UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona

Gabriel Lima Barros de Araujo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona

Gabriel Lima Barros de Araujo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos

São Paulo
2009

Gabriel Lima Barros de Araujo

Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“Nem só de pão vive o homem.”

Jesus

Não reclame... faça

“A vida te coloca onde você escolheu estar...

Nasceste no lar que precisavas.

Vestiste o corpo físico que merecias.

*Moras onde melhor Deus te proporcionou, de acordo com teu
adiantamento.*

*Possuis os recursos financeiros coerentes com as tuas necessidades, nem
mais, nem menos, mas o justo para as tuas lutas terrenas.*

*Teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua
realização.*

*Teus parentes e amigos são as almas que atraístes, com tua própria
afinidade.*

Portanto, teu destino está constantemente sob teu controle.

*Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas, expulsas, modificas, tudo
aquilo que te rodeia a existência.*

*Teus pensamentos e vontade são a chave de teus atos, atitudes, são as
fontes de atração e repulsão na tua jornada vivencial.*

Não reclames nem te faças de vítima.

Antes de tudo, analisa e observa.

A mudança está em tuas mãos.

*Reprograme tua meta,
busque o bem e viverás melhor"*

(FRANCISCO CÂNDIDO XAVIER)

À minha eterna companheira Claudia,
pela alegria, amor, carinho e apoio que tornam possíveis todas as
nossas conquistas.

Às minhas mãezinhas,
Francisca Ferreira Costa, Maria das Graças Lima Barros e
Dona Ruth (in memorian)

Ao meu tio,
Jair da Costa

Aos meus sogros,
Maria Helena do Lago Takano e Edison Takano

Ao meu pai,
Hamilton José de Araujo (in memorian)

por doarem seu amor e parte da vida para me ajudar a ser feliz e
alcançar meus sonhos.

Ao meu orientador,
Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos,
pela oportunidade, amizade, dedicação e exemplo de
ser humano e educador a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Criador, suprema inteligência do universo, causa primária de todas as coisas, pela oportunidade de vida, saúde, estudo e trabalho.

À Dra Akimi Mori Honda, pela grande amizade, incentivo e por colocar a tibolona em minha vida.

À Profa. Dra. Dalva Lucia Araujo de Faria, pela sincera amizade, apoio e pelos valerosos ensinamentos.

Ao Dr. Márcio H. Zaim, pelas discussões científicas, incentivo e pela colaboração na realização deste projeto.

Ao Dr. Flávio Machado de S. Carvalho, por me introduzir no mundo da difratometria de polícristais e pela estimada colaboração no estudo da tibolona.

Ao Prof. Dr. Fabio Ramos Dias de Andrade e ao Emérito Prof. Dr. José Moacyr Vianna Coutinho, do Instituto de Geociências-USP, pelos ensinamentos e por me apresentarem aos coloridos cristais biaxiais.

Ao Prof. Dr. Carlos de Oliveira Paiva Santos e sua aluna Selma G. Antonio, por nos receber e auxiliar em Araraquara e no LNLS, pelos trabalhos em colaboração e pela amizade que criamos durante esse período.

Aos Professores Doutores, Dominique C. Hermine Fischer, Silvia Storpirtis, Humberto G. Ferraz, Regina L. Moraes Moreau, Vladi O. Consigliere, pelas valiosas contribuições e sugestões feitas durante os exames de seleção, qualificação e passagem para doutorado direto.

Aos amigos coordenadores e gerentes Ivanir, Olga, Artur, Solange, Cláudio, Gislaine, da BIOLAB, e ao Dr. Miller Nunes de Freitas, da LIBBS, pelos ensinamentos, por todo apoio e confiança e por acreditarem no valor do estudo e da atividade de pesquisa para o desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional.

Aos amigos Dr. André G. Tempone, José Eduardo, Olga, Silvia e Hélio pela amizade e apoio, pelas calorosas discussões científicas e não-científicas, pelo aprendizado proporcionado e pelo exemplo de dedicação ao trabalho e à pesquisa.

A Altivo Pitaluga Jr, Dr. Nelson F. Claro Jr e Dr. Marco A. Silva, por compartilharem sua grande experiência em diálogos muito instrutivos.

Aos meus amigos do Grupo Fraternal Francisco de Assis, em especial à mocidade e ao EVE, pela sustentação espiritual.

A Lúcio, André, Tércia, Marcelo A. Nakazone e Anielli, Fernando K., Lourdes e Francisco, pela alegria, torcida e sincera amizade.

Aos amigos Robson, Maria Ângela, Camila, Márcio, Paula, Lincoln, Gisele e à turma do FOON, pelos divertidíssimos e inesquecíveis momentos.

Ao Prof. Dr. Lauro Moretto, pela amizade e pela criação do seminário solidário, fruto deste trabalho.

À família LATIG: Profa. Dra. Lucildes Pita, Dr. Luis Carlos Cides, Ricardo Alves, Dulce, Elder, Bete, Hitomi, Floripes e todos os outros, pela amizade e por me ajudarem em muitos momentos.

Ao Prof. Dr. Cristoforo Scavone, pela inestimável ajuda no início da carreira científica e por me receber como aluno em seu laboratório.

Aos laboratórios Biolab Sanus Farmacêutica LTDA e Libbs Farmacêutica LTDA, por proporcionarem meu desenvolvimento profissional, pelo apoio a este trabalho e incentivo à pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela estrutura e oportunidade.

A todos os familiares e amigos que comemoram comigo a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	xvii
<i>Abstract</i>	xix
Lista de Figuras	xxi
Lista de Tabelas e Quadros	xxviii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xxxix
Lista de Símbolos	xxxiii
 Capítulo I – Introdução e objetivos	 35
1.1. Introdução	36
1.2. Objetivos	37
1.2.1. Objetivos gerais	37
1.2.2. Objetivos específicos	37
1.3. Referências	38
 Capítulo II – Revisão da literatura	 39
2.1. Tibolona	40
2.2. Cristalinidade e polimorfismo	43
2.2.1. Estruturas cristalinas	43
2.2.2. Definições sobre o polimorfismo	45
2.2.3. Nomenclatura dos polimorfos	47
2.2.4. Propriedades cristalinas e o polimorfismo em fármacos	48
2.2.5. Polimorfismo e biodisponibilidade	49
2.2.6. Polimorfismo e estabilidade química	51
2.2.7. Polimorfismo e hábito cristalino	52
2.3. Transições de fase	53
2.3.1. Diagramas de fase	54
2.4. Aspectos regulatórios do polimorfismo na área farmacêutica	55

2.5. Referências	57
Capítulo III – Obtenção e caracterização dos polimorfos de tibolona	62
3.1. Técnicas utilizadas no estudo do polimorfismo	63
3.1.1. Microscopia	63
3.1.2. Cristalografia óptica	65
3.1.3. Microscopia eletrônica	66
3.1.4. Difractometria de raios X	67
3.1.4.1. Cristalografia de raios X de monocristal	67
3.1.4.2. Difractometria de raios X pelo método do pó	68
3.1.5. Análise térmica	68
3.1.5.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada	69
3.1.5.2. Calorimetria exploratória diferencial	70
3.1.6. Espectroscopia vibracional: Raman e infravermelho	74
3.2. Materiais e métodos	76
3.2.1. Materiais	76
3.2.2. Métodos	76
3.2.2.1. Procedimentos de recristalização	78
3.2.2.1.1. Recristalização em acetona-água	78
3.2.2.1.2. Recristalização em hexano	78
3.2.2.1.3. Recristalização em tolueno	78
3.2.3. Técnicas de caracterização dos cristais	79
3.2.3.1. Análise elementar	79
3.2.3.2. Difractometria de raios X pelo método do pó	79
3.2.3.3. Termogravimetria/Termogravimetria derivada	79
3.2.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	80
3.2.3.5. Microscopia Raman	80
3.2.3.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	80
3.2.3.7. Microscopia óptica de luz polarizada (MOLP)	81
3.2.3.8. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)	81

3.3. Resultados e discussão	81
3.3.1. Análise elementar	81
3.3.2. Microscopia	82
3.3.3. Difractometria de raios X pelo método do pó	86
3.3.3.1. Padrões de difração das formas cristalinas puras	86
3.3.3.2. Quantificação de fases pelo método de Rietveld	86
3.3.4. Espectroscopia vibracional	91
3.3.4.1. Infravermelho	91
3.3.4.1.1. Espectros em solução de CCl ₄	91
3.3.4.1.2. Espectro de ATR	91
3.3.4.1.3. Microscopia Raman	92
3.3.5. Análise térmica	95
3.3.5.1. Termogravimetria/Termogravimetria derivada	95
3.3.5.2. Calorimetria exploratória diferencial	96
3.3.5.3. Estudos cinéticos de decomposição térmica	98
3.4. Conclusão	102
3.5. Referências	103

Capítulo IV – Estudos dos eventos térmicos do polimorfo triclinico da tibolona

tibolona	108
4.1. Introdução	109
4.1.1. Aspectos práticos do monotropismo e enantiotropismo	110
4.1.2. Estudo das transições de fase do polimorfo triclinico da tibolona	111
4.2. Materiais e métodos	112
4.2.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	112
4.2.2. Calorimetria exploratória diferencial modulada (MDSC)	112
4.2.3. Espectroscopia Raman	112
4.2.4. Avaliação visual da fusão	113
4.2.5. Difractometria de raios X a altas temperaturas	113
4.3. Resultados e Discussão	114
4.3.1. Transições térmicas do polimorfo triclinico	120

4.4. Considerações finais	122
4.5. Referências	124

Capítulo V – Estudos de interação entre os polimorfos de tibolona e excipientes

Capítulo V – Estudos de interação entre os polimorfos de tibolona e excipientes	125
5.1. Introdução	126
5.2. Materiais e métodos	128
5.2.1. Preparação das amostras	128
5.2.2. Análise das amostras	128
5.3. Resultados e discussão	129
5.3.1. Análise térmica	129
5.3.1.1. Amido de batata	129
5.3.1.2. Amido de milho	134
5.3.1.3. BHT	139
5.3.1.4. Celulose microcristalina	144
5.3.1.5. Lactose monoidratada	148
5.3.1.6. Palmitato de ascorbila	152
5.3.2. Estudo do comportamento fármaco-excipiente a partir da análise de teor de tibolona por CLAE	155
5.3.3. Estabilidade dos polimorfos puros	157
5.4. Considerações finais	160
5.5. Referências	162

Capítulo VI – Fatos e artefatos no estudo do polimorfismo

Capítulo VI – Fatos e artefatos no estudo do polimorfismo	164
6.1. Introdução	165
6.1.2. Preparo de amostra	167
6.1.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho	167
6.1.2.2. Espectroscopia Raman	167
6.1.2.3. Difractometria de raios X pelo método do pó	168
6.1.3. Influência das condições experimentais em análise térmica	171

6.1.4. Controle de cristalização: misturas e desaparecimento de polimorfos	173
6.2. Materiais e métodos	174
6.2.1. Difratometria de raios X de alta resolução	174
6.2.2. Análise de distribuição de tamanho de partícula por difração a <i>laser</i>	174
6.3. Resultados e discussão	175
6.3.1. Preparo de amostra	175
6.3.1.1. Espectro no infravermelho em pastilhas de KBr	175
6.3.1.2. Redução do tamanho de partícula da amostra	176
6.3.1.2.1. Influência da micronização na estabilidade	177
6.3.1.2.2. Influência do tamanho de partícula na difratometria de raios X	178
6.3.2 Condições experimentais	180
6.3.2.1. Influência da atmosfera do ensaio termogravimétrico	180
6.3.2.2. Influência da razão de aquecimento	180
6.3.3. Mistura de polimorfos	181
6.4. Considerações finais	182
6.5. Referências	184
Capítulo VII – Considerações finais	186
7.1. Considerações finais	187
Capítulo VIII – Perspectivas	189
8.1. Perspectivas	190
APÊNDICE	191
APÊNDICE A - Verificação da seletividade, da linearidade e da precisão do método cromatográfico descrito na farmacopeia europeia	192
REFERÊNCIAS DO APÊNDICE A	194

ANEXOS OBRIGATÓRIOS	195
ANEXO A - Informações para Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	196
ANEXO B - Currículo Lattes	197
ANEXO C - Ficha do aluno emitida pelo Fenixweb	200

ARAUJO, G.L.B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos de tibolona**. 2009. 202f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RESUMO

Tibolona é um esteróide sintético muito utilizado na terapia de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa, o qual possui a propriedade de se cristalizar em dois grupos espaciais (polimorfismo), dependendo do solvente de cristalização. O objetivo desse trabalho foi obter as diferentes modificações polimórficas desse esteróide sintético e caracterizá-las pelas típicas técnicas sensíveis à estrutura, tais quais TG, DSC, difratometria de raios X pelo método do pó, microscopia Raman, espectroscopia FTIR, microscopia óptica com luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados confirmam que duas formas polimórficas puras da tibolona foram cristalizadas: forma I, monoclinica, obtida pela recristalização em acetona e água, e forma II, triclinica, recristalizada em tolueno ou hexano. Foram detectadas diferenças substanciais comparando-se os polimorfos no que se refere às suas propriedades de estado sólido. As análises microscópicas permitiram a perfeita distinção entre os polimorfos, pois ambos apresentam birrefringência, mas possuem morfologia e propriedades ópticas distintas. Os resultados da espectroscopia vibracional confirmam a existência de diferenças conformacionais. A difratometria de raios X pelo método do pó, aliada ao refinamento pelo método de Rietveld, mostrou-se uma técnica adequada para análise quantitativa de misturas dos polimorfos de tibolona. Os estudos de termogravimetria mostraram que os cristais monoclinicos apresentam maior estabilidade térmica que os triclinicos. Pela calorimetria exploratória diferencial foi possível caracterizar a menor estabilidade térmica dos cristais triclinicos, com a presença de três eventos endotérmicos nesses cristais, na faixa de 144 a 170 °C. Análises por microscopia Raman, difratometria de raios X em altas temperaturas e DSC no modo modulado, mostraram que não há evidências de transições polimórficas relacionadas a esses três eventos térmicos, mas de alterações na estrutura química da tibolona. Estudos dinâmicos e isotérmicos de interação tibolona e excipientes por TG, DSC e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicaram maior suscetibilidade

à degradação da forma triclinica que da forma monoclinica. Foi observado que a ação do excipiente palmitato de ascorbila sobre a estabilidade da tibolona depende da forma polimórfica utilizada. O estudo também mostrou que a compactação reduz a estabilidade química de ambas as formas cristalinas da tibolona. Fatores como preparo de amostra, condições experimentais e ocorrência de misturas de fases, os quais foram capazes de introduzir artefatos nos resultados de estudos de sistemas polimórficos, foram revisados e caracterizados.

Palavras-chave: Polimorfismo. Tibolona. Caracterização no estado sólido.

ARAUJO, G.L.B. **Solid state characterization of tibolone polymorphs.** 2009. 202f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ABSTRACT

Tibolone is a synthetic steroid widely used in hormone replacement therapy in postmenopausal women presenting the property of crystallizing in two space groups (polymorphism), depending on the solvent used in the crystallization procedure. The aim of this work was to obtain different polymorphic modifications of the synthetic steroid tibolone and to characterize them by means of typical structure-sensitive analytical techniques, such as Thermogravimetry (TG), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray powder diffractometry (XRPD), Raman microscopy, FTIR spectroscopy, Polarized Light Microscopy and Scanning Electron Microscopy (SEM). The results confirm that two pure polymorphic forms for tibolone were crystallized: Form I, monoclinic, obtained by recrystallisation from acetone and water and Form II, triclinic, recrystallised from toluene or hexane. Substantial differences were detected comparing the polymorphs with regard to their solid-state properties. Microscopic analysis enabled the perfect distinction between polymorphs, since both present birefringence, but have different morphology and optical properties. Results from vibrational spectroscopy, confirmed the existence of conformational differences. X-ray powder diffractometry allied to the refinement by Rietveld method has shown to be an appropriate technique for quantitative analysis of tibolone polymorphs mixtures. Studies of thermogravimetric analysis showed that the monoclinic form present greater thermal stability than the triclinic one. By differential scanning calorimetry it was possible to characterize the lower thermal stability of the triclinic crystalline form, with the presence of three endothermic events in these crystals ranging from 144 to 170°C. Raman microscopy, high temperature X-ray diffractometry and modulated DSC analysis showed no evidence of polymorphic transitions related these three thermal events, but changes in chemical structure of tibolone instead. Also, tibolone-excipients dynamic and isothermal

interaction studies by TG, DSC and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) indicated that the triclinic tibolone form presents a greater susceptibility to chemical degradation than the monoclinic form. The excipient ascorbil palmitate was shown to affect the tibolone stability differently depending on the polymorphic form used. This study also showed that compactation decreases the chemical stability of both crystalline forms of tibolone. Factors such as sample preparation, experimental conditions and the occurrence of phase mixtures, which were able to introduce artifacts in the results of studies of polymorphic systems, were reviewed and characterized.

Keywords: Polymorphism. Tibolone. Solid state characterization.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – Revisão da literatura

Figura 2.1. Fórmula estrutural da tibolona (BORRIGTER et al., 2002a)	39
Figura 2.2. Sistemas cristalinos dos polimorfos de tibolona: a) monoclinico; b) triclinico. Estruturas geradas por meio do programa Diamond versão 3.1a	44
Figura 2.3. Esquema da estrutura cristalina de um composto químico (HALEBLIAN, MCCRONE, 1975; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001) -	46
Figura 2.4. Exemplo de diagrama Energia/Temperatura com transições entre as diferentes fases de um mesmo composto (G_I , G_{II} e $G_{líquido}$ Energia livre de Gibbs das fases sólidas I e II e da fase líquida, respectivamente) (adaptado de MAO; PINAL; MORRIS, 2005)	54
Figura 2.5. Árvore de decisões para o estabelecimento de especificações para polimorfos (adaptado de FDA, 2007)	56

CAPÍTULO III – Obtenção e caracterização dos polimorfos de tibolona

Figura 3.1. Fotomicrografia eletrônica do crescimento da forma estável (forma I) sobre a forma metaestável (II) (STOICA et al., 2006).	66
Figura 3.2. Curvas DSC hipotéticas com a indicação de seis eventos térmicos, ampliação da faixa de temperatura do evento (2) e a terminologia empregada (ARAUJO; MERCURI; MATOS, 2009)	71
Figura 3.3. Curvas DSC para sistemas monotrópicos formado pelas formas cristalinas A e B (adaptado de GIRON, 1995)	73
Figura 3.4. Curvas DSC para sistemas enantiotrópicos formados pelas formas cristalinas A e B (adaptado de GIRON, 1995)	73
Figura 3.5. Fluxograma de trabalho para o estudo do polimorfismo da tibolona	77
Figura 3.6. Fotomicrografias ópticas dos cristais obtidos em hexano: A) luz transmitida, nicóis cruzados, aumento de 10 vezes; B) luz transmitida, nicóis descruzados, aumento de 10 vezes. C) Fotomicrografia de MEV dos	

cristais obtidos em hexano, aumento de 700 vezes	83
Figura 3.7. Fotomicrografias ópticas dos cristais de tibolona (50X): luz transmitida, nicóis descruzados, (A) obtidos em acetona, (D) obtidos em tolueno; luz transmitida, nicóis cruzados, (B) obtidos em acetona, (F) obtidos em tolueno; Fotomicrografia de MEV dos cristais de tibolona: obtidos em acetona (C), aumento de 1.000 vezes; obtidos em tolueno (F), aumento de 700 vezes	83
Figura 3.8. Esquema da orientação do cristal triclinico de tibolona (Contribuição do Professor Emérito José Moacyr Vianna Coutinho do IGC-USP)	84
Figura 3.9. Hábitos cristalinos obtidos por Stoica et al. (STOICA et al., 2005a, 2006)	84
Figura 3.10. Comparação entre os resultados experimentais (OBS) e calculados a partir das informações das estruturas (CALC) das formas cristalinas da tibolona: (A) monoclinico (padrão calculado) <i>versus</i> amostra obtida em acetona (ACE); (B) triclinico (padrão calculado) <i>versus</i> amostra obtida em tolueno (TOLU); (C) sobreposição dos difratogramas experimentais com a identificação dos picos característicos para cada sistema cristalino (M – monoclinico ; T – triclinico), conforme identificado nos difratogramas calculados	87
Figura 3.11. Gráficos de Rietveld das amostras obtidas em acetona (ACE) e tolueno (TOLU). Ambas as amostras apresentam pureza de fase 100%. Refinamentos realizados com o programa TOPAS Academic v4.1 (Coelho, 2007)	90
Figura 3.12. Espectros de FTIR (não normalizados) das amostras TOLU e ACE em solução de CCl ₄	93
Figura 3.13. Espectros de ATR (não normalizados) entre as formas triclinica (TOLU) e monoclinica (ACE) da tibolona na região de 3200 a 3500 cm ⁻¹	93
Figura 3.14. Espectros Raman entre as formas triclinica (TOLU) e monoclinica (ACE) da tibolona na região de 1600 a 1800 cm ⁻¹	94

Figura 3.15. Esquema das duas conformações possíveis meia-cadeira do anel A da tibolona (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELEN, 1984)	94
Figura 3.16. Curvas TG/DTG das formas monoclinica (ACE) e triclinica (TOLU) de tibolona em atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹), razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ , massa de ~ 5 mg em cadinho de platina	95
Figura 3.17. Curvas DSC e TG dos polimorfos monoclinico (linha azul) e triclinico (linha vermelha) da tibolona em atmosfera dinâmica de N ₂ (100 mL.min ⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹	97
Figura 3.18. Estudo cinético de decomposição do cristal monoclinico da tibolona (forma I - amostra ACE): a) Curvas TG da forma monoclinica em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹), razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 7,5;15 °C e 20°C.min ⁻¹ , massa de ~ 5 mg e cadinho de platina; b) Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura; c) Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura para a forma monoclinica	100
Figura 3.19. Estudo cinético de decomposição do cristal triclinico da tibolona (forma II - amostra TOLU): a) Curvas TG do TOLU em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min ⁻¹), razões de aquecimento de 2,5 – 5 – 7,5 –15 °C e 20°C.min ⁻¹ , massa de ~ 5 mg e cadinho de platina; b) Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura; c) Gráfico da função G(x) do inverso da temperatura para o cristal triclinico	101

CAPÍTULO IV – Estudos dos eventos térmicos do polimorfo triclinico da tibolona

Figura 4.1. Diagrama de fase: energia livre de Gibbs (G) <i>versus</i> temperatura (T) para sistemas monotrópicos (a) e enantiotrópicos (b) (MAO; PINAL; MORRIS, 2005)	109
Figura 4.2. Difratomogramas de raios X do polimorfo triclinico da tibolona obtidos em diferentes temperaturas. As temperaturas de medida foram: 25 °C antes do aquecimento (difratograma inferior), 135, 150, 158,	

170 e 25°C após resfriamento da amostra (difratograma superior). As setas indicam as distâncias interplanares em angstroms (Å)	115
Figura 4.3. Transições de fase da forma triclínica (TOLU). A) Curva DSC da forma triclínica, $\beta = 2^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, atmosfera dinâmica de N_2 , $m_{\text{amostra}} \sim 2 \text{ mg}$ em cápsula de Al; I, II e III: patamares de temperaturas, após a ocorrência das transições de fase, em que houve a retirada de amostra para registro do espectro Raman. B) Espectros Raman das amostras I, II, III, monoclinica ACE (M) e triclínica TOLU (T), excitados em 1064 nm	116
Figura 4.4. Comparação entre os espectros Raman da amostra coletada a 150°C (linha azul) e a amostra triclínica inicial (linha vermelha)	118
Figura 4.5. Curva DSC do polimorfo triclínico obtida no modo modulado	119
Figura 4.6. Esquema da hipótese de rearranjo interno do anel A da tibolona para formação do grupamento enol	121

CAPÍTULO V – Estudos de interação entre os polimorfos de tibolona e excipientes

Figura 5.1. Curvas TG/DTG do amido de batata, cristal monoclinico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o amido de batata, sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$)	131
Figura 5.2. Curvas DSC do amido de batata, cristal monoclinico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura 1:1 do polimorfo com o amido de batata, sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$)	132
Figura 5.3. Curvas TG/DTG do amido de milho, cristal triclínico de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o amido de milho, sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$)	136
Figura 5.4. Curvas DSC do amido de milho, cristal monoclinico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o amido de milho, sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$)	137
Figura 5.5. Curvas TG/DTG do BHT, cristal monoclinico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do BHT com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$)	142

Figura 5.6. Curvas DSC do BHT, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o BHT, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹)	143
Figura 5.7. Sobreposição das curvas DSC do polimorfo triclínico puro e da mistura binária do BHT/polimorfo triclínico	144
Figura 5.8. Curvas TG/DTG da celulose microcristalina, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 da celulose com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min)	146
Figura 5.9. Curvas DSC do celulose microcristalina, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura 1:1 do polimorfo com a celulose microcristalina, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹)	147
Figura 5.10. Curvas TG/DTG da lactose monoidratada, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 da lactose monoidratada com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹).....	150
Figura 5.11. Curvas DSC da lactose monoidratada, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com a lactose monoidratada, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹)	151
Figura 5.12. Curvas TG/DTG do palmitato de ascorbila, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 palmitato de ascorbila com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹)	152
Figura 5.13. Curvas DSC do palmitato de ascorbila, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o palmitato de ascorbila, sob atmosfera dinâmica de N ₂ (50 mL.min ⁻¹)	153
Figura 5.14. Gráfico comparativo da queda de teor dos polimorfos da tibolona, na forma de pastilha ou em pó (sem sofrer pressão), após armazenamento em câmara climática, em relação à amostra mantida em geladeira	155
Figura 5.15. Gráfico comparativo da queda de teor dos polimorfos da tibolona em misturas com excipientes na forma de pastilha, após armazenamento em câmara climática, em relação à amostra mantida em geladeira	156

Figura 5.16. Efeito da armazenagem em geladeira nas curvas DSC do polimorfo triclinico da tibolona	158
Figura 5.17. Influência das condições de estresse e pressão nas curvas DSC dos polimorfos da tibolona: A) Monoclinico; B) Triclinico	159
Figura 5.18. A) Curvas DSC das amostras de tibolona submetidas às condições de estresse e níveis diferentes de pressão. B) Gráfico dos resultados de teor por DSC <i>versus</i> a influência da pressão (0 psi, 200 psi e 500 psi) e as condições de armazenagem (GEL — geladeira; EST — câmara climática) (ARAUJO et al., 2007)	159

CAPÍTULO VI – Fatos e artefatos no estudo do polimorfismo

Figura 6.1. Esquema com pontos principais a serem considerados nas etapas de cristalização, preparação e caracterização da amostra no estado sólido e as possíveis consequências no estudo de sistemas polimórficos	169
Figura 6.2. Representação da orientação dos cristalitos: a) orientação preferencial b) orientação aleatória	169
Figura 6.3. Influência do hábito cristalino e orientação preferencial nos dados experimentais de DRXP do polimorfo triclinico da tibolona. Os difratogramas foram gerados por meio de simulação no programa TOPAS v.1. (OP = orientação preferencial)	169
Figura 6.4. Influência da orientação preferencial nos dados experimentais de DRXP do polimorfo III do sulfatiazol. (A) Padrão calculado a partir dos dados de monocristal. (B) Difratograma observado. (adaptado de BERNSTEIN, 2002)	170
Figura 6.5. Influência de β nas curvas DSC no estudo de polimorfos (BERNSTEIN, 2002)	172
Figura 6.6. Influência de β e atmosfera nas curvas TG/DTG: (A) Curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}) de uma amostra de lactose com β de 5 e $20^\circ\text{C min}^{-1}$. (B) Curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de ar e de CO_2 de uma amostra de $CaCO_3$ e com	

razão de aquecimento $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$	172
Figura 6.7. Espectros FTIR em pastilhas KBr (não normalizados) dos cristais recristalizados em tolueno	178
Figura 6.8. Espectros Raman das amostras obtidas em tolueno (A) e n-hexano (B), antes da redução de tamanho de partícula (linha preta) e após a micronização (linha vermelha)	177
Figura 6.9. Comparação entre os padrões de difração antes (I e III) e após (II e IV) a micronização: I e II amostra HEX; III e IV amostra TOLU	178
Figura 6.10. Comparação entre difratogramas da amostra HEX não micronizada obtidos por fonte de luz síncrotron e difratometria convencional.	179
Figura 6.11. Curvas TG/DTG das formas monoclinica e triclinica de tibolona em atmosfera dinâmica de ar ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), $\beta = 10^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, massa de $\sim 5 \text{ mg}$ em cadinho de platina	180
Figura 6.12. Gráfico de Rietveld do resultado final do refinamento da amostra HEX. Os pontos são os dados calculados, a linha contínua azul representa os dados observados e a linha contínua inferior (em preto) é a diferença entre o padrão calculado e observado	181
 APÊNDICE A – Verificação da seletividade, linearidade e da precisão do método cromatográfico descrito na farmacopeia européia	
Figura 8.1. Curva de linearidade obtida na faixa de concentração de 0,05 a 5 mg mL^{-1} para solução padrão de tibolona	193
Figura 8.2. Cromatograma da solução padrão de tibolona na concentração de $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$	193
Figura 8.3. Cromatograma de amostra de mistura binária 1:1 polimorfo triclinico e amido de batata.	193

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO III – Obtenção e caracterização dos polimorfos de tibolona

Tabela 3.1 - Técnicas utilizadas no estudo do polimorfismo e seus principais aspectos (adaptado de GIRON, 2003)	64
Tabela 3.2 - Tipos de microscópio e tamanho de partícula (WELLS, 1988) ...	65
Tabela 3.3 - Parâmetros cristalográficos das duas formas cristalinas da tibolona (BOERRIGTER et al., 2002).....	67
Tabela 3.4 - Resultados de análise elementar dos cristais de tibolona obtidos em acetona, tolueno e n-hexano comparados ao descrito no Merck Index (MERCK index, 1989)	81
Tabela 3.5 - Dados de caracterização por microscopia óptica das amostras de tibolona	85
Quadro 3.1 - Dados de difração de raios X pelo método do pó das formas cristalinas de tibolona	89
Tabela 3.6 - Indicadores de qualidade do refinamento obtido na quantificação das fases monoclinica e triclínica das amostras obtidas em acetona (ACE) e tolueno (TOLU)	89
Tabela 3.7 - Diferenças nos espectros entre as formas triclínica (TOLU) e monoclinica (ACE) da tibolona na região de 3200 a 3500 cm ⁻¹	91
Tabela 3.8 - Dados de termogravimetria dos polimorfos de tibolona em atmosfera dinâmica de N ₂	96
Tabela 3.9 - Determinação dos parâmetros cinéticos da primeira etapa de decomposição térmica dos polimorfos da tibolona	99

CAPÍTULO IV – Estudos dos eventos térmicos do polimorfo triclínico da tibolona

Tabela 4.1 - Dados das transições térmicas dos polimorfos de tibolona em atmosfera dinâmica de nitrogênio (n = 2)	114
--	------------

Tabela 4.2 - Posições dos máximos das bandas Raman na região de interesse entre 1600 cm ⁻¹ a 1800 cm ⁻¹	117
--	------------

CAPÍTULO V – Estudos de interação entre os polimorfos de tibolona e excipientes

Tabela 5.1 - Temperatura de pico e valores de entalpia de fusão do polimorfo monoclinico em mistura binária com amido de batata, obtidos por DSC	133
Tabela 5.2 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com amido de batata	134
Tabela 5.3 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com amido de milho ...	138
Tabela 5.4 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com amido de milho	139
Tabela 5.5 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com BHT	141
Tabela 5.6 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com BHT	141
Tabela 5.7 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com celulose microcristalina	145
Tabela 5.8 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com celulose microcristalina	145
Tabela 5.9 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com lactose monoidratada	149
Tabela 5.10 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com lactose monoidratada	149

CAPÍTULO VI – Fatos e artefatos no estudo do polimorfismo

Tabela 6.1 - Resultados estatísticos ¹ da distribuição de tamanho de partículas dos cristais de tibolona	177
Tabela 6.2 - Indicadores de qualidade do refinamento	182

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
ACE	Cristal de tibolona obtido pela recristalização em acetona-água (forma I, monoclinico)
ATR	Reflexão Total Atenuada
BHT	Butilidroxitolueno
Calc	Calculado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cmax	Concentração plasmática máxima
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
DRIFT	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
Ea	Energia de Ativação
Exp	Experimental
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HEX	Cristal de tibolona obtido pela recristalização em n-hexano (Mistura de Polimorfos)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
IGC-USP	Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo

IR	Infravermelho
ISU	Isotermas de Sorção de Umidade
LATIG	Laboratório de Análise Térmica “Prof. Ivo Giolito”
LEM	Laboratório de Espectroscopia Molecular
MOLP	Microscopia Óptica de Luz Polarizada
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NV	<i>Naamloze Vennootschap</i> (equivalente à Sociedade Anônima – S.A)
OBS	Observado
p.f.	Ponto de fusão
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
TG	Termogravimetria
Tmax	Tempo necessário para atingir Cmax
TOLU	Cristal de tibolona obtido pela recristalização em tolueno (forma II, triclínico)
u.a.	Unidades arbitrárias
XRPD	Difração de raio X pelo método do pó

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Razão de aquecimento
C	Carbono (elemento químico)
^{13}C	Isótopo do carbono
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Al	Alumínio (elemento químico)
ΔH_{fus}	Entalpia de fusão
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
Δm	Variação de massa
H	Hidrogênio (elemento químico)
H_2	Gás hidrogênio
HCl	Cloreto de hidrogênio (ácido clorídrico, quando em soluções aquosas)
KBr	Brometo de potássio
KCl	Cloreto de potássio
kJ	Quilojoules
K	Kelvin
ln	Logaritmo neperiano
λ	Comprimento de onda

m	Massa
mW	Miliwatt
mL	Mililitros
mg	Miligramas
N	Nitrogênio (elemento químico)
N ₂	Gás nitrogênio
O	Oxigênio (elemento químico)
Pt	Platina (elemento químico)
t	Tempo
T	Temperatura
T _{pico}	Temperatura de pico
T _g	Transição vítrea

CAPÍTULO I

Introdução e objetivos

Neste capítulo são introduzidas a importância e a motivação que norteiam o desenvolvimento do presente trabalho. Apresenta-se, assim, o estudo do fenômeno do polimorfismo para o agente de reposição hormonal chamado tibolona.

