

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

VINÍCIUS DANILO NONATO BEZZON

DEFINIÇÃO DE LIMITES PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
POLIMORFOS DO FÁRMACO FINASTERIDA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR
POLICRISTAIS

Araraquara
2013

VINÍCIUS DANILO NONATO BEZZON

DEFINIÇÃO DE LIMITES PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
POLIMORFOS DO FÁRMACO FINASTERIDA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR
POLICRISTAIS

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Carlos de Oliveira Paiva Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ornaghi Orlandi

Araraquara
2013

Bezzon, Vinícius Danilo Nonato.

Definição de limites para a identificação e
quantificação de polimorfos do fármaco finasterida por
difração de raios X por policristais / Vinícius Danilo
Nonato Bezzon, 2013

201 p. il.

Orientador: Carlos de Oliveira Paiva Santos

Co-orientador: Marcelo Ornaghi Orlandi

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2013

1. Fármacos. 2. Polimorfismo. 3. Limites de
identificação e quantificação. 4. Difração de raios X. 5.
Método de Rietveld. 6. Estrutura cristalina. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE VINÍCIUS DANILO NONATO BEZZON, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 18 dias do mês de fevereiro do ano de 2013, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Biblioteca do Instituto de Química de Araraquara, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS DE OLIVEIRA P SANTOS do(a) Departamento de Físico-Química / Instituto de Química de Araraquara, Profa. Dra. SELMA GUTIERREZ ANTONIO do(a) Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, Prof. Dr. HUMBERTO GOMES FERRAZ do(a) Departamento de Farmácia / Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de VINÍCIUS DANILO NONATO BEZZON, intitulado "DEFINIÇÃO DE LIMITE PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIMORFOS DO FÁRMACO FINASTERIDA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X POR POLICRISTAIS". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. CARLOS DE OLIVEIRA P SANTOS



Profa. Dra. SELMA GUTIERREZ ANTONIO



Prof. Dr. HUMBERTO GOMES FERRAZ

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Dr. Carlos de Oliveira Paiva Santos pela orientação neste trabalho e todos os ensinamentos que pude adquirir nesses dois anos de convivência.

Ao Professor Dr. Marcelo Ornaghi Orlandi pela co-orientação e amizade.

À minha mãe e meu pai, irmã, avós, tios, primos pelo amor incondicional e apoio quando tudo parecia sem solução.

À Selma G. Antonio pela paciência e apoio nas horas difíceis.

À Natália, Dervani, Celso, dona Rosa e família pelo carinho e amizade duradoura.

Ao amigo Willian que mesmo nas suas teimosias me fez crescer como pessoa e ao Alex que me fez crer que é na humildade que nos tornamos gente grande.

Aos amigos de laboratório, Diego, Simone, Neide pela troca de experiências e pelos momentos de descontração.

Ao Rafael pela troca de ideias e conversas sobre política.

Aos amigos que fiz em Araraquara, em especial à Juliane pelo carinho e amizade.

E à todos os amigos do LIEC e funcionários do IQ-UNESP que tornaram possível a realização desse trabalho.

Aos Doutores Flávio Machado de Sousa Carvalho do ICG - USP e Prof. Fábio Furlan Ferreira do CNH - UFABC pelas medidas de difração de raios X nos equipamentos Bruker D8 Advance e Stoe Stadi-P, respectivamente.

A Capes a concessão da bolsa de mestrado

E a todos que de maneira direta ou indireta estiveram presentes na minha vida e formação.

RESUMO

Polimorfismo é a propriedade de moléculas cristalizarem em mais de uma forma cristalina, o que pode afetar suas propriedades físico-químicas. Esse fenômeno está presente também em fármacos, e a avaliação de matérias-primas para manter o controle do polimorfo presente em comprimidos comercializados tem um papel importante na indústria farmacêutica. A identificação e o controle de formas polimórficas podem ser realizados utilizando diversas técnicas, dentre as quais: Análise térmica, espectroscopia na região do infra-vermelho, espectroscopia Raman e a difração de raios X por policristais (DRXP). Esta última é uma técnica que permite a caracterização de fases cristalinas, quantificação de amorfo utilizando padrões internos, e por meio do método de Rietveld o refinamento de estrutura cristalina e a quantificação das fases presentes na amostra. No entanto, alguns fatores limitam a identificação e quantificação das fases em misturas em análises por DRXP, e estão relacionados a parâmetros estruturais da amostra como a baixa simetria e grande volume da cela unitária, à características físicas como forma e tamanho dos cristalitos, e resolução dos difratômetros que são definidas pela geometria, fendas, monocromatização do feixe e sistema de detecção.

Palavras-Chave: Fármacos; Polimorfismo; limites de identificação e limites de quantificação; difração de raios X; método de Rietveld; estrutura cristalina.

ABSTRACT

Polymorphism is the property of molecules to crystallize in more than one crystal form, which may affect physicochemical properties. This phenomenon is also present in pharmaceuticals, and evaluation of raw materials to maintain the control of the polymorph present in tablets plays an important role in the pharmaceutical industry. The identification and control of polymorphic forms can be performed using various techniques, among which Thermal analysis, infrared spectroscopy, Raman spectroscopy and X-ray powder diffraction. The latter is a technique that allows among other things characterization of crystalline phases, quantification of amorphous using internal standards and, by means of Rietveld method, refinement of the crystal structure and quantification of phases present in the sample. However, several factors limit the identification and quantification of the phases in mixtures, and are related to structure parameters of the sample, such as low symmetry and large unit cell volume, the physical characteristics such as crystallite size and shape, and the resolution of diffractometers which are defined by the geometry, slits, beam monochromatization and detection system.

Keywords: Pharmaceuticals; polymorphism; identification and quantification limits; X-ray diffraction; Rietveld Method; crystalline structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de polimorfos.	24
Figura 2: Relação entre a energia de Gibbs G e temperatura para dois polimorfos em situações de enantiotropia e monotropia, respectivamente.	27
Figura 3: Estrutura da molécula da finasterida.	30
Figura 4: Sobreposição dos picos da Forma I e II da FNT - difratogramas simulados.	31
Figura 5: Representação das transições eletrônicas responsáveis pela emissão dos raios X característico.	43
Figura 6: (a) espectro contínuo (radiação branca); (b) espectro característico.	44
Figura 7: Lei de Bragg.	45
Figura 8: Geometrias de difratômetros.	49
Figura 9: Relação abertura da FD com o comprimento do feixe incidido na amostra.	50
Figura 10: Disposição das fendas - aparelhos convencionais.	51
Figura 11: Influência da fenda de recepção no perfil do pico de difração.	52
Figura 12: Contador proporcional a gás (esquerda), detector sensível à posição (direita), detector de estado sólido <i>RTMS</i> (abaixo).	56
Figura 13: (a) barquinha de alumina; (b) mufla de aquecimento utilizadas no tratamento térmico.	68
Figura 14: Difratograma simulado da Forma I da FNT com as posições dos picos mais intensos indicadas na figura. Simulação realizada com os parâmetros: Raio do difratômetro = 185 mm, fenda de divergência = $0,25^\circ$, fenda de recepção = 0,30 mm; tamanho de cristalito de 300 nm para cada forma.	81
Figura 15: Difratograma simulado da Forma II da FNT, as posições dos picos mais intensos estão indicadas. Simulação realizada com os parâmetros: Raio do	

difratômetro = 185 mm, fenda de divergência = 0,25°, fenda de recepção = 0,30 mm; tamanho de cristalito de 300 nm para cada forma.	82
Figura 16: Gráfico de Rietveld das amostras <i>Finasterida A</i>	83
Figura 17: DSC e TG das amostras (a) e (b) <i>Finasterida A</i>	83
Figura 18: Gráfico de Rietveld das amostras <i>Finasterida B</i>	85
Figura 19: DSC e TG das amostras (a) e (b) <i>Finasterida B</i>	86
Figura 20. DRXP das amostras obtidas por meio do tratamento térmico da Finasterida A. Nos destaques estão as regiões onde se poderiam observar os picos da Forma I.	88
Figura 21: Difrátograma observado (linha azul) e calculado (linha vermelha) antes do início do refinamento da <i>Finasterida A</i> tratada termicamente.	89
Figura 22: Difrátogramas observado, calculado e diferença da <i>Finasterida A</i> tratada termicamente. Após o refinamento do fator de escala, cela unitária e deslocamento da amostra.	90
Figura 23: <i>Finasterida A</i> tratada após refinamento do fator de escala, cela unitária, deslocamento da amostra, tamanho isotrópico de cristalito.	91
Figura 24: Refinamento anisotrópico e correção de orientação preferencial – <i>Finasterida A</i> após tratamento térmico.	92
Figura 25: Ampliação da linha base em que se pode perceber que a radiação de fundo não foi ajustada adequadamente.	93
Figura 26: Variação do ajuste no perfil do pico ao ser refinado o valor para a fenda Soller.	94
Figura 27: (a) Ampliação da região onde deveria ocorrer a sobreposição do pico da Forma I, se presente. (b) Ampliação de uma região onde só existem picos da Forma II.	95

Figura 28: Gráfico de Rietveld final para a <i>Finasterida A</i> após o tratamento térmico – Forma II.....	96
Figura 29: Refinamento da amostra com Forma II levando também em consideração a Forma I.....	97
Figura 30: DSC Forma II da FNT - após tratamento térmico.....	98
Figura 31: Refinamento da Forma I - difratômetro Rigaku RINT2000.....	100
Figura 32: Refinamento da Forma II - difratômetro Rigaku RINT2000.....	101
Figura 33: Refinamento da Forma I – difratômetro Siemens D5000.	102
Figura 34: Refinamento da Forma II – difratômetro Siemens D5000.	103
Figura 35: Refinamento da Forma I – difratômetro Bruker D8 Advance.....	104
Figura 36: Refinamento da Forma II – difratômetro Bruker D8 Advance.....	105
Figura 37: Refinamento da Forma I – difratômetro Stoe Stadi-P.....	107
Figura 38: Refinamento da Forma II com Forma I – difratômetro Stoe Stadi-P.....	108
Figura 39: (a) Dimensão da faixa angular coberta pelo detector = 18,9°. (b) Dimensão da faixa angular coberta pelo detector = 8,47°.....	110
Figura 40: Comparação do tamanho de cristalito, levando em consideração o pico (0 0 1) do LaB ₆ e (0 1 6) da FNT Forma I.....	112
Figura 41: (a), (b) MEV da Forma I – FNT.	114
Figura 42: (a), (b) MEV da Forma II – FNT.....	115
Figura 43: Distribuição de tamanho de partículas para a Forma I da FNT em relação à (a) <i>largura</i> e ao (b) <i>comprimento</i>	116
Figura 44: Distribuição de tamanho de partículas para a Forma II da FNT em relação à (a) <i>largura</i> e ao (b) <i>comprimento</i>	116
Figura 45: MET da Forma I (a) delimitação da região em que existe um ordenamento referente aos planos atômicos e (b) imagem original sem a delimitação.	118

Figura 46: Padrão de difração de elétrons para a amostra <i>Finasterida B</i> – eixo de zona $[\overline{37} \ 60 \ \overline{5}]$	119
Figura 47: Quantificação de amorfo – Difratorômetro D2 Phaser – $R_{wp} = 7,51\%$; $\chi^2 = 3,65$	122
Figura 48: Quantificação de amorfo – Difratorômetro D8 Advance - $R_{wp} = 14,60\%$; $\chi^2 = 2,25$	123
Figura 49: Quantificação de amorfo – Difratorômetro Empyrean - $R_{wp} = 8,13\%$; $\chi^2 = 3,01$	124
Figura 50: Quantificação de amorfo – Difratorômetro RINT2000 - $R_{wp} = 20,04\%$; $\chi^2 = 2,02$	125
Figura 51: Quantificação de amorfo – Difratorômetro Stadi-P - $R_{wp} = 21,26\%$; $\chi^2 = 5,59$	126
Figura 52: Quantificação de amorfo nas matérias-primas: (a) Forma I com padrão; (b) Forma II com padrão - Difratorômetro D2 Phaser	128
Figura 53: Quantificação de amorfo nas matérias-primas: (a) Forma I com padrão; (b) Forma II com padrão - Difratorômetro RINT2000.....	129
Figura 54: Forma I em proporções de 0,5% a 5,0% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras - difratorômetro Rigaku RINT2000.....	132
Figura 55: Proporção mínima de 0,5% da Forma I na mistura possível de ser identificada, quando comparada ao difratograma da Forma II pura - difratorômetro Rigaku RINT2000.....	134
Figura 56: Forma I em proporções de 95,0% a 99,5% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras - difratorômetro Rigaku RINT2000.....	135

Figura 57: Proporção mínima de 0,5% da Forma II na mistura que não é possível ser identificada, quando comparada ao difratograma das formas puras - difratômetro Rigaku RINT2000.....	136
Figura 58: Mínima proporção de Forma II (1,0%) possível de ser identificada - difratômetro Rigaku RINT2000.....	137
Figura 59: Forma I em proporções de 0,5% a 5,0% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras – difratômetro Siemens D5000.....	138
Figura 60: (a), (b), (c) Difratogramas em que a Forma I aparece em menor proporção na mistura binária. Em nenhum dos casos fica evidente a contribuição da forma em menor proporção quando comparado com o difratograma das formas puras - difratômetro Siemens D5000.....	139
Figura 61: Menor proporção de Forma I possível de ser identificada na mistura binária quando comparada ao resultado para as amostras das formas puras - difratômetro Siemens D5000.....	140
Figura 62: Menor proporção de Forma II possível de ser identificada na mistura binária quando comparada ao resultado para as amostras das formas puras. (a) região sem sobreposição dos picos; (b) região em que existe a sobreposição dos picos das formas - difratômetro Siemens D5000.....	141
Figura 63: Difratogramas das misturas binárias das Formas I e II da FNT, juntamente com os difratogramas das formas puras. O difratograma da Forma II foi sobreposto ao difratograma das misturas - difratômetro Bruker D8 Advance.....	143
Figura 64: Comparação entre as amostras Forma I 0,5% e Forma I 1,0% juntamente com as formas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.....	144

Figura 65: Comparação das amostras FI_2,0% com as amostras das formas polimórficas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.....	145
Figura 66: Forma I em proporções de 99,5% a 95,0% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.	146
Figura 67: Proporção mínima de 0,5% da Forma II na mistura que não é possível ser identificada, quando comparada ao difratograma das formas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.	147
Figura 68: Medida lenta realizada com a amostra FI_99,5%, com 2s por ponto - difratômetro Bruker D8 Advance.	148
Figura 69: Menor proporção possível de ser identificada (1,0% da Forma II) - difratômetro Bruker D8 Advance.	149
Figura 70: Comparação entre o difratograma real e a curva alisada.....	150
Figura 71: Forma II obtida por tratamento térmico, juntamente com o seu difratograma simulado e a Forma I pura - difratômetro Stoe Stadi-P.	152
Figura 72: Proporção de Forma II que não é possível identificar - difratômetro Stoe Stadi-P.	153
Figura 73: Proporção de forma II que não é possível identificar - difratômetro Stoe Stadi-P.	154
Figura 74: Refinamento da amostra FI_0,5% - difratômetro Stoe Stadi-P.	159
Figura 75: Refinamento da amostra FI_99,5% - difratômetro Stoe Stadi-P.	160
Figura 76: (a) Problema de assimetria dos picos ($\bar{1} 0 1$) e $(1 0 1)$. (b) Sobreposição do pico ($\bar{1} 0 1$) e o invertido mostrando que o pico calculado (vermelho) é praticamente simétrico - difratômetro Rigaku RINT2000.....	162

Figura 77: Refinamento do padrão Y_2O_3 utilizado para evidenciar o problema de assimetria dos picos causada possivelmente pelo desalinhamento das fendas: (a) e (c) ajuste antes do refinamento do valor das fendas; (b) e (d) ajuste após o refinamento do valor das fendas - difratômetro Rigaku RINT2000.....	163
Figura 78: Refinamento da amostra FI_0,5% - difratômetro Rigaku RINT2000.	166
Figura 79: Refinamento da amostra FI_99,5% - difratômetro Rigaku RINT2000. ...	166
Figura 80: Refinamento da amostra FI_99,5% sem levar em consideração a Forma II no refinamento. $R_{wp} = 13,38\%$, $\chi^2 = 5,23$ - difratômetro Rigaku RINT2000.....	167
Figura 81: Refinamento da amostra FI_99,0% - difratômetro Rigaku RINT2000. ...	168
Figura 82: Refinamento da amostra FI_0,5% - difratômetro Siemens D5000.	169
Figura 83: (a) e (b) Refinamento da amostra FI_99,5% - difratômetro Siemens D5000.....	170
Figura 84: Refinamento da amostra FI_0,5%.....	172
Figura 85: Refinamento da amostra FI_1,0%.....	173
Figura 86: Refinamento da amostra FI_99,5%.....	174
Figura 87: Refinamento da amostra FI_99,0%.....	175
Figura 88: Variação no perfil dos picos de difração da amostra FI_99,5% pelo mudança no tamanho de cristalito das formas polimórficas.	180
Figura 89: Mínima proporção identificada com um tamanho de cristalito de 15nm para ambas as formas polimórficas envolvidas nas misturas.....	181
Figura 90: Simulação amostra FI_99,5% com ruído de fundo baixo. No destaque estão os picos da Forma II.	182
Figura 91: Simulação amostra FI_99,5% com ruído de fundo médio.....	183

Figura 92: Simulação amostra FI_99,5% com ruído de fundo alto. A seta aponta para o pico (0 1 1) da Forma I que praticamente não se pode identificar devido ao ruído da medida.....	184
Figura 93: Simulação dos padrões de difração na região entre 16,2° e 18,2° para se avaliar a contribuição do pico (1 1 2).....	186
Figura 94: Simulação da proporção FI_0,5% com cristalitos de 300nm.....	186
Figura 95: Simulações da influência do ruído nas medidas – cristalitos de 300nm.	187
Figura 96: Simulação com tamanho de cristalito variado para as formas polimórficas – Forma I com cristalitos de 300nm e Forma II com cristalitos de 30nm.....	188
Figura 97: Ensaio de dissolução intrínseca para as amostras com misturas binárias dos polimorfos da finasterida. (a) amostra FI_99,5% altamente solúvel no meio de dissolução; (b) amostra FI_95,0% insolúvel no meio de dissolução.	189

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEME – Central de Medicamentos

CSD – Cambridge Structural Database

DHT – di-hidrotestosterona

DRXP – Difração de Raios X por Policristais

DSC – Differential Scanning Calorimetry

DTG – Derived Termogravimetry

EG – Eixo do goniômetro

FD – Fenda de divergência

FNT – Finasterida

FR – Fenda de recepção

FS – Fenda Soller

FWHM - Full width at half maximum

HRTEM – High Resolution Transmission Electron Microscopy

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

ME – Microscopia Eletrônica

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MO – Microscopia Ótica

MR – Método de Rietveld

OMS – Organização Mundial da Saúde

PNM – Política Nacional de Medicamentos

PSD – Position Sensitive Detector

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RMB - Relação Nacional de Medicamentos Básicos

RTMS – Real Time Multiple Strip

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TG – Termogravimetry

VDI – Velocidade de Dissolução Intrínseca

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Polimorfos e pseudopolimorfos da FNT. Entre parênteses é o desvio padrão relativo ao(s)último(s) algarismo(s) significativo(s).....	33
Tabela 2: Faixa de temperatura utilizada nas análises térmicas.....	67
Tabela 3: Amostras em proporção para quantificação de amorfo	74
Tabela 4: Quantidade de material obtida após cada tratamento térmico	87
Tabela 5: Parâmetros de rede obtidos ao final dos refinamentos.	113
Tabela 6: Proporção de amorfo no Carbonato de Lítio	121
Tabela 7: Proporção em massa de amorfo na matéria-prima	127
Tabela 8: Dados para a fração pesada na balança (% em massa), proporções corrigidas após os dados do Stadi-P (% corrigida) e proporções em massa real (proporção cristalina + proporção amorfo).	157
Tabela 9: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do Stadi-P; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - $R_{wp} = 4,92\%$, $\chi^2 = 1,52$ - difratômetro Stoe Stadi-P.	158
Tabela 10: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do RINT2000; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - $R_{wp} 12,61\%$, $\chi^2 = 5,79$	165
Tabela 11: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do D8; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - $R_{wp} 16,02\%$, $\chi^2 = 1,62$	171
Tabela 12: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do D8; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - $R_{wp} 10,58\%$, $\chi^2 = 3,49$	177

Sumário

1	Introdução	23
1.1	Desenvolvimento de medicamentos e polimorfismo	23
1.2	Relação termodinâmica entre polimorfos.....	26
1.3	Nomenclatura dos polimorfos e o caso da finasterida	27
1.4	Política nacional de produção de medicamentos.....	28
1.5	Fármaco analisado – finasterida	30
2	Objetivos	36
3	Introdução teórica.....	36
3.1	Técnicas para caracterização	36
3.1.1	Microscopia eletrônica	36
3.1.2	Análise térmica	38
3.1.2.1	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	39
3.1.2.2	Termogravimetria (TG)/Termogravimetria derivada (DTG)	40
3.1.3	Dissolução intrínseca.....	41
3.1.4	Difração de raios X	42
3.1.4.1	Difração de raios X por materiais policristalinos	46
3.1.4.2	Geometrias dos difratômetros	47
3.1.4.3	Colimação do feixe	49
3.1.4.4	Monocromatização	52
3.1.4.5	Detectores	53

3.1.4.6	Definição do perfil dos picos de difração e os Parâmetros Fundamentais	57
3.1.4.7	Método de Rietveld.....	60
3.1.4.8	Quantificação de fases pelo Método de Rietveld	63
4	Metodologia experimental	65
4.1	Preparação das amostras	65
4.1.1	Preparação das misturas binárias dos polimorfos da FNT	66
4.2	Análise térmica	66
4.3	Tratamento térmico.....	67
4.4	Microscopia eletrônica de varredura e transmissão.....	69
4.4.1	Indexação do padrão de difração de elétrons.....	70
4.5	Difração de raios X por policristais.....	71
4.5.1	Quantificação do amorfo.....	73
4.5.2	Simulações – difratogramas	77
4.5.3	Definição dos limites de identificação visual e quantificação pelo método de Rietveld	78
4.6	Dissolução intrínseca.....	79
4.6.1	Preparo da curva analítica	80
5	Resultados e discussões.....	80
5.1	Caracterização da matéria-prima.....	80
5.1.1	DRXP e análise térmica.....	80
5.1.2	Refinamentos das matérias-primas puras	99

5.1.3	Microscopia eletrônica.....	113
5.1.3.1	MEV e MET	113
5.2	Quantificação do amorfo no padrão interno Li_2CO_3	120
5.3	Quantificação do amorfo nas matérias-primas.....	127
5.4	Limites de identificação e quantificação.....	130
5.4.1	Limite de identificação	130
5.4.1.1	Rigaku RINT2000	131
5.4.1.2	Siemens D5000	137
5.4.1.3	Bruker D8 Advance	142
5.4.1.4	Stoe Stadi-P	151
5.4.2	Limite de quantificação	155
5.4.2.1	Stoe Stadi-P	156
5.4.2.2	Rigaku RINT2000	160
5.4.2.3	Siemens D5000	169
5.4.2.4	Bruker D8 Advance	172
5.5	Simulação das misturas binárias	177
5.5.1	Rigaku RINT2000	177
5.6	Dissolução intrínseca.....	189
6	Conclusões.....	191
6.1	Limites de identificação.....	192
6.1.1	Rigaku RINT2000	192

6.1.2	Siemens D5000	192
6.1.3	Bruker D8	192
6.1.4	Stoe Stadi-P.....	193
6.2	Limites de quantificação	193
6.2.1	Rigaku RINT2000	193
6.2.2	Siemens D5000	193
6.2.3	Bruker D8 Advance.....	194
6.2.4	Stoe Stadi-P.....	194
6.3	Simulação	194
6.4	Dissolução intrínseca.....	195
6.5	Outras considerações	195
7	Sugestões para trabalhos.....	196
8	Referências bibliográficas	197

1 Introdução

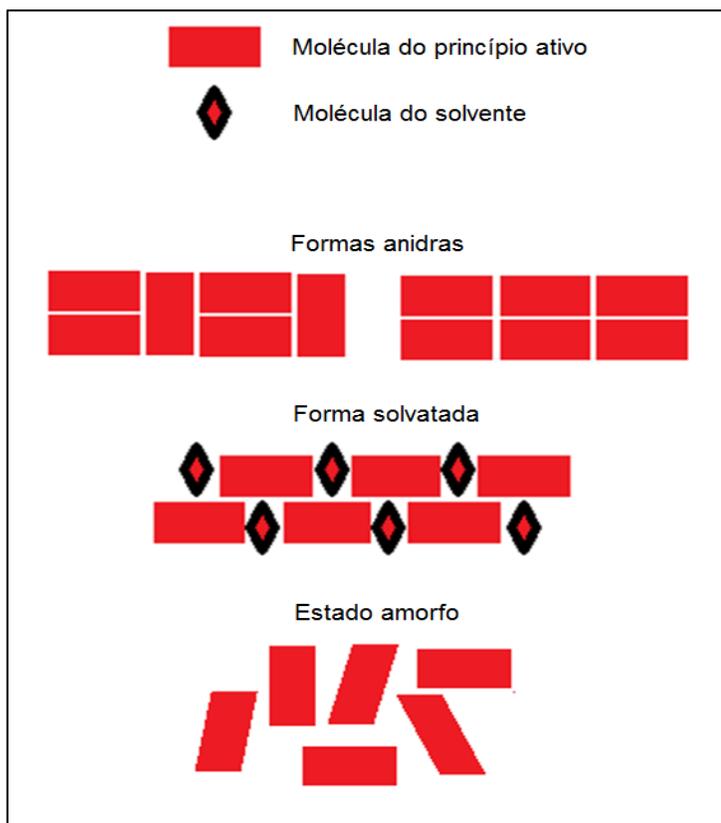
1.1 Desenvolvimento de medicamentos e polimorfismo

Polimorfismo é a tendência de uma substância se organizar em diferentes formas cristalinas mantendo sua estrutura química. Distintas formas polimórficas de uma substância podem apresentar propriedades físico-químicas diferentes, dentre as quais as temperaturas de fusão e sublimação, capacidade térmica, densidade, volume, dureza, cor, solubilidade, taxa de dissolução, entre outras [1].

Aproximadamente um terço dos compostos orgânicos apresenta o fenômeno de polimorfismo, e cerca de 80% dos compostos farmacêuticos possuem formas polimórficas [1]. Além das formas cristalinas anidras, são também classificadas como polimorfos as formas solvatadas (denominadas pseudopolimorfos) e o estado amorfo (Figura 1).

Os solvatos apresentam em sua estrutura moléculas do solvente utilizado para a síntese da matéria-prima (por exemplo, acetona, dioxano, metanol) e em casos que há a incorporação da água na estrutura do fármaco, este solvato é denominado hidrato.

Figura 1: Tipos de polimorfos.



Fonte: Adaptado de Hilfiker (2006) [1].

A forma hidratada pode aparecer no produto final de um medicamento, e a formação de hidratos ou mesmo processos de desidratação podem afetar o desempenho do medicamento no organismo. E é no próprio ambiente biológico que o problema se agrava. No organismo o medicamento é exposto a uma diferença de temperatura e a um ambiente úmido, de modo que esse processo de hidratação/desidratação da forma polimórfica pode produzir mudanças significativas na biodisponibilidade do medicamento [2].

Durante a síntese de uma matéria-prima é necessário que exista uma alta pureza no produto final e reprodutibilidade no processo para que não ocorram variações nas propriedades físicas e químicas, sendo desejável que exista a forma cristalina pura do polimorfo. No entanto, após a síntese, poderá ser obtido total ou parcialmente material no estado amorfo, sendo este menos estável física e quimicamente, apresentando alta solubilidade e alta taxa de dissolução [3]. A formação desse estado é induzida principalmente por quatro maneiras: moagem e compactação dos cristais, super-resfriamento do fármaco fundido, precipitação da solução, liofilização [4].

A produção da forma sólida do fármaco tem que ocorrer de modo consistente, produzida pura e a técnica ser reprodutível, sem que transições indesejáveis ocorram. Para isso, é necessário conhecer a potencial formação de solvatos da forma cristalina levando-se em consideração o ambiente de produção. As formas solvatadas possuem uma menor estabilidade quando comparadas às formas anidras, ou seja, são metaestáveis às condições ambientes, podendo transitar de fase para a forma mais estável [1].

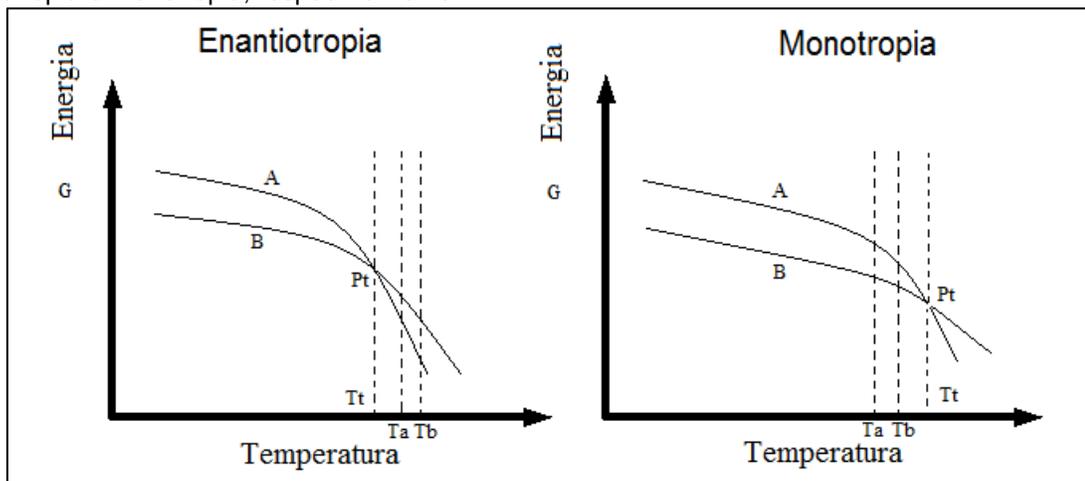
Além disso, durante o armazenamento a forma sólida não pode mudar, já que essa mudança poderia ocasionar variações em propriedades importantes do fármaco, a exemplo do Ritonavir, um medicamento administrado no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O Ritonavir começou a ser produzido em 1996 com o nome comercial Norvir®. Em 1998, após novas análises de dissolução dos lotes comercializados, um novo polimorfo foi identificado com uma solubilidade muito menor do que a forma cristalina inicialmente produzida [5].

1.2 Relação termodinâmica entre polimorfos

Curvas de energia-temperatura e pressão-temperatura são comumente utilizadas para avaliar os pontos de equilíbrio entre as formas polimórficas sobre a influência da umidade, temperatura e pressão. São necessárias para predizer, como reportado por Giron (1995) [6] possíveis mudanças no período de estocagem, estabilidade do medicamento e os processos de produção mais indicados.

Para o caso de dois polimorfos A e B, levando-se em consideração a variação da temperatura a uma pressão constante, a conseguinte transição de uma fase para outra pode ocorrer de duas maneiras. Na primeira situação em que A transita para B existe um ponto abaixo do ponto de fusão de ambos os polimorfos (ponto de transição) em que a transição é um processo reversível; essa relação denomina-se enantiotrópica. Quando não existe um processo reversível antes do ponto de fusão e um dos polimorfos é sempre estável abaixo do ponto de fusão de ambos [1] a relação é denominada monotrópica. Na Figura 2, G é a energia livre de Gibbs, P_t e T_t representam o ponto de transição e a temperatura de transição, respectivamente. Para o caso da monotropia, o ponto de transição está além dos pontos em que ambos os polimorfos se fundem, sendo esse ponto definido como de transição virtual. T_a e T_b correspondem aos pontos de fusão de A e de B.

Figura 2: Relação entre a energia de Gibbs G e temperatura para dois polimorfos em situações de enantiotropia e monotropia, respectivamente.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

1.3 Nomenclatura dos polimorfos e o caso da finasterida

Não existe uma convenção internacional para a nomenclatura das formas polimórficas. Como salienta Giron (1995) [6] alguns autores definem números romanos para representar as formas, enquanto outros utilizam classificação alfabética latina ou mesmo o alfabeto grego.

Parthasaradhi et al. (2004) [7] definiram duas novas formas cristalinas H1 e H2 para a finasterida sem caracterizá-las adequadamente. No entanto, Othman et al (2006) [8] verificaram que essas mesmas formas dizem respeito às formas solvatadas com estrutura cristalina determinada obtidas a partir do isopropanol e dioxano, respectivamente. Ainda neste trabalho, os autores apresentam contradições

encontradas nos trabalhos de Reddy et al (2005) [9] que fizeram referência à novas formas polimórficas da finasterida (Forma E e Forma M) que correspondem à Forma III definida em patente.

O problema que surge em relação à nomenclatura é evidente e uma padronização é necessária. Diversos polimorfos têm sido descobertos e muitos tendo sua estrutura cristalina determinada. Mesmo assim, para os que já possuem estrutura determinada, a falta de uma nomenclatura padrão prejudica especialmente a divulgação científica no âmbito farmacêutico.

1.4 Política nacional de produção de medicamentos

No ano de 1976 surgiu a Relação Nacional de Medicamentos Básicos (RMB) com a portaria MPAS/GM 514, sendo posteriormente atualizada e substituída pela Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, Portaria Interministerial MPAS/MS/MEC 03, 1982). O governo federal desativou a Central de Medicamentos (CEME) em 1997 (Medida Provisória 1.576, Decreto nº 2.283 e Portaria GM 1.085) sendo suas funções administrativas diluídas por instâncias do Ministério da Saúde e pelos estados e municípios.

Um importante avanço para o contexto de reforma sanitária no Brasil foi dado pela criação da Política Nacional de Medicamentos (PNM) pela portaria nº 3.916/MS de 12 de outubro de 1998, que foi formulada por meio das diretrizes da Organização

Mundial da Saúde (OMS), que entre suas orientações estão a adoção e revisão da RENAME, a regulamentação sanitária de medicamentos, o desenvolvimento científico e tecnológico, entre outras [10]. Cabe a ANVISA vistoriar e conceder registros de medicamentos divididos em medicamentos referência, similar e genérico.

O medicamento de referência é um produto inovador com eficácia e qualidade comprovadas junto ao órgão regulamentador. Esse medicamento é o que tem normalmente o domínio patentário do princípio ativo, cuja patente tem validade de 20 anos a contar a partir do depósito da mesma. Com a expiração da patente, o medicamento pode ser comercializado como similares e genéricos [11].

Os medicamentos similares são aqueles que possuem o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresentam mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento de referência registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária. Pode diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículo, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (Decreto nº 3.961, de 10 de outubro de 2001) [10].

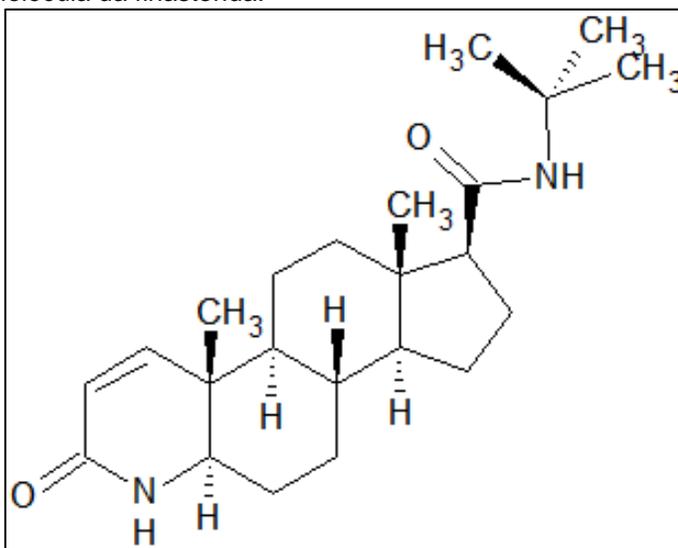
O medicamento genérico foi implementado a partir da Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999, e é análogo a um produto de referência ou inovador, e se pretende ser com este intercambiável. É produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança

e qualidade. São em geral mais baratos que os medicamentos de referência, já que sobre o produto não recaem os custos com pesquisa e desenvolvimento [10, 12].

A última atualização da RENAME foi publicada no Diário Oficial da União (DOU) do dia 29 de março de 2012. Dentre as inclusões de medicamentos, está a finasterida para o tratamento da hiperplasia prostática benigna que é um crescimento anormal da próstata.

1.5 Fármaco analisado – finasterida

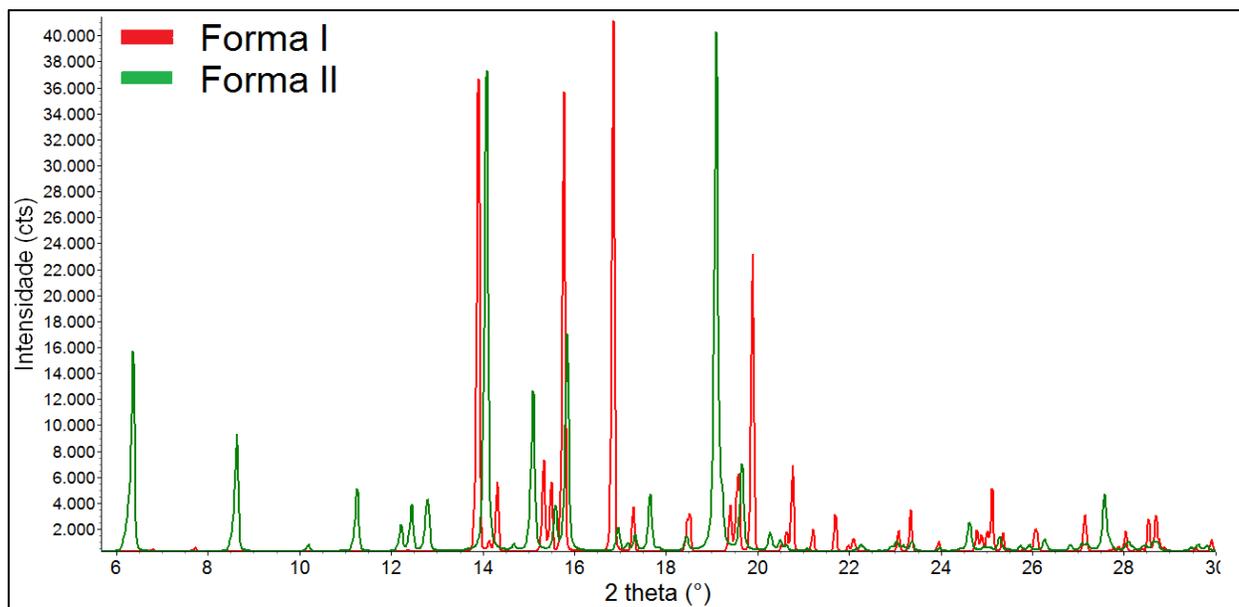
Figura 3: Estrutura da molécula da finasterida.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A finasterida (FNT, Figura 3), $C_{23}H_{36}N_2O_2$, 372,549 g/mol, nome IUPAC 17 β -(N-t-butilcarbamoil)-4-aza-5 α -androst-1-en-3-ona [13], foi escolhida para ser analisada neste trabalho, dentre outras sugestões como tibolona/isotibolona e espironolactona, por existir quantidade suficiente de material disponível no laboratório em que o trabalho foi desenvolvido, e por possuir alta sobreposição de picos das formas polimórficas em análises por difração de raios X por policristais. Como a sobreposição de picos pode causar ambiguidades nas análises (Figura 4), essa condição iria permitir identificar alguns cuidados necessários para esse e outros compostos com polimorfos em situação semelhante. No presente caso, os picos da Forma I podem não ser identificados claramente na presença majoritária de Forma II.

Figura 4: Sobreposição dos picos da Forma I e II da FNT - difratogramas simulados.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A finasterida é utilizada no tratamento da alopecia androgenética (AA, padrão masculino de perda de cabelo) com o medicamento contendo 1 mg do princípio ativo [14] e para o tratamento da hiperplasia prostática benigna (HPB), com 5 mg do princípio ativo no comprimido [15-16]. É um medicamento que inibe a enzima humana tipo II 5 α -redutase que metaboliza a testosterona em outro andrógeno (termo que diz respeito a composto natural ou sintético responsável pela manutenção das características masculinas) conhecido como di-hidrotestosterona (DHT). Essa enzima é encontrada essencialmente na próstata e em outros tecidos genitais, de modo que a próstata é um centro de conversão da testosterona em DHT. É vendida com as marcas comerciais Proscar® (5 mg do princípio ativo, tratamento da HPB) e Propecia® (1 mg do princípio ativo, tratamento AA) que são os medicamentos de referência comercializados pela empresa Merck & Co., entre outras marcas genéricas. A FNT possui dois medicamentos de referência, pois cada um é comercializado com uma quantidade de princípio ativo diferente, e são indicados para tratamentos terapêuticos distintos.

Na literatura é encontrada certa confusão em relação à apresentação dos polimorfos da FNT. As formas anidras I e II [17-18] possuem a estrutura cristalina determinada (código CSD: WOLXOK01 e WOLXOK02 para a Forma I – ortorrômbica; WOLXOK03 para a Forma II - monoclinica), enquanto que a Forma III [9] foi encontrado somente o difratograma presente na patente, não possuindo estrutura cristalina determinada. Além disso, segundo Othman et al. (2007) [8], a maneira com que é proposta a obtenção da Forma III na patente não é robusta o suficiente para que seja reproduzível, embora tenha conseguido obtê-la e caracterizá-la de fato como uma forma

anidra. Alguns solvatos são apresentados: metanol, ácido acético, dioxano, isopropanol, tetrahidrofurano e acetato de etila [8, 19] que possuem a estrutura cristalina determinada e estão disponíveis no banco de dados CSD (BEQKEN, WOLXEA, TIPGUV, TIJKON, TIPHAC e WOLXIE, respectivamente). Schultheiss et al. (2009) [19] caracterizaram mais três solvatos isoestruturais (butanona, acetona e tolueno), no entanto, não determinaram suas estruturas cristalinas. Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros cristalinos dos polimorfos e pseudopolimorfos da FNT.

Tabela 1: Polimorfos e pseudopolimorfos da FNT. Entre parênteses é o desvio padrão relativo ao(s) último(s) algarismo(s) significativo(s).

Código CSD	Grupo espacial	Parâmetros de rede			
		a (Å)	b (Å)	c (Å)	β (°)
<i>BEQKEN</i> *	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	11,607(2)	20,097(5)	10,449(4)	90
<i>WOLXEA</i> *	P 2 ₁	12,170(1)	8,1652(7)	13,577(1)	111,630(1)
<i>TIPGUV</i> *	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	8,1110(7)	18,0856(16)	35,512(3)	90
<i>TIJKON</i> *	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	8,1317(3)	17,7767(7)	35,734(1)	90
<i>TIPHAC</i> *	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	8,1132(3)	17,9012(8)	35,694(1)	90
<i>WOLXIE</i> *	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	8,173(3)	18,364(6)	35,650(2)	90
WOLXOK02 Forma I	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	6,437(1)	12,712(1)	25,929(1)	90
WOLXOK03 Forma II	P 2 ₁	16,387(2)	7,958(2)	18,115(5)	107,25(2)

*Solvatos

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A Forma I (P 2₁ 2₁ 2₁) é mais estável a temperatura ambiente do que a Forma II (P 2₁) sendo que as duas formas são polimorfos enantiotrópicos com evento térmico de transição da I para a II ocorrendo entre 200 e 230°C [8], dependendo da taxa de aquecimento.

1.6 Limite de detecção e quantificação de fases

A validação da técnica da difração de raios X por policristais é possível, haja visto a especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez que a mesma apresenta [20-21]. Uma vez que se enquadra nas exigências internacionais para a validação de métodos analíticos como o International Conference on Harmonisation (ICH) Q2 (R1) [22] e mesmo o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos divulgado pela ANVISA [23], a DRXP é uma eficiente técnica para a análise e controle de fármacos, corroborando com outros métodos de análises utilizados na indústria farmacêutica. Essas técnicas analíticas como espectroscopia Raman, espectroscopia na região do infravermelho, DSC, e DRXP vem sendo aplicadas para a quantificação de polimorfos de fármacos em misturas com proporções menores do que 1% em massa [20].

A ICH [22] determina três maneiras para se definir o limite de detecção e quantificação. A primeira delas é a avaliação visual, em que o limite é determinado pela análise da amostra com concentração conhecida do analito e estabelecendo o nível

mínimo ao qual o analito pode ser realmente detectado visualmente. A segunda é baseada no sinal-ruído, de forma que pode ser aplicada apenas a procedimentos analíticos que exibem ruído de linha base. A determinação da razão sinal-ruído é feita pela comparação de sinais medidos de amostras com baixa concentração conhecida de analito com aquelas de amostras padrão (branco) e a partir de então se pode determinar a menor concentração na qual o analito pode ser realmente detectado. Por fim, a terceira maneira para se identificar os limites é baseada no desvio padrão da curva de calibração da medida e da inclinação da mesma, e é calculado por equações específicas para limite de detecção e de quantificação.

Segundo o guia para validação da ANVISA [23], o limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada sob as condições experimentais estabelecidas.

Alguns fatores limitam a identificação de fases em uma mistura. Dentre esses limitantes estão granulação, tamanho de partícula, anisotropia e resoluções dos equipamentos (fendas utilizadas, geometrias, detector do difratômetro, monocromadores).

2 Objetivos

Definir os limites para a identificação e para a quantificação dos polimorfos da finasterida em misturas binárias, levando em consideração características físicas da amostra como forma e tamanho de cristalito e características instrumentais (resolução) de difratômetros de laboratórios de Universidades.

Fazer uso de simulações para elaborar recomendações sobre critérios para realizar medidas tanto para análises quantitativa de fases quanto para identificação de fases.

3 Introdução teórica

3.1 Técnicas para caracterização

3.1.1 Microscopia eletrônica

É possível por meio da Microscopia Eletrônica (ME) avaliar a estrutura interna dos materiais e determinar parâmetros físicos, o que é um limitante na Microscopia Ótica (MO) devido ao comprimento de onda da luz visível. Nos microscópios eletrônicos, os elétrons em alta energia são focalizados na amostra assim como a luz visível é focalizada na MO, e essa focalização do feixe de elétrons é realizada por meio de lentes eletrostáticas ou magnéticas. O aparato instrumental é

mantido em uma câmara de alto vácuo para que não haja a perda da intensidade do feixe de elétrons pela interação com o ar. Os elétrons são emitidos por uma fonte termiônica ou uma fonte de emissão de campo [24].

O feixe de elétrons ao interagir com a amostra provoca a emissão de outros tipos de radiação como elétrons retroespalhados, elétrons secundários, raios X característicos, elétrons Auger, e dependendo da exigência de cada amostra, um determinado tipo de radiação será utilizado na análise [24]. Os dois tipos de microscopia eletrônica comumente utilizadas são a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A MEV é utilizada principalmente para análises de forma e tamanho de partículas. É possível por meio dessa técnica a avaliação topográfica da amostra e uma grande vantagem é a possibilidade de combiná-la com a microanálise química. Possui uma resolução da ordem de 1 a 5 nm dependendo da amostra, da magnificação utilizada, entre outras variáveis [25]. Por outro lado, a MET pode ser utilizada para avaliar detalhes estruturais de até 0,1 nm. Neste caso, o feixe de elétrons incidente passa pela amostra e é espalhado, e para tanto a espessura da amostra deve estar na ordem de dezenas de nanômetros.

A aglomeração das partículas é um dos grandes problemas para a análise de fármacos por ME. A preparação da amostra é complexa, pois é difícil encontrar um meio líquido para a dispersão do material já que compostos como etanol, metanol, clorofórmio, entre outros e a própria água solubilizam alguns tipos de fármaco ocasionando a mudança de estrutura.

A MET possui algumas limitações no estudo de fármacos devido a dois fatores principais: forte interação do feixe de elétrons com a amostra, necessitando assim que esta possua uma espessura muito pequena, além da suscetibilidade do material orgânico ao feixe, causando danos à amostra [26].

Diferenças visuais ou aparência morfológica avaliadas de uma substância por meio da MEV não está necessariamente relacionada ao polimorfismo. Um composto pode produzir cristais com diferentes morfologias (hábitos) sem mudar a estrutura cristalina pelo crescimento preferencial em direções diferentes [6]. Dessa forma, outra maneira de identificar a estrutura polimórfica é a utilização da MET realizando difração de elétrons, que é complementar à difração de raios X, possibilitando a difração de um único cristal.

O padrão de difração de elétrons é único para cada estrutura e a utilização de imagens de alta resolução (HRTEM) possibilita identificar a direção preferencial de crescimento de materiais anisotrópicos e a avaliação dos conjuntos de planos atômicos dos cristais observados.

3.1.2 Análise térmica

As técnicas de análise térmica baseiam-se na transferência de calor entre a amostra e a atmosfera. Em geral, as amostras estão na forma de pó e a massa utilizada para a medida é muito pequena para que seja atingido o equilíbrio térmico mais rápido.

Os resultados estão diretamente relacionados com a taxa de aquecimento ou resfriamento, em que uma taxa lenta possibilita o equilíbrio térmico durante a análise e uma taxa alta provoca um atraso térmico entre a amostra e a fonte. Isto pode gerar um gradiente de temperatura entorno da amostra ocasionando erros nas medidas [25].

A atmosfera em volta da amostra serve para transferir calor e arrastar gases provenientes dos eventos térmicos. O gás de arraste utilizado pode ser ou não um gás inerte, e para o caso da utilização do gás inerte não há uma reação química deste com o material analisado. Dentre as técnicas de análise térmica, destacam-se:

3.1.2.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Essa técnica de análise tem por objetivo avaliar os eventos térmicos sem que haja mudança de massa, e entre esses eventos térmicos avaliados podemos destacar a análise de transformação de fase, transição vítrea, cristalização e fusão [35]. O termo diferencial remete à utilização de um padrão para a realização da medida em que é avaliado a diferença entre este e a amostra, sendo que os eventos térmicos analisados não ocorrem para o padrão na faixa de temperatura medida. É uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de polimorfos de fármacos, pois é muito sensível à transições estruturais que ocasionam trocas de energia.

Os experimentos de DSC são realizados utilizando uma taxa de aquecimento constante. Essa taxa está relacionada com os resultados obtidos referentes aos

eventos térmicos. Estes eventos dependem da transferência de calor e da difusão de átomos e moléculas, sendo necessário um tempo específico para o processo.

3.1.2.2 Termogravimetria (TG)/Termogravimetria derivada (DTG)

A termogravimetria é uma técnica utilizada na caracterização de materiais em que é avaliada a decomposição do material em relação à mudança de massa em função da temperatura aplicada. As variações da massa são medidas por uma termobalança e a amostra é mantida em um forno para aquecimento. A decomposição de uma amostra é representada por duas temperaturas características $T_{inicial}$ e T_{final} , em que a primeira diz respeito ao início da mudança de massa detectada pelo aparelho e a segunda é a temperatura em que a mudança de massa é completada [35]. A DTG é a derivada primeira da curva de TG, e é um recurso utilizado para avaliar mudanças de massa sutis, sendo possível separar reações sobrepostas. Esta técnica traz as mesmas informações do que a TG, embora o pico no gráfico de DTG enfatize o máximo valor para a perda de massa e a maior taxa com que ocorreu [14].

3.1.3 Dissolução intrínseca

A dissolução é um ensaio *in vitro* que permite a elaboração da curva de porcentagem do fármaco dissolvido em função do tempo. Possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à aparelhagem específica sob condições experimentais descritas [27].

Segundo ISSA (2011) [28], a dissolução intrínseca é o comportamento de dissolução de uma substância ativa pura e a determinação da velocidade de dissolução pode ser de grande importância para avaliar potenciais problemas durante o desenvolvimento de novas moléculas. Ainda conforme aponta o mesmo autor, a velocidade de dissolução intrínseca (VDI) é definida como a velocidade de dissolução de uma substância ativa pura, quando são mantidas constantes as condições de área superficial, temperatura, agitação, pH e força iônica do meio.

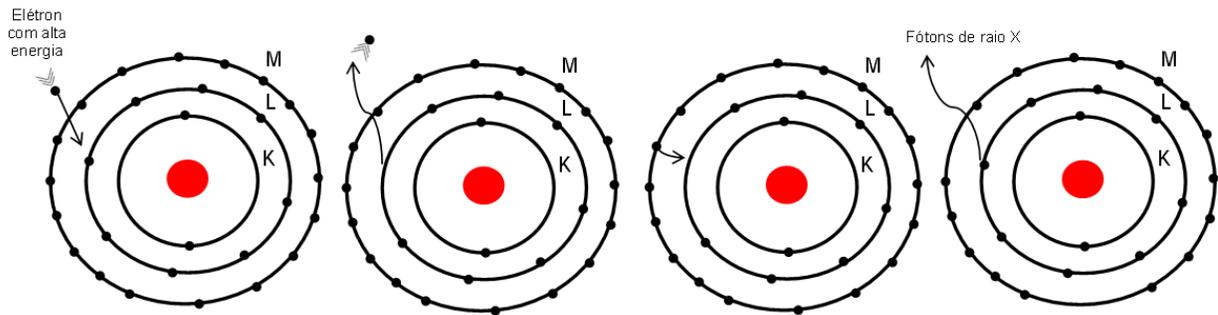
É possível correlacionar os valores obtidos para a velocidade de dissolução intrínseca com a solubilidade do fármaco. Essa variação na solubilidade do fármaco acarreta, conseqüentemente, variações na biodisponibilidade do medicamento.

ISSA (2011 apud YU e colaboradores 2004) [28] apresenta que para fármacos onde é possível obter uma boa correlação entre dissolução intrínseca e a solubilidade, o valor que limita a classificação de um fármaco em relação à sua solubilidade seria de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, ou seja, fármacos com VDI acima desse valor seriam classificados como de alta solubilidade, e abaixo desse valor fármacos de baixa solubilidade.

3.1.4 Difração de raios X

Os raios X são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda (λ) da ordem de 0,1-100 Å. Em cristalografia, o comprimento de onda utilizado está entre 0,5-2,5 Å, na mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas. São gerados basicamente de duas formas. Na primeira, a radiação é produzida dentro do tubo de geração, que consiste de dois eletrodos (catodo e anodo) e entre eles é produzida uma alta diferença de potencial. Devido às colisões dos elétrons com o material alvo são produzidos dois espectros distintos de radiação: o espectro contínuo e o espectro característico. O espectro contínuo é produzido quando elétrons são desacelerados pela interação com o núcleo do átomo do material alvo, causando a emissão de fótons de raios X. Essas desacelerações ocorrem de maneira diferente, formando um espectro composto por diversos comprimentos de onda que varia em relação à tensão de aceleração utilizada. Essa radiação é também denominada de radiação branca e na maioria das vezes é indesejável nas análises por difração [29-30]. Um exemplo de utilização da radiação branca é a técnica de Laue utilizada na orientação de monocristais [29].

Figura 5: Representação das transições eletrônicas responsáveis pela emissão dos raios X característico.



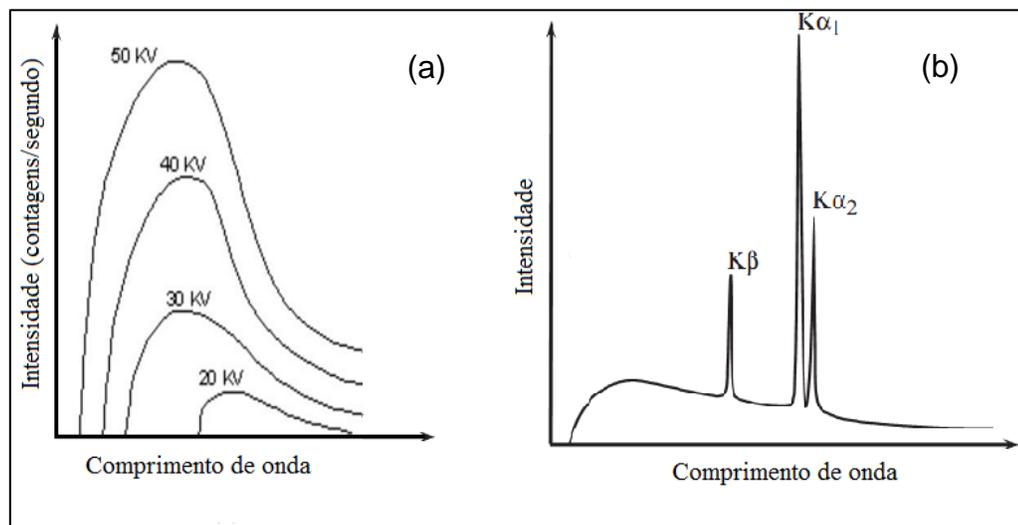
Fonte: Adaptado de Jenkins & Snyder (1996) [26] pelo autor deste trabalho.

Na estrutura eletrônica dos átomos, os elétrons ocupam órbitas com energias discretas. O bombardeamento com elétrons de alta energia no material alvo pode remover elétrons das camadas mais internas dos átomos, deixando lacunas e tornando-o ionizado. A tendência do átomo ionizado é voltar a um estado de menor energia através de transições eletrônicas de elétrons localizados em níveis mais externos, emitindo fótons de raios X com específicos comprimentos de onda. A energia do fóton liberado é igual a diferença de energias entre as camadas da respectiva transição. O espectro contendo esses comprimentos de onda é chamado espectro característico [30].

O feixe de radiação que deixa o tubo de geração é composto por diversos comprimentos de onda, e para a utilização em experimentos de difração é necessária uma monocromatização do feixe, que em fontes convencionais reduz os comprimentos de onda às contribuições K_{α} e K_{β} , ou no mínimo a $K_{\alpha 1}$.

A outra forma de produção de raios X é pelas fontes de radiação sincrotron. Elétrons de alta energia se movimentam em uma órbita circular, em um anel de armazenamento, próximos à velocidade da luz. Quando sofrem aceleração devido à trajetória curva, os elétrons emitem radiação eletromagnética. A potência de saída é muitas vezes maior do que a produzida pela fonte convencional. Para esse tipo de radiação existe uma relação entre a distribuição da intensidade do feixe de raios X e o comprimento de onda produzido, permitindo assim que este seja variado conforme a necessidade do experimento [30].

Figura 6: (a) espectro contínuo (radiação branca); (b) espectro característico.

