demonstrada a estabilidade do cocrystal neste meio de dispersão (Anexo VIII) e impedido o aumento da temperatura para valores críticos que pudessem afetar este fator, encontram-se reunidas as condições para aplicação de difração com laser (LD), para avaliar o tamanho das partículas obtidas por moagem em suspensão, pois como é sabido, não é possível a aplicação direta de SEM neste tipo de amostras.

Os resultados de LD encontram-se expostos na Figura 62. Tal como nos casos anteriores, os tamanhos das partículas foram medidos em função do volume total da amostra, e utiliza-se uma escala logarítmica para os tamanhos observados devido ao grande intervalo de valores obtidos.

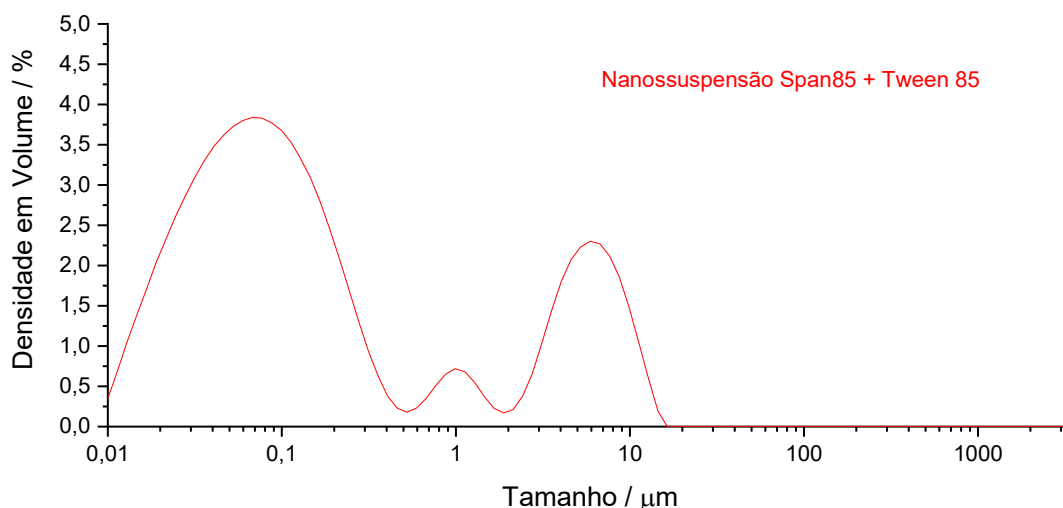


Figura 62. Gráfico da densidade de partículas em volume, em função do seu tamanho para a amostra correspondente à nanossuspensão de (S)NPX-NIC estabilizada por uma mistura de Span 85 e Tween 85, obtida por moagem em suspensão.

Uma análise preliminar permite, desde logo, detetar a presença de 3 populações de partículas com gamas de tamanho distintas, com prevalência para aquelas que apresentam menores dimensões. Como se atribuiu peso ao volume total da amostra, podemos então concluir que as partículas mais pequenas estão em quantidades muito superiores às restantes, desde logo pela densidade em volume que se verifica, e ainda, porque estas ocuparão um volume muito inferior a partículas maiores, pelo que terão de estar presentes em grandes quantidades para ganhar supremacia no sistema.

A Tabela 25 contém informação suplementar, relativa aos percentis para os 10, 50 e 90 % de volume total, que permitem complementar as conclusões retiradas.

Tabela 25. Percentis de 10, 50 e 90 % do volume total, representativos dos tamanhos de partículas presentes na nanossuspensão do cocristal (S)NPX-NIC, obtidos por moagem em suspensão

Percentis	Tamanhos de partículas / nm
Dv (10)	25,0
Dv (50)	109
Dv (90)	6580

O valor do percentil correspondente aos 50 % de volume total indica que esta técnica é mais eficiente que o LAG no que toca à síntese de nanopartículas, não esquecendo das vantagens que envolvem o trabalho com pós secos e que a moagem assistida demonstra também sucesso na obtenção dos nanocristais propostos.

Mais uma vez, o percentil para os 90 % corresponde a um valor superior a 1000 nm, que, tal como observado para o caso do LAG, é possível que corresponda a um número muito reduzido de agregados de pequenas partículas, relacionadas com um pequeno desvio em relação à quantidade ótima de ambos os surfactantes introduzidos no sistema, o que implica que o processo necessita de ser otimizado para reduzir a pequena heterogeneidade que se verifica, de forma a obter uma nanossuspensão composta apenas por partículas soltas e de tamanhos inferiores aos 1000 nm.

Os estudos levados a cabo nesta secção permitem, juntamente com os da secção 3.1.2.3, revelar a eficácia da moagem para a síntese de nanocristais, quer em suspensão, quer na ausência de qualquer dispersante, abrindo novas portas ao desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica.

3.5 Novos cocristais: estudos com naproxeno racémico

Num estudo paralelo ao da síntese de nanocristais, procurou-se obter novos modelos de cocristais com o intuito de enriquecer as bases de dados já existentes, permitindo o aumento do leque destes modelos que se encontram disponíveis para testar a eficácia dos métodos de síntese das partículas em causa, desenvolvidos durante a investigação.

O objetivo deste ramo do projeto seria obter novos cocristais constituídos por naproxeno racémico e isómeros de piridina-carboxamida, nomeadamente, isonicotinamida e picolinamida. Procurou-se obter

estas estruturas através da aplicação de LAG, com frequências de 30 Hz durante 30 min, em misturas de diferentes constituições de forma a detetar a estequiometria correta.

Numa fase inicial, avaliaram-se misturas de (RS)NPX e PA nas proporções de (1:2), (1:1,2), (1:1) e (2:1), de forma a perceber qual a que se aproxima da estequiometria do cocrystal, caso se forme. A constituição das diferentes misturas encontra-se exposta na Tabela 26.

Tabela 26. Condições de pesquisa de novos cocristsais (RS)NPX-PA, por LAG.^{a)}

Sólidos de partida / g	Etanol / μ l	Estequiometria
(RS)NPX – 0,0340 PA – 0,0358	10	(1:2)
(RS)NPX – 0,0460 PA – 0,0290	10	(1:1,2)
(RS)NPX – 0,0448 PA – 0,0251	10	(1:1)
(RS)NPX – 0,0508 PA – 0,0190	10	(2:1)

a) Moagem realizada com recurso a vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

A confirmação da obtenção do produto proposto, obriga a uma análise completa e rigorosa dos pós obtidos, bem como à sua comparação com os compostos que lhes deram origem. Esta foi iniciada pela aplicação de espectroscopia de IV (Figura 63)

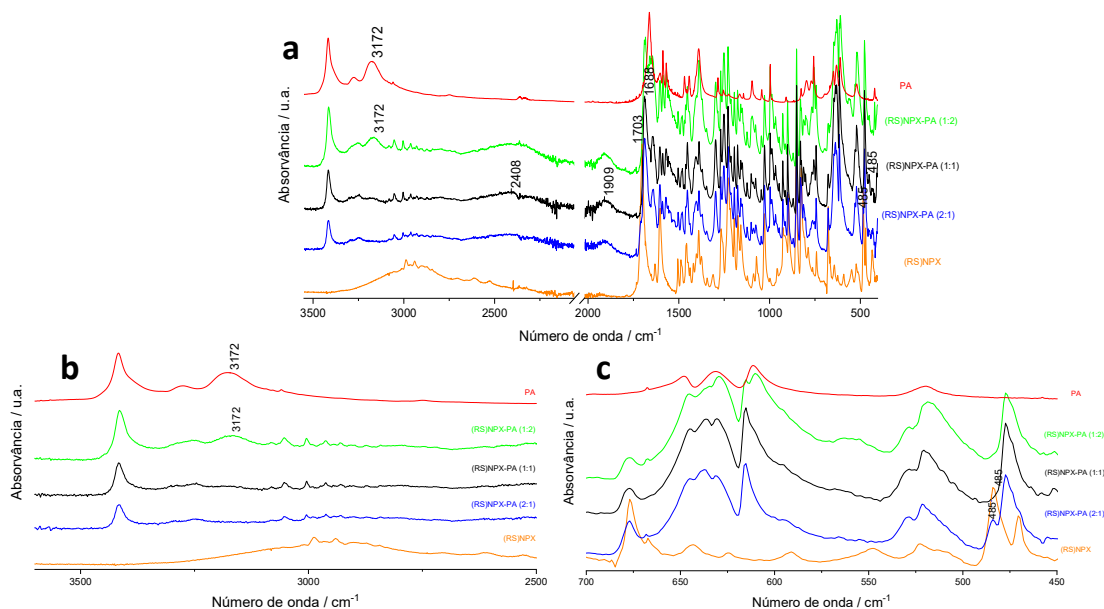


Figura 63. Espectros de IV da PA, polimorfo II; (RS)NPX; (RS)NPX-PA (1:2); (RS)NPX-PA (1:1); (RS)NPX-PA (2:1): (a) 3500-450 cm^{-1} ; (b) expansão: 3600 -2500 cm^{-1} ; (c) expansão: 700-450 cm^{-1} .

Após uma primeira observação dos espectros apresentados na Figura 63a, conclui-se a formação de novas estruturas, que se presumem ser do cocrystal constituído por naproxeno racémico e picolinamida, uma vez que os espectros das misturas não correspondem à soma dos espectros dos compostos de partida. Para além disso, verifica-se o aparecimento de bandas atribuíveis à formação de pontes de hidrogénio entre o azoto aromático da picolinamida e o ácido carboxílico presente no naproxeno (1909 e 2480 cm^{-1}), $\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{aromático}}$, bem como um desvio claro da banda relativa ao grupo carbonilo presente no ácido carboxílico de 1703 para 1688 cm^{-1} , que corroboram a hipótese de formação do novo cocrystal.

As expansões apresentadas nas Figuras 63b e 63c mostram com mais clareza, o comportamento da mistura com a variação da estequiometria dos compostos sujeitos a moagem. Na Figura 63b, nota-se um excesso de picolinamida na mistura de (RS)NPX e PA com estequiometria (1:2), evidenciado pela banda presente em ambos os espectros nos 3174 cm^{-1} , enquanto que na expansão (c) se distingue um excesso de naproxeno racémico na mistura com estequiometria (2:1), comprovado pela banda que se apresenta nos 484 cm^{-1} , correspondente ao naproxeno. Estes dados permitem prever que o cocrystal terá estequiometria (1:1).

Os termogramas das amostras referidas apresentam-se na Figura 64, seguidos dos respetivos parâmetros termodinâmicos, presentes na Tabela 27.

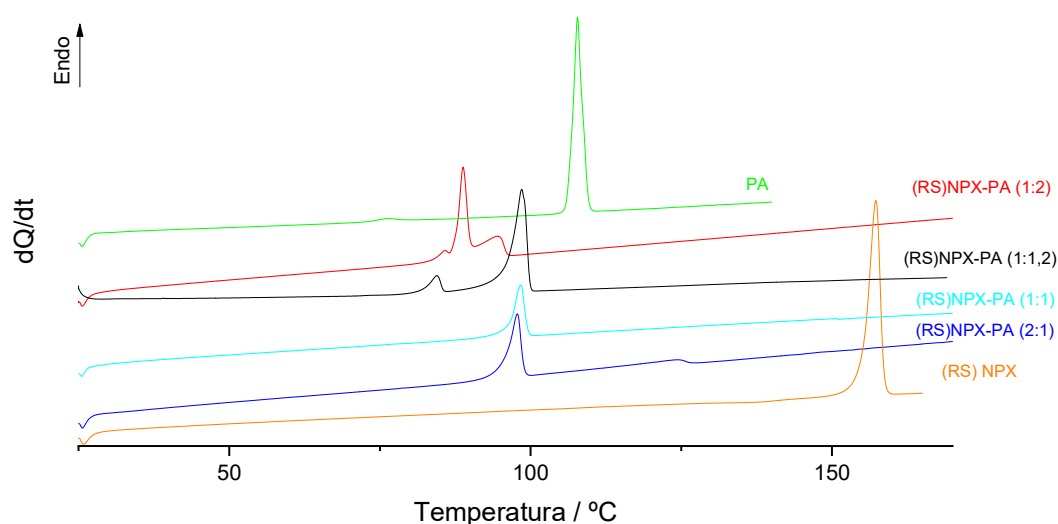


Figura 64. Termogramas, DSC, correspondentes a misturas de (RS)NPX com PA, de diferentes composições, submetidas a LAG, em comparação com os compostos de partida.

O polimorfo II da picolinamida funde a $102\text{ }^{\circ}\text{C}$. No entanto, o termograma identifica um pico de fusão com $T_{\text{onset}} = 106,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, que não corresponde ao polimorfo II, mas sim ao I, que forma um sistema enantiotrópico com o polimorfo II, e é metaestável à temperatura ambiente.^[160] Observa-se ainda um outro pico endotérmico com entalpia inferior, por volta dos $74,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, que corresponde à transição sólido-sólido do polimorfo II para o polimorfo I.

Tabela 27. Propriedades termodinâmicas de fusão de misturas de (RS)NPX-PA, de diferentes composições, submetidas a LAG, e dos respectivos compostos de partida.

	$T_{fus} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{fus}H / \text{J g}^{-1}$
PA	106,4	158
(RS)NPX-PA (1:2)	85,5	124
(RS)NPX-PA (1:1,2)	96,1	127
(RS)NPX-PA (1:1)	96,4	119
(RS)NPX-PA (2:1)	95,5	74
(RS)NPX	155,0	189

A análise dos termogramas corrobora as conclusões apontadas pelo estudo de espectroscopia por infravermelho: este cocrystal tem estequiometria de 1:1, uma vez que o termograma desta mistura apresenta um sinal único, característico da fusão de um composto puro, ao contrário, por exemplo, da mistura com estequiometria de (1:1,2), onde o sinal a cerca de 80 °C resulta da presença do excesso de picolinamida do sistema.

Os difratogramas expostos na Figura 65 permitem fazer comparações entre os padrões de difração das várias misturas, com as diferentes composições, e dos compostos que lhes deram origem, de forma a confirmar a estequiometria do cocrystal.

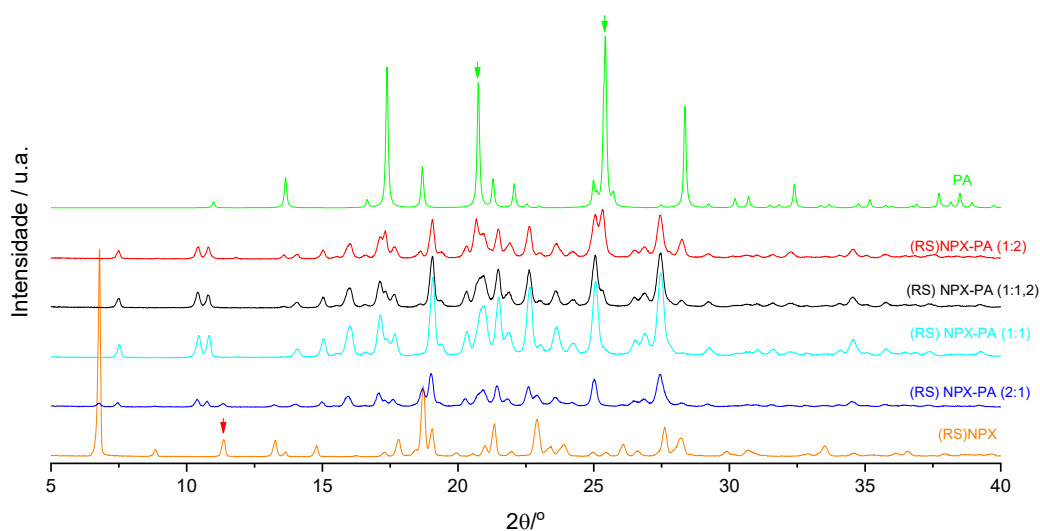


Figura 65. Difratogramas de raios-X de pó de misturas de (RS)NPX-PA de diferentes composições, submetidas a LAG, e dos compostos de partida.

Os padrões de reflexão apresentados permitem concluir que, de facto, ocorreu a formação de uma nova forma cristalina, com as setas apresentadas nos difratogramas do (RS)NPX e da PA, identificando os sinais que indicam o excesso do respetivo composto nas misturas. A vermelho, identifica-se um sinal por volta dos 11°, que confirma o excesso de (RS)NPX na mistura com estequiometria 2:1, e a verde, os sinais por volta dos 20 e dos 25°, que asseguram a presença do excesso de PA nas misturas com estequiometrias 1:2 e 1:1,2.

Uma vez que os sinais identificados pelas setas não se observam no padrão de difração da mistura com estequiometria 1:1, confirma-se que, de facto, esta será a estequiometria do cocrystal. A obtenção de um novo cocrystal constituído por naproxeno racémico e isonicotinamida envolveu um processo em tudo semelhante ao que foi utilizado para o cocrystal anterior, com a diferença de que, numa primeira fase, apenas se investigou a mistura com estequiometria de 1:1 (Tabela 28), na esperança de que o comportamento da INA na mistura fosse semelhante ao da PA.

