



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Duarte Henrique Ferreira da Silva

CO-CRISTAIS/SAIS: VIABILIDADE DA
TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Tecnologias do Medicamento orientada pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Duarte Henrique Ferreira da Silva

CO-CRISTAIS/SAIS: VIABILIDADE DA TRANSPOSIÇÃO DE ESCALA

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Tecnologias do Medicamento orientada
pelo Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2023

À memória dos meus avós paternos

Aos meus avós maternos

Aos meus pais

Às minhas irmãs

Agradecimentos

Tantas as pessoas que fizeram de mim aquilo que sou hoje... e aprendi tanto com todas elas. Sou um privilegiado.

Assim, prestes a terminar uma das etapas mais importantes da minha vida, deixo aqui uma palavra de agradecimento a todos aqueles que me acompanharam.

Ao Professor Doutor Ricardo António Esteves de Castro, com o qual tive a oportunidade de trabalhar pela primeira vez, agradeço todo o conhecimento transmitido, todas as palavras de incentivo, todo o apoio, toda a dedicação, disponibilidade e amizade que sempre demonstrou ao longo deste ano. Obrigado por tudo mesmo!!

À Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio, deixo o meu obrigado por todos os ensinamentos e conselhos, e pela prontidão com que sempre esteve disposta a ajudar.

Ao Professor Doutor João Carlos Canotilho Lage, deixo o meu obrigado por toda a ajuda disponibilizada e pela sua sempre simpatia.

Ao João Baptista, agradeço por toda a ajuda durante este ano no laboratório, por todas as moedelas de cabeça, por todas as chouriçadas feitas, por tudo mesmo! Um grande obrigado João!!

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, por me acolher durante todo este ano para a realização do meu trabalho experimental.

À Unidade de Controlo de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, UCQFarma, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela colaboração na caracterização por difração de raios-X de pó, pela análise por espectroscopia de infravermelho e pelas análises termogravimétricas realizadas.

Aos meus colegas de laboratório, por toda a simpatia, ajuda e boa disposição, em especial à Joana, à Amanda, ao Guilherme e à Inês, pelo conhecimento partilhado e por toda a paciência que tiveram para as minhas tantas questões.

Ao meu colega de laboratório, de casa, de faculdade, ao meu eterno amigo João Silva, que para além da ajuda durante todo este ano, tem sido o meu pilar durante todos estes que passaram. Sem ti não seria a mesma coisa, obrigado por tudo João!!

Aos meus amigos de sempre, desde a escolinha pequena à escolinha grande, um muito obrigado por todas as palavras de encorajamento ao longo destes anos. Agradeço ao Miguel, por tudo o que pude partilhar durante todos os anos da licenciatura. Agradeço à Lara, que sempre esteve disponível para me ouvir, ajudar e apoiar em tudo e mais alguma coisa e por todas as gargalhadas e momentos felizes. Aos meus colegas de casa, que sempre me apoiaram em tudo, por todas as brincadeiras e rizadas, jantares e conversas a horas tardias, permitiram que tudo isto fosse possível. Ao meu padrinho de curso, Dinis, e às tantas madrinhas que tive o privilégio de ter, Inês, Joana, Palmira e Helena, obrigado por me ajudarem sempre desde o primeiro dia e por estarem constantemente dispostos a ajudar. Aos meus afilhados, Lili, Pedro, Madalena e Palmira, obrigado por me terem escolhido para vos acompanhar ao longo deste percurso. A estes e aos restantes amigos, muito obrigado.

À minha família, agradeço por me tornarem na pessoa que sou hoje. À minha mãe e ao meu pai, pela educação que me deram, pelos “nãos” ditos, pelas contrariedades, tudo isso fez aquilo que sou hoje, e levo isso comigo para tentar passar, também eu, aos meus filhos. Agradeço o apoio incondicional que sempre demonstraram, pelas palavras certas nos momentos certos e por todo o esforço que fizeram ao longo destes anos para me manter a estudar, obrigado mamã e papá! Às minhas irmãs, agradeço por me ajudarem constantemente em todas os meus obstáculos, e por serem as minhas “segundas mães”. Aos meus cunhados por todos os momentos vividos. Aos meus avós, um muito obrigado por tudo o que me transmitiram e por toda alegria demonstrada em cada vitória minha. A estes e a todos os meus familiares, muito obrigado.

O meu eterno obrigado a todos, sem vocês nada disto seria possível!

Índice

Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	XIII
Lista de Abreviaturas	XV
Resumo	XVII
Abstract	XIX
1 Introdução.....	1
1.1 Formas sólidas cristalinas de ativos farmacêuticos	1
1.2 Co-cristais	2
1.3 Co-cristais e indústria.....	5
1.3.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica	5
1.3.2 Transposição de escala.....	6
1.4 Ativos farmacêuticos investigados neste trabalho.....	9
1.4.1 Diflunisal	9
1.4.2 Isoniazida	10
1.4.3 Lamotrigina	11
1.4.4 Etossuximida.....	12
1.5 Objetivo	13
2 Materiais e Métodos.....	15
2.1 Materiais.....	15
2.2 Métodos	16
2.2.1 Estudos de solubilidade.....	16
2.2.2 Caracterização de fases sólidas e de soluções	19
2.2.2.1 Difração de raios-X de pó.....	19
2.2.2.2 Calorimetria diferencial de varrimento.....	20
2.2.2.3 Espectroscopia de infravermelho	21
2.2.2.4 Espectroscopia de ultravioleta	21
2.2.2.5 Análise termogravimétrica	22
2.2.2.6 Termomicroscopia de luz polarizada.....	23
3 Resultados e Discussão.....	25
3.1 Investigação e caracterização das formas sólidas dos compostos de partida.....	25
3.1.1 Diflunisal	25
3.1.2 Isoniazida	27
3.1.3 Lamotrigina	29
3.1.4 Etossuximida.....	32

3.2	Investigação dos sistemas de diflunisal-isoniazida e diflunisal-lamotrigina	34
3.2.1	Diflunisal-Isoniazida.....	35
3.2.1.1	Síntese de co-cristal por precipitação em etanol	35
3.2.1.2	Síntese de co-cristal por <i>slurry</i> em etanol.....	48
3.2.2	Diflunisal-Lamotrigina.....	50
3.2.2.1	Síntese de sal por precipitação em etanol.....	50
3.2.2.2	Síntese de sal por <i>slurry</i> em etanol.....	66
3.3	Investigação do sistema lamotrigina-etossuximida.....	72
3.3.1	Lamotrigina-Etossuximida.....	72
3.3.1.1	Síntese de co-cristal por <i>slurry</i> em <i>n</i> -heptano e em etanol	72
4	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	77
	Referências Bibliográficas.....	79
	Anexo I	87

Índice de Figuras

Figura 1 – Possíveis formas sólidas de um API. Adaptado de [1].	1
Figura 2 – Local de formação de formas sólidas pelo método de precipitação e por <i>slurry</i> num diagrama de fases ternário.	4
Figura 3 – Representação esquemática do Sistema de Classificação Biofarmacêutica	6
Figura 4 – Diagramas de fases ternários e as regiões de estabilidade termodinâmica. A. Congruente; B. Incongruente. As regiões são representativas de: 1, API + solução; 2, API + co-cristal + solução; 3, co-cristal + solução; 4, co-formador + co-cristal + solução; 5, co-formador + solução; 6, solução. Adaptado de [20].	8
Figura 5 – Estrutura molecular do diflunisal	9
Figura 6 – Estrutura molecular da isoniazida	10
Figura 7 – Estrutura molecular da lamotrigina	11
Figura 8 – Estrutura molecular da etossuximida	12
Figura 9 – Diagrama de fases esquemático de um sistema ternário constituído pelo API (A), co-formador (B) e solvente a temperatura constante (T). A zona a vermelho representa a zona em que a temperatura de saturação (T_s) obtida experimentalmente é superior à temperatura expectável, sendo por isso uma zona onde o co-cristal é estável. A zona a azul representa o inverso sendo por isso uma zona onde o API ou co-formador são estáveis...	18
Figura 10 – Perfil da temperatura em função da fração molar excluída do solvente (Y_A) quando medido ao longo da linha tracejada da Figura 9. A zona a vermelho representa a zona em que a temperatura de saturação (T_s) é superior à temperatura de referência. A zona a azul representa o inverso, onde a T_s é inferior à T .	19
Figura 11 – Difractogramas de raios-X de pó experimentais: diflunisal adquirido comercialmente e diflunisal obtido por precipitação nos ensaios de solubilidade do Crystal16 em etanol; e difractogramas de raios-X de pó simulados: diflunisal forma I, FAFWIS01 e diflunisal forma III, FAFWIS02.	25
Figura 12 – Curvas de DSC de aquecimento do DIF comercial e do DIF Crystal16 ($\beta = 10$ °C/min.)	26
Figura 13 – Espetros de infravermelho do DIF comercial e do DIF Crystal16.	27
Figura 14 – Difractogramas de raios-X de pó experimentais: isoniazida adquirida comercialmente e isoniazida obtida por precipitação nos ensaios de solubilidade do Crystal16; e difractogramas de raios-X de pó simulados: isoniazida forma I, INICAC e isoniazida forma II, INICAC04.	28

Figura 15 – Curvas de DSC de aquecimento da ISO comercial e da ISO Crystal I6 ($\beta = 10$ °C/min.).	28
Figura 16 – Espectros de infravermelho da ISO comercial e da ISO Crystal I6.	29
Figura 17 – Difratoformas de raios-X de pó experimentais: lamotrigina adquirida comercialmente e lamotrigina obtida por precipitação nos ensaios de solubilidade do Crystal I6; e difratogramas de raios-X de pó simulados: lamotrigina forma I, EFEMUX01 e lamotrigina etanol-solvato, FISNED.	30
Figura 18 – Curvas de DSC de aquecimento da LAM comercial e da LAM Crystal I6 ($\beta = 10$ °C/min.).	31
Figura 19 – Espectros de infravermelho da LAM comercial e da LAM Crystal I6.	31
Figura 20 – Difratoforma de raios-X de pó experimental: etossuximida adquirida comercialmente; e difratogramas de raios-X de pó simulados: etossuximida forma I e etossuximida forma II.	33
Figura 21 – Curva de DSC de aquecimento da ESM comercial ($\beta = 10$ °C/min.).	33
Figura 22 – Espectros de infravermelho da ESM comercial.	34
Figura 23 – Gráfico da equação de van't Hoff de DIF e de ISO em etanol.	35
Figura 24 – Gráfico da temperatura de saturação em função da fração molar de diflunisal, excluída do solvente, do sistema DIF-ISO, a partir dos dados obtidos no Crystal I6.	37
Figura 25 – Difratoformas de raios-X de pó das fases sólidas em equilíbrio, para as misturas preparadas com diferentes valores de Y_{DIF} .	37
Figura 26 – Difratoformas de XRPD da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por LAG.	38
Figura 27 – Curvas de DSC da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por LAG ($\beta = 10$ °C/min.).	39
Figura 28 – Espectros de infravermelho da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por LAG.	39
Figura 29 – Difratoformas de XRPD do DIF comercial; do DIF contaminado com 1% de ISO, DIF-ISO = 0.99, e do DIF Crystal I6.	40
Figura 30 – Curvas de DSC do DIF comercial, forma I e do DIF contaminado com 1% de ISO, DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.99$ ($\beta = 10$ °C/min.).	41
Figura 31 – Espectros de infravermelho do DIF comercial; do DIF contaminado com 1% de ISO, DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.99$, e do DIF Crystal I6.	42
Figura 32 – Gel do “DIF new”.	42

Figura 33 – Difractogramas de XRPD da ISO Crystal I6; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$; de DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.9$, mantido à temperatura ambiente, e do DIF Crystal I6.....	43
Figura 34 – Curvas de DSC da ISO Crystal I6; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$; de DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.9$ mantido à temperatura ambiente, e do DIF Crystal I6 ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).....	44
Figura 35 – Espectros de infravermelho da ISO Crystal I6; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.9$, mantido à temperatura ambiente e de DIF Crystal I6.....	44
Figura 36 – 1ª derivada dos espectros de ultravioleta de DIF e ISO para diferentes concentrações de soluções em etanol (5, 10, 15, 20, 25 e 30 ppm).....	45
Figura 37 – Retas de calibração obtidas para ISO e DIF por espectroscopia de ultravioleta (UV).....	46
Figura 38 – Diagrama de fases ternário a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (DIF+ISO+etanol).....	47
Figura 39 – Diagrama de fases ternário a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (DIF+ISO+etanol) com zoom na zona de interesse.....	47
Figura 40 – Difractogramas de XRPD da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido pelo método de <i>slurry</i> em etanol.....	48
Figura 41 – Curvas de DSC da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido pelo método de <i>slurry</i> em etanol ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).....	49
Figura 42 – Espectros de infravermelho da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido pelo método de <i>slurry</i> em etanol.....	50
Figura 43 – Gráfico da equação de van't Hoff de DIF e de LAM em etanol.....	51
Figura 44 – Gráfico da temperatura de saturação em função da fração molar, do sistema DIF-LAM, a partir dos dados obtidos no Crystal I6.....	52
Figura 45 – Difractogramas de raios-X de pó das fases sólidas em equilíbrio, para as misturas preparadas com diferentes valores de Y_{DIF}	53
Figura 46 – Difractogramas de raios-X de pó de LAM precipitada no Crystal I6; DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ e difractogramas simulados para as formas I e III do DIF.....	53
Figura 47 – Difractogramas de XRPD da mistura DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$; da mesma mistura, mas aquecida até $170 \text{ }^\circ\text{C}$; do sólido obtido por NG e desta mesma mistura, mas submetida a um ciclo de aquecimento/arrefecimento até $200 \text{ }^\circ\text{C}$	54
Figura 48 – Curvas de DSC da mistura DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$. 1. Aquecimento até $240 \text{ }^\circ\text{C}$. 2. Aquecimento até $170 \text{ }^\circ\text{C}$, arrefecimento subsequente até temperatura ambiente e aquecimento até à fusão. 3. Amostra obtida por moagem, aquecida até $250 \text{ }^\circ\text{C}$. 4. Amostra obtida por moagem, aquecida até à fusão, depois de ter sido aquecida até $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e arrefecida até temperatura ambiente ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).....	55

Figura 49 – Espectros de infravermelho da LAM Crystal I 6; do sólido DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ Aq. 170 °C; do DIF comercial, forma I; e do DIF Crystal I 6, forma III.	56
Figura 50 – Imagens de PLTM recolhidas no aquecimento da amostra de sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ obtida por cristalização em etanol; $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200×.	57
Figura 51 – TGA da amostra do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$	58
Figura 52 – Difractogramas de XRPD do DIF contaminado com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.99$; do DIF Crystal I 6, forma III, e do DIF comercial, forma I.	59
Figura 53 – Curvas de DSC do DIF comercial; do DIF contaminado com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.99$, e do DIF Crystal I 6 ($\beta = 10$ °C/min.).	60
Figura 54 – Espectros de infravermelho do DIF comercial; da DIF contaminado com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.99$, e do DIF obtido por cristalização no Crystal I 6.	61
Figura 55 – Difractogramas de XRPD do DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$; do sal obtido por aquecimento a 170 °C; e do sólido obtido por transposição de escala.	62
Figura 56 – Curvas de DSC do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ (submetido a aquecimento até 170 °C e arrefecimento subsequente até temperatura ambiente) e do sólido obtido por transposição de escala ($\beta = 10$ °C/min.).	62
Figura 57 – Espectros de infravermelho da mistura sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por transposição de escala.	63
Figura 58 – 2ª derivada da espectroscopia de ultravioleta (com ajuste polinomial de 2ª ordem a cada 5 pontos, Savitzky-Golay) das diferentes concentrações de DIF e LAM (5, 10, 15, 20, 25 e 30 ppm).	64
Figura 59 – Retas de calibração de LAM e de DIF obtidas por espectroscopia de ultravioleta (UV).	64
Figura 60 – Diagrama de fases ternário a 25 °C (DIF+LAM+etanol).	65
Figura 61 – Diagrama de fases ternário a 25 °C (DIF+LAM+etanol) com zoom na zona de interesse.	66
Figura 62 – Difractogramas de XRPD da LAM comercial; do <i>slurry</i> DIF-LAM em etanol; do DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ obtido por precipitação; e do DIF comercial, forma I.	67
Figura 63 – Difractogramas de XRPD do DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$; da mesma mistura, mas submetida ao método de <i>slurry</i> em etanol; do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ obtido por NG e aquecido a 200 °C; do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ aquecido a 170 °C e o sólido obtido por <i>slurry</i> aquecido a 170 °C.	68
Figura 64 – Curvas de DSC do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$; do sal obtido por NG e do sal obtido pelo método de <i>slurry</i> em etanol ($\beta = 10$ °C/min.).	69

Figura 65 – Espectros de infravermelho do sal DIF-LAM obtido por <i>slurry</i> e da mesma mistura, mas submetida a aquecimento até 170 °C.	69
Figura 66 – Imagens de PLTM recolhidas no aquecimento da amostra de sal DIF-LAM <i>slurry</i> obtida por cristalização em etanol; $\beta = 10$ °C/min, ampliação 200×.	70
Figura 67 – Análise termogravimétrica do sólido obtido por <i>slurry</i> em etanol DIF-LAM.....	71
Figura 68 – Difratogramas de XRPD das amostras LAM-ESM obtidas pelo método <i>slurry</i> em <i>n</i> -heptano e em etanol, e os sólidos obtidos por NG e a LAG etanol.....	73
Figura 69 – Curvas de DSC da mistura LAM-ESM obtida pelo método <i>slurry</i> em <i>n</i> -heptano e em etanol, e os sólidos obtidos por NG e a LAG etanol ($\beta = 10$ °C/min.).	74
Figura 70 – Espectros de infravermelho das amostras LAM-ESM obtidas pelo método <i>slurry</i> em <i>n</i> -heptano e em etanol, e os sólidos obtidos por NG e por LAG etanol.	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Origem e propriedades físico-químicas dos compostos utilizados.....	15
Tabela 2 – Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.....	15
Tabela 3 – Parâmetros de ajuste à Equação (1) dos dados experimentais obtidos na determinação das temperaturas de saturação, com o equipamento Crystal16, para diflunisal e isoniazida em etanol.	36
Tabela 4 – Valores calculados para a preparação das soluções da mistura DIF-ISO com diferentes Y_{DIF}	36
Tabela 5 – Parâmetros de ajuste à Equação (1) dos dados experimentais obtidos na determinação das temperaturas de saturação, com o equipamento Crystal16, para diflunisal e lamotrigina em etanol.....	51
Tabela 6 – Valores calculados para a preparação das soluções da mistura DIF-LAM com diferentes Y_{DIF}	52
Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC para o <i>slurry</i> LAM-ESM em <i>n</i> -heptano, para o <i>slurry</i> LAM-ESM em etanol, para a LAM-ESM 1:1 obtida por NG e para a LAM-ESM 1:1 obtida por LAG em etanol.....	74

Lista de Abreviaturas

API – do inglês “Active Pharmaceutical Ingredient”

ATR – do inglês “Attenuated Total Reflectance”

BCS – do inglês “Biopharmaceutical Classification System”

CCDC – do inglês Cambridge “Crystallographic Data Centre”

CIF – do inglês “Crystallographic Information File”

DIF – Diflunisal

DSC – do inglês” Differential Scanning Calorimetry”

ESM – Etossuximida

FDA – do inglês “Food and Drug Administration”

FTIR – do inglês “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”

GMP – do inglês “Good Manufacturing Practice”

GRAS – do inglês “Generally Recognized as Safe”

ISO – Isoniazida

IV – Infravermelho

LAG – do inglês “Liquid-Assisted Grinding”

LAM – Lamotrigina

NG – do inglês “Neat Grinding”

PAT – do inglês “Process Analytical Technology”

UV – Ultravioleta

XRPD – do inglês “X-Ray Powder Diffraction”

Resumo

Os co-cristais farmacêuticos são materiais homogêneos no estado sólido, compostos por duas ou mais moléculas diferentes, sendo uma delas o ativo farmacêutico (API), interagindo por meio de ligações não covalentes e em relação estequiométrica dentro da mesma rede cristalina. A co-cristalização, assim como a formação de sais, são técnicas que permitem modificar as propriedades físico-químicas dos APIs com o objetivo de aumentar a sua eficácia e a sua segurança.

Este trabalho tem por objetivo o estudo de co-cristais/sais com potencial para utilização em terapia dual e metodologias de preparação com viabilidade para possível transposição de escala. Investigaram-se os sistemas binários constituídos por diflunisal e isoniazida; diflunisal e lamotrigina, e lamotrigina e etossuximida. O diflunisal é um anti-inflamatório não esteroide derivado do ácido salicílico. As suas propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas permitem o tratamento da artrite reumatoide, osteoporose e distensões e entorses. Pertence à classe II do BCS, pelo que possui baixa solubilidade e alta permeabilidade. Este fármaco forma co-cristal com a isoniazida, um derivado sintético do ácido isonicotínico e bastante utilizado no tratamento da tuberculose, e forma um sal com a lamotrigina, um antiepilético da classe das feniltiazinas, indicado na prevenção de convulsões focais e generalizadas em doentes epiléticos. A lamotrigina forma co-cristal com a etossuximida, também ela um antiepilético, mas destinado ao tratamento de crises de ausência. Estas três formas sólidas são consideradas *dual drug forms*, uma vez que todos os compostos são APIs.

Os diagramas de fases ternários obtidos neste trabalho, para os sistemas constituídos por API + co-formador + etanol, permitem encontrar as condições para a produção de co-cristal diflunisal-isoniazida (1:1) e do sal diflunisal-lamotrigina (1:1), via cristalização em solução. Foram também estabelecidas condições para a obtenção destas duas formas sólidas multicomponente e também do co-cristal diflunisal-etossuximida (1:1) usando o método de *slurry*.

De realçar ainda a identificação e caracterização de um novo polimorfo do sal diflunisal-lamotrigina (1:1) e o estabelecimento de condições experimentais para a obtenção do polimorfo I de diflunisal por cristalização em etanol.

Palavras-chave: co-cristais farmacêuticos; sais; terapia dual; transposição de escala; diagrama de fases ternário.

Abstract

Pharmaceutical co-crystals are homogeneous materials in the solid state and composed of two or more different molecules, one of which is the pharmaceutical active ingredient (API), interacting through non-covalent bonds and in a stoichiometric relationship within the same crystalline network. Co-crystallization, as well as salt formation are techniques that allow modifying the physicochemical properties of APIs with the aim of increasing therapeutic efficacy and safety.

This work aims to study co-crystals/salts with potential for use in dual therapy and preparation methodologies with viability for possible scale-up. Binary systems consisting of diflunisal and isoniazid; diflunisal and lamotrigine, and lamotrigine and ethosuximide were investigated. Diflunisal is a non-steroidal anti-inflammatory drug that is derived from salicylic acid. Its anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties allow the treatment of rheumatoid arthritis, osteoporosis and strains and sprains. It belongs to BCS class II, having low solubility and high permeability. This drug forms co-crystal with isoniazid, a synthetic derivative of isonicotinic acid and is recurrently used in the treatment of tuberculosis, and a salt with lamotrigine, an antiepileptic from the phenyltriazine class that is indicated for the prevention of focal and generalized seizures in epileptic patients. Lamotrigine forms co-crystal with ethosuximide, also an antiepileptic, but intended for the treatment of absence seizures. These three solid forms are considered dual drug forms since all compounds are APIs.

The ternary phase diagrams obtained in this work, for the systems consisting of API + co-former + ethanol, allow us to find the conditions for producing diflunisal-isoniazide (1:1) co-crystal and the diflunisal-lamotrigine (1:1) salt, via crystallization in solution. Conditions were also established for obtaining these two multicomponent solid forms and also the diflunisal-ethosuximide (1:1) co-crystal using the slurry method.

Also noteworthy is the identification and characterization of a new polymorph of the diflunisal-lamotrigine salt (1:1) and the establishment of experimental conditions for obtaining diflunisal polymorph I by crystallization in ethanol.

Keywords: pharmaceutical cocrystals; salts; dual therapy; scale-up; ternary phase diagram.

I Introdução

I.1 Formas sólidas cristalinas de ativos farmacêuticos

Atualmente, muitos dos novos ativos farmacêuticos apresentam baixa solubilidade aquosa: cerca de 60 a 70% inserem-se na classe II do sistema de classificação biofarmacêutica (BCS), devido ao seu tamanho molecular e à sua lipofilicidade, resultando numa grande barreira a nível da absorção, tendo implicações na sua biodisponibilidade oral. Muitos não conseguem ter a eficácia terapêutica desejada [1-3]. Devido a isto, a comunidade científica tem vindo a adotar várias estratégias, entre elas o desenvolvimento de outras formas sólidas dos APIs, incluindo sistemas multicomponente, procurando variar as propriedades finais sem alterar a sua ação farmacológica. Polimorfos, amorfos, hidratos, solvatos, sais e co-cristais são as formas sólidas mais utilizadas, Figura I. Encontrar a estrutura ideal requer um grande estudo durante a fase inicial de desenvolvimento do fármaco [4].

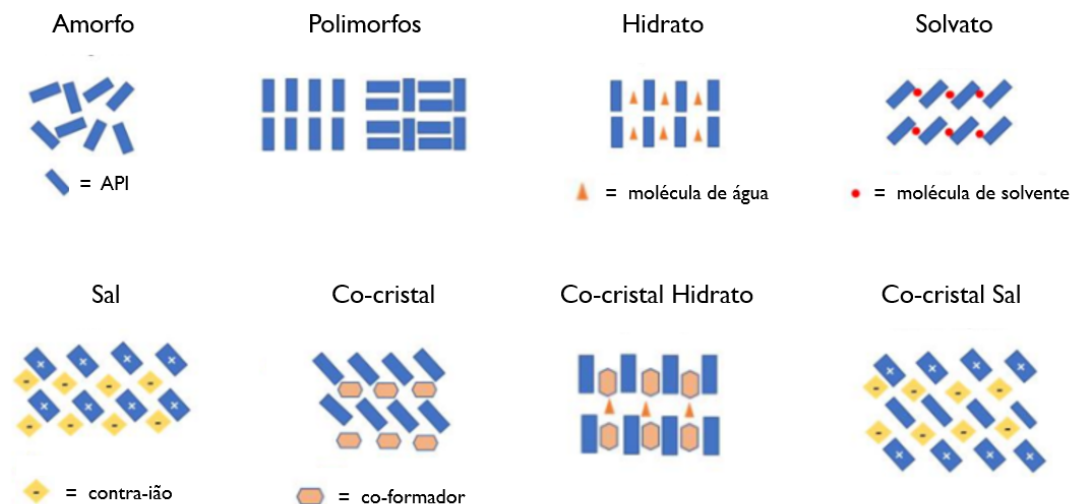


Figura I – Possíveis formas sólidas de um API. Adaptado de [1].

Numa fase cristalina, as moléculas estão dispostas numa ordenação regular nas três dimensões do espaço. Uma mesma molécula pode cristalizar em arranjos cristalinos diferentes, que se designam por polimorfos [5], os quais podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas, como a solubilidade e a estabilidade [6]. Existem também outras formas sólidas possíveis como fases amorfas, que ocorrem quando as moléculas do API não estão organizadas de uma forma regular, estão desordenadas, resultando numa estrutura sem ordem de longo alcance. Estas formas têm maior solubilidade do que as

formas cristalinas, uma vez que têm uma energia livre significativamente maior [7]. Quanto aos hidratos e aos solvatos, antigamente designados por uma parte da comunidade científica como pseudopolimorfos, apresentam na sua constituição moléculas de água e de solvente, respetivamente. Estas moléculas fazem parte da rede cristalina juntamente com o API, alterando as suas propriedades físico-químicas [5, 8]. A transformação de um API num sal, salificação, é o método mais utilizado para melhorar a solubilidade aquosa e a biodisponibilidade oral [9]. Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem utilizado cada vez mais o processo de salificação para melhorar as propriedades físico-químicas dos fármacos, e hoje, mais de 50% dos medicamentos no mercado são vendidos como sais. As razões para esse sucesso são a relativa facilidade de síntese, a sua cristalização e a confiabilidade do produto. A formação de sais não se limita à modificação da solubilidade e taxa de dissolução, mas afeta vários aspetos farmacológicos e tecnológicos, como o perfil de impurezas, a estabilidade físico-química, a capacidade de fabrico e a toxicidade [10]. Segundo a IUPAC, um sal é um “composto químico constituído por um conjunto de catiões e aniões” [11]. Assim, um sal farmacêutico é composto por um API ionizável e um contra-íão que pode ser molecular ou atómico. Além disso, devido à necessidade de equilíbrio de cargas, os sais devem ter uma estequiometria definida. Évora *et al.* confirmaram a formação de um sal entre o diflunisal e a lamotrigina, principalmente através da análise do espectro de infravermelho na região de alongação do grupo carboxilato [12].

Por tudo isto, o estudo de novas formas sólidas de APIs representam um papel fulcral na descoberta e desenvolvimento dos novos fármacos, tanto na otimização da biodisponibilidade como no desenvolvimento de métodos de fabrico mais rentáveis [8].

1.2 Co-cristais

A co-cristalização é uma técnica que permite modificar as propriedades físico-químicas de APIs com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica e a sua segurança [13]. Os co-cristais surgem nesse sentido. Embora exista uma grande discussão sobre a real definição de co-cristal, este trabalho terá em conta a definição dada pela FDA (Food and Drug Administration). Propõe que são “cristais compostos por duas ou mais moléculas diferentes, uma delas o API, que interagem por ligações específicas não-covalentes e em relação estequiométrica dentro da mesma rede cristalina” [14]. Os co-cristais foram descobertos pela primeira vez em 1844, mas a sua estrutura só foi caracterizada em 1958.

O facto de serem uma forma eficaz de modificar as propriedades físico-químicas do API, mantendo a atividade terapêutica, torna os co-cristais mais acessíveis do que outros métodos, como a micronização, ou a formação de nanopartículas [1]. Os co-cristais têm uma estrutura cristalina diferente dos compostos que lhes dão origem, tendo por isso diferentes propriedades físico-químicas, o que os torna tão interessantes, nomeadamente para a indústria farmacêutica, uma vez que uma grande maioria dos medicamentos são concebidos na forma sólida. Estas propriedades terão impacto direto em todo o ciclo, desde o desenvolvimento até à toma do medicamento, pelo que é de extrema importância a sua melhoria [15].

Existe um grande número de métodos para obter formas sólidas, nomeadamente co-cristais, que podem ser classificados como métodos de estado sólido ou baseados em solução. Dos métodos de estado sólido mais utilizados são os obtidos por mecanoquímica, entre eles a moagem sem solvente (NG) e a moagem assistida por líquido (LAG). Nestes métodos, através de forças de cisalhamento, obtém-se o sólido a partir do API e do co-formador. Outros métodos também são utilizados como a evaporação lenta do solvente, a cristalização por arrefecimento, o *slurry*, o ultra-som ou através de precipitação, sendo todos eles baseados em solução [16-19]. Nestes métodos, recorre-se à sobressaturação como força motriz e obtém-se o sólido a partir do API, do co-formador e do solvente. Todos estes métodos têm as suas vantagens e desvantagens, devendo por isso ser feito um estudo de qual será a forma mais rentável para obter o sólido desejado [20]. Neste trabalho as técnicas que irão ser abordadas são a co-cristalização através de ensaios por precipitação e através de *slurry*. O primeiro é realizado através do Crystal16, onde se efetuam ciclos de aquecimento/arrefecimento de maneira que as amostras solubilizem e precipitem, formando assim um sólido homogêneo. São determinados os valores de temperatura de saturação das amostras submetidas para posterior determinação das solubilidades. No método de obtenção por *slurry*, é formada uma pequena “lama” através da adição de uma reduzida quantidade de solvente à mistura entre o API e o co-formador. Toda esta mistura é submetida a uma agitação de 72h no mínimo, por norma. Esta técnica tem muitas vantagens no contexto farmacêutico uma vez que se conseguem reproduzir produtos termodinamicamente estáveis e de alta pureza [21-23]. A Figura 2 mostra o local de formação da forma sólida, em função do diagrama de fases ternário pelo método de precipitação e por *slurry*.