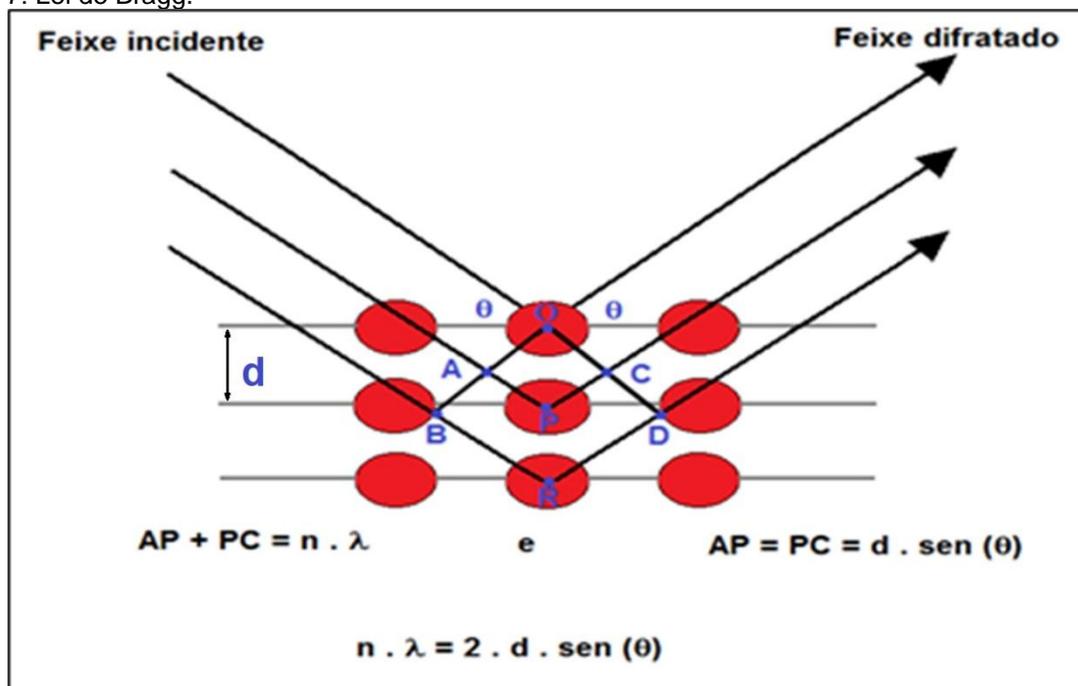


Fonte: Adaptado de Cullity (1976)[29] e Pecharsky (2009) [30].

Quando raios X incidem sobre a estrutura ordenada de um cristal, esta estrutura age como se fosse uma rede de difração. A difração pode ser definida como

um fenômeno de espalhamento de radiação eletromagnética por um arranjo periódico de centros de espalhamento, e o fenômeno só ocorre porque o comprimento de onda dos raios X e os centros de espalhamento (átomos) estão na mesma ordem de grandeza. Além disso, a lei de Bragg (Figura 7) que estabelece uma relação entre o comprimento de onda da radiação incidente, a distância interplanar (d) e o ângulo de incidência da radiação precisa ser satisfeita para que ocorra uma interferência construtiva da onda, formando o padrão de difração do material [30].

Figura 7: Lei de Bragg.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

3.1.4.1 Difração de raios X por materiais policristalinos

A análise de materiais por difração de raios X utilizando monocristais é muito eficiente, principalmente para a determinação estrutural. No entanto, nem sempre é possível que as amostras sejam preparadas como monocristais. A difração de raios X por materiais policristalinos é uma técnica versátil, que dentre algumas vantagens estão a possibilidade de se trabalhar em condições não-ambientes (variando temperatura e pressão sem muitas dificuldades), tempo reduzido de coleta de dados, quantificação de fases cristalinas e material amorfo, entre outras [31].

O termo “pó” pode se referir tanto a uma substância dividida em partículas muito pequenas quanto para blocos sólidos como metal, cerâmica, polímero, vidro ou mesmo filme fino ou um líquido [31]. O que deve ser levado em consideração são o número e tamanho de cristalitos individuais. Esses cristalitos devem estar aleatoriamente orientados na amostra e possuírem um tamanho pequeno, e segundo Will (2006) [31] devem possuir um tamanho menor do que 10 μm para a obtenção de bons resultados.

Dentre as dificuldades e limitações da difração por pó estão [31]

- i. A sobreposição de picos de difração causada pela:
 - a. Simetria, como em grupos espaciais cúbicos;
 - b. Baixa simetria e grande cela unitária, como os casos de orgânicos, entre eles os fármacos;
 - c. Resolução experimental;

- ii. Radiação de fundo que em alguns casos dificulta definir com precisão o perfil do pico de difração;
- iii. Distribuição não-aleatória dos cristalitos conhecida como orientação preferencial;
- iv. Alargamento do perfil do pico causado pela anisotropia do cristalito.

3.1.4.2 Geometrias dos difratômetros

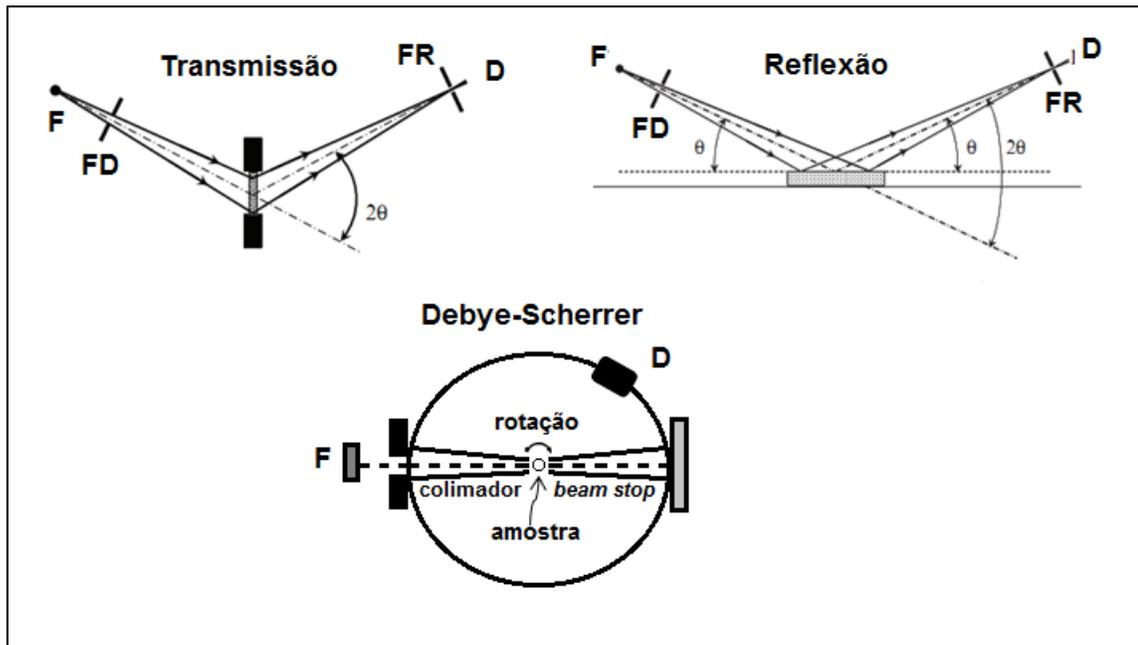
Os difratômetros são equipamentos utilizados para analisar o fenômeno da difração pela maneira com que os raios X são difratados por uma amostra cristalina conhecendo-se o comprimento de onda da radiação. Os tubos dos difratômetros produzem um feixe divergente, sendo necessária a utilização de geometrias focalizantes para que ocorra uma melhoria na resolução do instrumento. A maior parte dos difratômetros usados utiliza a geometria parafocal Bragg-Brentano. Nesta geometria o aparelho constitui-se de um goniômetro horizontal ($\theta - 2\theta$) ou vertical ($\theta - 2\theta$ ou $\theta - \theta$).

Para a colimação do feixe são utilizados aparatos como fendas Soller para divergência axial, fendas de divergência e recepção, espelhos focalizantes. Além da geometria Bragg-Brentano, alguns aparelhos utilizam a geometria de transmissão, e outros, a de Debye-Scherrer.

No primeiro, que opera no modo de reflexão, a intensidade espalhada é coletada após a reflexão da radiação na amostra. É indicado a materiais com alto

coeficiente de absorção e para aquisição de dados a superfície da amostra deve ser plana. Na geometria de transmissão, a intensidade espalhada é coletada depois da radiação ser transmitida através da amostra; é indicada a amostras com baixo coeficiente de absorção que podem ser preparadas em capilares ou finas folhas poliméricas. A desvantagem do modo de transmissão é que a focalização do feixe é menos precisa quando comparada ao modo de reflexão na geometria Bragg-Brentano [30]. Uma maneira de reduzir este problema é utilizar espelhos focalizantes que possibilita um perfil de intensidade homogênea sobre a amostra. Já na geometria Debye-Scherrer que também opera em modo de transmissão é utilizado um colimador que permite que a radiação da fonte de raios X chegue à amostra como um feixe paralelo. Esta é colocada em um capilar que gira durante a medida. Um segundo colimador (*beam stop*) é colocado atrás da amostra para reduzir o espalhamento secundário do feixe pelo corpo da câmera [32]. Na Figura 8, F representa a fonte emissora de radiação, FD fenda de divergência e FR fenda de recepção.

Figura 8: Geometrias de difratômetros.



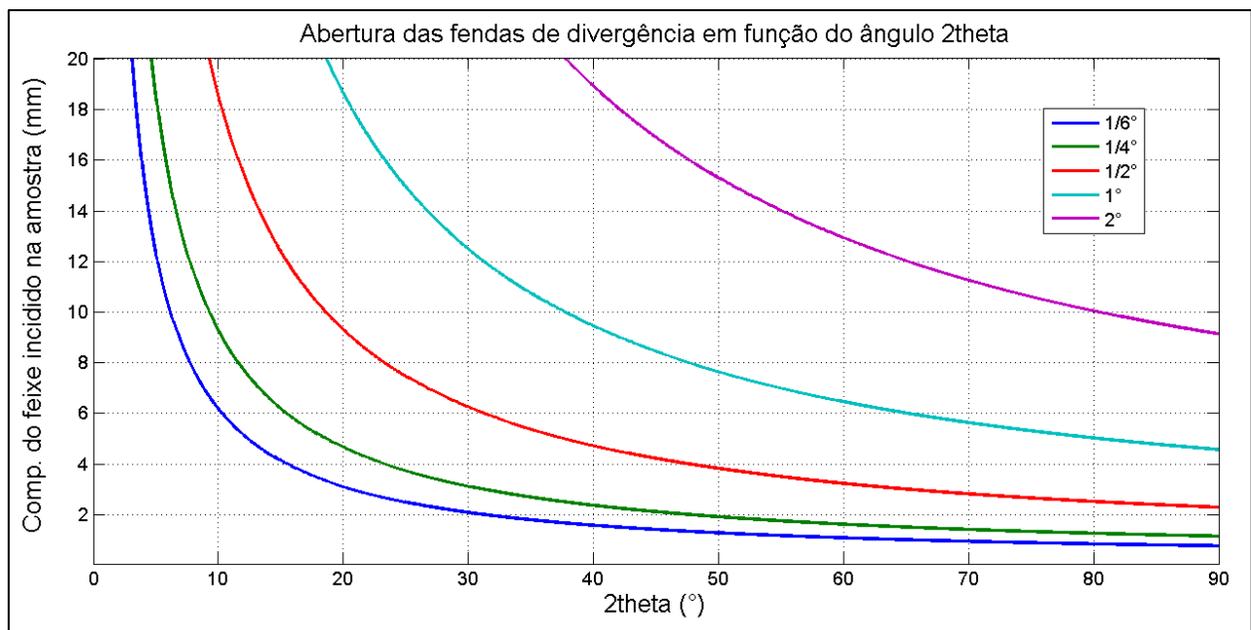
Fonte: Adaptado de Pecharsky (2009) [30] e Jenkins e Snyder (1996) [32].

3.1.4.3 Colimação do feixe

Fendas de divergência (FD): reduzem a divergência angular do feixe incidente por meio de sua abertura. Essa divergência é perpendicular ao eixo do goniômetro (EG – Figura 9) e limita a área da amostra que recebe radiação. É necessário que se escolha o valor adequado da FD levando-se em consideração as dimensões do porta-amostra que será utilizado na análise e o intervalo angular do primeiro pico de difração da amostra, como pode ser visto na Figura 9. Por exemplo, uma amostra que tem picos de difração começando em torno de 10° (2θ) e utilizando uma porta-amostra com diâmetro de 10 mm são indicadas fendas de divergência

menores de $\frac{1}{4}^\circ$ ou menores, já que fendas com abertura maior do que esse valor fazem com que a radiação incida também no porta-amostra, e conseqüentemente pode ocorrer a contribuição deste no difratograma da amostra. A relação depende do raio (R) do goniômetro, e a simulação a seguir foi realizada para o difratômetro Rigaku RINT2000 com $R=18,5$ cm, usando a relação $L(\theta) = FD \cdot R / \sin(\theta)$ onde L é o comprimento da amostra banhada pelo feixe incidente.

Figura 9: Relação abertura da FD com o comprimento do feixe incidido na amostra.

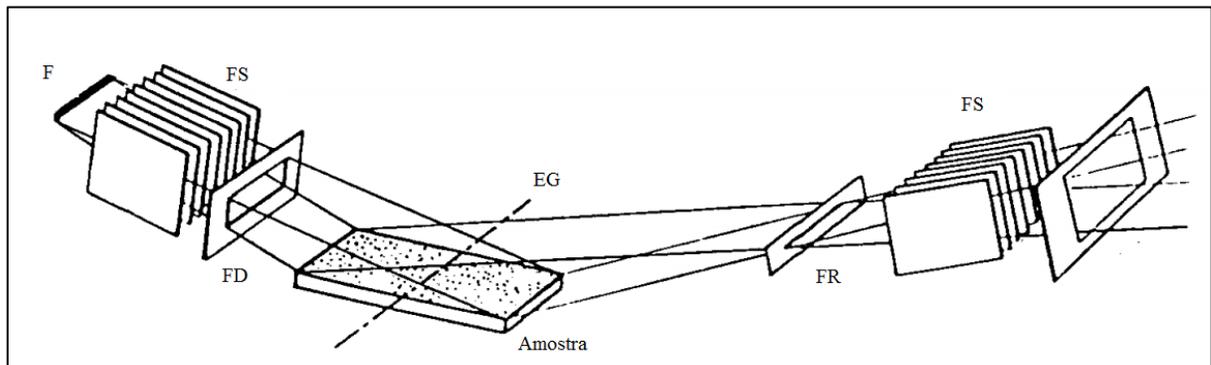


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Fendas Soller (FS): são utilizadas para limitar a divergência axial do feixe, ou seja, a divergência no sentido paralelo ao EG. É um conjunto de placas paralelas (como

se fossem diversas fendas de divergência agrupadas) colocadas tanto no feixe incidente como no feixe difratado (Figura 10).

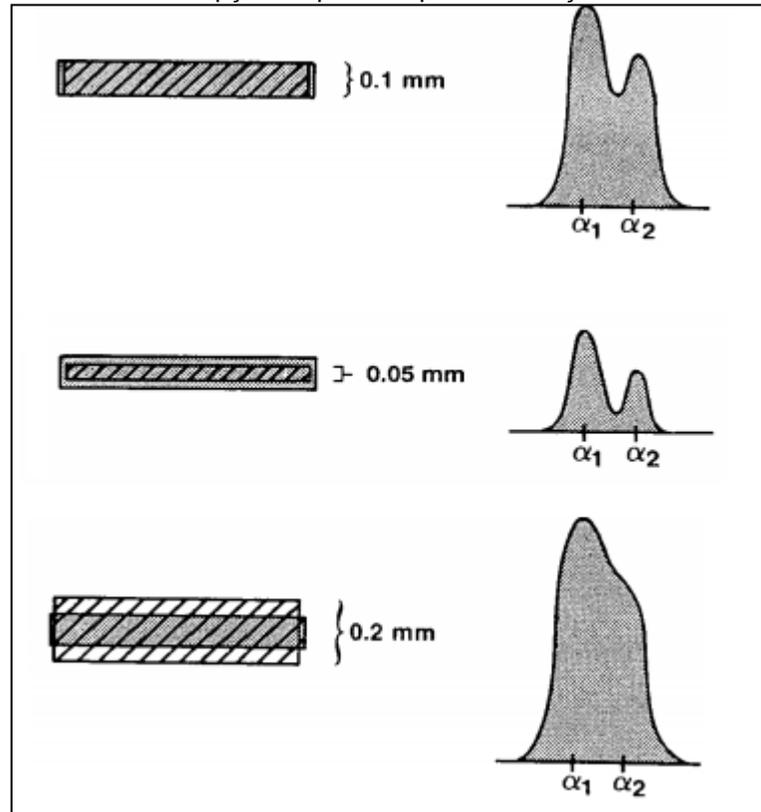
Figura 10: Disposição das fendas - aparelhos convencionais.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Fendas de recepção (FR): Essas fendas limitam a radiação que chega ao detector, havendo uma relação direta com a resolução e a intensidade do padrão de difração (Figura 11). O uso de uma abertura muito estreita não melhora a definição do pico e causa a perda de intensidade. Por outro lado, o uso de uma fenda mais larga, não causa o aumento da intensidade do pico, mas causa a perda de resolução (Figura 11).

Figura 11: Influência da fenda de recepção no perfil do pico de difração.



Fonte: Retirado de Jenkins e Snyder (1996) [32].

3.1.4.4 Monocromatização

A monocromatização é necessária para que apenas comprimentos de onda desejáveis sejam mantidos, como $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$ para equipamentos convencionais.

Filtros K_{β} : A borda de absorção de radiação desses filtros está entre os comprimentos de onda K_{α} e K_{β} do material alvo. O filtro escolhido deve absorver abaixo de K_{α} e acima de K_{β} . É composto por um elemento que possui um número atômico

menor do que o material utilizado como anodo. Por exemplo, no caso do anodo de cobre utiliza-se um filtro de níquel. A desvantagem é que a intensidade de K_{β} não é totalmente eliminada, mas apresenta por fim uma intensidade muito reduzida que está na mesma faixa de intensidade da radiação de fundo, e além disso, a intensidade do espectro como um todo é reduzida, ou seja, as intensidades das radiações $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$.

Monocromadores: São feitos de materiais como grafite, silício, germânio ou cloreto de lítio. Eles são dispostos no aparelho no caminho do feixe incidente ou após o feixe difratado, em ângulos específicos selecionando o comprimento de onda que chega ao detector. Como se tem definido a distância interplanar do cristal, colocando-o em um determinado ângulo é possível definir o comprimento de onda por meio da Lei de Bragg. Normalmente o monocromador é suficiente para eliminar K_{β} e radiação branca, mantendo as contribuições de $K_{\alpha 1}$ e $K_{\alpha 2}$. Utilizando-se um monocromador no feixe incidente (primário) é possível separar apenas a radiação $K_{\alpha 1}$. É encontrado em equipamentos de alta resolução[30] como no difratômetro Stadi-P da STOE, com monocromador primário de germânio usado em algumas medidas dessa dissertação.

3.1.4.5 Detectores

A principal função dos detectores é converter fótons que chegam a ele em sinais ou efeitos que podem ser então processados e analisados. É importante ser

avaliado a eficiência do detector, ou seja, a capacidade que ele tem de coletar fótons de raios X e convertê-los em um sinal que poderá ser mensurado.

Dentre os tipos mais comuns de detectores estão os detectores pontuais (contadores proporcionais a gás e contadores de cintilação) e detectores sensíveis à posição (como os lineares).

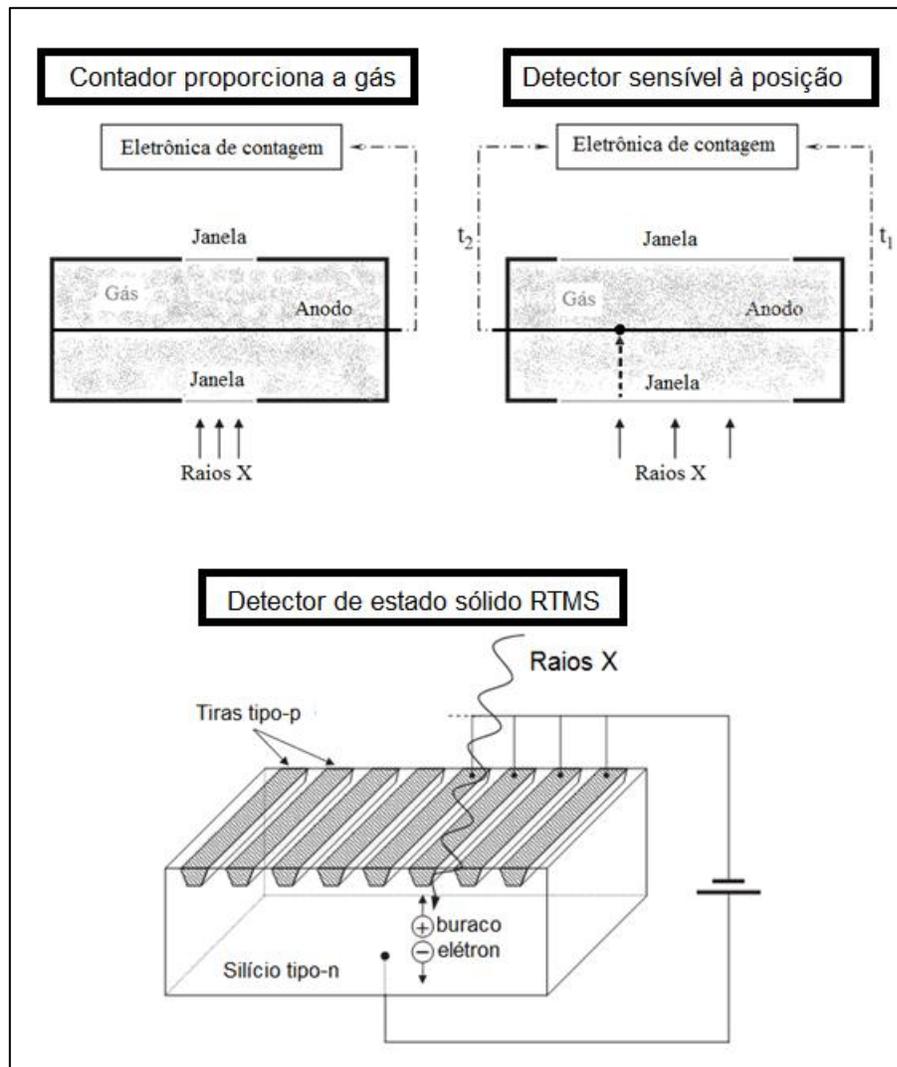
Contadores proporcionais a gás: consiste de um corpo cilíndrico utilizado como catodo contendo uma mistura de gases e um fio central utilizado como anodo. Os fótons que chegam ao detector ionizam o gás produzindo pares iônicos que são coletados como corrente elétrica. Apresentam boa resolução e os sinais podem ser analisados e separados para eliminar a contribuição de fótons com a energia $K\beta$ e radiação branca [30].

Contadores de cintilação: é constituído de um cristal cintilador acoplado a um tubo fotomultiplicador. O fóton faz com que o material de que é feito o detector sofra o fenômeno de fluorescência emitindo radiação em luz visível. Como essa radiação emitida é muito pequena, cabe ao tubo fotomultiplicador (por meio de dinodos) amplificar o sinal gerando uma corrente mensurável. O material normalmente utilizado é o iodeto de sódio dopado com tálio que emite luz no comprimento de onda do azul[29]. A resolução do comprimento de onda desse tipo de detector é muito baixa. Além disso, fótons $K\beta$ não podem ser distinguidos e separados pelo detector. No entanto, esses detectores apresentam alta estabilidade principalmente para alto fluxo de fótons[30].

Outros detectores de estado sólido utilizados são os de silício e germânio dopado com lítio. A interação dos fótons com esse material produz pares elétron-buraco proporcionais à energia do fóton. A diferença de potencial aplicada resulta em uma corrente induzida dos fótons que é amplificada e medida. Esses detectores apresentam alta resolução à baixa temperatura e facilitam a separação de fótons K_{β} e de radiação branca, resultando em um baixo *background* sem significativa perda de intensidade da radiação $K_{\alpha 1}/K_{\alpha 2}$. Uma das desvantagens desse tipo de detector é o seu pequeno intervalo linear que pode resultar em problemas quando picos muito intensos são medidos [30].

Detectores lineares: esses detectores tem o mesmo princípio de funcionamento que os contadores proporcionais a gás, com a vantagem de que é possível medir a intensidade dos picos de difração em diversos pontos ao mesmo tempo. As medidas são realizadas em um tempo muito inferior quando comparado aos demais detectores, e a qualidade se aproxima do contador proporcional gás.

Figura 12: Contador proporcional a gás (esquerda), detector sensível à posição (direita), detector de estado sólido RTMS (abaixo).



Fonte: Adaptado de Pecharsky (2009 [30]).

A partir do momento em que o fóton ioniza o gás produzindo os pares iônicos, estes são coletados pelo fio em forma de corrente elétrica. O evento elétrico é medido em dois pontos do fio, de modo que com a diferença de tempo para a coleta,

sabendo-se o tamanho do fio, pode-se definir a posição do ponto em que ocorreu o evento. Dessa forma, é possível que seja medido um maior intervalo angular de 5° a 10° para PSD linear curto e de 120° a 140° 2θ para PSD curvado longo, de uma só vez [30].

Detector de estado sólido *Real Time Multiple Strip (RTMS)*: Esse tipo de detector aplica o princípio dos detectores de estado sólido. Tiras de silício p-dopado são depositadas sobre pastilhas de silício n-dopado. A diferença de potencial elétrico aplicado para cada tira através da pastilha resulta em uma corrente elétrica induzida, obtida a partir dos pares elétron-buraco produzidos pela absorção do fóton de raios X, que é então amplificada e medida. A corrente medida para cada tira fornece informação sobre a posição na qual o fóton de raios X foi absorvido pelo detector (Figura 12) [30]. Esses detectores trabalham com múltiplos canais, ou seja, diversas dessas tiras para a coleta de dados.

3.1.4.6 Definição do perfil dos picos de difração e os Parâmetros Fundamentais

O perfil do pico de difração depende da natureza da radiação, da resolução do instrumento e das características físicas intrínsecas da amostra. A função que define a forma do perfil do difratograma é uma convolução de funções, cada qual relacionada

à contribuição de três elementos principais: (i) *estrutura cristalina* que inclui os parâmetros de rede, parâmetros atômicos (x, y, z, B, etc...), cristalinidade, defeitos; (ii) *amostra* como absorção, rugosidade superficial, orientação preferencial, tamanho de cristalito, tensão e deformação; e (iii) *parâmetros instrumentais* como radiação (comprimento de onda e monocromatização), geometria e alinhamento do difratômetro, divergência axial do feixe de radiação. Além disso, é acrescentada a contribuição do background à função resultante. De forma geral, essas funções estão relacionadas à posição, intensidade e forma do perfil do padrão de difração [30].

A função de perfil de um pico (FP) é definida por:

$$FP(2\theta) = g(2\theta) \otimes h(2\theta) \otimes f(2\theta) + \mathbf{b} \quad (1),$$

em que $g(2\theta)$ representa a função instrumental que depende dos parâmetros geométricos, monocromadores, fendas e amostra. Essa função é sintetizada pela convolução de funções instrumentais específicas $j(2\theta)$ já com a contribuição da distribuição espectral dos comprimentos de onda; $h(2\theta)$ é o perfil puro de difração em que são levadas em consideração as características físicas da amostra; $f(2\theta)$ depende da natureza da fonte geradora de raios X e do modo como foi obtida a monocromatização e \mathbf{b} representa a função do *background* [33].

A função $j(2\theta)$ também é uma convolução de diversas outras funções referentes à aberração instrumental associada com o difratômetro, ou seja,

$$j(2\theta) = j_1 \otimes j_2 \otimes j_3 \otimes j_4 \otimes j_5 \otimes j_6 \otimes j_7 \quad (2),$$

em que Fonte de radiação j_1 ; Superfície planar da amostra j_2 ; Divergência vertical j_3 ; Transparência da amostra j_4 ; Fenda de recepção j_5 ; desalinhamento do difratômetro j_6 ; dispersão espectral j_7 .

Os perfis de pico de difração podem ser modelados de maneiras distintas, como elucidadas por Pecharsky (2009) [30]: função empírica, modo semi-empírico e parâmetros fundamentais.

Pela função empírica, o perfil é ajustado de maneira direta aos resultados, sem que seja associado aos parâmetros físicos da amostra. Por meio do modo semi-empírico são utilizadas funções para descrever a contribuição instrumental e das dispersões da radiação enquanto as propriedades intrínsecas da amostra são modeladas levando-se em consideração quantidades físicas reais. Já os parâmetros fundamentais ajusta o perfil usando modelos físicos para gerar a forma do perfil [34].

Com os parâmetros fundamentais é possível fazer simulações de difratogramas de compostos cristalinos com estrutura determinada, com determinada característica física, o que torna possível determinadas situações, como por exemplo, a sobreposição de picos em uma mistura de fases.

3.1.4.7 Método de Rietveld

Tem como característica o ajuste do difratograma calculado do material por meio das informações estruturais com o padrão difratométrico obtido na rotina de análise da amostra. Os resíduos da diferença entre o padrão calculado e observado é então minimizado através do princípio dos mínimos quadrados e o refinamento da estrutura é realizado até que um melhor ajuste seja alcançado.

Para a geração do padrão calculado são levadas em consideração as coordenadas atômicas, os deslocamentos atômicos, os parâmetros de rede. Para cada ponto do incremento angular é calculada uma intensidade y_i , e o número de pontos no padrão de difração é usualmente de milhares.

A quantidade minimizada pelos mínimos-quadrados é o resíduo S_y [35]:

$$S_y = \sum_i w_i (y_i - y_{ci})^2 \quad (3)$$

em que,

$w_i = 1/y_i$ (intensidade ponderada),

y_i = intensidade observada no ponto i

y_{ci} = intensidade calculada no ponto i

O padrão de difração é uma coleção de perfis de reflexões individuais, com uma altura, posição, largura e decaimento de pico específico e uma área para cada pico

proporcional à intensidade de Bragg, I_k , em que K representa os índices de Miller. A intensidade integrada é proporcional ao quadrado do valor absoluto do fator de estrutura, $|F_k|^2$.

As intensidades calculadas são obtidas a partir de valores de $|F_k|^2$ em que é utilizado o modelo estrutural para o cálculo, utilizando soma das contribuições das reflexões possíveis de Bragg mais a contribuição do background [35]:

$$y_{ci} = s \sum_K L_K |F_K|^2 \phi(2\theta_i - 2\theta_K) P_K A_{iK} + y_{bi} \quad (4)$$

onde

s é o fator de escala,

K representa os índices de Miller para a reflexão de Bragg,

L_K representa os termos para Lorentz-polarização e fator multiplicidade

ϕ é a função do perfil de reflexão,

P_K é a função para correção da orientação preferencial,

A_K é a função de assimetria na posição i

F_K é o fator de estrutura para a K -ésima reflexão de Bragg,

y_{bi} é a intensidade do background no i -ésimo ponto

Alguns índices referentes ao refinamento auxiliam na avaliação da qualidade do mesmo [36]. O índice R_{wp} é um importante fator já que reflete o valor residual sendo minimizado. Outro critério numérico é o índice de qualidade de refinamento S (goodness of fit), que é a razão entre o índice R_{wp} com seu valor estatisticamente

esperado (R_{exp}) e serve apenas para acompanhar o andamento do refinamento. A qualidade do modelo estrutural refinado é avaliada pelo índice R_{Bragg} .

$$R_{wp} = \frac{\sum_i w_i (y_i - y_{ci})^2}{\sum_i w_i (y_i)^2} \quad (5)$$

$$R_{Bragg} = \frac{\sum_K |I_{K0} - I_{Kc}|}{\sum_K I_{K0}} \quad (6)$$

$$S = \chi^2 = \frac{R_{wp}}{R_{exp}} = \sqrt{\frac{\sum_i w_i (y_i - y_{ci})^2}{n-p}} \quad (7)$$

onde,

n é o número de pontos considerados,

p é o número de parâmetros refinados,

w_i é o valor ponderado das intensidades,

y_i e y_{ci} são as intensidades observadas e calculadas no i -ésimo ponto e R_{exp}

é dado por:

$$R_{exp} = \sqrt{\frac{n-p}{\sum_i w_i (y_i)^2}} \quad (8)$$

Valores de S menores do que 1,0 podem indicar um modelo que contém mais parâmetros do que pode ser justificado pela qualidade dos dados. Para valores iguais a 1,0 R_{wp} atingiu o valor estatisticamente esperado.

Também se usa a estatística d de Durbin-Watson (d-DW) [37] para verificar a existência de correlação serial entre resíduos adjacentes obtidos pelo método dos mínimos quadrados. Para que as correlações não sejam estatisticamente significativas o valor para o índice tem que estar próximo de 2 [38]. Valores abaixo indicam que o desvio padrão foi subestimado e não representa o desvio padrão obtido pela repetição do experimento.

3.1.4.8 Quantificação de fases pelo Método de Rietveld

A quantificação de fases pelo Método de Rietveld é realizada levando-se em consideração os fatores de escala das fases constituintes da amostra. A intensidade espalhada é medida usando uma escala relativa arbitrária e a normalização é feita pela análise das intensidades calculadas e observadas usando os mínimos-quadrados. O fator de escala para cada fase é aplicável ao padrão de difração inteiro [30].

A equação para o cálculo envolve o produto da massa e volume da cela unitária de cada fase, e para o refinamento são ajustados os parâmetros estruturais, experimentais e, indiretamente, a fração em massa por meio do fator de escala [31].

$$W_p = \frac{S_p(ZMV)_p}{\sum_j S_j(ZMV)_j} \quad (9) [39]$$

onde,

W_p é a fração em massa relativa da fase p em uma mistura de j fases,

S, M, Z e V são o fator de escala, massa molecular de uma fórmula unitária, número de fórmulas unitárias por cela unitária e volume da cela unitária, respectivamente.

No entanto, essa equação não leva em consideração a absorção μ e o tamanho das partículas (diâmetro médio das partículas D) das fases envolvidas na análise. A correção necessária foi proposta por Brindley (1945) [40] e a correção para o método de Rietveld está descrita no trabalho de Taylor e Matulis (1991) [41] em que examinaram uma amostra contendo duas fases com uma diferença grande do coeficiente de absorção (elevado contraste de fase) e tamanho médio de partícula constante.

Para a correção de Brindley, o cálculo da fração em massa da fase é corrigido pelo acréscimo dos fatores de absorção da fase, como se segue:

$$W_p = \frac{S_p(ZMV)_p}{\left[\left(\frac{\sum_j S_j(ZMV)_j}{\tau_j} \right) \tau_p \right]} \quad (10)$$

A correção pode não ser necessária para casos em que as fases, mesmo apresentando alto contraste de absorção apresentem o produto $\mu D < 1$.

4 Metodologia experimental

4.1 Preparação das amostras

As amostras da matéria-prima da FNT utilizada neste trabalho foram doadas pelo Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - SP. Foram dois os lotes utilizados, denominados neste trabalho de *Finasterida A* e *Finasterida B*. Inicialmente, essas duas amostras foram analisadas por meio de DRXP utilizando o equipamento Rigaku RINT2000, com radiação Cu K α , fenda de divergência de $\frac{1}{4}^\circ$, fenda de recepção de 0,30 mm, fendas Soller de $2,50^\circ$, monocromador curvo de grafite, porta-amostra de alumínio com 20,0 mm de diâmetro e passo de varredura de $0,02^\circ$, equipamento disponível no Instituto de química (IQ) - Unesp. Foram realizados os refinamentos pelo método de Rietveld com as amostras.

Uma vez que a *Finasterida A* apresentou uma mistura das Formas I e II, foi realizado um tratamento térmico para a obtenção de um pó com apenas a Forma II, já que o outro lote, *Finasterida B*, continha a Forma I pura. A intenção foi de obter amostras com os polimorfos puros para a preparação de misturas binárias em proporção. Além da difração de raios X, os pós também foram caracterizados por análise térmica (DSC e TG).

4.1.1 Preparação das misturas binárias dos polimorfos da FNT

Foram preparadas misturas binárias dos polimorfos, nas proporções em massa que variaram de (x%)Forma I:(100-x%)Forma II, com $x = (0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5)$. Cada amostra foi preparada contendo um total de 1g de material na respectiva proporção, a fim de se determinar a menor proporção possível de ser identificada na mistura dentre as proporções preparadas.

4.2 Caracterização das amostras

4.2.1 Análise térmica

Os equipamentos e condições utilizados na análise térmica foram:

- DSC: TA Instruments modelo Q100, atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 100 mL e taxa de aquecimento de 10°C por minuto; como material de referência utilizou-se cadinho de alumínio vazio.
- TG: TA Instruments com célula SDT, atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 100 mL e taxa de aquecimento de 10°C por minuto.

Nas análises térmicas, o nitrogênio foi utilizado como gás de arraste tanto para as medidas de DSC quanto para as de TG, e os intervalos de temperatura são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 2: Faixa de temperatura utilizada nas análises térmicas.

Fármaco	Formas	Faixa de temperatura (°C)	
		DSC	TG
Finasterida	A	30-300	30-690
	B	28-300	28-693
	Forma II*	33-300	_____

* amostra obtida após o tratamento térmico (Forma II)

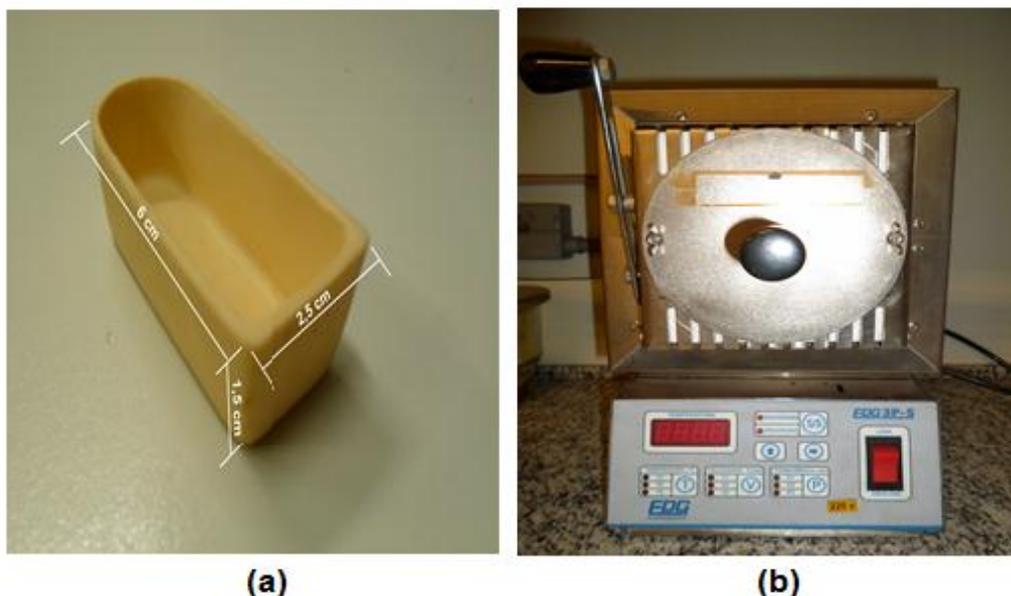
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

4.2.2 Tratamento térmico

Após a revisão bibliográfica (Othman et. al 2006 [8]), análise dos resultados da DSC e da TG, e de testes para avaliar a temperatura máxima e o tempo necessário para a completa transição da Forma I para a Forma II sem que houvesse a degradação da amostra, foram determinados os parâmetros para o tratamento térmico. Foi utilizada uma mufla, elevando a temperatura de 35°C até 205°C com taxa de aquecimento de 5°C/min e mantendo por 30 min a 205°C. Não foi possível controlar a taxa de

resfriamento, uma vez que este equipamento não possui sistema de resfriamento controlado. No entanto, foi deixado que a mufla resfriasse até uma temperatura de 65°C para retirar a amostra. Como recipiente para colocar o pó foi utilizada uma barquinha de alumina com 60,0 mm de comprimento, 25,0 mm de largura e 15,0 mm de profundidade, sendo que foi colocado material suficiente para preencher uma profundidade de cerca de 5,0 mm por vez para se manter a variação de temperatura mais homogênea possível por todo o material. No total foram realizadas três vezes esse procedimento para obter quantidade suficiente do polimorfo para a preparação das proporções em massa. Para cada amostra obtida no tratamento térmico foi realizada difração de raios X confirmando, assim, se o material resultante continha apenas o polimorfo desejado.

Figura 13: (a) barquinha de alumina; (b) mufla de aquecimento utilizadas no tratamento térmico.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Após o tratamento térmico a amostra foi novamente analisada por DSC, nas mesmas condições apresentadas anteriormente, a fim de se ter mais de uma técnica de caracterização para confirmar a presença do polimorfo puro.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Por MEV foram avaliadas forma e distribuição do tamanho das partículas, e logo em seguida, analisadas por MET (operando nos modos de baixa e alta resolução, e difração de elétrons).

Foi realizada difração de elétrons para se avaliar possível anisotropia e, para casos em que fosse observada, correlacionar o resultado obtido com a anisotropia média medida pelo refinamento da estrutura, utilizando a macro [42] implementada no programa Topas Academic V 4.1 [43]. Os equipamentos utilizados nas microscopias foram:

- MEV: JEOL modelo JSM 7500 – F, com canhão por emissão de campo (FEG).
- MET: Phillips modelo CM 200 operando em 200 kV.

Nas análises por MEV, o pó foi disperso em água destilada utilizando-se ponta-ultrassônica. Posteriormente, gotas desta suspensão foram depositadas sobre um substrato condutor de silício dopado. Para que os histogramas de distribuição de tamanho de partículas fossem elaborados, foram selecionadas 300 partículas nas micrografias e medidas suas dimensões levando em consideração a escala para cada medida. Para a distribuição do tamanho de partículas definimos as dimensões como *comprimento* que diz respeito à dimensão mais pronunciada e *largura* para a menor dimensão.

Por MET, as amostras foram pulverizadas em almofariz de ágata, tamisadas em peneira Mesh 200 e o pó disperso em água destilada. Neste caso, a suspensão foi depositada sobre grades de cobre recobertas com filme de carbono.

4.2.4 Indexação do padrão de difração de elétrons

A indexação seria necessária para determinar o(s) plano(s) de anisotropia caso fossem observados. Entretanto, não foi observada anisotropia das amostras da FNT, mas o procedimento foi realizado devido à sua importância em trabalhos futuros.

Por meio dos padrões obtidos a partir de monocristais foi realizada a indexação, em que foram considerados três vetores, cada um ligando o centro do padrão ao ponto correspondente à contribuição de um plano cristalino. Os planos possíveis e as respectivas distâncias interplanares para cada estrutura foi calculado por

meio do programa Topas Academic 4.1 [43] utilizando a estrutura cristalina do material. Esse cálculo, no entanto, é realizado levando em consideração o padrão policristalino para difração de raios X, o que implica que na indexação do padrão para monocristal há a necessidade de se considerar a multiplicidade para cada plano, de forma que sejam verificadas todas as possibilidades para os ângulos entre os vetores. O produto vetorial de dois vetores é correspondente ao eixo de zona que se encontra a amostra, e qualquer outro ponto da rede no espaço recíproco pode ser alcançado por vetores de translação. Uma vez obtida essas relações é possível garantir que o padrão diz respeito à estrutura cristalina analisada.

4.2.5 Difração de raios X por policristais

As amostras analisadas por DRXP foram pulverizadas em almofariz de ágata e preparadas sobre porta-amostra com diâmetro condizente com a área banhada pelo feixe. Para todos os difratômetros, os dados foram coletados com o porta-amostra girando.

Além do difratômetro Rigaku RINT2000, outros equipamentos foram utilizados para a conclusão deste trabalho, na análise das amostras em proporção e na quantificação de amorfo da matéria-prima, que foram:

- Difratorômetro Bruker D8-Advance com tubo de cobre, goniômetro de raio 288 mm e detector linear sensível à posição com abertura de $1,49^\circ$ e 194 canais para coleta dos dados. Fenda Soller primária e secundária de $2,5^\circ$; fenda de divergência de 0,2 mm ($0,122^\circ$) e fenda antiespalhamento de 3 mm. Passo de $0,0204^\circ$ (2 θ). Porta-amostra de acrílico com 20,0 mm de diâmetro.

- Difratorômetro Stoe Stadi-P, com tubo de cobre, modo de transmissão. Monocromador primário de Ge (111) com radiação Cu $K_{\alpha 1}$ pura; distância do feixe ao centro a amostra é de 130 mm e da amostra ao detector de 191 mm. O detector linear sensível à posição possui 1280 canais para coleta dos dados e abertura angular de $18,9^\circ$. A amostra foi colocada entre duas folhas poliméricas, e a radiação incidente na amostra foi limitada por um suporte metálico com abertura de diâmetro 3,0 mm.

- Difratorômetro Bruker D2 Phaser de bancada com tubo de cobre, goniômetro de raio 141,4 mm; detector linear sensível à posição com abertura angular de 5° com 194 canais para a coleta de dados. Fendas Soller primária e secundária de $2,5^\circ$ e fenda de divergência $0,37^\circ$. Porta-amostra de acrílico com 20,0 mm de diâmetro.

- Difratorômetro Panalytical Empyrean, tubo de cobre, goniômetro de raio de 240 mm, fendas Soller, fenda de divergência de $\frac{1}{4}^\circ$ e fenda antiespalhamento

$\frac{1}{2}^\circ$. Detector PSD com abertura angular de $3,46^\circ$. A amostra foi colocada entre duas folhas poliméricas, em um diâmetro de cerca de 20,0 mm.

Todos os refinamentos foram realizados utilizando o programa Topas Academic v. 4.1 [43]. Para a determinação do tamanho de cristalito foi utilizada uma aproximação do método de double Voigt [44] implementada nesse programa.

4.2.5.1 Quantificação do amorfo

O carbonato de lítio comercial da marca *Synth* com teor de pureza de 99,0% foi utilizado como padrão interno para determinar a fração de amorfo presente em cada amostra de matéria-prima. Para ser utilizado como padrão, o carbonato de lítio foi tamisado em peneira Mesh 200 e a sua fração de amorfo foi quantificada por meio do método de Rietveld usando como padrão interno a alumina (produzida pelo NIST¹ - SRM 676a) certificado com 0,98% de material amorfo.

Três diferentes proporções em massa da mistura carbonato de lítio (Li_2CO_3) + alumina (Al_2O_3) foram preparadas (Tabela 3). A alumina foi utilizada como recebida. As proporções foram pesadas em balança Shymadzu modelo AY220 (erro = 0,001g) e misturadas em almofariz de ágata usando pistilo.

¹ NIST: National Institute of Standards and Technology

O contraste no coeficiente de absorção das amostras é elevado ($126,4 \text{ cm}^{-1}$ para a alumina e $17,4 \text{ cm}^{-1}$ para o carbonato) de modo que foi realizada uma avaliação para verificar a necessidade da correção da microabsorção de Brindley [40]. A caracterização dos padrões por MEV para cálculo do tamanho das partículas foi parte do trabalho de doutorado de um dos integrantes² do nosso grupo de pesquisa, em que verificou que as correções de Brindley seriam desnecessárias, já que o cálculo do produto μD para ambas as fases forneceu valores abaixo de 1.

A proporção de amorfo de alumina na mistura corresponde aos valores apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Amostras em proporção para quantificação de amorfo

	Massa (g)	Proporção na mistura	Proporção do amorfo do padrão alumina na mistura
Al₂O₃ + Li₂CO₃	0,15 + 0,35	30% + 70%	0,29%
	0,25 + 0,25	50% + 50%	0,49%
	0,35 + 0,15	70% + 30%	0,69%

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

² Rafael Silva Nunes, defesa prevista para fevereiro de 2014.

A porcentagem em massa de amorfo foi obtida através do método de Rietveld utilizando o programa Topas Academic V. 4.1 [43]. Para a amostra em que foi utilizada a proporção de 30% em massa de alumina + 70% em massa de carbonato, o valor para a parte cristalina da alumina corresponde a 30,0%-0,29% (amorfo) = 29,71%. O cálculo para o amorfo no carbonato é feito como o exemplo a seguir. Para os dados obtidos com o difratômetro Rigaku RINT2000, a razão entre o valor calculado para a fração cristalina da alumina na amostra e o valor obtido no refinamento (34,15%) fornece um fator de escala que será utilizado para se determinar a proporção cristalina para o carbonato. De maneira geral, o cálculo é realizado da seguinte forma:

$$\frac{\% \text{pesada de alumina (cristalina)}}{\% \text{alumina obtida no refinamento}} = \textit{fator de escala} \quad (11)$$

$$\textit{fator de escala} \times \% \text{demais fases (refinamento)} = \% \text{cristalina das fases} \quad (12)$$

Assim,

$$[100\% - (\% \text{pesada de alumina (cristalina)} + \% \text{cristalina das fases})] =$$

$$\% \text{de amorfo na amostra} \quad (13)$$

Portanto, para o exemplo apresentado:

$$\frac{29,71\%}{34,15\%} = 0,8697$$

O valor da proporção cristalina do carbonato determinado no refinamento foi de 65,84%. Assim,

$$0,8697 \times 65,84\% = 57,26\%$$

Dessa forma,

$$[100\% - (29,71 + 57,26)] = 13,02\% \text{ de amorfo na amostra}$$

Estes mesmos cálculos foram realizados na quantificação do amorfo nas matérias-primas utilizando o carbonato como padrão interno.

Nos refinamentos para a quantificação de amorfo, foram colocados vínculos nos parâmetros instrumentais, como fendas utilizadas, correção para o detector PSD (para os equipamentos que utilizam esse tipo de detector), e vínculos também para parâmetros físicos (tamanho de cristalito) e estruturais (parâmetros de rede) nas três amostras em proporção de carbonato de lítio com alumina. Assim, foi possível garantir que os parâmetros refináveis variassem da mesma forma para as três amostras.

O resultado final para a proporção de amorfo foi calculado levando em consideração a média para as três medidas alumina + carbonato de lítio de cada equipamento, e dessas médias foi calculada a média global dos equipamentos, dada pela equação que se segue:

$$\bar{X}_g = \frac{[n \cdot \bar{X}_{D2} + n \cdot \bar{X}_{D8} + n \cdot \bar{X}_{Empyr} + n \cdot \bar{X}_{Rint} + n \cdot \bar{X}_{Stadi}]}{\sum n} \quad (14)$$

em que \bar{X} é a média das medidas para cada equipamento, n representa a quantidade de medidas para cada difratômetro. Foi calculado também o desvio de cada média em relação à média global para que fosse possível o cálculo do desvio padrão, que foi realizado por meio da equação 15.

$$s = \sqrt{\frac{(\bar{X}_{D2} - \bar{X}_g)^2 + (\bar{X}_{D8} - \bar{X}_g)^2 + (\bar{X}_{Empyr} - \bar{X}_g)^2 + (\bar{X}_{Rint} - \bar{X}_g)^2 + (\bar{X}_{Stadi} - \bar{X}_g)^2}{N-1}} \quad (15)$$

onde N representa a quantidade de equipamentos.

4.2.5.2 Simulações – difratogramas

Foram realizadas simulações de difratogramas das misturas binárias dos compostos estudados utilizando os Parâmetros Fundamentais [34] por meio do programa Topas Academic v. 4.1 [43], com frações em massa dos polimorfos.

As simulações foram realizadas utilizando os parâmetros instrumentais para o equipamento Rigaku RINT2000, com fenda de divergência de 0,25°, fenda de

recepção de 0,30 mm, fendas Soller de 2,50°, radiação Cu K α , monocromador curvo de grafite.

Com as simulações, foi possível definir os picos que iriam permitir a identificação de uma determinada forma quando presente minoritariamente, além de ser possível se familiarizar com os problemas nesse tipo de trabalho.

4.2.5.3 Definição dos limites de identificação visual e quantificação pelo método de Rietveld

Inicialmente, foram comparados os difratogramas dos polimorfos simulados com os difratogramas das formas polimórficas puras, a fim de corrigir o deslocamento dos picos devido ao deslocamento da amostra. Uma vez ajustados esses deslocamentos, os difratogramas das formas polimórficas puras foram utilizados para comparação com os difratogramas das misturas. Para cada equipamento foram consideradas duas situações diferentes, uma em que a Forma I apareceu na mistura em menor proporção de 0,5% a 5,0%, e a outra em que apareceu de 95,0% a 99,5%. As intensidades dos difratogramas das misturas foram normalizadas pela intensidade da forma de maior proporção, e as diferenças entre os difratogramas seriam do polimorfo em menor proporção. Desse modo, quando comparados com o difratograma da forma polimórfica pura, foi definido até quanto da menor proporção foi possível identificar visualmente.

Para os limites de quantificação, os difratogramas das proporções foram refinados e as fases quantificadas pelo método de Rietveld. Para os casos em que não foi possível identificar o polimorfo em menor proporção, ambas as formas polimórficas foram consideradas na quantificação para ser possível avaliar se deveriam aparecer no refinamento ou não, em virtude do resultado obtido.

4.2.6 Dissolução intrínseca

Para a avaliação da dissolução intrínseca da finasterida foi utilizado equipamento de dissolução Logan modelo D-800 (Logan Instruments Corp., Somerset, USA), no qual foram acoplados aparatos de disco rotativo Varian® (Varian Inc. Palo Alto, CA, Estados Unidos). Para o preparo dos compactados cerca de 100 mg do fármaco foram submetidos a pressão de 1000 psi em prensa hidráulica (American Lab., Charqueada, SP, Brasil) por 1 min. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando como meio de dissolução 900 mL de HCl 0,1 M + 1,0% de laurilsulfato de sódio a 37°C e velocidade de agitação de 200 rpm. Para a quantificação do fármaco dissolvido, alíquotas de 10 mL foram coletadas e submetidas a leitura em espectrofotômetro Beckman Coulter DU -640 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico no comprimento de onda de 255 nm. Após cada coleta, houve reposição do meio de dissolução. Para a realização dos cálculos foi utilizada

equação de reta gerada pela curva analítica construída com o fármaco nas mesmas condições do ensaio.

4.2.6.1 Preparo da curva analítica

Pesou-se 10 mg de finasterida em balança analítica Shimadzu AUW 220D que foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL contendo HCl 0,1 M + 1% laurilsulfato resultando em uma solução-mãe de concentração $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na sequência, diluições desta solução foram preparadas obtendo-se diferentes concentrações na faixa de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Beckman Coulter DU -640 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico no comprimento de onda de 255 nm.

5 Resultados e discussões

5.1 Caracterização da matéria-prima

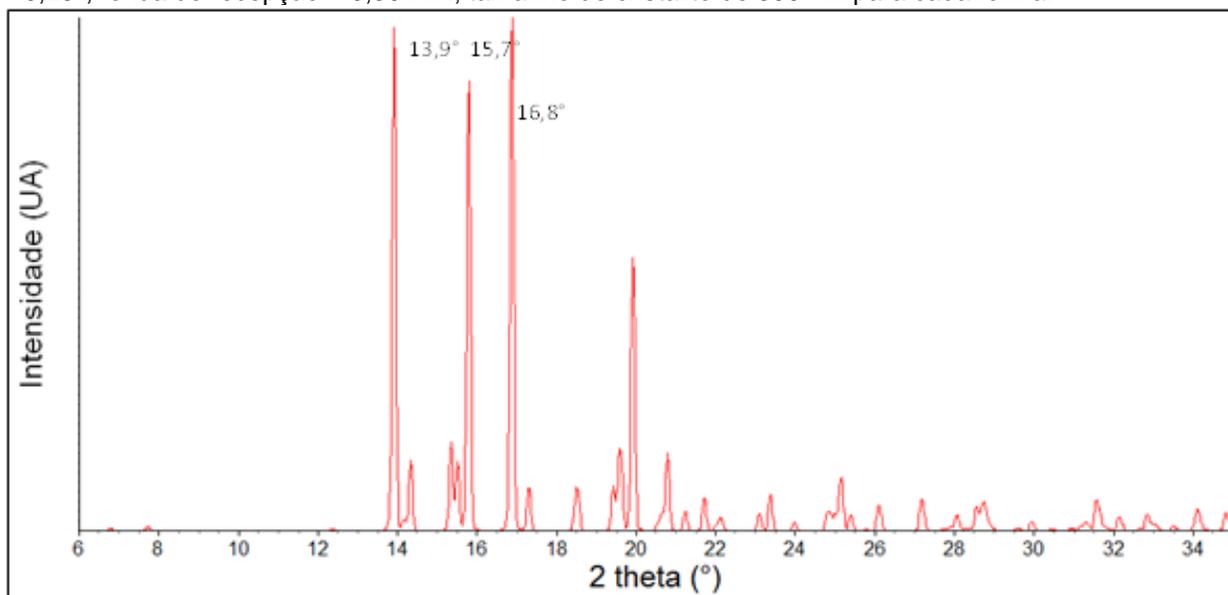
5.1.1 DRXP e análise térmica

Inicialmente foram simulados os difratogramas dos dois polimorfos da FNT utilizando os Parâmetros Fundamentais [34], levando em consideração os parâmetros

instrumentais do equipamento Rigaku RINT2000. Esses difratogramas foram gerados para identificar os picos característicos de cada forma.

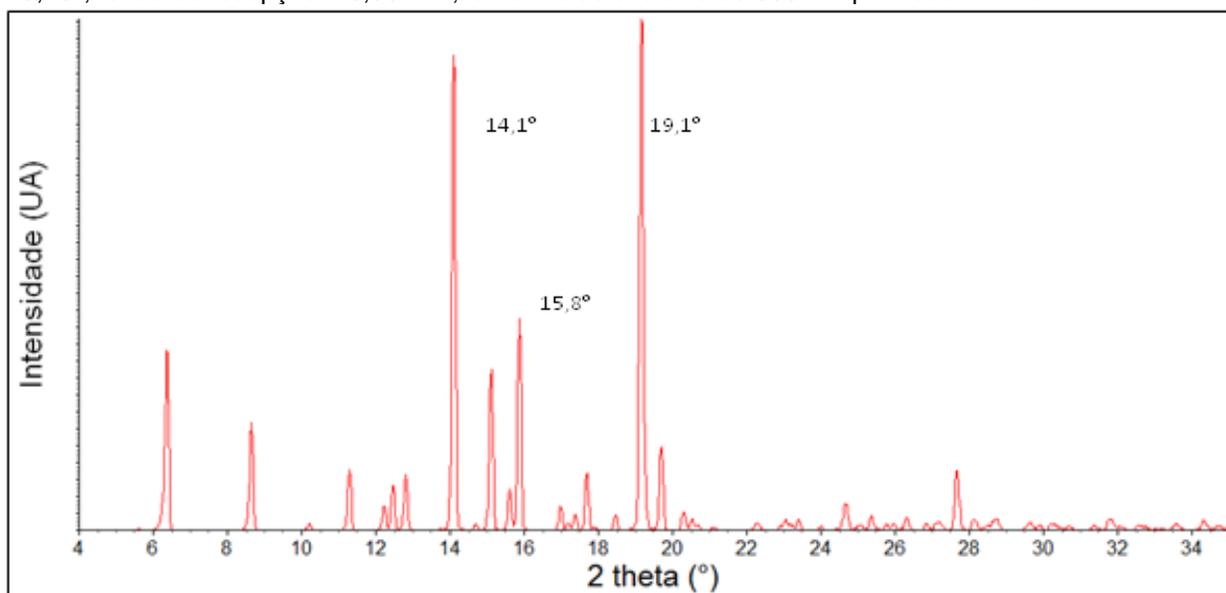
O difratograma da Forma I (Figura 14) apresenta os 3 picos mais intensos em 16,8°, 13,9°, 15,7°. Já para a Forma II (Figura 15) os 3 picos mais intensos estão em 19,1°, 14,1° e 15,8°. É importante observar que alguns picos de ambas as fases por estarem muito próximos, aparecerão sobrepostos. Além disso, em quantidade pequena, eles podem se sobrepôr à picos de baixa intensidade da outra forma, sendo isso discutido com detalhes nesse trabalho.