Tabela 28. Condições de obtenção do novo cocrystal (RS)NPX-INA, por moagem assistida por etanol.^{a)}

Sólidos de partida / g	Etanol / μ l	Estequiometria
(S)NPX – 0,0460 INA – 0,0240	10	(1:1)

a) Moagem realizada com recurso a vasos e esferas de aço, 30 Hz, 30 min.

O produto obtido por moagem foi sujeito a uma caracterização semelhante ao que se realizou no caso anterior, de forma a confirmar a formação da nova estrutura.

Aparentemente, os espetros de infravermelho (Figura 66) apresentam as características típicas da formação dos cocrystalis que têm vindo a ser observadas, com os desvios das bandas correspondentes às elongações assimétricas e simétricas das ligações NH do grupo amida da INA, de 3362 para 3388 cm^{-1} e de 3173 para 3154 cm^{-1} ; o desvio da banda de elongação da ligação C=O presente no ácido carboxílico do (RS)NPX, de 1704 para 1685 cm^{-1} e a formação dos sinais por volta de 1950 e de 2342 cm^{-1} , atribuíveis às ligações de hidrogénio que se deverão estabelecer entre azoto aromático da INA e o ácido carboxílico do (RS)NPX ($\text{COOH} \cdots \text{N}_{\text{aromático}}$).

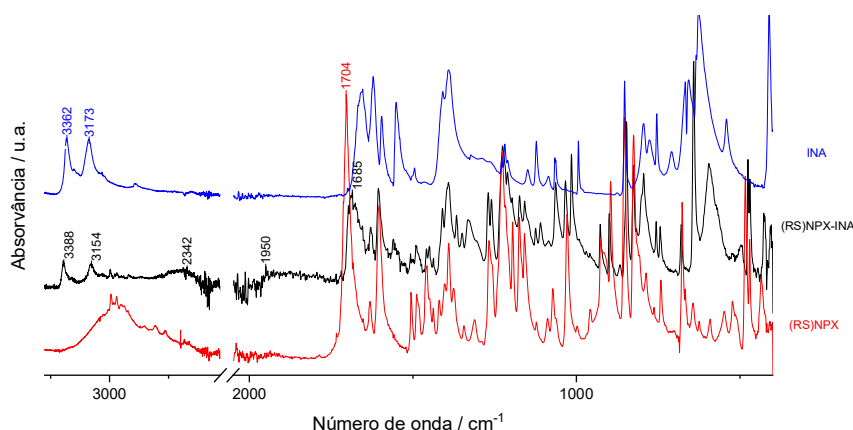


Figura 66. Comparação do espetro de IV do novo cocrystal (RS)NPX-INA com os espetros dos seus compostos de partida.

Os dados obtidos na análise por DSC, na Figura 67 (os parâmetros termodinâmicos são apresentados na Tabela 29), e por difração de raios-X de pó, Figura 68, confirmam que de facto ocorreu a formação de um novo composto supramoleculares a partir da mistura do (RS)NPX com INA (1:1), nas condições apresentadas. No termograma do pó proveniente da moagem, apenas se observa um pico endotérmico, que denota a ausência de qualquer excesso dos compostos de partida.

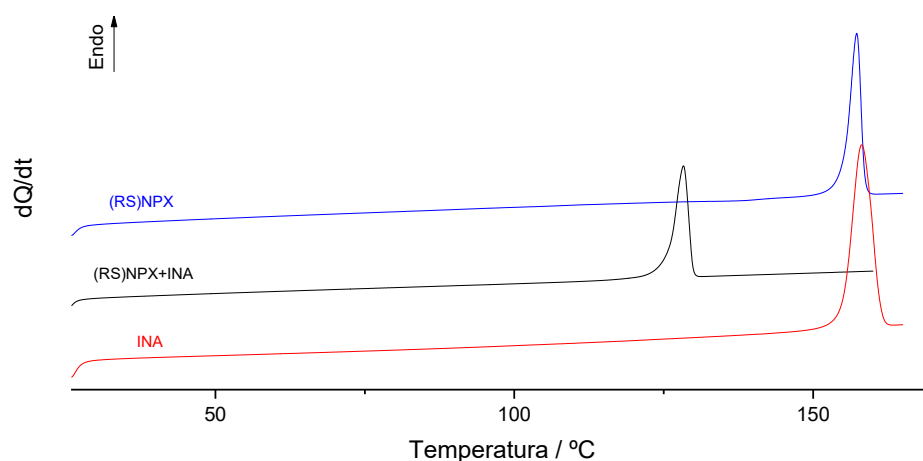


Figura 67. Termogramas, DSC, da mistura de (RS)NPX com INA (1:1), submetida a LAG, em comparação com os seus compostos de partida.

Tabela 29. Propriedades termodinâmicas de fusão da mistura de (RS)NPX-INA (1:1), submetida a LAG e dos compostos de partida.

	$T_{\text{fus}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{J g}^{-1}$
(RS)NPX	155,0	189
(RS)NPX-INA (1:1)	125,7	141
INA	155,5	185

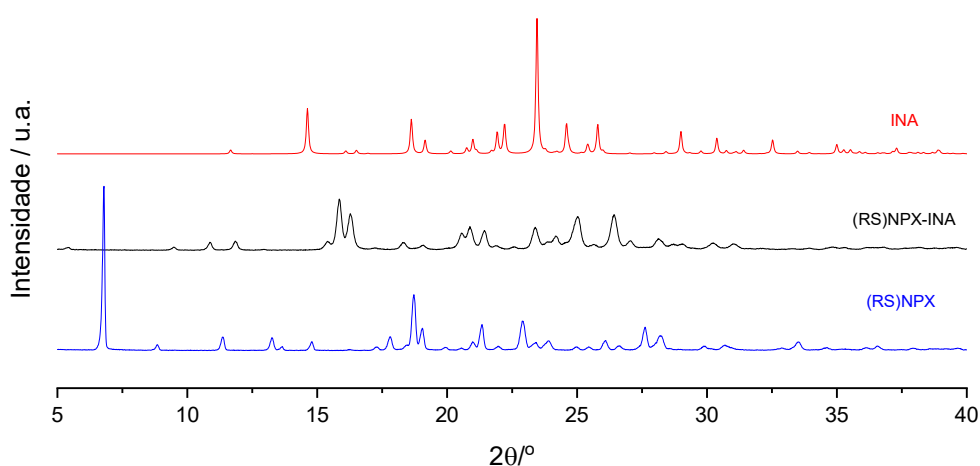


Figura 68. Difratogramas de raios-X de pó da mistura de (RS)NPX-INA (1:1), submetida a LAG, e dos compostos de partida.

A técnica de moagem aplicada permitiu a obtenção e caracterização dos novos cocrystalis, no entanto, não originou sólidos com qualidade para a resolução da sua estrutura cristalina. Para tal, eram necessários monocristais puros e de tamanhos razoáveis, que pudessem ser analisados de forma clara.

Foram realizados ensaios para a obtenção de monocristais dos novos cocrystalis identificados, por cristalização em etanol, nas condições na secção 2.2.7 (Tabela 30). Nestes, foram utilizadas superfícies de naturezas diferentes para induzir a cristalização.

Tabela 30. Condições utilizadas na realização dos ensaios para obtenção de monocristais de (RS)NPX-INA (1:1) e (RS)NPX-PA (1:1), por cristalização em etanol.

(RS)NPX-INA / g	Superfície de cristalização	(RS)NPX-PA / g
INA – 0,2703 (RS)NPX – 0,1831	Vidro	PA – 0,2697 (RS)NPX – 0,1830
INA – 0,2716 (RS)NPX – 0,1837	Teflon	PA – 0,2706 (RS)NPX – 0,1830
INA – 0,2700 (RS)NPX – 0,1829	Nylon	PA – 0,2704 (RS)NPX – 0,1830
INA – 0,2703 (RS)NPX – 0,1840	Magnete utilizado durante a agitação	PA – 0,2702 (RS)NPX – 0,1842

Sabendo, à partida, das dificuldades que envolvem a aplicação deste processo, seria necessário eliminar os ensaios em que não ocorreu formação do cocrystalis em causa, de forma a evitar a análise de monocristais dos compostos de partida por difração de raios-X. Submeteram-se, então, as amostras a análises por espectroscopia de IV (Figuras 69 e 70), com os respetivos espetros a servirem como ponto de partida para a determinação da presença das estruturas pretendidas em cada uma das amostras.

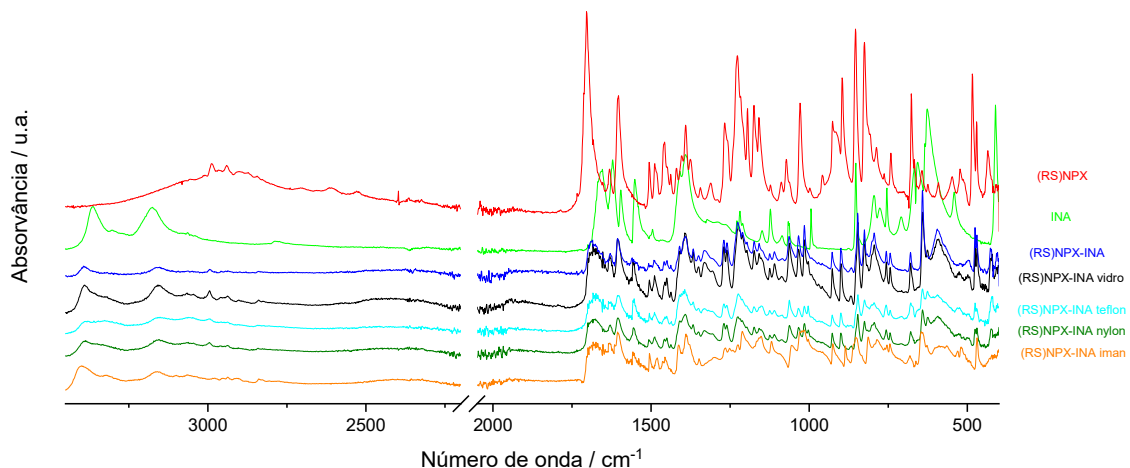


Figura 69. Espectros IV das amostras recolhida nos processos de cristalização resumidos na Tabela 30, para obtenção dos monocristais de (RS)NPX-INA.

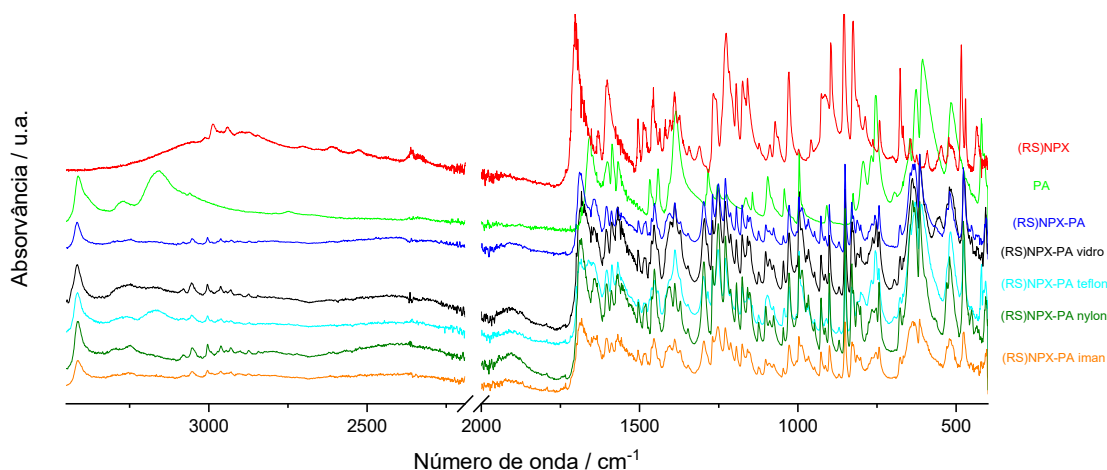


Figura 70. Espectros IV das amostras recolhidas nos processos de cristalização resumidos na Tabela 30 para obtenção dos monocristais de (RS)NPX-PA.

Em ambos os casos, os espectros apresentados provam que os ensaios realizados para obtenção dos respectivos monocristais originaram sempre os cocrystal pretendidos, embora com indícios da presença de alguma quantidade dos compostos de partida que não interagiram. A procura dos monocristais foi então realizada nas amostras em causa, tendo em conta a questão das impurezas detetadas.

Começando pelas amostras de (RS)NPX-INA, na sua grande maioria os cristais encontrados eram policristalinos e/ou de pequenas dimensões, com exceção da amostra em que se utilizou o íman como suporte para a formação dos núcleos de cristalização, onde foi possível encontrar cristais promissores, que possibilitaram a resolução da estrutura cristalina deste novo cocrystal (Figura 71). Na Tabela 31, apresentam-se os parâmetros cristalográficos da estrutura cristalina do novo cocrystal (RS)NPX-INA (1:1).

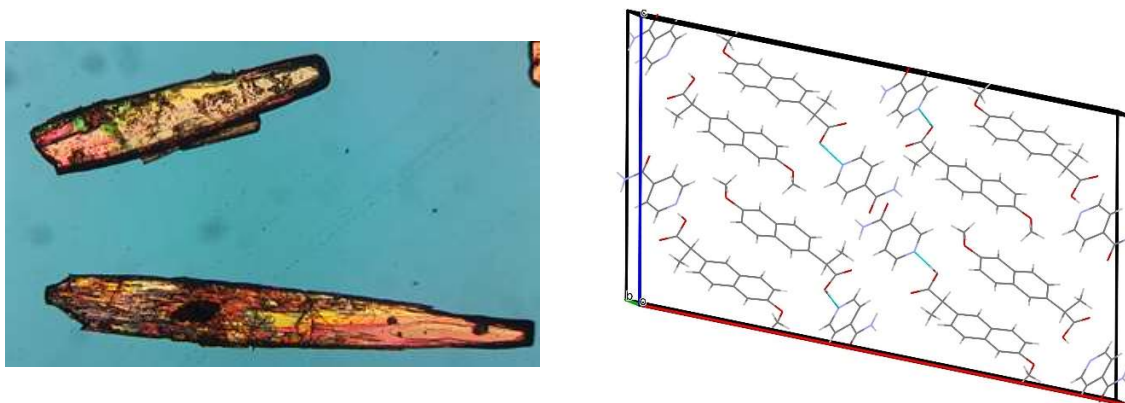


Figura 71. Monocristais do cocrystal (RS)NPX-INA (1:1) e a respetiva estrutura cristalina, resolvida a partir dos mesmos.

Tabela 31. Parâmetros cristalográficos da estrutura cristalina do novo cocrystal (RS)NPX-INA (1:1).

	(S)NPX-INA
Sistema Cristalográfico	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
a (Å)	33.108(4)
b (Å)	5.8340(8)
c (Å)	18.904(2)
α (°)	90
β (°)	101.683(3)
γ (°)	90
v (Å³)	3575.7(8)
Z	1

As ligações de hidrogénio que se estabelecem entre moléculas para originar a célula unitária do cocrystal apresentam-se na Figura 72.

Esta estrutura é semelhante à do cocrystal de (RS)IBU-NA (1:1), apresentado na secção 1.7.2, apresentando uma unidade assimétrica constituída por 4 moléculas, duas de (RS)NPX e duas de INA, que origina a formação de um homo e dois heterossintões.

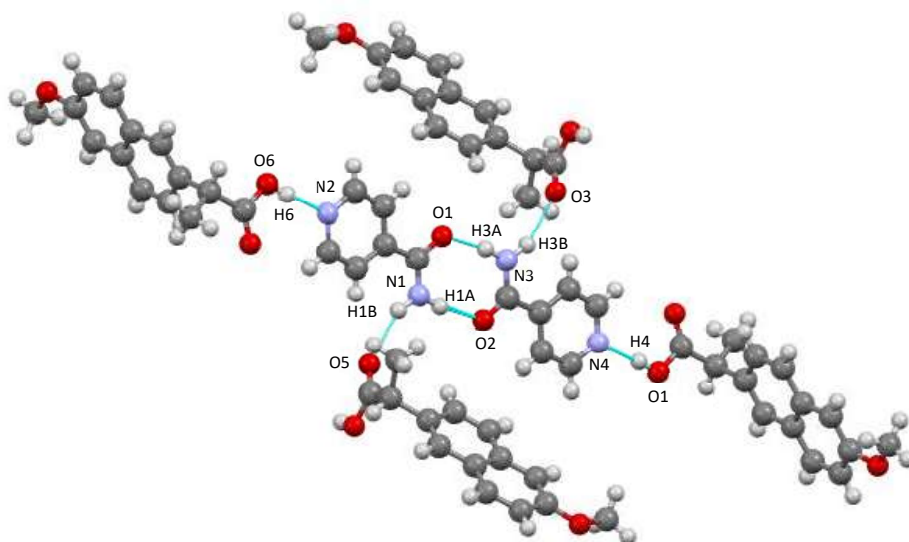


Figura 72. Ligações de hidrogénio que compõem a estrutura cristalina do cocrystal (RS)NPX-INA (1:1).

