

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE FÍSICA  
CURSO DE BACHARELADO EM FÍSICA MÉDICA

LUCAS DOS SANTOS CAVALCANTE

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUIMIOTERÁPICO  
LEUKERAN POR MÉTODOS ANALÍTICOS DE FÍSICA ATÔMICA**

Rio de Janeiro  
2019

LUCAS DOS SANTOS CAVALCANTE

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUIMIOTERÁPICO  
LEUKERAN POR MÉTODOS ANALÍTICOS DE FÍSICA ATÔMICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado ao Instituto de Física da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Wania Wolff

Orientador

Lúcia Helena Coutinho

Co-orientador

Rio de Janeiro

2019

**LUCAS DOS SANTOS CAVALCANTE**

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUIMIOTERÁPICO  
LEUKERAN POR MÉTODOS ANALÍTICOS DE FÍSICA ATÔMICA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Física da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Wania Wolff

---

Lúcia Helena Coutinho

---

Prof. Julio Cezar Suita

---

Prof. Hugo Milward Riani de Luna

---

Prof. Irina Nasteva

**RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL**

2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, que sempre apoiaram minhas decisões e por nunca terem desistido de me oferecer uma educação de qualidade. Sou eternamente grato a vocês.

Agradeço a minhas orientadoras, Wania Wolff e Lucia Helena Coutinho, pela paciência e ensinamentos durante a graduação e desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Julia Silveira, minha grande amiga, por sempre ter disponibilizado seu tempo a me ajudar e por nunca ter duvidado da minha capacidade.

Agradeço aos meus amigos Pedro Henrique e Gabriella Pinho, por todas as doses de ânimo dadas durante esses anos de graduação. Vocês são essenciais desde a minha formação do ensino médio.

Agradeço à Maria Luisa por toda paciência, carinho e parceria.

Agradeço aos professores da UFRJ, por lecionarem com afincamento e maestria, apesar da desvalorização e sucateamento da educação e pesquisa no país. Agradecimento especial ao professor Odair Dias Gonçalves, que me disponibilizou um espaço no Laboratório da Radiação Gama e X para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos colaboradores Sergio Suarez, Pablo Perez, Igor Alencar, Amanda Garcez e José Alberto Bonapace por disponibilizarem seu tempo e equipamentos para essa pesquisa.

Agradeço a todos os meus amigos da UFRJ, especialmente a Bruna Lamis, Joel Marques, João Henrique, Tales Freitas, Isabella Gerde, Heitor Mynssen, David Almeida e Juan Valani pelo apoio em momentos de desespero e pela risadas em momentos de diversão.

**RESUMO**  
**CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUIMIOTERÁPICO LEUKERAN POR**  
**MÉTODOS ANALÍTICOS DE FÍSICA ATÔMICA**  
**LUCAS DOS SANTOS CAVALCANTE**

Orientador: Wania Wolff

Fármacos servem à sua aplicação estando livres de impurezas e administrados em uma quantidade apropriada. Vários métodos químicos e instrumentais são aplicados em intervalos regulares na avaliação de drogas. Produtos farmacêuticos podem desenvolver impurezas, absorver contaminantes, degradar em vários estágios de seu desenvolvimento, transporte e armazenamento, tornando-se um risco farmacêutico ao ser administrado, portanto eles devem ser detectados e quantificados. A instrumentação analítica e métodos de análise desempenham um papel importante na avaliação da qualidade dos medicamentos. O composto quimioterápico selecionado para estudo, a clorambucila, é um derivado aromático da mostarda nitrogenada que atua como um agente alquilante bifuncional e é indicado para o tratamento de Doença de Hodgkin e formas de linfoma não-Hodgkin, como leucemia linfocítica crônica e macroglobulinemia de Waldenstrom. Experimentos baseados em métodos analíticos de física atômica e molecular como PIXE, RBS, XPS, TOF e SEM foram aplicados para investigar o composto ativo e o medicamento que o contém, Leukeran. A quantidade do composto ativo no comprimido foi identificada e comparada com a informação do fabricante. Os elementos presentes no revestimento foram determinados como também foi estimada a sua espessura. A degradação da molécula quando exposta à variação de temperatura e sob impacto de prótons foi investigada pelas técnicas de emissão de raios X induzido por prótons - PIXE (Particle-induced X-ray emission ou proton-induced X-ray emission), espectroscopia de retroespalhamento de Rutherford - RBS (Rutherford backscattering spectroscopy), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X - XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) e espectroscopia de massa por íons secundários - SIMS (Secondary ions mass spectroscopy).

**Palavras-chave: física atômica, espectroscopia, linfoma não-Hodgkin, Leukeran, clorambucila.**

**ABSTRACT****CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO QUIMIOTERÁPICO LEUKERAN POR  
MÉTODOS ANALÍTICOS DE FÍSICA ATÔMICA  
LUCAS DOS SANTOS CAVALCANTE**

Advisor: Wania Wolff

Drugs serve their application being free of impurities and administered in an appropriate amount. Various chemical and instrumental methods are applied at regular intervals in drug estimation. Pharmaceutical products can develop impurities, absorb contaminants, degrade at various stages of their development, transport and storage, making it a pharmaceutical risk when administered, so they must be detected and quantified. Analytical instrumentation and methods of analysis play an important role in the evaluation of drug quality. The chemotherapeutic compound selected for this study, chlorambucil, is an aromatic derivative of nitrogen mustard, which acts as a bifunctional alkylating agent and is indicated for the treatment of Hodgkin's disease and forms of non-Hodgkin's lymphoma, such as chronic leukemialinfocítica and Waldenstrom's macroglobulinemia. Experiments based on analytical methods of atomic and molecular physics such as PIXE, RBS, XPS, TOF and SEM were applied to investigate the active compound and the drug containing it, Leukeran. The amount of the active compound in the tablet was identified and compared to the manufacturer's information. The elements present in the coating were determined as well as the thickness was estimated. The degradation of the molecule when exposed to temperature variation and under impact of protons was investigated by the techniques PIXE - Particle-induced X-ray emission or proton-induced X-ray emission, RBS - Rutherford Backscattering spectroscopy, XPS - X-ray photoelectron spectroscopy and SIMS - Secondary ions mass spectroscopy.

**Keywords: atomic physics, spectroscopy, non-Hodgkin's lymphoma, Leukeran, chlorambucil.**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa Global Apresentando o Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades Abaixo de 70 Anos em 2015. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda (BRAY et al., 2018).	12
Figura 2	Novos casos e mortes dos 12 principais tipos de câncer no mundo no ano de 2018 (BRAY et al., 2018).	13
Figura 3	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a).	14
Figura 4	O sistema linfático (INSTITUTO VENCER O CÂNCER, 2018).	15
Figura 5	Embalagem, pote e o comprimido do fármaco Leukeran (THE DRUG-BANK DATABASE, 2018).	16
Figura 6	Principais adjuvantes utilizados em comprimidos pela indústria farmacêutica (FERRAZ, 2006).	18
Figura 7	Estrutura química em 3 dimensões da molécula da clorambucila (DEPOSITPHOTOS, 2018).	19
Figura 8	ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA (ALMEIDA et al., 2005).	20
Figura 9	(a) Esquema do fenômeno de emissão de raios X; (b) Criação de vacâncias na camada interna por raios X ou partículas carregadas; (c) Processo de emissão de elétrons Auger; (d) Processo de emissão de raios X (VERMA, 2007).	23
Figura 10	Esquema das principais transições dos elétrons entre níveis e subníveis eletrônicos (SANTOS, 2009).	23
Figura 11	Imagem esquemática do arranjo experimental do método PIXE (JOHANSSON et al., 1995).	24
Figura 12	Diagrama esquemático de um sistema de espectrometria de retroespalhamento.	27
Figura 13	Representação esquemática do efeito fotoelétrico. Respectivamente, os instantes antes e depois da interação (PODGORŠAK, 2006).	29
Figura 14	Representação esquemática do efeito Auger, do efeito Coster-Kronig e do efeito super Coster-Kronig (PODGORŠAK, 2006).	29

Figura 15	Imagem ilustrativa da instrumentação usada na técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios X (MENEZES, 2018). . . . .	30
Figura 16	Espectro de massa por ionização de elétrons do composto clorambucila (THE DRUGBANK DATABASE, 2018). . . . .	31
Figura 17	Representação esquemática de um espectrometro de massa linear por tempo de voo. . . . .	32
Figura 18	Representação esquemática de um espectrômetro de massa por tempo de voo com um refletor de íons (GROSS, 2006). . . . .	33
Figura 19	Componentes de espectromêtro de massa. . . . .	34
Figura 20	Imagem da câmara PIXE do Centro Atômico de Bariloche. . . . .	35
Figura 21	Imagem esquemática do acelerador e linha usada para análise PIXE no Centro Atômico de Bariloche (LIMANDRI et al., 2014). . . . .	36
Figura 22	Gráfico da transmissão de raios X para diversos detectores de raios X, incluindo o SiriusSD® SDD e2v (RAYSPEC, 2018). . . . .	36
Figura 23	Porta-amostra com as respectivas amostras analisadas. . . . .	37
Figura 24	Esquema do arranjo experimental da linha RBS do Centro Atômico de Bariloche. . . . .	38
Figura 25	Espectrômetro ESCALAB 250Xi do Laboratório Multiusuário de Espectroscopia de Fotoelétron utilizado para análise XPS. . . . .	40
Figura 26	Exemplo de espectro Survey gerado pelo software Advantage da Thermo Scientific, onde cada elemento visualizado na amostra pela técnica XPS é evidenciado. . . . .	41
Figura 27	Imagem da linha SIMS do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. . . . .	42
Figura 28	Princípio da técnica de espectrometria de massa de íons secundários no tempo de voo. . . . .	43
Figura 29	Amostras do Leukeran usadas na análise SIMS. . . . .	44
Figura 30	Esquema das regiões de incidência do feixe de prótons na primeira irradiação da pastilha de clorambucila + Ag. . . . .	47
Figura 31	Esquema das regiões de incidência do feixe de prótons na segunda irradiação da pastilha de clorambucila + Ag. . . . .	48
Figura 32	Esquema das posições de incidência do feixe de prótons na primeira irradiação da pastilha de clorambucila. . . . .	49



Figura 33	Esquema das posições de incidência do feixe de prótons na segunda irradiação da pastilha de clorambucila. . . . .	50
Figura 34	Espectro RBS do revestimento do comprimido Leukeran. . . . .	54
Figura 35	Gráfico da energia do íon e seus respectivo poder de freamento no revestimento do fármaco Leukeran. . . . .	56
Figura 36	Espectros de XPS (survey) para a clorambucila obtido após a degradação por temperatura. . . . .	57
Figura 37	Variação da proporção dos átomos de carbono, cloro, oxigênio e nitrogênio pelo método de degradação. . . . .	59
Figura 38	Espectros de alta resolução de XPS nas regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p para a Clorambucila, antes e após a degradação por temperatura. . . . .	60
Figura 39	Espectros de massa do composto clorambucila e seus fragmentos iônicos para a técnica SIMS. . . . .	63
Figura 40	Superfície do Leukeran com o revestimento após a degradação por temperatura. . . . .	67
Figura 41	Superfície do Leukeran sem o revestimento após a degradação por temperatura. . . . .	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipo de amostra e seu respectivo número. . . . .	38
Tabela 2	1a-Leukeran . . . . .	45
Tabela 3	1b-Leukeran . . . . .	45
Tabela 4	2a-Revestimento . . . . .	46
Tabela 5	3a-Leukeran + XRF . . . . .	46
Tabela 6	3b-Leukeran + XRF . . . . .	46
Tabela 7	3c-Leukeran + XRF . . . . .	46
Tabela 8	4a-Clorambucila + Ag . . . . .	47
Tabela 9	4b-Clorambucila + Ag . . . . .	47
Tabela 10	4c-Clorambucila + Ag . . . . .	47
Tabela 11	4d-Clorambucila + Ag . . . . .	47
Tabela 12	5a-Clorambucila + Ag . . . . .	48
Tabela 13	5b-Clorambucila + Ag . . . . .	48
Tabela 14	5c-Clorambucila + Ag . . . . .	49
Tabela 15	6a-Clorambucila . . . . .	49
Tabela 16	6b-Clorambucila . . . . .	49
Tabela 17	6c-Clorambucila . . . . .	50
Tabela 18	6d-Clorambucila . . . . .	50
Tabela 19	7a-Clorambucila . . . . .	50
Tabela 20	7b-Clorambucila . . . . .	50
Tabela 21	7c-Clorambucila . . . . .	51
Tabela 22	8a-Leukeran degradado . . . . .	51
Tabela 23	8b-Leukeran degradado . . . . .	51
Tabela 24	9a-Macrogol . . . . .	51
Tabela 25	9b-Macrogol . . . . .	52
Tabela 26	10a-Leukeran sem o revestimento . . . . .	52
Tabela 27	10b-Leukeran sem o revestimento . . . . .	52
Tabela 28	Massa da clorambucila nas Amostras do Leukeran . . . . .	53

Tabela 29	Valores da energia do íon e seus respectivo poder de frenamento para revestimento do Leukeran. . . . .	55
Tabela 30	Valores de energias de ligação (eV) nas regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p, para as amostras de clorambucila antes e após a degradação. Também estão apresentados os valores disponíveis na literatura. . . . .	58
Tabela 31	Porcetagem atômica da clorambucila antes e após a degradação. Também são apresentados os valores teóricos. . . . .	58
Tabela 32	Energia de ligação, área do pico e percentual atômico das ligações C-Cl.	61
Tabela 33	Energia de ligação, área do pico e percentual atômico das ligações C-N.	61
Tabela 34	Energia de ligação, área do pico e percentual atômico da ligação COOH.	61
Tabela 35	Espectros de massas e seus correspondentes fragmentos iônicos. . . . .	62
Tabela 36	Quantidade de cada elemento e suas respectivas incertezas na camada da amostra referente ao revestimento do quimioterápico. . . . .	69

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.0.1	Panorama mundial . . . . .	12
1.0.2	Panorama nacional . . . . .	13
1.0.3	Linfoma . . . . .	14
1.0.4	Leukeran . . . . .	16
1.0.5	Clorambucila . . . . .	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>TÉCNICAS</b>	<b>22</b>
3.1	Emissão de Raios-X Induzida por Prótons . . . . .	22
3.1.1	Introdução . . . . .	22
3.1.2	Fundamentação teórica . . . . .	22
3.1.3	Arranjo experimental . . . . .	24
3.2	Espectrometria por Retroespalhamento de Rutherford . . . . .	24
3.2.1	Introdução . . . . .	24
3.2.2	Fundamentação teórica . . . . .	25
3.2.3	Arranjo experimental . . . . .	27
3.3	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X . . . . .	27
3.3.1	Introdução . . . . .	27
3.3.2	Fundamentação teórica . . . . .	28
3.3.3	Arranjo experimental . . . . .	30
3.4	Espectrometria de Massas por Íons Secundários . . . . .	30
3.4.1	Introdução . . . . .	30
3.4.2	Fundamentação teórica . . . . .	31
3.4.3	Arranjo experimental . . . . .	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1	PIXE . . . . .	35
4.1.1	Aquisição dos dados . . . . .	35
4.1.2	Preparação das amostras . . . . .	37
4.1.3	Tratamento e interpretação dos dados . . . . .	37
4.2	RBS . . . . .	38
4.2.1	Aquisição dos dados . . . . .	38
4.2.2	Preparação da amostra . . . . .	39
4.2.3	Tratamento e interpretação dos dados . . . . .	39
4.3	XPS . . . . .	39

4.3.1	Preparação da amostra . . . . .	40
4.3.2	Tratamento e interpretação dos dados . . . . .	41
4.4	SIMS-TOF . . . . .	42
4.4.1	Aquisição dos dados . . . . .	42
4.4.2	Preparação da amostra . . . . .	44
4.4.3	Tratamento e interpretação dos dados . . . . .	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>45</b>
5.1	PIXE . . . . .	45
5.1.1	Concentração dos elementos . . . . .	45
5.1.2	Massa da clorambucila no Leukeran . . . . .	52
5.2	RBS . . . . .	54
5.2.1	Espessura do revestimento . . . . .	54
5.3	XPS . . . . .	56
5.3.1	Survey . . . . .	57
5.3.2	Espectros de alta resolução . . . . .	59
5.4	SIMS-TOF . . . . .	62
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXO A. Medidas recentes</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO B. Medidas de incertezas</b>	<b>69</b>
B.1	PIXE . . . . .	69
B.2	RBS . . . . .	69

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças que envolve o crescimento celular acelerado, nas quais células anormais se dividem sem controle com o potencial de invadir e se espalhar para outras partes do corpo, além de causar a falência das funções vitais. Essas células podem se espalhar através dos sistemas sanguíneo e linfático. Existem quase 200 tipos de cânceres que correspondem a diversos sistemas celulares do corpo, e que são diferenciados pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, sendo eles vizinhos ou não (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a).

Sua classificação é feita a partir da localização primária do tumor, e não de acordo os tecidos para os quais a neoplasia se espalhou. Os diferentes tipos da doença podem ser colocados, em sua maioria, nos seguintes grupos: carcinomas, sarcomas, leucemia e linfomas. O carcinoma é o tipo de câncer mais comum nos seres humanos, com potencial surgimento em praticamente todos os órgãos. Sua origem é no tecido epitelial, ou seja, o tecido que recobre nossa pele e reveste a maioria dos nossos órgãos. Já o sarcoma é uma neoplasia bastante rara que se inicia nos tecidos conjuntivos que ficam entre a pele e os órgãos internos, como os tendões, músculos e gordura. A leucemia refere-se a um grupo de doenças complexas que surgem na medula óssea e afetam a produção de glóbulos brancos. Existem mais de 12 tipos de leucemia, sendo os quatro tipos principais: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (CLL). Por fim, os linfomas são transformações neoplásicas de células linfóides normais que residem no sistema linfático, conjunto composto por linfonodos ou gânglios e os tecidos. São morfologicamente divididos em linfomas de Hodgkin (LH) e não-Hodgkin (LNH), e devido ao fato do tecido linfático ser encontrado em todo o corpo, o linfoma se espalha de forma desordenada, podendo se originar em qualquer lugar do corpo (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a; ALMEIDA et al., 2005).

A incidência e a mortalidade por câncer estão crescendo rapidamente em todo o mundo. As razões são complexas, mas o seu aumento é reflexo do envelhecimento juntamente com o crescimento exponencial da população, além de mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para o câncer, que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento socioeconômico de cada nação. Com esses fatores combinados, a crescente proeminência do câncer como principal causa de morte reflete os acentuados declínios, em muitos países, das taxas de mortalidade de outras doenças, como o derrame e doenças do coração (BRAY et al., 2018). Dessa forma, a posição do câncer como causa de morte reflete os níveis nacionais de desenvolvimento social e econômico de cada país, e por isso, apresentaremos nas subseções abaixo um panorama mundial e nacional da doença.