Figura 14: Difratograma simulado da Forma I da FNT com as posições dos picos mais intensos indicadas na figura. Simulação realizada com os parâmetros: Raio do difratômetro = 185 mm, fenda de divergência = 0,25°, fenda de recepção = 0,30 mm; tamanho de cristalito de 300 nm para cada forma.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 15: Difratograma simulado da Forma II da FNT, as posições dos picos mais intensos estão indicadas. Simulação realizada com os parâmetros: Raio do difratômetro = 185 mm, fenda de divergência = 0,25°, fenda de recepção = 0,30 mm; tamanho de cristalito de 300 nm para cada forma.

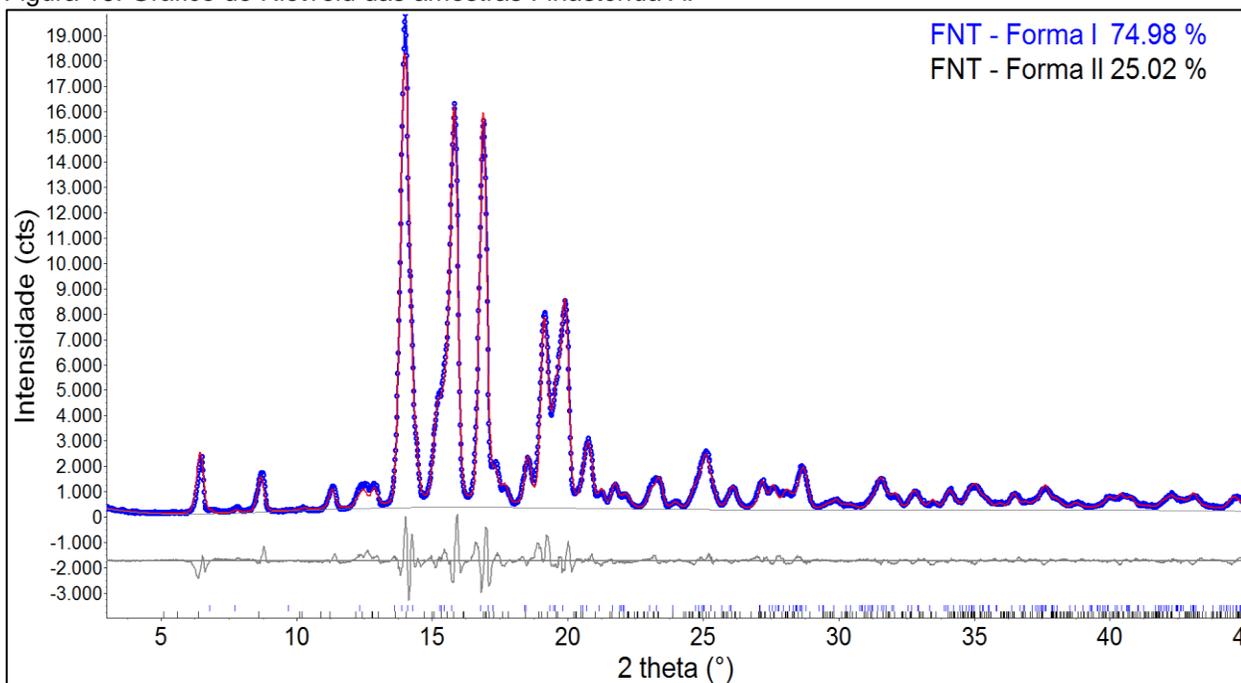


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os refinamentos pelo método de Rietveld mostraram que a *Finasterida A* continha uma mistura das Formas I (75,0%) e II (25,0%). Os índices do refinamento foram $R_{wp} = 9,85\%$, $\chi^2 = 3,69$, Forma I $R_{Bragg} = 1,75\%$ e Forma II $R_{Bragg} = 5,28\%$ (Figura 16).

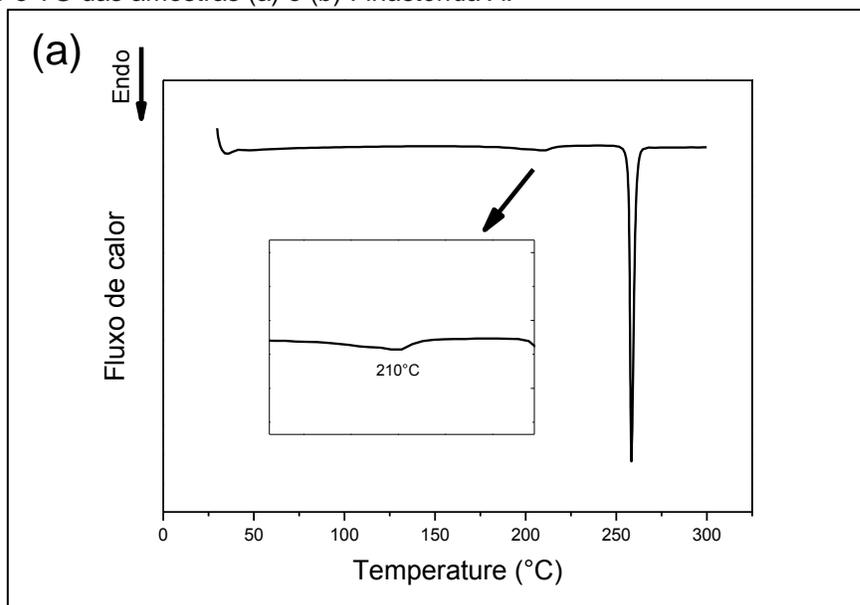
As medidas de DSC das matérias-primas mostraram um evento endotérmico para a amostra *Finasterida A* (Figura 17). O evento endotérmico da Figura 17(a) (em torno de 210°) está relacionado com a transição sólido-sólido da Forma I para a Forma II.

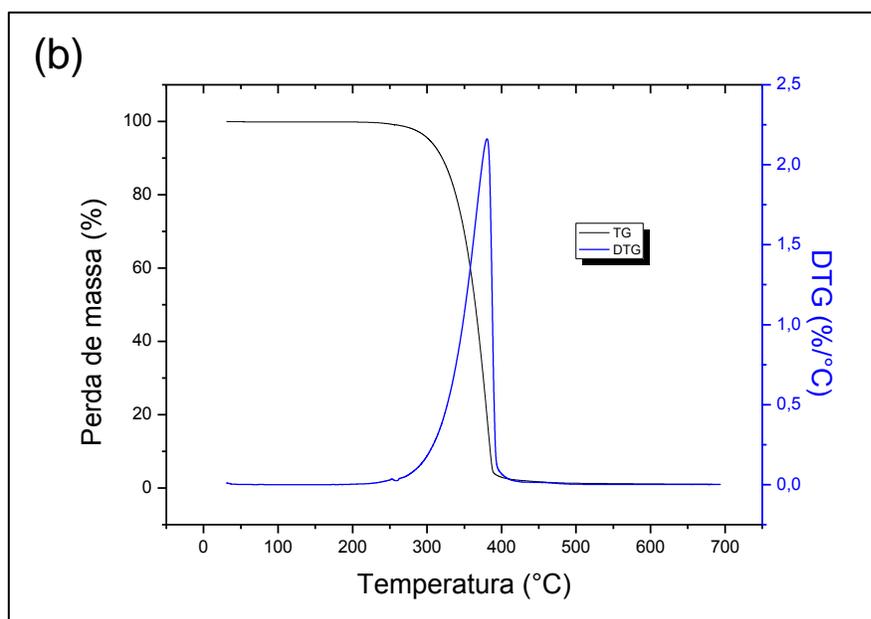
Figura 16: Gráfico de Rietveld das amostras *Finasterida A*.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 17: DSC e TG das amostras (a) e (b) *Finasterida A*.





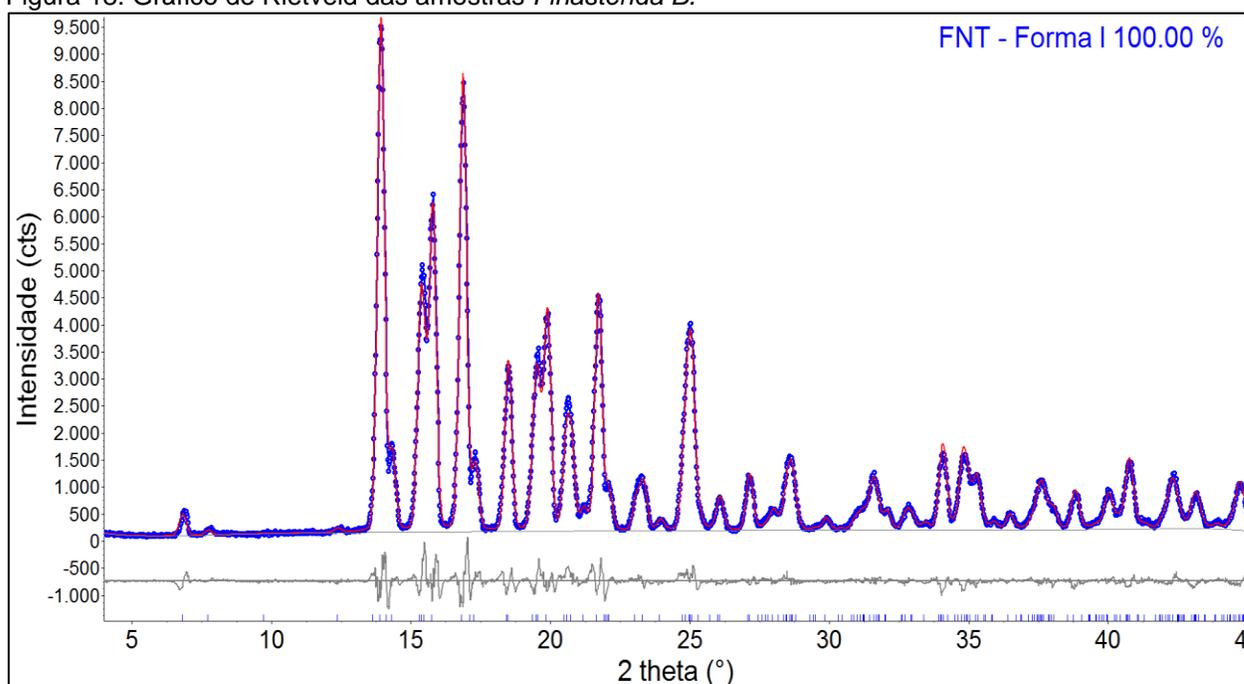
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

A *Finasterida B* apresentou somente a Forma I e os índices do refinamento foram $R_{wp} = 8,45\%$, $\chi^2 = 2,45$, $R_{Bragg} = 2,14\%$. O gráfico de Rietveld pode ser visualizado na Figura 18.

Quando comparada à Figura 19(a) a energia requerida para transição é muito inferior e a temperatura encontrada para o evento foi de 210°C , sendo que para a *Finasterida B* que foi encontrado somente a Forma I, o evento apresenta a temperatura de 239°C . Essa diferença pode estar relacionada à mudança em propriedades termodinâmicas na amostra em que existe a mistura das formas polimórficas. Por DTG, Figura 17(b) e Figura 19(b), é possível verificar que nenhuma perda de massa é encontrada na região de transição das formas e após a faixa de transição, a perda máxima é de aproximadamente $2,15\ \%/^{\circ}\text{C}$ para *Finasterida A* e $2,65\ \%/^{\circ}\text{C}$ para

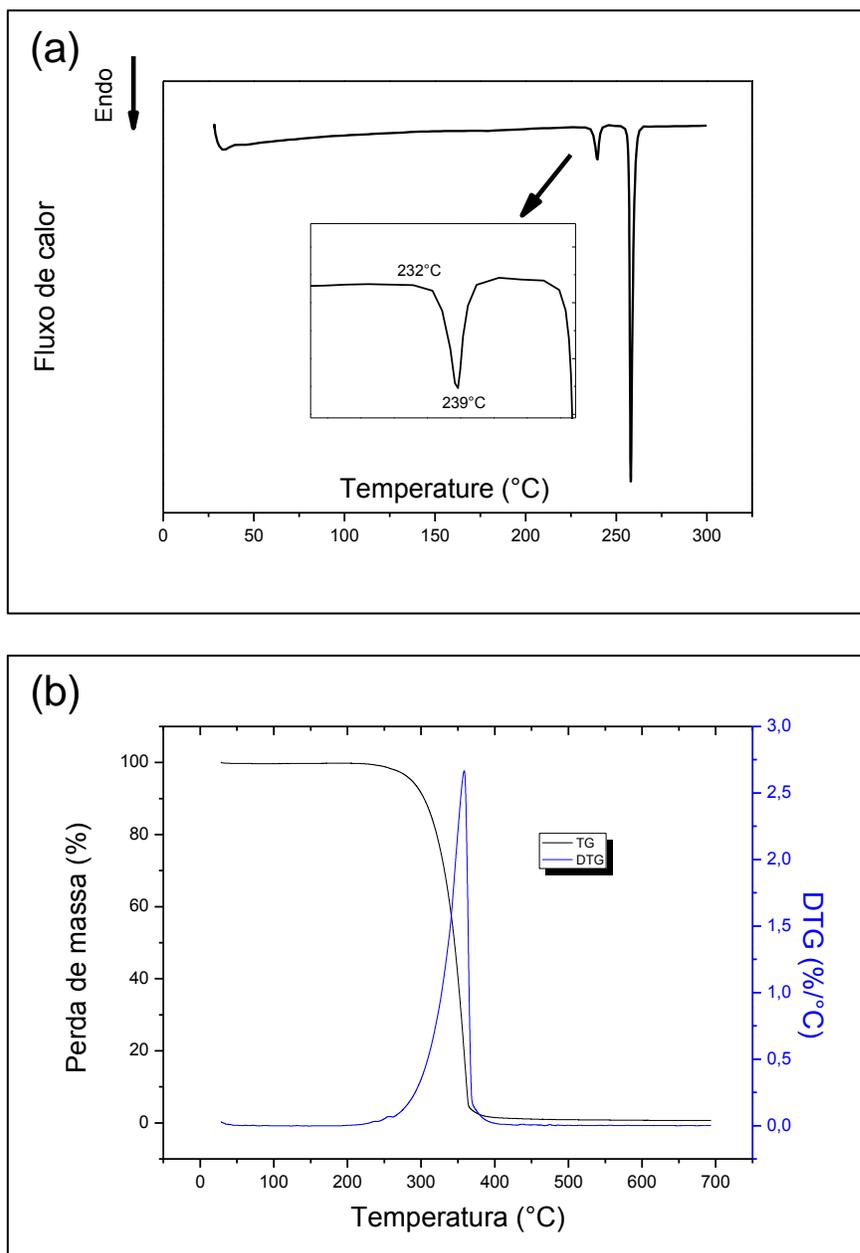
Finasterida B, sendo essa região de máxima perda de massa ocorrendo depois do ponto de fusão, o que indica perda por degradação da amostra. O evento endotérmico caracteriza a relação enantiotrópica das duas formas polimórficas, uma vez que não há perda de massa antes do evento e abaixo do ponto de fusão da forma com o ponto de fusão mais alto.

Figura 18: Gráfico de Rietveld das amostras *Finasterida B*.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 19: DSC e TG das amostras (a) e (b) *Finasterida B*.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Para obter a Forma II pura, foi aquecida certa quantidade de pó da amostra *Finasterida A* (mistura de Forma I com Forma II) utilizando uma mufla com taxa de

aquecimento de 5°C/min, com temperatura final de 205°C e mantida nesse patamar por 30min. Esse procedimento foi realizado três vezes até se obter quantidade de Forma II suficiente para preparar as misturas. Para cada procedimento, foi realizada a análise por DRXP na região de 16,5° a 20,5°, em que aparecem os picos característicos da Forma I, a fim de verificar se apenas a Forma II estava presente.

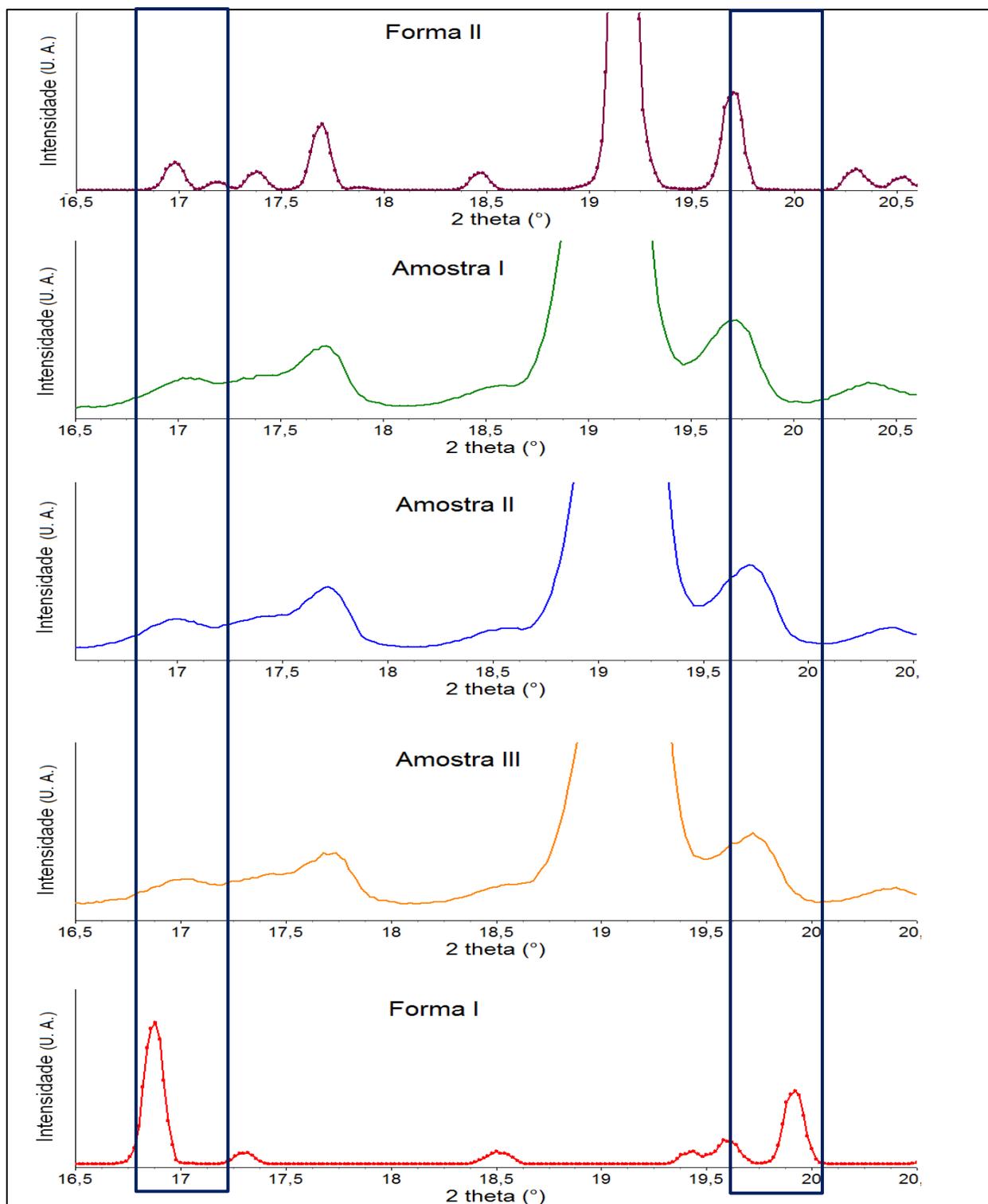
A quantidade de material obtida em cada tratamento térmico é apresentada na Tabela 4, e os difratogramas das regiões em que apareceriam os picos da Forma I para cada um dos três procedimentos, juntamente com os difratogramas simulados são apresentados na Figura 20

Tabela 4: Quantidade de material obtida após cada tratamento térmico

	Massa obtida após tratamento térmico (g)
Procedimento I	1,814(7)
Procedimento II	2,098(7)
Procedimento III	2,206(6)

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 20. DRXP das amostras obtidas por meio do tratamento térmico da Finasterida A. Nos destaques estão as regiões onde se poderiam observar os picos da Forma I.



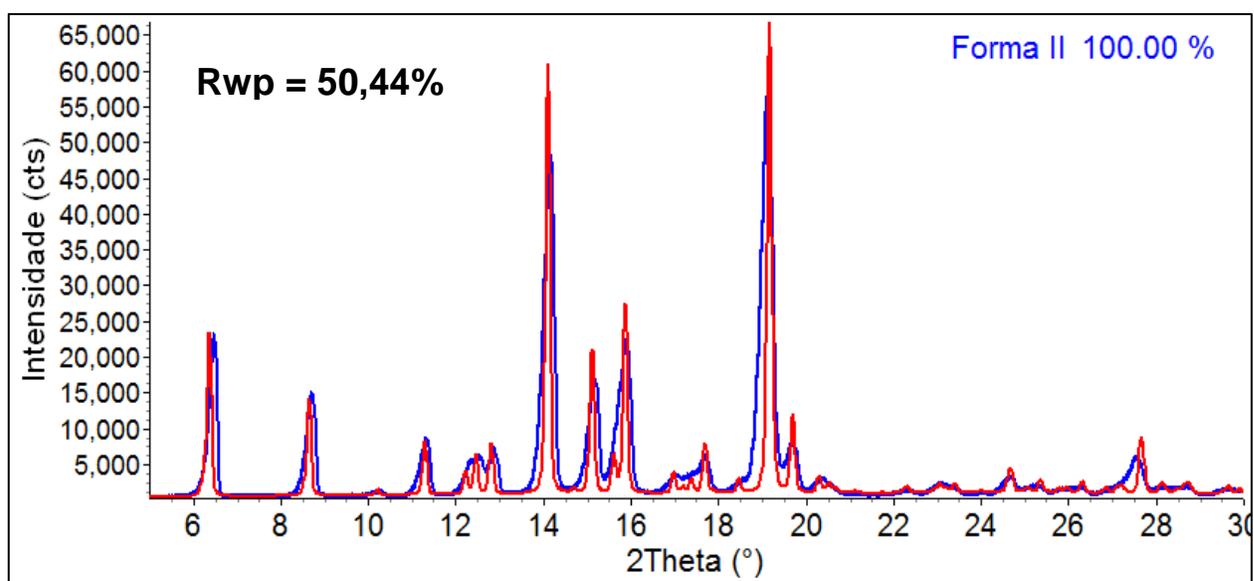
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Por meio dos difratogramas da Figura 20 não é possível afirmar que a Forma I está presente na amostra, e para confirmar a presença somente da Forma II, ao final dos tratamentos térmicos foi realizada mais uma vez DRXP da amostra com um intervalo angular maior, para que pudesse ser realizado o refinamento.

O procedimento para o refinamento com os dados dessa amostra será mostrado por etapas, as quais irão mostrar o cuidado que se teve para tentar identificar a Forma I nesta amostra, caso estivesse presente.

Inicialmente, foram refinados apenas fator de escala e 3 termos do polinômio de Chebychev para a radiação de fundo. A Figura 21 mostra os difratogramas observado e calculado após esse refinamento. O tamanho do cristalito usado no difratograma calculado foi de 300 nm, apresentando apenas o perfil gaussiano.

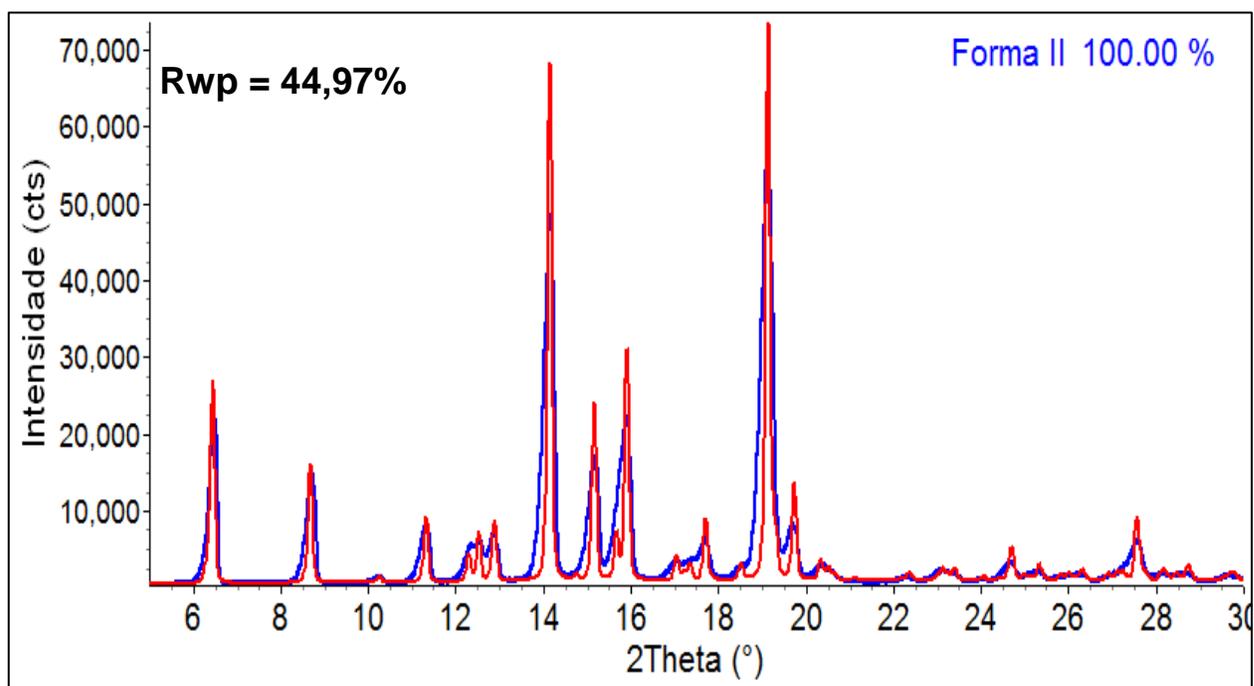
Figura 21: Difratograma observado (linha azul) e calculado (linha vermelha) antes do início do refinamento da *Finasterida A* tratada termicamente.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Nota-se que os picos calculados (linha vermelha) são mais estreitos e estão ligeiramente deslocados dos observados. Antes de ajustar o alargamento dos picos, que estão relacionados ao tamanho médio do cristalito, é necessário refinar os parâmetros que irão colocar os picos calculados sobrepostos adequadamente aos observados. Assim, o próximo passo foi refinar o deslocamento da amostra do centro do difratômetro e as dimensões da cela unitária. O resultado está na Figura 22.

Figura 22: Difratogramas observado e calculado da *Finasterida A* tratada termicamente. Após o refinamento do fator de escala, cela unitária e deslocamento da amostra.

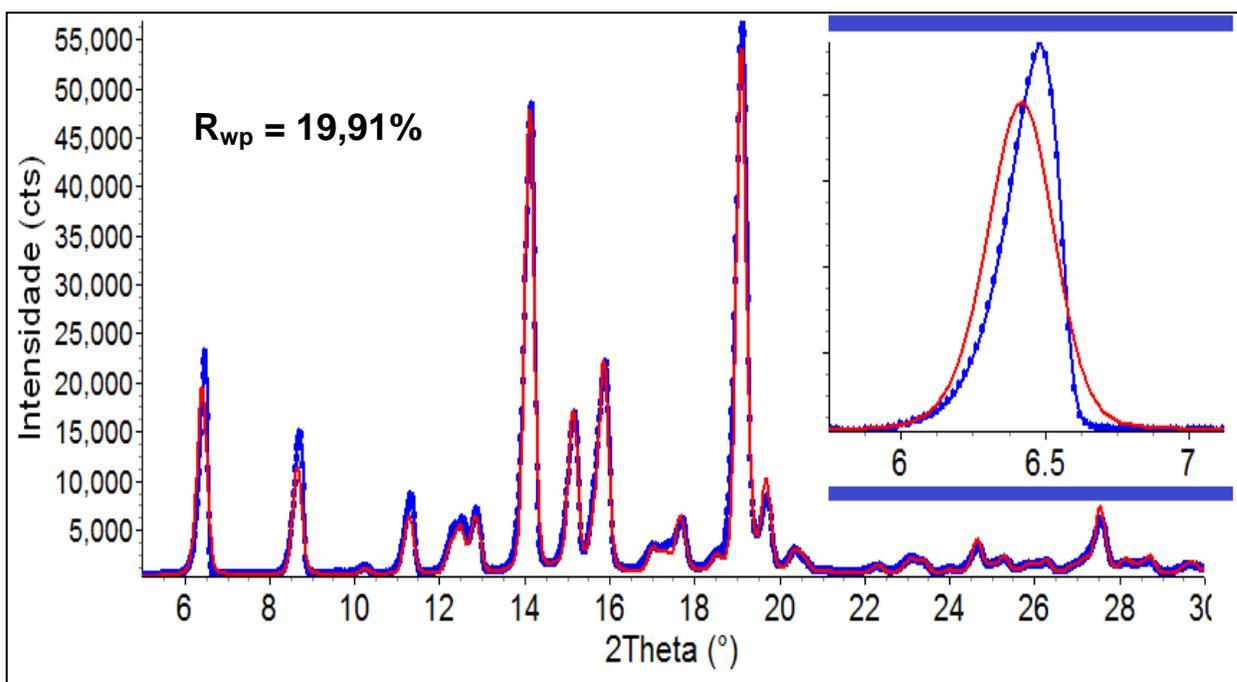


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Agora se nota que os picos estão bem sobrepostos e podem-se refinar os parâmetros relacionados com o alargamento dos picos. Assim, foram colocados para

refinar as dimensões dos cristalitos que fornecem um perfil gaussiano e lorentziano. O resultado está na Figura 23.

Figura 23: *Finasterida A* tratada após refinamento do fator de escala, cela unitária, deslocamento da amostra, tamanho isotrópico de cristalito.

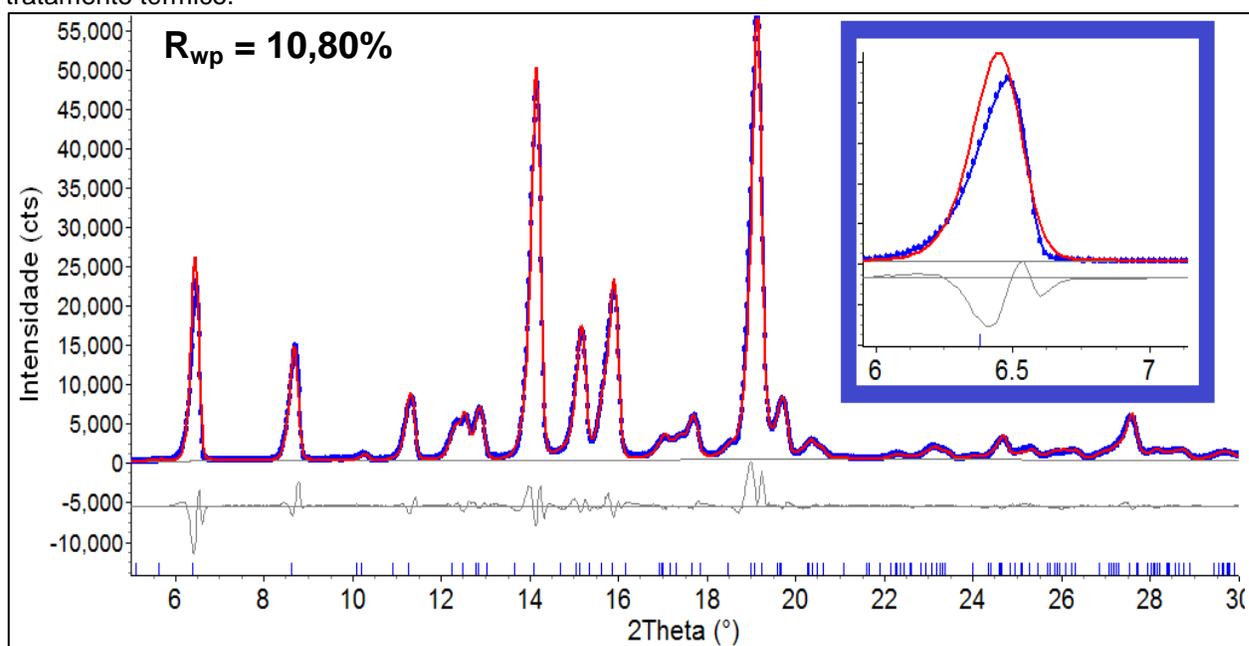


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Em destaque na Figura 23 está uma ampliação do pico ($\bar{1}01$). A sua assimetria observada é muito grande e não está sendo ajustada usando como parâmetro a divergência das fendas Soller. Esse ajuste inadequado poderia ser devido a (i) fendas Soller mal posicionadas (foi verificado no equipamento e isso não está ocorrendo); (ii) espaçamento errado das placas das fendas Soller (também foi verificado

e não houve alteração), (iii) anisotropia dos cristalitos e (iv) algum desajuste no equipamento. Nesse último caso, nada pode ser feito analiticamente para a correção. É necessário um alinhamento fino. No momento o que se pode tentar é considerar o cristalito anisotrópico e refinar. Entretanto, se houver anisotropia, irá ocorrer orientação preferencial dos cristalitos no porta-amostra. Assim, foram refinados simultaneamente a anisotropia dos cristalitos e orientação preferencial. Nos dois casos foi usado o modelo dos esféricos harmônicos [45]. O R_{wp} caiu para 10,80%, mas a assimetria continuou não concordando com a observada. O resultado está na Figura 24.

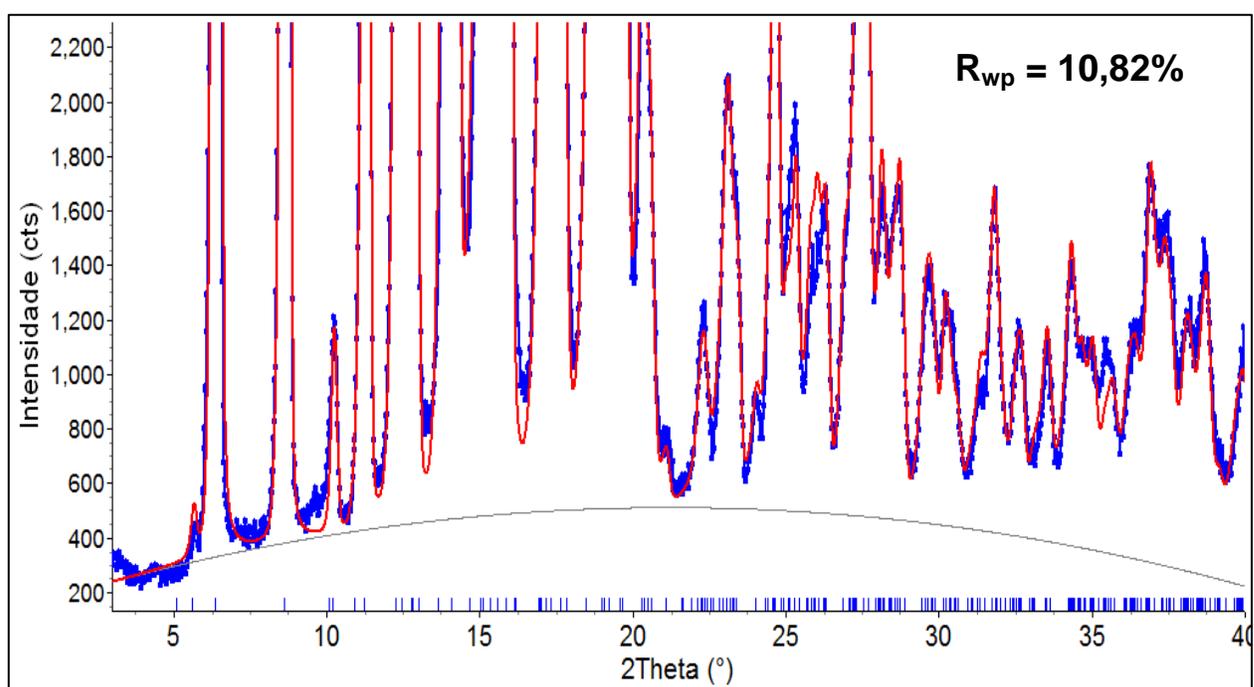
Figura 24: Refinamento anisotrópico e correção de orientação preferencial – *Finasterida A* após tratamento térmico.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Uma ampliação da linha de base Figura 25 mostra que a radiação de fundo não foi ajustada adequadamente. Assim, mais 3 termos do polinômio de Chebychev foram incluídos e o R_{wp} baixou para 10,40% (Figura 26).

Figura 25: Ampliação da linha de base em que se pode perceber que a radiação de fundo não foi ajustada adequadamente.



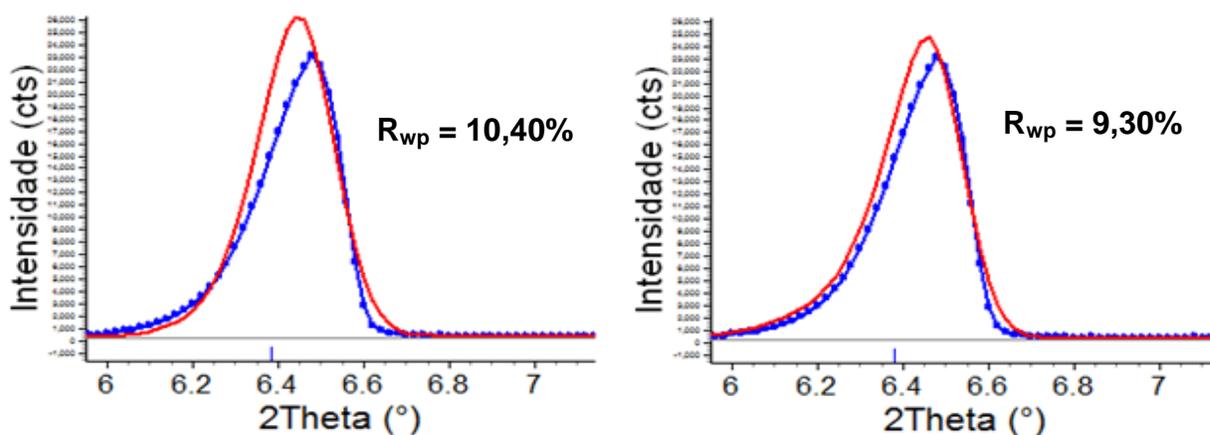
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Entretanto, a assimetria continua mal ajustada. As fendas Soller do Rigaku RINT2000 possuem divergência de 2,5°. Esse valor tem sido usado por todos os pesquisadores do LIEC nos últimos 5 anos e tem sido suficiente para ajustar adequadamente a anisotropia. Assim, não deveria ser necessário refinar. Porém, foi

decidido refinar. O R_{wp} caiu de 10,40% para 9,3% (Figura 26). O tamanho médio do cristalito convergiu para 62 nm. Sem mais nada que pudesse ser refinado, foi procurado pequenos detalhes que pudessem dar indicação da (in)existência da Forma I nessa amostra.

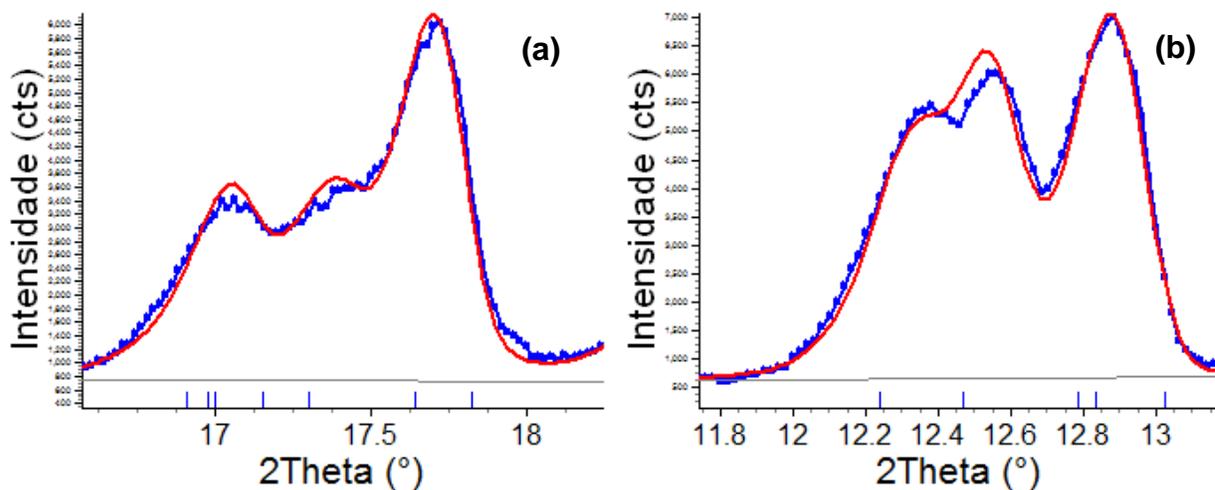
Devido à grande sobreposição de picos das duas formas, a melhor indicação da presença da Forma I, em proporções detectáveis conforme mostrado na Figura 18, pode ser encontrada no pico em $\sim 16,8^\circ$ (2θ). Uma ampliação dessa região (Figura 27(a)) mostra uma pequena diferença no perfil, mas que não pode ser relacionada à Forma I porque essa diferença aparece também no perfil do pico em $12,25^\circ$ (2θ) em que não existe pico da Forma I (Figura 27(b)). Assim, essa pequena alteração foi considerada apenas problemas de ruído, ou anisotropia, ou distribuição bimodal de tamanho de cristalito.

Figura 26: Variação do ajuste no perfil do pico ao ser refinado o valor para a fenda Soller.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

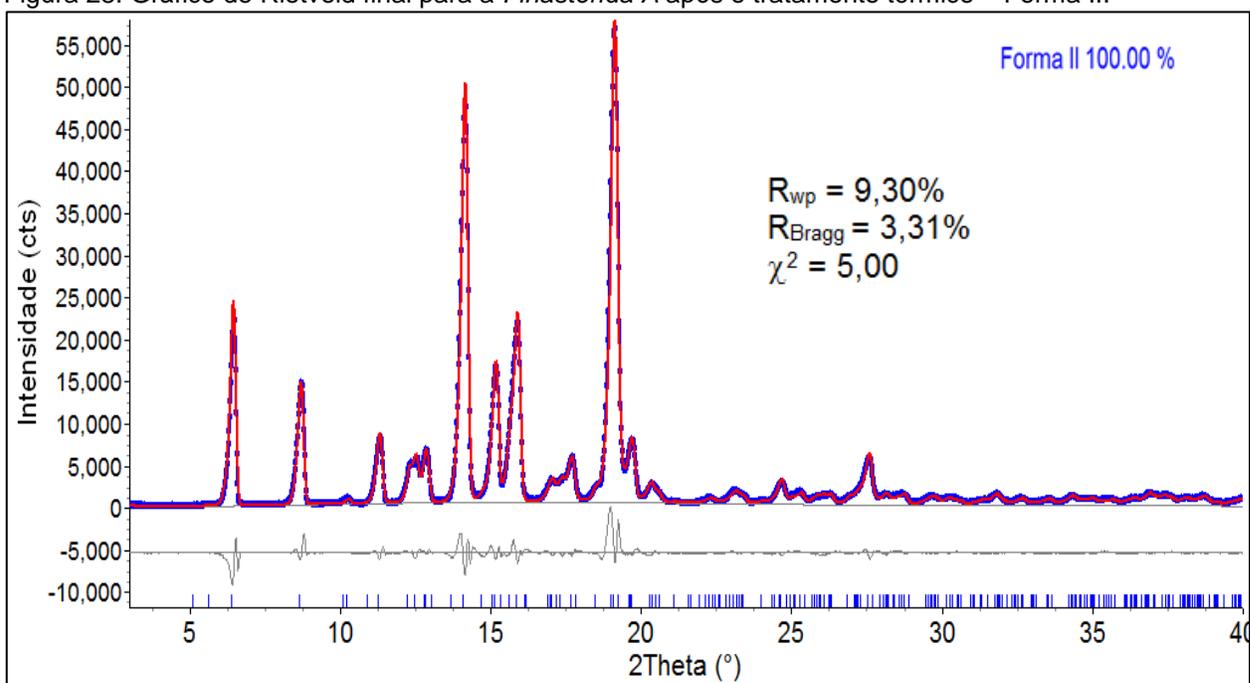
Figura 27: (a) Ampliação da região onde deveria ocorrer a sobreposição do pico da Forma I, se presente. (b) Ampliação de uma região onde só existem picos da Forma II.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

O gráfico de Rietveld após o final do refinamento é apresentado na Figura 28, juntamente com os respectivos valores dos índices de qualidade. O desajuste na anisotropia pode ter sido causado por algum desalinhamento do equipamento e/ou distribuição bimodal de cristalitos.

Figura 28: Gráfico de Rietveld final para a *Finasterida A* após o tratamento térmico – Forma II.

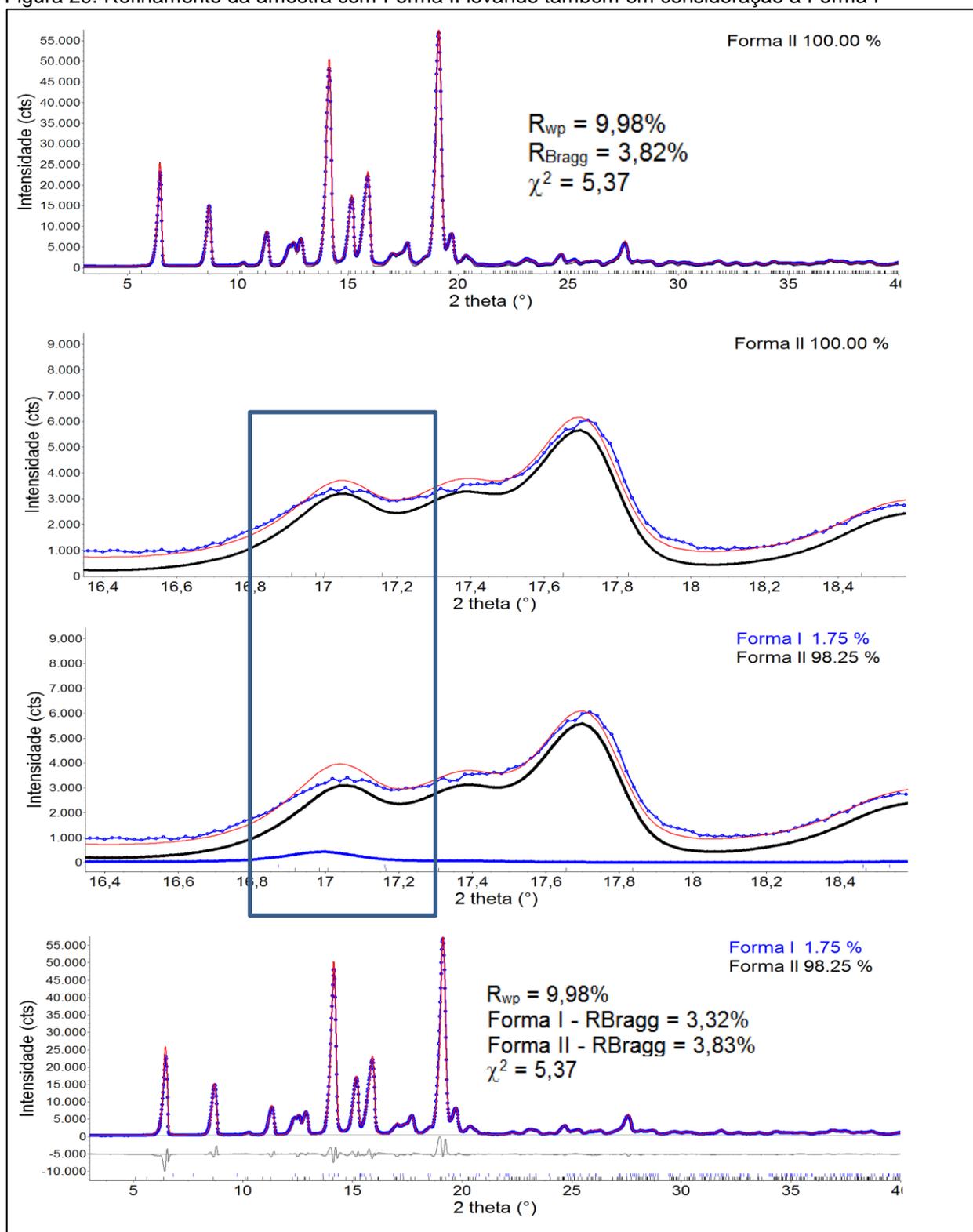


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Como os índices apresentaram valores elevados, foi avaliada a possibilidade da Forma I estar presente na amostra, incluindo-a no refinamento. No entanto, os valores para os índices continuaram os mesmos e, embora tenha sido possível realizar o refinamento, o ajuste para a intensidade quando levada em consideração a Forma I ficou superestimado do que para o refinamento somente com a Forma II, como pode ser visto na Figura 29.

A área selecionada na figura está relacionada à região em que é possível se notar um valor superestimado da Forma I. Essa pequena alteração na intensidade não é suficiente para garantir que esta forma esteja ou não presente. Tendo em vista a impossibilidade de identificar a Forma I nesse difratograma, foi considerado que, com base na DRXP, somente a Forma II está presente.

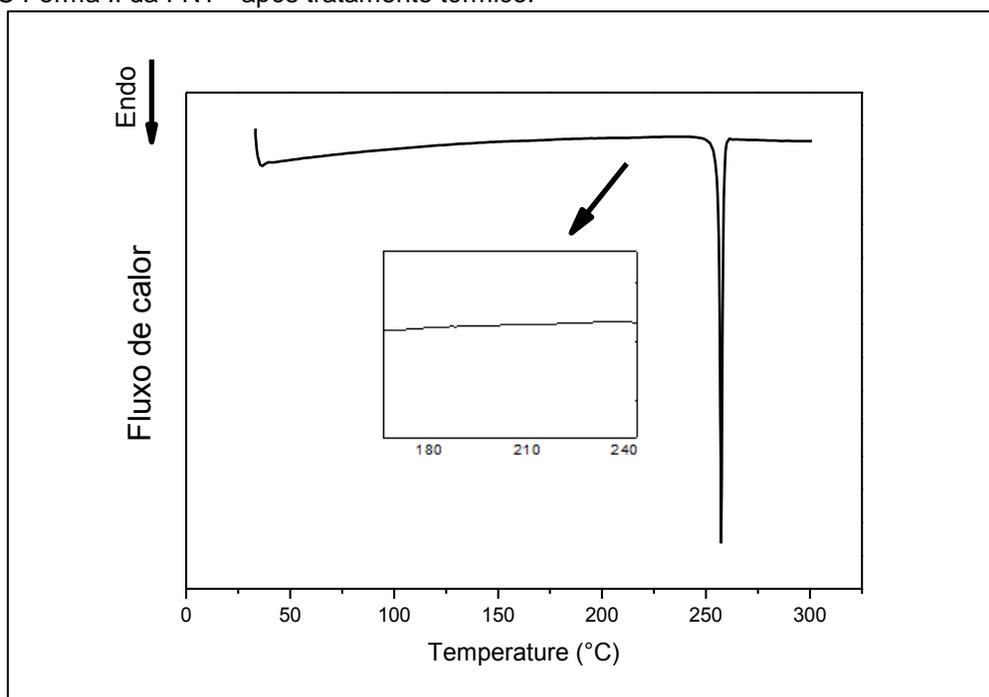
Figura 29: Refinamento da amostra com Forma II levando também em consideração a Forma I



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Após as análises por DRXP foi realizada novamente análise térmica, e não foi observada a banda correspondente à transição da Forma I para a Forma II (Figura 30). Observa-se apenas o evento endotérmico relacionado com a fusão da Forma II. Com o resultado da análise térmica corroborando com o resultado da DRXP, foi considerado que a amostra *Finasterida A* após o tratamento térmico apresenta apenas a Forma II.

Figura 30: DSC Forma II da FNT - após tratamento térmico.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.1.2 Refinamentos das matérias-primas puras

A seguir, são apresentados os refinamentos para cada equipamento, juntamente com os valores para os índices de qualidade de refinamento. Esses refinamentos foram realizados para avaliar possíveis variações, por exemplo, no tamanho médio de cristalito devido a problemas instrumentais que não foram adequadamente ajustados utilizando os Parâmetros Fundamentais.

Difratômetro Rigaku RINT2000

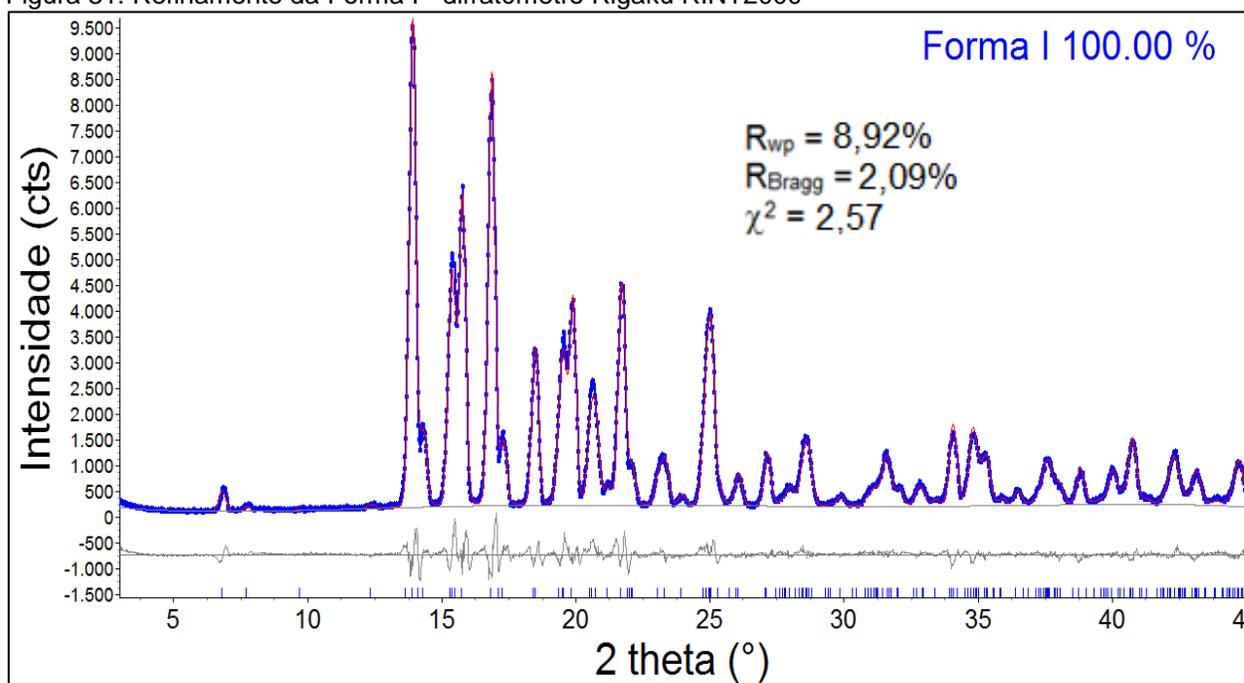
Forma I

Inicialmente a cela unitária foi refinada juntamente com o *background*, este ajustado com seis termos.

Posteriormente, foi realizada a correção para o alargamento do pico devido ao tamanho de cristalito (contribuição de Gauss e Lorentz).

Foi corrigida a orientação preferencial utilizando os esféricos harmônicos, com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi de ≈ 30 nm.

Figura 31: Refinamento da Forma I - difratômetro Rigaku RINT2000



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Forma II

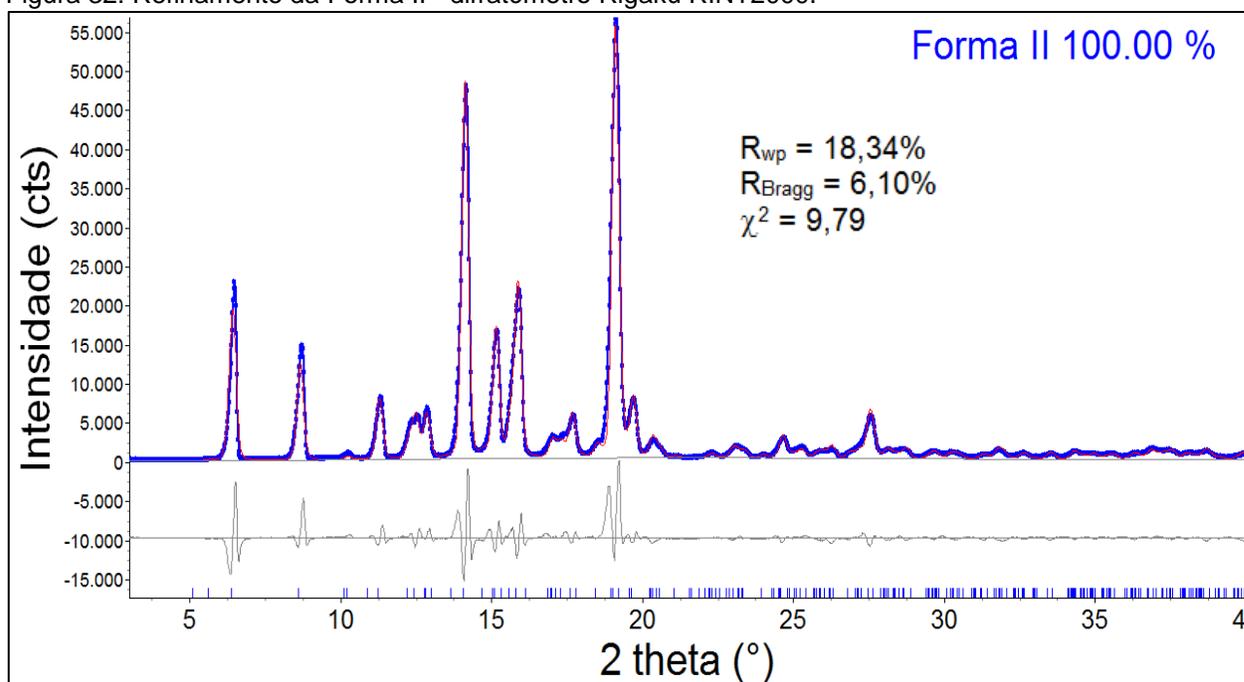
A cela unitária foi refinada, juntamente com o *background* (6 termos para o ajuste).

Foi aplicada a correção para o alargamento do pico, com os valores para o tamanho de cristalito calculados pela macro implementada no programa Topas Academic v. 4.1.

Em seguida foi aplicada a correção para orientação preferencial utilizando os esféricos harmônicos com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi de ≈ 30 nm.

Os valores para o tamanho médio de cristalito foram utilizados para comparar com o que foi observado nas análises por MET. Foram considerados somente os valores encontrados para o difratômetro Rigaku RINT2000. Para os outros equipamentos utilizados neste trabalho (Stadi-P e D8 Advance) esse cálculo variou em torno de uma ordem de grandeza após os ajustes para a função que corrige a contribuição do detector linear sensível à posição. Dessa forma, como os parâmetros instrumentais de um difratômetro com sistema de detecção pontual são bem definidos, como o difratômetro RINT2000, os valores para o tamanho de cristalitos são mais confiáveis.