O homossintão compõe um dímero cíclico constituído por duas moléculas de isonicotinamida, que interagem por ligações de hidrogénio formadas entre os grupos amida de duas moléculas de INA ($N3-H3A \cdots O1$; $N1-H1A \cdots O2$), que se encontram representadas no centro da Figura 72. Os heterossintões surgem através da interação entre moléculas de (RS)NPX com o dímero cíclico, posicionando-se estas em torno do mesmo.

Observam-se, então, dois heterossintões distintos, um formado por ligações de hidrogénio entre o ácido carboxílico do (RS)NPX e a amida da INA, em que o ácido atua como aceitador de prótons ($N1-H1B \cdots O5$; $N3-H3B \cdots O3$); e outro formado pelo mesmo tipo de interação entre o ácido carboxílico do (RS)NPX e o azoto aromático da INA, sendo que, neste caso, o ácido atua como dador de próton ($O6-H6 \cdots N2$; $O4-H4 \cdots N4$).

No caso do cocrystal de (RS)NPX-PA, apesar da recolha de alguns cristais promissores obtidos no ensaio em que a nucleação ocorreu no vidro do copo em que se preparou a solução, ainda não foi possível resolver a sua estrutura.

Capítulo 4

Conclusões e

perspetivas futuras

Capítulo 4

Conclusões e perspectivas futuras

A síntese de nanocristais é uma ciência jovem e com grande margem de progressão na área do desenvolvimento de fármacos. Estas estruturas cristalinas reúnem os benefícios da formação de cocristais e da diminuição do tamanho de partículas para o aumento da solubilidade e velocidade de dissolução de APIs, que, em condições normais, seriam pouco solúveis em água, afetando a sua absorção, e consequentemente, a sua biodisponibilidade oral.

Neste trabalho, foram testadas três vias de síntese destas partículas, recorrendo ao (S)NPX-NIC e ao (RS)IBU-NIC como cocristais modelo. Por sua vez, estas vias envolvem diferentes métodos de indução de forças de cisalhamento para redução do tamanho de partículas, nomeadamente moagem, sonoquímica e agitação mecânica, com especial foco para a moagem, devido à sua versatilidade e facilidade de operação.

Investigações preliminares permitiram definir um conjunto de problemas relativos à aplicação de moagem assistida, que devem ser considerados em estudos que envolvem a síntese de nanocristais, designadamente, a constituição do modelo em causa, a natureza e a concentração do estabilizador e o tempo de aplicação da técnica, sendo que no caso da LAG, a preparação da solução do estabilizador ganha especial relevo. No que toca às técnicas que envolvem a preparação de suspensões de nanocristais, acresce ainda a necessidade de garantir a escolha de um meio de dispersão em que estes correspondam à fase termodinamicamente estável.

Relativamente à sonoquímica e à agitação mecânica, os estudos indicam que, nas condições em que foram aplicadas, estas são pouco eficazes como métodos “top-down”, sendo que o acoplamento das duas técnicas não melhora os resultados obtidos. Futuramente, propõe-se o aumento da frequência das ondas ultrassónicas e da agitação mecânica, nas respetivas técnicas, o que irá proporcionar um aumento das forças de cisalhamento induzidas no sistema, com energia que se pensa ser suficiente para a clivagem das partículas.

Os ensaios com moagem assistida permitiram comprovar o seu grande potencial para a síntese de nanocristais *in situ*. Estabelecendo uma comparação entre a moagem assistida por solução/dispersão de surfactante e a assistida por polímero, observa-se vantagens claras na estabilização dos nanocristais com surfactantes, no caso dos cocristais estudados.

Da aplicação de LAG ao modelo de (RS)IBU-NIC, surgem as primeiras evidências do crescimento preferencial dos cocristais, consoante o valor do EHL do surfactante utilizado como estabilizador, fenómeno que é indiscutivelmente observado nos ensaios com aumento do tempo de moagem aplicados ao modelo (S)NPX-NIC. Estas observações confirmam a complexidade do processo de clivagem dos cocristais, com a exposição de grupos funcionais hidrofílicos ou hidrofóbicos, conforme o plano de clivagem que se forma.

Estas evidências levaram à aplicação de misturas de surfactantes constituídas por Span 85 (natureza lipofílica) e Tween 85 (natureza hidrofílica) para estabilização das partículas, o que permitiu a síntese bem sucedida de nanocristais de (S)NPX-NIC, com estabilidade apreciável e grande prevalência de partículas com tamanhos inferiores a 1000 nm. A otimização da técnica permitiu estabelecer o tempo de moagem de 30 min, com frequências de 30 Hz e estabilização através de uma solução constituída por 5 µl de uma solução 75% de Span 85 e 5 µl de uma solução com percentagens entre os 40 e os 50% de Tween 85 em etanol (% V/V), como condições ideais à obtenção de nanocristais de (S)NPX-NIC *in situ*.

A substituição dos vasos de aço por vasos de óxido de zircónio demonstram a reprodutibilidade da técnica, com preferência para a utilização do óxido de zircónio, uma vez que este é um material mais inerte

que o aço, e, portanto, a contaminação do material fruto da degradação dos vasos durante a aplicação de LAG será inferior.

Os ensaios relativos à aplicação de moagem em suspensão revelam que esta técnica é também uma excelente via de obtenção de nanocristais, através da síntese de uma nanossuspensão de (S)NPX-NIC, disperso numa solução aquosa saturada com o API e o respetivo coformador, e estabilizado por uma mistura de surfactantes tal como na aplicação de LAG, adaptada à adição do meio de dispersão ao sistema. Quando comparada com a moagem assistida, esta apresenta vantagens claras na diminuição do tamanho de partículas, embora com a desvantagem da síntese em dois passos, que envolve a obtenção dos cocristais numa primeira fase, seguida da aplicação do método “top-down”, a juntar ao problema da escolha do meio de dispersão.

Num estudo futuro, seria interessante aplicar a técnica de moagem em suspensão ao cocristal de (RS)IBU-NIC, uma vez que se verificou que a técnica de LAG *in situ* não pode ser aplicada com este cocristal. Para além disso, seria necessário otimizar o processo da medição do tamanho de partículas por LD, de forma a perceber qual o tamanho exato das partículas de maiores dimensões que estão presentes nas amostras. Pensa-se que, para esse efeito, poderá ser adicionada uma quantidade de mistura de surfactante ao meio de dispersão, que permita impedir a formação de agregados de pequenas partículas, estabilizando-as no meio e possibilitando a sua medição correta.

A síntese de novos cocristais de (RS)NPX-INA (1:1) e (RS)NPX-PA (1:1), permite a realização futura de ensaios com as técnicas de moagem descritas, de forma a continuar o estudo dos seus efeitos em modelos de cocristais diferentes. Relativamente a estes cocristais, é ainda necessária a obtenção de monocristais de (RS)NPX-PA que permitam a resolução da sua estrutura cristalina, uma vez que este objetivo só foi cumprido para o caso da INA.

Concluindo, durante esta investigação, a moagem assistida por líquido e a moagem em suspensão assumem-se como técnicas de eleição na obtenção de nanocristais, destacando-se a síntese destas partículas *in situ*, que abre novas portas na área do desenvolvimento de fármacos, através da preparação de formulações mais eficientes de APIs pouco solúveis em água.

Referências bibliográficas

1. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000;44(1):235–249. doi:10.1016/S1056-8719(00)00107-6
2. Kerns EH, Di L. Chapter 19 - Pharmacokinetics. Em: Kerns EH, Di L, eds. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*. San Diego: Academic Press; 2008:228–241. doi:10.1016/B978-012369520-8.50020-6
3. Negus SS, Banks ML. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic (PKPD) Analysis with Drug Discrimination BT - The Behavioral Neuroscience of Drug Discrimination. Em: Porter JH, Prus AJ, eds. Cham: Springer International Publishing; 2018:245–259. doi:10.1007/7854_2016_36
4. Sultatos L. Drug absorption. *xPharm Compr Pharmacol Ref*. 2007:1–2. doi:10.1016/B978-008055232-3.60020-0
5. Lipka E, Amidon GL. Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: Optimizing oral drug delivery systems. *J Control Release*. 1999;62(1–2):41–49. doi:10.1016/S0168-3659(99)00022-X
6. Mayersohn M. Principles of drug absorption. Em: Florence A, Siepmann J, eds. *Modern Pharmaceutics*. 5ª edição. Boca Raton: CRC Press; 2009:23–80. doi:10.3109/9781420065657
7. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci*. 1995;12(3):413–420. doi:10.1023/A:1016212804288
8. Yazdani M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The «High Solubility» Definition of the Current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System May Be Too Strict for Acidic Drugs. *Pharm Res*. 2004;21(2):293–299. doi:10.1023/B:PHAM.0000016242.48642.71
9. Cook J, Addicks W, Wu YH. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development - An industrial view. *AAPS J*. 2008;10(2):306–310. doi:10.1208/s12248-008-9036-5
10. Baki G, Chaudhari S, Gaudana R, Boddu SHS. Selection of Excipients Based on the Biopharmaceutics Classification System of Drugs BT - Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery. Em: Narang AS, Boddu SHS, eds. Cham: Springer International Publishing; 2015:351–383. doi:10.1007/978-3-319-20206-8_12
11. Gong Y, Grant DJW, Britain HG. Principles of Solubility. *Solvent Syst Their Sel Pharm Biopharm*. 2007:1–27. doi:10.1007/978-0-387-69154-1_1
12. Takano R, Furumoto K, Shiraki K, et al. Rate-limiting steps of oral absorption for poorly water-soluble drugs in dogs; prediction from a miniscale dissolution test and a physiologically-based computer simulation. *Pharm Res*. 2008;25(10):2334–2344. doi:10.1007/s11095-008-9637-9
13. Murdande SB, Pikal MJ, Shanker RM, Bogner RH. Solubility advantage of amorphous pharmaceuticals: I. A thermodynamic analysis. *J Pharm Sci*. 2010;99(3):1254–1264. doi:10.1002/jps.21903
14. Starzak ME. Chemical Potentials in Solution. Em: Starzak ME, ed. New York, NY: Springer New York; 2010:119–127. doi:10.1007/978-0-387-77823-5_8

15. Kerns EH, Di L. Chapter 7 - Solubility. Em: Kerns EH, Di Structure Design and Methods LBT-DPC, eds. San Diego: Academic Press; 2008:56–85. doi:10.1016/B978-012369520-8.50008-5
16. Williams HD, Trevaskis NL, Charman SA, et al. Strategies to address low drug solubility in discovery and development. *Pharmacol Rev.* 2013;65(1):315–499. doi:10.1124/pr.112.005660
17. Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc.* 1897;19(12):930–934. doi:10.1021/ja02086a003
18. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997;25(1):3–14. doi:10.1016/S0169-409X(96)00487-5
19. Schultheiss N, Newman A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst Growth Des.* 2009;9(6):2950–2967. doi:10.1021/cg900129f
20. Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ. Pharmaceutical co-crystals. *J Pharm Sci.* 2006;95(3):499–516. doi:10.1002/jps.20578
21. Tilborg A, Norberg B, Wouters J. Pharmaceutical salts and cocrystals involving amino acids: A brief structural overview of the state-of-art. *Eur J Med Chem.* 2014;74:411–426. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.045
22. Emami S, Siahi-Shadbad M, Adibkia K, Barzegar-Jalali M. Recent advances in improving oral drug bioavailability by cocrystals. *BiolImpacts.* 2018;8(4):305–320. doi:10.15171/bi.2018.33
23. Morissette SL, Soukasene S, Levinson D, Cima MJ, Almarsson Ö. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2180–2184. doi:10.1073/pnas.0437744100
24. Desiraju GR. Supramolecular Synthons in Crystal Engineering—A New Organic Synthesis. *Angew Chemie Int Ed English.* 1995;34(21):2311–2327. doi:10.1002/anie.199523111
25. Almarsson Ö, Zaworotko MJ. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chem Commun.* 2004;(17):1889–1896. doi:10.1039/b402150a
26. Saha S, Desiraju GR. Acid···Amide Supramolecular Synthon in Cocrystals: From Spectroscopic Detection to Property Engineering. *J Am Chem Soc.* 2018;140(20):6361–6373. doi:10.1021/jacs.8b02435
27. Shattock TR, Arora KK, Vishweshwar P, Zaworotko MJ. Hierarchy of supramolecular synthons: Persistent carboxylic acid···pyridine hydrogen bonds in cocrystals that also contain a hydroxyl moiety. *Cryst Growth Des.* 2008;8(12):4533–4545. doi:10.1021/cg800565a
28. Alshahateet SF. Synthesis and supramolecularity of hydrogen-bonded cocrystals of pharmaceutical model rac-ibuprofen with pyridine derivatives. *Mol Cryst Liq Cryst.* 2010;533(1):152–161. doi:10.1080/15421406.2010.526557
29. Wöhler F. Untersuchungen über das Chinon. *Justus Liebigs Ann Chem.* 1844;51(2):145–163. doi:10.1002/jlac.18440510202
30. Matsuda H, Osaki K, Nitta I. Crystal Structure of Quinhydrone, C₁₂H₁₀O₄. *Bull Chem Soc Jpn.* 1958;31(5):611–620. doi:10.1246/bcsj.31.611

31. Sakurai T. On the refinement of the crystal structures of phenoquinone and monoclinic quinhidrone. *Acta Crystallogr Sect B*. 1968;24(3):403–412. doi:10.1107/S0567740868002451
32. Anastas P, Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev*. 2010;39(1):301–312. doi:10.1039/b918763b
33. E. Castro RA, Ribeiro JDB, Maria TMR, et al. Naproxen Cocrystals with Pyridinecarboxamide Isomers. *Cryst Growth Des*. 2011;11(12):5396–5404. doi:10.1021/cg2009946
34. Karki S, Friščić T, Jones W, Motherwell WDS. Screening for pharmaceutical cocrystal hydrates via neat and liquid-assisted grinding. *Mol Pharm*. 2007;4(3):347–354. doi:10.1021/mp0700054
35. Nehm SJ, Rodríguez-Spong B, Rodríguez-Hornedo N. Phase Solubility Diagrams of Cocrystals Are Explained by Solubility Product and Solution Complexation. *Cryst Growth Des*. 2006;6(2):592–600. doi:10.1021/cg0503346
36. Chiarella RA, Davey RJ, Peterson ML. Making Co-Crystals The Utility of Ternary Phase Diagrams. *Cryst Growth Des*. 2007;7(7):1223–1226. doi:10.1021/cg070218y
37. Good D, Miranda C, Rodríguez-Hornedo N. Dependence of cocrystal formation and thermodynamic stability on moisture sorption by amorphous polymer. *CrystEngComm*. 2011;13(4):1181–1189. doi:10.1039/C0CE00592D
38. Malamataris M, Ross SA, Douroumis D, Velaga SP. Experimental cocrystal screening and solution based scale-up cocrystallization methods. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;117:162–177. doi:10.1016/j.addr.2017.08.006
39. Gülsün T, Gürsoy RN, Öner L. Nanocrystal Technology For Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. *Fabad J Pharm Sci*. 2009;34(1):55–65.
40. Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng Sci*. 1960;23(5):22–36.
41. Junk A, Riess F. From an idea to a vision: There's plenty of room at the bottom. *Am J Phys*. 2006;74(9):825–830. doi:10.1119/1.2213634
42. Müller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals - Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;78(1):1–9. doi:10.1016/j.ejpb.2011.01.007
43. Haeri A, Osouli M, Bayat F, Alavi S, Dadashzadeh S. Nanomedicine approaches for sirolimus delivery: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2018;46(sup1):1–14. doi:10.1080/21691401.2017.1408123
44. Junghanns JUAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(3):295–309. doi:10.2147/ijn.s595
45. Chang TL, Zhan H, Liang D, Liang JF. Nanocrystal technology for drug formulation and delivery. *Front Chem Sci Eng*. 2015;9(1):1–14. doi:10.1007/s11705-015-1509-3
46. Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanoparticle Res*. 2008;10(5):845–862. doi:10.1007/s11051-008-9357-4