### 1.0.1 Panorama mundial

O câncer é um grande problema de saúde pública no mundo todo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2015, o câncer foi a primeira ou segunda causa de morte em humanos com idade até 70 anos em 91 dos 172 países do mundo, e em outros 22 países, a doença ocupou o terceiro ou segundo lugar em causas de mortes (BRAY et al., 2018). Estas estatísticas são exibidas na Figura 1.

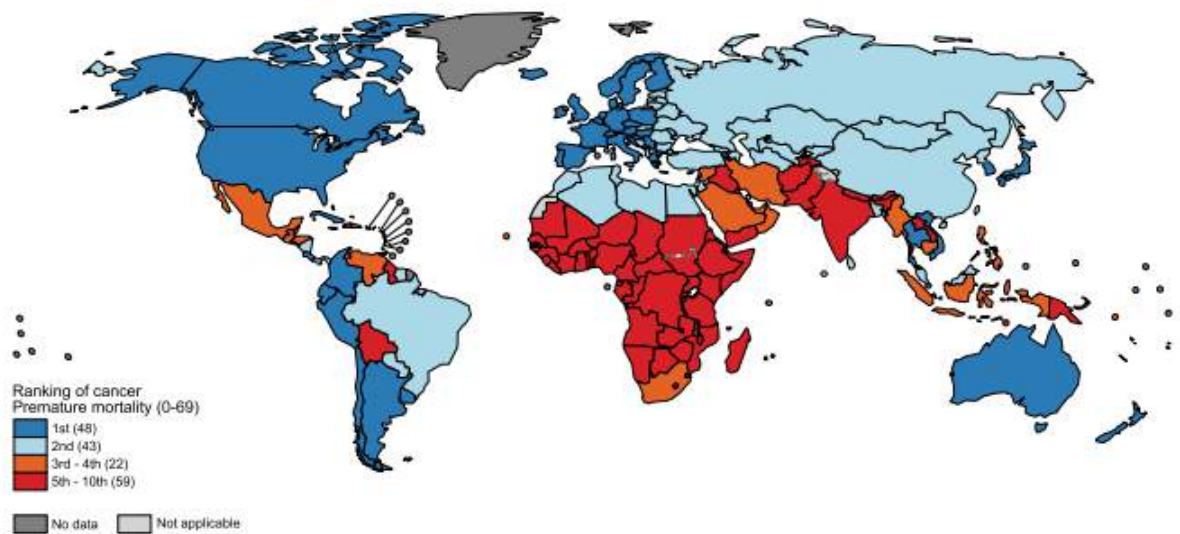


Figura 1: Mapa Global Apresentando o Ranking Nacional de Câncer como Causa de Morte em Idades Abaixo de 70 Anos em 2015. Os números de países representados em cada grupo de classificação estão incluídos na legenda (BRAY et al., 2018).

No ano de 2018 foram estimados 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes causadas pelo câncer, todas essas estimativas levam em conta as estatísticas do câncer de pele não melanoma (CPNM). Calcula-se que quase metade dos novos casos e a maioria das mortes por câncer no mundo ocorreram na Ásia no ano de 2018, isso deve-se ao fato de que 60% da população mundial reside nesse continente. Para os outros continentes, a Europa se destaca, respondendo por 23,4% do total de casos de câncer e 20,3% das mortes por câncer no de 2018, embora represente apenas 9% da população mundial, seguido pelos 21% de incidência e 14,4% da mortalidade em todo o mundo no mesmo ano (BRAY et al., 2018).

A Figura 2 mostra as porcentagens dos 12 principais tipos de câncer para os novos casos e mortes em todo o mundo no ano de 2018. Pode-se perceber que o câncer de pulmão e o câncer de mama feminino são mais comumente diagnosticados, ambos possuem uma porcentagem de 11,6% do total de novos casos, seguido de perto pelo câncer colorretal com uma incidência de 10,2% e o câncer de próstata com 7,1%. Para as taxas percentuais de mortalidade, o câncer de pulmão lidera as estatísticas com 18,4% dos casos, em seguida aparece o câncer colorretal com

9,2%, e os cânceres de estômago e fígado com uma taxa de 8,2% do total de mortes causadas por câncer em 2018. Para obtenção desses valores foram combinadas as estatísticas de homens e mulheres. No geral, os 12 principais tipos de câncer são responsáveis por mais de 65% das mortes por câncer recém-diagnosticados (BRAY et al., 2018).

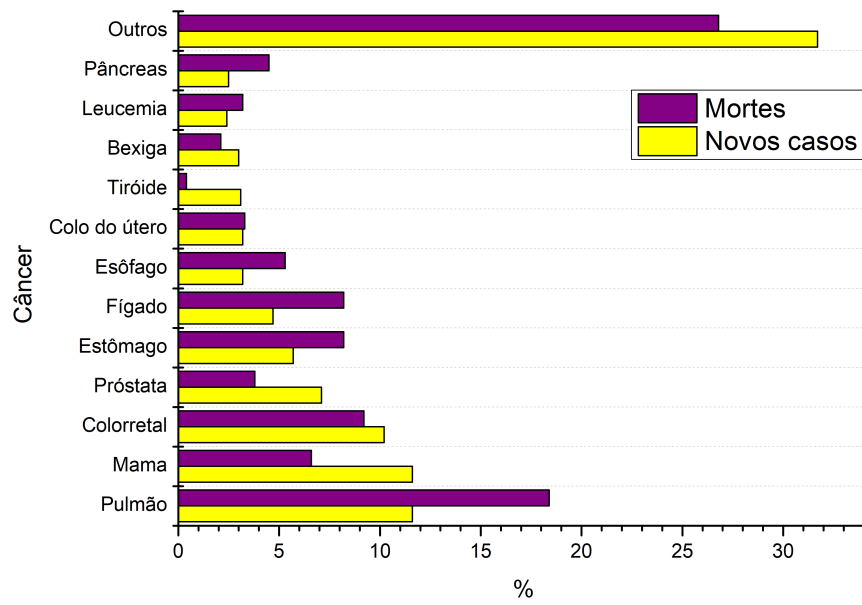


Figura 2: Novos casos e mortes dos 12 principais tipos de câncer no mundo no ano de 2018 (BRAY et al., 2018).

### 1.0.2 Panorama nacional

No Brasil, para o biênio 2018-2019, é esperado uma ocorrência de 600 mil casos novos de câncer em cada ano. Essa estimativa reflete o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto entre os mais incidentes para ambos os sexos combinados, e ao mesmo tempo apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago. No caso das mulheres, a neoplasia que ocorrerá com a maior frequência é de mama (60 mil), e para os homens, será o câncer de próstata (68 mil). As taxas de incidência ajustadas por idade tanto para homens quanto para mulheres apresentam compatibilidade as taxas de incidências apresentadas para países em desenvolvimento (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a). A Figura 3 apresenta o perfil de recorrência dos dez principais tipos de câncer no Brasil.

A distribuição da incidência quando feita por Região revela informações interessantes. As Regiões Sul e Sudeste, por exemplo, acumulam 70% da ocorrência de casos novos de câncer de todo o país. Os cânceres de próstata, pulmão, de mama feminina e de intestino lideram as taxas de incidência nas Regiões Sudeste e Sul. O padrão de incidência na Região Centro-



Oeste apresenta um comportamento semelhante, mas incorpora em sua distribuição os cânceres do colo do útero e de estômago entre os mais incidentes. Nas Regiões Norte e Nordeste, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago tem impacto importante nessa população. Um outro aspecto interessante é que a Região Norte é a única do país onde as taxas do câncer de mama e do colo do útero são iguais entre as mulheres (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Côlon e Reto	18.980	9,4%
Côlon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a).

### 1.0.3 Linfoma

O sistema linfático é composto pelos linfonodos, vasos linfáticos e a linfa. Os linfonodos são estruturas localizadas nas proximidades de todos os órgãos do corpo, exceto o cérebro. Essas estruturas se concentram, principalmente, no pescoço, axilas e regiões inguinais. Os vasos linfáticos são pequenos canais que interligam os linfonodos. E a linfa, encontrada nos vasos linfáticos, é um fluido composto pelos linfócitos e outras células envolvidas na resposta imunológica. O sistema linfático, exibido na Figura 4, produz e transporta os glóbulos brancos, células que combatem as infecções e participam do sistema de defesa do organismo (INSTITUTO VENCER O CÂNCER, 2018).

O linfoma ocorre quando uma célula normal do sistema linfático se transforma, cresce sem parar e se dissemina pelo organismo. Existem dois tipos principais de linfomas: o linfoma de Hodgkin e o linfoma não-Hodgkin, e ambos envolvem diferentes tipos de células linfocitárias. Cada tipo de linfoma cresce, se dissemina a uma taxa diferente e responde de forma diferente ao tratamento. Essa neoplasia pode ocorrer em crianças, adolescentes e adultos. O comportamento dos linfomas depende de seu tipo, que é definido a partir do exame anatomopatológico do material obtido por biópsia (INSTITUTO VENCER O CÂNCER, 2018).

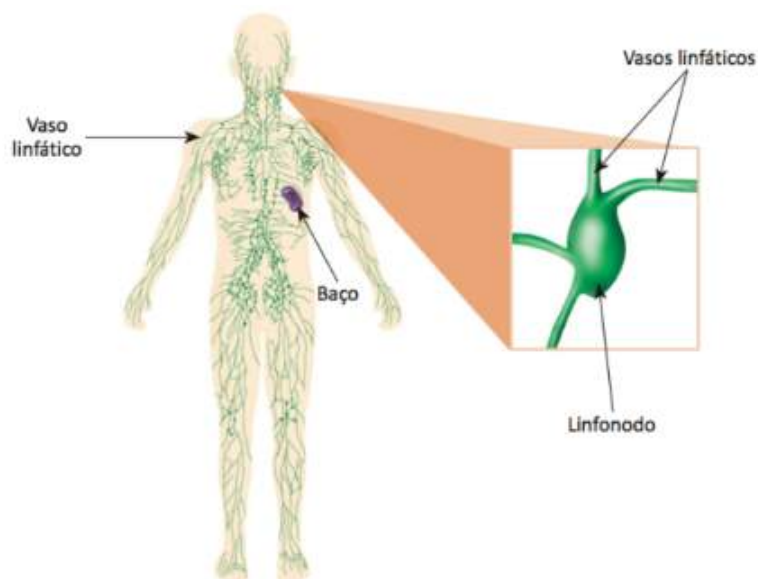


Figura 4: O sistema linfático (INSTITUTO VENCER O CÂNCER, 2018).

Os linfomas não-Hodgkin são divididos de acordo com o grau de agressividade e a velocidade de crescimento das células tumorais. Por exemplo, os indolentes apresentam um crescimento lento e podem ficar anos sem diagnóstico. Já os agressivos crescem de forma acelerada e precisam de um tratamento imediato. Os tipos mais comuns de linfomas não-Hodgkin são os difusos de células grandes, que são agressivos, e os linfomas foliculares (há vários subtipos), que são indolentes (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a; INSTITUTO VENCER O CÂNCER, 2018).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, para cada ano do biênio 2018/2019, sejam diagnosticados no Brasil 10.180 novos casos de linfoma não-Hodgkin (5.370 em homens e 4.810 em mulheres). Para ambos os sexos, é a 11<sup>a</sup> neoplasia mais frequente entre todos os cânceres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,19 casos novos a cada 100 mil homens e 4,55 para cada 100 mil mulheres (INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018a).

Para a decisão do tratamento mais adequado para o linfoma é preciso levar em consideração o estado de saúde do paciente, o estágio do linfoma e o seu tipo. De uma forma geral, a quimioterapia e radioterapia são os tratamentos mais utilizados. A quimioterapia é o método que utiliza substâncias químicas, isoladas ou em combinação, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao tratamento de neoplasias malignas é chamada de quimioterapia antineoplásica ou antitumoral (RIUL; AGUILLAR, 1999; INCA - MINISTERIO DA SAUDE, 2018b). O objetivo da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, isto é, atuam tanto nas células malignas como nas normais. Apesar disso, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento, justificando os seus benefícios mesmo com tantos efeitos colaterais (ALMEIDA et al., 2005).

### 1.0.4 Leukeran

O Leukeran é um quimioterápico que pertence a um grupo de medicamentos chamados de citotóxicos e apresenta como substância ativa a clorambucila, utilizada para o tratamento de linfomas, leucemias e algumas desordens do sangue. É fornecido em comprimidos biconvexos redondos, castanhos, revestidos por uma película, em frascos de vidro âmbar com tampas resistentes, como mostra a figura 5. De acordo com o fabricante, o medicamento deve ser armazenado na geladeira numa faixa de temperatura de 2 a 8°C (GLAXOSMITHKLINE BRASIL LTDA, 2005).



Figura 5: Embalagem, pote e o comprimido do fármaco Leukeran (THE DRUGBANK DATABASE, 2018).

Cada comprimido contém 2 mg de clorambucila e 2,5 mm de diâmetro. Além disso, o Leukeran é composto por adjuvantes, ou seja, ingredientes que não possuem atividade terapêutica. Os adjuvantes que compõem o quimioterápico são:

- Dióxido de silício coloidal ( $\text{SiO}_2$ ), densidade =  $2.65\text{g/cm}^3$ : o dióxido de silício coloidal ajuda a obter o pó ideal e fluxo exigido pelas atuais prensas de comprimidos de alta velocidade, incorpora ingredientes líquidos ou sólidos para cristalizar, melhora a dissolução de ingredientes farmacêuticos ativos de baixa solubilidade, ajuda a executar processos de granulação e tem grande aplicação como lubrificante, melhorando consideravelmente as propriedades de fluxo do material ao qual é adicionado. Além disso, é muito mais eficiente e econômico (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009);
- Hipromelose ( $\text{C}_{56}\text{H}_{108}\text{O}_{30}$ ), densidade =  $1.26\text{g/cm}^3$ : a hidroxipropilmetilcelulose, conhecida como hipromelose é utilizada na fabricação de matrizes hidrofílicas. Ela proporciona a liberação do fármaco de forma controlada, aumentando consideravelmente a sua duração de liberação e prolongando o seu efeito terapêutico (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009);
- Lactose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ), densidade =  $1.53\text{g/cm}^3$ : a lactose é um pó branco ligeiramente amarelado, e possui baixa fluidez. É utilizada como recheio e diluente em formas farma-

cêutica sólidas. Seus teores finos de lactose são usados na preparação de comprimidos pelo método de granulação úmida ou quando a moagem é realizada durante o processamento, uma vez que o tamanho fino permite uma melhor mistura com outros ingredientes da formulação, atuando como aglutinante de forma mais eficiente (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009);

- Macrogol ( $C_{2n+2}H_{4n+6}O_{n+2}$ , densidade  $1.20g/cm^3$ ): o polietilenoglicol (PEG) de baixo peso molecular, é conhecido como Macrogol. É utilizado como solvente em líquidos orais e cápsulas moles. O excipiente está ligado a drogas biofarmacêuticas, retardando a sua degradação no corpo humano e aumentando a sua duração de ação, bem como reduzindo a imunogenicidade (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009);
- Celulose microcristalina ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, densidade  $1.50g/cm^3$ : a celulose microcristalina é um pó cristalino, branco, insípido, inodoro, constituído de partículas porosas, plásticas e altamente compressíveis. É comercializado sob diferentes graus de tamanho de partícula, e atua como enchedor, desintegrante, lubrificante e facilitador de fluxo. Sua vantagem está na compressão direta de comprimidos, além de possuir alta pureza e propriedades físicas que melhoram o processo de fabricação do fármaco. (FERRAZ, 2006);
- Ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ), densidade  $0.94g/cm^3$ : o ácido esteárico é um sólido cristalino, de cor branca ou ligeiramente amarelada, de aspecto untuoso com odor de gordura. Considerado uma alternativa ao estearato de magnésio, é utilizado como ligante ou em combinação com goma-laca como um revestimento de comprimido. Pode ser usado em comprimidos entéricos como transportador de fármaco de liberação sustentada (FERRAZ, 2006);
- Dióxido de titânio ( $TiO_2$ ), densidade  $4.23g/cm^3$ : o dióxido de titânio é um pó não-higroscópico branco, amorfo, inodoro e insípido. É amplamente utilizado em confeitaria, preparações dermatológicas e cosméticos, alimentos, na indústria de plásticos, em formulações farmacêuticas tópicas e orais como um pigmento branco. Devido ao seu alto índice de refração, o dióxido de titânio fornece opacidade útil, que pode contribuir para a estabilidade à luz sensível dos compostos ativos na formulação de comprimidos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009);
- Óxido de ferro vermelho ( $Fe_2O_3$ ), densidade  $5.24/cm^3$  e Óxido de ferro amarelo ( $Fe(OH)_3$ ), densidade  $4.25g/cm^3$ : Os óxidos de ferro são definidos como compostos inorgânicos constituídos por qualquer uma das combinações de óxidos de ferro preparados sinteticamente, incluindo as formas hidratadas. Eles são amplamente utilizados em cosméticos, alimentos e aplicações farmacêuticas como corantes e absorvedores de UV. Como corantes inorgânicos, eles estão se tornando cada vez mais importantes como resultado das

limitações que afetam alguns corantes orgânicos sintéticos. No entanto, possuem restrições em alguns países sobre as quantidades que podem ser consumidas e, tecnicamente, seu uso é restrito devido à sua limitada gama de cores e à sua abrasividade (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Pode-se perceber a importância destes excipientes que possuem múltiplas funções nos medicamentos. Os adjuvantes permitem a fabricação eficiente do comprimido, não afetam as características físicas e químicas nem a biodisponibilidade do princípio ativo, e por isso estão incluídos na maioria das composições farmacêuticas (FERRAZ, 2006). Os principais adjuvantes utilizados em comprimidos são mostrados na figura 6.

<b>TIPO</b>	<b>FUNÇÃO</b>	<b>EXEMPLOS</b>
Diluentes	Aumentar o volume de pós, permitindo a obtenção de uma forma farmacêutica de tamanho adequado; permitir a compressão direta*	Lactose, lactose spray-dried, manitol, amido, celulose microcristalina*, fosfato de cálcio dibásico diidratado*
Aglutinante (umectante)	Obter uma liga dos pós, permitindo a formação de grânulos	PVP, amido (goma), derivados da celulose, gelatina, amido pré-gelatinizado
Desagregante (desintegrante)	Promover ou acelerar a ruptura da forma farmacêutica, após contato com a água	Amido, celulose microcristalina, PVP modificado, amido pré-gelatinizado
Lubrificante	Facilitar a compressão, promover uma melhor ejeção do comprimido, diminuir a adesão do material às matrizes e punções e melhorar o escoamento de pós e granulados	Ácido esteárico, talco, estearato de magnésio
Promotores de reologia	Melhorar o escoamento dos pós e granulados	Derivados da sílica
Molhantes	Permitir um melhor contato da água com a forma farmacêutica, favorecendo a sua entrada para o interior e contato com o desintegrante	Lauril sulfato de sódio, polissorbatos

Figura 6: Principais adjuvantes utilizados em comprimidos pela indústria farmacêutica (FERRAZ, 2006).