Figura 32: Refinamento da Forma II - difratômetro Rigaku RINT2000.



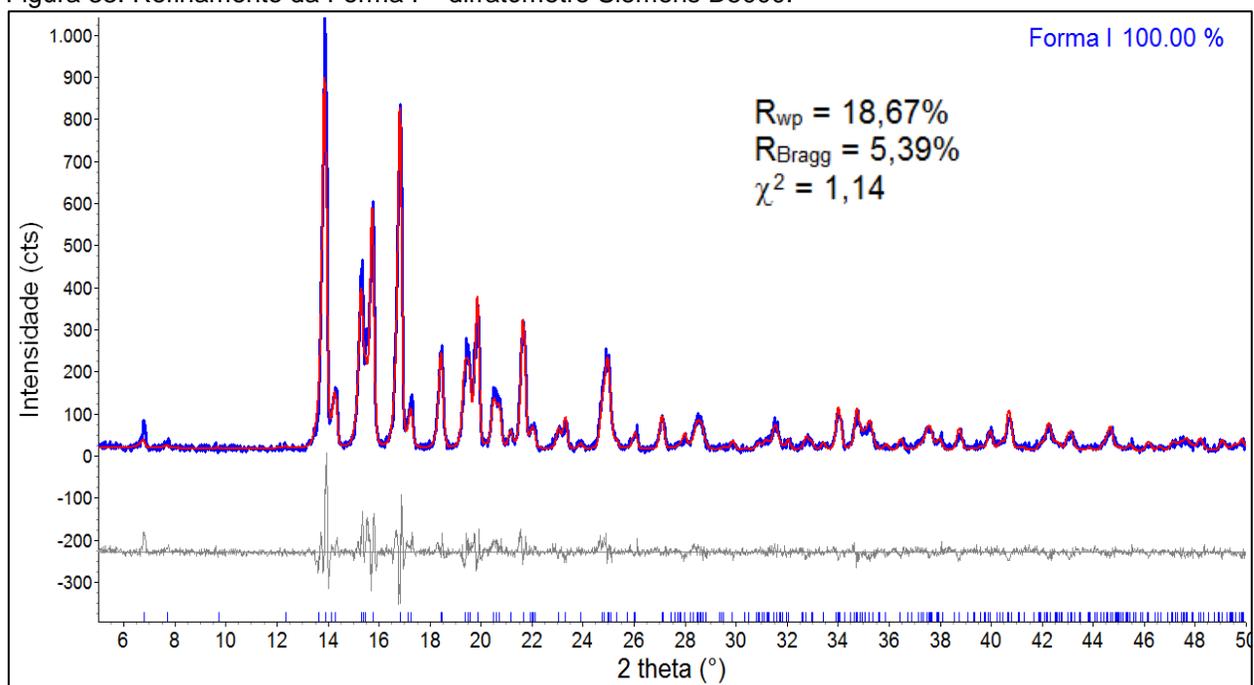
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Difratômetro Siemens D5000

Forma I

Foram refinados inicialmente cela unitária e *background* (com 3 termos). Posteriormente, o ajuste para o tamanho de cristalito foi realizado. Foi aplicada a correção para orientação preferencial utilizando os esféricos harmônicos com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi de ≈ 60 nm.

Figura 33: Refinamento da Forma I – difratômetro Siemens D5000.

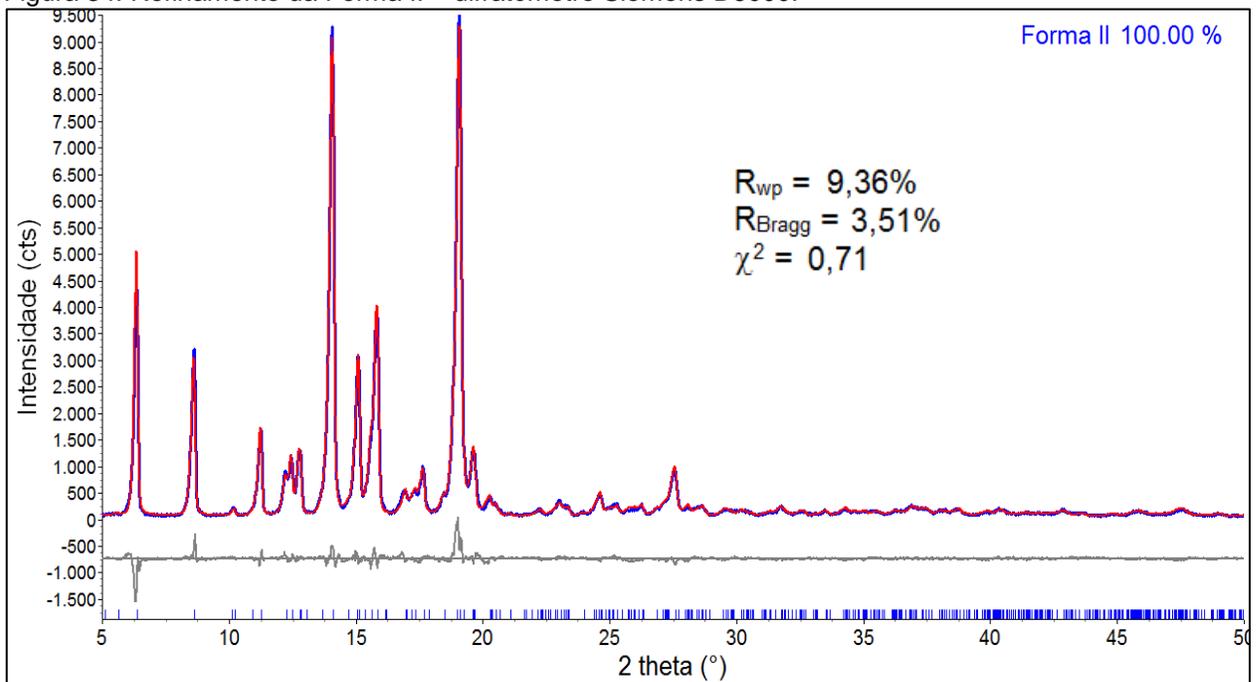


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Forma II

Inicialmente, foram refinados *cela unitária* e *background* (com 3 termos). Posteriormente, o ajuste para o tamanho de cristalito foi realizado. Foi aplicada a correção para orientação preferencial utilizando os esféricos harmônicos com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi de ≈ 110 nm.

Figura 34: Refinamento da Forma II – difratômetro Siemens D5000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

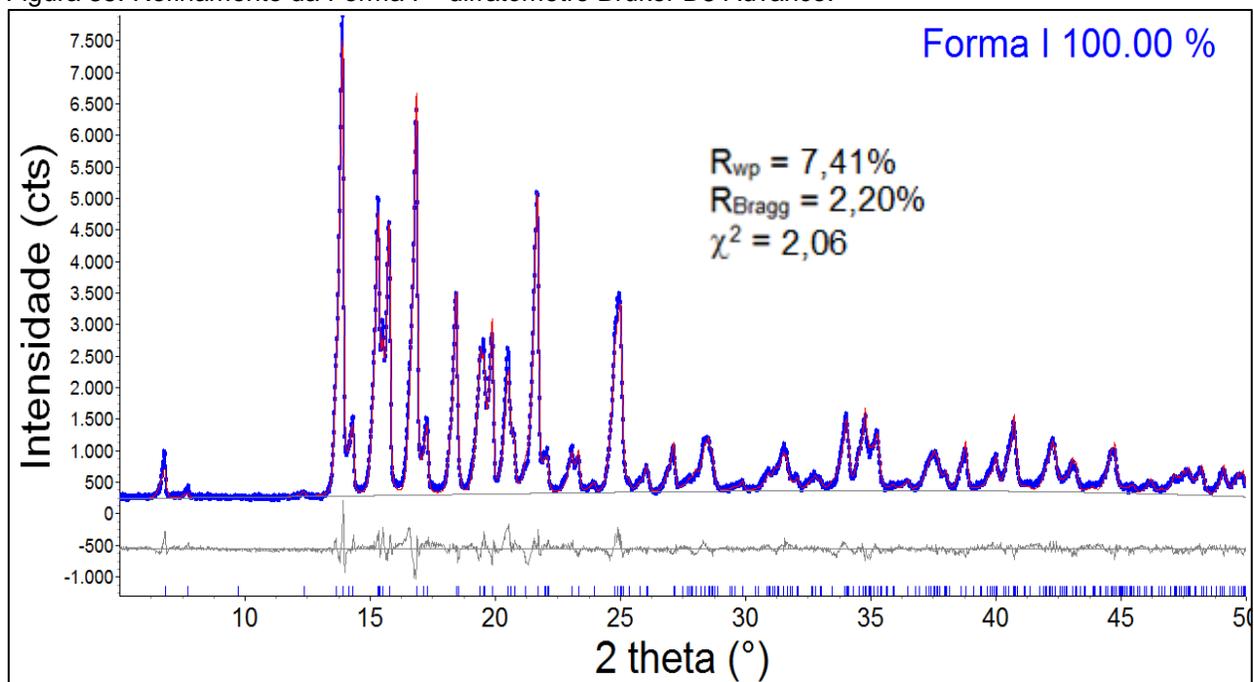
Difratômetro Bruker D8 Advance

Forma I

Foram refinados inicialmente cela unitária e *background* (com 5 termos). Posteriormente, o ajuste para o tamanho de cristalito foi realizado e em seguida, foram refinados os parâmetros instrumentais referentes ao detector (PSD), assim como a função para a correção da divergência axial e mantidos fixos os valores após o ajuste.

Foi aplicada a correção para orientação preferencial utilizando os esféricos harmônicos, com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi > 5000 nm

Figura 35: Refinamento da Forma I – difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

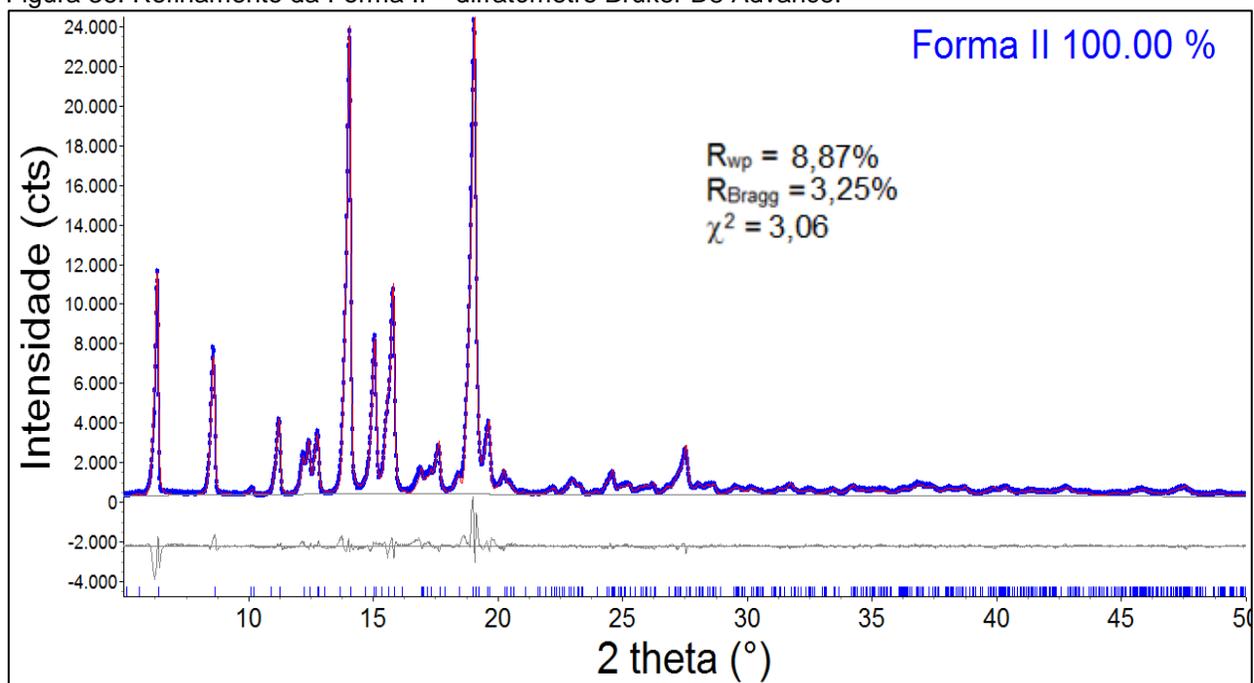
Forma II

Assim como para os demais refinamentos, inicialmente foram refinados a célula unitária e *background* (com 5 termos para ajuste).

O ajuste para o tamanho de cristalito foi realizado, e foram refinados também os parâmetros instrumentais referentes ao detector (PSD), assim como a função para a correção da divergência axial, e mantidos fixos os valores após o ajuste.

Foi aplicada a correção para a orientação preferencial com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi de ≈ 220 nm.

Figura 36: Refinamento da Forma II – difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Assim como para o difratômetro RINT2000, quando analisada pelo equipamento D8 Advance a amostra que passou por tratamento térmico apresentou somente a Forma II da FNT. Não foi encontrado indício de que a Forma I estaria presente mesmo que em proporção muito reduzida, ou seja, nenhum pico da Forma I foi identificado.

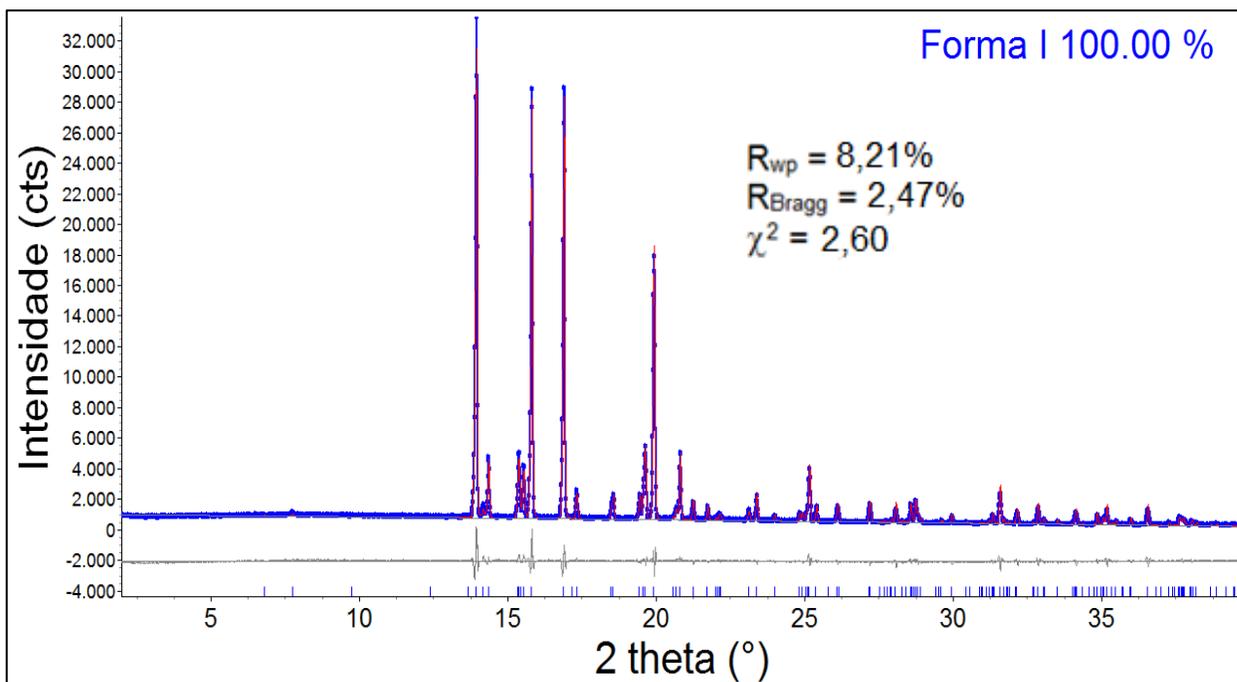
Difratômetro Stoe Stadi-P

Forma I

Foram refinados inicialmente cela unitária e *background* (com 3 termos). Posteriormente, foi realizado o ajuste para o tamanho de cristalito e refinados os parâmetros instrumentais referentes ao detector (PSD), assim como a função para a correção da divergência axial, e mantidos fixos os valores após o ajuste.

Foi aplicada a correção para a orientação preferencial utilizando os esféricos harmônicos, com 8 termos. O valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi de > 420 nm.

Figura 37: Refinamento da Forma I – difratômetro Stoe Stadi-P.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Forma II

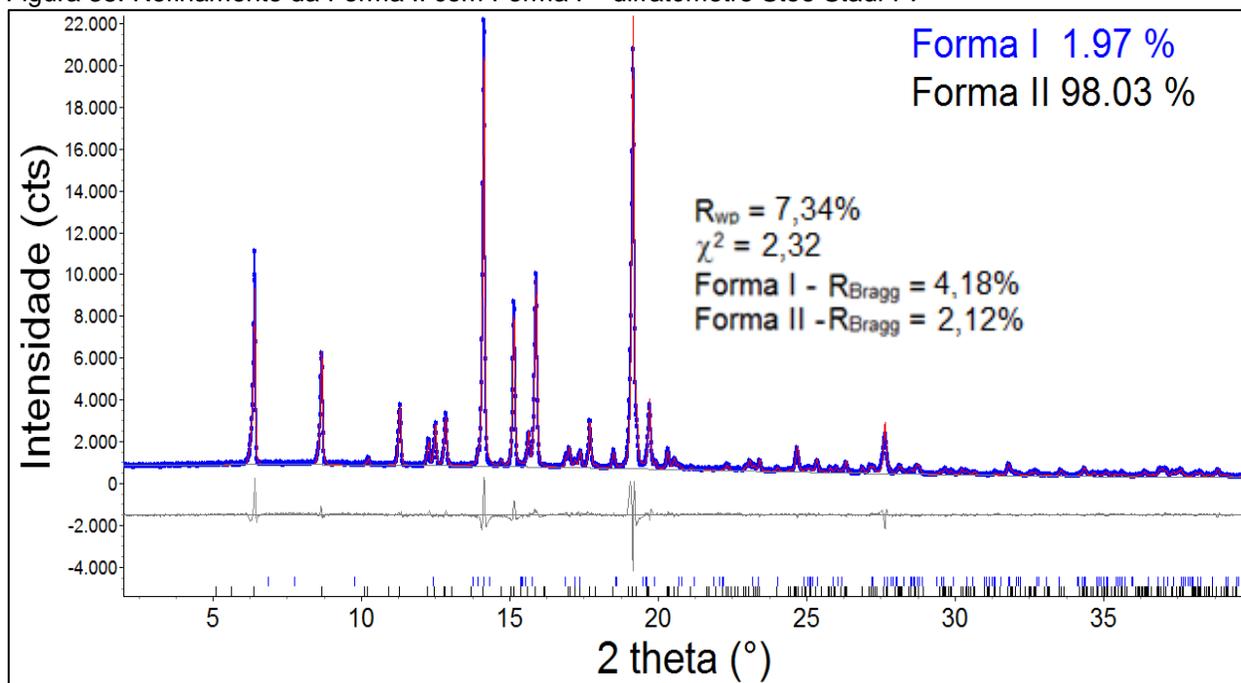
Os dados obtidos pelo difratômetro Stoe Stadi-P evidenciaram a presença da Forma I na amostra da Forma II. O baixo alargamento instrumental devido às condições instrumentais, além da monocromatização do feixe, fornecendo uma análise com apenas o comprimento de onda $K_{\alpha 1}$ propicia a obtenção de resultados com picos de difração mais estreitos sem a elevada sobreposição. Foi possível dessa forma, identificar a presença da Forma I, mesmo que em uma proporção muito reduzida.

Inicialmente, foram refinados os parâmetros de rede juntamente com o *background* (3 termos para a correção). Em seguida, foi corrigido o alargamento devido

o tamanho de cristalito. Para a Forma I, a correção Gaussiana, e para a Forma II, a correção Lorentziana.

Foi corrigida a orientação preferencial da Forma II utilizando os esféricos harmônicos com 8 termos. Para a Forma I, o valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi >600nm, e para Forma II o valor calculado para o tamanho médio de cristalito foi > 5000 nm.

Figura 38: Refinamento da Forma II com Forma I – difratômetro Stoe Stadi-P.



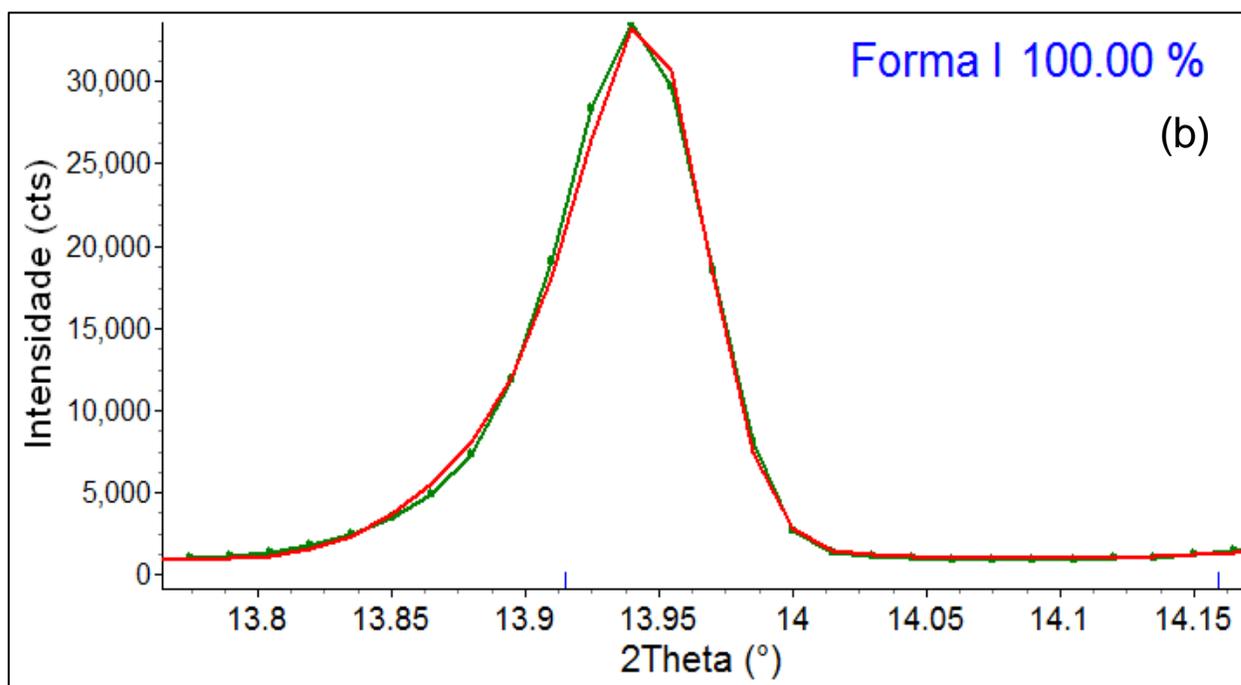
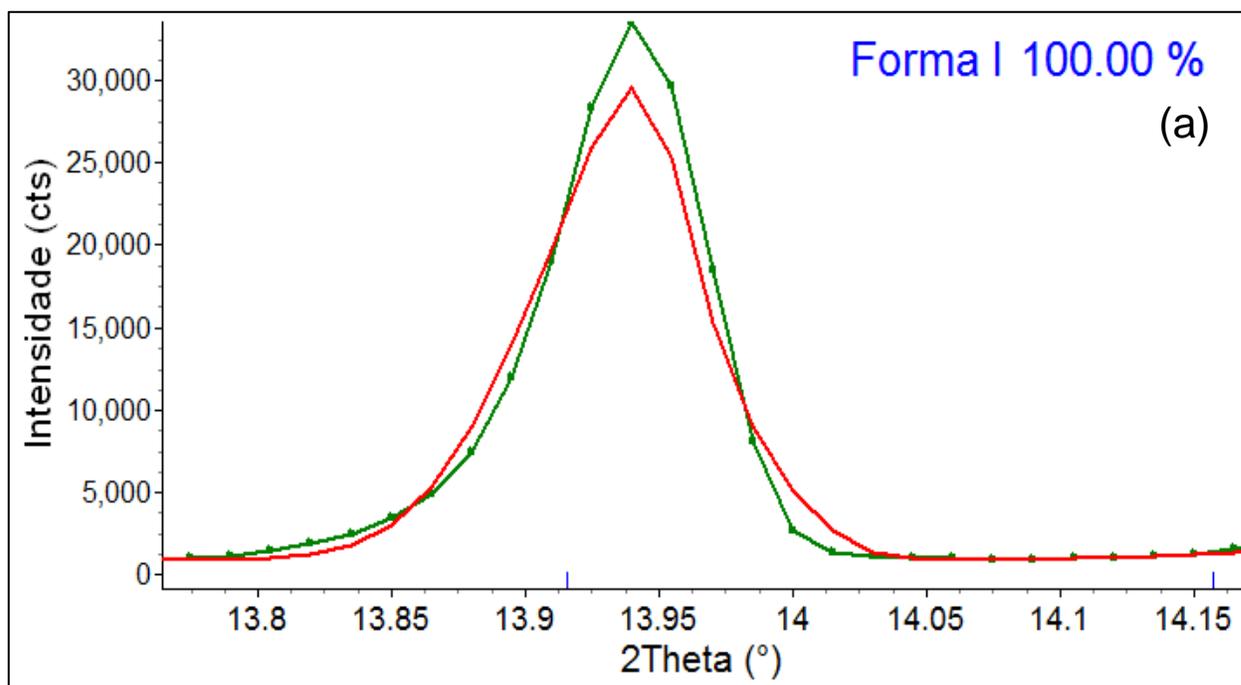
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Essa proporção de 1,97(11)% em massa para a Forma I foi levada em consideração ao ser apresentado o valor dos limites de identificação e quantificação

nas misturas, de modo que ao final das análises foram apresentados os valores para a menor proporção em massa que foi possível quantificar, considerando a proporção da forma cristalina e do amorfo.

Para o sistema do Stoe Stadi-P os valores usados na dimensão da faixa angular coberta pelo detector, descrita pela macro *lpsd_th2_angular_range_degrees* (programa Topas Academic v. 4.1), é 18,9°. Entretanto, o refinamento forneceu $R_{wp} = 9,634\%$, $\chi^2 = 3,08$ e d-DW = 0,8 (índice referente à estatística de Durbin-Watson), e tamanho de cristalito “infinito” para os raios X. Ou seja, tanto faz refinar ou não as dimensões do cristalito que o resultado é o mesmo. No caso, o cristalito refinado foi de 5000 nm, quando um valor máximo para os raios X é em torno de 250 nm. A Figura 39(a) mostra o ajuste do pico (0 2 0) da FNT Forma I. Esse ajuste foi considerado ruim e assim foram colocados para refinar o parâmetro da faixa angular do detector. Após a convergência obteve-se o valor de 8,47°, $R_{wp} = 4,10\%$, $\chi^2 = 1,31$, d-DW = 0,99 (Figura 39(b)). O cristalito continuou sendo “infinito” para os raios X. O mesmo aconteceu para o sistema do difratômetro D8.

Figura 39: (a) Dimensão da faixa angular coberta pelo detector = 18,9°. (b) Dimensão da faixa angular coberta pelo detector = 8,47°.



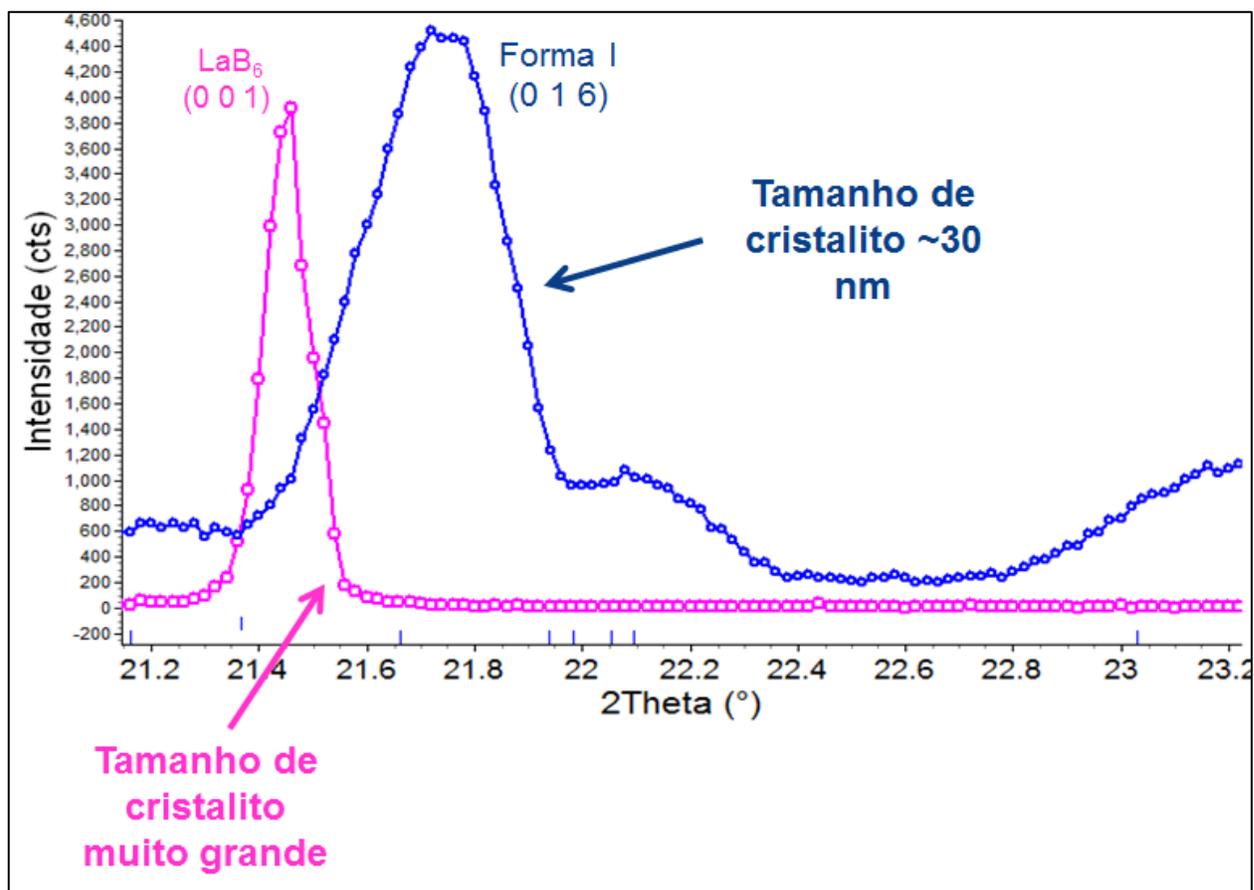
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para o caso do RINT2000, os Parâmetros Fundamentais permitiram o melhor ajuste do perfil. Mesmo quando os parâmetros relacionados com a divergência axial foram refinados, eles se mantiveram iguais aos valores usados, dentro do erro obtido.

Tendo em vista que os valores dos parâmetros dos sistemas do Stadi-P e D8 Advance não estavam fornecendo ajustes razoáveis, e o do RINT2000 sim, decidiu-se usar apenas os valores desse último e sugerir um estudo, nível de doutorado, dos parâmetros usados nesses dois sistemas de forma a permitir a determinação de tamanhos de cristalitos compatíveis com os obtidos em outros sistemas.

Para esclarecer dúvidas de que o refinamento com o RINT2000 poderia fornecer resultados errados, foram comparados os picos (0 0 1) do LaB_6 NIST SRM 660a e (0 1 6) da FNT Forma I, que estão em posições aproximadas, conforme se vê na Figura 40. Se a FNT Forma I tivesse mesmo um cristalito “infinito”, o seu pico deveria ter um alargamento semelhante ao do LaB_6 , e o que se observa é um alargamento muito maior. Portanto, pode-se garantir que os cálculos com o RINT2000 apresentam maior probabilidade de estarem mais próximos da realidade que no caso dos sistemas com PSD.

Figura 40: Comparação do tamanho de cristalito, levando em consideração o pico (0 0 1) do LaB_6 e (0 1 6) da FNT Forma I.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os valores para os parâmetros de rede obtidos ao final dos refinamentos para os equipamentos utilizados são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 5: Parâmetros de rede obtidos ao final dos refinamentos.

		Parâmetros de rede				
Equipamento	Polimorfo	G.E.*	A (Å)	b (Å)	c (Å)	β
Rigaku RINT2000	Forma I	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	6,4625(8)	12,7574(14)	25,977(2)	90°
	Forma II	P 2 ₁	16,473(4)	7,975(2)	18,144(6)	107,00(1)
Siemens D5000	Forma I	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	6,456(10)	12,746(18)	25,987(2)	90°
	Forma II	P 2 ₁	16,412(18)	7,9461(7)	18,104(3)	107,174(7)°
Bruker D8 Advance	Forma I	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	6,4449(6)	12,728(2)	25,941(1)	90°
	Forma II	P 2 ₁	16,419(1)	7,9543(7)	18,113(2)	107,154(6)°
Stoe Stadi-P	Forma I	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	6,4408(1)	12,7178(3)	25,9206(9)	90°
	Forma II	P 2 ₁	16,4179(7)	7,9563(3)	18,117(1)	107,176(3)°

*G.E. = grupo espacial.

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

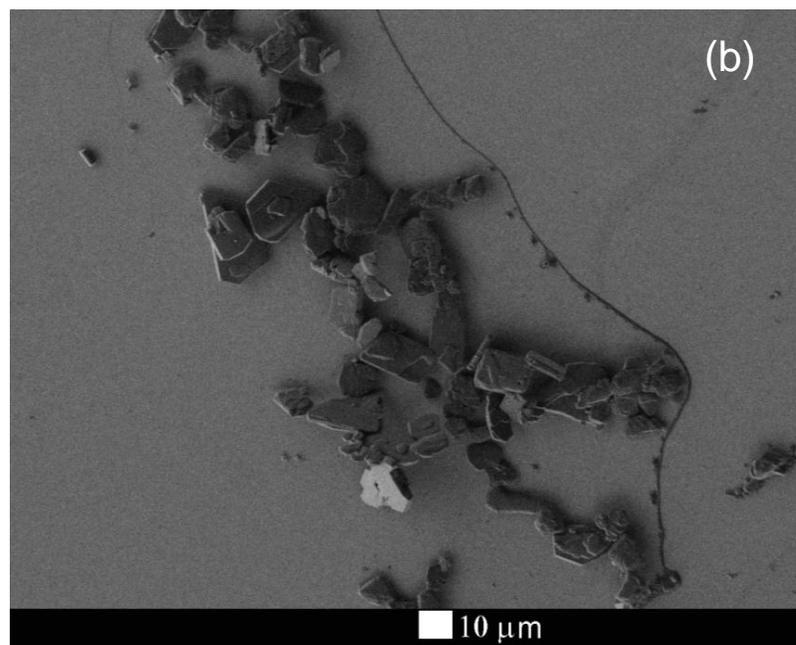
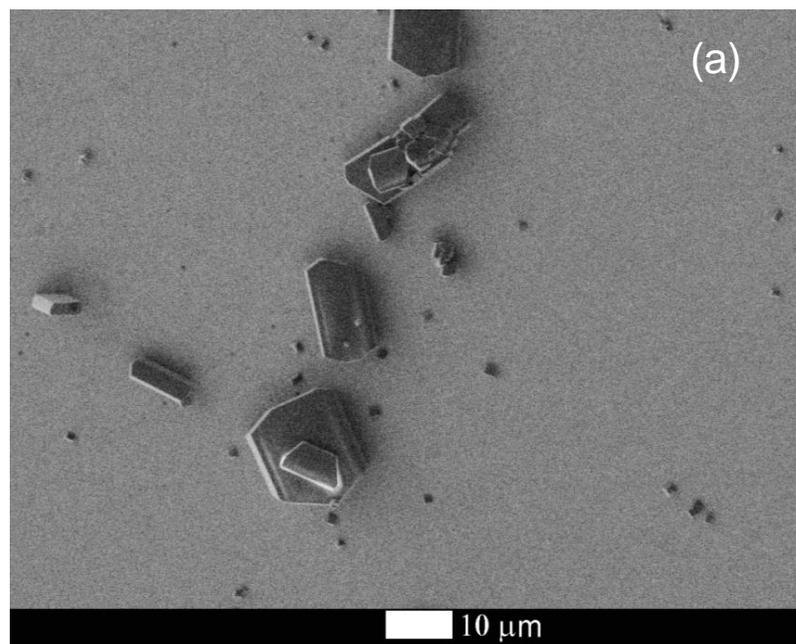
5.1.3 Microscopia eletrônica

5.1.3.1 MEV e MET

A análise por MEV é necessária para uma caracterização morfológica tridimensional da matéria-prima e para o cálculo de distribuição de tamanho de partícula. As amostras de FNT foram dispersas em água destilada.

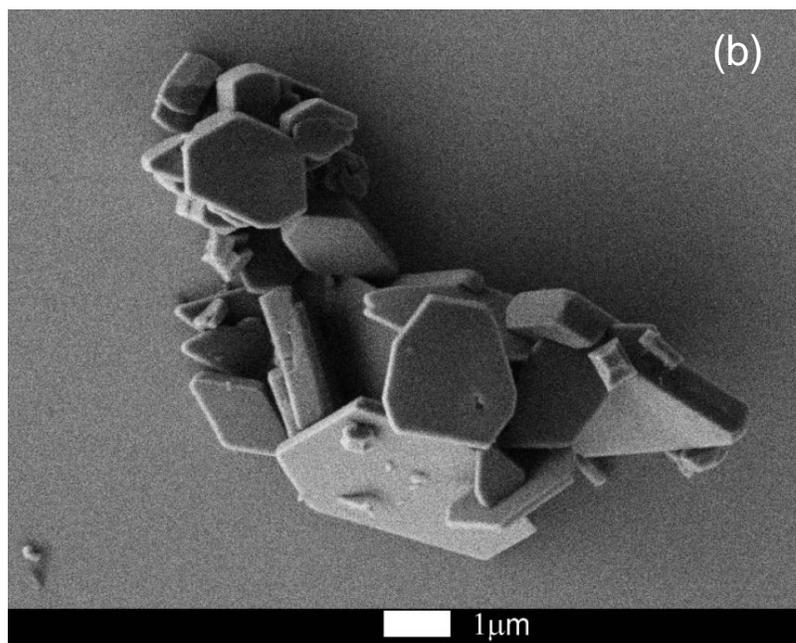
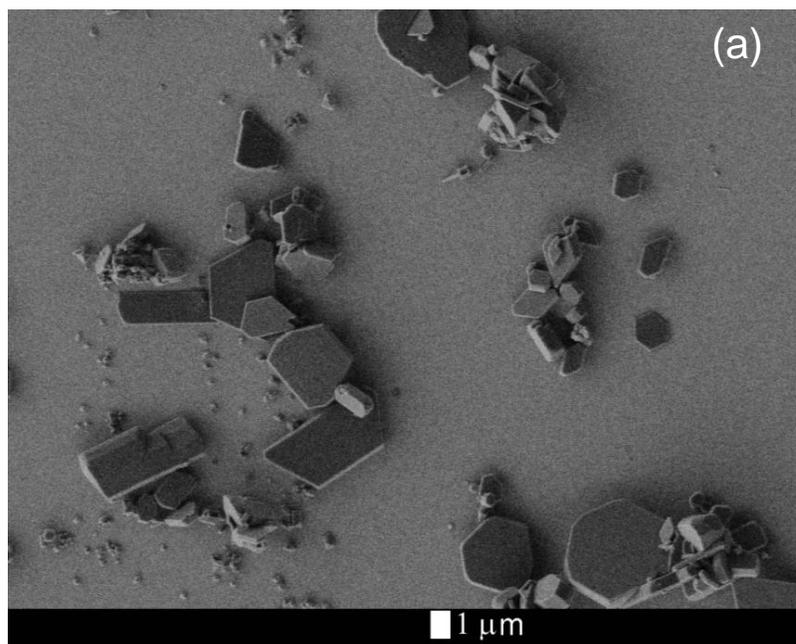
Pelas micrografias obtidas é evidente a forma planar do hábito cristalino, sendo que as partículas da Forma I possui um maior tamanho em uma direção do que em outra, o mesmo ocorrendo para as partículas da Forma II.

Figura 41: (a), (b) MEV da Forma I – FNT.



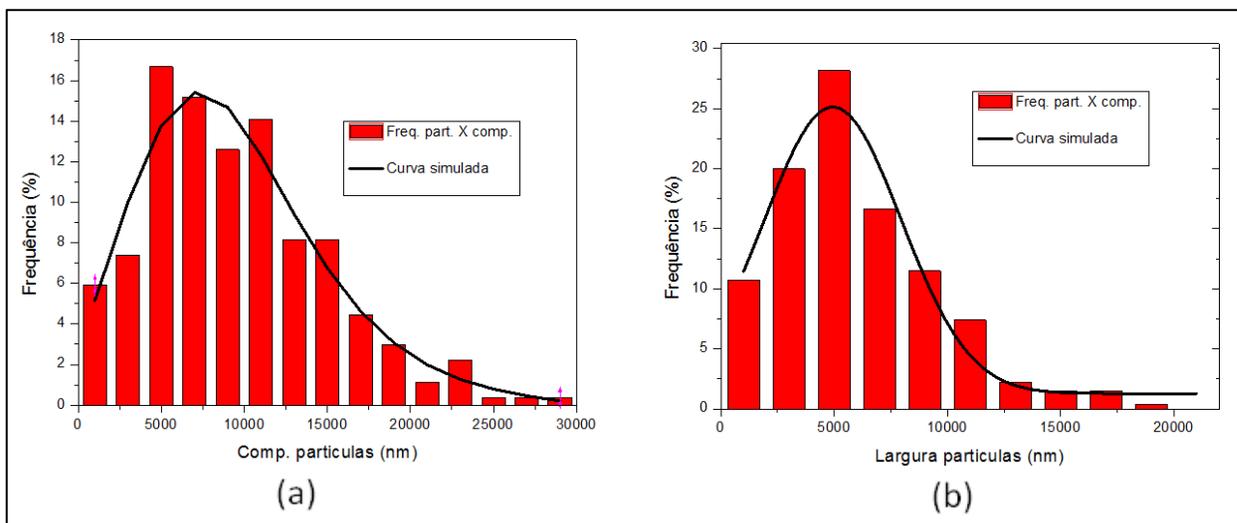
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 42: (a), (b) MEV da Forma II – FNT.



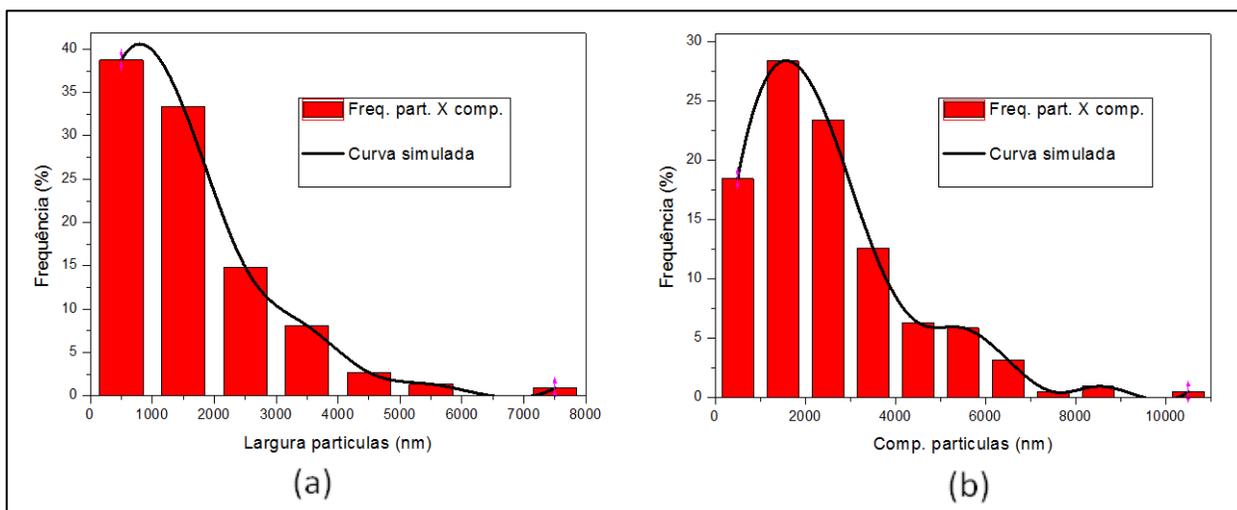
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 43: Distribuição de tamanho de partículas para a Forma I da FNT em relação à (a) largura e ao (b) comprimento.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 44: Distribuição de tamanho de partículas para a Forma II da FNT em relação à (a) largura e ao (b) comprimento.



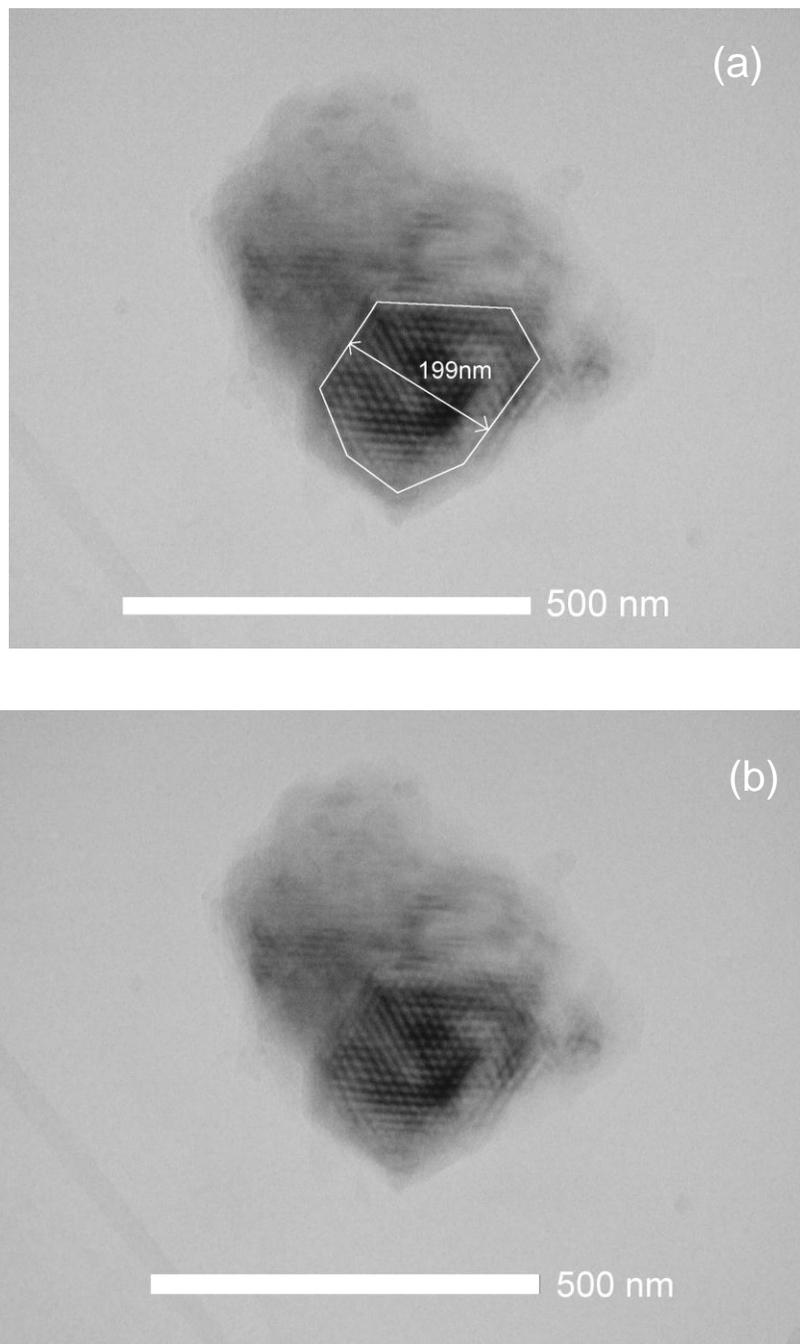
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Na Figura 45 é possível observar um ordenamento de planos atômicos de cerca de 200 nm na região assinalada e em regiões próximas, que podem ser cristalitos aleatoriamente ordenados no material. O valor encontrado para esse cristalito não é representativo de toda a amostra, já que o tamanho médio de tamanho de cristalito calculado utilizando os dados para o difratômetro Rigaku RINT2000 fornecem valores de cerca de 30 nm. As regiões muito escuras estão relacionadas com a espessura da amostra.

A homogeneidade no tamanho das partículas a fim de que se encontrem na ordem de nanômetros para obtenção de melhores resultados por MET é uma etapa complexa. A redução da espessura das amostras pode ser obtida por um moinho de bolas, muito embora a utilização deste moinho no caso do presente trabalho não foi possível devido à limitada quantidade de material disponível.

As imagens obtidas por MET em que se pode observar o ordenamento de planos atômicos só foi obtida para a amostra da Forma I da FNT. Para a amostra da Forma II o tamanho das partículas para as análises por MET estavam muito espessas, além de que a amostra se mostrou muito suscetível ao feixe de elétrons.

Figura 45: MET da Forma I (a) delimitação da região em que existe um ordenamento referente aos planos atômicos e (b) imagem original sem a delimitação.

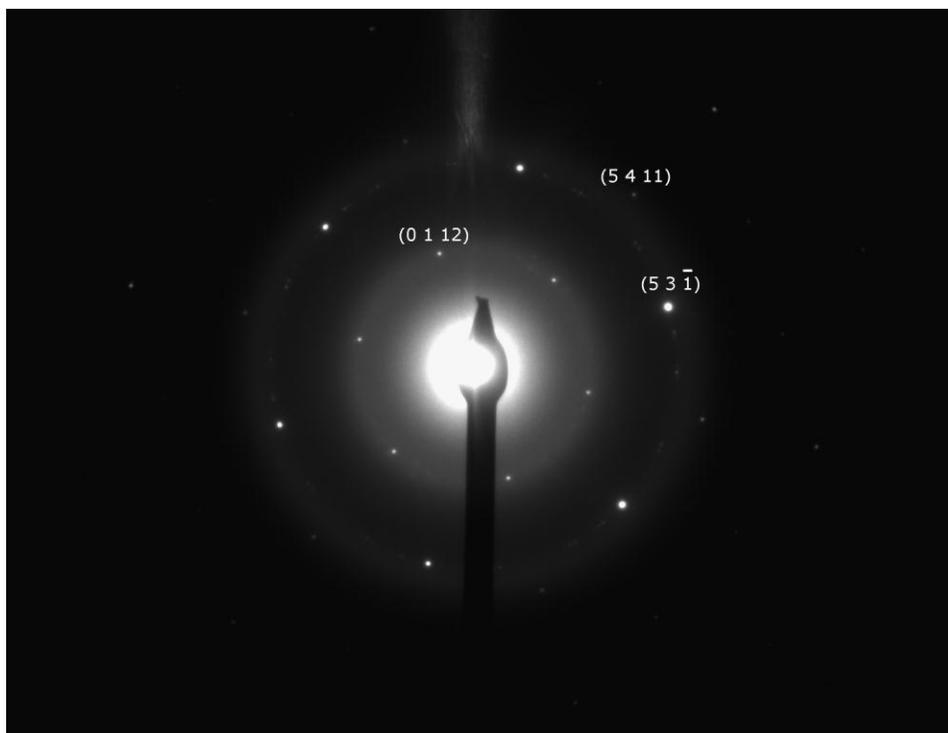


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

A forma planar das partículas não sugere uma anisotropia dos cristalitos, já que não apresentam uma orientação preferencial de crescimento como seria o caso, por exemplo, para cristalitos em forma de agulhas, ou mesmo a forma triangular como reportado no trabalho de EDDLESTON et al. (2010) [26], que utilizaram MET para caracterizar alguns fármacos, identificando formas polimórficas e defeitos nas amostras.

A difração de elétrons é uma técnica complementar na caracterização de materiais. No presente trabalho, só foi possível obter um bom padrão para a amostra *Finasterida B*, em que havia somente a presença da Forma I, confirmada por meio da indexação do padrão de difração.

Figura 46: Padrão de difração de elétrons para a amostra *Finasterida B* – eixo de zona $[\bar{3}7\ 60\ \bar{5}]$.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A difração de elétrons foi utilizada para caracterizar a forma polimórfica da FNT e corroborou com os resultados que obtivemos antes por DRXP para a amostra da Forma I. Embora não tenha sido possível utilizá-la na caracterização da amostra da Forma II, a metodologia apresentada aqui será utilizada em outros trabalhos, por exemplo, no estudo da isotibolona (um isômero da tibolona) por meio de MET correlacionando os resultados com os obtidos por DRXP.

5.2 Quantificação do amorfo no padrão interno Li_2CO_3

A proporção de amorfo calculada no carbonato de lítio foi de 14,8% com um desvio padrão de 1,0%. Os valores encontrados para cada difratômetro são apresentados na Tabela 6, e em seguida foi apresentado também os refinamentos das três proporções para cada difratômetro utilizado.

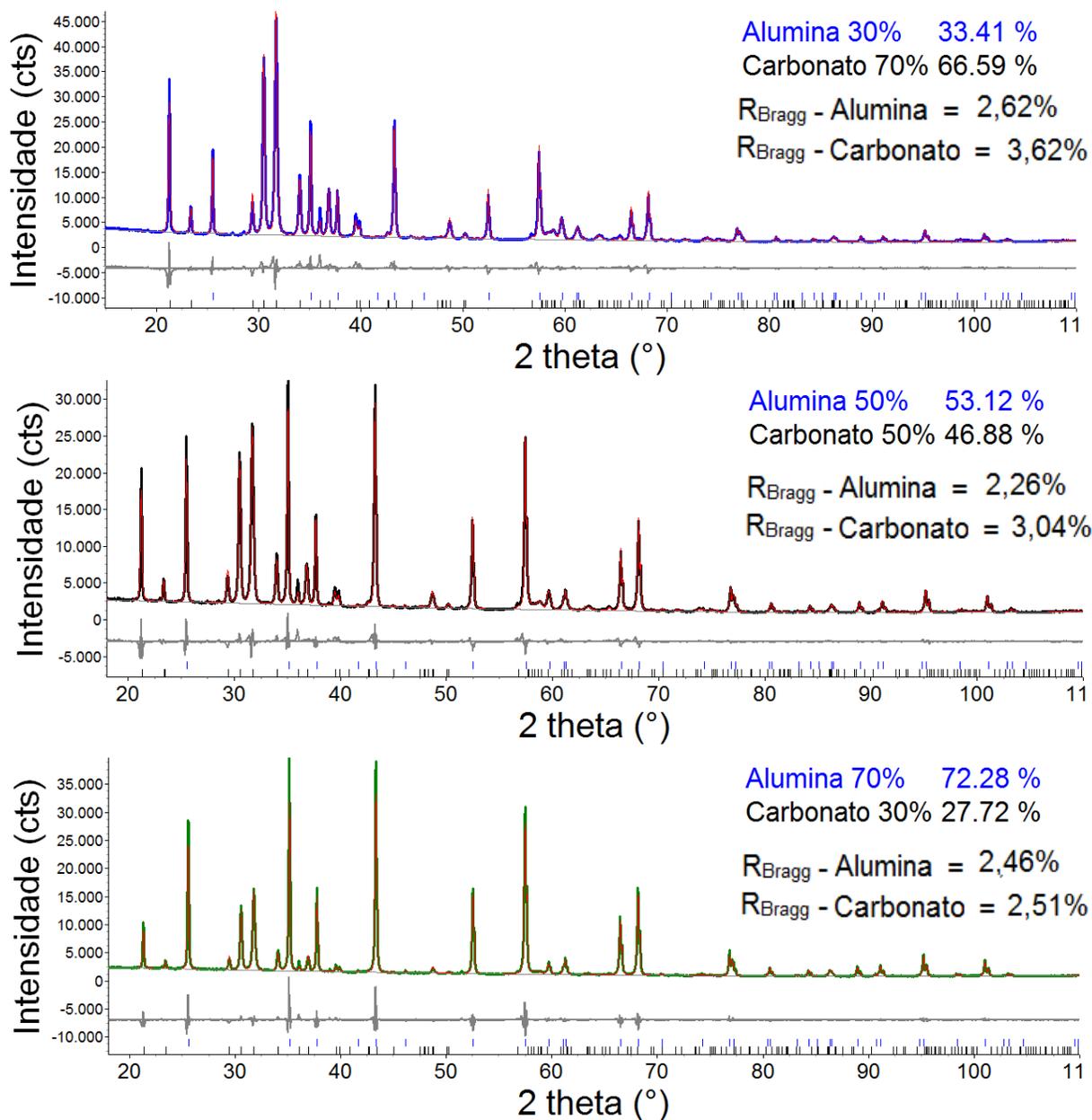
Tabela 6: Proporção de amorfo no Carbonato de Lítio

Proporção de amorfo nas misturas de Alumina (Al) + Carbonato de lítio (Car)					
Difratômetro	30%Al/70%Car	50%Al/50%Car	70%Al/30%Car	Média (\bar{X})	Desvio
D2 Phaser	15,48%	12,66%	11,45%	13,12%	1,68
D8 Advance	18,42%	15,70%	12,91%	15,69%	-0,80
Empyrean	15,35%	14,14%	14,55%	14,68%	0,12
Rigaku	18,19%	10,46%	16,05%	14,90%	0,10
Stadi-P	15,32%	16,22%	15,25%	15,60%	-0,88

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

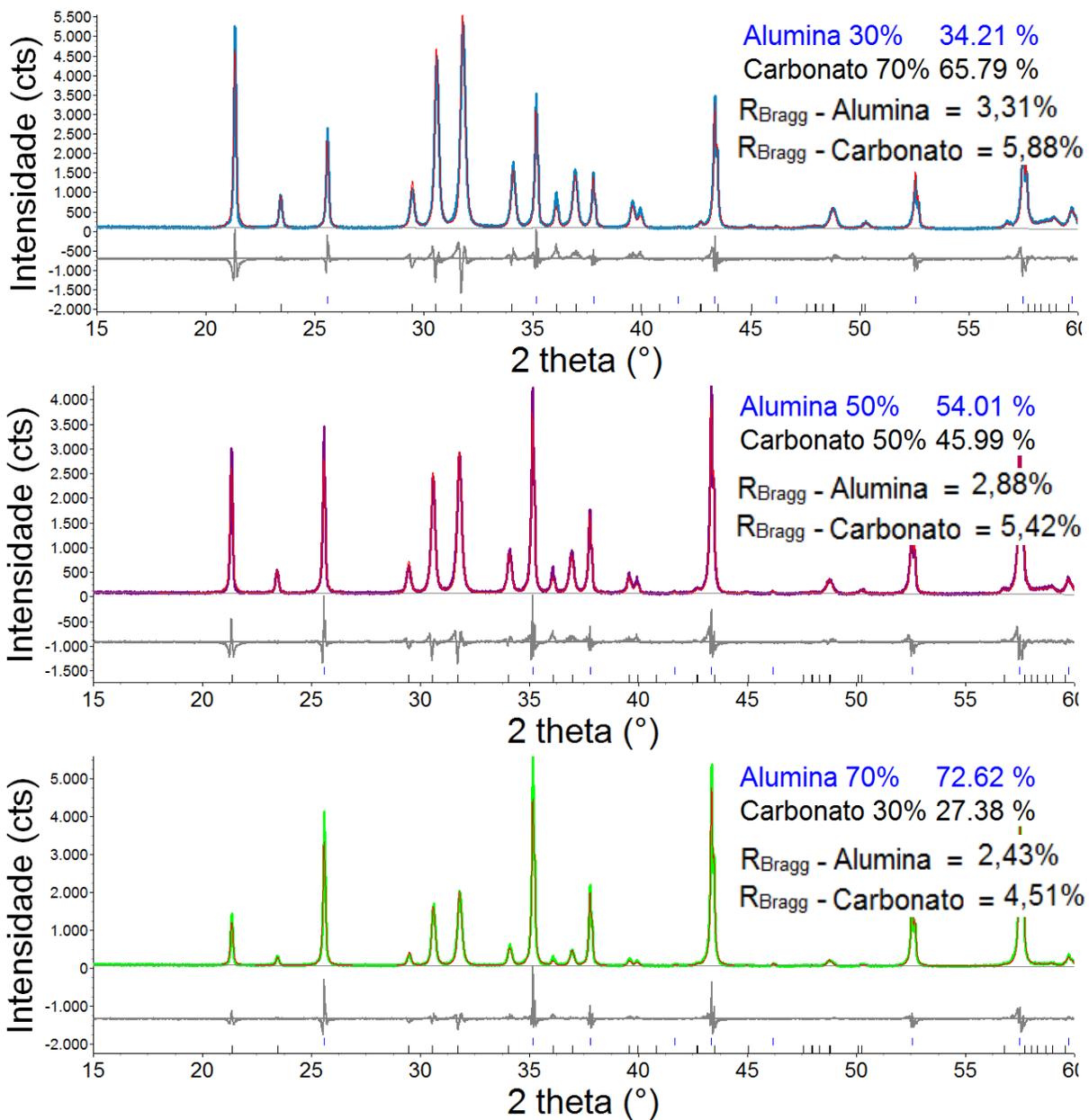
Ocorreram pequenas variações na quantificação do amorfo para as três amostras medidas, e uma média dos valores foi calculada. O maior problema encontrado foi para a proporção de 50%alumina/50%carbonato de lítio, possivelmente devido a um problema de ajuste durante o refinamento. As medidas foram realizadas em diversos equipamentos com amostras em proporções diferentes dos padrões para reduzir os erros devido à “flutuações” nos valores para o amorfo.