"A busca de Deus é a busca da alegria. O encontro com Deus é a própria alegria."

(Santo Agostinho)

1.1. INTRODUÇÃO

A tibolona é um esteróide sintético relacionado estruturalmente aos derivados da 19-noretisterona, tais quais noretinodrel e noretisterona. No Brasil e no mundo é comercializada na forma de comprimidos sob a marca Livial® (fabricante Schering-Plough – divisão Organon) com a indicação terapêutica de alívio dos sintomas hipo-estrogênicos e como proteção à perda óssea em mulheres pós-menopausa (RYMER, 2002).

Esse esteróide apresenta a propriedade de se cristalizar em dois sistemas cristalinos distintos, monoclinico e triclinico; isto é, apresenta o fenômeno do polimorfismo (SCHOUTEN; KANTERS, 1991).

A forma monoclinica é obtida preferencialmente em solventes polares e a triclinica em solventes apolares; entretanto, é possível encontrar condições experimentais nas quais ocorre a cristalização de ambos os polimorfos concomitantemente no mesmo solvente (BOERRIGTER et al., 2002).

A estrutura triclinica, conhecida como forma II, é a forma metaestável. Já a chamada forma I, de estrutura monoclinica, é termodinamicamente estável e preferencialmente utilizada nas formulações, por aumentar significativamente o prazo de validade do medicamento (SAS, 1993).

Apesar de diversos trabalhos já publicados sobre a tibolona envolvendo os aspectos da transição sólido-sólido, até o presente momento não foram localizados trabalhos sistematizados de caracterização no estado sólido e de pré-formulação. Como exemplo, não há publicações com trabalhos de caracterização termogravimétrica dos polimorfos de tibolona. Estudos dedicados à caracterização das transições de fase no estado sólido e tabelas contendo os dados de difratometria de raios X pelo método do pó, que permitam diferenciar claramente as formas cristalinas, também não foram ainda elaborados.

A presente tese aborda inicialmente os aspectos teóricos do fenômeno do polimorfismo em fármacos, as técnicas de caracterização e a revisão da literatura científica relevante sobre o tema. Na revisão é descrita a importância do fenômeno para a atualidade. São mencionados exemplos de fármacos já caracterizados, bem como a contextualização do estado da arte em relação à tibolona.

Em seguida, é apresentada a parte experimental do trabalho, envolvendo os procedimentos de cristalização das amostras, as metodologias de caracterização, os resultados de caracterização e as reflexões sobre os mesmos. Em especial, ênfase foi

dada ao estudo termoanalítico, em função das poucas informações disponíveis na literatura e da grande aplicabilidade das técnicas para o estudo de polimorfos.

Em vista dos difusos dados da literatura científica sobre o tema e da importância do fenômeno para a qualidade de medicamentos que contêm tibolona, faz-se necessário um estudo de caracterização sistematizado que reúna, aprofunde e complemente as descobertas já existentes.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização no estado sólido dos polimorfos da tibolona. A partir de conhecimentos já relatados, buscou-se ampliá-los em aspectos como a caracterização por análise térmica, a quantificação de fases e a utilização das diferentes técnicas já consagradas para o estudo do fenômeno do polimorfismo em fármacos.

1.2.2. Objetivos específicos

Constituem-se objetivos específicos deste trabalho:

- Obtenção de formas cristalinas puras de tibolona.
- Caracterização das formas cristalinas por difração de raios X pelo método do pó.
- Quantificação de fases pelo Método de Rietveld.
- Caracterização das formas cristalinas empregando-se microscopia óptica com luz polarizada, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia vibracional (IR / Raman).
- Estudo termoanalítico (TG/DSC) das formas cristalinas puras e na presença de excipientes.
- Estudo cinético da decomposição térmica de cada forma cristalina.
- Estudo das transições polimórficas.

1.3. REFERÊNCIAS

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M. In Situ Observation of epitaxial polymorphic nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, n.18, p.4725-4731, 2002.

RYMER, J. Why tibolone is different? **Reviews in Gynaecological Practice**, v.2, n.1/2, p.165 -170, 2002.

SAS, G. A. J. M. T. **Pharmaceutical composition which contains a pharmaceutically suitable carrier and the compound having the structure (7 α , 17 α)-17-hydroxy-7-methyl-19-nor-17-pregn-5(10)-en-20-yn-3-one**. EP Pat. 0389035, 12 Mar. 1993, 15 Dez. 1993. 13p.

SCHOUTEN, A.; KANTERS, J. A. Structure of the triclinic modification of 17 β -hydroxy-19-nor-7 α -methyl-17 α -pregn-5(10)-en-20-in-3-one (Org OD 14). **Acta Crystallographica Section C**, v.47, n.8, p.1754-1756, 1991.

CAPÍTULO II

Revisão da literatura

Este capítulo é dedicado à revisão da literatura sobre o polimorfismo e à contextualização do estado da arte em relação à tibolona.

“Se eu fui capaz de ver mais longe é porque estava de pé sobre os ombros de gigantes.”

(Sir Isaac Newton)

2.1. TIBOLONA

A tibolona, algumas vezes codificada na literatura por Org OD14 ou 7 α MNa ou ainda na forma oficial (7 α ,17 α)-17-hidroxi-7-metil-19-nor-17-pregn-5(10)-en-20-in-3-ona, é um esteróide sintético relacionado estruturalmente com os derivados da 19 - norestisterona, tais quais noretinodrel e noretisterona (Figura 2.1) (BOERRIGTER et al., 2002). Esse fármaco é utilizado no tratamento dos distúrbios da menopausa natural ou cirúrgica resultantes da deficiência estrogênica, tais como: sudorese excessiva, osteoporose, distúrbios do humor, atrofia e secura vaginal. Após administração oral é rapidamente metabolizada predominantemente em três tipos de esteróides ativos, 3- α -hidroxi-metabólito, 3- β -hidroxi-metabólito e isômero Δ^4 , dos quais os dois primeiros têm atividade essencialmente estrogênica, enquanto o terceiro possui

predominantemente atividade progestogênica. Os metabólitos são excretados na bile e eliminados pelas fezes. Pequenas quantidades são excretadas na urina (RYMER, 2002).

O uso da tibolona na terapêutica apresenta vantagens sobre as outras terapias convencionais, porque, além de melhorar os sintomas vasomotores e possuir efeitos favoráveis sobre as queixas de atrofia vaginal e a diminuição da libido, proporciona menor estimulação do tecido mamário e não estimula o endométrio (RYMER, 2002). No Brasil a tibolona é comercializada na forma de comprimidos sob a marca Livial® (Organon do Brasil Ltda).

A síntese da tibolona foi patenteada em 1965 pela empresa holandesa NV Organon, com melhorias do processo de obtenção patenteadas em 1967 e 1969 (MERCK index, 1989). A rota de síntese foi publicada sucintamente em 1967 (WIELAND; ANNER, 1967). Em um trabalho publicado em 1984, Declercq e colaboradores determinaram a estrutura cristalina do cristal monoclínico da tibolona, sem mencionar o polimorfismo deste fármaco (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELEN, 1984). Em 1991, Shouten e Kanters identificaram a capacidade da tibolona de apresentar o fenômeno de polimorfismo. Nesse estudo foi realizada a determinação da estrutura cristalina triclinica em monocristal, com a descoberta de que a cristalização da tibolona realizada pela solubilização em acetona e posterior adição de água resulta em cristais com sistema cristalino monoclínico (grupo

espacial P21), enquanto que cristais do sistema cristalino triclinico (grupo espacial P1) são obtidos a partir do resfriamento de uma solução de tolueno quente (SCHOUTEN; KANTERS, 1991).

Apesar de todo conhecimento prévio, o processo de fabricação dos polimorfos puros da tibolona, forma I (monoclínico) e forma II (triclinico), somente foi patenteado na década de 1990. Segundo a patente, entende-se que uma forma cristalina pura de tibolona deva conter menos de 10%, ou preferencialmente 5%, da outra forma cristalina. O documento também descreve que a utilização da forma I é preferível em função de possuir maior estabilidade química que a forma II, o que aumenta significativamente o prazo de validade do produto acabado (SAS, 1993).

A maior parte do esforço para entendimento do comportamento polimórfico da tibolona em termos termodinâmicos e cinéticos foi despendida por pesquisadores de centros holandeses de pesquisa (BOERRIGTER et al., 1999, 2002a, 2002b; STOICA et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006). Identificou-se que a fase triclinica pode ser obtida pelo crescimento dos cristais em solventes apolares, como n-hexano e tolueno, enquanto que a fase monoclinica cresce em meios polares como, por exemplo, acetronitrila e acetona. Percebeu-se que diferenças na supersaturação são decisivas quanto à forma cristalina da tibolona que será cristalizada, podendo, inclusive, haver o crescimento de ambas as formas a partir do mesmo solvente e na mesma temperatura ou, em outras palavras: ocorre o fenômeno da cristalização concomitante. Desse modo, uma vez que em escala industrial o grau de supersaturação e a temperatura não são facilmente controlados, como em escala laboratorial, há a possibilidade da ocorrência de misturas dos polimorfos na obtenção da matéria-prima (BOERRIGTER et al., 2002a).

Os dados de caracterização por difratometria de raios X pelo método do pó, de ressonância magnética nuclear (NMR) em estado sólido e de quantificação dos polimorfos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância difusa (DRIFT) são apresentados na patente EP0389035 de maneira superficial e sem rigor científico. Entretanto, Boerrigter e colaboradores (1999, 2002a, 2002b), por meio de diversos trabalhos científicos publicados em revistas indexadas, apresentam dados completos das transições de fase sólido-sólido, da interação soluto-solvente e do empacotamento na formação do cristal. Nesses estudos os cristais de tibolona são caracterizados *in situ*, durante a sua formação em solventes polares e apolares, por microscopia Raman, difratometria de raios X pelo método do pó e microscopia com luz polarizada. Também é apresentada uma sucinta descrição (sem a

apresentação de curvas experimentais) do comportamento térmico das duas formas cristalinas e da transição sólido-sólido. Não foram localizados estudos detalhados de caracterização no estado sólido por análise térmica (incluindo as transições sólido-sólido), difratometria de raios X pelo método do pó e espectroscopia vibracional. Não foram encontrados, também, estudos de metodologias para a quantificação das fases de tibolona por essas técnicas.

Em 2005, um trabalho por ressonância magnética nuclear ^{13}C no estado sólido foi publicado e mostrou que não ocorrem transições de fase durante o processo de fabricação ou no decorrer dos estudos de estabilidade de formulações de comprimidos de tibolona (BOOY et al., 2005). Essa técnica de estudo é altamente sensível, porém requer altos recursos técnicos e financeiros na maioria das vezes não disponíveis em laboratórios de rotina ou mesmo de pesquisa.

Embora seja um fármaco conhecido há mais de 40 anos, apenas recentemente foi incluído em um compêndio farmacopeico, o suplemento 2007 da Farmacopeia Europeia 2006 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2006). Nessa monografia, sugere-se, como procedimento de identificação, a comparação entre o espectro de absorção no infravermelho da amostra e do padrão comercializado pela farmacopeia. Caso o ensaio reprove a matéria-prima por divergência entre os espectros, a monografia recomenda solubilizar a amostra de tibolona em etanol, recrystalizar por evaporação para, em seguida, se proceder novamente à identificação. O motivo de tal procedimento não é abordado na monografia, porém, a partir da avaliação do trabalho de Boerrigter e colaboradores (2002a), é possível inferir que o padrão de tibolona a ser utilizado é monoclinico e a recrystalização sugerida visa levar uma amostra triclinica à transição para a fase monoclinica. Porém, é importante destacar que a aprovação da matéria-prima triclinica e sua consequente utilização na forma farmacêutica reduzem a estabilidade do medicamento, conforme supracitado (SAS, 1993).

Em 2006, a tibolona foi alvo de disputa judicial na corte escocesa entre a proprietária N.V. Organon e a empresa de genéricos Arrow Generics, na qual se discutiu a nulidade da patente EP0389035 de 1993, a qual protege o processo de obtenção dos polimorfos puros da tibolona, uma vez que um dos polimorfos já tinha sido descrito em publicação anterior. Esse acontecimento ilustra a importância do fenômeno de polimorfismo para a indústria farmacêutica na atualidade (SCOTTISH COURTS, 2007).

2.2. CRISTALINIDADE E POLIMORFISMO

2.2.1. Estruturas cristalinas

Os materiais podem se apresentar estruturados e espacialmente organizados. A esta regularidade estrutural denominamos cristais, comuns em substâncias e compostos sólidos. Os líquidos cristalinos também podem apresentar esta característica, como os chamados cristais líquidos, e mesmo substâncias não cristalinas podem apresentar algum grau de organização (BAUMHARDT NETO, 2004).

O processo de formação de um cristal, a cristalização, caracteriza-se pelo agrupamento de aproximadamente 10^{20} moléculas ou íons em um arranjo com a regularidade já mencionada (BEINSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999). O cristal pode atingir dimensões macroscópicas, visíveis sem o auxílio de lentes, mas apresenta uma identidade básica, que o caracteriza: uma célula unitária, a menor subcomponente de uma estrutura cristalina (rede ou retículo), ou seja, a menor unidade de organização. A célula unitária possui orientação e forma definidas pelos vetores de translacionais “a”, “b” e “c”, possuindo volume definido, que contém os átomos e moléculas necessários para a formação do cristal. Cada cristal pode ser classificado como membro de um dos sete sistemas cristalinos possíveis, que são a representação em paralelogramos da célula unitária, definidos pela relação entre as dimensões individuais de “a”, “b” e “c” e os ângulos entre eles α , β , e γ , na célula unitária. Existem sete sistemas cristalinos básicos: triclinico, monoclinico, ortorrômbico, tetragonal, trigonal, hexagonal e cúbico (CULLITY, 1978). A Figura 2.2 apresenta os sistemas cristalinos da tibolona.

Figura 2.2. Sistemas cristalinos dos polimorfos de tibolona: a) monoclinico; b) triclínico. Estruturas geradas por meio do programa Diamond versão 3.1a.

2.2.2. Definições sobre o polimorfismo

A Figura 2.3 apresenta um esquema bastante utilizado na literatura (HALEBLIAN, MCCRONE, 1975; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001) para melhor entendimento da estrutura de um composto químico. Nesse contexto, têm-se as seguintes definições:

- Sólido amorfo: enquanto os cristais se caracterizam pela repetição espacial, tridimensional, dos átomos ou moléculas que os constituem, as formas amorfas apresentam átomos ou moléculas distribuídas aleatoriamente, tal como num líquido (BAUMHARDT NETO, 2004).
- Solvatos (pseudopolimorfo): quando moléculas do solvente de cristalização fazem parte do retículo cristalino, estequiométrica ou não estequiometricamente, os cristais são denominados de solvatos. Os solvatos cujo solvente de cristalização é a água são denominados hidratos (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001). Para referenciar esses casos utiliza-se o termo pseudopolimorfismo (SPONG et al., 2004; GAVEZZOTTI, 2007).
- Polimorfismo: o polimorfismo é definido como a habilidade de um material sólido cristalino (elemento ou composto) existir com no mínimo duas estruturas cristalinas diferentes, de mesma composição química, em função de diferenças nos arranjos espaciais/conformacionais. Cada polimorfo ou modificação cristalina é uma fase distinta, ou seja, é homogênea no que se refere à composição química e ao estado físico (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969; SPONG et al., 2004; GAVEZZOTTI, 2007). Assim, os polimorfos possuem o mesmo estado líquido e gasoso, diferindo apenas em relação ao estado sólido.

Os guias da FDA e da ICH (Q6A) direcionados ao tema consideram o termo polimorfismo como sendo, de modo geral, “a ocorrência de diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco” e abrangem dentro desse termo os solvatos/hidratos (pseudopolimorfos) e as formas amorfas (FDA, 2007; ICH, 1999). Entretanto, a rigor, polimorfismo, solvatos e sólidos amorfos possuem significados distintos.

Figura 2.3. Esquema da estrutura cristalina de um composto químico (HALEBLIAN, MCCRONE, 1975; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Pode-se ainda classificar o polimorfismo pelos dois mecanismos de formação das estruturas cristalinas diferentes. O polimorfismo conformacional ocorre em função da molécula adotar conformações diferentes nas diversas estruturas cristalinas. A outra classificação é chamada de “polimorfismo por empacotamento”, no qual ocorrem empacotamentos diferentes de moléculas de mesma conformação. Estas moléculas são “relativamente rígidas”, sendo este polimorfismo decorrente principalmente das ligações intermoleculares e das interações soluto-solvente. Essa classificação é considerada um tanto quanto artificial, pois, virtualmente, todos os polimorfos possuem diferenças, mesmo que pequenas, de conformação molecular e toda a modificação de conformação, inevitavelmente, resulta em diferenças no empacotamento (VIPAGUNTA, BRITAIN; GRANT, 2001; SPONG et al., 2004).

2.2.3. Nomenclatura dos polimorfos

Até o momento não existe sistema de convenção internacional para a nomenclatura de polimorfos. Numerais romanos (I, II, III,...) são os mais frequentemente utilizados, precedidos da palavra forma ou polimorfo (ex: forma I ou polimorfo I), para designar as diferentes formas cristalinas (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969; GIRON, 1995). A rigor, a utilização da palavra forma (em referência à forma cristalina), seria mais adequada, pois o termo polimorfo (do grego *polýmorphos*: *polýs* muito + *morphé* forma) possui conotação geral.

Alguns autores consideram que a forma I deveria ser a de maior ponto de fusão ou a forma mais estável à temperatura ambiente. Mas, esse sistema não é satisfatório, uma vez que sempre há a possibilidade da descoberta de uma nova forma de estabilidade ou ponto de fusão intermediário (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969).

Exemplos na literatura da utilização do alfabeto latino também podem ser encontrados na tolbutamida (formas A e B) (UEDA et al., 1985) e no mesilato de doxasozina (formas A, B, C, D, E, F, G, H e I) (SOHN, Y.; LEE, Y, 2005). Entretanto, nomenclatura de pseudopolimorfos com o alfabeto latino é distinta e geralmente bem definida, por exemplo, S_A/S_B para solvatos e H_A/H_B para hidratos das formas A e B, respectivamente (GIRON, 1995).

Outro sistema é a utilização do alfabeto grego (α , β), particularmente utilizado para ácidos glaxos, álcoois, ésteres e glicerídeos (GIRON, 1995).

Um sistema lógico e simples é a numeração das formas pela ordem de descoberta, o que em geral tende a seguir a ordem de estabilidade termodinâmica, mas requer conhecimento muitas vezes indisponível sobre a história do polimorfo e da data da descoberta, além da possibilidade de grupos de pesquisa diferentes estarem trabalhando separadamente com a mesma forma cristalina (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999a).

No caso da tibolona, a nomenclatura dos polimorfos entrou em pauta em uma disputa judicial na corte escocesa, o que ilustra a importância desse tópico. Conforme já citado no item 2.1, Declercq e colaboradores determinaram, em data anterior à patente, a estrutura cristalina do cristal monoclínico em monocristal da tibolona, sem mencionar o polimorfismo deste fármaco (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELEN, 1984). Baseando-se nesse fato, a empresa Arrow alegou que o artigo antecipa e descaracteriza a atividade inventiva do grupo Akzo, ou seja, o processo de obtenção da forma I pura.

Este, por sua vez, se defende alegando que na época do artigo não se conhecia o polimorfismo da tibolona, logo, o cristal descrito por Declercq e colaboradores não poderia ser chamado de forma I, uma vez que a forma II não teria sido ainda descoberta (SCOTTISH COURTS, 2007).

Assim, diante da falta de padronização atual, denominar os polimorfos por seu sistema cristalino e grupo espacial, além do suporte com outros dados de caracterização, é de grande importância para proteção intelectual e parece ser um sistema adequado para evitar confusões na nomenclatura.

2.2.4. Propriedades cristalinas e polimorfismo em fármacos

Muitas das propriedades físico-químicas de um sólido variam quando a estrutura cristalina deste é alterada. O exemplo clássico do carbono puro em suas três formas – o diamante (estrutura tetraédrica), o grafite (folhas poliaromáticas) e os fulerenos (esferas poliaromáticas) dramatizam o profundo efeito que diferenças na estrutura cristalina podem ocasionar nas propriedades de um sólido (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969). Propriedades elétricas e ópticas, dureza, ponto de fusão, pressão de vapor, solubilidade, densidade, grau de higroscopicidade, reatividade no estado sólido, estabilidade física, estabilidade química e comportamento térmico são exemplos de características que podem apresentar divergências em formas cristalinas diferentes de um mesmo composto (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001). Como consequência, muitas das propriedades importantes para a área farmacêutica são afetadas, como, por exemplo: velocidade de dissolução e, conseqüentemente, biodisponibilidade, densidade aparente e verdadeira, forma do cristal, compactação e escoamento do pó, além da estabilidade química e física dos fármacos (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969).

2.2.5. Polimorfismo e biodisponibilidade

A influência do polimorfismo na biodisponibilidade é considerada a mais importante consequência do fenômeno na área farmacêutica e ocorre quando existe dependência entre a velocidade de dissolução *in vivo* e a velocidade de absorção. A concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para obtê-la (t_{max}) são os principais impactos *in vivo* (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Estabeleceu-se que polimorfos com diferenças grandes de energia livre apresentam diferenças significativas no comportamento farmacocinético. Esse fato é reflexo das consequências do fenômeno na solubilidade, uma vez que a forma mais estável (menor energia livre) possui menor solubilidade. Isso resulta, na maioria dos casos, em menor velocidade de dissolução e, conseqüentemente, menor velocidade de absorção (SINGHAL; CURATOLO, 2004).

Diversos relatos têm sido apresentados na literatura sobre o tema desde a década de 1960. Um dos exemplos mais antigo, e muito citado na literatura, é o palmitato de cloranfenicol, um pró-fármaco do cloranfenicol descrito por Aguiar e colaboradores, em 1967. Este pró-fármaco existe em três formas cristalinas (A, B e C) e na forma amorfa. Os autores descrevem significantes variações na biodisponibilidade do cloranfenicol quando viabilizado na forma de suspensões, decorrentes da utilização de proporções diferentes das formas cristalinas A e B contidas nas formulações. Para que haja a absorção do cloranfenicol existe a necessidade de que ocorra a hidrólise do pró-fármaco, palmitato, por esterases intestinais. Estas variações na absorção decorrem da forma B ser mais solúvel que a forma A, uma vez a velocidade de hidrólise depende da velocidade de dissolução do pró-fármaco. Assim, biodisponibilidade maior foi obtida em suspensões que continham maior proporção da forma B (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969; PUDIPEDDI; SERAJUDDIN, 2004).

Outros trabalhos descrevem a importância dos estudos de formas cristalinas para a dissolução e biodisponibilidade dos fármacos. Em 1978, Chakrabarti e colaboradores isolaram e caracterizaram as duas formas cristalinas da fenitoína, obtendo diferentes velocidades de dissolução em função do tipo de cristal (CHAKRABARTI; VAN SEVEREN; BRAECKMAN, 1978). A forma cristalina do antibiótico novobiocina, apesar de química e termodinamicamente mais estável que sua forma amorfa, é pouco absorvida e não provê níveis plasmáticos terapeuticamente adequados. Mas, como a forma amorfa se converte lentamente em sua forma cristalina em suspensões, faz-se necessário ter o cuidado de se

adicionar aditivos para supressão de cristalização no preparo de formulações terapeuticamente ativas com o sólido amorfo (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969). Em uma avaliação de seis amostras comerciais de oxitetraciclina, que atendiam as especificações da farmacopeia norte-americana, Liebenberg e colaboradores identificaram duas amostras do polimorfo A. Os comprimidos preparados com a forma A apresentaram cerca de 55% de dissolução em 30 minutos (HCl 0,1 mol/L), enquanto que os comprimidos preparados com a outra forma cristalina apresentaram aproximadamente 95% no mesmo tempo, ou seja, a forma A possui a dissolução significativamente menor (LIEBENBERG et al., 1999).

Pudipeddi e Serajuddin, em uma análise de 55 compostos descritos na literatura (correspondendo a 81 razões de solubilidade em função das múltiplas formas existentes), apresentam dados que questionam o real impacto do polimorfismo na solubilidade de fármacos, apesar dos casos críticos apresentados na literatura. Os autores mostram que a razão de solubilidade entre a forma mais e a menos solúvel é de no máximo 2, com algumas exceções. Como já apresentado, a possível causa para esta razão de solubilidade baixa reside nas pequenas diferenças existentes entre as energias livres de cada fase, em função dos diferentes empacotamentos ou conformações dos compostos que formam os cristais moleculares. As razões anidrato/hidrato são maiores, sendo que quando se compara a uma forma amorfa as razões de solubilidade superam 10 vezes (PUDIPEDDI; SERAJUDDIN, 2004).

Em relação à tibolona descreve-se, sem apresentação de comprovação experimental, que a forma II apresenta menor velocidade de dissolução que a forma I, apesar de ser a forma metaestável à temperatura ambiente (GLAENZER, 2006). O efeito prático em formulações de tal citação é questionável, uma vez que, ao se avaliar as entalpias de dissolução apresentadas em trabalhos científicos, infere-se que são muito próximas: $17,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a forma II e $18,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para a forma I (BOERRIGTER et al., 2002a). Além disso, as formulações que contêm uma mistura das duas formas cristalinas, desde que o tamanho de partícula seja inferior a $22,8 \mu\text{m}$, são bioequivalentes às mesmas formulações que contêm apenas a forma I pura (DE HAAN, 2004).

Assim, a consequência do polimorfismo na biodisponibilidade de fármacos é uma questão complexa, pois depende não só da solubilidade, mas também de outros fatores, como dose, permeabilidade, metabolização e formulação (PUDIPEDDI; SERAJUDDIN, 2004).

2.2.6. Polimorfismo e estabilidade química

Além de alterações nas propriedades físico-químicas, o polimorfismo pode ocasionar alterações na estabilidade química, principalmente para os compostos com predisposição à degradação no estado sólido.

As diferenças no empacotamento resultam em diferenças nas estruturas eletrônicas e nas propriedades das moléculas, o que se reflete em diferentes reatividades e, portanto, diferentes velocidades de degradação. Li e Feng estudaram a reatividade dos polimorfos da indometacina e encontraram profunda influência do empacotamento sobre as estruturas eletrônicas das moléculas desse fármaco (TONGLEI; SHAOXIN, 2005). Enquanto a forma α reage rapidamente com o gás amônia, a forma γ é praticamente inerte ao gás, apresentando baixa reatividade durante 24 horas de exposição.

Outros trabalhos relatam fármacos cujo fenômeno influencia a estabilidade química. A metilprednisolona se cristaliza em duas formas. A forma I é quimicamente estável e a outra (forma II) reage quando exposta à luz ultravioleta, ao calor ou à umidade elevada (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

Walkling e colaboradores relatam que as duas formas cristalinas da fenretinida possuem estabilidades químicas diferentes. Após 4 semanas a 25 °C a forma estável não apresentou degradação detectável, enquanto que a forma instável apresentou 8 % de degradação no mesmo período (WALKLING et al., 1986).

Em geral, as formas amorfas possuem maior reatividade que as formas cristalinas (PIKAL et al., 1978). As formas amorfas da penicilina G sódica e potássica possuem menor estabilidade que as formas cristalinas. Por exemplo, cristais da forma sódica podem ser submetidos à secagem por calor por várias horas, sem que haja decomposição. Já a forma amorfa, nas mesmas condições, apresenta significativa queda de atividade (MACEK, 1965).

Para a tibolona não foram encontrados estudos sobre a estabilidade química dos polimorfos. Existem apenas citações sucintas conferindo melhor estabilidade química da forma I para utilização em formulações, principalmente em relação à formação do isômero, chamado isotibolona (duplas entre os carbonos 4-5), que forma-se em meio ácido e/ou por exposição ao calor (SAS, 1993; BOERRIGTER et al., 2002b; SCOTTISH COURTS, 2007). Apesar dessas citações sobre as diferenças na estabilidade, existem descrições de que ambas as formas são estáveis por anos se mantidas em local seco e sob refrigeração (BOERRIGTER et al., 2002a; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2006).

2.2.7. Polimorfismo e hábito cristalino

O termo polimorfismo se refere às diferenças em relação à estrutura interna dos cristais, os quais podem também apresentar diferenças no hábito cristalino, ou seja, na estrutura morfológica externa. Tais diferenças resultam da interação de inúmeros outros fatores, além das alterações na estrutura interna, como, por exemplo, a inibição ou as diferentes taxas de crescimento de determinadas faces do cristal durante a cristalização, o grau de saturação e a temperatura. Dessa maneira, a descoberta de diferentes hábitos de um mesmo composto não necessariamente significa que se trata de diferentes polimorfos. Por exemplo, a forma II da prednisona pode existir com hábito acicular ou prismático; em contraposição, as formas I e V podem também se apresentar com o mesmo formato de agulhas (TIWARY, 2001).

A morfologia dos polimorfos da tibolona é altamente dependente da interação do fármaco com o solvente e das condições de crescimento. A forma triclinica, obtida em solventes apolares, apresenta hábito acicular, enquanto a forma monoclinica apresenta formato placóide. É possível também o crescimento epitaxial de uma forma sobre a outra (BOERRIGTER et al., 1999, 2002a; STOICA et al., 2004, 2005a).

O hábito cristalino pode influenciar a orientação da partícula, modificando características como fluidez, compressibilidade, seringabilidade, estabilidade em suspensão e dissolução do pó (TIWARY, 2001). Shell descreve melhor seringabilidade para cristais placóides em comparação com os cristais aciculares (SHELL, 1963).

A forma B da tolbutamida possui aspecto de placa e causa decapagem nos comprimidos durante a compressão (TIWARY, 2001).

O ibuprofeno é geralmente obtido industrialmente por meio da cristalização em hexano, formando agulhas alongadas. Este formato é geralmente inadequado para compressão, em função da baixa fluidez. Já cristais equidimensionais obtidos pela cristalização em metanol apresentam melhores propriedades de fluidez e compressibilidade (TIWARY, 2001).