### 1.0.5 Clorambucila

A clorambucila (ou clorambucil) é um composto derivado da mostarda nitrogenada e bastante utilizado na quimioterapia. É quimicamente conhecido como ácido 4- [bis (2-cloretil) amino] benzenobutanóico e possui a seguinte fórmula molecular:  $C_{14}H_{19}Cl_2NO_2$ . Embora seja menos tóxico que a maioria das outras mostardas nitrogenadas, foi listado como um conhecido agente cancerígeno (THE DRUGBANK DATABASE, 2018). Sua estrutura química em 3 dimensões é exibida na figura 7.

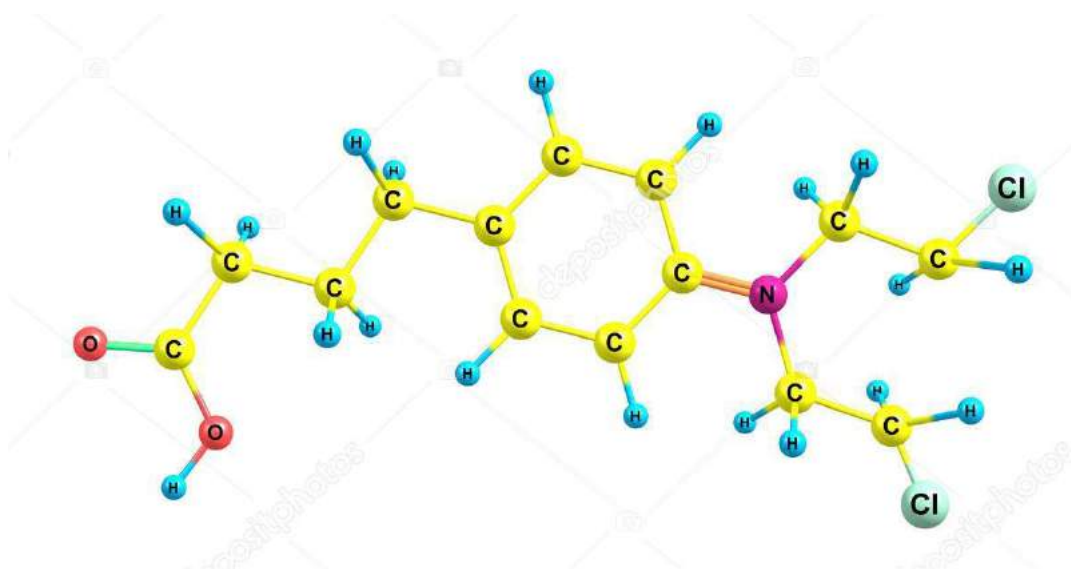


Figura 7: Estrutura química em 3 dimensões da molécula da clorambucila (DEPOSITPHOTOS, 2018).

O composto trata diferentes tipos de câncer, mas sua indicação predominante é para leucemia linfóide crônica, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin e para mielomas múltiplos. O clorambucil é extensamente metabolizado no fígado, principalmente para mostarda de ácido fenilacético. Os dados farmacocinéticos sugerem que a clorambucila, quando administrada por via oral, sofre uma rápida absorção gastrointestinal e depuração plasmática, sendo completamente metabolizada com excreção urinária extremamente baixa. Sua atividade imunossupressora é devido à sua supressão de linfócitos (THE DRUGBANK DATABASE, 2018).

O princípio ativo do Lekeuran pertence à família dos agentes alquilantes. Os agentes alquilantes são compostos altamente reativos capazes de formar ligações covalentes com regiões nucleofílicas de macromoléculas intracelulares, ou seja, são compostos que interagem quimicamente com o DNA e impedem a multiplicação de células malignas. Recebem esse nome devido à sua capacidade de adicionar bases alquiladas às bases nitrogenadas do DNA, resultando na sua fragmentação por enzimas de reparo, impedindo a sua síntese e transcrição. O dano gerado ao DNA induz a parada do ciclo celular e a apoptose celular (THE DRUGBANK DATABASE, 2018; ALMEIDA et al., 2005).

A clorambucila é um agente alquilante bifuncional. Agentes alquilantes bifuncionais param o crescimento do tumor através da ligação cruzada de bases de guanina nas cadeias de dupla hélice do DNA, atacando diretamente o DNA. São considerados mais tóxicos do que os agentes alquilantes monofuncionais, pois a alquilação de um único filamento de DNA pode

até ser reparada facilmente, mas as ligações cruzadas interfilamentares, produzidas por agentes alquilantes bifuncionais, exigem mecanismos mais complexos de reparação. Além disso, essas drogas adicionam metil ou outros grupos alquila em moléculas onde elas não pertencem, o que, por sua vez, inibe sua correta utilização por emparelhamento de bases e causa um *miscoding* do DNA (ALMEIDA et al., 2005; THE DRUGBANK DATABASE, 2018). A figura 8 exibe as ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA.

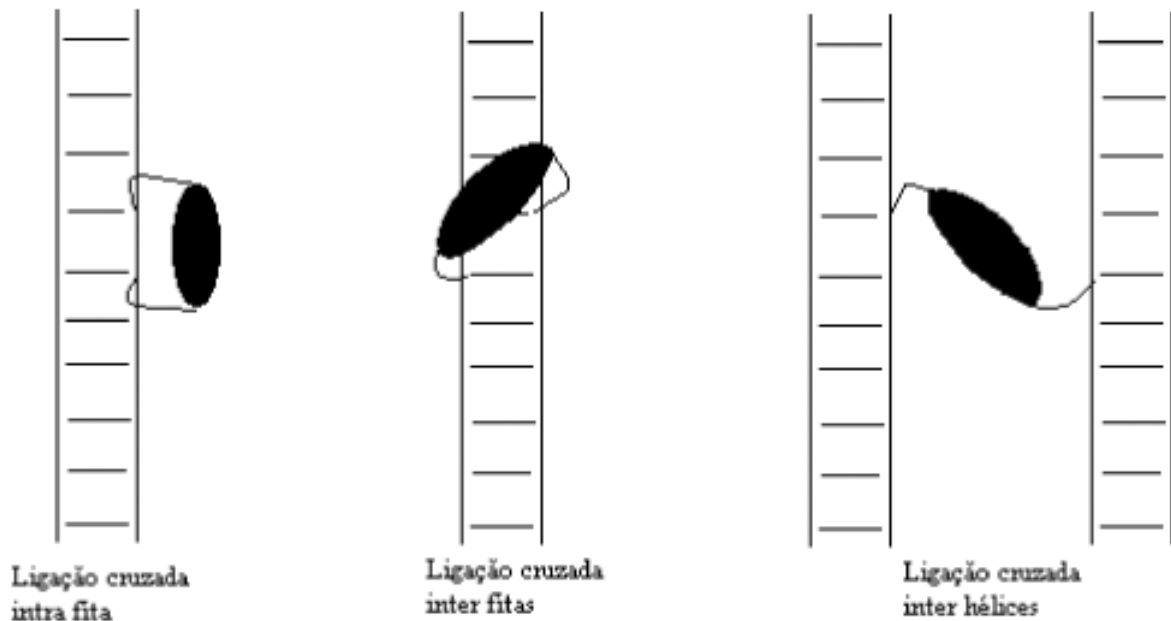


Figura 8: ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA (ALMEIDA et al., 2005).

## 2 OBJETIVOS

A estabilidade de um fármaco é definida como a capacidade da droga de se manter dentro das especificações estabelecidas que garantem sua identidade, força, qualidade e pureza durante os períodos de validade. De uma forma geral, os fármacos são sensíveis a fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, por isso, algumas condições de armazenamento são necessárias para a manutenção da integridade e reatividade do composto a fim de garantir suas características terapêuticas. Além disso, a compreensão da resposta das drogas e suas formulações para condições de estresse como pH, temperatura, luz, atmosfera oxidante e radiação são parte integrante do desenvolvimento de medicamentos estáveis. Esses testes de estabilidade fornecem informações sobre mecanismos de degradação, produtos potenciais de degradação, possíveis caminhos de degradação do fármaco, bem como interação entre o fármaco e os excipientes em produtos farmacêuticos. Os resultados são aplicados no desenvolvimento de um processo de fabricação adequado, selecionando embalagens adequadas, condições de armazenamento, prazo de validade do produto e datas de validade. As técnicas analíticas podem fornecer informações sobre armazenamento e estabilidade de produtos farmacêuticos.

Uma outra forma de avaliar a qualidade do fármaco é estudar sua capacidade de reter e estabilizar a droga carregada durante a circulação sanguínea e liberação no tecido alvo. A quantidade de revestimento de filme aplicada a um comprimido e, portanto, sua espessura está diretamente ligada com a aparência do produto, a opacidade do revestimento, o grau de proteção contra a degradação da luz de um componente ativo, o grau de proteção contra a permeação de umidade e a taxa de liberação do fármaco caso o revestimento do filme seja usado como uma barreira de difusão. Dessa forma, torna-se indiscutível sua importância para a determinação da qualidade do fármaco.

Por estas razões, os objetivos deste estudo são:

- Identificar os elementos que compõem o revestimento do Leukeran e suas respectivas concentrações;
- A estimativa da espessura do revestimento do Leukeran;
- Avaliar a estabilidade da clorambucila em pó e no comprimido de Leukeran quando exposta a várias condições de estresse, como temperatura e radiação ionizante para determinar a degradação, descrevendo mudanças de concentração de clorambucila, bem como os parâmetros de ligação-química;
- O cálculo da massa de clorambucila no quimioterápico Leukeran;
- Identificar os fragmentos da molécula da Clorambucila.



## 3 TÉCNICAS

### 3.1 Emissão de Raios-X Induzida por Prótons

#### 3.1.1 Introdução

A Emissão de Raios-X Induzida por Prótons, em inglês, Particle Induced X-ray Emission (PIXE) é uma técnica de análise de materiais multielementar e considerada não destrutiva. Foi proposta em 1970 por Johansson e Johansson (JOHANSSON et al., 1995). Ela utiliza íons monoenergéticos, com energia na ordem de alguns MeV, para induzir a emissão de raios X característicos de uma amostra, que posteriormente determina a composição atômica do material. O espectro de energia é formado por linhas espectrais dos raios X característicos dos elementos presentes nas amostras além do espectro contínuo proveniente da desaceleração da partícula carregada do feixe de radiação (TABACNIKS, 1997; SANTOS, 2009).

Os raios X são detectados por um detector de estado sólido, sensível a raios X. Toda uma eletrônica é responsável pelo processamento dos pulsos gerados, bem como a conversão do sinal analógico em digital. Quando associada a energia do raios X característico com a quantidade de pulsos referente ao pico, é possível calcular a concentração absoluta dos átomos que compõem a amostra (SANTOS, 2009). Dentre as características do método PIXE, as mais relevantes são: não destrutividade, rapidez, fácil preparação da amostra e determinação da maioria dos elementos ( $Z > 13$ ) (VERMA, 2007).

#### 3.1.2 Fundamentação teórica

O princípio do método PIXE consiste na ionização dos níveis atômicos através da interação das partículas carregadas, e durante esse processo vacâncias são geradas (VERMA, 2007). Uma vacância é definida como uma ausência de um elétron em uma dada camada eletrônica, e dependendo da energia dessa interação, a ionização pode ocorrer na camada externa ou em uma das camadas internas do átomo (PODGORŠAK, 2006).

Um átomo com uma vacância em sua camada interna está em um estado fortemente excitado, e tal átomo retornará ao seu estado fundamental através de uma série de transições eletrônicas. Elétrons de camadas atômicas mais altas preencherão as vagas das camadas mais baixas e a diferença de energia entre a camada inicial ou final, devido à energia de ligação dos elétrons, será emitida pelo átomo de duas maneiras: Radiativamente na forma de raio X característico, ou também chamado de raio X de fluorescência, e não radiativamente na forma de elétrons Auger, elétrons Coster-Kronig ou elétrons super Coster-Kronig (PODGORŠAK, 2006). Os processos de desexcitação que levam à emissão de raios-X característicos e elétrons Auger são exibidos figura 9.

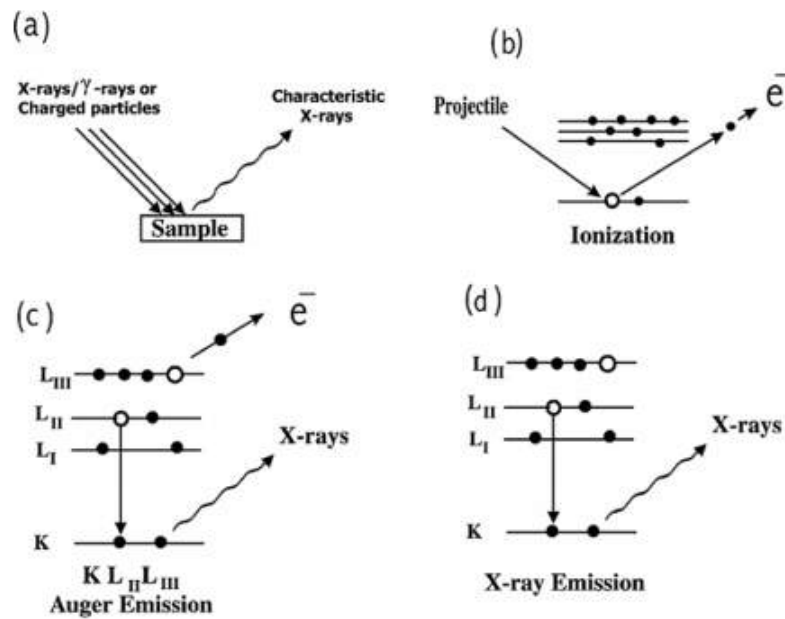


Figura 9: (a) Esquema do fenômeno de emissão de raios X; (b) Criação de vacâncias na camada interna por raios X ou partículas carregadas; (c) Processo de emissão de elétrons Auger; (d) Processo de emissão de raios X (VERMA, 2007).

### 3.1.2.1 Raios X característicos

As transições radiativas são comumente chamadas de radiação característica, uma vez que o comprimento de onda e a energia do fóton emitido são característicos do átomo em que o fóton originou-se (PODGORŠAK, 2006). A figura 10 exibe as possíveis transições entre níveis e subníveis eletrônicos.

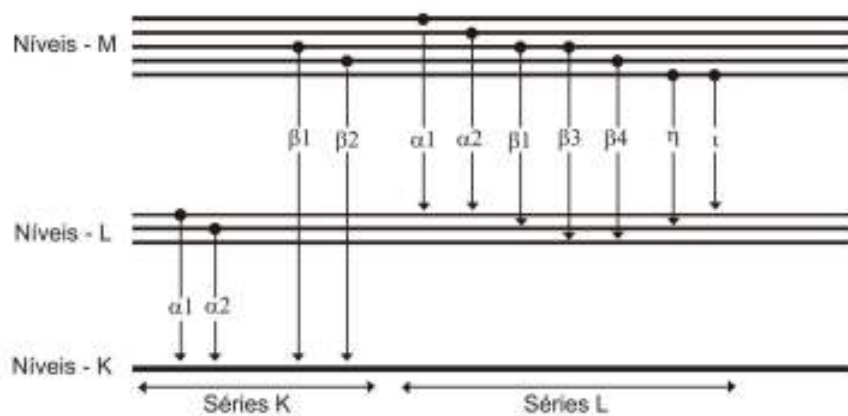


Figura 10: Esquema das principais transições dos elétrons entre níveis e subníveis eletrônicos (SANTOS, 2009).

### 3.1.3 Arranjo experimental

Os aceleradores tipo tandem são usados na análise PIXE. São máquinas com tensão máxima em torno de 1,5 MV que aceleram as partículas a uma energia máxima de 3 MeV, energia essa que é suficiente para a excitação das típicas amostras analisadas pela técnica PIXE. Um típico arranjo experimental pode ser visto na Figura 11. Um feixe monoenergético de íons, produzido por um acelerador, é colimado por um conjunto de fendas. Atrás da amostra encontra-se um copo de Faraday que está ligado a um integrador de cargas, sua principal função é monitorar a quantidade de partículas incidentes no alvo (SANTOS, 2007; SANTOS, 2009).

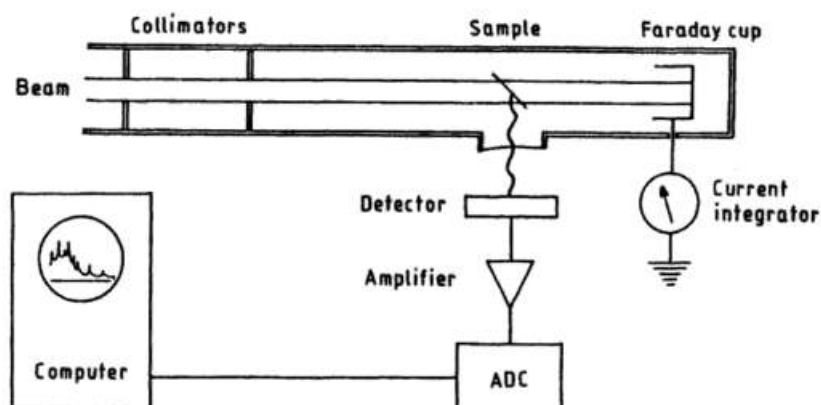


Figura 11: Imagem esquemática do arranjo experimental do método PIXE (JOHANSSON et al., 1995).

Os raios X característicos provenientes da interação do feixe com a amostra são coletados por um detector de estado sólido tipo Si(Li) ou Si-PIN. Esse detector é capaz de identificar linhas espectrais de raios X muito próximas e com alta resolução. Para garantir essa resolução, o cristal de Si(Li) é mantido em vácuo e refrigerado. Outro aspecto importante é que o tamanho do cristal define a quantidade de raios X detectados, e esses raios X absorvidos provocarão um sinal eletrônico no sistema de aquisição. Para evitar a entrada de partículas espalhadas no detector, é usado um material absorvedor de raios X entre a amostra e o detector. Além disso, o material absorvedor otimiza as condições experimentais (TABACNIKS, 2005; SANTOS, 2009).

## 3.2 Espectrometria por Retroespalhamento de Rutherford

### 3.2.1 Introdução

A técnica de Espectroscopia por Retroespalhamento de Rutherford, do inglês Rutherford Backscattering Spectroscopy (RBS), é um método analítico de análise de materiais que emprega feixe de íons monoenergéticos da ordem de MeV (geralmente entre 0,5 e 3 MeV/u). Foi pro-

posta há 50 anos por Tunkevich, que introduziu o sensor de partículas alfa no experimento de Geiger e Marsden (LIMA, 2008). Suas principais características são: técnica de análise rápida, não destrutiva, alta precisão e multielemental para elementos de Be a U (VERMA, 2007).