Figura 47: Quantificação de amorfo – Difratorômetro D2 Phaser – $R_{wp} = 7,51\%$; $\chi^2 = 3,65$.



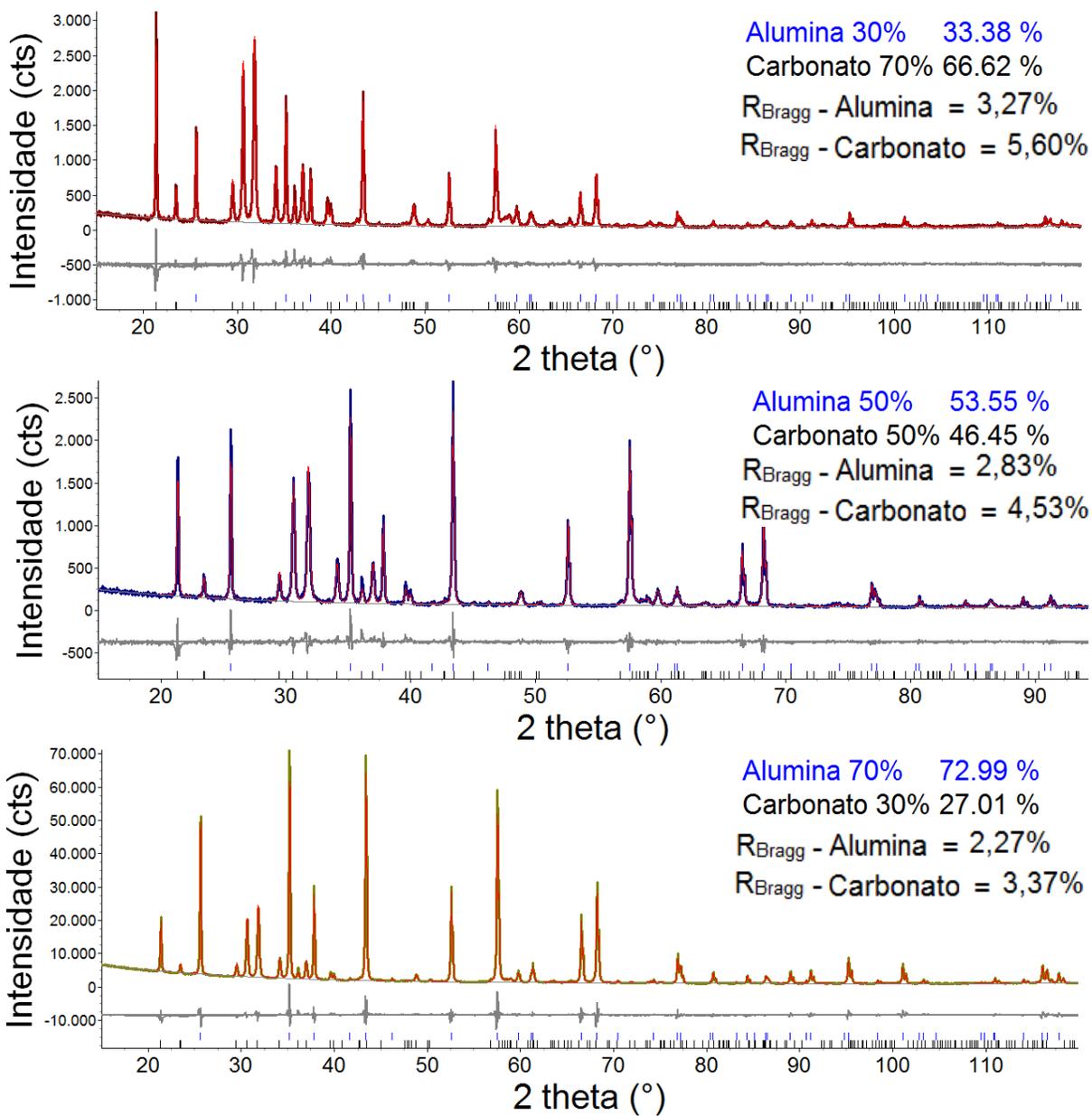
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 48: Quantificação de amorfo – Difratorômetro D8 Advance - $R_{wp} = 14,60\%$; $\chi^2 = 2,25$.



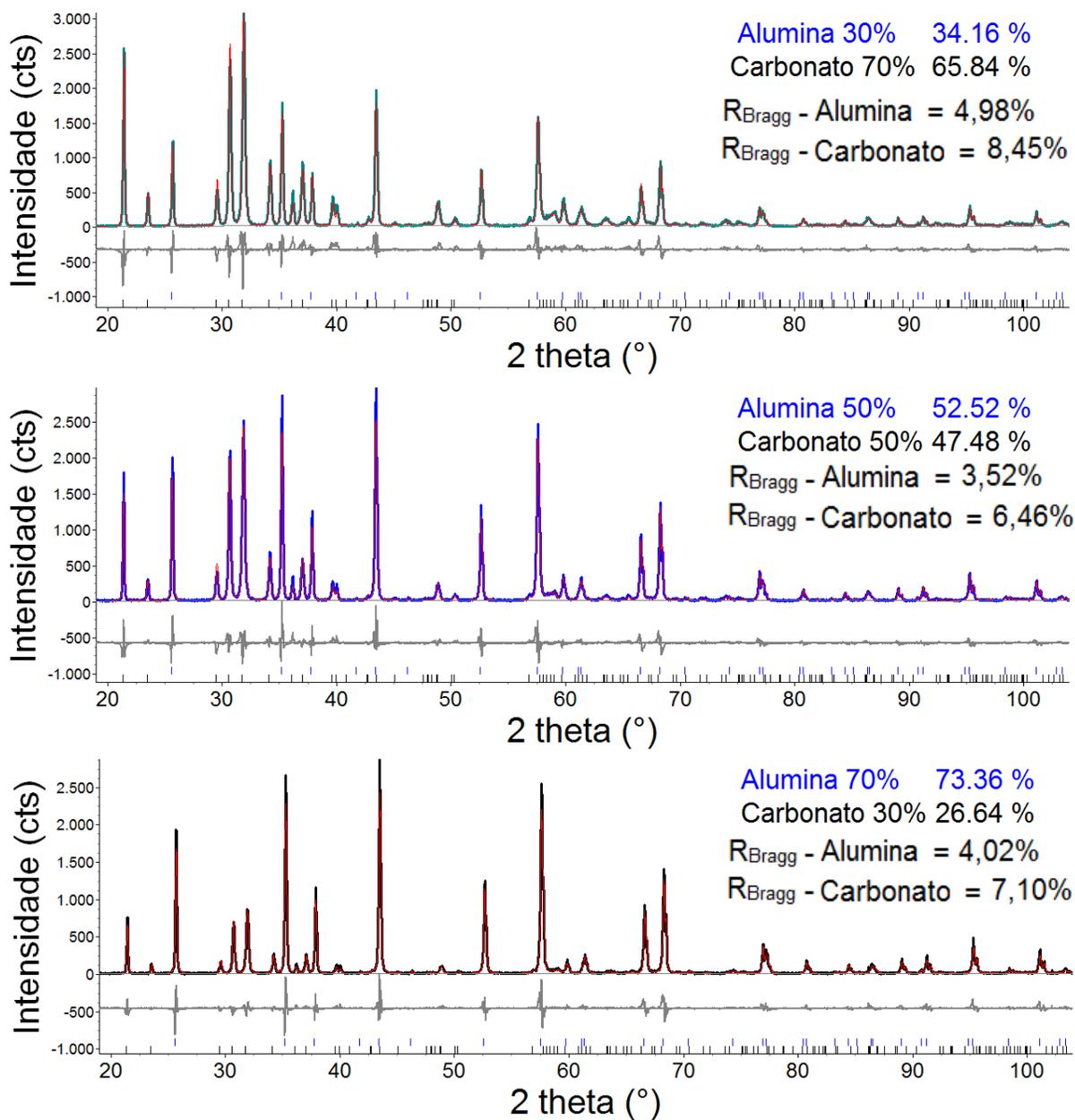
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 49: Quantificação de amorfo – Difratorômetro Empyrean - $R_{wp} = 8,13\%$; $\chi^2 = 3,01$.



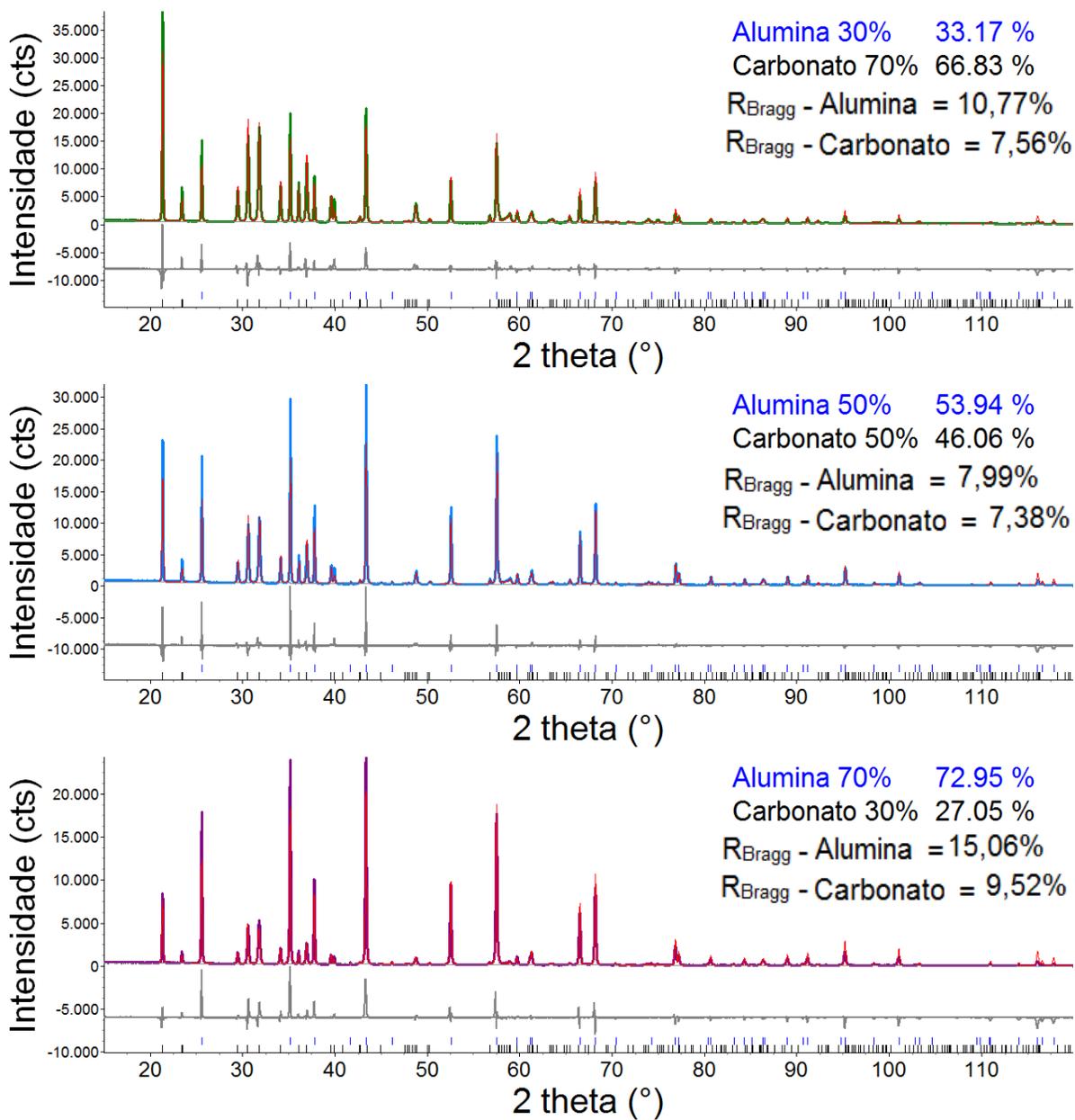
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 50: Quantificação de amorfo – Difratorômetro RINT2000 - $R_{wp} = 20,04\%$; $\chi^2 = 2,02$.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Figura 51: Quantificação de amorfo – Difratorômetro Stadi-P - $R_{wp} = 21,26\%$; $\chi^2 = 5,59$.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

5.3 Quantificação do amorfo nas matérias-primas

Uma vez quantificada a proporção de amorfo no carbonato, foram realizadas as misturas deste com a matéria-prima. As amostras foram preparadas na proporção de 30%Forma I + 70%carbonato e 30%Forma II + 70%carbonato, e para a quantificação do amorfo nas matérias-primas foram utilizados os equipamentos D2 Phaser e o Rigaku RINT2000, sendo os valores apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Proporção em massa de amorfo na matéria-prima

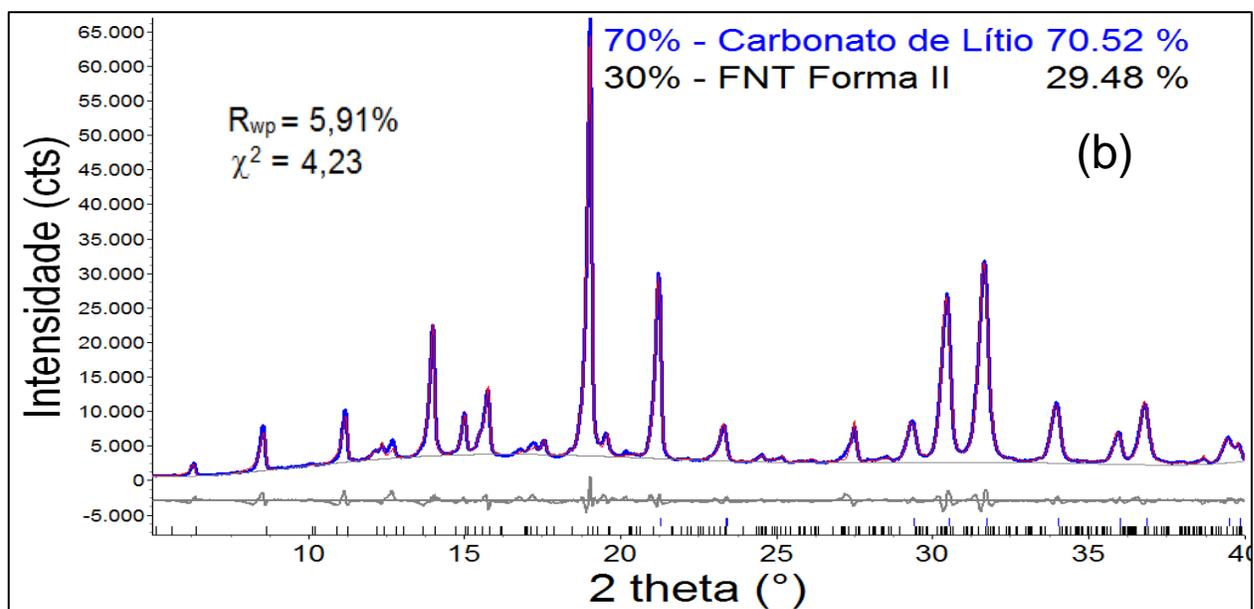
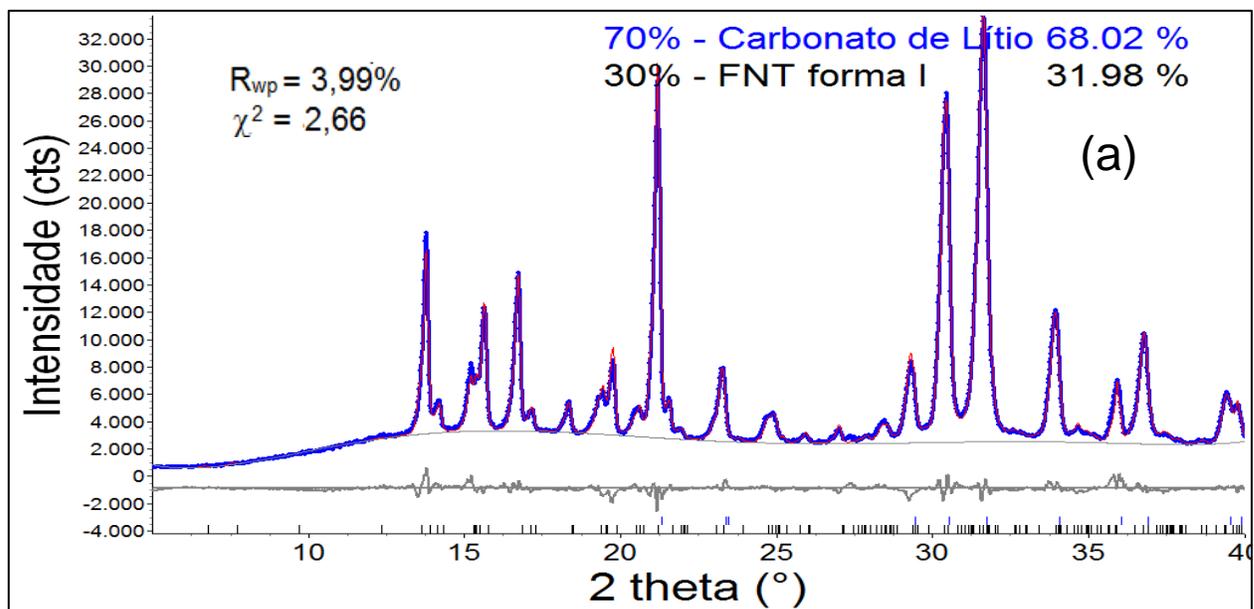
Proporção de amorfo		
Difratômetro	Amostra Forma I	Amostra Forma II
D2 Phaser	11,10%	18,03%
Rigaku RINT2000	11,13%	18,40%
Valor médio	11,11%	18,21%

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

O cálculo da proporção de amorfo na matéria-prima é relevante, já que este pode aparecer em fármacos. Além disso, ao se quantificar uma mistura de fases pelo método de Rietveld, o valor determinado está relacionado apenas com a parte cristalina

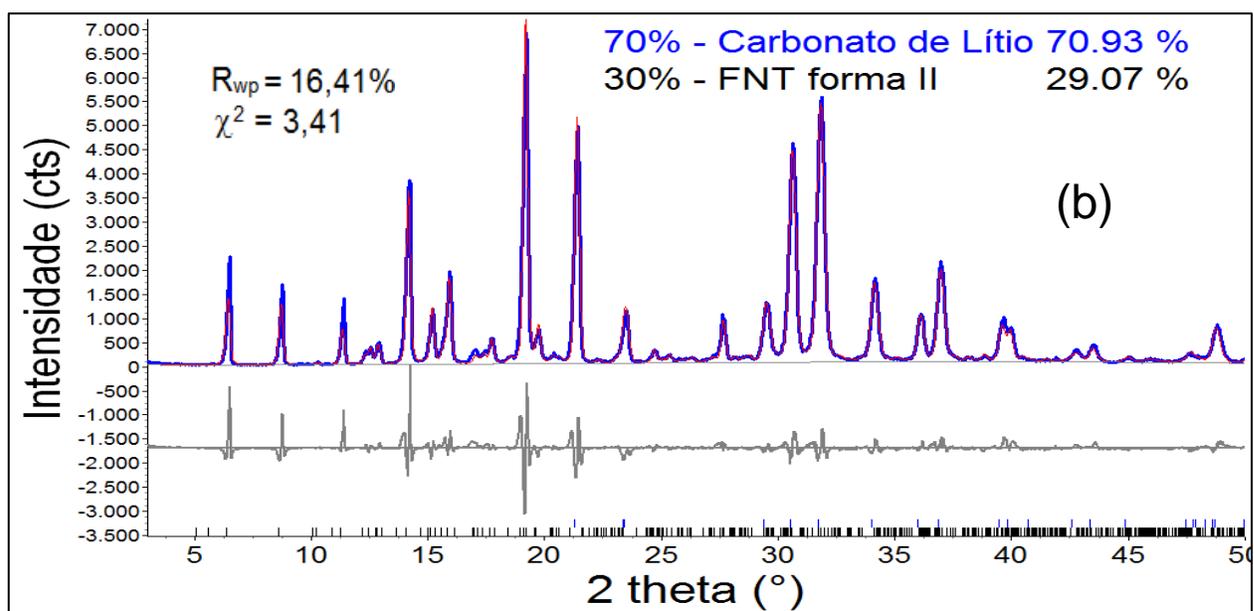
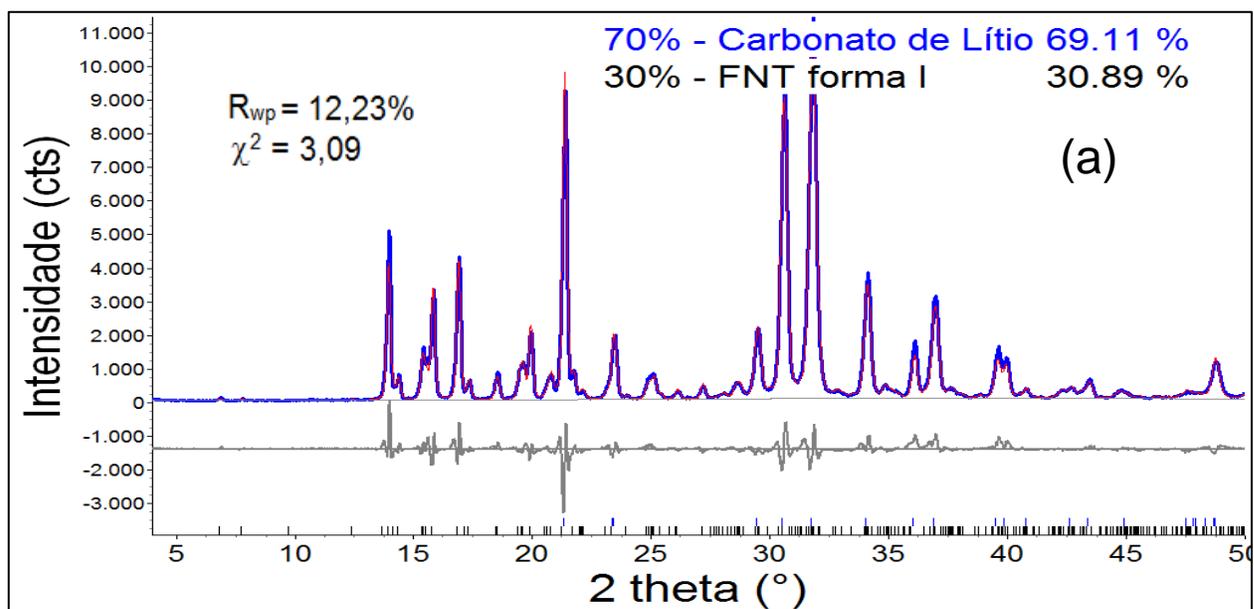
da amostra, de modo que a real proporção em massa deve levar em consideração a fração de amorpho presente.

Figura 52: Quantificação de amorpho nas matérias-primas: (a) Forma I com padrão; (b) Forma II com padrão - Difratorômetro D2 Phaser



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 53: Quantificação de amorfo nas matérias-primas: (a) Forma I com padrão; (b) Forma II com padrão - Difratorômetro RINT2000



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Portanto, no caso da definição dos limites de identificação e quantificação da fração minoritária, serão apresentados os resultados para a menor proporção cristalina possível de identificar e quantificar juntamente com os valores reais das proporções em massa.

5.4 Limites de identificação e quantificação

5.4.1 Limite de identificação

Para compararmos os difratogramas das proporções, a fim de definirmos diferenças nas intensidades que estariam relacionadas com a forma polimórfica em menor proporção, foram ajustadas as intensidades dos picos principais da forma majoritária com o difratograma da forma pura, mantendo assim um mesmo fator de escala. Para tanto, os ajustes foram realizados levando em consideração picos mais intensos e que não estavam sobrepostos com a forma minoritária. Como apresentado na metodologia experimental, a análise foi dividida em duas situações, uma em que a Forma I aparece de 0,5% a 5,0% em massa e em outra em que aparece em proporções de 95,0% a 99,5%, em massa. Ressalta-se que a análise visual pode não indicar a realidade da quantidade preparada. Esta variação pode ser ocasionada pela orientação preferencial na amostra que altera as intensidades dos picos. No entanto, mesmo com

a contribuição da orientação preferencial os resultados apresentados foram suficientes para definir os limites de identificação das formas polimórficas envolvidas.

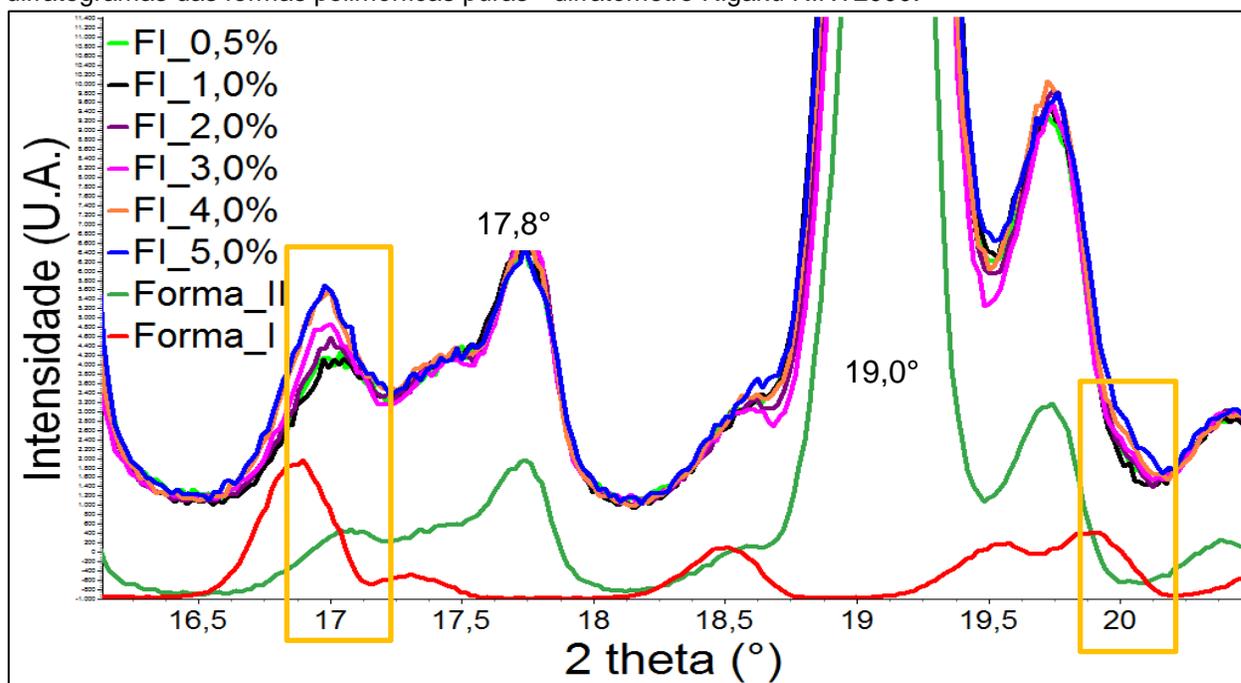
No caso de dúvidas em rotinas de análises por DRXP em misturas de fases, é indicado realizar novas medidas mudando o acondicionamento da amostra no porta-amostra, avaliando dessa forma a contribuição da orientação preferencial. Para facilitar a apresentação dos resultados, as amostras foram nomeadas em relação à proporção de Forma I na mistura, como FI_X em que X é a proporção de Forma I. Por exemplo, a amostra FI_5 corresponde a 5,0% de Forma I + 95,0% de Forma II. As amostras das formas polimórficas puras foram denominadas de Forma I e Forma II.

5.4.1.1 Rigaku RINT2000

Na primeira situação, foi ajustada inicialmente a intensidade do difratograma da amostra FI_0,5 com o difratograma da Forma II pura, levando em consideração o pico mais intenso desta forma (em 19,0°) e outro pico bem menos intenso, mas sem sobreposição (em 17,8°). Em seguida, foram colocados no mesmo gráfico os difratogramas das demais proporções, ajustando-os ao difratograma da Forma II pura (novamente foram normalizadas as intensidades e ajustados os deslocamentos da amostra). A Forma I pura também foi incluída para ser avaliada a região em que haveria a contribuição desta, e foi incluído também o difratograma da Forma II pura, em que

foram reduzidas suas intensidades em relação aos demais difratogramas das proporções. Isso foi feito para analisar as posições dos picos das formas polimórficas.

Figura 54: Forma I em proporções de 0,5% a 5,0% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras - difratômetro Rigaku RINT2000.

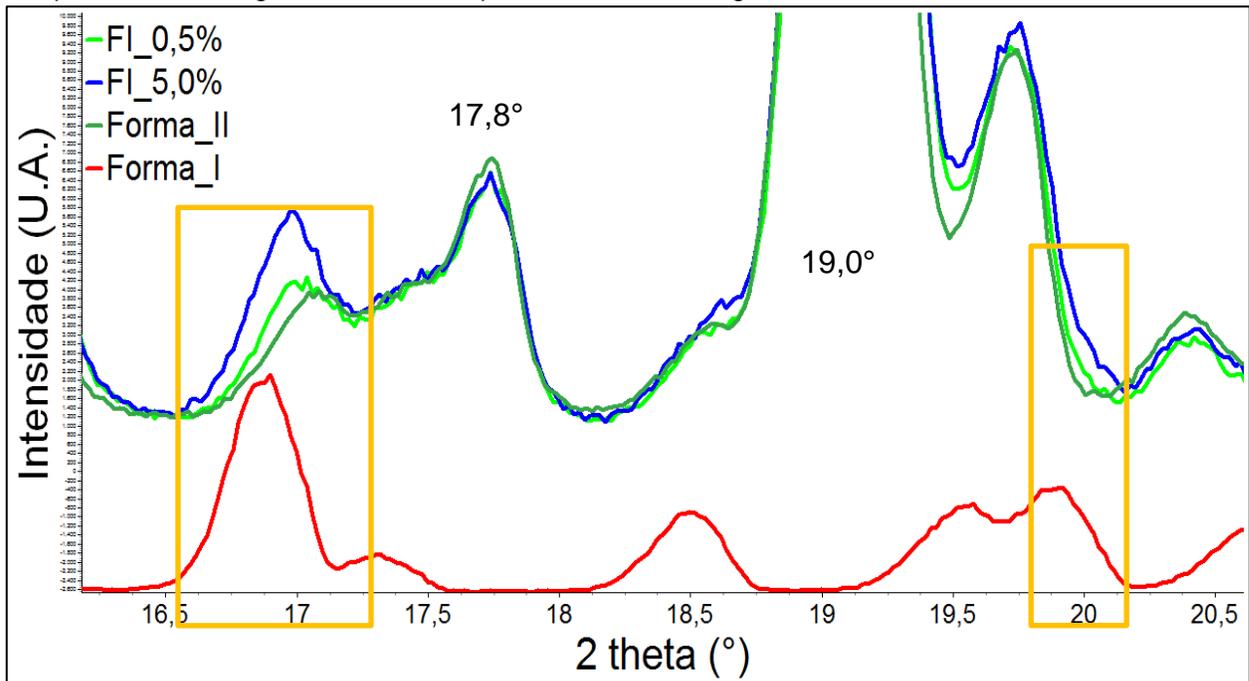


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Em uma análise preliminar da Figura 54 poderia ser definido que somente a partir da amostra em que aparece a Forma I a 2,0% (difratograma em roxo) é que pode ser notada a presença desta forma. No entanto, ao se sobrepor os difratogramas da Forma II pura com a amostra FI_0,5% (Figura 55) é possível perceber a contribuição de um dos picos mais intensos da Forma I a 16,8°, e outra contribuição, bem mais sutil de

um pico com menor intensidade, a $20,0^\circ$. A amostra FI_5,0% foi colocada juntamente com a amostra FI_0,5% para que fosse possível uma comparação da variação da intensidade pela contribuição da Forma I. Nota-se na Figura 54, em que são comparados os difratogramas de todas as amostras em proporção, que os perfis para as FI_0,5% e FI_1,0% são muito semelhantes, não apresentando variação relacionada à contribuição da forma minoritária. Era de se esperar que houvesse uma variação, assim como ocorre da amostra da Forma I pura para a FI_0,5%, e da amostra FI_1,0% para a amostra FI_2,0%. Era de se esperar que a intensidade do pico em $16,8^\circ$ para o caso de 0,5% de Forma I ficasse no espaço entre o pico da Forma II pura e da FI_1,0%. Assim, embora essa simples observação não seja suficiente para conclusões, pode-se supor que a amostra com 0,5% de Forma I está apresentando quantidade maior desta forma do que se esperava com base no que foi pesado na balança para a preparação da mistura.

Figura 55: Proporção mínima de 0,5% da Forma I na mistura possível de ser identificada, quando comparada ao difratograma da Forma II pura - difratômetro Rigaku RINT2000.



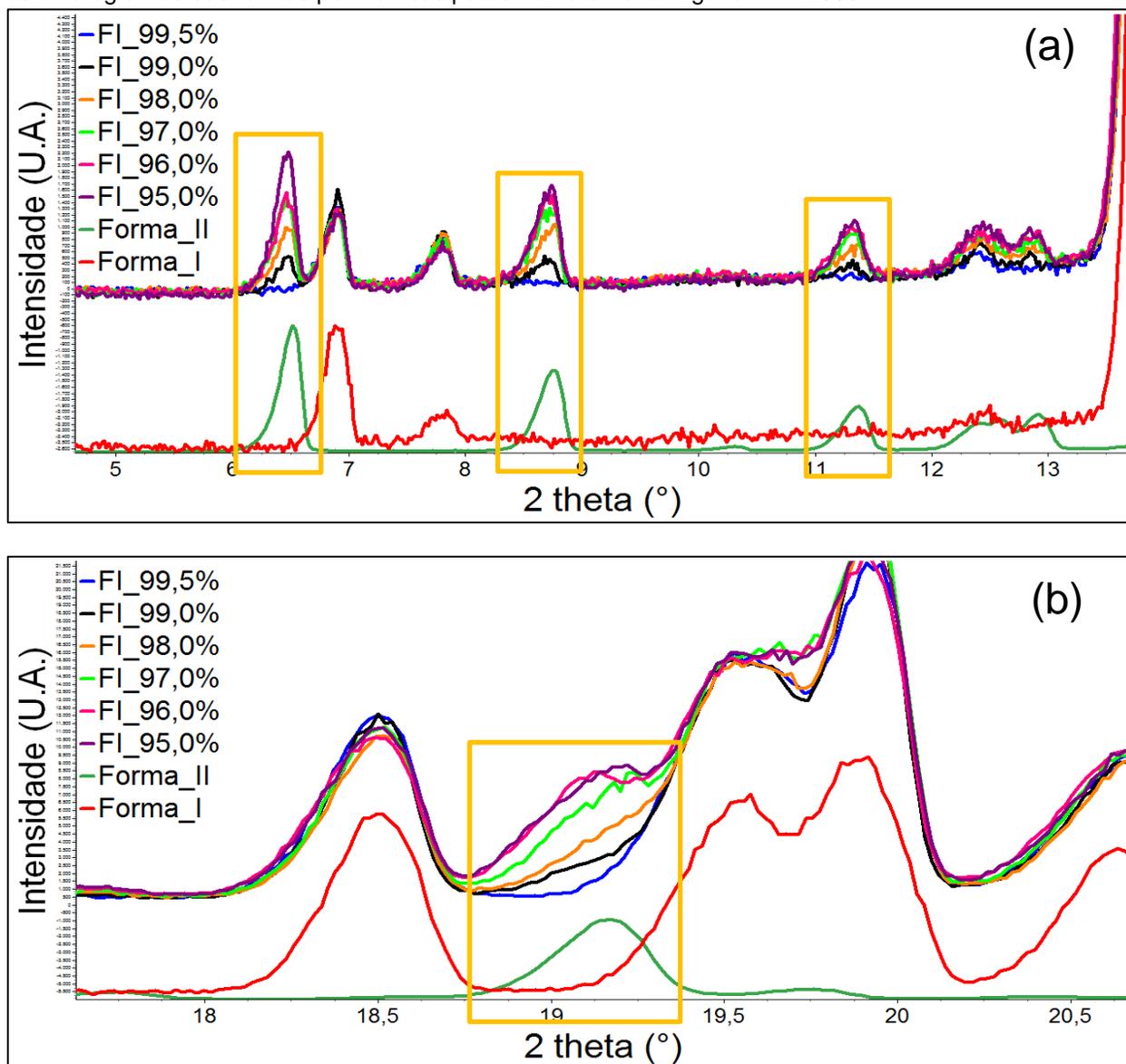
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

Na segunda situação os difratogramas analisados são referentes às amostras em que a Forma I aparece em maior proporção na mistura, ou seja, nas proporções de 95,0% a 99,5%. Foram analisadas duas regiões diferentes do difratograma, uma em que não houve a sobreposição dos picos (de 5° a 13,5°) e a outra, em que mesmo ocorrendo a sobreposição, foi possível observar a contribuição do pico da forma em menor proporção, já que este pico é o mais intenso.

Na Figura 56 foram assinaladas por retângulos as regiões em que aparecem a contribuição de picos da forma minoritária (Forma II). Na amostra FI_99,5% já não é possível notar a contribuição da forma minoritária. Isto fica mais evidente quando o

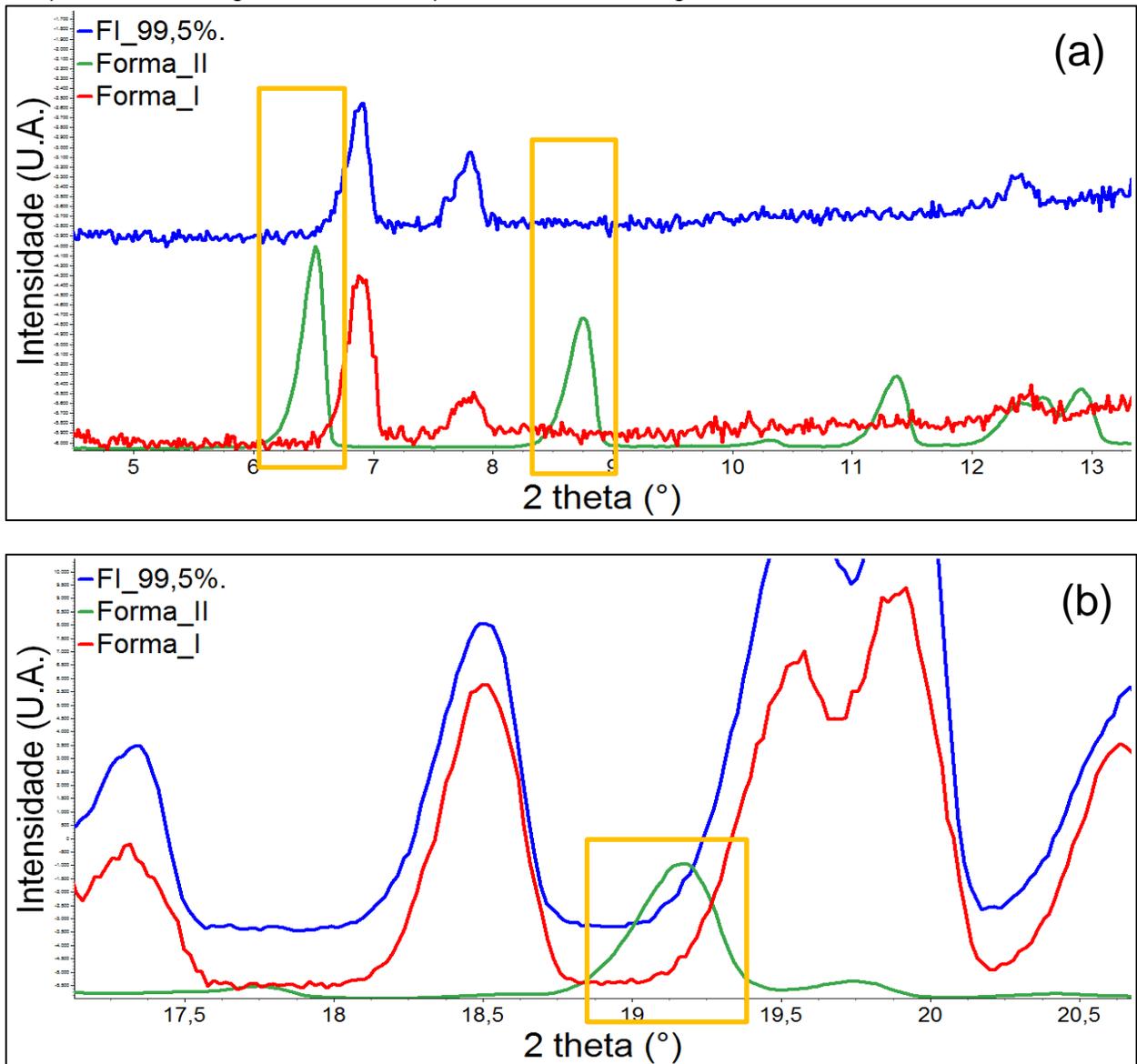
difratograma desta amostra é colocado juntamente com os difratogramas das formas puras, como pode ser visto na Figura 57. Nesta, não é possível notar a contribuição dos picos da forma minoritária para nenhuma das regiões avaliadas.

Figura 56: Forma I em proporções de 95,0% a 99,5% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

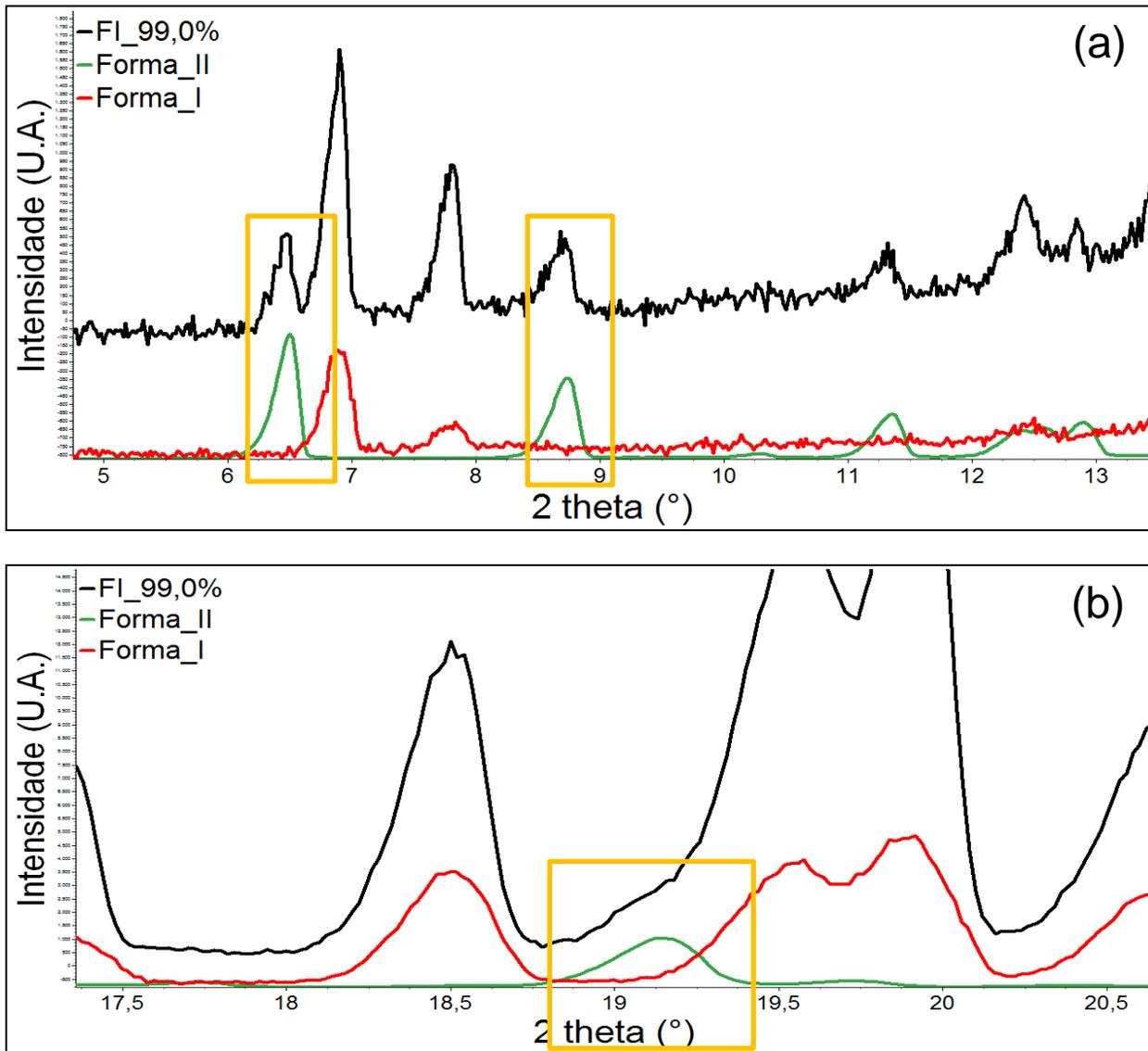
Figura 57: Proporção mínima de 0,5% da Forma II na mistura que não é possível ser identificada, quando comparada ao difratograma das formas puras - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Na Figura 58 foi apresentado o difratograma da amostra FI_99,0% em que já é possível se notar a presença da Forma II na mistura. Os picos isolados entre 5,0° e 13,5°, e o sobreposto em 19,1° tornam evidente a presença desta forma.

Figura 58: Mínima proporção de Forma II (1,0%) possível de ser identificada - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

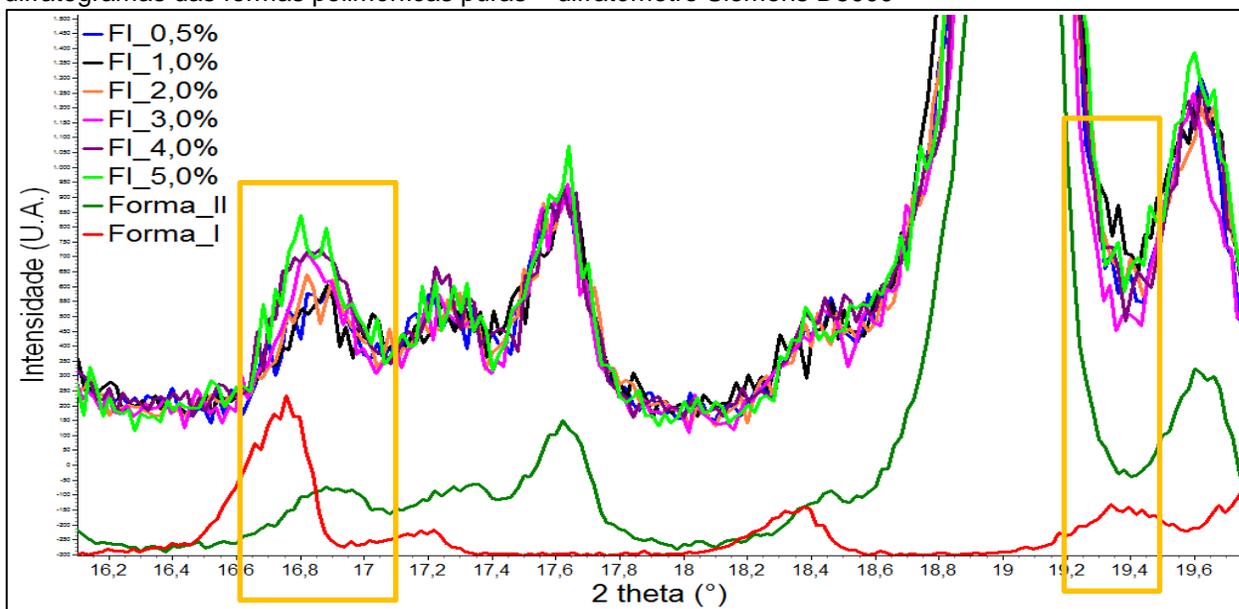
5.4.1.2 Siemens D5000

Para o caso deste equipamento também foram colocados em um mesmo gráfico os difratogramas das proporções, inicialmente para a situação em que a Forma I

aparece em menor proporção na mistura binária, e em seguida a situação em que a Forma II aparece em menor proporção. Assim, foram avaliadas as menores proporções das formas nas amostras.

Os resultados apresentaram um ruído de fundo bem elevado, possivelmente pelo tempo reduzido para a coleta dos dados. Para casos com ruído de fundo muito elevado é necessário avaliar o tempo adequado para a coleta de dados. Esse tipo de problema dificulta a análise de limites de identificação visual.

Figura 59: Forma I em proporções de 0,5% a 5,0% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras – difratômetro Siemens D5000

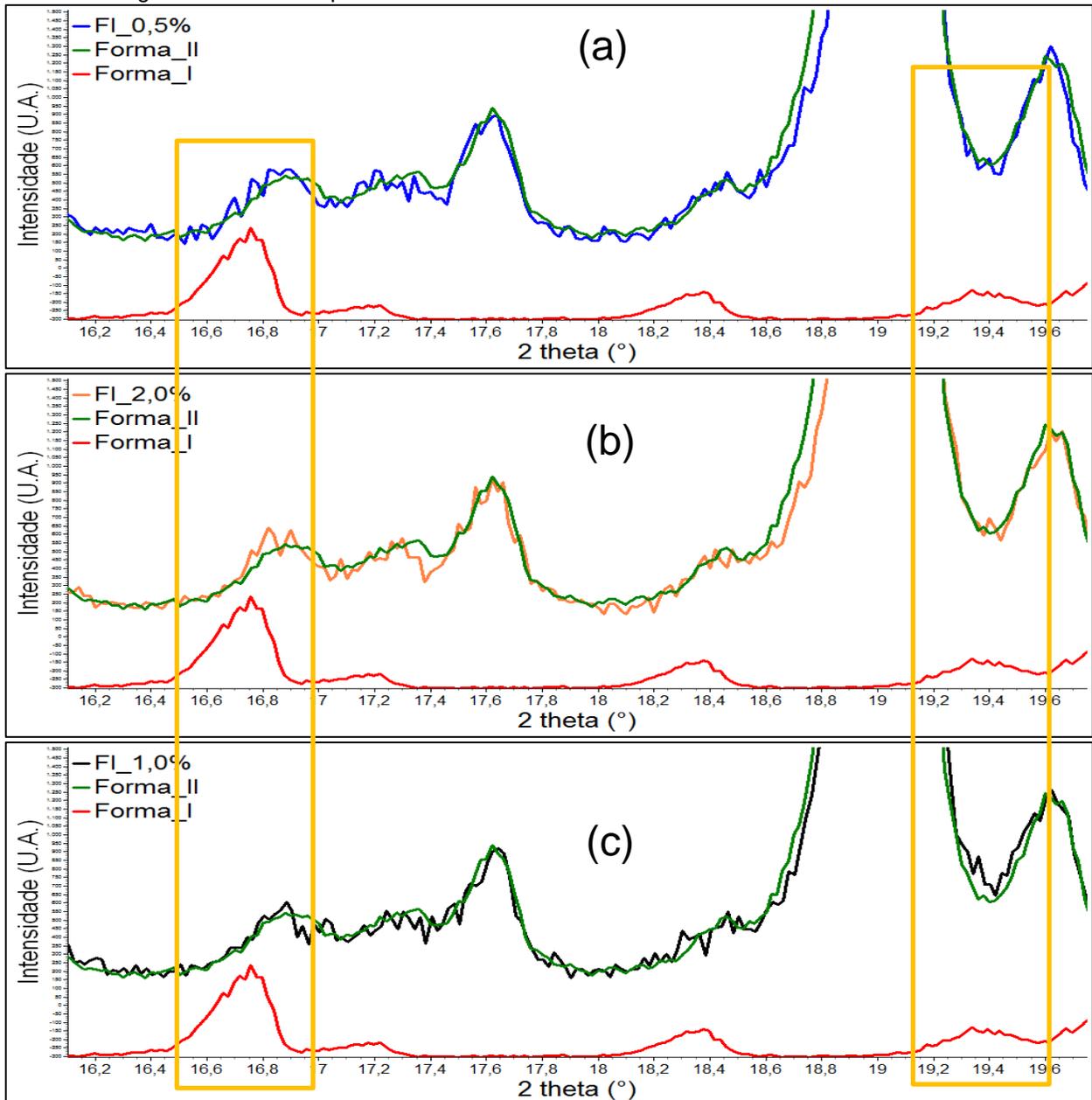


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Em nenhuma das amostras em que a Forma I aparece em proporções abaixo de 2,0% é possível identificar essa pequena proporção. Pode-se notar na figura a seguir uma semelhança entre os difratogramas, o que pode indicar problemas de

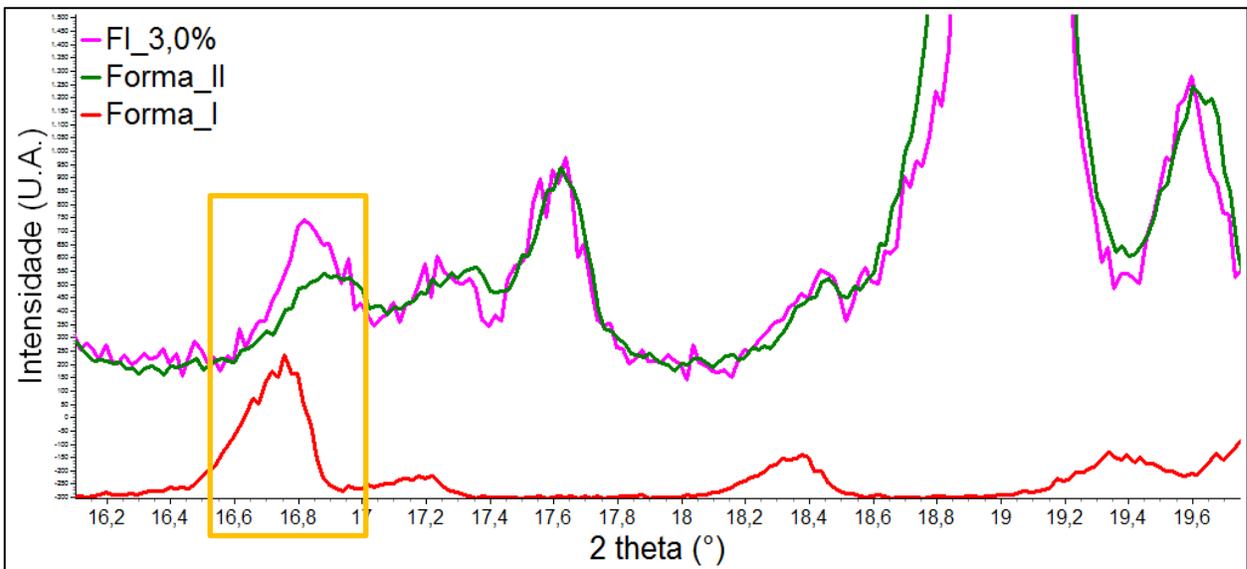
amostragem. Foi possível identificar a Forma I a partir de 3,0%. O problema com o ruído na amostra dificultou a identificação visual de proporções menores (Figura 61).