47. Malamataris M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today*. 2018;23(3):534–547. doi:10.1016/j.drudis.2018.01.016
48. Freag MS, Elnaggar YSR, Abdallah OY. Development of novel polymer-stabilized diosmin nanosuspensions: In vitro appraisal and ex vivo permeation. *Int J Pharm*. 2013;454(1):462–471. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.06.039
49. Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci*. 2015;10(1):13–23. doi:10.1016/j.ajps.2014.08.005
50. Nicoud L, Licordari F, Myerson AS. Estimation of the Solubility of Metastable Polymorphs: A Critical Review. *Cryst Growth Des*. 2018;18(11):7228–7237. doi:10.1021/acs.cgd.8b01200
51. Hancock BC, Parks M. What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals? *Pharm Res*. 2000;17(4):397–404. doi:10.1023/A:1007516718048
52. Eslami F, Elliott JAW. Role of precipitating solute curvature on microdrops and nanodrops during concentrating processes: The nonideal Ostwald-Freundlich equation. *J Phys Chem B*. 2014;118(50):14675–14686. doi:10.1021/jp5063786
53. Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*. 2004;284(1–2):109–122. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.07.019
54. Buckton G, Beezer AE. The relationship between particle size and solubility. *Int J Pharm*. 1992;82(3):7–10. doi:10.1016/0378-5173(92)90184-4
55. Mauludin R, Müller RH, Keck CM. Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. *Eur J Pharm Sci*. 2009;36(4–5):502–510. doi:10.1016/j.ejps.2008.12.002
56. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm*. 2006;321(1–2):1–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.011
57. Peltonen L, Hirvonen J, Laaksonen T. Drug Nanocrystals and Nanosuspensions in Medicine. Em: Torchilin V, ed. *Handbook of Nanobiomedical Research*. Vol 3. Frontiers in Nanobiomedical Research. Singapore: WORLD SCIENTIFIC; 2013:169–197. doi:10.1142/9789814520652_0005
58. Gao X, Tao W, Lu W, et al. Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials*. 2006;27(18):3482–3490. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.038
59. Müller RH, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm*. 1998;160(2):229–237. doi:10.1016/S0378-5173(97)00311-6
60. Peltonen L. Practical guidelines for the characterization and quality control of pure drug nanoparticles and nano-cocrystals in the pharmaceutical industry. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;131:101–115. doi:10.1016/j.addr.2018.06.009
61. Liu Y, Kathan K, Saad W, Prud'homme RK. Ostwald ripening of β -carotene nanoparticles. *Phys Rev Lett*. 2007;98(3):8–11. doi:10.1103/PhysRevLett.98.036102

62. Werz T, Baumann M, Wolfram U, Krill CE. Particle tracking during Ostwald ripening using time-resolved laboratory X-ray microtomography. *Mater Charact.* 2014;90:185–195. doi:10.1016/j.matchar.2014.01.022
63. Alshora DH, Ibrahim MA, Alanazi FK. Chapter 6 - Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility. Em: Grumezescu AM, ed. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*. US: William Andrew Publishing; 2016:163–191. doi:10.1016/B978-0-323-42861-3.00006-6
64. Keck CM, Müller RH. Nanotoxicological classification system (NCS) - A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;84(3):445–448. doi:10.1016/j.ejpb.2013.01.001
65. Williams DF. B. Em: *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press; 1999:33–54. doi:10.5949/UPO9781846314438.006
66. Müller RH, Shegokar R, Gohla S, Keck CM. Nanocrystals: Production, Cellular Drug Delivery, Current and Future Products. Em: Prokop A, ed. *Intracellular Delivery*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011:411–432. doi:10.1007/978-94-007-1248-5_15
67. Peltonen L, Hirvonen J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: Critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(11):1569–1579. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01022.x
68. Verma S, Gokhale R, Burgess DJ. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *Int J Pharm.* 2009;380(1–2):216–222. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.005
69. Tuomela A, Hirvonen J, Peltonen L. Stabilizing Agents for Drug Nanocrystals: Effect on Bioavailability. *Pharmaceutics.* 2016;8(2):16. doi:10.3390/pharmaceutics8020016
70. Hang J, Shi L, Feng X, Xiao L. Electrostatic and electrosteric stabilization of aqueous suspensions of barite nanoparticles. *Powder Technol.* 2009;192(2):166–170. doi:10.1016/j.powtec.2008.12.010
71. Van Der Hoeven PC, Lyklema J. Electrostatic stabilization in non-aqueous media. *Adv Colloid Interface Sci.* 1992;42(C):205–277. doi:10.1016/0001-8686(92)80024-R
72. El Badawy AM, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ Sci Technol.* 2010;44(4):1260–1266. doi:10.1021/es902240k
73. Pelton R. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv Colloid Interface Sci.* 2000;85(1):1–33. doi:10.1016/S0001-8686(99)00023-8
74. Schmidt C, Bodmeier R. Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms. *J Control Release.* 1999;57(2):115–125. doi:10.1016/S0168-3659(98)00108-4
75. Shete G, Jain H, Punj D, Prajapat H, Akotiya P, Bansal AK. Stabilizers used in nano-crystal based drug delivery systems. *J Excipients Food Chem.* 2014;5(4):184–209.
76. Tadros T. Steric Stabilization. Em: Tadros T, ed. *Encyclopedia of Colloid and Interface Science*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2013:1048–1049. doi:10.1007/978-3-642-20665-8

77. Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Em: McNeil SE, ed. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011:63–70. doi:10.1007/978-1-60327-198-1_6
78. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*. 2007;28(31):4600–4607. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.029
79. Yang H, Kim H, Jung S, et al. Pharmaceutical Strategies for Stabilizing Drug Nanocrystals. *Curr Pharm Des*. 2018;24(21):2362–2374. doi:10.2174/1381612824666180515125247
80. Sun B, Yeo Y. Nanocrystals for the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Curr Opin Solid State Mater Sci*. 2012;16(6):295–301. doi:10.1016/j.cossms.2012.10.004
81. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(9):785–796. doi:10.1038/nrd1494
82. Gao L, Zhang D, Chen M, Zheng T, Wang S. Preparation and characterization of an oridonin nanosuspension for solubility and dissolution velocity enhancement. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007;33(12):1332–1339. doi:10.1080/03639040701741810
83. Deng J, Huang L, Liu F. Understanding the structure and stability of paclitaxel nanocrystals. *Int J Pharm*. 2010;390(2):242–249. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.02.013
84. Akpinar B, Fielding LA, Cunningham VJ, et al. Determining the Effective Density and Stabilizer Layer Thickness of Sterically Stabilized Nanoparticles. *Macromolecules*. 2016;49(14):5160–5171. doi:10.1021/acs.macromol.6b00987
85. Gedde UW. A Brief Introduction to Polymer Science. Em: Gedde UW, ed. *Polymer Physics*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1999:1–18. doi:10.1007/978-94-011-0543-9_1
86. Pattnaik S, Swain K, Rao JV, Varun T, Prusty KB, Subudhi SK. Aceclofenac nanocrystals for improved dissolution: Influence of polymeric stabilizers. *RSC Adv*. 2015;5(112):91960–91965. doi:10.1039/c5ra20411a
87. Lee J, Lee SJ, Choi JY, Yoo JY, Ahn CH. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. *Eur J Pharm Sci*. 2005;24(5):441–449. doi:10.1016/j.ejps.2004.12.010
88. Kadajji VG, Betageri G V. Water soluble polymers for pharmaceutical applications. *Polymers (Basel)*. 2011;3(4):1972–2009. doi:10.3390/polym3041972
89. Wallick D. Polyethylen Glycol. Em: Rowe R, Sheskey P, Quinn M, eds. *Handbook oh Pharmaceutical Excipients*. 6.^a ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2009:517–522.
90. D'souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(9):1257–1275. doi:10.1080/17425247.2016.1182485
91. Afifi SA, Hassan MA, Abdelhameed AS, Elkhodairy KA. Nanosuspension: An emerging trend for bioavailability enhancement of etodolac. *Int J Polym Sci*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/938594
92. Haaf F, Sanner A, Straub F. Polymers of n-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. *Polym J*. 1985;17(1):143–152. doi:10.1295/polymj.17.143

93. Koczur KM, Mourdikoudis S, Polavarapu L, Skrabalak SE. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalt Trans.* 2015;44(41):17883–17905. doi:10.1039/c5dt02964c
94. Yamashita Y, Miyahara R, Sakamoto K. Emulsion and emulsification technology. Em: Sakamoto K, Lochhead RY, Maibach HI, Yamashita Y, eds. *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications*. Amesterdão: Elsevier Inc.; 2017:489–506. doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00028-8
95. Naskar MK, Patra A, Chatterjee M. Understanding the role of surfactants on the preparation of ZnS nanocrystals. *J Colloid Interface Sci.* 2006;297(1):271–275. doi:10.1016/j.jcis.2005.10.057
96. Matteucci ME, Hotze MA, Johnston KP, Williams RO. Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: Mixing energy versus surfactant stabilization. *Langmuir.* 2006;22(21):8951–8959. doi:10.1021/la061122t
97. Sharma S, Verma A, Teja BV, Shukla P, Mishra PR. Development of stabilized Paclitaxel nanocrystals: In-vitro and in-vivo efficacy studies. *Eur J Pharm Sci.* 2015;69:51–60. doi:10.1016/j.ejps.2014.11.012
98. Mahdi ES, Sattar M, Sakeena MHF, Abdulkarim M, Noor AM, Abdullah G. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:311. doi:10.2147/DDDT.S15698
99. Sadasivan S, Bellabarba RM, Tooze RP. Size dependent reduction-oxidation-reduction behaviour of cobalt oxide nanocrystals. *Nanoscale.* 2013;5(22):11139–11146. doi:10.1039/c3nr02877a
100. Huang X, Du YZ, Yuan H, Hu FQ. Preparation and pharmacodynamics of low-molecular-weight chitosan nanoparticles containing insulin. *Carbohydr Polym.* 2009;76(3):368–373. doi:10.1016/j.carbpol.2008.10.025
101. Sosnik A, Mühlebach S. Editorial: Drug Nanoparticles and Nano-Cocrystals: From Production and Characterization to Clinical Translation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;131:1–2. doi:10.1016/j.addr.2018.09.001
102. Huang Y, Li JM, Lai ZH, Wu J, Lu TB, Chen JM. Phenazopyridine-phthalimide nano-cocrystal: Release rate and oral bioavailability enhancement. *Eur J Pharm Sci.* 2017;109(March):581–586. doi:10.1016/j.ejps.2017.09.020
103. Karashima M, Kimoto K, Yamamoto K, Kojima T, Ikeda Y. A novel solubilization technique for poorly soluble drugs through the integration of nanocrystal and cocrystal technologies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;107:142–150. doi:10.1016/j.ejpb.2016.07.006
104. De Smet L, Saerens L, De Beer T, et al. Formulation of itraconazole nanococrystals and evaluation of their bioavailability in dogs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(1):107–113. doi:10.1016/j.ejpb.2013.12.016
105. Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm.* 2010;399(1–2):129–139. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.07.044
106. Hollis CP, Zhao R, Li T. Hybrid nanocrystal as a versatile platform for cancer theranostics. *Biomater Cancer Ther Diagnosis, Prev Ther.* 2013:188–207. doi:10.1533/9780857096760.3.188
107. Serrano D, Gallagher K, Healy A. Emerging Nanonisation Technologies: Tailoring Crystalline Versus Amorphous Nanomaterials. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(22):2327–2340. doi:10.2174/1568026615666150605122917

108. Cheow W, Xu R, Hadinoto K. Towards Sustainability: New Approaches to Nano-Drug Preparation. *Curr Pharm Des.* 2013;19(35):6229–6245. doi:10.2174/1381612811319350002
109. Liu P, Rong X, Laru J, et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling. *Int J Pharm.* 2011;411(1–2):215–222. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.050
110. Mugheirbi NA, Paluch KJ, Tajber L. Heat induced evaporative antisolvent nanoprecipitation (HIEAN) of itraconazole. *Int J Pharm.* 2014;471(1–2):400–411. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.045
111. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm.* 2005;299(1–2):167–177. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.014
112. Zhang J, Lv H, Jiang K, Gao Y. Enhanced bioavailability after oral and pulmonary administration of baicalein nanocrystal. *Int J Pharm.* 2011;420(1):180–188. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.023
113. Li X, Anton N, Arpagaus C, Belleteix F, Vandamme TF. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. *J Control Release.* 2010;147(2):304–310. doi:10.1016/j.jconrel.2010.07.113
114. De Waard H, De Beer T, Hinrichs WLJ, Vervaet C, Remon JP, Frijlink HW. Controlled crystallization of the lipophilic drug fenofibrate during freeze-drying: Elucidation of the mechanism by in-line raman spectroscopy. *AAPS J.* 2010;12(4):569–575. doi:10.1208/s12248-010-9215-z
115. Wagener P, Barcikowski S. Laser fragmentation of organic microparticles into colloidal nanoparticles in a free liquid jet. *Appl Phys A.* 2010;101(2):435–439. doi:10.1007/s00339-010-5814-x
116. Salazar J, Müller RH, Möschwitzer JP. Combinative Particle Size Reduction Technologies for the Production of Drug Nanocrystals. *J Pharm.* 2014;2014:1–14. doi:10.1155/2014/265754
117. Pidcock E, Chisholm JA, Wood PA, et al. The Cambridge Structural Database System and Its Applications in Supramolecular Chemistry and Materials Design. Em: Gale PA, Steed JW, eds. *Supramolecular Chemistry*. NJ: John Wiley & Sons; 2012. doi:10.1002/9780470661345.smc112
118. Todd PA, Clissold SP. Naproxen. *Drugs.* 1990;40(1):91–137. doi:10.2165/00003495-199040010-00006
119. Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years. *Clin Pharmacokinet.* 1998;34(2):101–154. doi:10.2165/00003088-199834020-00002
120. Vane JR, Botting RM. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Am J Med.* 1998;104(3):2S-8S. doi:10.1016/S0002-9343(97)00203-9
121. Ehrlich GE. Racemic mixtures: Harmless or potentially toxic? *Am J Hosp Pharm.* 1992;49(supp 9):15–18. doi:10.1093/ajhp/49.9_suppl_1.s15
122. Evans AM. Comparative Pharmacology of S(+)-Ibuprofen and (RS)-Ibuprofen. *Clin Rheumatol.* 2001;20(1):9–14. doi:10.1007/BF03342662
123. Kasprzyk-Hordern B. Pharmacologically active compounds in the environment and their chirality. *Chem Soc Rev.* 2010;39(11):4466–4503. doi:10.1039/c000408c
124. Uraki M, Kawase A, Iwaki M. Stereoselective hepatic disposition of ibuprofen in the perfused liver of rat with adjuvant-induced arthritis. *Xenobiotica.* 2017;47(11):943–950. doi:10.1080/00498254.2016.1252869

125. Irvine J, Afrose A, Islam N. Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018;44(2):173–183. doi:10.1080/03639045.2017.1391838
126. Varghese S, Ghoroi C. Improving the wetting and dissolution of ibuprofen using solventless co-milling. *Int J Pharm*. 2017;533(1):145–155. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.062
127. Song JS, Sohn YT. Crystal forms of naproxen. *Arch Pharm Res*. 2011;34(1):87–90. doi:10.1007/s12272-011-0110-7
128. Rolfe HM. A review of nicotinamide: treatment of skin diseases and potential side effects. *J Cosmet Dermatol*. 2014;13(4):324–328. doi:10.1111/jocd.12119
129. Ravikumar K, Rajan SS, Pattabhi V, Gabe EJ. Structure of naproxen, C₁₄H₁₄O₃. *Acta Crystallogr Sect C*. 1985;41(2):280–282. doi:10.1107/S0108270185003626
130. Shankland N, Florence AJ, Cox PJ, et al. Crystal morphology of ibuprofen predicted from single-crystal pulsed neutron diffraction data. *Chem Commun*. 1996;(7):855–856. doi:10.1039/cc9960000855
131. Dudognon E, Danède F, Descamps M, Correia NT. Evidence for a new crystalline phase of racemic Ibuprofen. *Pharm Res*. 2008;25(12):2853–2858. doi:10.1007/s11095-008-9655-7
132. Derollez P, Dudognon E, Affouard F, Danède F, Correia NT, Descamps M. Ab initio structure determination of phase II of racemic ibuprofen by X-ray powder diffraction. *Acta Crystallogr Sect B Struct Sci*. 2010;66(1):76–80. doi:10.1107/S0108768109047363
133. Maxwell R, Chickos J. An Examination of the Thermodynamics of Fusion, Vaporization, and Sublimation of Ibuprofen and Naproxen by Correlation Gas Chromatography. *J Pharm Sci*. 2012;101(2):805–814. doi:10.1002/jps.22803
134. Burger A, Koller KT, Schiermeier WM. RS-Ibuprofen and S-Ibuprofen (Dexibuprofen) - Binary System and Unusual Solubility Behaviour. *Eur J Pharm Biopharm*. 42(2):142–147.
135. Hino T, Ford JL, Powell MW. Assessment of nicotinamide polymorphs by differential scanning calorimetry. *Thermochim Acta*. 2001;374(1):85–92. doi:10.1016/S0040-6031(01)00491-9
136. Chow SF, Chen M, Shi L, Chow AHL, Sun CC. Simultaneously improving the mechanical properties, dissolution performance, and hygroscopicity of ibuprofen and flurbiprofen by cocrystallization with nicotinamide. *Pharm Res*. 2012;29(7):1854–1865. doi:10.1007/s11095-012-0709-5
137. Yalkowsky SH, He Y, Jain P. *Handbook of Aqueous Solubility Data*. 2.^a ed. Boca Raton: CRC Press; 2019.
138. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Kinneary JF. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 12.^a ed. NJ: Whitehouse Station; 1996.
139. Filippa MA, Gasull EI. Experimental determination of Naproxen solubility in organic solvents and aqueous binary mixtures: Interactions and thermodynamic parameters relating to the solvation process. *J Mol Liq*. 2014;198:78–83. doi:10.1016/j.molliq.2014.06.031
140. Filippa MA, Gasull EI. Ibuprofen solubility in pure organic solvents and aqueous mixtures of cosolvents: Interactions and thermodynamic parameters relating to the solvation process. *Fluid Phase Equilib*. 2013;354:185–190. doi:10.1016/j.fluid.2013.06.032

