

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DA CRISTALIZAÇÃO DO METRONIDAZOL POR ACOMPANHAMENTO COM  
TÉCNICAS DE ANÁLISE EM TEMPO REAL**

**CAMILA MACHADO DIAS**

**RIO DE JANEIRO  
2021**

Camila Machado Dias

Avaliação da Cristalização do Metronidazol por Acompanhamento com Técnicas de Análise em  
Tempo Real

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Química do  
Instituto de Química, Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
(Química).

Orientador: Dr. João Francisco Cajaiba da Silva

Rio de Janeiro  
2021

**Camila Machado Dias**

**Avaliação da Cristalização do Metronidazol por Acompanhamento com Técnicas de Análise  
em Tempo Real**

**Aprovada em \_\_ / \_\_ / \_\_**

---

**Dr. João Francisco Cajaiba da Silva, IQ - UFRJ**

---

**Dr(a). Michelle Jakeline Cunha Rezende, IQ - UFRJ**

---

**Dr. Ricardo Cunha Michel, IQ - UFRJ**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, que colocaram esse objetivo em minha vida e, mesmo quando quis desistir, me fortaleceram e colocaram amigos em meu caminho para que esta etapa fosse concluída.

Ao meu orientador João Cajaiba, que me recebeu em seu laboratório e como um pai tem cuidado para que eu chegue ao fim deste trabalho e tenha meu diploma.

Aos meus amigos Teresa Cristina, Carol Strunks e Bêzinho, Jhonatan, Dijan, Mauro, Marcelo, Quelli Larissa, Vanessa (Sá menina), Daniel, Ar Thur, Adolfo, Carol Araújo e Leonardo León Marrenco (Colômbia) que realmente deram sentido à caminhada. Muitos perrengues, jantares no bandejão, lanches, xerox, karaokês, churras, longas horas de conversa fizeram da gente amigos para toda a vida...o QG estará sempre aberto! Enfim, somos todos MESTRINHOS!

Aos meus amigos do NQTR, foram tantos lanches, horas e horas juntos, tantas conversas no refeitório, tantos esporros da Garotinha que o ganho não foi só profissional, mas também cultural e social. Experiências para toda a vida!

Ao programa PGQu, que além de acreditar no futuro dos profissionais, busca tratar seus alunos com atenção e particularidade. Obrigada, de coração.

A UFRJ, que ao longo dos últimos 13 anos, tem sido minha casa, minha ruína, minha alegria. Um mix de sentimentos, mas que fortalece minha jornada como um ser humano mais sábio e capaz de dar vida aos seus ensinamentos.

Em especial, quero deixar registrado para aqueles que um dia perderam a vontade de concluir um sonho, tenham amigos. Faça alguns, poucos, mas façam. Não entrem na neura de competição da pós, não somos nada sem o outro. Aqui deixo um relato breve do quanto fui agraciada, premiada e abençoada por conhecer duas pessoas, Alline Viana e Felipe Bispo. Fiquei doente, mal pelo meu TOC, situações ruins ao longo da minha vida fizeram com que não tivesse condições de escrever minha dissertação com calma e sozinha. Foi necessário intervir medicamente, por um longo tempo. Fiquei mal, por várias vezes quase desisti do meu mestrado. Mas quando algo tem que acontecer, acontece, não importa a força que o tente impedir. Vai acontecer. Essa dissertação é prova disso. Foram essas duas pessoas que dedicaram tempo e compartilharam conhecimento para que a parte escrita saísse. Isso não acontece com frequência no mundo acadêmico, não mesmo. A competição torna esse espaço solitário e mesquinho. Então, se hoje posso escrever essa página de

agradecimento, é porque tive amigos, desses que brigam contigo, falam verdades, mas que te ajudam de fato. O fato é que, se existe registro deste trabalho, isso se deve a eles.

Então, como forma de agradecimento, dedico as páginas deste trabalho e meu título aos meus amigos.

“Quem tem amigos, não fica sem dissertação! ”

Camila Dias, 2021.

## RESUMO

O processo de cristalização é uma operação unitária muito utilizada industrialmente, pois em uma única etapa, pode-se obter cristais de alta pureza e isolados de outros possíveis subprodutos. Porém, para que os cristais apresentem as características finais adequadas, como hábito cristalino e dimensões uniformes, o controle do processo de cristalização se torna objeto de estudo contínuo. Alguns parâmetros de controle são: velocidade de agitação, taxa de resfriamento, semeadura - adição de monocristal para indução da cristalização -, adição de antissolvente etc. Diversos estudos com metronidazol, derivado do nitroimidazol, fármaco classificado como anti-helmínticos e anti-protozoários, mostram que há dificuldade para sua compactação e confecção dos comprimidos, o que acarreta em problemas de desintegração e dissolução desses, afetando na biodisponibilidade do fármaco; assim, o controle da etapa de cristalização é uma etapa chave em todo o processo. Foram preparadas soluções supersaturadas em etanol e água a 42°C, resfriadas nas taxas de 0,2, 0,4 e 0,6°C·min<sup>-1</sup> até a temperatura final de 5°C, obtendo dados para comparação da temperatura de início de cristalização, tamanho médio dos cristais e hábito cristalino. O tamanho das partículas foi avaliado por medição de feixe focalizado – *FBRM* (Focused Beam Reflectance Measurement); o hábito cristalino por um vídeo microscópio inline – *PVM* (Particle Vision and Measurement) e por microscopia eletrônica de varredura dos cristais obtidos após filtração a vácuo e secagem por 24 h em estufa a 60°C. Por fim, a temperatura de início de cristalização foi avaliada por índice de retroespalhamento (*RBI*) e análise de imagem, por alteração do sinal das componentes vermelho, verde e azul (*RGB*), a qual, por utilizar uma câmera como sensor, torna a análise de baixo custo e de fácil acesso. Também foi estudada a influência do posicionamento da câmera no sistema, sendo uma interna (*inline*) e outra externa (*online*) ao reator. Com o uso do *PVM*, pode-se avaliar *inline* os diferentes hábitos cristalinos influenciados pelas taxas de resfriamento e solventes, sendo corroborados pelas imagens do *MEV*. No sistema em etanol, houve apenas a formação do hábito cristalino prismático para as três taxas; contudo, na cristalização em água, a taxa de 0,2°C·min<sup>-1</sup> formou cristais com hábito cristalino prismático; para as taxas 0,4°C e 0,6°C·min<sup>-1</sup>, a primeira formou uma mistura de cristais em formato de prisma com aciculares e a segunda cristais aciculares. Os sistemas de câmeras *online* e *inline* captaram o início da cristalização ao mesmo tempo, mostrando que a técnica não é influenciada pela posição do sensor, contudo, a posição externa apresentou menor capacidade de captação do sinal *RGB*. Todas as técnicas de análise em tempo real utilizadas detectaram o início da cristalização em tempos estatisticamente iguais para uma mesma taxa de resfriamento. Com bases nesses dados a condição mais indicada para produção de comprimidos de metronidazol é a cristalização a partir de soluções aquosas a uma taxa de 0,2°C/min.

## ABSTRACT

The crystallization process is a unitary operation widely used industrially, because in a single step, high purity crystals and possible possible by-products can be obtained. However, for the crystals to present the final selected characteristics, as there are crystals and uniform dimensions, or control of the crystallization process becomes an object of continuous study. Some control parameters are: agitation speed, cooling rate, seeding - addition of monocrystal for induction of crystallization, addition of anti-solvent, etc. shows that there is difficulty in compacting and inspecting tablets, or in problems of disintegration and dissolution of these, affecting the bioavailability of the drug; thus, the control of the crystallization step is a key step in the process. Supersaturated solutions were prepared in ethanol and water at 42 ° C, cooled at rates of 0.2, 0.4 and 0.6 ° C.min-1 to a final temperature of 5 ° C, obtaining data for comparison of the starting temperature crystallization, average crystal size and crystalline habit.

The sample size was assessed by a focused focus - *FBRM* (Focused Beam Reflectance measurement); there is a lens by an *inline* microscope video - *PVM* (Particle Vision and Measurement) and by scanning crystal electron microscopy after vacuum filtration and drying for 24 h in an oven at 60°C. Finally, the temperature of the beginning of crystallization was evaluated by the backscatter index (*RBI*) and image analysis, by changing the signal of the red, green and blue components (*RGB*), which, by using a camera as a sensor, low cost analysis and easy access. The influence of the camera's positioning in the system was also studied, one being internal (*online*) and the other external (*online*) to the reactor. With the use of *PVM*, it is possible to evaluate online the different crystal habits influenced by the rates and solvents, being confirmed by the SEM images. In the ethanol system, there was only one formation of the crystalline habit of hexagonal prism for three rates, however, of crystallization in water, of 0.2°C/min from crystals with prismatic crystal habit with an average size close to 100 µm; for rates of 0.4°C and 0.6°C/min, average size varying between 80 and 90 µm, but the first forms a mixture of prismatic crystals with acicular and the second acicular crystals. The *online* and *inline* camera systems captured the beginning of crystallization at the same time, showing that the technique is not influenced by the position of the sensor, however, the external position showed less capacity to capture the *RGB* signal. All the real-time analysis techniques used detected the onset of crystallization at statistically equal times for the same cooling rate. Based on these data, the most suitable condition for making metronidazole tablets is crystallization from aqueous solutions at a rate of 0.2°C/min.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fórmula estrutural do metronidazol.....	15
Figura 2 - Hábitos cristalinos: I - tabular; II - platy; III - prismático; IV - acicular; V - bladed. Adaptado de (BERNSTEIN, 2002) .....	16
Figura 3 - Constituição de um cristal por repetição de uma célula unitária. Adaptado de link.....	17
Figura 4 - Representação dos parâmetros de uma célula unitária, em que a, b e c indicam o comprimentos dos três eixos, enquanto $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ são os ângulos existentes nos vértices da célula. ....	17
Figura 5 - Arranjos atômicos de Bravais. Adapatado de (TOPPR WEBSITE, [S.d.]) .....	18
Figura 6 - Hábitos do metronizadol obtidos por meio de resfriamento. Adaptado de (DI MARTINO, P., CENSI, et al., 2007).....	21
Figura 7- Hábitos do metronizadol obtidos pelo método de antissolvente. Adaptado de (DI MARTINO, P., CENSI, et al., 2007). .....	22
Figura 8 - Cristais obtidos por (a) evaporação da água, (b) semeadura e (c) mistura de solventes. ....	23
Figura 9 - Exemplo de webcam com destaque ao sensor CCD).DE OLIVEIRA, 2019) .....	24
Figura 10 - Sistema de cores <i>RGB</i> ).DE OLIVEIRA, 2019) .....	24
Figura 11 - Esquema de funcionamento da sonda <i>FBRM</i> . Adaptado de (METTLER TOLEDO, 2007) .....	28
Figura 12 - Ilustração da medida do comprimento de corda através de uma sonda <i>FBRM</i> . Adaptado de (ABU BAKAR, NAGY, et al., 2010) .....	29
Figura 13 - Obtenção da distribuição do comprimento de corda. Adaptado de (METTLER TOLEDO, 2007) .....	30
Figura 14. Ilustração do equipamento Lansetec <i>FBRM</i> S400 com tecnologia <i>FBRM</i> .....	31
Figura 15. Ilustração do Microscópio Eletrônico de Varredura - Phenom ProX .....	32
Figura 16 - (a) Webcam Microsoft LifeCam HD 720p e (b) webcam Endoscope IP67 HD 720p....	33
Figura 17 - Ilustração do equipamento ParticleView V819 com tecnologia <i>PVM</i> .....	34
Figura 18 - Ilustração do equipamento OptiMax 1001.....	35

Figura 19 - Aparato experimental usado no estudo da cristalização do metronidazol. A sonda do <i>FBRM</i> não está explícita na imagem. No entanto é destacada a sua fibra óptica, para nortear onde a sonda foi instalada.....	37
Figura 20 - Detalhe interno do vaso do reator OptiMax 1001, indicando o sistema de iluminação e a janela de visualização de vidro. ....	38
Figura 21 - Ilustração do processo de remoção de calor do vaso do reator OptiMax 1001. ....	40
Figura 22 - Regressão linear das curvas de resfriamento de cada taxa aplicada em experimentos usando água como meio de teste, com variação de 35°C a 5°C.....	42
Figura 23 - Exemplo de dados coletados durante a solubilização e cristalização do metronidazol em água como solvente, a uma taxa de resfriamento de 0,2°C/min. ....	43
Figura 24 - Taxa de 0,6°C/min mostrando a temperatura inicial de cristalização e a estabilização do crescimento antes de 5°C. ....	44
Figura 25 - Medida dos sinais <i>RBI</i> , <i>RGB</i> , contagem/s e temperatura para o processo de cristalização do metronidazol em água como solvente, a uma taxa de resfriamento de 0,6°C/min. ....	46
Figura 26 - Cristalização do metronidazol em água como solvente com taxa de resfriamento de 0,2°C/min.....	47
Figura 27 - Cristalização do metronidazol em água como solvente com taxa de resfriamento de 0,4°C/min.....	48
Figura 28 - Cristalização do metronidazol em água como solvente com taxa de resfriamento de 0,6°C/min.....	48
Figura 29 - Contagens no processo de cristalização de metronidazol em água como solvente na taxa de resfriamento de 0,6°C/min.....	49
Figura 30 - Contagens no processo de cristalização de metronidazol em água como solvente na taxa de resfriamento de 0,4 e 0,2°C/min (A e B, respectivamente). ....	50
Figura 31 - Comportamento das curvas <i>RGB</i> das câmeras <i>inline</i> e <i>online</i> e do sinal <i>FBRM</i> no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,2°C/min. ....	53
Figura 32 - Comportamento das curvas <i>RGB</i> das câmeras <i>inline</i> e <i>online</i> e do sinal <i>FBRM</i> no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,4°C/min. ....	53
Figura 33 - Comportamento das curvas <i>RGB</i> das câmeras <i>inline</i> e <i>online</i> e do sinal <i>FBRM</i> no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,6°C/min. ....	54

Figura 34 - Comportamento da curvas <i>RBI</i> e do sinal <i>FBRM</i> no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,4°C/min.....	55
Figura 35 - Comportamento da curvas <i>RBI</i> e do sinal <i>FBRM</i> no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,6°C/min.....	55
Figura 36 - Comparativo das temperaturas de cristalização nas diferentes taxas e técnicas. ....	56
Figura 37 - Imagem capturada pela câmera <i>online</i> na etapa inicial do processo, sem adição de soluto, a 300 rpm e 42°C. ....	58
Figura 38 - Imagem capturada pela câmera <i>online</i> durante o processo de formação dos primeiros cristais em solução aquosa 0,06 mol/L, a 300 rpm e taxa de resfriamento de 0,4°C/mim. ....	58
Figura 39 - Imagens obtidas no momento da cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa de resfriamento de 0,4°C/mim, para diferentes momento, usando a câmera <i>online</i> . ....	59
Figura 40 - Images capturadas pela câmera <i>inline</i> ).a) Etapa inicial, sem adição de soluto, a 300 rpm e 42°C; (b) momentos antes do início da cristalização, (c) etapa de crescimento cristalino e formação de novos cristais, a um resfriamento de 0,2 °C/min, (d) cristalização concluída.....	60
Figura 41 - Imagens dos cristais obtidos por vídeo-microscópio <i>PVM</i> e <i>MEV</i> (colunas da esquerda e direita, respectivamente).a) e (b) - cristais com hábito prismático obtidos a 0,2°C/min).c) e (d) - cristais com hábito prismático e acicular obtidos a 0,4°C/min).e) e (f) - cristais com hábito acicular obtidos a 0,6°C/min. Ampliações no <i>MEV</i> de 265 vezes.....	62
Figura 42 - Imagens dos cristais obtidos por <i>MEV</i> (ampliação de 440 vezes), em soluções etanólicas de metronidazol 0,06 mol/L).a), (b) e (c) - taxas de resfriamento de 0,2°C/min, 0,4°C/min e 0,6°C/min, respectivamente.....	63
Figura 43 - Representação em 3D da célula unitária do metronidazol. ....	64
Figura 44 - Imagens dos cristais de metronidazol obtidos a 0,2°C/min para os solventes (a) etanol e (b) água. ....	65
Figura 45 - Imagens dos cristais obtidos por <i>MEV</i> (ampliação de 380 vezes), em soluções aquosas de metronidazol 0,06 mol/L).a) e (b) - taxas de resfriamento de 0,01°C/min e 0,05°C/min, respectivamente. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos sete sistemas cristalinos.....	18
Tabela 2 - Avaliação da capacidade de resfriamento do aparato experimental empregado (OptiMax 1001 associado a um criostato) utilizando 500 mL de água como referência e diferentes taxas de resfriamento.....	41
Tabela 3 - Contagem das partículas para as três taxas de resfriamento avaliadas.....	51
Tabela 4 - Comparação dos valores de $T_{onset}$ calculados em função da taxa de resfriamento e das técnicas de medida usadas. Intervalos com 95% de confiança e $T_{onset}$ calculado como sendo a média de 3 replicatas.....	56

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>FBRM</i>	do inglês <i>Focused Beam Reflectance Measurement</i> - Medida de refletância por um Feixe de Luz Focalizado
<i>MEV</i>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>DSC</i>	do inglês <i>Differential Scanning Calorimetry</i> - Calorimetria Exploratória Diferencial
<i>DRX</i>	Difratometria de Raios-X
<i>THF</i>	Tetraidrofurano
<i>CCD</i>	do inglês charge-coupled device – dispositivo de carga acoplada
<i>RGB</i>	do inglês Red, Green and Blue – sistemas de cores Vermelho, Verde, Azul
<i>PVM</i>	do inglês Particle Vision and Measurement - Medição e Visualização de Partículas
<i>RBI</i>	do inglês <i>Relative Backscatter Index</i> - Índice Relativo de Retroespalhamento
<i>HD</i>	High Definition
<i>LED</i>	do inglês <i>Light-Emitting Diode</i> - Diodo Emissor de Luz
<i>T<sub>r</sub></i>	Temperatura no interior do reator
<i>T<sub>j</sub></i>	Temperatura da jaqueta
<i>T<sub>r</sub>- T<sub>j</sub></i>	Diferença entre a temperatura do reator e da jaqueta

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE TABELAS .....	6
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	7
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVOS .....	14
2.1. OBJETIVO GERAL .....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1. METRONIDAZOL .....	15
3.2. HÁBITO CRISTALINO, POLIMORFISMO E AMORFISMO .....	16
3.3. CRISTALIZAÇÃO DE FÁRMACOS .....	19
3.3.1. ESTUDOS DE CRISTALIZAÇÃO DO METRONIDAZOL .....	21
3.4. ANÁLISE DE IMAGENS .....	23
3.4.1. MEDIDAS <i>RGB</i> .....	24
3.4.2. MEDIDAS <i>RBI</i> .....	25
3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	26
3.6. MEDIÇÃO DE REFLETÂNCIA POR UM FEIXE DE LUZ FOCALIZADO ( <i>FBRM</i> ) .....	27
4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	31
4.1. MATERIAIS .....	31
4.2. EQUIPAMENTOS .....	31
4.2.1. Lansetec <i>FBRM S400</i> .....	31
4.2.2. Microscópio Eletrônico de Varredura – <i>Phenom ProX</i> .....	32
4.2.3. Webcams .....	32
4.2.4. Vídeo-microscópio <i>ParticleView V819</i> com tecnologia <i>PVM</i> .....	33
4.2.5. <i>OptiMax 1001</i> .....	34
5. MÉTODOS .....	35
5.1. CRISTALIZAÇÃO DO METRONIDAZOL .....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
6.1. DETERMINAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	40
6.1.1. DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE RESFRIAMENTO .....	40
6.1.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES - ETAPA DE SOLUBILIZAÇÃO .....	42

6.1.3	ETAPA DE CRISTALIZAÇÃO.....	43
6.2	AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE INÍCIO DE CRISTALIZAÇÃO .....	47
6.2.1	ANÁLISE POR <i>FBRM</i> .....	47
6.2.2	ANÁLISE PELO PARÂMETRO $T_r - T_j$ .....	52
6.2.3	ANÁLISE POR IMAGEM .....	52
5.2.7	COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS.....	56
5.3	AVALIAÇÃO DO HÁBITO CRISTALINO.....	57
5.3.1	ANÁLISE DO HÁBITO CRISTALINO <i>INLINE</i> E <i>OFF-LINE</i> .....	61
6	CONCLUSÃO .....	68
7	REFERÊNCIAS .....	69
	APÊNDICE A.....	75
	APÊNDICE B .....	76

## 1. INTRODUÇÃO

O processo em que ocorre a organização de átomos ou moléculas a uma estrutura cristalina rígida e de menor estado energético é conhecido como cristalização e dentre as características de um sólido cristalino está o alto grau de pureza (PAUFLER, 1993). Os cristais possuem seus átomos, íons ou moléculas em um arranjo periódico que se repete nas três dimensões, tendo como origem uma unidade estrutural básica conhecida como célula unitária, que define características do cristal formado.

O processo de cristalização ocorre quando em uma solução a solubilidade de um soluto é reduzida abaixo da sua concentração de solubilidade, o que torna a solução supersaturada neste soluto e ocorre a formação dos respectivos cristais. O processo de cristalização pode ser induzido por meio de duas técnicas básicas:

- a) Redução do volume de solvente com o uso de meios físicos (evaporação e ebulação), aumentando a concentração dos solutos;
- b) Diminuição da solubilidade do soluto em solução por meio agentes externos (temperatura, antissolvente, etc).

Em si, o mecanismo de cristalização pode ser explicado principalmente por dois estágios, sendo eles a nucleação e o crescimento (MULLIN, 2001, ROHANI, S, HORNE, *et al.*, 2005).

### a) Nucleação

O fenômeno de nucleação ocorre quando as partículas do soluto na solução supersaturada se reúnem e atingem um tamanho crítico. A nucleação se divide em primária e secundária. A nucleação primária ocorre quando se formam núcleos diretamente da solução, enquanto na nucleação secundária ocorre a formação dos núcleos na presença de outros sólidos. Neste último caso, fragmentos dos primeiros cristais formados provocam a formação de novos núcleos (TER HORST, SCHMIDT, *et al.*, 2015). A taxa de nucleação sofre influência da molécula que está sendo cristalizada: quanto mais irregular sua forma, mais demorada é a nucleação (especialmente moléculas orgânicas grandes). A polaridade é outro fator relevante, quanto menos polar a estrutura, mais difícil a nucleação. Parâmetros como tipo de solvente e nível de supersaturação também podem ser usados para manipular da taxa de nucleação (MULLIN, 2001). O controle da nucleação também pode ser feito por meio da adição de uma “semente” (cristais pequenos do mesmo material, provenientes de uma operação anterior). A semeadura possibilita a manipulação da taxa de nucleação, uma vez que se tenha definido o tamanho e a quantidade (massa) de sementes no meio (MULLIN, 2001).

### b) Crescimento do cristal

Etapa seguinte à nucleação, nela o cristalito já formado tem aumento de volume. O crescimento é um processo espontâneo que é responsável pelo formato dos cristais (hábito) na escala macroscópica (TER HORST, SCHMIDT, *et al.*, 2015). A velocidade de crescimento do cristal e a característica do produto final podem ser condicionadas a partir de certos parâmetros de operação tais como velocidade de agitação do meio reacional, grau de supersaturação, temperatura, etc. Por exemplo, uma solução que possui o grau de supersaturação demasiado elevado se encontra em um equilíbrio termodinâmico muito instável, provocando uma velocidade de nucleação muito elevada e, por consequência, formam-se muitos núcleos simultaneamente. Por fim, o produto final é formado por cristais muito pequenos, já que o crescimento é limitado (TER HORST, SCHMIDT, *et al.*, 2015).

Além das etapas de nucleação e de crescimento, a aglomeração é outro evento que pode ocorrer paralelamente na cristalização. Os sítios de cristais já formados agregam-se entre si, provocando um distúRB/o (mudança) no hábito do cristal. A formação de agregados pode diminuir a cristalinidade do sólido formado, prejudicando a pureza do material (MULLIN, 2001).

A cristalização é um processo tanto natural quanto industrial. Na indústria ela é usada principalmente nas etapas de separação e purificação de uma operação e possui aplicação em diversas áreas, como por exemplo nos setores alimentício, químico e farmacêutico. Os cristais podem ser obtidos através de alguns métodos, os mais conhecidos são resfriamento, adição de antissolvente, evaporação e reação (precipitação). A finalidade do processo de cristalização, a solubilidade e a estabilidade do soluto no solvente escolhido são fatores que influenciam na escolha do método a ser empregado.

O processo de resfriamento, técnica empregada neste trabalho, consiste em diminuir a temperatura de uma solução a uma taxa programada até o aparecimento dos cristais do soluto. O valor da taxa pode influenciar no hábito cristalino, que corresponde à aparência típica do cristal quanto ao tamanho e à forma. Quanto menor a taxa, maior o tempo de organização da estrutura cristalina e por consequência maior o tamanho dos cristais.

O processo de resfriamento a uma taxa rápida, que resulta na cristalização em tempo curto, é conhecido como precipitação e geralmente resulta na formação de sólidos cuja estrutura é pouco organizada ou cujos tamanhos dos cristais são menores do que num método utilizando uma taxa lenta (TER HORST, SCHMIDT, *et al.*, 2015).

A cristalização aplicada na indústria farmacêutica tem como um dos objetivos a preparação de Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) sólidos, pois os IFAs na forma sólida são mais estáveis e

econômicos para distribuição de medicamentos. Os IFAs podem estar na forma de polimorfos, solvatos, hidratos, sais, co-cristais e sólidos amorfos. (ROHANI, Sohrab, 2010) Durante o processo de cristalização o fármaco pode cristalizar em mais de um arranjo cristalino diferente. Essas estruturas, embora quimicamente iguais, são genericamente distintas e podem produzir efeitos distintos no organismo. Esse fenômeno é conhecido como polimorfismo e essa propriedade torna necessário que haja uma avaliação cuidadosa da indústria farmacêutica quanto às propriedades que cada polimorfo pode apresentar (ROHANI, Sohrab, 2010).

O metronidazol, substância alvo deste estudo, é um exemplo de IFA na forma sólida usado na indústria. Dentre os diferentes métodos de cristalização, os de evaporação de solvente e resfriamento são os mais usados na obtenção de metronidazol (DI MARTINO, Piera, CENSI, *et al.*, 2007, RAMUKUTTY, RAMACHANDRAN, 2012). Diversos estudos empregando esses dois métodos em diferentes condições e com uso de solventes de polaridade variadas já foram realizados. Por consequência na mudança de diversos parâmetros, diferentes hábitos cristalinos foram encontrados, porém não se confirmou a presença de estruturas polimorfas nos cristais obtidos. Ou seja, ele possui somente um arranjo cristalino (DI MARTINO, P., CENSI, *et al.*, 2007).

A indústria tem interesse neste fármaco devido a sua atividade antiprotozoária. Além disso, este composto também possui atividade antibacteriana contra bacilos gram-negativos anaeróbios, contra bacilos gram-positivos esporulados e contra todos os cocos anaeróbios. Ele é utilizado em diversos tratamentos, dentre eles no combate contra a giardíase, a amebíase, a tricomoníase, e em infecções causadas por bactérias anaeróbias como *Bacteroides fragilis*, além do tratamento de pacientes portadores de periodontite crônica refratária (DHAND, SNYDMAN, 2009, FREEMAN, KLUTMAN, *et al.*, 1997).

A administração de fármacos por via oral é a forma mais comum para efeitos sistêmicos e dentre os medicamentos administrados por via oral os comprimidos são as formas farmacêuticas sólidas mais empregadas em terapia, pois permitem administração de uma dose única e exata do fármaco, além de apresentarem alta produtividade e custos relativamente baixos. O metronidazol, apesar de ser muito utilizado mundialmente, não apresenta boa compressibilidade (propriedade de um material ou substância que, sob aplicação de uma pressão externa, pode ter seu volume reduzido) quando usado sozinho, o que dificulta a laminação e revestimento de comprimidos. Em função disso, é comum que seja fabricado com quantidades de incipientes entre 40-60% m/m (ITIOLA e PILPEL, 1986).

As propriedades do metronidazol podem ser obtidas a partir da caracterização do sólido (cristal) obtido no processo de cristalização. Na literatura há o relato do emprego de diversos métodos, como os cristalográficos, os espectroscópicos, os térmicos e os microscópicos. Todos

foram empregados como técnicas de análise para obter informações quanto a presença de polimorfos, composição, estabilidade térmica e morfologia (hábito do cristal) a partir do metronidazol cristalizado (BLATON, PEETERS, *et al.*, 1979, DE SOUZA, DE SOUZA, *et al.*, 2003, DI MARTINO, Piera, CENSI, *et al.*, 2007, SRAVANI, RAJA, *et al.*, 2011).

Porém há poucos estudos em que se registra o que ocorre durante o processo de cristalização. Neste caso se faz necessário o uso de técnicas que permitam uma análise em tempo real, ou seja, o registro de todo o fenômeno ao longo do tempo, desde a formação dos núcleos até o crescimento total do cristal. O uso dessas análises torna-se necessário pois o tamanho e a contagem de cristais afetam diretamente o desempenho no processo cristalização. Ao monitorar o tamanho e a contagem do cristal em tempo real é possível entender, otimizar e ampliar os processos com confiança.

Análise em tempo real define-se como qualquer medida analítica que pode ser monitorada assim que entra em um sistema, imediatamente ou em até um minuto em que a medida foi coletada (LAPLANTE, 1992). Mais do que isso, está ligada à capacidade de analisar um evento na medida em que ele ocorre, sejam eventos físicos ou químicos. Este tipo de medição torna a técnica mais vantajosa que as análises convencionais, pois o tempo de resposta é muito rápido.

Existem diferentes técnicas que possibilitam a análise em tempo real, elas podem ser diferenciadas a partir de como são empregadas, por exemplo há as análises *inline* e *online*. No modelo convencional, a amostra é retirada do sistema para fazer a medição específica em outro equipamento. Porém quando se adota as medições *inline* e *online* isto não é necessário, minimizando os erros de amostragem e possibilitando uma maior velocidade para detecção de problemas (BOWLER, BAKALIS, *et al.*, 2020).

Na medição *inline* a amostragem é feita dentro do processo: o sensor/equipamento está em contato direto com o sistema, fazendo a aquisição dos dados de imediato. Já a medição *online* não há contato direto do equipamento com o sistema, mas a aquisição do resultado também ocorre em um tempo curto. Em ambas as técnicas não há perda ou dano da amostra, além disso, permitem uma medição contínua, sem interrupção do processo (CRESSER, 1999).

Técnicas *inline* e *online* podem ser usadas para monitorar o tamanho e até o hábito de partículas em um processo de cristalização de fármaco em tempo real. Desta forma, podem ser usadas para ajustar parâmetros do processo, como agitação, taxa de resfriamento, concentração das espécies, etc (NAGY, FEVOTTE, *et al.*, 2013). Neste trabalho, essas técnicas foram empregadas para avaliar e otimizar a cristalização do metronidazol, com o intuito de otimizar o processo e definir condições que possibilitem a obtenção de cristais mais viáveis à fabricação de comprimidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a mudança do hábito cristalino do metronidazol no processo de cristalização por resfriamento controlado a partir de soluções aquosas e etanólicas deste fármaco, empregando técnicas de análise em tempo real (análise de imagem e microscopia *inline*), para caracterizar a melhor condição para obter cristais viáveis à compactação e fabricação de comprimidos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar a influência da taxa de resfriamento na modificação do hábito cristalino do metronidazol obtido a partir de soluções aquosas e etanólicas;
- b) Avaliar o tempo de resposta de *webcams inline* e *online*, de um vídeo microscópio *inline* e de uma sonda FRBM na determinação do início da cristalização do metronidazol;
- c) Observar, em tempo real, o hábito cristalino obtido na cristalização do metronidazol através de um vídeo microscópio e comparar com os dados obtidos *off-line* por microscopia eletrônica de varredura;
- d) Propor, com base nos hábitos encontrados e parâmetros estudados, as melhores condições de processo para reduzir a problemática compactação dos comprimidos de metronidazol.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 METRONIDAZOL

O metronidazol ou 1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol, Figura 1, é um agente antibacteriano e antiprotozoário derivado do 5-nitroimidazol. Descoberto no final da década de 1950, com indicação original para o tratamento de infecções causadas pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* (tricomoníase) (DHAND, SNYDMAN, 2009, FREEMAN, KLUTMAN, *et al.*, 1997), com o tempo ganhou aplicação no tratamento de uma variedade de infecções bacterianas e protozoárias (FITZGERALD, 2012).