Figura 60: (a), (b), (c) Difratomogramas em que a Forma I aparece em menor proporção na mistura binária. Em nenhum dos casos fica evidente a contribuição da forma em menor proporção quando comparado com o difratograma das formas puras - difratômetro Siemens D5000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

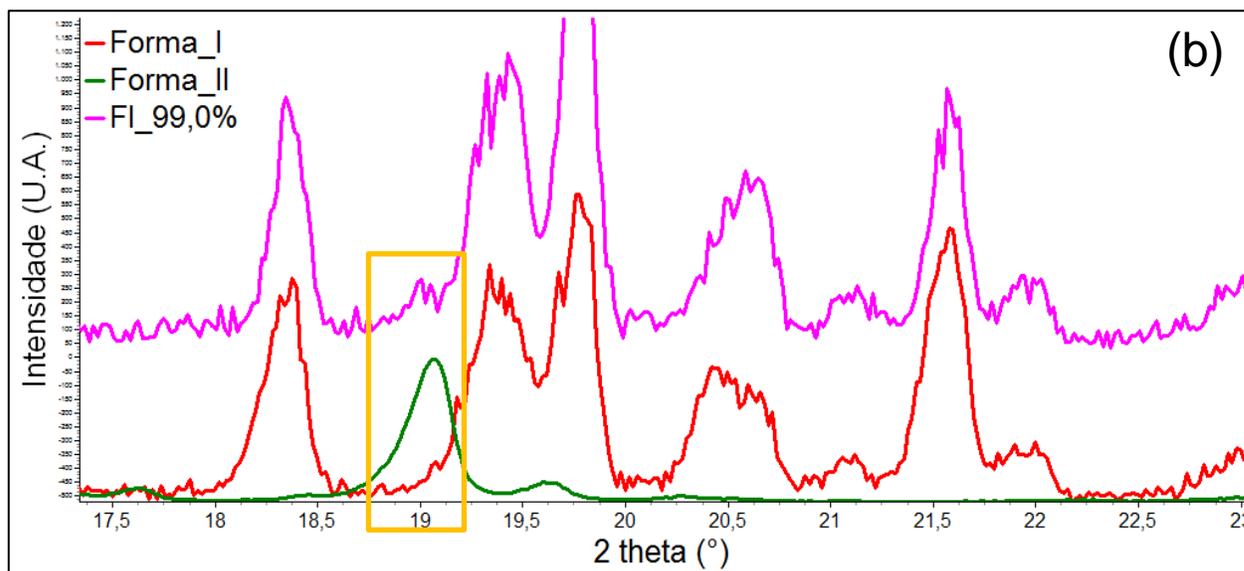
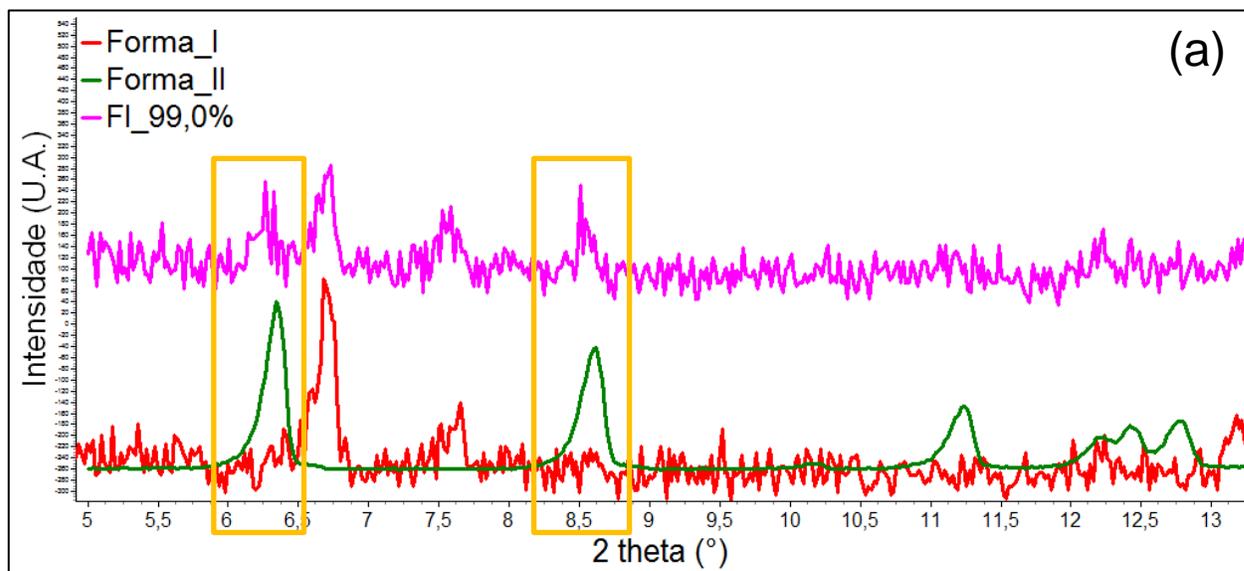
Figura 61: Menor proporção de Forma I possível de ser identificada na mistura binária quando comparada ao resultado para as amostras das formas puras - difratômetro Siemens D5000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para a situação em que a Forma II aparece em menor proporção na mistura binária, é possível identificar a partir de 1,0% de Forma II. No resultado para esta amostra fica evidente a contribuição da fase minoritária nas regiões assinaladas na figura a seguir.

Figura 62: Menor proporção de Forma II possível de ser identificada na mistura binária quando comparada ao resultado para as amostras das formas puras. (a) região sem sobreposição dos picos; (b) região em que existe a sobreposição dos picos das formas - difratômetro Siemens D5000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

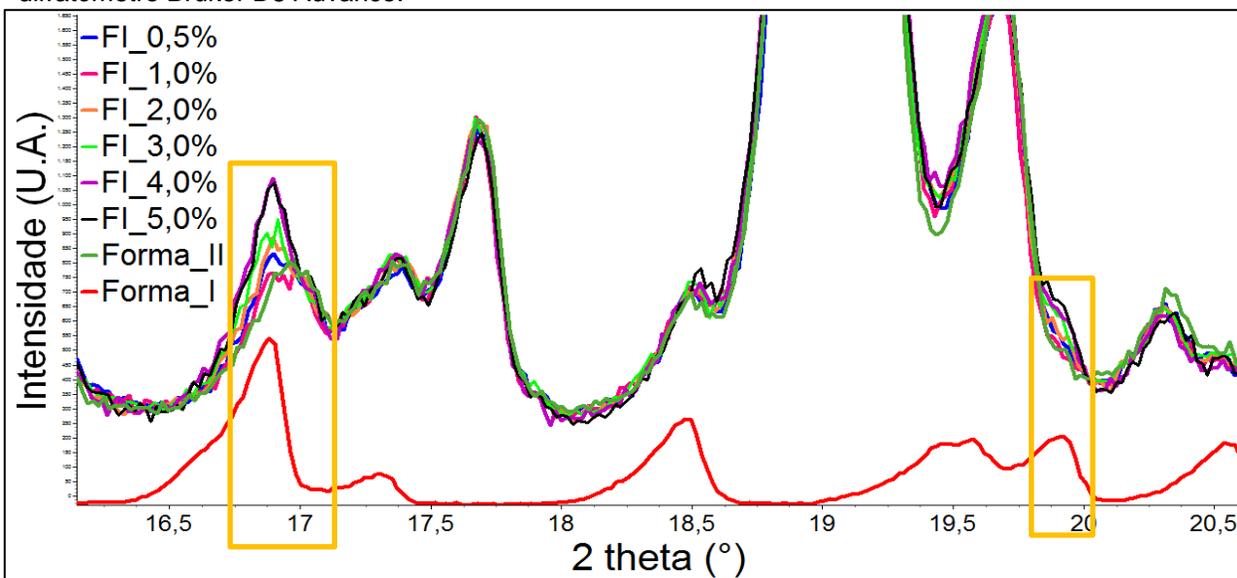
5.4.1.3 Bruker D8 Advance

Inicialmente foi sobreposto o difratograma simulado da forma pura com os difratogramas das forma puras obtidos experimentalmente, de modo a ajustar as intensidades dos picos principais e o deslocamento da amostra. Em seguida, os demais difratogramas foram acrescentados ao gráfico e normalizados de modo a permitir a identificação da forma minoritária.

Por alguma razão a Forma I pura apresenta um difratograma diferente dos casos com pequena quantidade de Forma II (região entre $19,0^\circ$ e $20,0^\circ$, Figura 63). Considerando que não deveria haver alteração tão evidente, supõe-se que isso deve ter acontecido devido à orientação preferencial e à forma de preparação das amostras no momento de acondicioná-las no porta-amostra, ou seja, a orientação preferencial pode ter ocorrido para todas as amostras, como é comum no caso de fármacos, porém em proporções diferentes. Em virtude dos prazos para a conclusão do trabalho não se teve condições de analisar os dados em tempo para que novos testes pudessem ser realizados. De qualquer forma, isso não irá causar problemas nas análises, já que orientação pode ser adequadamente corrigida e um difratograma semelhante da Forma I pode ser simulado para comparações. Este difratograma foi utilizado para avaliar as posições dos picos.

Nas Figuras 63 e 65 estão os difratogramas e comparações das amostras com a Forma I minoritária e, nas Figuras 66 e 69 estão os difratogramas onde a Forma I é predominante.

Figura 63: Difratogramas das misturas binárias das Formas I e II da FNT, juntamente com os difratogramas das formas puras. O difratograma da Forma II foi sobreposto ao difratograma das misturas - difratômetro Bruker D8 Advance.

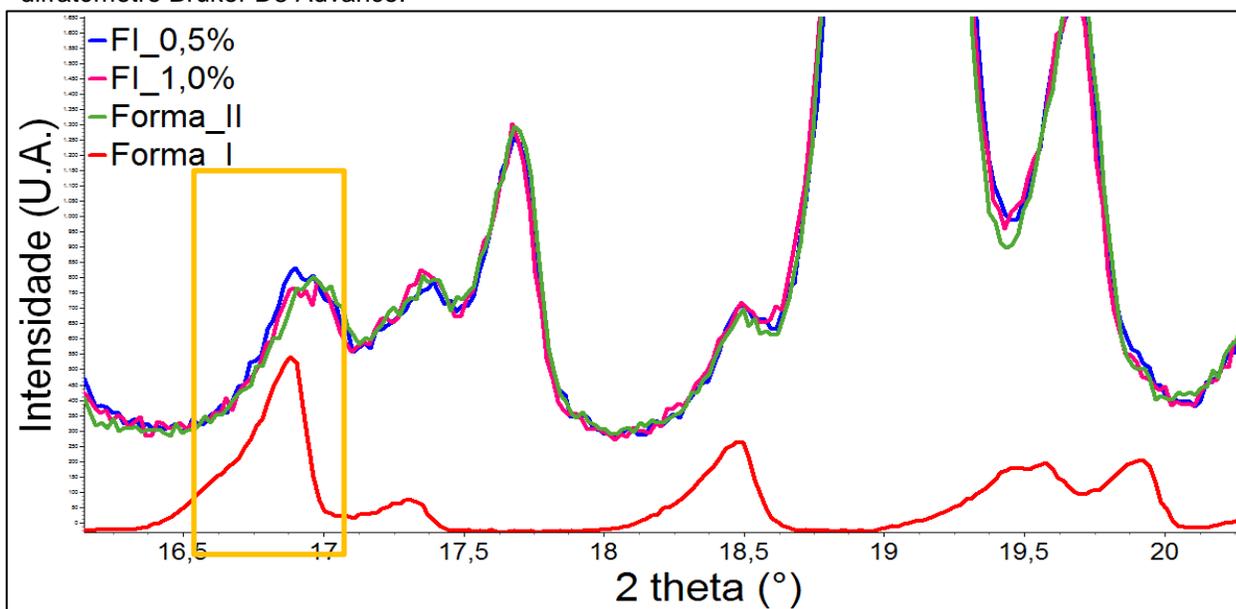


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Nos casos em que a Forma I está presente em pequenas quantidades (FI_0,5%, FI_1,0%, FI_2,0%, FI_3,0%, FI_4,0% e FI_5,0%), é possível verificar que apenas a partir da proporção de 2,0% de Forma I é que se pode observar a sua contribuição nos difratogramas (Figura 63). Essa observação fica mais evidente na Figura 64. Abaixo desta proporção, ou seja, 0,5% e 1,0% de Forma I praticamente não ocorre alteração no perfil dos picos da Forma II entre 16,0° e 21,0°. A pequena alteração que se observa em cerca de 17,0° pode ser confundida com ruído na medida. Na Figura 65, o difratograma da amostra com 2,0% da Forma I foi comparado com os difratogramas das amostras de Forma II e Forma I puras. Nesse caso, a contribuição da Forma I se distingue claramente do perfil da Forma II e não pode ser confundida com

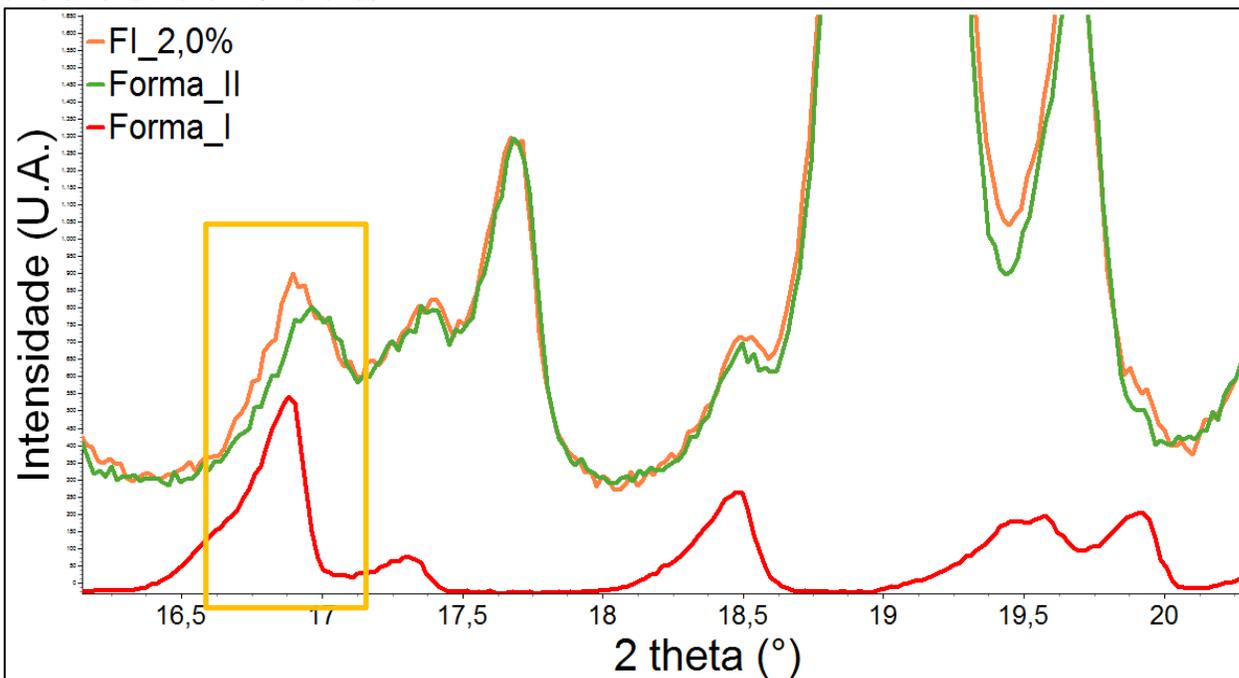
ruído e nem orientação preferencial da Forma II. Já para as amostras com 3,0, 4,0 e 5,0% de Forma I, a diferença pode ser vista nitidamente na Figura 63.

Figura 64: Comparação entre as amostras Forma I 0,5% e Forma I 1,0% juntamente com as formas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho

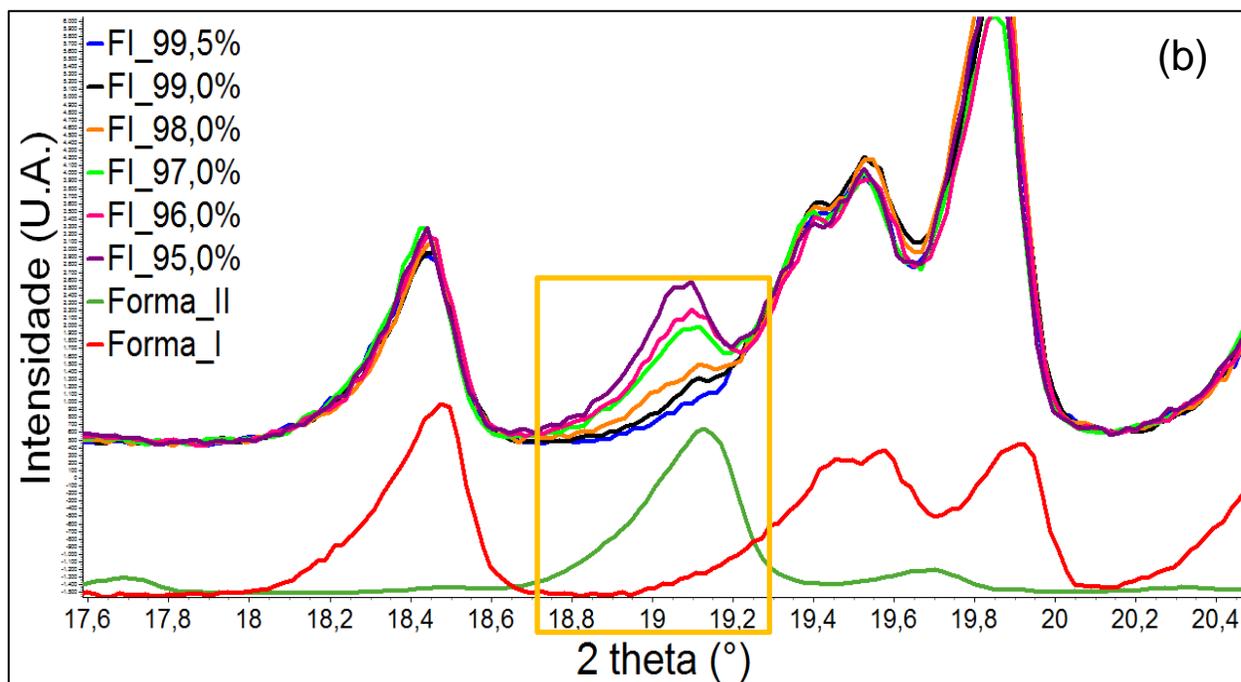
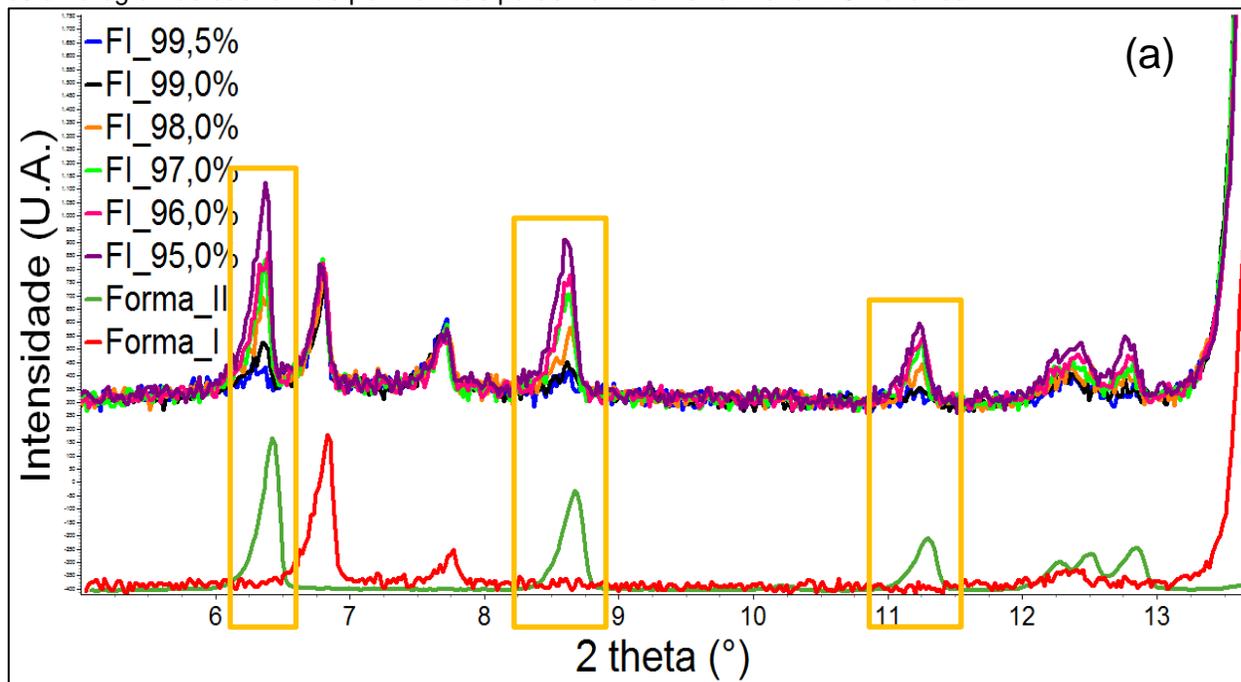
Figura 65: Comparação das amostras FI_2,0% com as amostras das formas polimórficas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

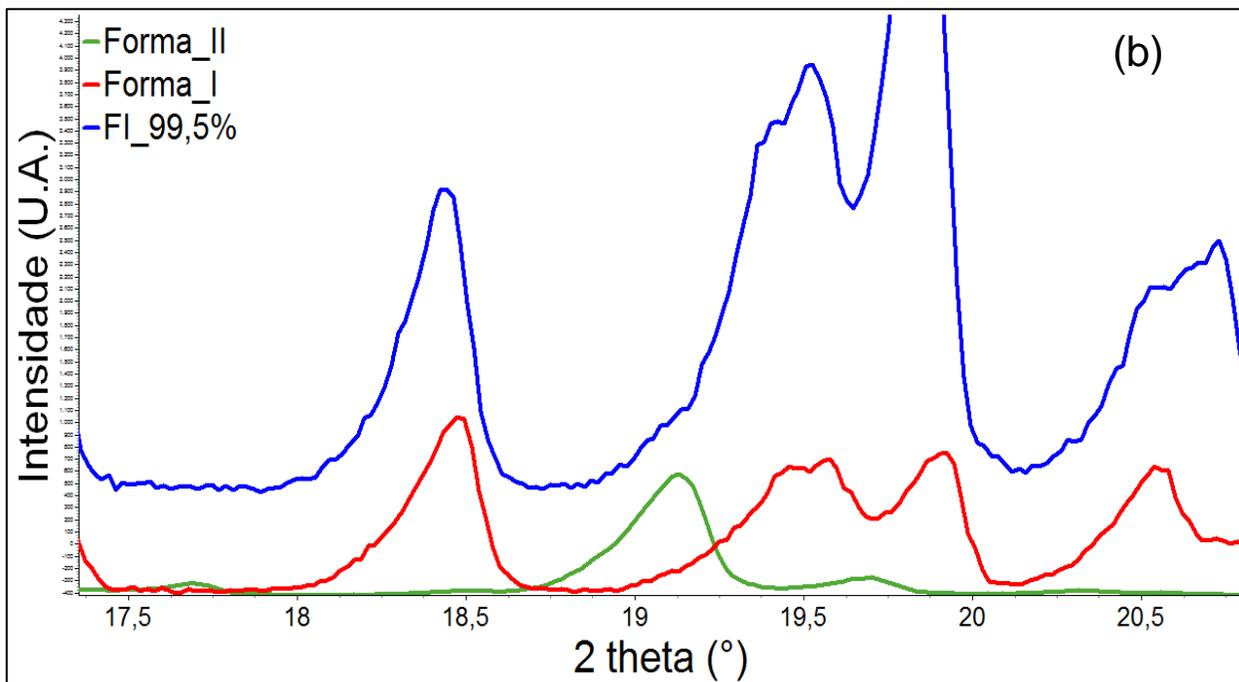
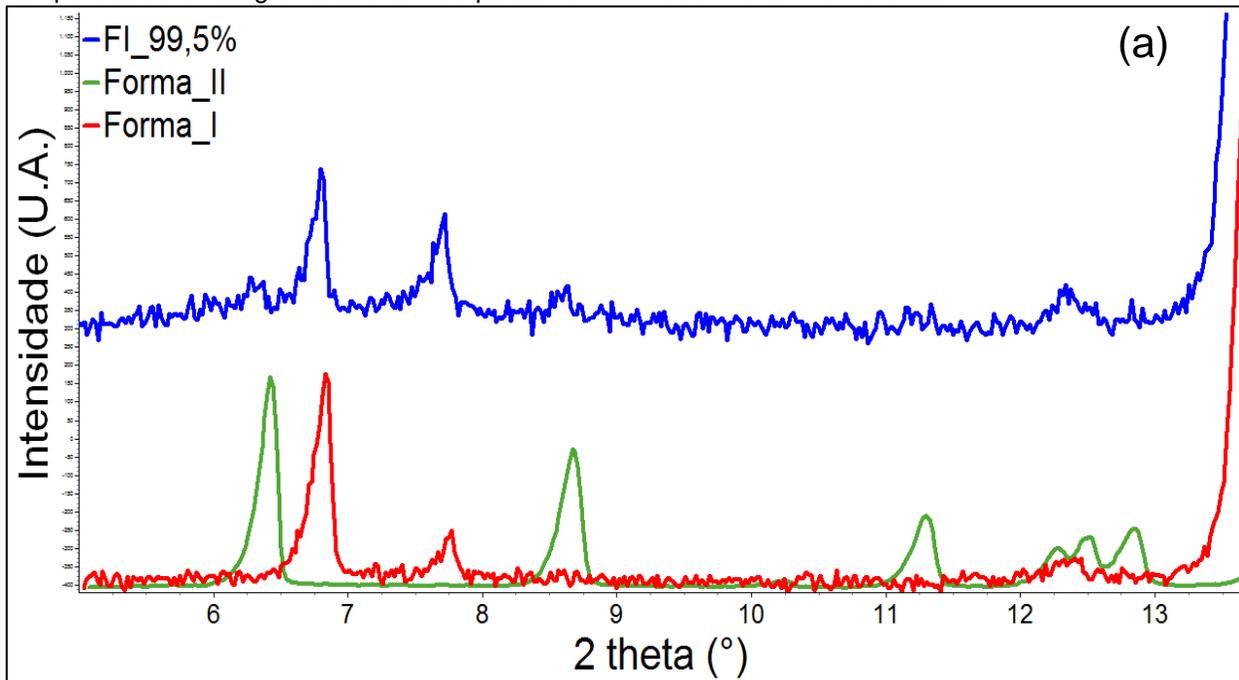
Nos casos em que a Forma I é majoritária (FI_95,0%, FI_96,0%, FI_97,0%, FI_98,0%, FI_99,0% e FI_99,5%), as regiões em que se percebe a contribuição da Forma II são apresentadas nas Figura 66(a) e (b). Nota-se a forma de menor proporção (Forma II) a partir de 1,0% na mistura, ou seja, amostra FI_99,0%. Nos difratogramas apresentados na Figura 67, em que foi colocada a amostra FI_99,5% em comparação com as forma polimórficas puras não se nota claramente os picos da Forma II (minoritária), e sua presença só pode ser nitidamente observada na amostra FI_99,0% (Figura 69).

Figura 66: Forma I em proporções de 99,5% a 95,0% na mistura binária com a Forma II, juntamente com os difratogramas das formas polimórficas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

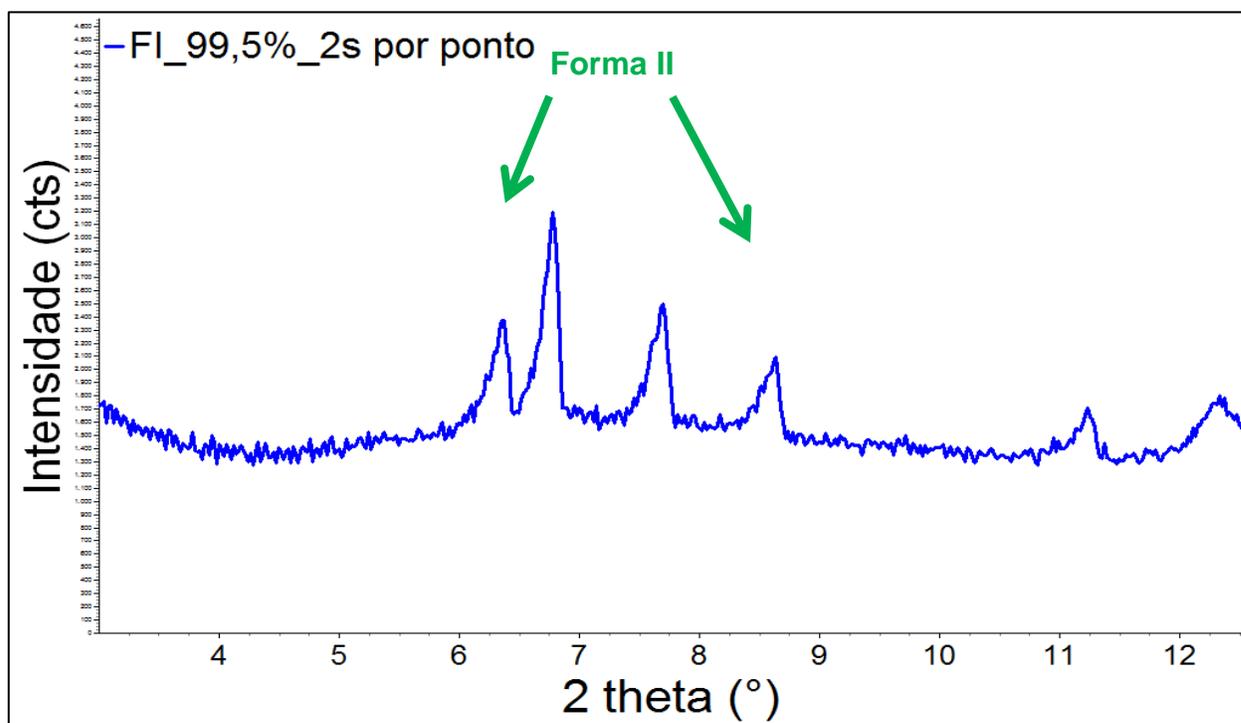
Figura 67: Proporção mínima de 0,5% da Forma II na mistura que não é possível ser identificada, quando comparada ao difratograma das formas puras - difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

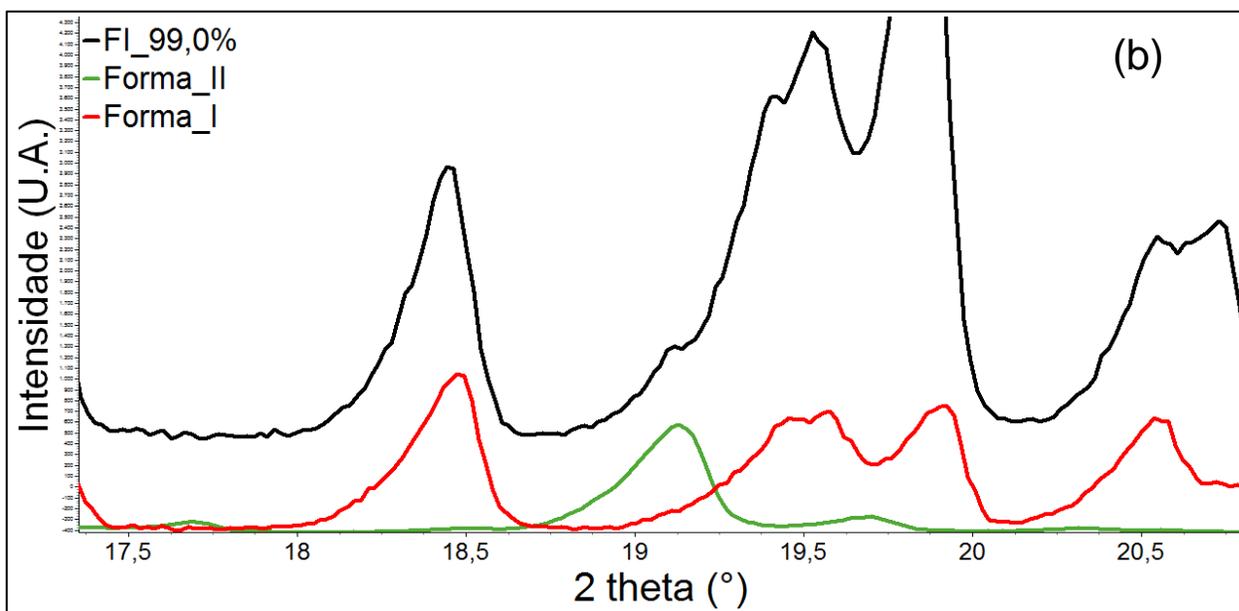
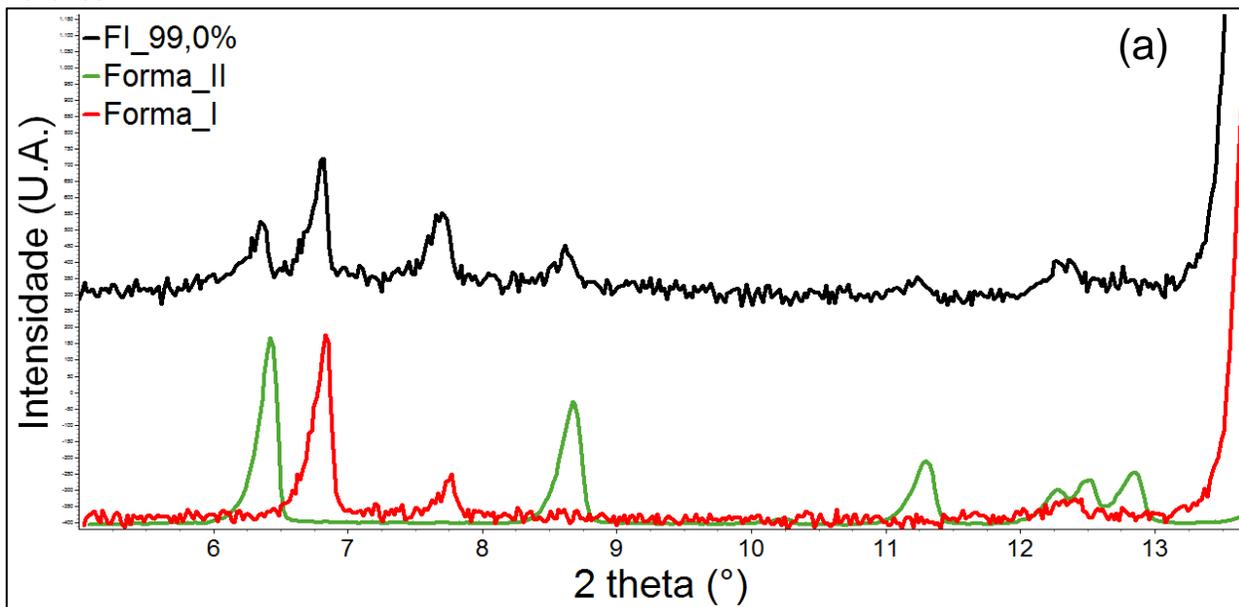
Um analista experiente tenderia a afirmar, com base na Figura 67, que nas posições $2\theta \approx 6,3^\circ$ e $8,7^\circ$ existem picos de difração e que se medidas mais lentas fossem realizadas, eles ficariam nitidamente observáveis. De fato, novas medidas (Figura 68) não deixam dúvidas quanto a isso. Uma rotina de análise mais lenta, utilizando 2s por ponto (4 vezes o das outras medidas) foi realizada e foi possível notar a contribuição desses picos para o padrão de difração.

Figura 68: Medida lenta realizada com a amostra FI_99,5%, com 2s por ponto - difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

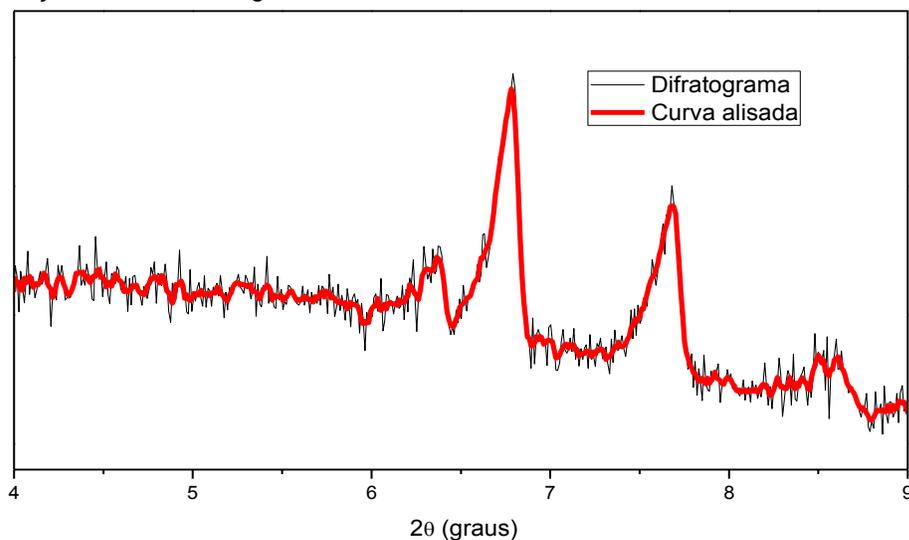
Figura 69: Menor proporção possível de ser identificada (1,0% da Forma II) - difratômetro Bruker D8 Advance.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para casos de tão baixa quantidade, deve-se avaliar se onde deveria estar um de seus picos de difração existe apenas ruído ou há uma tendência de que um pico seja registrado. É recomendado que o alisamento de um difratograma jamais seja feito. E um caso desses (Figura 70) mostra bem a importância de que isso (alisamento) não seja feito, pois ele ou não deixa nítido os pequenos efeitos para a definição de um pico de difração ou produz pequenos picos que podem ser interpretados como uma tendência a explicitação de um pico.

Figura 70: Comparação entre o difratograma real e a curva alisada.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

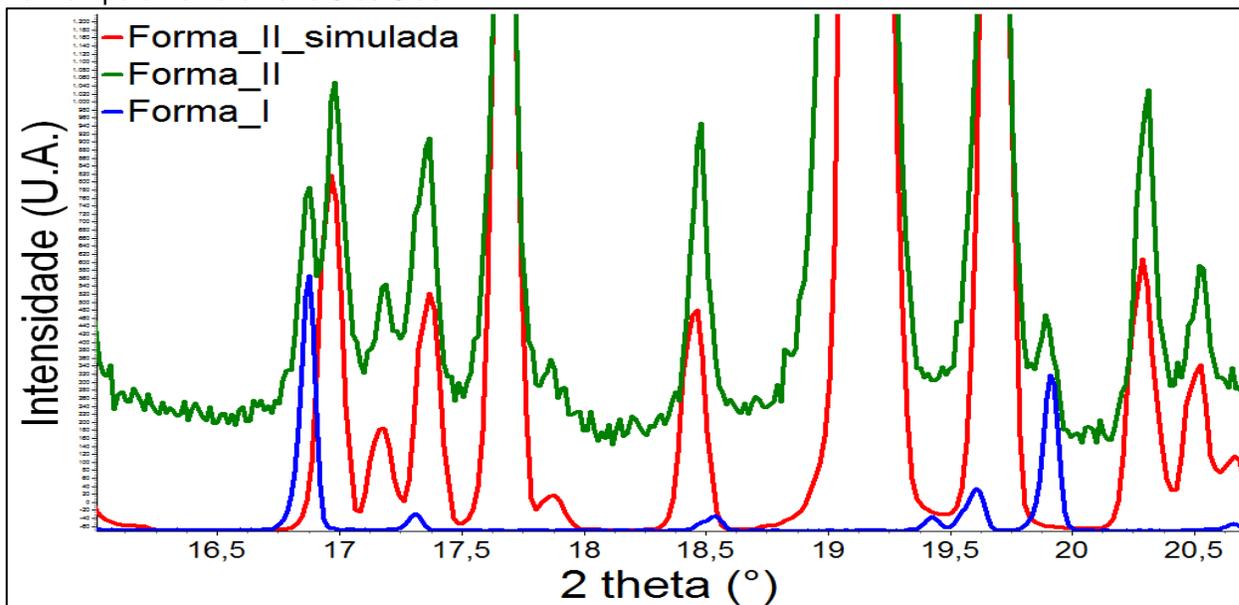
5.4.1.4 Stoe Stadi-P

Esse equipamento é de alta resolução, com monocromador primário que elimina a contribuição $K_{\alpha 2}$. Com isso, como se verá a seguir, os difratogramas apresentam picos muito estreitos, que remete a dados com radiação síncrotron.

Com os dados do Stadi-P foi possível identificar na matéria-prima da Forma II uma pequena proporção da Forma I (Figura 71). Essa amostra foi obtida por meio de tratamento térmico, e caracterizada inicialmente utilizando o Rigaku RINT2000 e análise térmica (DSC) sem que a Forma I fosse identificada. Com isso, é evidente que a alta resolução deste equipamento torna os resultados muito mais confiáveis, por se mostrar mais sensível que o difratômetro Rigaku RINT2000 e a própria análise térmica.

Na impossibilidade de analisar as amostras obtidas ao final de cada procedimento do tratamento térmico utilizando o Stadi-P, já que este se encontra na Universidade Federal do ABC e o envio de cada amostra para análise é inviável, esses procedimentos foram acompanhados pelo que se tinha à disposição no laboratório do IQ-Unesp. Os resultados do Stadi-P não inviabilizam o que foi analisado anteriormente para os demais equipamentos. Também não inviabiliza o trabalho, pois após a análise quantitativa com os dados do Stadi-P foram realizadas as correções nas proporções das formas cristalinas nas amostras preparadas.

Figura 71: Forma II obtida por tratamento térmico, juntamente com o seu difratograma simulado e a Forma I pura - difratômetro Stoe Stadi-P.



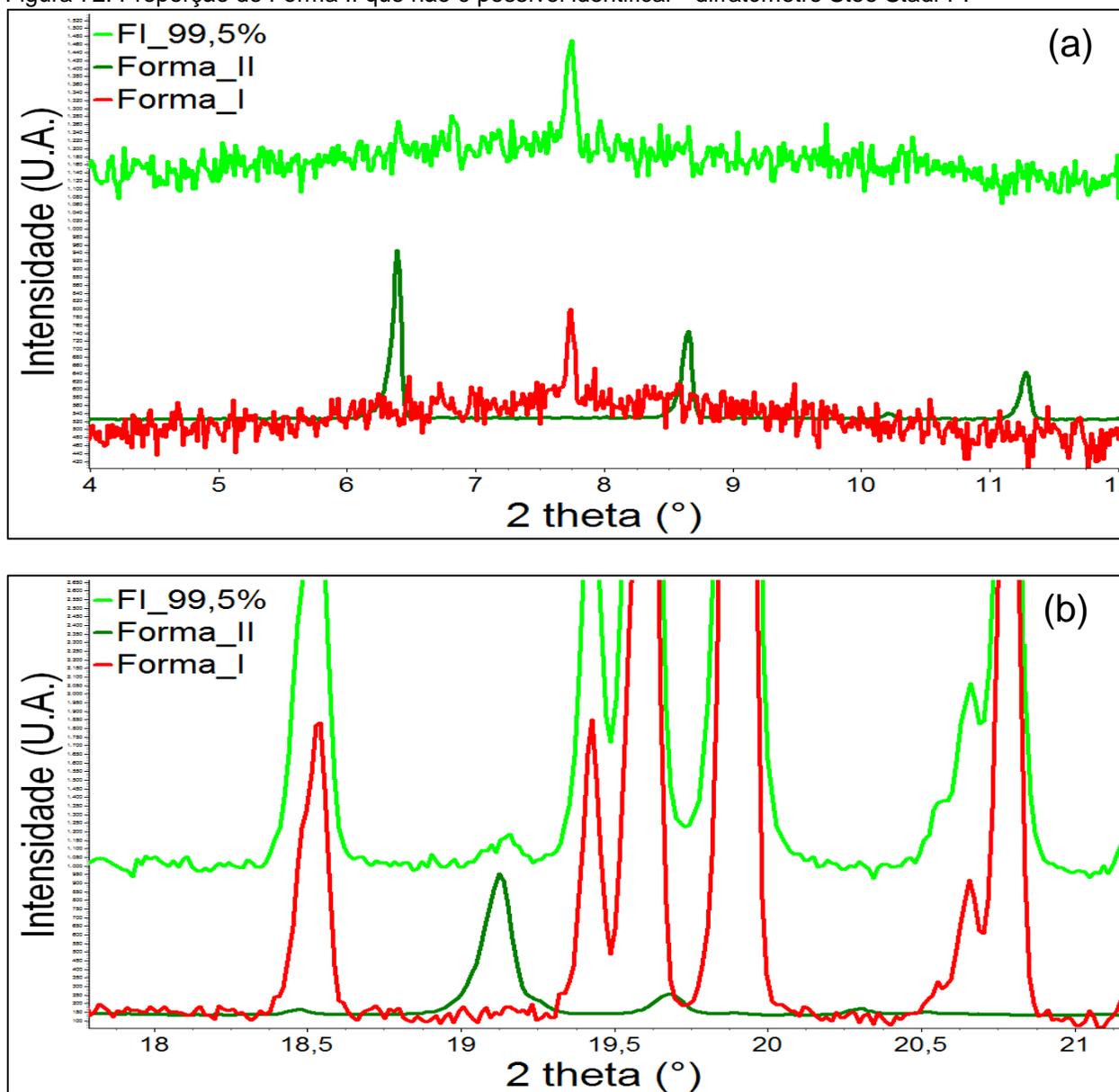
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A amostra que apresentou a menor proporção de Forma I foi a própria amostra de Forma II pura, já que nesta aparece uma pequena fração da primeira. Desse modo, dentre as amostras em que a Forma I aparece em menor proporção, a da Forma II (que foi considerada pura até a análise dos dados do Stadi-P) com uma pequena quantidade de Forma I é a que possui a menor proporção desta fase disponível para a análise.

Para a amostra FI_99,5%, na região entre 5,0° e 13,0° que foi utilizada para identificar a Forma II, não foi possível notar a presença desta forma (Figura 72(a)), embora para a segunda região analisada entre 18,5° e 19,5°, fica evidente a sua presença (Figura 72(b)). Na região de mais baixo ângulo, só foi possível identificar a

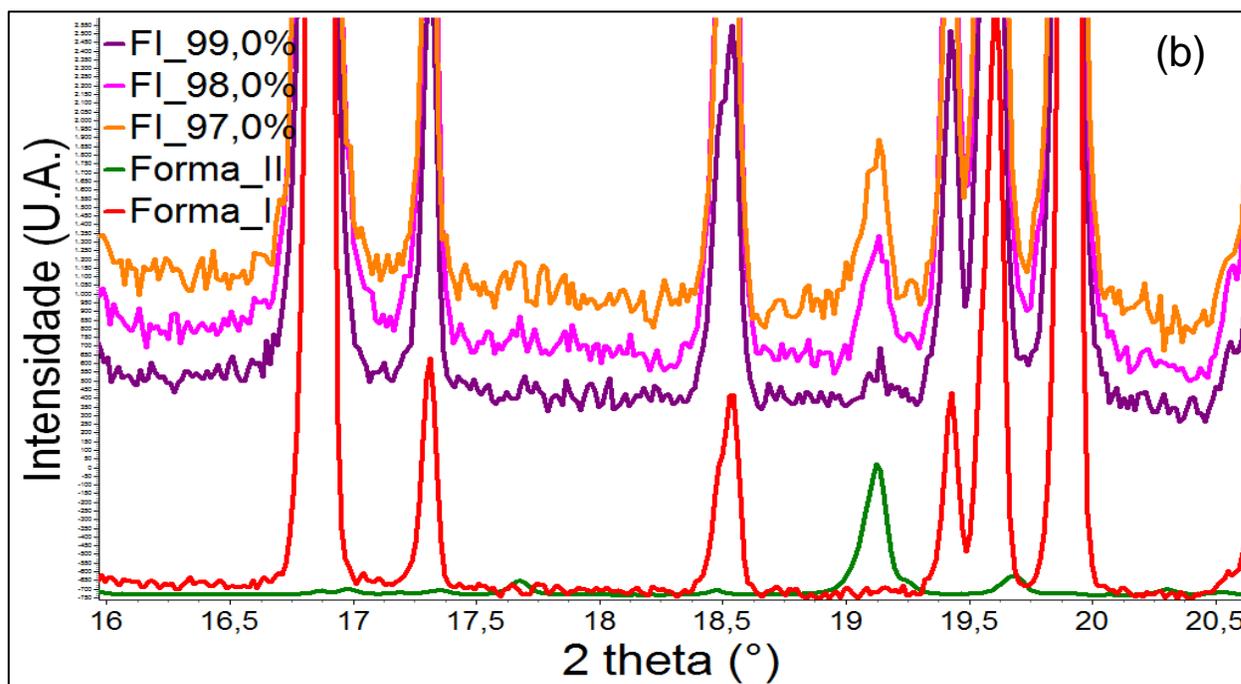
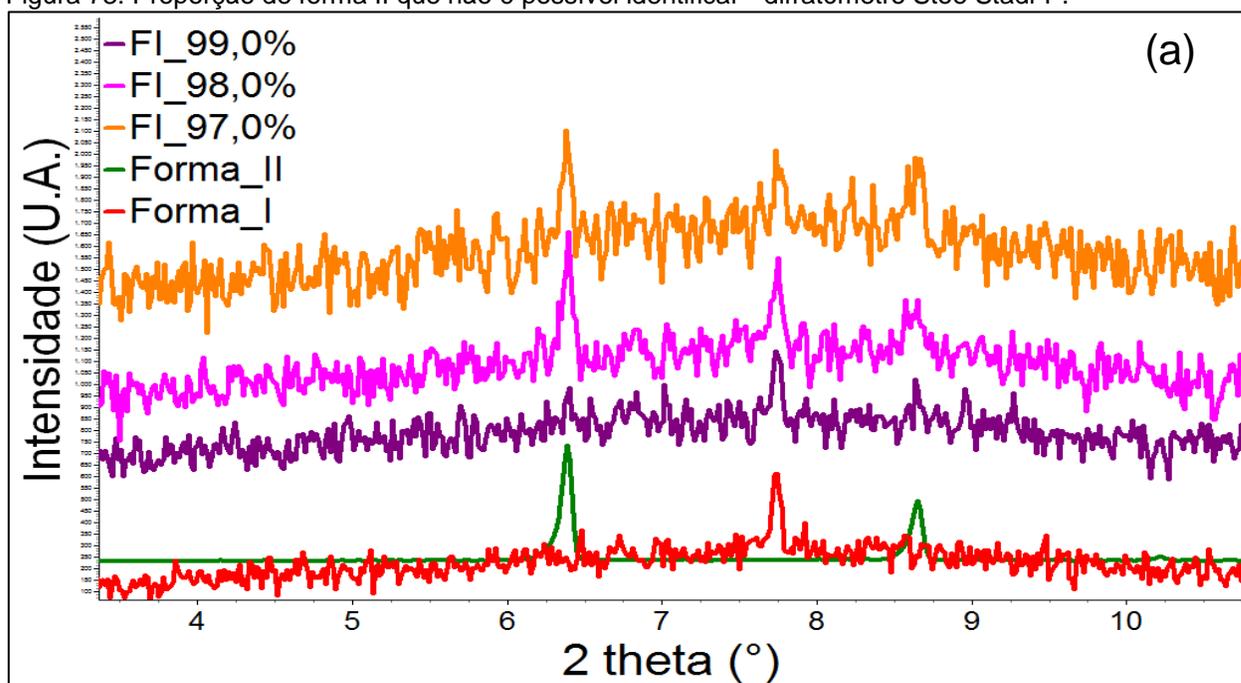
Forma II na mistura a partir da proporção que seria de Forma I 98,0%, ou seja, a partir de 2,0% de Forma II na mistura (Figura 73(a)).

Figura 72: Proporção de Forma II que não é possível identificar - difratômetro Stoe Stadi-P.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 73: Proporção de forma II que não é possível identificar - difratômetro Stoe Stadi-P.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.4.2 Limite de quantificação

Os refinamentos foram realizados sem vínculos estruturais entre as amostras, pois as condições do ambiente como temperatura e umidade podem ter variado de uma medida para outra. Foram colocados vínculos nos tamanhos de cristalito e parâmetros instrumentais. Para os dados dos equipamentos D8 Advance e Stadi-P foram usados os valores dos parâmetros instrumentais obtidos no refinamento das matérias-primas puras.

Nas seções anteriores os resultados para o Stadi-P foram apresentados na sequência dos resultados para os demais equipamentos. Nesta seção a ordem foi alterada, pois os resultados obtidos pela análise com este equipamento de alta resolução foram necessários para analisar a análise quantitativa com o D8 Advance, RINT2000 e Siemens D5000.

Na quantificação de fases, os erros encontrados inicialmente apresentaram valores elevados. Na análise feita foi verificado que as correlações entre os parâmetros estavam contribuindo para esses valores elevados. Dessa forma, ao final dos ajustes, parâmetros como *background*, orientação preferencial, tamanho de cristalito e parâmetros instrumentais foram mantidos fixos, e somente o que foi refinado foi o fator de escala e os parâmetros de rede. Isso se justifica ao ser analisada a equação para a quantificação de fases pelo método de Rietveld (Equação 9). A quantificação depende do fator de escala e dos parâmetros de rede, e uma vez que os demais parâmetros

foram ajustados e mantidos fixos, os dois primeiros foram deixados refinando para a quantificação final das fases.

5.4.2.1 Stoe Stadi-P

Utilizando os dados do Stadi-P foi possível quantificar todas as amostras em proporção. Como visto anteriormente, a própria matéria-prima da Forma II continha uma pequena proporção de Forma I, que ao ser quantificada resultou em 1,97% na mistura. Não foi possível determinar essa proporção de Forma I na Forma II para os dados dos equipamentos D8 Advance, RINT2000 e D5000, e esse valor foi levado em consideração para a determinação da quantidade real das proporções na mistura.

Para a quantificação de amorfo na Forma II com dados do D2 Phaser e RINT2000 foi levada em consideração somente a estrutura cristalina desta forma juntamente com a do carbonato de lítio utilizado como padrão interno, de modo que no cálculo para a quantidade de amorfo, a Forma I por não ser considerada no refinamento acabou entrando como proporção de material amorfo. Portanto, a proporção real de amorfo na amostra da Forma II equivale à diferença entre a proporção de amorfo determinada ao final do refinamento e 1,97% de Forma I encontrada com os dados do Stadi-P. O valor calculado para o amorfo na Forma II foi de 18,21%. Portanto, a proporção real de amorfo observado nesta amostra foi de $18,21\% - 1,97\% = 16,24\%$.

As proporções (em massa) medidas na balança foram então corrigidas para que fosse considerada a quantidade já existente de Forma I na amostra de Forma II. A coluna “Mistura (% em massa)” da Tabela 7 está relacionada com o que foi pesado na

balança sem levar em consideração a proporção de Forma I já existente na amostra da Forma II. A coluna “Mistura após correção – (% corrigida)” diz respeito aos valores corrigidos após a quantificação desta pequena contribuição com os dados do Stadi-P. Na coluna “Proporção em massa real” estão os valores reais das proporções em massa (parte cristalina + amorfo) para cada amostra.

Tabela 8: Dados para a fração pesada na balança (% em massa), proporções corrigidas após os dados do Stadi-P (% corrigida) e proporções em massa real (proporção cristalina + proporção amorfo).

Mistura (% em massa)		Mistura após correção – (% corrigida)		Proporção em massa real (%)		
Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	Amorfo
0,5	99,5	2,46	97,54	2,19	81,70	16,11
1,0	99,0	2,95	97,05	2,62	81,29	16,09
2,0	98,0	3,93	96,07	3,49	80,47	16,04
3,0	97,0	4,91	95,09	4,36	79,65	15,99
4,0	96,0	5,89	94,11	5,24	78,83	15,99
5,0	95,0	6,87	93,13	6,11	78,00	15,89
95,0	5,0	95,10	4,90	84,53	4,10	11,36
96,0	4,0	96,08	3,92	85,40	3,28	11,31
97,0	3,0	97,06	2,94	86,28	2,46	11,26
98,0	2,0	98,04	1,96	87,15	1,64	11,21
99,0	1,0	99,02	0,98	88,02	0,82	11,16
99,5	0,5	99,51	0,49	88,45	0,41	11,13

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

A proporção de fase cristalina nas amostras foi calculada por meio de um fator de escala, ou seja, foi realizada uma normalização da proporção cristalina

apresentada na coluna “Proporção em massa real (%)” da Tabela 8, e esses valores foram os esperados que seriam encontrados pelo método de Rietveld (coluna “% Cristalina – método de Rietveld” na Tabela 9). As incertezas nas medidas foram apresentadas juntamente com os resultados. O índice d-DW é referente à estatística de Durbin-Watson, que está relacionada à correlação dos parâmetros envolvidos nas medidas.

Tabela 9: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do Stadi-P; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - $R_{wp} = 4,92\%$, $\chi^2 = 1,52$ - difratômetro Stoe Stadi-P.

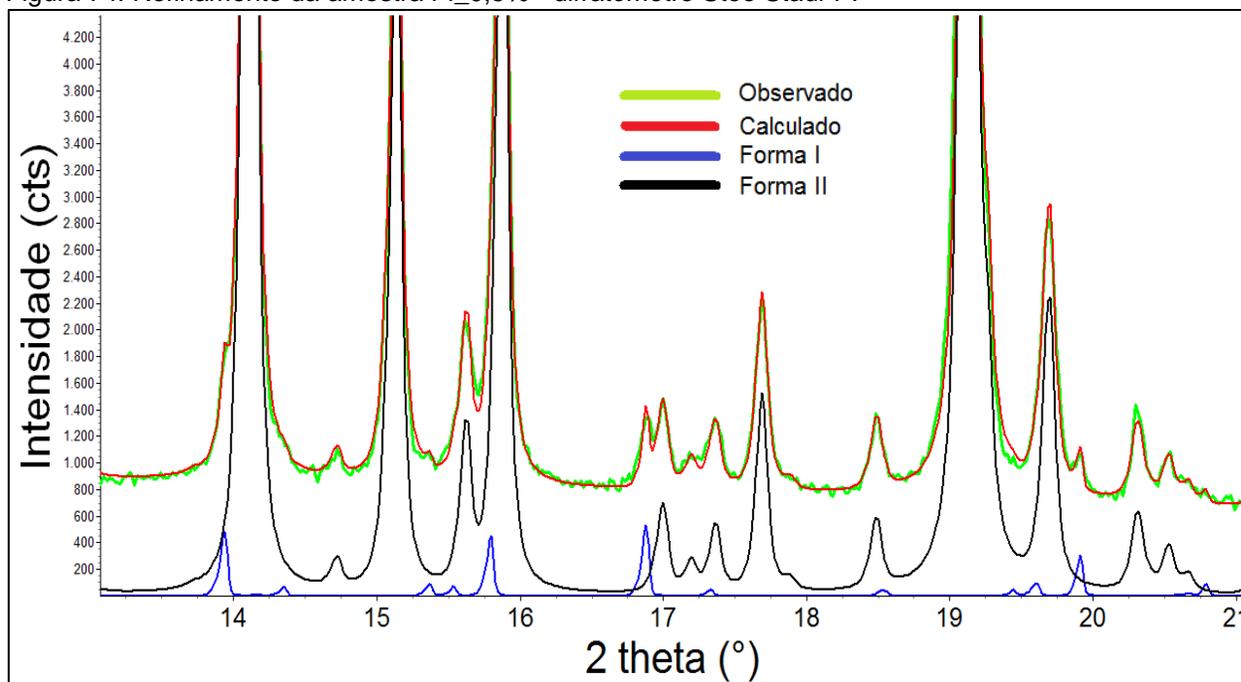
% Cristalina real			% Cristalina método de Rietveld		Índice de qualidade de refinamento		
Amostra	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	R_{Bragg} (%)		d-DW
					Forma I	Forma II	
FI_0,5%	2,61	97,39	2,63(9)	97,37(9)	1,91	1,09	0,504
FI_1,0%	3,12	96,88	2,60(10)	97,40(10)	2,48	1,54	0,564
FI_2,0%	4,16	95,84	3,09(9)	96,91(9)	2,18	1,46	0,511
FI_3,0%	5,20	94,80	3,45(7)	96,55(7)	2,63	1,49	0,616
FI_4,0%	6,23	93,77	4,87(9)	95,13(9)	1,90	1,27	0,723
FI_5,0%	7,26	92,74	6,21(14)	93,79(14)	1,68	1,23	0,664
FI_95,0%	95,37	4,63	95,79(6)	4,21(6)	1,18	2,76	0,739
FI_96,0%	96,30	3,70	96,25(6)	3,75(6)	0,96	3,35	0,827
FI_97,0%	97,22	2,78	97,50(10)	2,50(10)	1,10	1,68	0,774
FI_98,0%	98,15	1,85	98,27(7)	1,73(7)	1,16	2,13	0,906
FI_99,0%	99,08	0,92	99,29(9)	0,71(9)	1,07	1,24	0,709
FI_99,5%	99,54	0,46	99,42(5)	0,58(5)	1,07	1,50	0,733

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os valores obtidos pelo método de Rietveld ficaram próximos dos esperados. Por meio dos gráficos obtidos nos refinamentos, foi possível notar a contribuição de cada fase nas regiões analisadas anteriormente para se definir os limites de identificação.