141. Ouyang J, Zhang Y, Na B, Liu Z, Zhou L, Hao H. Solubility Determination of Nicotinamide and Its Application for the Cocrystallization with Benzoic Acid. *J Chem Eng Data*. 2018;63(11):4157–4165. doi:10.1021/acs.jced.8b00560
142. Joyban A. *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*. 1.^a ed. Boca Raton: CCR Press; 2009.
143. Li J, Bourne SA, Caira MR. New polymorphs of isonicotinamide and nicotinamide. *Chem Commun*. 2011;47(5):1530–1532. doi:10.1039/C0CC04117C
144. Yuliandra Y, Zaini E, Syofyan S, et al. Cocrystal of ibuprofen–nicotinamide: Solid-state characterization and in vivo analgesic activity evaluation. *Sci Pharm*. 2018;86(2). doi:10.3390/scipharm86020023
145. Abbas N, Latif S, Afzal H, et al. Simultaneously Improving Mechanical, Formulation, and In Vivo Performance of Naproxen by Co-Crystallization. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(7):3249–3257. doi:10.1208/s12249-018-1152-7
146. Ando S, Kikuchi J, Fujimura Y, et al. Physicochemical Characterization and Structural Evaluation of a Specific 2:1 Cocrystal of Naproxen–Nicotinamide. *J Pharm Sci*. 2012;101(9):3214–3221. doi:10.1002/jps.23158
147. Neurohr C, Marchivie M, Lecomte S, et al. Naproxen-Nicotinamide Cocrystals: Racemic and Conglomerate Structures Generated by CO₂ Antisolvent Crystallization. *Cryst Growth Des*. 2015;15(9):4616–4626. doi:10.1021/acs.cgd.5b00876
148. Berry DJ, Seaton CC, Clegg W, et al. Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: A study of nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients. *Cryst Growth Des*. 2008;8(5):1697–1712. doi:10.1021/cg800035w
149. Sun X, Yin Q, Ding S, et al. Solid-liquid phase equilibrium and ternary phase diagrams of ibuprofen-nicotinamide cocrystals in ethanol and ethanol/water mixtures at (298.15 and 313.15) K. *J Chem Eng Data*. 2015;60(4):1166–1172. doi:10.1021/je5011455
150. Hall RG, Leff RD, Gumbo T. Treatment of active pulmonary tuberculosis in adults: Current standards and recent advances - Insights from the society of infectious diseases pharmacists. *Pharmacotherapy*. 2009;29(12):1468–1481. doi:10.1592/phco.29.12.1468
151. Agarwal S, Gupta M, Choudhury B. Solvent free biocatalytic synthesis of isoniazid from isonicotinamide using whole cell of *Bacillus smithii* strain IITR6b2. *J Mol Catal B Enzym*. 2013;97:67–73. doi:10.1016/j.molcatb.2013.07.010
152. Yamamoto H, Okamoto H. Protection by picolinamide, a novel inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, against both streptozotocin-induced depression of proinsulin synthesis and reduction of NAD content in pancreatic islets. *Top Catal*. 1980;95(1):474–481. doi:10.1016/0006-291X(80)90762-7
153. Manimaran T, Stahly GP. Optical purification of profen drugs. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1993;4(8):1949–1954. doi:10.1016/S0957-4166(00)80436-X
154. Braun DE, Ardid-Candel M, D’Oria E, et al. Racemic naproxen: A multidisciplinary structural and thermodynamic comparison with the enantiopure form. *Cryst Growth Des*. 2011;11(12):5659–5669. doi:10.1021/cg201203u
155. Aakeröy CB, Beatty AM, Helfrich BA, Nieuwenhuyzen M. Do Polymorphic Compounds Make Good Cocrystallizing Agents? A Structural Case Study that Demonstrates the Importance of Synthons Flexibility. *Cryst Growth Des*. 2003;3(2):159–165. doi:10.1021/cg025593z

156. Eccles KS, Deasy RE, Fábíán L, Braun DE, Maguire AR, Lawrence SE. Expanding the crystal landscape of isonicotinamide: Concomitant polymorphism and co-crystallisation. *CrystEngComm*. 2011;13(23):6923–6925. doi:10.1039/c1ce06320k
157. Vicatos AI, Caira MR. A new polymorph of the common cofomer isonicotinamide. *CrystEngComm*. 2019;21(5):843–849. doi:10.1039/c8ce01588k
158. Takano T, Sasada Y, Kakudo M. The crystal and molecular structure of picolinamide. *Acta Crystallogr*. 1966;21(4):514–522. doi:10.1107/S0365110X66003396
159. Évora AOL, Castro RAE, Maria TMR, et al. Resolved structures of two picolinamide polymorphs. Investigation of the dimorphic system behaviour under conditions relevant to co-crystal synthesis. *CrystEngComm*. 2012;14(24):8649–8657. doi:10.1039/c2ce26244d
160. James SL, Adams CJ, Bolm C, et al. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chem Soc Rev*. 2012;41(1):413–447. doi:10.1039/C1CS15171A
161. Tsuzuki T, McCormick PG. Mechanochemical synthesis of nanoparticles. *J Mater Sci*. 2004;39(16–17):5143–5146. doi:10.1023/B:JMSC.0000039199.56155.f9
162. Baláž P, Achimovicová M, Baláž M, et al. Hallmarks of mechanochemistry: From nanoparticles to technology. *Chem Soc Rev*. 2013;42(18):7571–7637. doi:10.1039/c3cs35468g
163. Friščić T. Supramolecular concepts and new techniques in mechanochemistry: Cocrystals, cages, rotaxanes, open metal–organic frameworks. *Chem Soc Rev*. 2012;41(9):3493–3510. doi:10.1039/c2cs15332g
164. Tan D, Friščić T. Mechanochemistry for Organic Chemists: An Update. *European J Org Chem*. 2018;2018(1):18–33. doi:10.1002/ejoc.201700961
165. Hasa D, Schneider G, Voinovich D, Jones W. Cocrystal Formation through Mechanochemistry: From Neat and Liquid-Assisted Grinding to Polymer-Assisted Grinding. *Angew Chemie - Int Ed*. 2015;54(25):7371–7375. doi:10.1002/anie.201501638
166. Zhong X, Lu Y, Luo F, Liu Y, Li X, Liu S. A Nanocrystalline POM@MOFs Catalyst for the Degradation of Phenol: Effective Cooperative Catalysis by Metal Nodes and POM Guests. *Chem - A Eur J*. 2018;24(12):3045–3051. doi:10.1002/chem.201705677
167. Salimi MN, Bridson RH, Grover LM, Leeke GA. Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles. *Powder Technol*. 2012;218:109–118. doi:10.1016/j.powtec.2011.11.049
168. Yu K, Rinklebe J. Advancement in soil microcosm apparatus for biogeochemical research. *Ecol Eng*. 2011;37(12):2071–2075. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.08.017
169. Jiang Z, Zhang L, Yao Q, et al. Agitator dependent homogeneity enhancement of co-precipitation reaction for improving the dispersibility of precursors and Y2O3 powders. *Ceram Int*. 2017;43(18):16121–16127. doi:10.1016/j.ceramint.2017.08.178
170. Ludwig EE, ed. Chapter 5 - Mixing of Liquids. Em: *Emphasizes how to apply techniques of process design and interpret results into mechanical equipment details*. Vol 1. Houston: Gulf Professional Publishing; 1999:288–342. doi:10.1016/S1874-8635(99)80006-5

171. lawford HG, Rousseau JD. Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide. *Appl Biochem Biotechnol*. 1991;28(1):667–684. doi:10.1007/BF02922641
172. Cravotto G, Gaudino EC, Cintas P. On the mechanochemical activation by ultrasound. *Chem Soc Rev*. 2013;42(18):7521–7534. doi:10.1039/c2cs35456j
173. Mohseni Meybodi S, Hosseini SA, Rezaee M, Sadrnezhad SK, Mohammadyani D. Synthesis of wide band gap nanocrystalline NiO powder via a sonochemical method. *Ultrason Sonochem*. 2012;19(4):841–845. doi:10.1016/j.ultsonch.2011.11.017
174. Dular M, Požar T, Zevnik J, Petkovšek R. High speed observation of damage created by a collapse of a single cavitation bubble. *Wear*. 2019;418–419:13–23. doi:10.1016/j.wear.2018.11.004
175. Borchard G. Drug Nanocrystals. Em: Crommelin DJA, de Vlieger JSB, eds. *Non-Biological Complex Drugs: The Science and the Regulatory Landscape*. Cham: Springer International Publishing; 2015:171–189. doi:10.1007/978-3-319-16241-6_6
176. Khan SA, Khan SB, Khan LU, Farooq A, Akhtar K, Asiri AM. Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. Em: Sharma SK, ed. *Handbook of Materials Characterization*. Cham: Springer International Publishing; 2018:317–344. doi:10.1007/978-3-319-92955-2_9
177. Schuttlefield JD, Grassian VH. ATR-FTIR spectroscopy in the undergraduate chemistry laboratory part I: Fundamentals and examples. *J Chem Educ*. 2008;85(2):279–281. doi:10.1021/ed085p279
178. Coleman NJ, Craig DQM. Modulated temperature differential scanning calorimetry: A novel approach to pharmaceutical thermal analysis. *Int J Pharm*. 1996;135(1–2):13–29. doi:10.1016/0378-5173(95)04463-9
179. Haines PJ, Reading M, Wilburn FW. Chapter 5 - Differential Thermal Analysis and Differential Scanning Calorimetry. Em: Brown MEHT-H of TA and C, ed. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1998:279–361. doi:10.1016/S1573-4374(98)80008-3
180. Yamashita H, Hirakura Y, Yuda M, Teramura T, Terada K. Detection of cocrystal formation based on binary phase diagrams using thermal analysis. *Pharm Res*. 2013;30(1):70–80. doi:10.1007/s11095-012-0850-1
181. Freitas JCC, Nunes E, Passamani EC, Larica C, Kellermann G, Craievich AF. Structure and melting of Pb nanocrystals produced by mechanical alloying of Fe/Pb powder mixtures. *Acta Mater*. 2006;54(19):5095–5102. doi:10.1016/j.actamat.2006.06.050
182. Sabbah R, Xu-Wu A, Chickos JS, Leitão MLP, Roux M V., Torres LA. Reference materials for calorimetry and differential thermal analysis. *Thermochim Acta*. 1999;331(2):93–204. doi:10.1002/chin.199936282
183. Mathkar S, Kumar S, Bystol A, et al. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;49(3):627–631. doi:10.1016/j.jpba.2008.12.030
184. Bunaciu AA, Udriștioiu E gabriela, Aboul-Enein HY. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Crit Rev Anal Chem*. 2015;45(4):289–299. doi:10.1080/10408347.2014.949616
185. Bragg WH, Bragg WL. The reflection of X-rays by crystals. *Proc R Soc London Ser A, Contain Pap a Math Phys Character*. 1913;88(605):428–438. doi:10.1098/rspa.1913.0040

186. Whittig LD, Allardice WR. X-Ray Diffraction Techniques. Em: Klute A, ed. *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*. 2.^a ed. SSSA Book Series. Madison: Soil Science Society of America; 1986:331–362. doi:10.2136/sssabookser5.1.2ed.c12
187. Harris KDM. Powder Diffraction Crystallography of Molecular Solids. Em: Rissanen K, ed. *Advanced X-Ray Crystallography*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012:133–177. doi:10.1007/128_2011_251
188. Sheldrick GM. SHELXS-97 and SHELXL-97, Program for Crystal Structure Solution and Refinement. *Institut für Anorg Chemie der Univ Gottingen, Ger*. 1997.
189. Akhtar K, Khan SA, Khan SB, Asiri AM. Scanning Electron Microscopy: Principle and Applications in Nanomaterials Characterization. Em: Sharma SK, ed. *Handbook of Materials Characterization*. Cham: Springer International Publishing; 2018:113–145. doi:10.1007/978-3-319-92955-2_4
190. Reimer L. Introduction. Em: Reimer L, ed. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1998:1–12. doi:10.1007/978-3-540-38967-5_1
191. Goldberg MW. Chapter 7 Immunolabeling for Scanning Electron Microscopy (SEM) and Field Emission SEM. *Methods Cell Biol*. 2008;88(08):109–130. doi:10.1016/S0091-679X(08)00407-X
192. Boreham A, Volz P, Peters D, Keck CM, Alexiev U. Determination of nanostructures and drug distribution in lipid nanoparticles by single molecule microscopy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2017;110:31–38. doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.020
193. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*. 2016;8(4):409–427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
194. de Boer GBJ, de Weerd C, Thoenes D, Goossens HWJ. Laser Diffraction Spectrometry: Fraunhofer Diffraction Versus Mie Scattering. *Part Part Syst Charact*. 1987;4(1–4):14–19. doi:10.1002/ppsc.19870040104
195. Mühlenweg H, Dan Hirtleman E. Laser Diffraction Spectroscopy: Influence of Particle Shape and a Shape Adaptation Technique. *Part Part Syst Charact*. 1998;15(4):163–169. doi:10.1002/(SICI)1521-4117(199808)15:4<163::AID-PPSC163>3.0.CO;2-8
196. Chappell A. Dispersing sandy soil for the measurement of particle size distributions using optical laser diffraction. *Catena*. 1998;31(4):271–281. doi:10.1016/S0341-8162(97)00049-0
197. Luger P. 1. Introduction. Em: *Modern X-Ray Analysis on Single Crystals*. Berlin, Boston: De Gruyter; 2014:1–13. doi:10.1515/9783110308280.1
198. Pattanaboonmee N, Ramasamy P, Yimnirun R, Manyum P. A comparative study on pure, l-arginine and glycine doped ammonium dihydrogen orthophosphate single crystals grown by slow solvent evaporation and temperature-gradient method. *J Cryst Growth*. 2011;314(1):196–201. doi:10.1016/j.jcrysgro.2010.11.061
199. Karimi-Jafari M, Padrela L, Walker GM, Croker DM. Creating cocrystals: A review of pharmaceutical cocrystal preparation routes and applications. *Cryst Growth Des*. 2018;18(10):6370–6387. doi:10.1021/acs.cgd.8b00933
200. Boistelle R, Astier JP. Crystallization mechanisms solution. *J Cryst Growth*. 1988;90(1):14–30. doi:10.1016/0022-0248(88)90294-1

201. Wittmann JC, Smith P. Highly oriented thin films of poly(tetrafluoroethylene) as a substrate for oriented growth of materials. *Nature*. 1991;352(6334):414–417. doi:10.1038/352414a0
202. ter Horst JH, Deij MA, Cains PW. Discovering New Co-Crystals. *Cryst Growth Des*. 2009;9(3):1531–1537. doi:10.1021/cg801200h
203. Sun CC, Kiang Y-H. On the identification of slip planes in organic crystals based on attachment energy calculation. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):3456–3461. doi:10.1002/jps.21234
204. Alves A. Investigação de co-cristais de (R,S)- e (S)-Ibuprofeno. *Tese Mestr em Química, Área Espec em Química Avançada e Ind Dep Química - Univ Coimbra, Coimbra 97pp*. 2012.
205. Helgason T, Awad TS, Kristbergsson K, McClements DJ, Weiss J. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Colloid Interface Sci*. 2009;334(1):75–81. doi:10.1016/j.jcis.2009.03.012
206. Prigogine I, Defay R. *Chemical Thermodynamics*. Glasgow, Reino Unido: Longmans; 1954.
207. Niskanen I, Forsberg V, Zakrisson D, et al. Determination of nanoparticle size using Rayleigh approximation and Mie theory. *Chem Eng Sci*. 2019;201:222–229. doi:10.1016/j.ces.2019.02.020
208. Hasa D, Schneider Rauber G, Voinovich D, Jones W. Cocrystal Formation through Mechanochemistry: from Neat and Liquid-Assisted Grinding to Polymer-Assisted Grinding. *Angew Chemie Int Ed*. 2015;54(25):7371–7375. doi:10.1002/anie.201501638
209. Kibbe AH. Povidone. Em: Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6.^a ed. Londres: Pharmaceutical Press; 2009:581–585.
210. Kumar S, Burgess DJ. Wet milling induced physical and chemical instabilities of naproxen nanocrystalline suspensions. *Int J Pharm*. 2014;466(1):223–232. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.03.021
211. Merisko-Liversidge E, Sarpotdar P, Bruno J, et al. Formulation and Antitumor Activity Evaluation of Nanocrystalline Suspensions of Poorly Soluble Anticancer Drugs. *Pharm Res*. 1996;13(2):272–278. doi:10.1023/A:1016051316815
212. Lackinger M, Griessl S, Heckl WM, Hietschold M, Flynn GW. Self-assembly of trimesic acid at the liquid-solid interface - A study of solvent-induced polymorphism. *Langmuir*. 2005;21(11):4984–4988. doi:10.1021/la0467640
213. Kampschulte L, Lackinger M, Maier AK, et al. Solvent induced polymorphism in supramolecular 1,3,5-benzenetribenzoic acid monolayers. *J Phys Chem B*. 2006;110(22):10829–10836. doi:10.1021/jp057553m