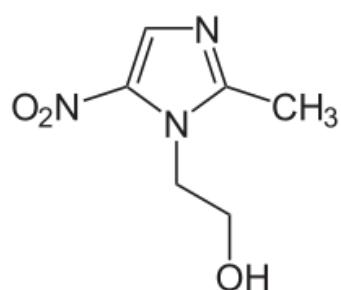


Figura 1- Fórmula estrutural do metronidazol.

O mecanismo de atuação deste fármaco ainda não é totalmente conhecido, mas acredita-se que sua ação envolva 4 fases: (i) entrada na célula do microrganismo susceptível; (ii) redução do grupo nitro por proteínas transportadoras de elétrons; (iii) efeito citotóxico do produto intermediário, que se liga ao DNA, promovendo a sua degradação; (iv) liberação de produtos finais inativos (FREEMAN, KLUTMAN, *et al.*, 1997).

O metronidazol é sintetizado como cristais amarelos claros, levemente solúveis em água e etanol. Preferencialmente é administrado na forma oral, via comprimidos ou como benzoato de metronidazol em suspensão, o que garante biodisponibilidade superior a 90%, enquanto aplicações tópicas geralmente tem efeito reduzido. O metronidazol é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e altas concentrações do fármaco são alcançadas no plasma, osso, tecido periférico e no sistema nervoso central, com meia-vida de aproximadamente 8 h em mamíferos (FITZGERALD, 2012).

O amplo espectro de atuação contra bactérias e protozoários anaeróbios, a disponibilidade para dosagem oral e intravenosa, com rápida eliminação do agente infeccioso, a boa penetração nos tecidos e custo relativamente baixo tornam essa droga bastante popular no tratamento de inúmeras infecções.

O comportamento mecânico dos cristais de um fármaco pode influenciar, por exemplo, na sua resistência ao esmagamento, dificultando o processo de confecção de comprimidos (RAMUKUTTY, JEYASUDHA, *et al.*, 2013). Em particular, metronidazol possui propriedades que dificultam a formação de comprimidos, sendo exigidos cristais com características externas apropriadas para melhorar o seu desempenho tecnológico.

Como uma das principais vias de administração deste fármaco é a oral através de comprimidos, suas propriedades mecânicas são particularmente importantes. Como durante a cristalização um grande número de variáveis (presença de impurezas, temperatura, agitação, método de cristalização) pode modificar as propriedades mecânicas do cristal (DI MARTINO, Piera, CENSI, *et al.*, 2007), afetando suas propriedades, o conhecimento dos parâmetros de cristalização é útil para limitar essas alterações e garantir que as especificações do processo de formulação dos comprimidos sejam atendidas (DI MARTINO, Piera, CENSI, *et al.*, 2007).

Neste sentido e sendo o foco deste trabalho, o tópico subsequente relata, brevemente, importantes conceitos relativos à cristalização de fármacos e contextualiza a sua influência nas características mecânicas dos cristais.

### 3.2 HÁBITO CRISTALINO, POLIMORFISMO E AMORFISMO

Hábito cristalino é o formato dos cristais e dependendo do seu tamanho é possível observá-lo a olho nu, como cristais de açúcar e de sal de cozinha. Basicamente, o hábito é a resposta das alterações feitas durante o processo de cristalização, ou seja, de fatores que podem favorecer ou não um sentido de crescimento das faces, como a taxa de cristalização, a interação do material com o solvente, o processo de cristalização escolhido, etc (BERNSTEIN, 2002).

Com isso, mesmo que um material tenha somente uma morfologia, ele poderá ter diversos hábitos. A Figura 2 indica exemplos de alguns hábitos cristalinos (alguns nomes foram mantidos em inglês para evitar perda de significância na tradução e por não haver termo similar em português).

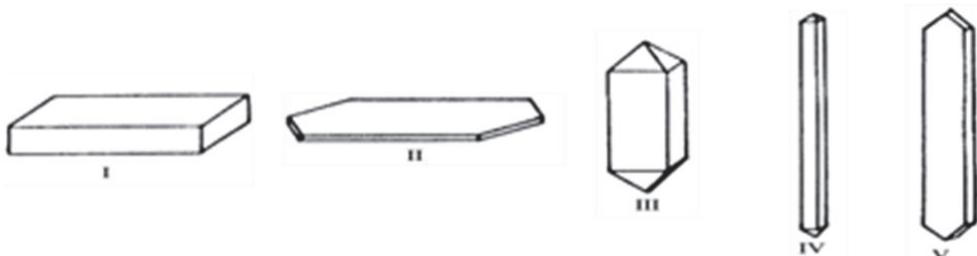


Figura 2 - Hábitos cristalinos: I - tabular; II - platy; III - prismático; IV - acicular; V - bladed. Adaptado de (BERNSTEIN, 2002)

Os arranjos atômicos num sólido cristalino podem ser descritos usando como referência os pontos de interseção de uma rede de linhas nas três dimensões. Num cristal ideal, o arranjo desses pontos em torno de um ponto particular deve ser igual ao arranjo em torno de qualquer outro ponto da rede cristalina. Dessa maneira, é possível descrever um conjunto de pontos ou posições atômicas repetitivas, denominada célula unitária (Figura 3) (MULLIN, 2001).

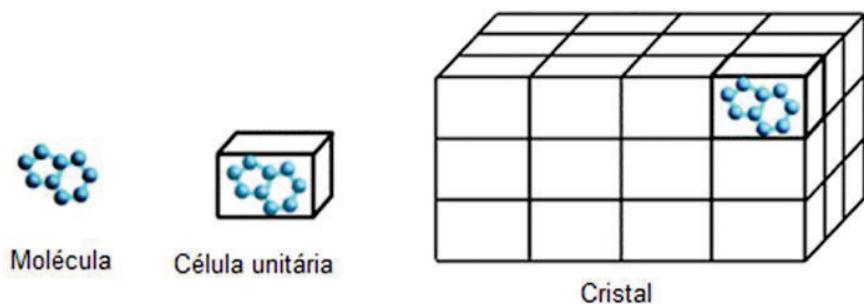


Figura 3 - Constituição de um cristal por repetição de uma célula unitária. Adaptado de MULLIN (2001).

O comprimento das arestas de uma célula unitária e a medida dos ângulos de suas faces, como indicado na Figura 4, definem a célula unitária (MULLIN, 2001). Assim, a partir da adoção de valores específicos dos parâmetros axiais e ângulos inter-axiais pode-se obter células unitárias de diversas naturezas.

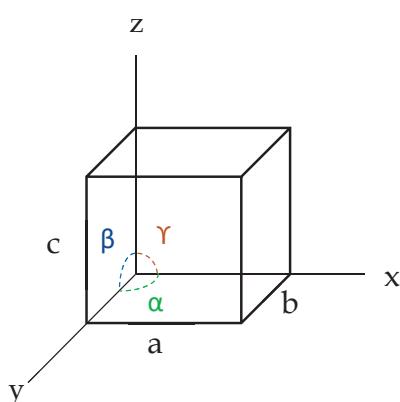


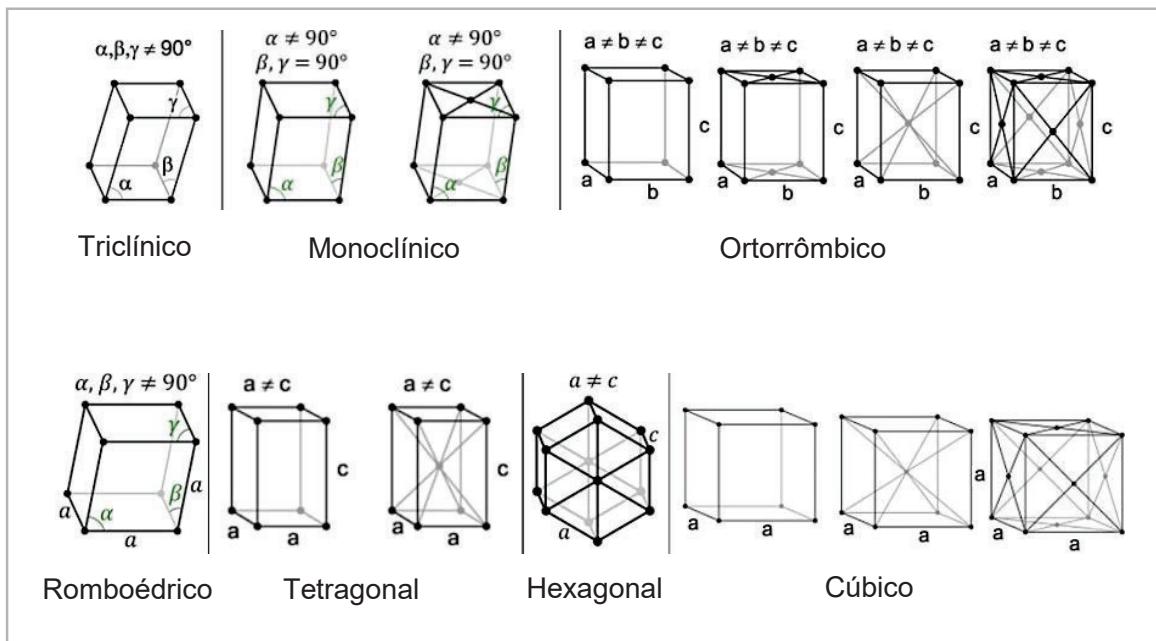
Figura 4 - Representação dos parâmetros de uma célula unitária, em que  $a$ ,  $b$  e  $c$  indicam o comprimentos dos três eixos, enquanto  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são os ângulos existentes nos vértices da célula.

Ao todo, sete arranjos atômicos básicos podem representar as estruturas de todas as substâncias cristalinas conhecidas e, por isso, são chamados de sistemas cristalinos. Partindo desses sistemas, A. J. Bravais derivou 14 células unitárias, que permitem descrever qualquer estrutura cristalina, que em sua homenagem são chamadas de redes de Bravais.

As características destes sistemas cristalinos estão descritas na Tabela 1, enquanto a Figura 5 indica os componentes das redes de Bravais (MULLIN, 2001).

Tabela 1 - Características dos sete sistemas cristalinos.

GEOMETRIA DOS SISTEMAS CRISTALINOS		
Sistemas	Eixos	Ângulos axiais
Cúbico	$a = b = c$	Todos os ângulos iguais a $90^\circ$
Tetragonal	$a = b \neq c$	Todos os ângulos iguais a $90^\circ$
Ortorrômico	$a \neq b \neq c$	Todos os ângulos iguais a $90^\circ$
Monoclínico	$a \neq b \neq c$	Dois ângulos iguais a $90^\circ$ e um ângulo diferente de $90^\circ$
Triclínico	$a \neq b \neq c$	Todos os ângulos diferentes e nenhum igual a $90^\circ$
Hexagonal	$a_1 \neq a_2 \neq a_3 \neq c$	Três ângulos iguais a $90^\circ$ e um ângulo igual a $120^\circ$
Romboédrico	$a = b = c$	Todos os ângulos iguais, mas diferentes de $90^\circ$



O polimorfismo, frequentemente confundido com o hábito cristalino, trata do arranjo cristalino dos materiais, relacionado com os fenômenos termodinâmicos de empacotamento das células unitárias. Isto é, o hábito cristalino está relacionado à estrutura externa do cristal, enquanto o polimorfismo está relacionado à sua estrutura interna. Um mesmo material pode apresentar dois ou mais polimorfos, mas somente os termodinamicamente estáveis são possíveis de serem caracterizados (BERNSTEIN, 2002).

A título de exemplo, alguns polimorfos de carbonato de cálcio são: calcita (sistema cristalino trigonal), aragonita (sistema cristalino ortorrômbico) e vaterita (sistema cristalino hexagonal) (REDDY, NANCOLLAS, 1976). Por fim, quando os sistemas não apresentam regularidade na sua organização tridimensional, por sua vez, são chamados de amorfos.

Para determinar e caracterizar sistemas cristalinos é comum o emprego de técnicas como ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho, difração de raios X, análise térmica, entre outras. Análises por imagens, como microscopia eletrônica de varredura (MEV) e vídeo microscópios, por sua vez, podem ser especialmente úteis para avaliar o hábito cristalino (LACHMAN, L. LIEBERMAN, H. KANIG, 2001).

### 3.3 CRISTALIZAÇÃO DE FÁRMACOS

A cristalização geralmente é a fase final da síntese de medicamentos sólidos e geralmente é realizada para purificar o fármaco. Essa purificação pode ser realizada em uma única etapa, produzindo um produto não apenas de alta pureza, mas também com características ideais ao seu manuseio (DI MARTINO, P., CENSI, *et al.*, 2007). Este último aspecto é importante porque a cristalização pode promover alterações na estrutura interna (polimorfismo) ou nas propriedades externas dos cristais (propriedades mecânicas) que influenciam na resistência ao esmagamento e no preenchimento volumétrico da substância no comprimido (RAMUKUTTY, JEYASUDHA, *et al.*, 2013).

Como durante a cristalização um grande número de variáveis (presença de impurezas, temperatura, agitação, método de cristalização) pode modificar as propriedades mecânicas do cristal (DI MARTINO, P., CENSI, *et al.*, 2007), afetando suas propriedades, o conhecimento dos parâmetros de cristalização são úteis para limitar essas alterações e garantir que as especificações do processo de formulação dos comprimidos sejam atendidas (DI MARTINO, Piera, CENSI, *et al.*, 2007).

Desta forma, a otimização dos processos de cristalização de fármacos deve ser feita considerando as características intrínsecas dos produtos com atividade farmacêutica, a fim de se evitar problemas durante a produção ou após, quando os fármacos já estão embalados e prontos para consumo.

Alterações no hábito cristalino e na distribuição do tamanho das partículas podem afetar não apenas a biodisponibilidade do fármaco, mas também impactam a filtração, escoamento, secagem, compactação, formação de comprimidos (*tableting*) e encapsulamento. Com destaque, substâncias que têm baixa ou pouquíssima solubilidade devem ter tamanho de partícula reduzido para ter a máxima área superficial e, com isso, possibilitar maior biodisponibilidade (KIM, LOTZ, *et al.*, 2005).

Como exemplo, as formas ortorrômbica e monoclínica do paracetamol foram comparadas por DI MARTINO, Piera, JOIRIS, *et al.* (1998) com a finalidade de definir qual a mais adequada no processo de compactação para formação de comprimidos. Por análises de tamanho de partícula, densidade, compressão e MEV concluíram que a forma ortorrômbica favorece a formação de comprimidos devido a sua capacidade de redução de volume quando sob pressão. A redução de volume no processo de compressão ocorre pelo rearranjo interno das partículas, facilitado pelo deslizamento dos planos paralelos, o que melhora a coesão na compactação.

Em especial, o polimorfismo é uma variável importante já que pode impactar a biodisponibilidade do fármaco. Como exemplo, CSAKURDA-HARMATHY, THEGE (1997) indicam que o palmitato de cloranfenicol apresenta 3 polimorfos, sendo a forma C instável e difícil de ser observada. A forma A é a mais estável a temperatura ambiente, mas não apresenta atividade farmacológica. Assim a forma B é a empregada como princípio ativo.

Porém, a passagem da forma B para a forma A pode acontecer e se dá por um processo exotérmico irreversível. Assim, as farmacopeias Húngara, Americana e Britânica recomendam análises de infravermelho e DSC para caracterizar os polimorfos durante a produção.

Outro exemplo é relatado nos estudos executados por LEVY (1961), onde se levantou a questão de que diferentes polimorfos do ácido acetilsalicílico poderiam afetar as taxas de dissolução e absorção *in vivo*, tendo em vista que a absorção inicial acontece no estômago e é proporcional à quantidade que pode ser dissolvida pelo suco gástrico. Nas pesquisas executadas por TAWASHI (1968) para o mesmo fármaco, pôde-se observar que a dissolução do polimorfo de Forma II era 50% mais rápida que o da Forma I.

### 3.3.1 ESTUDOS DE CRISTALIZAÇÃO DO METRONIDAZOL

O metronidazol, apesar de ser muito utilizado mundialmente, não apresenta boa compressibilidade quando usado sozinho, o que dificulta a laminação e revestimento dos comprimidos. Em função disso, é comum que seja fabricado com quantidades de excipientes entre 40-60% m/m (ITIOLA, PILPEL, 1986).

Apesar de possuir diversos hábitos cristalinos, o metronidazol não apresenta polimorfismo, condição caracterizada por análise de difração de raios X realizada por (DI MARTINO, P., CENSI, *et al.*, 2007). Nesse estudo, várias soluções com 13 diferentes solventes foram empregadas em processos de cristalização por resfriamento controlado sob agitação e também por adição de antissolvente (hexano e ciclohexano). Ao fim dos experimentos, os cristais foram analisados por DRX, DSC e MEV, e os resultados mostraram que as diferentes polaridades dos solventes e métodos de cristalização não trouxeram alteração no sistema cristalino, apenas do hábito.

A partir dos cristais secos, as análises em MEV possibilitaram definir o tamanho e o hábito dos cristais. Como resultado, foram encontrados os hábitos indicados na Figura 6 para a cristalização por resfriamento: agulhado, bastão, isodimensional, poliédrico. Para cristalização por método de antissolvente apenas não foi encontrado o hábito poliédrico, como indicado na Figura 7.

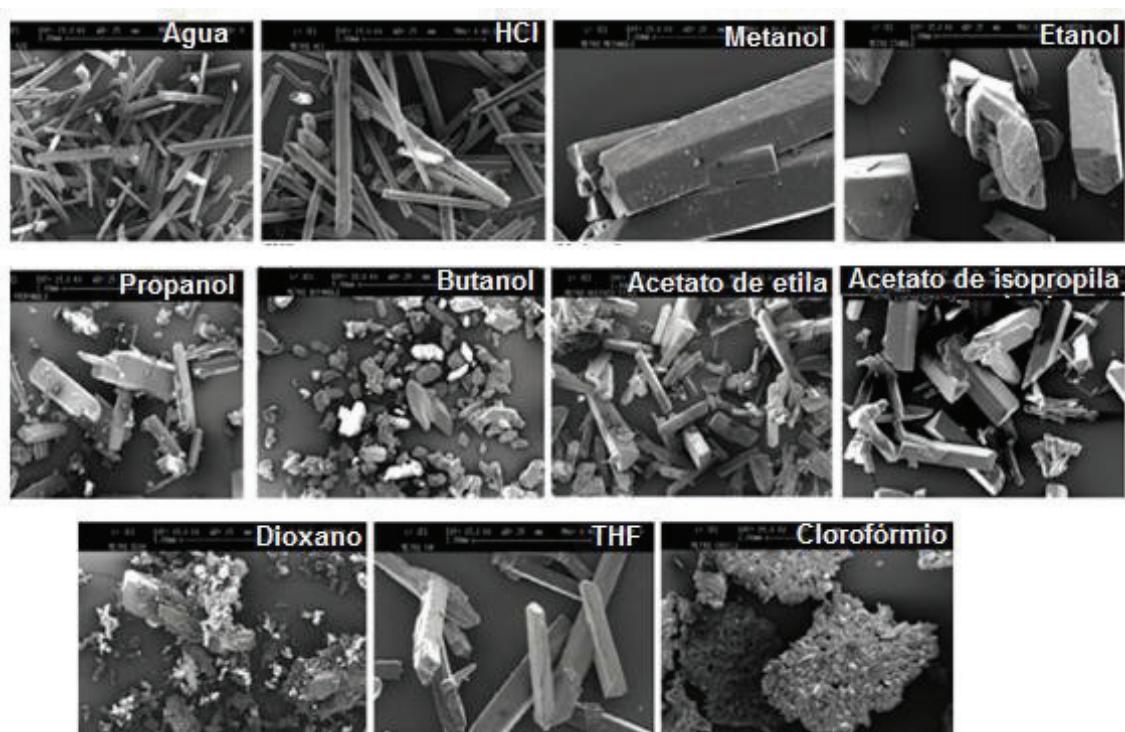


Figura 6 - Hábitos do metronidazol obtidos por meio de resfriamento. Adaptado de (DI MARTINO, P., CENSI, *et al.*, 2007)

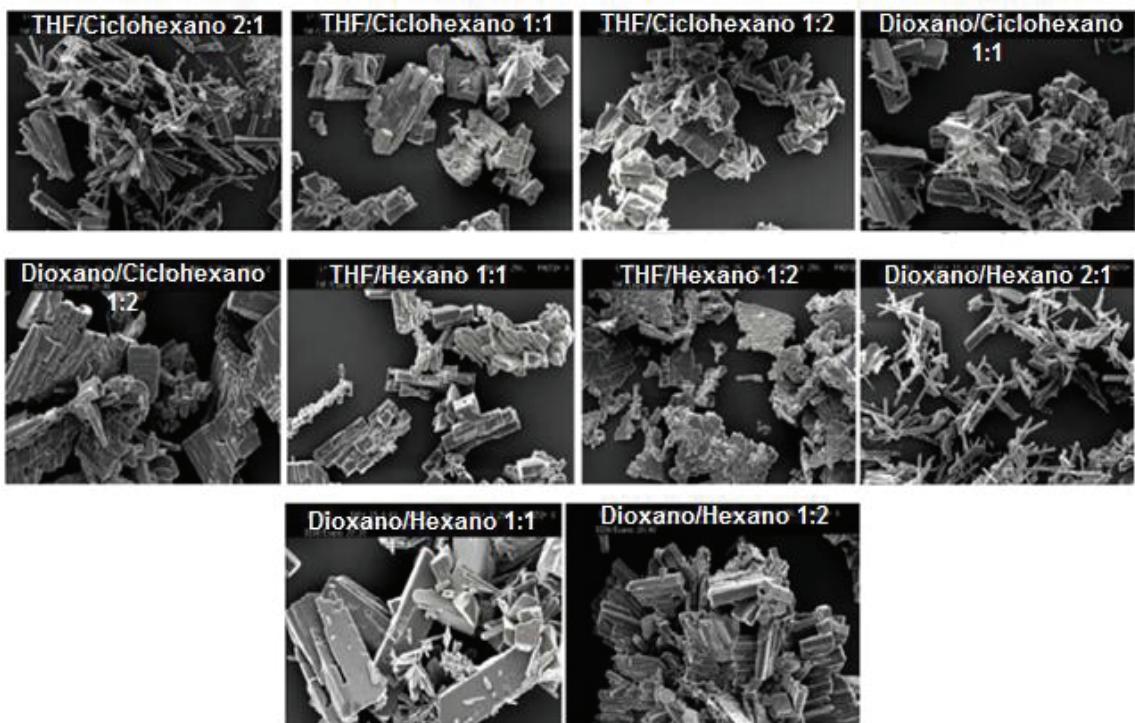


Figura 7- Hábitos do metronidazol obtidos pelo método de antissolvente. Adaptado de (DI MARTINO, P., CENSI, *et al.*, 2007).

Assim, pelos cristais obtidos por diferentes métodos e solventes, foi observado que a polaridade do solvente influencia no crescimento do cristal, por consequência gera diferentes hábitos. A influência da polaridade dos solventes no hábito pode ser explicado pela interação entre as moléculas do solvente e as diferentes faces do cristal, por meio de adsorção, como explicado por BERKOVITCH-YELLIN (1985) e KHOSHKHOO e ANWAR (1993). Segundo esses pesquisadores, a interação do solvente com faces específicas, acaba por retardar seus crescimentos, favorecendo o crescimento das demais faces.

Já BLATON, PEETERS, *et al.* (1979) propõem que o sistema cristalino do metronidazol é monoclinico e que o arranjo de suas células unitárias comporta 8 moléculas, em que ao longo do eixo “b” os anéis de imidazol são coplanares em faces opostas. Desta forma, na presença de solventes hidrofílicos (água ou solução ácida), os grupos polares podem estabelecer ligações de hidrogênio com as moléculas de água, de modo que as moléculas de metronidazol se organizam preferencialmente ao longo do eixo “b”, que é o mais hidrofóbico devido à sobreposição de vários anéis de imidazol. Assim, DI MARTINO, P., CENSI, *et al.* (2007) sugeriram que os solventes polares são absorvidos preferencialmente pelas faces polares e os solventes não polares pelas faces não polares.

No trabalho realizado por RAMUKUTTY, RAMACHANDRAN (2012), o estudo era voltado também para observar os diferentes comportamentos de cristalização do metronidazol. Assim, soluções aquosas de metronidazol a 0,06 mol/L foram utilizadas para obter cristais por método de evaporação de solvente, semeadura e mistura de solventes - metanol e água 1:1.

Inicialmente, cristais de metronidazol foram obtidos por evaporação da água a 27°C, aproximadamente, formando um hábito trapezoidal com dimensões iguais a 1,0 mm x 1,5 mm x 0,5 mm. Esses cristais foram utilizados como sementes em outro processo de cristalização e após um mês de crescimento foi obtido um cristal de hábito trapezoidal com dimensão 8,0 mm x 6,5 mm x 2,0 mm. No sistema de mistura de solventes foi obtido um cristal piramidal com dimensões 12 mm x 7 mm x 5 mm. Em todos esses casos o solvente foi evaporado.

A Figura 8 indica os hábitos encontrados para cada situação estudada por (RAMUKUTTY, RAMACHANDRAN, 2012).

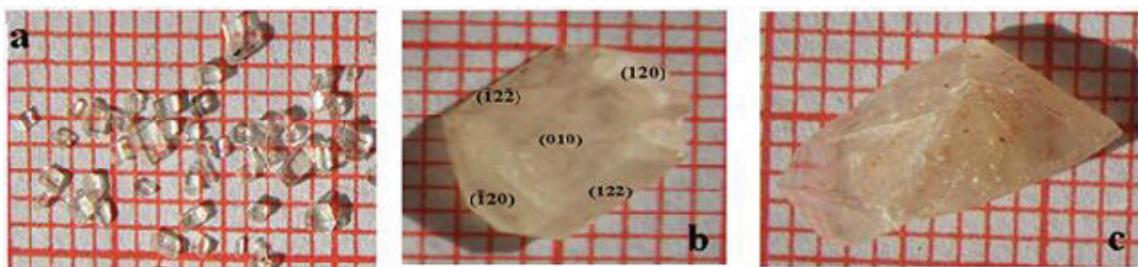


Figura 8 - Cristais obtidos por (a) evaporação da água, (b) semeadura e (c) mistura de solventes.

Numa comparação com o trabalho desenvolvido por DI MARTINO, P., CENSI, *et al.* (2007), onde cristais agulhados (*needle*) foram obtidos em meio aquoso, vê-se uma forte alteração no hábito cristalino. Dessa forma, conclui-se que o hábito do metronidazol é alterado não só pela mudança do solvente, mas também pelo método de cristalização e grau de supersaturação da solução.

### 3.4 ANÁLISE DE IMAGENS

Desde a década de 60 são encontrados trabalhos com o uso da análise de imagens como ferramenta analítica, com o objetivo realizar uma descrição detalhada dos objetos de interesse de forma confiável e mais eficiente que a visão humana. Câmeras digitais, tomógrafos, satélites e scanners são alguns exemplos de dispositivos usados na aquisição de imagens. Estes dispositivos fazem a aquisição ou a captura da imagem e conversão para um formato adequado à visualização (GELADI, BENGTSSON, *et al.*, 1992).

O tipo de sensor, as condições de iluminação, o número de tons de cinza ou cores da imagem digitalizada são aspectos que influenciam no processamento da imagem. Nessa, o destaque se dá às câmeras digitais, que geralmente possuem como sensor o dispositivo de carga acoplada, mais conhecido como CCD (*Charge Coupled Device*).

### 3.4.1 MEDIDAS RGB

Uma webcam, como a da Figura 9, é uma câmera digital de baixo custo que capta imagens e que as transfere para um computador (TECHTERMS, 2019). Estas câmeras têm sido amplamente utilizadas como ferramentas analíticas nos últimos anos em função da rápida captura de imagens, background estável e ótima linearidade (SILVA, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2013). Seu princípio de funcionamento se baseia no armazenamento, em tempo real, de informações sobre a intensidade de luz que incide sobre a lente do equipamento. A resposta analítica, por sua vez, é obtida em termos de um sistema de cor denominado *RGB*.



Figura 9 - Exemplo de webcam com destaque ao sensor CCD (DE OLIVEIRA, 2019).

O sistema de cor *RGB*, Figura 10, se baseia em um sistema de cores aditivas que têm como cores principais o vermelho (*Red*), verde (*Green*) e azul (*Blue*). A combinação destas três cores de várias formas possibilita reproduzir um largo espectro cromático.

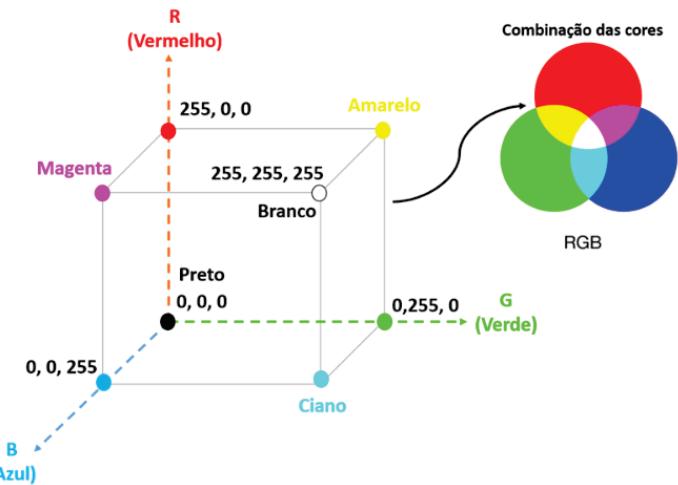


Figura 10 - Sistema de cores *RGB* (DE OLIVEIRA, 2019).

Em computação gráfica, as componentes R, G e B são as quantidades de luz vermelha, verde e azul que uma cor possui, medidas em valores que variam de 0 a 255 para sistemas que representam cor utilizando 24 bits. O menor elemento que pode ser exibido e atribuído cor é chamado de *pixel* e cada *pixel* tem seu próprio valor *RGB* representado geralmente por 3 bytes, um para cada componente de cor (vermelho, verde e azul). Se cada componente for armazenado como um byte, cada um poderá representar 256 diferentes intensidades. Ou seja, pode-se trabalhar com mais de 16,7 milhões de cores (NISHAD, MANICKA CHEZIAN, 2013).

Sistemas contendo webcam com sensor CCD geralmente são sistemas de baixo custo, que já foram, inclusive, usados na análise de processos cristalinos, como na detecção do início do processo de formação de cristais. Dentre os trabalhos pode-se citar o desenvolvido por VENÂNCIO, DO ROSÁRIO, *et al.* (2017), que a partir das imagens acompanharam todo processo de cristalização do carbonato de cálcio, e o trabalho de BELATI, CAJAIBA (2018), que determinou a temperatura inicial do aparecimento de parafinas num processo de resfriamento controlado.

Na área de química fina também há relatos do uso de webcam, como no caso da síntese de dimetilfumarato LIMA, FINELLI, *et al.* (2020) e na construção de curvas de solubilidade do ibuprofeno SILVA, DE OLIVEIRA, *et al.*, 2013). Em todos os casos, as câmeras digitais possuem a vantagem de monitorar uma grande área do processo, apesar de não haver ampliação suficiente para observar o formato dos cristais.

Essa desvantagem é facilmente superada com o uso de vídeo-microscópios, que fornecem imagens com elevada resolução. Assim, esses instrumentos possibilitam o acompanhamento em tempo real do hábito cristalino e, assim, ajudam a determinar a influência da alteração dos parâmetros do processo no tamanho e forma das partículas.

### **3.4.2 MEDIDAS *RBI***

O Índice Relativo de Retroespalhamento (*RBI*) é uma medida baseada na análise de imagens que descreve com precisão a refletividade do sistema de partículas presentes no meio. Em si, este índice descreve a relação entre a luz detectada retroespelhada e a incidente (WERNER, MUENZBERG, *et al.*, 2017). Assim, a tendência em tempo real do *RBI* é fruto das mudanças no tamanho, forma e concentração das partículas, bem como do brilho e do índice de refração (METTLER TOLEDO, 2015).

Combinado com imagens de microscopia em tempo real e outras variáveis do processo, como temperatura e agitação, o *RBI* fornece informações que ajudam a otimizar e controlar sistemas complexos de partículas. Algumas aplicações comuns da medida *RBI* incluem a determinação da

solubilidade de compostos; a determinação da largura da zona metaestável; a caracterização de eventos como nucleação secundária, coalescência de gotículas ou quebra de partículas (METTLER TOLEDO, 2015).