Quando a Forma I aparece em menor proporção, ou seja, FI_0,5% o valor determinado pelo refinamento esteve próximo ao esperado e é possível avaliar a contribuição da Forma I no difratograma. Ressalta-se que o mínimo que foi quantificado da Forma I na Forma II foi 1,97%, ou seja, a proporção que aparece na amostra da Forma II pura.

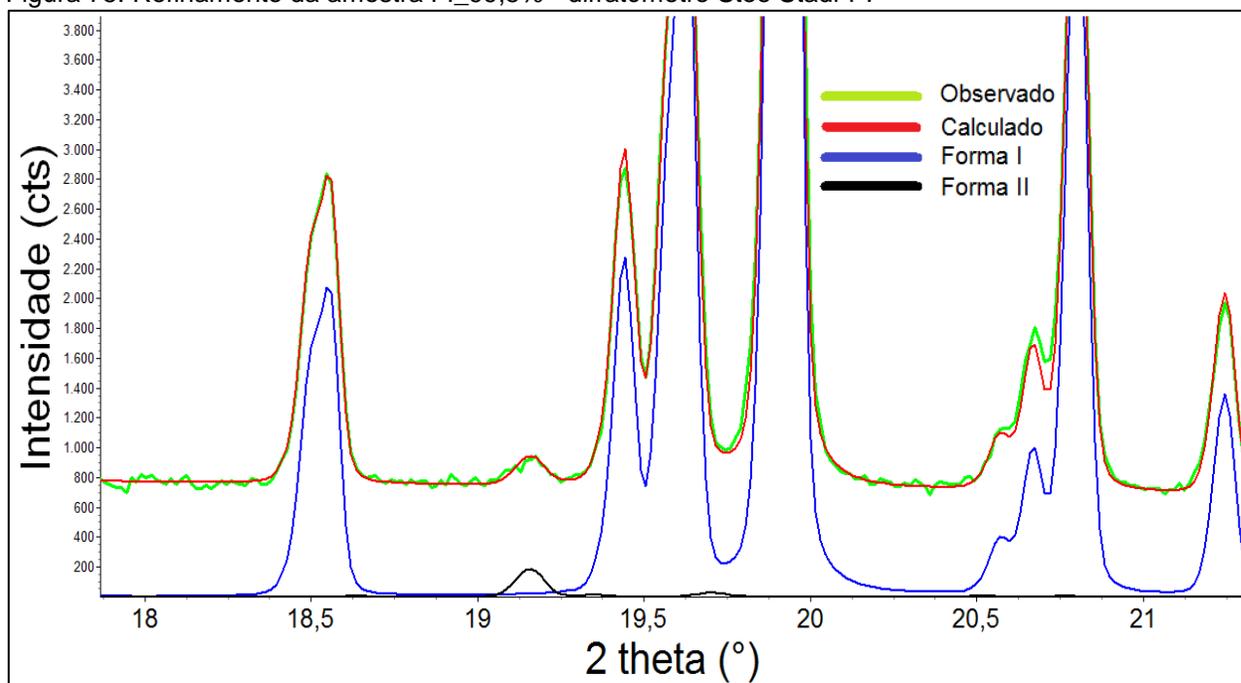
Figura 74: Refinamento da amostra FI_0,5% - difratômetro Stoe Stadi-P.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para o outro extremo é possível notar a contribuição do pico da Forma II (em menor proporção) entre a região de 18,5° e 19,5°, de modo que também foi possível quantificar essa mistura de fases.

Figura 75: Refinamento da amostra FI_99,5% - difratômetro Stoe Stadi-P.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.4.2.2 Rigaku RINT2000

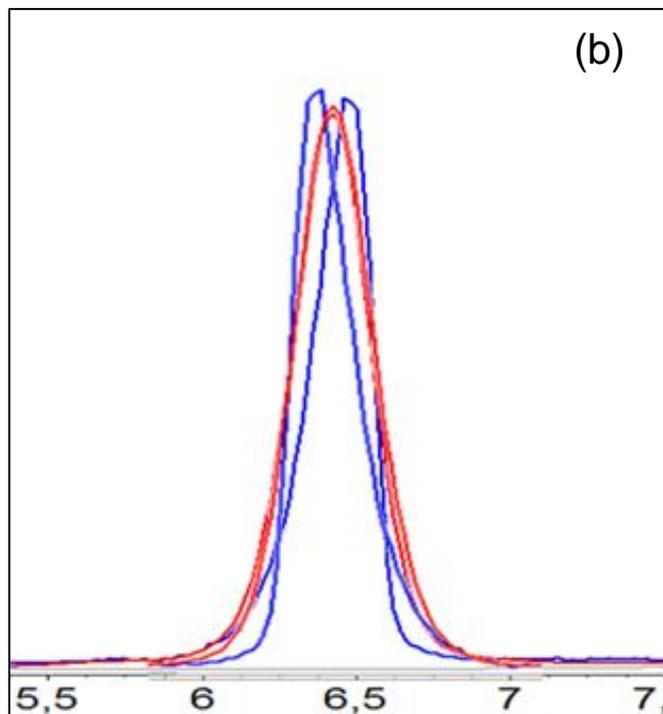
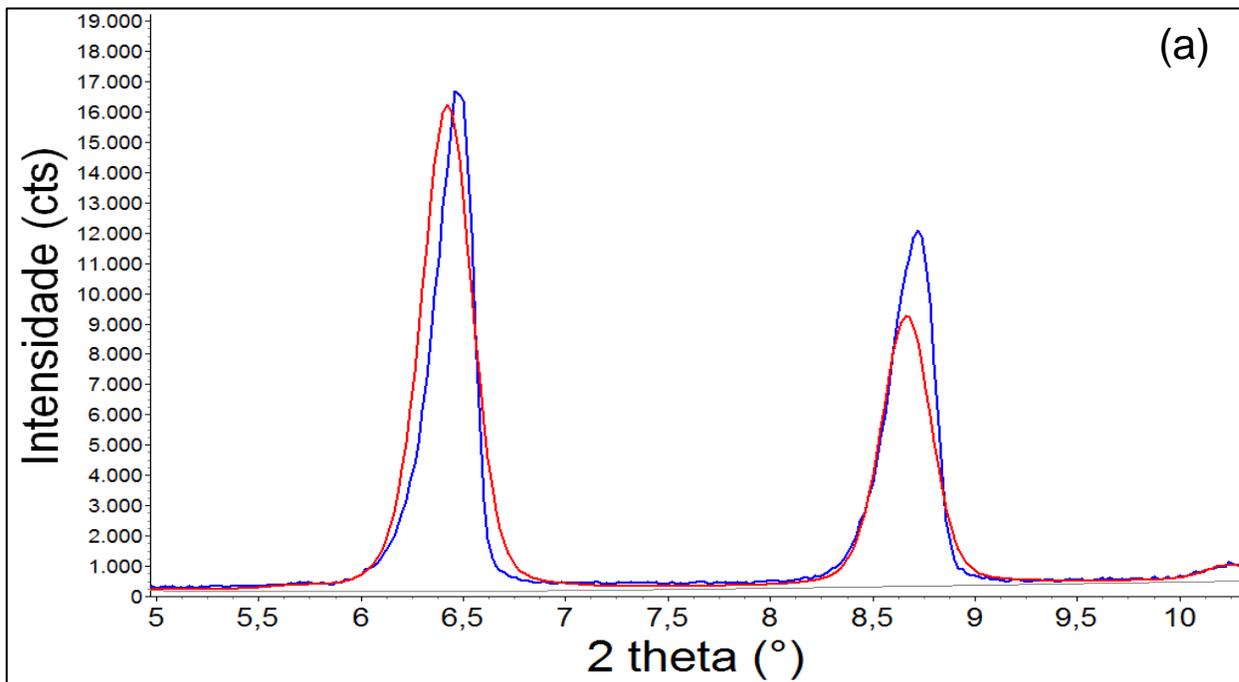
Durante os refinamentos com os dados deste equipamento, ocorreu um problema de ajuste de perfil abaixo de 9,0° para as amostras em que a Forma I aparece em menor proporção. O problema encontrado está relacionado com a assimetria e intensidade dos dois primeiros picos para a Forma II. A Correção para possível orientação preferencial não surtiu efeito. Nas análises dos dados obtidos com o

difratômetro Stadi-P esse problema não apareceu, de modo que não é um problema estrutural, mas que pode estar relacionado com o aparato instrumental, como fendas de divergência e/ou recepção, e/ou fendas Soller e/ou desalinhamento do equipamento. Acima de $9,0^\circ$ a assimetria diminuiu, e assim foi utilizada para o refinamento a região do difratograma acima de $9,2^\circ$ para que o problema de ajuste devido ao aparato instrumental não afetasse os resultados (Figura 76).

Na tentativa de identificar o problema no equipamento, foi feito um refinamento com uma amostra de Y_2O_3 , padrão para alargamento de linha instrumental disponível no LabCACC. Na Figura 77 está o resultado. Nota-se que usando os valores das fendas especificadas pelo software que controla o equipamento (Figura 77(a) e (c)), os perfis não ficam ajustados adequadamente. Refinando as larguras das fendas, o valor para a de recepção diminuiu de 0,3 mm para 0,2 mm, e o ajuste resultante está nas Figura 77(b) e (d). Neste caso, o ajuste ficou muito bom.

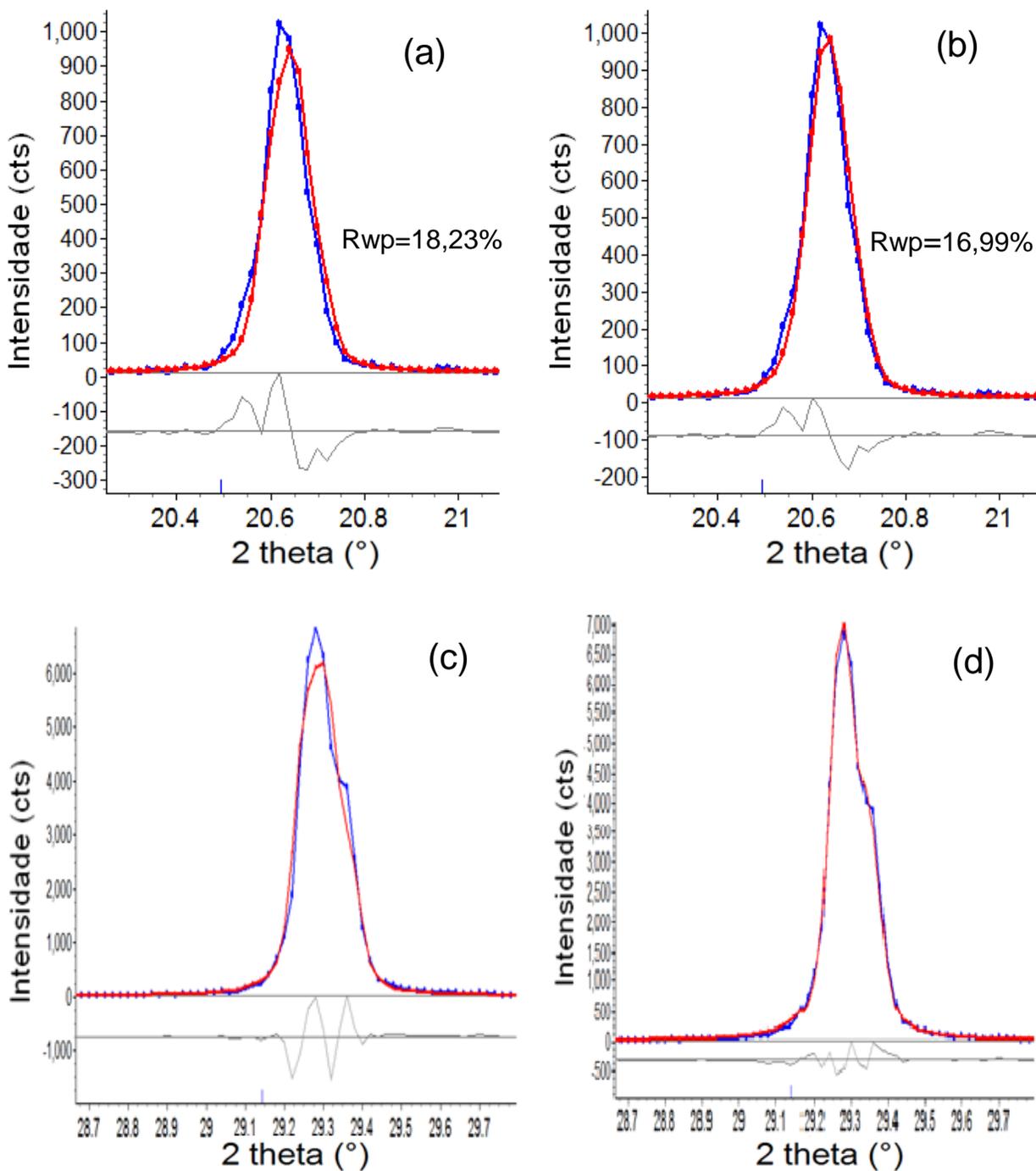
O refinamento do Y_2O_3 possui picos onde o padrão de difração da FNT Forma I ou II apresenta uma sobreposição de picos muito elevada. Dessa forma, o problema que é observado aqui representa apenas uma parte dos problemas que são observados no caso do fármaco. Mas o mais importante que se pode tirar dessa experiência é o ajuste inadequado que a eletrônica do equipamento está permitindo. O que deve estar acontecendo é a falta de manutenção do equipamento, como limpeza das fendas e outras partes móveis comandadas pelo sistema eletrônico, e a troca de dispositivos como engrenagens que podem estar desgastadas e permitindo um ajuste inadequado do posicionamento da amostra e detector.

Figura 76: (a) Problema de assimetria dos picos $(\bar{1} 0 1)$ e $(1 0 1)$. (b) Sobreposição do pico $(\bar{1} 0 1)$ e o invertido mostrando que o pico calculado (vermelho) é praticamente simétrico - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 77: Refinamento do padrão Y_2O_3 utilizado para evidenciar o problema de assimetria dos picos causada possivelmente pelo desalinhamento das fendas: (a) e (c) ajuste antes do refinamento do valor das fendas; (b) e (d) ajuste após o refinamento do valor das fendas - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os resultados obtidos nos refinamentos são apresentados na Tabela 9, juntamente com as incertezas nas medidas. O refinamento para a amostra FI_0,5% foi possível ser refinado e a região assinalada em amarelo na Figura 78 mostra a contribuição da Forma I e o ajuste pelo refinamento. A região assinalada em verde mostra um problema de ajuste do perfil calculado, mas que não é referente à forma minoritária.

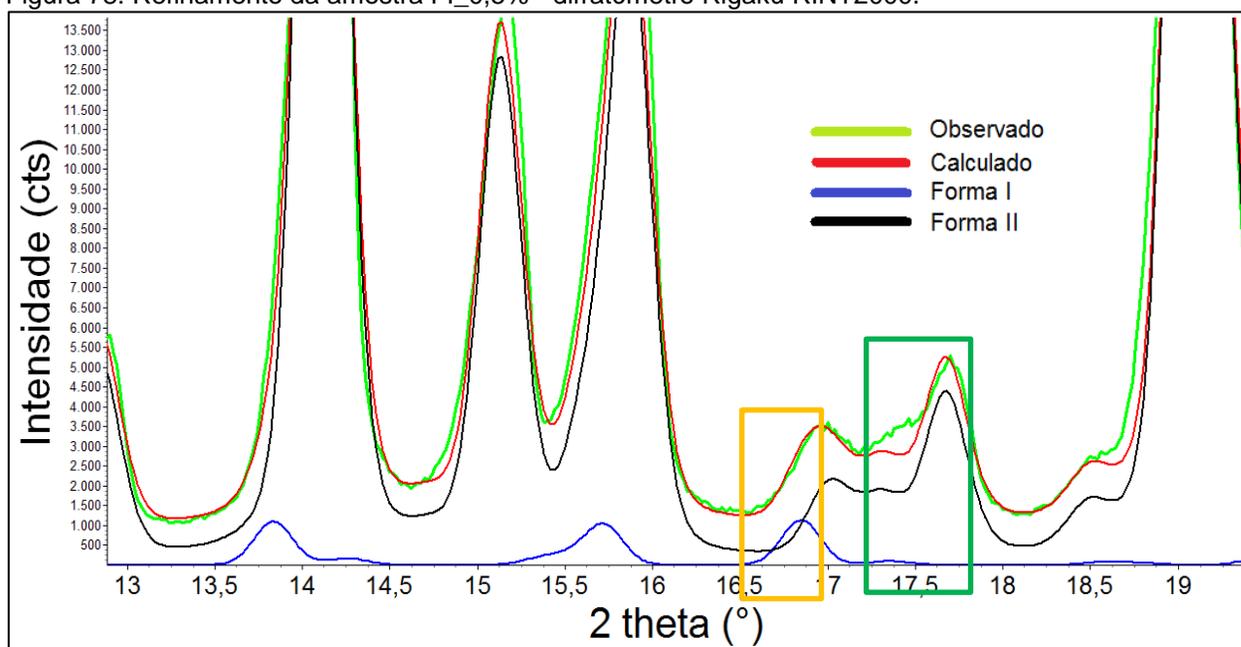
Ao se avaliar os refinamentos em que a Forma I aparece em menor proporção, pode-se notar na Figura 79(a) que o refinamento realizado para a amostra FI_99,5% pode não ter apresentado valores verdadeiros para a fase em menor proporção. Por meio dessa figura se observa que nas regiões assinaladas em amarelo o perfil calculado “força” a presença da Forma II na mistura, o que não fica evidente no perfil observado. Para regiões de mais alto ângulo, também não é possível avaliar regiões em que se perceba a contribuição da forma minoritária (Figura 79(b)). Ao se realizar o refinamento somente para essa amostra, sem levar em consideração a Forma II, os índices de qualidade de refinamento não alteraram significativamente, aumentando o valor do R_{wp} e diminuindo o χ^2 . No gráfico deste refinamento, percebe-se a melhora no perfil do pico, mantendo somente o problema de ajuste de perfil encontrado para muito baixo ângulo para esse difratômetro (como apresentado anteriormente).

Tabela 10: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do RINT2000; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - R_{wp} 12,61%, $\chi^2 = 5,79$.

% Cristalina real			% Cristalina método de Rietveld		Índice de qualidade de refinamento		
					R_{Bragg} (%)		d-DW
Amostra	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	
FI_0,5%	2,61	97,39	3,5(2)	96,5(2)	7,58	4,06	0,131
FI_1,0%	3,12	96,88	3,3(2)	96,7(2)	7,49	4,00	0,131
FI_2,0%	4,16	95,84	4,7(2)	95,3(2)	3,32	2,97	0,128
FI_3,0%	5,20	94,80	5,6(3)	94,4(3)	4,45	3,57	0,148
FI_4,0%	6,23	93,77	7,5(3)	92,5(3)	3,34	2,81	0,142
FI_5,0%	7,26	92,74	7,9(3)	92,1(3)	4,48	2,55	0,157
FI_95,0%	95,37	4,63	95,14(13)	4,86(13)	3,52	6,58	0,157
FI_96,0%	96,30	3,70	95,48(13)	4,52(13)	2,80	9,19	0,177
FI_97,0%	97,22	2,78	96,10(13)	3,90(13)	2,83	7,92	0,168
FI_98,0%	98,15	1,85	97,42(11)	2,58(11)	3,22	5,91	0,192
FI_99,0%	99,08	0,92	98,65(10)	1,35(10)	3,87	6,38	0,193
FI_99,5%	99,54	0,46	99,58(8)	0,42(8)	3,39	9,65	0,184

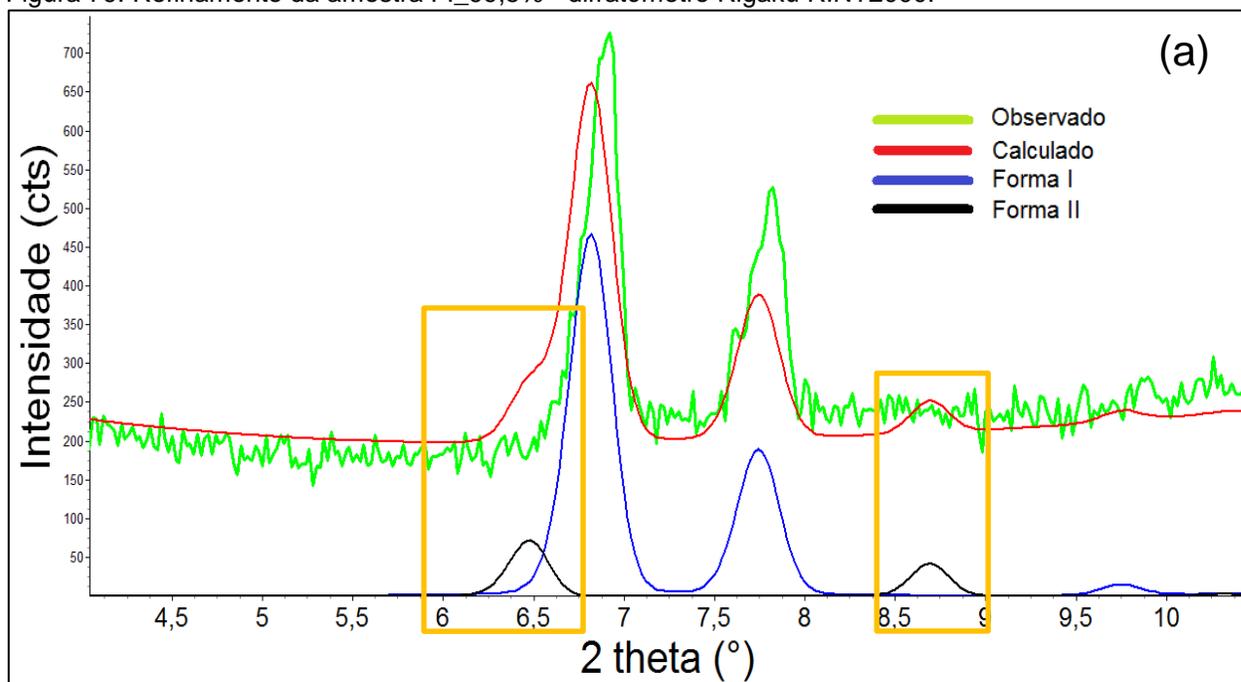
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

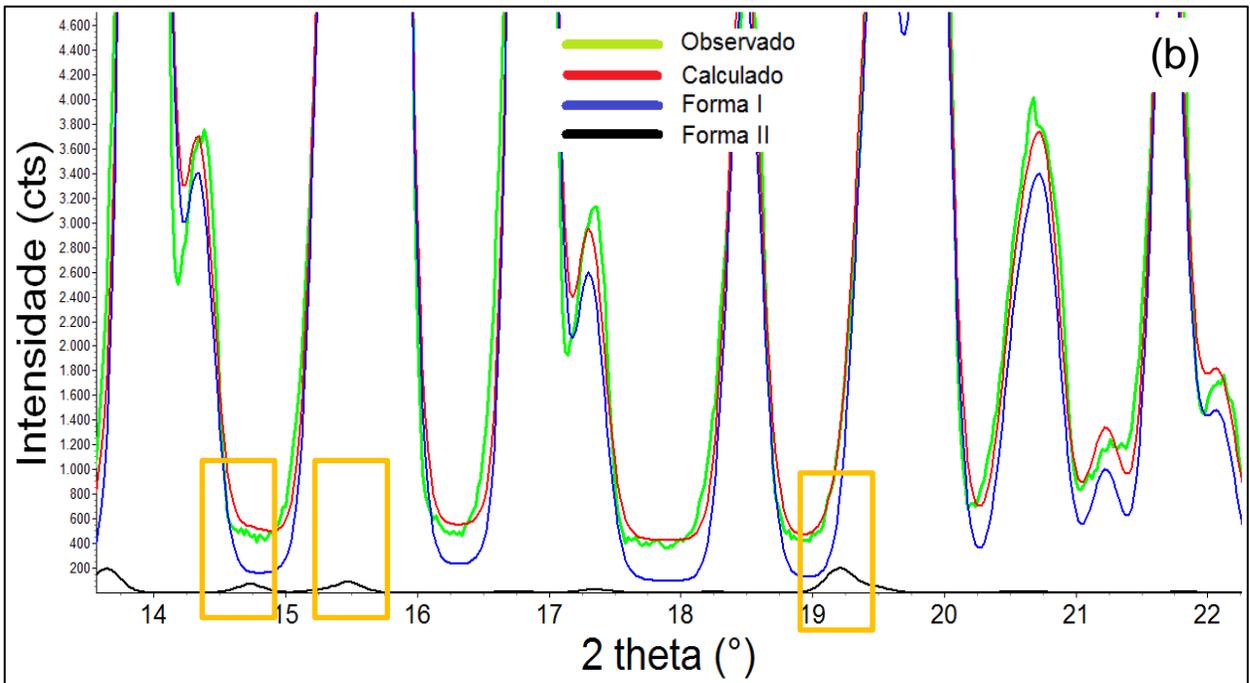
Figura 78: Refinamento da amostra FI_0,5% - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

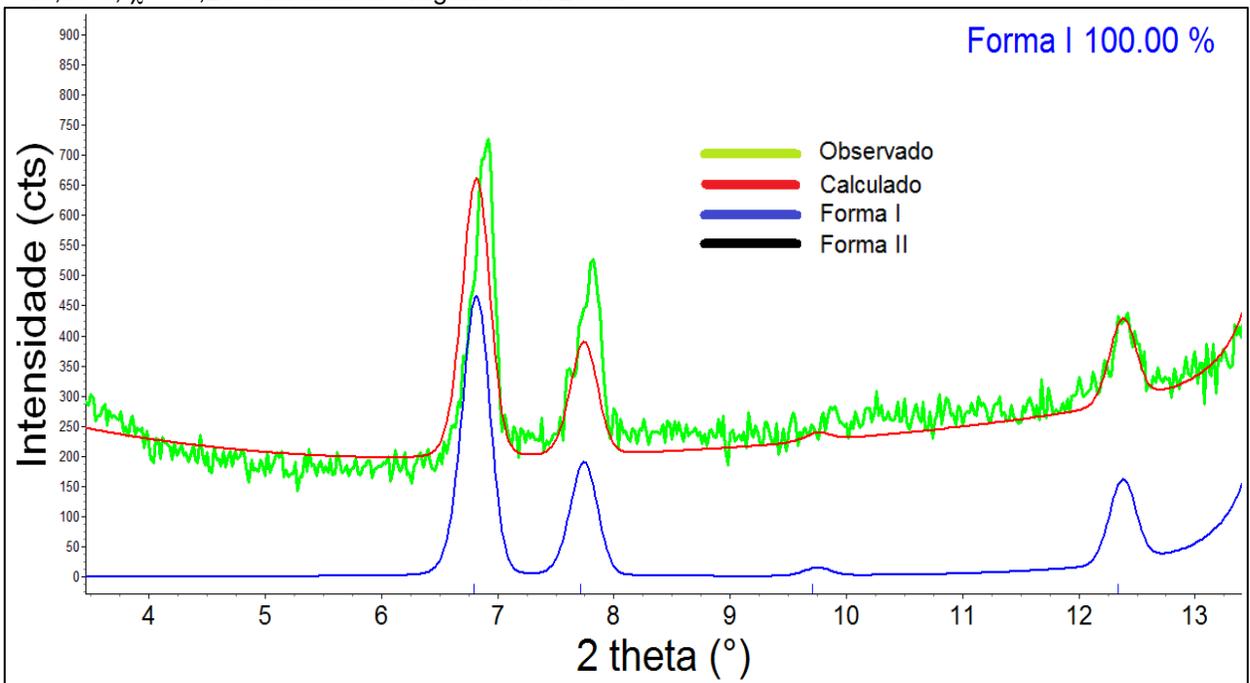
Figura 79: Refinamento da amostra FI_99,5% - difratômetro Rigaku RINT2000.





Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

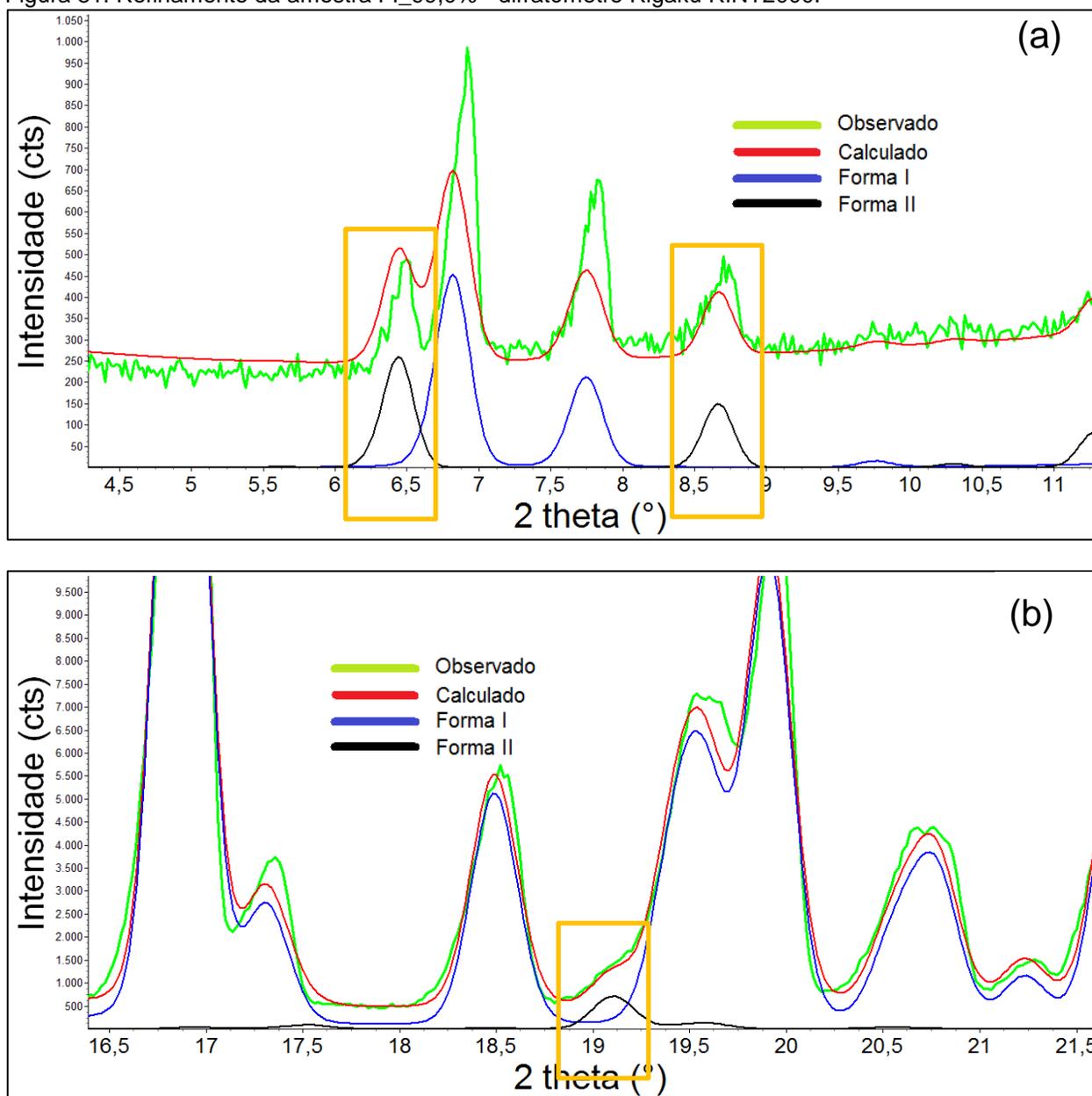
Figura 80: Refinamento da amostra FI_99,5% sem levar em consideração a Forma II no refinamento. $R_{wp} = 13,38\%$, $\chi^2 = 5,23$ - difratômetro Rigaku RINT2000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Com o refinamento da amostra FI_99,0% se observa a contribuição da forma minoritária (retângulos amarelos) de modo que nenhum ajuste superestimado foi notado.

Figura 81: Refinamento da amostra FI_99,0% - difratômetro Rigaku RINT2000.

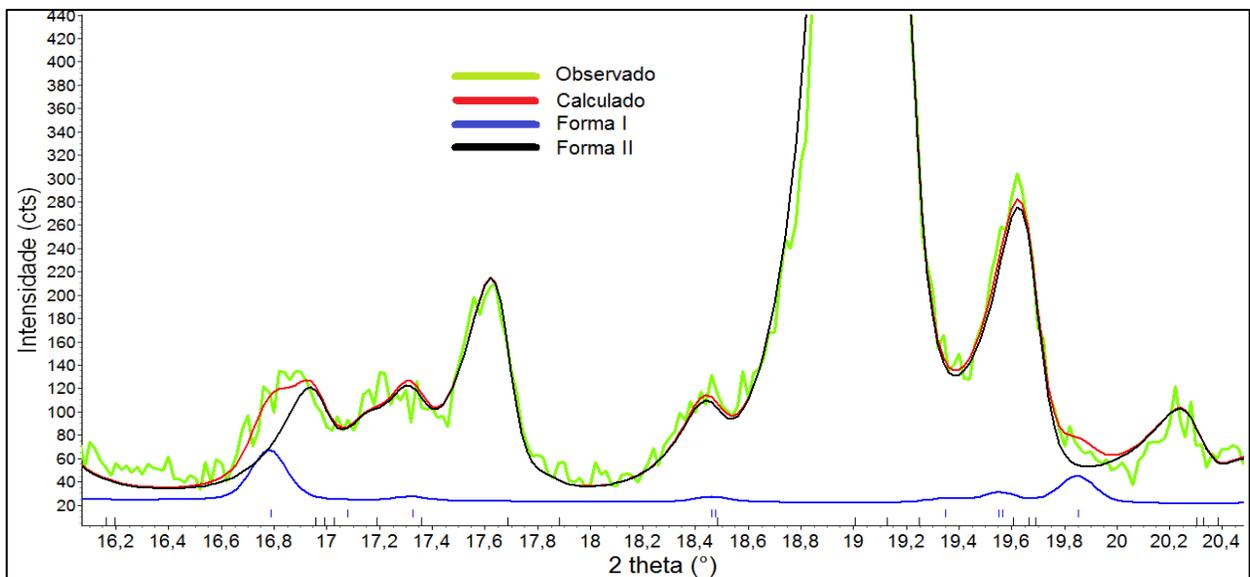


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.4.2.3 Siemens D5000

Foi possível quantificar todas as amostras medidas com o D5000. Embora as medidas apresentassem um ruído de fundo elevado, foi possível verificar nos gráficos de Rietveld dos refinamentos que o ajuste foi adequado para as regiões em que ocorre a sobreposição dos picos, como pode ser visto na Figura 82 e Figura 83(b).

Figura 82: Refinamento da amostra FI_0,5% - difratômetro Siemens D5000.

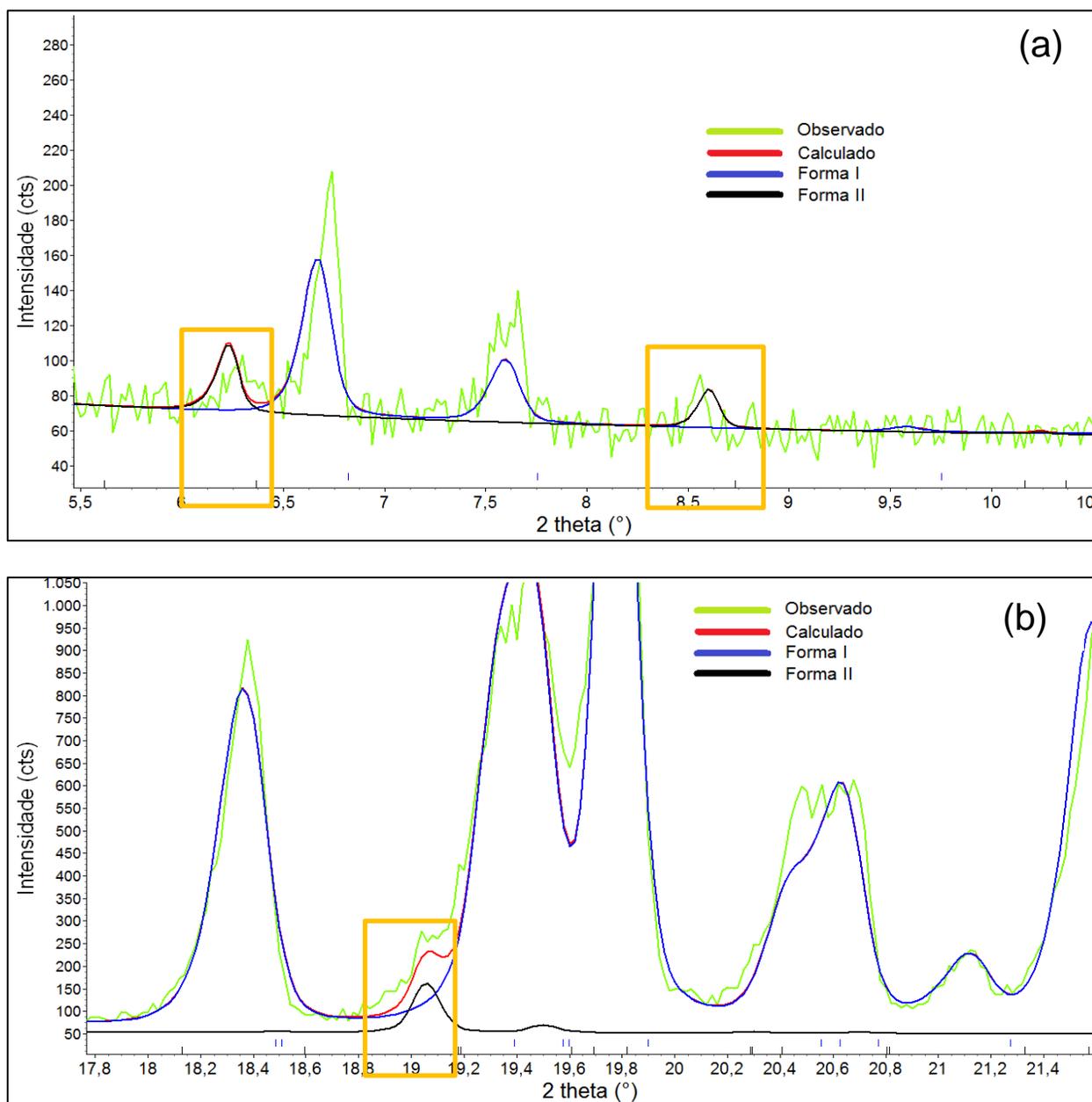


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para a situação em que não ocorre a sobreposição dos picos, como é o caso da amostra FI_99,5% na região entre $\sim 6,0^\circ$ e $10,0^\circ$ (Figura 83(a)) o ajuste também foi

adequado e a quantificação das misturas binárias pelo método de Rietveld apresentou valores próximos aos esperados.

Figura 83: (a) e (b) Refinamento da amostra FI_99,5% - difratômetro Siemens D5000.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Os resultados para a quantificação de fases com os dados do D5000 são apresentados na tabela a seguir, juntamente com os erros obtidos e os índices de qualidade de refinamento.

Tabela 11: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do D8; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - Rwp 16,02%, $\chi^2 = 1,62$.

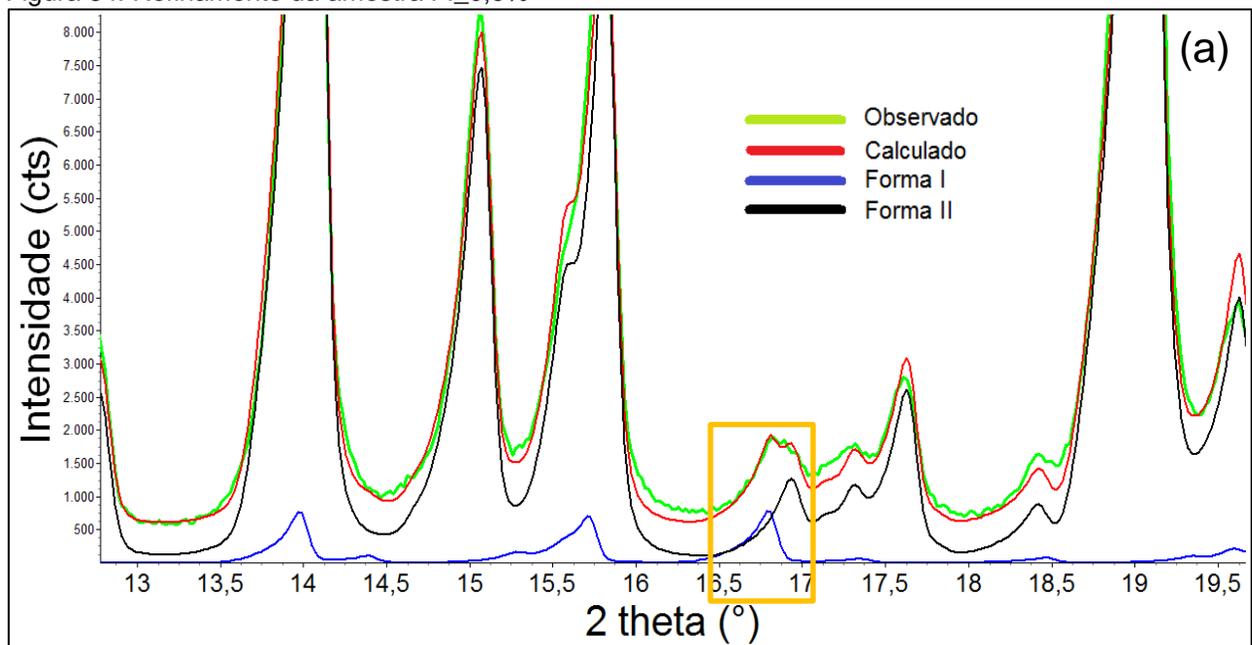
% Cristalina real			% Cristalina método de Rietveld		Índice de qualidade de refinamento		
					R _{Bragg} (%)		d-DW
Amostra	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	
FI_0,5%	2,61	97,39	3,4(4)	96,5(4)	5,43	3,26	1,25
FI_1,0%	3,12	96,88	1,8(3)	98,2(3)	4,39	2,50	1,22
FI_2,0%	4,16	95,84	2,8(3)	97,2(3)	5,51	2,96	1,19
FI_3,0%	5,20	94,80	4,7(4)	95,3(4)	5,81	4,11	1,08
FI_4,0%	6,23	93,77	4,0(3)	95,9(3)	6,36	3,51	1,08
FI_5,0%	7,26	92,74	4,3(3)	95,7(3)	6,07	3,42	1,17
FI_95,0%	95,37	4,63	95,3(3)	4,7(3)	4,75	12,89	0,68
FI_96,0%	96,30	3,70	96,31(19)	3,69(19)	4,13	15,39	0,93
FI_97,0%	97,22	2,78	96,81(16)	3,18(16)	4,39	14,52	0,98
FI_98,0%	98,15	1,85	97,9(2)	2,0(2)	4,81	14,88	1,27
FI_99,0%	99,08	0,92	99,20(19)	0,79(19)	4,94	15,16	1,20
FI_99,5%	99,54	0,46	99,40(7)	0,59(7)	4,41	13,12	0,42

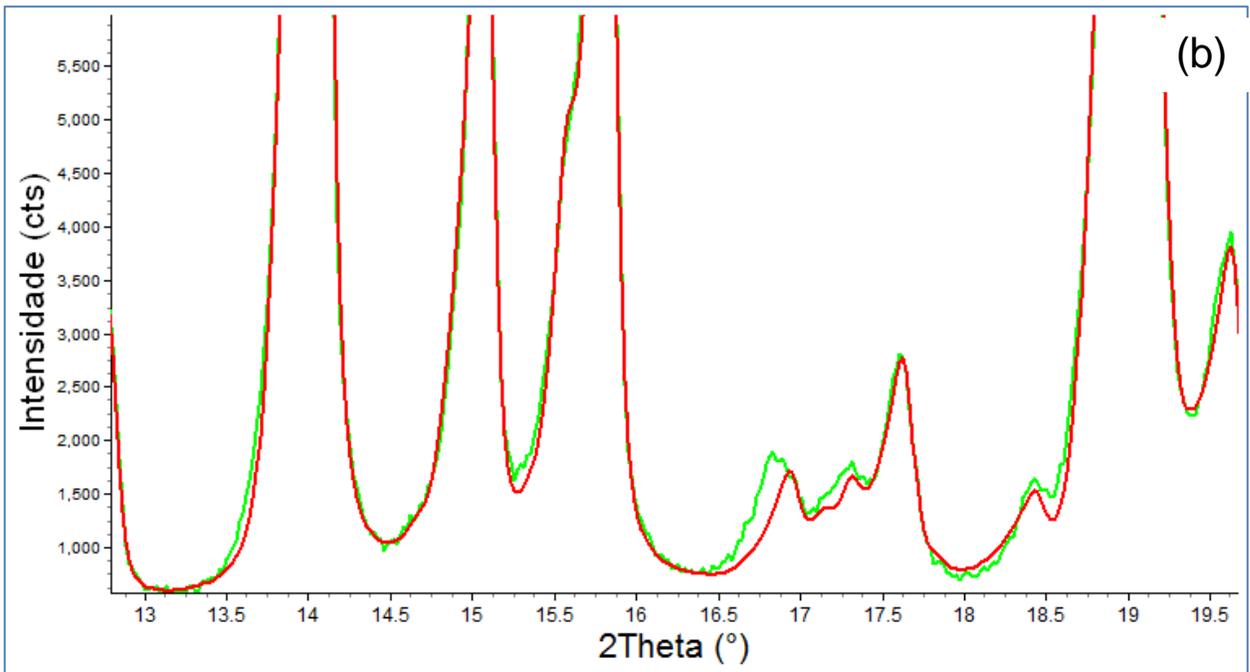
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.4.2.4 Bruker D8 Advance

Após verificar que a Forma I, com dados do D8, só é observada acima de 2,0%, foram realizados os refinamentos para todas as misturas, e determinada a porcentagem em massa das duas formas, chegando a valores próximos aos esperados. Nas Figuras 84(a) e 85 está a única região em que é possível se distinguir um pico da forma, em pequenas quantidades, no difratograma da mistura. Observa-se o ajuste do perfil calculado com o observado para a Forma I em 0,5% e 1,0%, respectivamente. Na Figura 84(b) está a mesma região, após um refinamento sem que a Forma I, presente em 0,5% em massa, fosse considerada. Vê-se que em 18,2° falta uma parte do perfil para ajustar. Como se vê na Figura 84(a) é a Forma I.

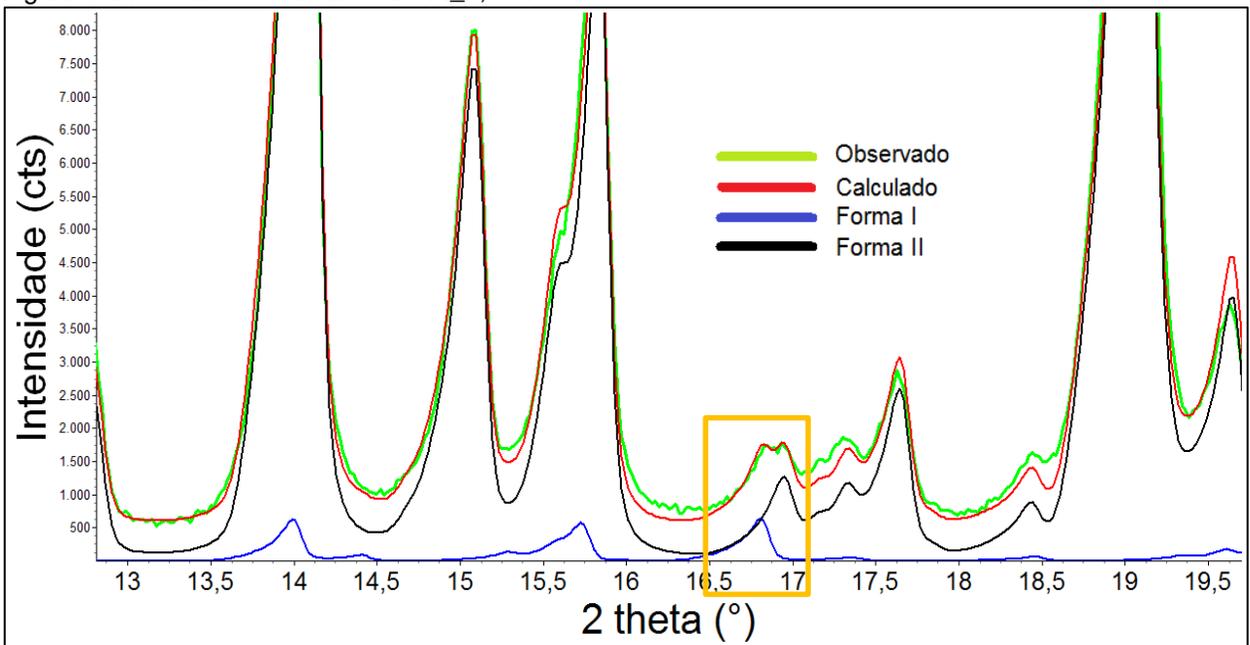
Figura 84: Refinamento da amostra FI_0,5%





Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

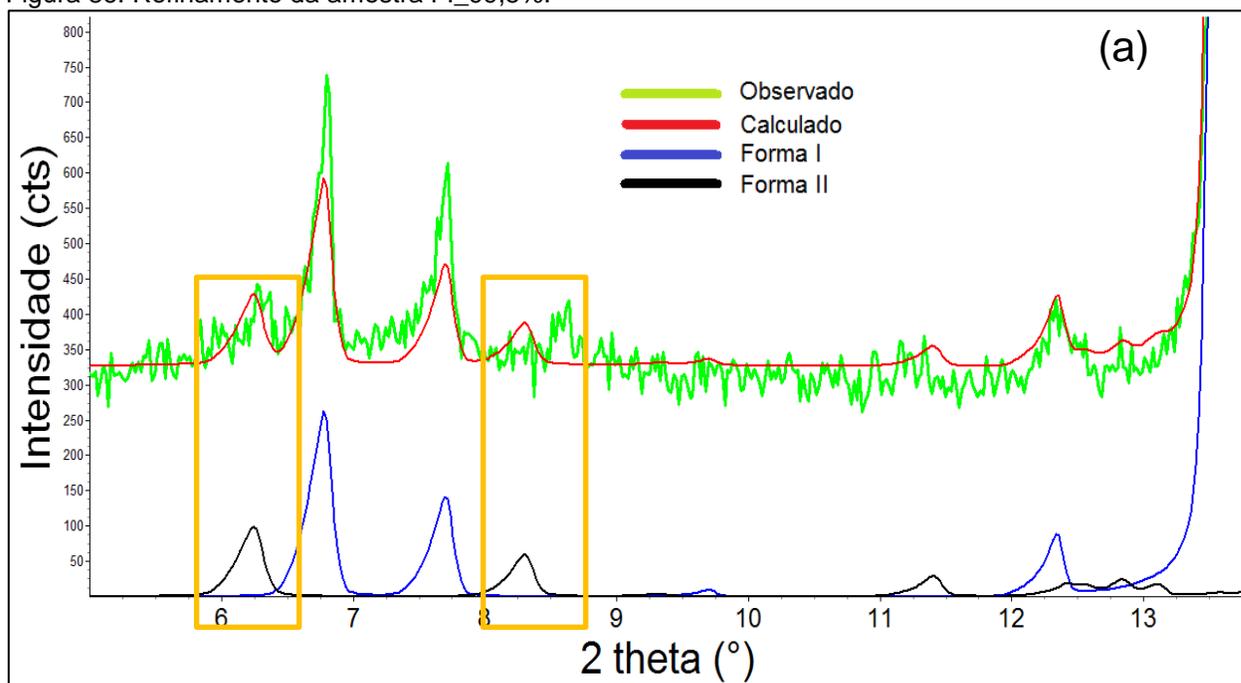
Figura 85: Refinamento da amostra FI_1,0%.

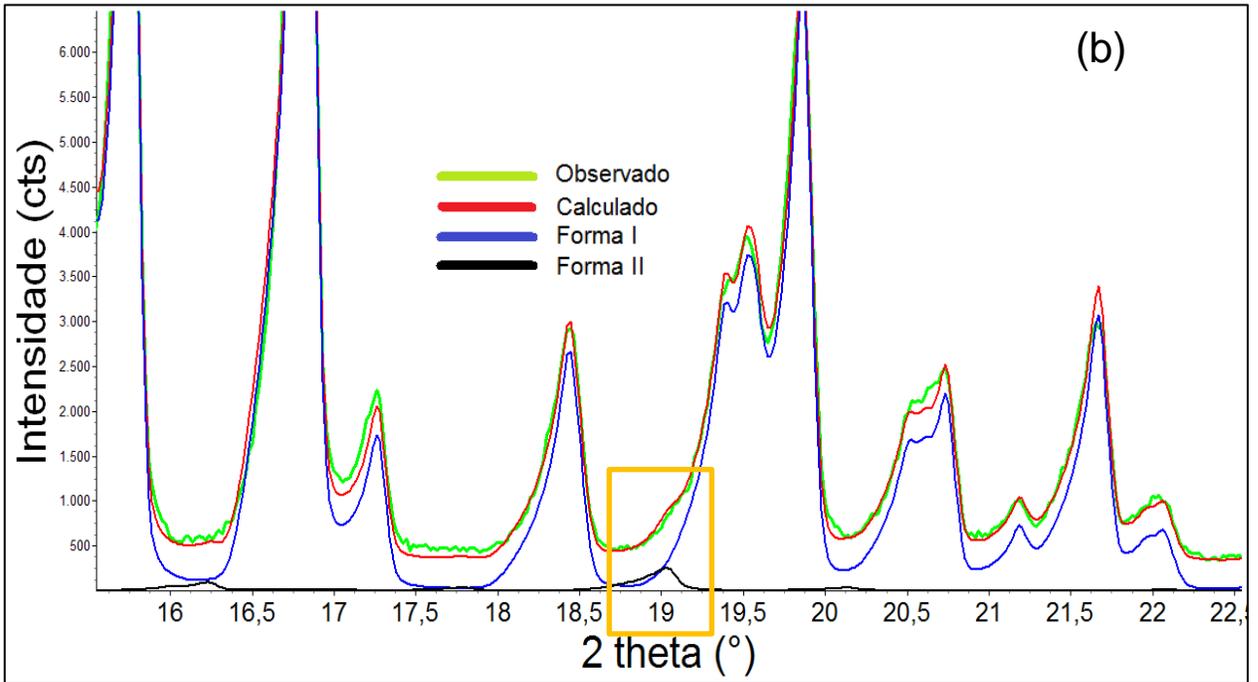


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para a amostra FI_99,5%, na Figura 86(a) e (b), estão as únicas regiões em que se pode distinguir os picos da forma minoritária. Essa amostra foi medida também com um tempo maior (Figura 68), como apresentado na seção sobre os limites de identificação, e as regiões assinaladas apresentam os picos da forma minoritária. Na Figura 86(b) destaca-se apenas uma pequena alteração no perfil. Os resultados da análise quantitativa de fases estão na Tabela 4. Na Figura 87 é possível ver o bom ajuste no refinamento da amostra FI_99,0%, já que houve uma boa definição dos picos de difração principalmente para a região de mais baixo ângulo.

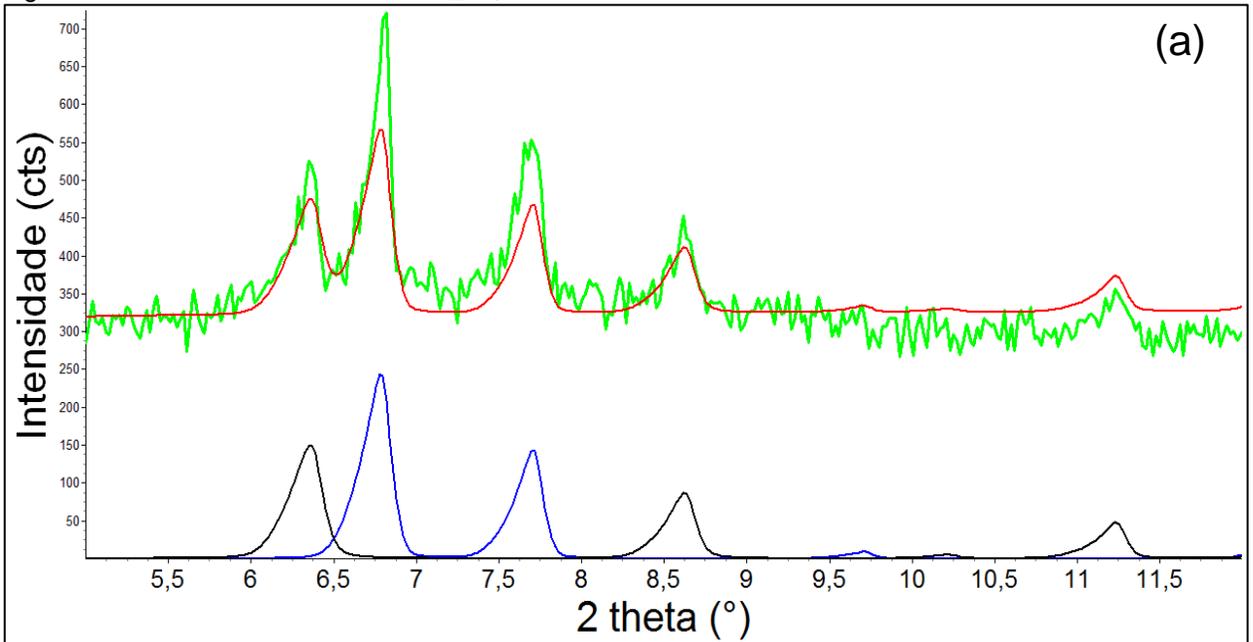
Figura 86: Refinamento da amostra FI_99,5%.