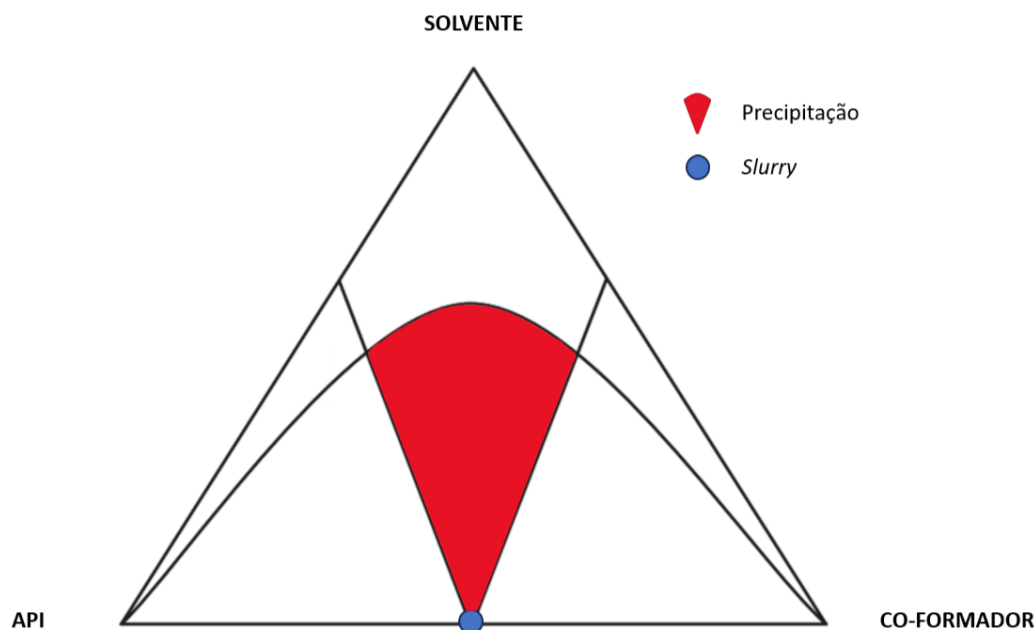


Figura 2 – Local de formação de formas sólidas pelo método de precipitação e por *slurry* num diagrama de fases ternário.

Para sintetizar co-cristais, é importante escolher cuidadosamente os co-formadores uma vez que desempenham um papel importante na decisão das características finais do co-cristal. Os co-formadores têm a capacidade de modular a estabilidade e a solubilidade do API, induzindo alterações na sua estrutura cristalina [24, 25]. Possibilitam também mudanças no perfil de dissolução, na permeabilidade, na higroscopicidade e na biodisponibilidade. A escolha dos co-formadores deve ser feita considerando os grupos funcionais capazes de formar sintões, nomeadamente homossintões (interação entre grupos funcionais iguais) e heterossintões (interação entre grupos funcionais diferentes) com o(s) API(s) na rede cristalina [26]. Também devem ser considerados o pKa, a sua forma física e o seu tamanho molecular [27]. A seleção do co-formador é feita muitas vezes pelo método experimental, mas pode ser dirigida por avaliação da complementaridade estrutural entre o API e o co-formador. O método experimental tem por base a tentativa e erro, em que é realizada uma tentativa de co-cristalização entre um API e o co-formador em teste, sendo a formação de co-cristal confirmada através de métodos analíticos, como difração de raios-X de pó (XRPD), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), entre outras [28, 29]. Como alternativa, existem vários métodos baseadas no conhecimento, tendo por base as ligações de hidrogénio, o conhecimento sobre os pKa's dos compostos envolvidos e a base de dados da Cambridge Crystallographic Data Centre

(CCDC) [30-32]. Esta última contém informações cristalográficas que permitem tentar estimar a probabilidade de estabelecimento de ligações de hidrogénio entre o API e o co-formador. Atualmente, esta base de dados contém mais de 1,2 milhões de estruturas cristalinas [33]. Cada ficheiro CIF (Crystallographic Information File) contém informações sobre estrutura química e dados cristalográficos, dimensões moleculares, geometria molecular, representação de estrutura e análise conformacional [34]. Com base na compreensão das geometrias e orientações preferenciais de interações intermoleculares reais, uma grande parte dos co-formadores são selecionados desta mesma forma [35]. Quanto ao perfil de segurança dos co-formadores, estes cumprem normas definidas pela FDA, devendo ter estatuto GRAS (Generally Recognized as Safe) de maneira a poderem, no final do processo, entrar para mercado [26, 36]. Esta designação confirma que apresentam uma baixa toxicidade e que são muitas vezes encontrados em produtos naturais [37]. Quando APIs são utilizados como co-formadores, o produto final é denominado por co-cristal *drug-drug* ou *dual-drug* [36, 38]. Neste trabalho, as três formas sólidas em estudo (DIF-ISO, DIF-LAM e LAM-ESM) são consideradas *dual drug forms*, uma vez que todos os compostos são APIs.

É de referir que é possível a formação de um co-cristal hidrato/solvato e co-cristal sal, como se apresenta na Figura 1. O co-cristal sal pode apresentar um ou mais co-formadores e dois ou mais iões, sem presença de solventes. Pode ainda ser referida a formação de co-cristal sal solvato, que pode apresentar um ou mais solventes, dois ou mais iões e um ou mais co-formadores na sua estrutura cristalina [39].

1.3 Co-cristais e indústria

1.3.1 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) classifica os fármacos em quatro categorias principais de acordo com a solubilidade e a permeabilidade (Figura 3). Os que se inserem na Classe II e Classe IV são limitados por uma baixa solubilidade aquosa. Como já foi visto, esta limitação pode resultar numa fraca absorção e, por isso, numa baixa biodisponibilidade, representando um desafio para o processo de desenvolvimento de medicamentos. Aumentar a biodisponibilidade dos fármacos inseridos nestas classes torna-se necessário para melhorar a eficácia do medicamento [40].

O BCS é uma abordagem científica baseada na solubilidade aquosa e nas características de permeabilidade gastrointestinal de cada substância. Permite reduzir a necessidade de estudos de bioequivalência *in vivo*, caso dados *in vitro* se mostrarem confiáveis e seguros na equivalência dos resultados obtidos [41].

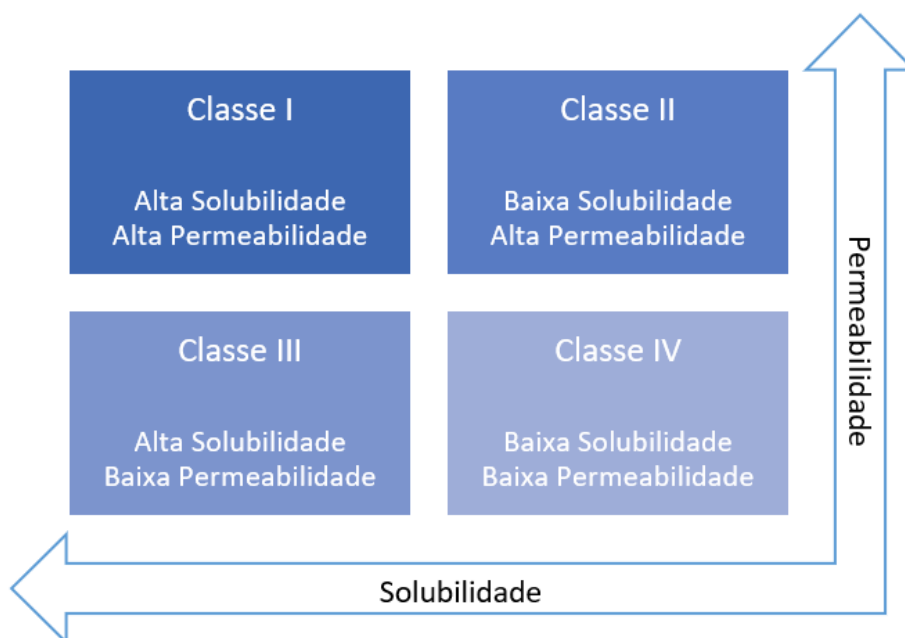


Figura 3 – Representação esquemática do Sistema de Classificação Biofarmacêutica

1.3.2 Transposição de escala

Como já foi referido, existem vários métodos de obtenção de co-cristais, entre eles os métodos de estado sólido e os baseados em solução. A mecanoquímica, método de estado sólido, é um dos mais utilizados no processo de co-cristalização, mas a transposição de escala é bastante limitada devido ao elevado nível de energia que o processo produz, podendo induzir algum grau de amorfização e alterações cristalinas, comprometendo a pureza do co-cristal produzido [42]. Já os métodos baseados em solução apresentam inúmeras vantagens em relação aos de estado sólido. A principal, é o facto de permitirem a eliminação de impurezas depois de produzido o co-cristal. Além disso, existe uma grande disponibilidade de equipamentos, na indústria farmacêutica, para realizar a transposição de escala para métodos de cristalização baseada em solução [43]. A transposição de escala, através deste método, pode ser feita em vários momentos do processo de produção de co-cristal, desde a investigação e desenvolvimento no primeiro momento, usando métodos de alto rendimento, em μg , passando pela pequena escala laboratorial, em mg, depois pela

caracterização, em g, até à transposição de escala para produção comercial, em kg [44]. Todo o processo envolve mecanismos de controlo, sendo um dos fulcrais o PAT (Process Analytical Technology). É designado como um sistema para a conceção, análise e controlo dos processos de fabrico através da avaliação de atributos críticos de qualidade e desempenho das matérias-primas e materiais concebidos, com o objetivo de garantir a qualidade final do produto [45].

O primeiro passo para uma transposição de escala é otimizar a síntese de co-cristais na escala laboratorial, através dos métodos já estudados, como ensaios de precipitação ou de *slurry*. Depois da síntese otimizada, é importante avaliar como é que essas mesmas condições podem ser mantidas ou adaptadas para uma escala maior, tendo em consideração fatores como a agitação ou a homogeneidade da mistura. É muito importante garantir que os co-cristais produzidos em grande escala sejam idênticos aos obtidos em pequena escala, no laboratório, devendo ser aplicados métodos como XRPD e IV para os caracterizar. De seguida é importante a escolha dos equipamentos apropriados, como reatores e agitadores, e definir os parâmetros de processo. É muito importante uma análise de custo, para avaliar a viabilidade económica da transposição de escala. De acordo com o setor a que os co-cristais estejam direcionados, é importante garantir que a transposição de escala cumpra com as devidas regulamentações, como por exemplo as GMPs (Good Manufacturing Practice). Antes de iniciar o processo de transposição de escala é aconselhado realizar estudos de validação para demonstrar a qualidade do co-cristal transposto e implementar uma monitorização contínua para garantir a sua qualidade ao longo do tempo. No fim, já feita a transposição de escala, é fundamental a otimização contínua do processo, para melhorar a eficácia, reduzindo os custos e garantido a qualidade [46-51].

O conhecimento de diagramas de fases ternário, Figura 4, é fundamental para implementar a co-cristalização a partir de soluções. Estes diagramas permitem representar o comportamento de um sistema constituído por três componentes, em que cada vértice corresponde a um componente puro do sistema, o API, o co-formador, e o solvente. O diagrama de fases ternário permite encontrar as condições de produção dos co-cristais e de outros sistemas multicomponente, utilizando baixas quantidades de matéria-prima durante a sua criação para, de seguida, aplicar o diagrama diretamente na transposição de escala utilizando grandes quantidades de matéria-prima e obter também grandes quantidades de co-cristal [52]. Com base na diferença de solubilidades entre o API e o co-formador, os diagramas de fases ternários podem ser designados de duas formas: sistemas congruentes e sistemas incongruentes. Quando a solubilidade do API é semelhante à do co-formador, o

diagrama de fases ternário é congruente, exemplificado na Figura 4 A, para um co-cristal (1:1), e o co-cristal formar-se-á ao centro do diagrama. Quando as solubilidades de ambos são díspares, o diagrama é incongruente, Figura 4 B [53].

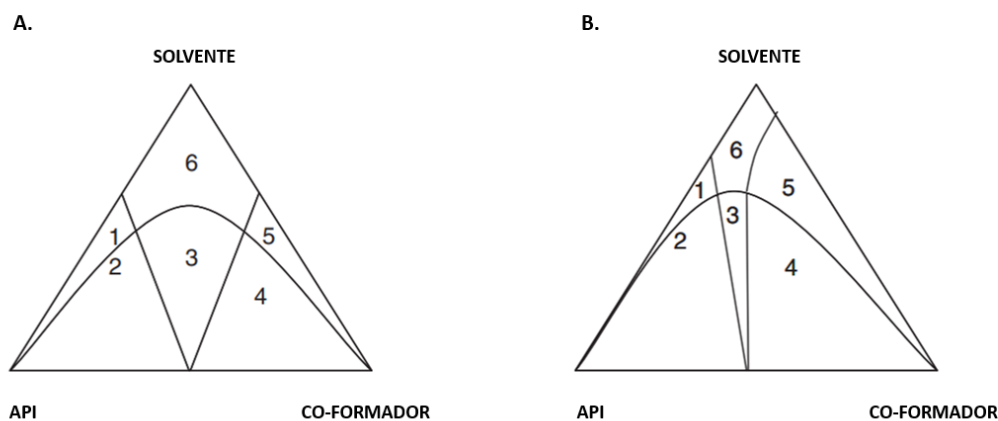


Figura 4 – Diagramas de fases ternários e as regiões de estabilidade termodinâmica. A. Congruente; B. Incongruente. As regiões são representativas de: 1, API + solução; 2, API + co-cristal + solução; 3, co-cristal + solução; 4, co-formador + co-cristal + solução; 5, co-formador + solução; 6, solução. Adaptado de [20].

O diagrama de fases ternário é uma ótima maneira para implementar a produção de co-cristais à escala industrial, uma vez que a partir de pequenas quantidades de matéria-prima se consegue obter um diagrama que possibilitará a transposição de escala [54].

1.4 Ativos farmacêuticos investigados neste trabalho

1.4.1 Diflunisal

O diflunisal ou ácido 5-(2,4-difluorofenil)-2-hidroxi-benzóico (DIF), Figura 5,

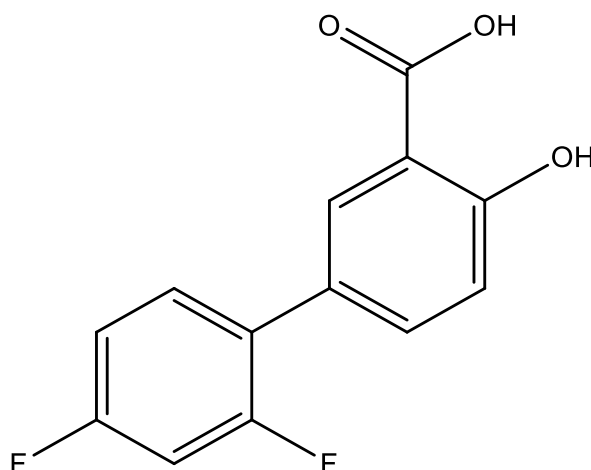


Figura 5 – Estrutura molecular do diflunisal

é um anti-inflamatório não esteroide que é derivado do ácido salicílico. O diflunisal é um inibidor não seletivo da cicloxigenase (COX), uma enzima envolvida na produção de prostaglandinas, sendo estas mediadores inflamatórios. A inibição da COX reduz, assim, a síntese de prostaglandinas, resultando em efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos que permitem o tratamento da artrite reumatoide, da osteoporose e de distensões e entorses. A sua absorção é rápida sendo a concentração plasmática atingida 2 a 3 horas após administração oral. É sujeito a um metabolismo hepático e o seu tempo de meia-vida varia entre 8 e 12 horas [55, 56].

Até ao momento foram descobertas cinco formas polimórficas do diflunisal. Inicialmente foram realizados estudos mostrando a existência de três diferentes polimorfos - forma I, forma II e forma III, por Cotton e Hux [57]. Mais tarde, Martínez-Ohárriz *et al.* descreveram a forma IV [58], e por último, Perlovich *et al.* descreveram a forma V [59]. Embora se conheçam cinco diferentes formas polimórficas de diflunisal, só três estruturas se encontram já resolvidas, a forma I e a forma III por Cross *et al.* [60] e a forma V por Kim *et al.* [61].

Esta facilidade do diflunisal desenvolver diversas formas polimórficas deve-se ao facto da sua molécula ter uma grande capacidade para estabelecer ligações de hidrogénio inter e intramoleculares, e por ter também uma grande flexibilidade conformacional [59].

O diflunisal está incluído na classe II do BCS devido à sua alta permeabilidade e à sua biodisponibilidade oral ser limitada por baixa solubilidade aquosa e, assim, um baixo perfil de dissolução [62].

1.4.2 Isoniazida

A isoniazida ou piridina-4-carbohidrazida (ISO), Figura 6,

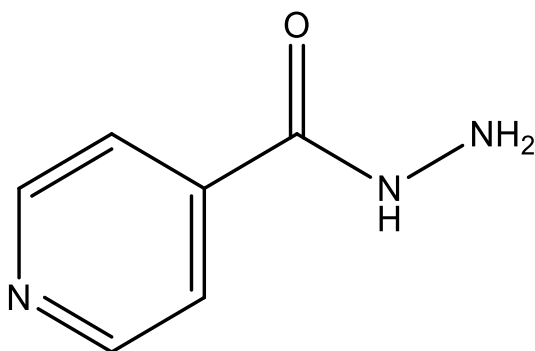


Figura 6 – Estrutura molecular da isoniazida

é um derivado sintético do ácido isonicotínico sendo recorrentemente utilizado no tratamento da tuberculose. A isoniazida é uma pró-droga que é convertida pela catalase e peroxidase numa série de espécies reativas, entre elas o óxido nítrico, com ação bactericida [63]. É facilmente absorvida após administração oral, embora possa sofrer um metabolismo de primeira passagem significativo. A sua absorção e a sua biodisponibilidade são reduzidas quando a isoniazida é administrada com alimentos. Têm uma ligação às proteínas plasmáticas muito reduzida (0-10%) e o seu tempo de meia-vida pode variar entre 1 e 5 horas [64].

Quanto ao polimorfismo da isoniazida foram identificadas, até ao momento, duas formas polimórficas. A estrutura cristalina da forma I foi obtida por L. H. Jensen [65] e Bhat *et al.* [66]. Mais tarde, Keke Zhang *et al.* resolveram a estrutura cristalina da forma II [67].

A isoniazida está incluída na classe III do BCS embora existam alguns autores a sugerir que poderá, nalguns casos, estar no limite entre a classe I e III, uma vez que devido à sua interação com diferentes excipientes, ocorrem variações na sua permeabilidade. A isoniazida é altamente solúvel [68].

1.4.3 Lamotrigina

A lamotrigina ou 6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina (LAM), Figura 7,

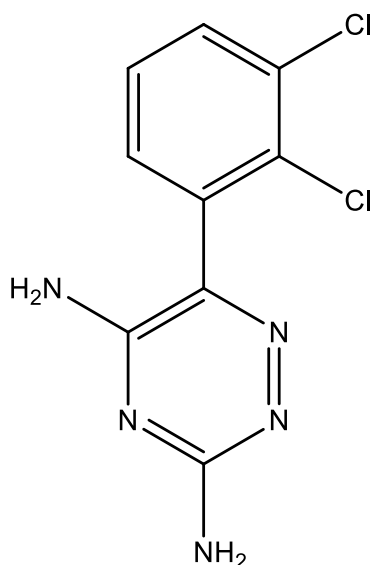


Figura 7 – Estrutura molecular da lamotrigina

é um anticonvulsivante (ou antiepilético) da classe das feniltriazinas que está indicado na prevenção de crises focais e generalizadas em doentes epiléticos, assim como em monoterapia ou em tratamentos de manutenção adjuvante para o transtorno bipolar, sendo utilizada também como estabilizador de humor. A lamotrigina é um inibidor dos canais de sódio pré-sinápticos, significando assim que há uma inibição da libertação de neurotransmissores excitatórios. Apresenta uma rápida absorção, tendo um volume de distribuição a variar entre 0,9 e 1,3 L/Kg. A sua ligação às proteínas plasmáticas ronda os 55% e o seu metabolismo é hepático. O seu tempo de meia-vida pode variar significativamente entre 14 e 59 horas [69].

Atualmente, é ainda só conhecida uma estrutura cristalina da lamotrigina. Foi resolvida por Sridhar e Ravikumar [70].

A lamotrigina está incluída na classe II do BCS devido à sua alta permeabilidade e à sua biodisponibilidade oral ser limitada por baixa solubilidade aquosa [71].

1.4.4 Etossuximida

A etossuximida ou 3-etil-3-metilpirrolidina-2,5-diona (ESM), Figura 8,

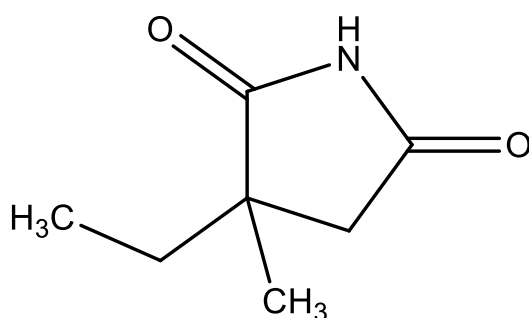


Figura 8 – Estrutura molecular da etossuximida

é um anticonvulsivante que se destina ao tratamento de crises de ausência (um tipo de epilepsia que se manifesta na infância através de perdas repentinas de consciência). Atua bloqueando parcialmente os canais de cálcio tipo T presentes nos neurónios talâmicos, fazendo com que a atividade nervosa no cérebro estabilize e previna as convulsões. Apresenta uma rápida absorção e o seu metabolismo é hepático, nomeadamente através da enzima CYP3A4. O seu tempo de meia-vida ronda as 53 horas [72-74].

Quanto ao polimorfismo, acredita-se que a etossuximida apresenta duas formas polimórficas, ambas obtidas por cristalização do fundido, por Osiecka et al. [75].

A etossuximida está incluída na classe III do BCS devido à sua baixa permeabilidade e à sua alta solubilidade aquosa [76].

1.5 Objetivo

O trabalho apresentado nesta tese tem por objetivo o estudo de co-cristais/sais com potencial para utilização em terapia dual, utilizando-se para isso, os sistemas binários constituídos por diflunisal (anti-inflamatório não esteroide) e isoniazida (tuberculostático); diflunisal e lamotrigina (anticonvulsivante) e lamotrigina e etossuximida (anticonvulsivante). Pretende-se testar estes sistemas em ensaios de precipitação e de *slurry*.

A solubilidade dos ativos farmacêuticos isolados e na forma de co-cristal ou sal será estudada em solventes adequados de forma a poder analisar a viabilidade da transposição de escala destes sistemas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Na Tabela 1, são indicados os diferentes compostos utilizados na realização do presente trabalho, com o respetivo fornecedor, massa molar, temperatura de fusão e grau de pureza. Foram ainda utilizados diferentes solventes, que se apresentam na Tabela 2 com a respetiva origem e grau de pureza.

Tabela 1 – Origem e propriedades físico-químicas dos compostos utilizados.

Composto	Fornecedor	M / g mol⁻¹	T_{fusão} / °C	Pureza %
DIF	Sigma-Aldrich	250,20	210,0 - 211,0	99,0
ISO	Sigma-Aldrich	137,14	171,4	≥ 99,0
LAM	Jai Radhe	256,10	216,0 - 218,0	99,79
ESM	Sigma-Aldrich	141,17	64,0 - 65,0	≥ 98,0

Tabela 2 – Origem e grau de pureza dos solventes utilizados.

Solvente	Fornecedor	Pureza %
Etanol	Fisher Chemical	≥ 99,8
<i>n</i> -Heptano	Riedel-de-Haën	≥ 99,0
Acetato de etilo	Fisher Chemical	≥ 99,8
Tolueno	Merck	≥ 99,9
1,4-Dioxano	Merck	≥ 99,8
Clorofórmio	Fisher Chemical	≥ 99,8
2-Propanol	Merck	≥ 99,8

2.2 Métodos

2.2.1 Estudos de solubilidade

Os estudos de solubilidade foram realizados no equipamento Crystall6 da Technobis Crystallization Systems, versão 1.14.0, utilizando-se o CrystalClear, como software de análise de dados, versão 1.0.1.614. Este equipamento permite medir *clear points* e *cloud points* através da análise da turbidez. Com estes dados conseguimos obter curvas de solubilidade para cada composto, a partir dos valores de *clear point*. Cada solução é submetida a ciclos de aquecimento/arrefecimento à velocidade de 0,3 °C/min. A temperatura do *clear point* corresponde ao valor da temperatura no momento em que o material sólido em suspensão se dissolve totalmente, quando temos uma solução completamente límpida (transmissividade de 100 %). A temperatura do *cloud point* é o valor de temperatura quando o material sólido aparece pela primeira vez na solução, quando acontece a precipitação (transmissividade decrescente). O *cloud point* é fundamental para definir a amplitude da zona metaestável. O equipamento Crystall6 consegue analisar até dezasseis *vials* com diferentes soluções, podendo variar a temperatura de -15 a 150 °C com uma velocidade de agitação de até 1250 rpm. Cada *vial* tem capacidade de até 2 mL.

No caso presente as soluções foram submetidas a quatro ciclos de aquecimento/arrefecimento entre -10 a 75 °C, à velocidade de 0,3 °C/min e agitação de 600 rpm. Como solvente foi utilizado o etanol por ter baixo potencial tóxico. Por pertencer à classe 3 da classificação de solventes residuais, é o solvente preferencial no desenvolvimento farmacêutico [77].

Depois de realizadas as medidas de temperaturas de *clear* e *cloud points* para os APIs e para os co-formadores utilizando o equipamento Crystall6, verificou-se que os *clear points* experimentais, valores de solubilidade, para o ativo e para os co-formadores seguem a equação de van't Hoff, Equação (1).

$$\ln x = - \frac{\Delta H}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta H}{RT_0} \quad (1)$$

Onde x é a fração molar do composto; ΔH e T_0 são parâmetros de ajuste; T_s é a temperatura de saturação da fração molar x ; e R é a constante dos gases.

A Equação (1) foi usada para descrever a solubilidade numa gama de temperatura reduzida, tendo sido extrapoladas as solubilidades para outras temperaturas. Assim, é possível determinar os valores de solubilidade dos APIs e dos co-formadores para uma mesma temperatura de referência, $X_A^*(T)$ e $X_B^*(T)$ respetivamente. Para pesquisa de co-cristais e estabelecimento do diagrama de fases ternário, Figura 9. pode-se escolher amostras de forma sistemática e de composição conhecida ao longo da linha tracejada cuja equação é representada na Equação (2):

$$X_B = mX_A + X_B^*(T) \quad (2)$$

Para calcular o declive basta escolher dois pontos da reta, Equação (3):

$$X_B = \left(\frac{X_B^*(T) - 0}{0 - X_A^*(T)} \right) X_A + X_B^*(T) \quad (3)$$

Simplificando, obtemos a Equação (4):

$$\frac{X_B}{X_B^*(T)} = 1 - \frac{X_A}{X_A^*(T)} \quad (4)$$

A partir desta equação, os valores de X_B podem ser determinados, usando as frações molares de X_A conhecidas.

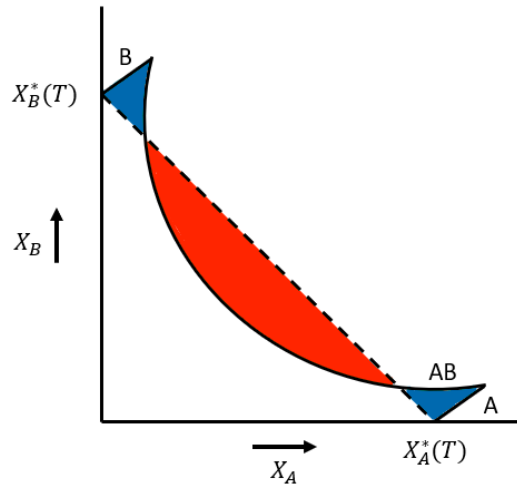


Figura 9 – Diagrama de fases esquemático de um sistema ternário constituído pelo API (A), co-formador (B) e solvente a temperatura constante (T). A zona a vermelho representa a zona em que a temperatura de saturação (T_s) obtida experimentalmente é superior à temperatura expectável, sendo por isso uma zona onde o co-cristal é estável. A zona a azul representa o inverso sendo por isso uma zona onde o API ou co-formador são estáveis.

Os diagramas de fases pseudobinários, exemplificados na Figura 10, podem ser construídos eliminando a fração molar do solvente, usando a relação dada pela Equação (5):

$$Y_A = \frac{X_A}{(X_A + X_B)} \quad (5)$$

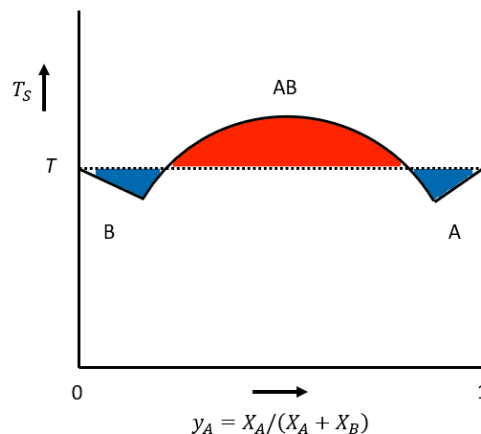


Figura 10 – Perfil da temperatura em função da fração molar excluída do solvente (Y_A) quando medido ao longo da linha tracejada da Figura 9. A zona a vermelho representa a zona em que a temperatura de saturação (T_s) é superior à temperatura de referência. A zona a azul representa o inverso, onde a T_s é inferior à T .

Quando $Y_A = 1$, a fração molar de A, X_A corresponde a $X_A^*(T)$, que é a solubilidade do componente A puro a uma temperatura estabelecida. Quando $Y_A = 0$, o composto A está ausente, e o $X_B = X_B^*(T)$, que é a solubilidade do componente B puro à mesma temperatura estabelecida, Figura 10.

Os cálculos detalhados das frações molares de X_A e X_B , para a construção do diagrama pseudobinário experimental do perfil da temperatura em função da fração molar excluída do solvente apresentado na Figura 10, são apresentados no Anexo I.

Após os ensaios de determinação dos *clear points*, as soluções foram deixadas sob agitação à temperatura de 25 °C e, após 72 horas foram centrifugadas, caracterizando-se as fases sólidas por XRPD e a composição da fase líquida por espectroscopia derivativa no ultravioleta.

2.2.2 Caracterização de fases sólidas e de soluções

2.2.2.1 Difração de raios-X de pó

A difração de raios-X de pó (XRPD) baseia-se na medição da dispersão de raios-X pela matéria. Este método é extremamente útil na caracterização de formas sólidas, como co-cristais. Através da análise de difratogramas de XRPD é possível determinar as fases

cristalinas presentes na amostra, que apresentam reflexões características da rede cristalina, e a ausência de cristalinidade.