As medidas *RGB* e *RBI* se assemelham em relação à capacidade de detectar alterações no sistema particulado, como aumento no número de partículas ou o crescimento de cristais. No entanto, elas se baseiam em medidas físicas distintas das imagens analisadas: enquanto o *RGB* está associado às mudanças nas componentes vermelho, verde e azul, o *RBI* está relacionado às mudanças na refletividade.

### 3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A evolução na fabricação de microscópicos possibilitou diversificar seu uso na aplicação de diversas áreas, principalmente na análise de substâncias. Anteriormente, a microscopia óptica era a técnica de análise de superfície de materiais. Porém, o desenvolvimento de microscópicos mais avançados tornou este método quase obsoleto devido à sua limitação no poder de resolução frente aos microscópios eletrônicos.

O “poder de resolução” indica, para um dado instrumento, a capacidade de resolver detalhes de um material observado. Para uma amostra observada em um sistema óptico, por exemplo, a capacidade desse microscópio separar e quantificar detalhes da imagem obtida determina o seu poder de resolução (SCHMAL, 2018).

O microscópio óptico pode obter um limite de resolução máximo de 0,2  $\mu\text{m}$ . Porém, por mais sofisticados que sejam, pouco pode ser feito para alterar esse limite: o comprimento de onda ( $\lambda$ ) é um fator limitante, pois os humanos não enxergam a luz em comprimentos menores que o correspondente à radiação violeta (SKOOG, CROUCH, *et al.*, 2008).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um dos exemplos da melhoria da técnica. Seu limite de resolução está associado a outros fatores que não são cabíveis na microscopia óptica. A resolução é muito maior já que a técnica utiliza feixe de elétrons e não de radiação luminosa como microscópio óptico. Assim, o comprimento do feixe de elétrons irá definir, juntamente com outros fatores, o poder de resolução (SCHMAL, 2018).

Desta forma, considerando as propriedades ondulatórias do elétron, um fino feixe dessas partículas interagindo com uma amostra em condições apropriadas define um alto poder de resolução: cerca de 10 nm para MEV convencional, podendo chegar a uma faixa de 1 a 2 nm para os de alta resolução (SCHMAL, 2018, SKOOG, CROUCH, *et al.*, 2008).

Diferente do microscópico óptico, que forma imagens de maneira direta, ou seja, raios atravessam amostra gerando uma imagem real e ocular, no MEV isso não é observado, pois a geração de imagens é indireta. No MEV não existe caminho óptico, o que se observa é o resultado da interação entre os elétrons e a amostra. Ao incidir na amostra, o feixe de elétrons interage com os átomos do material e provoca espalhamento e emissão de vários tipos de radiação, dentre eles raios X. Este tipo de radiação é normalmente de maior interesse nas análises de MEV e a maioria desses equipamentos possui detectores capazes de coletar esses sinais (KLANG, VALENTA, *et al.*, 2013).

A microscopia eletrônica de varredura tem importante aplicação na área farmacêutica, como ferramenta para caracterização de fármacos. Nas últimas décadas pesquisas farmacêuticas têm focado no desenvolvimento de drogas em escala nano. Portanto, é necessário o uso de técnicas que possibilitem o máximo de informação a respeito da morfologia, cristalinidade e composição elementar do sistema com o mais próximo de resolução atômica.

No processo de cristalização, por exemplo, os fármacos podem apresentar mais de uma forma cristalina (polimorfismo), que podem ter diferenças entre si em relação à estabilidade, solubilidade etc. Um exemplo da aplicabilidade do MEV neste campo é indicado no trabalho de CESUR, GOKBEL (2008), que estuda a cristalização do ácido mefenâmico, uma droga anti-inflamatória usada como analgésico, principalmente no combate de cólicas menstruais.

O ácido mefenâmico é altamente hidrofóbico, além de ser propenso a aderir superfícies, o que pode causar problemas durante a granulação e no estágio final para fazer os comprimidos. (CESUR, GOKBEL, 2008) realizou a cristalização deste fármaco em diferentes solventes, a fim de avaliar as características dos seus diferentes polimorfos e minimizar os problemas na granulação do fármaco.

### **3.6 MEDAÇÃO DE REFLETÂNCIA POR UM FEIXE DE LUZ FOCALIZADO (FBRM)**

O tamanho e a quantidade de partículas afetam o desempenho de muitos processos multifásicos. Ao monitorar essas variáveis em tempo real é possível determinar quais parâmetros do processo afetam a cristalização, precipitação, polimerização etc. Esse conhecimento é importante, por exemplo, para otimizar processos e obter uma distribuição adequada do tamanho de partículas. É o caso do controle da produção de fármacos, cujo tamanho de partícula pode ter grande influência na biodisponibilidade do medicamento.

Uma das técnicas mais populares para monitorar o tamanho de partículas é o método *inline FBRM* (*Focused Beam Reflectance Measurement*), que se baseia na medida do retroespalhamento sofrido por um feixe de laser focalizado para determinar a distribuição do comprimento de corda das partículas, que por sua vez é função da distribuição real do tamanho dessas partículas (NASSER, SALHI, 2015, TADAYYON, ROHANI, 2000).

A Figura 11 ilustra o princípio de medição empregado pela técnica. Essencialmente, um feixe se propaga em trajetória circular através da janela de safira da sonda. Ao interceptar a extremidade de uma partícula, parte do laser é retroespelhado de volta à sonda e detectado. O retroespalhamento somente cessa quando uma das extremidades opostas da partícula é alcançada (GREAVES, BOXALL, *et al.*, 2008).

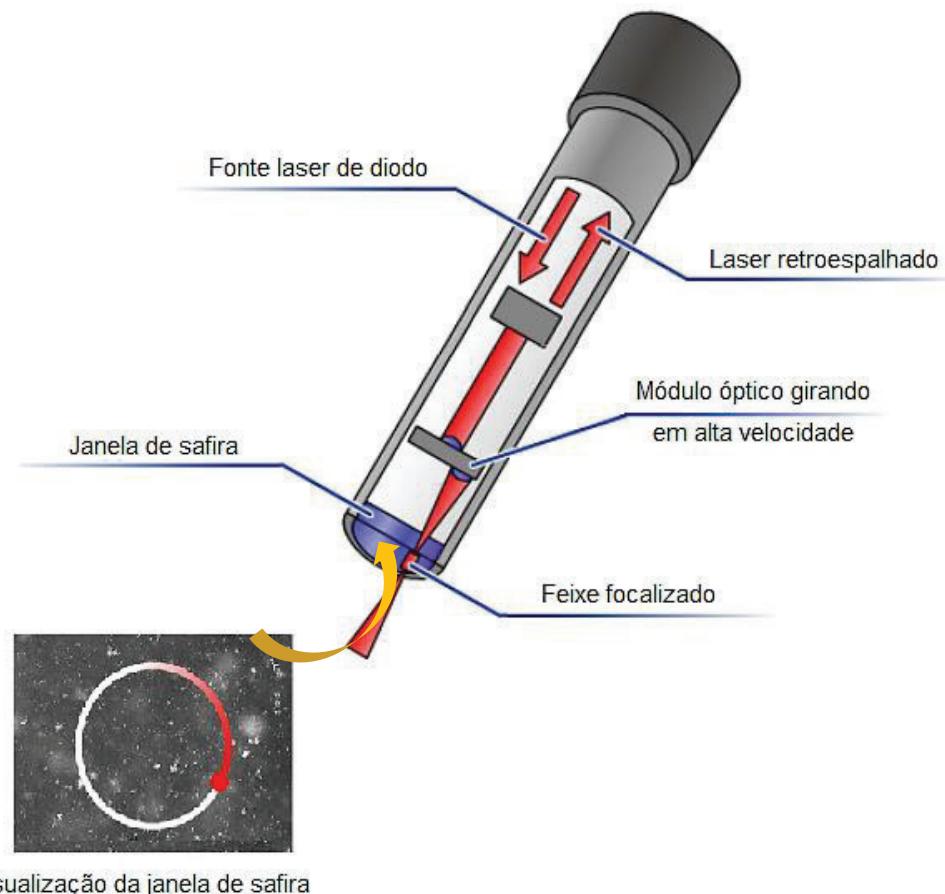


Figura 11 - Esquema de funcionamento da sonda *FBRM*. Adaptado de (METTLER TOLEDO, 2007).

O comprimento de corda é obtido a partir da multiplicação do intervalo de tempo em que ocorre o retroespalhamento pela a velocidade de escaneamento,  $V_b$ . Desta forma, este parâmetro equivale à distância entre quaisquer dois pontos nas bordas da partícula (Figura 12) (ABU BAKAR, NAGY, et al., 2010). Em função disso, o comprimento de corda somente reflete o tamanho real das partículas quando elas possuem simetria esférica. Ainda assim, essas medidas são um valor referencial do tamanho, já que o comprimento de corda é influenciado pelo tamanho, além da geometria e número de partículas.

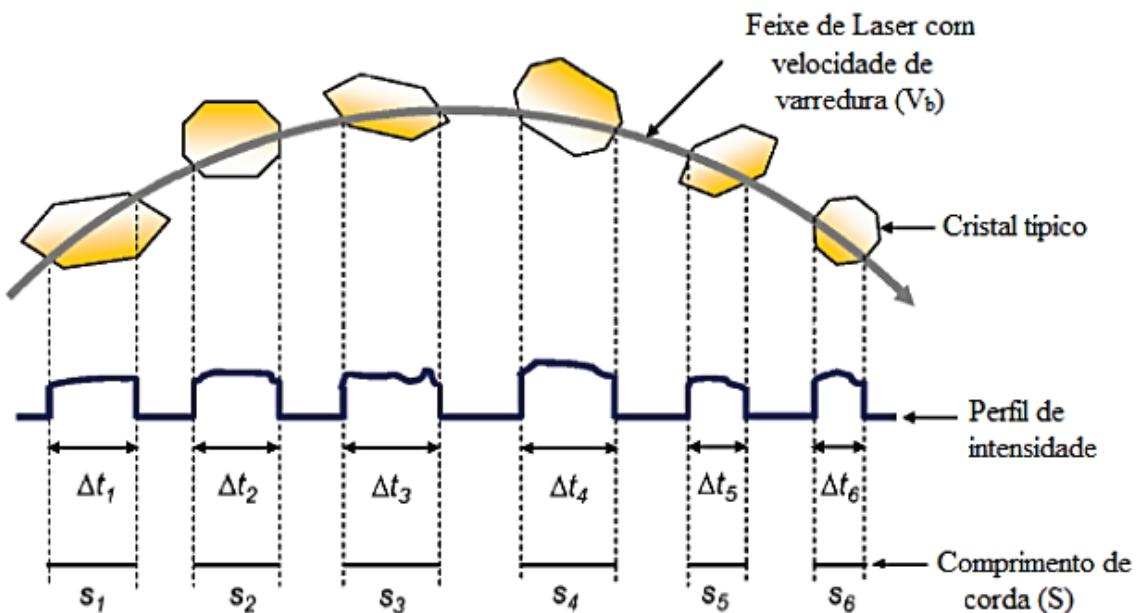


Figura 12 - Ilustração da medida do comprimento de corda através de uma sonda *FBRM*. Adaptado de (ABU BAKAR, NAGY, et al., 2010)

Num sistema que apresenta grande variabilidade do tamanho dos cristais, a distribuição do tamanho de corda é um parâmetro de análise mais importante (Figura 13). Como milhares de medidas são realizadas por segundo, a distribuição do tamanho de corda fornece uma medida sensível à mudança no tamanho e número de partículas. Assim, a técnica *FBRM* pode ser usada para estudar a cinética das mudanças de tamanho das partículas, como o crescimento de cristais (BARRETT, GLENNON, 2002, CACIANO DE SENA, SOARES, et al., 2011).

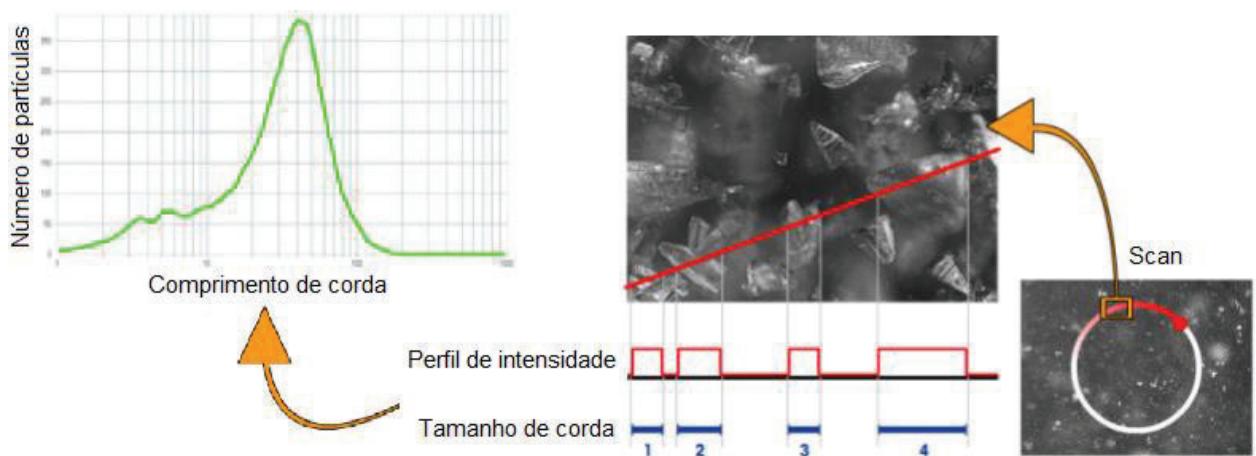


Figura 13 - Obtenção da distribuição do comprimento de corda. Adaptado de (METTLER TOLEDO, 2007).

## 4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

### 4.1 MATERIAIS

Todas as análises foram reproduzidas com metronidazol doado pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/FIOCRUZ), de fabricação nacional pela Formil Química Ltda., lote nº 12.07.024.028. Os solventes empregados foram água destilada e etanol absoluto, este último fornecido pela Vetec Química Fina.

### 4.2 EQUIPAMENTOS

#### 4.2.1 Lansetec *FBRM S400*

O Lansetec *FBRM S400* (Figura 14) é um instrumento baseado em sonda que possibilita monitorar em tempo real alterações no tamanho e no número de partículas do meio avaliado a partir da medição de refletância por feixe de luz focalizado (*FBRM*). O equipamento permite a análise do tamanho de corda entre 0,20  $\mu\text{m}$  a 2000  $\mu\text{m}$  em poucos segundos.



**FBRM® S400**

Figura 14. Ilustração do equipamento Lansetec *FBRM S400* com tecnologia *FBRM*.

O sistema inclui uma sonda, construída em aço C22 e capaz de operar na faixa de -80°C a 90°C, conectada a uma unidade de interface através de um cabo de fibra óptica. Esta unidade, por sua vez, se comunica a um computador, a partir do qual é realizado o controle do equipamento e a aquisição dos dados, que neste trabalho foram realizados através do software iControl *FBRM*.

#### 4.2.2 Microscópio Eletrônico de Varredura – Phenom ProX

O Microscópio Eletrônico de Varredura de Bancada Phenom ProX foi utilizado para a projeção bidimensional da imagem 3D dos cristais de metronidazol. Esse microscópio possui ampliação da câmara óptica entre 20 - 135 vezes, com magnificação de 80 - 150.000 vezes e zoom digital máximo de 12 vezes. O hexaboreto de cério ( $\text{CeB}_6$ ) é a fonte de elétrons empregada, com possibilidade de ajuste dos feixes de elétrons para 5 kV, 10 kV e 15 kV. Com um detector de elétrons retroespalhados, este MEV garante resolução igual ou inferior a 10 nm.



Figura 15. Ilustração do Microscópio Eletrônico de Varredura - Phenom ProX

#### 4.2.3 Webcams

Duas *webcams* foram empregadas para realizar a análise de imagem por *RGB* do sistema de cristalização do metronidazol: *webcam* Microsoft LifeCam HD 720p e *webcam* Endoscope IP67 HD 720p (Figura 16). Esta última câmara foi usada associada a uma sonda metálica. A partir das imagens capturadas, o valor absoluto das componentes *RGB* (*Red*, *Green* e *Blue*) foi avaliado em tempo real através do software *mcView*, desenvolvido pelo Núcleo de Desenvolvimento de Processos e Análises Químicas em Tempo Real (NQTR/UFRJ), e o valor médio dessas componentes foi usado como resultado final.



Figura 16 - (a) *Webcam* Microsoft LifeCam HD 720p e (b) *webcam* Endoscope IP67 HD 720p.

#### 4.2.4 Vídeo-microscópio ParticleView V819 com tecnologia *PVM*

O ParticleView V819 com tecnologia *PVM* (*Particle Vision and Measurement*) é vídeo microscópio *inline* de alta resolução (superior a 2  $\mu\text{m}$ ), que possibilita a aquisição de imagens de cristais à medida em que vão surgindo no meio monitorado (Figura 17). O sistema inclui uma sonda conectada a uma unidade de interface através de um cabo de fibra óptica. Esta unidade, por sua vez, se comunica a um computador, a partir do qual é realizado o controle do equipamento e a aquisição dos dados, que neste trabalho foram realizados através do software iControl *PVM*.

A sonda é construída em aço Alloy C22 e é capaz de operar na faixa de -80°C a 120°C. Ela conta com fontes independentes para iluminar uma área fixa com um campo de visão de 1300  $\mu\text{m}$  x 890  $\mu\text{m}$ . A transmissão da luz da sonda para o meio e vice-versa ocorre através de uma janela de safira e a luz espalhada que retorna à sonda é usada por elemento CCD para produzir a imagem na escala cinza com resolução de 1500 x 1024 pixels.

A taxa máxima de aquisição é de 5 imagens por segundo, enquanto a profundidade da zona focal é restrita a cerca de 50  $\mu\text{m}$ , o que garante que todos os objetos em foco resultem em imagens com níveis de ampliação idênticos. Com estas características, este sistema possibilita coletar imagens de alta resolução e em tempo real de partículas, gotículas e cristais, até mesmo em suspensões e emulsões escuras e concentradas, além de fornecer medidas contínuas do índice de retroespalhamento automaticamente.



Figura 17 - Ilustração do equipamento ParticleView V819 com tecnologia *PVM*.

#### 4.2.5 OptiMax 1001

Todas as cristalizações foram realizadas no reator OptiMax 1001 da Mettler Toledo (Figura 18), equipado com um vaso de vidro borossilicato de 1000 mL, agitador mecânico do tipo propeller, sensor de temperatura Pt100 e sistema Peltier para controle de temperatura, este último auxiliado por um criostato Huber UnichillerTM modelo 022-MPC, ajustado para operar a -10°C. Com estas especificações, o reator era capaz de operar dentro dos limites de temperatura deste trabalho.

Convenientemente, este equipamento possibilita o controle da temperatura do meio segundo uma programação prévia, seja ela a manutenção de um perfil isotérmico ou o estabelecimento de uma rampa de aquecimento/resfriamento. Além disso, uma janela fornece visibilidade para o vaso iluminado, garantindo que alterações no meio sejam visíveis e possam ser capturadas por uma câmera que pode ser fixada nesta janela. Para a iluminação, o reator contava com 12 LEDs, 6 frontais e 6 traseiros.

Por fim, o controle do equipamento e a aquisição dos dados de temperatura foram realizados através do software iControl OptiMax 5.1.0.0.

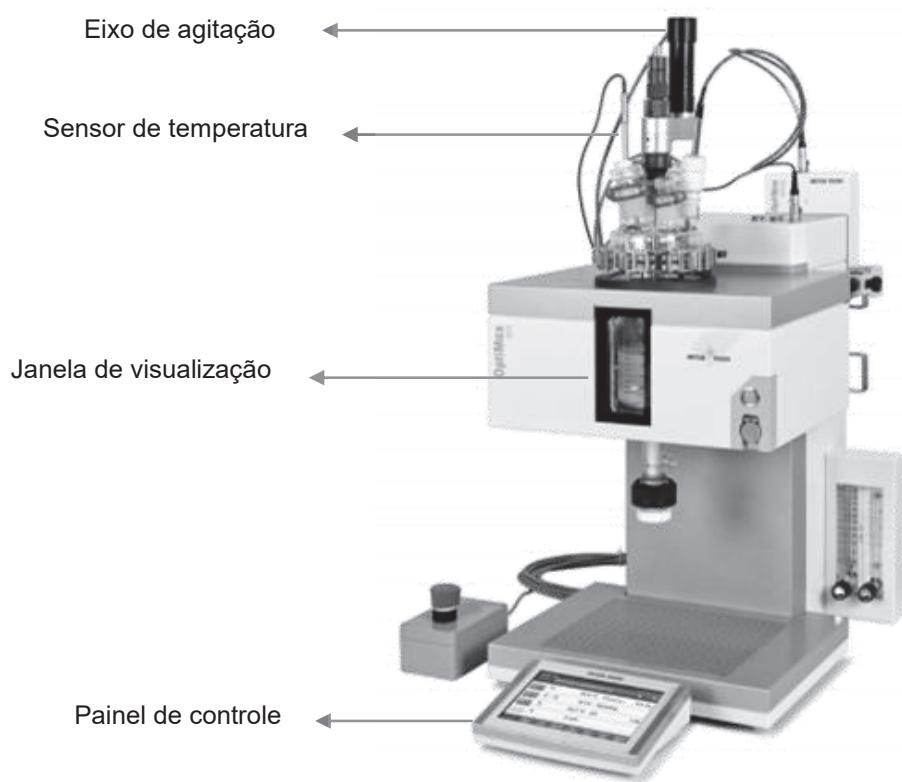


Figura 18 - Ilustração do equipamento OptiMax 1001.

## 5. MÉTODOS

Todas as cristalizações foram realizadas no reator OptiMax 1001, cujo vaso estava acoplado a três sondas, descritas abaixo. Ainda, na janela de vidro do reator foi acoplada uma *webcam* modelo Microsoft LifeCam HD para realizar o acompanhamento *online* do sinal *RGB*. A Figura 19 ilustra o aparato experimental empregado.

- i. Sonda do vídeo-microscópio *PVM* para visualização em tempo real das partículas formadas durante a cristalização, bem como para medição *inline* do sinal *RBI*;
- ii. Sonda do *FBRM* para acompanhamento em tempo real das mudanças na distribuição do tamanho de corda das partículas;
- iii. Sonda metálica contendo uma câmera *webcam* Endoscope IP67 para realizar a medição *inline* do sinal *RGB*.

Na própria tampa do reator já havia entradas específicas para o posicionamento das sondas, sendo a câmera externa a única não pré-definida. Em função disso, ela foi instalada na janela de vidro de forma que pudesse capturar imagens da coluna de líquido. Dessa forma, o menor volume de solvente utilizado deveria ser 500 mL. Com esse volume também foi garantido que as fontes luminosas do reator (12 LEDs) estivessem completamente submersas (Figura 20).

As câmeras e a sonda *PVM* eram fixadas no início dos experimentos e somente retiradas ao final, já que mudanças no posicionamento do sensor poderiam trazer alterações nos dados coletados, uma vez que a análise das imagens exige que o mesmo quadrante seja analisado.

Todas as medidas através da sonda *FBRM* foram realizadas com contagem de tamanho de corda a cada 2 segundos, enquanto a aquisição de imagens através do vídeo-microscópio e das *webcams* ocorria numa taxa de 1 imagem por segundo. A agitação do vaso foi mantida constante a 300 rpm e sua tampa de vidro foi recoberta com papel alumínio para que a iluminação externa não interferisse na aquisição dos dados com as câmeras.

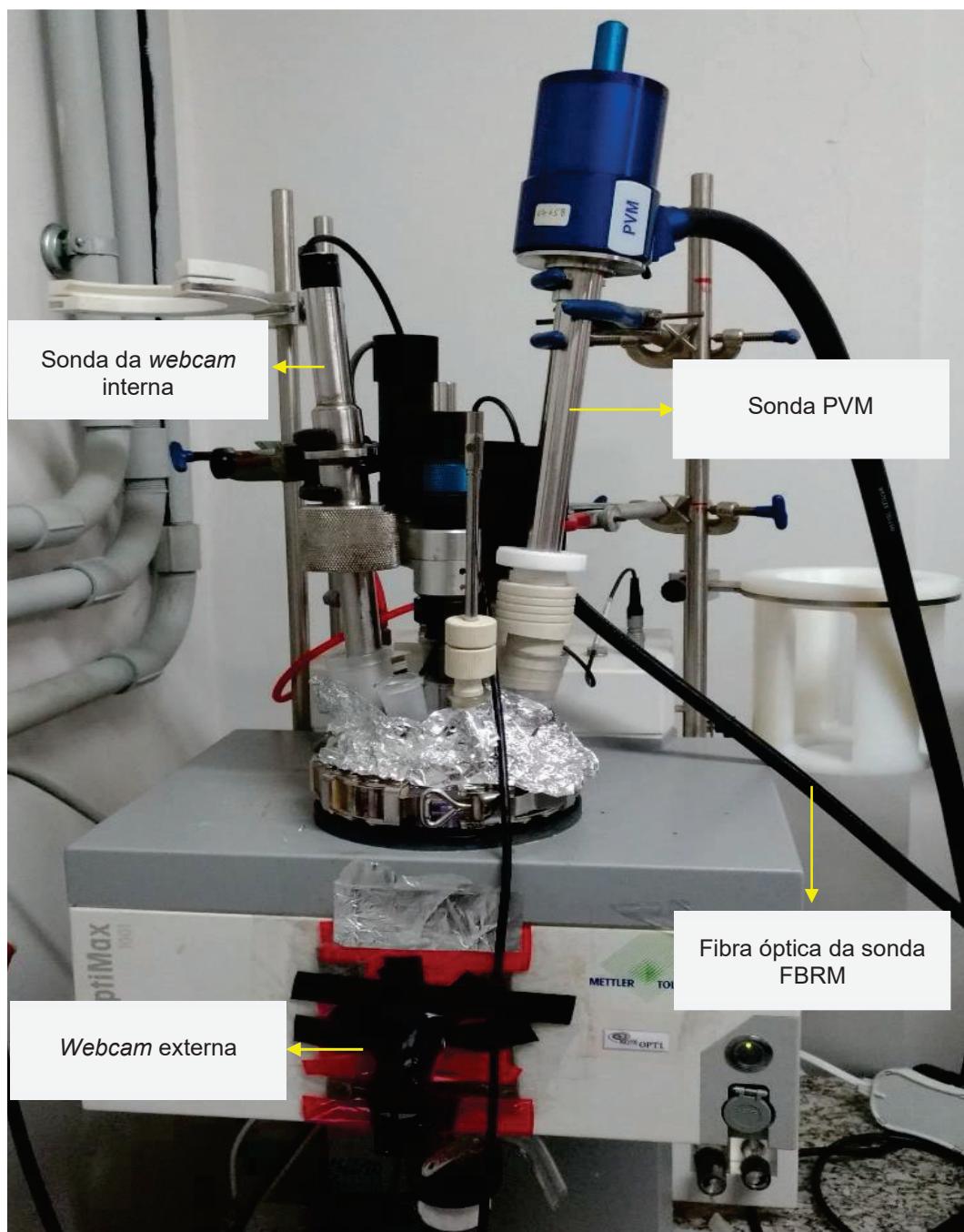


Figura 19 - Aparato experimental usado no estudo da cristalização do metronidazol. A sonda do *FBRM* não está explícita na imagem. No entanto é destacada a sua fibra óptica, para nortear onde a sonda foi instalada.



Figura 20 - Detalhe interno do vaso do reator OptiMax 1001, indicando o sistema de iluminação e a janela de visualização de vidro.

### 5.1 CRISTALIZAÇÃO DO METRONIDAZOL

As soluções de metronidazol foram preparadas com concentração igual a 0,06 mol/L, valor escolhido em referência aos trabalhos desenvolvidos por RAMUKUTTY, JEYASUDHA, *et al.* (2013) e RAMUKUTTY, RAMACHANDRAN (2012), que realizaram a cristalização do metronidazol a partir da evaporação do solvente à temperatura ambiente ( $\sim 27^{\circ}\text{C}$ ).

Desta forma, as soluções de metronidazol foram obtidas por meio da dissolução completa de 6 g do fármaco em 500 mL de solvente apropriado (etanol ou água destilada), processo que ocorreu a  $42^{\circ}\text{C}$  e sob agitação constante de 300 rpm. Esta temperatura foi próxima da utilizada por DI MARTINO, P., CENSI, *et al.* (2007),  $40^{\circ}\text{C}$ , que também preparam soluções em água e em etanol para cristalização do metronidazol por resfriamento controlado.

Todas as soluções foram preparadas no início de cada experimento, no próprio reator, com monitoramento por *FBRM*, que fornecia o sinal do número de contagens por segundo para partículas menores que 10  $\mu\text{m}$ . Quando não havia mais sólido em suspensão, critério avaliado a

partir da ausência de partículas menores que 10  $\mu\text{m}$ , as leituras dos demais equipamentos eram acionadas e se iniciava o processo de resfriamento em taxas lineares de decaimento da temperatura. As taxas selecionadas foram 0,20°C/min; 0,40°C/min e 0,60°C/min.

O resfriamento acontecia até a temperatura final de 5°C, quando a coleta dos dados era interrompida. Então, os cristais eram filtrados a vácuo, com papel de filtro qualitativo de porosidade de 2  $\mu\text{m}$ , secos a 60°C numa estufa por 24 h e, posteriormente, analisados por microscopia eletrônica de varredura, onde as imagens eram captadas com ampliações adequadas e fonte de feixe de elétrons ajustada para 10 kV ou 15 kV, conforme a necessidade de nitidez.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 DETERMINAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Neste primeiro momento será discutido o desenvolvimento da metodologia aplicada, a saber: determinação das taxas de resfriamento, etapa de solubilização e etapa de cristalização do metronidazol, conforme indicado nos tópicos subsequentes.

#### 6.1.1 DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE RESFRIAMENTO

Com o propósito de realizar a cristalização do metronidazol foi necessário verificar a capacidade de resfriamento do reator empregado, para garantir que as taxas de resfriamento adotadas no trabalho pudessem ser reproduzidas. Efetivamente, o controle de temperatura no reator do OptiMax 1001 ocorre por sistema Peltier, em que a aplicação de um potencial elétrico na jaqueta do reator gera um gradiente de temperatura, que possibilita aquecer ou resfriar o conteúdo do vaso.

Desta forma, o calor removido do vaso pelo sistema Peltier deve ser transferido para outro meio, para garantir a eficiência do processo de resfriamento (Figura 21). Caso contrário, o sistema operará de forma ineficiente e baixas temperaturas não serão alcançadas, nem as taxas de resfriamento selecionadas serão atendidas. O meio inicialmente empregado para essa finalidade foi água corrente, em função da disponibilidade e para simplificar o aparato experimental.

No entanto, testes preliminares mostraram que o equipamento não era capaz de resfriar o sistema até temperaturas inferiores à necessária para promover a cristalização do metronidazol. Uma justificativa para esse fato seria a troca de calor ineficiente: a temperatura da água corrente (temperatura ambiente, geralmente alta) limitava a remoção de calor do vaso.



Figura 21 - Ilustração do processo de remoção de calor do vaso do reator OptiMax 1001.

Assim, a água foi substituída por uma mistura MEG/água na proporção volumétrica 3:1, proveniente de um criostato Huber UnichillerTM modelo 022-MPC, ajustado para operar a -10°C. Desta maneira foi possível assegurar o controle apropriado da temperatura do conteúdo do vaso e a manutenção das taxas de resfriamento previamente definidas.

Em seguida foi definido o intervalo de operação do reator em relação às taxas de resfriamento. A partir de testes exploratórios percebeu-se que a faixa de trabalho deveria estar entre 0,20°C/min e 0,60°C/min. Fora desses limites, o OptiMax 1001 associado ao criostato não era capaz de manter a taxa de resfriamento linear definida pelo usuário, pré-requisito para o estudo.

A Tabela 2 indica os resultados obtidos nessa avaliação exploratória, em que 500 mL de água foram submetidos a diferentes programações lineares de resfriamento de 45°C a 5°C, destacando as taxas de resfriamento selecionadas e as realmente obtidas. Como é possível observar, fora do intervalo de operação do reator (0,20°C/min a 0,60°C/min) as taxas impostas não foram respeitadas.

Tabela 2 - Avaliação da capacidade de resfriamento do aparato experimental empregado (OptiMax 1001 associado a um criostato) utilizando 500 mL de água como referência e diferentes taxas de resfriamento.