Anexos

Anexo I – Secção 1.7.2

Tabela A1. Parâmetros cristalográficos dos modelos de cocristais utilizados.^{28,146}

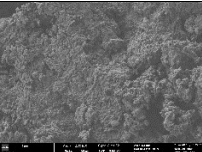
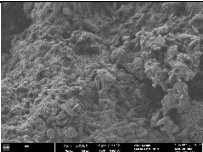
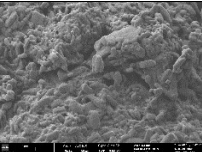
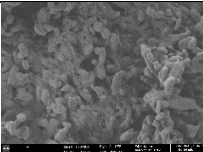
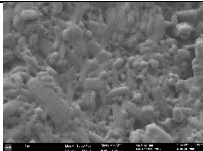
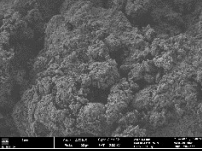
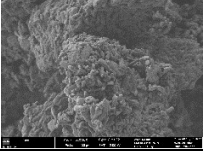
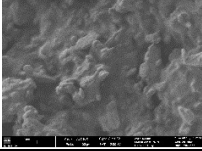
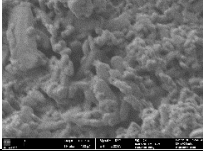
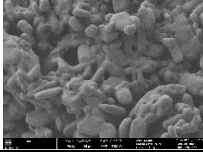
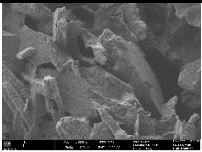
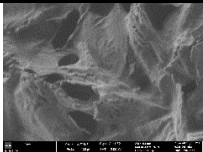
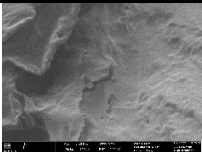
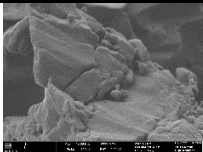
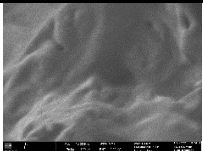
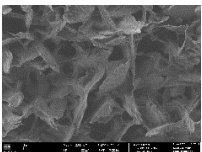
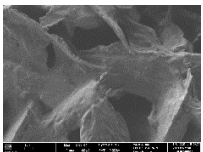
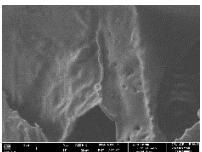
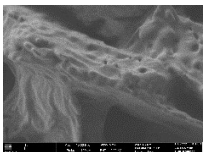
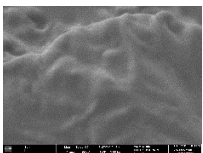
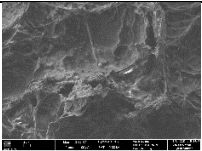
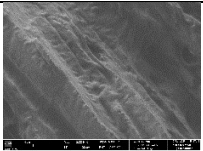
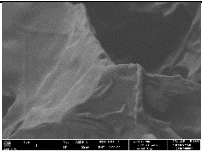
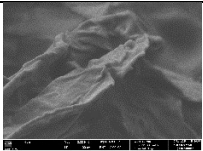
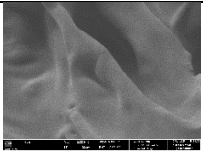
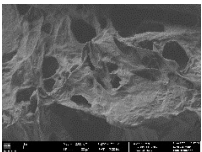
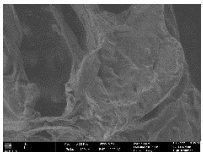
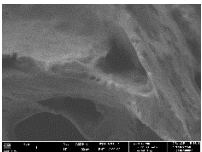
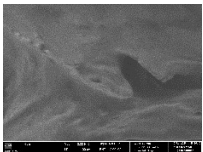
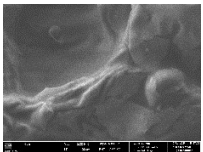
	(S)NPX-NIC	(RS)IBU-NIC
Sistema Cristalográfico	Ortorrômbico	Ortorrômbico
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Pca2 ₁
a (Å)	5.963 (11)	11.7129(16)
b (Å)	15.128 (3)	5.4915(8)
c (Å)	32.541 (6)	56.289(7)
α (°)	90,0	90,0
β (°)	90,0	90,0
γ (°)	90,0	90,0
V (Å ³)	2935.7 (1)	3,620.6(9)
Z	4	8

Tabela A2. Parâmetros geométricos das ligações de hidrogénio dos modelos de cocrystal.^{28,147} O * indica a ligação que se forma em detrimento da anterior.

	D—H···A	D···H / Å	H···A / Å	D···A / Å	D—H···A / °
(S)NPX+NIC	O3—H11···O7	0.83	1.80	2.620(4)	170.9
	N2—H33···O2	0.87	2.18	3.019(5)	160.7
	O6—H25···N1	0.83	1.85	2.667(4)	167.6
	N2—H34···O5A	0.87	2.20	3.07(2)	172.4
	N2—H34···O5B*		1.99	2.80(3)	154.4
(RS)IBU+NIC	N1—H1A···O2	0.87(6)	2.06(6)	2.905(7)	164.5
	N1—H1B···O5	0.87(6)	2.25(7)	3.092(7)	164.1
	N3—H3A···O1	0.87(7)	2.10(6)	2.939(7)	162.5
	N3—H3B···O3	0.87(6)	2.25(7)	3.101(6)	166.7
	O4—H4···N4	0.83(7)	1.86(6)	2.682(7)	173.2
	O6—H6···N2	0.83(7)	1.82(7)	2.624(9)	164.4

Anexo II – Secção 3.1.1.1

Tabela A3. Imagens SEM correspondentes às amostras de (*S*)-naproxeno e de (*RS*)-ibuprofeno, submetidas a LAG.

(S)NPX	2000x	5000x	7500x	10000x	15000
10 µl 25% Span 85 em etanol					
					
(RS)IBU					
					
10 µl 50% Span 85 em etanol					
					

Anexo III – Secção 3.1.1.2

Tabela A4. Imagens SEM do cocrystal (S)NPX-NIC obtido por LAG em diferentes condições experimentais.

NPX:NIC (2:1)	1000x	5000x	25000x	50000x
Etanol				
10 µl 25% Span 85 em etanol				
10 µl 50% Span 85 em etanol				

Tabela A5. Imagens FESEM do cocrystal (S)NPX-NIC obtidos por LAG em diferentes condições experimentais.

NPX:NIC (2:1)	2000x	5000x	7500x	10000x	15000
20 µl 25% Span 85 em etanol					
10 µl 50% Span 85 em etanol					
20 µl 50% Span 85 em etanol					

Tabela A6. Imagens FESEM do cocrystal (RS)IBU-NIC obtidos por LAG em diferentes condições experimentais.

(RS)IBU-NIC (1:1)	2000x	3500x	8000x
20 µl etanol			
20 µl 25% Span 85 em etanol			
20 µl 25% Tween 85 em etanol			

Anexo IV – Secção 3.1.1.3

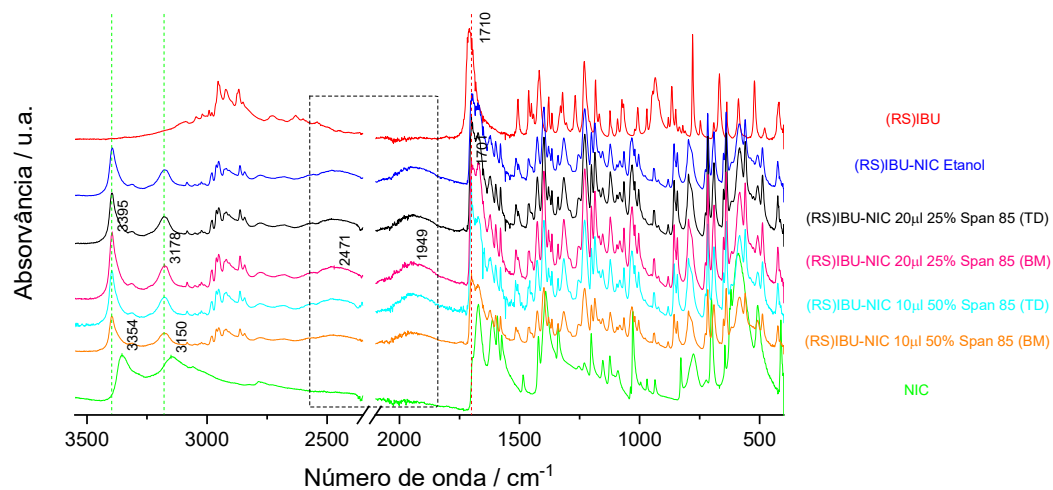


Figura A1. Espectros IV correspondentes aos cocrystal (RS)IBU-NIC obtidos via “top-down”: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH₂; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH···N_{aromático}; (MB) – moinho de bolas; (DT) – diagrama ternário.

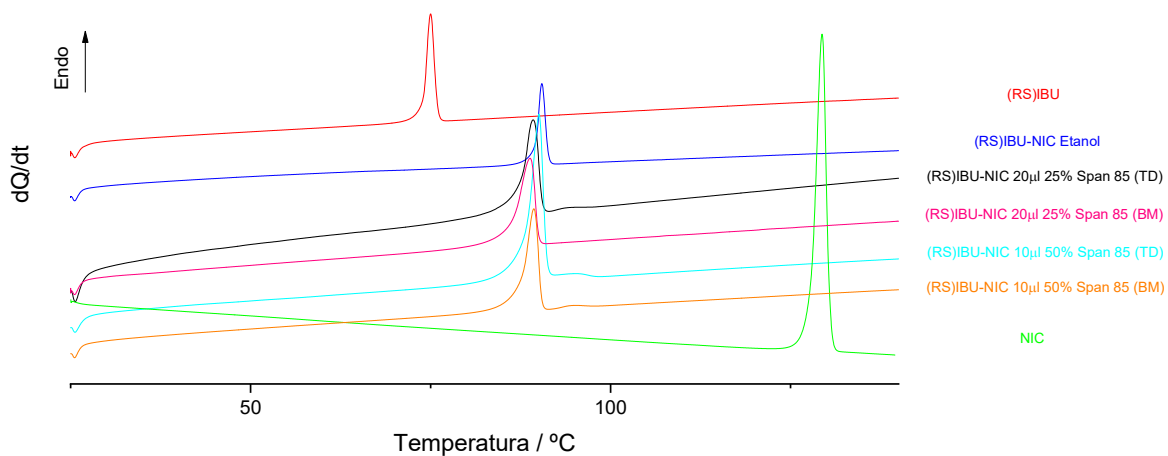


Figura A2. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do cocristal (RS)IBU-NIC obtidos via “top-down”.

Tabela A7. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas, DSC, dos sistemas (RS)IBU-NIC, nas várias condições estudadas para obtenção de nanocristais via método “top-down”: MB - moinho de bolas; DT – diagrama ternário.

	$T_{fus} / ^\circ\text{C}$	$\Delta_{fus}H / \text{J g}^{-1}$
(RS)IBU	74,9	131
(RS)IBU-NIC Etanol	89,1	138
(RS)IBU-NIC 20 μl 25% Span 85 em Etanol (MB)	86,0	110
(RS)IBU-NIC 20 μl 25% Span 85 em Etanol (DT)	87,3	94
(RS)IBU-NIC 10 μl 50% Span 85 em Etanol (MB)	87,3	130
(RS)IBU-NIC 10 μl 50% Span 85 em Etanol (DT)	87,9	120
NIC	128,1	190

As pequenas variações observadas nos parâmetros termodinâmicos dos cocristais apresentados na Tabela A7 devem-se à presença do surfactante na mistura, que promove a diminuição da temperatura e entalpia de fusão.

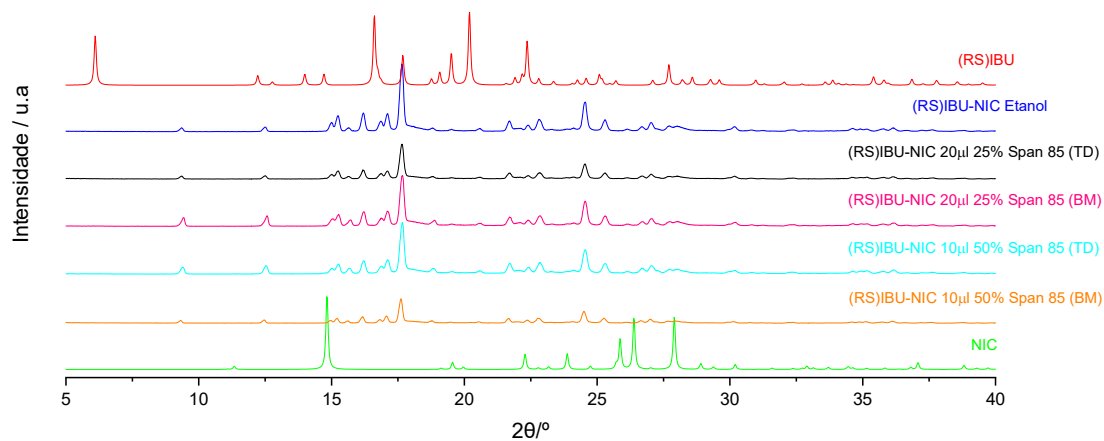


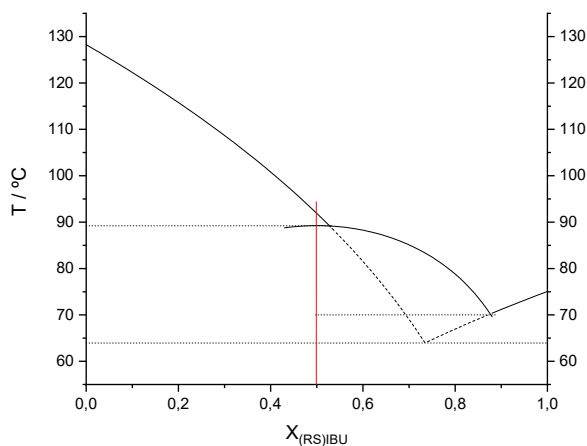
Figura A3. Difratomogramas de raios-X de pó dos cocristais de (RS)IBU-NIC obtidos via “top-down”, e dos compostos de partida que lhes deram origem.

Tabela A8. Imagens FESEM do cocrystal (RS)IBU-NIC obtido via “top-down” em diferentes condições experimentais. (DT) – diagrama ternário; (MB) – moinho de bolas.

(RS)IBU-NIC (1:1)	20 µl 25% Span 85 em etanol (DT)	20 µl 25% Span 85 em etanol (MB)	10 µl 50% Span 85 em etanol (DT)	10 µl 50% Span 85 em etanol (MB)
2000x				
2500x		-		-
3000x		-		-
5000x				
10000x	-			
15000x				-

Anexo V – Secção 3.1.1.4

A moagem do cocrystal (RS)IBU-NIC para obtenção de nanocristais *in situ* revelou um processo de fusão da mistura dos compostos de partida, seguida da recristalização com obtenção do cocrystal puro. Esta ocorrência pode ser associada à formação da mistura eutética de (RS)IBU com a NIC. De forma a esclarecer o processo observado, simulou-se o diagrama de fases deste sistema, apresentado na Figura A4, partindo das temperaturas e entalpias de fusão do cocrystal e dos seus compostos de partida (Tabela 10).



$$\frac{1}{T_{fus}} = \frac{1}{T_{fus}^*} - \frac{R \ln x_i}{\Delta_{fus} H_m^*}$$

$$\frac{1}{T_{fus}} = \frac{1}{T_{fus}^{cc}} - \frac{R}{\Delta_{fus} H_m^{cc}} \{ \ln [x_{cc}(1 - x_{cc})] - \ln [x_i(1 - x_i)] \}$$

Figura A4. Diagrama de fases sólido-líquido da mistura binária de (RS)IBU+NIC. T_{fus}^* e $\Delta_{fus} H_m^*$; T_{fus}^{cc} e $\Delta_{fus} H_m^{cc}$, correspondem à temperatura e entalpia de fusão dos componentes puros.²⁰⁶

A composição da mistura em análise corresponde à estequiometria de 1:1, uma vez que foi a partir desta que se observou o processo de fusão durante a moagem, e encontra-se assinalada pela linha a vermelho no diagrama, de forma a permitir perceber quais os processos que irão, teoricamente, ocorrer.