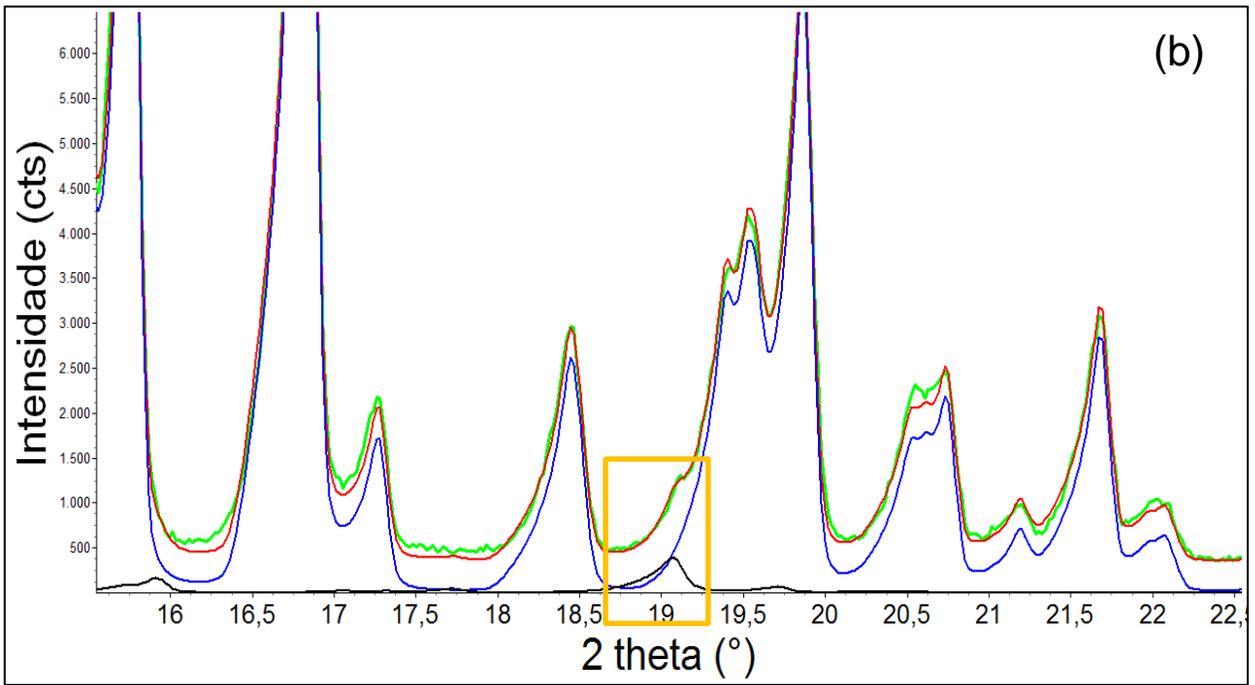




Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 87: Refinamento da amostra FI_99,0%.





Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Tabela 12: Proporção cristalina real e proporção cristalina obtida pelo método de Rietveld com os dados do D8; índices de refinamento global, levando em consideração todos os refinamentos - R_{wp} 10,58%, $\chi^2 = 3,49$.

% Cristalina real			% Cristalina método de Rietveld		Índice de qualidade de refinamento		
					R_{Bragg} (%)		d-DW
Amostra	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	Forma I	Forma II	
FI_0,5%	2,61	97,39	3,7(2)	96,3(2)	3,38	5,30	0,217
FI_1,0%	3,12	96,88	3,10(19)	96,89(19)	3,26	5,36	0,217
FI_2,0%	4,16	95,84	4,06(19)	95,94(19)	3,04	5,17	0,219
FI_3,0%	5,20	94,80	4,18(19)	95,81(19)	3,91	6,75	0,232
FI_4,0%	6,23	93,77	6,1(2)	93,9(2)	3,21	5,20	0,191
FI_5,0%	7,26	92,74	6,5(2)	93,5(2)	3,75	5,14	0,227
FI_95,0%	95,37	4,63	93,40(17)	6,60(17)	1,97	4,57	0,237
FI_96,0%	96,30	3,70	94,83(14)	5,17(14)	1,72	4,66	0,274
FI_97,0%	97,22	2,78	95,75(13)	4,24(13)	1,60	4,20	0,422
FI_98,0%	98,15	1,85	97,25(12)	2,75(12)	1,86	2,70	0,485
FI_99,0%	99,08	0,92	98,42(12)	1,58(12)	1,62	2,56	0,399
FI_99,5%	99,54	0,46	98,97(10)	1,03(10)	1,94	3,96	0,526

Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.5 Simulação das misturas binárias

5.5.1 Rigaku RINT2000

As simulações foram realizadas somente com os parâmetros para o equipamento Rigaku RINT2000, pois foi o equipamento de menor resolução entre todos

os usados neste trabalho e o que melhor definiu as dimensões dos cristalitos das duas formas da FNT. Para isso foi usado o método dos Parâmetros Fundamentais utilizando o programa Topas Academic v 4.1.

As simulações foram usadas inicialmente para localizar as regiões em que seria possível buscar por indicações de picos da forma minoritária, para definir os limites de identificação da forma minoritária, por meio de análise visual. Depois foram usadas para corrigir o deslocamento das amostras, para a mesma análise de identificação visual (seção 5.4.1).

Uma vez realizadas as análises quantitativas por DRXP e das tentativas de encontrar a forma dos cristalitos através de MET, passou-se a buscar por uma forma adequada de realizar as simulações, levando em conta o tamanho e a forma do cristalito com a finalidade de subsidiar o usuário, que pode ser um pesquisador ou colaborador de uma indústria a definir a melhor condição experimental para as medidas, caso não se deseje em um material porcentagens acima de um determinado valor. Nos casos aqui descritos, os valores mínimos são de 0,5% em massa para a Forma I ou II da FNT.

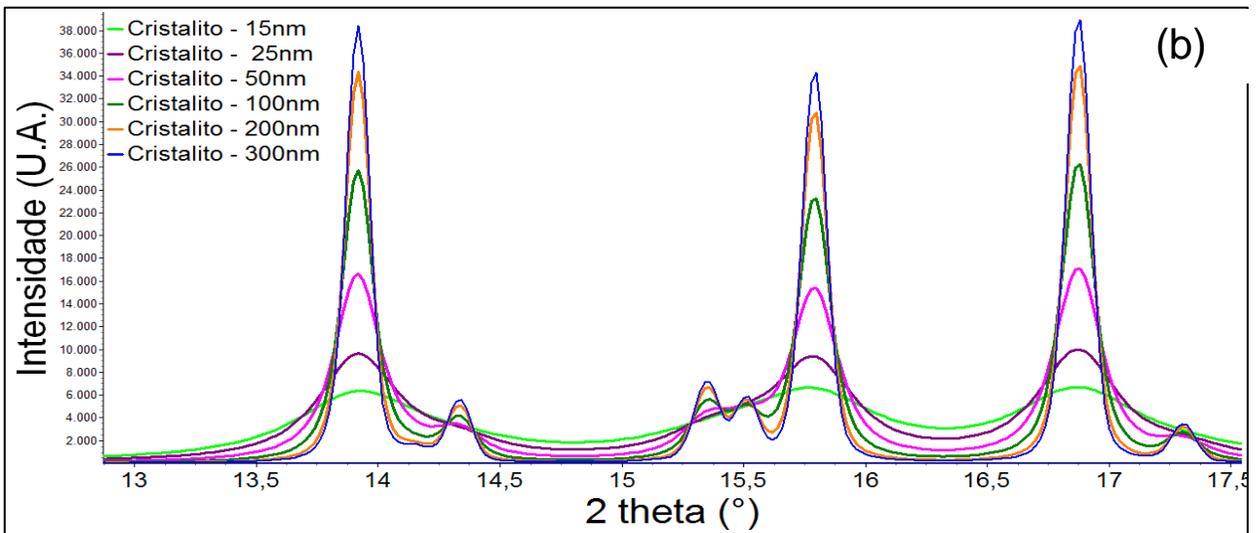
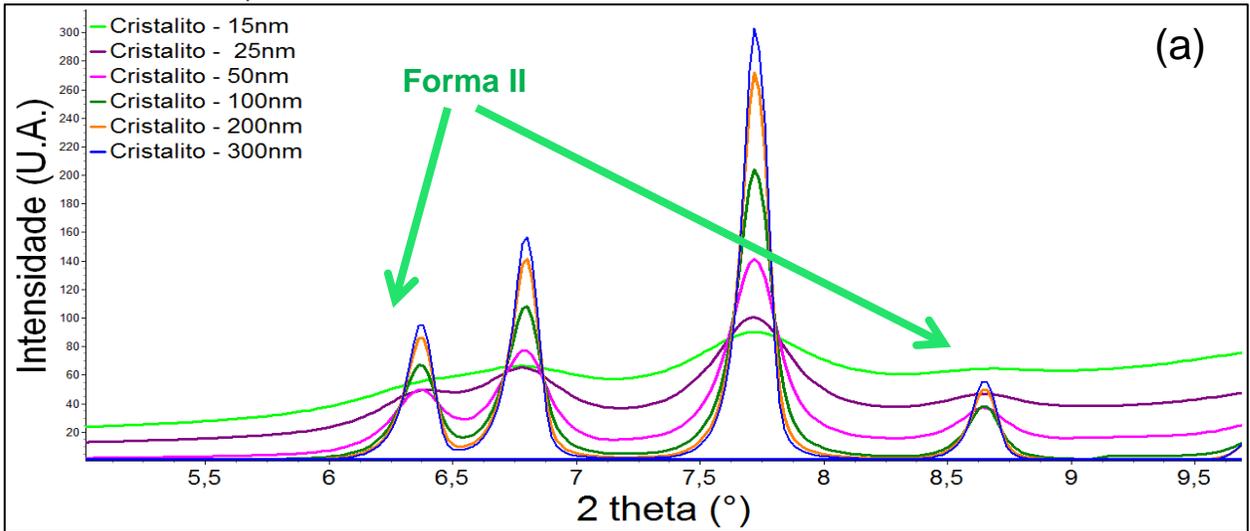
Embora em uma matéria-prima se tenha uma distribuição de tamanho de cristalito, além de material amorfo, as simulações aqui realizadas não levam isso em consideração, por não se dispor de um modelo que permita gerar um perfil com as influências de uma distribuição. Young (1988) [46] mostrou que em uma distribuição bimodal, se observa pontos satélites acima do máximo de um perfil calculado de um pico, embora não tenha apresentado um modelo para sua correção. Assim, as

simulações a seguir representam padrões de difração de um pó homogêneo, com tamanho de cristalito único entre 15 e 300 nm. Esses limites foram escolhidos porque acima de 300 nm o perfil de um pico não apresenta alargamento físico (devido ao tamanho de cristalito) e abaixo de 15nm, o padrão para o pó está próximo de um material amorfo.

Foi utilizada a simulação para a amostra (FI_99,5%) a fim de definir o mínimo que pode ser identificado com essa mistura levando em consideração o tamanho médio de cristalito.

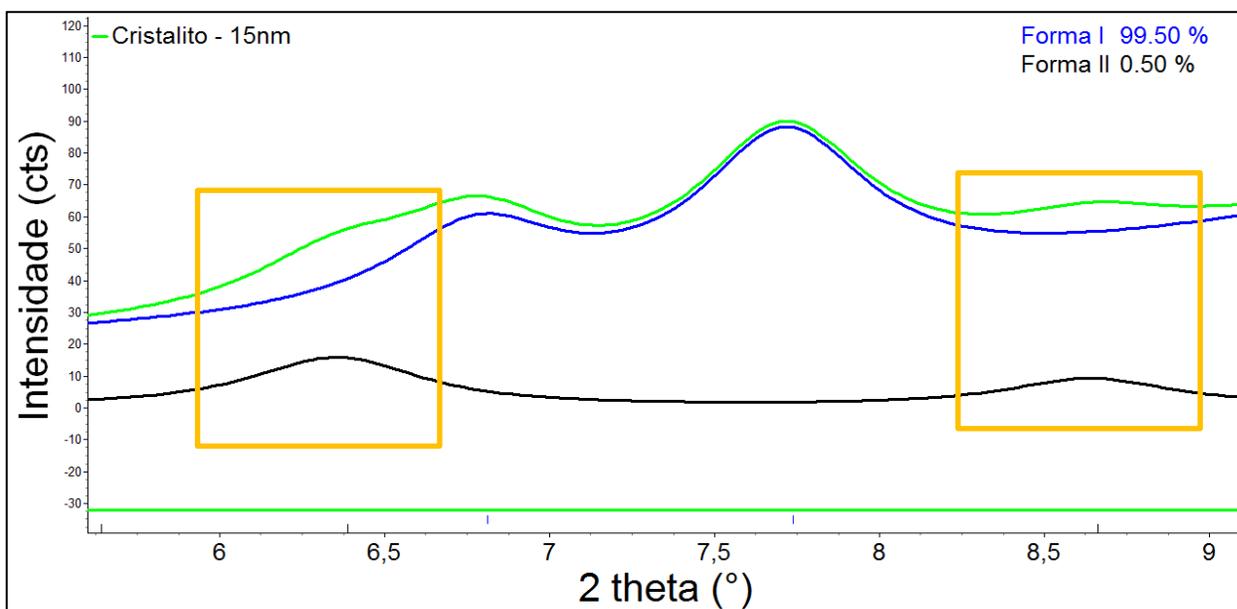
Na Figura 88 estão vários padrões de difração para uma mistura com 99,5% da Forma I e 0,5% da Forma II, calculados com cristalitos de 300 nm, 200 nm, 100 nm, 50 nm, 25 nm e 15 nm para ambas as forma. Nota-se que, mesmo para o caso com cristalito de 15nm, nas condições ideais apresentada nessa figura, existe uma alteração, em torno de $6,35^\circ$, causada por 0,5% da Forma II. Pode-se ver em detalhes essa pequena alteração no perfil do pico da Forma I, causada pela presença da Forma II na Figura 89.

Figura 88: Variação no perfil dos picos de difração da amostra FI_99,5% pelo mudança no tamanho de cristalito das formas polimórficas.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Figura 89: Mínima proporção identificada com um tamanho de cristalito de 15nm para ambas as formas polimórficas envolvidas nas misturas.

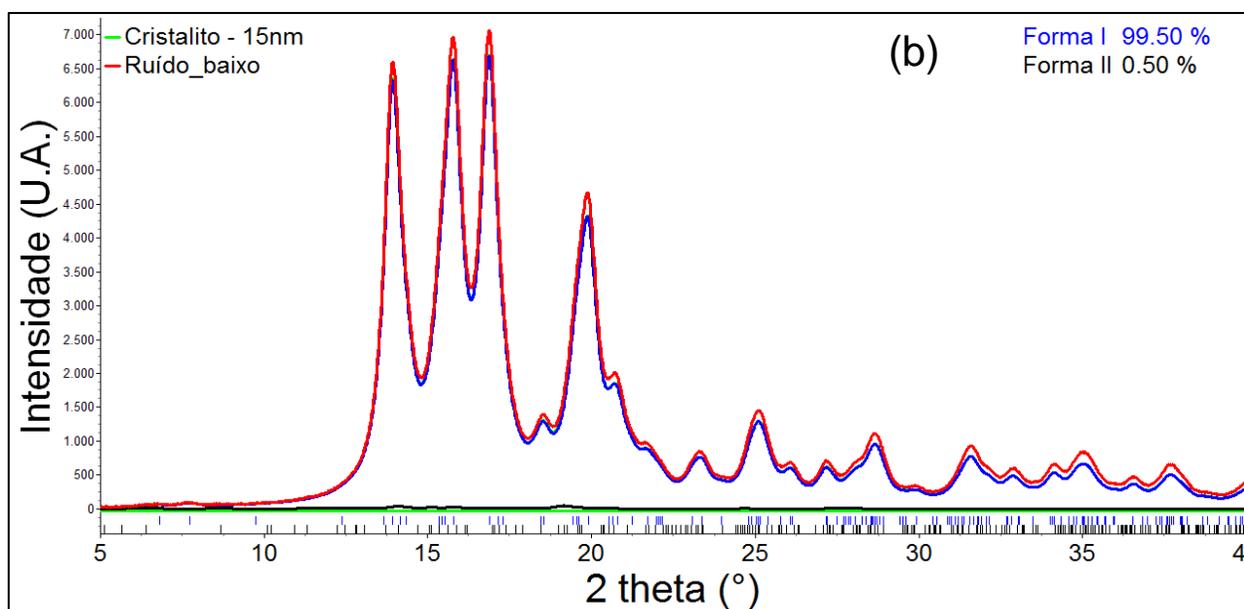
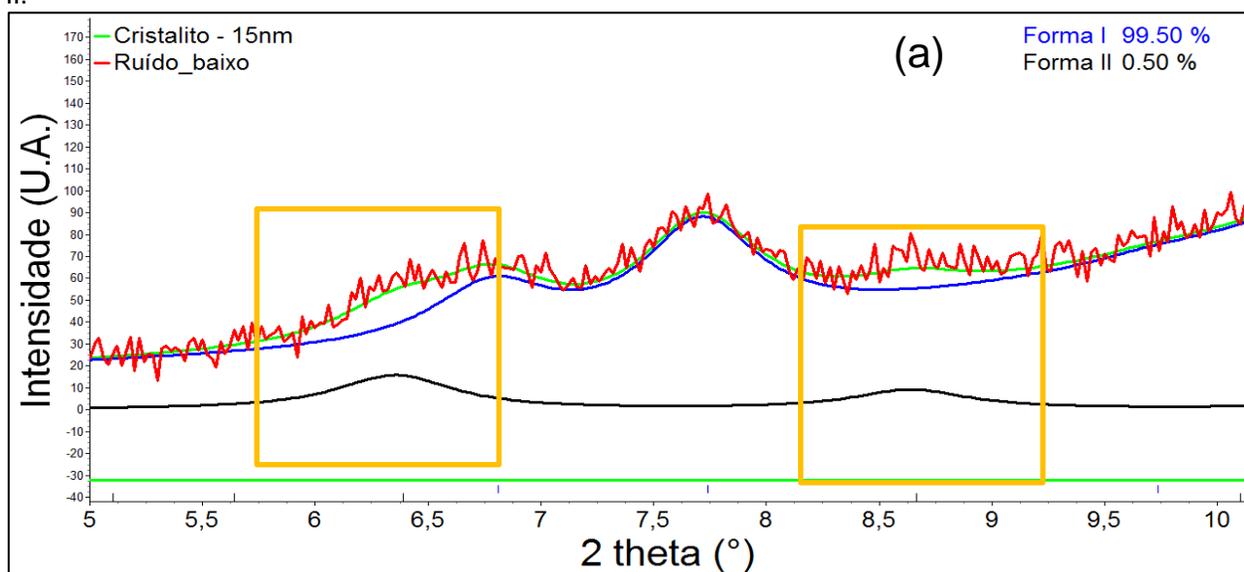


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Essa condição ideal não leva em consideração a distribuição de tamanho de cristalito e nem ruídos de medições. O mais próximo que se obtém de uma condição ideal seria um pó tamisado em peneira Mesh 200, e com tempo de medida muito elevado, por exemplo, acima de 3 min por ponto. Uma medida assim, de 5° a 40° (2θ) e $\Delta 2\theta=0,02^\circ$, levaria acima de 3 dias e meio, usando um sistema de detecção convencional. O tempo gasto é muito alto para apenas uma medida, mesmo em laboratórios com baixa demanda de solicitações de medidas. Poderiam ser utilizados equipamentos com detectores lineares onde um difratograma “ideal” poderia ser obtido com medidas entre 30 e 90 min.

Para representar uma situação real, foram introduzidos ruídos nas simulações, representando medidas rápidas, moderadas e lentas – ruído alto, médio e baixo, respectivamente.

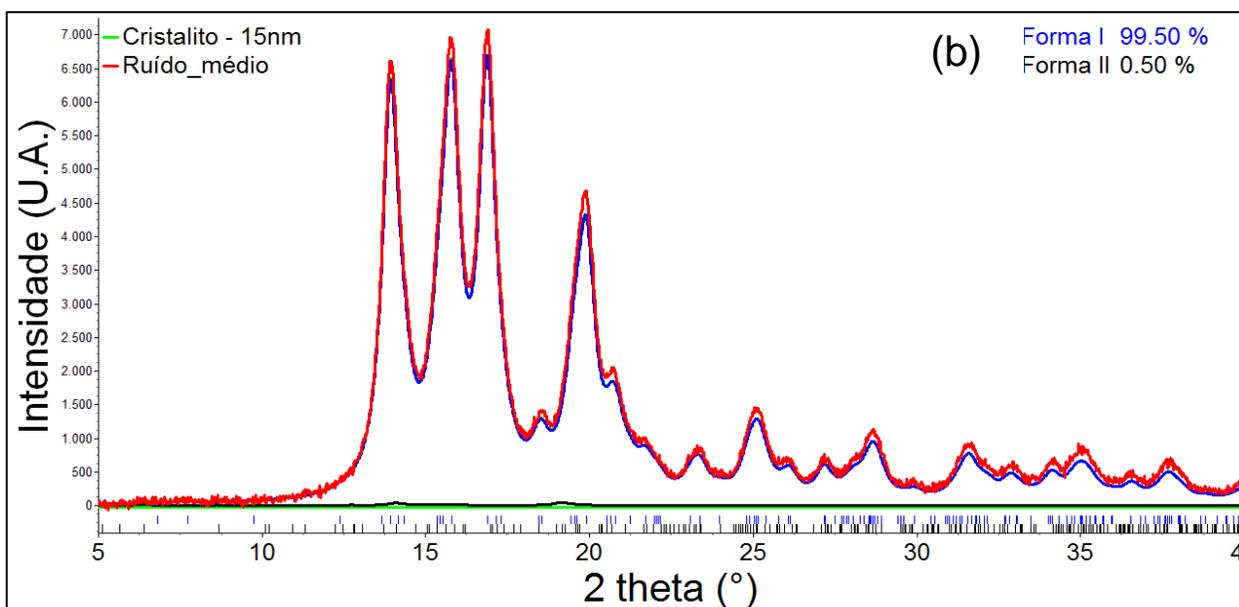
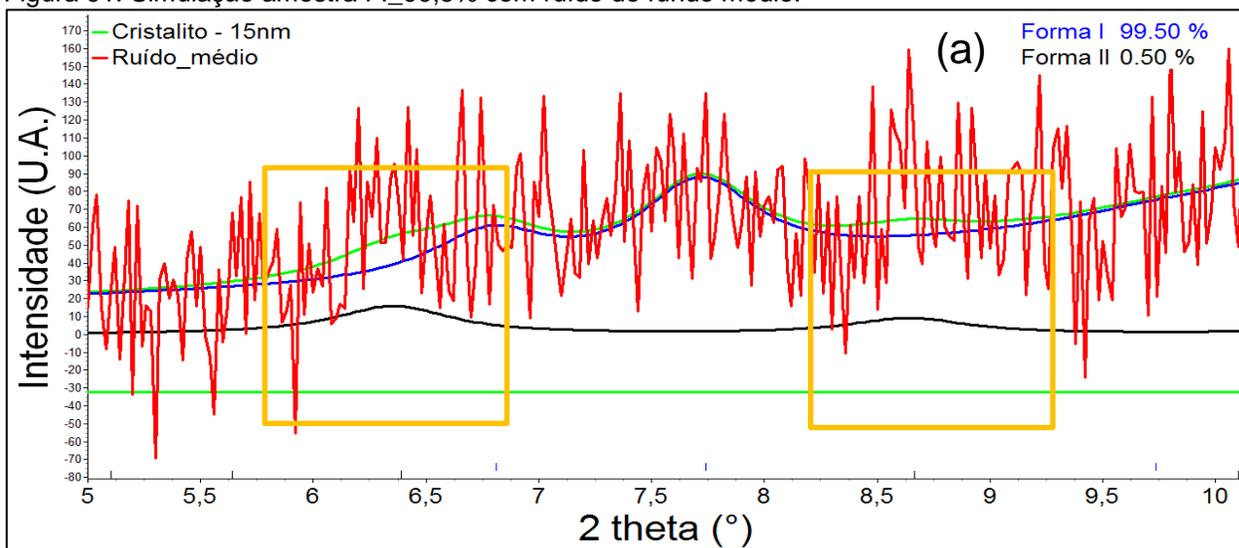
Figura 90: Simulação amostra FI_99,5% com ruído de fundo baixo. No destaque estão os picos da Forma II.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Para casos de ruídos baixos, ainda é possível identificar a Forma II (Figura 90(a)). Para os casos de ruídos médio e alto, o perfil se perde no meio das variações da intensidade do ruído (Figura 91 e Figura 92, respectivamente).

Figura 91: Simulação amostra FI_99,5% com ruído de fundo médio.

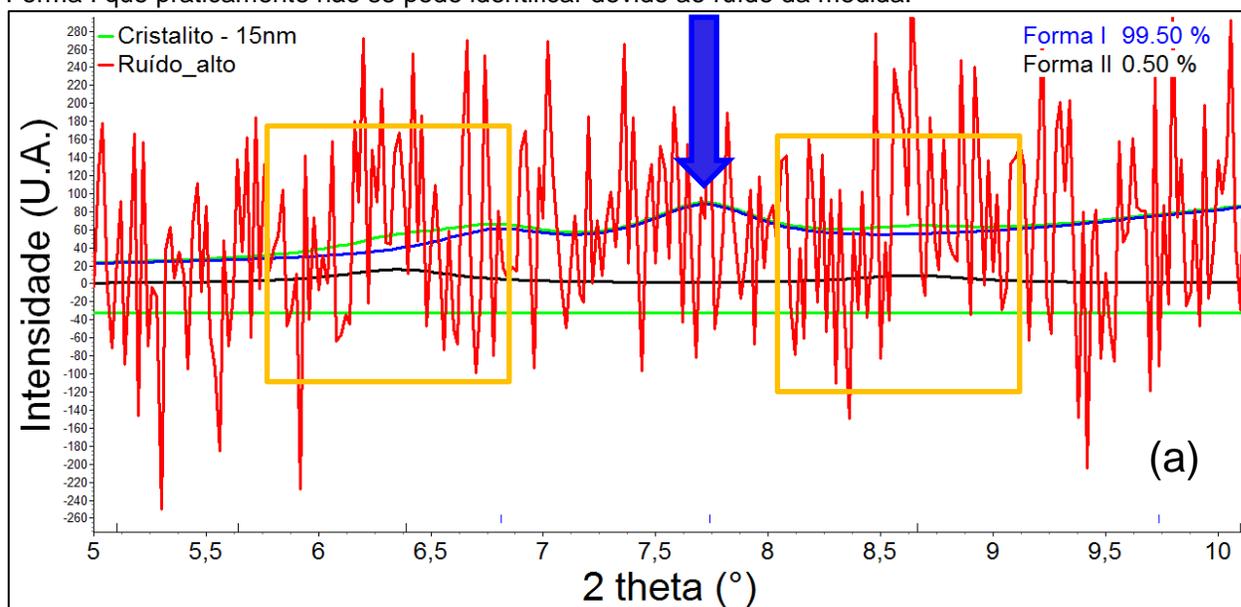


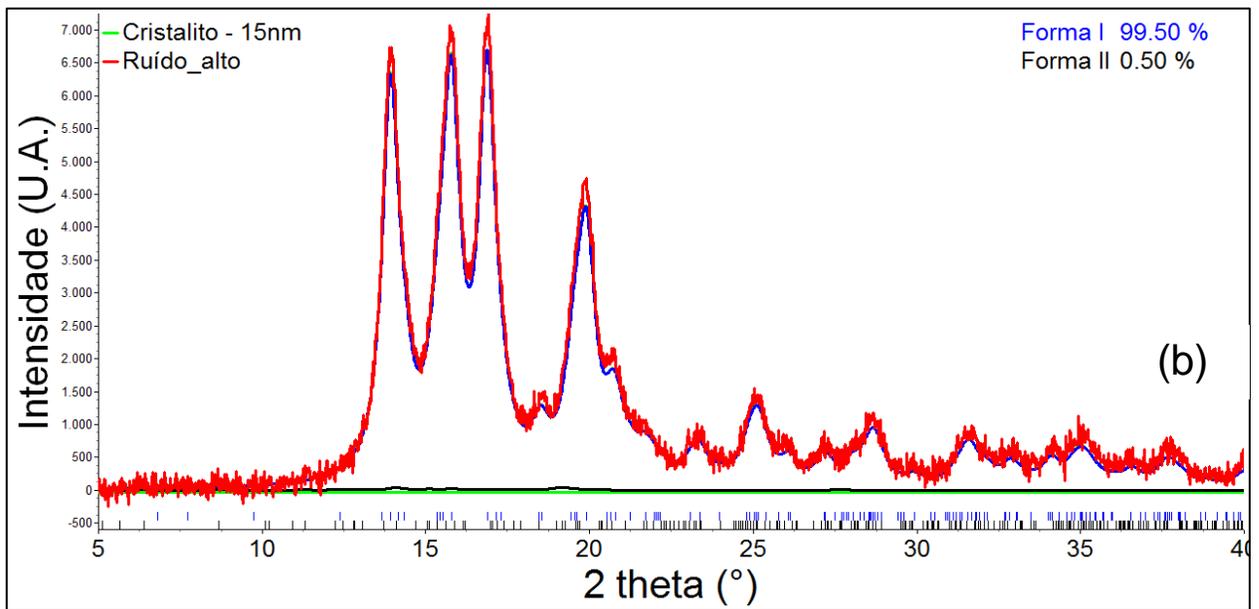
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Na situação em que existe ruído de fundo alto, até mesmo o pico da Forma I fica “escondido” nos resultados das medidas, como o caso da figura a seguir. Por isso medidas rápidas não são adequadas para a identificação de polimorfos.

Se o objetivo for apenas identificar pequenas quantidades de algum polimorfo em uma matéria-prima, é necessário medidas de alta intensidade. Recomenda-se também uma simulação para encontrar a região em que seria possível encontrar alguma evidência da forma minoritária e, se for o caso, medir apenas a região de maneira cuidadosa.

Figura 92: Simulação amostra FI_99,5% com ruído de fundo alto. A seta aponta para o pico (0 1 1) da Forma I que praticamente não se pode identificar devido ao ruído da medida.

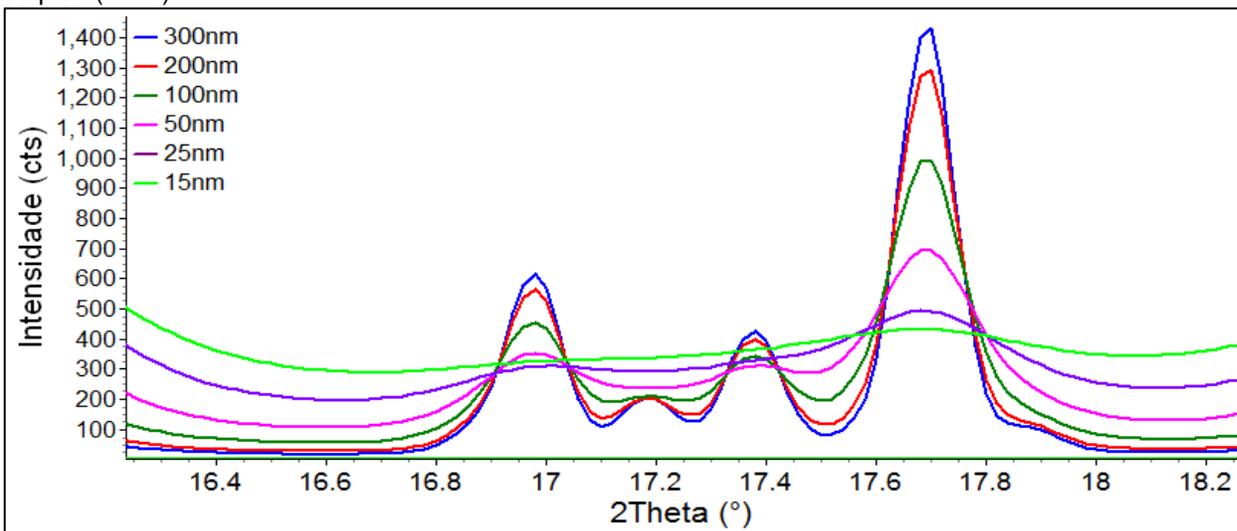




Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

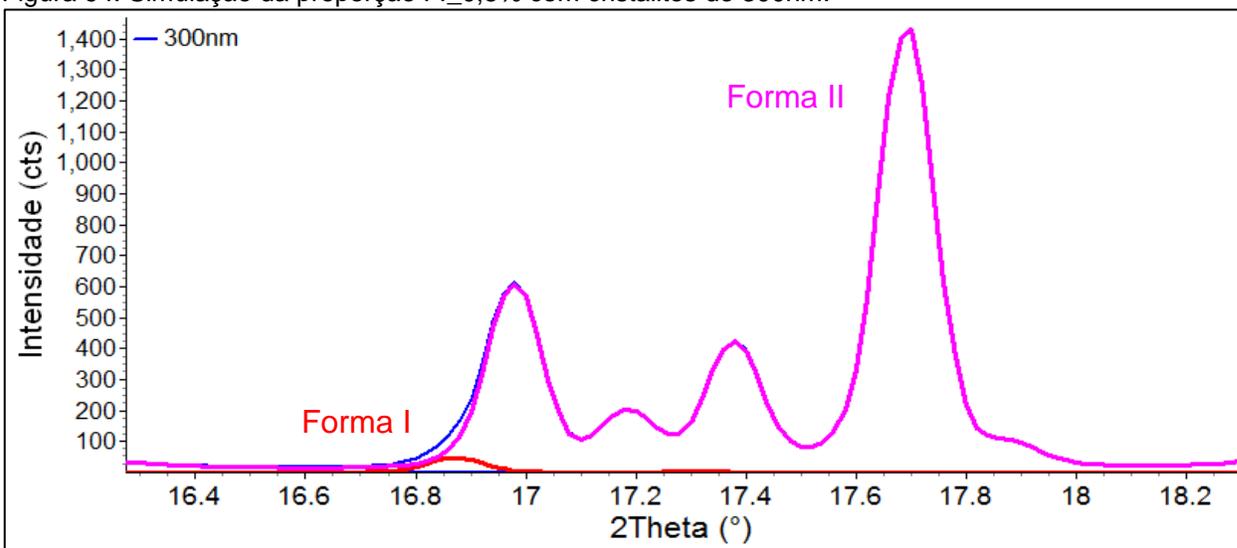
Para o caso da Forma I aparecer em proporção minoritária (amostra FI_0,5%). A Figura 93 mostra a sequência de padrões de difração, com os cristalitos nas mesmas condições do caso anterior e na região entre 16,2° e 18,2° (2θ) em que se pode buscar por uma evidência do pico (1 1 2) da Forma I, em aproximadamente 16,8° (2θ). Para o caso de maior cristalito (300 nm) para ambas as formas a comparação está na Figura 94.

Figura 93: Simulação dos padrões de difração na região entre 16,2° e 18,2° para se avaliar a contribuição do pico (1 1 2).



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

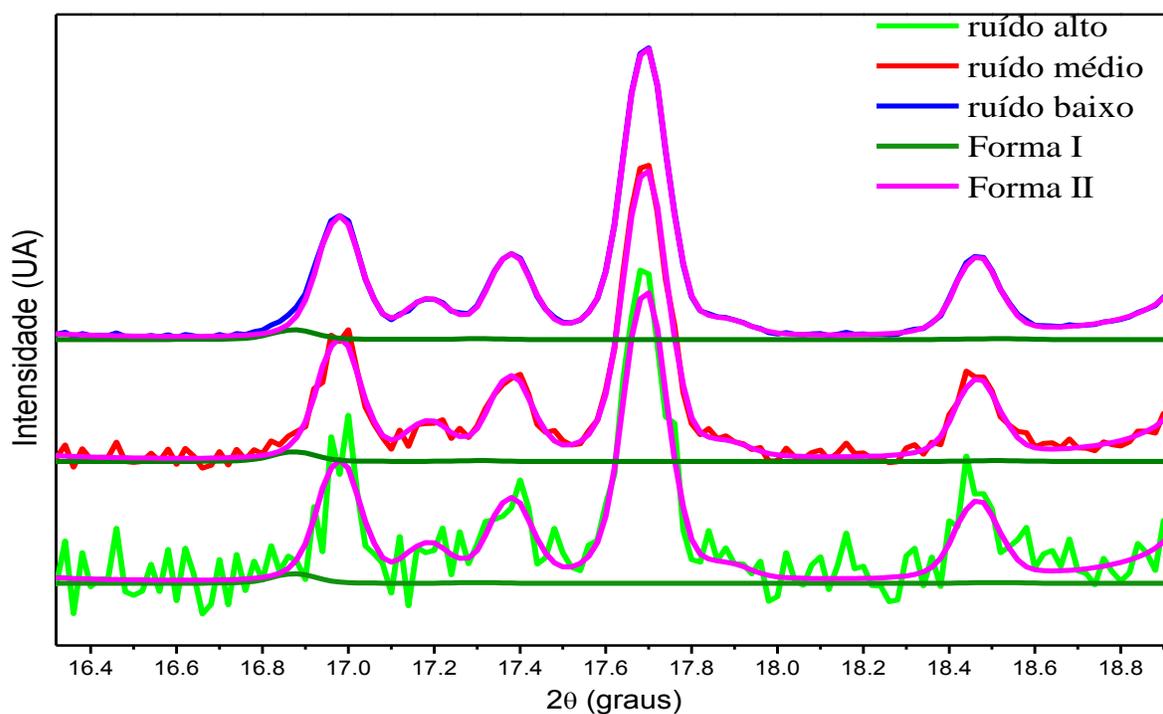
Figura 94: Simulação da proporção FI_0,5% com cristalitos de 300nm.



Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

Da mesma forma que no caso da Forma II minoritária, o ruído pode não deixar o pico da Forma I evidente na análise. A Figura 95 mostra ruídos altos, médios e baixos, equivalentes a medidas rápidas, moderadas e lentas, com detectores convencionais. Apenas no caso de baixo ruído é possível notar um leve desajuste devido ao pico da Forma I. Porém, desajustes dessa dimensão são comuns em refinamentos pelo método de Rietveld e, não necessariamente pode-se atribuí-lo à Forma I.

Figura 95: Simulações da influência do ruído nas medidas – cristalitas de 300nm.

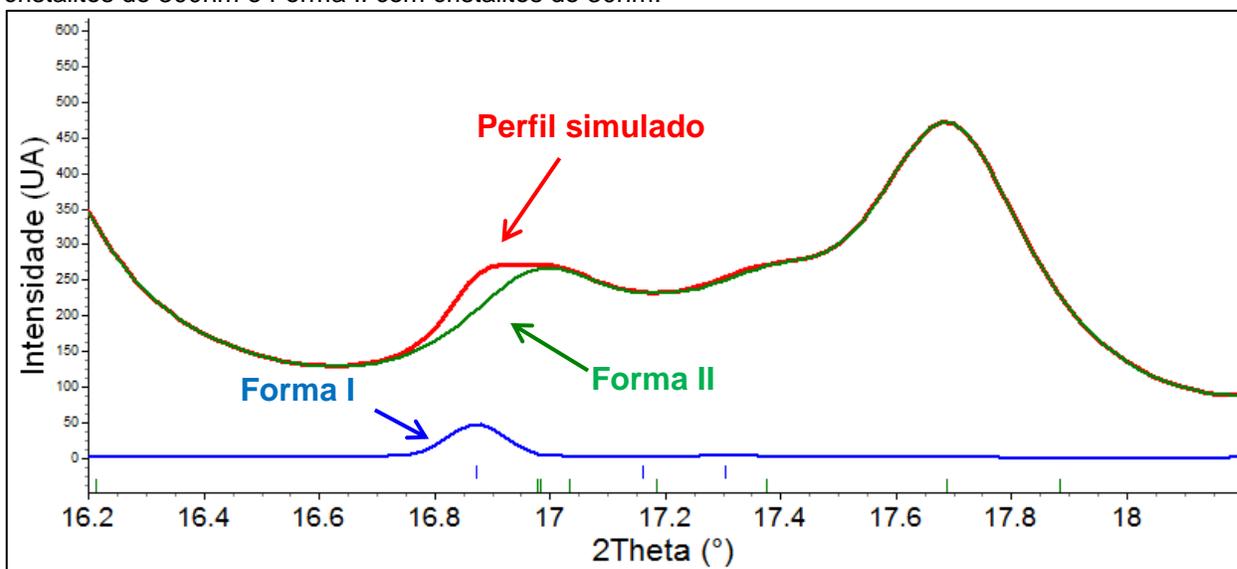


Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

No desenvolvimento desse trabalho, observou-se claramente a presença da Forma I em 0,5%. Para responder a essa questão, é necessário mais algumas observações sobre as diferenças entre caso real e simulações.

Já foi comentado anteriormente sobre simulações ideais, ou seja, com cristaltos de dimensão única e sem anisotropia (esféricos). Além disso, está se considerando que as duas formas possuem cristaltos idênticos. A probabilidade de que em um experimento se encontre um caso assim é praticamente nula. O mais comum é que as fases tenham cristaltos de dimensões diferentes. Por exemplo, se a Forma I tem um cristalito de 300 nm e a Forma II tem um cristalito de 30 nm, será observado o que está na Figura 96. Assim, aumenta-se a probabilidade de se identificar a Forma I, mesmo em quantidades tão pequenas quanto 0,5% em massa em uma mistura com a Forma II.

Figura 96: Simulação com tamanho de cristalito variado para as formas polimórficas – Forma I com cristaltos de 300nm e Forma II com cristaltos de 30nm.

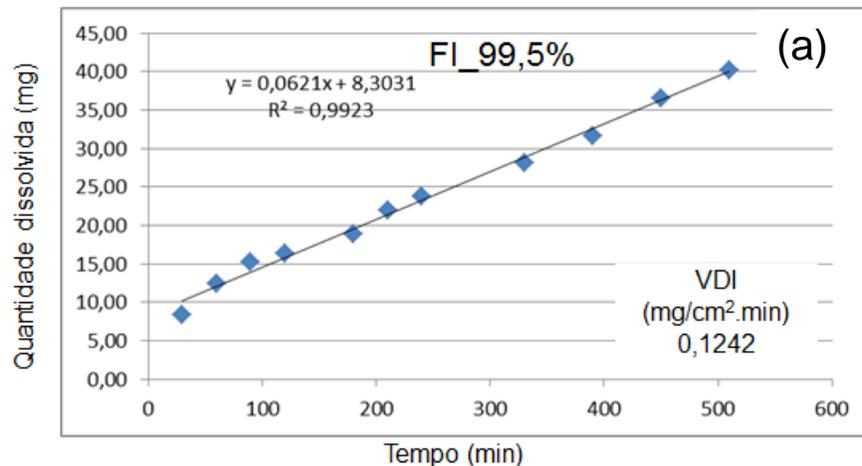


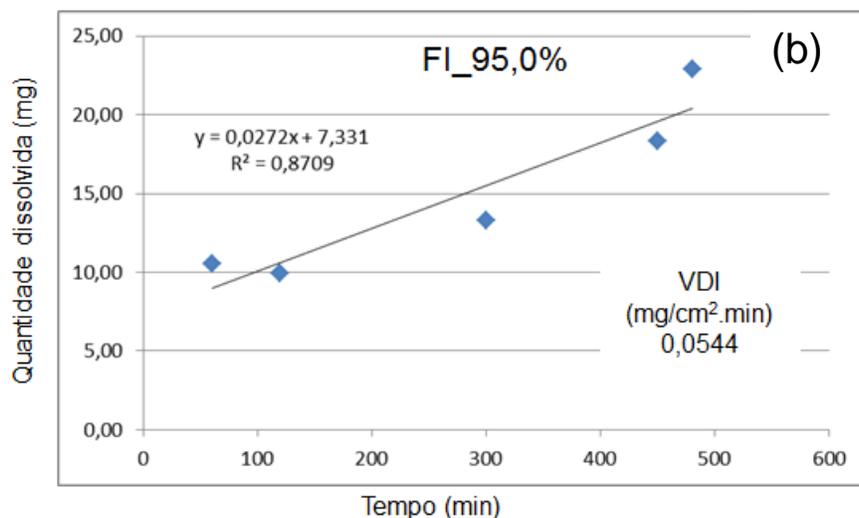
Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

5.6 Dissolução intrínseca

Com os ensaios de dissolução intrínseca das amostras das misturas binárias, foi identificada uma variação considerável na VDI, e conseqüentemente na solubilidade da matéria-prima. Com a variação da proporção de Forma II na mistura de 0,5% para 4,5% na mistura, a solubilidade da amostra de matéria-prima mudou de “altamente solúvel” para “insolúvel”, ou seja, matérias-primas da finasterida com variação na proporção dos polimorfos presentes podem acarretar problemas na biodisponibilidade do medicamento, como consequência da variação da solubilidade. Essa variação na solubilidade ocorreu para o meio de dissolução ácido com laurilsulfato de sódio.

Figura 97: Ensaio de dissolução intrínseca para as amostras com misturas binárias dos polimorfos da finasterida. (a) amostra FI_99,5% altamente solúvel no meio de dissolução; (b) amostra FI_95,0% insolúvel no meio de dissolução.





Fonte: Elaboração do autor deste trabalho.

O problema de ajuste da reta na Figura 97(b) ocorreu devido a quantidade insuficiente de amostra para a realização do ensaio. Foi realizado o teste para a FI_95,0% inicialmente para ajustar os parâmetros para o ensaio, de modo que a quantidade de material que restou para finalizar o ensaio não foi suficiente para coletar mais pontos para a elaboração da reta. O mesmo não ocorreu com a amostra FI_99,5%, pois os parâmetros para o ensaio já haviam sido definidos.

6 Conclusões

O equipamento de alta resolução (Stoe Stadi-P) permite, de forma inequívoca, a identificação das formas I ou II quando em quantidades tão pequenas quanto 2,61% e 0,46% em massa, respectivamente.

Com o equipamento de menor resolução, como o Rigaku RINT2000 nas condições usadas nesse trabalho, a identificação da Forma I em 2,61% em massa só é possível através de uma análise muito cuidadosa da região entre 16,5 e 18,0° (2 θ). Ainda assim, é necessário que o pesquisador esteja familiarizado com esse sistema.

No caso em que a Forma II foi considerada pura após o tratamento térmico, apenas a difração de raios X de alta resolução permitiu a identificação da forma I presente. Nem mesmo a análise térmica (DSC) identificou aproximadamente 2,0% da Forma I nessa amostra.

A apresentação das simulações para o equipamento RINT2000 mostrou como essa ferramenta pode direcionar experimentos que visam identificar mínimas proporções. Simulações com diferentes dimensões dos cristalitos de cada forma fornecem um bom subsídio para o que o pesquisador pode esperar do experimento.

Os resultados para a MET de alta resolução e difração de elétrons para ambas as formas polimórficas deram indícios de que não havia anisotropia nos cristalitos. Isso também foi verificado pelas análises por DRXP.

6.1 Limites de identificação

6.1.1 Rigaku RINT2000

É possível identificar as proporções mínimas de cada Forma, nas misturas binárias preparadas nesse trabalho. Quando a Forma I aparece em menor proporção na mistura, é possível identificar a partir de 2,61% em massa. Para a situação em que a Forma I aparece em maior proporção é possível identificar a partir de ~1,0% da Forma II na mistura.

6.1.2 Siemens D5000

Para as amostras em que a Forma I aparece em menor proporção é possível identificar a partir de 4,16% em massa na mistura binária (amostra FI_3,0%). Para a situação em que a Forma II aparece em menor proporção na mistura com Forma I é possível identificar a partir de ~ 1,0%.

6.1.3 Bruker D8

Quando a Forma I aparece em menor proporção na mistura é possível identificar a partir de 4,16% em massa. Já para a situação em que a Forma II aparece em menor proporção na mistura, é possível identificar a partir de 1,0% (FI_99,0%) em massa desta forma nas condições normais de medidas, e a partir de 0,5% (FI_99,5%) em massa se medidas mais lentas forem realizadas ou se um analista estiver familiarizado com a análise da finasterida.

6.1.4 Stoe Stadi-P

É possível identificar na matéria-prima da Forma II uma pequena proporção de Forma I, que não pode ser observada nos difratogramas dos outros equipamentos usados nesse trabalho. Foi possível identificar as duas formas em todas as misturas preparadas, sendo que para a Forma I a menor proporção (~2%) estava na própria amostra de Forma II considerada até então pura. Para a situação em que a Forma II aparece em menor proporção o mínimo identificado foi de ~0,5% em massa.

6.2 Limites de quantificação

6.2.1 Rigaku RINT2000

É possível quantificar a Forma II acima de ~1%. Para a Forma I foi possível quantificar a partir de ~2,6%

6.2.2 Siemens D5000

É possível quantificar as duas formas nas proporções mínimas preparadas para esse trabalho. Para a Forma I 2,6% e para a Forma II 0,5%.

6.2.3 Bruker D8 Advance

É possível quantificar as duas formas nas proporções mínimas preparadas para esse trabalho. Ou seja, 2,6% para a Forma I e 0,5% para a Forma II.

6.2.4 Stoe Stadi-P

É possível quantificar as duas formas nas proporções mínimas preparadas para esse trabalho. Ou seja, 2,6% para a Forma I e 0,5% para a Forma II

6.3 Simulação

Foi realizada a simulação apenas com os parâmetros do Rigaku RINT2000. Para os outros equipamentos, verificou-se que os parâmetros fundamentais não estavam representando o caso real.

Além disso, por ser esse equipamento o de menor resolução, toda conclusão obtida dele pode ser estendida aos outros. A recíproca não é verdadeira.

Verifica-se que dados de alta relação sinal/ruído são importantes para se avaliar pequenas quantidades de qualquer das formas.

Recomenda-se as simulações no início das análises de misturas de fases a fim de evitar que sejam realizadas medições desnecessárias se o objetivo for apenas a identificação de uma determinada forma cristalina da Finasterida. Essa recomendação pode ser estendida a outros fármacos e seus polimorfos.

6.4 Dissolução intrínseca

Por meio dos ensaios de dissolução intrínseca das amostras preparadas em proporção foi possível avaliar a variação no valor da velocidade de dissolução intrínseca (VDI) e concluir que a medida que se varia a proporção de um polimorfo na mistura binária, ocorre variação na solubilidade da matéria-prima o que causa variações na biodisponibilidade do medicamento, evidenciando assim importância em avaliar as mínimas proporções presentes em misturas de fases.

6.5 Outras considerações

A utilização dos equipamentos de mais baixa resolução, como o caso do D8 Advance e o RINT2000 é viável para o trabalho com fármacos.

Outra recomendação é a avaliação do tempo adequado para a coleta de dados para esses equipamentos. O tempo utilizado nesse trabalho foi o que se usa rotineiramente nas análises com fármacos. O aumento do tempo de medida para equipamentos com detector linear é viável, pois mesmo que ele seja quadruplicado não irá interferir significativamente na rotina de análises de um laboratório com alta demanda de amostras para análise. Por exemplo, no caso do D8, ao se quadruplicar o tempo de coleta, a rotina de análise para a amostra não passou de 30 min. Já para o RINT2000, os dados foram obtidos em um tempo total de aproximadamente 14h por

amostra, de modo que duplicar ou triplicar o tempo de medida por ponto seria inviável. Nesse caso, através das simulações, pode-se definir uma pequena região a ser medida em condições especiais.

7 Sugestões para trabalhos

Durante o desenvolvimento dessa dissertação, muitas questões foram surgindo e que poderiam ser exploradas em outros trabalhos.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para complementar o estudo da Finasterida e outros casos de interesse geral na área de fármacos.

- Novo estudo para a obtenção da Forma II pura, variando as condições do tratamento térmico e análise utilizando um sistema de alta resolução, como o Stoe Stadi-P ou as linhas de difração de raios X por pó de um laboratório Síncrotron. Preparar e medir menores proporções da mistura dos polimorfos da FNT, até um limite que não seja possível identificar. Essa etapa será medida novamente em todos os equipamentos utilizados.
- Propor um projeto de doutorado para relacionar os parâmetros instrumentais de equipamentos com detectores lineares com as características físicas das amostras.
- Utilizar a metodologia desse trabalho no estudo dos fármacos espironolactona e tibolona, que já possuem as amostras das proporções em massa preparadas.

8 Referências bibliográficas

1. HILFIKER, R. **Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006. 425 p.
2. TIAN, F.; QU, H.; ZIMMERMANN, A.; MUNK, T.; JØRGENSEN, A. C.; RANTANEN, J.. Factors affecting crystallization of hydrates. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1534-1546, 2010.
3. YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 27-42, 2001.
4. HANCOCK, B. C.; ZOGRAFI, G. Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n.1, p. 1-12, 1997.
5. BAUER, J.; SPANTON, S.; HENRY, R.; QUICK, J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism. **Pharmaceutical Research**, v.18, n.6, p. 859-866, 2001.
6. GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1-59, 1995.
7. HETERO DRUGS LIMITED. PARTHASARADHI, R. B. et al. **Novel Crystalline Forms of Finasteride**. WO 2004/083230 A1. 30 Sep. 2004.
8. OTHMAN, A.; EVANS, J. S.O.; EVANS, I. R.; HARRIS, R. K. ; HODGKINSON, P. Structural study of polymorphs and solvates of finasteride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96. n. 5, p. 1380-1397, 2007.
9. Dr. REDDY'S LABORATORIES LTD. REDDY, M. S.; RAJAN, S. T.; BRAHMESHWARA RAO, M. V. N.; VYAS, K.; REDDY, S. V., REKHA, K. S. **Novel polymorphic form of 17-beta-(n-ter. butyl carbamoyl)-4-aza-5-alpha-androst-1-en-3-one and a process for preparing it**. USP 0059691 A1. Mar. 15, 2004. Mar. 17, 2005.
10. OLIVEIRA, E. A.; LABRA, M. E.; BERMUDEZ, J. A produção pública de medicamentos no Brasil: uma visão geral. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22. n. 11, p. 2379-2389, 2006.
11. ARAÚJO, L. U.;ALBUQUERQUE, K. T.;KATO, K. C.;SILVEIRA, G. S.;MACIEL, N. R.;SPÓSITO, P. A.;BARCELLOS, N. M. S.;SOUZA, J.;BUENO, M. E STORPIRTIS, S. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 28, n. 6, p. 480-492, 2010.
12. ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/agencia>. Acesso 02/07/2012.
13. MERK & CO., INC. RASMUSSEN, G. H.; REYNOLDS, G. F. **17.b-N-monosubstituted carbamoyl-4-aza-5.a.-androst-1-en-3-ones which are active as testosterone 5.alpha.-reductase inhibitors**. USP 4,760,071. Jul. 26, 1988.
14. OTBERG, N.; FINNER, A. M.; SHAPIRO, J. Androgenetic Alopecia. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 379-398, 2007.

15. BRIGANTI, A.; CAPITANIO, U.; SUARDI, N.; GALLINA, A.; SALONIA, A.; BIANCHI, M.; TUTOLO, M.; GIROLAMO, V. DI; GUAZZONI, G.; RIGATTI, P.; MONTORSI, F. Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies. **European urology**, v. 8, n. 13, p. 865-871, 2009.
16. DJAVAN, B.; ECKERSBERGER, E.; FINKELSTEIN, J.; ESPINOSA, G.; SADRI, H.; BRANDNER, R.; SHAH, O.; LEPOR, H. Benign Prostatic Hyperplasia: Current Clinical Practice. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 37, n. 3, p. 583-597, 2010.
17. MERCK & Co., Inc.,. MCCAULEY, J. A. e VARSOLONA, R. J. **Process for the production of finasteride**. USP 5,652,365. March 30, 1995 08/411,685
18. MERCK & CO., INC.,. DOLLING, U. H.; MCCAULEY, J. A.; VARSOLONA, R. J. **Finasteride processes**. USP 5,886,184. Mar. 26, 1997.
19. SCHULTHEISS, N.; SMIT, J. P.; HANKO, J. A. Three isostructural solvates of finasteride and their solid-state characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 5, p. 498-503, 2009.
20. TIWARI, M.; CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Quantification of Olanzapine polymorphs using powder X-ray diffraction technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43. p. 865-872, 2007.
21. SURYANARAYANAN, R.; HERMAN, C. S. Quantitative analysis of the active ingredient in a multi-component tablet formulation by powder X-ray diffractometry. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 77. p. 287-295, 1991.
22. GUIDELINE, ICH HARMONISED TRIPARTITE. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). Disponível em http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso 25/06/2012.
23. ANVISA. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em 23/06/2012.
24. WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy**. USA: Huntsville AL, 2009. 779 p.
25. LENG, Y. **Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods**. Hong Kong University of Science and Technology: John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd, 2008.
26. EDDLESTON, M. D.; BITHHELL, E. G.; JONES, W. Transmission Electron Microscopy of Pharmaceutical Materials. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 9, p. 4072-4083, 2010.
27. FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5. Ed. BRASÍLIA, DF: ANVISA, 2010. V. 1.
28. ISSA, M. G. **Avaliação do impacto de diferentes variáveis no ensaio de dissolução intrínseca de metronidazol**. 78p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
29. CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**. 3nd ed. New Jersey: Prentice Hall, 2001. 678.
30. PECHARSKY, V. K.; ZAVALIJ, P. Y. **Fundamentals of Powder Diffraction and Structural Characterization of Materials**. 2nd ed. New York, USA: Springer, 2009. 751 p.

31. WILL, G. **The Rietveld Method and the Two Stage Method to Determine and Refine Crystal Structures from Powder Diffraction Data.** New York: Springer, 2006. 232 p.
32. JENKINS, R.; SNYDER, R. L. **Introduction to x-ray powder diffractometry.** New York: John Wiley & Sons, v. 138, 1996, 403 p.
33. ALEXANDER, L. The Synthesis of X-Ray Spectrometer Line Profiles with Application to Crystallite Size Measurements. **Journal of Applied Physics**, v. 25, n. 2, p. 155-161, 1954.
34. CHEARY, R. W.; COELHO, A. A.; CLINE, J. P. Fundamental Parameters Line Profile Fitting in Laboratory Diffractometers. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 109, p. 1-25, 2004.
35. YOUNG, R. A. **The Rietveld Method.** New York: International Union of Crystallography, monographs on crystallography - OXFORD University Press, 1993, 298 p.
36. TOBY, B. H. R factors in Rietveld analysis: How good is good enough? **Powder Diffraction**, v. 21, n. 1, p. 67-70, 2006.
37. DURBIN, J.; WATSON, G. S. . Testing for serial correlation in least squares regression. **Biometrika**, v. 37. p. 409-428, 1950.
38. OLIVEIRA, T. F. **Análise das incertezas da quantificação de fase pelo método de Rietveld em análise de pó por difração de raios X.** 161p. Tese (doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Industrial, Rio de Janeiro, RJ. 2005.
39. HILL, R. J.; HOWARD, C. J. Quantitative Phase Analysis from Neutron Powder Diffraction Data Using the Rietveld Method. **Journal of Applied Crystallography**, v 20. p. 467-474. 1987.
40. BRINDLEY, G. W. The effect of grain or particle size on X-ray reflections from mixed powders and alloys considered in relation to the quantitative determination of crystalline substances by X-ray methods. **Philosophical Magazine**, v. 36, p. 347-369, 1945.
41. TAYLOR, J. C.; MATULIS, C. E. Absorption contrast effects in the quantitative XRD analysis of powders by full multiphase profile refinement. **Journal of Applied Crystallography**. v. 24, p. 14-17, 1991.
42. ANTONIO, S. G. **Aplicação da difração de raios X por policristais e do método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos,** 2010. 161p. Doutor. Unesp - Araraquara, São Paulo, Brasil.
43. COELHO, A. . **Topas Academic.** Version 4.1. Brisbane, 2007. Computer Software.
44. BALZAR, D.; LEDBETTER, H. Voigt-Function Modeling in Fourier-Analysis of Size-Broadened and Strain-Broadened X-Ray-Diffraction Peaks. **Journal of Applied Crystallography**. v. 26. p. 97-103, 1993.
45. JÄRVINEN, M. Application of symmetrized harmonics expansion to correction of the preferred orientation effect. **Journal of Applied Crystallography**, v.26, p. 525-531, 1993.

46. YOUNG, R. A.; SAKTHIVEL, A. Bimodal distributions of profile-broadening effects in Rietveld refinement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 21, n. 5, p. 416-425, 1988.