Taxa de resfriamento ajustada (°C/min)	Taxa de resfriamento real (°C/min)
0,20	0,20
0,40	0,40
0,60	0,56
0,80	0,69
1,00	0,71
1,50	0,69

Dentro da capacidade de resfriamento do sistema, as taxas teóricas selecionadas para o estudo foram 0,20°C/min; 0,40°C/min e 0,60°C/min. Com esses valores, esperava-se obter dados sobre o comportamento do processo de cristalização quando o sistema era resfriado duas e três vezes mais rápido. A Figura 22 traz as equações das retas obtidas no processo de resfriamento empregando essas taxas e água como meio de teste, até a temperatura final de estudo usada na cristalização do metronidazol (5°C).

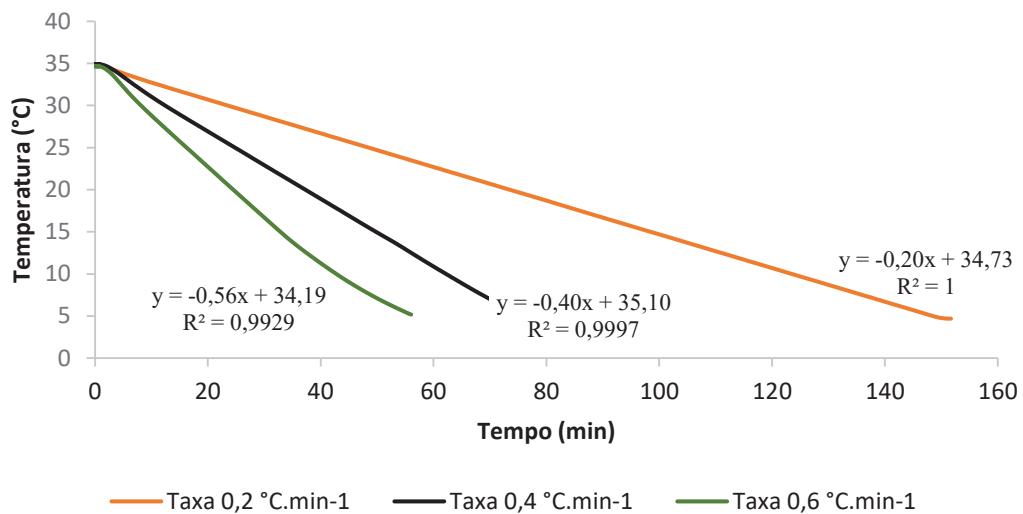


Figura 22 - Regressão linear das curvas de resfriamento de cada taxa aplicada em experimentos usando água como meio de teste, com variação de 35°C a 5°C.

É possível observar que as taxas selecionadas apresentaram boa linearidade, com valores de  $R^2 \geq 0,99$ . O módulo do coeficiente angular das curvas ajustadas corresponde ao o valor da taxa de resfriamento real fornecida pelo sistema e apresentam boa concordância com os valores nominais selecionados de 0,20°C/min; 0,40°C/min e 0,60°C/min.

### 6.1.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES - ETAPA DE SOLUBILIZAÇÃO

A Figura 23 traz um exemplo representativo do processo de solubilização e posterior cristalização do metronidazol a uma taxa de resfriamento de 0,2°C/min em água como solvente. A curva azul informa o número de contagens de partículas por segundo medido pela sonda *FBRM*, enquanto a laranja indica a temperatura do meio ( $T_r$ ).

Com a adição do soluto houve um aumento vertiginoso do parâmetro contagens/s, alcançando o valor próximo de 2500 contagens/s, que diminuiu com o tempo à medida que o fármaco solubilizava na água. O processo de solubilização foi dado como completo quando o sinal de contagens/s de partículas menores que 10  $\mu\text{m}$  retornava ao nível “zero”.

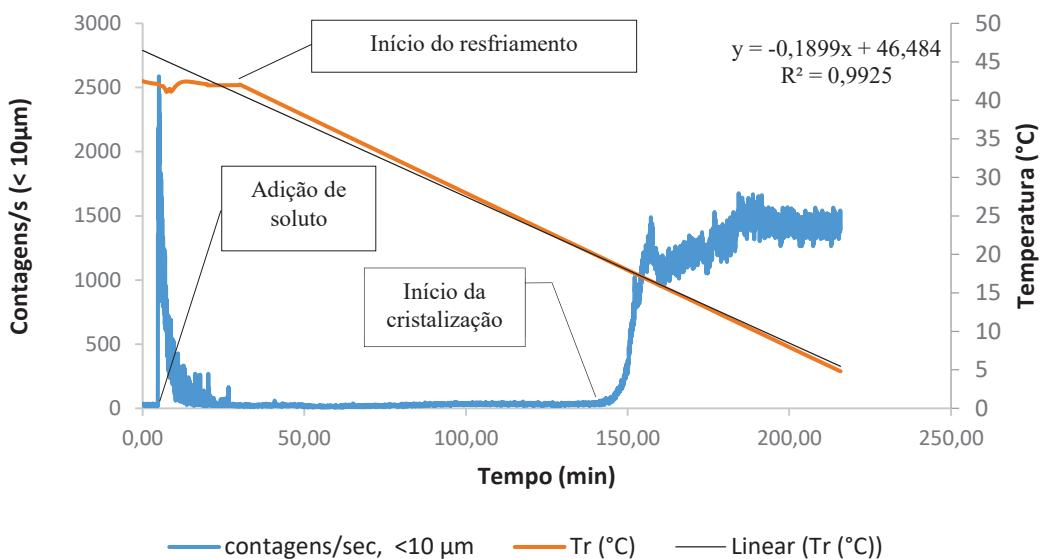


Figura 23 - Exemplo de dados coletados durante a solubilização e cristalização do metronidazol em água como solvente, a uma taxa de resfriamento de 0,2°C/min.

A sonda *FBRM* empregada permite observar diversas faixas de contagens, com tamanhos variando entre 2 μm e 20000 μm. A escolha do critério “partículas menores que 10 μm” para a observação se deu pela necessidade de se obter uma solução isenta de metronidazol sólido. Caso contrário, o processo de cristalização seria afetado pela presença do material não solubilizado. Por isso, era importante garantir a inexistência de partículas menores que 10 μm no meio antes de iniciar o processo de cristalização.

### 6.1.3 ETAPA DE CRISTALIZAÇÃO

Para o exemplo ilustrado na Figura 23, após a completa dissolução do metronidazol, quando o sinal de contagens retornou ao nível próximo de zero, a temperatura do meio foi reduzida de 42°C até 5°C sob uma taxa de resfriamento fixa de 0,2°C/min. Neste processo, o sinal da contagem/s elevou-se após 150 min, indicando o início da cristalização. Esse processo continuou até 200 minutos e, após este tempo, não houve variação significativa do sinal. Portanto, a cristalização havia cessado.

Ao correlacionar o sinal da sonda *FBRM* com a temperatura do meio, a temperatura de início de cristalização foi em torno de 17°C. Análise similar pode ser feita ao avaliar os sinais *RBI* e *RGB*, como será discutido no Tópico 6.2. Portanto, essas três técnicas possibilitam avaliar a temperatura

inicial de cristalização do metronidazol, parâmetro utilizado para validar a reprodutibilidade dos experimentos.

Ainda, os valores de temperatura fornecidos por cada uma dessas técnicas possibilitam compará-las no que diz respeito à identificação do início da formação dos cristais pelos sensores empregados, um dos objetivos específicos deste estudo.

Na literatura, os dois métodos mais usuais para avaliar o processo de cristalização escolhido são: (1) escolher uma temperatura final e interromper o processo ou (2) parar os testes no início da formação dos primeiros cristais. Neste trabalho o critério foi a escolha de uma temperatura final, método (1), o que possibilita a comparação entre os ensaios empregados nas diferentes taxas.

Na taxa igual a 0,6°C/min vê-se que o início da cristalização em água se dá em aproximadamente 13°C (Figura 24). Então, a temperatura adotada para a finalização dos experimentos, 5°C, deveria ser suficiente para que fosse possível comparar experimentos em taxas menores, quando a temperatura de início de cristalização é maior. Além disso, o limite final de 5°C foi definido porque temperaturas menores poderiam iniciar o processo de cristalização do solvente concomitantemente com o metronidazol, o que atrapalharia o estudo.

DI MARTINO, P., CENSI, *et al.* (2007) definiram a temperatura final de seus estudos em 10°C, mas como observado que a temperatura de cristalização para a maior taxa adotada no presente trabalho (0,6°C/min) era próxima a esse valor, foi escolhida uma temperatura mais baixa para que fosse possível definir com segurança a temperatura de aparecimento dos primeiros cristais.

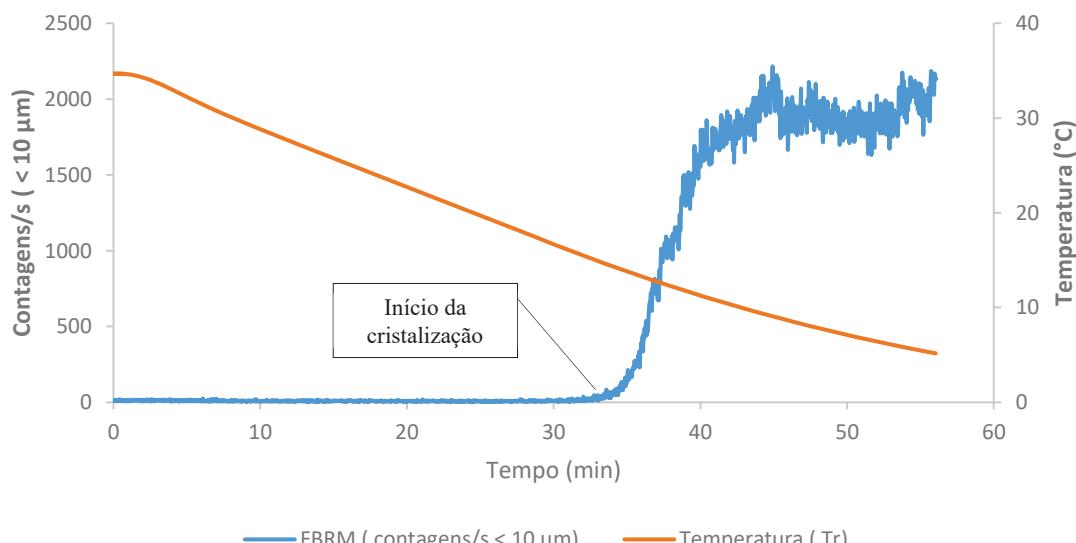


Figura 24 - Taxa de 0,6°C/min mostrando a temperatura inicial de cristalização e a estabilização do crescimento antes de 5°C.

Ao correlacionar os sinais obtidos pela sonda *FBRM* (contagem/s), pelas câmeras *inline* e *online* (*RGB*) e pelo vídeo-microscópio *inline PVM* (RGI) com a temperatura do meio é possível inferir a temperatura de início de cristalização do metronidazol por cada uma dessas técnicas. Essencialmente, o início da cristalização é acompanhado do aumento desses sinais, que ocorre num ponto chamado *onset*. Se esses equipamentos tiverem *onset* sobrepostos, esses sensores são capazes de detectar o início da cristalização em tempos próximos ou iguais.

A Figura 25 ilustra esta correlação para os sinais *RBI* e *RGB* medidos quando o resfriamento ocorre a uma taxa  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Essa taxa é a que submete o sistema ao resfriamento mais rápido, onde seria necessária uma rápida percepção do início da cristalização. Como pode ser observado, os sensores tiveram tempos de resposta similares, percebendo o início da cristalização por volta de 35 min, momento em que os sinais subiram.

Assim, os valores de temperatura inicial de cristalização,  $T_{onset}$ , para as diferentes técnicas foram calculados com base nos desvios dos valores médios das respectivas linhas de base dos sinais de cada equipamento refletidos na curva de temperatura fornecida pelo reator, empregando Teste *t* a uma significância de 5%.

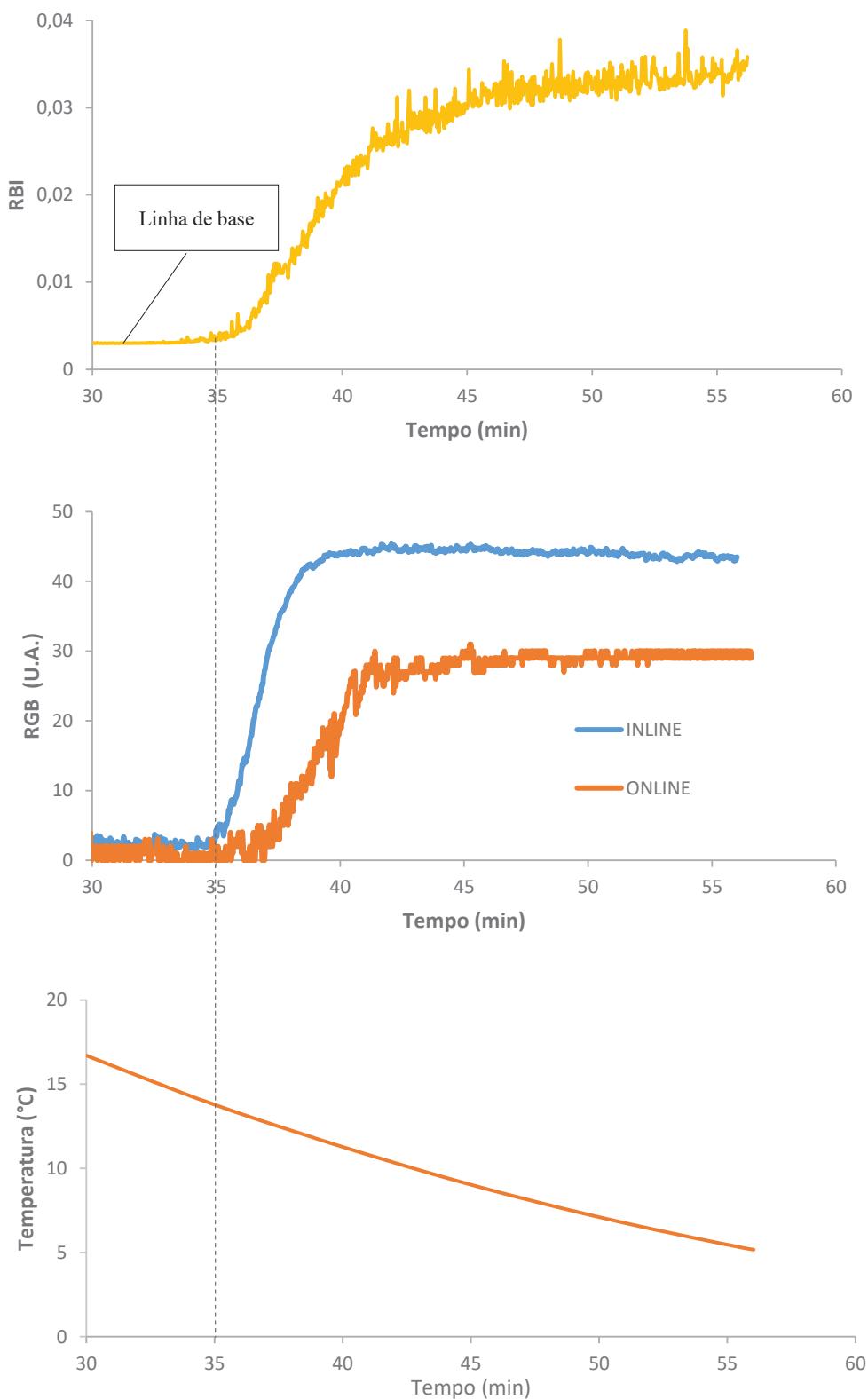


Figura 25 - Medida dos sinais *RBI*, *RGB*, contagem/s e temperatura para o processo de cristalização do metronidazol em água como solvente, a uma taxa de resfriamento de 0,6°C/min.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE INÍCIO DE CRISTALIZAÇÃO

Neste tópico serão discutidas as informações obtidas por cada uma das técnicas empregadas para avaliar a temperatura de início de cristalização do metronidazol em água como solvente, enquanto a análise sobre o hábito cristalino será feita posteriormente. As soluções etanólicas apresentaram grande dificuldade de repetitividade, com grandes diferenças entre as temperaturas de cristalização obtidas nas réplicas.

Tal fato pode ter acontecido porque, numa tentativa de se evitar o consumo excessivo de solvente e descarte após cada teste, ele era recuperado por destilação e reutilizado em outro experimento. Este processo pode ter incorporado impurezas ao etanol - como água - ou mesmo o metronidazol pode ter sido carreado para o destilado. Assim, somente os dados de imagem do MEV serão incorporados na discussão sobre o uso de etanol.

### 6.2.1 ANÁLISE POR FBRM

A Figura 26 indica os resultados obtidos na cristalização do metronidazol em água como solvente a uma taxa de resfriamento de 0,2°C/min. Após certo tempo o número de partículas com tamanho de corda inferior a 10 µm estabiliza, indicando que a quantidade máxima de cristais nesta faixa de tamanho foi atingida. Neste caso,  $T_{onset}$  é  $19,5^{\circ}\text{C} \pm 3,1^{\circ}\text{C}$  (intervalo de confiança baseado na distribuição de Student, com 95% de confiança e resultados avaliados em triplicata).

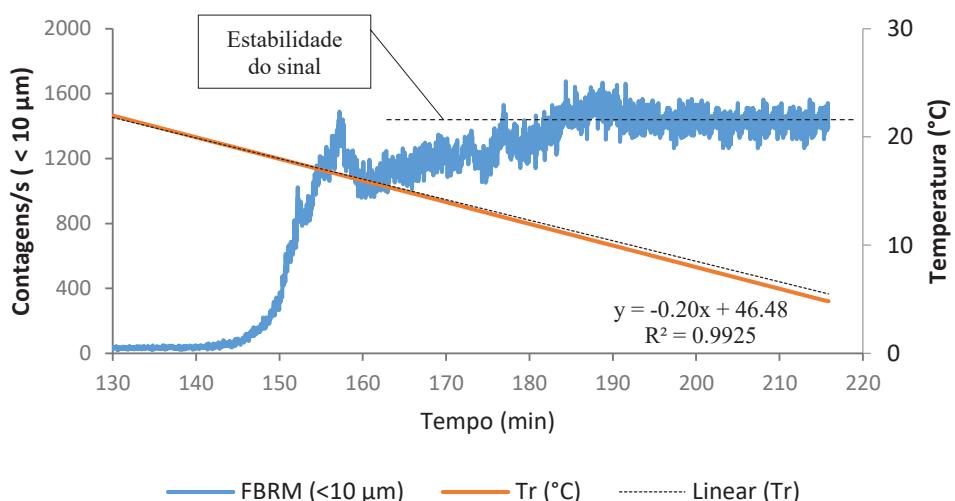


Figura 26 - Cristalização do metronidazol em água como solvente com taxa de resfriamento de 0,2°C/min.

Na Figura 27 e Figura 28 pode-se fazer a mesma interpretação para as outras duas taxas de resfriamento empregadas. Nestes casos,  $T_{onset}$  foi  $16,1^{\circ}\text{C} \pm 1,8^{\circ}\text{C}$  para a taxa de  $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $14,1^{\circ}\text{C} \pm 0,6^{\circ}\text{C}$  para a taxa de  $0,6^{\circ}/\text{min}$ . Todas essas medidas de  $T_{onset}$  foram realizadas baseando-se na curva de tamanho de corda inferior a  $10 \mu\text{m}$ , para que fosse possível detectar o início do processo de cristalização com maior exatidão. Os dados das replicatas usadas nos cálculos de intervalo de confiança de  $T_{onset}$  podem ser consultados no Apêndice A.

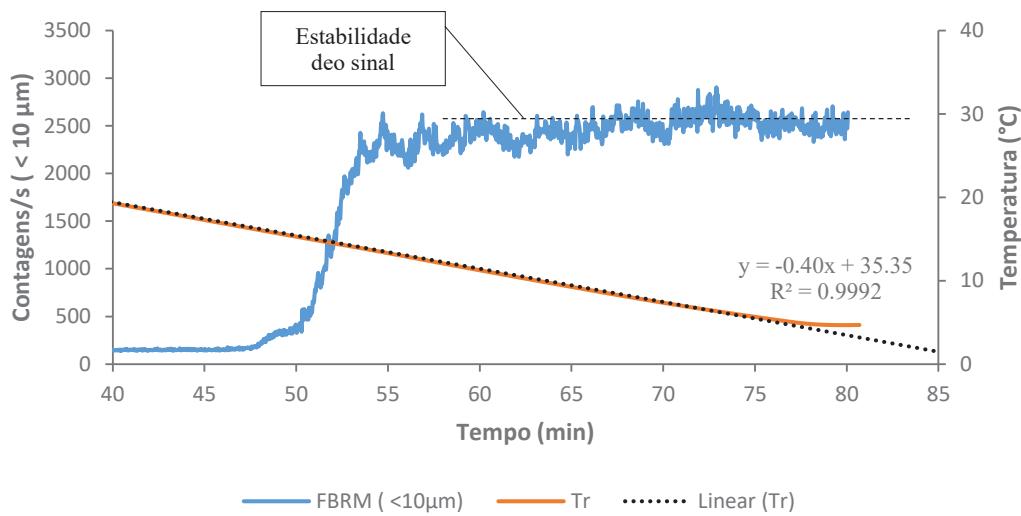


Figura 27 - Cristalização do metronidazol em água como solvente com taxa de resfriamento de  $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

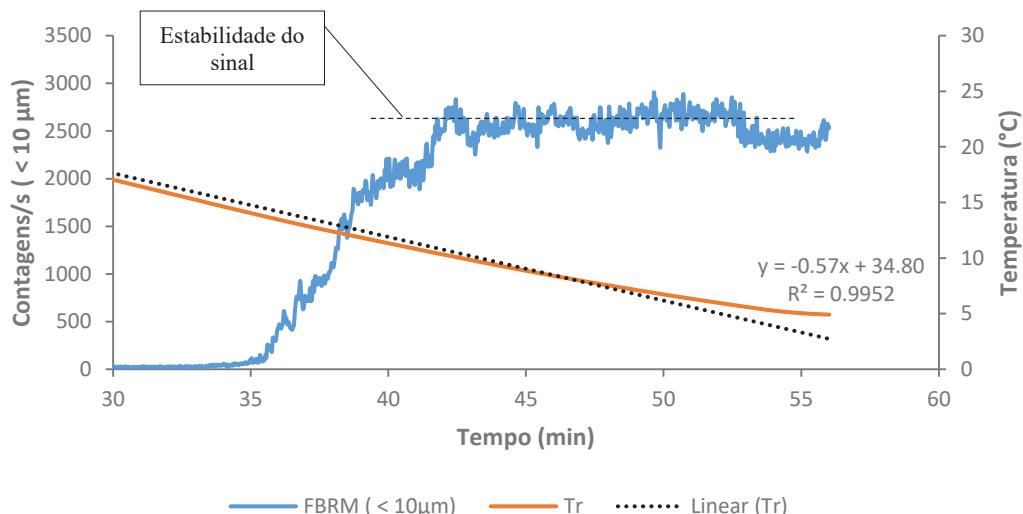


Figura 28 - Cristalização do metronidazol em água como solvente com taxa de resfriamento de  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

A partir dos gráficos é possível notar que o tempo para estabilização do crescimento cristalino ficou em torno de 30 minutos para a taxa de 0,2°C/min. Isso indica que após o início da cristalização, apenas deveria ser aguardado esse tempo para finalizar o experimento. Já na taxa de 0,4°C/min o tempo para o crescimento máximo cristalino ficou em torno de 15 minutos e na taxa de 0,6°C/min foi em torno de 10 minutos após o início da cristalização. Esses valores refletem o tempo ideal para a finalização do processo.

Nos últimos 5 minutos de análise na taxa 0,6°C/min (Figura 28 e Figura 29) é possível identificar um evento que promoveu a diminuição do número de contagens de partículas inferiores a 10 µm, concomitante com o aumento do número de partículas entre 10-50 µm. Este fenômeno ocorreu, possivelmente, devido à aglomeração das partículas menores. Como indicado, após 10 minutos do início da cristalização tem-se a estabilização do crescimento cristalino (estabilidade dos sinais). No entanto, como o processo de resfriamento foi mantido por mais tempo, até a temperatura final de 5°C, a aglomeração das partículas existentes pode ter sido favorecida.

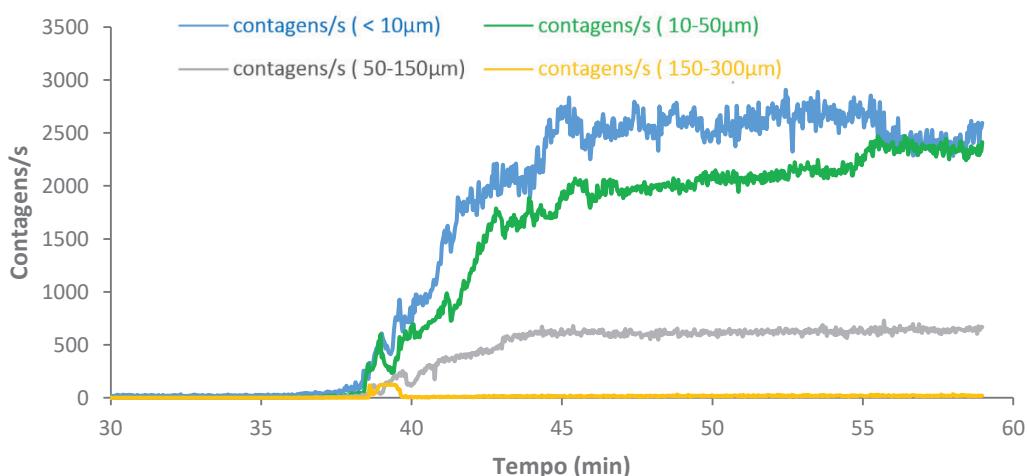


Figura 29 - Contagens no processo de cristalização de metronidazol em água como solvente na taxa de resfriamento de 0,6°C/min.

Nos três casos analisados, cristais com tamanhos de corda superiores a 150 µm quase não foram observados (contagens próximas de zero). Cabe ressaltar que as medidas realizadas não estão associadas ao tamanho de partícula, mas sim a uma faixa com distribuição do tamanho de corda. Caso o hábito seja esférico, então é possível afirmar qual o tamanho das partículas, tendo em vista que a leitura do equipamento é influenciada pela posição do cristal que passa em frente ao feixe do laser.

Assim, se a face analisada for longa ou larga, o tempo de retorno do feixe refletido será maior, indicando que o tamanho da partícula analisada era grande. Mas se a face for pequena ou estreita, como em hábitos agulhados, o tempo de reflexão será curto, indicando que o tamanho da partícula era pequeno. Somente a partir da análise das imagens dos cristais obtidas por vídeo-microscópio PVM ou MEV é que será possível afirmar qual o hábito do cristal e concluir algo sobre a leitura do *FBRM* em relação às faces.

A Tabela 3 reúne as contagens obtidas em cada taxa de resfriamento por tamanho de corda, obtidas após a estabilização dos sinais e antes de eventuais processos de aglomeração, enquanto a Figura 30 indica os gráficos de contagens ao longo do tempo.

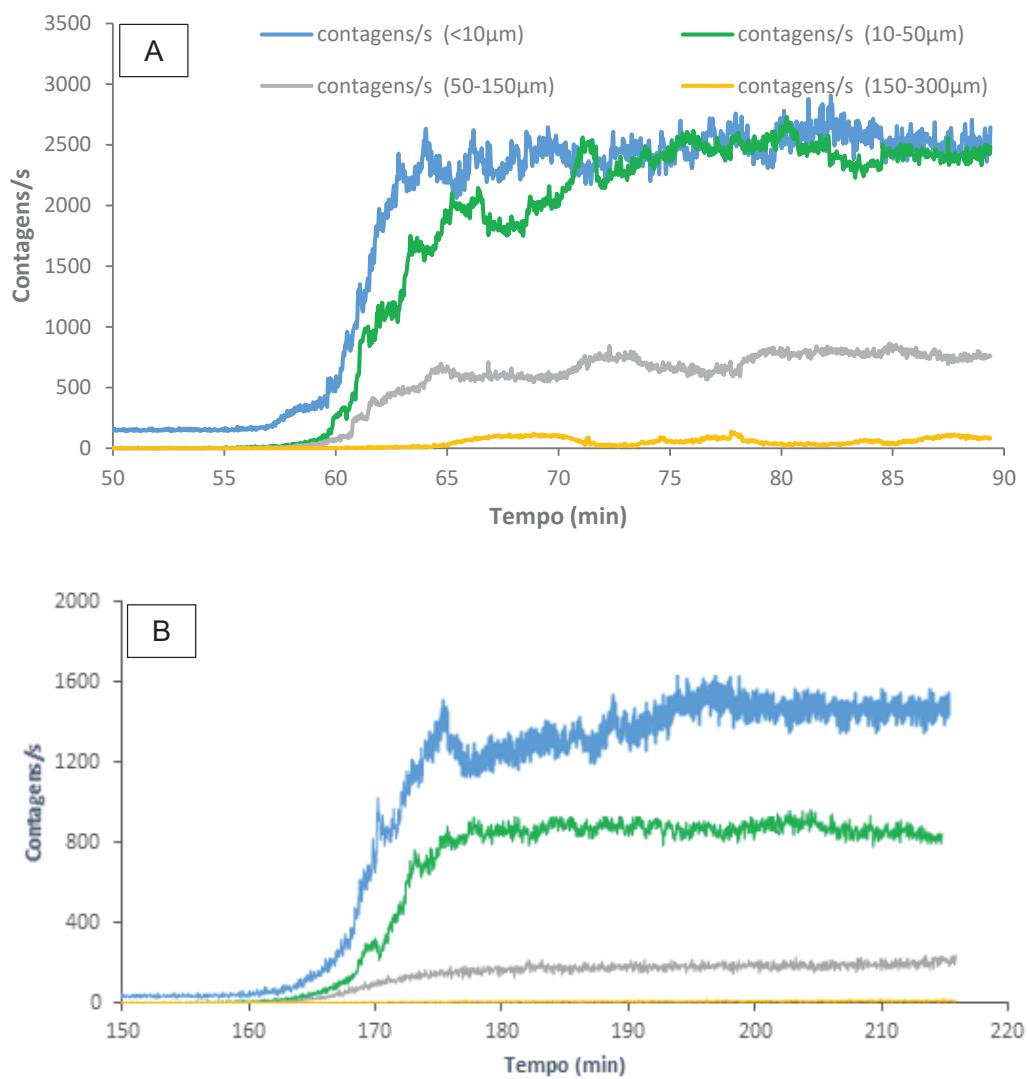


Figura 30 - Contagens no processo de cristalização de metronidazol em água como solvente na taxa de resfriamento de 0,4 e 0,2°C/min (A e B, respectivamente).

Tabela 3 - Contagem das partículas para as três taxas de resfriamento avaliadas.

Tamanho de corda ( $\mu\text{m}$ )	Contagens por segundo		
	0,2°C/min	0,4°C/min	0,6°C/min
< 10	1460	2420	2690
10 - 50	870	2310	2120
50 - 100	190	750	600

Pelas teorias clássicas de cristalização (DE YOREO, GILBERT, *et al.*, 2015), espera-se obter cristais menores e em maior quantidade conforme a taxa de resfriamento aumenta, já que a formação de novos núcleos é favorecida em detrimento ao crescimento das faces dos núcleos já formados. Na Tabela 3, ao observar apenas as contagens para cristais com tamanho inferior a 10  $\mu\text{m}$  essa premissa é respeitada. No entanto, o aumento da taxa de resfriamento também foi acompanhado do aumento do número de contagens de partículas com maior tamanho de corda, especialmente na faixa de 10-50  $\mu\text{m}$ .

Uma hipótese para isso ter ocorrido é que essas taxas de resfriamento são muito próximas e não possibilitam observar esse fenômeno. Essa hipótese ganha força principalmente porque as duas maiores taxas empregadas reproduziram contagens bastante semelhantes em todas as faixas de tamanho de corda.

Além do mais, é importante frisar que pode ter havido a influência da taxa de agitação no processo de formação dos cristais, devido ao choque entre os cristais devido à superpopulação e choque com o agitador mecânico e com as sondas inseridas no meio. Isso pode ter limitado o crescimento de cristais na faixa de 50-100  $\mu\text{m}$  na taxa de resfriamento 0,2°C/min e favorecido a predominância de cristais de menor tamanho.