O princípio do método é baseado na detecção das partículas carregadas elasticamente espalhadas pelos núcleos da amostra analisada, a interação é essencialmente feita através da força Coulombiana. Isso deve-se ao fato da energia do feixe não ser alta, evitando-se reações nucleares. O RBS mede a energia de partículas carregadas (geralmente alfa) que são retrodifundidas (geometria de dispersão de  $180^\circ$ ) de uma amostra, e essa energia depende das razões das massas do projétil e do núcleo do átomo. Ainda, a quantidade de energia do íon incidente na colisão com os núcleos atômicos, perdida continuamente ao longo do percurso no interior da amostra, depende do número atômico  $Z$  de cada elemento presente no material alvo. Estes fatos alinhados permitem que a técnica RBS determine a composição atômica da amostra e seu perfil de profundidade (VERMA, 2007; TABACNIKS, 2005).

### 3.2.2 Fundamentação teórica

Para a técnica do RBS, os seguintes conceitos são importantes: fator cinemático, poder de frenamento e seção de choque diferencial. Todos esses conceitos serão apresentados nesta subseção.

#### 3.2.2.1 Fator cinemático

O fator cinemático  $K$  é dado pela razão da energia do íon incidente após o retroespalhamento e a energia do íon incidente antes da colisão, ou seja, é a fração energética cedida pelo íon ao colidir com os átomos da amostra (VERMA, 2007).

Vejamos, quando uma partícula de massa  $M_1$ , deslocando-se com velocidade constante, colide elasticamente com uma partícula estacionária  $M_2$ , ela transfere parte da sua energia para a partícula em repouso. Para o caso do retroespalhamento de Rutherford, temos que a massa  $M_1$  é referente à partícula  $\alpha$  e a massa  $M_2$  ao átomo do material de estudo. Além disso, a energia da partícula incidente tem um valor adequado (limite superior de 2 a 3 MeV) de forma que seja maior do que a energia de ligação dos átomos do material, que não haja reações e ressonâncias nucleares e que garanta uma colisão essencialmente elástica (CHU, 2012).

Aplicando as leis de conservação de energia e de momento, obtém-se a expressão para o fator cinemático  $K$ :

$$K = \frac{E_1}{E_0} = \left( \frac{(M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{\frac{1}{2}} + M_1^2 \cos^2 \theta}{M_1 + M_2} \right)^2 \quad (1)$$

Onde,

- $M_1$  é a massa da partícula incidente;

- $M_2$  é a massa do alvo;
- $\theta$  é o ângulo de retroespalhamento em relação à trajetória de incidência do feixe.

Analisando a fórmula acima percebe-se que, à medida que a massa  $M_2$  aumenta, menor será a quantidade de movimento transferida para o átomo-alvo e com isso a energia da partícula retroespalhada aproxima-se assintoticamente da energia da partícula incidente. Dessa forma, pode-se concluir que o RBS é muito mais útil para distinguir dois elementos leves do que para distinguir dois elementos pesados, e por isso o RBS possui boa resolução de massa para elementos leves e uma baixa resolução de massa para elementos pesados. Outra informação relevante dada pela fórmula é a condição de máxima transferência de energia, e consequentemente um poder maior de resolução. E essa condição ocorre para  $\theta = 180^\circ$  (VERMA, 2007).

### 3.2.2.2 Poder de frenamento

Quando uma partícula incidente penetra em um material, ela perde sua energia interagindo com átomos da amostra. Essa perda de energia ocorre através de colisões elásticas com núcleos dos átomos da amostra (poder de frenamento nuclear) e através de colisões inelásticas com elétrons (poder de frenamento eletrônico). A perda de energia nuclear predomina na região de baixa velocidade, mas a perda de energia eletrônica é muito maior em altas velocidades. Dessa forma, na faixa de energia do método RBS, a perda de energia, em sua maioria, é devido à interação dos íons com os elétrons no material (VERMA, 2007).

A perda de energia ( $S$ ) da partícula, no material absorvedor, por unidade de comprimento é definida na fórmula abaixo:

$$S = -\frac{dE}{dx} = \lim_{\Delta x \rightarrow 0} -\frac{\Delta E}{\Delta x} \quad (2)$$

### 3.2.2.3 Seção de choque diferencial

A probabilidade de interação entre o íon do feixe incidente com o átomo da amostra é dada pela seção de choque diferencial ( $\Gamma$ ). E o seu valor está diretamente ligado ao tamanho do núcleo do átomo, visto que isso implica em número maior de partículas retroespalhadas acolhidas pelo detector. No entanto, a área útil de detecção é referente ao ângulo sólido  $\Omega$ . Sendo assim, o diferencial de  $\Gamma$  é a medida importante (CHU, 2012).

Sendo  $Q$  o número total de partículas incidentes e  $dQ$  o número de partículas retroespalhadas detectadas dentro de um ângulo sólido  $d\Omega$ , a seção de choque diferencial pode ser definida como:

$$\frac{d\Gamma}{d\Omega} = \frac{1}{Nt} \left( \frac{dQ}{Q} \frac{1}{d\Omega} \right) \quad (3)$$

Onde,

- $N$  é o número de átomos por volume;
- $t$  é a espessura da amostra;

### 3.2.3 Arranjo experimental

O arranjo experimental típico está esquematizado na figura 12. Um feixe monoenergético de  $\text{He}^+$ , depois de passar por um quadrupolo de localização magnética, é colimado por um conjunto de fendas e um analisador magnético. As partículas retroespalhadas, após o choque com a amostra, são detectadas em um ângulo traseiro. Após a detecção, o sinal passa por um tratamento de dados, no qual é pré-amplificado, amplificado e digitalizado (TABACNIKS, 1997).

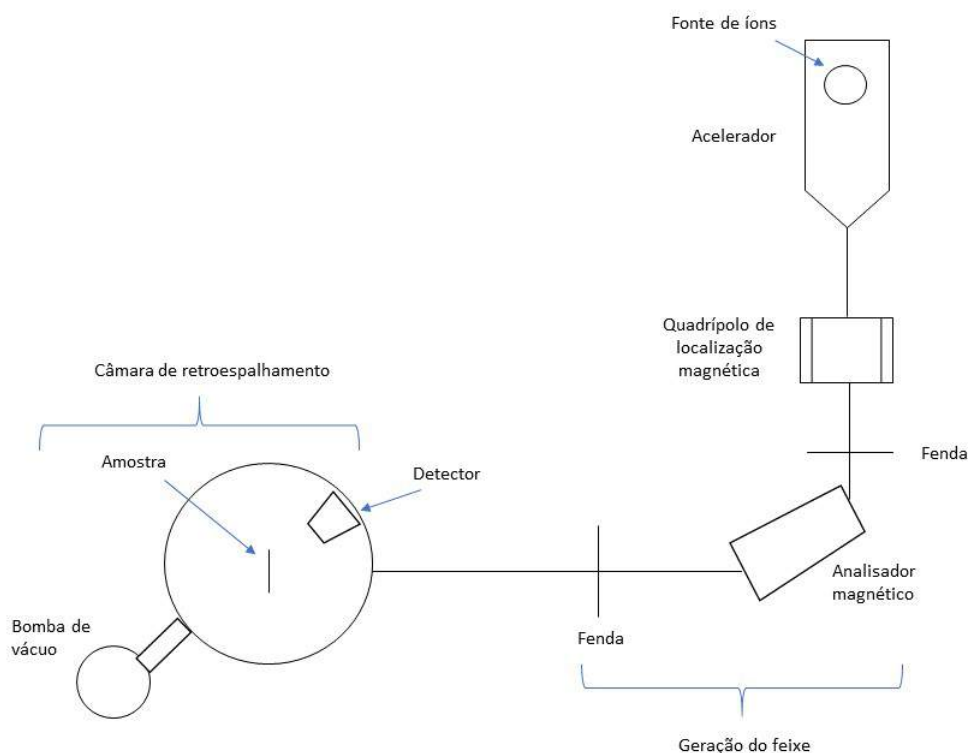


Figura 12: Diagrama esquemático de um sistema de espectrometria de retroespalhamento.

## 3.3 Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X

### 3.3.1 Introdução

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foi proposta nos anos 60 pelo Prof. Kai Siegbahn. É uma técnica não destrutiva que se baseia no efeito fotoelétrico (veja a subseção 3.3.2.1) para fornecer informações atômicas e moleculares da superfície de uma amostra. Em XPS, a amostra pode tanto estar na forma sólida ou líquida, e possuir dimensões

pequenas. No momento da análise, a superfície do espécime é irradiada por um feixe monocromático de raios X na faixa de 200-2.000 eV, e os átomos da superfície, após a transferência direta de energia para os elétrons, emitem os fotoelétrons. Os espectros são adquiridos medindo simultaneamente a energia cinética e a quantidade de elétrons que escapam de uma profundidade de 2 a 20 camadas atômicas (menos de 100 Å). Por fim, a energia desse fotoelétron é medida e o átomo emissor, com exceções do hidrogênio e hélio, pode ser identificado a partir da energia eletrônica característica (VERMA, 2007).

Como se trata de uma técnica muito sensível e com um espectro de alta resolução, é possível quantificar a composição atômica relativa e as informações químicas das ligações atômicas dos elementos presentes na superfície do material. Também é possível identificar o estado químico quando a precisão da medição é da ordem de 0,1 eV e pequenas mudanças na energia de ligação (VERMA, 2007).

### 3.3.2 Fundamentação teórica

Lidando com a técnica de XPS, os seguintes conceitos básicos são importantes: efeito fotoelétrico e os elétrons Auger, Coster-Kronig e super Coster-Kronig. Esses conceitos serão discutidos abaixo.

#### 3.3.2.1 Efeito Fotoelétrico

Uma das possíveis formas de interações entre um fóton e um elétron orbital de um átomo absorvedor é chamada de efeito fotoelétrico. Nesta interação, o fóton é inteiramente absorvido pelo elétron, que é ejetado com uma energia cinética dada pela equação 4. O elétron emitido da superfície do material absorvedor é comumente chamado de fotoelétron (EISBERG et al., 1994; PODGORŠAK, 2006).

$$E_0 = h\nu - E_1 \quad (4)$$

Onde,

- $E_0$  é a energia cinética do fotoelétron;
- $h\nu$  é a energia do fóton incidente absorvido;
- $E_1$  é o trabalho necessário para remover o elétron do átomo.

A grandeza  $E_1$  representa o trabalho, realizado pelo fotoelétron, necessário para superar os campos eletromagnéticos dos outros átomos do material e as perdas de energia devido às colisões internas do fotoelétron (EISBERG et al., 1994). A interação fotoelétrica entre um fóton com energia  $h\nu$  e um elétron da camada K de um átomo é mostrada esquematicamente na figura 13.

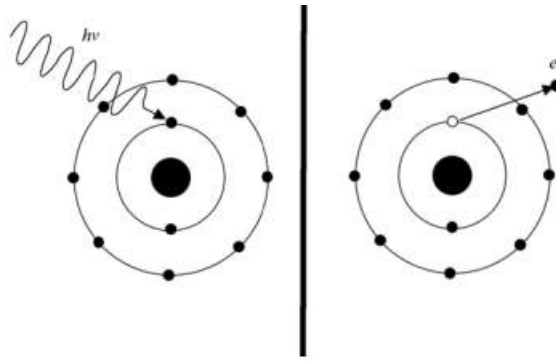


Figura 13: Representação esquemática do efeito fotoelétrico. Respectivamente, os instantes antes e depois da interação (PODGORŠAK, 2006).

### 3.3.2.2 *Elétron Auger, Coster-Kronig e super Coster-Kronig*

Como foi mencionado na subseção 3.1.2, as transições permitidas entre órbitas eletrônicas não necessariamente resultam em raios X característicos, elas também podem resultar em fenômenos não radiativos. Isto é, um átomo excitado, ao sofrer o processo de desexcitação, não libera o excesso de energia pela emissão de raios X característicos, e sim transfere a energia para outros elétrons orbitais que são ejetados do átomo como elétrons Auger, elétrons Coster-Kronig ou elétrons super Coster-Kronig, como mostrado na figura 14 (TAUHATA et al., 2013; PODGORŠAK, 2006).

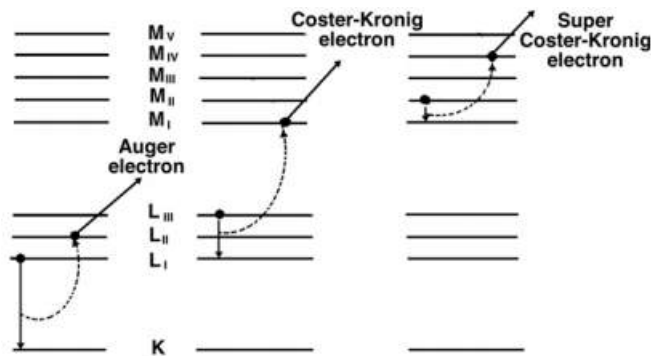


Figura 14: Representação esquemática do efeito Auger, do efeito Coster-Kronig e do efeito super Coster-Kronig (PODGORŠAK, 2006).

O efeito Auger ocorre quando a transição eletrônica primária ocorre entre níveis de energias diferentes, e o fóton proveniente dessa desexcitação é absorvido por um elétron da mesma camada, e esse elétron é chamado de elétron Auger. No efeito Coster-Kronig a transição eletrônica dá-se entre subníveis da mesma camada enquanto a energia é transferida para um elétron de uma camada superior que recebe o nome de elétron Coster-Kronig. Por fim, no efeito



super Coster-Kronig o elétron novamente faz uma transição entre subníveis da mesma camada, no entanto, a energia é transferida para um elétron da mesma camada, que no final do processo é nomeado elétron super Croster-Kronig (PODGORŠAK, 2006).

### 3.3.3 Arranjo experimental

A figura 15 ilustra a instrumentação básica de um sistema XPS. O aparelho XPS consiste em uma fonte de raios X monocromática, um suporte de amostras acoplado ao manipulador de precisão, um analisador de energia cinética dos elétrons que os dispersa de acordo com sua energia e mede o fluxo desses elétrons para uma determinada energia, câmaras de ultra-alto vácuo para permitir que os fotoelétrons emitidos sejam analisados sem interferência de colisões e um detector de elétrons (VERMA, 2007).

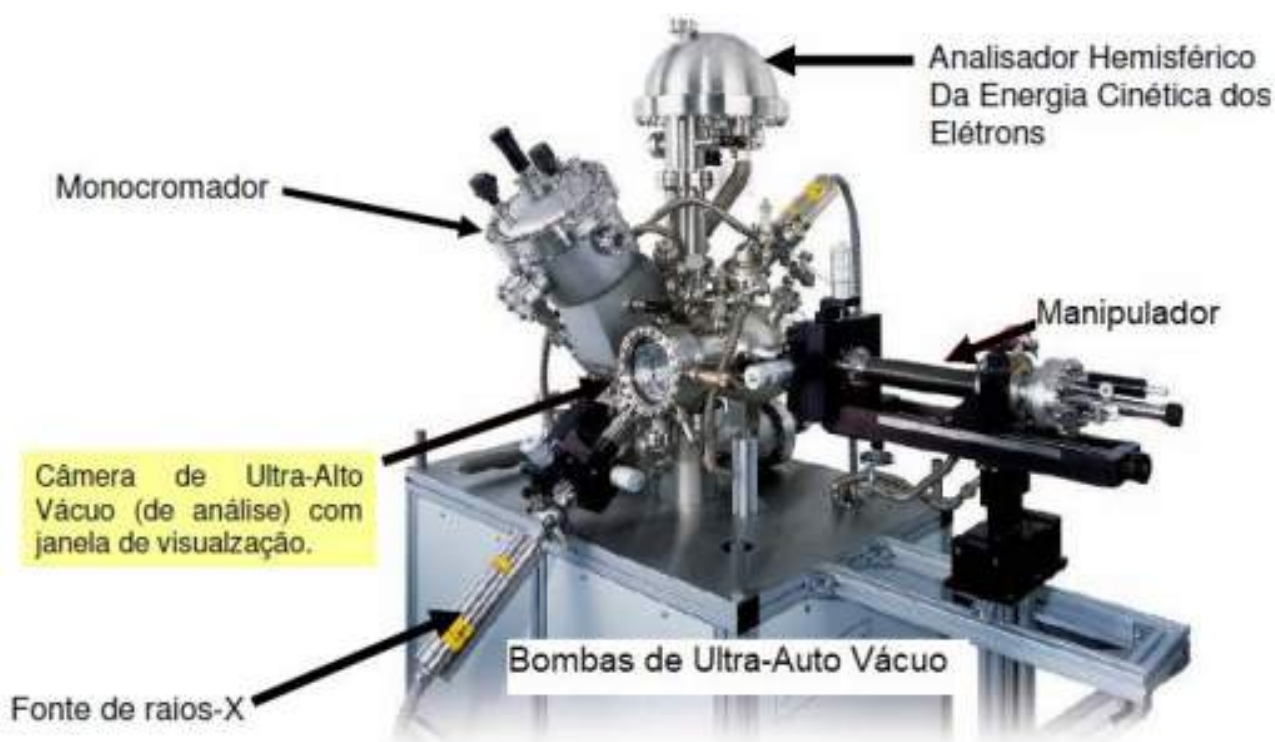


Figura 15: Imagem ilustrativa da instrumentação usada na técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios X (MENEZES, 2018).

## 3.4 Espectrometria de Massas por Íons Secundários

### 3.4.1 Introdução

Nas últimas duas décadas, a espectrometria de massa tornou-se uma das técnicas centrais da química analítica e da análise de macromoléculas biológicas. Trata-se de uma ferramenta analítica que determina a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons, usada para obter informações da

estrutura atômica da amostra e seu peso molecular. Tal técnica deve atender a dois requisitos básicos: primeiro, as moléculas, geralmente existentes no estado líquido ou sólido, devem ser transferidas no estado gasoso e no vácuo para um analisador de massa; segundo, as moléculas neutras precisam adquirir uma ou várias cargas para serem separadas e detectáveis no analisador de massa (GROSS, 2006; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Os princípios que delimitam a técnica de espectrometria de massa vieram das leis do eletromagnetismo e da mecânica clássica. Tais princípios baseiam-se na simples ideia de que as velocidades de dois íons, com mesma carga e criados no mesmo instante de tempo, terão uma relação direta com as massas dos íons, ou seja, quanto menor a massa do íon maior será a sua velocidade. Dessa forma, íons mais leves chegarão primeiro ao detector. As características da espectrometria de massa que a coloca em uma posição de destaque entre os métodos analíticos são: sensibilidade, limites de detecção, velocidade e diversidade de suas aplicações. A figura 16 mostra um típico espectro de massa (OLIVEIRA, 2009; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

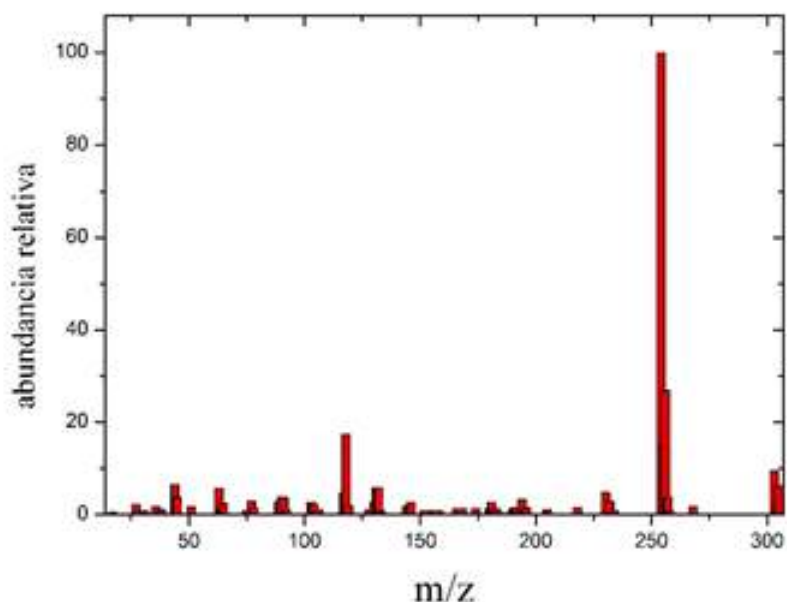


Figura 16: Espectro de massa por ionização de elétrons do composto clorambucila (THE DRUGBANK DATABASE, 2018).