A informação presente no diagrama corrobora a teoria da fusão da mistura eutética, com um excesso de nicotinamida, uma vez que a estequiometria do cocrystal apresenta uma fração molar de (RS)IBU inferior à da mistura eutética. Para confirmar se, de facto, a informação obtida através da simulação do diagrama é reprodutível experimentalmente, procurou obter-se os termogramas referentes à mistura física dos compostos preparados em almofariz, com esta estequiometria, aquecidos a velocidades de 2 e 10 °C/min, que se apresentam na Figura 41.

Uma vez que o calorímetro utilizado se encontra calibrado para a realização de aquecimentos com velocidades de 10 °C/min, foi necessária a obtenção do termograma de um calibrante, neste caso o bifenilo, de forma a minimizar a diferença de temperaturas para o ensaio realizado a 2 °C/min, diminuindo o erro associado.

Ambos os aquecimentos confirmam a presença do eutético por volta dos 60 °C, de forma semelhante ao que se verificava na simulação que se apresenta, o que implica que, de facto, o processo de moagem desta

mistura leva à fusão da mistura eutética metastável entre os dois compostos de partida, que depois acaba por recrystalizar, formando o cocrystal deste sistema.

Anexo VI – Secção 3.1.2.1

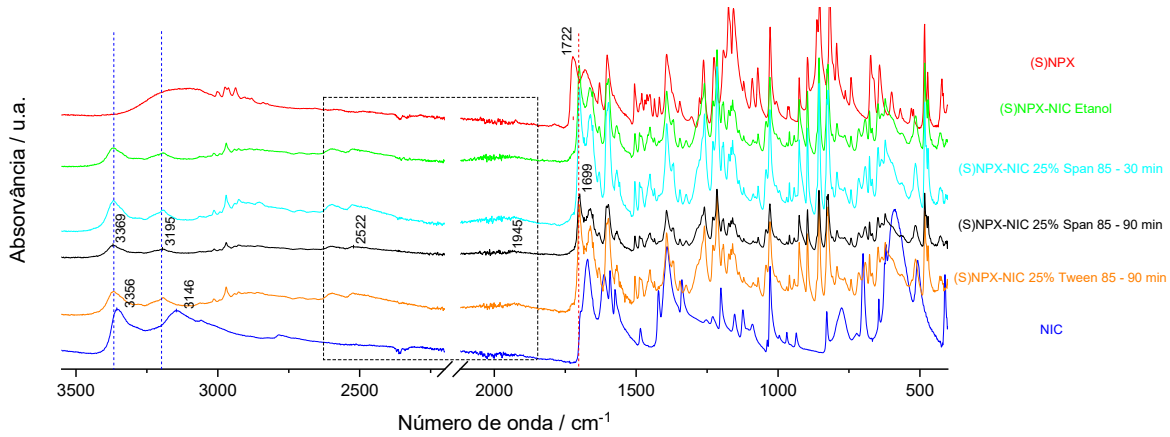


Figura A5. Espectros IV dos cocrystalos (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com Span 85 e Tween 85, com aumento do tempo de moagem: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH₂; --- desvio da elongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH...N_{aromático}.

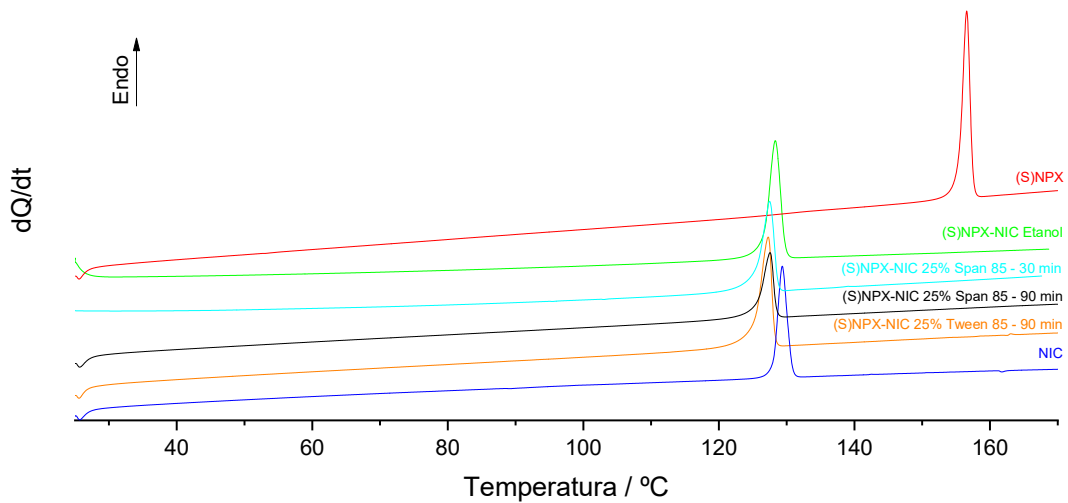
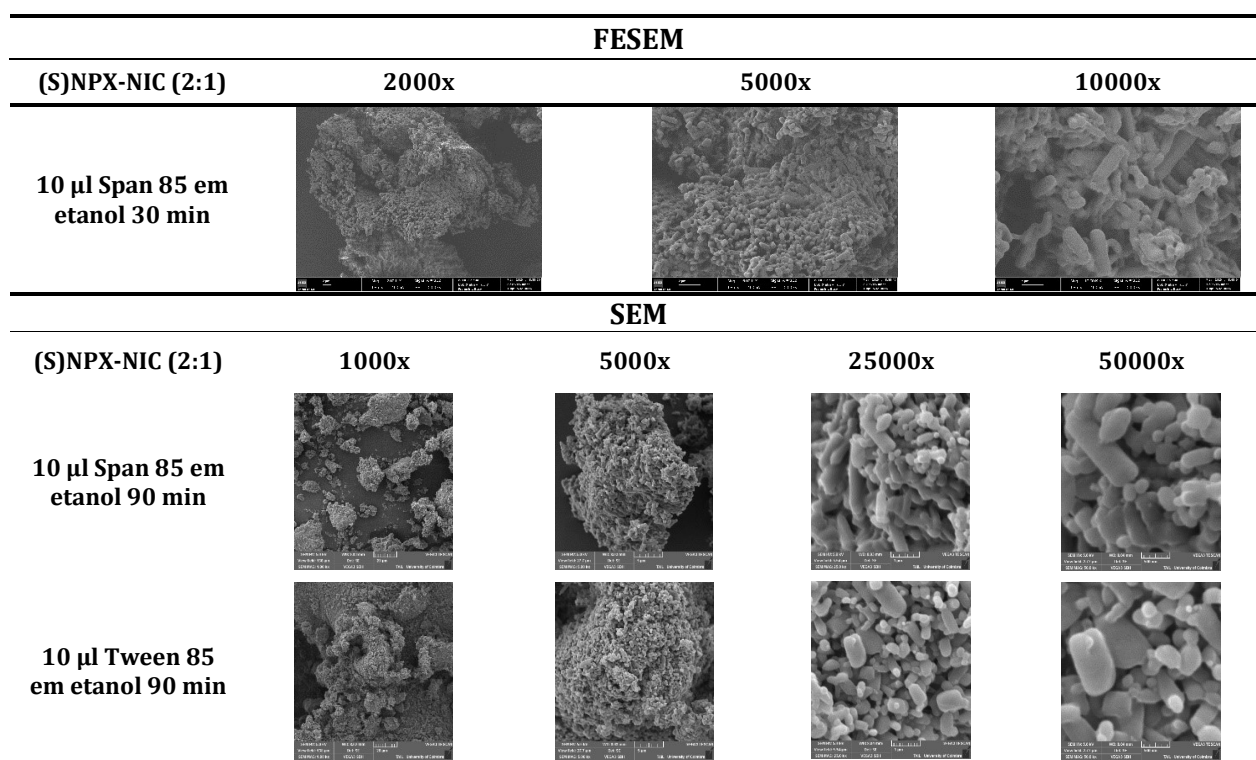


Figura A6. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do sistema (S)IBU-NIC obtidos por LAG, estabilizados com Span 85 e Tween 85, com aumento do tempo de moagem.

Tabela A9. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com Span 85 e Tween 85, com aumento do tempo de moagem.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$
(S)NPX	155,3	142
(S)NPX-NIC Etanol	126,1	128
(S)NPX-NIC 10 μl 25% Span 85, 30 min	125,2	112
(S)NPX-NIC 10 μl 25% Span 85, 90 min	125,5	121
(S)NPX-NIC 10 μl 25% Tween 85, 90 min	125,1	123
NIC	128,1	190

Tabela A10. Imagens FESEM e SEM correspondentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG em diferentes tempos de moagem.



Anexo VII – Secção 3.1.2.2

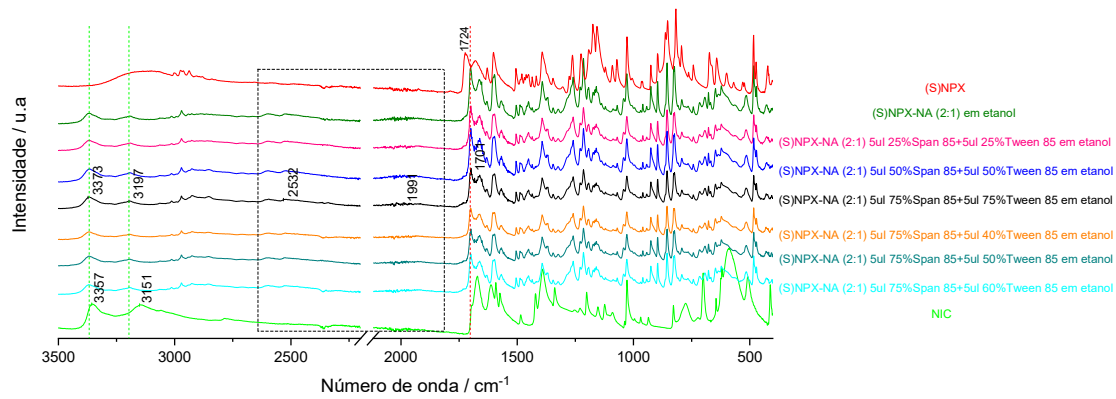


Figura A7. Espectros IV dos cocristais (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com misturas de Span 85 e Tween 85: --- desvio de alongação assimétrica e simétrica do grupo NH₂; --- desvio da alongação do grupo C=O; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, COOH...N_{aromático}.

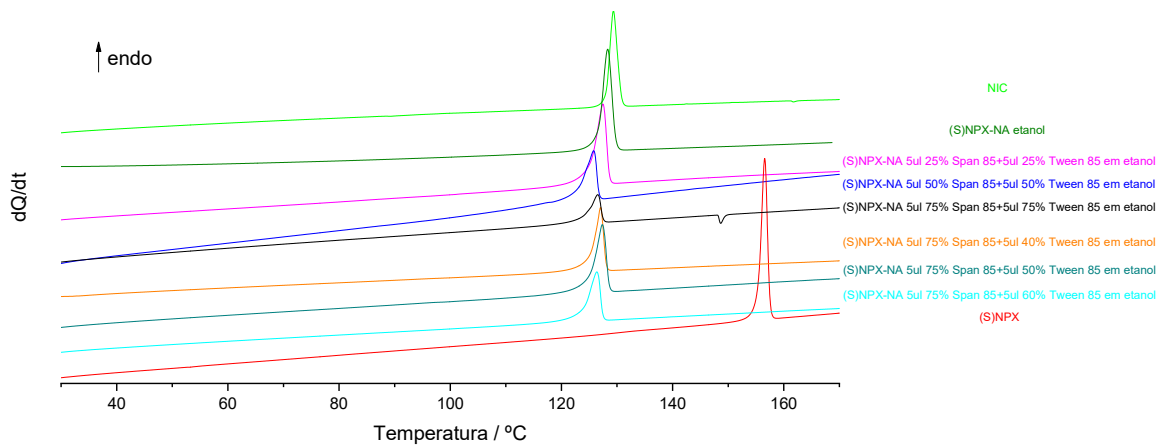


Figura A8. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do sistema (S)NPX-NIC obtido por LAG, estabilizado com misturas de Span 85 e Tween 85.

Tabela A11. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com misturas de Span 85 e Tween 85.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$
(S)NPX	155,3	142
(S)NPX-NIC Etanol	126,1	128
(S)NPX-NIC 5 μl 25% Span 85 + 5 μl 25% Tween 85	124,8	128
(S)NPX-NIC 5 μl 50% Span 85 + 5 μl 50% Tween 85	122,7	110
(S)NPX-NIC 5 μl 75% Span 85 + 5 μl 75% Tween 85	124,1	97
(S)NPX-NIC 5 μl 75% Span 85 + 5 μl 40% Tween 85	125,2	116
(S)NPX-NIC 5 μl 75% Span 85 + 5 μl 50% Tween 85	124,9	118
(S)NPX-NIC 5 μl 25% Span 85 + 5 μl 60% Tween 85	123,7	154
NIC	128,1	190

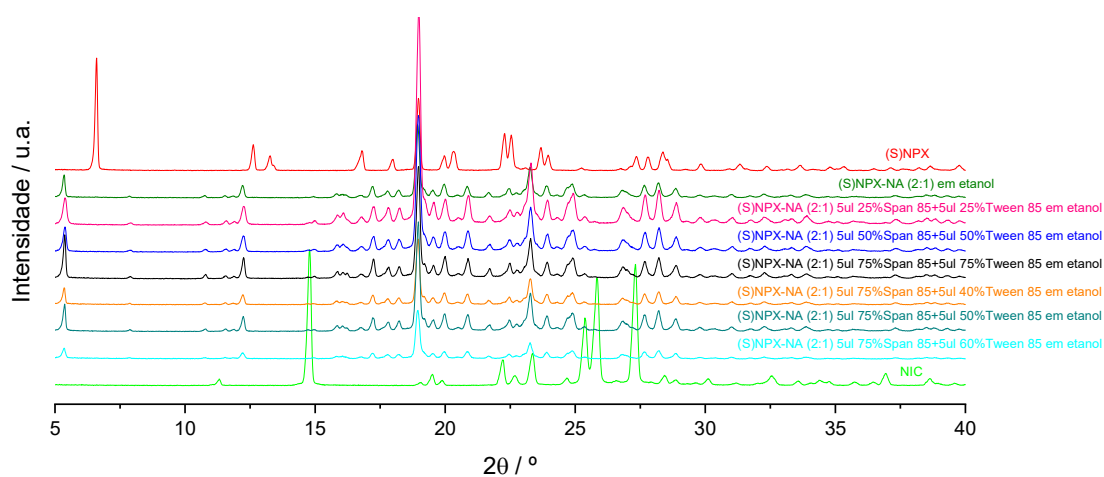


Figura A9. Difratogramas de raios-X de pó dos cocrystalos de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, estabilizados com misturas de Span 85 e Tween 85.

Tabela A12. Imagens SEM correspondentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com aplicação de misturas em percentagens equivalentes de Span 85 e Tween 85.

(S)NPX-NIC (2:1)	1000x	5000x	25000x	50000x
5 μ l 25% Span 85 5 μ l 25% Tween 85				-
5 μ l 50% Span 85 5 μ l 50% Tween 85				
5 μ l 75% Span 85 5 μ l 75% Tween 85				

Tabela A13. Imagens SEM correspondentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com aplicação de misturas de 75% Span 85 e percentagens variáveis de Tween 85 (% V/V).

(S)NPX-NIC (2:1)	1000x	5000x	25000x	50000x
5 μ l 75% Span 85 5 μ l 40% Tween 85				
5 μ l 75% Span 85 5 μ l 50% Tween 85				
5 μ l 75% Span 85 5 μ l 60% Tween 85				

Anexo VIII – Secção 3.1.2.3

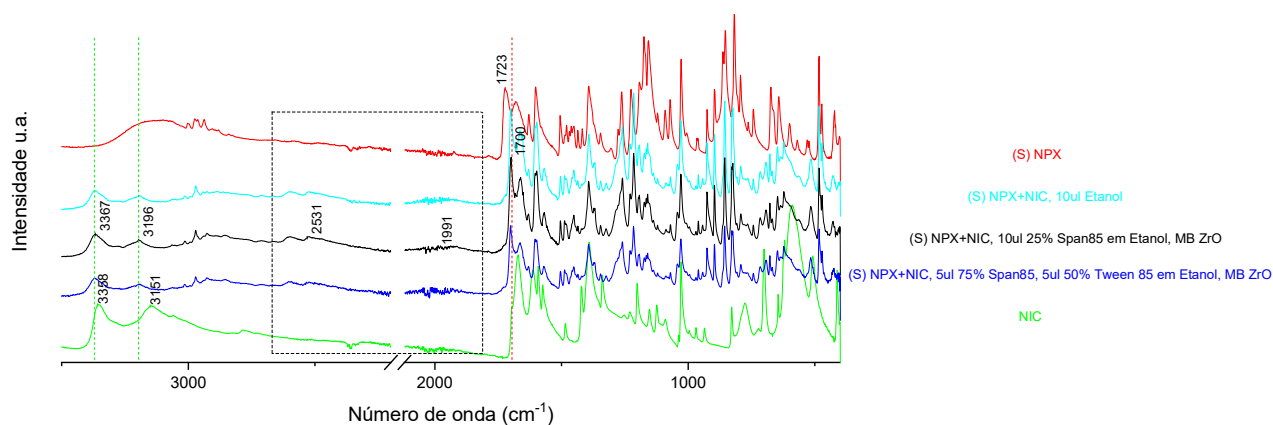


Figura A10. Espectros IV dos cocrystalos (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio: --- desvio da elongação assimétrica e simétrica do grupo NH_2 ; --- desvio da elongação do grupo C=O ; --- sinais correspondentes à formação de pontes de hidrogénio, $\text{COOH}\cdots\text{N}_{\text{aromático}}$.