Nesta taxa de resfriamento, desde o início do processo de cristalização até que a temperatura final do processo fosse atingida (5°C), o tempo decorrido foi 70 min, enquanto para as taxas 0,4°C/min e 0,6°C/min esse tempo foi menor: 30 min e 20 min, respectivamente. Portanto, na taxa de 0,2°C/min a formação de cristais maiores pode ter sido limitada pela agitação associada ao longo tempo em que os cristais ficaram submetidos à agitação severa.

### 6.2.2 ANÁLISE PELO PARÂMETRO $T_r - T_j$

A cristalização é um processo exotérmico (LAKATOS, SZILÁGYI, 2015). Desta forma, se for possível detectar o momento em que se inicia a geração de calor, é possível definir o valor de  $T_{onset}$  por correlação. No caso deste estudo, o sistema de controle de temperatura do reator OptiMax 1001 segue uma programação linear da temperatura da jaqueta ( $T_j$ ), para atender a taxa de resfriamento imposta ( $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ou  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

Havendo uma perturbação no sistema mediante o início da cristalização, o reator deve reduzir mais rapidamente a temperatura na jaqueta do vaso, para compensar a geração anômala de calor e manter a taxa de resfriamento previamente imposta. Isso significa que no momento do início da cristalização deve haver um desvio na tendência de  $T_j$  e  $T_r - T_j$ . Se os dados de  $T_r - T_j$  forem derivados, inclusive, perturbações do sistema podem ser detectadas mais facilmente.

No entanto, em nenhum experimento reproduzido foi possível avaliar a presença desse evento exotérmico a partir da avaliação de  $T_j$  e  $T_r - T_j$ . Talvez, a quantidade de calor envolvida no processo seja tão pequena que o sistema de controle de temperatura não foi capaz de identificá-la, especialmente porque a quantidade de fármaco usado era reduzida.

### 6.2.3 ANÁLISE POR IMAGEM

Nas análises por imagem esperava-se observar alguns pontos importantes dos experimentos, como a possibilidade de determinar o início da cristalização (através dos sinais *RBI* e *RGB*) e o hábito cristalino ainda em solução (através do vídeo-microscópio *PVM* e das câmeras *online* e *inline*).

Com o intuito de observar o início da cristalização do sistema com uso das câmeras, fez-se um comparativo entre o sinal de contagens/s de partículas menores que  $10 \mu\text{m}$  fornecido pela sonda *FBRM* e o sinal *RGB* coletado pelos sensores das câmeras *inline* e *online*. O sinal *RGB* era relativo à média dos sinais das componentes vermelha, verde e azul, pois elas apresentaram intensidades semelhantes nas análises. Esse comparativo está representado na Figura 31 para o processo de cristalização a  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

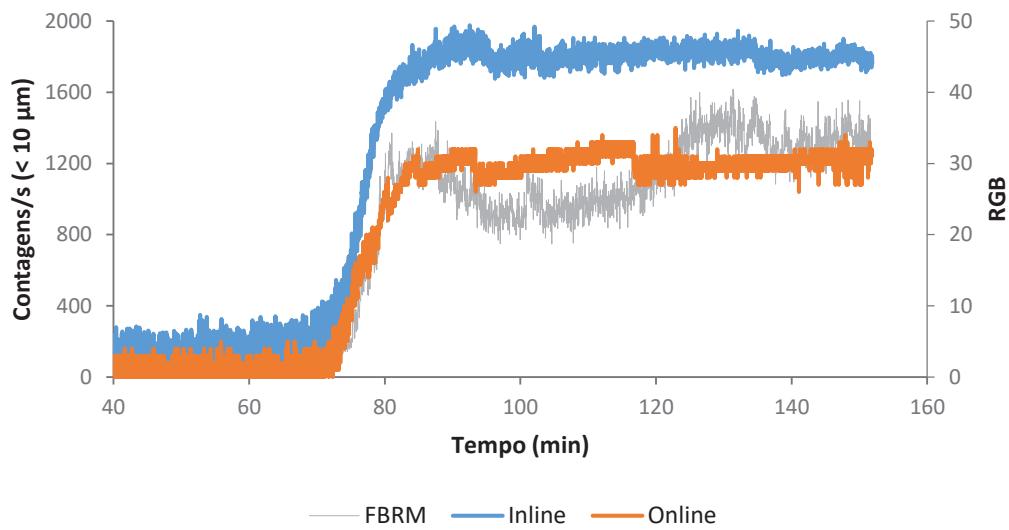


Figura 31 - Comportamento das curvas *RGB* das câmeras *inline* e *online* e do sinal *FBRM* no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,2°C/min.

Na figura anterior, o sinal *RGB* aumentou no momento em que os cristais começaram a ser formados, indicando que havia algo espalhando a luz incidente no meio. O mesmo fenômeno pode ser observado pelo sinal de contagens/s, que aumentou. Interpretação similar é dada à Figura 32 e à Figura 33, que comparam os sinais para as taxas de resfriamento de 0,4°C/min e 0,6°C/min, respectivamente.

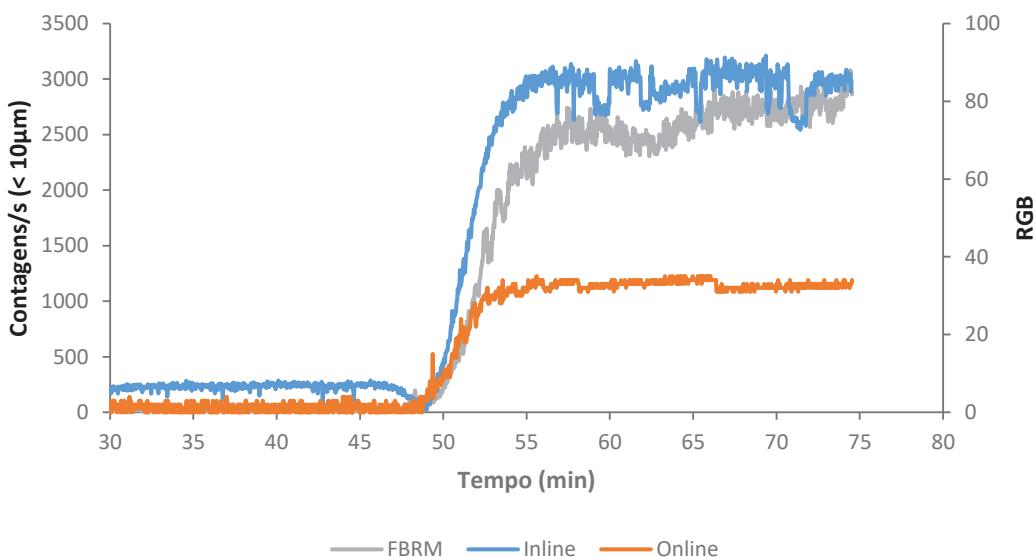


Figura 32 - Comportamento das curvas *RGB* das câmeras *inline* e *online* e do sinal *FBRM* no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa 0,4°C/min.

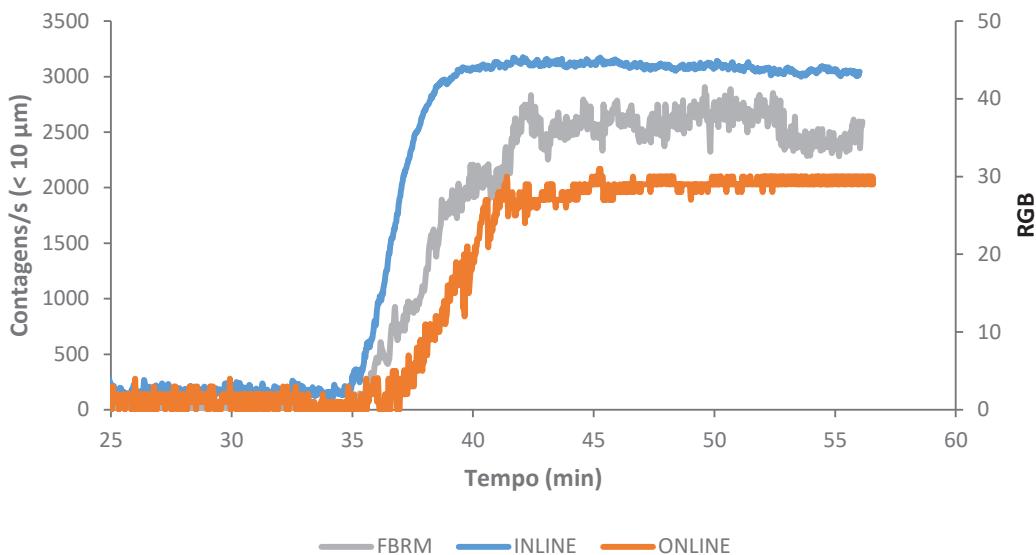


Figura 33 - Comportamento das curvas *RGB* das câmeras *inline* e *online* e do sinal *FBRM* no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Apesar de as câmeras coletarem informações do sistema ao mesmo tempo e com a mesma concentração de particulados, observou-se que a câmera *inline* apresentou maior sinal que a câmera *online* nas três taxas analisadas. O sinal obtido pela câmera *inline* pode ser mais alto devido ao contato direto com a luz espalhada, já que a câmera externa tinha um caminho óptico obstruído pela presença do vidro do reator e do vidro da janela de visualização do sistema Optimax, onde estava fixada.

As medidas *RGB* e *RBI* se assemelham em relação à capacidade de detectar alterações no sistema particulado, como aumento no número de partículas ou o crescimento de cristais. No entanto, elas se baseiam em medidas físicas distintas das imagens analisadas: enquanto o *RGB* está associado às mudanças nas componentes vermelho, verde e azul, o *RBI* está relacionado às mudanças na refletividade.

Portanto, há similaridade do comportamento desses dois sinais para a cristalização do metronidazol. Para efeitos de ilustração, a Figura 34 e a Figura 35 fazem um comparativo entre o sinal de contagens/s de partículas menores que  $10\text{ }\mu\text{m}$  fornecido pela sonda *FBRM* e o sinal *RBI* fornecido pelo vídeo-microscópio *PVM*.

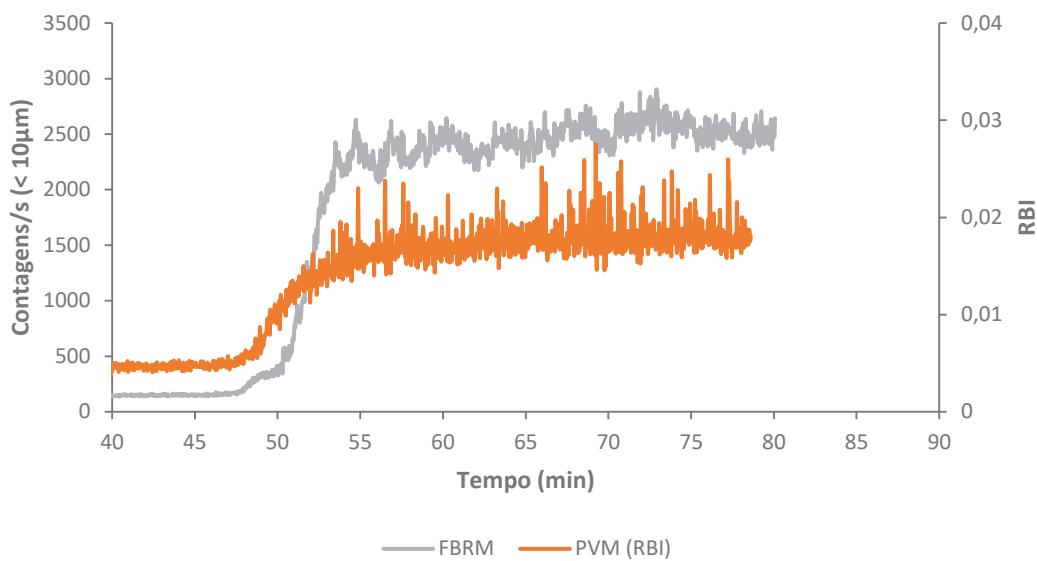


Figura 34 - Comportamento da curvas *RBI* e do sinal *FBRM* no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa  $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

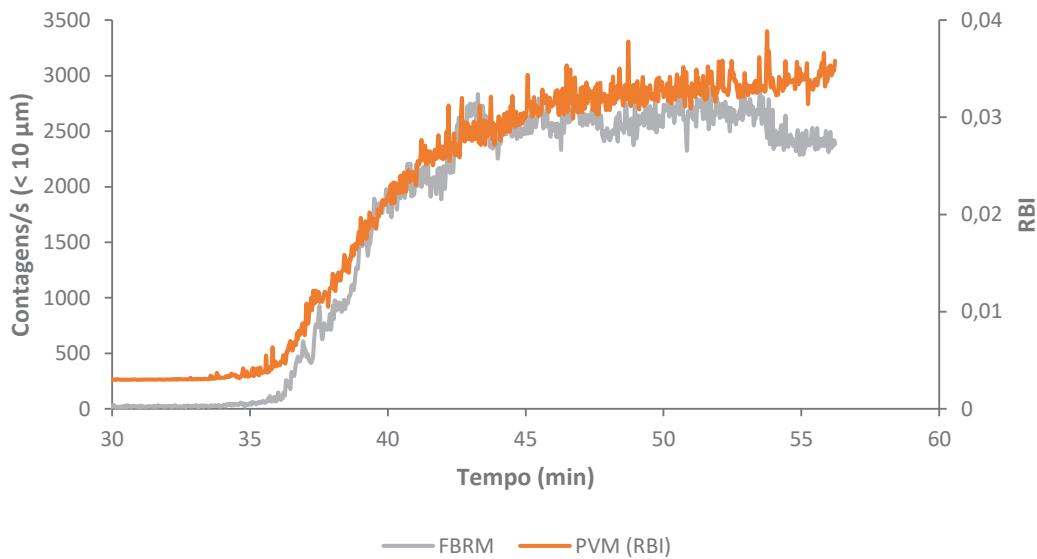


Figura 35 - Comportamento da curvas *RBI* e do sinal *FBRM* no processo de cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

### 5.2.7 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS

Quando se comparam os valores de  $T_{onset}$  para as diferentes técnicas (Tabela 4 e Figura 36) nota-se que as técnicas apresentam o mesmo tempo de resposta para caracterizar o início da cristalização em cada taxa aplicada. Isto é, dada uma taxa de resfriamento, embora haja aparente diferença entre as temperaturas de início de cristalização observadas por cada equipamento, estatisticamente elas são iguais entre si.

Tabela 4 - Comparação dos valores de  $T_{onset}$  calculados em função da taxa de resfriamento e das técnicas de medida usadas. Intervalos com 95% de confiança e  $T_{onset}$  calculado como sendo a média de 3 replicatas.

Técnica	$T_{onset}$		
	0,2°C/min	0,4°C/min	0,6°C/min
<b>Câmera online</b>	19,2°C ± 0,5°C	15,5°C ± 1,5	13,9°C ± 0,7°C
<b>Câmera inline</b>	19,6°C ± 1,9°C	15,3°C ± 1,1°C	13,8°C ± 0,7°C
<b>Sonda PVM</b>	20,8°C ± 5,5°C	17,3°C ± 1,9°C	14,4°C ± 2,9°C
<b>Sonda FBRM</b>	19,5°C ± 3,1°C	16,1°C ± 1,8°C	14,1°C ± 0,6°C

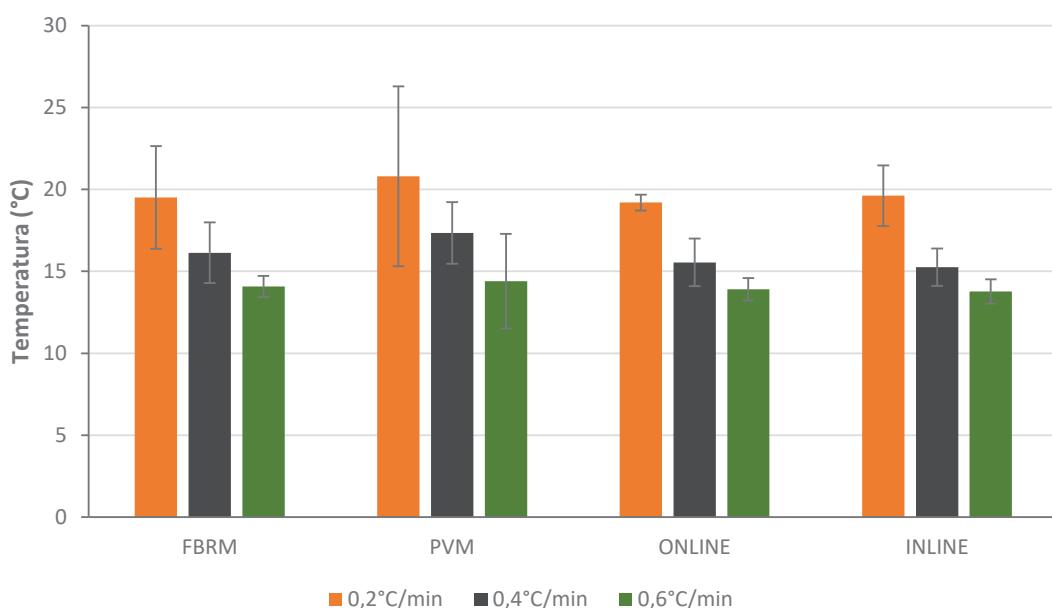


Figura 36 - Comparativo das temperaturas de cristalização nas diferentes taxas e técnicas.

É importante frisar que as câmeras *online* e *inline* foram as únicas técnicas que conseguiram diferenciar a  $T_{onset}$  em função da taxa de resfriamento. Os valores de  $T_{onset}$  obtidos por *FBRM*, nas três taxas de resfriamento empregadas, são estatisticamente iguais. O mesmo ocorre para os valores obtidos por *PVM*. No entanto, o valor de  $T_{onset}$  obtido pelas câmeras *online* e *inline* na taxa 0,2°C/min é maior que os valores obtidos nas taxas 0,4°C/min e 0,6°C/min.

Provavelmente, a grande variabilidade experimental nas medidas de contagens/s e de *RBI* limitou a sensibilidade dessas técnicas para captar essa diferença nos valores de  $T_{onset}$  em função da taxa de resfriamento. Inclusive, o vídeo-microscópio *PVM* foi o equipamento que apresentou os maiores desvios nos dados de temperatura, como mostra a Figura 36.

Esperava-se que o sistema da câmera *inline*, por estar em contato direto com a solução, apresentasse maior sensibilidade e conseguisse captar o valor de  $T_{onset}$  antes da câmera *online*, o que não ocorreu. As câmeras reproduziram os mesmos resultados. Comparando as quatro técnicas empregadas, a câmera *online* foi a que apresentou maiores vantagens pela simplicidade, por não ser uma técnica invasiva (não há contato com a solução) e por ter sido capaz de diferenciar a temperatura de cristalização em função da taxa de resfriamento empregada.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO HÁBITO CRISTALINO

Na Figura 37 a seguir observa-se uma foto do solvente sob agitação e aquecimento retirada pela câmera *online*, no momento inicial dos testes. Nesta imagem é possível observar as bolhas formadas pela agitação, como ressaltado na figura por setas vermelhas. Porém, no início da cristalização (Figura 38) nota-se que há elementos com formatos diferentes da imagem anterior e que se assemelham com o hábito cristalino acicular/ agulhado (setas amarelas).

Pela experiência adquirida com testes anteriores, e principalmente pelo uso do vídeo-microscópio e do microscópio eletrônico de varredura, foi possível comparar e entender que se tratavam de possíveis cristais. No entanto, na imagem também há elementos indistinguíveis, que estão indicados por setas azuis.

Nas Figura 37 e 38 é possível observar o reflexo da fonte luminosa, a ponta da sonda da câmera interna a esquerda, o eixo do agitador no centro e a sonda do vídeo-microscópio à direita. A sonda *FBRM* estava posicionada atrás da sonda do vídeo-microscópio, por isso não aparece nas imagens.

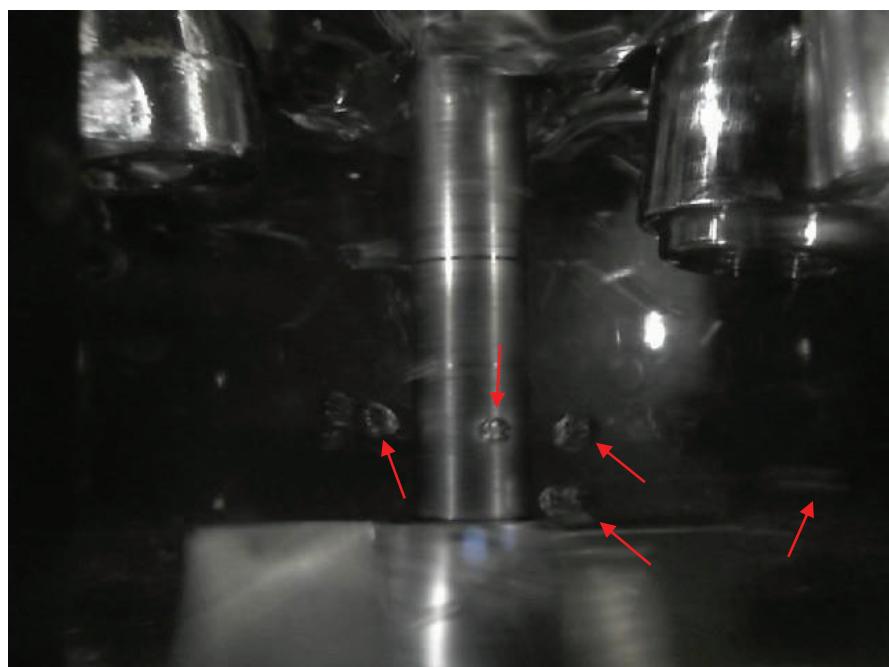


Figura 37 - Imagem capturada pela câmera *online* na etapa inicial do processo, sem adição de soluto, a 300 rpm e 42°C.

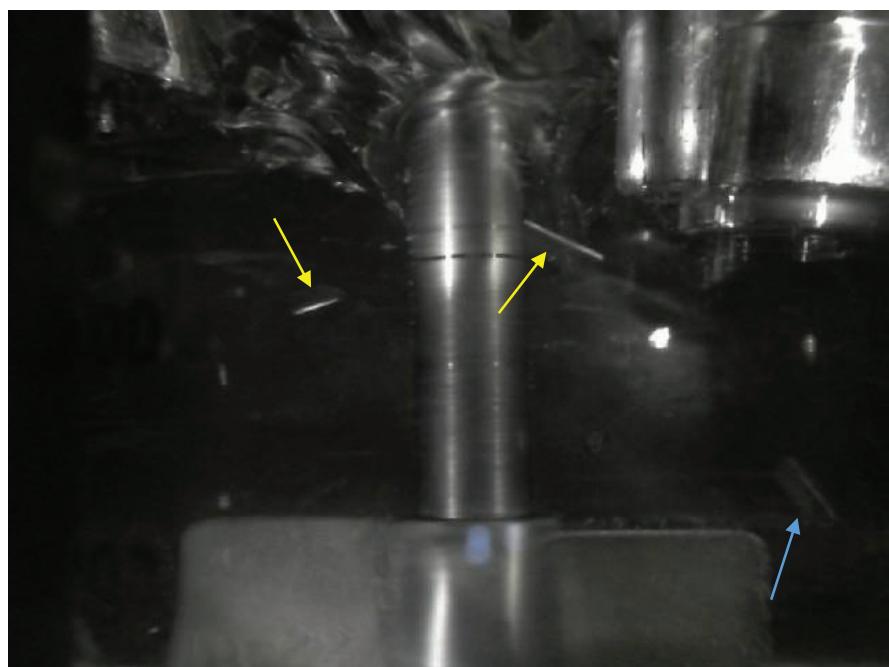


Figura 38 - Imagem capturada pela câmera *online* durante o processo de formação dos primeiros cristais em solução aquosa 0,06 mol/L, a 300 rpm e taxa de resfriamento de 0,4°C/mim.

A princípio, uma grande aplicação de *webcams* seria a observação do hábito cristalino ainda em solução. No entanto, apesar de as câmeras apresentarem boa resolução e sensores capazes de coletar o espalhamento da luz, elas não foram capazes de fornecer imagens com nitidez suficiente para que fosse possível avaliar o formato do hábito sem gerar dúvidas ao analista.

Como o processo de cristalização por resfriamento controlado exige que o sistema permaneça com temperatura homogênea, é necessário o emprego de um agitador mecânico ou magnético, que deixa o sistema em circulação constante. Assim, mesmo que imagens possam ser coletadas, torna-se difícil distinguir os elementos que ali estão com total nitidez, como bolhas e cristais.

Para ilustrar melhor essa dificuldade, a Figura 39 reúne quatro imagens coletadas no início da cristalização do metronidazol, empregando a câmera *online* fixada na janela de visualização do reator OptiMax 1001.

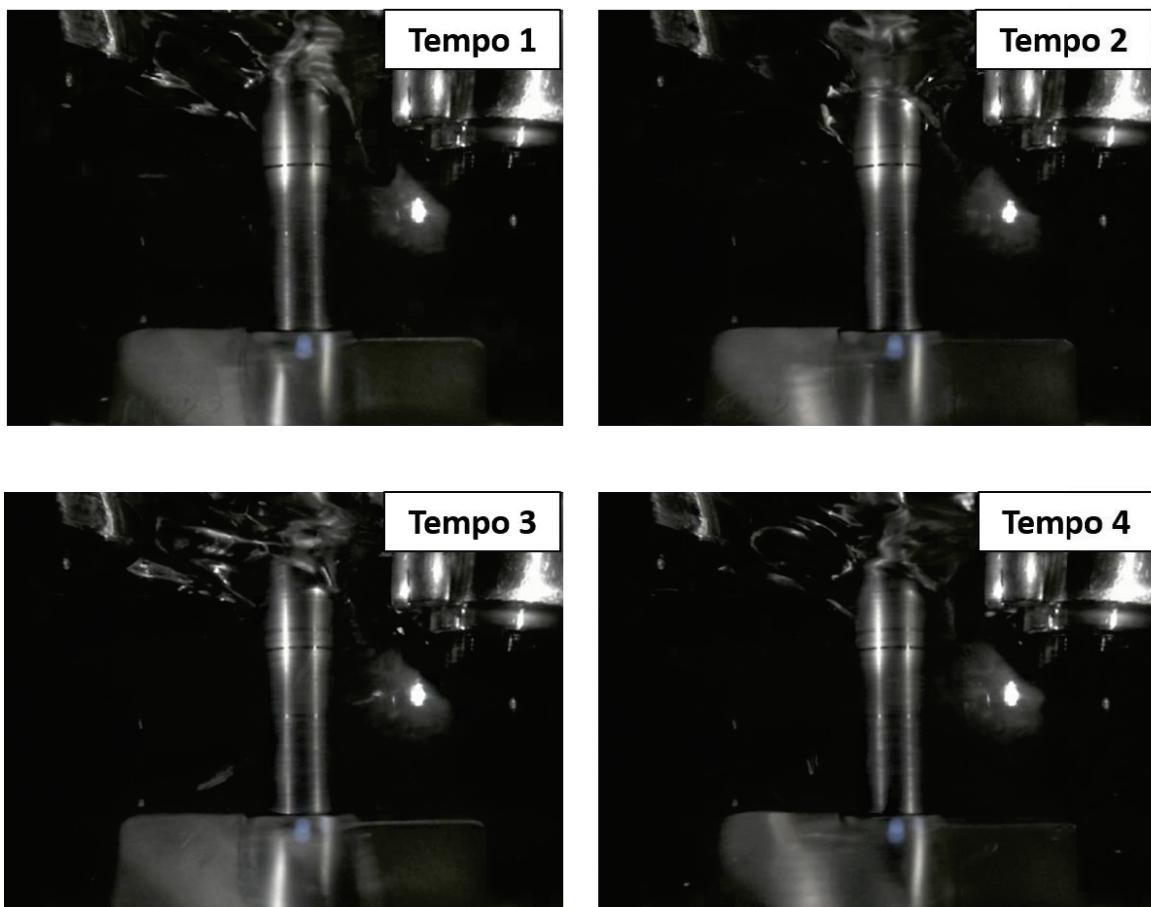


Figura 39 - Imagens obtidas no momento da cristalização do metronidazol em água como solvente na taxa de resfriamento de 0,4°C/mim, para diferentes momento, usando a câmera *online*.

A câmera *inline* conseguiu captar o início da cristalização, assim como a câmera *online*. No entanto, desde o início dos experimentos, ela perdeu a capacidade de gerar imagens com boa nitidez por estar inserida diretamente na solução através de uma sonda. Assim, apenas é possível avaliar momentos antes da cristalização e após, como sequenciado nas imagens da Figura 40, não sendo possível perceber a existência de bolhas ou realizar suposição do hábito para o sistema estudado.

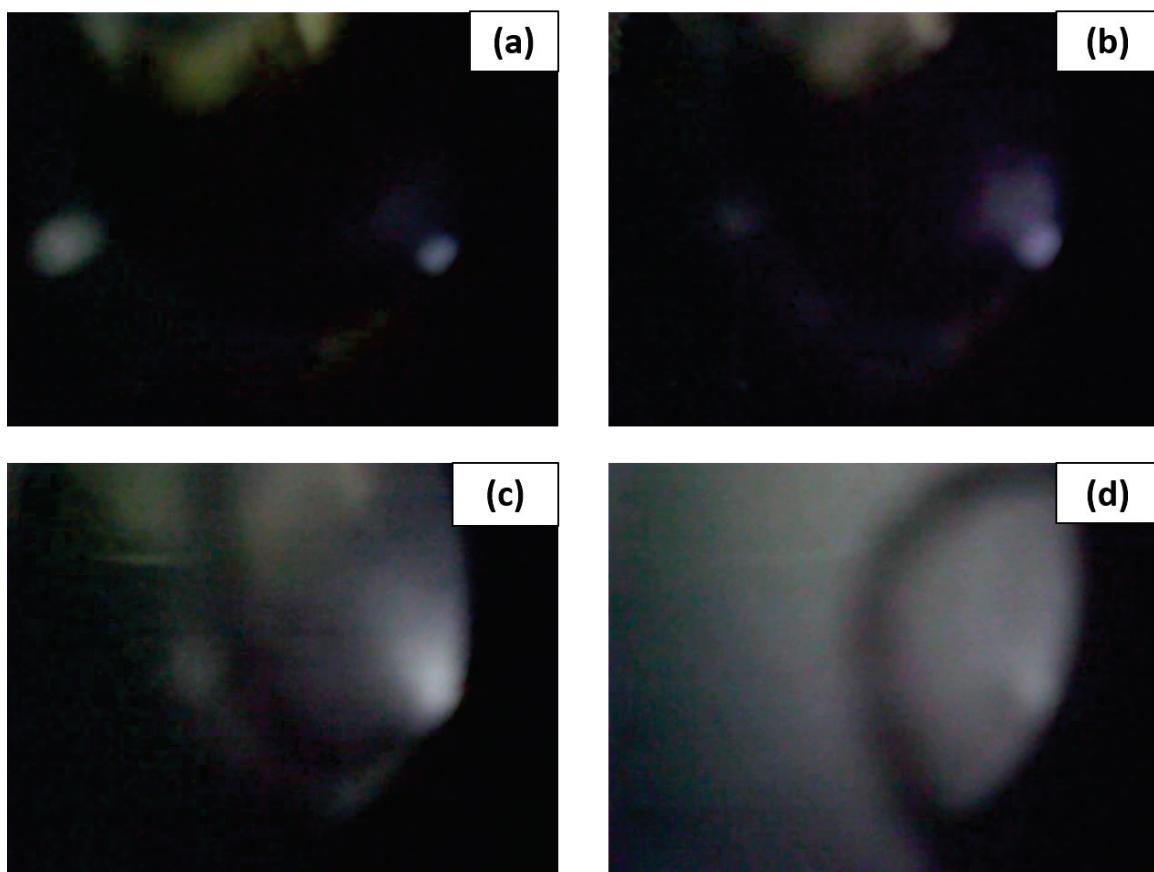


Figura 40 - Images capturadas pela câmera *inline*).a) Etapa inicial, sem adição de soluto, a 300 rpm e 42°C; (b) momentos antes do início da cristalização, (c) etapa de crescimento cristalino e formação de novos cristais, a um resfriamento de 0,2 °C/min, (d) cristalização concluída.

Considerando a necessidade de se avaliar o início da cristalização, as câmeras *inline* e *online* foram capazes de avaliar o início da cristalização em tempos similares aos obtidos pela sonda *FBRM* e pelo vídeo-microscópio *PVM*, cujos custos são elevados, exigem maior treinamento do operador e condições específicas de operação, como ar comprimido.