### 3.4.2 Fundamentação teórica

Com base nos conceitos descritos na subseção anterior, a velocidade de um íon acelerado por um potencial elétrico  $V$  ao longo de uma distância  $L$ , na sua transmissão por um tubo de tempo de voo de comprimento  $d$ , onde o campo elétrico é nulo, será proporcional ao inverso da raiz quadrada da razão  $m/z$ , conforme a equação abaixo:

$$v = \sqrt{\frac{2LV}{m/z}} \quad (5)$$

Os íons são separados de acordo com suas razões massa/carga ( $m/z$ ) e atingem o detector em tempos distintos. Para cargas  $z_1 = z_2 = z_3 = 1$ , vale a expressão:

$$t = \frac{d}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2V}} \quad (6)$$

Um outro fator importante na espectrometria de massa é a resolução, definida de acordo com a fórmula

$$R = \frac{M}{\Delta M} \quad (7)$$

Onde,

- $R$  é a resolução;
- $M$  é a massa do fragmento;
- $\Delta M$  é a diferença de massa entre um fragmento de massa  $M$  e um fragmento de massa mais alta que possa ser resolvida pelo espectrômetro.

Os espectrômetros de massa lineares têm como desvantagem uma baixa resolução para massas de moléculas complexas e grandes, que é consequência de alguns fatores como a duração do pulso de ionização e a dispersão de energia cinética dos íons (GROSS, 2006). A figura 17 exibe o esquema de um espectrômetro de massa do tipo tempo de voo linear.

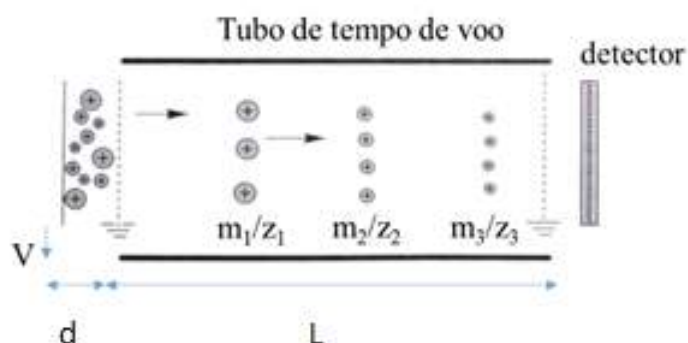


Figura 17: Representação esquemática de um espectrômetro de massa linear por tempo de voo.

Como a resolução é proporcional ao tempo de travessia do íon até o detector, o aumento do tamanho do tubo de voo e o uso de espelhos chamados reflectrons é uma opção para a melhorar a resolução.

O reflectron, figura 18, é composto por uma série de grades e eletrodos onde é aplicado um aumento progressivo de potencial repulsivo. Quando os íons entram no tubo de voo, são desacelerados por um campo elétrico, e mudam sua direção de movimento retornando à região livre de campo. A dispersão da energia cinética é corrigida, pois os íons com maior energia cinética chegam primeiro e permanecem por mais tempo no reflectron, ao contrário dos íons com menor energia, que penetram menos e passam mais rápido pelo dispositivo. Dessa forma, íons com a mesma razão  $m/z$  e diferentes energias cinéticas atingem o detector ao mesmo tempo (GROSS, 2006).

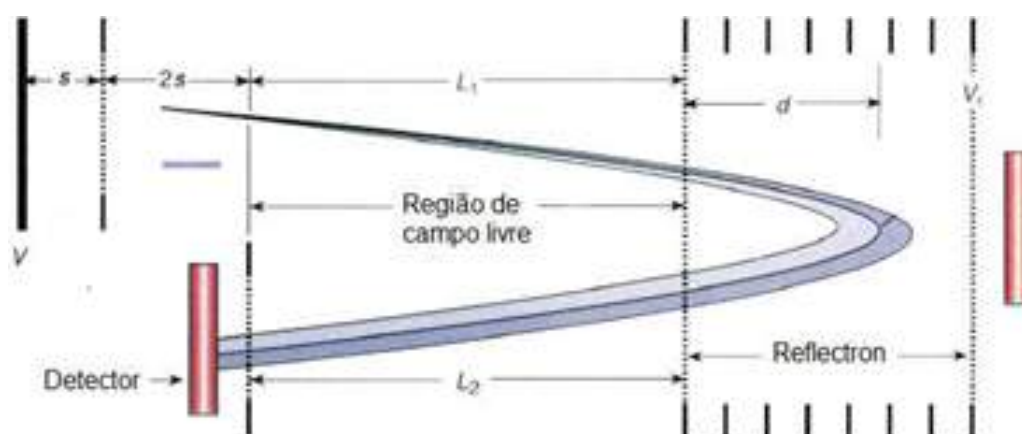


Figura 18: Representação esquemática de um espectrômetro de massa por tempo de voo com um refletor de íons (GROSS, 2006).

### 3.4.3 Arranjo experimental

O espectrômetro de massas é constituído basicamente pelos seguintes componentes:

- Unidade de agente ionizante: o agente ionizante pode ser laser, fótons, elétrons e íons pesados. Nas experiências selecionamos o íon pesado, cobre com carga +4, gerado por uma fonte de íons negativos e acelerador tipo tandem;
- Fonte de ionização: local onde ocorre a conversão das moléculas neutras da amostra em íons na fase gasosa. As fontes de ionização mais comuns são: ionização por elétrons (EI), ionização química (CI), ionização por electrospray (ESI), ionização por dessorção-electrospray (DESI), ionização por íons secundários (SIMS), ionização por dessorção a laser (LDI), ionização por dessorção a laser assistido por matriz (MALDI), ionização química à pressão atmosférica (APCI). Neste trabalho utilizamos a fonte de ionização SIMS;
- Analisador de massa: região onde os íons são separados de acordo com suas razões massa/carga ( $m/z$ ). Campos elétricos e magnéticos são utilizados em analisadores de massas

para controlar o movimento dos íons. Entre os analisadores de massas mais utilizados estão quadrupolar, triploquadrupolar, tempo de voo (TOF), orbitrap e o ion trap;

- Detector: O detector de espectrômetro de massas é composto por coletor de íons que produz uma corrente proporcional aos íons emergentes do analisador de massas, e o detector mede abundâncias desses íons. Os multiplicadores de elétrons, os copos de Faraday e os fotomultiplicadores são exemplos dos detectores mais comuns na espectrometria de massa;
- Processador de sinais: todo o aparato eletrônico que possibilita mostrar, armazenar e processar os espectros de massa.

Um esquema com o típico arranjo experimental utilizado na espectrometria de massa é exibido na figura 14.



Figura 19: Componentes de espectrômetro de massa.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritas as aquisições de dados, a preparação das amostras e o tratamento e interpretação dos dados para todas as técnicas analíticas utilizadas neste trabalho.

### 4.1 PIXE

#### 4.1.1 Aquisição dos dados

As medidas foram realizadas no Centro Atômico de Bariloche, no acelerador TANDEM de 1,7 MV, equipado com uma linha de micro-ondas e uma estação RC43 da National Electros-tatic. O acelerador, além do método PIXE, pode ser usado para outras técnicas analíticas, como a Espectrometria de Retroespalhamento de Rutherford (RBS), Análise de Detecção de Recuo Elástico (ERDA), Análise por Reação Nuclear (NRA), canalização de íons em monocristais (Channeling). A figura 20 exibe a câmara PIXE do acelerador de partículas utilizado.



Figura 20: Imagem da câmara PIXE do Centro Atômico de Bariloche.

O sistema, exemplificado na figura 21, possui 9 metros de extensão e é equipado com um NEC Pelletron 5SHD que contém duas fontes de íons negativos, sendo uma do tipo SNICS (Source of Negative Ions by Cesium Sputtering) que fornece a maioria dos íons, e outra do tipo Alphatross (rádio frequência) com câmara de troca de carga. Além disso, o sistema possui um detector Sirius SD localizado a uma distância de 15 cm do porta amostra. A posição da amostra é visualizada com ajuda de uma câmera CCD.

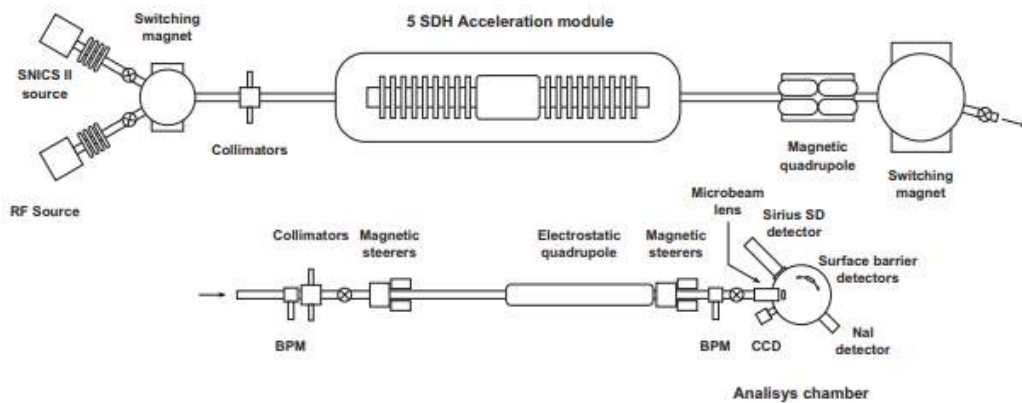


Figura 21: Imagem esquemática do acelerador e linha usada para análise PIXE no Centro Atômico de Bariloche (LIMANDRI et al., 2014).

A linha PIXE do Centro de Bariloche tem em sua composição o detector de raios X SiriusSD® SDD e2v que possui janela de polímero ultrafino, com área nominal de 30 mm<sup>2</sup>. Como as janelas de polímero (como a Moxtek AP3.3) fornecem uma sensibilidade de baixa energia melhorada, em comparação com as janelas de berílio mais grossas e robustas, o SiriusSD consegue identificar elementos com baixo número atômico, como o átomo de carbono (RAYSPEC, 2018). A figura 22 exibe um gráfico que compara a transmissão de raio X de outros detectores com a transmissão do Sírius.

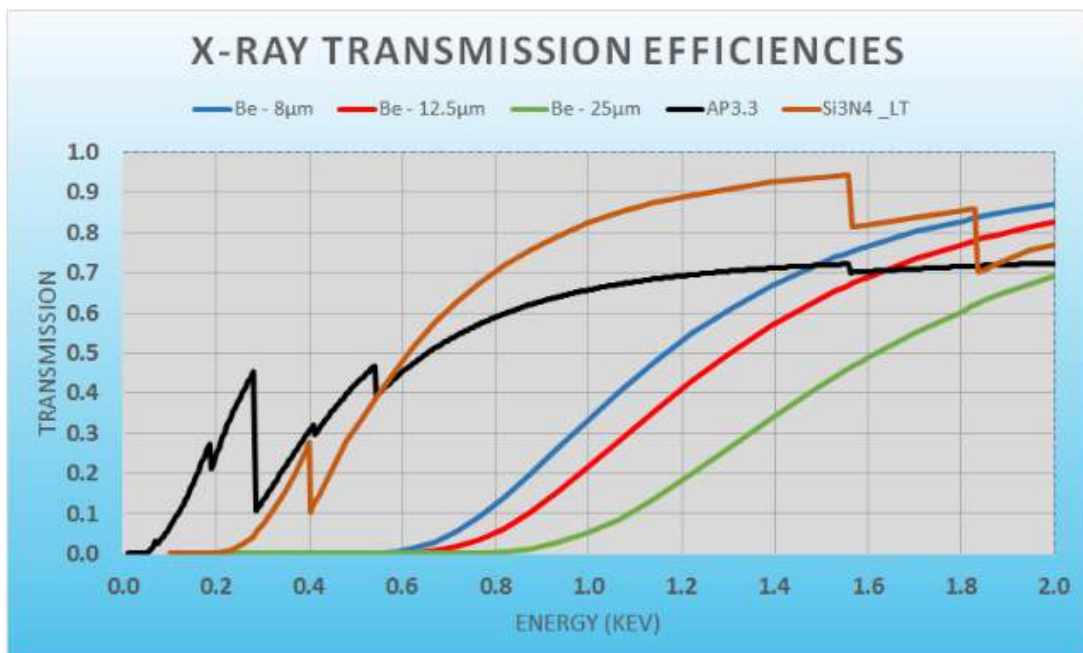


Figura 22: Gráfico da transmissão de raios X para diversos detectores de raios X, incluindo o SiriusSD® SDD e2v (RAYSPEC, 2018).

#### 4.1.2 Preparação das amostras

Todo o procedimento para o preparo das amostras foi realizado no Centro Atômico de Bariloche. Foram utilizados pastilhadores e uma prensa hidráulica para a preparação de 8 pastilhas diferentes, que são exibidas na figura 23. Para o processo de irradiação as amostras foram colocadas em um porta-amostra, e foi utilizada uma fita de carbono dupla face para garantir a aderência das pastilhas.

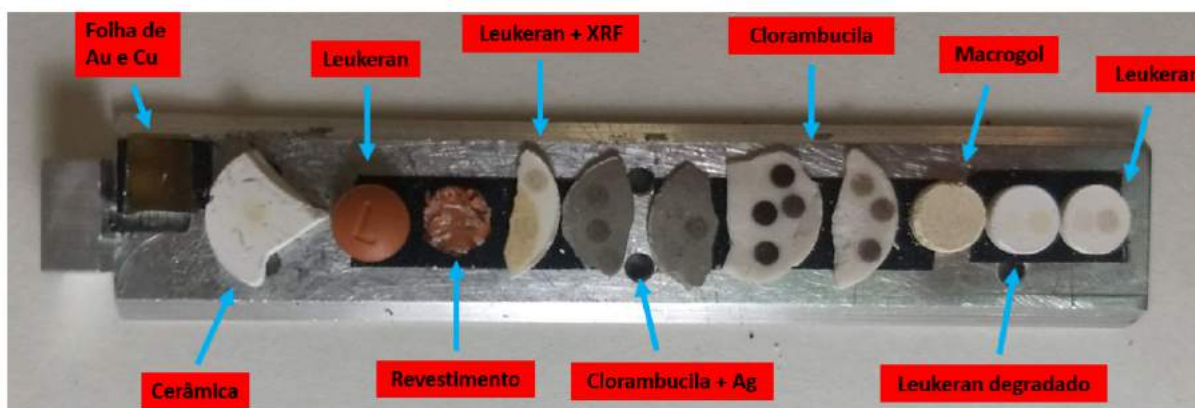


Figura 23: Porta-amostra com as respectivas amostras analisadas.

As amostras foram organizadas da seguinte forma: a primeira pílula, da esquerda para direita, é o quimioterápico Leukeran na sua forma comercial; a segunda pílula trata-se apenas do revestimento do comprimido Leukeran; a terceira é o composto Leukeran que foi moído e prensado para formar uma pastilha, após ter sido analisado pela técnica de Fluorescência de Raios X (XRF) no Laboratório de Impacto de Fótons e Elétrons do Instituto de Química da UFRJ; a quarta e a quinta pílula são o composto clorambucila em formato de pastilha após ter sido misturado com prata; a sexta e a sétima pílula são a clorambucila pura na forma de pastilha; a oitava pílula é o comprimido Leukeran sem o revestimento depois de ter sofrido uma degradação através do aumento de sua temperatura; a nona pílula é o excipiente Macrogol utilizado na composição do Leukeran; por fim, a última pílula é o comprimido Leukeran sem o seu revestimento.

Para fins didáticos iremos nos referir a cada amostra através de um número, e esse número é equivalente a sua posição no porta-amostra. A tabela 1 apresenta essa relação.

#### 4.1.3 Tratamento e interpretação dos dados

Para análise dos espectros foi utilizado o software GUPIX. Trata-se de software versátil para o tratamento dos espectros PIXE de diferentes tipos de amostras, sejam elas finas ou espessas, que foram excitadas por prótons, deuteronos ou partículas alfa. O GUPIX, além de identificar cada pico, extrai suas intensidades e as converte em concentrações através de um mé-



Tabela 1: Tipo de amostra e seu respectivo número.

Número	Amostra
1	Comprimido Leukeran na forma comercial
2	Revestimento do comprimido Leukeran
3	Pastilha do comprimido Leukeran (sem o revestimento) após degradação por radiação
4	Clorambucila + Ag
5	Clorambucila + Ag
6	Clorambucila pura
7	Clorambucila pura
8	Comprimido Leukeran (sem o revestimento) após degradação por temperatura
9	Excipiente Macrogol
10	Comprimido Leukeran sem o revestimento

todo de padronização do valor-H. Após o fit do espectro, o software gera um arquivo de texto com as informações sobre os elementos encontrados na amostra e suas respectivas concentrações. Para ajudar no entendimento dessas informações, os dados gerado foram dispostos em um planilha no programa Microsoft Office Excel.

## 4.2 RBS

### 4.2.1 Aquisição dos dados

As aquisições da técnica RBS foram feitas utilizando a mesma linha da análise PIXE no mesmo laboratório do Centro Atômico de Bariloche, que foi descrito na seção anterior. A única diferença é o sistema detecção. As medições da composição elementar da amostra usando RBS foram realizadas com um feixe de prótons de 3 MeV, e o detector posicionou-se a  $15^\circ$  da linha do feixe como mostra a figura 24.

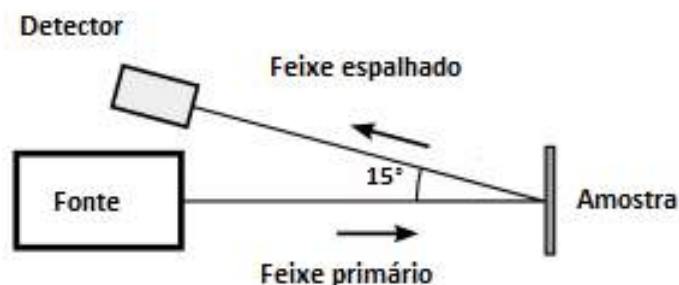


Figura 24: Esquema do arranjo experimental da linha RBS do Centro Atômico de Bariloche.