O tubo de raios catódicos presente no equipamento, gera feixes de raios-X que são filtrados, produzindo radiação monocromática, colimados e bombardeados na amostra. Estes feixes, ao chegarem à amostra, podem ser refletidos ou sofrer difração. Os difratados, se a amostra for cristalina, geram interferências construtivas, originando um padrão único de reflexões para cada amostra que depende da natureza dos átomos e da sua organização [78].

A difração de raios-X obedece à Lei de Bragg, Equação (6):

$$n\lambda=2d \sin \theta \quad (6)$$

Onde n é um número inteiro; λ é o comprimento de onda da radiação; d é a distância interplanar que gera o padrão de difração; e θ é o ângulo de difração.

Neste trabalho, os estudos por difração de raios-X de pó foram realizados no equipamento MiniFlex 600 da Rigaku com o detetor D/teX Ultra. Os dados foram adquiridos entre os 3-40° com uma velocidade de 5°/min. Foi utilizado um porta-amostra de silício com uma cavidade para colocar a amostra com 5,0 mm de diâmetro e 0,1 mm de profundidade.

2.2.2.2 Calorimetria diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é um método calorimétrico, que mede o fluxo diferencial de calor entre uma amostra e o material de referência, quando é aplicado um programa de temperatura. Ao estudar a co-cristalização, é importante realizar análises de DSC, pois permitem identificar vários eventos como a fusão, transições polimórficas e recristalização, e determinar a temperatura e variação de entalpia associados a esses eventos.

Neste trabalho, o DSC foi utilizado para investigar o comportamento térmico dos sólidos obtidos. Os estudos calorimétricos foram realizados no DSC7 da Perkin-Elmer, um DSC de compensação de potência, em que a amostra e a referência são colocadas em dois fornos diferentes, com temperatura controlada e termicamente isolados. Ao realizar esta análise acontece uma diferença do fluxo de calor (dQ/dt) entre a amostra e a referência em função

da temperatura. Ao analisar a curva de DSC obtida, é possível encontrar picos endotérmicos, sinal positivo, em que ocorre absorção de energia, e picos exotérmicos, sinal negativo, em que ocorre liberação de energia. O DSC foi utilizado com banho de arrefecimento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e com purga de azoto com débito de 20 mL/min. As amostras com peso de 1 a 2 mg foram preparadas em cápsulas abertas de alumínio de 50 μl e com taxa de aquecimento/arrefecimento de $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Como referência, utilizou-se uma cápsula vazia [79].

2.2.2.3 Espetroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR) é um método analítico muito usado para caracterizar grupos funcionais com base na interação da radiação de infravermelho com a matéria, medindo as frequências de radiação que a amostra absorve, produzindo excitação vibracional. A espectroscopia de infravermelho é um método rápido para identificação e caracterização de estruturas químicas e biológicas. Cada grupo funcional tem frequência de vibração específica. A absorção de radiação na região do infravermelho ocorre quando a energia da radiação corresponde à diferença de energia entre níveis vibracionais associados a uma vibração molecular, podendo o modo vibracional envolver variação no comprimento de ligações interatômicas ou deformação angular.

Neste trabalho, as análises por espectroscopia de infravermelho foram realizadas no equipamento NICOLET 380 FT-IR da Thermo Scientific com acessório de diamante ATR (espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier no modo reflexão total atenuada). De modo a analisar diretamente as amostras, sem causar qualquer alteração na sua rede cristalina, os espectros foram obtidos em modo ATR (reflexão total atenuada). O registo foi feito em gamas de números de onda compreendidas entre 4000 cm^{-1} e 650 cm^{-1} , com 32 scans por espectro e resolução de 2 cm^{-1} [80, 81].

2.2.2.4 Espetroscopia de ultravioleta

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica analítica que mede a absorção de radiação por espécies moleculares em comprimentos de onda na região ultravioleta e visível [82].

A espectroscopia de ultravioleta obedece à lei de Beer-Lambert, Equação 7:

$$A = \epsilon L c \quad (7)$$

Onde A é a absorvância; ϵ é a absorvidade molar; L é a distância que a luz atravessa na cubete; e c é a concentração da amostra.

As análises por espectroscopia de ultravioleta foram realizadas no espectrofotômetro UV-1800 da Shimadzu, utilizando-se cubetes de quartzo. O caminho ótico foi de 1,0 cm e o comprimento de onda da análise foi entre 200 e 380 nm.

2.2.2.5 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma das técnicas de análise térmica mais usadas, sendo rápida, precisa, acessível e fácil de utilizar. Avalia a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, devido à decomposição, oxidação e perda de compostos voláteis, através de um programa de temperatura controlado, e utilizando uma balança de alta precisão. Esta análise é realizada aumentando gradualmente a temperatura da amostra sob uma taxa de aquecimento constante. A curva obtida, termograma, fornece informações qualitativas, permitindo identificar as amostras, e quantitativas, avaliando a percentagem de perda de massa. Permite, por isso, detetar por exemplo dessolvatação. Muitas das vezes, a análise termogravimétrica é simultaneamente utilizada com o DSC (TG-DTA/DSC). Esta combinação permite realizar simultaneamente vários tipos de análise, usando uma única amostra. É possível avaliar se um processo endotérmico/exotérmico é acompanhado de uma variação de massa ou se se trata de uma mudança de fase sem alteração de massa (como fusão, transição sólido-sólido) [83].

Neste trabalho foi usado o equipamento Netzsch TG 209 F3 Tarsus utilizando cadinhos de alumina. As massas utilizadas variaram entre 5 e 10 mg a temperatura controlada entre 40 e 600 °C com um fluxo de azoto de 25 mL/min. A calibração de temperatura foi realizada com índio, estanho, bismuto, zinco, alumínio e prata. A massa e a linearidade da balança foram verificadas com massas padrão na ordem dos miligramas. Os dados foram analisados pelo software Netzsch Proteus Thermal Analysis, versão 7.2.0.

2.2.2.6 Termomicroscopia de luz polarizada

A termomicroscopia de luz polarizada (PLTM) é uma técnica de imagem que combina a microscopia de luz polarizada com variação de temperatura. Esta técnica é bastante utilizada no estudo de co-cristais, uma vez que permite avaliar e analisar alterações de fase da amostra, como transições sólido-sólido, fusão ou avaliar a sua cristalinidade [84].

Os estudos de PLTM foram realizados num sistema Linkam hot stage, modelo DSC600. Para observação ótica, foi utilizado um microscópio Leica DMRB, com uma ampliação de 200×, e uma câmara de vídeo Pixelink PLA-622. A placa de aquecimento/arrefecimento, consegue realizar varrimentos numa gama de temperaturas entre -160 e 600 °C, com velocidades entre 0,1 e 130 °C/min. A temperatura da placa é controlada por uma unidade central CI-94 e a refrigeração é feita por circulação de azoto líquido através da unidade LNP. As imagens foram obtidas combinando o uso da luz polarizada e compensadores de ondas. Estas imagens foram analisadas através do software Linksys32 da Linkam. Este software permite acompanhar as alterações de fase que vão ocorrendo durante o procedimento pela variação da intensidade luminosa. As células de vidro utilizadas têm como dimensões, 7 mm de diâmetro e 2 mm de altura, com uma tampa do mesmo material, como cobertura.

3 Resultados e Discussão

3.1 Investigação e caracterização das formas sólidas dos compostos de partida

O diflunisal, a isoniazida, a lamotrigina e a etossuximida foram investigados individualmente utilizando o XRPD, DSC, FTIR-ATR e ainda foram submetidos a estudos de solubilidade, utilizando o equipamento Crystal 16.

3.1.1 Diflunisal

Começou-se por analisar os difratogramas de raios-X de pó do diflunisal adquirido comercialmente e do sólido resultante dos estudos de solubilidade no Crystal 16,

Figura 11. Verificou-se que há alteração da estrutura do diflunisal submetido aos estudos de solubilidade. O diflunisal adquirido comercialmente foi identificado por difração de raios-X de pó como sendo a forma I. Na mesma figura identificou-se o precipitado sólido resultante dos estudos de solubilidade como sendo a forma III. Estes dados são suportados pela simulação dos difratogramas de pó a partir dos ficheiros CIF depositados na Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) e naturalmente pela informação contida nos artigos associados [58, 60, 85].

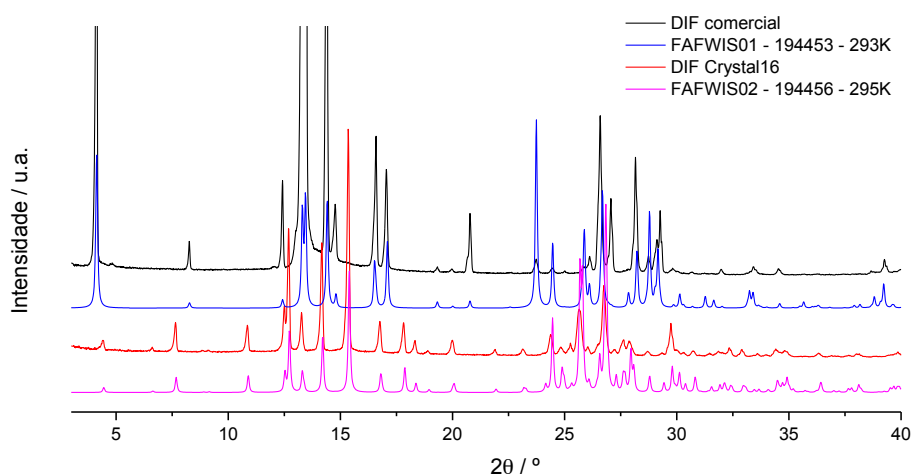


Figura 11 – Difratogramas de raios-X de pó experimentais: diflunisal adquirido comercialmente e diflunisal obtido por precipitação nos ensaios de solubilidade do Crystal 16 em etanol; e difratogramas de raios-X de pó simulados: diflunisal forma I, FAFWIS01 e diflunisal forma III, FAFWIS02.

Na Figura 12 apresentam-se as curvas de DSC de aquecimento das duas amostras. O DIF comercial e o DIF Crystal16 fundem a $T_{\text{fus}} = 213,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{fus}} = 212,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, respetivamente, e apresentam entalpias de fusão de $\Delta_{\text{fus}}H = 37,2\text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta_{\text{fus}}H = 35,8\text{ kJ mol}^{-1}$. Enquanto o DIF comercial, forma I, apresenta um único pico correspondente ao ponto de fusão do DIF, o DIF Crystal16, forma III, apresenta uma transição endotérmica adicional antes da fusão, a $206,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que muito provavelmente está associado a uma transição sólido-sólido para a forma I [58].

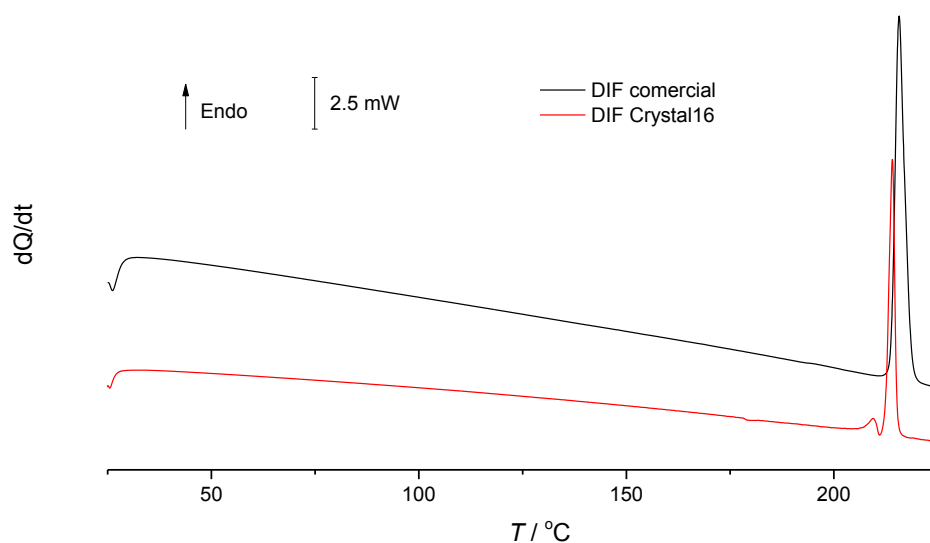


Figura 12 – Curvas de DSC de aquecimento do DIF comercial e do DIF Crystal16 ($\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min.}$).

Os espectros de infravermelho do DIF comercial e do DIF Crystal16 são apresentados na Figura 13.

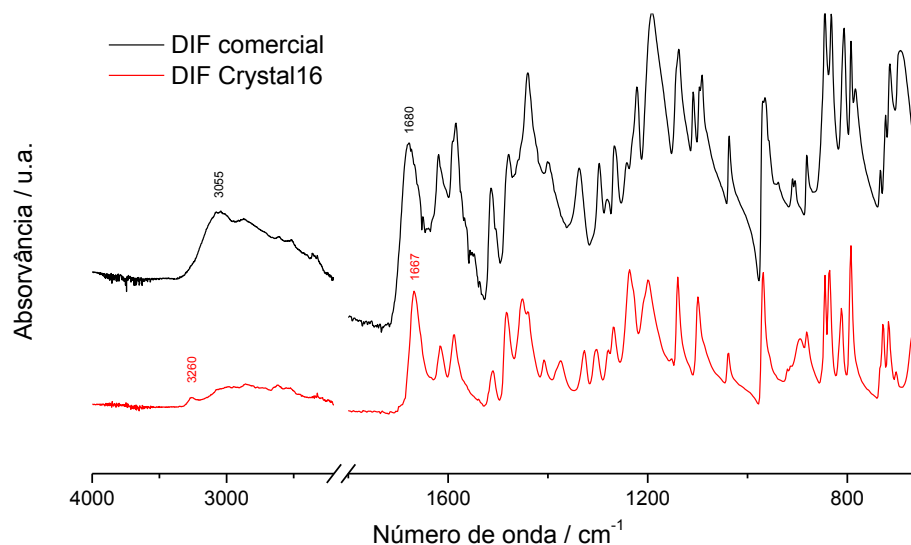


Figura 13 – Espectros de infravermelho do DIF comercial e do DIF Crystal16.

O diflunisal é caracterizado por uma banda larga de 3500 a 2500 cm^{-1} devido à presença de grupos hidroxilo que estabelecem ligações intra e intermoleculares. Verifica-se a alteração de estrutura cristalina do DIF quando submetido a estudos de solubilidade pelo Crystal16. A elongação do grupo carbonilo da forma I, localizada a 1680 cm^{-1} , desloca-se para 1667 cm^{-1} , na forma III. A região entre 1410 e 1310 cm^{-1} corresponde às bandas associadas às ligações que envolvem os átomos de fluor; na forma I esta região apresenta duas bandas e na forma III quatro bandas. Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [58, 86].

3.1.2 Isoniazida

A isoniazida adquirida comercialmente foi identificada por difração de raios-X de pó como sendo a forma I (Figura 14). Na mesma figura identificou-se o precipitado sólido resultante dos estudos de solubilidade efetuados no equipamento Crystal16 como sendo também a forma I [65-67, 87, 88].

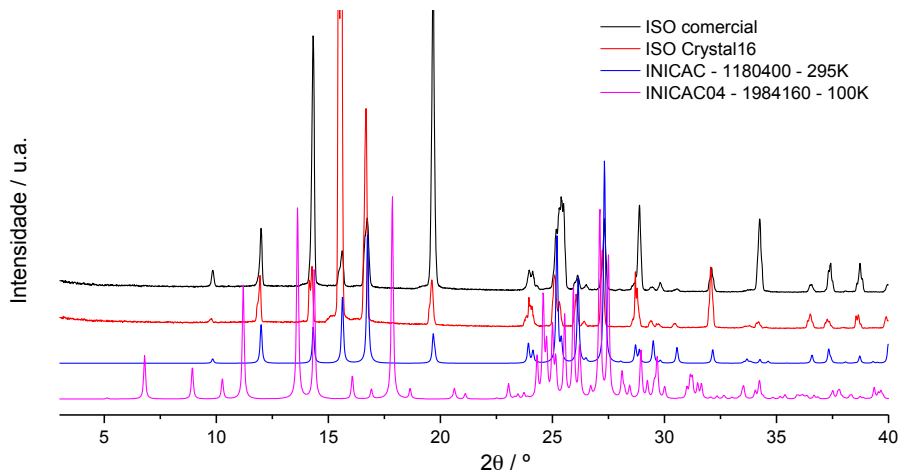


Figura 14 – Difratomogramas de raios-X de pó experimentais: isoniazida adquirida comercialmente e isoniazida obtida por precipitação nos ensaios de solubilidade do Crystal16; e difratogramas de raios-X de pó simulados: isoniazida forma I, INICAC e isoniazida forma II, INICAC04.

Na Figura 15 apresentam-se as curvas de DSC de aquecimento das duas amostras. A ISO comercial e a ISO Crystal16 que fundem a $T_{fus} = 170,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $T_{fus} = 170,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, respetivamente, e apresentam entalpias de fusão de $\Delta_{fus}H = 31,8\text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta_{fus}H = 34,2\text{ kJ mol}^{-1}$.

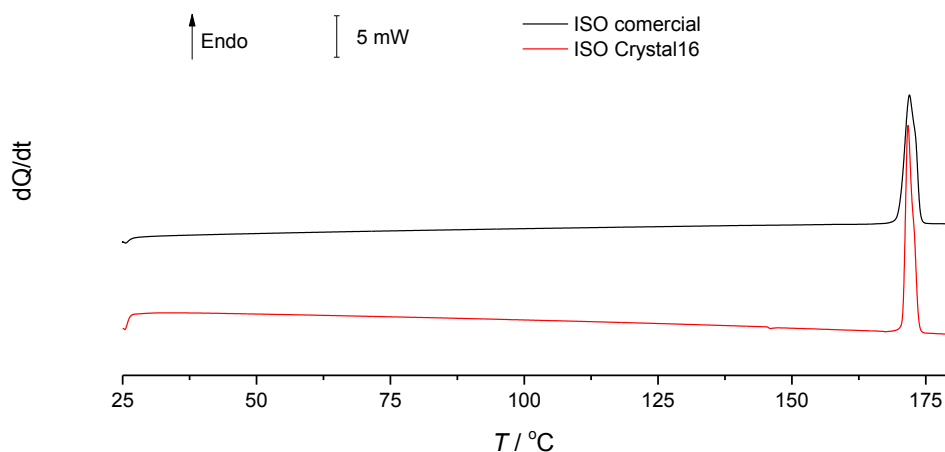


Figura 15 – Curvas de DSC de aquecimento da ISO comercial e da ISO Crystal16 ($\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min.}$).

Os espectros de infravermelho da ISO comercial e da ISO Crystal16 são apresentados na Figura 16, e mostram-se idênticos, como seria de esperar.

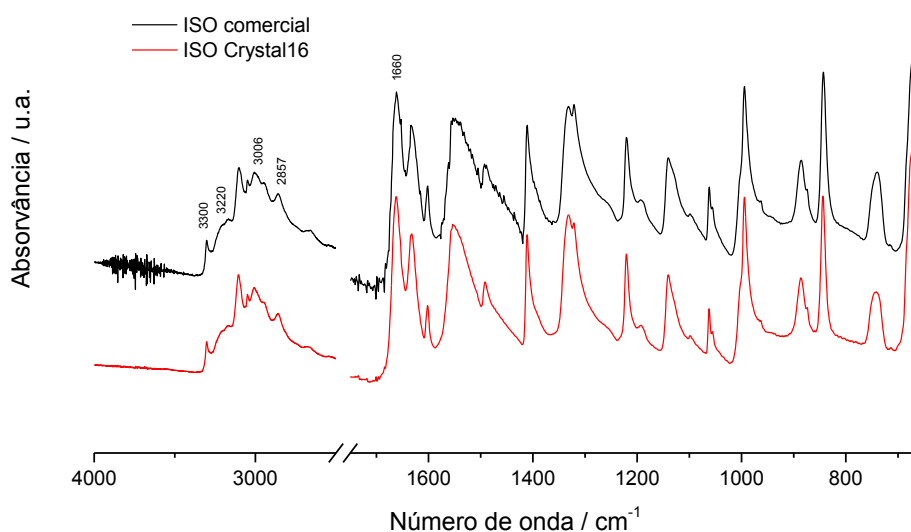


Figura 16 – Espectros de infravermelho da ISO comercial e da ISO Crystal16.

É registado para ambos os espectros um máximo a 1660 cm^{-1} correspondente à elongação do grupo carbonilo. A 2857 cm^{-1} a vibração da elongação C-H. Entre 3006 cm^{-1} e 3220 cm^{-1} surgem as bandas da elongação assimétrica da ligação H-N-N e simétrica da ligação NH_2 . Encontra-se ainda a elongação assimétrica da ligação NH_2 que tem o seu máximo a 3300 cm^{-1} . Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [89].

3.1.3 Lamotrigina

A lamotrigina adquirida comercialmente foi identificada por difração de raios-X de pó como sendo a forma I (Figura 17). Na mesma figura identificou-se o precipitado sólido resultante dos estudos de solubilidade efetuados no equipamento Crystal16 como sendo o solvato de etanol [12, 70].

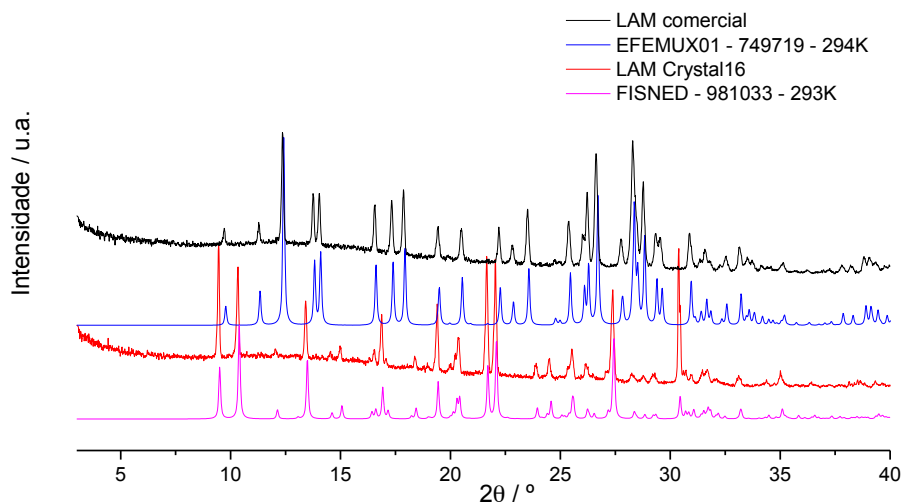


Figura 17 – Difratogramas de raios-X de pó experimentais: lamotrigina adquirida comercialmente e lamotrigina obtida por precipitação nos ensaios de solubilidade do Crystal16; e difratogramas de raios-X de pó simulados: lamotrigina forma I, EFEMUX01 e lamotrigina etanol-solvato, FISNED.

Na Figura 18 apresentam-se as curvas de DSC de aquecimento das duas amostras. A LAM comercial e a LAM Crystal16 que fundem a $T_{fus} = 215,9\text{ °C}$ e $T_{fus} = 215,3\text{ °C}$, respetivamente, e apresentam entalpias de fusão de $\Delta_{fus}H = 35,2\text{ kJ mol}^{-1}$ e $\Delta_{fus}H = 31,5\text{ kJ mol}^{-1}$. São observáveis algumas diferenças. Enquanto a LAM comercial, forma I, apresenta um único pico correspondente ao ponto de fusão da LAM, a LAM Crystal16 apresenta uma transição endotérmica a $96,1\text{ °C}$, que se atribui a uma dessolvatação, seguida de uma transição exotérmica, acabando por fundir a uma temperatura semelhante à da forma I [12, 90].

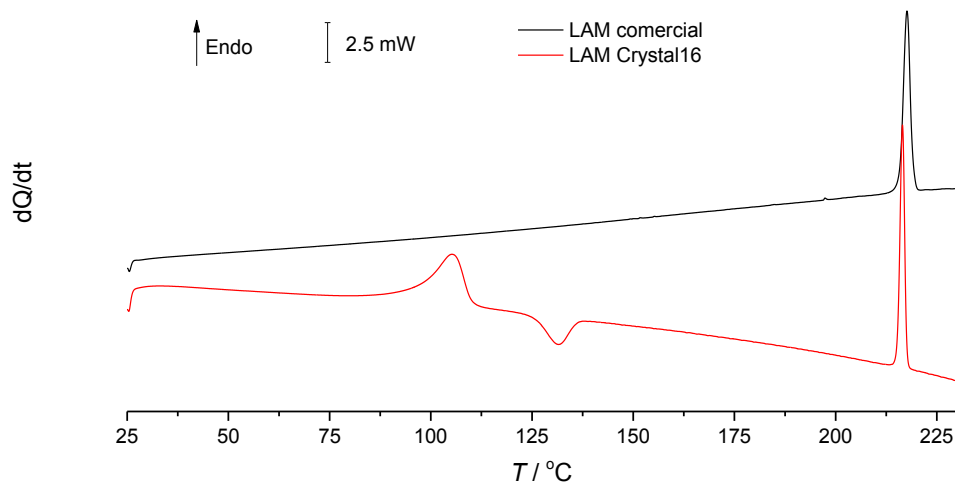


Figura 18 – Curvas de DSC de aquecimento da LAM comercial e da LAM Crystal16 ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).

A Figura 19 reúne os espectros de infravermelho da LAM comercial e da LAM Crystal16.

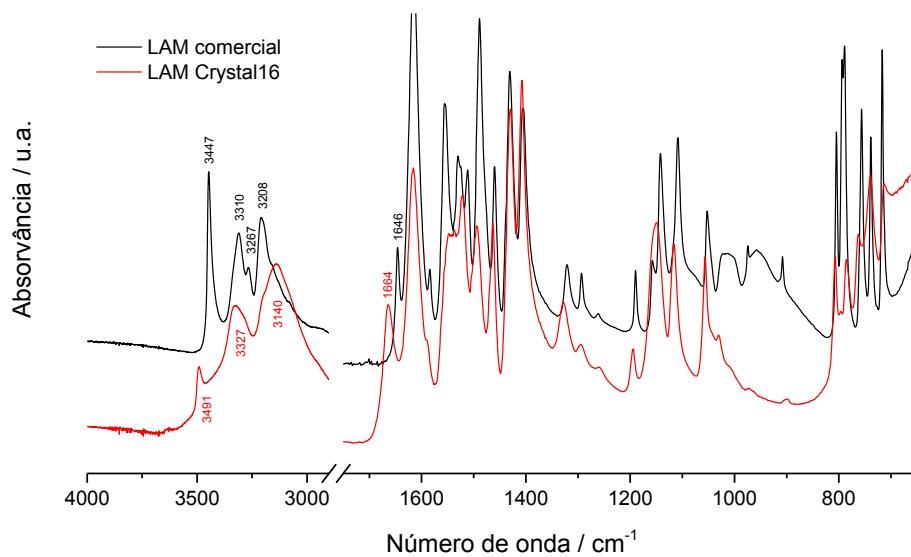


Figura 19 – Espectros de infravermelho da LAM comercial e da LAM Crystal16.

Quanto ao espectro da LAM comercial, a banda mais característica é a deformação do grupo NH_2 a 1646 cm^{-1} . O grupo NH_2 apresenta duas elongações simétricas com máximo a 3208 cm^{-1} e a 3267 cm^{-1} e duas elongações assimétricas a 3310 cm^{-1} e a 3447 cm^{-1} . Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [91]. As bandas de elongação assimétrica do espectro de infravermelho da LAM do Crystal16 aparecem com maior número de onda relativamente ao da LAM comercial, implicando que as ligações de hidrogénio no LAM Crystal16 sejam mais fracas que na rede cristalina do LAM comercial.

3.1.4 Etossuximida

Contrariamente ao que acontece com os outros compostos, a etossuximida não apresenta estruturas cristalinas disponíveis no CCDC para se poder comparar com as estudadas nesta investigação, mas foi possível utilizar os polimorfos descobertos num trabalho de pesquisa realizado no mesmo laboratório, a forma I obtida através de cristalização do fundido e a forma II obtida por LAG (10 μL etanol, 30 min 30 Hz). No entanto, a moagem por LAG origina a fusão do composto e a análise imediata deteta a presença de uma pequeníssima quantidade de forma I. Após alguns dias, a análise por XRPD mostra apenas forma II pura [92]. A etossuximida adquirida comercialmente foi identificada por difração de raios-X de pó como sendo a forma II, contaminada com forma I, Figura 20. Não foi possível obter o precipitado sólido resultante dos estudos de solubilidade efetuados no equipamento Crystal16 dada a sua solubilidade elevada, não sendo possível encontrar um solvente ideal para o conseguir concretizar. Mais à frente, nos resultados, é explicado detalhadamente como foi realizado o estudo deste composto.

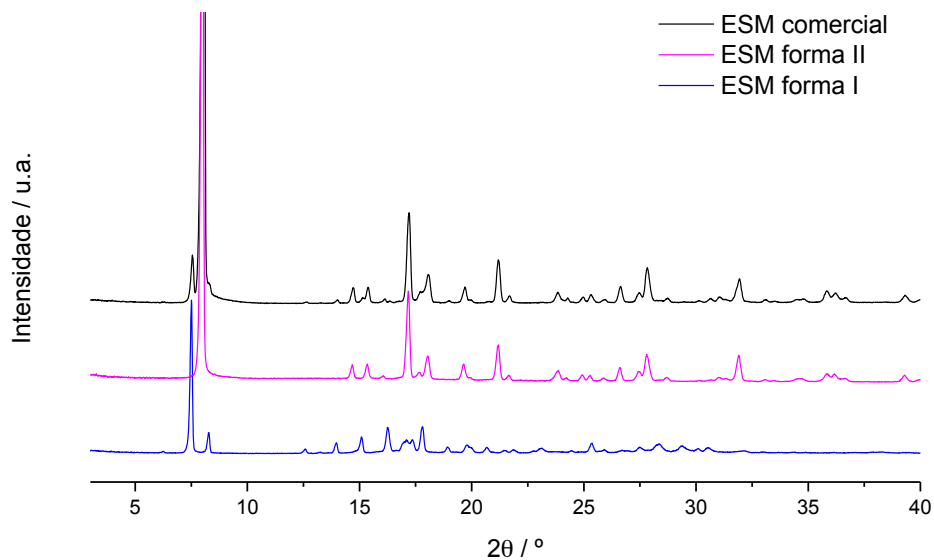


Figura 20 – Difratoograma de raios-X de pó experimental: etossuximida adquirida comercialmente; e difratogramas de raios-X de pó simulados: etossuximida forma I e etossuximida forma II.

Na Figura 21 encontra-se a curva de DSC de aquecimento da ESM comercial. Funde a $T_{fus} = 45,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e apresenta uma entalpia de fusão de $\Delta_{fus}H = 16,8\text{ kJ mol}^{-1}$.

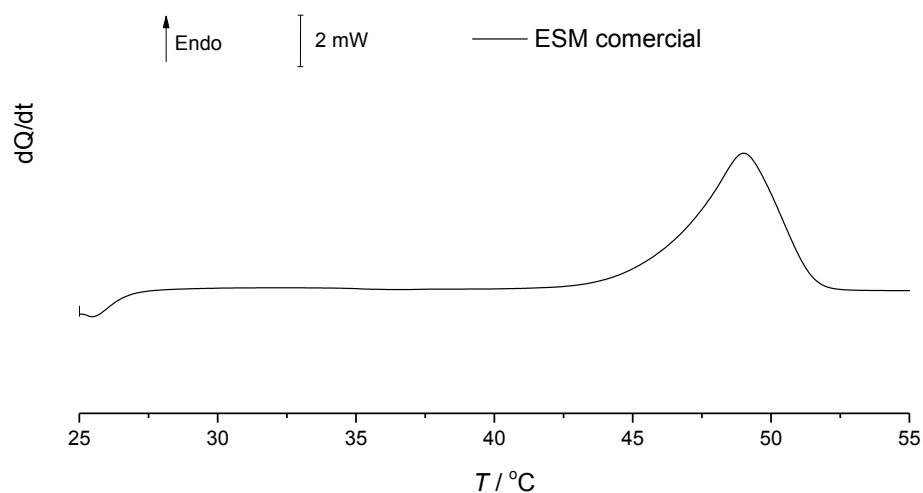


Figura 21 – Curva de DSC de aquecimento da ESM comercial ($\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min.}$).