Porém, o uso da câmera *inline*, do vídeo-microscópio *PVM* e *FBRM* exigem o emprego de sonda, que se não for bem limpa pode introduzir impurezas no sistema e caso possua ranhuras pode gerar pontos de nucleação secundária. Além do mais, o uso de sondas apresenta limitações operacionais de temperatura, pressão e agitação.

A câmera externa, por sua vez, não oferece esses riscos, já que realiza uma análise não invasiva (aquisição *online* dos dados). Além de ter possibilitado obter os valores de  $T_{onset}$ , ela se mostrou capaz de captar alguma informação sobre os cristais formados no meio. Este já é um indicativo de que a técnica de análise por imagem pode revelar o hábito cristalino em tempo real. Equipamentos de imagem com altíssimas resoluções, como 4K e com sistemas *slow motion*, podem trazer novas perspectivas para a técnica e melhorar a qualidade dos dados obtidos.

### 5.3.1 ANÁLISE DO HÁBITO CRISTALINO *INLINE* E *OFF-LINE*

O vídeo-microscópio *PVM* pode gerar imagens do processo de cristalização com foco nos cristais. Assim, é possível avaliar o hábito cristalino em tempo real durante o processo de cristalização e, posteriormente, comparar os resultados com os obtidos por *MEV*. A primeira análise a ser feita é com relação ao hábito do metronidazol obtido a partir de soluções aquosas, como indicado na Figura 41, que compara as imagens dos cristais obtidas pelo vídeo-microscópio *PVM* e pelo *MEV*.

Na taxa 0,2°C/min houve a formação de cristais de hábito prismático, enquanto na taxa 0,4°C/min foram identificados cristais aciculares ou agulha, além de cristais prismáticos (alguns destacados em vermelho). Por fim, na taxa 0,6°C/min os cristais apresentaram, majoritariamente, formato acicular. A princípio, há uma relação de transição entre os hábitos conforme há o aumento da taxa de resfriamento empregada. Por limitações técnicas, taxas mais rápidas não puderam ser aplicadas para verificar se outros hábitos cristalinos poderiam se formar.

Desta forma, as imagens obtidas por vídeo-microscópio *PVM* fornecem informações similares às do *MEV*, independente da taxa de resfriamento empregada. Assim, com o intuito de se controlar o processo de cristalização, o emprego do vídeo-microscópio oferece vantagens por possibilitar uma análise em tempo real do processo, além de possibilitar estimar o valor de  $T_{onset}$ .

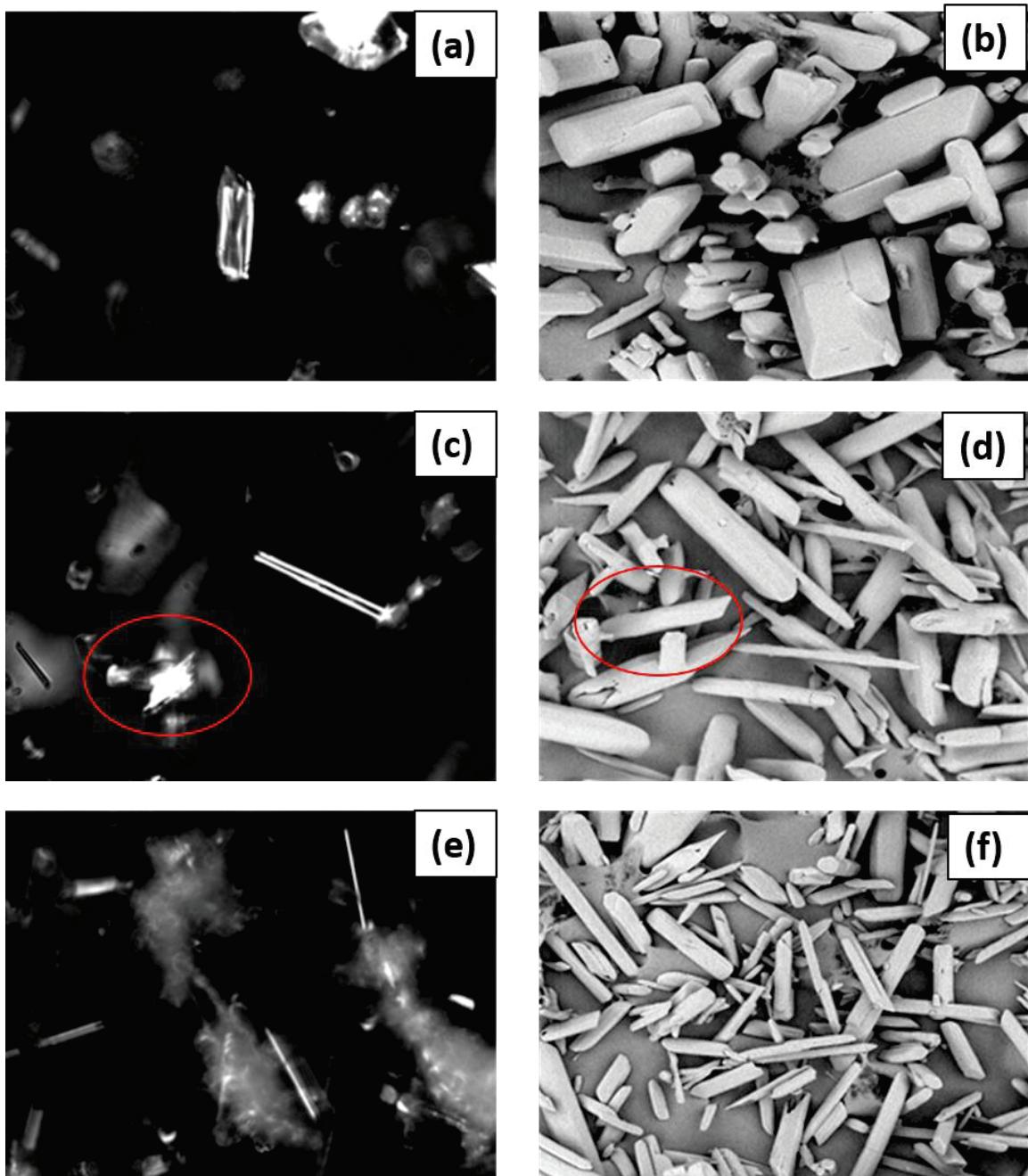


Figura 41 - Imagens dos cristais obtidos por vídeo-microscópio PVM e MEV (colunas da esquerda e direita, respectivamente)).a) e (b) - cristais com hábito prismático obtidos a  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).c) e (d) - cristais com hábito prismático e acicular obtidos a  $0,4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).e) e (f) - cristais com hábito acicular obtidos a  $0,6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Ampliações no MEV de 265 vezes.

A cristalização do metronidazol em etanol 95% como solvente também foi estudada. O objetivo era confrontar os dados obtidos com os do meio aquoso e verificar possíveis mudanças. A conclusão é que não houve mudança no hábito cristalino em função das taxas de resfriamento. O hábito permaneceu prismático, ao contrário do que foi observado com a água (Figura 42).

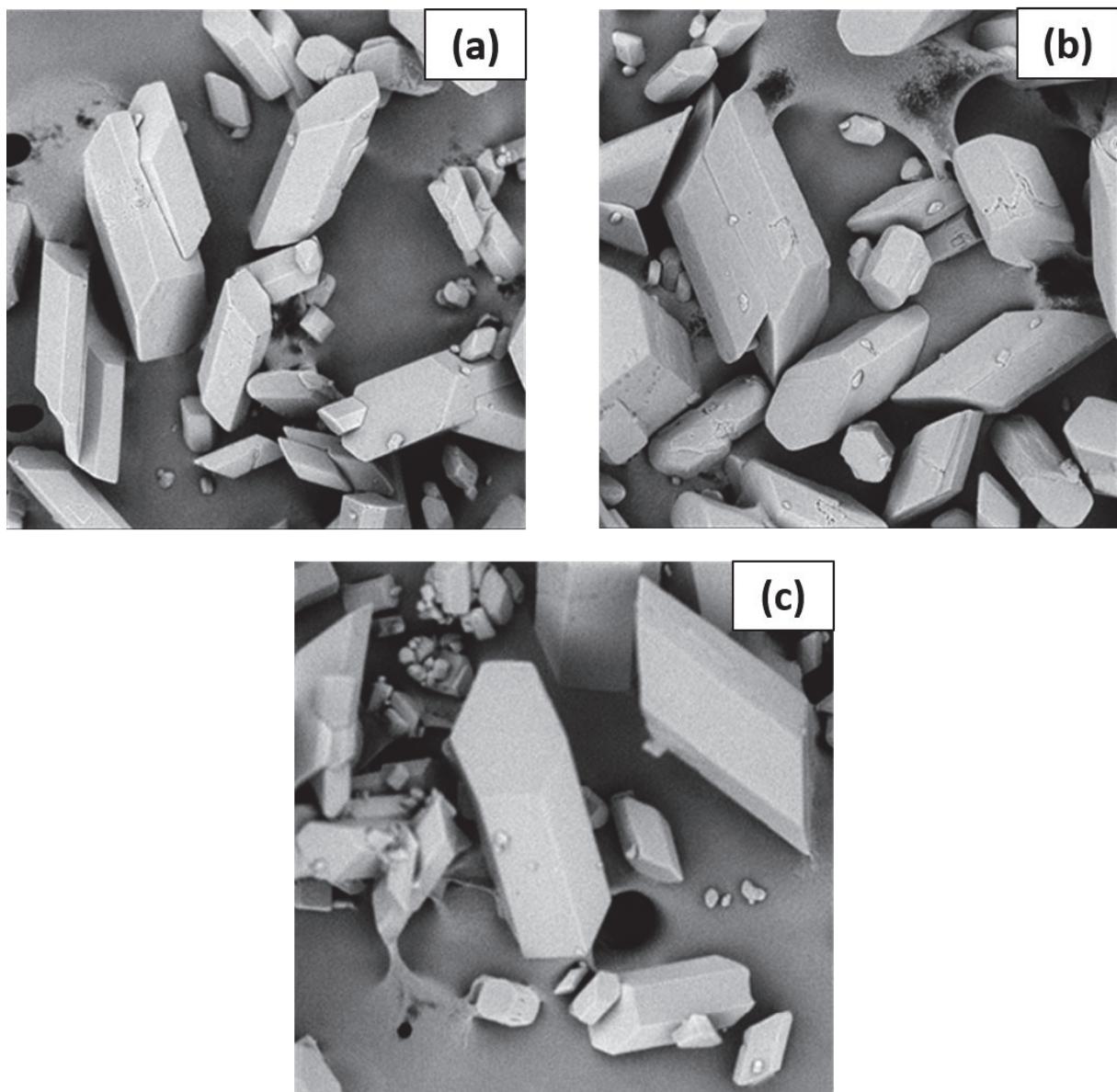


Figura 42 - Imagens dos cristais obtidos por MEV (ampliação de 440 vezes), em soluções etanólicas de metronidazol 0,06 mol/L.a), (b) e (c) - taxas de resfriamento de 0,2°C/min, 0,4°C/min e 0,6°C/min, respectivamente.

No estudo apresentado por DI MARTINO, P., CENSI, et al. (2007), os cristais de metronidazol obtidos em soluções aquosas foram aciculares/agulhados, enquanto em soluções etanólicas foram prismas (não há informação sobre a taxa de resfriamento e concentrações usadas). Segundo os autores, ao longo do eixo b (eixo y) os anéis de imidazol são coplanares em faces opostas, Figura 43, enquanto ao longo do eixo c é pode ocorrer a interação entre a hidroxila de uma molécula metronidazol e um anel imidazol de outra molécula.

Assim, quando o solvente é capaz de promover interações por ligação de hidrogênio, ele se associa a essas hidroxilas e limita a interação (OH  $\cdots$  imidazol), dificultando o crescimento ao longo deste eixo (eixo c). É o caso da água, que interage fortemente com as hidroxilas do metronidazol, favorecendo o crescimento ao longo dos demais eixos. Em meio menos polar, por sua vez, as interações entre o solvente e a hidroxila do metronidazol são menos intensas. Com isso, o crescimento ao longo do eixo b também é favorecido.

Em resumo, fortes interações com o solvente hidrofílico impedem um sentido de crescimento das faces e quanto menor a polaridade mais se favorece o crescimento igualitário das faces. Num extremo, solventes apolares levam a formação de hábito isodimensional (DI MARTINO, P., CENSI, et al., 2007).

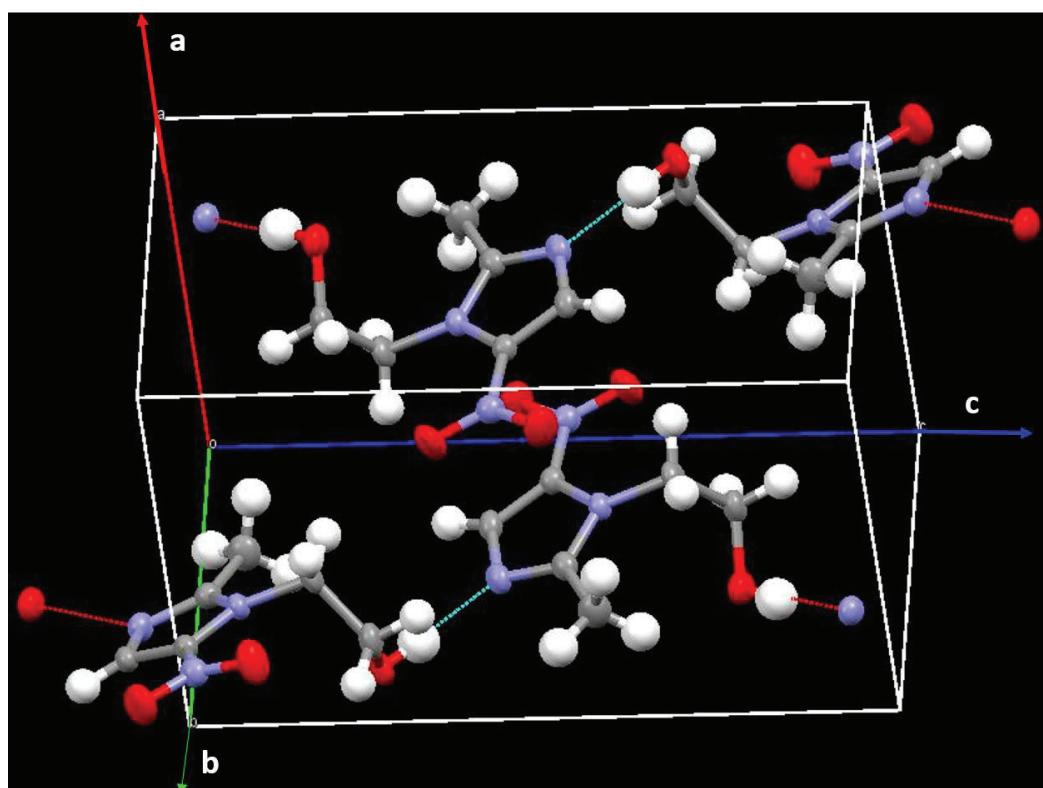


Figura 43 - Representação em 3D da célula unitária do metronidazol.

Como a água é mais polar que o etanol, ela limita mais intensamente o crescimento em uma das faces (ao longo do eixo b), levando a um hábito agulhado. Ao contrário, o etanol limita menos o crescimento ao longo deste eixo, o que possibilita a obtenção de hábito prismático, onde a face associada ao eixo b cresce mais que nos cristais obtidos em água.

Diante do exposto e por análise da Figura 42, se a redução da polaridade desfavorece o crescimento da face no eixo b, a redução da taxa de resfriamento também. O maior tempo para formação dos primeiros núcleos e para o crescimento cristalino, em decorrência das menores taxas de resfriamento, influenciam no crescimento das faces e os resultados encontrados no presente trabalho indicam que é possível obter cristais com hábito prismático tanto por mudança da polaridade do solvente como por resfriamento lento e controlado.

A Figura 44 compara o hábito encontrado em água e em etanol para a mesma taxa, embora sejam prismas com 6 faces, há uma diferença nas extremidades dos cristais.

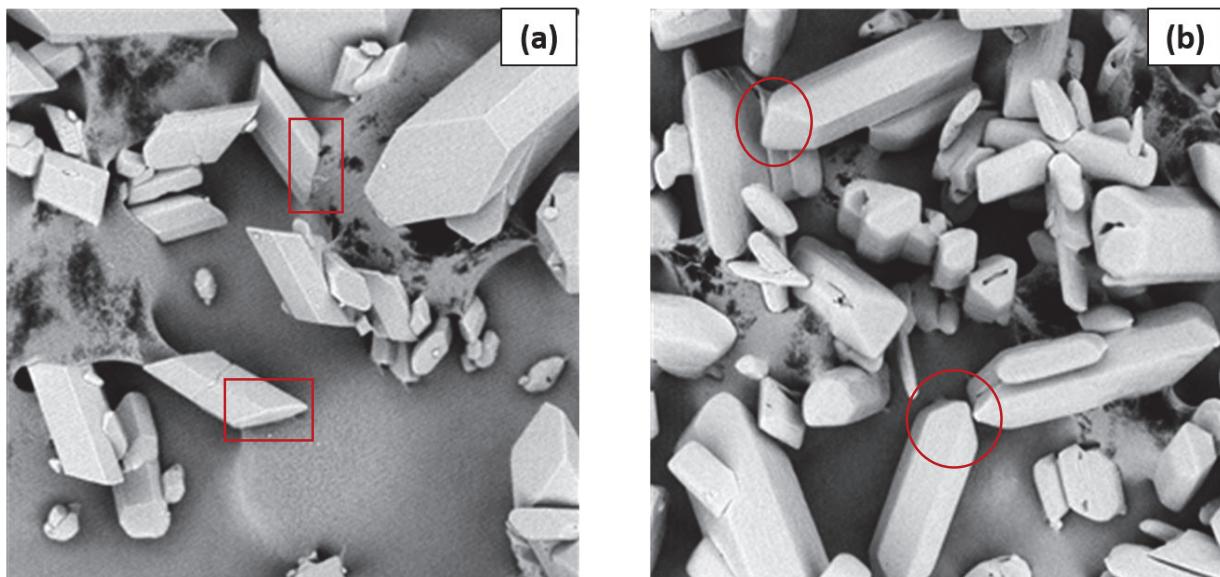


Figura 44 - Imagens dos cristais de metronidazol obtidos a 0,2°C/min para os solventes (a) etanol e (b) água.

O prisma encontrado na solução etanólica possuía as faces terminais de seu comprimento em plano inclinado, como pode ser visto em vermelho na Figura 44 (a). No cristal formado em meio aquoso, sua extremidade já tendia para um formato triangular, onde no vértice de encontro das faces há um ângulo menor que 90°, vide Figura 44 (b).

Não foi encontrado na literatura nomes específicos para hábitos em bastão com diferenças nas extremidades das faces, por isso, mesmo que haja leve diferença, como pode ser visto pelas imagens acima, foi considerado que o mesmo hábito era encontrado nas duas soluções.

Ainda numa investigação sobre as possíveis mudanças no hábito causadas pela taxa de resfriamento, fez-se uma extrapolação para resfriamentos ultralentos, sendo soluções nas mesmas concentrações resfriadas em taxas de  $0,01^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . A Figura 45 traz as imagens em MEV para comparação.

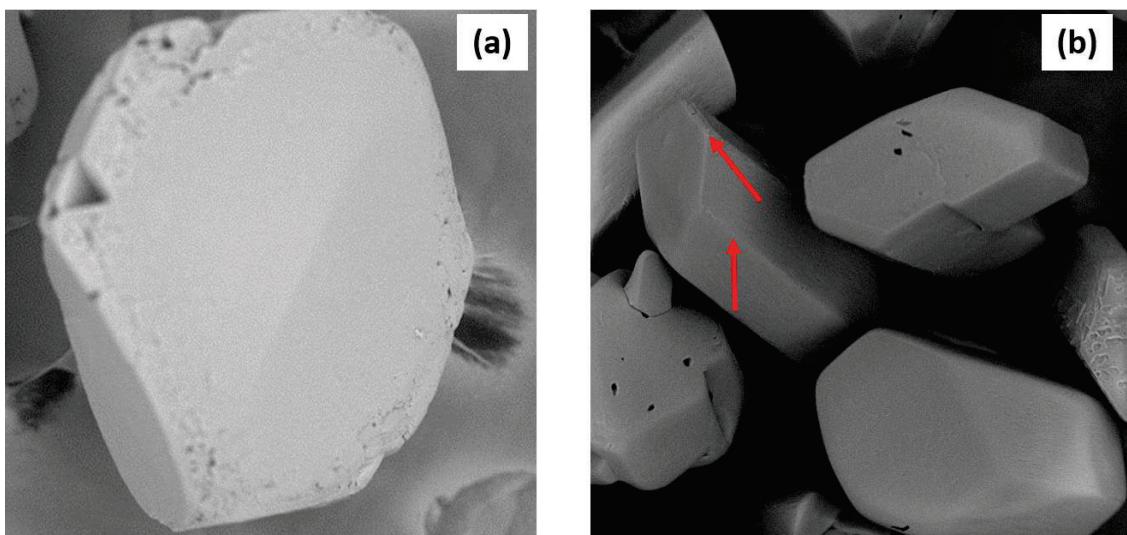


Figura 45 - Imagens dos cristais obtidos por MEV (ampliação de 380 vezes), em soluções aquosas de metronidazol 0,06 mol/L.a) e (b) - taxas de resfriamento de  $0,01^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , respectivamente.

Pela Figura 45 (a), vê-se que o longo tempo dado para o crescimento cristalino não favoreceu um eixo específico - a, b ou c -, com isso, o hábito isodimensional também foi encontrado numa solução altamente polar, o que confronta o estudo apresentado por DI MARTINO, P., CENSI, *et al.* (2007). Na Figura 45 (b), os cristais foram produzidos numa condição de taxa de resfriamento 5 vezes maior que a anterior e já apresentam definição de face com a presença de vértices e arestas, destacadas em vermelho.

A análise em tempo real por imagem e do *FBRM* foi prejudicada pelo longo tempo dos experimentos, entre 40 e 60 h, decorrentes das taxas aplicadas  $0,01$  e  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Os computadores ficaram sobrecarregados com os dados e como desligaram de forma aleatória, não foi possível um cruzamento das informações sobre  $T_{\text{onset}}$ ,  $RGB$ , contagens/s e  $RBI$ .

Segundo QIU, CHEN, *et al.* (2017), hábitos aciculares dificultam o processamento e compactação para formação de comprimidos, o que pode ser contornado pela redução do tamanho

de partículas. No entanto, isso impacta no controle do peso médio dos comprimidos e pode causar a obstrução dos equipamentos. Dessa forma, para a questão da compactação, os processos reproduzidos neste estudo que permitiram a obtenção de hábito em formato de bastão são mais adequados.

Sob o ponto de vista do solvente, o uso de água pode trazer vantagens pela disponibilidade, custo reduzido e menor grau de risco, já que não é inflamável. Desta forma, dentre as condições analisadas no presente trabalho, a condição ótima para reduzir problemas na formação de comprimidos seria a cristalização de metronidazol em água como solvente, numa taxa de resfriamento de 0,2°C/min.

No entanto, é importante avaliar que as diferenças entre os cristais prismáticos obtidos em água e etanol podem influenciar a compactação. Desta forma, essa é uma possibilidade de estudo futuro: realizar testes de compactação para verificar se essas pequenas diferenças são capazes de influenciar nas características mecânicas dos comprimidos de metronidazol.

Por fim, o Apêndice B traz uma coletânea de imagens obtidas pelo vídeo microscópio *PVM* durante o processo de cristalização do metronidazol e imagens de MEV dos cristais formados ao final do processo, para enriquecer a parte textual deste trabalho.

## 6 CONCLUSÃO

Os equipamentos apresentaram o mesmo tempo de resposta ao observar o início da cristalização, quando comparados a uma significância de 5%. Assim, a análise de imagem pode ser indicada como substituinte das demais técnicas, devido ao menor custo e facilidade de operação.

Dentre as câmeras usadas, a *online* apresenta maiores vantagens para determinar a temperatura do início de cristalização, pela simplicidade, por não ser uma técnica invasiva (não há contato com a solução) e por ter sido capaz de diferenciar a temperatura de cristalização em função da taxa de resfriamento empregada.

Câmeras *online* possuem grande potencial de serem usadas na determinação, em tempo real, do hábito cristalino. No entanto, os resultados reproduzidos neste trabalho indicam que a capacidade da câmera deve ser melhorada. Equipamentos de imagem com altíssimas resoluções, como 4K e com sistemas *slow motion*, podem trazer novas perspectivas para a técnica e melhorar a qualidade dos dados obtidos.

As imagens do hábito cristalino fornecidas pelo vídeo-microscópio *PVM* foram corroboradas pelas imagens obtidas por *MEV*. Apesar das imagens do vídeo-microscópio possuírem menores detalhes, já que a análise ocorre em meio agitado, o equipamento possibilita a distinção de bolhas e cristais, além de possibilitar a inferência sobre o hábito em solução.

O hábito cristalino apresentou mudança entre as taxas, para soluções aquosas, mas não foi percebido o mesmo para as soluções etanólicas. A polaridade do solvente facilita ou retarda o crescimento de uma face em detrimento a outra. Conforme a taxa de resfriamento foi aumentando, o hábito cristalino encontrado passou de prisma para acicular.

Apesar da polaridade ser grande influenciadora do hábito, foi obtido hábito prismático/bastão para as soluções etanólicas em todas as taxas de resfriamento, enquanto para as soluções aquosas este hábito foi obtido apenas na taxa de resfriamento 0,2°C/min

O hábito cristalino acicular não é indicado para produção de comprimidos, pois dificulta o processamento e a compactação. Desta forma, das condições estudadas, a mais indicada para elaboração de comprimidos de metronidazol é a cristalização a partir de soluções aquosas a uma taxa de 0,2°C/min. O uso de álcool possibilita o emprego das demais taxas de resfriamento para a obtenção do mesmo tipo de hábito, mas este solvente apresenta maior custo e perigo (inflamabilidade).

## 7 REFERÊNCIAS

- ABU BAKAR, M. R., NAGY, Z. K., RIELLY, C. D. "Investigation of the Effect of Temperature Cycling on Surface Features of Sulfathiazole Crystals during Seeded Batch Cooling Crystallization", **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 9, p. 3892–3900, set. 2010. DOI: 10.1021/cg1002379. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cg1002379>.
- BARRETT, P., GLENNON, B. "Characterizing the Metastable Zone Width and Solubility Curve Using Lasentec *FBRM* and *PVM*", **Chemical Engineering Research and Design**, v. 80, n. 7, p. 799–805, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1205/026387602320776876>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876202722521>.
- BELATI, A., CAJAIBA, J. "Measurement of wax appearance temperature using *RGB* image analysis and *FBRM*", **Fuel**, v. 220, p. 264–269, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.01.110>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236118301212>.
- BERKOVITCH-YELLIN, Z. "Toward an ab initio derivation of crystal morphology", **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 26, p. 8239–8253, dez. 1985. DOI: 10.1021/ja00312a070. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00312a070>.
- BERNSTEIN, J. "Polymorphism in Molecular Crystals Joel Bernstein. Oxford University Press, New York, 2002. ISBN 0198506058.", v. 2, n. 6, p. 675–676, nov. 2002. .
- BLATON, N. M., PEETERS, O. M., DE RANTER, C. J. "2-(2-Methyl-5-nitro-1-imidazolyl)ethanol (metronidazole)", **Acta Crystallographica Section B**, v. 35, n. 10, p. 2465–2467, 15 out. 1979. DOI: 10.1107/S0567740879009663. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S0567740879009663>.
- BOWLER, A. L., BAKALIS, S., WATSON, N. J. "A review of *inline* and *online* measurement techniques to monitor industrial mixing processes", **Chemical Engineering Research and Design**, v. 153, p. 463–495, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.10.045>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876219305155>.
- CACIANO DE SENA, R., SOARES, M., PEREIRA, M. L. O., et al. "A Simple Method Based on the Application of a CCD Camera as a Sensor to Detect Low Concentrations of Barium Sulfate in Suspension", **Sensors**, v. 11, n. 1, p. 864–875, 13 jan. 2011. DOI: 10.3390/s110100864. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8220/11/1/864>.
- CESUR, S., GOKBEL, S. "Crystallization of mefenamic acid and polymorphs", **Crystal Research and Technology**, v. 43, n. 7, p. 720–728, jul. 2008. DOI: 10.1002/crat.200711119. Disponível em:

<http://doi.wiley.com/10.1002/crat.200711119>.

CRESSER, M. S. "Sensor Systems for Environmental Monitoring. Volume One: Sensor Technologies" and "Volume Two Environmental Monitoring." (Ed. M. Campbell) 309 Pages and 359 Pages, Published By Blackie Academic and Professional, 1997, ISBN 0-7514-0267-2 (Two Volume Set);", **Chemistry and Ecology**, v. 16, n. 4, p. 255–256, 1 set. 1999. DOI: 10.1080/02757549908037650. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02757549908037650>.

CSAKURDA-HARMATHY, Z., THEGE, I. K. "Transformation of chloramphenicol palmitate from therapeutically inactive polymorph A to active polymorph B", **Journal of thermal analysis**, v. 50, n. 5–6, p. 867–871, 1997. DOI: 10.1007/bf01979216. .

DE OLIVEIRA, A. **SISTEMA DE GERAÇÃO DE NITROGÊNIO E CALOR IN-SITU, PARA APLICAÇÃO EM AMBIENTES SUBMARINOS: UM ESTUDO EM MEIO PRESSURIZADO COM GERAÇÃO DE CATALISADOR IN-SITU**. 2019. 146 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

DE SOUZA, N. A. B., DE SOUZA, F. S., BASÍLIO, I. D., *et al.* "Thermal stability of metronidazole drug and tablets", **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, n. 2, p. 535–538, 2003. DOI: 10.1023/A:1024569414701. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1024569414701>.

DE YOREO, J. J., GILBERT, P. U. P. A., SOMMERDIJK, N. A. J. M., *et al.* "Crystallization by particle attachment in synthetic, biogenic, and geologic environments", **Science**, v. 349, n. 6247, p. aaa6760–aaa6760, 31 jul. 2015. DOI: 10.1126/science.aaa6760. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaa6760>.

DHAND, A., SNYDMAN, D., "Mechanism of Resistance in Metronidazole". [S.l: s.n.], 2009. p. 223–227. DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2\_19.

DI MARTINO, P., CENSI, R., MALAJ, L., *et al.* "Influence of solvent and crystallization method on the crystal habit of metronidazole", **Crystal Research and Technology**, v. 42, n. 8, p. 800–806, 2007. DOI: 10.1002/crat.200710908. .

DI MARTINO, Piera, CENSI, R., MALAJ, L., *et al.* "Influence of Metronidazole Particle Properties on Granules Prepared in a High-Shear Mixer-Granulator", **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 2, p. 121–131, 1 jan. 2007. DOI: 10.1080/03639040601085417. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03639040601085417>.

DI MARTINO, Piera, JOIRIS, E., BERNERON, C., *et al.* "Compression behavior of orthorhombic

paracetamol", **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1122–1130, 1998. DOI: 10.1023/A:1011954800246. .

FITZGERALD, K. "Metronidazole", **Small Animal Toxicology, Third Edition**, p. 653–657, 1 nov. 2012. DOI: 10.1016/B978-1-4557-0717-1.00061-2. .

FREEMAN, C. D., KLUTMAN, N. E., LAMP, K. C. "Metronidazole. A therapeutic review and update", **Drugs**, v. 54, n. 5, p. 679–708, 1997. DOI: 10.2165/00003495-199754050-00003. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/9360057>.

GELADI, P., BENGTSSON, E., ESBENSEN, K., *et al.* "Image analysis in chemistry I. Properties of images, greylevel operations, the multivariate image", **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 41–53, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(92\)80118-P](https://doi.org/10.1016/0165-9936(92)80118-P). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016599369280118P>.

GREAVES, D., BOXALL, J., MULLIGAN, J., *et al.* "Measuring the particle size of a known distribution using the focused beam reflectance measurement technique", **Chemical Engineering Science**, v. 63, n. 22, p. 5410–5419, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.07.023>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000925090800393X>.

ITIOLA, O. A., PILPEL, N. "Tableting characteristics of metronidazole formulations", **International Journal of Pharmaceutics**, v. 31, n. 1–2, p. 99–105, 1986. DOI: 10.1016/0378-5173(86)90218-8. .