#### **4.2.2 Preparação da amostra**

A preparação da amostra foi a mesma utilizada na análise PIXE, e ela foi descrita na seção anterior. Vale ressaltar que apenas a amostra número 2 (tabela 1) foi discutida neste trabalho.

#### **4.2.3 Tratamento e interpretação dos dados**

O software SIMNRA foi utilizado para as simulações dos espectros gerados após a análise por RBS. A partir dos valores obtidos na análise PIXE, sobre as concentrações atômicas dos elementos do revestimento Leukeran, foi possível calcular utilizando o software SIMNRA a densidade do revestimento e simular as perdas de energias das partículas na amostra.

Para as simulações do poder de frenamento e do cálculo da espessura do revestimento foi usado o software SRIM. Dessa vez, as informações obtidas após o fit do espectro de RBS no software SIMNRA foi utilizado para que o SRIM fornecesse as informações de interesse.

### **4.3 XPS**

As análises de superfície foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia de Fotoelétrons, localizado no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Janeiro, e o equipamento utilizado para as medidas foi o ESCALAB 250Xi projetado pela Thermo Scientific. O ESCALAB 250Xi, exemplificado na figura 25, é utilizado em medições rotineiras de alta velocidade e totalmente controlado por computador.



Figura 25: Espectrômetro ESCALAB 250Xi do Laboratório Multiusuário de Espectroscopia de Fotoelétron utilizado para análise XPS.

O espectrômetro é equipado com uma fonte de radiação monocromatizada de  $Al K\alpha$  com energia de 1486.6 eV calibrada com padrões cobre, ouro e prata, além de um analisador de energia de elétrons hemisférico. A pressão dentro da câmara de vácuo foi mantida abaixo de  $4 \times 10^{-9}$  Torr. Para os espectros de varredura completa, chamados de *survey*, a energia de passagem foi definida para 100 eV, enquanto que para os espectros de alta resolução das regiões de maior interesse identificadas no *survey* foram utilizados 25 eV.

#### 4.3.1 Preparação da amostra

Um frasco de cloramucila em pó foi fornecido ao laboratório para a investigação. De acordo com as instruções do fabricante, o frasco deveria ser armazenado dentro de uma geladeira a fim de manter o seu estado conservado. No entanto, o intuito do experimento era determinar as diferenças físico-químicas do fármaco quando submetido a degradação por temperatura. Dessa forma, a amostra de cloramucila foi dividida em 5 grupos. O primeiro grupo

foi exposto à temperatura ambiente (NT), o segundo grupo foi colocado em um forno a 40 °C durante 1 hora (40 °C-1), o terceiro e o quarto grupo foram colocadas no forno a 50 °C, sendo que aquele durante 1 hora (50 °C-1) e este durante um período de 2 horas (50 °C-2). O último grupo da amostra também foi colocado no forno, mas a uma temperatura de 60 °C (60 °C-1).

Por tratar-se de uma técnica bem sensível, qualquer impureza ou contaminação que estiver na superfície da amostra serão detectadas e contabilizadas juntamente com os elementos presentes na amostra. Por isso, é necessário a utilização de luvas para o manuseio das amostras e também é fundamental limpar o porta-amostra com acetona para remover qualquer resquício de material de outras análises. Após a limpeza do porta-amostra, uma fita de carbono grafite dupla face é colada e em seguida as amostras são colocadas por cima da fita. A fita de carbono ajuda na aderência e evita o carregamento da amostra.

### 4.3.2 Tratamento e interpretação dos dados

Os espectros obtidos foram tratados através do software *Avantage Data System for Surface Analysis Software*, da própria Thermo Scientific fabricante do ESCALAB. O software usa uma mistura de funções Lorentzianas e Gaussianas para gerar o espectro final, essa mistura pode ser dada da soma, produto ou convolução das funções. Além disso, o software usa um algoritmo para suavização das funções critérios de avaliação. A figura 26 mostra um espectro obtido durante as análises de XPS no Instituto de Química.

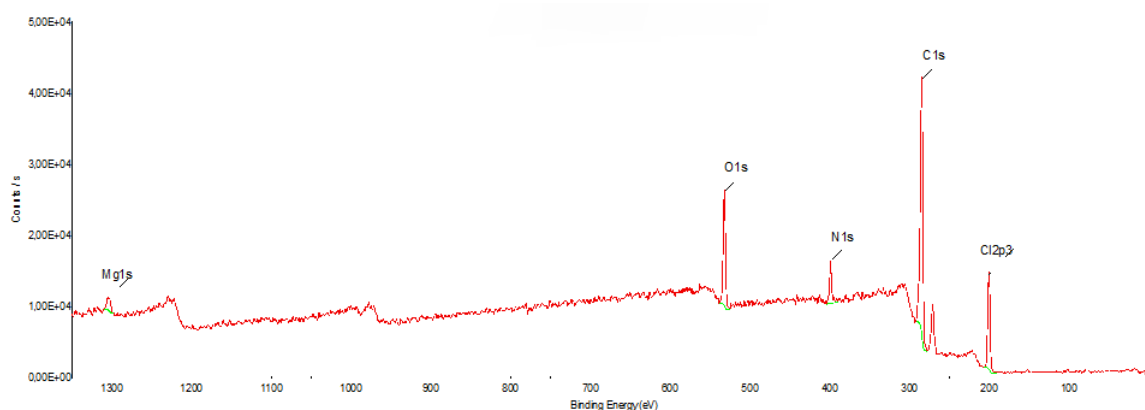


Figura 26: Exemplo de espectro Survey gerado pelo software Avantage da Thermo Scientific, onde cada elemento visualizado na amostra pela técnica XPS é evidenciado.

Depois do espectro pronto, a primeira ação realizada foi a correção dos valores de energia de ligação para todos os espectros obtidos, tendo como referência a energia de ligação do nível 1s do carbono. Em seguida, foi realizada a análise elementar de cada amostra a partir de seus espectros survey. A identificação dos picos de níveis de camada interna teve como base o próprio banco de dados do software Avantage. Por fim, para cada espectro de alta resolução, foram feitos ajustes Lorentzianos e Gaussianos para calcular as porcentagens atômicas, sempre

levando em consideração os fatores de sensibilidade atômicos correspondentes.

## 4.4 SIMS-TOF

### 4.4.1 Aquisição dos dados

As medidas da análise SIMS-TOF foram adquiridas no Laboratório de Implantação Iônica (LII) do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IF-UFRGS). A linha de SIMS, figura 27, foi implementada recentemente e grande parte do sistema já foi otimizado.

A detecção é feita por tempo de voo usando um detector tipo placa de canais com alta resolução temporal. A aquisição funciona por repetição de ciclos (150  $\mu$ s permite chegar até massas de 2 kDa) com um sinal de início próximo da aplicação da voltagem de extração e múltiplos sinais de pausa. Os íons secundários atravessam quase 1 m, passando por um espelho eletrostático com dois estágios, até chegarem ao detector. A fonte de íons primários não é pulsada. Desta maneira, é observada uma variação no número de contagens ao longo dos experimentos. Utilizando correntes próximas à 1 nA, é possível obter espectros com aquisição de 1 s.



Figura 27: Imagem da linha SIMS do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A espectrometria de massa de íons secundários no tempo de voo (SIMS-TOF) é ex-

tremamente sensível à superfície e possui seletividade química superior, tornando essa técnica analítica de superfície única na identificação de estruturas químicas e na exploração da superfície. No modo de espectrometria de massas SIMS a produção de íons da amostra, íons da molécula mãe e fragmentos iônicos, chamados de íons secundários, é induzida pela colisão de um íon pesado. No presente estudo o íon secundário foi o  $\text{Cu}^{4+}$ , que colide com uma energia de 6 MeV em uma amostra sólida, o comprimido Leukeran. O princípio da técnica SIMS está exibido na figura 28.

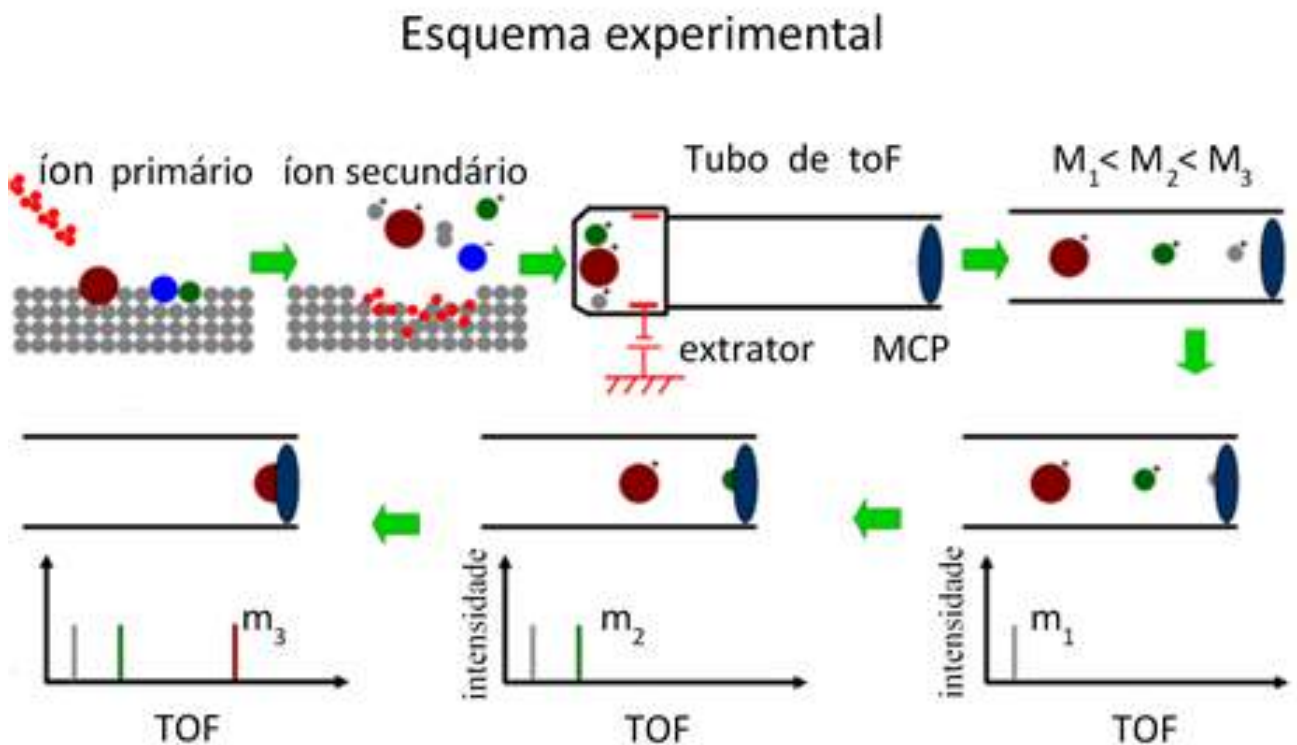


Figura 28: Princípio da técnica de espectrometria de massa de íons secundários no tempo de voo.

#### 4.4.2 Preparação da amostra

A preparação das amostras do SIMS-TOF foi feita da seguinte forma: o revestimento do Leukeran foi retirado, e em seguida o comprimido foi moído até virar um pó. Depois disso, os compostos foram depositados em um porta amostra como exibe a figura 29.

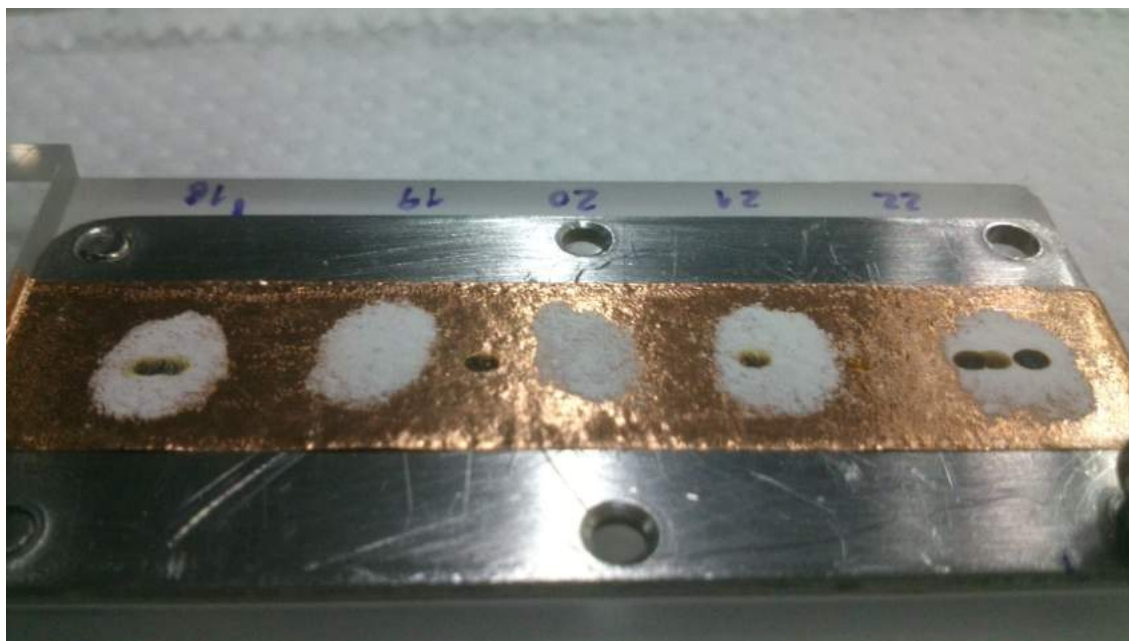


Figura 29: Amostras do Leukeran usadas na análise SIMS.

#### 4.4.3 Tratamento e interpretação dos dados

Os dados obtidos foram tratados e plotados utilizando-se o software Origin. No Origin foi feito o cálculo das massas dos fragmentos a partir de seus respectivos tempos de voo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados das quatro técnicas analíticas de física atômica usadas para a caracterização do composto quimioterápico Leukeran. Cada técnica será discutida individualmente em cada seção.

### 5.1 PIXE

A análise PIXE teve como objetivos: identificar os elementos presentes nas amostras, calcular suas concentrações e tornar possível o cálculo da massa de clorambucila presente nos comprimidos Leukeran. Os objetivos foram alcançados, e eles serão apresentados e discutidos nesta seção.

#### 5.1.1 Concentração dos elementos

Os resultados obtidos para as concentrações de cada elemento químico nas amostras irradiadas serão discutidos individualmente nas subseções abaixo. Para fins comparativos, as concentrações dos elementos serão exibidas através de sua porcentagem na proporção da cada amostra. Tais medidas foram calculadas pela razão da concentração de cada elemento pelo somatório da concentração de todos os elementos da amostra.

##### 5.1.1.1 *Leukeran na forma comercial*

As tabelas 2 e 3 mostram as proporções de cada elemento observado no comprimido Leukeran em sua forma comercial, ou seja, com o seu revestimento. Já a tabela 4 mostra as concentrações dos elementos para uma pastilha feita apenas com o revestimento do comprimido. Inicialmente foi feita uma medida (tabela 2) para uma corrente de 0,1 nC com uma coleta de carga de 0,1  $\mu$ C em um determinado ponto da amostra. Em seguida, foi realizada uma segunda medida (tabela 3) irradiando novamente a amostra no mesmo ponto e com os mesmos valores de corrente e carga. A irradiação da pastilha do revestimento também foi realizada com valores iguais de corrente e coleta de carga.

Tabela 2: 1a-Leukeran

C	O	Al	Si	S	Cl	Ti	Fe-K	Fe-L
47,74%	37,39%	0,12%	0,06%	0,05%	0,44%	1,20%	4,33%	8,67%

Tabela 3: 1b-Leukeran

C	O	Al	Si	S	Cl	Ti	Fe-K	Fe-L
47,71%	38,19%	0,14%	0,05%	0,04%	0,42%	1,17%	4,17%	8,10%



Tabela 4: 2a-Revestimento

C	O	Al	Si	S	Cl	Ti	Fe-K	Fe-L
49,73%	37,99%	0,11%	0,07%	0,04%	0,41%	1,44%	5,85%	4,38%

É possível notar que não houve diferença significativa nas concentrações dos elementos após a degradação pelo feixe de radiação, principalmente do nosso objeto de estudo que é o cloro. Além disso, não ocorreram mudanças físicas visíveis na superfície do comprimido após a incidência do feixe de prótons.

A grande quantidade de carbono e oxigênio nas amostras provém dos compostos químicos que compõem os excipientes e o revestimento do comprimido. O ferro, quando comparado com os outros elementos, apresenta valores de concentrações expressivos. Ele é encontrado nos óxidos de ferro amarelo e vermelho, que compõem o revestimento do Leukeran.

#### 5.1.1.2 Pastilhas de Leukeran após a análise por XRF

As tabelas 5, 6 e 7 exibem as concentrações dos elementos detectados pela técnica PIXE. Essas amostras são pastilhas feitas com o comprimido Leukeran, sem o seu revestimento, após terem sido investigadas pela técnica de Fluorescência de raio X, em inglês, X-ray fluorescence (XRF). Seu aspecto amarelado é resultado da degradação da amostra após a análise por XRF.

Nos três casos foram feitas medidas com uma corrente de 0,1 nC para uma coleta de carga de 0,1  $\mu$ C, a diferença é que as tabelas 5 e 6 mostram os resultados da análise feita na zona das pastilhas que tinham sido irradiadas anteriormente na técnica de XRF. Já os resultados da tabela 7 são referentes às medidas feitas na zona que não foi irradiada.

Tabela 5: 3a-Leukeran + XRF

C	O	Al	Si	S	Cl
54,26%	45,12%	0,11%	0,13%	0,01%	0,37%

Tabela 6: 3b-Leukeran + XRF

C	O	Al	Si	Cl
54,59%	44,81%	0,10%	0,13%	0,36%

Tabela 7: 3c-Leukeran + XRF

C	O	Al	Si	Cl
54,45%	44,91%	0,13%	0,13%	0,38%

Nenhuma diferença significativa na composição química das amostras foi observada, mesmo quando o feixe incidia sobre zonas irradiadas e não irradiadas. No entanto, mudanças

físicas na superfície da pastilha tornaram-se visíveis e corroboram com as mudanças observadas após a análise por XRF. Mais um aspecto interessante é a detecção do elemento alumínio na amostra, que é utilizado na síntese da clorambucila.

### 5.1.1.3 Clorambucila + Ag

Para evitar a degradação da superfície da amostra devido ao feixe de radiação, foi adicionado um isolante (prata) à clorambucila pura para as confecções das pastilhas. As tabelas 8, 9, 10 e 11 apresentam os resultados das concentrações dos elementos químicos das amostras. Cada tabela é referente a uma posição diferente do feixe na amostra, como mostra a figura 30.