Na etapa de pré-formulação, o estudo das mudanças no hábito cristalino, correlacionadas com as transformações polimórficas, é de suma importância para o reconhecimento de variações lote a lote das matérias-primas e para a garantia de reprodutibilidade no desempenho das formas farmacêuticas (TIWARY, 2001).

2.3. TRANSIÇÕES DE FASE

Embora um fármaco possa coexistir em duas formas polimórficas ou fases, somente uma delas é a forma termodinamicamente estável a uma dada temperatura e pressão. As demais formas cristalinas, termodinamicamente instáveis naquelas condições, tendem a se converter com o passar do tempo na forma mais estável (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969).

Além dos fatores termodinâmicos, como a maioria dos processos químicos, as transições cristalinas também são resultados de fatores cinéticos. Uma transição que a termodinâmica aponta como espontânea pode ocorrer muito lentamente para ter qualquer significado prático. Como exemplo clássico: nas temperaturas e pressões ambientes, o potencial químico da grafite é mais baixo que o do diamante; então, há tendência termodinâmica para o diamante se transformar espontaneamente em grafite. Para esta transição ocorrer, porém, é necessário que os átomos de C modifiquem as respectivas localizações, o que é um processo imensuravelmente lento, exceto em temperaturas elevadas. A velocidade de equilíbrio a ser atingida é um problema cinético, que escapa à termodinâmica. Nos gases e nos líquidos a mobilidade das moléculas propicia a ocorrência rápida das transições de fase, mas nos sólidos é possível que a instabilidade termodinâmica fique indefinidamente congelada. As fases termodinamicamente instáveis que não se alteram por impedimento de natureza cinética são chamadas de fases metaestáveis. Assim, o diamante é uma fase metaestável do carbono, nas condições ambientes (ATKINS, 1999).

Em geral, a forma mais estável exibe maior ponto de fusão, menor solubilidade e máxima estabilidade química. Entretanto, a forma metaestável pode exibir suficiente estabilidade química e física nas condições de prateleira que justifiquem sua utilização por razões de melhor dissolução ou características para compressão (WADKE et al., 1989).

As transformações polimórficas podem ocorrer durante a moagem, a granulação, a secagem e as operações de compressão. Durante o processo de pulverização, por exemplo, a digoxina, a espironolactona e o estradiol sofrem transições polimórficas. O mesmo ocorre com a fenilbutrazona durante a moagem e a compressão. Na etapa de granulação, devido à utilização de solventes, pode ocorrer a formação de solvatos. Por outro lado, se a forma cristalina é um solvato, o processo de secagem pode conduzi-lo à transformação para a forma anidra ou amorfa (WADKE et al., 1989).

A influência da temperatura também pode levar às transições de fase do tipo sólido-sólido, como, por exemplo, para os polimorfos p-monoclínico e triclínico da carbamazepina. O primeiro é termodinamicamente mais estável até 70°C, enquanto que o segundo é mais estável acima desta temperatura (MCGREGOR et al., 2004).

2.3.1. Diagramas de fase

Os diagramas de fase de energia *versus* temperatura, como ilustrado na Figura 2.4, descrevem a dependência entre a temperatura e a energia livre de Gibbs (G) de dois ou

Figura 2.4. Exemplo de diagrama Energia/Temperatura com transições entre as diferentes fases de um mesmo composto (G_I , G_{II} e $G_{\text{líquido}}$ Energia livre de Gibbs das fases sólidas I e II e da fase líquida respectivamente) (adaptado de BERNSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999).

mais polimorfos. A intersecção entre as curvas do diagrama indica a temperatura de transição de fase; acima de cada temperatura de transição as curvas se invertem e, então, a fase (líquida ou sólida) anteriormente com energia maior (menos estável) passa a ser a fase mais estável, ou seja, com energia menor. Os tipos de transição de fase dos sistemas polimórficos, ilustrados na Figura 2.4, são: i) da fase sólida do polimorfo I para a fase líquida, correspondente à fusão (intersecção entre a linha contínua e pontilhada); ii) da fase sólida do polimorfo II para a fase líquida, também fusão (intersecção entre linha contínua e tracejada); iii) da fase sólida (polimorfo I) para fase sólida (polimorfo II),

também conhecida como transição sólido-sólido (intersecção entre a linha pontilhada e tracejada) (BERNSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999).

2.4. ASPECTOS REGULATÓRIOS DO POLIMORFISMO NA ÁREA FARMACÊUTICA

Diante da importância do fenômeno do polimorfismo para a qualidade dos medicamentos, os órgãos reguladores têm atuado de maneira a minimizar os riscos à população, exigindo, para o registro de medicamentos com fármacos novos ou mesmo genéricos, estudos que comprovem o monitoramento e o controle de qualidade das formas cristalinas existentes (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

O guia mais completo atualmente disponível foi publicado pela FDA em julho de 2007. Nesse guia a FDA aborda os principais aspectos do fenômeno sobre a qualidade dos medicamentos, discute a não necessidade do medicamento genérico possuir o mesmo polimorfo (uma vez que a identidade química do fármaco é a mesma) e destaca a responsabilidade da empresa no controle da forma cristalina caso a biodisponibilidade possa ser afetada. O guia também recomenda que procedimentos analíticos apropriados sejam utilizados para detectar as formas cristalinas e coloca a difratometria de raios X como a técnica principal e inequívoca para comprovação do fenômeno (FDA, 2007).

A Figura 2.5 apresenta a árvore de decisões para auxiliar na identificação das necessidades de se definir especificações para polimorfos na matéria-prima e no produto acabado (FDA, 2007).

No Brasil, a ANVISA solicita, para o registro de medicamentos (genéricos, similares e inovadores) informações sobre os prováveis polimorfos e, sempre que possível, a metodologia analítica para sua determinação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, 2007).

Figura 2.5. Árvore de decisões para o estabelecimento de especificações para polimorfos (adaptado de FDA, 2007).

2.5. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.136, de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7914&word=>. Acesso em: 20 out 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.16, de 02 de março de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos, anexo I. Acompanha esse Regulamento o Anexo II, intitulado "Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos". Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=25960>. Acesso em: 20 out 2009.

ATKINS, P. W. **Físico-química**. 6. ed., Rio de Janeiro: LTC, 1999.cap. 6, p.108-127.

BAUMHARDT NETO, R. Raios X. In: CANEVALORO Jr., S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. cap.2, p.41-60.

BERNSTEIN, J.; DAVEY, R. J.; HENCK, J.-O. Concomitant polymorphs. **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 38, n.23, p.3440-3461,1999.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P. The wolf in sheep's clothing; the morphologic mystery of a polymorphic steroid. In: **Proceedings**. Cambridge, 1999.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M. In Situ Observation of epitaxial polymorphic nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, n.18, p.4725-4731, 2002.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; VERWER P.; BENNEMA, P. Pseudomorphic Crystal Growth of the Model Steroid Methyl Analogue of Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, p.13224-13230, 2002.

BOOY, K.-J.; WIEGERINCK, P.; VADER, J. ; KASPERSEN, F.; LAMBREGTS, D.; VROMANS, H.; KELLENBACH, E. The Use of ¹³C Labeling to Enhance the Sensitivity of ¹³C Solid-State CPMAS NMR to Study Polymorphism in Low Dose Solid Formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.94, n.2, p.458-463, 2005.

BYRN, S. R.; PFEIFFE, R. R.; STOWELL, J. G. In: Polymorphs. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd ed. West Lafayette: SSCI, 1999a. cap.10, p.143-222.

BYRN, S. R.; PFEIFFE, R. R.; STOWELL, J. G. In: Miscellaneous Topics. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd. ed. West Lafayette: SSCI, 1999b. cap.22, p.489.

CHAKRABARTI, S.; BELPAIRE, F. M. Bioavailability of phenytoin in lipid containing dosage forms in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.30, n.5, p.330-331, 1978.

CULLITY, B. D., **Elements Of X-ray Diffraction**. 2.ed. Massachussetts: Addison-Wesley Publishing, 1978, p.32-37. (Addison-Wesley Series in Metallurgy and Materials).

DECLERCQ, J. P.; VAN MEERSSCHE, M.; ZEELLEN, F. J. Conformational analysis of 3-oxo 5(10) - unsaturated steroids. Single-crystal X-ray structure - analysis of 17-hydroxy-7 α -methyl-19-nor-17- α -7-pregn-5(10)-en-20-yn-3-one (Org OD 14). **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v.103, n.5, p.145-147, 1984.

DE HAAN, P. **Immediate-release pharmaceutical dosage form comprising polymorphous tibolone**. Pat. n. WO n.103378, 19 May 2004, 02 Dez 2004, 32p.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strasbourg: Concil of Europe, 2006. p. 5124-5125. (Supplement 5.7- 2007).

FDA. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry: ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information**. Rockville: FDA, 2007. 13p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>. Acesso em: 20 out. 2009.

GAVEZZOTTI, A. A solid-state chemist's view of the crystal polymorphism of organic compounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p.2232-2241, 2007.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochemica Acta**, n.248, p.1-59, 1995.

GLAENZER, K. **Tibolone-adsorbates**. US Pat. n.0003977, 12 Jul 2005, 05 Jan 2006.11p.

HALEBLIAN, J.; MCCRONE, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58,n. 8, p. 911-929, 1969.

HALEBLIAN, J. Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.64, n.8, p.1269-1288, 1975.

ICH. Quality Guidelines. **Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances (including Decision Trees)**. 1999. 25p. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q6A>. Acesso em: 20 out. 2009.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.1, p.305.

LIEBENBERG, W.; DE VILLIERS, M.; WURSTER, D. E.; SWANEPOEL, E.; DEKKER, T. G.; LOTTER, A. P. The effect of polymorphism on powder compaction and dissolution properties of chemically equivalent oxytetracycline hydrochloride powders. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n.25, p.1027-1033, 1999.

MACEK, T. J. The physical and chemical problems inherent in the formulation of dosage forms for new pharmaceuticals. **American Journal of Pharmacy and the Sciences Supporting Public Health**, n.137, n.6, p.217-238, 1965.

MAO, C.; PINAL, R.; MORRIS, K. R. A quantitative model to evaluate solubility relationship of polymorphs from their thermal properties. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n.7, p.1149 - 1157, 2005.

MCGREGOR, C.; SAUNDERS, M. H.; BUCKTON G.; SAKLATVALA, R. D. The use of high-speed differential scanning calorimetry (hyper-dsc™) to study the thermal properties of carbamazepine polymorphs. **Thermochimica Acta**, v.417, p.231-237, 2004.

MERCK index 11th Ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., p.1485, 1989.

PIKAL, M. J.; LUKES, A. L.; LANG, J. E.; GAINES, K. Quantitative crystallinity determinations for beta-lactam antibiotics by solution calorimetry: correlations with stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.67, n.6, p.767-773, 1978.

PUDIPEDDI, M.; SERAJUDDIN, A. T. M. Trends in solubility of polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.94, n.5, p.929-939, 2004.

RYMER, J. Why tibolone is different? **Reviews in Gynaecological Practice**, v.2, n.1/2, p.165 -170, 2002.

SAS, G. A. J. M. T. **Pharmaceutical composition which contains a pharmaceutically suitable carrier and the compound having the structure (7 α , 17 α)-17-hydroxy-7-methyl-19-nor-17-pregn-5(10)-en-20-yn-3-one**. EP Pat. 0389035, 12 Mar. 1993, 15 Dez. 1993. 13p.

SCHOUTEN, A.; KANTERS, J. A. Structure of the triclinic modification of 17 β -hydroxy-19-nor-7 α -methyl-17 α -pregn-5(10)-en-20-in-3-one (Org OD 14). **Acta Crystallographica Section C**, v.47, p.1754-1756, 1991.

SCOTTISH COURTS, site da internet: <http://www.scotcourts.gov.uk/opinions/csoh146.html>. Acesso em: 04 de setembro de 2007.

SHELL, J. W. X-ray and crystallographic applications in pharmaceutical research III. Crystal habit quantitation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.52, p.100-101, 1963.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, p.335-347, 2004.

SOHN, Y.; LEE, Y. Polymorphism of Doxazosin Mesylate. **Archives of Pharmacal Research**, v.28, n. 6, p.730-735, 2005.

SPONG, B. R.; PRICEB, C. P.; JAYASANKARA, A.; MATZGERB, A. J.; HORNEDOA, N. R. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, p.241-274, 2004.

STOICA, C.; VERWER, P.; MEEKS, H.; VAN HOOFF, P. J. C. M., KASPERSEN, F. M.; VLIEG, E. Understanding the effect of a solvent on the crystal habit. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n.4, p.765-768, 2004.

STOICA, C.; P. VERWER; MEEKS, H.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M.; KASPERSEN, F. M. Heterogeneous 2D nucleation of the stable polymorphic form on the metastable form. **Journal of Crystal Growth**, n.275, n.1/2, p.E1727-E1731, 2005.

STOICA, C.; TINNEMANS; P.; VERWER; MEEKS, H.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P.J.C.M.; KASPERSEN F.M. Epitaxial 2D Nucleation of Metastable Polymorphs: A 2D version of Ostwald's rule of stages. **Crystal Growth & Design**, v.5, n.3, p.975-981, 2005.

STOICA, C.; P. VERWER; MEEKS, H.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M.; KASPERSEN F.M. Epitaxial 2D nucleation of the stable polymorphic form of the steroid 7 α MNa on the

metastable form: Implications for Ostwald's rule of stages. **International Journal of Pharmaceutics**, n.309, n.1/2, p.16-24, 2006.

TIWARY, A. K. Modification of crystal habit and its role in dosage form performance. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.27, n.7, p.699-709, 2001.

TONGLEI, L.; SHAOXIN, F. Study of crystal packing on the solid-state reactivity of indomethacin with density functional theory. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n.11, p.1964 - 1969, 2005.

UEDA, T.; OHNISHI, N.; YOKOYAMA, T.; KURODA, T.; KITA, Y.; KURODA, K.; TATSUMI, E.; MATSUDA, Y. A kinetic study on the isothermal transition of polymorphic forms of tolbutamide and mefenamic acid in solid state at high temperatures. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, n.33, p.2073-2078, 1985.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAI, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.48, p. 3-26, 2001.

WADKE, D. A.; SERAJUDDIN, A. T. M.; JACOBSON, H.; Preformulation testing; In: LIBERMAN, H. A; LACKMAN, L.; SCHWARTZ; **Pharmaceutical dosage forms: tablets**. 2. ed., New York: Marcel Dekker, 1989, cap.1, p.34-41.

WALKLING, W. D.; SISCO, W. R.; NEWTON, M. P.; FEGELY, B. J.; CHRZANOWSKI, F. A. Stability of fenretinide polymorphs. **Acta pharmaceutica technologica**, n.32, p.10-12, 1986.

WIELAND, P.; ANNER, G. Steroids. CCXI. Synthesis of 7.alpha.-methyl-3-oxo-19-norandrosta-4,9,11-trienes. **Helvetica Chimica Acta**, v. 6, n.50, p.1453-1461, 1967.

Capítulo III

Obtenção e caracterização dos polimorfos de tibolona

Este capítulo apresenta os resultados do estudo de caracterização no estado sólido dos polimorfos puros de tibolona.

"Mede o que é mensurável e torna mensurável o que não o é."
(Galileu Galilei)

3.1. TÉCNICAS UTILIZADAS NO ESTUDO DO POLIMORFISMO

Qualquer característica de um fármaco que possa afetar a estabilidade, a segurança e a biodisponibilidade deve ser monitorada e controlada. No caso do polimorfismo, as agências reguladoras exigem que sejam utilizados procedimentos analíticos que permitam este controle e monitoramento da qualidade das matérias-primas e do produto acabado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003, 2007; FDA, 2007; ICH, 1999).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para identificar as diferentes formas cristalinas de fármacos. A Tabela 3.1 resume os métodos analíticos utilizados para o estudo do polimorfismo. As técnicas utilizadas na caracterização dos polimorfos da tibolona foram descritas com maior detalhamento nos tópicos a seguir.

Cada uma das técnicas apresentadas na Tabela 3.1 pode ser utilizada com sucesso para a identificação de uma fase, mas em função das peculiaridades e limitações de cada técnica, além das características do fármaco a ser avaliado, a ferramenta mais potente e recomendada é a combinação entre elas (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999a).

3.1.1. Microscopia

A microscopia possui duas principais aplicações na área farmacêutica:

- I) Cristalografia Básica (morfologia, estrutura cristalina, polimorfismo e solvatos).
- II) Análise de tamanho de partícula.

A maioria dos pós utilizados na área farmacêutica possui cristais na faixa de 0,5 a 300 μm de diâmetro. Entretanto, frequentemente as distribuições granulométricas são da ordem de 0,5 a 50 μm para garantir homogeneidade e dissolução rápida. A Tabela 3.2 relaciona os tipos de microscópios com a faixa de tamanho de partícula adequada (WELLS, 1988).

Tabela 3.1 - Técnicas utilizadas no estudo do polimorfismo e seus principais aspectos (adaptado de GIRON, 2003).

Técnica	Medida obtida	Características e Aplicações
Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	Fluxo de calor <i>versus</i> temperatura	Rápida, pequena quantidade de amostra e muito sensível Permite automação Provê informações termodinâmicas, possibilita o estudo de transições vítreas, a quantificação limitada em função de efeitos cinéticos e as impurezas modificam o ponto de fusão Pode ser acoplada às técnicas XRPD, IR e TG.
Microcalorimetria	Fluxo de calor <i>versus</i> tempo	Provê informações termodinâmicas Quantificação da forma amorfa
Termogravimetria (TG)	Variação de massa em função da temperatura	Rápida, pouca quantidade de amostra e muito sensível Permite automação Estudo de solvatos, hidratos Pode ser acoplada às técnicas CG/MS e IR Quantificação de fases Estudos de estabilidade
Isotermas de adsorção/dessorção de vapor de água	Variações de massa <i>versus</i> variações de umidade relativa	Higroscopicidade Definições das condições de armazenamento Cinética de formações de hidratos Estudo da cristalização de amorfos
FTIR, DRIFT, ATR	Espectro no infravermelho (IR)	Pode ser acoplada a platinas de aquecimento e à microscopia Avaliação de solventes e solvatos A preparação da amostra pode introduzir artefatos Influência da umidade na preparação Quantificação de fases
Raman	Espectro Raman	Informações complementares ao IR Acoplamento à microscopia Sem preparação da amostra Quantificação de fases
NMR no estado sólido	Espectro de Ressonância	Caracterização das fases Quantificação de fases
Difratometria de raios X (DRX)	Difratograma	Determinação de estrutura cristalina (a partir de monocristal ou pó) Permite acoplamento com sistemas para determinações <i>in situ</i> , ciclos de aquecimento e resfriamento, câmaras com variação de umidade Técnica mais utilizada para quantificação de fases Influência de orientação preferencial, tamanho de partícula e umidade
Solubilidade	Quantidade dissolvida em solventes e temperaturas diferentes	Determinação de solubilidade: dado necessário à pré-formulação Solubilidade <i>versus</i> temperatura: determinação de temperatura de transição Solubilidade de saturação: avaliação de transições de fase mediadas por solventes
Microscopia, SEM	Microscopia por reflexão da luz ou de elétrons	Avaliação da morfologia, análise de superfície, determinação de sistemas cristalinos Microscopia térmica Microscopia-IR Microscopia Raman

Tabela 3.2 - Tipos de microscópio e tamanho de partícula (WELLS, 1988).

Microscópio	Tamanho de partícula (μm)
Eletrônico de transmissão	0,001-1
Eletrônico de varredura	0,1-10
Mono-objetiva	1,0-100
Estereobinocular	10-1000

3.1.2. Cristalografia óptica

Polimorfos podem pertencer a duas classes de cristais, dependendo do efeito de transmissão da luz polarizada, nas diferentes direções através do cristal: isotrópico ou anisotrópico (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

Nos cristais isotrópicos, a velocidade da luz é sempre constante, independente da direção e, portanto, apresentam um único índice de refração. Sistemas cristalinos cúbicos, como o cloreto de sódio, e pós amorfos são exemplos de materiais isotrópicos. Com filtros polarizadores cruzados, essas substâncias não transmitem luz (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

Nos cristais anisotrópicos, nos quais se inclui a maioria dos fármacos, a velocidade da luz depende da direção. Nestes tem-se dois ou três valores principais de índice de refração, além de valores intermediários. A diferença entre o índice máximo e o mínimo constitui a birrefringência, ou dupla refração do cristal, sendo também chamados de birrefringentes. Nessa classe visualizam-se claros e cores de interferência com os polarizadores cruzados (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

Os cristais anisotrópicos que apresentam um eixo óptico são chamados de uniaxiais e são característicos dos sistemas cristalinos hexagonais, como no caso do corticosteróide acetonido de triancinolona, ou tetragonais, como, por exemplo, o acetato de fludrocortisona. Cristais anisotrópicos que possuem dois eixos ópticos são chamados de biaxiais e são característicos dos sistemas monoclinico (ex: ácido nalidíxico), triclinico (ex: ciclizina) e ortorrômbico (ex: tolbutamida) (HALEBLIAN, MCCRONE, 1969; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

A microscopia óptica também possibilita o estudo das transições de fase em solução e a avaliação de estabilidade termodinâmica entre duas fases. A partir da observação de dois polimorfos, imersos em uma gota de solução saturada, pode-se acompanhar o crescimento da forma menos solúvel e a solubilização da mais solúvel. Como exemplo, a partir de uma solução supersaturada de tibolona em acetona, foi possível acompanhar e determinar as condições nas quais ocorre a transição do cristal triclinico para a forma monoclinica, em um microscópio com luz polarizada (BOERRIGTER et al., 2002a).

A microscopia óptica é uma ferramenta de baixo custo, versátil e de grande utilidade para o estudo e a caracterização do polimorfismo em fármacos. Permite identificar os sistemas cristalinos, determinar propriedades ópticas, avaliar aspectos morfológicos, otimizar procedimentos de cristalização, observar o fenômeno de dissolução e acompanhar as transições de fase (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b).

3.1.3. Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de alcance subóptico (ver Tabela 3.2), pois utiliza a reflexão de um feixe de elétrons ao invés do feixe de luz.

Atualmente é bastante utilizada para o estudo das características de superfície, morfológicas e de interações partícula-partícula (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999b). A Figura 3.1 apresenta uma fotomicrografia eletrônica que permite a visualização do crescimento da forma estável da tibolona sobre a forma metaestável (STOICA et al., 2006).

Figura 3.1. Fotomicrografia eletrônica do crescimento da forma estável (forma I) sobre a forma metaestável (II) (STOICA et al., 2006).

3.1.4. Difractometria de raios X

3.1.4.1. Cristalografia de raios X de monocristal

A cristalografia de raios X de monocristal fornece informações estruturais precisas sobre os cristais: parâmetros de cela unitária, densidade, ordem do cristal, conformação molecular, empacotamento molecular, padrão das ligações de hidrogênio (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999c).

Nas últimas décadas, com o aprimoramento dos recursos computacionais e de detecção de raios X, com a utilização de fontes de raios X de alta intensidade (fontes de luz síncrotron) e da difração de nêutrons de alta resolução, a cristalografia estrutural vem sofrendo avanços significativos (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998). Atualmente, por exemplo, já é possível a determinação de estruturas a partir de cristais micrométricos (LAGOMARSINO et al., 2002) .

As estruturas cristalinas dos polimorfos da tibolona foram elucidadas por Declercq, van Meerssche e Zeelen (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELEN, 1984), Shouten e Kanters (SCHOUTEN; KANTERS, 1991). Os parâmetros cristalográficos estão depositados no CSD (*Cambridge Structural Database*) e são apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Parâmetros cristalográficos das duas formas cristalinas da tibolona (BOERRIGTER et al., 2002).

Sistema Cristalino	Monoclínico	Triclínico
CSD código de referência	CIYRIL00	CIYRIL01
Grupo espacial	$P2_1$	$P1$
Dimensões de cela	$a = 6,53 \text{ \AA}$	$a = 6,54 \text{ \AA}$
	$b = 41,21 \text{ \AA}$	$b = 6,68 \text{ \AA}$
	$c = 6,67 \text{ \AA}$	$c = 10,29 \text{ \AA}$
	$\alpha = 90^\circ$	$\alpha = 87,1^\circ$
	$\beta = 101,5^\circ$	$\beta = 80,1^\circ$
	$\gamma = 90^\circ$	$\gamma = 79,2^\circ$
Z	4	1

3.1.4.2. Difractometria de raios X pelo método do pó

A difratometria pelo método do pó é uma das técnicas mais importantes para a caracterização e a quantificação de polimorfos. Os materiais cristalinos em pó, ou policristalinos, possuem padrões característicos de difração de raios X. As distâncias interplanares e suas respectivas intensidades relativas são características e específicas para cada substância cristalina. Como consequência de sua importância, a utilização da técnica tornou-se comum e essencial nos trabalhos de caracterização de polimorfos na área farmacêutica (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998).

A difratometria pelo método do pó possui a vantagem de ser não destrutiva, além de serem necessárias pequenas quantidades de amostra. Uma vez que os picos de difração podem ser sobrepostos e somados para misturas de compostos, convém garantir que as amostras não contenham impurezas (HALEBLIAN; MCCRONE, 1969).

Um dos avanços na técnica para a quantificação de fases é a aplicação do método de Rietveld (HILL; HOWARD, 1987). O método de Rietveld tem por base a simulação de todo o perfil difratométrico a partir de parâmetros estruturais das fases constituintes, permitindo refinar parâmetros de natureza instrumental e cristalográfica. A comparação do difratograma calculado com o observado e a redução das diferenças por meio do método de mínimos quadrados permitem a obtenção de resultados quantitativos das fases (YAMAMURA; MOMOSE, 2001). Não é necessário padrão interno, mas as estruturas cristalinas devem ser conhecidas (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998).

3.1.5. Análise térmica

As técnicas de análise térmica têm sido utilizadas na área farmacêutica há mais de trinta anos (FORD; TIMMINS, 1986). Este grupo de técnicas é particularmente muito adequado para o estudo de polimorfismo e pseudopolimorfismo em fármacos e excipientes, sendo utilizadas como técnicas de rotina para estudos de pré-formulação e no controle de qualidade de matérias-primas e produtos acabados (GIRON, 1995; ARAUJO; MERCURI; MATOS, 2009).

Entre as mais importantes técnicas termoanalíticas para caracterização do estado sólido na área farmacêutica estão a termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC). Separadamente ou em conjunto, estas técnicas são frequentemente os primeiros passos para a pesquisa de

polimorfos e a determinação de sua estabilidade, em função da rapidez de obtenção de resultados com a utilização de pequenas quantidades de amostra (GIRON, 1995).

3.1.5.1. Termogravimetria (TG) / Termogravimetria derivada (DTG)

A TG é a técnica de análise térmica na qual a variação de massa da amostra (perda ou ganho de massa) é determinada como uma função da temperatura e/ou do tempo, enquanto a amostra é submetida à programação controlada de temperatura. Os experimentos para avaliar as variações na massa de um material em função da temperatura são executados por meio da termobalança, que deve permitir o trabalho sob as mais variadas condições experimentais. No método termogravimétrico, convencional ou dinâmico, mais comumente empregado, são registradas as curvas de variação de massa da amostra (m) em função da temperatura (T) ou do tempo (t) (GIOLITO, 1988).

A curva Termogravimétrica Derivada (DTG) é a derivada primeira da curva TG. Nessa curva os degraus correspondentes às variações de massa da curva TG são substituídos por picos que determinam áreas proporcionais às variações de massa. A curva DTG traz as mesmas informações que a TG, porém é possível separar reações sobrepostas, uma vez que as inflexões sutis da TG são enfatizadas. Assim, pode-se obter as temperaturas correspondentes ao início e ao final da reação com maior exatidão e, também, calcular a variação de massa no caso de sobreposição de reações, uma vez que na curva TG tornar-se-á difícil localizar o início e/ou fim da reação.

A TG é também uma ferramenta muito adequada para os estudos de avaliação do nível crítico de umidade, como, por exemplo, na determinação da estabilidade de formas anidras e hidratadas em diferentes condições de umidade relativa. Ensaio de termogravimetria mostraram as diferentes estabilidades dos sais de fenoprofeno, sendo que o sal sódico diidratado apresentou perda de água à temperatura ambiente e o sal cálcico diidratado manteve-se estável até a temperatura de 70 °C (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999d).

Outro grande potencial da termogravimetria é na caracterização, na diferenciação e na detecção de traços de pseudopolimorfos em uma amostra (GIRON,1995). Os métodos térmicos de análise cinética também foram utilizados para a avaliação da desidratação de vários hidratos de cefalexina, os quais apresentaram mudanças na estrutura cristalina durante o processo de dessolvatação e ressolvatação (FORD; TIMMINS,1986).

3.1.5.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A DSC é a técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência, termicamente inerte, em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas à programação controlada de temperatura (GIOLITO; IONASHIRO, 1988).

DSC é a técnica de análise térmica mais frequentemente utilizada para a caracterização de polimorfos, uma vez que quaisquer transições térmicas resultam na liberação ou absorção de energia (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998).

As formas I, II e III da carbamazepina e do cloridrato de gepirona podem ser distinguidas por meio da utilização de curvas DSC (FORD; TIMMINS, 1986; RUSTICHELLI et al., 2000). Sacchetti demonstrou que os dados de DSC, como a capacidade calorífica, podem ser utilizados para a determinação da estabilidade relativa entre os polimorfos do paracetamol, bem como para estimar a temperatura de transição (SACHETTI, 2001). Boerrigter e colaboradores determinaram por DSC uma transição de fase endotérmica da forma II para forma I da tibolona a 144°C (BOERRIGTER et al., 2002). Burger e Ramberger investigaram polimorfos de mais de trinta fármacos por DSC e estabeleceram, com base nas informações termodinâmicas obtidas, regras importantes para a construção de diagramas de energia/temperatura e a avaliação da estabilidade termodinâmica entre eles (BURGER; RAMBERGER, 1979).

A Figura 3.2 ilustra uma curva DSC hipotética com indicação de seis eventos térmicos e a terminologia normalmente empregada (ARAUJO; MERCURI; MATOS, 2009). O evento (1) corresponde ao início do aquecimento e não está associado à amostra. De maneira geral ocorre com qualquer célula DSC e é atribuído ao período de estabilização do sistema à custa da potência enviada para aquecer o forno. A alteração em relação ao zero diferencial (linha de base esperada) varia em intensidade dependendo da razão de aquecimento empregada e das condições da célula. Em (2) está ilustrada uma tênue mudança da linha de base no sentido endotérmico. É detectada, por exemplo, quando ocorre a transição vítrea (T_g), ou seja, a passagem do estado vítreo (mais ordenado) para o estado de “borracha” (mais flexível e menos ordenado); tal evento ocorre em função do aumento da energia rotacional, o qual proporciona flexibilidade e propriedades elastoméricas a materiais poliméricos, sendo também um evento característico de substâncias amorfas (JENNINGS, 1999). Em (3) um

pico endotérmico, quando estreito, é atribuído ao processo de fusão da amostra. O evento exotérmico (4), com pico estreito, pode ser devido à recristalização da amostra; em alguns casos o processo pode ocorrer logo após a fusão. Quando o evento (3) está associado a um processo de desidratação, o evento (4) pode corresponder à transição cristalina. Porém, para a precisa interpretação a curva DSC deve ser comparada às curvas TG/DTG. Neste caso pode-se verificar se o evento térmico indicado na curva DSC está ou não associado à perda de massa. O evento (5), endotérmico, é característico da transição cristalina (pico estreito) ou então do início do processo de decomposição térmica que se inicia com absorção de energia para que ocorram rompimentos de ligações químicas e volatilização do composto químico formado. O evento (6) é típico de processos oxidativos ou de processos térmicos associados a várias etapas de decomposição térmica que ocorrem simultânea e favoravelmente com liberação de calor.

Figura 3.2. Curvas DSC hipotéticas com a indicação de seis eventos térmicos, ampliação da faixa de temperatura do evento (2) e a terminologia empregada (ARAUJO; MERCURI; MATOS, 2009).