A Figura 22 apresenta o espectro de infravermelho da ESM comercial.

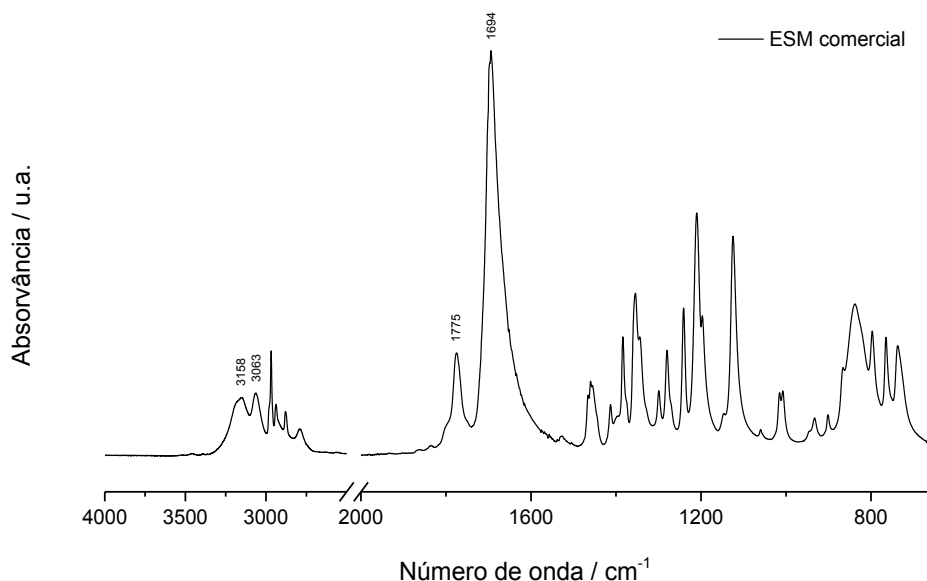


Figura 22 – Espectros de infravermelho da ESM comercial.

São observáveis bandas a 1694 e 1775 cm^{-1} correspondentes à elongação das ligações C=O. São registadas também, com máximos a 3063 e 3158 cm^{-1} , bandas da elongação da ligação NH. Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [93].

3.2 Investigação dos sistemas de diflunisal-isoniazida e diflunisal-lamotrigina

Como acima descrito, o diflunisal é um anti-inflamatório não esteroide e, por isso, a sua associação com outros ativos farmacêuticos, formando um sistema de terapia dual, pode ser bastante interessante. Foram investigados os sistemas diflunisal+isoniazida e diflunisal+lamotrigina. A associação com a isoniazida, um tuberculostático, mostra-se relevante na medida em que os efeitos adversos mais comuns da isoniazida são a dormência, o ardor no estômago e dores articulares, pelo que este sistema de terapia dual com o diflunisal poderá ser bastante útil para os minimizar [94]. No caso do diflunisal com a lamotrigina, um anticonvulsivante, a sua associação resulta num sal. É de interesse uma vez que o diflunisal permite uma redução dos efeitos adversos consequentes da toma deste antiepilético (dor no peito e nas costas, dismenorreia, dor abdominal e de cabeça) [95]. Em trabalho anterior, estes dois sistemas foram obtidos por técnicas de moagem a seco e com

solvente [90, 92]. Neste trabalho propõe-se encontrar as condições certas para obter estes dois sistemas por precipitação e *slurry*.

3.2.1 Diflunisal-Isoniazida

3.2.1.1 Síntese de co-cristal por precipitação em etanol

Primeiramente, foram realizados estudos de solubilidade usando o equipamento Crystall6, tendo-se obtido valores de temperatura de dissolução e de precipitação para soluções de diferentes concentrações dos compostos puros, DIF e ISO, em etanol. Obtiveram-se valores experimentais de solubilidade para cada um dos compostos puros, como se pode verificar na Figura 23 e na Tabela 3, que foram ajustados à equação de van't Hoff (Equação (1)).

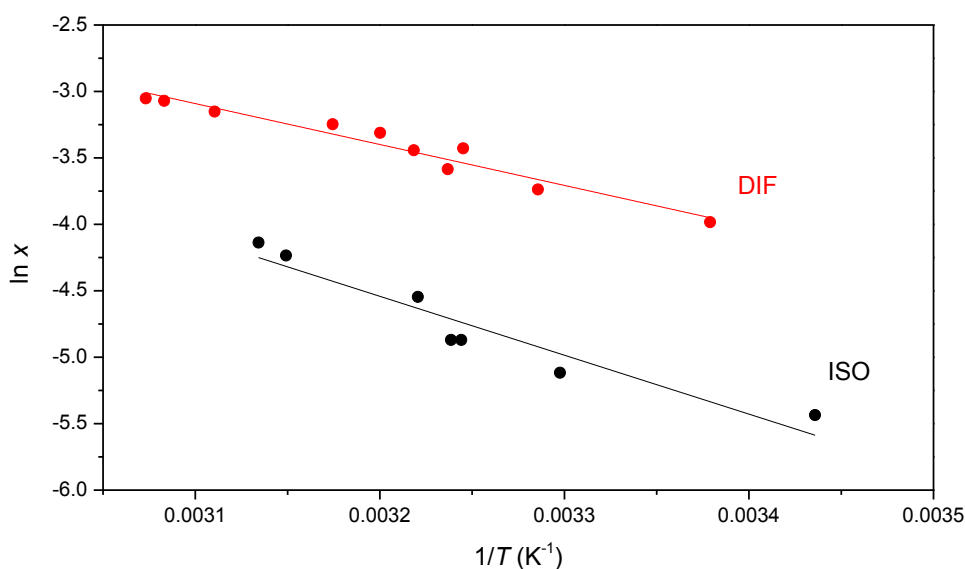


Figura 23 – Gráfico da equação de van't Hoff de DIF e de ISO em etanol.

Tabela 3 – Parâmetros de ajuste à Equação (I) dos dados experimentais obtidos na determinação das temperaturas de saturação, com o equipamento Crystal 16, para diflunisal e isoniazida em etanol.

	$-(\Delta H/R) / K$	$\Delta H/(RT_0)$	Coefficiente de correlação
Diflunisal	3079 ± 252	6,45 ± 0,81	0,943
Isoniazida	4433 ± 606	9,64 ± 1,97	0,897

Escolheu-se a temperatura de referência de 40 °C e usou-se a equação de van't Hoff, Equação (I), com os parâmetros da Tabela 3, para achar a solubilidade dos compostos puros. Utilizou-se a metodologia descrita na seção 2.2.1, para obter a fração molar de cada um dos pseudobinários e ternários, e partir delas conseguiu-se obter concentrações teóricas para todas as proporções desejadas, como indicado na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores calculados para a preparação das soluções da mistura DIF-ISO com diferentes Y_{DIF} .

Y_{DIF}	X_{DIF}	X_{ISO}	n_{DIF}	n_{ISO}	$C_{DIF} / mg mL^{-1}$	$C_{ISO} / mg mL^{-1}$
1,0	0,03409	0,00000	6,05E-04	0,00E+00	151,26	0,00
0,9	0,02534	0,00282	4,47E-04	4,96E-05	111,76	6,81
0,8	0,01919	0,00480	3,37E-04	8,42E-05	84,26	11,55
0,7	0,01462	0,00627	2,56E-04	1,10E-04	64,01	15,04
0,6	0,01110	0,00740	1,94E-04	1,29E-04	48,48	17,71
0,5	0,00830	0,00830	1,45E-04	1,45E-04	36,18	19,83
0,4	0,00602	0,00904	1,05E-04	1,57E-04	26,21	21,55
0,3	0,00413	0,00964	7,18E-05	1,68E-04	17,96	22,97
0,2	0,00254	0,01016	4,41E-05	1,76E-04	11,02	24,17
0,1	0,00118	0,01060	2,04E-05	1,84E-04	5,11	25,19
0,0	0,00000	0,01098	0,00E+00	1,90E-04	0,00	26,07

Fez-se a mistura dos compostos e procedeu-se ao estudo de solubilidade, em etanol, utilizando o equipamento Crystal 16. O gráfico das temperaturas de saturação de cada uma das misturas está representado na Figura 24 em função da fração molar excluída do solvente.

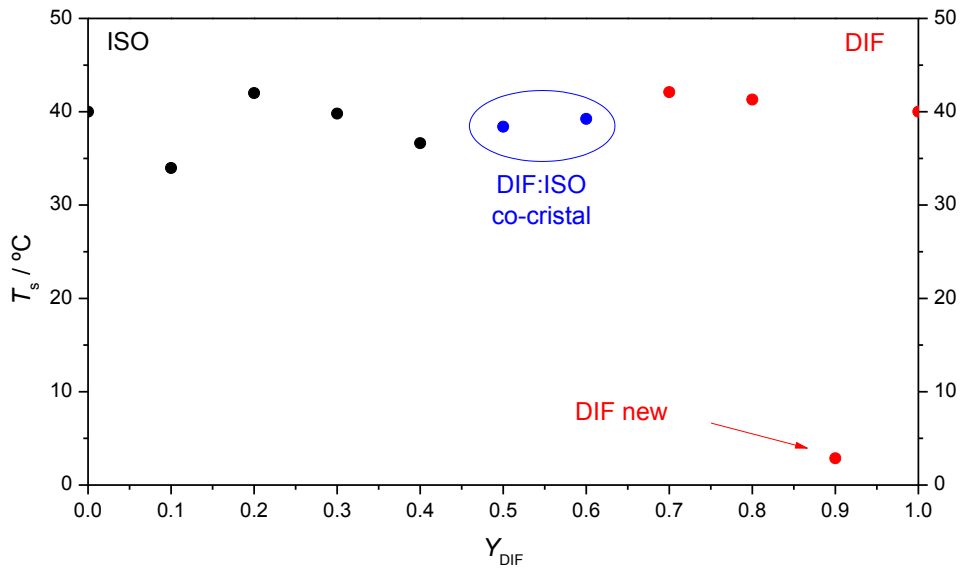


Figura 24 – Gráfico da temperatura de saturação em função da fração molar de diflunisal, excluída do solvente, do sistema DIF-ISO, a partir dos dados obtidos no Crystal I 6.

Após realizadas as experiências em modo politérmico, os vials foram deixados por 72h, a 25 °C. Após esse período, foi efetuada a centrifugação de cada uma das amostras e o respetivo sólido foi analisado por XRPD. Os resultados são apresentados na Figura 25, onde é observada a formação de co-cristal para $Y_{DIF} = 0.5$ e 0.6 , e irão ser discutidos de seguida.

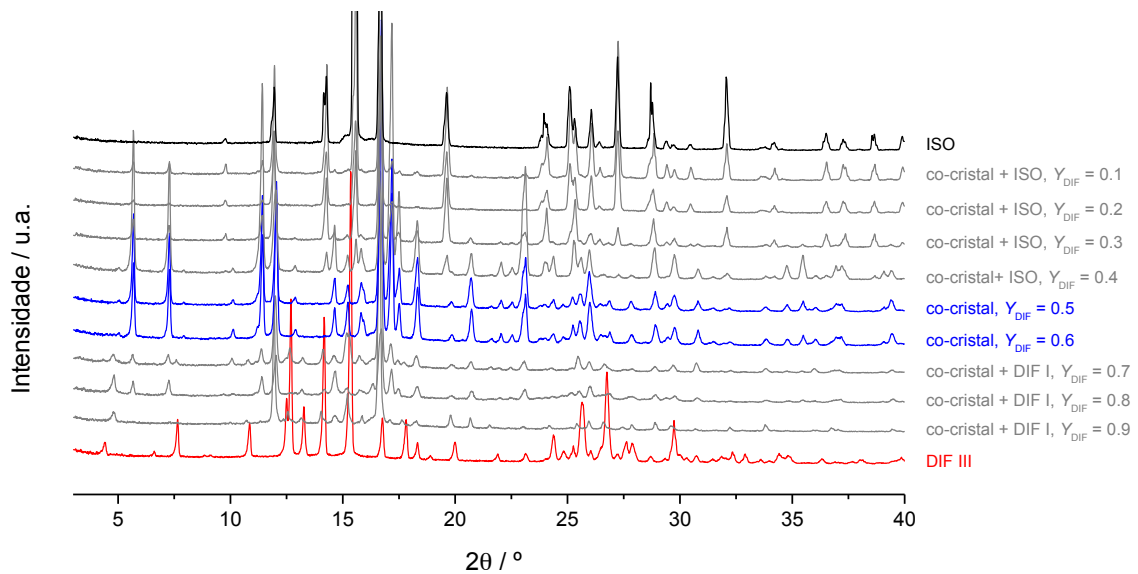


Figura 25 – Difratogramas de raios-X de pó das fases sólidas em equilíbrio, para as misturas preparadas com diferentes valores de Y_{DIF} .

Nesta figura são visíveis várias zonas típicas de um diagrama ternário bastante importantes, como foram apresentadas na Figura 4. Assim, temos uma zona de frações molares excluídas do solvente em que estão presentes o co-cristal e a ISO, ($Y_{\text{DIF}} 0.1$ a $Y_{\text{DIF}} 0.4$), outra zona em que só o co-cristal está presente, ($Y_{\text{DIF}} 0.5$ e $Y_{\text{DIF}} 0.6$), outra em que o co-cristal e o DIF estão presentes, ($Y_{\text{DIF}} 0.7$ e $Y_{\text{DIF}} 0.8$) e uma última zona em que apenas temos DIF ($Y_{\text{DIF}} 0.9$ e $Y_{\text{DIF}} 1$).

Escolheu-se o sólido obtido para $Y_{\text{DIF}} 0.5$, para detalhar a comparação com a mistura DIF-ISO 1:1 obtida por LAG - (10 μL etanol, 30 min 30 Hz) - esta última foi investigada em trabalho anterior realizado no mesmo laboratório [92]. Procedeu-se à caracterização da amostra através da análise por XRPD, DSC e FTIR-ATR.

O difratograma de raios-X de pó, Figura 26, mostra que o co-cristal precipitado DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} 0.5$ corresponde ao difratograma da co-cristal DIF-ISO 1:1 obtido por LAG.

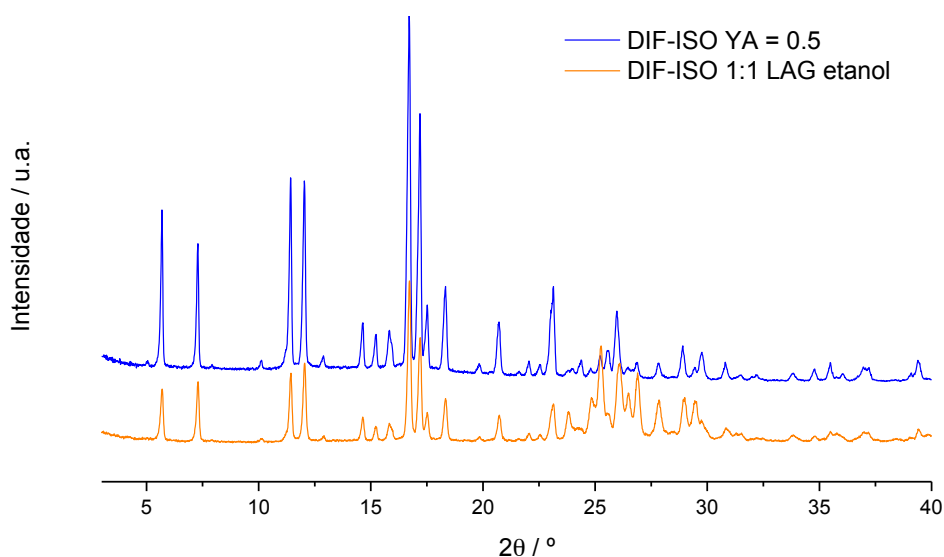


Figura 26 – Difratogramas de XRPD da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ e do sólido obtido por LAG.

As curvas de aquecimento por DSC encontram-se na Figura 27. O co-cristal DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} 0.5$ funde a $T_{\text{fus}} = 151,1$ $^\circ\text{C}$ e a mistura DIF-ISO 1:1 LAG etanol funde a $T_{\text{fus}} = 148,0$ $^\circ\text{C}$. Apresentam entalpias de fusão de $\Delta_{\text{fus}}H = 52,3$ kJ mol^{-1} e $\Delta_{\text{fus}}H = 48,3$ kJ mol^{-1} , respetivamente. Os valores obtidos nestes ensaios e também os difratogramas de raios-X de pó, apontam para maior cristalinidade do co-cristal obtido por cristalização em solução relativamente à amostra obtida por moagem.

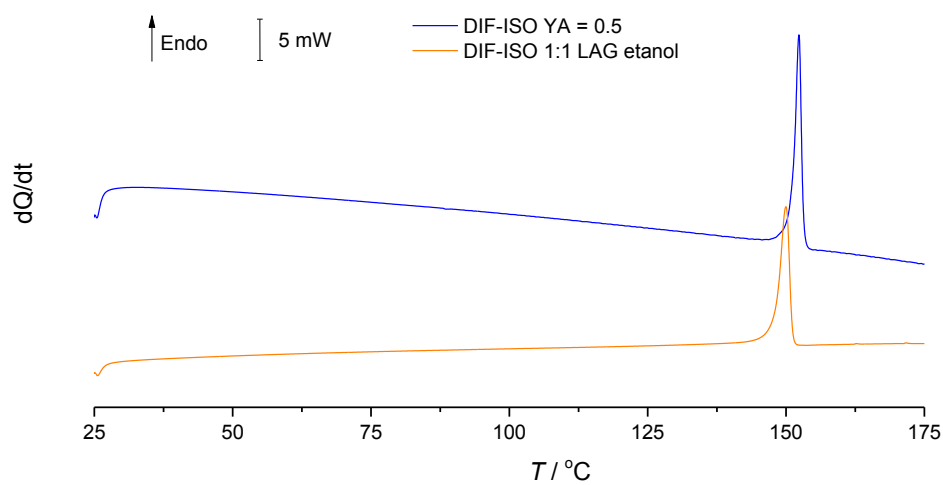


Figura 27 – Curvas de DSC da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por LAG ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).

Os espectros de infravermelho do co-cristal DIF-ISO $Y_{DIF} 0.5$ e do co-cristal DIF-ISO 1:1 LAG etanol são apresentados na Figura 28, mostrando ser semelhantes.

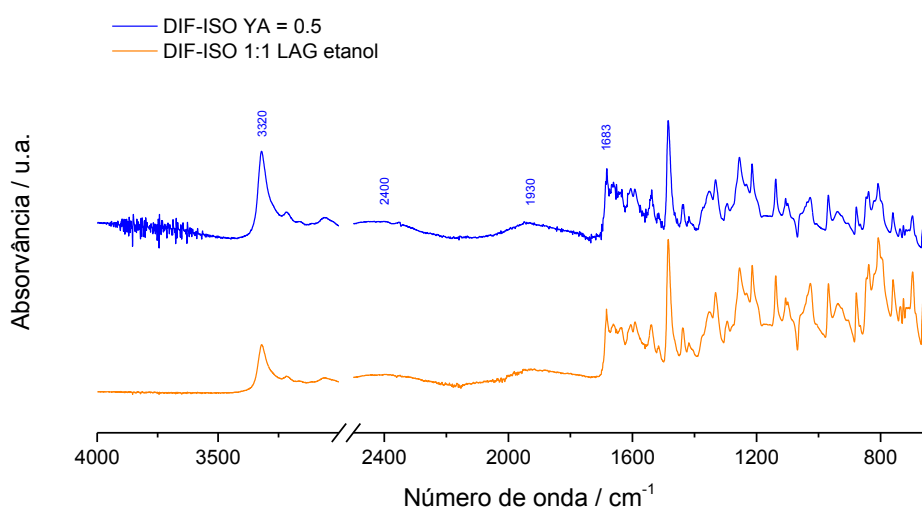


Figura 28 – Espectros de infravermelho da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por LAG.

Ambos os espectros mostraram o aparecimento de duas bandas por volta dos 1930 e dos 2400 cm^{-1} , atribuíveis à formação de ligações de hidrogénio ácido carboxílico-azoto aromático, [96]. É observado também, em ambos os espectros, a elongação do grupo carbonilo com máximo a 1683 cm^{-1} e da ligação N-H com máximo a 3320 cm^{-1} . Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [58, 86, 89, 92].

Podemos concluir então que a cristalização em solução para $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ foi bem-sucedida na obtenção de um co-cristal DIF-ISO (1:1), idêntico ao obtido por LAG.

No sentido de tentar perceber o aparecimento da temperatura de solubilização tão baixa e repetitiva para a proporção $Y_{\text{DIF}} 0.9$ na Figura 24, foi realizado o estudo do DIF com uma ligeira contaminação de 1% de ISO para testar a possível formação de uma nova forma polimórfica do DIF. O procedimento foi realizado como anteriormente, utilizando o equipamento Crystal16. Foi feita a análise por XRPD, DSC e FTIR-ATR, e para interpretação dos resultados obtidos, utilizaram-se os dados de DIF forma I e III.

O difratograma de raios-X de pó, Figura 29, mostrou que a amostra de DIF obtida nestas condições apresenta um perfil de difração muito semelhante ao DIF comercial, forma I.

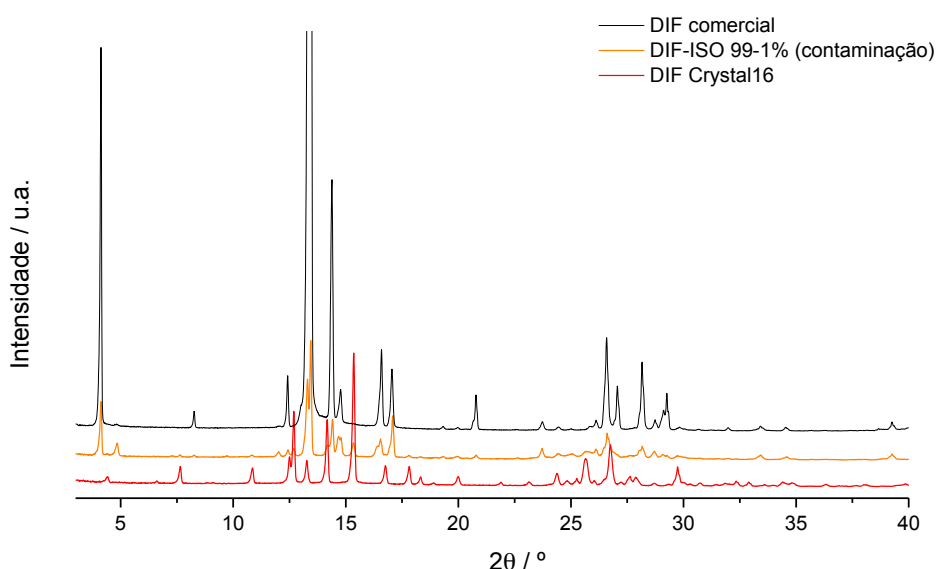


Figura 29 – Difratogramas de XRPD do DIF comercial; do DIF contaminado com 1% de ISO, DIF-ISO = 0.99, e do DIF Crystal16.

As curvas de aquecimento por DSC encontram-se na Figura 30. A curva relativa ao sólido obtido por contaminação DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} 0.99$ não apresenta outras transições no aquecimento para além da fusão a $T_{\text{fus}} = 211,7 \text{ }^\circ\text{C}$ e apresenta uma entalpia de fusão de $\Delta_{\text{fus}}H = 33,0 \text{ kJ mol}^{-1}$, apresentado assim um comportamento térmico muito semelhante ao DIF comercial, forma I.

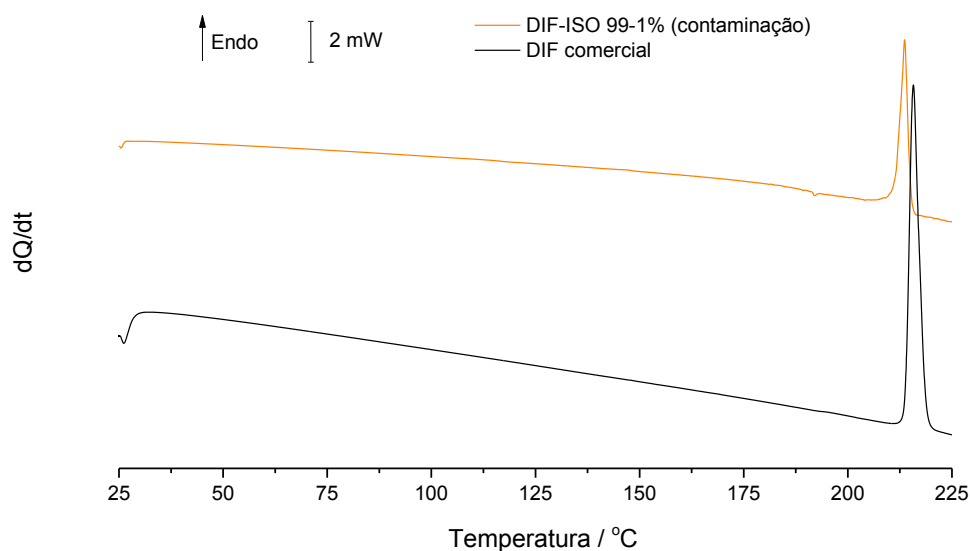


Figura 30 – Curvas de DSC do DIF comercial, forma I e do DIF contaminado com 1% de ISO, DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} = 0.99$ ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).

Os espetros de infravermelho são apresentados na Figura 31. O DIF obtido da solução contaminada com 1% de ISO, DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} 0.99$, apresenta um espetro idêntico ao do DIF forma I.

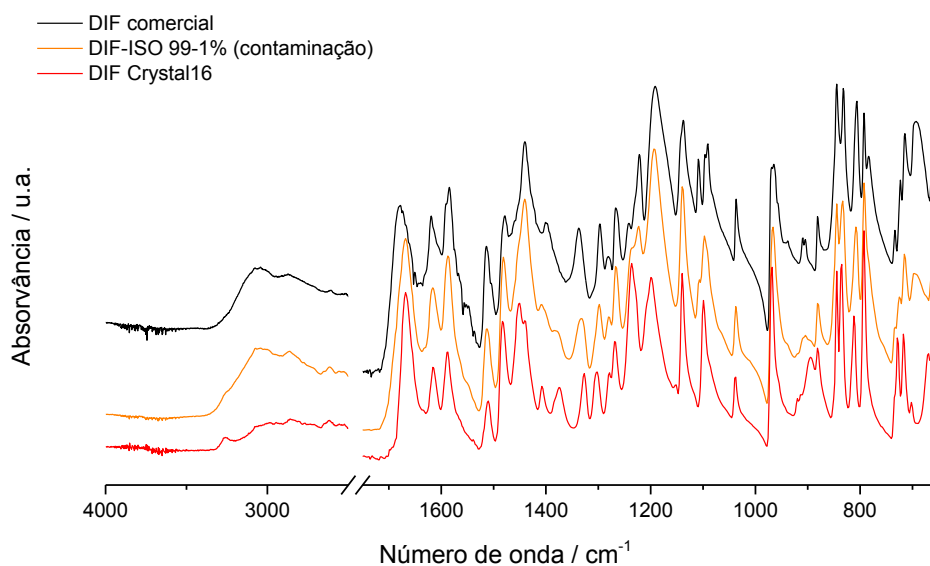


Figura 31 – Espectros de infravermelho do DIF comercial; do DIF contaminado com 1% de ISO, DIF-ISO $Y_{\text{DIF}} = 0.99$, e do DIF Crystal16.

Com os resultados obtidos podemos concluir que esta contaminação origina DIF forma I. Consegue-se assim por contaminação com ISO precipitar a forma I contrariamente ao que é usual em etanol (forma III).

De seguida, procedeu-se à análise de uma nova amostra, “DIF new” ($Y_{\text{DIF}} 0.9$), e submetida a novos ensaios no Crystal16. Desta vez a amostra foi deixada a temperatura constante de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para analisar o sólido precipitado. Ao ser retirada do equipamento foi possível observar que em vez de um sólido, o que estava presente no interior do *vial* era um gel, como mostra a Figura 32.



Figura 32 – Gel do “DIF new”.

Este gel desgelificou rapidamente ao atingir a temperatura de ≈ 4 °C. A boa termoreversibilidade é um comportamento típico dos géis e a sua temperatura de transição gel-sol depende da concentração da amostra (neste caso, da mistura) [97], o que justifica os resultados obtidos para esta amostra em particular. Com os resultados obtidos conseguiu-se esclarecer o ponto experimental que tinha suscitado dúvida na Figura 25, não sendo uma nova forma polimórfica, mas sim, um gel.

Quando este *vial* é mantido à temperatura ambiente, acaba por precipitar um sólido, que se caracterizou através da análise por XRPD, DSC e FTIR-ATR. Para interpretação dos resultados obtidos, utilizaram-se os dados para os compostos puros obtidos após ensaio no Crystal16, DIF e ISO e ainda o co-cristal DIF-ISO Y_{DIF} 0.5. O difratograma de raios-X de pó, Figura 33, mostrou que nestas condições a amostra é constituída pelo co-cristal, sendo visíveis picos de difração do DIF I.

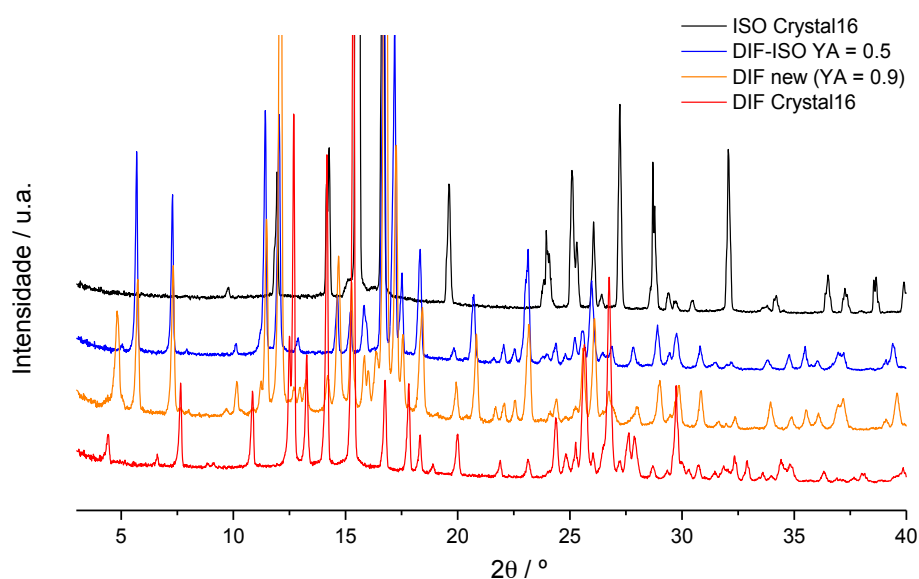


Figura 33 – Difratogramas de XRPD da ISO Crystal16; do DIF-ISO Y_{DIF} = 0.5; de DIF-ISO Y_{DIF} = 0.9, mantido à temperatura ambiente, e do DIF Crystal16.

As curvas de aquecimento por DSC encontram-se na Figura 34. A amostra problema apresenta um perfil de fusão complexo, como seria de esperar, iniciando-se a fusão a $T_{fus} = 146,9$ °C com registo de um outro pico alargado referente à fusão do excesso de DIF.