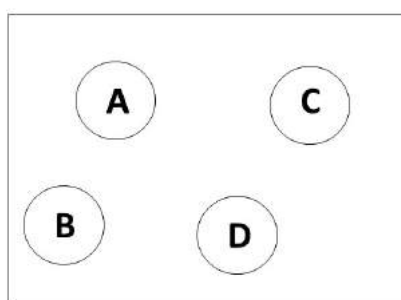


Figura 30: Esquema das regiões de incidência do feixe de prótons na primeira irradiação da pastilha de clorambucila + Ag.

Tabela 8: 4a-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-L
51,65%	8,91%	0,08%	11,42%	27,94%

Tabela 9: 4b-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-L
51,99%	8,74%	0,14%	11,53%	27,60%

Tabela 10: 4c-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-K	Ag-L
30,06%	6,34%	0,13%	12,27%	29,43%	21,76%

Tabela 11: 4d-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-K	Ag-L
28,94%	7,10%	0,33%	11,48%	31,19%	20,95%

Os pontos A e B, tabelas 8 e 9 respectivamente, foram expostos a uma quantidade de carga elétrica de  $0,1 \mu\text{C}$ . Já o ponto C, referente à tabela 10, foi exposto a uma carga de  $0,05 \mu\text{C}$  e o ponto D, com as medidas exibidas na tabela 11, recebeu uma quantidade de carga de  $0,025 \mu\text{C}$ .

Comparando os resultados pode-se perceber que para os mesmos valores de carga não há diferenças significativas entre as concentrações dos elementos das amostras, basta observar as tabelas 8 e 9. Entretanto, uma pequena variação na coleta de carga ocasiona diferenças significativas entre as proporções dos elementos na amostra. Para valores de cargas menores, foi possível detectar a contribuição dos raios X característicos da prata para as camadas K e L, e por se tratarem de medidas relativas, as proporções dos outros elementos diminuiriam.

A fim de investigar com mais detalhes a influência da quantidade de carga e concentrações dos elementos, foram realizadas mais três medidas em diferentes posições, como mostra a figura 31.

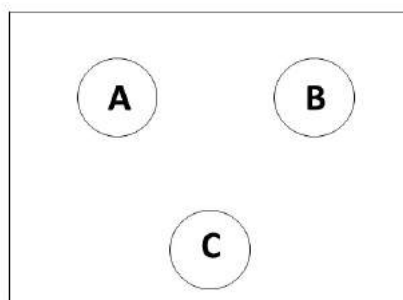


Figura 31: Esquema das regiões de incidência do feixe de prótons na segunda irradiação da pastilha de clorambucila + Ag.

A região A, tabela 12, foi exposta a uma quantidade de carga elétrica de  $0,01 \mu\text{C}$ . A região B, tabela 13, foi exposta a uma carga de  $0,005 \mu\text{C}$ . E a região C, tabela 14, recebeu uma quantidade de carga de  $0,2 \mu\text{C}$ .

Tabela 12: 5a-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-L
46,36%	8,88%	0,18%	15,12%	29,46%

Tabela 13: 5b-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-L
55,80%	12,28%	0,30%	11,60%	20,02%

Tabela 14: 5c-Clorambucila + Ag

C	O	Al	Cl	Ag-K	Ag-L
39,55%	8,00%	0,12%	12,20%	18,59%	21,54%

Nota-se que ocorreram mudanças significativas na proporção dos elementos para diferentes valores de carga elétrica.

#### 5.1.1.4 Clorambucila

Para a pastilha de clorambucila pura foram escolhidas quatro posições diferentes para análise da amostra, como mostra a figura 32. Cada região A, B, C e D recebeu uma quantidade de carga diferente, sendo elas respectivamente, 0,1, 0,2, 0,05 e 0,02  $\mu\text{C}$ .

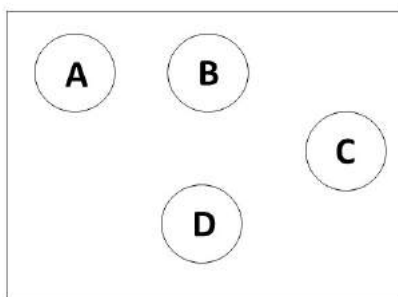


Figura 32: Esquema das posições de incidência do feixe de prótons na primeira irradiação da pastilha de clorambucila.

As tabelas abaixo indicam os valores encontrados para as concentrações de cada elemento. Como era esperado, os valores não apresentaram mudanças relevantes e a concentração do cloro se manteve constante para os diferentes de carga elétrica. Novamente apenas alterações físicas foram percebidas na superfície das amostras.

Tabela 15: 6a-Clorambucila

C	O	Al	Cl
66,51%	10,70%	0,14%	22,65%

Tabela 16: 6b-Clorambucila

C	O	Al	Cl
66,55%	10,79%	0,08%	22,57%

Tabela 17: 6c-Clorambucila

C	O	Al	Cl
68,23%	8,97%	0,03%	22,77%

Tabela 18: 6d-Clorambucila

C	O	Al	Cl
68,29%	9,33%	0,11%	22,27%

Uma segunda pastilha com a clorambucila pura foi feita e novas medidas foram realizadas para três regiões de incidência A, B e C. A figura 33 mostra um esquema com as áreas de atuação do feixe. Dessa vez, a região A recebeu uma quantidade de carga de  $0,01 \mu\text{C}$ , a região B uma quantidade de carga de  $0,005 \mu\text{C}$  e a região C  $0,0025 \mu\text{C}$ .

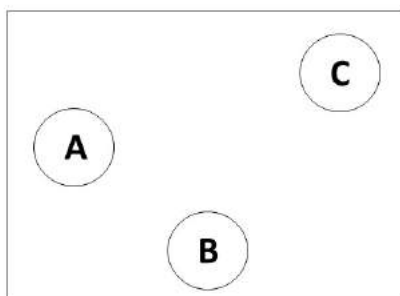


Figura 33: Esquema das posições de incidência do feixe de prótons na segunda irradiação da pastilha de clorambucila.

As tabelas 19, 20 e 21 exibem os resultados encontrados para regiões A, B e C, respectivamente. E mais uma vez os resultados indicam que a radiação não provoca alterações na concentração dos elementos químicos das amostras.

Tabela 19: 7a-Clorambucila

C	O	Al	Cl
69,30%	8,62%	0,09%	22,00%

Tabela 20: 7b-Clorambucila

C	O	Al	Cl
67,15%	10,46%	0,12%	22,28%

Tabela 21: 7c-Clorambucila

C	O	Cl
65,83%	11,41%	22,76%

#### 5.1.1.5 *Leukeran sem o revestimento após a degradação por temperatura*

Medidas foram realizadas em uma pastilha elaborada a partir do quimioterápico Leukeran sem o seu revestimento após ter sido exposto a uma variação positiva de temperatura. Foram escolhidas duas regiões para a incidência do feixe, sendo que a região A recebeu uma quantidade de carga de  $0,05 \mu\text{C}$  e a região B recebeu  $0,01 \mu\text{C}$ . As tabelas 22 e 23 apresentam os dados, respectivamente, das regiões A e B.

Tabela 22: 8a-Leukeran degradado

C	O	Al	Si	Cl
52,29%	46,77%	0,18%	0,22%	0,54%

Tabela 23: 8b-Leukeran degradado

C	O	Al	Si	Cl
54,45%	45,02%	0,06%	0,09%	0,37%

Comparando-se os resultados é possível constatar diferenças entre as concentrações dos elementos das amostras, principalmente do alumínio, do silício e do cloro. Essa diferença é um indicativo, quando consideramos os resultados anteriores e que não há o revestimento na pílula, de que a temperatura provoca uma degradação no fármaco, e que os primeiros elementos a sofrerem os efeitos são os destacados anteriormente.

#### 5.1.1.6 *Excipiente Macrogol*

Para investigar os danos da radiação sobre o excipiente do Leukeran, algumas pastilhas foram feitas utilizando o composto químico Macrogol. Dois pontos de interesse sobre a amostra foram escolhidos. O primeiro ponto recebeu uma carga elétrica de  $0,01 \mu\text{C}$ , e o segundo foi exposto a  $0,1 \mu\text{C}$ . As tabelas 24 e 25, na devida ordem, mostram os resultados obtidos após a análise.

Tabela 24: 9a-Macrogol

C	O	Al
53,20%	46,69%	0,11%

Tabela 25: 9b-Macrogol

C	O	Al
53,24%	46,65%	0,11%

Os resultados mostram que a radiação não provoca a degradação dos compostos, tendo em vista que não ocorreram mudanças nas concentrações para as diferentes regiões.

#### 5.1.1.7 *Leukeran sem o revestimento*

Também foram feitas medidas com a pílula do Leukeran sem a sua película. Novamente duas regiões na superfície da amostra foram escolhidas para a incidência do feixe de radiação. A primeira delas, a região A, foi exposta a uma quantidade de carga de  $0,01 \mu\text{C}$ . A segunda delas, a região B, recebeu um quantidade de carga de  $0,1 \mu\text{C}$ . As tabelas abaixo apresentam ambos os resultados por essa ordem.

Tabela 26: 10a-Leukeran sem o revestimento

C	O	Al	Si	Cl
53,45%	45,74%	0,19%	0,12%	0,51%

Tabela 27: 10b-Leukeran sem o revestimento

C	O	Al	Si	Cl
53,79%	45,62%	0,13%	0,12%	0,34%

As concentrações do cloro e alumínio apresentaram pequenas diferenças com o aumento da quantidade de carga. Essa diferença evidencia a importância do revestimento para o comprimido, pois sem ele o composto fica mais suscetível a danos causados seja pela radiação ou pela exposição a temperatura.

#### 5.1.2 **Massa da clorambucila no Leukeran**

Além dos cálculos para as concentrações dos elementos químicos nas amostras, os resultados da análise PIXE nos permite estimar a quantidade em massa da clorambucila em cada comprimido Leukeran analisado. Trata-se de um cálculo estequiométrico que utiliza as proporções de cloro obtidas em cada amostra para obter os valores de massa de clorambucila. O intuito é comparar os resultados com o valor de  $2\text{mg}$  fornecido, em bula, pelo fabricante do quimioterápico.

Para realizar o cálculo, primeiro transforma-se os valores das concentrações de cloro em valores de massa. Para isso, basta dividir cada valor por 100 e multiplica-los por 100 mg. Como a massa molar da clorambucila é conhecida e a quantidade de massa de cloro na molécula também, basta realizar um cálculo estequiométrico, respeitando essas proporções, para obter o

valor de massa de clorambucila em cada pílula do quimioterápico. A equação 6 foi usada para calcular as quantidades de massa.

$$m_c = \frac{m_{Cl}M}{M_{Cl}} \quad (7)$$

Onde,

- $m_c$  é a massa da clorambucila no leukeran;
- $m_{Cl}$  é a massa de cloro no leukeran;
- $M$  é a massa molar da clorambucila;
- $M_{Cl}$  é a quantidade em massa de cloro na clorambucila.

A tabela 28 apresenta os resultados dos cálculos de massa da clorambucila nas amostras do Leukeran e suas discrepâncias relativas.

Tabela 28: Massa da clorambucila nas Amostras do Leukeran

Amostras	Massa Cloro (mg)	Massa Clorambucila (mg)	Discrepância relativa
1a	0,44	1,90	5%
1b	0,41	1,77	11%
3a	0,36	1,56	22%
3b	0,36	1,56	22%
3c	0,38	1,64	18%
8a	0,50	2,16	8%
8b	0,36	1,56	22%
10a	0,47	2,03	2%
10b	0,32	1,39	31%

As amostras 1a e 1b possuem o revestimento, e elas apresentaram uma discrepância baixa em relação ao valor fornecido pelo fabricante. No entanto, as amostras que não possuem o revestimento apresentaram valores significativos de discrepância. Esses resultados corroboram com o que já foi discutido até aqui. Eles evidenciam a importância do revestimento para a garantia de qualidade do fármaco, e indicam que, possivelmente, há flutuações nas quantidades atômicas dos elementos ocasionadas por aglomerados locais do composto após degradação por radiação ou temperatura.



## 5.2 RBS

A técnica RBS foi utilizada para estimar a espessura do revestimento do fármaco Leukeran. Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos nessa seção.

### 5.2.1 Espessura do revestimento

O espectro do revestimento do Leukeran gerado após a análise por RBS é exibido na figura 34. Para o fit do espectro, foram usadas as informações das concentrações dos elementos identificados no revestimento do Leukeran encontradas pela análise PIXE. Os elementos usados para o fit do espectro foram: carbono, oxigênio, silício e o ferro.

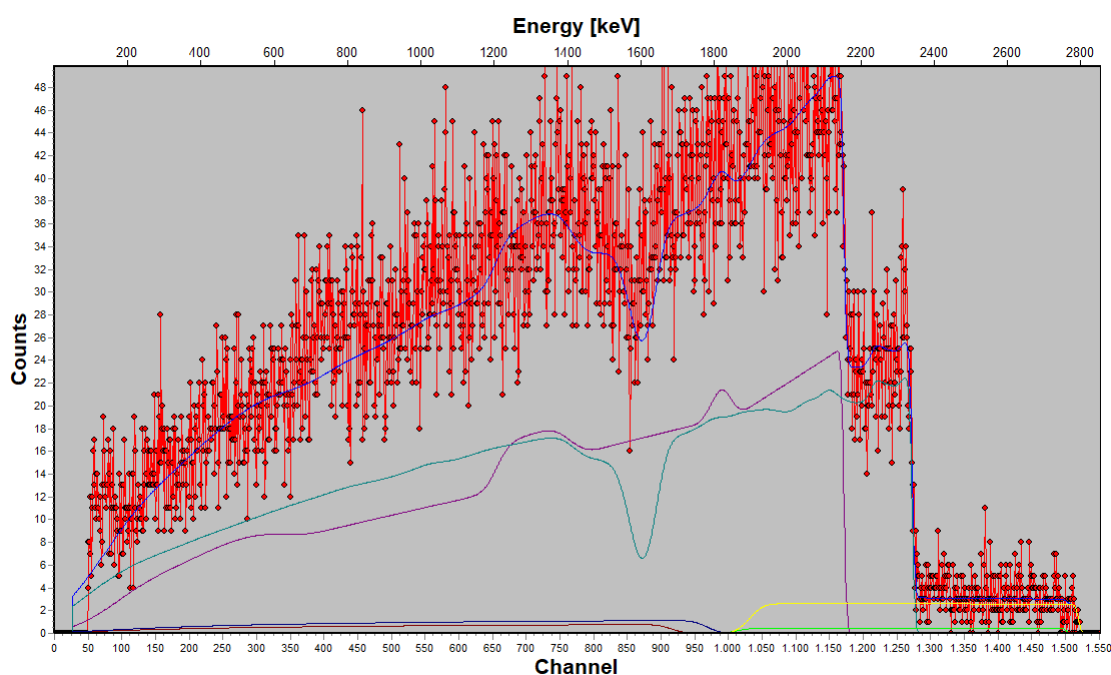


Figura 34: Espectro RBS do revestimento do comprimido Leukeran.

Dadas as informações das concentrações dos elementos de interesse ao software SIMNRA, e após o fit do espectro, ele calcula a perda de energia e a distância percorrida dos íons incidentes. No entanto, a unidade dessa distância é dada em  $\text{átomos}/\text{cm}^2$  e isso não facilita os cálculos. Dessa forma, foi utilizado o software SRIM para fazer a análise.

O SRIM gera uma tabela que relaciona a energia do íon, em keV, com seu poder de frenamento, em  $\text{keV}/\mu\text{m}$ . Essa tabela é gerada a partir dos percentuais atômicos dos elementos que constituem a amostra, bem como a sua densidade. Como todas essas informações eram conhecidas, não tivemos dificuldades em realizar a análise. A tabela 29 fornece essas informações geradas pelo software SRIM.

Tabela 29: Valores da energia do íon e seus respectivo poder de frenamento para revestimento do Leukeran.

Energia do íon (keV)	S (keV/ $\mu\text{m}$ )
1000	42,64
1100	40,61
1200	38,62
1300	36,68
1400	34,96
1500	33,41
1600	32,00
1700	30,72
1800	29,54
2000	27,44
2250	25,24
2500	23,39
2750	21,82
3000	20,46
3250	19,29
3500	18,25
3750	17,33
4000	16,51

Para alvos finos, a variação de energia do íon é suficientemente pequena, então possibilita calcular a perda de energia pela diferença da energia inicial das partículas incidentes e a energia das partículas emergentes após a colisão. Faremos uso dessa condição para calcular o poder de frenamento das partículas no revestimento.

Sabemos que a energia das partículas incidentes é a energia do feixe, ou seja, igual a 3000 keV. O software SIMRA calculou a perda de energia total como sendo de 412 keV. Assim, a energia das partículas emergentes após a colisão é igual a 2588 keV. Consultando a tabela 29 vemos que os cálculos do SRIM fornece o poder de frenamento referente a energia de 3000 keV, no entanto não temos essa informação para a energia de 2588 keV. Para obtermos esse valor, plotamos um gráfico com os dados completos da análise do software SRIM. A figura 35 exhibe o gráfico.

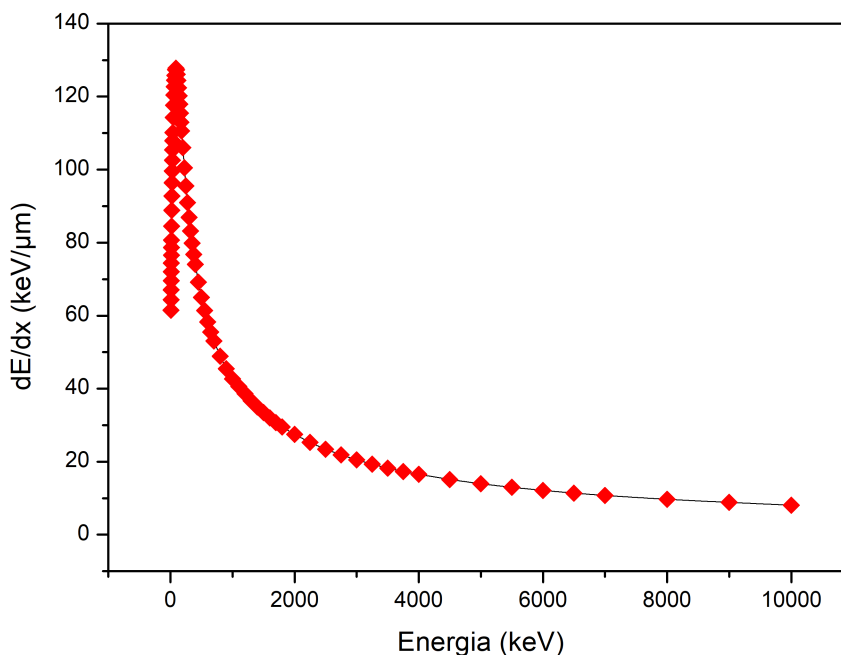


Figura 35: Gráfico da energia do íon e seus respectivo poder de frenamento no revestimento do fármaco Leukeran.