Os principais tipos de curvas DSC observadas nos estudos de sistemas polimórficos são (GIRON,1995):

- Tipo 1 – Uma transição sólido-sólido ocorre antes do ponto de fusão do polimorfo com maior temperatura de fusão. Esse evento será exotérmico para a monotropia e endotérmico no caso de enantiotropia. Nenhuma perda de massa será detectada na curva TG. O cálculo de pureza no pico de fusão não será alterado se a transição ocorrer distante deste.
- Tipo 2 – Presença de 2 pontos de fusão. Após fundir a forma de menor ponto de fusão, cristais crescem do material fundido, resultando em um pico exotérmico no DSC (recristalização). Este tipo de curva pode corresponder tanto para sistemas monotrópicos, como enantiotrópicos. A amostra poderá ser constituída por uma forma pura ou mistura de polimorfos.
- Tipo 3 – Cada forma cristalina possui um ponto de fusão característico, não existindo transição de fase entre os pontos.

Por meio das curvas DSC dos tipos 2 e 3 não é possível concluir definitivamente a respeito da estabilidade termodinâmica.

Nas Figuras 3.3 e 3.4 estão ilustradas as curvas DSC hipotéticas características de sistemas monotrópicos e enantiotrópicos, respectivamente, para duas formas cristalinas A e B, onde: T_fA é a temperatura de fusão de A; T_fB é a temperatura de fusão de B e T_t é a temperatura de transição da forma A para B. Na Figura 3.3 temos a seguintes possibilidades para os sistemas monotrópicos:

- 1) Fusão da forma de maior ponto de fusão (polimorfo A).
- 2) A forma de menor ponto de fusão (polimorfo B) sofre transição exotérmica para forma A, que se funde em seguida.
- 3) Fusão da forma B, seguida da cristalização a partir do material fundido da forma A, que na sequência se funde.

Na Figura 3.4 temos as seguintes possibilidades para sistemas enantiotrópicos:

- 1) Transição endotérmica sólido-sólido de A para B, seguida de fusão de B.
- 2) Fusão da forma A e eventual cristalização de B a partir do material fundido, seguida da fusão deste (linha tracejada).

- 3) Transformação de B em A na temperatura ambiente, por meio de transição exotérmica espontânea (B é instável abaixo de T_t), seguida da transição endotérmica sólido-sólido de A para B e da fusão de B.
- 4) Fusão da forma B.

Figura 3.3. Curvas DSC hipotéticas para sistemas monotrópicos formado pelas formas cristalinas A e B (adaptado de GIRON, 1995).

Figura 3.4. Curvas DSC para sistemas enantiotrópicos formados pelas formas cristalinas A e B (adaptado de GIRON, 1995).

3.1.6. Espectroscopia vibracional: Raman e infravermelho

As espectroscopias no infravermelho e Raman mostram-se extremamente úteis para análise de sólidos, uma vez que podem ser realizadas sem a dissolução da amostra, sendo sensíveis às estruturas, às conformações e ao ambiente de um composto orgânico, o que as tornam técnicas potentes de caracterização e identificação de diferentes formas cristalinas de fármacos (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998; BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999e).

Há uma diferença importante entre os espectros vibracionais de gases e líquidos, daqueles obtidos com sólidos, particularmente os cristais. Os materiais cristalinos se comportam como se toda a rede cristalina sofresse vibração, enquanto que para gases e líquidos é significativa a noção dos níveis de energia vibracionais das moléculas individuais (BUGAY, 2001).

As regras de seleção são diferentes para ambas as técnicas, uma vez que a absorção no infravermelho depende da variação do momento de dipolo da molécula e o espalhamento Raman da variação da polarizabilidade. Isso resulta em informações complementares nos espectros Raman e IR, embora nos casos de baixa simetria molecular existam bandas nas mesmas posições, variando somente a intensidade (SPONG et al., 2004).

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica de rotina recomendada pelas farmacopeias para a identificação química dos insumos farmacêuticos e é amplamente utilizada para a identificação de polimorfos e solvatos, em função da sua popularização nos laboratórios farmacêuticos (AUER; GRIESSER; SAWATZKI, 2003).

Cloridrato de propanolol, cloridrato de ranitidina e tolbutamida, meprobamato e carbamazepina são exemplos de fármacos que tiveram seus polimorfos caracterizados e diferenciados pela aplicação da espectroscopia de absorção no infravermelho (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999e).

As formas I e II da tibolona apresentam diferentes espectros de absorção no infravermelho (DRIFT) na região de 3000 a 3700 cm^{-1} , de acordo com a patente EP0389035. O estiramento O-H da forma I apresenta duas bandas duplicadas, enquanto que a forma II apresenta apenas duas bandas separadas, sem duplicação (SAS, 1993).

A espectroscopia Raman fornece informações químicas similares à espectroscopia de absorção no infravermelho. Entretanto, quando aplicada ao estudo do polimorfismo, a técnica possui diversas vantagens. A espectroscopia Raman é bastante adequada aos estudos *in situ*. O interfaceamento com o microscópio permite, por exemplo, a visualização de pequenas amostras que não puderam ser removidas do frasco após a cristalização, eliminando a necessidade da preparação da amostra. Além disso, pode ser utilizada mesmo na presença de água ou através de vidro, sendo que essas condições não poderiam ser utilizadas para IR.

Stoica e colaboradores estudaram, por meio da utilização da microscopia Raman *in situ*, o crescimento e a transição de fase em solução das formas cristalinas da tibolona. A forma monoclinica apresenta duplicação de banda com picos em 1660 e 1665 cm^{-1} , enquanto que a triclinica apresentam apenas o pico em 1662 cm^{-1} . Os autores atribuem esta duplicação às duas conformações meia-cadeira possíveis que o anel A pode assumir no cristal monoclinico (STOICA et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006).

As atuais exigências dos órgãos reguladores em relação ao controle das formas polimórficas no produto final exigem o desenvolvimento de métodos adequados para a quantificação de fases. Nesse sentido, os trabalhos envolvendo a utilização da espectroscopia Raman vêm crescendo e se ampliando. Auer e colaboradores demonstraram que a espectroscopia Raman se mostrou uma técnica rápida e eficiente para quantificação dos polimorfos da carbamazepina, meprobamate, acemetacina, famotidina, fenilbutazona, sulfametrol, manitol e sorbitol em medicamentos disponíveis comercialmente (AUER; GRIESSER; SAWATZKI, 2003).

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Materiais

- Amostra de tibolona lote T11 com teor acima de 99,9 % (por CLAE - conforme laudo do fabricante) fornecida pela Sintefina Indústria e Comércio Ltda.
- Solventes: acetona; acetonitrila; hexano; tolueno; piridina; acetato de etila (grau HPLC, fabricante Malinkrodt Chemical).
- Água deionizada.

3.2.2. Métodos

A amostra de matéria-prima foi solubilizada e recristalizada conforme os procedimentos experimentais descritos pela patente EP0389035 (SAS, 1993) para obtenção das formas cristalinas puras. Os cristais obtidos na recristalização foram analisados por difratometria de raios X e a quantificação das formas cristalinas foi realizada pelo método de Rietveld. O procedimento foi repetido até a obtenção das formas cristalinas puras monoclinica (forma I) e triclinica (forma II), para posterior caracterização por outras técnicas. A Figura 3.5 apresenta o fluxograma de trabalho utilizado. Os cristais de tibolona obtidos da recristalização em acetona, n-hexano e tolueno foram denominados ACE, HEX e TOLU, respectivamente.

Figura 3.5. Fluxograma de trabalho para o estudo do polimorfismo da tibolona.

3.2.2.1. Procedimentos de recristalização

3.2.2.1.1. Recristalização em acetona-água

A recristalização foi realizada por meio da solubilização da amostra comercial de tibolona em acetona com traços de piridina à temperatura de 20 a 25 °C. Filtrou-se a solução e ao filtrado adicionou-se água destilada (previamente filtrada), sob agitação e fluxo de nitrogênio, formando-se uma suspensão. Resfriou-se a suspensão à temperatura de 0 a 5 °C, mantendo a agitação nesta temperatura por 1 hora. Os cristais obtidos foram separados por filtração, lavados com água destilada, secados à pressão reduzida e armazenados em dessecador, com pentóxido de fósforo.

3.2.2.1.2. Recristalização em n-hexano

A recristalização foi realizada através da solubilização da amostra comercial de tibolona em acetato de etila com traços de piridina à temperatura de 35 a 40 °C. Filtrou-se a solução e ao filtrado adicionou-se n-hexano à temperatura de 35 °C (previamente filtrado) sob agitação e fluxo de nitrogênio, formando-se uma suspensão. Resfriou-se a suspensão à temperatura de 0 a 5 °C em banho de gelo. Os cristais obtidos foram separados por filtração, lavados com n-hexano à temperatura de 0 a 5 °C, secados à pressão reduzida e armazenados em dessecador, com pentóxido de fósforo.

3.2.2.1.3. Recristalização em tolueno

A recristalização foi realizada através solubilização da amostra comercial de tibolona em tolueno previamente aquecido à temperatura de 50 a 55 °C. Filtro-se a solução e resfriou-se o filtrado em repouso até que fosse atingida a temperatura ambiente. A solução então foi colocada sob refrigeração (2-8 °C) até ocorrer a cristalização. Os cristais obtidos foram separados por filtração, lavados com tolueno à temperatura de 0 a 5 °C, secados à pressão reduzida e armazenados em dessecador, com pentóxido de fósforo.

3.2.3. Técnicas de caracterização dos cristais

3.2.3.1. Análise elementar

O teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio da matéria-prima e dos produtos de recristalização foi obtido utilizando-se o equipamento Elemental Analyser 2400 CHN (PerkinElmer) na central analítica do IQ-USP.

3.2.3.2. Difratometria de raios X pelo método do pó

As amostras foram prensadas em um porta-amostras de plástico e os dados foram coletados em um difratômetro Siemens/Bruker modelo D5000, na radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), operando com 40 KV e 40 μA de tensão e corrente do tubo, respectivamente. A varredura foi feita no intervalo de 5 a 90 $^{\circ}(2\theta)$, com um passo de 0,02 $^{\circ}(2\theta)$ e 5 seg/ passo. Os resultados do refinamento foram obtidos a partir dos programas GSAS (LARSON; VON DREELE, 2000) com a interface gráfica EXPGUI (TOBY, 2001), TOPAS Academic v4.1 (COELHO, 2007) e das estruturas cristalinas descritas na literatura (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELEN, 1984; SCHOUTEN; KANTERS, 1991). Os ensaios e refinamentos foram realizados no laboratório de difração de raios X do Instituto de Geociências da USP e no Laboratório Computacional de Análises Cristalográficas e Cristalinas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

3.2.3.3. Termogravimetria (TG) / Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG/DTG foram obtidas em equipamento TGA-50 da Shimadzu no LATIG-IQ-USP, na faixa de temperatura de 25 a 900 $^{\circ}\text{C}$, $\beta=10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera inerte de N_2 e massa de amostra de cerca de 5 mg em cadinho de platina. Os estudos cinéticos (não-isotérmicos) de decomposição foram realizados variando-se as razões de aquecimento em 2, 5, 10, 15 e 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. A seleção do modelo cinético, para o cálculo da constante de velocidade (k) e da energia de ativação, foi realizada por simulação computacional, utilizando o método de Ozawa (OZAWA, 1965). Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha base do sistema. A calibração do equipamento TGA-50 foi realizada conforme a norma ASTM (E1582–04); para verificação do sistema utilizou-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado com pureza 99,9%.

3.2.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas no equipamento DSC-50 da Shimadzu no LATIG-IQ-USP, na faixa de temperatura de 25 a 200 °C, $\beta = 10$ °C/min (estudo exploratório) / $\beta = 2$ °C/min (estudo das transições de fase) sob atmosfera inerte de N₂ e massa de amostra de cerca de 2 mg em cadinho de alumínio parcialmente fechado. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para se avaliar a linha base do sistema. A célula DSC foi calibrada (antes dos experimentos) e verificada a sua calibração (depois dos experimentos), empregando as substâncias padrão índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6$ °C; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,7$ J.g⁻¹) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5$ °C) metálicos com pureza de 99,99 %.

3.2.3.5. Microscopia Raman

As análises por microscopia Raman foram feitas no LEM-IQ-USP em equipamento FT-Raman Bruker RFS-100/S, dotado de detector de Ge refrigerado por nitrogênio líquido. Os espectros foram registrados de 100 a 3400 cm⁻¹, com excitação feita em 1064 nm (laser de Nd³⁺/YAG) e as amostras não sofreram qualquer tipo de preparação prévia.

3.2.3.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos na empresa Biolab Sanus Farmacêutica Ltda, em um espectrômetro por transformada de Fourier Perkin Elmer, modelo Spectrum One, equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de ZnSe, à temperatura ambiente, na faixa de 4000 a 650 cm⁻¹ e com resolução de 4 cm⁻¹. O cristal foi limpo entre as leituras das amostras com papel absorvente. Para cada espectro foram realizadas oito varreduras, sendo que a combinação de todas as varreduras resulta em um espectro médio, representativo da amostra analisada. Os espectros das amostras diluídas em KBr (sob a forma de pastilha) e clorofórmio foram obtidos sob as mesmas condições de análise e no mesmo equipamento, utilizando-se os acessórios adequados.

3.2.3.7. Microscopia óptica de luz polarizada (MOLP)

As análises foram realizadas em um microscópio petrográfico binocular do IGC-USP, com iluminação de luz transmitida marca Zeiss, modelo Axioplan.

3.2.3.8. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

As amostras foram montadas em suportes de alumínio (“stubs”) em fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas com platina (metalizador Bal-Tec modelo MED020), com um filme de aproximadamente 15 nm de espessura. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura LEO STEREOSCAN modelo 440, com filamento de tungstênio, operando em alto vácuo. O modo de operação foi de 10 kV, utilizando-se detector de elétrons secundários. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Tecnológica da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Análise Elementar

Os resultados de análise elementar mostram que os cristais de tibolona obtidos em n-hexano (HEX), acetona (ACE) e tolueno (TOLU) possuem a mesma composição em relação aos teores de C e H em concordância aos relatados em literatura para tibolona (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Resultados de análise elementar dos cristais de tibolona obtidos em acetona, tolueno e n-hexano comparados ao descrito no Merck Index (MERCK index, 1989).

Elemento	Merck Index	ACE	TOLU	HEX
C (%)	80,73	80,60	80,85	80,39
H (%)	9,03	9,09	9,00	8,61

3.3.2. Microscopia

As fotomicrografias ópticas de luz polarizada e eletrônica de varredura das amostras ACE, TOLU e HEX são apresentadas nas Figuras 3.6 e 3.7.

Todas as amostras apresentam anisotropia óptica (birrefringência) e são biaxiais, indicando que se trata de sistemas monoclinicos, triclinicos ou ortorrômbicos. A partir da constatação da existência de um ângulo de extinção oblíqua entre 15° a 38° em seções longitudinais e da análise da relação existente entre os eixos cristalográficos “a”, “b” e “c” com os eixos X, Y e Z da indicatriz óptica foi possível se determinar que os cristais da amostra ACE pertencem ao sistema monoclinico e os da amostra TOLU pertencem ao sistema triclinico. Um esquema de tal determinação é ilustrado na Figura 3.8. Os cristais HEX, por possuírem maior quantidade da forma triclinica, como mostram os resultados da difratometria de raios X, apresentam-se com as relações cristalográficas e ópticas características do sistema triclinico. Os dados de caracterização por microscopia óptica das amostras ACE, TOLU e HEX estão listados na Tabela 3.5.

Os cristais obtidos em hexano e tolueno apresentaram hábitos alongados e prismáticos, muito semelhantes entre si. Stoica e colaboradores (STOICA et al., 2005a) descrevem hábitos aciculares para os cristais obtidos de n-hexano e hábitos placóides para os de acetona (Figuras 3.9-A e 3.9-B), muito semelhantes aos observados. Para os obtidos em tolueno, entretanto, os autores descrevem cristais de hábito maciço, conforme apresentado na Figura 3.9-C (STOICA et al., 2005a). Tais diferenças morfológicas devem residir nas condições de cristalização diferentes utilizadas pelos autores, como, por exemplo, a cristalização *in situ* em celas silanizadas.

Figura 3.6. Fotomicrografias ópticas dos cristais obtidos em hexano: A) luz transmitida, nicóis cruzados, aumento de 10 vezes; B) luz transmitida, nicóis descruzados, aumento de 10 vezes. C) Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura dos cristais obtidos em hexano, aumento de 700 vezes.

Figura 3.7. Fotomicrografias ópticas dos cristais de tibolona (50X): luz transmitida, nicóis descruzados, (A) obtidos em acetona, (D) obtidos em tolueno; luz transmitida, nicóis cruzados, (B) obtidos em acetona, (E) obtidos em tolueno; Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura dos cristais de tibolona: obtidos em acetona (C), aumento de 1.000 vezes; obtidos em tolueno (F), aumento de 700 vezes.

Figura 3.8. Esquema da orientação do cristal triclínico de tibolona (Contribuição do Professor Emérito José Moacyr Vianna Coutinho do IGC-USP).

Figura 3.9. Hábitos cristalinos obtidos por Stoica e colaboradores em acetona (A), n-hexano (B) e tolueno (C) (STOICA et al., 2005a, 2006).

Tabela 3.5 - Dados de caracterização por microscopia óptica das amostras de tibolona.

Amostra	Forma do cristal/Hábito	Índice de Refração			Birrefringência (Δ)	2V (°)	Sinal Óptico	Sistema
		Mínimo n_{α}	Intermediário n_{β}	Máximo n_{γ}				
ACE	Tabular, placóide, pinacoidal {100}, {010},{001}	1,570	n.d	1,610	0,040	n.d	n.d	Monoclínico
TOLU	Laminado, pinacoidal	1,552(5)	1,592(5)	1,640(5)	0,088(5)	85-90(5)	2Vz (+)	Triclínico
HEX3	Laminado, pinacoidal	1,550	1,594(3)	1,640(3)	0,090(5)	~90 (5)	neutro	Triclínico

3.3.3 Difractometria de raios X pelo método do pó

3.3.3.1 Padrões de difração das formas cristalinas puras

A Figura 3.10 apresenta os padrões de difração de raios X das amostras dos cristais de tibolona, obtidos de acetona e tolueno, bem como os padrões calculados a partir da estrutura cristalina reportada (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELEN, 1984; SCHOUTEN; KANTERS, 1991) para os sistemas monoclinico e triclinico desse esteróide. Os difratogramas das amostras estão em conformidade com os padrões calculados. Os dados de difração de raios X pelo método do pó são apresentados no Quadro 3.1 e as raia de difração características de cada sistema cristalino são ilustradas na Figura 3.10-C.

3.3.3.2 Quantificação de fases pelo método de Rietveld

Boerrigter e colaboradores (2002b) reportaram que em função da similaridade das duas estruturas dos polimorfos da tibolona, a maioria dos picos de difração da fase triclinica sobrepõe os da fase monoclinica, mas não vice-versa. Assim, segundo os autores, não é possível a detecção da presença de traços da fase triclinica em uma amostra monoclinica por difratometria de raios X. Entretanto, uma vez que o método de Rietveld utiliza um algoritmo que ajusta todo o perfil difratométrico aos parâmetros estruturais das fases constituintes e todos os picos de cada fase são explicitamente considerados, torna-se possível a quantificação de fases, desde que haja resolução adequada.

Os refinamentos pelo método de Rietveld (Tabela 3.6) confirmaram a pureza de fase de 100% das amostras ACE e TOLU, não havendo a formação da mistura de polimorfos (Figura 3.11). Os cristais da amostra ACE possuem sistema monoclinico e os da amostra TOLU são do sistema triclinico. Tal atribuição é reforçada pelos resultados obtidos pelas outras técnicas utilizadas. A amostra HEX apresentou mistura dos polimorfos pelo refinamento. Os resultados da caracterização são discutidos no capítulo 6.

Figura 3.10. Comparação entre os resultados experimentais (OBS) e calculados a partir das informações das estruturas (CALC) das formas cristalinas da tibolona: (A) monoclinico (padrão calculado) *versus* amostra obtida em acetona (ACE); (B) triclinico (padrão calculado) *versus* amostra obtida em tolueno (TOLU); (C) sobreposição dos difratogramas experimentais com a identificação dos picos característicos para cada sistema cristalino (M – monoclinico ; T – triclinico), conforme identificado nos difratogramas calculados.

Monoclínico (calc)			Triclinico (calc)			ACE (obs)			TOLU (obs)		
2 θ^1	d-space	Int (rel) ²	2 θ^1	d-space	Int (rel) ²	2 θ^1	d-space	Int (rel) ²	2 θ^1	d-space	Int (rel) ²
8,58	10,30	0,65	---	---	---	8,52	10,38	17,61	---	---	---
---	---	---	8,72	10,13	2,82	---	---	---	8,70	10,16	4,45
12,88	6,87	0,90	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	13,49	6,56	25,47	---	---	---	13,48	6,57	25,12
13,53	6,54	1,65	---	---	---	---	---	---	---	---	---
13,70	6,46	65,61	---	---	---	13,66	6,48	78,82	---	---	---
13,81	6,41	7,20	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	13,96	6,34	9,85	---	---	---	13,96	6,34	13,22
13,98	6,33	40,07	---	---	---	13,96	6,34	48,48	---	---	---
---	---	---	---	---	---	14,16	6,25	13,26	---	---	---
14,20	6,23	5,44	---	---	---	14,22	6,23	13,75	---	---	---
14,47	6,12	23,24	---	---	---	14,44	6,13	29,35	---	---	---
14,99	5,91	59,69	---	---	---	14,96	5,92	74,43	---	---	---
---	---	---	15,20	5,82	82,87	---	---	---	15,22	5,82	76,58
15,25	5,81	71,46	---	---	---	15,22	5,82	75,22	---	---	---
---	---	---	15,94	5,56	2,91	---	---	---	16,02	5,53	7,67
16,04	5,52	42,27	---	---	---	16,02	5,53	46,31	---	---	---
---	---	---	16,23	5,46	48,30	16,22	5,46	28,82	16,22	5,46	39,33
16,28	5,44	28,25	---	---	---	16,26	5,45	32,35	16,26	5,45	36,38
17,20	5,15	8,03	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17,29	5,12	7,68	---	---	---	---	---	---	---	---	---
17,30	5,12	33,09	---	---	---	17,30	5,13	78,78	---	---	---
17,43	5,08	100,00	---	---	---	17,42	5,09	100,00	---	---	---
---	---	---	17,49	5,07	7,50	---	---	---	---	---	---
17,52	5,06	13,95	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	17,59	5,04	100,00	---	---	---	17,60	5,04	100,00
---	---	---	17,68	5,01	3,30	---	---	---	---	---	---
17,83	4,97	93,93	---	---	---	17,82	4,98	89,25	---	---	---
18,47	4,80	28,34	18,47	4,80	39,52	18,48	4,80	29,68	18,48	4,80	31,90
18,72	4,74	2,07	---	---	---	---	---	---	---	---	---
18,93	4,69	3,18	---	---	---	---	---	---	---	---	---
19,33	4,59	19,69	---	---	---	19,32	4,59	22,66	---	---	---
20,28	4,38	4,30	---	---	---	---	---	---	---	---	---
20,40	4,35	15,24	---	---	---	20,36	4,36	20,73	---	---	---
20,47	4,34	2,23	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	20,54	4,32	2,55	---	---	---	---	---	---
---	---	---	20,80	4,27	11,38	---	---	---	20,80	4,27	11,59
---	---	---	21,18	4,19	10,31	---	---	---	21,20	4,19	7,71
21,26	4,18	7,55	---	---	---	21,20	4,19	10,22	---	---	---
21,37	4,15	11,13	---	---	---	21,28	4,18	12,97	---	---	---
21,55	4,12	0,18	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21,62	4,11	0,49	---	---	---	---	---	---	---	---	---
21,70	4,09	1,62	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	---	---	---	21,92	4,05	48,36	21,92	4,05	4,49
---	---	---	21,94	4,05	3,78	21,94	4,05	43,27	21,94	4,05	4,77
21,95	4,05	31,97	---	---	---	---	---	---	---	---	---
22,12	4,01	14,18	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	22,13	4,01	1,07	---	---	---	---	---	---
22,24	3,99	0,10	---	---	---	22,36	3,98	2,34	---	---	---

continua

Monoclínico (calc)			Triclínico (calc)			ACE (obs)			TOLU (obs)		
2 θ^1	d-space	Int (rel) ²	2 θ^1	d-space	Int (rel) ²	2 θ^1	d-space	Int (rel) ²	2 θ^1	d-space	Int (rel) ²
22,96	3,87	2,01	---	---	---	22,94	3,88	6,32	---	---	---
---	---	---	22,98	3,87	3,02	---	---	---	22,98	3,87	2,74
22,99	3,86	2,24	---	---	---	22,98	3,87	5,21	---	---	---
23,70	3,75	0,88	---	---	---	23,72	3,75	7,27	---	---	---
---	---	---	23,73	3,75	7,03	---	---	---	23,72	3,75	6,35
23,87	3,73	5,80	---	---	---	23,82	3,74	15,89	---	---	---
23,87	3,72	7,52	---	---	---	---	---	---	---	---	---
---	---	---	24,22	3,67	8,40	---	---	---	24,24	3,67	10,04
24,49	3,63	0,54	---	---	---	---	---	---	---	---	---
24,94	3,57	7,14	---	---	---	24,88	3,58	8,46	---	---	---
25,53	3,49	2,08	---	---	---	25,28	3,52	1,81	---	---	---
25,68	3,47	3,28	---	---	---	25,62	3,48	8,17	---	---	---
25,92	3,43	1,99	---	---	---	---	---	---	---	---	---
26,08	3,41	6,63	---	---	---	26,08	3,42	14,16	---	---	---
26,14	3,41	5,74	---	---	---	26,26	3,39	2,34	---	---	---
---	---	---	26,23	3,39	9,39	---	---	---	26,08	3,42	1,35
---	---	---	26,37	3,38	0,43	---	---	---	26,26	3,39	5,48
---	---	---	26,70	3,34	9,03	---	---	---	26,70	3,34	8,22

conclusão

Quadro 3.1 - Dados de difração de raios X pelo método do pó das formas cristalinas de tibolona
(¹ Radiação CuK α (λ = 1.5418 Å) ; ² Intensidade relativa ao pico de maior reflexão registrada).

Tabela 3.6 - Indicadores de qualidade do refinamento obtido na quantificação das fases monoclinica e triclínica das amostras obtidas em acetona (ACE) e tolueno (TOLU).

Indicador	Valores em %	
	ACE	TOLU
R _{wp}	13,710	13,334
R _{Bragg}	1,748	2,001
χ^2	3,52	3,17

Figura 3.11. Gráficos de Rietveld das amostras obtidas em acetona (ACE) e tolueno (TOLU). Ambas as amostras apresentam pureza de fase 100%. Refinamentos realizados com o programa TOPAS Academic v4.1 (Coelho, 2007).

3.3.4 Espectroscopia vibracional

3.3.4.1 Infravermelho

3.3.4.1.1 Espectros em solução de CCl_4

A Figura 3.12 apresenta os espectros no infravermelho das amostras de tibolona através da solubilização dos cristais ACE e TOLU em CCl_4 . Os espectros não apresentaram diferenças entre si, confirmando, dentro dos limites de detecção da técnica, de que se trata da mesma espécie. Tal semelhança entre os espectros dos diferentes cristais ocorre em função da destruição dos retículos cristalinos pela solubilização das amostras, o que anula o efeito do estado sólido/polimorfismo no espectro.

3.3.4.1.2 Espectro de ATR

Os espectros de ATR obtidos confirmam a identificação da tibolona, conforme ilustrado na Figura 3.13. A escolha da faixa espectral foi baseada em dados da literatura sobre as diferenças entre os espectros dos polimorfos de tibolona (SAS,1993).

O espectro do cristal monoclinico difere daquele do cristal triclinico pela posição das bandas entre 3200 e 3450 cm^{-1} , conforme mostrado na Tabela 3.7.

Tabela 3.7– Diferenças nos espectros entre as formas triclinica (TOLU) e monoclinica (ACE) da tibolona na região de 3200 a 3500 cm^{-1} .

Número de onda (cm^{-1})	
ACE	TOLU
3251	-
3270	3265
3407	-
3488	-
-	3489

As bandas em 3489 e 3265 cm^{-1} no cristal triclinico (TOLU) são atribuídas aos estiramentos OH e CH (tripla), respectivamente. No cristal monoclinico (ACE) as bandas em 3251 e 3270 cm^{-1} são desdobramentos do estiramento CH (tripla), bem como a banda em 3407 e 3488 cm^{-1} são os desdobramentos do estiramento OH. Esses desdobramentos ocorrem como reflexo das duas conformações possíveis para o anel A no cristal monoclinico e ilustram como o arranjo cristalino pode influenciar diferentes regiões do espectro vibracional.

Também é possível inferir que não existem ligações de hidrogênio fortes na estrutura cristalina dos polimorfos de tibolona, uma vez que não há na região de 3200 a 3500 cm^{-1} as bandas largas e intensas de estiramento OH, características desse tipo de interação.

3.3.4.1.3 Microscopia Raman

Os espectros Raman dos cristais de tibolona são apresentados na Figura 3.14. Os espectros foram originalmente registrados entre 100 e 3400 cm^{-1} , mas a região mostrada na Figura é aquela que apresenta as alterações mais significativas, em acordo com dados da literatura para os espectros Raman de polimorfos de tibolona (BOERRIGTER et al., 1999, 2002a, 2002b).

O cristal triclinico apresenta apenas duas bandas de espalhamento na região de interesse. A banda em 1715 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da carbonila e aquela em 1661 cm^{-1} à dupla ligação entre os carbonos 5 e 10. Já o cristal monoclinico é diferenciado do triclinico por apresentar um desdobramento na banda da dupla ligação entre os carbonos 5 e 10, com máximos em 1664 e 1657 cm^{-1} , fenômeno também observado nos espectros no infravermelho. A Figura 3.15 esquematiza as duas conformações possíveis meia-cadeira que o anel A pode assumir, responsáveis pela presença dos desdobramentos nos espectros.

Os trabalhos descritos na literatura não utilizam a região de 1700 cm^{-1} a 1720 cm^{-1} para identificação dos polimorfos, em função dos estudos serem conduzidos em soluções de acetona, a qual apresenta banda nessa região. No estado sólido, entretanto, a carbonila da forma monoclinica da tibolona tem sua banda deslocada para 1710 cm^{-1} em relação à banda 1715 cm^{-1} da forma triclinica, podendo essa ser uma região interessante para a diferenciação de polimorfos desse esteróide.

Figura 3.12. Espectros de FTIR (não normalizados) das amostras TOLU e ACE em solução de CCl_4 .

Figura 3.13. Espectros de ATR (não normalizados) entre as formas triclinica (TOLU) e monoclinica (ACE) da tibolona na região de 3200 a 3500 cm^{-1} .

Figura 3.14. Espectros Raman entre as formas triclínica (TOLU) e monoclinica (ACE) da tibolona na região de 1600 a 1800 cm⁻¹.

Figura 3.15. Esquema das duas conformações possíveis meia-cadeira do anel A da tibolona (DECLERCQ; VAN MEERSSCHE; ZEELLEN, 1984).

3.3.5 Análise térmica

3.3.5.1 Termogravimetria/Termogravimetria derivada

As curvas TG/DTG obtidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de N_2 indicam que o processo de decomposição térmica da amostra do cristal triclinico obtido em tolueno (amostra TOLU) ocorreu em três etapas, conforme apresentado na Figura 3.16. A primeira etapa, entre 180 e $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_1 = 24,2\%$), a segunda, entre 350 e $530\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_2 = 60,5\%$), e a terceira, entre 530 e $790\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_3 = 14,7\%$).

Para os cristais monoclinicos obtidos em acetona (amostra ACE), este processo também ocorreu em três etapas de decomposição térmica (Figura 3.16). A primeira etapa ocorreu entre 185 e $360\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_1 = 56,8\%$); a segunda etapa ocorreu entre 360 e $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_2 = 36,6\%$); a última etapa de decomposição ocorreu entre 500 e $790\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta m_3 = 6,5\%$). Estes resultados indicam que a forma triclinica da tibolona é estável termicamente entre 25 e $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a forma monoclinica entre 25 e $185\text{ }^{\circ}\text{C}$. O processo de decomposição térmica de ambas as formas se inicia em temperaturas próximas. Porém, a primeira etapa de perda de massa para a forma monoclinica e a segunda etapa de perda de massa para a forma triclinica são mais acentuadas e isso, numa primeira avaliação, permite diferenciá-las.