KHOSHKHOO, S., ANWAR, J. "Crystallization of polymorphs: the effect of solvent", **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 26, n. 8B, p. B90–B93, 1993. DOI: 10.1088/0022-3727/26/8b/013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1088/0022-3727/26/8B/013>.

KIM, S., LOTZ, B., LINDRUD, M., *et al.* "Control of the Particle Properties of a Drug Substance by Crystallization Engineering and the Effect on Drug Product Formulation", **Organic Process Research & Development**, v. 9, n. 6, p. 894–901, 2005. DOI: 10.1021/op050091q. .

KLANG, V., VALENTA, C., MATSKO, N. B. "Electron microscopy of pharmaceutical systems", **Micron**, v. 44, p. 45–74, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.07.008>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432812002156>.

LACHMAN, L. LIEBERMAN, H. KANIG, J. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Second ed. Rio de Janeiro, Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LAKATOS, B. G., SZILÁGYI, B. "Modeling Crystallization from Solution with Heat Effects", **Crystal Growth & Design**, v. 15, n. 12, p. 5726–5737, 2 dez. 2015. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b00863.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00863>.

LAPLANTE, P. A. **Real-time systems design and analysis - an engineer's handbook**. Pennsylvania, IEEE Press, 1992.

LEVY, G. "Comparison of dissolution and absorption rates of different commercial aspirin tablets", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 5, p. 388–392, 1961. DOI: 10.1002/jps.2600500503.

LIMA, M., FINELLI, F., DE OLIVEIRA, A., *et al.* "Continuous-flow synthesis of dimethyl fumarate: a powerful small molecule for the treatment of psoriasis and multiple sclerosis", **RSC Advances**, v. 10, p. 2490–2494, 14 jan. 2020. DOI: 10.1039/C9RA09119J. .

METTLER TOLEDO. **iC FBRM User's Guide**. . Columbia, [s.n.], 2007.

METTLER TOLEDO. **ParticleView v19 - Hardware Manual**. . Columbia, [s.n.], 2015.

MULLIN, J. . **Crystallization**. 4 th ed. [S.I.], Butterworth-Heinemann, 2001.

NAGY, Z. K., FEVOTTE, G., KRAMER, H., *et al.* "Recent advances in the monitoring, modelling and control of crystallization systems", **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 10, p. 1903–1922, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.07.018>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876213002955>.

NASSER, W., SALHI, F. "Kinetics determination of calcium carbonate precipitation behavior by inline techniques", **Powder Technology**, v. 270, p. 548–560, 31 jan. 2015. DOI: 10.1016/j.powtec.2014.05.025. .

NISHAD, P. M., MANICKA CHEZIAN, R. "Various Colour Spaces and Colour Space Conversion Algorithms", **Journal of Global Research in Computer Science**, v. 4, n. 1, p. 44–48, 2013. .

PAUFLER, P. "D. McKie and C. McKie. Essentials of Crystallography. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1992. 437 p., pbk. L 19.50. ISBN 0-632-01574-8.", **Crystal Research and Technology**, v. 28, n. 6, p. 812, 1 jan. 1993. DOI: 10.1002/crat.2170280607. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/crat.2170280607>.

QIU, Y., CHEN, Y., G. Z. ZHANG, G. ;, *et al.* **Developing Solid Oral Dosage Forms 2nd Edition**. Second ed. Lodon, Academic Press, 2017.

RAMUKUTTY, S., JEYASUDHA, R., RAMACHANDRAN, E. "Mechanical and thermal studies of metronidazole crystals", **Indian Journal of Physics**, v. 87, 1 out. 2013. DOI: 10.1007/s12648-013-

0337-x. .

RAMUKUTTY, S., RAMACHANDRAN, E. "Crystal growth by solvent evaporation and characterization of metronidazole", **Journal of Crystal Growth**, v. 351, p. 47–50, 2012. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2012.04.017. .

REDDY, M. M., NANCOLLAS, G. H. "The crystallization of calcium carbonate: IV. The effect of magnesium, strontium and sulfate ions", **Journal of Crystal Growth**, v. 35, n. 1, p. 33–38, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(76\)90240-2](https://doi.org/10.1016/0022-0248(76)90240-2). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022024876902402>.

ROHANI, S, HORNE, S., MURTHY, K. "Control of Product Quality in Batch Crystallization of Pharmaceuticals and Fine Chemicals. Part 1: Design of the Crystallization Process and the Effect of Solvent", **Organic Process Research & Development**, v. 9, n. 6, p. 858–872, 1 nov. 2005. DOI: 10.1021/op050049v. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/op050049v>.

ROHANI, Sohrab. "Applications of the crystallization process in the pharmaceutical industry", **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 4, n. 1, p. 2–9, 2010. DOI: 10.1007/s11705-009-0297-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11705-009-0297-z>.

SCHMAL, M. **Catálise Heterogênea**. Rio de Janeiro, Synergia, 2018. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=HVJTDwAAQBAJ>.

SILVA, A. de P. M. da, DE OLIVEIRA, P. B., BANDINI, T. B., et al. "Low-cost system based on image analysis to determine solubility curves", **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 1071–1074, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.097>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400512012932>.

SKOOG, D. A., CROUCH, S. R., HOLLER, F. J., et al. **Principios de análisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis**. [S.I.], Cengage Learning, 2008. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=7FOyZbb7q8UC>.

SRAVANI, B., RAJA, D., BHARATH, S., et al. "Studies on Vigna mungo mucilage as a pharmaceutical excipient", **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 118–125, 1 jan. 2011. .

TADAYYON, A., ROHANI, S. "Control of fines suspension density in the fines loop of a continuous KCl crystallizer using transmittance measurement an *FBRM®* probe", **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 78, p. 663–673, 1 ago. 2000. DOI: 10.1002/cjce.5450780408. .

TAWASHI, R. "Aspirin: Dissolution rates of two polymorphic forms", **Science**, v. 160, n. 3823, p. 76, 1968. DOI: 10.1126/science.160.3823.76. .

TECHTERMS. **Webcam**. 2019. Disponível em: <https://techterms.com/definition/webcam>. Acesso em: 3 mar. 2020.

TER HORST, J. H., SCHMIDT, C., ULRICH, J., "32 - Fundamentals of Industrial Crystallization". In: RUDOLPH, P. B. T.-H. OF C. G).SECOND E).Org.), **Handbook of Crystal Growth**, Boston, Elsevier, 2015. p. 1317–1349. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63303-3.00032-8>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444633033000328>.

TOPPR WEBSITE. **Space lattice or Crystal lattice and Unit Cell**. [S.d.]. Disponível em: <https://www.toppr.com/guides/chemistry/the-solid-state/space-lattice-or-crystal-lattice-and-unit-cell/>. Acesso em: 3 ago. 2020.

VENÂNCIO, F., DO ROSÁRIO, F. F., CAJAIBA, J. "A low-cost system based on image analysis for monitoring the crystal growth process", **Sensors (Switzerland)**, v. 17, n. 6, p. 1–6, 2017. DOI: 10.3390/s17061248. .

WERNER, P., MUENZBERG, M., HASS, R., *et al.* "Process analytical approaches for the coil-to-globule transition of poly(N-isopropylacrylamide) in a concentrated aqueous suspension", **ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 409, n. 3, p. 807–819, jan. 2017. DOI: 10.1007/s00216-016-0050-7. .

## APÊNDICE A

Tabela A1 - Temperaturas de início de cristalização do metronidazol em água como solvente, obtidas nas replicatas de cada taxa de resfriamento

Taxa (°C/min)	Replicata	Temperatura (°C)			
		Sonda <i>FBRM</i>	Sonda <i>PVM</i>	Câmera <i>online</i>	Câmera <i>inline</i>
0,2	1	18,1	18,3	19,4	18,9
	2	20,6	21,7	19,2	20,4
	3	19,8	22,4	19,0	19,6
0,4	1	15,9	16,9	15,4	15,2
	2	17,0	16,9	16,2	15,8
	3	15,5	18,2	15,1	14,9
0,6	1	13,9	13,8	13,7	13,4
	2	14,4	15,7	14,2	14,1
	3	14,0	13,6	13,8	13,9

## APÊNDICE B

- Dissolução e cristalização do metronidazol avaliadas pelo vídeo microscópio *PVM*

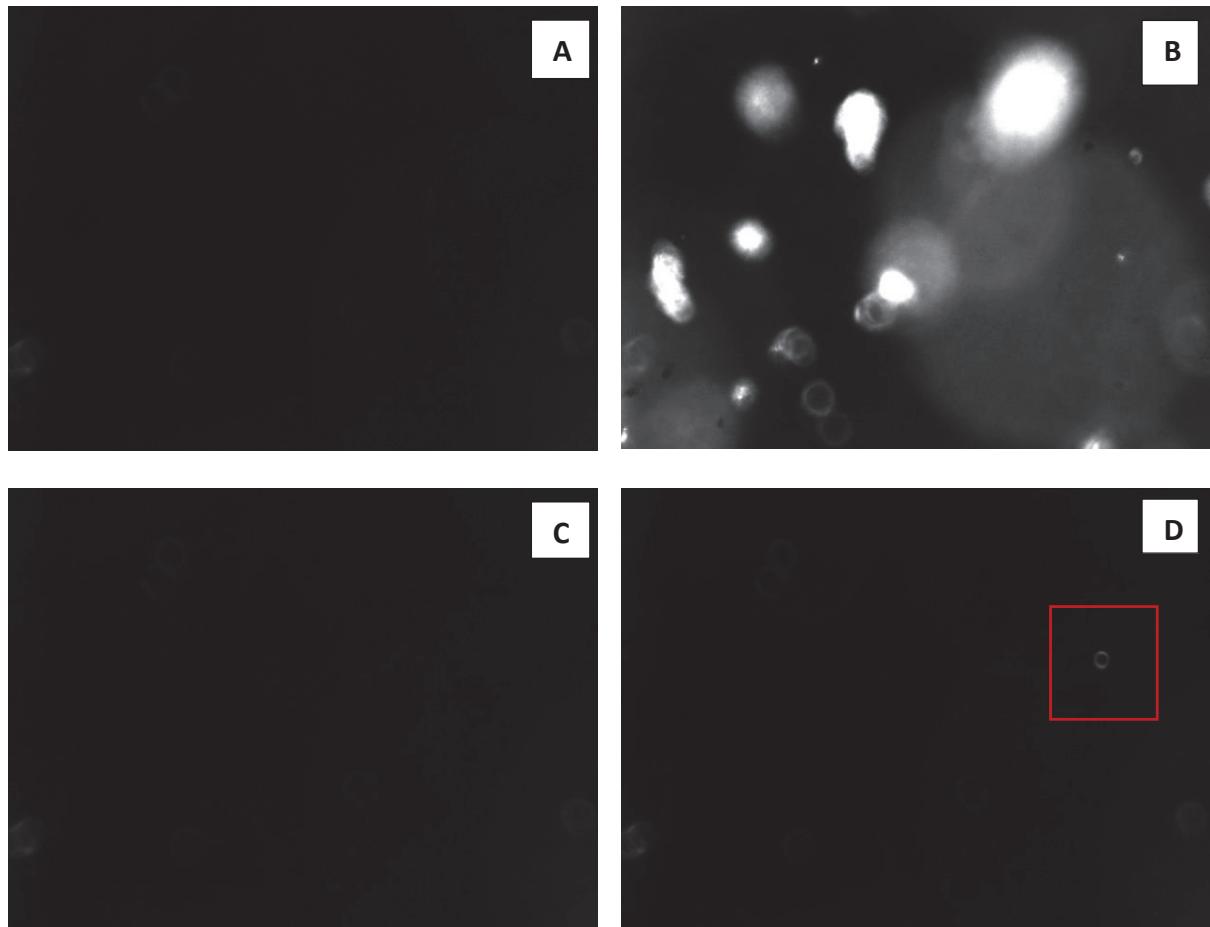


Figura B1 - Imagens do vídeo microscópio *PVM* no processo de solubilização do metronidazol em solução aquosa a 0,06 mol/L.

As imagens na Figura B1 foram obtidas através do vídeo microscópio *PVM* no processo de solubilização do metronidazol em solução aquosa 0,06 mol/L. A imagem A é uma fotografia do processo antes da adição de sólido; as manchas presentes são reflexo da luz de LED, sendo observadas em todas as imagens obtidas pelo equipamento. Na imagem B, os pontos brancos são os sólidos de metronidazol que foram introduzidos no reator. As imagens C e D mostram a ausência de particulados no meio, sendo confirmado pela redução do sinal de contagens/s do *FBRM* para partículas com tamanho de corda inferior a 10  $\mu\text{m}$ . Com isso, o sólido adicionado já se encontrava totalmente solubilizado no meio. Em particular, a imagem D mostra a presença de bolhas formadas pela agitação, em destaque no quadrado vermelho.

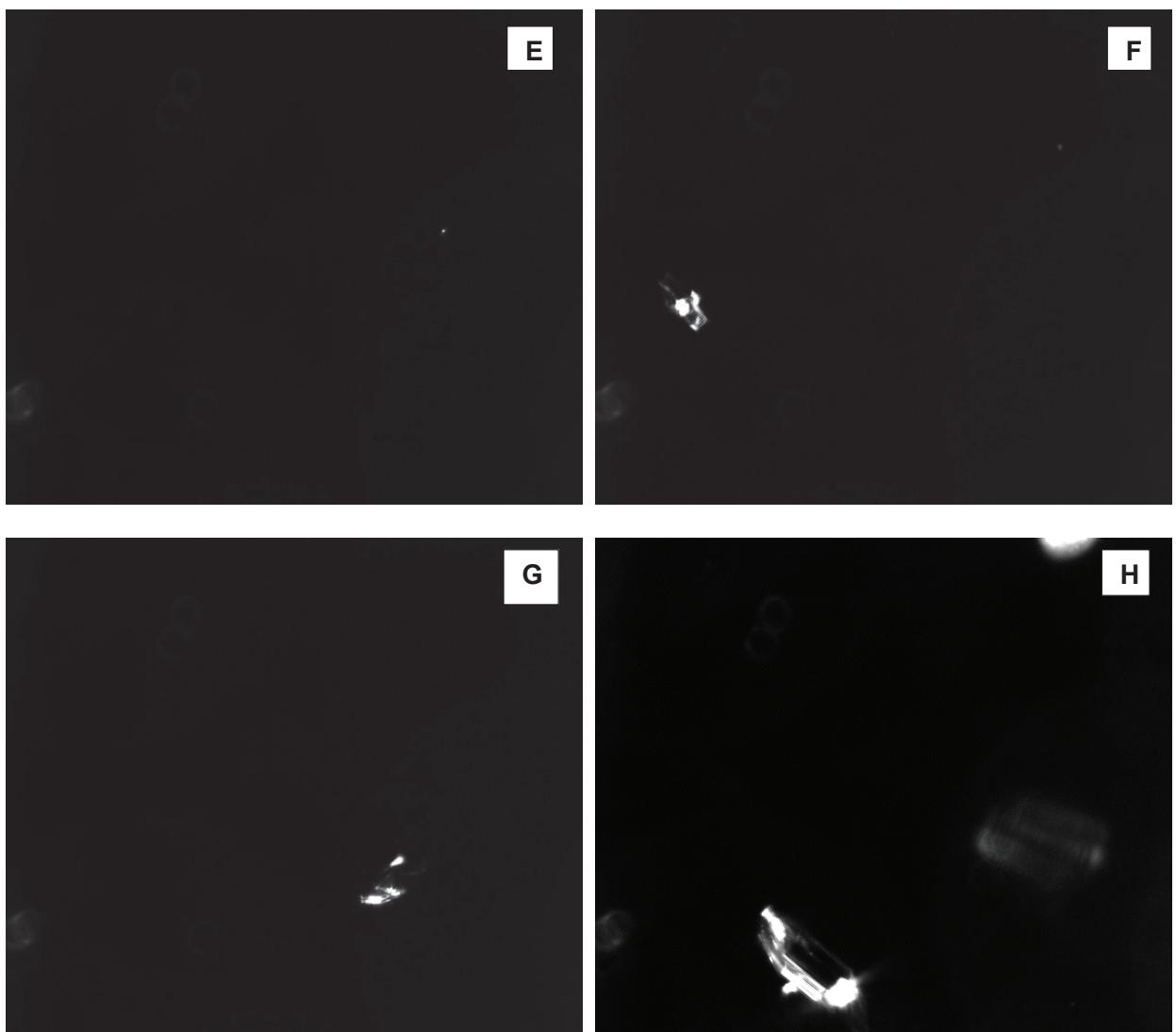


Figura B2 - Imagens do vídeo microscópio *PVM* no processo de cristalização do metronidazol a 0,2°C/min, em solução aquosa a 0,06 mol/L.

As imagens na Figura B2 mostram a mesma solução indicada na Figura B1, porém durante o processo de cristalização. A imagem E mostra um dos primeiros possíveis cristais formados na taxa de resfriamento de 0,2°C/min, mas ainda não é observável o hábito cristalino. Em sequência, as imagens F, G e H mostram o crescimento cristalino conforme a temperatura diminuída. Na Figura H, o hábito de prisma já começa a ser bem determinado ainda em solução, como pode ser melhor visto nas Figuras B3 e B4, representantes do final do processo de resfriamento.

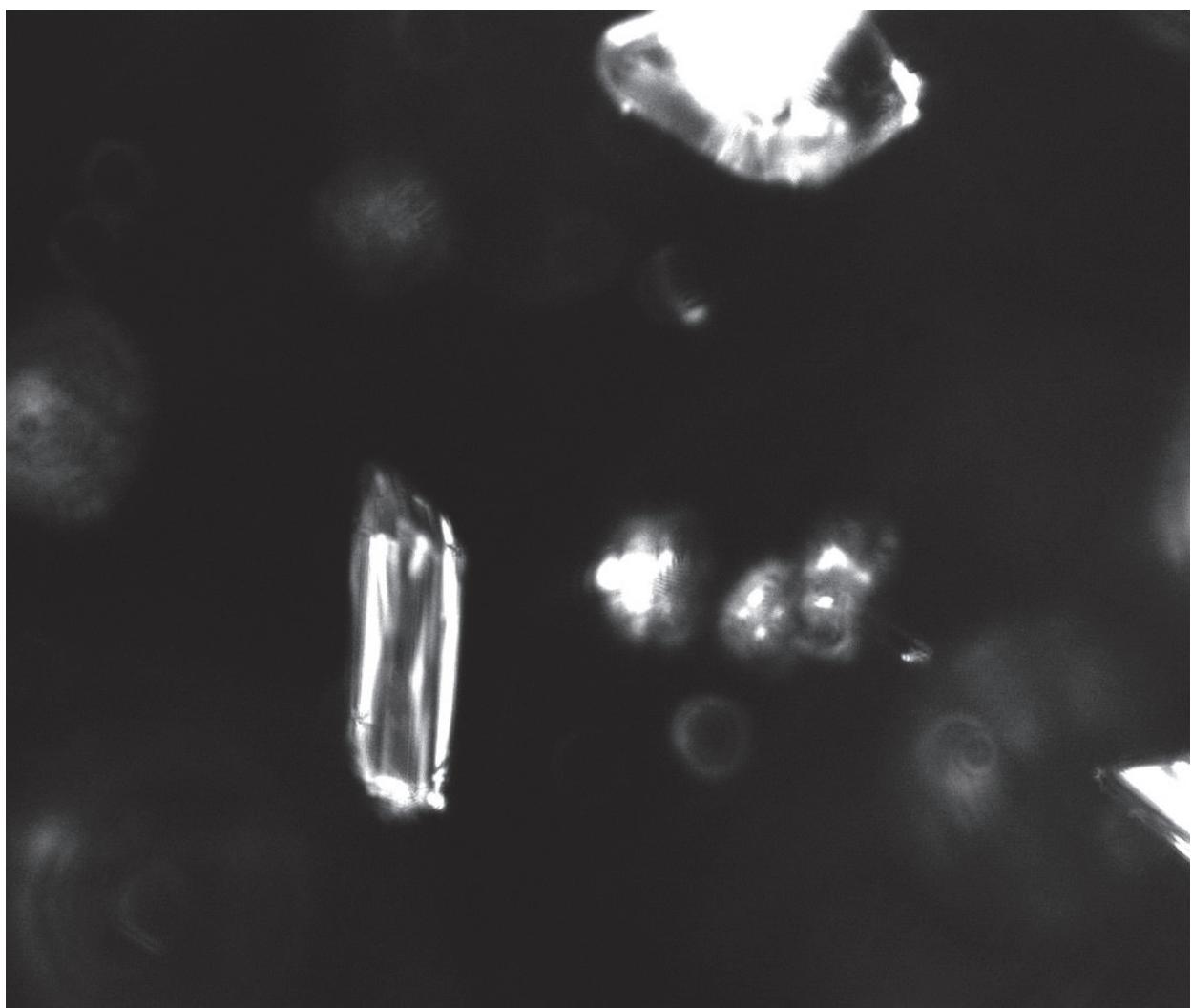


Figura B3 - Destaque do hábito cristalino do metronidazol obtido através do vídeo microscópio *PVM* ao final do processo de cristalização a  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , em solução aquosa a  $0,06\text{ mol/L}$ .

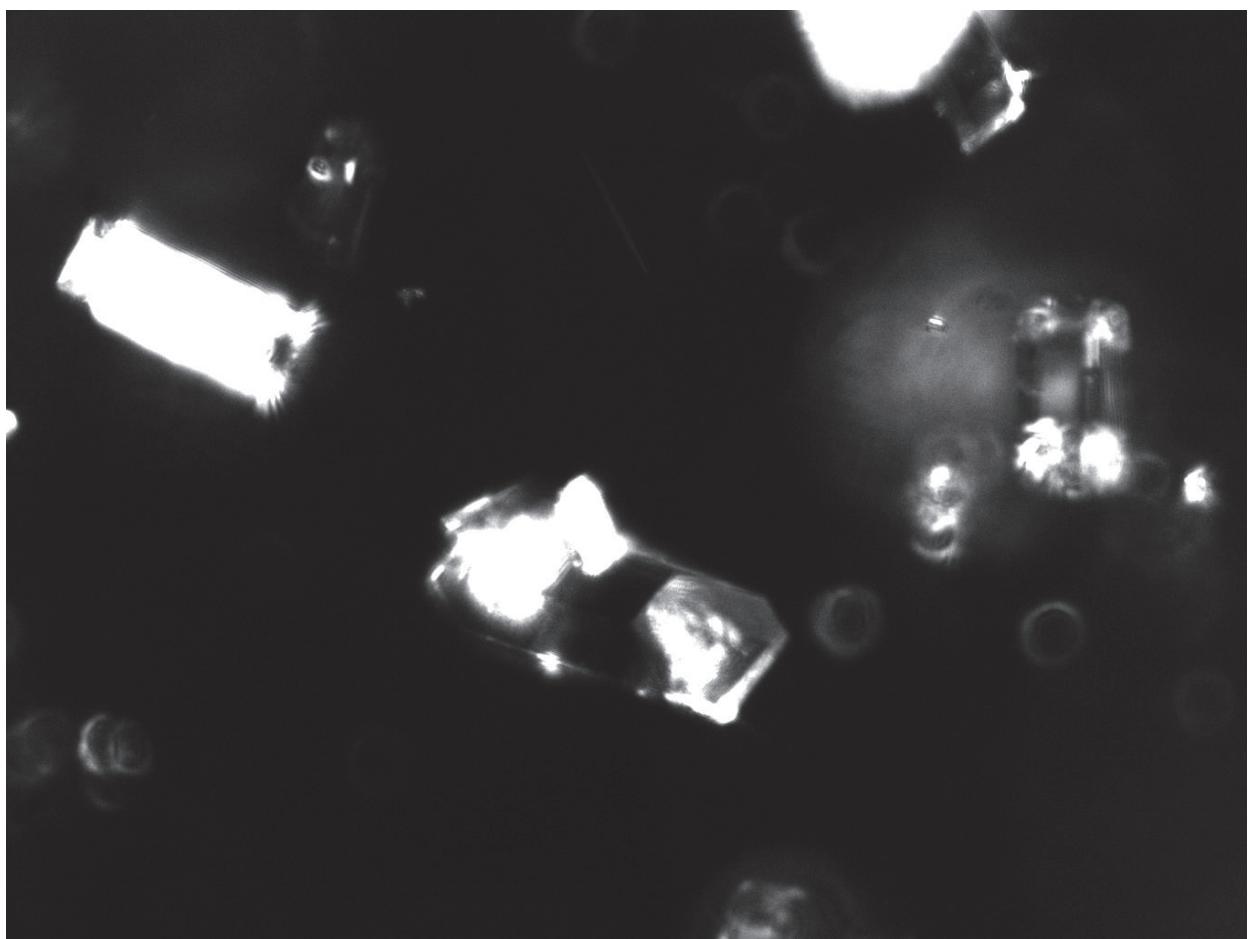


Figura B4- Destaque do hábito cristalino do metronidazol obtido através do vídeo microscópio *PVM* ao final do processo de cristalização a 0,2°C/min, em solução aquosa a 0,06 mol/L.

- Cristalização do metronidazol avaliado pelo vídeo microscópio *PVM* a 0,4°C/min, em solução aquosa a 0,06 mol/L

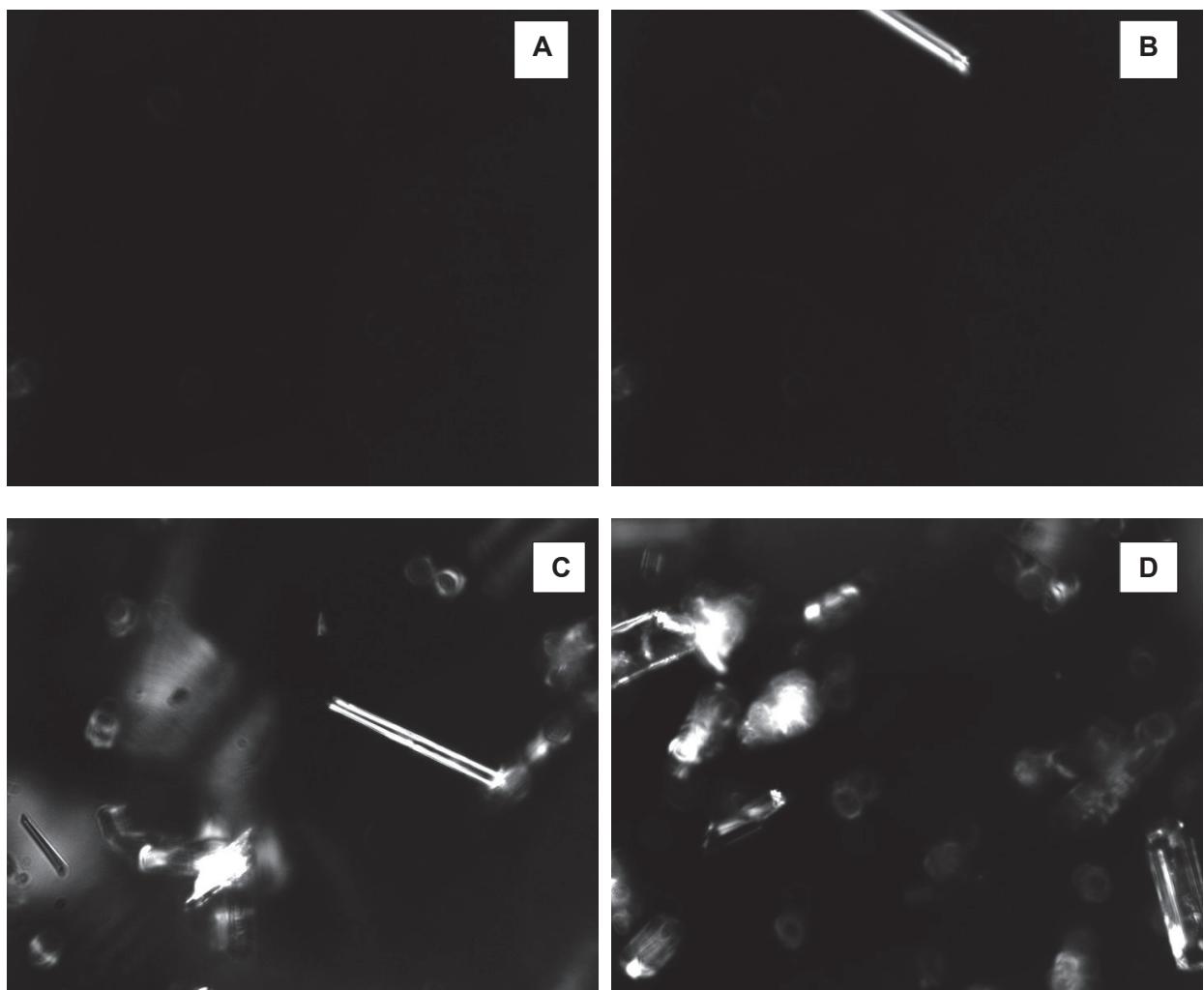


Figura B5 - Imagens do vídeo microscópio *PVM* no processo de cristalização do metronidazol a 0,4°C/min, em solução aquosa a 0,06 mol/L.

Na imagem A tem-se o início do experimento, antes da cristalização. Na imagem B já aparece o primeiro cristal, com hábito cristalino acicular ou forma de agulha, mais alongado. Nas imagens C e D aparecem dois hábitos misturados na solução, prismático e acicular.

- Cristalização do metronidazol avaliado pelo vídeo microscópio *PVM* a 0,6°C/min, em solução aquosa a 0,06 mol/L

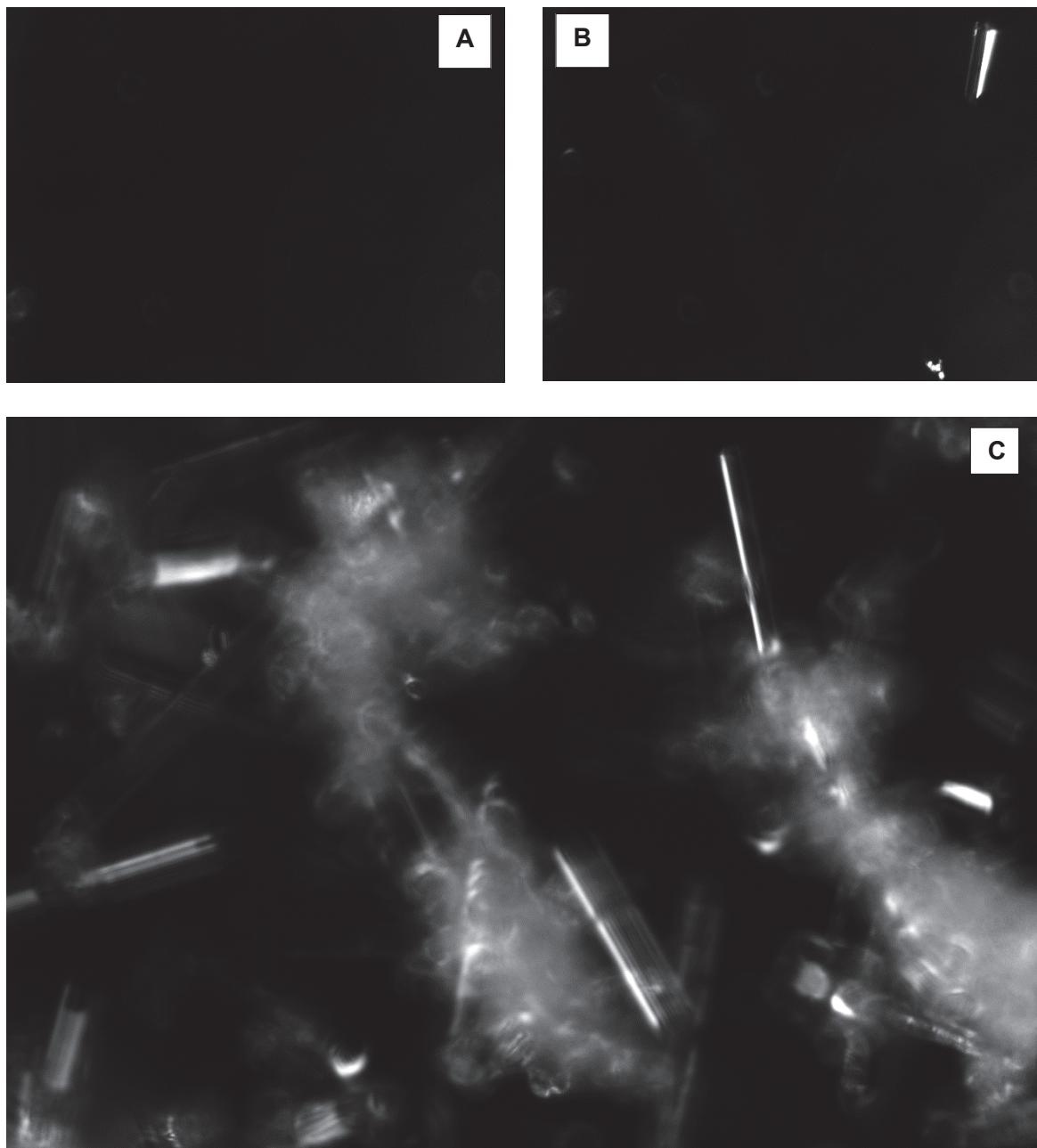


Figura B6 - Imagens do vídeo microscópio *PVM* no processo de cristalização do metronidazol a 0,6°C/min, em solução aquosa a 0,06 mol/L.