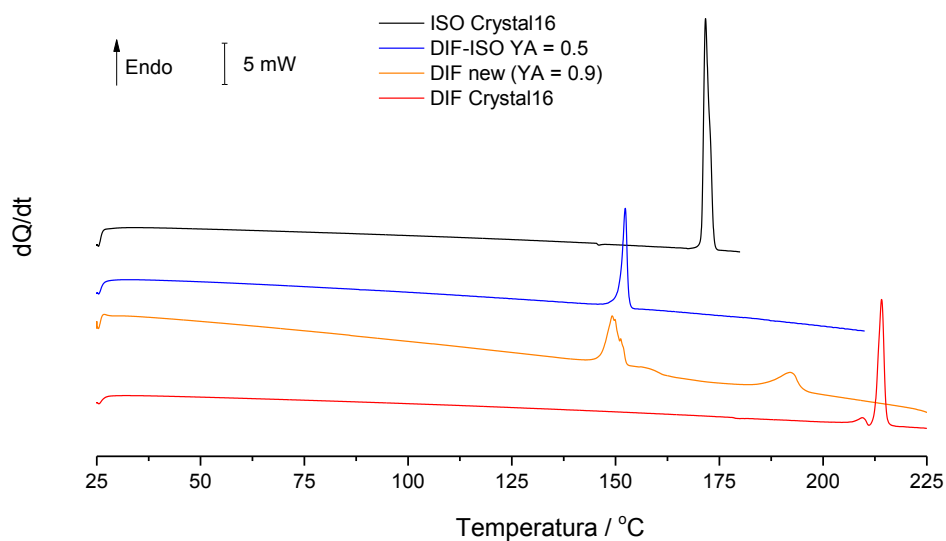


Figura 34 – Curvas de DSC da ISO Crystal16; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$; de DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.9$ mantido à temperatura ambiente, e do DIF Crystal16 ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$).

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 35. É notória a presença do co-cristal na amostra.

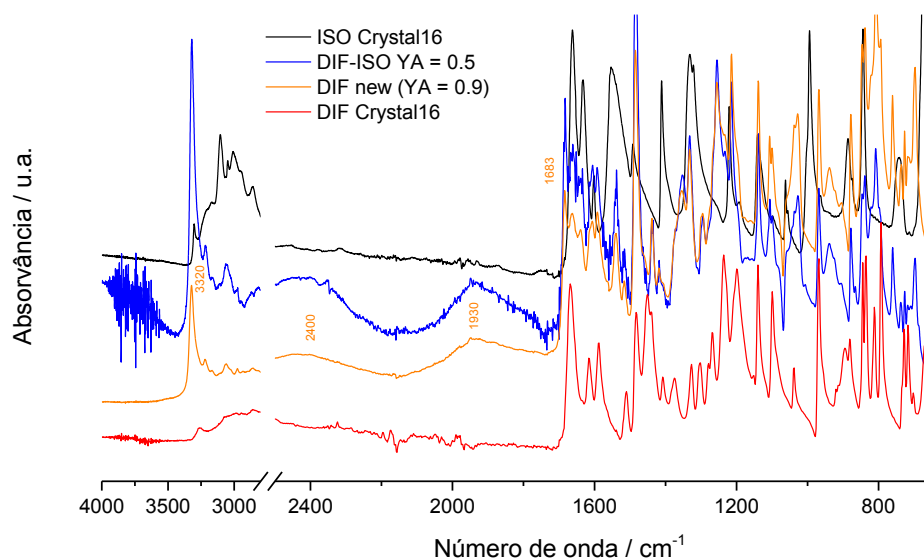


Figura 35 – Espectros de infravermelho da ISO Crystal16; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$; do DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.9$, mantido à temperatura ambiente e de DIF Crystal16.

Com os resultados obtidos, conseguiu-se esclarecer o ponto experimental que tinha suscitado dúvida na Figura 24, não sendo uma nova forma polimórfica, mas sim, um gel.

Para construir o diagrama de fases ternário experimental analisou-se o sobrenadante em equilíbrio com os sólidos que foram identificados na Figura 25, A quantificação de DIF e ISO solubilizados, em equilíbrio com o sólido após 72h à temperatura de 25 °C, foi efetuada através de espectroscopia de ultravioleta (UV).

No sentido de obter curvas de calibração para cada um dos compostos puros, DIF e ISO, foram preparadas soluções-mãe com concentração de 100 mg/L para cada um dos compostos puros, em etanol. A partir de cada uma, foram feitas diluições para 30, 25, 20, 15, 10 e 5 mg/L. Estas soluções foram analisadas por UV, determinando-se o valor da primeira derivada dos espectros aos comprimentos de onda de 245 nm para a ISO e 266 nm para o DIF, como se ilustra na Figura 36.

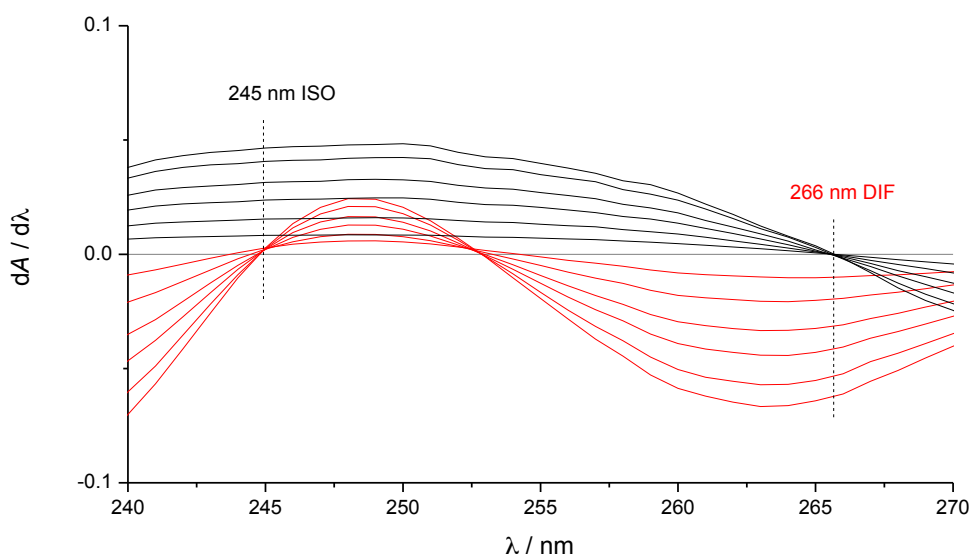


Figura 36 – 1ª derivada dos espectros de ultravioleta de DIF e ISO para diferentes concentrações de soluções em etanol (5, 10, 15, 20, 25 e 30 ppm).

Com os valores de derivada registados aos comprimentos de onde selecionados, foi traçada a curva de calibração para cada composto, Figura 37.

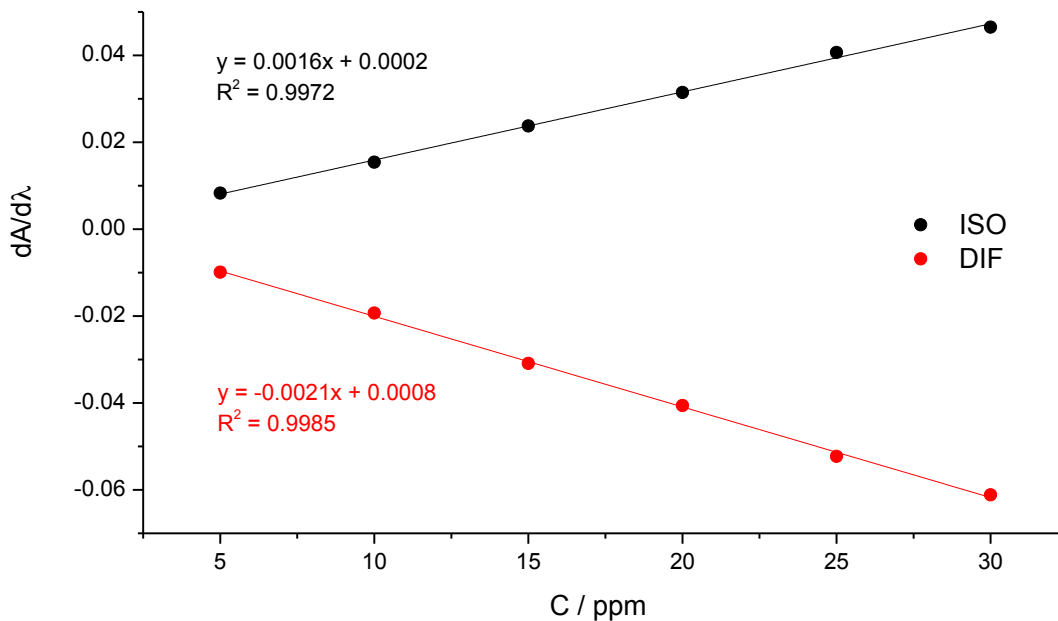


Figura 37 – Retas de calibração obtidas para ISO e DIF por espectroscopia de ultravioleta (UV).

De seguida foram feitas misturas das soluções diluídas. Juntaram-se as soluções de concentrações de 10-10, 20-20, 30-30, 10-30 e 30-10 mg/L de DIF-ISO (0,5 mL de cada solução) e foi feita a análise por UV. A leitura dos valores de derivada da absorbância aos comprimentos de onda indicados serviu para validar este método de quantificação por espectroscopia derivativa [98].

Depois disto, foram analisados por UV cada um dos sobrenadantes presentes nos *vials* do sistema DIF-ISO. Retiraram-se 0,5 mL do sobrenadante e colocaram-se num balão de 50 mL, perfazendo o resto do volume com etanol. De seguida, foram retirados 0,5 mL desta solução para um balão de 10 mL, perfazendo o volume com etanol. Desta última mistura foi feita a análise por UV.

Obtido o espectro de UV para cada uma das misturas estudadas para este sistema, foram lidos os valores de derivada da absorbância. Com eles, temos acesso às concentrações de partida. Assim conseguimos obter as frações molares de cada um dos compostos, que estão representadas no diagrama de fases ternário (DIF + ISO + etanol), que se apresenta na Figura 38 e ampliado na Figura 39.

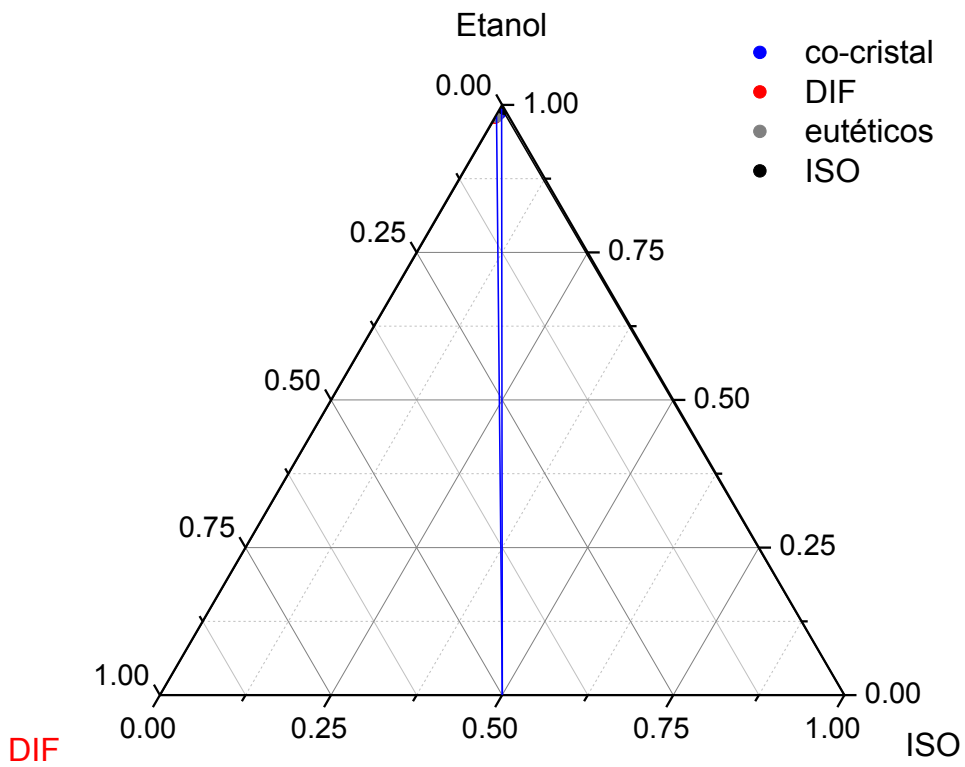


Figura 38 – Diagrama de fases ternário a 25 °C (DIF+ISO+etanol)

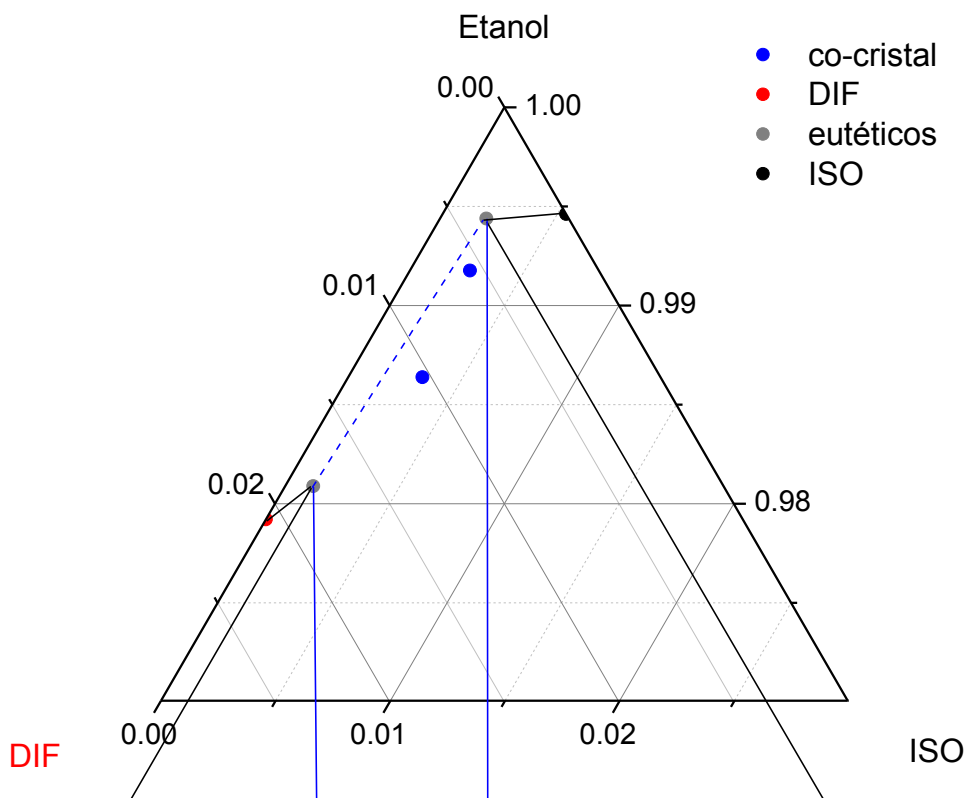


Figura 39 – Diagrama de fases ternário a 25 °C (DIF+ISO+etanol) com zoom na zona de interesse.

O diagrama experimental mostra que entre as duas linhas azuis apresentadas na Figura 39, é possível obter co-cristal DIF-ISO puro.

3.2.1.2 Síntese de co-cristal por *slurry* em etanol

Outra via de obtenção de co-cristais é pelo método de *slurry*. É formada uma suspensão através da adição de uma pequena quantidade de solvente à mistura do API e do co-formador sólidos. A técnica de *slurry* tem muitas vantagens no contexto farmacêutico uma vez que se conseguem normalmente produtos termodinamicamente estáveis [21, 22].

Neste sistema foram usados 32,54 mg de DIF e 17,83 mg de ISO, proporção estequiométrica (1:1). Foram adicionados 200 μ L de etanol, sendo o *slurry* deixado em agitação durante 72 h. Foi feita a análise por XRPD, DSC e FTIR-ATR, e para comparação dos resultados obtidos, utilizou-se o co-cristal DIF-ISO Y_{DIF} 0.5 obtido por precipitação.

O difratograma de raios-X de pó,

Figura 40, mostrou que o sólido obtido por *slurry* da mistura DIF-ISO corresponde exatamente ao difratograma do co-cristal DIF-ISO Y_{DIF} 0.5 obtido por precipitação.

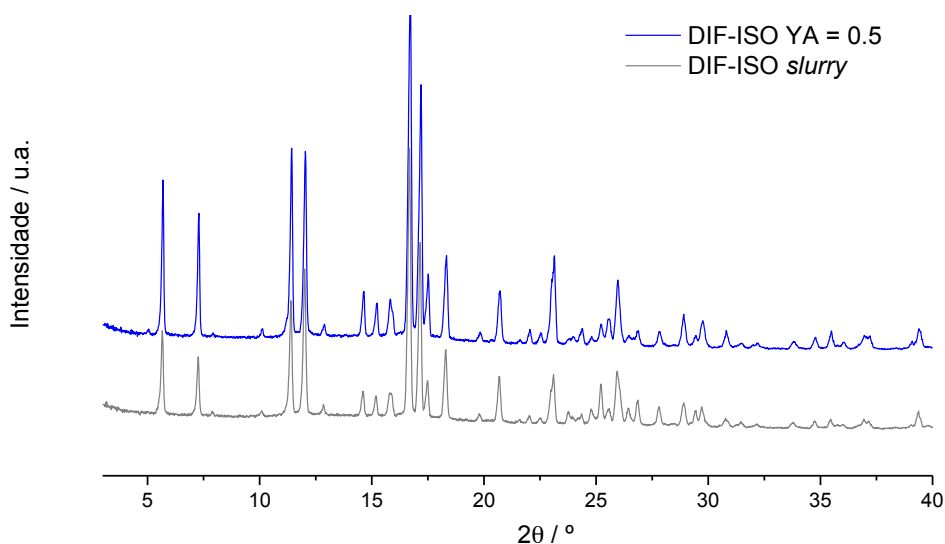


Figura 40 – Difratogramas de XRPD da mistura (co-cristal) DIF-ISO Y_{DIF} = 0.5 e do sólido obtido pelo método de *slurry* em etanol.

Quanto às curvas de aquecimento por DSC, encontram-se na Figura 41. O co-cristal obtido por *slurry* DIF-ISO em etanol apresenta uma temperatura de fusão de $T_{fus} = 151,1 \text{ }^\circ\text{C}$ e uma entalpia de fusão de $\Delta_{fus}H = 53,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Estes são valores idênticos aos conseguidos para o co-cristal obtido por precipitação ($T_{fus} = 151,1 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta_{fus}H = 52,3 \text{ kJ mol}^{-1}$).

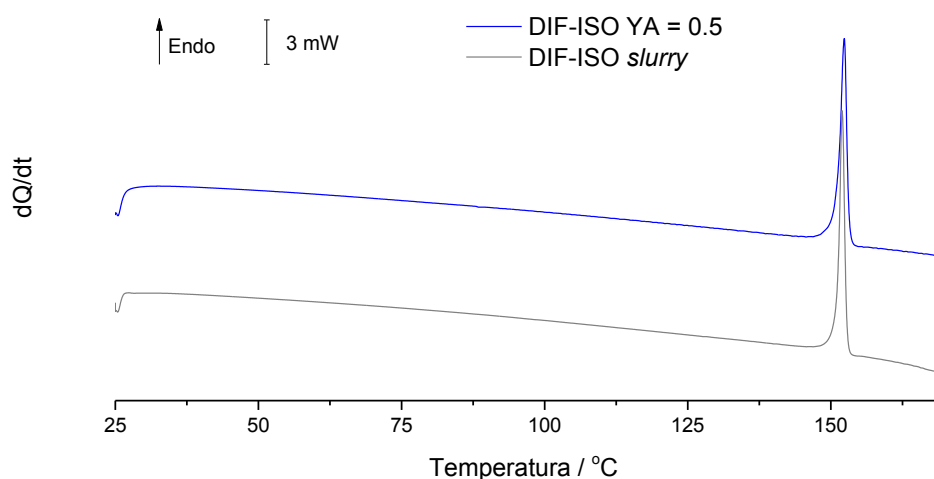


Figura 41 – Curvas de DSC da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido pelo método de *slurry* em etanol ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 42. A amostra obtida por *slurry* DIF-ISO apresenta um espectro que corresponde exatamente ao espectro do co-cristal obtido por precipitação, como se esperaria.

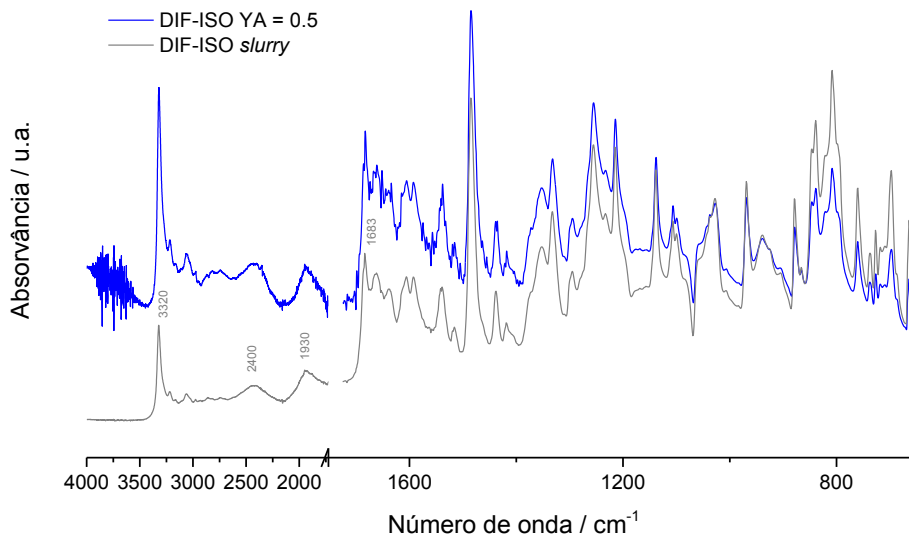


Figura 42 – Espetros de infravermelho da mistura (co-cristal) DIF-ISO $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido pelo método de *slurry* em etanol.

Através da análise dos resultados obtidos podemos concluir que a obtenção de co-cristais pelo método de *slurry* é altamente viável e facilmente exequível.

3.2.2 Diflunisal-Lamotrigina

3.2.2.1 Síntese de sal por precipitação em etanol

Tal como para o primeiro sistema investigado, também foram realizados estudos de solubilidade da lamotrigina em etanol, usando o equipamento Crystal16, tendo-se obtido valores de temperaturas de dissolução e de precipitação para soluções deste composto de diferentes concentrações. Os valores experimentais de solubilidade foram ajustados à equação de van't Hoff, Equação (1), Figura 43 e na Tabela 5.

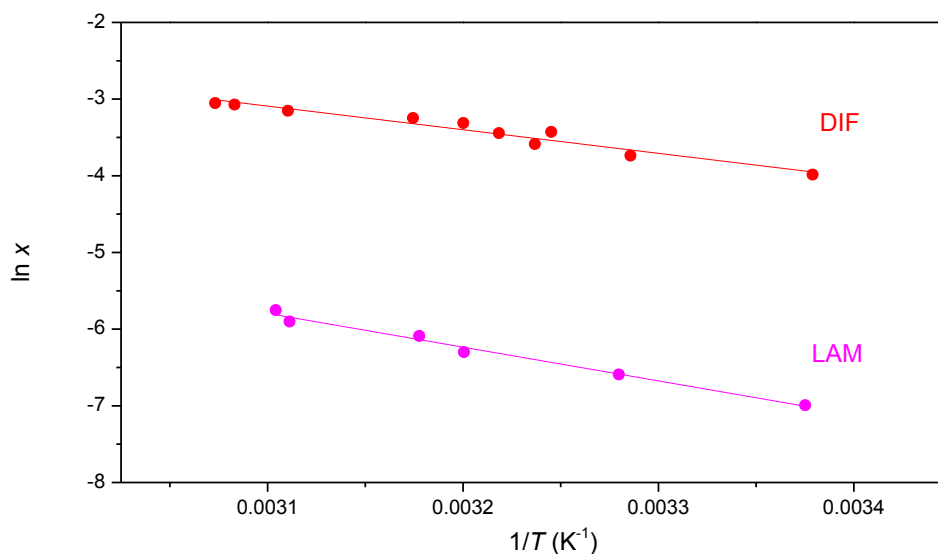


Figura 43 – Gráfico da equação de van't Hoff de DIF e de LAM em etanol.

Tabela 5 – Parâmetros de ajuste à Equação (1) dos dados experimentais obtidos na determinação das temperaturas de saturação, com o equipamento Crystal 6, para diflunisal e lamotrigina em etanol.

	$-(\Delta H/R) / K$	$\Delta H/(RT_0)$	Coefficiente de correlação
Diflunisal	3079 ± 252	$6,45 \pm 0,81$	0,943
Lamotrigina	4400 ± 248	$7,84 \pm 0,80$	0,984

Usando a equação de van't Hoff, Equação (1), com os parâmetros da Tabela 5, obteve-se o valor da solubilidade dos compostos puros à temperatura de referência de 50 °C. Utilizando a metodologia descrita na secção 2.2.1, foram achadas as concentrações teóricas para preparação das soluções para traçado dos diagramas de fases pseudobinários e ternários, como foi feito para o primeiro sistema investigado, Tabela 6.

Tabela 6 – Valores calculados para a preparação das soluções da mistura DIF-LAM com diferentes Y_{DIF} .

Y_{DIF}	X_{DIF}	X_{LAM}	n_{DIF}	n_{LAM}	$C_{DIF} / \text{mg mL}^{-1}$	$C_{LAM} / \text{mg mL}^{-1}$
1,0	0,04621	0,00000	8,30E-04	0,00E+00	207,64	0,00
0,9	0,01746	0,00194	3,05E-04	3,39E-05	76,29	8,68
0,8	0,00982	0,00245	1,70E-04	4,26E-05	42,61	10,90
0,7	0,00628	0,00269	1,09E-04	4,66E-05	27,18	11,92
0,6	0,00425	0,00283	7,33E-05	4,88E-05	18,33	12,51
0,5	0,00292	0,00292	5,03E-05	5,03E-05	12,59	12,89
0,4	0,00199	0,00298	3,42E-05	5,14E-05	8,57	13,15
0,3	0,00130	0,00303	2,23E-05	5,21E-05	5,59	13,35
0,2	0,00077	0,00307	1,32E-05	5,27E-05	3,30	13,50
0,1	0,00034	0,00309	5,91E-06	5,32E-05	1,48	13,62
0,0	0,00000	0,00312	0,00E+00	5,36E-05	0,00	13,72

Fez-se a preparação das soluções e procedeu-se ao estudo de solubilidade, em etanol, através do equipamento Crystal16. O gráfico das temperaturas de saturação de cada uma das misturas está representado na Figura 44.

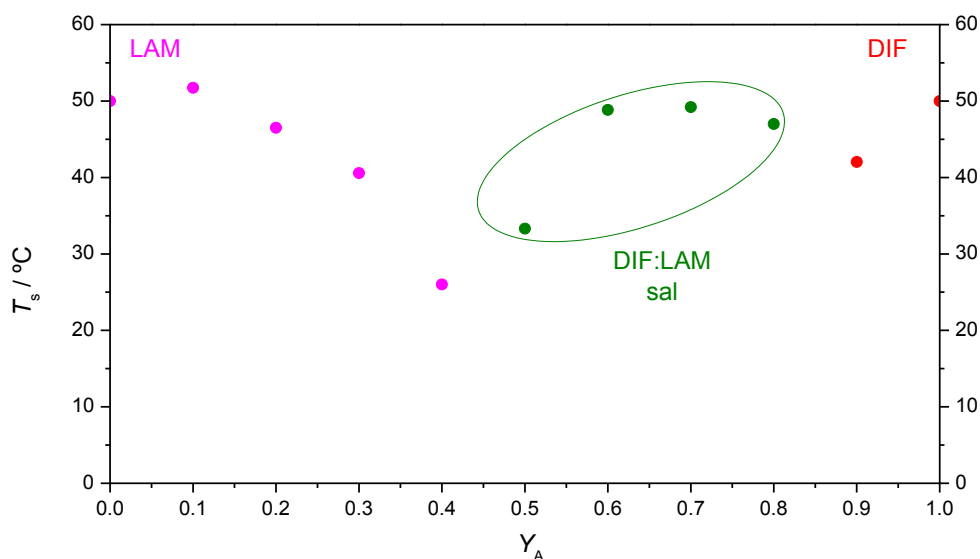


Figura 44 – Gráfico da temperatura de saturação em função da fração molar, do sistema DIF-LAM, a partir dos dados obtidos no Crystal16.

Após recolha destes dados, as amostras permaneceram 72h a 25 °C, e após centrifugação, os sólidos foram analisados por XRPD, Figura 45.

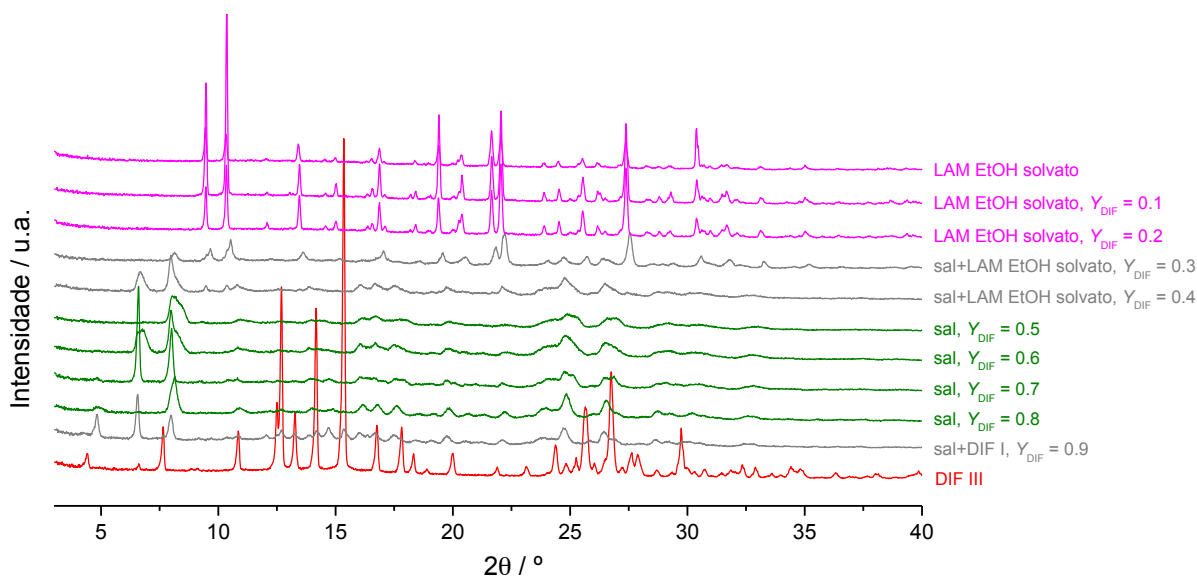


Figura 45 – Difratomogramas de raios-X de pó das fases sólidas em equilíbrio, para as misturas preparadas com diferentes valores de Y_{DIF} .

A Figura 46, evidencia um novo sólido, não muito cristalino, formado por precipitação, dado que o seu difratograma é diferente dos compostos de partida.