Figura 3.16. Curvas TG/DTG das formas monoclinica (ACE) e triclinica (TOLU) de tibolona em atmosfera dinâmica de N_2 ($50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, massa de $\sim 5\text{ mg}$ em cadinho de platina.

A Tabela 3.8 apresenta os dados termogravimétricos obtidos para a decomposição térmica dos polimorfos monoclinico e triclinico da tibolona.

Tabela 3.8 – Dados de termogravimetria dos polimorfos de tibolona em atmosfera dinâmica de N₂.

Amostra	1º pico DTG (°C)	Δm_1 (%)	Δm_2 (%)	Δm_3 (%)
ACE	295	56,8	36,6	6,5
TOLU	289	24,2	60,5	14,7

3.3.5.2 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas DSC dos polimorfos de tibolona obtidas a 10 °C.min⁻¹ são mostradas na Figura 3.17. As curvas TG sobrepostas indicam que não ocorre perda de massa significativa na região dos eventos endotérmicos observados para ambos os polimorfos. O cristal monoclinico apresenta um pico endotérmico fino, bem definido, correspondente à temperatura de fusão (T_{onset}) em 169 °C ($\Delta H_{fusão} = 29,8$ kJ.mol⁻¹), sem apresentar qualquer transição de fase anterior a este evento. Para o cristal triclinico ocorre inicialmente com $T_{onset} = 148$ °C ($\Delta H_{t1} = 21,0$ kJ.mol⁻¹) um evento endotérmico mais intenso com aspecto característico de picos de fusão, seguido por um segundo evento endotérmico fraco a 163 °C ($\Delta H_{t2} = 3,0$ kJ.mol⁻¹), indicando a ocorrência de transições de fase (possivelmente fusão ou transições sólido-sólido). Estes valores são comparáveis aos já previamente relatados por Boerrigter e colaboradores em 2002 (2002a), que utilizaram razão de aquecimento de 5 °C.min⁻¹. Nesta condição a forma monoclinica apresentou ponto de fusão a 170 °C e a forma triclinica apresentou o primeiro evento em 144 °C e o segundo com temperatura não informada.

Este primeiro evento da forma triclinica foi descrito como uma transição sólido-sólido, sendo a temperatura de 144 °C a temperatura necessária para induzir a transição de fase (BOERRIGTER et al., 2002a). Segundo os autores, conforme resultado de microscopia óptica com estágio de aquecimento acoplada com infravermelho, esta transição corresponde à transição sólido-sólido da forma triclinica para a forma monoclinica, indicativa de sistema enantiotrópico. Além disso, os autores relatam a ocorrência de efeito de histerese, uma vez que o evento não se

mostra reversível ao se resfriar abaixo da temperatura ambiente; fato esperado, segundo os dados de solubilidade. Nesse trabalho as curvas DSC, as micrografias e os espectros das transições não são apresentados. Entretanto, a curva DSC do cristal triclinico claramente exhibe um ombro indicativo da sobreposição de eventos. Ao se avaliar a derivada primeira desta curva nota-se a ocorrência de dois eventos, ao invés de apenas um, como descrito anteriormente para o sistema triclinico. Críticas a este artigo também podem ser realizadas em relação à terminologia “termograma” em referência às curvas DSC, pois está em desacordo com o recomendado pelas normas da ICTA (*International Confederation for Thermal Analysis*).

Figura 3.17. Curvas DSC e TG dos polimorfos monoclinico (linha azul) e triclinico (linha vermelha) da tibolona em atmosfera dinamica de N₂ (100 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

3.3.5.3 Estudos cinéticos de decomposição térmica

Visando maior entendimento das diferenças apresentadas pelos cristais monoclinico e triclinico da tibolona, utilizou-se, em experimentos de aquecimento dinâmico, o método não isotérmico estabelecido por Ozawa (OZAWA, 1965) para a determinação das energias de ativação e da ordem das reações envolvidas nos dois processos de decomposição térmica. Os dados foram obtidos a partir do aquecimento das amostras até 900°C nas razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 7,5; 15; 20°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de N₂. Os gráficos apresentados nas Figuras 3.18 e 3.19 ilustram o processo de obtenção do modelo da reação, $g(x)$, e os dois parâmetros de Arrhenius (A e E_a), conjunto denominado por triplete cinético. Estes foram gerados por meio do programa de análise cinética desenvolvido pela Shimadzu, que utiliza o modelo proposto por Ozawa (OZAWA, 1965). Os valores de A , E_a e n (ordem de reação) estão descritos na Tabela 3.9.

O termo pré-exponencial ou fator frequência (A) fornece uma medida da frequência de ocorrência da situação do primeiro evento de decomposição observado. Pode-se notar que a decomposição da forma monoclinica apresenta um fator frequência em torno de seis vezes maior que a da triclinica, indicando maior probabilidade desta reação ocorrer.

A energia de ativação (E_a) é descrita como a barreira de energia requerida para converter reagentes em produtos; ou seja, no caso, para que sejam gerados os produtos de decomposição térmica. As diferenças no comportamento de fusão e a presença de transições de fases nos cristais metaestáveis triclinicos, como mostram os experimentos de DSC (Figura 3.17), são capazes de produzir sítios de variada reatividade em regiões diferentes das amostras. Observou-se, dessa maneira, para a decomposição térmica da amostra triclinica, energia de ativação aproximadamente 5% menor que a da forma monoclinica, ratificando a estrutura mais estável desta última.

A ordem da reação (n) pode ser definida como a variação da velocidade da reação com a concentração dos reagentes. A reação de ordem zero ocorre quando a perda ou a decomposição do fármaco independe da concentração de reagente e é constante com relação ao tempo. A cinética de primeira ordem pode ser observada quando a degradação do fármaco for diretamente proporcional à concentração remanescente com relação ao tempo. Por fim, a cinética de segunda ordem é

verificada quando a velocidade de reação for proporcional ao quadrado da concentração atual do fármaco. Os resultados que apresentam melhor correlação com a curva teórica sugerem uma reação de primeira ordem para o processo de decomposição dos cristais monoclinicos e de segunda ordem para os cristais triclinicos obtidos em tolueno. Este dado revela a grande interferência da massa da amostra no processo de decomposição térmica da tibolona, especialmente para os cristais triclinicos.

Tabela 3.9 - Determinação dos parâmetros cinéticos da primeira etapa de decomposição térmica dos polimorfos da tibolona.

Polimorfo	DTG _{pico}	Ea (kJ mol ⁻¹)	Fator frequência (min ⁻¹)	Ordem da reação
Monoclínico	295	95	1,02x10 ⁸	1,0
Triclínico	289	91	1,82x10 ⁷	2,0

Figura 3.18. Estudo cinético de decomposição do cristal monoclinico da tibolona (forma I - amostra ACE): a) Curvas TG da forma monoclinica em atmosfera dinamica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 7,5; 15; 20°C.min⁻¹, massa de ~ 5 mg e cadinho de platina; b) Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura; c) Gráfico da função $G(x)$ do inverso da temperatura para a forma monoclinica.

Figura 3.19. Estudo cinético de decomposição do cristal triclinico da tibolona (forma II - amostra TOLU): a) Curvas TG da forma triclinica em atmosfera dinamica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razões de aquecimento de 2,5; 5,0; 7,5; 15; 20°C.min⁻¹, massa de ~ 5 mg e cadinho de platina; b) Curva do logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura; c) Gráfico da função $G(x)$ do inverso da temperatura para a forma triclinica.

3.4. CONCLUSÃO

Os cristais de tibolona obtidos da recristalização em tolueno e acetona foram caracterizados por TG/DTG, DSC, difratometria de raios X pelo método do pó, microscopia Raman, espectroscopia de absorção no infravermelho, microscopia óptica com luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados permitem verificar a pureza cristalina das amostras e mostram as características morfológicas e físico-químicas específicas que permitem diferenciá-las, como: hábito cristalino, índice de refração, espalhamento Raman e absorção no infravermelho, comportamento térmico, distâncias interplanares, etc.

O método de Rietveld mostrou-se uma ferramenta aplicável para o estudo quantitativo de fases de fármacos desde que se conheça a estrutura cristalina das fases envolvidas.

Os estudos cinéticos de decomposição térmica indicaram menor estabilidade para os cristais obtidos em tolueno, triclínicos, em comparação com os obtidos em acetona, monoclínicos.

O evento endotérmico da forma triclínica na região de 144°C, atribuído à transição sólido-sólido na literatura, foi confirmado, porém com indícios de existir mais eventos na região que não foram descritos, necessitando de uma investigação mais detalhada.

3.5. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.136, de 29 de maio de 2003**. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=7914&word=>. Acesso em: 20 out. 2009.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.16, de 02 de março de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos, anexo I. Acompanha esse Regulamento o Anexo II, intitulado "Folha de rosto do processo de registro e pós-registro de medicamentos genéricos". Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=25960>. Acesso em: 20 out. 2009.

ARAUJO, G. L. B; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, cap.4, p.32-65. (Coleção Ciências Farmacêuticas).

AUER, M. E.; GRIESSER U. J., SAWATZKI J. Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**. v.661/662, p.307-317, 2003.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P. The wolf in sheep's clothing; the morphologic mystery of a polymorphic steroid. In: **Proceedings**. Cambridge, 1999.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M. In Situ Observation of epitaxial polymorphic nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, n.18, p.4725-4731, 2002.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; VERWER P.; BENNEMA, P. Pseudomorphic Crystal Growth of the Model Steroid Methyl Analogue of Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, p.13224-13230, 2002.

BUGAY, D. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p.43-65, 2001.

BURGER, A; RAMBERGER, R. On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. II. **Mikrochimica Acta**, v.72, n.3/4, p. 273-316, 1979.

BYRN, S. R.; PFEIFFE R. R.; STOWELL J. G. In: Solid-State NMR Spectroscopy. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd ed. West Lafayette: SSCI, 1999a. cap.9, p.139.

BYRN, S. R.; PFEIFFE R. R.; STOWELL J. G. In: Microscopy. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd ed. West Lafayette: SSCI, 1999b. cap.4, p.69-80.

BYRN, S. R.; PFEIFFE R. R.; STOWELL J. G. In: X-Ray Crystallography. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd.ed. West Lafayette: SSCI, 1999c. cap.2, p.47.

BYRN, S. R.; PFEIFFE R. R.; STOWELL J. G. In: Loss of Solvent of Crystallization. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd.ed. West Lafayette: SSCI, 1999d. cap.14, p.287.

BYRN, S. R.; PFEIFFE R. R.; STOWELL J. G. In: Infrared Spectroscopy of Solids. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2nd.ed. West Lafayette: SSCI, 1999e. cap.8, p.111-117.

COELHO, A. **Topas-Academic**. Version 4.1 Computer Software. Brisbane, Coelho Software, 2007.

DECLERCQ, J. P.; VAN MEERSSCHE, M.; ZEELEN, F. J. Conformational analysis of 3-oxo 5(10) – unsaturated steroids. Single-crystal X-ray structure - analysis of 17-hydroxy-7 α -methyl-19-nor-17- α -7-pregn-5(10)-en-20-yn-3-one (Org OD 14). **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v.103, n.5, p.145-147, 1984.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for Industry: ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information**. Rockville: FDA, 2007. 13p. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>. Acesso em: 20 out. 2009.

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis. Techniques and applications**. New York: Wiley-Interscience, 1986, p.137-149.

GIOLITO, I.; IONASHIRO, M.; A nomenclatura em análise térmica: parte II. **Cerâmica**, n.34, v.225, p.163-164, 1988.

GIRON D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochemica Acta**, n.248, p. 1-59, 1995.

GIRON, D. Monitoring of polymorphism – from detection to quantification. **Engineering in life sciences**, v.3, v.3, p. 103-112, 2003.

HALEBLIAN, J.; MCCRONE, W. Pharmaceutical applications of polymorphism. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.8, p.911-929, 1969.

HILL, R. J.; HOWARD, C. J. Quantitative phase analysis from neutron diffraction data using the Rietveld method. **Journal of Applied Crystallography**, v.20, p.467-474, 1987.

ICH. Quality Guidelines. **Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: Chemical substances (including Decision Trees)**. 1999. 25p. Disponível em: <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.html#Q6A>. Acesso em: 20 out. 2009.

JENNINGS, T. A. **Lyophilization - Introduction and Basic Principles**. 2ed. Interpharm Press Inc., 1999, 646p.

LAGOMARSINO, S.; CEDOLA, A.; DI FONZO, S.; JARK, W.; MOCELLA, V.; PELKA, J. B.; RIEKEL, C. Advances in microdiffraction with X-ray waveguide. **Crystal Research and Technology**, v.37, n.7, p.758-769, 2002.

LARSON, A.C.; VON DREELE, R.B. **GSAS General structure analysis system**. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory, 2000. (Report LAUR.86-748). Disponível em: <http://www.ccp14.ac.uk/ccp/ccp14/ftp-mirror/gsas/public/gsas/manual/GSASManual.pdf>. Acesso em: 20 out. 2009.

MERCK index 11th Ed., Merck & Co., Inc., Rahway, N. J., p.1485, 1989.

OZAWA, T., A new method of analyzing thermogravimetric data, **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 38 (11), p.1881-1886, 1965.

RUSTICHELLI, C.; GAMBERINI, G.; FERIOLI, V.; GAMBERINI, M. C.; FICARRA, R.; TOMMASINI, S. Solid-state study polymorphic drugs: carbamazepine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n.23, p.41-54, 2000.

SACCHETTI, M. Thermodynamic analysis of DSC data for acetaminophen polymorphs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 63, p.345 - 350, 2001.

SCHOUTEN, A.; KANTERS, J. A. Structure of the triclinic modification of 17 β -hydroxy-19-nor-7 α -methyl-17 α -pregn-5(10)-en-20-in-3-one (Org OD 14). **Acta Crystallographica Section C**, v.47, p.1754-1756, 1991.

SPONG, B. R.; PRICEB, C. P.; JAYASANKARA, A.; MATZGERB A. J.;HORNEDOA, N. R. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, p.241-274, 2004.

SAS, G. A. J. M. T. **Pharmaceutical composition which contains a pharmaceutically suitable carrier and the compound having the structure (7 α , 17 α)-17-hydroxy-7-methyl-19-nor-17-pregn-5(10)-en-20-yn-3-one**. EP Pat. 0389035, 12 Mar. 1993, 15 Dez. 1993. 13p.

STOICA, C.; VERWER, P.; MEEKS, H.; VAN HOOFF, P. J. C. M., KASPERSEN, F. M.; VLIEG, E. Understanding the effect of a solvent on the crystal habit. **Crystal Growth & Design**, v. 4, n.4, p.765-768, 2004.

STOICA, C.; TINNEMANS; P.; VERWER; MEEKS, H.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P.J.C.M.; KASPERSEN F.M. Epitaxial 2D Nucleation of Metastable Polymorphs: A 2D version of Ostwald's rule of stages. **Crystal Growth & Design**, v.5, n.3, p.975-981, 2005.

STOICA, C.; P. VERWER; MEEKS, H.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M.; KASPERSEN, F. M. Heterogeneous 2D nucleation of the stable polymorphic form on the metastable form. **Journal of Crystal Growth**, n.275, n.1/2, p.E1727-E1731, 2005.

STOICA, C.; P. VERWER; MEEKS, H.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M.; KASPERSEN F.M. Epitaxial 2D nucleation of the stable polymorphic form of the steroid 7 α MNa on the metastable form: Implications for Ostwald's rule of stages. **International Journal of Pharmaceutics**, n.309, n.1/2, p.16-24, 2006.

TOBY, B. H. EXPGUI, a graphical user interface for GSAS. **Journal of Applied Crystallography**, n.34, p.210-213, 2001.

WELLS, J. I. In: Microscopy. **Pharmaceutical preformulation**: the physicochemical properties of drug substances. New York: Ellis Horwood, 1988. cap.6. p.192-208. (Ellis Horwood books in biological sciences).

YAMAMURA, S.; MOMOSE, Y. Quantitative analysis of crystalline pharmaceuticals in powders and tablets by a pattern-fitting procedure using X-ray powder diffraction data. **International Journal of Pharmaceutics**, v.212, p.203-213, 2001.

YU, L.; REUTZEL, S. M.; STERPHENSON, G. A. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.1, n.3, p.118-127, 1998.

Capítulo IV

Estudos dos eventos térmicos do polimorfo triclínico da tibolona

Este capítulo apresenta breve introdução sobre os conceitos e a importância da caracterização das transições de fase em sistemas polimórficos. Em seguida, são apresentados os resultados dos estudos dos eventos térmicos observados em temperaturas elevadas para o polimorfo triclínico da tibolona.

"Eu não falhei, encontrei 10 mil soluções que não davam certo."
(Thomas A. Edison)

4.1. INTRODUÇÃO

Os sistemas polimórficos podem ser classificados, em termos de reversibilidade das transições de fase, como enantiotrópicos ou monotrópicos. Quando ocorrem transições de fases sólido-sólido reversíveis, diz-se que os polimorfos formam um sistema enantiotrópico. Neste sistema, ocorre uma transição em temperatura abaixo do ponto de fusão, a chamada temperatura de transição, sendo que uma das formas é a termodinamicamente estável abaixo da temperatura de transição e a outra é a forma termodinamicamente estável acima dessa temperatura (Figura 4.1b). Nos sistemas monotrópicos, o polimorfo de maior ponto de fusão é o mais estável durante toda a faixa de temperatura compreendida do zero absoluto até o ponto de fusão, sendo que as transformações espontâneas são irreversíveis e podem ocorrer somente da forma metaestável para estável. A situação monotrópica está representada na Figura 4.1a. Neste caso, não existe ponto de transição abaixo do ponto de fusão das duas formas polimórficas (MAO; PINAL; MORRIS, 2005).

Figura 4.1. Diagrama de fase: energia livre de Gibbs (G) *versus* temperatura (T) para sistemas monotrópicos (a) e enantiotrópicos (b) (MAO; PINAL; MORRIS, 2005).

Uma vez que a solubilidade é diretamente proporcional à energia livre de uma forma cristalina, a determinação das curvas de solubilidade é o método mais confiável de se determinar as energias livres dos polimorfos. A diferença de solubilidade de dois polimorfos é uma medida direta da ΔG entre eles. Embora a solubilidade absoluta de um polimorfo (e, portanto, sua velocidade de dissolução) dependa do solvente utilizado, a solubilidade relativa entre as formas cristalinas independe deste, ou seja, a razão entre as solubilidades de dois polimorfos é constante para uma dada temperatura, sendo esta razão uma constante termodinâmica que permite avaliar a estabilidade termodinâmica relativa entre eles. Uma forma que é termodinamicamente estável na temperatura e na pressão de medida é a que possui a menor energia livre e a menor solubilidade. No caso enantiotrópico, ambas as modificações possuem a mesma solubilidade na temperatura de transição. No caso monotrópico, o ponto de transição é virtual, pode ocorrer acima do ponto de fusão dos dois polimorfos ou abaixo do zero absoluto, sendo, portanto, que a forma mais estável possui invariavelmente a menor solubilidade (BEINSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999).

4.1.1 Aspectos práticos do monotropismo e enantiotropismo

O conhecimento da natureza enantiotrópica ou monotrópica do sistema pode ser utilizado para direcionar os processos de cristalização para obtenção de um polimorfo desejado, bem como a exclusão de um indesejado. Além disso, este conhecimento deve ser parte integrante da etapa de pré-formulação, de maneira a prever o comportamento da forma cristalina durante as etapas de fabricação. Para um sistema dimórfico (2 polimorfos) existem 4 possibilidades (BERNSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999):

- Polimorfo termodinamicamente estável

I) Sistema monotrópico: nenhuma transformação pode ocorrer para outra forma e nenhuma precaução necessita ser tomada a fim de se evitar transições polimórficas.

II) Sistema enantiotrópico: precauções devem ser tomadas para que as condições termodinâmicas (temperatura, pressão, umidade relativa, etc.) sejam mantidas de modo que a curva no diagrama G/T do polimorfo desejado se mantenha abaixo (menor potencial químico) da curva da outra forma cristalina.

- Polimorfo termodinamicamente instável (metaestável)

III) Sistema monotrópico: uma transformação controlada cineticamente pode ocorrer, levando à forma estável indesejada. Para prevenir tais transformações, condições drásticas deverão ser utilizadas para se reduzir os efeitos cinéticos (temperaturas muito baixas, condições muito secas, etc.).

IV) Sistema enantiotrópico: neste caso, todas as informações necessárias para se obter e se manter esta forma são essencialmente encontradas no diagrama de energia/temperatura para o polimorfo.

4.1.2. Estudo das transições de fase do polimorfo triclinico da tibolona

Experimentos de cristalização em acetona possibilitaram a identificação de uma transformação do tipo sólido-sólido da forma triclinica para monoclinica da tibolona (BOERRIGTER et al., 2002a). A partir da extrapolação do gráfico de van't Hoff (solubilidade *versus* $1/T$ para cada fase sólida), determinou-se que as formas monoclinica e triclinica da tibolona se relacionam enantiotropicamente, com a temperatura de transição de -52 ± 36 °C. No estado sólido a transição ocorreu mediada pela temperatura, a 144 °C, determinada por meio de experimentos por DSC. Em ambos os métodos, confirmou-se a relação enantiotrópica dos dois polimorfos. Um erro tão elevado na temperatura de transição pode ser atribuído à extrapolação dos dados experimentais acima de 10 K (BYRN; PFEIFFE; STOWELL, 1999).

Nos estudos realizados por Boerrigter e colaboradores (2002a) não foram apresentadas curvas termoanalíticas que permitissem visualizar a natureza e a ocorrência da transição de fase mediada pela temperatura na forma triclinica. No capítulo anterior foram apresentadas evidências de tal transição, porém, pela análise minuciosa das curvas DSC, foi possível perceber a ocorrência de sobreposição de eventos. Assim, esse capítulo dedica-se à separação e ao estudo dos novos eventos observados para o polimorfo triclinico.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas no equipamento DSC-50 da marca Shimadzu no LATIG-IQ-USP, na faixa de temperatura de 25 a 200 °C, $\beta = 2 \text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de N_2 ($100 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$) e massa de amostra de cerca de 2 mg em cadinho de alumínio parcialmente fechado. Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para se avaliar a linha base do sistema. A célula DSC foi calibrada (antes dos experimentos) e verificada a sua calibração (depois dos experimentos), empregando-se as substâncias padrão índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_{\text{fusão}} = 28,7 \text{ J}.\text{g}^{-1}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) metálicos com pureza de 99,99 %.

4.2.2. Calorimetria exploratória diferencial modulada (MDSC)

As curvas de DSC foram obtidas em um equipamento modelo Q2000 da marca TA instruments (Newcastle, EUA) com modulação de temperatura e sistema de refrigeração (RCS). A amplitude de modulação (MDSC) foi de $\pm 0,16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e o período de 60 segundos com $\beta = 1 \text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ na região de 140 a 170 °C. Utilizaram-se cadinhos fechados e o equipamento foi previamente calibrado com padrões de índio metálico e safira, respectivamente.

4.2.3. Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram feitas em um espectrômetro FT-Raman modelo FS-100 da Bruker equipado com detector CCD refrigerado por N_2 , radiação de excitação de 1064 nm Innova 400 da Coherent, média de 1000 espectros com resolução espectral de 4 cm^{-1} . As medidas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Molecular do Instituto de Química da USP - São Paulo.

4.2.4 Avaliação visual da fusão

A avaliação visual do comportamento de fusão da amostra foi realizada no equipamento Eletrothermal modelo 9100 até a temperatura de 200 °C. As medidas foram realizadas em tubo capilar com aproximadamente 1 mm de diâmetro.

4.2.5 Difratometria de raios X a altas temperaturas

As análises de fases por difração de raios X a altas temperaturas foram realizadas no Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Utilizou-se um difratômetro Bruker-AXS, modelo D8 Advance, com configuração Bragg-Brentano θ - θ , com tubo de cobre com filtro de níquel (radiação Cu- α) e detector de posição Braun (PSD), câmara de alta temperatura Anton Paar modelo HTK16, no qual a amostra na forma de pó foi posicionada em uma placa de Pt. A placa de Pt é aquecida por passagem controlada de corrente e um termopar de Pt-Pt10%Rh, soldado na placa de Pt, é utilizado para o controle e aferição da temperatura. A varredura foi feita no intervalo de 9 a 30 °(2 θ), com um passo de 0,0661 °(2 θ) e 10 seg/passo. As temperaturas de medida foram: 135, 150, 158 e 170 °C.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de se obter a separação dos eventos observados para o polimorfo triclinico, novas curvas DSC foram obtidas na razão de aquecimento de $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Figura 4.3-A).

Nessa razão de aquecimento foi possível visualizar que o cristal triclinico, na região de 140 a 170 $^{\circ}\text{C}$, apresenta, na realidade, três eventos endotérmicos. Os dados termodinâmicos das transições estão resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Dados das transições térmicas dos polimorfos de tibolona em atmosfera dinâmica de nitrogênio ($n = 2$).

Dado	1ª Transição	2ª Transição	3ª transição
$T_{\text{onset}} (^{\circ}\text{C})$	145,2 ($\pm 0,7$)	152,0 ($\pm 0,4$)	158,7 ($\pm 0,2$)
ΔH_t (kJ/mol)	0,9 ($\pm 0,0$)	6,5 ($\pm 0,6$)	2,0 ($\pm 0,1$)
$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$	148,2 (0,4)	154,6 (0,0)	161,9 (0,2)

Para se obter a avaliação em tempo real de cada evento foram realizadas medidas de difração de raios X em alta temperatura na mesma razão de aquecimento utilizada na curva DSC. As temperaturas de medida foram 135, 150, 158, 170 $^{\circ}\text{C}$, correspondentes aos patamares. A Figura 4.2 apresenta os difratogramas de raios X registrados.

Na temperatura de 135 $^{\circ}\text{C}$, antes das transições, observa-se que a amostra apresenta o padrão de difração característico da fase triclinica com apenas o deslocamento das raia para esquerda em função do aquecimento. Após o primeiro evento (150 $^{\circ}\text{C}$) a amostra assume um novo padrão de difração que não é característico da forma triclinica. Tal padrão também não coincide com aquele da amostra monoclinica. Na temperatura de 158 $^{\circ}\text{C}$, após o segundo evento endotérmico, o padrão é mantido, apenas com o desaparecimento da raia correspondente a aproximadamente $d = 5,9\text{ \AA}$, indicada na Figura 4.2 com uma seta. Na temperatura de 170 $^{\circ}\text{C}$, mesmo após a pressuposta fusão do material, percebe-se que a cristalinidade é mantida, assim como o mesmo padrão de difração. Após o resfriamento também não ocorreram alterações significativas do difratograma. Tal resultado contribui para a hipótese da formação de alguma outra espécie durante o aquecimento.

Figura 4.2. Difratogramas de raios X do polímero triclinico da tibolona obtidos em diferentes temperaturas. As temperaturas de medida foram: 25 °C antes do aquecimento (difratograma inferior), 135, 150, 158, 170 e 25 °C após resfriamento da amostra (difratograma superior). As setas indicam as distâncias interplanares em angstroms (Å).

Realizou-se também uma avaliação por espectroscopia Raman de amostras coletadas nas temperaturas em que ocorrem os patamares na curva DSC, ou seja, após a ocorrência de cada transição de fase. Os espectros Raman ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$) das amostras foram comparados aos espectros obtidos dos polímeros puros na região de interesse entre 1600 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} .

A sequência dos espectros Raman (Figura 4.3-B) mostra que o perfil dos espectros dos produtos I e II se aproxima ao perfil do espectro do material fundido (produto III) e não ao do polímero monoclinico. Além disso, os espectros da forma monoclinica (M) e da triclinica (T) não evidenciam as bandas observadas entre 1580

e 1640 cm^{-1} , como apresentado nos espectros dos três produtos coletados em função do aquecimento (Tabela 4.2).

Figura 4.3. Transições de fase da forma triclinica (TOLU). A) Curva DSC da forma triclinica, $\beta = 2^{\circ}\text{C min}^{-1}$, atmosfera dinâmica de N_2 , $m_{\text{amostra}} \sim 2\text{ mg}$ em cápsula de Al; I, II e III: patamares de temperaturas, após a ocorrência das transições de fase, em que houve a retirada de amostra para registro do espectro Raman. B) Espectros Raman das amostras I, II, III, monoclinica ACE (M) e triclinica TOLU (T), excitados em 1064 nm .

Tabela 4.2 – Posições dos máximos das bandas Raman na região de interesse entre 1600 cm^{-1} a 1800 cm^{-1} .

Amostra	Posições de máximos das bandas Raman (cm^{-1})
ACE	1710, 1664, 1657
TOLU	1715, 1661
Resíduo I	1714, 1672, 1622
Resíduo II	1712, 1663, 1620
Fundido III	1713 (largo), 1668, 1620, 1608

Assim, não foi encontrada a evidência da transição da fase triclinica para a fase monoclinica descrita na literatura, uma vez que semelhança dos espectros nos produtos coletados se aproxima daquele do cristal triclinico com modificações. Foi possível perceber o amarelamento da amostra durante o aquecimento, indicando alguma espécie de decomposição da tibolona, com a geração de algum grupo cromóforo conjugado, fato reforçado pelo aparecimento da banda em 1620 cm^{-1} .

Utilizando as bandas da região de 1330 cm^{-1} (região de estiramento C-C) e de 705 cm^{-1} (região de deformação angular C-H) como padrão de intensidade, visto que aparentemente não sofrem alterações de intensidade relativa durante o aquecimento, avaliou-se, com correção da linha de base, a região na qual ocorreram as alterações em relação à amostra coletada em $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, resíduo da primeira transição, em que apareceram as principais modificações. Nessa comparação (Figura 4.4) observa-se, na banda em 1661 cm^{-1} (estiramento C=C), o aparecimento de um ombro em 1671 cm^{-1} , além de ser possível visualizar mais claramente o surgimento da banda característica de estiramento C=C em 1620 cm^{-1} e a diminuição da intensidade do estiramento da carbonila, sem alargamento da banda.

Figura 4.4. Comparação entre os espectros Raman da amostra coletada a 150°C (linha azul) e da amostra triclinica inicial (linha vermelha).

A caracterização por DSC modulado (MDSC) também foi realizada com o objetivo de desvendar a natureza dos eventos térmicos observados. A MDSC é uma extensão da DSC convencional, que fornece informações sobre as características reversíveis e irreversíveis de eventos térmicos (COLEMAN, 1996). Esta técnica é um recurso de *software* que combina uma rampa de aquecimento linear ($^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$) com uma rampa de aquecimento tipo senoidal, com amplitude de oscilação da temperatura ($\pm^{\circ}\text{C}$) e do período de oscilação da temperatura (s). Na DSC convencional o sinal de fluxo de calor é resultado da soma de todos os eventos térmicos (reversíveis e irreversíveis). No MDSC o fluxo de calor total é decomposto, por transformada de Fourier, em fluxo de calor reversível (evento termodinâmico, capacidade calorífica) e fluxo de calor não reversível ou irreversível (evento de natureza cinética) (COLEMAN, 1996). Eventos como, por exemplo, a decomposição

ou a evaporação podem ser identificados no sinal do fluxo de calor não reversível. Outros eventos, como processos nos quais se pode retornar a condição inicial pelo mesmo caminho durante a oscilação (ex: alguns tipos de transições de fase puras), aparecem apenas no sinal do fluxo de calor reversível (SOUZA, 2001).

A Figura 4.5 ilustra a curva DSC obtida para a amostra do polimorfo triclinico no modo modulado. O primeiro evento apresenta um sinal predominantemente não reversível. Os processos irreversíveis comuns relacionados à curva endotérmica são a dessolvatação, a decomposição ou a evaporação. Como não foi evidenciada perda de massa, um processo não reversível de mudança na estrutura química parece a hipótese mais provável, visto que a observação visual evidenciou que a espécie tornou-se amarela. A natureza dos dois últimos eventos não é conclusiva, pois ambos possuem o componente cinético (sinal não reversível) e o termodinâmico (sinal reversível) acentuados. Isso pode ocorrer com eventos complexos de fusão ou fusão concomitante com algum evento não reversível dependendo da amplitude e da frequência de modulação utilizadas (SOUZA, 2001).