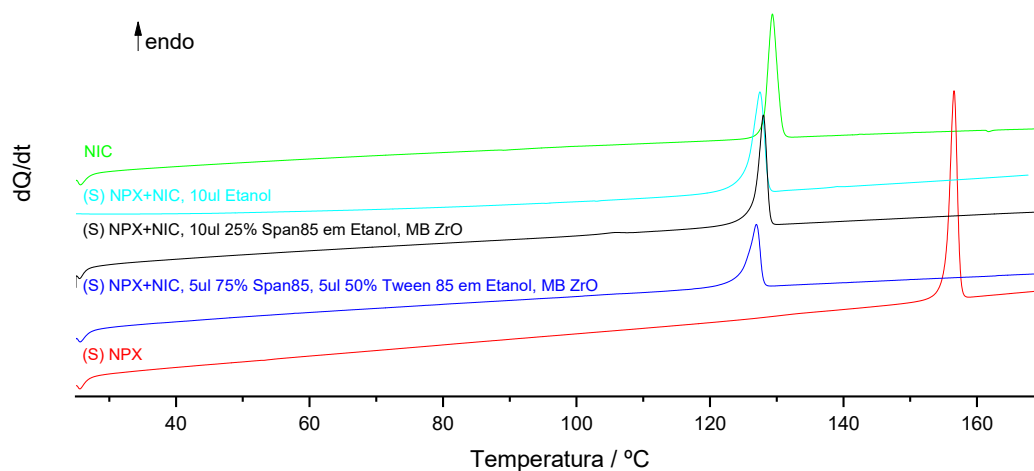


Figura A11. Comparação entre os termogramas, DSC, dos compostos de partida e os do sistema (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.

Tabela A14. Parâmetros termodinâmicos de fusão obtidos a partir dos termogramas dos sistemas (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.

	$T_{\text{onset}} / ^\circ\text{C}$	$\Delta H / \text{J g}^{-1}$
(S)NPX	155,3	142
(S)NPX-NIC Etanol	126,1	128
(S)NPX-NIC 10 μl 25% Span 85 – ZrO	126,6	127
(S)NPX-NIC 5 μl 75% Span 85 + 5 μl 50% Tween 85 – ZrO	124,9	113
NIC	128,1	190

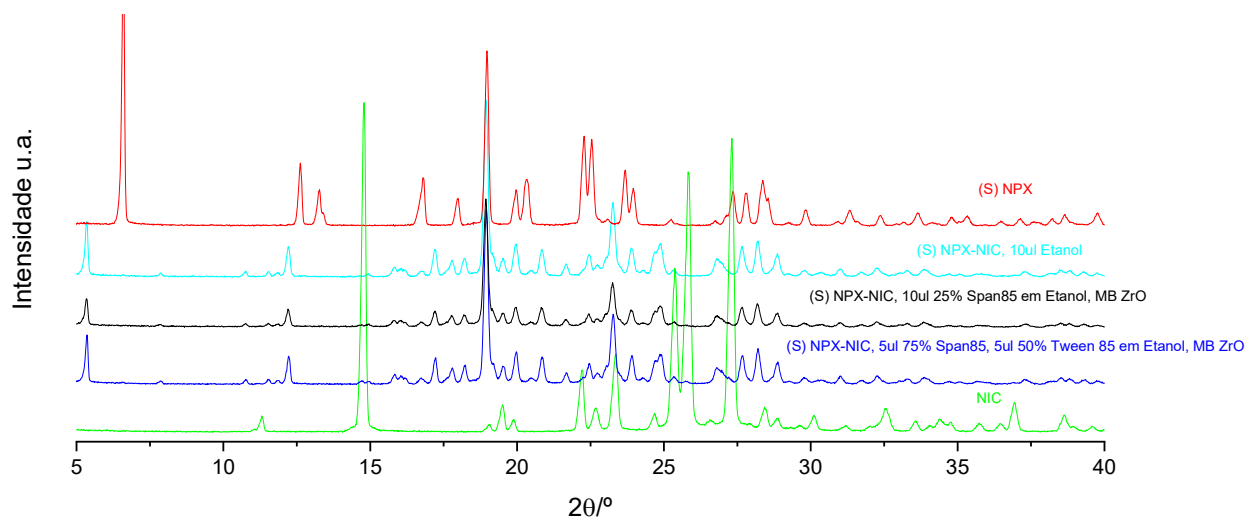


Figura A12. Difratogramas de raios-X de pó dos cocristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.

Tabela A15. Imagens SEM correspondentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC obtidos por LAG, com recurso a vasos de óxido de zircónio.

(S)NPX-NIC (2:1)	1000x	5000x	25000x	50000x
10 µl 25% Span 85 - ZrO				
5 µl 75% Span 85 5 µl 50% Tween 85 - ZrO				

- **Preparação do meio de dispersão para moagem em suspensão e análise de tamanho de partículas por difração com laser, LD**

O objetivo proposto inicialmente para este projeto seria a síntese de nanocristais constituídos por APIs pouco solúveis em água, de forma a promover o aumento desta propriedade e, conseqüentemente, o aumento da biodisponibilidade do fármaco.

Até a este ponto, todas as tentativas de síntese destas estruturas foram levadas a cabo na ausência de solventes e/ou meios de dispersão, pelo que o problema na diferença de solubilidades dos componentes, que teria como consequência a separação dos seus compostos de partida, não seria um fator a ter em conta.

A aplicação de técnicas de medição do tamanho de partículas como o DLS ou a LD e a utilização de técnicas que envolvem a obtenção de nanossuspensões, vêm alterar este paradigma, impondo a necessidade de resolver o problema em causa. Seria possível argumentar que, para os casos como o do cocristal de

(RS)IBU-NIC, em que são conhecidos diagramas ternários congruentes, este problema não iria ser observado, uma vez são conhecidas as frações molares através das quais se obtém o cocrystal puro, e, portanto, nessas condições, não iria ocorrer separação dos compostos de partida, o que faria destes modelos os candidatos ideais para este tipo de estudos. No entanto, um grande conjunto destes diagramas depende de uma mistura de solventes, em que a sua constituição é suscetível às alterações de pressão e temperatura associadas a técnicas “top-down”, o que iria provocar alterações na composição do meio, alterando a congruência do sistema.

Deste modo, surge a necessidade de definir uma estratégia, idealmente aplicável a qualquer sistema binário, que permitisse a manutenção da estabilidade dos cocrystal, e ao mesmo tempo, não fosse extensamente afetada pelas condições de pressão e temperatura impostas pela aplicação deste tipo de técnicas.

As propriedades termodinâmicas da água fazem deste solvente um bom ponto de partida para a obtenção da solução pretendida, nomeadamente o seu elevado ponto de fusão e baixa pressão de vapor, que permitem a manutenção da fase líquida num grande leque de condições. A solução encontrada para o problema em causa passa pela dissolução do API e do coformador em meio aquoso, originando uma solução saturada que impede a separação dos cocrystal devido à grande diferença de solubilidade dos seus componentes.

Para testar a eficácia do meio de dispersão, este foi preparado de acordo com os dados apresentados na Tabela A15, tendo em conta as concentrações de saturação do (S)NPX e da NIC em água, uma vez que se utilizou o cocrystal entre estes dois compostos como ponto de partida. Em primeiro lugar, a solução foi aquecida em refluxo a 50 °C até à solubilização total de ambos os componentes do cocrystal, passando depois por um processo de arrefecimento à temperatura ambiente, para que os excessos precipitassem. Após uma simples filtração em vácuo, obteve-se a solução saturada a utilizar como meio de dispersão, sendo que o pó filtrado poderá novamente ser utilizado para preparar mais dispersante. É de notar o elevado grau de saturação inicial em nicotinamida, que é necessário para que ocorra nucleação deste composto na solução aquosa.

Tabela A16. Constituição inicial do meio de dispersão preparado. Os valores entre parênteses correspondem às massas a pesar para atingir o ponto de saturação dos respetivos compostos em meio aquoso.

Componentes	Solubilidade em meio aquoso / mg ml ⁻¹	Quantidade adicionada (quantidade necessária para saturação à temperatura ambiente)
Água	-	10 ml
(S)NPX	0,0159 ¹³⁷	14,5 mg (0,159 mg)
NIC	500 ¹³⁸	8320 mg (5000 mg)

O cocrystal de (S)NPX-NIC forma uma dispersão neste meio, tal como pretendido. Para averiguar se, de facto, o cocrystal se manteve estável, procedeu-se à recolha de uma amostra da dispersão, que foi submetida a um processo de centrifugação, seguido pela eliminação do sobrenadante e subsequente secagem do composto com um papel de filtro, de forma a absorver o resto da água que ficou depois da

aplicação dos passos anteriores, permitindo a realização de uma análise por difração de raios-X ao pó resultante.

Os difratogramas apresentados na Figura A13 confirmam a estabilidade do cocristal no meio de dispersão proposto, uma vez que o difratograma correspondente à análise do pó após a eliminação da solução aquosa indica a presença do cocristal, juntamente com um excesso de NIC que ficou para trás após a remoção da solução saturada, não se observando a presença de excesso de (S)NPX, que estaria necessariamente presente caso se verificasse a separação dos compostos de partida devido à instabilidade do cocristal neste meio.

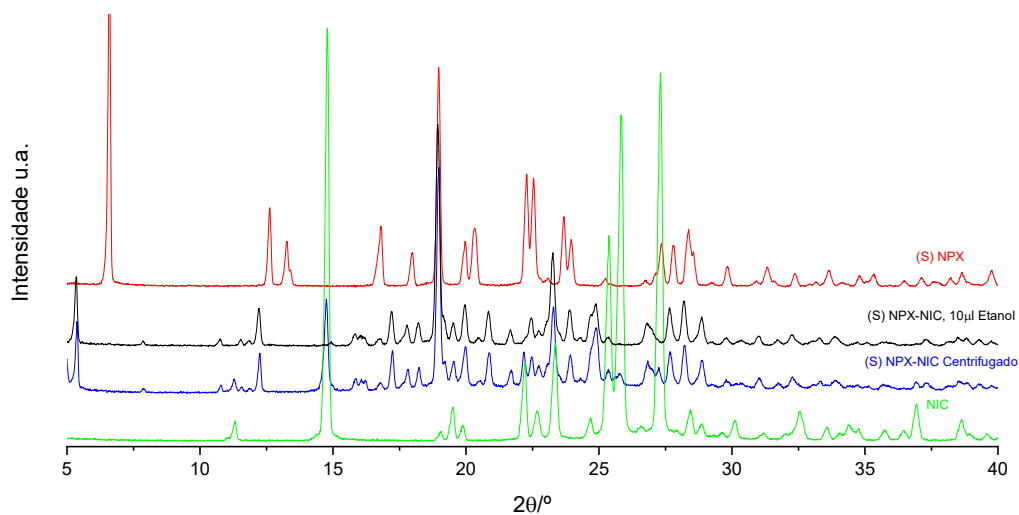
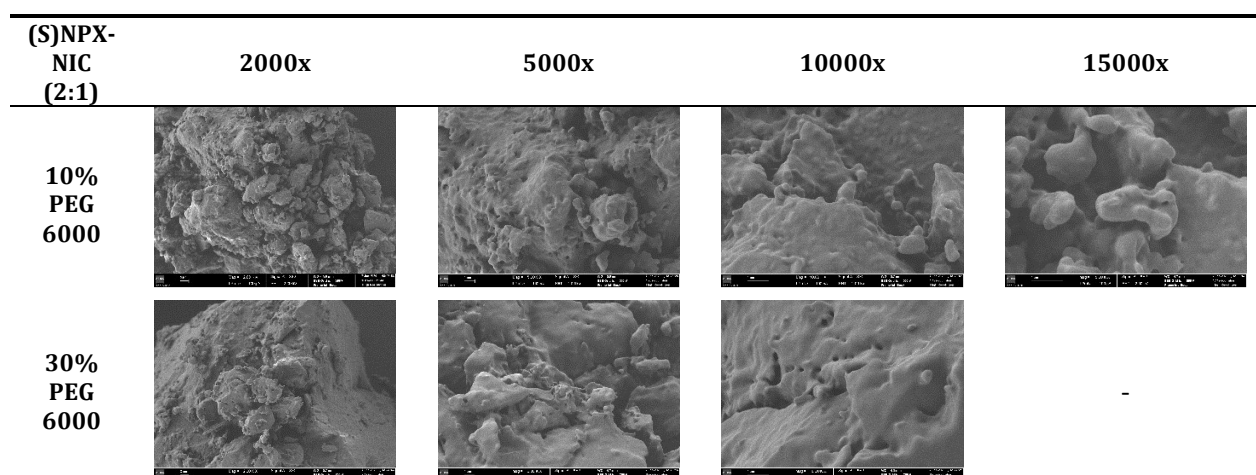


Figura A13. Comparação entre o difratograma de raios-X de pó do cocristal de (S)NPX-NIC após eliminação do meio de dispersão e os difratogramas do cocristal puro e dos compostos de partida.

Anexo IX – Secção 3.2.2

Tabela A17. Imagens SEM correspondentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC obtidos por moagem assistida por PEG 6000.

(S)NPX-NIC (2:1)	1000x	5000x	25000x	50000x
1% PEG 6000				
1% PEG 6000 - 2º ensaio				
2,5% PEG 6000				
5% PEG 6000				
7,5% PEG 6000				

Tabela A18. Imagens FESEM correspondentes aos nanocristais de (S)NPX-NIC moídos com PEG 6000.

Anexo X – Secção 3.3.2

Os ensaios relativos à homogeneização mecânica, demonstram algumas melhorias nas nanossuspensões obtidas, quando comparadas com a aplicação de ultrassons, discutida na secção 3.3.1. Mesmo assim, é perceptível a presença de partículas de grandes dimensões na maioria das amostras, coerentes com uma grande heterogeneidade de tamanhos.

Procurou-se contornar este problema através do acoplamento de ambas as técnicas, de forma a combinar as forças geradas pela criação do fluxo radial na dispersão proveniente da agitação mecânica, com as forças criadas pelos fenómenos de cavitação induzidos no meio pela exposição aos ultrassons.

Para testar o acoplamento das técnicas prepararam-se novas dispersões, nas condições apresentadas na Tabela A19

Tabela A19. Condições para obtenção das dispersões de (RS) IBU para aplicação de homogeneização mecânica e ultrassons.

Sólidos de partida / g	Dispersante	% Estabilizador / % V/V
(RS)IBU – 0,0505	10 ml Água	1% Span 85
(RS) IBU – 0,0489		1% Tween 85

As dispersões foram formuladas de forma a permitirem uma comparação entre a eficácia do acoplamento das técnicas e da agitação mecânica, realizada com recurso às imagens obtidas por microscopia ótica, recorrendo a ampliações de 50 e 200 vezes, que se apresentam na Figura 57, correspondentes aos resultados de ensaios com 90 min de duração.

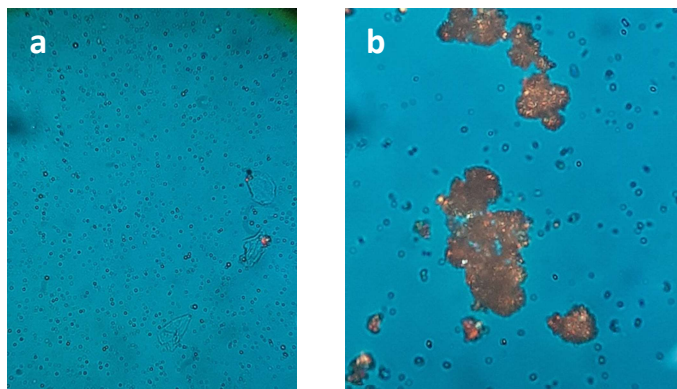


Figura A14. Imagens obtidas por microscopia com luz polarizada, correspondentes à aplicação do acoplamento de técnicas durante 90 min: (a) 1% Span; (b) 1% Tween 85. Ampliação: (a) 50x, (b) 200x.

Mais uma vez, é possível observar a presença de cristais do API em ambos os ensaios realizados, o que permite concluir que o acoplamento também não foi eficaz, provavelmente devido à frequência das ondas sonoras que não geram força suficiente para promover a clivagem dos cristais, de forma a obter resultados mais satisfatórios do que os que se verificaram na aplicação apenas da agitação mecânica.

Após estes ensaios, o passo que naturalmente iria surgir, seria a aplicação de maiores frequências de ultrassons, o que não é possível devido aos limites dos aparelhos ao dispor, pelo que, não será possível avançar com a otimização desta via.