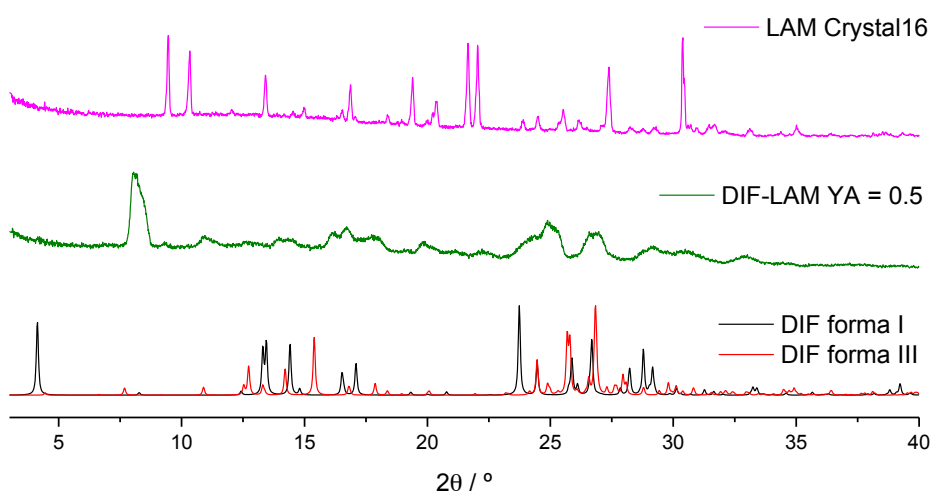


Figura 46 – Difratomogramas de raios-X de pó de LAM precipitada no Crystal16; DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ e difratogramas simulados para as formas I e III do DIF.

Assim como no sistema anterior, selecionou-se a proporção de mistura de 1:1, $Y_{\text{DIF}} = 0.5$, e comparou-se com a mistura DIF-LAM 1:1 obtida por NG, e sujeita a tratamento adicional de aquecimento e arrefecimento, como reportado em trabalho anterior realizado no mesmo laboratório [90]. Procedeu-se à caracterização da amostra através da análise por XRPD, DSC, FTIR-ATR, PLTM e TG.

O difratograma de raios-X de pó, Figura 47, mostrou que o sólido precipitado DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ tem algumas semelhanças com o difratogramas do sólido DIF-LAM 1:1 obtido por NG. De acordo com a informação obtida por DSC, Figura 48, observando-se transições entre 110-130 °C, resolveu-se investigar uma amostra sujeita ao programa de temperatura 25 °C → 170 °C → 25 °C. Verifica-se que os difratogramas das amostras aquecidas/arrefecidas (DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ Aq. 170 °C e DIF-LAM 1:1 NG Aq. 200 °C) são idênticos, *i.e.*, o processo de aquecimento é fundamental para a formação de um novo sólido. Évora *et al.* tinham provado que este sólido resultante do aquecimento é um sal [90].

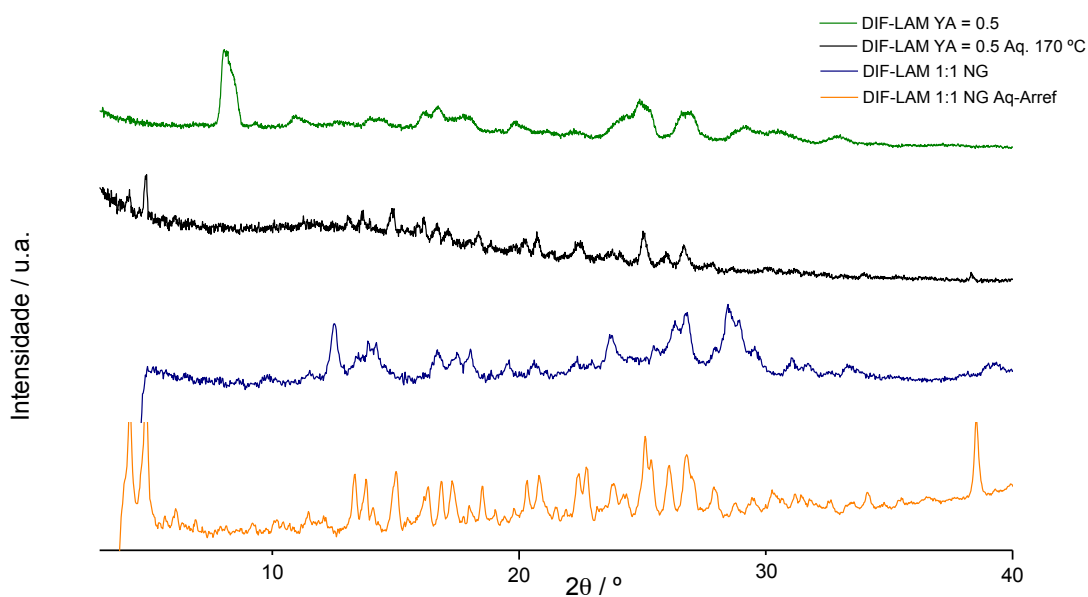


Figura 47 – Difratogramas de XRPD da mistura DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$; da mesma mistura, mas aquecida até 170 °C; do sólido obtido por NG e desta mesma mistura, mas submetida a um ciclo de aquecimento/arrefecimento até 200 °C.

As curvas de aquecimento por DSC encontram-se na Figura 48. A curva 1 apresenta o aquecimento do sólido DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} 0.5$. Nesta curva verifica-se um evento endotérmico a $109\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de um evento exotérmico a $128\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a fusão a $T_{\text{fus}} = 228,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H = 45,7\text{ kJ mol}^{-1}$. Na curva 2 o mesmo sólido, foi submetido a aquecimento até $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ e arrefecido até temperatura ambiente. O evento endotérmico e exotérmico anteriormente registado, apresenta-se muito ténue. A curva 2 mostra ainda o segundo aquecimento até à fusão desta amostra, observando-se apenas a fusão, $T_{\text{fus}} = 227,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H = 49,0\text{ kJ mol}^{-1}$. Na curva 3 o sólido obtido por moagem apresenta um evento exotérmico a $117\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a fusão a $T_{\text{fus}} = 225,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A curva 4 mostra o segundo aquecimento, do sólido obtido por moagem, mas previamente aquecido até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este sólido apresenta apenas a fusão a $T_{\text{fus}} = 225,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os valores de fusão de todas as curvas são bastante próximos indicando que se trata do mesmo sal, embora mais uma vez o sólido obtido por precipitação e aquecido até $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ e arrefecido à temperatura ambiente (curva 2) se apresente com uma fusão a temperatura ligeiramente superior e uma curva com um perfil de fusão bastante estreito, podendo assim indicar uma melhor cristalinidade.

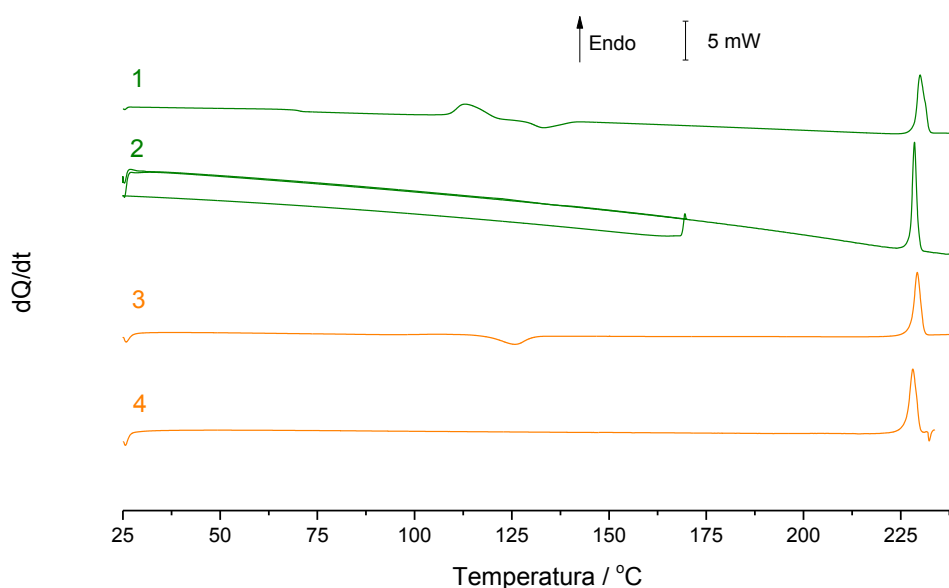


Figura 48 – Curvas de DSC da mistura DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$. 1. Aquecimento até $240\text{ }^{\circ}\text{C}$. 2. Aquecimento até $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, arrefecimento subsequente até temperatura ambiente e aquecimento até à fusão. 3. Amostra obtida por moagem, aquecida até $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. 4. Amostra obtida por moagem, aquecida até à fusão, depois de ter sido aquecida até $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ e arrefecida até temperatura ambiente ($\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C/min.}$).

Na Figura 49 pode-se verificar que o sólido obtido por precipitação DIF-LAM Y_{DIF} 0.5 após aquecimento até 170 °C apresenta as bandas típicas de alongação do carboxilato, a 1374 e 1650 cm^{-1} , que correspondem à alongação simétrica, (que para iões carboxilato pode encontrar-se entre 1360 e 1450 cm^{-1}), e à alongação assimétrica, (que varia entre 1540 e 1650 cm^{-1}), confirmando assim a presença de um sal. Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [58, 86, 91, 96, 99].

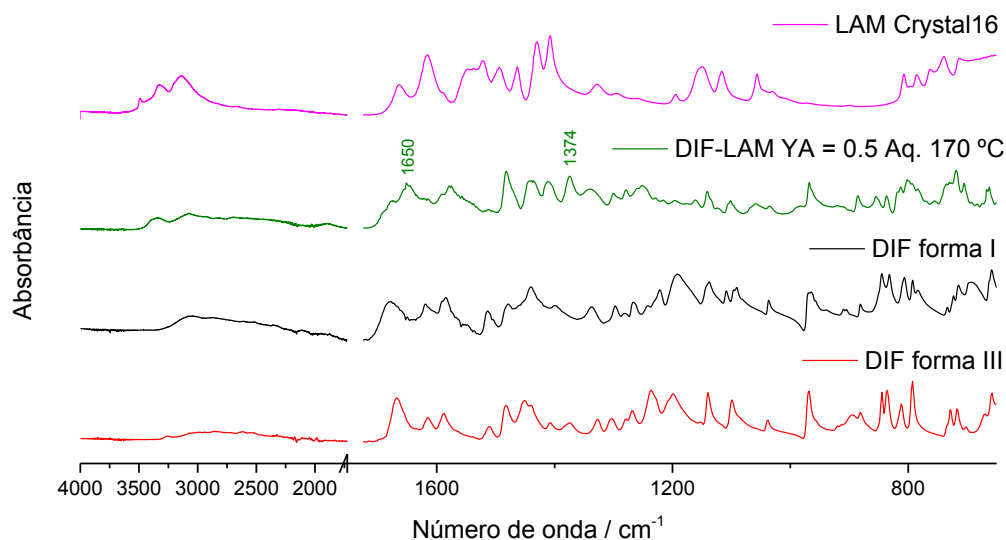


Figura 49 – Espectros de infravermelho da LAM Crystal16; do sólido DIF-LAM Y_{DIF} = 0.5 Aq. 170 °C; do DIF comercial, forma I; e do DIF Crystal16, forma III.

Foi realizada um ensaio de termomicroscopia de luz polarizada (PLTM), Figura 50, para observar o comportamento térmico do sal DIF-LAM Y_{DIF} 0.5 durante o aquecimento. Verificou-se que a amostra escureceu por volta das temperaturas de transição registadas na curva de DSC (110-130 °C) e que funde à temperatura esperada para o sal, de 228 °C.

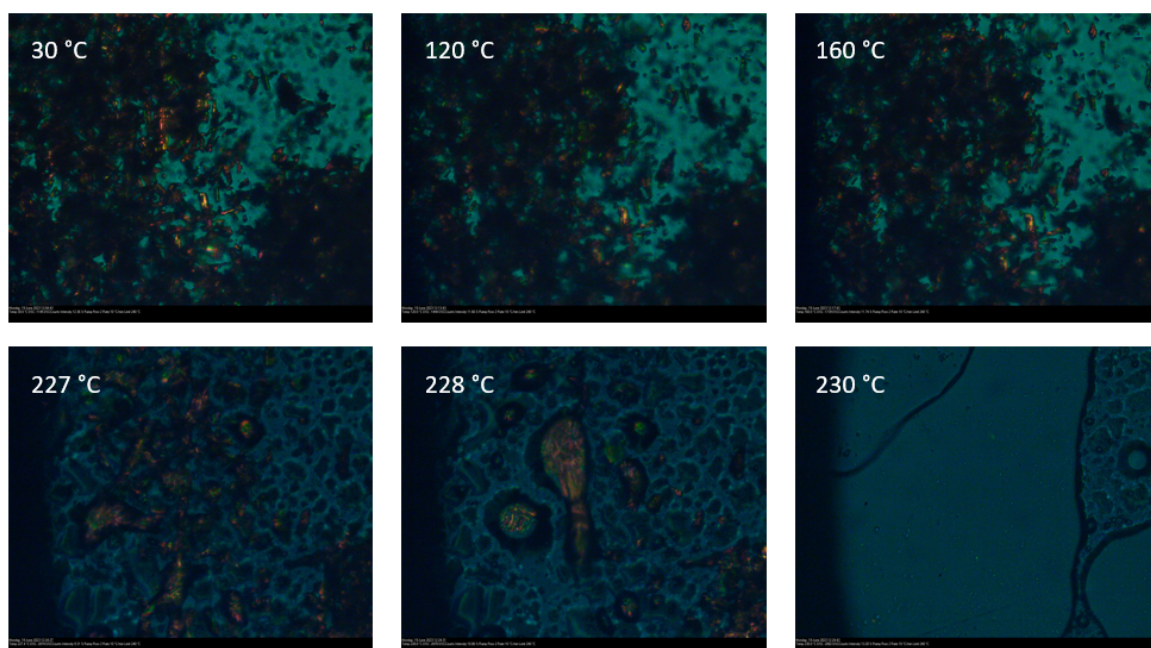


Figura 50 – Imagens de PLTM recolhidas no aquecimento da amostra de sal DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ obtida por cristalização em etanol; $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min}$, ampliação $200\times$.

Foi também realizada uma análise termogravimétrica (TGA) com a finalidade de averiguar a existência de perda de solvente associada às transições registadas por DSC na curva 2, Figura 51. Pode-se observar que não existe qualquer perda de massa associada às temperaturas de transição, podendo assim concluir-se que não se trata de um solvato. Por outro lado, verifica-se que o sal se degrada durante a fusão.

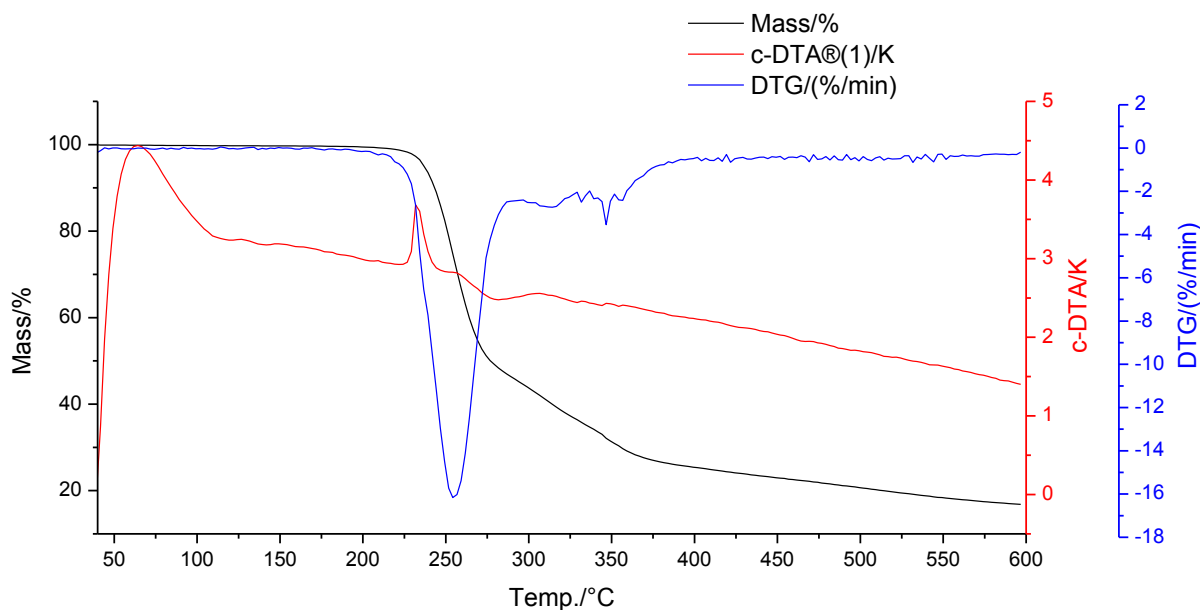


Figura 51 – TGA da amostra do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$.

Após a análise dos resultados podemos concluir que se conseguiu formar o sal por precipitação, e que, por ciclo de aquecimento/arrefecimento até 170 °C, se obtém um polimorfo do sal de partida.

Foi observado na Figura 45, que o difratograma da amostra DIF-LAM $Y_{DIF} 0.9$, apesar de ter 90% de DIF não apresentava as difrações esperadas relativas ao DIF forma III, mas sim da forma I. Assim, foi efetuada a contaminação de DIF com 1% de LAM para testar a possível indução da cristalização da forma polimórfica I do DIF em etanol na presença de LAM. O procedimento foi realizado utilizando o equipamento Crystal 6.

O difratograma de raios-X de pó, Figura 52 mostrou que esta amostra apresenta um difratograma idêntico ao da forma I [58].

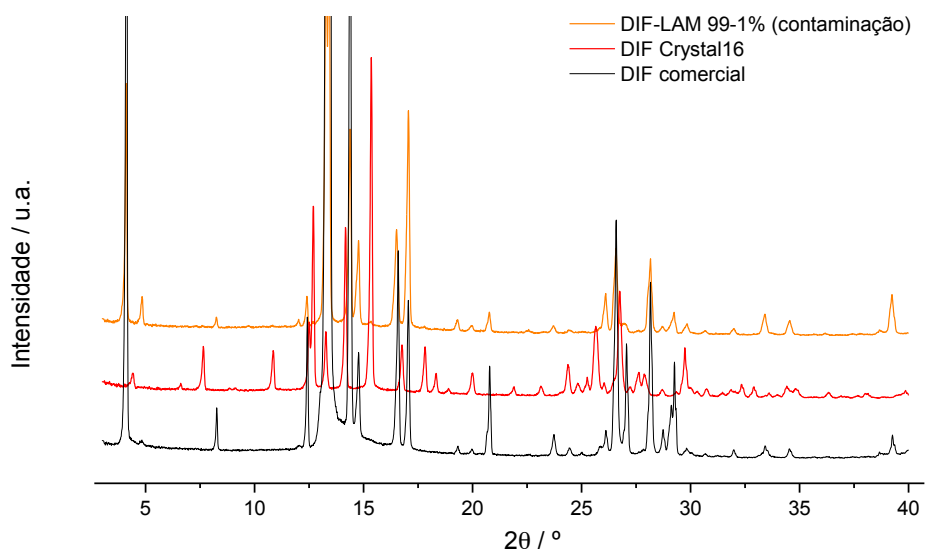


Figura 52 – Difratoogramas de XRPD do DIF contaminado com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.99$; do DIF Crystal16, forma III, e do DIF comercial, forma I.

As curvas de aquecimento por DSC encontram-se na Figura 53. A amostra de DIF contaminada com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} 0.99$, não evidencia qualquer transição no aquecimento, verificando-se apenas a fusão, $T_{\text{fus}} = 211,7 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H = 40.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este comportamento está de acordo com o evidenciado pela forma I ($T_{\text{fus}} = 213,9 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta_{\text{fus}}H = 37,2 \text{ kJ mol}^{-1}$).

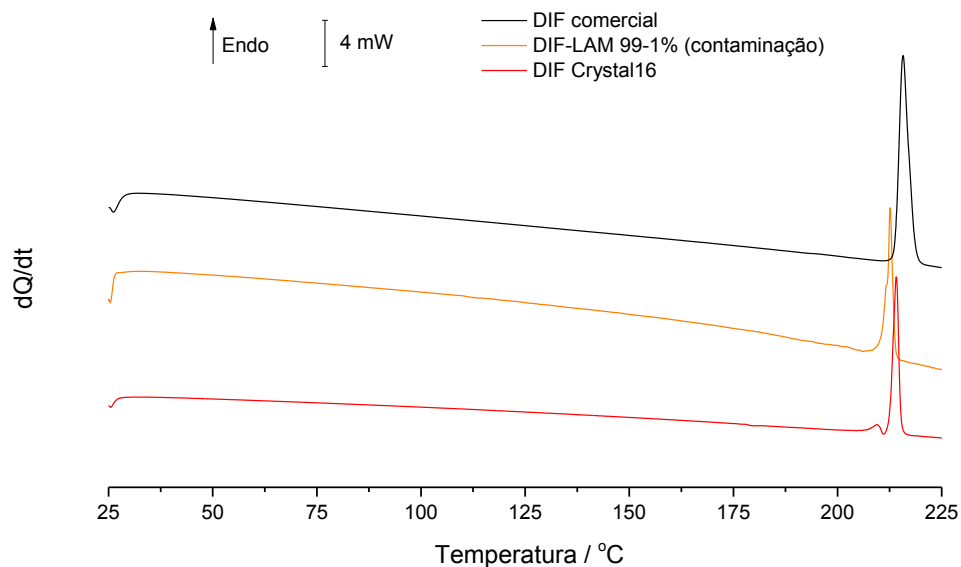


Figura 53 – Curvas de DSC do DIF comercial; do DIF contaminado com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.99$, e do DIF Crystal16 ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C/min.}$).

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 54. A amostra de DIF contaminada com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{DIF} 0.99$, apresenta um espectro de infravermelho semelhante ao do DIF comercial (forma I), embora seja evidente alguma contaminação de etanol nesta amostra.

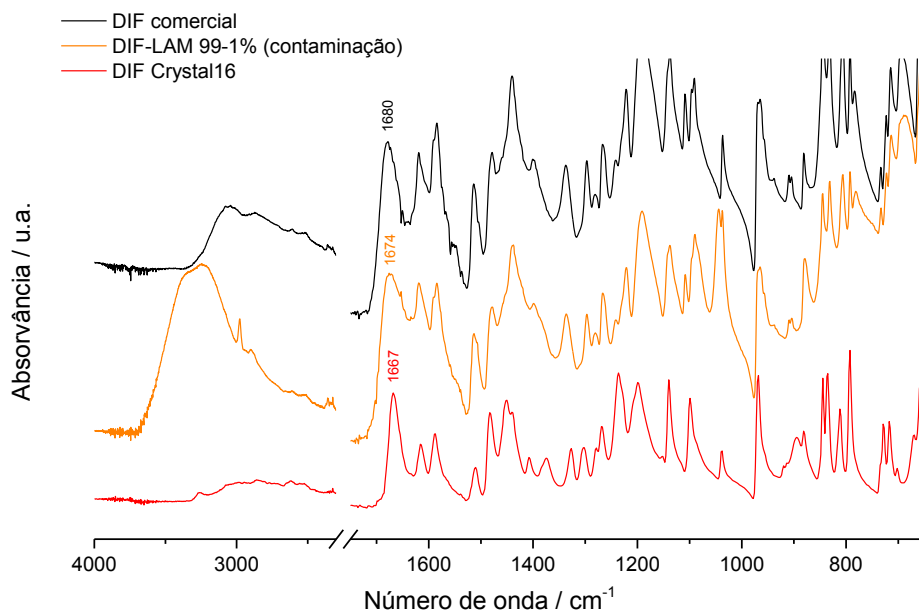


Figura 54 – Espectros de infravermelho do DIF comercial; da DIF contaminado com 1% de LAM, DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.99$, e do DIF obtido por cristalização no Crystal16.

Com os resultados obtidos podemos concluir que este estudo confirma que a presença de LAM induz o aparecimento da forma I do DIF por precipitação em etanol, *i.e.* consegue-se controlar a forma polimórfica precipitada de uma forma muito mais simples e verde relativamente à descrita por Martínez-Ohárriz *et al.* que utilizam solventes como o tetracloreto de carbono e clorofórmio para conseguir obter a forma I por precipitação [58].

Foram também realizados ensaios de transposição de escala para massas 4 vezes superiores às usadas nos ensaios anteriores. Utilizaram-se 50,44 mg de DIF e 51,57 mg de LAM em proporção equimolar (1:1). A mistura em etanol foi aquecida até 60 °C durante 30 min, com agitação (600 rpm). Depois foi deixada a arrefecer até temperatura ambiente e colocada em repouso durante 72 h. Foi obtido sólido com rendimento de 35 %. A caracterização foi feita por XRPD, DSC e FTIR-ATR, e para interpretação dos resultados, utilizou-se o sólido DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} 0.5$ e o sal obtido por aquecimento a 170 °C.

O difratograma de raios-X de pó, Figura 55, mostrou que a transposição de escala origina diretamente o sal sem necessidade de aquecimento a temperaturas tão elevadas, dado que o seu difratograma se apresenta idêntico ao sal obtido por aquecimento, tendo-se mostrado ainda mais cristalino.

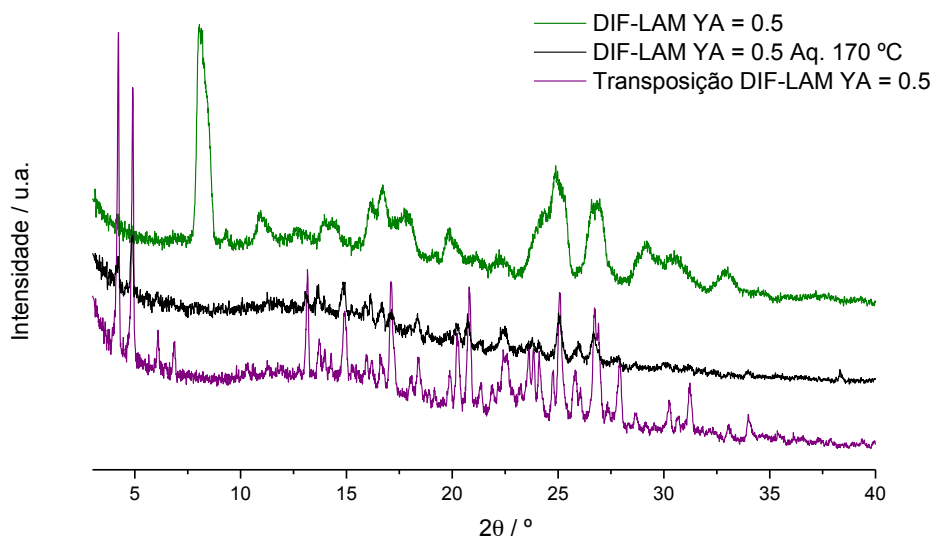


Figura 55 – Difratoigramas de XRPD do DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$; do sal obtido por aquecimento a 170 °C; e do sólido obtido por transposição de escala.

As curvas de aquecimento por DSC, Figura 56, e os espectros de infravermelho, Figura 57, estão de acordo com o que é esperado.

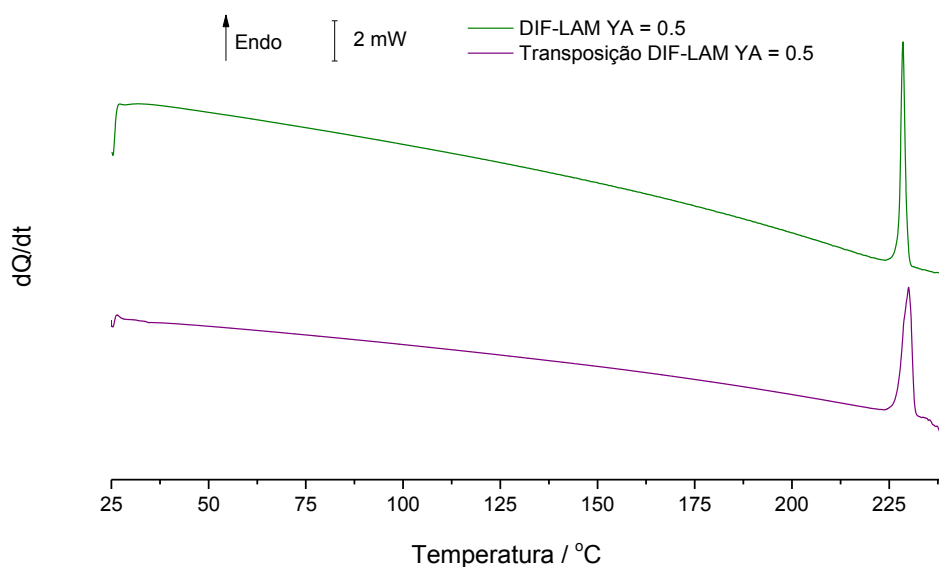


Figura 56 – Curvas de DSC do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ (submetido a aquecimento até 170 °C e arrefecimento subsequente até temperatura ambiente) e do sólido obtido por transposição de escala ($\beta = 10$ °C/min.).

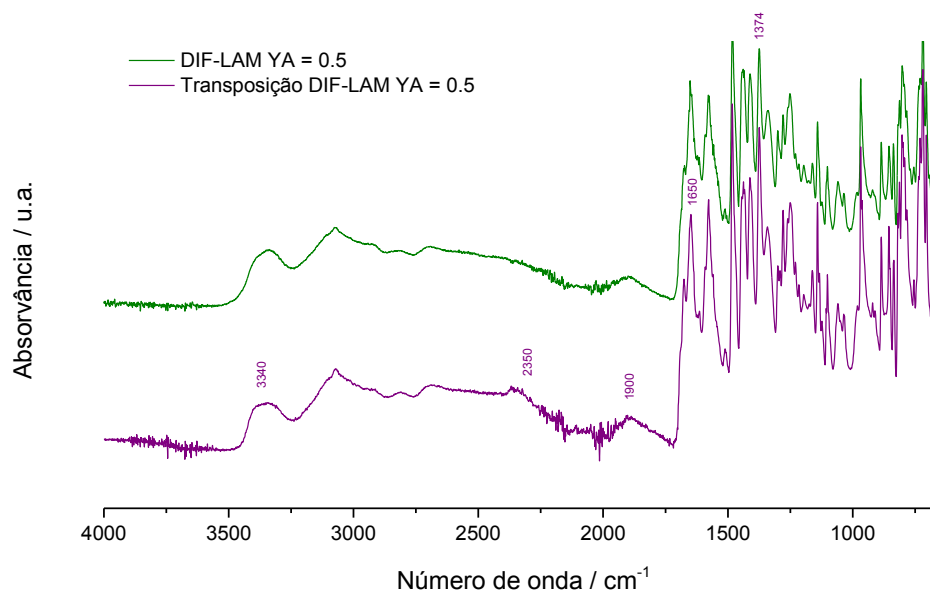


Figura 57 – Espectros de infravermelho da mistura sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ e do sólido obtido por transposição de escala.

Para construir o diagrama de fases ternário experimental analisou-se o sobrenadante em equilíbrio com os sólidos que foram identificados na Figura 45. A quantificação do DIF e da LAM solubilizados, em equilíbrio com o sólido após 72h à temperatura de 25 °C, foi efetuada através de espectroscopia de ultravioleta (UV).

Foi preparada uma solução-mãe com concentração de 100 mg/L para cada um dos compostos puros, DIF e LAM em etanol. A partir de cada uma, foram feitas diluições para 30, 25, 20, 15, 10 e 5 mg/L em etanol. Estas diluições foram analisadas por UV, conseguindo-se na segunda derivada dos espectros (com ajuste polinomial de 2ª ordem a cada 5 pontos, Savitzky-Golay [100]) a resolução dos picos aos comprimentos de onda de 252 nm para o DIF e 277 nm para a LAM como se ilustra na Figura 58.