Figura 4.5. Curva DSC do polimorfo triclinico obtida no modo modulado.

Apesar dos avançados recursos tecnológicos de instrumentação necessários para o estudo de polimorfismo, a observação por técnicas visuais ainda é uma

alternativa válida, simples e de baixo custo, que deve ser empregada para se obter informações de grande relevância sobre os fenômenos polimórficos (BERNSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999). Nesse sentido, acompanhou-se em um capilar o comportamento da amostra triclinica durante o aquecimento na razão de aproximadamente $1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ na faixa dos eventos endotérmicos observados.

Na temperatura de aproximadamente $148\text{ }^{\circ}\text{C}$ ocorre o leve amarelamento da amostra, sem ocorrer a fusão. Entre 148 e $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ há a gradual fusão do material, formando um líquido amarelo escuro dentro do capilar, indicando que ocorreu alguma alteração química com formação de nova espécie.

Com essa observação pode-se definir o segundo evento endotérmico ($T_{\text{pico}} = 154,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) como evento de fusão do material que, acompanhado de alguma variação intramolecular, conduz à intensificação da cor ao final da fusão. Avaliando-se a curva DDSC (derivada primeira), obtida da curva DSC convencional (Figura 4.3-A), é possível visualizar que outros eventos térmicos ocorrem durante os eventos II e III, reforçando a hipótese de um rearranjo molecular com a formação de uma nova espécie sem que haja variação de massa.

É digno de nota que ao realizar o mesmo procedimento com a amostra monoclinica observa-se a fusão entre 160 e $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, porém com a formação de um líquido incolor ao término do processo.

4.3.1 Transições térmicas do polimorfo triclinico

A diminuição de intensidade da banda carbonila e o aumento da intensidade da banda referente à insaturação conjugada permitem deduzir que a região afetada no aquecimento corresponde ao anel A da tibolona (Figura 2.1). Nesse rearranjo intramolecular não deve ocorrer perda de massa, porém deve estar presente uma ligação dupla conjugada e deve ser afetada também a carbonila, devido à redução observada na intensidade da banda em 1715 cm^{-1} (detalhe da Figura 4.4). Essas evidências apóiam a hipótese de ocorrência de um rearranjo interno com a formação de um isômero com o grupamento enólico no anel A, conforme esquematizado na Figura 4.6. Como a enolização é um evento endotérmico (CZERWINSKA et al., 2006) o resultado evidenciado por DSC pode ser considerado consistente.

No difratograma de raios X também é possível observar que a principal alteração ocorre após o primeiro evento ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$), porém ainda estando presentes,

com reduzida intensidade, as raiaas referentes ao cristal triclinico, indicando alteraçao parcial. Ap0s o segundo evento (158 C), as raiaas caractersticas do cristal triclinico j no esto mais presentes, indicando completa converso durante a fuso. Entre o segundo e o terceiro eventos (170 C) ocorrem ainda sutis alteraçes no difratograma, principalmente na regio de 2 entre 20 e 30, sugerindo que o ltimo evento pode estar correlacionado com rearranjos estruturais do composto formado. O difratograma de raios X do material resfriado at 25 C semelhante ao difratograma do material aquecido a 170 C, indicando que ap0s resfriamento no ocorreu qualquer modificao estrutural da espcie formada durante o aquecimento da tibolona triclinica.

Figura 4.6 Esquema da hiptese de rearranjo interno do anel A da tibolona para formao do grupamento enol.

4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Boerrigter e colaboradores calcularam por extrapolação do gráfico de van't Hoff (solubilidade *versus* $1/T$ para cada fase sólida), que as formas monoclinica e triclinica da tibolona se relacionam enantiotropicamente, com a temperatura de transição de -52 ± 36 °C. Em função do elevado erro da determinação, os autores conduziram análises por DSC e microscopia com estágio a quente acoplada a IR para obter resultados mais conclusivos. A partir dessas análises os autores observaram uma transição que ocorreu mediada pela temperatura a 144 °C e descreveram essa transição como a conversão da forma triclinica para monoclinica. Porém, não apresentaram no artigo as curvas de DSC nem os espectros de absorção no infravermelho.

A partir de experimentos de DSC empregando baixa razão de aquecimento (2 °C min^{-1}) foi possível separar os eventos observados para a forma triclinica da tibolona. A associação de técnicas sensíveis às alterações do estado sólido possibilitou estabelecer uma correlação entre os eventos observados e a alteração na estrutura química da tibolona triclinica causada pelo aquecimento. Os resultados sugerem uma modificação estrutural da tibolona, devido a um rearranjo intramolecular; possivelmente, ocorre a formação de um isômero, sem a descrita formação da fase monoclinica.

Burger e Ramberger estabeleceram regras para se prever a relação termodinâmica entre as formas polimórficas (BURGER; RAMBERGER, 1979). Entre as quais, a regra do calor de transição estabelece que se uma transição de fase endotérmica é observada por DSC, em determinada temperatura, o par polimórfico é enantiotrópico e a temperatura de transição real (temperatura teórica do equilíbrio termodinâmico) está abaixo da temperatura observada na curva DSC. No caso observado a utilização dos dados de DSC (ex: entalpia de fusão, entalpia de transição, etc.) para o estabelecimento de correlações termodinâmicas entre os polimorfos não é válida, pois as entalpias envolvidas estão correlacionadas com os processos de alteração da estrutura química.

Desse modo, pode-se considerar a relação entre os polimorfos monoclinico e triclinico da tibolona como sendo monotrópica para fins práticos (experimentais e à temperatura ambiente), pois nenhuma temperatura real de transição reversível (caso

enantiotrópico) pode ser determinada até a temperatura de fusão ou degradação de ambas as formas.

Assim, o desenvolvimento de um processo de obtenção da forma monoclinica pura por meio de aquecimento não é possível em função da instabilidade térmica da forma triclinica.

4.5. REFERÊNCIAS

BERNSTEIN, J.; DAVEY, R. J.; HENCK, J.-O. Concomitant polymorphs. **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 38, n.23, p.3440-3461, 1999.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M. In Situ Observation of epitaxial polymorphic nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, n.18, p.4725-4731, 2002.

BURGER, A; RAMBERGER, R. On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. II. **Mikrochimica Acta**, v.72, n.3/4, p. 273-316, 1979.

BYRN, S. R.; PFEIFFE R. R.; STOWELL J. G. In: Drugs as Molecular Solids. **Solid-State chemistry of Drugs**. 2.ed. West Lafayette: SSCI, 1999. cap.1, p.20.

COLEMAN, N. J.; CRAIG, Q. M. D. Modulated temperature differential scanning calorimetry: a novel approach to pharmaceutical thermal analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, p.13-29, 1996.

CZERWINSKA, M.; SIKORA, A.; SZAJERSKI, P.; ADAMUS, J; MARCINEK, A; GEBICKI, J. Mechanistic Aspects of Alloxan Diabetogenic Activity: A Key-Role of Keto-Enol Inversion of Dialuric Acid on Ionization. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.110, p.7272-7278, 2006.

MAO, C.; PINAL, R.; MORRIS, K. R. A quantitative model to evaluate solubility relationship of polymorphs from their thermal properties. **Pharmaceutical Research**, v.22, n.7, p.1149 - 1157, 2005.

SOUZA, C. M. L. **Calorimetria Diferencial de Varredura Modulada Aplicada a Blendas Poliméricas**. Campinas, 2001. 145p. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas.

CAPÍTULO V

Estudos de interação entre os polimorfos de tibolona e excipientes

Neste capítulo é apresentada uma investigação sobre a influência do polimorfismo da tibolona na interação com excipientes comumente utilizados em formulações sólidas. Também foram abordados os efeitos do processo de compressão em sua estabilidade, além de discutidos os nuances da metodologia escolhida para a avaliação.

"Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado."

(Sir Isaac Newton)

5.1. INTRODUÇÃO

O planejamento de uma formulação farmacêutica estável e eficaz depende de uma cuidadosa seleção dos excipientes utilizados para facilitar a administração do fármaco, promover a liberação consistente, a biodisponibilidade adequada e, muitas vezes, protegê-lo de degradação. Assim, no início dos estudos de pré-formulação uma das maiores preocupações se concentra em se descobrir se os excipientes utilizados são compatíveis com o agente terapêutico (MURA et al., 2005). A incompatibilidade pode levar a uma completa perda de potência, formação de complexos, reações do tipo ácido/base ou na formação de sistemas eutéticos. Essas interações podem resultar na redução da estabilidade ou em alterações na biodisponibilidade, o que pode prejudicar a segurança e a eficácia do medicamento (FORD; TIMMINS, 1986).

Um dos procedimentos clássicos para prever interações consiste em se obter misturas íntimas entre o fármaco e excipientes, preferencialmente na proporção 1:1, e avaliá-las em estudos dinâmicos por meio de técnicas termoanalíticas. Também pode-se estocá-las sob condições aceleradas de temperatura e umidade, em um estudo isotérmico para, posteriormente, analisá-las por meio de técnicas cromatográficas como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CESCHEL et al., 2003). Segundo alguns autores, um estudo isotérmico a 50°C por três semanas corresponde a 12 semanas em temperatura ambiente (WELLS, 1988). Outras abordagens simulam o estresse ocasionado pelos processos de fabricação, tais como a granulação via úmida, submetendo as misturas binárias à umidificação e secagem ou à compressão, pela formação de pastilhas por meio de prensas. Tais procedimentos visam a melhor previsão das interações pela maior similaridade com as condições encontradas na manipulação (CHRZANOWSKI et al., 1986).

As técnicas termoanalíticas são, em diversas situações, capazes de prever interações físicas e químicas de maneira rápida, permitindo a análise de diversos excipientes em um curto espaço de tempo e com quantidades de amostra pequenas, da ordem de 5 mg. Por estas razões essas técnicas, em especial a TG/DTG e a DSC, têm sido utilizadas com essa finalidade há mais de 30 anos (FORD; TIMMINS, 1986). Tais interações são deduzidas das curvas termoanalíticas através de mudanças nos eventos térmicos, tais como eliminação/aparecimento de picos endotérmicos ou exotérmicos, alterações nos valores de entalpia de fusão e perdas de massa, adiantamentos nos

eventos de decomposição térmica e alterações de natureza cinética (ARAUJO et al., 2003).

Diversos autores, entretanto, recomendam a suplementação dos estudos de seleção de excipientes pela realização de estudos isotérmicos avaliados por técnicas cromatográficas (WELLS, 1988). Em especial, a CLAE se destaca por permitir a avaliação quantitativa, de modo automatizado e com a possibilidade de se obter informações importantes sobre os produtos de degradação formados. Para tal, deve-se assegurar que o método empregado consiga detectar a decomposição do fármaco, além de não sofrer a interferência dos excipientes (CESCHEL, 2003).

Conforme citado no capítulo 1, as diferenças no empacotamento cristalino podem resultar em diferenças nas estruturas eletrônicas e nas propriedades das moléculas. Consequentemente, os sítios de reatividade podem ficar mais ou menos expostos, de acordo com arranjo espacial, o que se reflete em diferentes reatividades dos polimorfos e, portanto, na possibilidade de interações diferentes com os mesmos excipientes. O esclarecimento de tais diferenças lança outra tarefa ao pré-formulador: a de descobrir qual o polimorfo é o mais adequado para utilização na forma farmacêutica desejada, em função de sua possível interação com os excipientes (CARSTENSEN, 1998).

Nesse sentido, Alves estudou a interação de diversos excipientes com os polimorfos da rifampicina, um antibiótico utilizado na terapia da tuberculose (ALVES, 2007). Nesse trabalho relatou-se que o polimorfo II, a forma menos estável, se converte no polimorfo I por meio de uma interação com os excipientes Lutrol F68 e PEG 6000. Outro exemplo é o ácido flufenâmico, um agente antiinflamatório não esteroide, cuja forma I apresenta maior reatividade que a forma III, à temperatura ambiente, possivelmente em função do maior acesso aos grupos reativos (XIAOMING; TONGLEI; MORRIS; BYRN, 2002).

No presente estudo foram investigadas as possíveis interações existentes entre os polimorfos monoclinico e triclinico da tibolona com os excipientes comumente utilizados em formulações sólidas. Também foi investigado o impacto do processo de compressão na estabilidade dos polimorfos. Tais interações foram avaliadas por TG/DTG, DSC e CLAE em um estudo isotérmico com exposição à umidade, visando aumentar a previsibilidade, além de ampliar o conhecimento sobre os estudos de interação com excipientes por diferentes metodologias.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Preparação das amostras

Foram preparadas misturas secas na proporção 1:1 entre os polimorfos monoclinico e triclinico com os excipientes comuns em formulações sólidas contendo tibolona: celulose microcristalina, amido de milho, amido de batata, lactose monoidratada, palmitato de ascorbila e butilidroxitolueno (BHT).

As misturas secas, juntamente com as amostras dos polimorfos puros, foram submetidas à pressão de 1,5 ton para a formação de pastilhas, simulando um processo de compressão para obtenção de comprimidos. As pastilhas foram divididas ao meio, colocadas em frascos de vidro cobertos com filme plástico (contendo pequenos furos para permitir contato com o vapor de água) e armazenadas paralelamente em geladeira e em câmara climática (50°C/90%UR), pelo período de um mês.

5.2.2. Análise das amostras

As amostras armazenadas em geladeira e câmara climática foram avaliadas por análise térmica (TG/DTG e DSC) e CLAE.

As curvas TG/DSC foram obtidas nas seguintes condições: atmosfera dinâmica N₂, razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹ (DSC) e 10 °C min⁻¹ (TG) nas faixas de temperatura de 25 a 200 °C (DSC) e de 25 a 600 °C (TG).

O teor de tibolona das amostras foi obtido por CLAE, de acordo com o método analítico publicado no suplemento 2007 da Farmacopeia Europeia 2006 (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2006). A seletividade do método frente aos excipientes, a precisão e a linearidade foram também determinadas. Os resultados dessa avaliação encontram-se descritos no apêndice A.

Na realização dos ensaios, as amostras foram dissolvidas em uma mistura de acetonitrila/água na proporção 25/75 para que fossem obtidas soluções na concentração de 1 mg mL⁻¹ de tibolona. As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico modelo HP 1200 (Agilent, USA) composto por um sistema quaternário de bombas, desgaseificador, forno para a coluna, autoinjeter e detector de arranjo de diodos (DAD). O programa *ChemStation* versão B.03.02 (Agilent, EUA) foi utilizado para realização dos ensaios e para a avaliação dos resultados obtidos. A fase móvel foi composta por uma mistura de metanol:acetonitrila:água na proporção 8:40:52. A separação foi realizada em

uma coluna ZORBAX SB-C8 (Agilent, EUA - 150 x 4,6 mm, 5 μ m). Os resultados foram obtidos com injeção de 5 μ L de cada amostra, eluição isocrática e fluxo de fase móvel igual a 1,5 mL min⁻¹. A coluna foi mantida a 25 °C durante os experimentos.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da associação de técnicas TG/DSC e CLAE foi possível avaliar as alterações físico-químicas provenientes das interações entre os polimorfos de tibolona e os excipientes testados. A seguir estão apresentadas as sobreposições das curvas TG/DTG e DSC, os resultados por CLAE e a discussão do comportamento de cada excipiente e das respectivas misturas binárias.

5.3.1. Análise térmica

Para cada excipiente empregado no estudo de pré-formulação foi apresentada a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC do excipiente, da mistura física (1:1) e dos polimorfos da tibolona. No capítulo 3 já foram discutidas, isoladamente, as curvas TG/DTG e DSC de cada polimorfo. As diferenças observadas na curva DSC da amostra triclinica são discutidas no item 5.3.3.

5.3.1.1. Amido de batata

As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, respectivamente, do amido de batata, dos polimorfos da tibolona e das misturas físicas 1:1 entre o amido de batata e os polimorfos de tibolona.

As curvas TG/DTG indicam que o processo de decomposição térmica do amido de batata ocorre em três etapas (Figura 5.1). A primeira etapa, a desidratação, ocorre entre 25 e 170 °C ($\Delta m_1 = 16,5\%$) e é também visualizada na curva DSC ($T_{\text{pico}} = 64,2$ °C). A segunda, entre 260 e 425 °C, é referente à etapa de decomposição térmica ($\Delta m_2 = 59,0\%$) e a terceira etapa, entre 530 e 790 °C, corresponde ao processo lento de eliminação do material carbonáceo ($\Delta m_3 = 23,4 \%$) formado na etapa anterior de decomposição. Observa-se teor de umidade aproximadamente 35% maior para o amido de batata em comparação ao amido de milho.

Para as curvas TG/DTG e DSC das misturas físicas simples obtidas para amido de batata/polimorfos da tibolona, os eventos térmicos observados correspondem aos que

ocorreram em temperaturas próximas para os componentes individuais, sem alterações significativas (Figuras 5.1 e 5.2). Pode-se verificar que o valor de entalpia de fusão na mistura corresponde, aproximadamente, à metade daquele encontrado para o fármaco individualmente, visto que este contribui com cerca de 50% da massa total (Tabelas 5.1 e 5.2). O comportamento térmico das misturas indica um perfil correspondente ao somatório dos eventos térmicos que ocorrem para os materiais individualmente. Assim, se pode inferir que não houve interação entre o amido de batata e os polimorfos de tibolona pelo procedimento convencional.

Figura 5.1. Curvas TG/DTG do amido de batata, cristal monoclínico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o amido de batata, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL/min).

Figura 5.2. Curvas DSC do amido de batata, cristal monoclinico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura 1:1 do polimorfo com o amido de batata, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL/min).

A Tabela 5.1 apresenta os valores comparativos de entalpia de fusão e de temperatura de pico obtidos a partir das curvas DSC (Figura 5.2-A) relacionadas ao polimorfo monoclínico. As amostras das pastilhas mantidas em geladeira não apresentaram alterações significativas em relação às misturas na forma de pó, indicando que não houve influência da compressão ou que esta tenha sido pouco significativa. No caso das amostras das pastilhas mantidas em câmara climática (estudo térmico acelerado), houve redução de aproximadamente 11% nos valores de entalpia de fusão da amostra do polimorfo monoclínico em relação aquele obtido para as amostras mantidas em geladeira. Observou-se que as curvas DSC das amostras das pastilhas obtidas por compactação do polimorfo puro mantidas em geladeira e em câmara climática não apresentaram diferenças significativas para a entalpia de fusão. Isso reforça que realmente ocorreu algum tipo de interação na mistura física polimorfo/amido de batata, conduzindo à redução no valor do $\Delta H_{\text{fusão}}$ do fármaco.

Tabela 5.1 - Temperatura de pico e valores de entalpia de fusão do polimorfo monoclínico em mistura binária com amido de batata, obtidos por DSC.

Componente/Condição	T _{pico} - fusão	$\Delta H_{\text{fusão}}$ (J g ⁻¹)
Monoclínico puro	171,2	96
Mistura simples	170,8	46
Pastilha Geladeira	170,6	46
Pastilha Câmara Climática	170,0	41

A Tabela 5.2 apresenta os valores comparativos de entalpia de fusão e de temperatura de pico obtidos a partir das curvas DSC (Figura 5.2-B) relacionadas ao polimorfo triclinico. Também neste caso não houve alteração significativa. Observa-se exatamente o mesmo comportamento evidenciado na curva DSC da amostra do polimorfo puro (Figura 5.11 apresentada e discutida no item 5.3.4), mantida em geladeira, ou seja, na região do evento exotérmico ocorre o aparecimento de um evento endotérmico (1 J.g⁻¹) para a amostra da pastilha armazenada em geladeira. A curva DSC da amostra da pastilha submetida ao tratamento em câmara climática apresentou alterações na

endoterma de fusão e na exoterma observada após fusão, além da ocorrência do processo de fusão em temperatura menor.

Tabela 5.2 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com amido de batata.

Componente/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$	$\Delta H_{\text{endo após fusão}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$	$\Delta H_{\text{exo}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$
Triclinico puro	157,7	52	-	6,7
Mistura simples	157,6	32	-	4,1
Pastilha Geladeira	156,8	31	1,0	2,6
Pastilha Câmara Climática	155,0	34	-	8,6

5.3.1.2. Amido de milho

As Figuras 5.3 e 5.4 apresentam a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, respectivamente, do amido de milho, dos polimorfos da tibolona e das misturas físicas 1:1 entre o amido de milho e os polimorfos de tibolona.

As curvas TG/DTG indicam que o processo de decomposição térmica do amido de milho ocorreu em quatro etapas (Figura 5.3). A primeira etapa corresponde à desidratação e ocorre entre 25 e 150 °C ($\Delta m_1 = 12,3\%$), também indicada na curva DSC na Figura 5.4, pela endoterma na mesma faixa de temperatura ($T_{\text{pico}} = 59,9^{\circ}\text{C}$). A segunda, entre 280 e 385 °C, é referente à etapa de decomposição térmica ($\Delta m_2 = 60,0\%$). A terceira e a quarta etapas ocorrem, respectivamente, entre 385 e 450 °C e entre 450 e 600°C e correspondem ao processo lento de eliminação do material carbonáceo ($\Delta m_3 = 8,6\%$; $\Delta m_4 = 19,1\%$) formado na segunda etapa da decomposição térmica.

Para as curvas DSC e TG/DTG das misturas físicas obtidas para amido de milho/polimorfos da tibolona, os eventos térmicos observados correspondem aos que ocorreram em temperaturas próximas para os componentes individuais. Além disso, o comportamento térmico das misturas indica um perfil correspondente ao somatório dos eventos térmicos que ocorrem para os materiais individualmente. Assim, se pode inferir

que não houve interação entre o amido de milho e os polimorfos de tibolona pelo método convencional.

A Tabela 5.3 apresenta os valores comparativos de entalpia de fusão e temperatura de pico obtidos a partir das curvas DSC (Figura 5.4-A) relacionadas ao polimorfo monoclinico. As pastilhas mantidas em geladeira não apresentaram alterações significativas em relação às misturas na forma de pó, indicando que não houve influência da compressão, ou que esta tenha sido pouco significativa. No caso das pastilhas mantidas em câmara climática houve redução de aproximadamente 16% nos valores de entalpia de fusão do polimorfo monoclinico em relação ao valor encontrado para as amostras de pastilhas mantidas em geladeira. Nesse caso, também, foi observado que as curvas DSC de amostras das pastilhas obtidas por compactação do polimorfo puro mantidas em geladeira e em câmara climática não apresentaram diferenças significativas para a entalpia de fusão. Isso reforça que realmente ocorreu algum tipo de interação na mistura física polimorfo / amido de milho, conduzindo a redução no valor do $\Delta H_{\text{fusão}}$ do fármaco.

Figura 5.3. Curvas TG/DTG do amido de milho, cristal triclinico de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o amido de milho, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹).

Figura 5.4. Curvas DSC do amido de milho, cristal monoclínico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o amido de milho, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}).

Tabela 5.3 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com amido de milho.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} (\text{J g}^{-1})$
Monoclinico puro	171,2	95
Mistura simples	170,5	44
Pastilha Geladeira	170,6	43
Pastilha Câmara Climática	169,4	36

A Tabela 5.4 apresenta os valores comparativos de entalpia de fusão e de temperatura de pico obtidos a partir das curvas DSC (Figura 5.4-B) relacionadas ao polimorfo triclinico. Também neste caso não houve alteração significativa. Observa-se exatamente o mesmo comportamento evidenciado na curva DSC da amostra do polimorfo puro (Figura 5.11 apresentada e discutida no item 5.3.4), mantida em geladeira; ou seja, na região do evento exotérmico, ocorre o aparecimento de um evento endotérmico, menos intenso, para a amostra da pastilha armazenada em geladeira. Neste caso, não se observa com nitidez o aparecimento do evento endotérmico próximo ao evento exotérmico para a amostra da pastilha armazenada em geladeira, como visto no caso da mistura polimorfo/amido de batata. A curva DSC da amostra da pastilha submetida ao tratamento em câmara climática apresentou alterações na endoterma de fusão e na exoterma observada após fusão, além da ocorrência do processo de fusão em temperatura menor, o que indica interação.

Tabela 5.4. Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com amido de milho.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{ fusão } (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{\text{fusão}} (\text{J g}^{-1})$	$\Delta H_{\text{exo}} (\text{J g}^{-1})$
Triclinico puro	157,7	54	6,8
Mistura simples	157,0	35	3,9
Pastilha Geladeira	156,7	32	1,6
Pastilha Câmara Climática	154,3	26	11

5.3.1.3. BHT

As Figuras 5.5 e 5.6 apresentam a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, respectivamente, da amostra de BHT, dos polimorfos da tibolona e das misturas físicas 1:1 (BHT/polimorfos de tibolona).

As curvas TG/DTG (Figura 5.5) indicam que o processo de perda de massa do BHT ocorreu em uma única etapa ($\Delta m_1 = 99,7\%$; $T_{\text{onset}} = 222^{\circ}\text{C}$), conforme evidenciado na curva DTG por um único pico entre 120 e 330°C ($T_{\text{pico}} = 281,2^{\circ}\text{C}$). A curva DSC (Figura 5.6) indica um evento endotérmico, antes do início da perda de massa, característico de fusão ($T_{\text{onset}} = 68^{\circ}\text{C}$; $\Delta H_f = 89 \text{ J g}^{-1}$; $T_{\text{pico}} = 70^{\circ}\text{C}$), uma vez que apresenta um pico fino, bem definido, e não há perda de massa correspondente nessa faixa de temperatura nas curvas TG/DTG. Logo após a fusão, a curva DSC evidencia variação no fluxo de calor no sentido endotérmico até a indicação da T_{pico} em $154,1^{\circ}\text{C}$. Esse perfil é característico de amostras que passam por processo de fusão, seguido de volatilização e decomposição térmica.

Para as curvas TG/DTG das amostras das misturas físicas obtidas para BHT/polimorfos da tibolona, os eventos térmicos são antecipados nas misturas quando em comparação aos componentes individuais, sugerindo interação entre as espécies. Pode-se observar que a T_{pico} na DTG da mistura, referente à primeira perda de massa, ocorreu em $208,2^{\circ}\text{C}$ enquanto que para BHT e polimorfo monoclinico ocorreu, respectivamente, em $281,2$ e $320,2^{\circ}\text{C}$. Além disso, as curvas DSC apresentam deslocamentos e atenuações do pico correspondente à fusão da tibolona, principalmente

para a forma triclinica. As Tabelas 5.5 e 5.6 apresentam os valores comparativos de entalpia de fusão e T_{pico} obtidos a partir das curvas DSC. Para a mistura simples dos pós, a curva DSC evidencia valor de entalpia de fusão de 30 J g^{-1} , para o polimorfo monoclinico, inferior ao valor esperado (cerca de $47,5 \text{ J g}^{-1}$, considerando 50% do material na mistura). Porém, para o polimorfo triclinico, o valor foi superior (41 J g^{-1}) ao esperado ($26,5 \text{ J g}^{-1}$). Assim, pode-se inferir, a partir do método convencional, que há interação química distinta entre os polimorfos de tibolona e o antioxidante BHT. Os resultados de DSC sugerem que a interação polimorfo/BHT foi mais acentuada para o triclinico, visto que para essa espécie a curva DSC já não evidencia a endoterma, característica da fusão do fármaco, enquanto que para o monoclinico, observou-se a endoterma com T_{pico} em $170,2^{\circ}\text{C}$.

As pastilhas das amostras de ambas as misturas mantidas em geladeira, de ambos os polimorfos, apresentaram comportamento similar ao observado para as misturas não compactadas. Entretanto, no estudo para as amostras mantidas em câmara climática o valor de entalpia foi significativamente superior, ou seja, 78 e 85 J g^{-1} na mistura com o monoclinico e o triclinico, respectivamente. Porém as curvas DSC dessas amostras não evidenciam a endoterma com T_{pico} em $68,8^{\circ}\text{C}$ que caracteriza a presença do BHT. Isso sugere que, durante o período no qual as amostras ficaram acondicionadas na câmara climática, o BHT volatilizou completa ou parcialmente. Os resultados de CLAE para as amostras de pastilhas, analisadas após a incubação, confirmam que realmente ocorreu a perda de BHT, visto que o conteúdo de tibolona encontrado foi superior ao valor teórico esperado (50% da amostra) em ambas as misturas de polimorfos/BHT.

Para a mistura contendo a forma triclinica, após a incubação, além de não se observar a endoterma característica da fusão do BHT ocorreu o aparecimento de eventos, semelhantes àqueles observados para a fusão/decomposição da tibolona pura. Porém, são observadas alterações no perfil dos picos, deslocamento dos eventos para temperaturas menores, deslocamento da linha base no sentido exotérmico na faixa de temperatura entre 78 e 127°C e intensificação do evento exotérmico após a fusão do fármaco (Figura 5.7). Isso indica que além da volatilização do BHT, provavelmente, ocorreu algum tipo de interação fármaco/excipientes.

Tabela 5.5. Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com BHT.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$
Monoclinico puro	171,2	95
Mistura simples	170,2	30
Pastilha Geladeira	170,6	35
Pastilha Câmara Climática	170,0	85

Tabela 5.6. Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com BHT.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$	$\Delta H_{\text{exo}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$
Triclinico puro	157,7	53	7
Mistura simples	(126,0 / 159,7)*	41	-
Pastilha Geladeira	130,2	44	4
Pastilha Câmara Climática	152,0	78	26

(*) eventos endotérmicos associados à fusão e perda de massa.

Figura 5.5. Curvas TG/DTG do BHT, cristal monoclinico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do BHT com o polimorfo, sob atmosfera dinamica de N_2 ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

Figura 5.6. Curvas DSC do BHT, cristal monoclinico (A) / triclínico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o BHT, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}).

Figura 5.7. Sobreposição das curvas DSC do polimorfo triclinico puro e da mistura binária do BHT/polimorfo triclinico.

5.3.1.4. Celulose microcristalina

As Figuras 5.8 e 5.9 apresentam a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, respectivamente, da celulose microcristalina, dos polimorfos da tibolona e das misturas físicas 1:1 entre a celulose microcristalina e os polimorfos de tibolona.

As curvas TG/DTG indicam que o processo de decomposição térmica da celulose microcristalina ocorreu em três etapas (Figura 5.8): a primeira etapa, devido à desidratação, ocorreu entre 25 e 115 °C ($\Delta m_1 = 4,2\%$), também visualizada na curva DSC (Figura 5.6-B) pela endoterma com T_{pico} em 50,4 °C. A segunda etapa de perda de massa ocorreu entre 225 e 440 °C, referente à decomposição térmica ($\Delta m_2 = 77,5\%$) com carbonização, e a terceira etapa, entre 440 e 600 °C, que corresponde ao processo lento de eliminação do material carbonáceo ($\Delta m_3 = 7,1\%$) formado na etapa anterior de decomposição.

Para as curvas DSC e TG/DTG das misturas físicas obtidas para celulose microcristalina/polimorfos da tibolona, os eventos térmicos observados correspondem aos que ocorreram, em temperaturas próximas, para os componentes individuais. O comportamento térmico das misturas indica um perfil correspondente ao somatório dos eventos térmicos que ocorrem para os materiais individualmente. Assim, se pode inferir que não houve interação entre a celulose microcristalina e os polimorfos de tibolona, na avaliação empregando o método convencional. A comparação entre os valores de T_{pico} de

fusão e de entalpia de fusão (Tabelas 5.7 e 5.8), obtidos nas referidas misturas e componentes individuais, não evidenciou diferenças significativas que possam sugerir a interação fármaco/excipientes.

Tabela 5.7 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com celulose microcristalina.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$
Monoclinico puro	171,2	95
Mistura simples	171,0	48
Pastilha Geladeira	170,9	44
Pastilha Câmara Climática	169,9	43

Tabela 5.8 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com celulose microcristalina.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$	$\Delta H_{\text{exo}} \text{ (J g}^{-1}\text{)}$
Triclinico puro	157,7	53	7
Mistura simples	157,7	33	8
Pastilha Geladeira	156,9	29	4
Pastilha Câmara Climática	155,0	23	11

No estudo isotérmico (câmara climática), em ambos os casos foram observados pequenos deslocamentos da T_{pico} de fusão do fármaco e pequenas variações nos valores de $\Delta H_{\text{fusão}}$. Não ocorreram alterações significativas que indiquem interações da celulose com ambos os polimorfos.