As imagens A, B e C mostram o processo de formação dos cristais de hábito acicular, sendo em A o momento antes da cristalização, em B a imagem da formação de um dos primeiros cristais em formato agulhado/acicular e em C a final do processo de cristalização.

- Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a diferentes taxas de resfriamento, em solução aquosa 0,06 mol/L

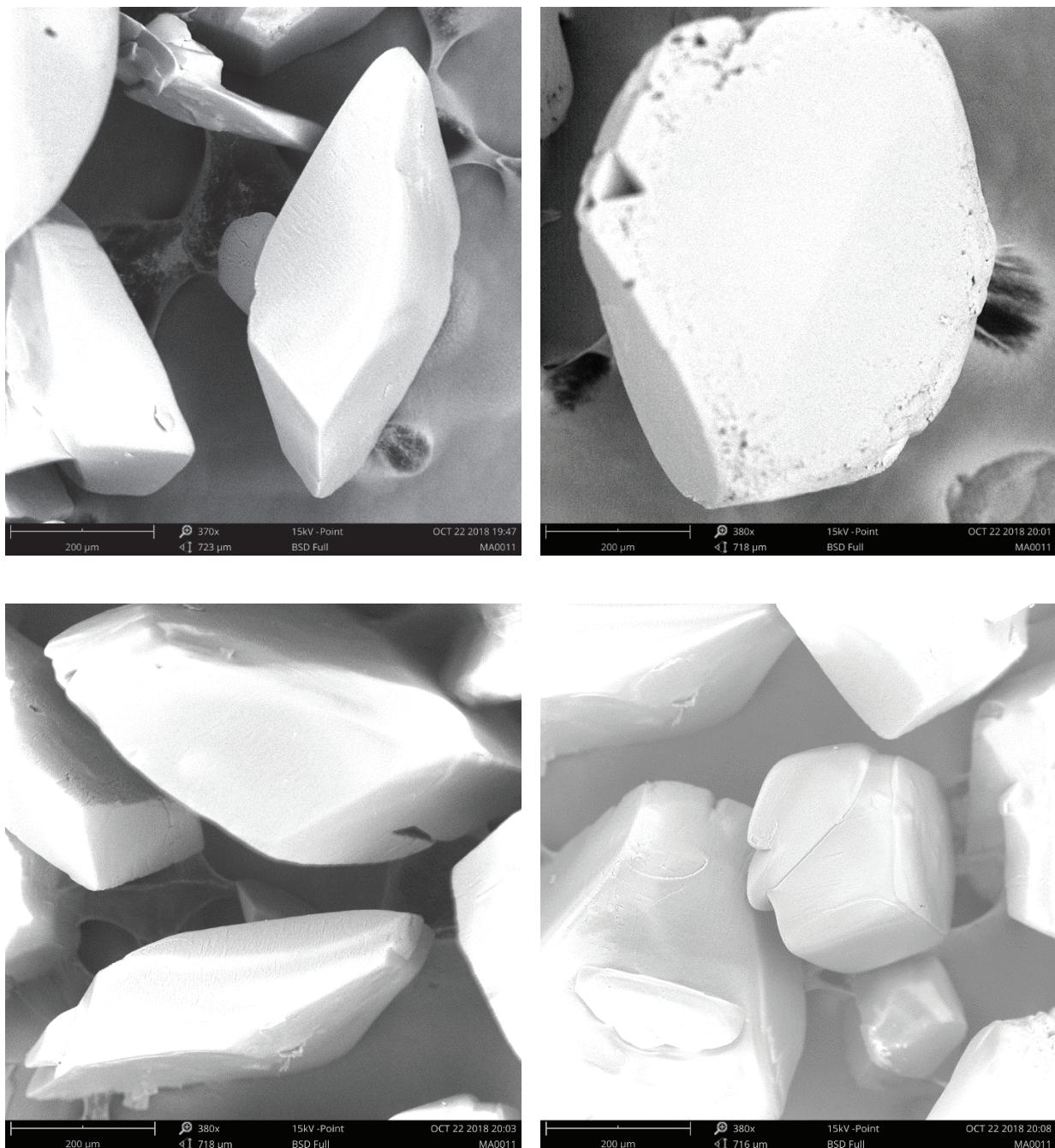


Figura B7 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,01°C/min, em solução aquosa 0,06 mol/L (hábito isodimensional).

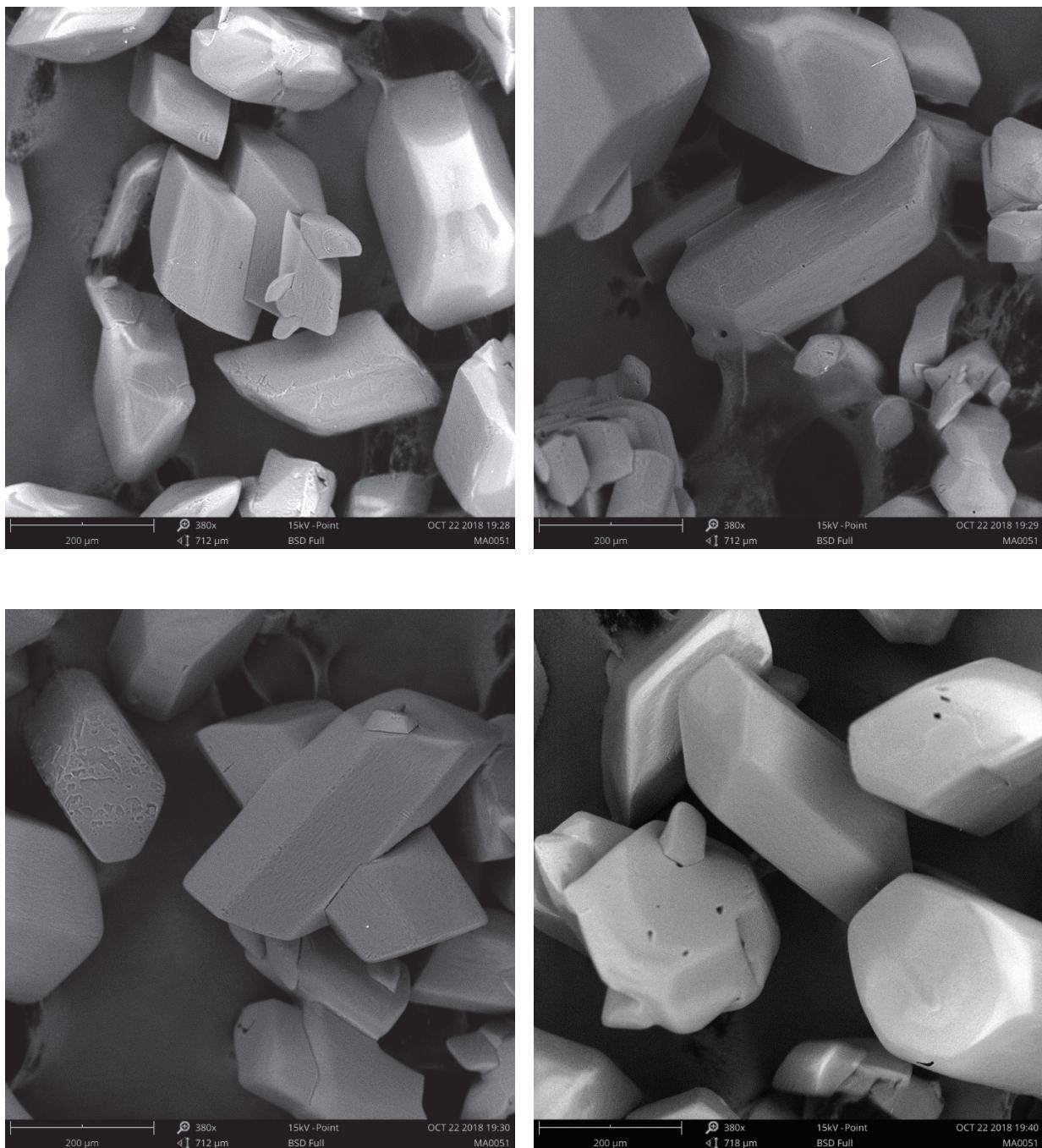


Figura B8 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,05°C/min, em solução aquosa 0,06 mol/L (hábitos primal e isodimensional).

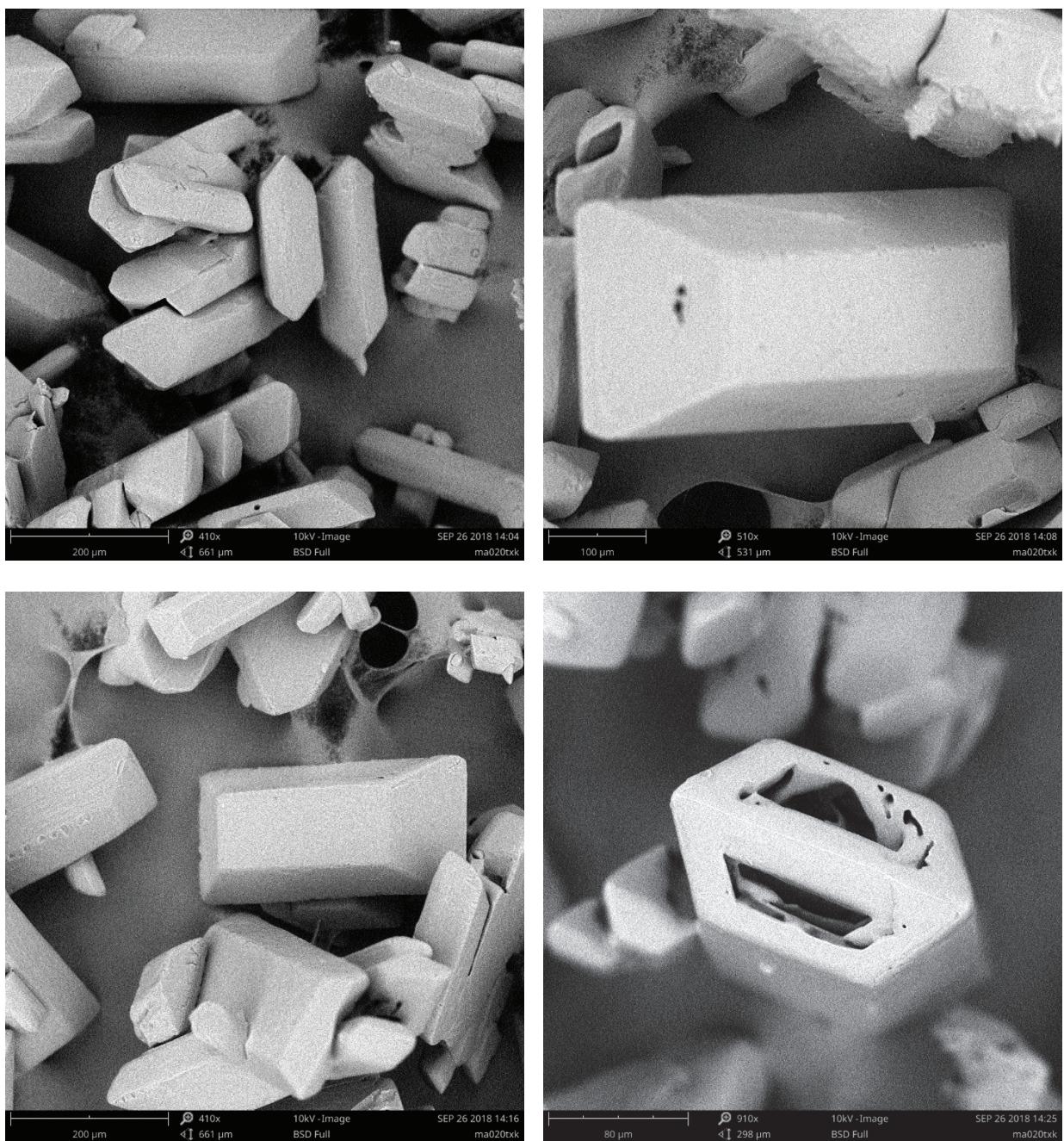


Figura B9 - Imagens MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,2°C/min, em solução aquosa 0,06 mol/L (hábito prismático).

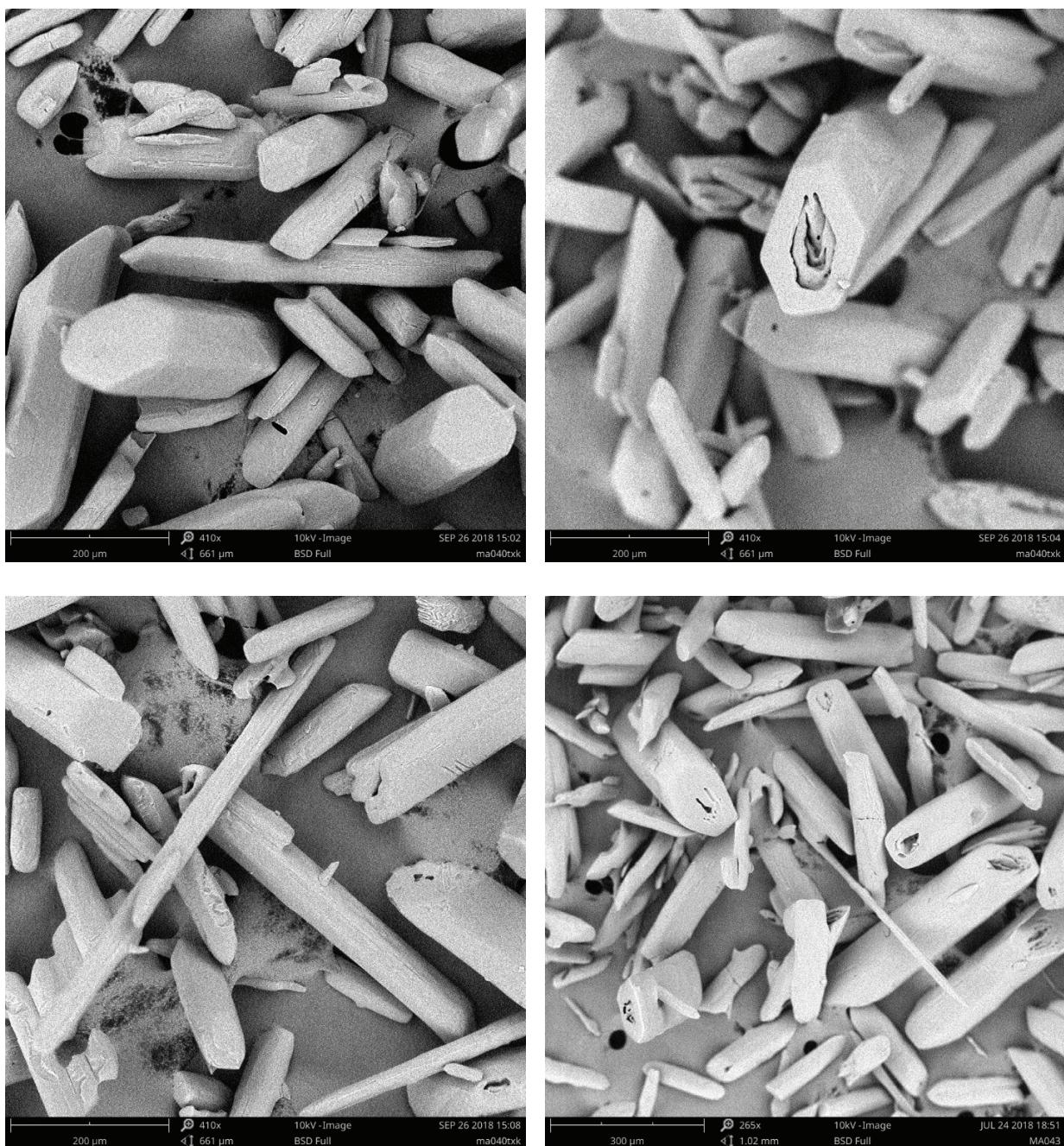


Figura B10 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,4°C/min, em solução aquosa 0,06 mol/L (hábito prismático e acicular).

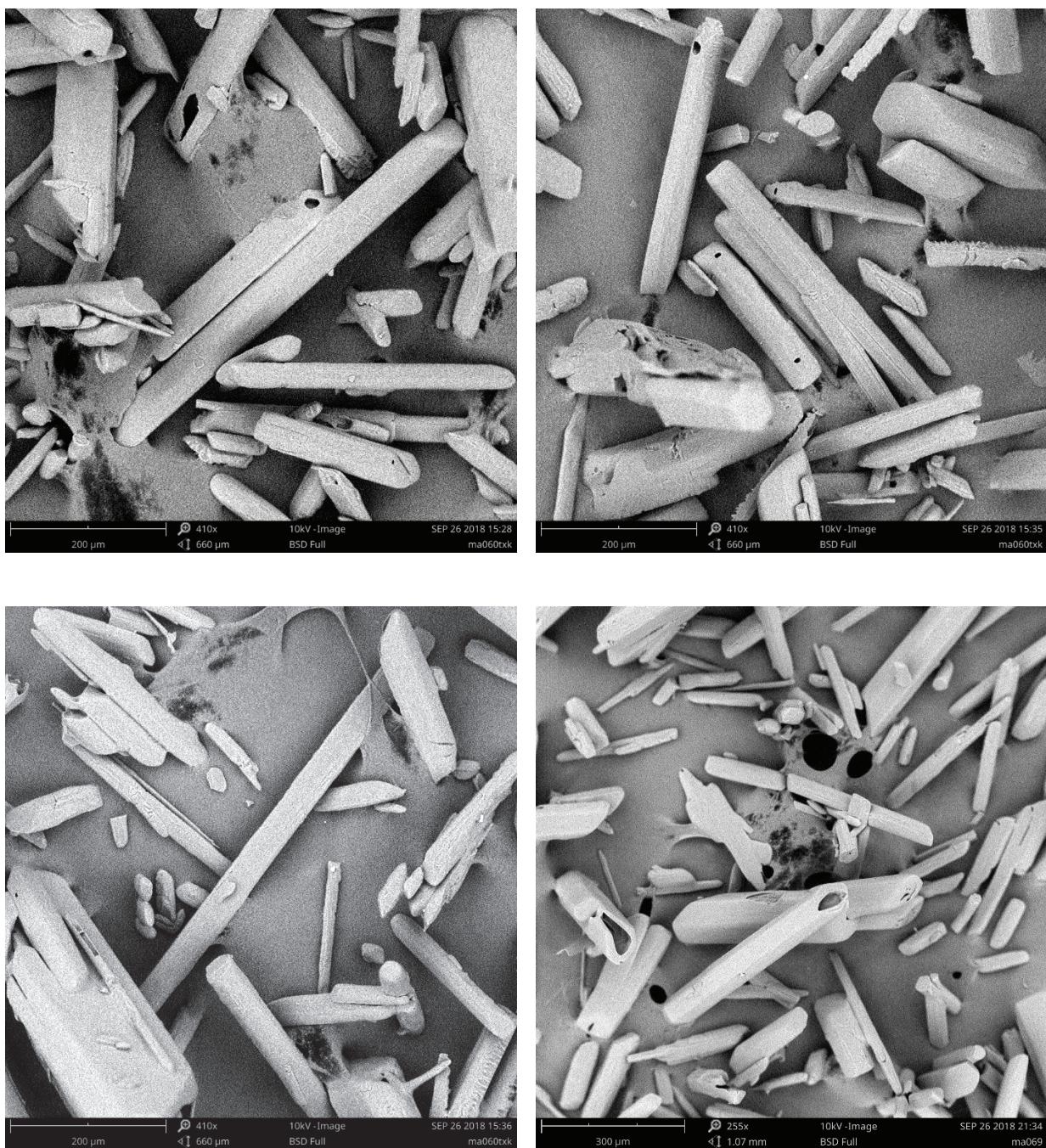


Figura B11 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,6°C/min, em solução aquosa 0,06 mol/L (hábito acicular).

- Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a diferentes taxas de resfriamento, em solução alcóolica 0,06 mol/L

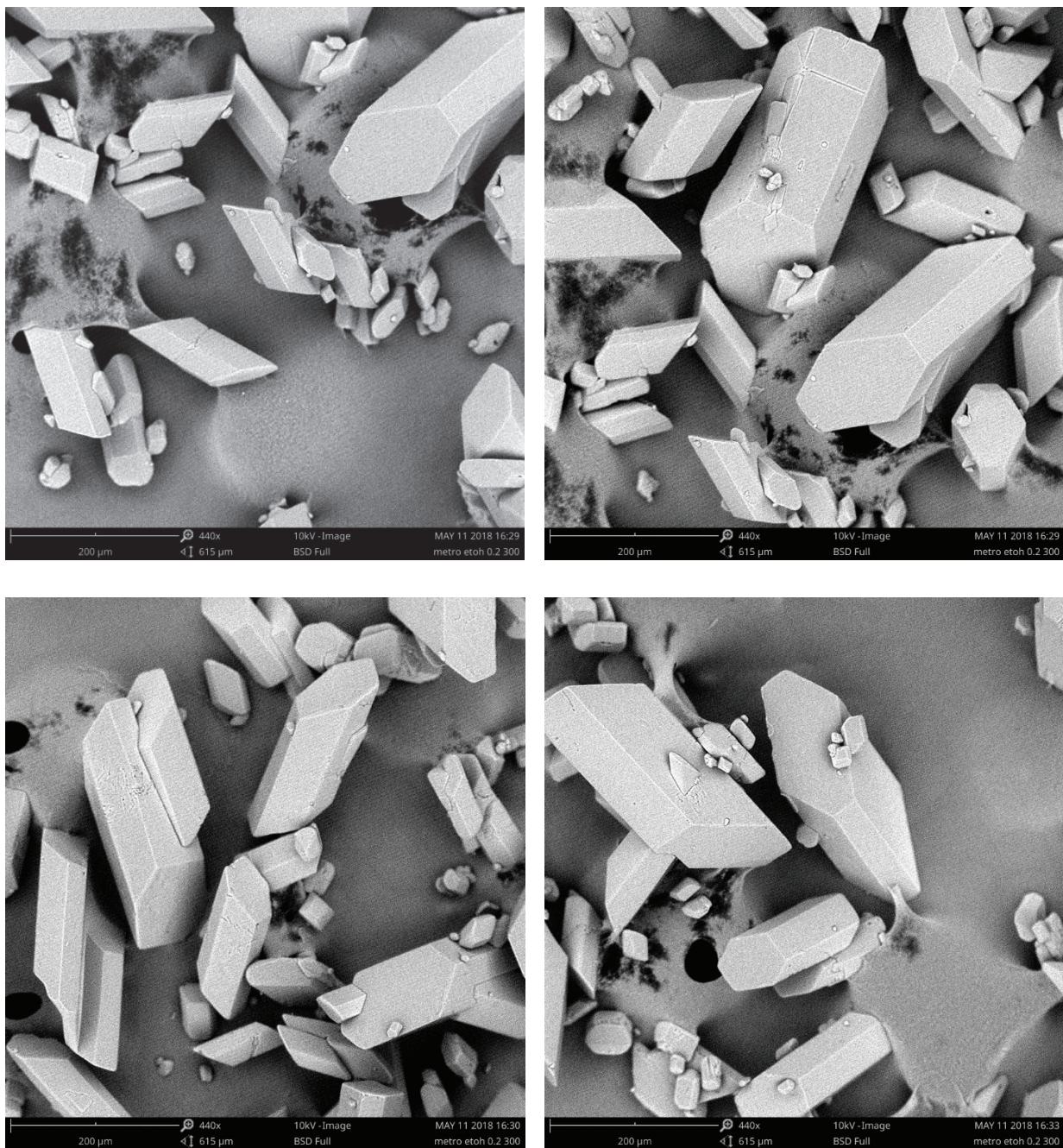


Figura B12 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , em solução alcóolica 0,06 mol/L (hábito primal).

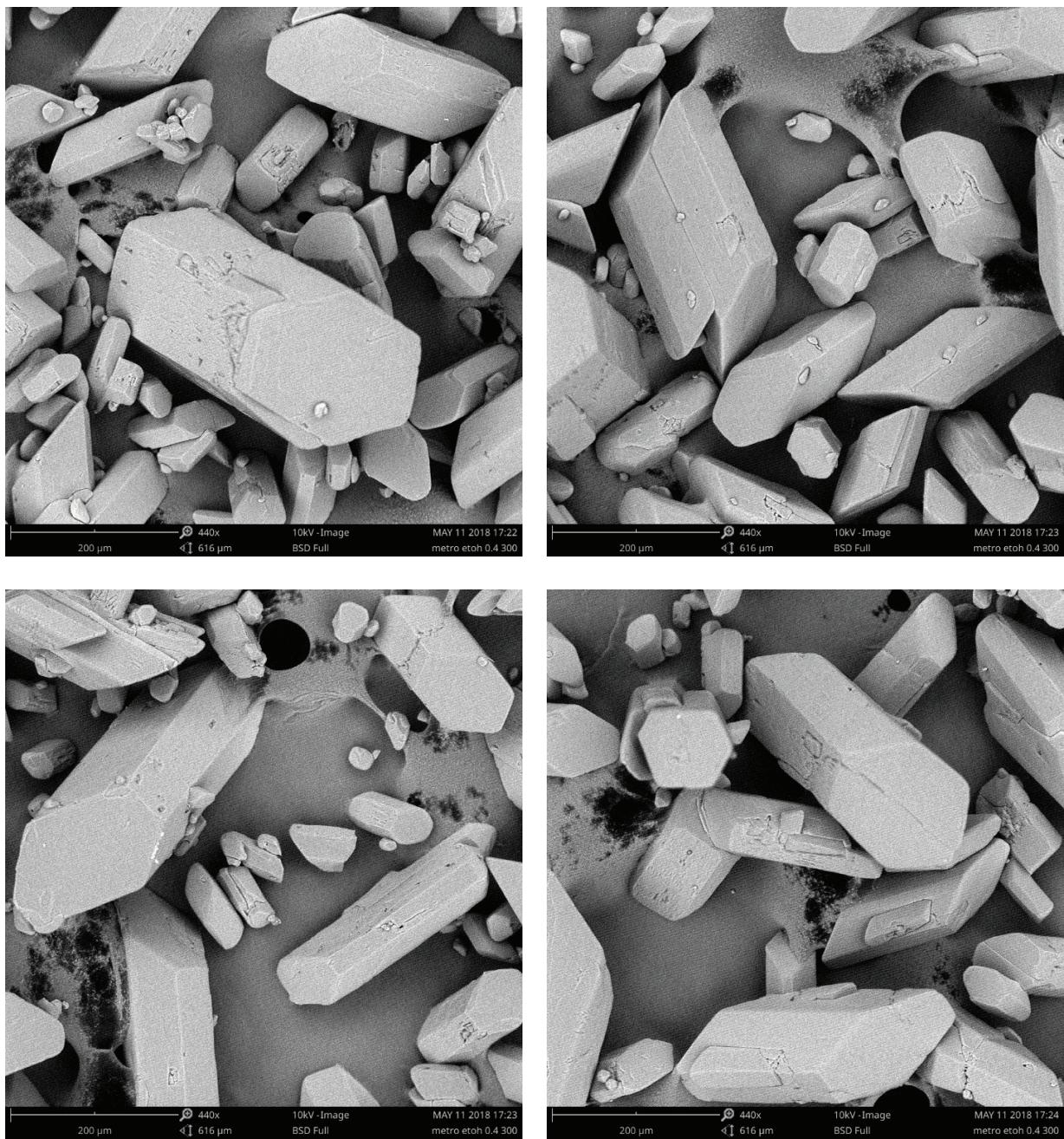


Figura B13 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,4°C/min, em solução alcóolica 0,06 mol/L (hábito primal).

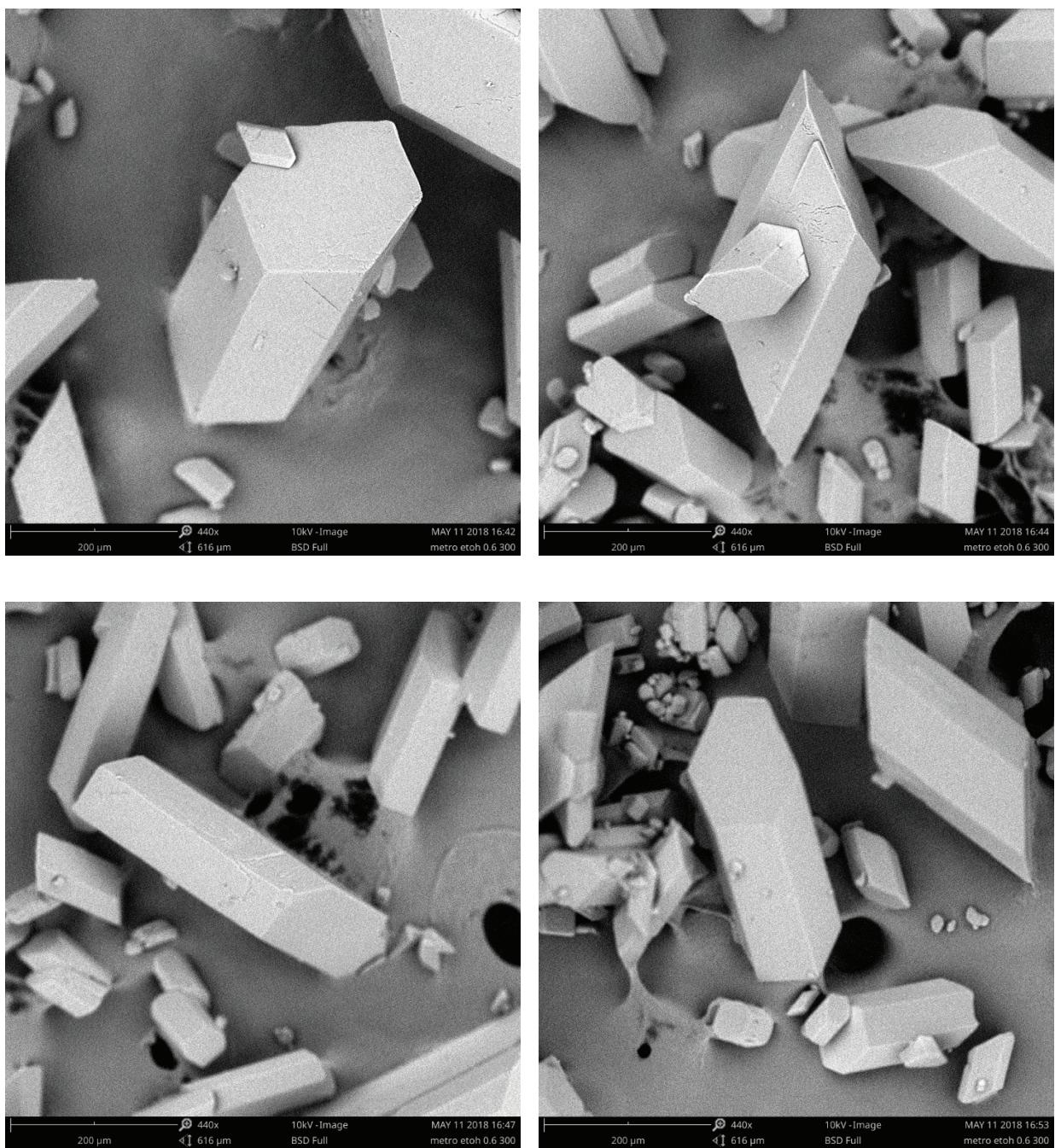


Figura B14 - Imagens de MEV dos cristais de metronidazol obtidos a 0,6°C/min, em solução alcóolica 0,06 mol/L (hábito primal).