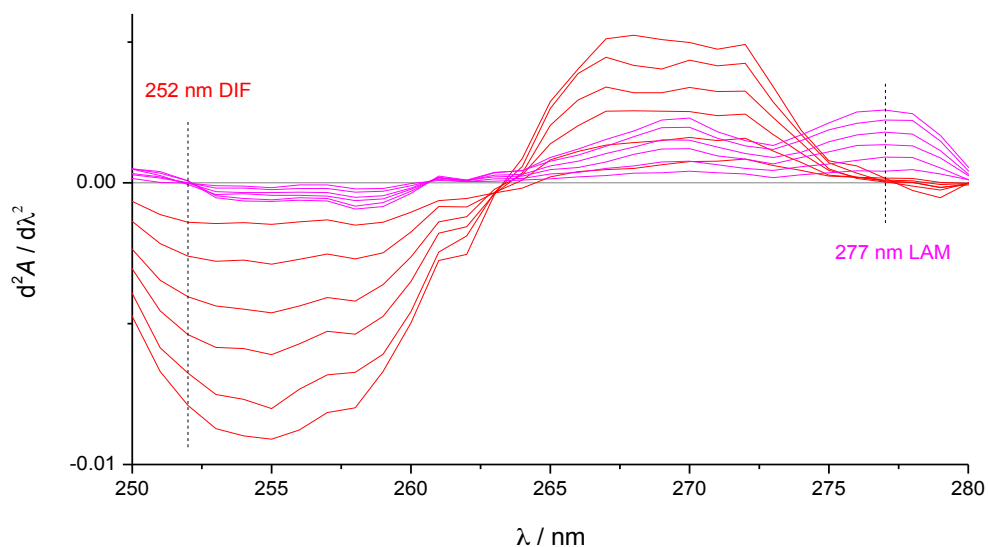


Figura 58 – 2ª derivada da espectroscopia de ultravioleta (com ajuste polinomial de 2ª ordem a cada 5 pontos, Savitzky-Golay) das diferentes concentrações de DIF e LAM (5, 10, 15, 20, 25 e 30 ppm).

A determinação das 2^{as} derivadas dos espectros dos padrões, nos comprimentos de onda indicados, permitiu traçar a curva de calibração para cada composto, como se mostra na Figura 59.

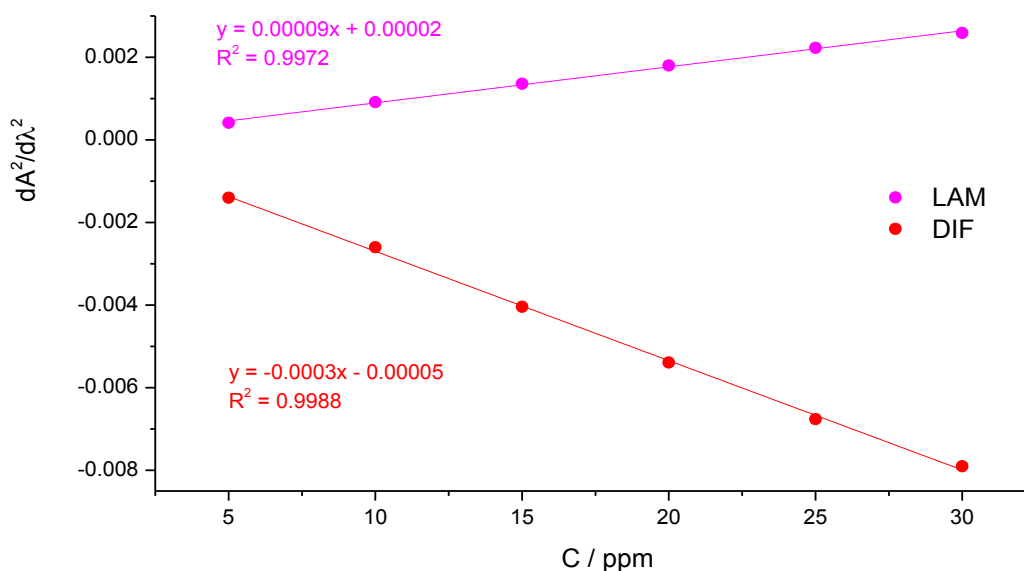


Figura 59 – Retas de calibração de LAM e de DIF obtidas por espectroscopia de ultravioleta (UV).

De seguida foram feitas misturas das soluções diluídas. Juntaram-se as concentrações de 10-10, 20-20, 30-30, 10-30 e 30-10 mg/L de DIF-LAM (0,5 mL de cada solução) e foi feita a análise por UV. Foi obtida a 2ª derivada com ajuste polinomial de 2ª ordem a cada 5 pontos, e lidos os valores nos comprimentos de onda 252 nm para o DIF e 277 nm para a LAM. Estes valores serviram então para validar o método através da quantificação por espectroscopia derivativa [98].

Assim como no sistema anterior, depois disto, foram analisados por UV cada um dos sobrenadantes presentes nos *vials* do sistema DIF-LAM. Retiraram-se 0,5 mL do sobrenadante e colocaram-se num balão de 50 mL, perfazendo o resto do volume com etanol. De seguida, foram retirados 2 mL desta solução diluída para um balão de 10 mL, perfazendo o resto do volume com etanol. Desta última mistura foi feita a análise por UV.

Usando as retas de calibração mostradas na Figura 59, obtiveram-se os valores das concentrações de partida e foram calculadas as frações molares de cada um dos compostos, que foram utilizadas para o desenho do diagrama de fases ternário (DIF, LAM e etanol), que se apresenta na Figura 60 e na Figura 61.

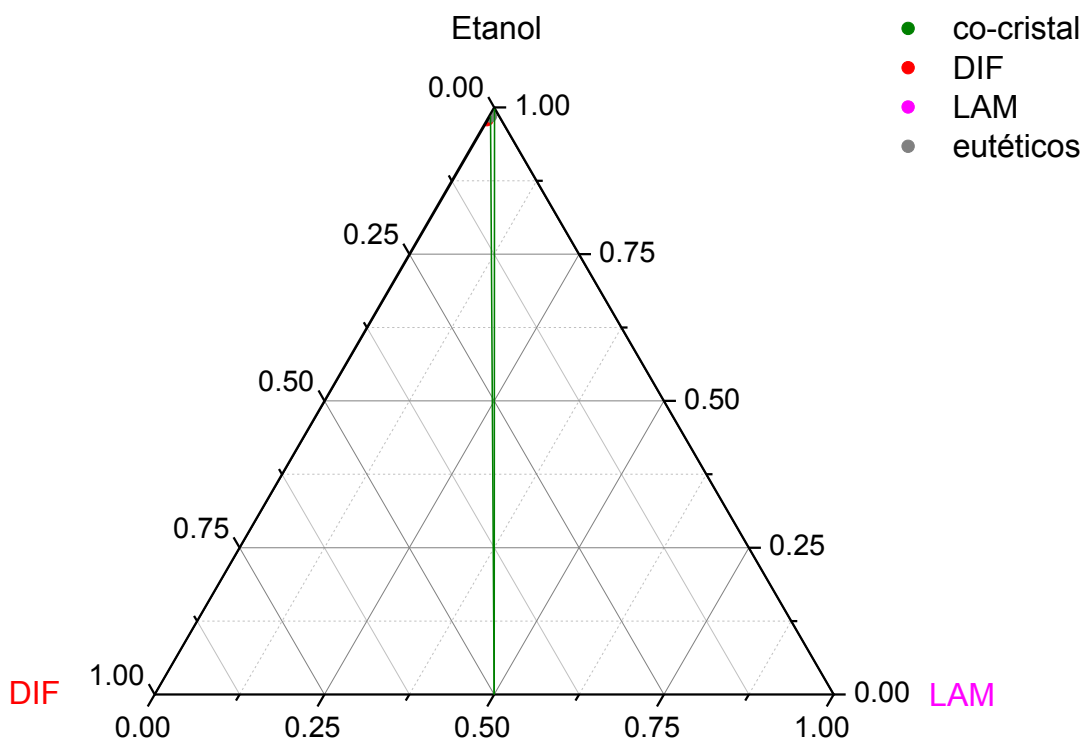


Figura 60 – Diagrama de fases ternário a 25 °C (DIF+LAM+etanol).

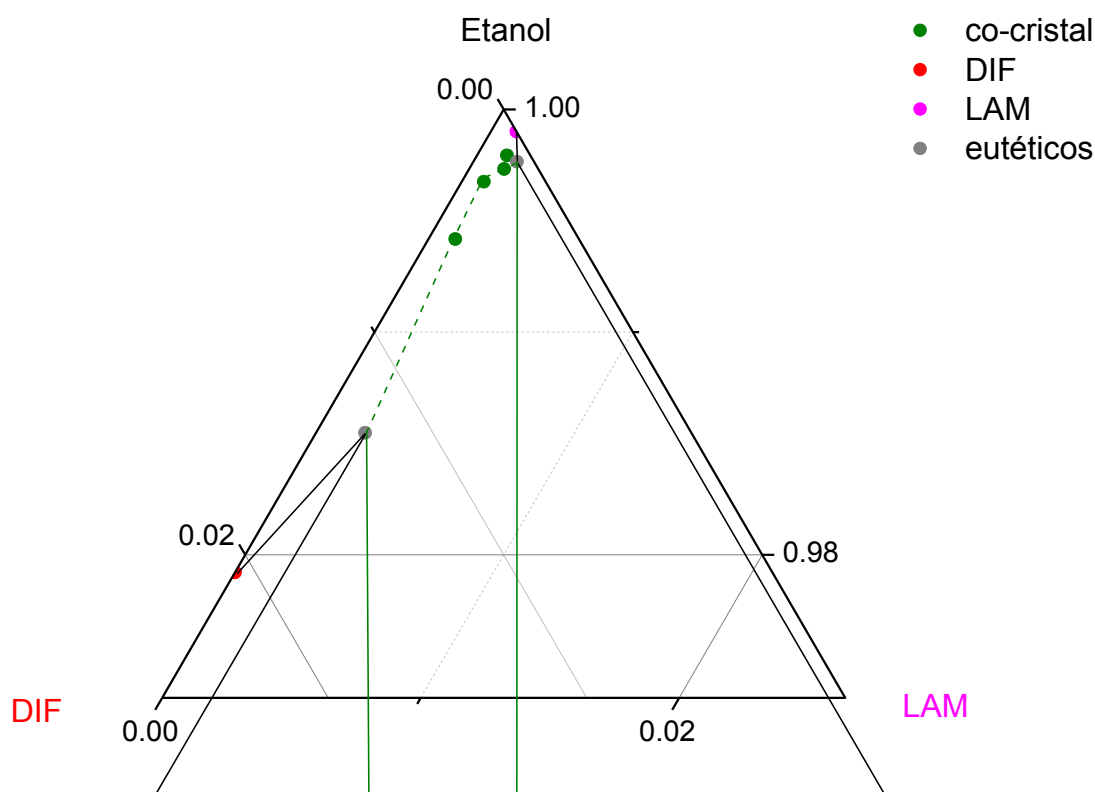


Figura 61 – Diagrama de fases ternário a 25 °C (DIF+LAM+etanol) com zoom na zona de interesse.

O diagrama experimental mostra que entre as duas linhas verdes apresentadas na Figura 61, é possível obter co-cristal DIF-LAM puro.

3.2.2.2 Síntese de sal por *slurry* em etanol

Assim como no sistema anterior, foi realizado o estudo pelo método de *slurry* para o sistema DIF-LAM como outro método de obtenção do sal.

Foram usados 25,05 mg de DIF e 25,56 mg de LAM, em proporção equimolar (1:1). Foram adicionados 200 μ L de etanol, sendo o *slurry* deixado em agitação durante 72 h. Foi feita a análise por XRPD, DSC, FTIR-ATR, PLTM e TGA.

O difratograma de raios-X de pó, mostra que o sólido obtido por *slurry* apresenta semelhanças com o difratograma do DIF-LAM Y_{DIF} 0.5, apresentando, no entanto, uma estrutura bastante mais cristalina. Ambos os difratogramas são distintos relativamente aos compostos de partida, Figura 62.

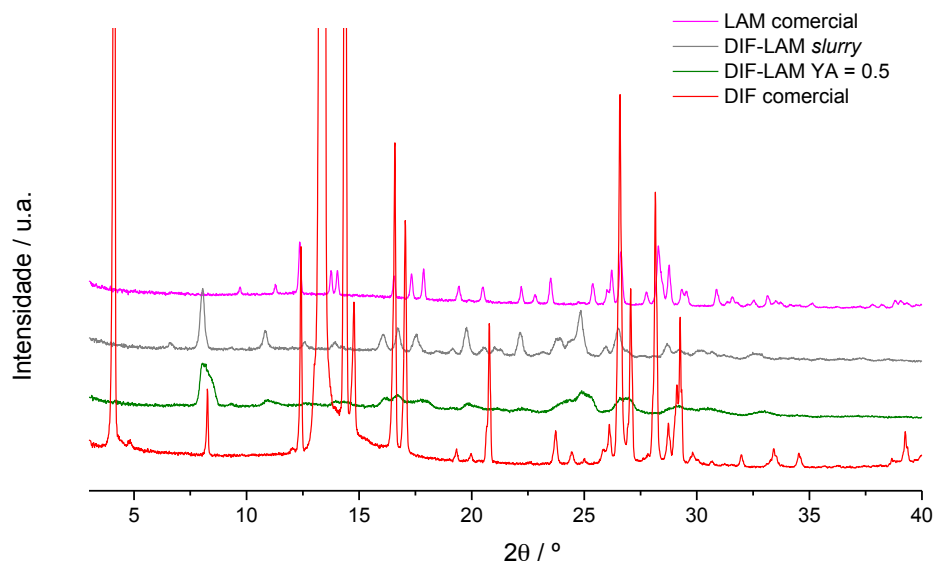


Figura 62 – Difratoogramas de XRPD da LAM comercial; do *slurry* DIF-LAM em etanol; do DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$ obtido por precipitação; e do DIF comercial, forma I.

Atendendo à curva de DSC, Figura 48, resolveu-se submeter a amostra obtida por *slurry* a aquecimento até 170 °C. Pode-se verificar a exata correspondência entre o difratograma obtido para esta amostra e o que se obtém fazendo o mesmo tratamento à amostra obtida por NG, Figura 63.

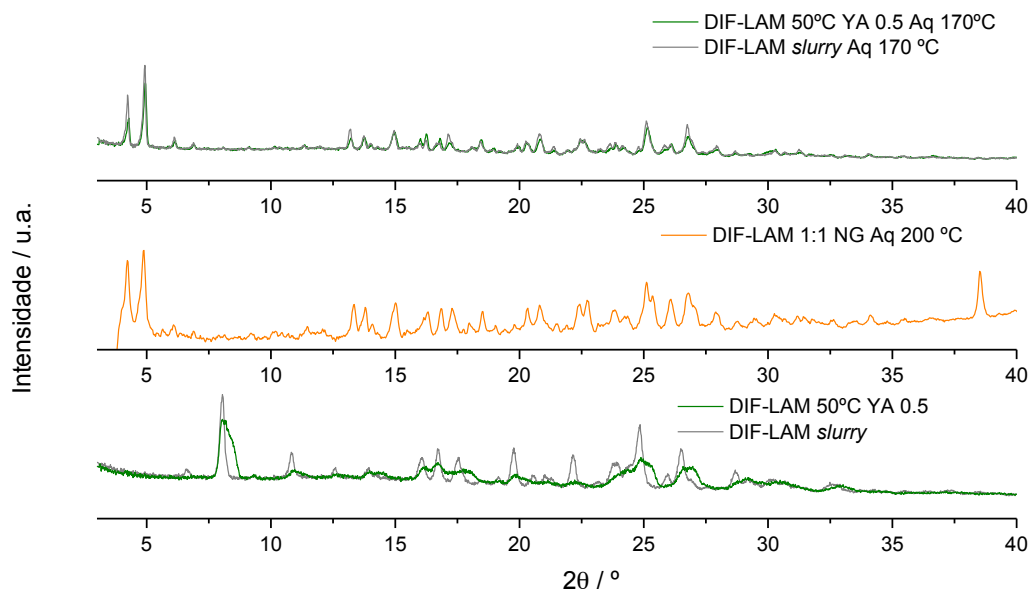


Figura 63 – Difractogramas de XRPD do DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$; da mesma mistura, mas submetida ao método de *slurry* em etanol; do sal DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ obtido por NG e aquecido a 200 °C; do sal DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} = 0.5$ aquecido a 170 °C e o sólido obtido por *slurry* aquecido a 170 °C.

Quanto às curvas de aquecimento por DSC, encontram-se na Figura 64. O *slurry* DIF-LAM em etanol apresenta no aquecimento uma transição endotérmica seguida de transição exotérmica no intervalo 100-150 °C, seguida de fusão, $T_{\text{fus}} = 227,9$ °C, $\Delta_{\text{fus}}H = 51,8$ kJ mol⁻¹. Este comportamento, transição endotérmica seguido de transição exotérmica, está de acordo com o registado para o sólido precipitado da solução DIF-LAM $Y_{\text{DIF}} 0.5$ e o sólido obtido por NG. Os valores de fusão também são concordantes.

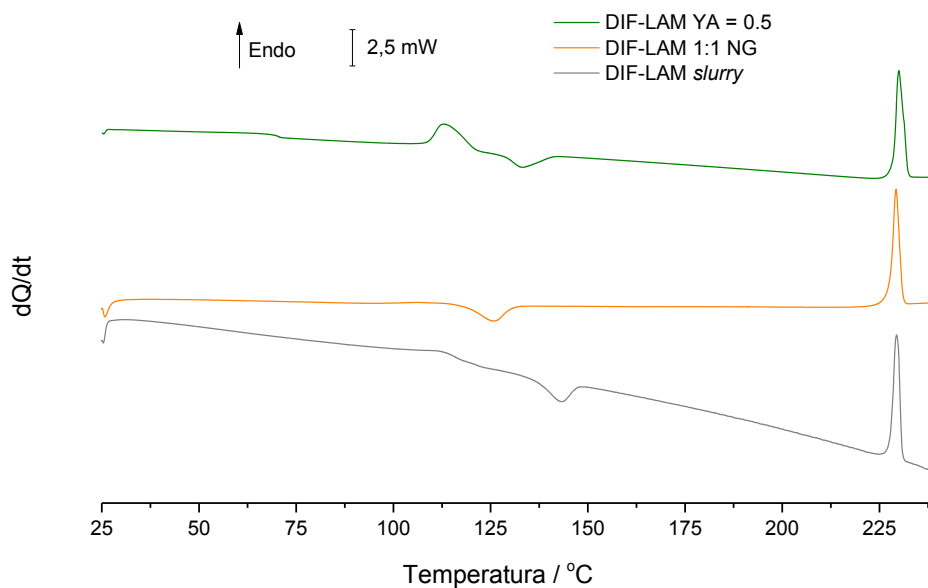


Figura 64 – Curvas de DSC do sal DIF-LAM $Y_{DIF} = 0.5$; do sal obtido por NG e do sal obtido pelo método de *slurry* em etanol ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$).

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 65. A amostra obtida por *slurry* DIF-LAM apresenta um espectro distinto do que se regista após aquecimento até $170 \text{ }^\circ\text{C}$.

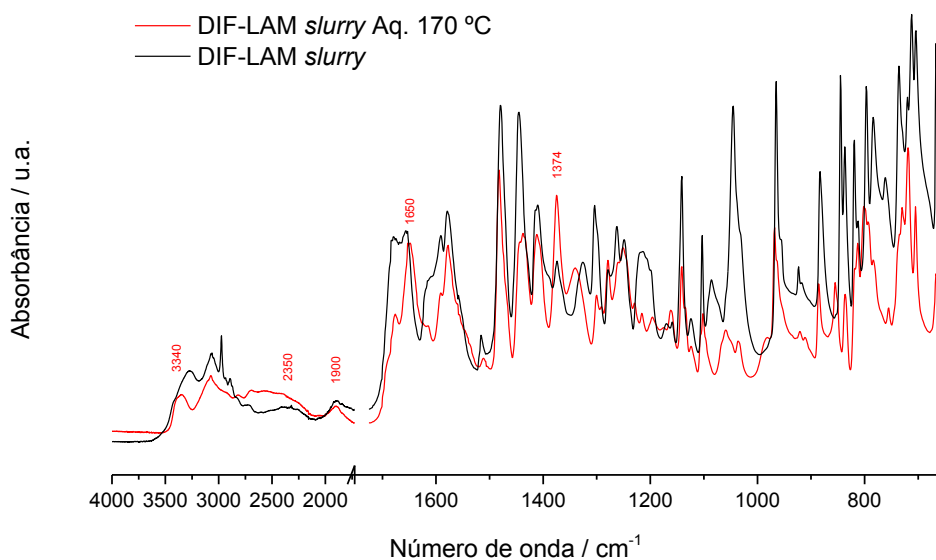


Figura 65 – Espectros de infravermelho do sal DIF-LAM obtido por *slurry* e da mesma mistura, mas submetida a aquecimento até $170 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foi realizada um ensaio de termomicroscopia de luz polarizada (PLTM), Figura 66, para visualizar o comportamento térmico do sal obtido por *slurry*.

As imagens obtidas não permitem observar transições entre os 100-150 °C como as registadas nas curvas de DSC. A fusão é coincidente com os valores obtidos por DSC.

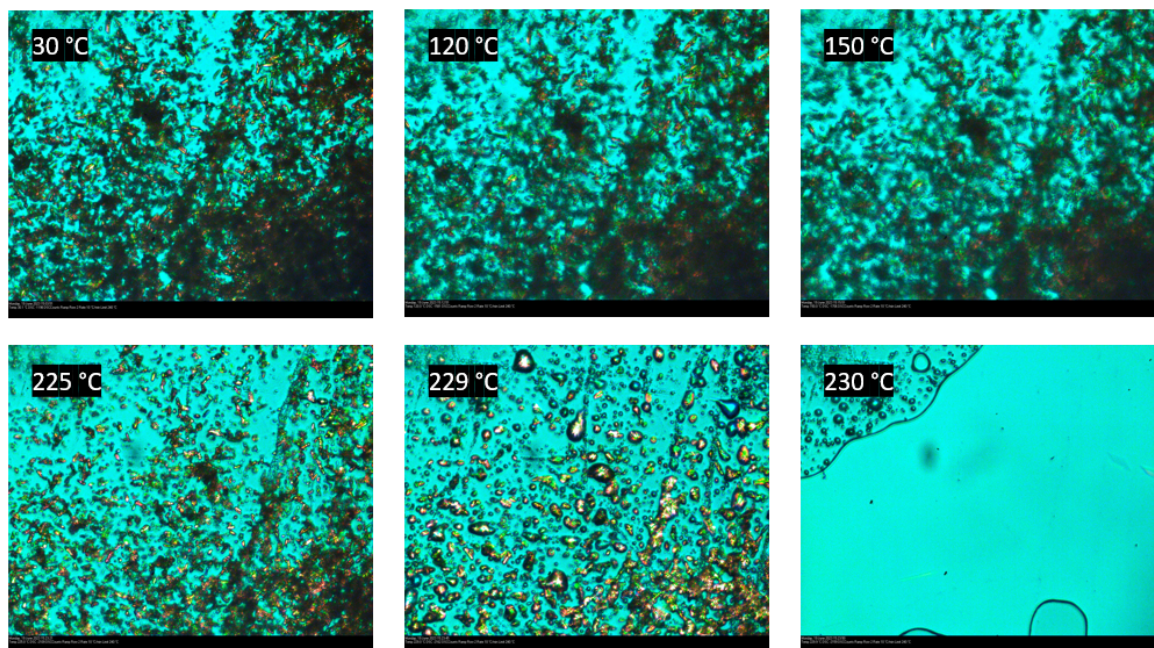


Figura 66 – Imagens de PLTM recolhidas no aquecimento da amostra de sal DIF-LAM *slurry* obtida por cristalização em etanol; $\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, ampliação 200 \times .

Foi também realizada uma análise termogravimétrica (TGA), Figura 67.

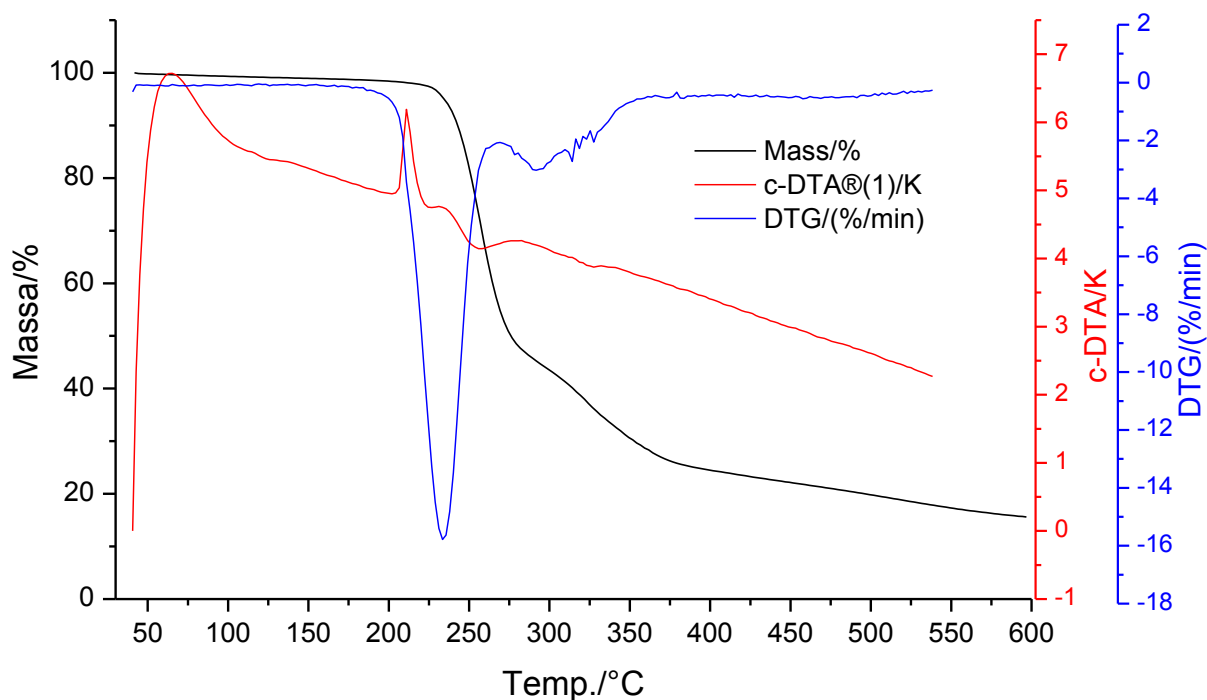


Figura 67 – Análise termogravimétrica do sólido obtido por *slurry* em etanol DIF-LAM.

A curva de TGA mostra que os eventos endotérmicos e exotérmicos observados na curva de DSC, não estão associados à presença de qualquer solvato. A curva mostra ainda que o sal se degrada durante a fusão.

Através da análise dos resultados obtidos podemos concluir que a obtenção do sal pelo método de *slurry* é altamente viável e facilmente exequível. Pode-se ainda verificar que o aquecimento acima da temperatura das transições exotérmica e endotérmica (170 °C) origina um sal distinto do de partida.

3.3 Investigação do sistema lamotrigina-etossuximida

Neste sistema é de notar que ambos os compostos são anticonvulsivantes, no entanto, o seu mecanismo de ação é diferente. Assim, a formação de um sistema de terapia dual entre eles poderá ser potencialmente útil para abranger alguns tipos de tratamentos mais específicos [69, 72-74].

3.3.1 Lamotrigina-Etossuximida

Quanto à etossuximida, não conseguimos obter resultados a partir do equipamento Crystall 6. De facto, utilizando etanol (índice de polaridade relativa = 0,654) como solvente, a etossuximida apresenta uma elevada solubilidade. Foram então experimentados solventes com índice de polaridade relativa mais baixa: 2-propanol (0,546), clorofórmio (0,259), acetato de etilo (0,228), 1,4-dioxano (0,164), tolueno (0,099) e *n*-heptano (0,012), todos eles com insucesso. Os solventes até ao tolueno dissolveram a etossuximida em demasia e em *n*-heptano não se dissolve o suficiente para se poder obter resultados no Crystall 6. Foi experimentado também uma mistura de solventes, *n*-heptano-tolueno 2:1 e 1:1, mas em nenhum deles foi conseguido o tal ajuste de solubilidades necessário à realização dos ensaios no Crystall 6.

Posto isto, não conseguimos realizar estudos de solubilidade através do equipamento Crystall 6 pelo que, em contrapartida, realizamos o estudo deste mesmo sistema pelo método de *slurry*, em *n*-heptano e em etanol.

3.3.1.1 Síntese de co-cristal por *slurry* em *n*-heptano e em etanol

Como já foi visto, o método de *slurry* é um método que pode ser usado na obtenção de co-cristais [21, 22].

Para preparação do *slurry* em *n*-heptano foram usados 32,52 mg de LAM e 17,96 mg de ESM, proporção equimolar. Foram adicionados 200 µL de *n*-heptano, sendo o *slurry* deixado em agitação durante 72 h.

Para preparação do *slurry* em etanol foram usados 32,54 mg de LAM e 17,95 mg de ESM. Foram adicionados 100 µL de etanol, sendo o *slurry* deixado em agitação durante 72 h.

Os sólidos obtidos foram analisados por XRPD, DSC e FTIR-ATR, e para comparação dos resultados, utilizou-se a mistura LAM-ESM submetida a moagem sem solvente (NG) e a mesma mistura, mas submetida a moagem assistida por líquido (LAG) em etanol, investigados em trabalho realizado no mesmo laboratório [92].

O difratograma de raios-X de pó, Figura 68, mostrou que a amostra obtida por *slurry* LAM-ESM em *n*-heptano corresponde exatamente ao difratograma da mistura equimolar, submetida a LAG etanol. A amostra obtida por *slurry* LAM-ESM em etanol tem as mesmas reflexões, mas na zona de $2\theta = 10^\circ$ evidencia 2 picos que não se encontram nas outras duas amostras.

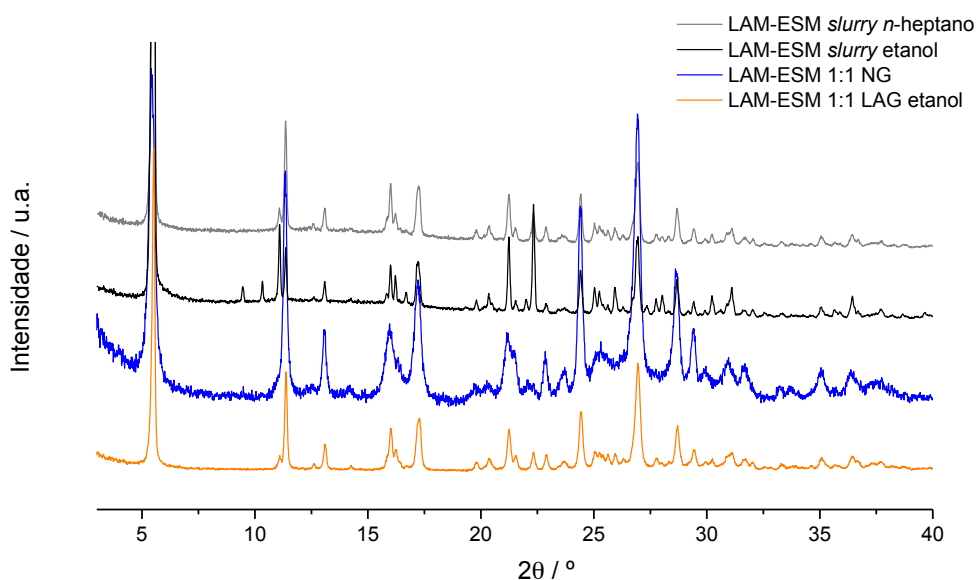


Figura 68 – Difratogramas de XRPD das amostras LAM-ESM obtidas pelo método *slurry* em *n*-heptano e em etanol, e os sólidos obtidos por NG e a LAG etanol.