Figura 5.8. Curvas TG/DTG da celulose microcristalina, cristal monoclinico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 da celulose com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹).

Figura 5.9. Curvas DSC da celulose microcristalina, cristal monoclinico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura 1:1 do polimorfo com a celulose microcristalina, sob atmosfera dinâmica de N_2 (50 mL min^{-1}).

5.3.1.5 Lactose monoidratada

As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, respectivamente, da lactose monoidratada, polimorfos da tibolona e das misturas físicas 1:1 entre a lactose monoidratada e os polimorfos de tibolona.

As curvas TG/DTG indicam que o processo de perda de massa da lactose monoidratada ocorreu em três etapas (Figura 5.10): a primeira etapa, corresponde à desidratação, ocorreu entre 120 e 180 °C ($\Delta m_1 = 4,7\%$). A segunda, ocorreu entre 220 e 295 °C e é referente à etapa de decomposição térmica com carbonização ($\Delta m_2 = 11,3\%$). E a terceira ocorreu entre 295 e 600 °C, correspondendo ao processo lento de eliminação do material carbonáceo ($\Delta m_3 = 75,0\%$) formado na etapa anterior de decomposição. A curva DSC da lactose monoidratada (Figura 5.7-B) evidencia um evento endotérmico devido à etapa de desidratação com $T_{\text{onset}} = 143\text{ °C}$ ($T_{\text{pico}} = 148\text{ °C}$; $\Delta H = 160\text{ J g}^{-1}$). Esse evento é seguido por uma exoterma, sem perda de massa, característica da transição de fase da α -lactose para β -lactose anidra. Conforme os dados das curvas termogravimétricas, tais eventos precedem a endoterma de fusão com decomposição térmica que apresenta $T_{\text{onset}} = 207\text{ °C}$ e $T_{\text{pico}} = 216\text{ °C}$.

Para as curvas TG/DTG das misturas físicas obtidas para lactose monoidratada/polimorfos da tibolona, os eventos térmicos observados correspondem aos que ocorreram em temperaturas próximas para os componentes individuais. O comportamento térmico das misturas indica um perfil correspondente ao somatório dos eventos térmicos que ocorrem para os materiais individualmente. Entretanto, as curvas DSC apresentam comportamento distinto entre os polimorfos. Pela proximidade do evento de desidratação da lactose e dos eventos térmicos que ocorrem para a forma triclinica, as curvas DSC mostram eventos sobrepostos. O evento que caracteriza a fusão/decomposição da lactose em ambos os casos das misturas ocorre na mesma faixa de temperatura, comparado com a lactose individualmente. Dessa maneira, pode-se concluir, pelo método convencional, que não houve interação química entre esse excipiente e os polimorfos de tibolona.

O estudo isotérmico (câmara climática) indica que praticamente não houve alterações significativas entre as misturas compactadas armazenadas em geladeira e em câmara climática para ambos os polimorfos. As mesmas diferenças observadas entre o monoclinico e o triclinico na mistura simples foram observadas nas curvas DSC das pastilhas. As Tabelas 5.9 e 5.10 listam os valores de T_{pico} e ΔH de fusão correspondente

aos polimorfos da tibolona individual e das misturas. No caso das misturas obtidas com o polimorfo triclinico, devido à sobreposição dos eventos de desidratação da lactose e fusão do fármaco, não foram calculados os valores de entalpia de fusão.

Tabela 5.9. Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo monoclinico em mistura binária com lactose monoidratada.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} (\text{J g}^{-1})$
Monoclinico puro	171,2	95
Mistura simples	171,2	51
Pastilha Geladeira	170,5	49
Pastilha Câmara Climática	170,5	50

Tabela 5.10 - Temperatura de pico de fusão e valores de entalpia dos eventos do polimorfo triclinico em mistura binária com lactose monoidratada.

Polimorfo/Condição	$T_{\text{pico}} - \text{fusão (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta H_{\text{fusão}} (\text{J g}^{-1})$	$\Delta H_{\text{exo}} (\text{J g}^{-1})$
Triclinico puro	157,7	53	7
Mistura simples	157,7	-	-
Pastilha Geladeira	156,8	-	-
Pastilha Câmara Climática	154,8	-	-

Figura 5.10. Curvas TG/DTG da lactose monoidratada, cristal monoclinico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 da lactose monoidratada com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹).

Figura 5.11. Curvas DSC da lactose monoidratada, cristal monoclínico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com a lactose monoidratada, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹).

5.3.1.6 Palmitato de ascorbila

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam a sobreposição das curvas TG/DTG e DSC, respectivamente, do palmitato de ascorbila, dos polimorfos da tibolona e das misturas físicas simples 1:1 entre o palmitato de ascorbila e os polimorfos de tibolona.

Figura 5.12. Curvas TG/DTG do palmitato de ascorbila, cristal monoclinico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 palmitato de ascorbila com o polimorfo, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL min⁻¹).

Figura 5.13. Curvas DSC do palmitato de ascorbila, cristal monoclínico (A) / triclinico (B) de tibolona e mistura simples 1:1 do polimorfo com o palmitato de ascorbila, sob atmosfera dinâmica de N₂ (50 mL.min⁻¹).

As curvas TG/DTG indicam que o processo de perda de massa do palmitato de ascorbila ocorreu em duas etapas (Figura 5.12): a primeira etapa corresponde à desidratação e ocorre entre 45 e 90 °C ($\Delta m_1 = 1,9\%$), o percentual de perda indica que se trata de um hemiidrato (Δm esperado igual a 2,1%). A segunda etapa ocorre entre 178 e 600 °C e é referente à etapa de decomposição térmica ($\Delta m_2 = 85,0\%$). A curva DSC evidencia um evento endotérmico entre 48 e 80 °C devido à desidratação ($T_{\text{pico}} = 64,6$ °C e $\Delta H = 53,1 \text{ J.g}^{-1}$) e um outro evento endotérmico característico de fusão ($T_{\text{onset}} = 112$ °C; $T_{\text{pico}} = 116$ °C; $\Delta H_f = 53,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$), uma vez que apresenta um pico fino, bem definido, numa faixa de temperatura na qual as curvas TG/DTG não mostram perda de massa.

Para as TG/DTG das misturas físicas simples obtidas para o palmitato de ascorbila e os polimorfos da tibolona, os eventos térmicos observados correspondem aos que ocorreram em temperaturas próximas para os componentes individuais. Além disso, o comportamento térmico das misturas indica um perfil correspondente ao somatório dos eventos térmicos que ocorrem para os materiais individualmente. Entretanto, nas curvas DSC (Figura 5.13-A) das misturas simples envolvendo o polimorfo monoclinico são observados os dois eventos térmicos de desidratação e fusão do palmitato de ascorbila até 120 °C. Entre 125 e 160 °C é observada uma endoterma (T_{pico} em 136,8 °C) que pode ser atribuída à fusão/solubilização da tibolona, visto que as curva TG/DTG não evidenciam perda de massa nessa faixa de temperatura e o valor de ΔH ($16,3 \text{ J.g}^{-1}$) envolvido nesse(s) evento(s) é bem inferior ao esperado para a fusão da tibolona na mistura 1:1 ($47,5 \text{ J.g}^{-1}$). Isso pode indicar uma interação física entre as espécies, uma vez que não ocorrem alterações na curva DSC do palmitato de ascorbila presente nas misturas. Para a mistura simples envolvendo o polimorfo triclinico (Figura 5.13-B), o comportamento é similar, porém o valor do ΔH do evento atribuído à fusão/solubilização é menor ($6,3 \text{ J.g}^{-1}$).

No caso das misturas de ambos os polimorfos na forma de pastilhas, mantidas em geladeira, as curvas DSC evidenciam, além dos eventos endotérmicos que caracteriza a desidratação e a fusão do palmitato de ascorbila, outro evento endotérmico intermediário com T_{pico} em aproximadamente 82 °C. Entretanto, para as pastilhas mantidas em estufa, em ambos os casos, é observado apenas uma endoterma com T_{pico} em aproximadamente 110 °C, indicando que algum tipo de interação ocorreu entre as espécies.

5.3.2. Estudo do comportamento fármaco-excipiente a partir da análise de teor de tibolona por CLAE

A partir desse estudo buscou-se avaliar, por CLAE, o teor de tibolona em amostras apenas do fármaco na forma de pó e compactadas e também o teor do fármaco em misturas fármaco/excipiente das amostras mantidas em geladeira e em câmara climática durante o período de um mês. Para facilitar o entendimento e a visualização, os resultados foram expressos na forma de gráficos de barras que comparam a queda ocorrida no teor de tibolona de amostras mantidas em câmara climática em relação a uma parte da mesma amostra que foi mantida em geladeira durante o mesmo período. Os dados da análise de teor por CLAE são apresentados no apêndice A. A Figura 5.14 ilustra os resultados comparativos da queda de teor de tibolona entre os polimorfos puros na forma de pó e em pastilha e a Figura 5.15 ilustra os resultados comparativos para o caso das misturas com cada excipiente.

Figura 5.14. Gráfico comparativo da queda de teor dos polimorfos da tibolona, na forma de pastilha ou em pó (sem sofrer pressão), após armazenamento em câmara climática, em relação à amostra mantida em geladeira.

Figura 5.15. Gráfico comparativo da queda de teor dos polimorfos da tibolona em misturas com excipientes na forma de pastilha, após armazenamento em câmara climática em relação à amostra mantida em geladeira.

Na avaliação do comportamento das misturas foi observado que em contato com o amido de batata o polimorfo triclinico apresentou queda de teor superior a duas vezes aquela encontrada para o polimorfo monoclinico, indicando menor estabilidade. Entretanto, no caso do amido de milho a queda de teor foi menor para o mesmo polimorfo.

Entre os dois polimorfos, as maiores diferenças encontradas ocorreram nas misturas com a lactose, o amido de batata e o palmitato de ascorbila. Tais excipientes aumentaram efetivamente a queda no teor do polimorfo triclinico em comparação com a do monoclinico. Entretanto, na mistura polimorfo triclinico/palmitato de ascorbila a queda foi muito superior àquela encontrada em misturas com os demais excipientes. Para a celulose microcristalina não houve diferenças significativas entre o comportamento dos polimorfos.

Para a forma monoclinica foi possível notar efeito estabilizante do amido de batata, do palmitato de ascorbila e da lactose monoidratada, efeito não observado para o amido de milho e a celulose microcristalina. No caso da forma triclinica, tal efeito foi observado com o amido de milho e a lactose monoidratada. Entretanto, a interação desse polimorfo com o palmitato de ascorbila provocou queda significativa no teor do fármaco, sugerindo incompatibilidade entre as espécies.

5.3.3 Estabilidade dos polimorfos puros

Na análise do comportamento dos polimorfos puros da tibolona, o monoclinico se apresentou mais estável que o triclinico na forma de pó, visto que não ocorreu queda significativa de teor no período de incubação. Tal resultado corrobora com o texto descrito na patente EP0389035 (SAS, 1993) que cita maior estabilidade da forma monoclinica, porém esta patente não apresenta qualquer comprovação experimental.

Os resultados obtidos no estudo isotérmico de estabilidade em câmara climática também são concordantes com aqueles obtidos nos estudos cinéticos de decomposição térmica apresentados no capítulo 3, que indicaram menor estabilidade térmica da forma triclinica. Geralmente, o polimorfo termodinamicamente mais estável é aquele que possui maior estabilidade química (HILFIKER, 2006), comportamento este também válido para a tibolona.

Apesar das diferenças encontradas na estabilidade, existem relatos de que ambas as formas são estáveis por vários anos se acondicionadas em local seco e sob refrigeração de 2 a 8 °C (BOERRIGTER et al., 2002; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2006). Entretanto, em nossos estudos foram observados que até mesmo sob refrigeração há indícios de alterações nos eventos térmicos (curvas DSC) que ocorrem na faixa de temperatura entre 140 e 160°C para a amostra triclinica de tibolona. Essa amostra utilizada nos ensaios de interação fármaco-excipientes permaneceu armazenada, na forma de pó, em geladeira por aproximadamente um ano após a caracterização inicial. Em seguida, a amostra foi compactada e armazenada em geladeira por um mês e submetidas aos ensaios de DSC. A curva DSC, Figura 5.16, evidenciou novas alterações na mesma região, ou seja, ocorreu o aparecimento de um evento endotérmico ($T_{\text{pico}} = 165,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $\Delta H = 6,2 \text{ J.g}^{-1}$). Por outro lado, para as pastilhas compactadas e armazenadas na câmara climática a 50 °C a 90%UR não ocorreu o aparecimento desse evento endotérmico. Assim, pode-se dizer que o armazenamento em baixa temperatura é o principal fator e, possivelmente, a compressão foi o agente que acelerou a ocorrência dessas mudanças. Na avaliação das misturas binárias com os excipientes, o mesmo evento endotérmico também foi observado, principalmente na mistura com o amido de batata, excipiente com maior teor de umidade. Dessa forma, a condensação de umidade presente no ambiente interno de armazenagem pode ter correlação com o fenômeno. Nenhuma alteração significativa para o polimorfo monoclinico foi observada nas mesmas condições.

Figura 5.16 – Efeito da armazenagem em geladeira nas curvas DSC do polimorfo triclinico da tibolona.

Após a exposição à temperatura e à umidade, ambas as amostras compactadas apresentaram queda similar de teor não observada para os polimorfos na forma de pó. Também se evidenciou que a pressão aplicada na compactação resultou no adiantamento dos eventos térmicos (Figura 5.17), indicando que houve diminuição da pureza das amostras. Isso indica que a pressão reduziu a estabilidade de ambos os polimorfos da tibolona.

Este resultado concorda com aqueles encontrados para uma amostra comercial de tibolona (Figura 5.18), que indicam influência negativa da pressão na estabilidade e esta influência é proporcional ao nível de pressão aplicado (ARAUJO et al., 2007).

Figura 5.17. Influência das condições de estresse e pressão nas curvas DSC dos polimorfos da tibolona: A) Monoclínico; B) Triclínico.

Figura 5.18. A) Curvas DSC das amostras de tibolona submetidas às condições de estresse e níveis diferentes de pressão. B) Gráfico dos resultados de teor por DSC *versus* a influência da pressão (0 psi, 200 psi e 500 psi) e as condições de armazenagem (GEL — geladeira; EST — câmara climática) (ARAUJO et al., 2007).

5.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambas as técnicas empregadas se mostraram sensíveis para detectar a influência da compressão e da exposição às condições de umidade e de temperatura elevadas na estabilidade dos polimorfos da tibolona. No caso da CLAE essa influência foi evidenciada pela queda do teor de tibolona nas amostras das misturas binárias, conforme apresentado na Figura 5.14. Entretanto, por DSC, o aumento da decomposição foi evidenciado por meio do alargamento do pico referente à endoterma de fusão, além do adiantamento do evento, característico da redução da pureza da amostra devido à presença de alguma impureza formada.

Na avaliação das pastilhas, a partir do estudo isotérmico acelerado, foi possível verificar, por análise térmica, que existem interações entre os polimorfos da tibolona e os amidos de milho e de batata que não são observadas em um estudo convencional com mistura simples não compactadas. Para o polimorfo monoclinico, por exemplo, evidenciou-se redução maior na entalpia de fusão para a mistura binária com o amido de milho. Tais interações podem estar relacionadas com o efeito estabilizante do amido de batata para com o polimorfo monoclinico e do amido de milho para o triclinico observado por CLAE.

A patente WO/1998/047517 (HAAN DE et al., 1998) aborda o uso de amido como um estabilizante em formulações contendo tibolona. Nesse documento não se faz referência sobre as diferenças entre os tipos de amido, tampouco sobre a correlação dessa estabilização com o polimorfismo desse fármaco. Porém, menciona-se o efeito benéfico da umidade relativa elevada na estabilidade do fármaco. Assim, se pode inferir que o elevado conteúdo de umidade do amido de batata pode beneficiar a conservação da estabilidade da tibolona. Entretanto, pelos resultados obtidos, conclui-se que sua utilização não estabiliza o polimorfo triclinico.

Outros agentes estabilizantes mencionados na patente WO 98/47517 são os antioxidantes como, por exemplo, o palmitato de ascorbila. Novamente o documento não cita o polimorfismo do fármaco. Verificou-se, do mesmo modo, que tal estabilização só pode ser possível para o polimorfo monoclinico; no caso do triclinico, a interação foi prejudicial. Outro antioxidante testado, o BHT, apresentou interação com ambos os polimorfos.

O estudo isotérmico acelerado associado à determinação analítica por CLAE fornece informações claras, quantitativas e específicas sobre os efeitos de degradação ou de

estabilização dos excipientes sobre o fármaco, que não podem ser obtidos por meio da avaliação termoanalítica convencional das misturas binárias 1:1. Todavia, tal abordagem requer, além de tempo maior para realização, outros recursos, como: esforços para desenvolver metodologia analítica capaz de determinar a degradação do fármaco, razoável quantidade de amostra e padrões analíticos em pureza adequada (muitas vezes ainda não disponíveis, principalmente no caso de novos fármacos), solventes, câmara climática com controle de temperatura e umidade, etc. Além disso, as curvas DSC e TG/DTG permitem avaliar a integridade dos excipientes e as interações físicas que também podem oferecer riscos à formulação e que não resultariam necessariamente em degradação do fármaco. Deve-se ponderar cada abordagem, conforme os objetivos, tempo e recursos disponíveis; por outro lado, a associação das técnicas de análise térmica e CLAE é amplamente recomendável.

5.5. REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. A. S.; STORPIRTIS, S.; MERCURI, L. P.; CARVALHO, F. M. S.; SANTOS FILHO, M. M.; MATOS, J. R. Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, n.260, p. 303-314, 2003.

ARAUJO, G. L. B.; CHING, R. C. K. ; HONDA, A. M.; MATOS, J. R. Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) na avaliação da estabilidade de um esteróide sintético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, supl.1, p. 11, 2007. [XV Congresso Paulista de Farmacêuticos].

ALVES, R. **Estudo termoanalítico e de compatibilidade fármaco-excipiente de rifampicina e alguns medicamentos utilizados na terapêutica da tuberculose**. São Paulo, 2007. 90p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M. In Situ Observation of epitaxial polymorphic nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, n.18, p.4725-4731, 2002.

CARSTENSEN, J. T. **Pharmaceutical preformulation**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998, p.259-275.

CESCHEL, G. C.; BADIELLO, R.; RONCHI, C.; MAFFEI, P. Degradation of components in drug formulations: a comparison between HPLC and DSC methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 32, p.1067-1072, 2003.

CHYZANOWSKI, F. A.; ULISSI, L. A.; FEGELY, B.J., NEWMAN, C.A. Preformulation excipient compatibility testing: application of a differential scanning calorimetric method versus a wet granulation simulating, isothermal stress method. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, n.32, v.6, p. 783-800, 1986.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5.ed. Strasbourg: Concil of Europe, 2006. p. 5124-5125. (Supplement 5.7- 2007).

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis. Techniques and applications**. New York: Willey-Interscience, 1986, p.137-149.

HAAN DE, P.; ROVERS, A. C.P.; LAMBREGTS-DE HURK, T. A. M.; ZWINKELS, J. A. M.; MORITA, R. **Stabilized tibolone compositions** WO Pat. 047517, 20 Abr. 1998, 29 Out. 1998. 21p.

HILFIKER, R. **Polymorphism in the Pharmaceutical Industry**. Weinheim: WILEY-VCH, 2006. p.11.

MURA, P.; FURNANETTO, S.; CIRRI, M.; MAESTRELLI, F.; MARRAS, A. M.; PINZAUTI, S. Optimization of glibenclamide tablet composition through the combined use of differential scanning calorimetry and d-optimal mixture experimental design. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 37, p. 65-71, 2005.

WELLS, J. I. In: Excipient compatibility and resumé. **Pharmaceutical preformulation**: the physicochemical properties of drug substances. New York: Ellis Horwood, 1988. cap. 8, p. 215-219. (Ellis Horwood books in biological sciences).

XIAOMING, C. ; TONGLEI, L.; MORRIS, K. R.; BYRN, S. R. Crystal packing and chemical reactivity of two polymorphs of flufenamic acid with ammonia. **Molecular crystals and liquid crystals science and technology. Section A: Molecular crystals and liquid crystals**, v.381, p. 121-131, 2002.

CAPÍTULO VI

Fatos e artefatos no estudo do polimorfismo

Este capítulo é dedicado à apresentação de exemplos dos cuidados necessários para se evitar a obtenção e a interpretação inadequada dos resultados nos estudos de sistemas polimórficos, com ênfase na caracterização dos polimorfos da tibolona.

*"Cuius rei demonstrationem mirabilem sane detexi. Hanc marginis exiguitas non
caperet."*

"Encontrei uma demonstração verdadeiramente maravilhosa disto, mas esta
margem é estreita demais para contê-la."

(Pierre de Fermat)

6.1 INTRODUÇÃO

A palavra “artefato” nas ciências experimentais é utilizada em referência ao resultado experimental não originado pelo fenômeno em investigação, mas por fatores ligados às condições experimentais (STANFORD, 2008). A seguinte citação de Huber é apresentada por Bernstein em um trabalho que descreve pontos importantes de controle relacionados ao estudo do polimorfismo e ilustra a importância do controle experimental (BERNSTEIN, 2002).

[...] Controlar na ciência é de grande importância; não como um fim, mas como um dos componentes de prova. A capacidade de controlar é a mais forte demonstração do verdadeiro entendimento. Muitos duvidaram quando Becquerel, Curie, Bohr, Oppenheimer e outros diziam entender o que ocorre dentro do átomo. Porém, após 16 de julho de 1945, quando o dia nasceu, prematuramente, no noroeste de Alamagordo (Novo México), ninguém mais pôde duvidar, pois a bomba atômica se fez mais clara que o sol. Com a habilidade demonstrada de controlar, o bom cientista pode assinar como um matemático ao final da apresentação de uma prova: Quod erat demonstrandum (Huber 1991).

Nesse contexto, diversos fatores podem afetar os resultados dos experimentos no estudo do polimorfismo (BERNSTEIN, 2002). As peculiaridades e as limitações de cada técnica empregada na caracterização e as condições experimentais utilizadas são bons exemplos de controle no estudo de polimorfos. Essencialmente, cada técnica pode incluir algum tipo de pré-tratamento da amostra, o que torna também a etapa de preparação um fator muito importante e muitas vezes preponderante (MITRA, 2003).

A partir do conhecimento acumulado da literatura sobre o tema polimorfismo, buscou-se ilustrar com a Figura 6.1 um esquema, com algumas etapas, que reflete os principais pontos a serem considerados/controlados e as consequências envolvidas no isolamento e na caracterização de polimorfos (YU; REUTZEL; STERPHENSON, 1998; BLAGDEN et al., 1998; BERNSTEIN, 2002; SPONG et al., 2004).

Etapas e Controles

Consequências

Figura 6.1 - Esquema com pontos principais a serem considerados nas etapas de cristalização, preparação e caracterização da amostra no estado sólido e as possíveis consequências no estudo de sistemas polimorfos

6.1.2. Preparo de amostra

6.1.2.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho

A preparação da amostra é considerada como uma etapa de maiores desafios na espectroscopia de absorção no infravermelho (BUGAY, 2001). Desde o desenvolvimento dos primeiros espectrômetros por transformada de Fourier diversas técnicas de pré-tratamento de amostras para análises na área farmacêutica foram desenvolvidas. Assim, a espectroscopia no infravermelho se tornou uma técnica de rotina para identificação química nas farmacopeias, também amplamente aplicável para identificação de polimorfos e solvatos (AUER, 2003).

Tipicamente, no procedimento clássico de preparo de amostras para IR, as substâncias são intimamente misturadas com haletos alcalinos (ex. NaCl, KBr ou CsI), a mistura é comprimida na forma de pastilha e em seguida analisada. Como a pressão pode induzir as transições no estado sólido, diversas outras técnicas, como a reflectância difusa, a reflectância total atenuada e a microscopia acoplada ao infravermelho, podem ser utilizadas como alternativa à utilização da pastilha, a fim de se evitar a ocorrência de transições de fase (BUGAY, 2001).

6.1.2.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica não destrutiva e requer pouca ou nenhuma preparação e manipulação da amostra. O material pode ser muitas vezes analisado dentro de seu próprio recipiente, desde que não haja interferência das bandas de espalhamento do material de embalagem. Em estudos de sistemas polimórficos deve-se evitar a compactação das amostras para que não ocorram transições parciais ou totais. Lâminas, capilares e frascos de vidro estão entre os mais utilizados para o acondicionamento das amostras durante os experimentos (HILFIKER, 2006).

Um dos principais cuidados na utilização da técnica é avaliar se a potência do feixe de *laser* causa alguma alteração na amostra em função da absorção da radiação e aquecimento. Esse fator, de grande importância, em particular para substâncias coloridas,

pode resultar em decomposição, perda de solventes, transições de fase e até mesmo carbonização (HILFIKER, 2006).

6.1.2.3 Difratometria de raios X pelo método do pó

Na difratometria de raios X pelo método do pó a preparação da amostra é descrita como a etapa mais importante e determinante para a qualidade dos resultados (JENKINS; SNYDER, 1996). Jenkins e Snyder (1996) resumem as possíveis causas dos problemas relacionados com as amostras preparadas para o experimento de difração. A principal é a ocorrência de orientação preferencial na amostra. Para ser possível visualizar todas as raia de difração, o pó deve possuir número grande de cristalitos dispostos em uma orientação aleatória em relação ao feixe incidente. Em função dos hábitos não esféricos dos cristalitos, como, por exemplo, agulhas ou plaquetas, a amostra tende a se acomodar orientada de maneira não aleatória (Figura 6.2). Nos casos de orientação preferencial acentuada poderá haver diminuição e/ou aumento das intensidades, podendo ocorrer até o desaparecimento de raia de difração. Nos casos de orientação preferencial de fraca a moderada, a mais frequente consequência é a diferença existente entre as intensidades observadas e as intensidades reais para uma amostra na qual há orientação aleatória (JENKINS; SNYDER, 1996).

A Figura 6.3 exemplifica a influência da orientação preferencial, por meio de difratogramas simulados da forma triclinica da tibolona. A Figura 6.3a apresenta o difratograma correspondente a cristalitos na forma de agulhas de dimensões 5000 x 50 x 50 nm nas direções dos eixos “a”, “b” e “c”, respectivamente, e os planos (h00) estão orientados perpendicularmente ao eixo do capilar. Na Figura 6.3b os cristalitos possuem hábito placóide de dimensões 50X5000X5000 nm nas direções dos eixos a, b e c, respectivamente, e os planos (h00) estão orientados paralelos à superfície do porta-amostra. Enquanto na Figura 6.3b podem ser visualizados os picos referentes aos planos (h00), na Figura 6.3a os mesmos planos apresentam intensidades praticamente nulas. A Figura 6.4 ilustra outro exemplo de orientação preferencial forte; nesta, o difratograma da forma III do sulfatiazol evidencia a supressão dos picos que eram esperados (BERNSTEIN, 2002).

Figura 6.2. Representação da orientação dos cristalitos: a) orientação preferencial; b) orientação aleatória.

Figura 6.3. Influência do hábito cristalino e orientação preferencial nos dados experimentais de XRPD do polímero triclínico da tibolona. Os difratogramas foram gerados por meio de simulação no programa TOPAS v.1. (OP = orientação preferencial).

Figura 6.4. Influência da orientação preferencial nos dados experimentais de XRPD do polimorfo III do sulfatiazol. (A) Padrão calculado a partir dos dados de monocristal. (B) Difratoograma observado (adaptado de BERNSTEIN, 2002).

A necessidade de redução do tamanho de partícula da amostra é outra fonte de artefatos. As alterações mais comuns na amostra que podem ser geradas pela micronização são: a amorfização, a decomposição por aquecimento, a perda de componentes voláteis, as reações no estado sólido e o aumento da higroscopicidade (JENKINS; SNYDER, 1996). Tal redução de tamanho é um recurso que auxilia na redução da orientação preferencial, bem como na melhora estatística em análises quantitativas em função do aumento do número de partículas, o que está correlacionado com número maior de cristalitos avaliados por unidade de volume. Existem recomendações gerais de tamanho de partícula inferior a 10 μm para análises quantitativas (BISH; POST, 1989). McCusker e colaboradores, entretanto, consideram tamanho ideal de partícula algo entre 1 e 5 μm para análise quantitativa de fases pelo método de Rietveld (MCCUSKER et al., 1999).

Além dos pontos mencionados, outros devem ainda ser considerados para se evitar artefatos. A radiação utilizada nos experimentos de difração também pode induzir

mudanças no material, como reações no estado sólido (exemplo: polimerização), decomposições, amorfização, etc (BERNSTEIN, 2002). Também o ambiente da análise pode resultar em outras alterações da amostra, como, por exemplo, na formação de hidratos pela exposição à umidade (BERNSTEIN, 2002).

6.1.3 Influência das condições experimentais em análise térmica

Os estudos de sistemas polimórficos por TG/DTG e DSC estão sujeitos à influência de fatores como, por exemplo, a razão de aquecimento (β), a massa da amostra, a atmosfera atuante no interior da célula de medida, a geometria e a composição do cadinho, entre outros (GIRON, 1995).

Nos ensaios de DSC a β se mostra como um dos fatores principais (GIRON, 1995). A Figura 6.5 apresenta, de modo geral, a influência da β no estudo de transições polimórficas. Em uma β baixa ($0,5\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$) é possível visualizar a transição sólido-sólido da forma III para forma I e a subsequente fusão da forma I, o polimorfo mais estável. Na β de $64\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ a forma III funde-se diretamente, pois nesta β elevada há alteração na cinética de fusão da forma III, não havendo tempo suficiente para a recristalização da forma I, como é possível visualizar para β de $4\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$. Em uma β de $16\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ o sistema não atinge o equilíbrio, então a recristalização da forma I é mascarada pela fusão direta da forma III (BERNSTEIN, 2002).

Para as curvas TG/DTG, dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra, fatores instrumentais e relacionados às características da amostra podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (MATOS et al., 2000). Para a reação que ocorre numa única etapa, de maneira geral observa-se que a T_{onset} medida quando se emprega razão de aquecimento alta é maior do que quando se emprega razão de aquecimento baixa. O mesmo é observado para os valores de T_{endset} , ou T_{pico} na DTG.

A Figura 6.6-A ilustra as curvas TG/DTG de uma amostra de lactose obtida sob atmosfera dinâmica de N_2 e sob duas razões de aquecimento (β) distintas, 5 e $20\text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$. Outro importante fator é a atmosfera do forno. A escolha de um gás reativo ou inerte, sua pressão e se a atmosfera vai ser estática ou fluente dependerá das características da amostra ou do tipo de estudo. De maneira geral, as curvas TG/DTG são obtidas sob atmosfera dinâmica. Esta tem a função de proteger o compartimento da balança dos voláteis liberados durante a decomposição térmica da amostra e evitar a condensação desses produtos nas partes frias do sistema, principalmente na haste de

sustentação do conjunto formado por estribo e cadinho. O material condensado pode, numa determinada temperatura, se desprender e gerar eventos não esperados. O efeito da atmosfera do forno sobre as curvas TG/DTG depende do tipo de reação, da natureza dos produtos e do tipo da atmosfera empregada. A Figura 6.6-B apresenta as curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de ar e de CO_2 de uma amostra de CaCO_3 .

Figura 6.5. Influência de β nas curvas DSC no estudo de polimorfos (BERNSTEIN, 2002).

Figura 6.6. Influência de β e atmosfera nas curvas TG/DTG: (A) Curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 ($50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) de uma amostra de lactose com β de 5 e $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. (B) Curvas TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de ar e de CO_2 de uma amostra de CaCO_3 com razão de aquecimento $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$.

6.1.4 Controle de cristalização: misturas e desaparecimento de polimorfos

A princípio, para qualquer polimorfo, é possível definir experimentalmente os solventes, as faixas de temperatura, a razão de evaporação ou resfriamento e muitas outras condições sob as quais irá se cristalizar. Esse conjunto de fatores é definido como domínio de ocorrência (BERNSTEIN; DAVEY; HENCK, 1999). O domínio existe para qualquer substância, entretanto, raramente é conhecido em sua totalidade. Ademais, para determinado polimorfo, o domínio de ocorrência não é necessariamente único. Há regiões nas quais ocorre a sobreposição de domínios de ocorrência e, então, se pode esperar que dois ou mais polimorfos possam se cristalizar concomitantemente, formando misturas (BERNSTEIN, 2002).

De acordo com Bernstein (2002), o fenômeno é bastante comum, porém não muito apreciado e, por isso, raramente é mencionado e especificado diretamente, sendo árduo encontrar exemplos na sessão experimental dos trabalhos publicados. Um exemplo que evidencia a complexidade do fenômeno é o sulfatiazol, que pode apresentar a cristalização concomitante das cinco formas cristalinas anidras, dependendo da razão de evaporação do solvente e da concentração da solução (LEE et al., 2007).

Outro fenômeno relacionado e bastante preocupante foi denominado de “polimorfos desaparecidos” (BERNSTEIN, 2002). Durante o desenvolvimento do ritonavir, um inibidor da transcriptase reversa, apenas uma forma cristalina foi identificada, a qual foi utilizada na fabricação de 240 lotes comercializados sem a ocorrência de problemas. Em meados de 1998, entretanto, vários lotes das cápsulas, contendo solução alcoólica de ritonavir, foram reprovados no ensaio de dissolução. Por meio de uma avaliação por difratometria de raios X de seu conteúdo, um novo polimorfo foi identificado. A solubilidade desse novo polimoro era muito inferior aquela da forma inicialmente comercializada. A forma inicial não era mais passível de ser obtida, apesar dos esforços. Após grandes prejuízos e trabalho descobriu-se que o fenômeno era causado pela junção de dois fatores: uma determinada conformação do ritonavir é favorecida em soluções altamente saturadas e a presença de um produto de degradação funciona como semente de nucleação para que ocorra o crescimento do novo polimorfo (BAUER et al., 2001).

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras foram avaliadas por meio das metodologias e condições descritas no capítulo 3 para as técnicas XRPD, TG/DTG, DSC e espectroscopia Raman e de absorção na região do infravermelho.

6.2.1 Difratometria de raios X de alta resolução

As medidas de difração de raios X de alta resolução foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP, nas linhas de luz D10B-XPD e D12A-XRD1, com difratômetros de múltiplos eixos Hubber.

6.2.2 Análise de distribuição de tamanho de partícula por difração a *laser*

As análises foram realizadas na empresa Biolab Sanus Farmacêutica Ltda em um analisador de tamanho de partícula por difração de radiação *laser* Beckman Counter modelo LS 13320, utilizando-se o módulo líquido universal, tendo como meio dispersor água e um detergente. A análise do padrão de difração foi realizada segundo a teoria de Fraunhofer.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Preparo de amostra

6.3.1.1 Espectro no infravermelho em pastilhas de KBr

O espectro no infravermelho dos cristais de tibolona avaliado a partir da formação de pastilhas em KBr apresentou bandas mais alargadas, comparado ao espectro de ATR, conforme ilustrado na Figura 6.7.

Tal fato é decorrência da preparação da amostra, uma vez que nessa técnica há a formação soluções sólidas através da mistura da amostra com KBr, ou outro haleto alcalino, como, por exemplo KCl. Usualmente essa mistura ocorre por meio da trituração, seguida da compactação a pressões elevadas que conduzem à formação de uma pastilha transparente. Esse procedimento pode levar à degradação do ativo, à troca iônica ou à ocorrência de transições de fase que resultam em alterações no espectro, inclusive com o alargamento das bandas de absorção no espectro. Desse modo, essa técnica não se mostra adequada para o estudo do fenômeno do polimorfismo.

Figura 6.7. Espectros FTIR em ATR e pastilhas KBr (não normalizados) dos cristais recristalizados em tolueno.

6.3.1.2 Redução do tamanho de partícula da amostra

Os resultados iniciais das análises de difração de raios X para os cristais obtidos em n-hexano não coincidiram com o padrão da estrutura triclínica descrita na base de dados CSD, apresentando orientação preferencial acentuada em várias direções, o que impossibilitou que o refinamento pelo método de Rietveld fosse completado. Após a repetição da recristalização em n-hexano (obtenção da amostra HEX), o padrão de difração continuou a mostrar a presença de picos discrepantes. O resultado de análise elementar e a identificação por espectroscopia no infravermelho confirmaram a pureza química do cristal, descartando a possibilidade da formação ou contaminação de outras espécies. Suspeitou-se da formação de um novo polimorfo.

O difratograma dos cristais obtidos pela recristalização em acetona apresentou concordância com a ficha cristalográfica da fase monoclínica (Figura 3.10-A), além de possibilitar a conclusão do refinamento pelo método de Rietveld.

Alternativamente, para a tentativa da obtenção do polimorfo triclínico puro, foi conduzida a recristalização em tolueno. O difratograma de raios X do cristal obtido em tolueno apresentou maior semelhança com o padrão cristalográfico da fase triclínica (Figura 6.9–III), porém ainda com a presença de picos não coincidentes que impossibilitaram resultados estatisticamente confiáveis e o consequente término do refinamento pelo método de Rietveld.

Em função das características dos picos discrepantes, desconfiou-se da influência da granulometria, além da forte orientação preferencial observada nas amostras de tolueno e hexano. Procedeu-se então a micronização dessas duas amostras, através de moinho com ar comprimido; após esse procedimento foi feita a obtenção do difratograma de raios X. A Tabela 6.1 apresenta a granulometria das amostras antes e após a micronização.

Tabela 6.1 - Resultados estatísticos¹ da distribuição de tamanho de partículas dos cristais de tibolona.

Amostra	d10 (μm)	d50 (μm)	d90 (μm)	Tamanho Médio (μm)
HEX	45,1	160,6	714,4	293,2
HEX micronizado	1,7	11,8	40,0	18,2
TOLU	28,0	119,5	450,6	184,8
TOLU micronizado	1,3	9,7	28,6	14,0
ACE	1,8	7,2	12,9	7,4

¹ d10, d50 e d90 referem-se, respectivamente, a 10, 50 e 90% do volume analisado com partículas de diâmetro abaixo do valor apresentado.

6.3.1.2.1 Influência da micronização na estabilidade

As alterações nas amostras em função do procedimento de micronização foram avaliadas por espectroscopia Raman. Não foram detectadas alterações na amostra recristalizada em tolueno (Figura 6.8).

Os espectros da amostra obtida em hexano indicaram que não ocorreram alterações expressivas na amostra; entretanto, é possível visualizar o aparecimento de uma banda fraca em 1622 cm^{-1} . Dessa maneira, faz-se necessário um estudo mais detalhado por outras técnicas sobre a influência desse procedimento em cristais de tibolona obtidos a partir de diferentes solventes.

Figura 6.8. Espectros Raman das amostras obtidas em tolueno (A) e n-hexano (B), antes da redução de tamanho de partícula (linha preta) e após a micronização (linha vermelha).

6.3.1.2.2 Influência do tamanho de partícula na difratometria de raios X

Os resultados de difração de raios X após a micronização de ambas as amostras mostraram-se condizentes com o padrão triclinico esperado, descartando-se, então, a possibilidade de um novo polimorfo. A Figura 6.9 apresenta o efeito do tamanho de partícula sobre os difratogramas das amostras recristalizadas em tolueno e hexano.

A amostra obtida da recristalização em acetona não apresentou problemas, coincidindo com o padrão monoclinico e possibilitando a conclusão do refinamento pelo método de Rietveld, conforme apresentado no capítulo 3.

Foi possível verificar a grande influência da micronização nos resultados da difração de raios X pelo método do pó, esclarecendo as divergências anteriormente encontradas para os cristais de hexano. Os cristais obtidos em acetona apresentam granulometria relativamente baixa, o que justifica não terem ocorrido os mesmos problemas encontrados no refinamento com os dados das amostras de solventes apolares. Esta diferença na distribuição de tamanho de partícula também foi visível nas imagens de microscopia eletrônica.

Figura 6.9. Comparação entre os padrões de difração antes (I e III) e após (II e IV) a micronização: I e II amostra HEX; III e IV amostra TOLU.

Uma alternativa para anular os efeitos do tamanho de partícula e minimizar os da orientação preferencial é a utilização de capilares e da difração de raios X de alta resolução com fonte de luz síncrotron. Nesse sistema o capilar é mantido em rotação para promover a aleatoriedade dos planos cristalinos. Em uma comparação realizada (Figura 6.10) pode-se verificar que as medidas possuem melhor qualidade e resolução

que os dados anteriormente apresentados, além de que não foram observados os efeitos do tamanho de partícula da amostra evidenciados na difração convencional.

Figura 6.10. Comparação entre difratogramas da amostra HEX não micronizada obtidos por fonte de luz síncrotron e difratometria convencional.

As diferenças entre o difratograma convencional e o obtido com fonte de luz síncrotron dos polimorfos da tibolona, em função da orientação preferencial, estão sendo pesquisadas em profundidade em um trabalho de doutorado em andamento¹. Nesse trabalho, observa-se ainda que há a presença de alguma outra fase, que não a dos polimorfos de tibolona, na amostra HEX micronizada, possivelmente uma das principais impurezas relacionadas ao fármaco, corroborando com o observado por espectroscopia Raman no item 6.4.1.2.1. Tal estudo em desenvolvimento possibilitará também a quantificação de impurezas e produtos de degradação pelo Método de Rietveld em matérias-primas de fármacos, sem a necessidade do uso de substâncias de referência e da construção de curvas de calibração.

¹ ANTONIO, S.G. *Aplicação da difração de raios X por policristais e pelo método de Rietveld de refinamento de estruturas cristalinas no estudo de polimorfos cristalinos de fármacos*. Araraquara, 2009. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista. [em fase de elaboração].

6.3.2. Condições experimentais

6.3.2.1. Influência da atmosfera do ensaio termogravimétrico

Embora os experimentos em atmosfera dinâmica de N_2 tenham indicado diferenças entre o perfil de decomposição térmica das duas formas cristalinas, ensaios de termogravimetria conduzidos a $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de ar anularam tais diferenças, resultando em curvas TG/DTG muito similares (Figura 6.10). Isso acontece porque em presença de O_2 ocorre o processo oxidativo (combustão das amostras) inexistente em atmosfera inerte de N_2 , o qual é similar para ambos os polimorfos.

Figura 6.11. Curvas TG/DTG das formas monoclinica e triclinica de tibolona em atmosfera dinâmica de ar ($50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$), $\beta = 10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, massa de $\sim 5\text{ mg}$ em cadinho de platina.

6.3.2.2. Influência da razão de aquecimento

A influência da razão de aquecimento na decomposição térmica foi estudada no capítulo 4 e é destacada na Figura 4 A. Evidencia-se antecipação no início da decomposição térmica para ambos os polimorfos da tibolona com a redução da razão de aquecimento. Matos e colaboradores (2000) descrevem que na TG a razão de aquecimento pode deslocar os eventos para temperaturas maiores ou menores, bem como influir no número de etapas de decomposição térmica e, também, causar variações

nos valores de perda de massa, induzindo a erros quando se pretende definir a estequiometria de uma dada espécie (MATOS et al., 2000).

Em relação à influência da razão de aquecimento na curva DSC dos polimorfos da tibolona, destaca-se a separação dos eventos evidenciados a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ para a forma triclinica da tibolona com a aplicação de uma razão de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (capítulo 2)

Desta maneira, no estudo do comportamento térmico de polimorfos é aconselhável que a investigação seja realizada sob diferentes razões de aquecimento.

6.3.3. Mistura de polimorfos

O resultado do refinamento pelo método de Rietveld e a análise quantitativa de fases para a amostra HEX podem ser vistos na Figura 6.12 e na Tabela 6.2. A Figura 6.12 evidencia que a amostra possui efeito de textura para o plano (110), não afetando o resultado final. Também apresenta boa correlação dos demais picos com o padrão calculado de cada fase, mostrando tratar-se de mistura constituída por 87,54% da forma triclinica e 12,46% da forma monoclinica.

Figura 6.12. Gráfico de Rietveld do resultado final do refinamento da amostra HEX. Os pontos são os dados calculados, a linha contínua azul representa os dados observados e a linha contínua inferior (em preto) é a diferença entre o padrão calculado e observado.

Tabela 6.2 – Indicadores de qualidade do refinamento

Indicadores	Valores em %
R_{wp}	14,767
$R_{Bragg}(P2_1)$	3,61
$R_{Bragg}(P1)$	2,87
χ^2	2,805

Alguns experimentos de recristalizações, conduzidas posteriormente, mostraram que também é possível a obtenção de misturas a partir de amostras recristalizadas em acetona e tolueno, como já anteriormente descrito na literatura (BOERINGTER et. al., 1999; 2002a, 2002b), em função das diferenças de entalpia de dissolução dos dois polimorfos diferirem em apenas 1kJ/mol (BOERINGTER et al., 2002a).

6.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de preparo das amostras se mostrou de grande importância nos estudos de sistemas polimórficos.

A técnica da formação de pastilhas em KBr modificou os espectros de absorção no infravermelho das amostras de tibolona. A microscopia Raman se mostrou mais adequada em função do baixo nível de manipulação das amostras, podendo, inclusive, ser utilizada para monitorar alterações nas amostras.

Alterações na razão de aquecimento e na atmosfera dos ensaios afetam diretamente os resultados nos estudos por análise térmica sendo, portanto, as condições experimentais de grande importância para a diferenciação de polimorfos.

Foi possível também identificar a grande influência do tamanho de partícula e da orientação preferencial nos resultados da difração de raios X pelo método do pó, esclarecendo as divergências anteriormente encontradas para os cristais triclinicos.

O método de Rietveld se mostrou adequado para o estudo e o monitoramento de misturas dos polimorfos de tibolona. As dificuldades de obtenção de polimorfos puros de tibolona, descritos na literatura, também foram evidenciadas, pois, ainda que seguindo os procedimentos da patente, foram obtidas misturas de polimorfos. Para o domínio do fenômeno de cristalização concomitante é necessário o controle fino da temperatura e do

grau de supersaturação, frequentemente não possível de se obter em condições industriais ou mesmo laboratoriais (BOERINGTER et. al, 2002).

Dessa maneira, o estudo de caracterização no estado sólido do polimorfismo da tibolona foi de grande utilidade para exemplificar alguns dos cuidados necessários na caracterização de sistemas polimórficos.

6.5. REFERÊNCIAS

AUER, M. E.; GRIESSER, U. J.; SAWATZKI, J. Qualitative and quantitative study of polymorphic forms in drug formulations by near infrared FT-Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 661/662, p.307-317, 2003.

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.

BERNSTEIN, J. **Polymorphism in molecular crystals**. Oxford: Oxford University Press, 2002. p. 67-93. (International Union of Crystallography monographs on crystallography, 14).

BERNSTEIN, J.; DAVEY, R. J.; HENCK, J.-O. Concomitant polymorphs. **Angewandte Chemie, International Edition**, v. 38, n.23, p.3440-3461, 1999.

BISH, D. L.; POST, J. E. **Modern powder diffraction**. Washington: Mineralogical Society of America, 1989. 369p. (Reviews in Mineralogy, v.20).

BLAGDEN, N.; DAVEY, R. J.; ROWE, R.; ROBERTS, R. Disappearing polymorphs and the role of reaction by-products: the case of sulphathiazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v.172, p.169-177, 1998.

BOERRIGTER, S. X. M.; VAN DEN HOOGENHOF, C. J. M.; MEEKES, H.; BENNEMA, P.; VLIEG, E.; VAN HOOFF, P. J. C. M. In Situ Observation of epitaxial polymorphic nucleation of the Model Steroid Methyl Analogue 17 Norethindrone. **Journal of Physical Chemistry B**, n.106, n.18, p.4725-4731, 2002.

BUGAY, D. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p.43-65, 2001.

GIRON D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, n.248, p.1-59, 1995.

HILFIKER, R. **Polymorphism in the Pharmaceutical Industry**. Weinheim: WILEY-VCH, 2006, p.104-105.

STANFORD Encyclopedia of Philosophy. Stanford: Stanford University, 2008. Disponível em: <http://plato.stanford.edu/archives/fall2008/entries/artifact/>. Acesso em: 25 maio 2009.

JENKINS, R.; SNYDER, R. L. **Introduction to X-ray Powder Diffraction**. New York: John Wiley, 1996. p.231-258. (Chemical analysis, v.138).

LEE, I. S.; LEE, A. Y.; MYERSON, A. S. Concomitant polymorphism in confined environment. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.4, p.960-968, 2007.

MATOS, J. R., MIYANO, M. H., SIQUEIRA, L., DE MOURA, M. F. V., MARQUES LUIZ, J.; Ilustração da influência da razão de aquecimento nos resultados de termogravimetria. **Química Nova**, v.23, n.1, p.113-115, 2000.

MCCUSKER, L. B.; VON DREELE, R. B.; COX, D. E.; SCARDIE, L.; SCARDIE, P. Rietveld refinement guidelines. **Journal of Applied Crystallography**, n.32, p.36-50, 1999.

MITRA, S. **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. Hoboken: John Wiley, 2003. p.1-35. (Chemical analysis, v.162).

SPONG, B. R.; PRICEB, C. P.; JAYASANKARA, A.; MATZGERB A. J.; HORNEDOA, N. R. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n.56, p.241-274, 2004.

YU, L.; REUTZEL, S. M.; STERPHENSON, G. A. Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.1, n.3, p.118-127, 1998.

CAPÍTULO VII

Considerações Finais

Neste capítulo são apresentados um resumo e os principais pontos de todo o trabalho de caracterização dos polimorfos da tibolona.

"As pessoas viajam para admirar a altura das montanhas, as imensas ondas dos mares, o longo percurso dos rios, o vasto domínio do oceano, o movimento circular das estrelas e, no entanto, elas passam por si mesmas sem se admirarem."

(Santo Agostinho)

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O esteróide sintético tibolona foi recristalizado em tolueno e acetona. Os cristais obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas sensíveis à estrutura: XRPD, SEM, MOLP, microscopia Raman, espectroscopia FTIR, TG/DTG e DSC. Todas as técnicas indicaram a presença de duas formas cristalinas distintas, a forma monoclinica, na amostra cristalizada em acetona, e a forma triclinica, na obtida em tolueno.

Cada uma das técnicas apresentadas pode ser utilizada com sucesso para a identificação de cada polimorfo, mas, em função das peculiaridades e das limitações de cada técnica, além das características da tibolona, a ferramenta mais potente e recomendada é a combinação entre elas.

Foi possível identificar a grande influência do tamanho de partícula e da orientação preferencial nos resultados da difração de raios X pelo método do pó, esclarecendo as divergências anteriormente encontradas para os cristais triclinicos. A forte orientação preferencial desses cristais é também visível por meio da microscopia.

Mesmo seguindo o procedimento de recristalização da patente, é possível se obter misturas das duas formas cristalinas de tibolona.

Além da difração, o método de preparo das amostras no estudo de polimorfos também se mostrou de grande importância na espectroscopia vibracional. A técnica da formação de pastilhas em KBr modificou os espectros de absorção no infravermelho das amostras de tibolona. As técnicas de ATR e microscopia Raman foram as mais adequadas em função do baixo nível de manipulação das amostras.

As técnicas de análise térmica evidenciaram maior estabilidade térmica do cristal monoclinico. Além disso, identificou-se a ocorrência de três eventos térmicos ainda não descritos na literatura para a forma triclinica da tibolona. A avaliação de tais eventos permitiu lançar questões relativas à não existência da transição à temperatura de 144°C da forma triclinica para a monoclinica, anteriormente descrita na literatura.

Como a presença do polimorfo triclinico na matéria-prima é indesejada, poder-se-ia, uma vez que ocorre a transição descrita, se obter a forma monoclinica apenas com o simples aquecimento. Porém, o nosso estudo mostrou que tal fato não é possível, pois esse polimorfo é quimicamente instável com a elevação da temperatura.

CAPÍTULO VIII

Perspectivas

Neste capítulo apresentam-se possibilidades de trabalhos futuros que podem ser desenvolvidos envolvendo a tibolona.

"Estuda o passado se queres prognosticar o futuro."

(Confúcio)

8.1 PERSPECTIVAS

- Determinação de curvas de solubilidade dos polimorfos em solventes diferentes.
- Estudos para obtenção de outros polimorfos por meio de técnicas, como: resfriamento brusco, ensaios de recristalização em outros sistemas de solventes, etc.
- Estudos de formação de co-cristais de tibolona visando a melhoria de propriedades, como, por exemplo, o aumento solubilidade em meio aquoso ou da estabilidade química.
- Isolamento e caracterização dos produtos de decomposição térmica do polimorfo triclinico.

APÊNDICE

APÊNDICE A – VERIFICAÇÃO DA SELETIVIDADE, DA LINEARIDADE E DA PRECISÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO DESCRITO NA FARMACOPEIA EUROPEIA

O método analítico utilizado para a determinação quantitativa da tibolona proveniente das misturas binárias entre esta espécie química e os excipientes avaliados, submetidas à estufa e à geladeira por tempo determinado, foi retirado da monografia encontrada na farmacopeia europeia para este composto. Os parâmetros analíticos de seletividade, linearidade e precisão foram avaliados conforme os critérios propostos pela resolução da Anvisa RE nº 899, de 29/5/2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Os parâmetros cromatográficos utilizados encontram-se descritos na seção de métodos do capítulo 5.

Para avaliação da linearidade foram construídas curvas de calibração com soluções da substância de referência dissolvidas no diluente preconizado (Figura 8.1). A faixa de concentração utilizada no estudo de linearidade nas curvas foi de 0,05 a 5,00 mg.mL⁻¹ para a tibolona. O coeficiente de correlação (r) encontrado para a curva obtida no estudo de linearidade foi igual a 1,00. A seletividade do método foi determinada por meio da análise de soluções individuais dos excipientes na concentração de 1,00 mg.mL⁻¹. Não foi evidenciado qualquer pico cromatográfico proveniente dos excipientes na região do cromatograma na qual a tibolona foi encontrada. A precisão foi avaliada por meio de 6 injeções, no mesmo dia (intra-dia), de uma solução de tibolona na concentração de 1,00 mg.mL⁻¹. O desvio padrão relativo encontrado foi inferior a 2,0%.

Os cromatogramas característicos da solução padrão de tibolona e da amostra na proporção 1:1 tibolona e excipiente encontram-se nas Figuras 8.2 e 8.3.

Figura 8.1. Curva de linearidade obtida na faixa de concentração de 0,05 a 5 mg mL⁻¹ para solução padrão de tibolona.

Figura 8.2. Cromatograma da solução padrão de tibolona na concentração de 1,00 mg ml⁻¹.

Figura 8.3. Cromatograma de amostra de mistura binária 1:1 polimorfo triclinico e amido de batata.

REFERÊNCIAS - APÊNDICE A

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE, n. 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em: 20 out. 2009.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

CURRÍCULO LATTES

Dados pessoais

Gabriel Lima Barros de Araujo

Possui graduação pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2005), atualmente é aluno de doutorado do Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, atuando principalmente nos seguintes temas: análise térmica, polimorfismo de fármacos e tecnologia farmacêutica.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização do currículo em 01/11/2009

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/1901271310079230>

**Certificado
pelo autor em
01/11/09**

Nome Gabriel Lima Barros de Araujo

Nome em citações bibliográficas ARAUJO, G.L.B.; DE ARAUJO, G.L.B.; ARAÚJO, G.L.B.; Araújo, G. L. B.

Formação acadêmica/Titulação

1999 - 2005 Graduação .
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Atuação profissional

LIBBS Farmacêutica LTDA, LIBBS, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - Atual Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Pesquisador, Carga horária: 42, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Departamento de Pesquisa e Inovação

BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA, BIOLAB, Brasil.

Vínculo institucional

2003 - 2008 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de P&D (2003-2006); Pesquisador (2006-2008), Carga horária: 42, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento

ORGANON DO BRASIL, ORGANON, Brasil.

Vínculo institucional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2002 - 2003 Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 42.

2002 - 2002 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Bolsista do Programa de Capacitação Técnica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Departamento de Farmacologia Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo . Projeto: Sinalização Intracelular na Inflamação no SNC, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Orientador: Cristoforo Scavone.

Vínculo institucional

2001 - 2001 Vínculo: Livre ; Colaborador, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Outras informações Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Protozoologia: atividades de participação em projeto envolvendo fármacos encapsulados em lipossomos irradiados por raios gama de cobalto 60, contra Leishmania spp. Orientador: Dr. André Gustavo Tempone

Produção bibliográfica**Artigos completos publicados em periódicos**

1. CIDES DA SILVA, L. C. ; ARAÚJO, G. L. B. ; SEGISMUNDO, N. R. ; MOSCARDINI, E. F. ; MERCURI, L. P. ; COSENTINO, I. C. ; FANTINI, M. C. A. ; MATOS, J. R. . DSC estimation of structural and textural parameters of SBA-15 silica using water probe. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 97, p. 701-704, 2009.
2. NAKAZONE, MA ; ARAUJO, G.L.B. ; PINHEIRO, A ; TAKANO, C ; GODOY, MF ; SOUZA, DRS . Quantificação do desperdício de medicamentos na prática clínica. *Arquivos de Ciências da Saúde. Arquivos de Ciências da Saúde (FAMERP)*, v. 13, p. 75-81, 2006.

Capítulos de livros publicados

1. ARAUJO, G.L.B.; MERCURI, L.P.; MATOS, J. R. Análise Térmica Aplicada a Fármacos e Medicamentos. In: SILVIA STORPIRTIS, JOSÉ EDUARDO GONÇALVES, CHANG CHIANN, MARÍA NELLA GALI.. (Org.). *BIOFARMACOTÉCNICA*. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2009, v. único, p. 32-65.

Resumos publicados em anais de congressos

1. ARAUJO, G.L.B. ; HONDA, A. M. ; MATOS, J. R. . Estudo do comportamento térmico de ramipril e das interações com excipientes. In: 30a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia, SP. 30a Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2007.
2. ARAUJO, G.L.B. ; CHING, R. C. K. ; HONDA, A. M. ; MATOS, J. R. . Aplicação da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) na avaliação da estabilidade de um esteroide sintético. In: XV CONGRESSO PAULISTA DE FARMACÊUTICOS, 2007, SÃO PAULO. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - suplemento*, 2007.
3. ARAUJO, G.L.B. ; MATOS, J. R ; ANDRADE, F. R. D. ; ZAIM, M. H. ; FARIA, D. L. A. ; CARVALHO, F. M. S. . Análise quantitativa dos polimorfos da Tibolona. In: Simpósio Latino Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos, 2007, Fortaleza - CE. *Simpósio Latino Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos*, 2007.
4. ARAUJO, G.L.B. ; ZAIM, M. H. ; CARVALHO, F. M. S. ; ANDRADE, F. R. D. ; FARIA, D. L. A. ; MATOS, J. R. . Solid State characterization of a synthetic steroid crystal form. In: Simpósio Latino Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos, 2007, Fortaleza - CE. *Simpósio Latino Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos*, 2007.
5. NORIEGA, P. ; PITOMBO, R. N. M. ; ARAUJO, G.L.B. ; MATOS, J. R ; WASICKY, A. ; BACCHI, E. M. . AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO DE *Passiflora alata* Curtis, MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).. In: *Semana Farmacêutica USP*, 2007, São Paulo. *Resumo do evento*, 2007.
6. ARAUJO, G.L.B. ; Luís C C ; Thais V. S. ; MATOS, J. R. . Estudo do Comportamento Térmico do Cloxazolam e das Interações com Excipientes.. In: *Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria - Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria*, 2006, Poços de Caldas, MG. *Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria - Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria*, 2006.
7. ARAUJO, G.L.B. . Racionalização do Desperdício de Medicamentos Prescritos na Prática Clínica. In: XVIII Congresso Médico do Oeste Paulista, 2005, São José do Rio Preto. *Anais do XVIII Congresso Médico do Oeste Paulista*, 2005.

Artigos aceitos para publicação

1. ANTONIO, S. G. ; FERREIRA, F. F. ; ARAUJO, G. L. B. ; MATOS, J. R ; PAIVA-SANTOS, C. O. X-ray diffraction data of tibolone delta 4 isomer (isotibolone). *Powder Diffraction*, 2009.
2. ARAUJO, G. L. B. ; FARIA, D. L. A. ; ZAIM, M. H. ; CARVALHO, F. M. S. ; ANDRADE, F. R. D. ; Matos, J. R.. Thermal studies on polymorphic structures of tibolone. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2009.
3. ARAUJO, G. L. B. ; SALVIO, H. ; ZAIM, M. H. ; Matos, J. R. Drug excipient interaction study with polymorphic forms of tibolone. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2009.

Participação em eventos

1. XV CONGRESSO PAULISTA DE FARMACÊUTICOS.APLICAÇÃO DA CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) NA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE UM ESTERÓIDE SINTÉTICO. 2007. (Congresso).
2. Simpósio Latino Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos.Análise quantitativa dos polimorfos da Tibolona. 2007. (Simpósio).
3. Simpósio Latino Americano de Polimorfismo e Cristalização em Fármacos e Medicamentos.Solid State characterization of a synthetic steroid crystal form. 2007. (Simpósio).
4. XVIII Congresso Médico do Oeste Paulista.Racionalização do Desperdício de Medicamentos Prescritos na Prática Clínica. 2005. (Congresso).

Organização de eventos

1. ARAUJO, G. L. B. ; SALVIO, H. . SEMINÁRIOS SOLIDÁRIOS - TÓPICOS ESPECIAIS EM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO. 2009. (Outro).
2. ARAUJO, G.L.B. ; SALVIO, H. . SEMINÁRIOS SOLIDÁRIOS - IMPUREZAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS. 2008. (Outro).
3. ARAUJO, G.L.B. . SEMINÁRIOS SOLIDÁRIOS - FÁRMACOS QUIRAIS. 2007. (Outro).
4. ★ ARAUJO, G.L.B. . SEMINÁRIOS SOLIDÁRIOS - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMO EM FÁRMACOS. 2006. (Outro).

Outras informações relevantes

Participação em curso - "Comunicações Verbais e Não Verbais - Oratória / Retórica, Reuniões, Inteligência Interpessoal e Técnicas de Apresentações" pela METHODUS consultoria em Aprendizagem (30 hrs).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em
13/11/2009 às 18:48:41

FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 3127038/1 - Gabriel Lima Barros de Araújo

Email:	gabriel.araujo@usp.br
Data de Nascimento:	19/07/1979
Cédula de Identidade:	RG - 28.016.736-2 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2004

Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	15/02/2006
Início da Contagem de Prazo:	15/02/2006
Data Limite:	15/02/2010
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 15/02/2006 a 22/06/2006 E.Mail: hajudan@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Jivaldo do Rosario Matos - 23/06/2006 até o presente. E.Mail: jdmatos@gmail.com

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:

Ingressou no Doutorado Direto em
15/02/2006

Matrícula de Acompanhamento em
13/07/2009

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2009

Impresso em: 10/11/09 12:48:16

Prazo Máximo para Aprovação no Exame de Qualificação:

15/08/2009 (verifique em sua CPG se ela possui um prazo anterior)

Data de Aprovação no Exame de Qualificação:

Aprovado em 15/07/2009

9139 - 3127038/1 - Gabriel Lima Barros de Araújo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
QFL5619-2/1	Microscopia Raman: Fundamentos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	08/03/2006	08/06/2006	120	8	100.0	A	N	Concluída
FBF5777-1/1	Seminários Gerais	13/03/2006	25/06/2006	45	3	93.0	A	N	Concluída
QFL5714-4/1	Introdução à Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/09/2006	14/11/2006	90	6	100.0	A	N	Concluída
FBT5729-5/2	Liofilização e suas Aplicações a Alimentos e a Medicamentos	04/10/2006	06/12/2006	90	6	90.0	A	N	Concluída
GMG5851-3/3	Tópicos Especiais em Microscopia (Instituto de Geociências - Universidade de São Paulo)	14/03/2007	23/05/2007	90	6	100.0	B	N	Concluída
FBA5703-4/1	Tópicos em Tratamento de Dados para Ciência e Tecnologia de Alimentos	11/06/2007	24/06/2007	60	0	0.0	-	N	Matrícula cancelada

Disciplinas:	25	25	29
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	29

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2009 - Impresso em: 10/11/09 12:48:16