As curvas de aquecimento por DSC encontram-se na Figura 69 e os parâmetros termodinâmicos obtidos para cada um dos sólidos encontram-se na Tabela 7.

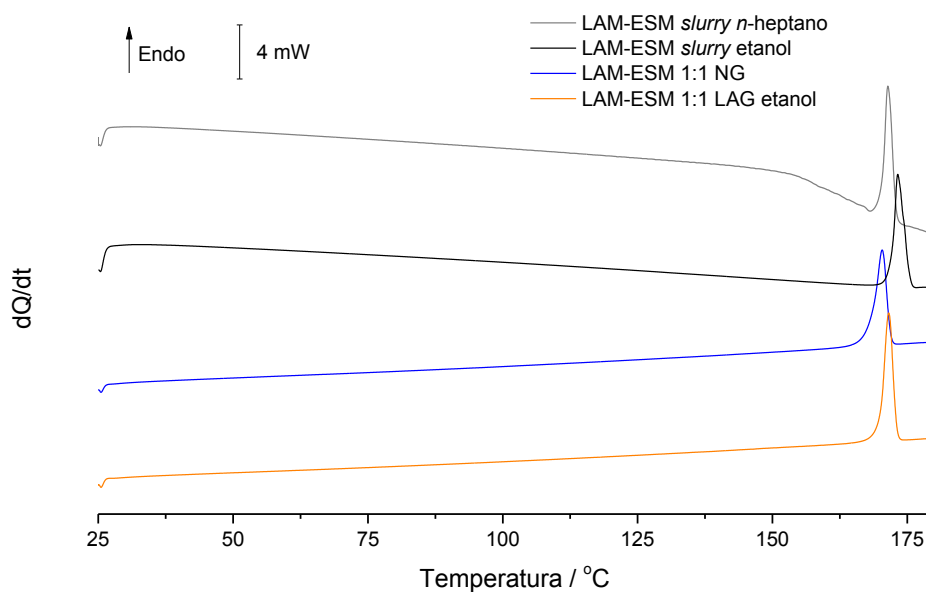


Figura 69 – Curvas de DSC da mistura LAM-ESM obtida pelo método *slurry* em *n*-heptano e em etanol, e os sólidos obtidos por NG e a LAG etanol ($\beta = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$).

Tabela 7 – Parâmetros termodinâmicos obtidos a partir das curvas de DSC para o *slurry* LAM-ESM em *n*-heptano, para o *slurry* LAM-ESM em etanol, para a LAM-ESM 1:1 obtida por NG e para a LAM-ESM 1:1 obtida por LAG em etanol.

	$T_{\text{fus}} / \text{ }^\circ\text{C}$	$\Delta_{\text{fus}}H / \text{ kJ mol}^{-1}$
LAM-ESM <i>slurry n</i> -heptano	170,3	49,7
LAM-ESM <i>slurry</i> etanol	172,0	51,1
LAM-ESM 1:1 NG	168,1	53,4
LAM-ESM 1:1 LAG etanol	169,9	57,0

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 70. Os espectros das amostras obtidas por *slurry* apresentam grandes semelhanças com o sólido obtido por NG e por LAG etanol.

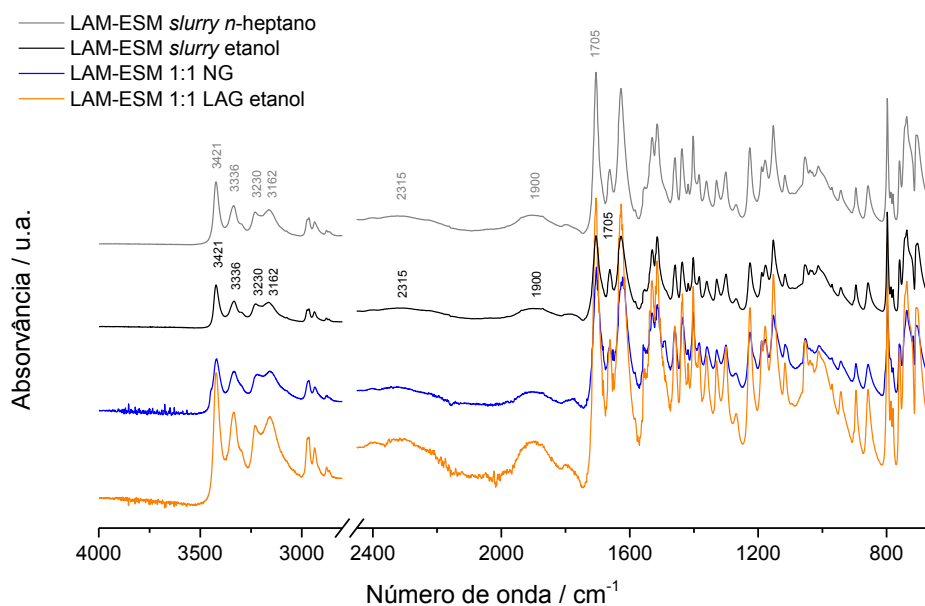


Figura 70 – Espectros de infravermelho das amostras LAM-ESM obtidas pelo método *slurry* em *n*-heptano e em etanol, e os sólidos obtidos por NG e por LAG etanol.

Os sinais referentes às bandas de elongações dos grupos NH_2 da LAM encontram-se significativamente deslocados relativamente ao composto puro, com os seus máximos a 3162, 3230, 3336 e 3421 cm^{-1} . A banda a 1705 cm^{-1} corresponde à elongação das ligações $\text{C}=\text{O}$ referentes à ESM. Estes valores estão em concordância com o descrito na literatura [91, 93].

Portanto, é de salientar que a técnica de obtenção de co-cristal por *slurry* foi bem-sucedida, tanto em *n*-heptano como em etanol. Naturalmente, o etanol é um solvente preferível ao *n*-heptano [101].

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

O trabalho teve por objetivo o estudo de co-cristais/sais com potencial para utilização em terapia dual, nomeadamente os sistemas DIF-ISO, o DIF-LAM e a LAM-ESM, e testá-los em ensaios de cristalização em solventes e de *slurry*. Foi também estudada a viabilidade da transposição de escala.

No que diz respeito ao sistema DIF-ISO, foi possível produzir o co-cristal (1:1) obtido por LAG noutro estudo, por cristalização em etanol. Estabeleceu-se o diagrama de fases ternário, DIF + ISO + etanol, a 25 °C, identificando as condições para realizar transposição de escala por cristalização em solução. O co-cristal foi também obtido em ensaios de *slurry* em etanol. Foi possível identificar uma metodologia para induzir a cristalização do polimorfo I de diflunisal no mesmo solvente. Em etanol é normalmente obtida a forma III, mas a presença de uma quantidade residual de ISO na solução parece induzir a cristalização da forma I. Foi também identificada a formação de um gel para concentrações elevadas de DIF em soluções etanólicas contendo também ISO, Y_{DIF} 0,9.

Passando ao sistema DIF-LAM, foi possível obter, por cristalização em etanol e por *slurry*, um sal (1:1) que não foi descrito anteriormente. Este sal transforma-se no seu polimorfo, anteriormente reportado na literatura, por aquecimento até 170 °C. Também para este sistema se estabeleceu o diagrama de fases ternário, DIF + LAM + etanol, a 25 °C. Foi também realizada uma experiência de transposição de escala por cristalização em etanol, usando massas 4 vezes superiores às utilizadas em ensaios anteriores. Foi obtido diretamente o polimorfo do sal que só tinha sido conseguido por aquecimento até 170 °C.

Verificou-se também que a contaminação de uma solução etanólica de diflunisal com uma quantidade reduzida de lamotrigina, induz a cristalização do polimorfo I de DIF.

Embora não se tenha conseguido obter co-cristal no sistema LAM-ESM através de cristalização em solução, o método de *slurry* mostrou ser viável e facilmente exequível, tendo-se obtido o co-cristal (1:1) tanto em etanol como em *n*-heptano.

Referências Bibliográficas

1. Nugrahani, I. and M.A. Jessica, *Amino Acids as the Potential Co-Former for Co-Crystal Development: A Review*. *Molecules*, 2021. **26**(11).
2. Kavanagh, O.N., et al., *Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application*. *Drug Discovery Today*, 2019. **24**(3): p. 796-804.
3. Almeida e Sousa, L., et al., *Supersaturation Potential of Salt, Co-Crystal, and Amorphous Forms of a Model Weak Base*. *Crystal Growth & Design*, 2016. **16**(2): p. 737-748.
4. Cerreia Vioglio, P., M.R. Chierotti, and R. Gobetto, *Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017. **117**: p. 86-110.
5. Rodríguez-Spong, B., et al., *General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. **56**(3): p. 241-74.
6. Nauha, E., et al., *Comparison of the polymorphs and solvates of two analogous fungicides—a case study of the applicability of a supramolecular synthon approach in crystal engineering*. *CrystEngComm*, 2011. **13**(15): p. 4956-4964.
7. Pandi, P., et al., *Amorphous solid dispersions: An update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products*. *Int J Pharm*, 2020. **586**: p. 119560.
8. Healy, A.M., et al., *Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2017. **117**: p. 25-46.
9. Serajuddin, A.T.M., *Salt formation to improve drug solubility*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. **59**(7): p. 603-616.
10. Saal, C. and A. Becker, *Pharmaceutical salts: a summary on doses of salt formers from the Orange Book*. *Eur J Pharm Sci*, 2013. **49**(4): p. 614-23.
11. Hartshorn, R.M., et al., *Brief guide to the nomenclature of inorganic chemistry*. *Pure and Applied Chemistry*, 2015. **87**(9-10): p. 1039-1049.
12. Evora, A.O.L., et al., *Lamotrigine: Design and synthesis of new multicomponent solid forms*. *Eur J Pharm Sci*, 2019. **129**: p. 148-162.
13. Rathi, R., et al., *Oxaliplatin-flavone pharmaceutical co-crystal-CN11205332A: patent spotlight*. *Pharm Pat Anal*, 2022. **11**(5): p. 147-154.
14. FDA, *Regulatory Classification of Pharmaceutical Co Crystals Guidance for Industry*. 2018.
15. Kalepu, S. and V. Nekkanti, *Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015. **5**(5): p. 442-453.

16. Karki, S., et al., *Screening for pharmaceutical cocrystal hydrates via neat and liquid-assisted grinding*. *Mol Pharm*, 2007. **4**(3): p. 347-54.
17. Weyna, D., et al., *Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution*. *Crystal Growth & Design - CRYST GROWTH DES*, 2009. **9**.
18. Yamashita, H., et al., *Detection of cocrystal formation based on binary phase diagrams using thermal analysis*. *Pharm Res*, 2013. **30**(1): p. 70-80.
19. Aher, S., et al., *Ultrasound assisted cocrystallization from solution (USSC) containing a non-congruently soluble cocrystal component pair: Caffeine/maleic acid*. *Eur J Pharm Sci*, 2010. **41**(5): p. 597-602.
20. Miroshnyk, I., S. Mirza, and N. Sandler, *Pharmaceutical co-crystals—an opportunity for drug product enhancement*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2009. **6**(4): p. 333-341.
21. Rahman, F., et al., *COMPARISON STUDY OF GRINDING AND SLURRY METHOD ON PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF ACYCLOVIR & SUCCINIC ACID COCRYSTAL*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2017. **10**(3): p. 153-158.
22. Haskins, M.M. and M.J. Zaworotko, *Screening and Preparation of Cocrystals: A Comparative Study of Mechanochemistry vs Slurry Methods*. *Crystal Growth & Design*, 2021. **21**(7): p. 4141-4150.
23. Pawar, N., et al., *Solution Cocrystallization: A Scalable Approach for Cocrystal Production*. *Crystals*, 2021. **11**(3): p. 303.
24. Koranne, S., et al., *Role of Coformer and Excipient Properties on the Solid-State Stability of Theophylline Cocrystals*. *Crystal Growth & Design*, 2019. **19**.
25. Duggirala, N.K., et al., *Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines*. *Chem Commun (Camb)*, 2016. **52**(4): p. 640-55.
26. Yuliandra, Y., et al., *Cocrystal of Ibuprofen–Nicotinamide: Solid-State Characterization and In Vivo Analgesic Activity Evaluation*. *Scientia Pharmaceutica*, 2018. **86**(2): p. 23.
27. Manin, A., et al., *Hydrogen Bond Donor/Acceptor Ratios of the Coformers: Do They Really Matter for the Prediction of Molecular Packing in Cocrystals? The Case of Benzamide Derivatives with Dicarboxylic Acids*. *Crystal Growth & Design*, 2018. **18**.
28. Kumar, S. and A. Nanda, *Pharmaceutical Cocrystals: An Overview*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017. **79**.
29. Surov, A.O., et al., *Virtual Screening, Structural Analysis, and Formation Thermodynamics of Carbamazepine Cocrystals*. *Pharmaceutics*, 2023. **15**(3): p. 836.
30. Arunan, E., et al., *Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2011. **83**(8): p. 1637-1641.

31. Cruz-Cabeza, A.J., *Acid–base crystalline complexes and the pKa rule*. CrystEngComm, 2012. **14**(20): p. 6362-6365.
32. Kuminek, G., et al., *Cocrystals to facilitate delivery of poorly soluble compounds beyond-rule-of-5*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **101**: p. 143-166.
33. Thakuria, R., B. Sarma, and A. Nangia, *Hydrogen Bonding in Molecular Crystals*. 2016.
34. Kumar, A. and A. Nanda, *In-silico methods of cocrystal screening: A review on tools for rational design of pharmaceutical cocrystals*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2021. **63**: p. 102527.
35. Bennett, A.J. and A.J. Matzger, *Progress in Predicting Ionic Cocrystal Formation: The Case of Ammonium Nitrate*. Chemistry – A European Journal, 2023. **29**(27): p. e202300076.
36. Wang, X., et al., *Drug-drug cocrystals: Opportunities and challenges*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021. **16**(3): p. 307-317.
37. Liu, M., et al., *Development of a pharmaceutical cocrystal with solution crystallization technology: Preparation, characterization, and evaluation of myricetin-proline cocrystals*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. **107**: p. 151-159.
38. Karimi-Jafari, M., et al., *Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications*. Crystal Growth & Design, 2018. **18**(10): p. 6370-6387.
39. Grothe, E., et al., *Solvates, Salts, and Cocrystals: A Proposal for a Feasible Classification System*. Crystal Growth & Design, 2016. **16**(6): p. 3237-3243.
40. Sathisaran, I. and S.V. Dalvi, *Engineering Cocrystals of Poorly Water-Soluble Drugs to Enhance Dissolution in Aqueous Medium*. Pharmaceutics, 2018. **10**(3): p. 108.
41. ICH, *Biopharmaceutics Classification System-Based Biowaivers*. 2019.
42. Rehder, S., et al., *Investigation of the Formation Process of Two Piracetam Cocrystals during Grinding*. Pharmaceutics, 2011. **3**(4): p. 706-722.
43. Sun, C.C., *Cocrystallization for successful drug delivery*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2013. **10**(2): p. 201-213.
44. Malamataris, M., et al., *Experimental cocrystal screening and solution based scale-up cocrystallization methods*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2017. **117**: p. 162-177.
45. Zhou, G. and C.y. Chen, *9.18 Industrial Applications of Process Analytical Technology to Asymmetric Synthesis*, in *Comprehensive Chirality*, E.M. Carreira and H. Yamamoto, Editors. 2012, Elsevier: Amsterdam. p. 457-482.
46. Chavan, R.B., et al., *Continuous manufacturing of co-crystals: challenges and prospects*. Drug Deliv Transl Res, 2018. **8**(6): p. 1726-1739.

47. Su, Q., et al., *A perspective on Quality-by-Control (QbC) in pharmaceutical continuous manufacturing*. *Computers & Chemical Engineering*, 2019. **125**: p. 216-231.
48. Holaň, J., et al., *Design of co-crystallization processes with regard to particle size distribution*. *Chemical Engineering Science*, 2015. **128**: p. 36-43.
49. Darmali, C., et al., *Mechanisms and Control of Impurities in Continuous Crystallization: A Review*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2019. **58**(4): p. 1463-1479.
50. Pu, S. and K. Hadinoto, *Continuous crystallization as a downstream processing step of pharmaceutical proteins: A review*. *Chemical Engineering Research and Design*, 2020. **160**: p. 89-104.
51. Orehek, J., D. Teslić, and B. Likozar, *Continuous Crystallization Processes in Pharmaceutical Manufacturing: A Review*. *Organic Process Research & Development*, 2021. **25**(1): p. 16-42.
52. Chiarella, R.A., R.J. Davey, and M.L. Peterson, *Making Co-Crystals The Utility of Ternary Phase Diagrams*. *Crystal Growth & Design*, 2007. **7**(7): p. 1223-1226.
53. Huang, Y., et al., *Investigation of Ternary Phase Diagrams of Carbamazepine–Nicotinamide Cocrystal in Ethanol and Ethanol/Ethyl Acetate Mixtures at 298.15 K and 313.15 K*. *Journal of Solution Chemistry*, 2020. **49**(1): p. 117-132.
54. Pereira, L.M.F., *O papel do diagrama ternário na transposição de escala de um co-cristal farmacêutico*, in *Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra*. 2022, Universidade de Coimbra.
55. Brogden, R.N., et al., *Diflunisal: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in pain and musculoskeletal strains and sprains and pain in osteoarthritis*. *Drugs*, 1980. **19**(2): p. 84-106.
56. Hannah, J., et al., *Novel analgesic-antiinflammatory salicylates*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1978. **21**(11): p. 1093-1100.
57. Cotton, M.L. and R.A. Hux, *Diflunisal*. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 1985. **14**: p. 491-526.
58. Martínez-Ohárriz, M.C., et al., *Polymorphism of diflunisal: isolation and solid-state characteristics of a new crystal form*. *J Pharm Sci*, 1994. **83**(2): p. 174-7.
59. Perlovich, G.L., L.K. Hansen, and A. Bauer-Brandl, *Interrelation between thermochemical and structural data of polymorphs exemplified by diflunisal*. *J Pharm Sci*, 2002. **91**(4): p. 1036-45.
60. Cross, W.I., et al., *A Whole Output Strategy for Polymorph Screening: Combining Crystal Structure Prediction, Graph Set Analysis, and Targeted Crystallization Experiments in the Case of Diflunisal*. *Crystal Growth & Design*, 2003. **3**(2): p. 151-158.

61. Kim, Y.-B. and I.Y. Park, *Disordered Crystal Structure of Diflunisal*. Journal of Pharmaceutical Investigation, 1996. **26**: p. 55-59.
62. Bashir, M., et al., *Binary inclusion complexes of diflunisal with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Preparation and characterization*. Pak J Pharm Sci, 2020. **33**(5(Supplementary)): p. 2307-2315.
63. Timmins, G.S., et al., *Nitric oxide generated from isoniazid activation by KatG: source of nitric oxide and activity against Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(8): p. 3006-9.
64. Kliegman, R.M., *Principles of Antimycobacterial Therapy Chapter 211*. Nelson Textbook of Pediatrics, ed. S. Elsevier. 2007.
65. Jensen, L.H., *The Crystal Structure of Isonicotinic Acid Hydrazide I*. Journal of the American Chemical Society, 1954. **76**(18): p. 4663-4667.
66. Bhat, T.N., T.P. Singh, and M. Vijayan, *Isonicotinic acid hydrazide - a reinvestigation*. Acta Crystallographica Section B, 1974. **30**(12): p. 2921-2922.
67. Zhang, K., et al., *Discovery of new polymorphs of the tuberculosis drug isoniazid*. CrystEngComm, 2020. **22**(16): p. 2705-2708.
68. Becker, C., et al., *Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: isoniazid*. J Pharm Sci, 2007. **96**(3): p. 522-31.
69. Edinoff, A.N., et al., *Lamotrigine and Stevens-Johnson Syndrome Prevention*. Psychopharmacol Bull, 2021. **51**(2): p. 96-114.
70. Sridhar, B. and K. Ravikumar, *Lamotrigine, an antiepileptic drug, and its chloride and nitrate salts*. Acta Crystallographica Section C, 2009. **65**(9): p. o460-o464.
71. Gunda, R., *FORMULATION DEVELOPMENT AND EVALUATION OF LAMOTRIGINE SUSTAINED RELEASE TABLETS USING 32 FACTORIAL DESIGN*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2015. **6**: p. 1746-1752.
72. Rogawski, M.A., W. Löscher, and J.M. Rho, *Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(5).
73. Gören, M.Z. and F. Onat, *Ethosuximide: from bench to bedside*. CNS Drug Rev, 2007. **13**(2): p. 224-39.
74. Goldenberg, M.M., *Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment*. Pharmacy and Therapeutics, 2010. **35**(7): p. 392-415.
75. Osiecka, N., et al., *Insight into polymorphism of the ethosuximide (ETX)*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2018. **133**(2): p. 961-967.

76. Wolk, O., R. Agbaria, and A. Dahan, *Provisional in-silico biopharmaceutics classification (BCS) to guide oral drug product development*. Drug Des Devel Ther, 2014. **8**: p. 1563-75.
77. EMA, *ICH guideline Q3C (R6) on impurities - guideline for residual solvents*. 2019.
78. Bunaciu, A.A., E.G. Udriștioiu, and H.Y. Aboul-Enein, *X-ray diffraction: instrumentation and applications*. Crit Rev Anal Chem, 2015. **45**(4): p. 289-99.
79. Coleman, N.J. and D.Q.M. Craig, *Modulated temperature differential scanning calorimetry: A novel approach to pharmaceutical thermal analysis*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **135**(1): p. 13-29.
80. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, in *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. 2008, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart.
81. Țucureanu, V., A. Matei, and A.M. Avram, *FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study*. Crit Rev Anal Chem, 2016. **46**(6): p. 502-20.
82. Ríos-Reina, R. and S.M. Azcarate, *How Chemometrics Revives the UV-Vis Spectroscopy Applications as an Analytical Sensor for Spectralprint (Nontargeted) Analysis*. Chemosensors, 2023. **11**(1): p. 8.
83. Gerassimidou, S., et al., *Characterisation and composition identification of waste-derived fuels obtained from municipal solid waste using thermogravimetry: A review*. Waste Manag Res, 2020. **38**(9): p. 942-965.
84. Castellanos-Guzmán, A., *Polarised Light Microscopy in Materials Characterisation*. MICROSCOPY AND ANALYSIS, 2002: p. 9-12.
85. Hansen, L.K., G.L. Perlovich, and A. Bauer-Brandl, *The 1:1 hydrate of diflunisal*. Acta Crystallographica Section E, 2001. **57**(5): p. o477-o479.
86. Lucio, D., A. Zornoza, and M.C. Martínez-Ohárriz, *Influence of chitosan and carboxymethylchitosan on the polymorphism and solubilisation of diflunisal*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **467**(1): p. 19-26.
87. Lemmerer, A., *Covalent assistance to supramolecular synthesis: modifying the drug functionality of the antituberculosis API isoniazid in situ during co-crystallization with GRAS and API compounds*. CrystEngComm, 2012. **14**(7): p. 2465-2478.
88. Rajalakshmi, G., V.R. Hathwar, and P. Kumaradhas, *Topological analysis of electron density and the electrostatic properties of isoniazid: an experimental and theoretical study*. Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater, 2014. **70**(Pt 2): p. 331-41.
89. Borba, A., A. Gómez-Zavaglia, and R. Fausto, *Molecular Structure, Infrared Spectra, and Photochemistry of Isoniazid under Cryogenic Conditions*. The Journal of Physical Chemistry A, 2009. **113**(32): p. 9220-9230.

90. Évora, A.O.L.É.e., *Investigação de novas formas sólidas de diflunisal e de lamotrigina*, in *Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias*. 2015, Universidade de Coimbra.
91. Ramya, T., S. Gunasekaran, and G.R. Ramkumaar, *Density functional theory, restricted Hartree – Fock simulations and FTIR, FT-Raman and UV–Vis spectroscopic studies on lamotrigine*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013. **114**: p. 277-283.
92. Marques, A.M.A., *Investigação de CoCristais Farmacêuticos e Estudos de Compatibilidade Ativo-Excipiente*, in *Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias*. 2021, Universidade de Coimbra.
93. Vijaya Chamundeeswari, S.P., E. James Jebaseelan Samuel, and N. Sundaraganesan, *Quantum mechanical and spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, I3C, IH and UV) investigations of antiepileptic drug Ethosuximide*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011. **83**(1): p. 478-489.
94. O'Connor, C. and M.F. Brady, *Isoniazid*, in *StatPearls*. 2023.
95. Betchel, N.T., K.A. Fariba, and A. Saadabadi, *Lamotrigine*, in *StatPearls*. 2023.
96. Mukherjee, A., et al., *Synthon identification in co-crystals and polymorphs with IR spectroscopy. Primary amides as a case study*. *CrystEngComm*, 2013. **15**(23): p. 4640-4654.
97. Feng, G., et al., *Gelation of microemulsions and release behavior of sodium salicylate from gelled microemulsions*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009. **71**(2): p. 297-302.
98. Redasani, V.K., et al., *A REVIEW ON DERIVATIVE UV-SPECTROPHOTOMETRY ANALYSIS OF DRUGS IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS AND BIOLOGICAL SAMPLES REVIEW*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2018. **63**: p. 4126-4134.
99. Brittain, H., *Vibrational Spectroscopic Studies of Cocrystals and Salts. 2. The Benzylamine–Benzoic Acid System*. *Crystal Growth & Design - CRYST GROWTH DES*, 2009. **9**.
100. Schmid, M., D. Rath, and U. Diebold, *Why and How Savitzky-Golay Filters Should Be Replaced*. *ACS Meas Sci Au*, 2022. **2**(2): p. 185-196.
101. Byrne, F.P., et al., *Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides*. *Sustainable Chemical Processes*, 2016. **4**(1): p. 7.

Anexo I

Cálculos detalhados para a construção do diagrama pseudobinário experimental do perfil da temperatura em função da fração molar excluída do solvente, apresentado na Figura I0.

Os valores de X_B podem ser determinados, usando as frações molares de X_A conhecidas, Equação (1.1):

$$\frac{X_B}{X_B^*(T)} = 1 - \frac{X_A}{X_A^*(T)} \quad (1.1)$$

Colocando X_B em função de X_A , Equação (1.2):

$$X_B = \left(1 - \frac{X_A}{X_A^*(T)}\right) \times X_B^*(T) \quad (1.2)$$

E o X_A pode ser determinado, juntando as equações, como mostrado na Equação (1.3):

$$Y_A = \frac{X_A}{\left(X_A + \left(\left(1 - \frac{X_A}{X_A^*(T)}\right) \times X_B^*(T)\right)\right)} \quad (1.3)$$

Simplificando:

$$Y_A = \frac{X_A}{\left(X_A + \left(\left(\frac{X_A^*(T) - X_A}{X_A^*(T)}\right) \times X_B^*(T)\right)\right)}$$
$$Y_A = \frac{X_A}{\left(X_A + \left(\frac{(X_A^*(T) \times X_B^*(T)) - (X_A \times X_B^*(T))}{X_A^*(T)}\right)\right)}$$

$$Y_A = \frac{X_A}{\left(\frac{(X_A \times X_A^*(T)) + (X_A^*(T) \times X_B^*(T)) - (X_A \times X_B^*(T))}{X_A^*(T)} \right)}$$

$$\frac{(Y_A \times X_A \times X_A^*(T)) + (Y_A \times X_A^*(T) \times X_B^*(T)) - (Y_A \times X_A \times X_B^*(T))}{X_A^*(T)} = \frac{X_A \times X_A^*(T)}{X_A^*(T)}$$

$$(Y_A \times X_A \times X_A^*(T)) - (Y_A \times X_A \times X_B^*(T)) - X_A \times X_A^*(T) = -(Y_A \times X_A^*(T) \times X_B^*(T))$$

Colocando o X_A em evidência, obtém-se a Equação (1.4):

$$X_A \times ((Y_A \times X_A^*(T)) - (Y_A \times X_B^*(T)) - (X_A^*(T))) = -(Y_A \times X_A^*(T) \times X_B^*(T))$$

$$X_A = \frac{-(Y_A \times X_A^*(T) \times X_B^*(T))}{((Y_A \times X_A^*(T)) - (Y_A \times X_B^*(T)) - (X_A^*(T)))} \quad (1.4)$$

○ X_A e o X_B são calculados para obter uma maior gama de Y_A s.

Para calcular o número de moles (n), com finalidade de utilizar nas frações molares de X_A e X_B (n_A e n_B), é necessário um sistema de equações lineares, que podem ser resolvidas usando o cálculo de matrizes diretamente no Excel.

Para n_A , Equação (1.5):

$$X_A = \frac{n_A}{(n_A + n_B + n_C)}$$

$$X_A(n_A + n_B + n_C) = n_A$$

$$X_A n_A + X_A n_B + X_A n_C - n_A = 0$$

$$X_A n_A - n_A = -X_A n_B - X_A n_C$$

$$n_A(X_A - 1) = -X_A n_B - X_A n_C$$

$$n_A = \frac{-X_A n_B - X_A n_C}{(X_A - 1)} \quad (1.5)$$

Da mesma forma para n_B , Equação (1.6):

$$X_B = \frac{n_B}{(n_A + n_B + n_C)}$$

$$X_B(n_A + n_B + n_C) = n_B$$

$$X_B n_A + X_B n_B + X_B n_C - n_B = 0$$

$$X_B n_B - n_B = -X_B n_A - X_B n_C$$

$$n_B(X_B - 1) = -X_B n_A - X_B n_C$$

$$n_B = \frac{-X_B n_A - X_B n_C}{(X_B - 1)} \quad (1.6)$$

Sendo que n_A e n_B são as variáveis a serem resolvidas e n_C é o número de moles de solvente, Equação (1.5) e (1.6).

Considerando que $X_A n_C$ e $X_B n_C$ são valores conhecidos, o sistema de equações é:

$$\begin{cases} X_B n_A + (X_B - 1)n_B = -X_B n_C \\ (X_A - 1)n_A + X_A n_B = -X_A n_C \end{cases}$$

Este sistema de equações pode ser descrito para uma equação matricial hipotética $AX=b$

onde A é uma matriz $m \times n$; X é um vetor coluna com n elementos; e b um vetor coluna com m elementos.

A solução x é dada pela multiplicação da matriz inversa A (A^{-1}) pela matriz b ($x=A^{-1}b$).

$$A = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \cdots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{m1} & a_{m2} & \cdots & a_{mn} \end{bmatrix}, \quad x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{bmatrix}, \quad b = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_m \end{bmatrix}$$

Transformando o sistema de equações em matrizes:

$$A = \begin{bmatrix} X_B & X_B - 1 \\ X_A - 1 & X_A \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} -X_B n_C \\ -X_A n_C \end{bmatrix} \quad x = \begin{bmatrix} n_A \\ n_B \end{bmatrix}$$

Assim, escrevendo “=MATRIZ.MULT(MATRIZ.INVERSE(A);(b))” no Excel, podem ser encontrados os valores de n_A e n_B para cada Y_A correspondente. Com o número de moles do API e do co-formador (n_A e n_B), foram calculadas as massas respectivas, necessárias para preparação das soluções desejadas, e determinados os valores dos *clear points*, temperaturas de saturação, no equipamento Crystall6, como descrito acima. Estes valores foram utilizados na construção dos diagramas de fases pseudobinários.