Através do gráfico foi possível calcular o poder de frenamento relacionado à energia de 2588 keV. O valor encontrado foi de 22,85 keV/μm. Pela a tabela 29 vemos que o poder de frenamento referente à energia de 3000 keV é igual a 20,46 keV/μm. Usando as aproximações para alvos finos, e calculando a média do poder de frenamento das partículas incidentes com o poder de frenamento das partículas emergentes encontra-se o valor do poder de frenamento referente à energia de 2588 keV, e essa quantidade foi igual a 21,65 keV/μm.

Com todas as informações necessárias, basta usarmos a equação (4) para calcular a distância percorrida pelas partículas. Substituindo na equação os valores de energia e do poder de frenamento, encontra-se o valor da espessura do revestimento, que é aproximadamente igual a 19 μm. Trata-se de um valor satisfatório, pois possui a ordem de grandeza dos valores encontrados na literatura para espessuras de revestimentos dos fármacos.

### 5.3 XPS

Como dito anteriormente, a clorambucila foi exposta a diferentes temperaturas em determinados espaços de tempo e posteriormente foi caracterizada por emissão de fotoelétrons na região de raios X (XPS). Nesta seção, os espectros obtidos serão cuidadosamente analisados e discutidos.

Esses espectros foram obtidos nas regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p, após a degra-

dação por temperatura em diferentes métodos, com a intenção de indentificar possíveis modificações estruturais e químicas induzidas pela degradação. Os espectros obtidos foram tratados utilizando-se o software Advantage de propriedade da Thermo Scientific, e em seguida, os dados foram transferidos e plotados para o programa Origin.

### 5.3.1 Survey

O espectro de fotoelétrons excitado por raios X (survey) para a molécula da cloram-bucila, para todos métodos de degradação, encontram-se apresentados pela Figura 36. Nele pode-se observar os picos de alta intensidade na faixa de energia de 197 a 535 eV, referentes às regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p.

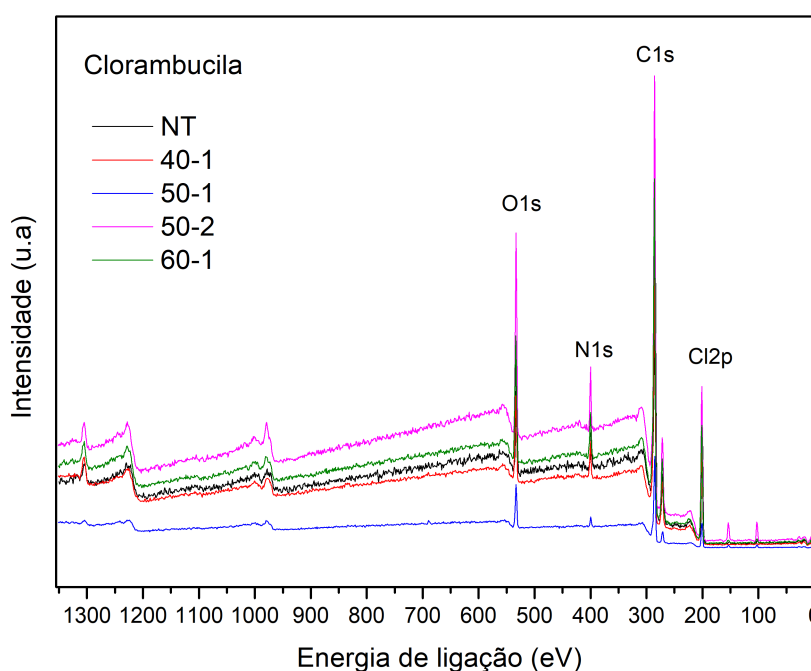


Figura 36: Espectros de XPS (survey) para a cloram-bucila obtido após a degradação por temperatura.

Além disso, outros picos com menores intensidades foram detectados e estão presentes no gráfico. Tais picos podem ser identificados nas energias de ligações de 102, 689 e 1303 eV, sendo esses valores referentes aos elétrons Auger do carbono, oxigênio e cloro. Na tabela 30, são apresentados os valores de energia de ligação nas regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p, obtidas a partir da análise de dados do espectro survey, tanto para as amostra de cloram-bucila não degradada quanto para as amostras degradadas, além das energias de ligação encontradas na literatura (NAUMKIN ANNA KRAUT-VASS; POWELL, ).

Tabela 30: Valores de energias de ligação (eV) nas regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p, para as amostras de clorambucila antes e após a degradação. Também estão apresentados os valores disponíveis na literatura.

Transição	Literatura	NT	40°C-1	50°C-1	50°C-2	60°C-1
C 1s	285,00	284,83	285,89	285,31	285,69	285,94
N 1s	399,00	399,06	400,16	399,77	400,08	400,22
O 1s	531,00	532,16	533,67	533,1	533,13	533,76
Cl 2p	198,30	200,36	201,38	200,97	201,26	201,39

Observa-se uma mudança significativa na intensidade relativa dos picos como resultado da degradação da amostra de clorambucila, principalmente para as regiões do O 1s e do Cl 2p. Um outra informação relevante, que é fornecida após o tratamento de dados utilizando o software Advantage, é a composição atômica da superfície da amostra.

A fim de comparar os percentuais atômicos medidos experimentalmente com os percentuais teóricos dos elementos da clorambucila, foi feita uma correção dos percentuais experimentais para o carbono, nitrogênio, oxigênio e cloro de modo a desconsiderar a contribuição dos elétrons auger citados anteriormente. A tabela 31 exibe a porcentagem atômica das amostras da clorambucila após a degradação.

Tabela 31: Porcetagem atômica da clorambucila antes e após a degradação. Também são apresentados os valores teóricos.

Átomo	Valor Esperado	NT	40°C-1	50°C-1	50°C-2	60°C-1
Carbono	73,68%	68,85%	73,15%	73,03%	72,31%	69,38%
Nitrogênio	5,26%	5,46%	4,98%	4,58%	5,02%	5,11%
Oxigênio	10,53%	10,20%	9,87%	14,15%	12,18%	9,97%
Cloro	10,53%	15,50%	12,00%	8,24%	10,49%	15,55%

A predominância de carbono era esperada, uma vez que, desconsiderando-se os hidrogênios, a clorambucila é composta em sua maioria por tal elemento. Além disso, como dito anteriormante, para efeitos de aderência a amostra foi colocada sobre uma folha de carbono. Já a proporção dos demais elementos pode ser considera coerente, levando-se em conta a quantidade relativa desses elementos na clorambucila.

Com o propósito de obter uma melhor interpretação sobre os efeitos da degradação na composição atômica da superfície da amostra, foi gerado um gráfico do percentual atômico em função do método de degradação, e ele é mostrado na Figura 37.

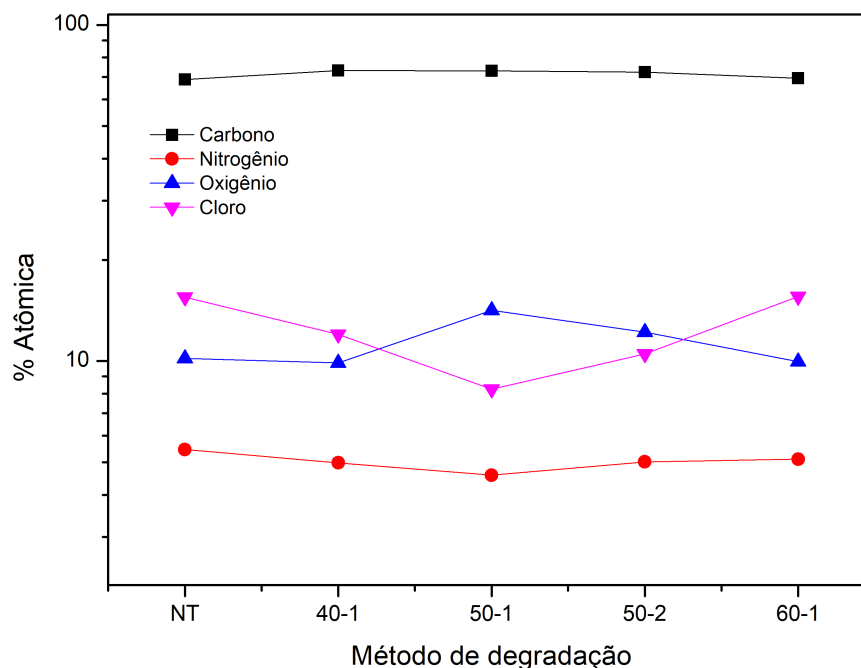


Figura 37: Variação da proporção dos átomos de carbono, cloro, oxigênio e nitrogênio pelo método de degradação.

É possível notar que o percentual atômico do carbono e do nitrogênio tiveram pouquíssimas alterações para os diferentes métodos de degradação, já os átomos de oxigênio e cloro apresentaram alterações significativas. Pode-se observar que à medida que o percentual atômico do cloro diminuiu o percentual atômico do oxigênio aumenta, e isso pode ser explicado pelo fato dessa variável tratar-se de uma medida relativa. Além disso, essas alterações são um indicativo de que essas regiões são as mais afetadas pelo aumento da temperatura da amostra e que após a degradação a clorambucila tem sua conformação molecular alterada.

Para desenvolver uma discussão mais aprofundada sobre o impacto causado na estrutura molecular da clorambucila pela degradação, foram obtidos espectros de XPS de alta resolução nas regiões do carbono 1s, nitrogênio 1s, oxigênio 1s e cloro 2p, para a técnicas de degradação a 40°C por 1 hora. Os resultados obtidos serão discutidos nas subseções seguintes.

### 5.3.2 Espectros de alta resolução

Na Figura 39 são apresentados os espectros de alta resolução para a região do carbono 1s, comparando-se os resultados obtidos entre amostra exposta a temperatura ambiente e a 40°C durante 1 hora. Os espectros, normalizados e plotados, foram sobrepostos para efeitos comparativos. A linha preta representa o espectro da amostra não-degradada enquanto a linha vermelha mostra o espectro após a degradação, já a linha azul, representa a diferença entre os

dois espectros.

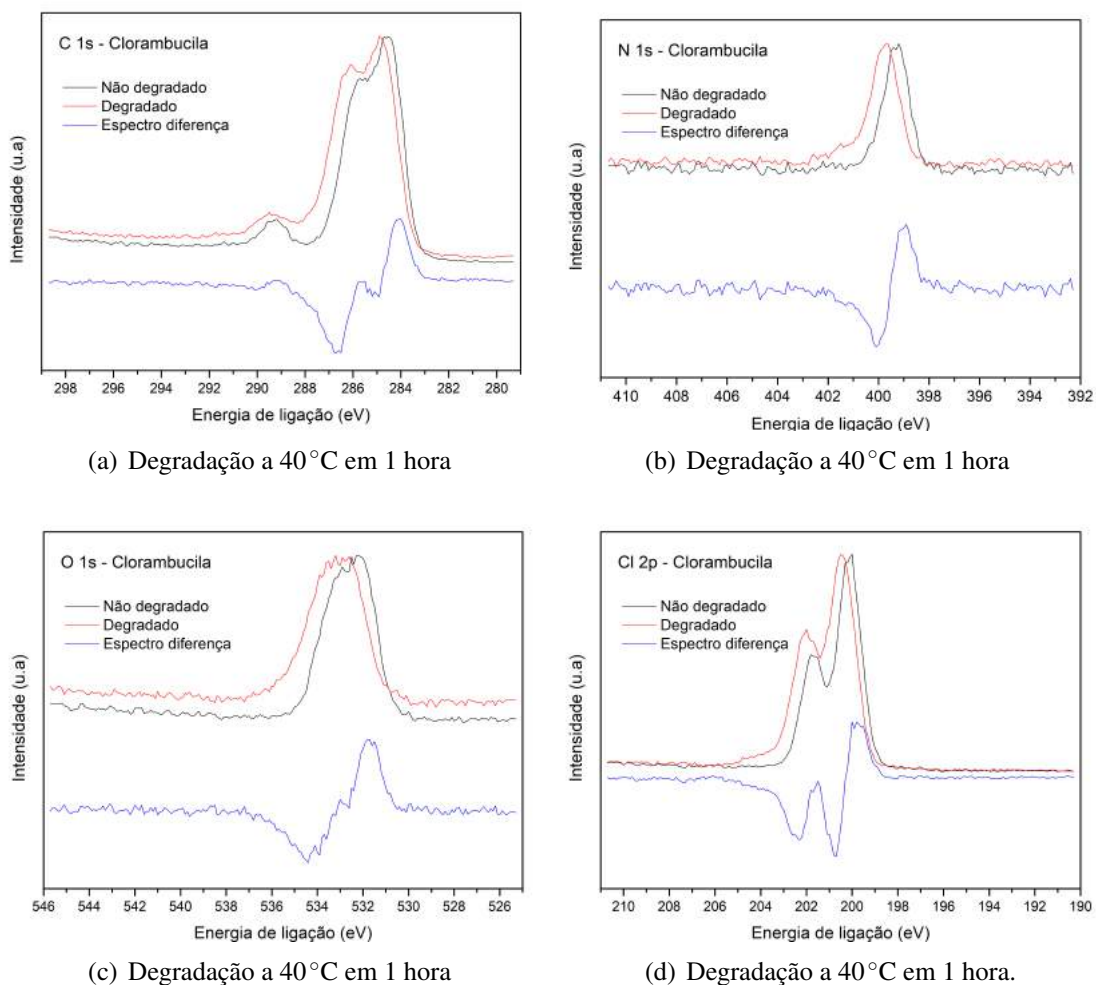


Figura 38: Espectros de alta resolução de XPS nas regiões do C 1s, N 1s, O 1s e Cl 2p para a Clorambucila, antes e após a degradação por temperatura.

É possível observar mudanças na conformação e deslocamentos dos espectros nas quatro regiões de interesse. Tendo em vista que esses deslocamentos foram uniformes e apresentam a mesma variação para os diferentes métodos de degradação, acredita-se que sua causa venha de uma possível falha do neutralizador de amostras do equipamento utilizado para as medidas do XPS. Devido aos lapsos do neutralizador, a amostra ficará carregada, e após uma nova ionização e emissão de um fotoelétron com energia de ligação maior, ocorrerá o deslocamento do espectro para energias mais altas.

A partir da análise do espectro de XPS de alta resolução do C 1s foi possível deconvoluir o pico do carbono em 7 contribuições distintas. Como a amostra, no momento da análise, estava sobre um filme fino de carbono, é possível que tenha ocorrido uma superposição das contribuições dos átomos de carbono do filme e da amostra de clorambucila no espectro, impossibilitando assim uma análise mais precisa sobre as seguintes ligações: C-C, C=C. Para fins

didáticos, iremos discutir somente os picos que recebem apenas a contribuição da amostra da clorambucila.

Um desses picos refere-se às ligações C-Cl e C-N. Os valores da energia de ligação, da área do pico e da porcentagem atômica das contribuições desses picos para a formação do espectro do cloro na região 2p e do nitrogênio na região 1s estão apresentados, respectivamente, nas tabelas 32 e 33.

Tabela 32: Energia de ligação, área do pico e percentual atômico das ligações C-Cl.

Método	$E_l$ (eV)	Área (CPS.eV)	% Atômica
Temperatura ambiente	200,11	5067,3	100%
40 °C em 1 hora	200,42	3982,60	100%

Tabela 33: Energia de ligação, área do pico e percentual atômico das ligações C-N.

Método	$E_l$ (eV)	Área (CPS.eV)	% Atômica
Temperatura ambiente	399,31	1778,66	100%
40 °C em 1 hora	399,74	1790,6	100%

Para uma melhor avaliação do efeito da degradação sobre essas ligações foi realizado um estudo mais específico para investigar alterações na proporção relativa dos elementos cloro e nitrogênio de um método para outro.

Por exemplo, para o método de degradação à temperatura ambiente, a área do pico referente à ligação C-Cl é igual a 5067,3 CPS.eV, já para o pico da ligação C-N temos um valor de área igual a 1778,66 CPS.eV. Dividindo um valor pelo outro, temos um fator de 2,9. Efetuando os mesmos cálculos para o método de degradação à temperatura de 40 °C em 1 hora obtém-se um fator de 2,2. Tomando o fator para a técnica de degradação à temperatura ambiente como o valor de referência, e calculando a discrepância relativa entre ambos fatores, encontra-se um valor de 24%. Isso significa que de um método para outro ocorreu uma redução do cloro de 24%, além de sugerir que há uma degradação da amostra quanto exposta a temperaturas mais altas.

O outro pico que recebe apenas a contribuição da amostra de clorambucila é o do ácido carboxílico (COOH). Os valores da energia de ligação, da área do pico e da porcentagem atômica das contribuições estão apresentados na tabela 34.

Tabela 34: Energia de ligação, área do pico e percentual atômico da ligação COOH.

Método	$E_l$ (eV)	Área (CPS.eV)	% Atômica
Temperatura ambiente	289,27	1077,72	6,52%
40 °C em 1 hora	289,4	734,85	6,37%

Comparando os valores de área do pico do COOH com os valores da ligação C-CL, e realizando os mesmos cálculos feitos para a ligação C-N, encontra-se um fator de 4,7 para o



método de degradação à temperatura ambiente e um fator de 5,4 para o método de degradação à temperatura de 40 °C. Calculando a discrepância relativa, sendo novamente o fator da temperatura ambiente como o valor de referência, obtém-se um valor de 15%. Ou seja, houve uma redução de 15% do cloro, corroborando novamente com a hipótese de degradação da amostra após ter sido exposta a variações de temperatura.

## 5.4 SIMS-TOF

De acordo com a literatura o espectro de massa da clorambucila por impacto de elétrons consiste do pico da molécula original, e fragmentos iônicos, que resultam da perda de radicais. Tal espectro de massa foi mostrado na figura 13, ele está na base de dados do NIST e pode ser encontrado no The Drugbank Database (consta nas referências).

J. H. Burton et al indentificaram os seguintes íons (m/z): 118,1, 168,1, 192,1 e 241,1, para o monitoramento do composto clorambucil de massa igual a 304,1 (BURTON et al., 2017). Esses fragmentos iônicos foram identificados no espectro de massa do Leukeran, que além do composto ativo clorambucil contém vários excipientes com moléculas orgânicas extensas. A tabela 35 relaciona os espectros de massas da figura 39 com as massas e os respectivos fragmentos iônicos.

Os espectros obtidos estão de acordo com a análise de PIXE e XPS, que mostram que os radicais contendo cloro e os radicais de oxigênio são degradados quanto sofrem ação de agentes ionizantes e degradação por temperatura.

Tabela 35: Espectros de massas e seus correspondentes fragmentos iônicos.

Gráfico	m/z	Fragmento iônico
A	303	$C_{14}H_{19}Cl_2NO_2^+$ e isótopos
B	118	$C_8H_8N^+$ e isótopos
C	168	$C_{10}H_{10}NO^+$ e isótopos
D	254	$C_{13}H_{17}ClNO_2^+$ e isótopos
E	192	$C_{10}H_{11}NO^+$ e isótopos

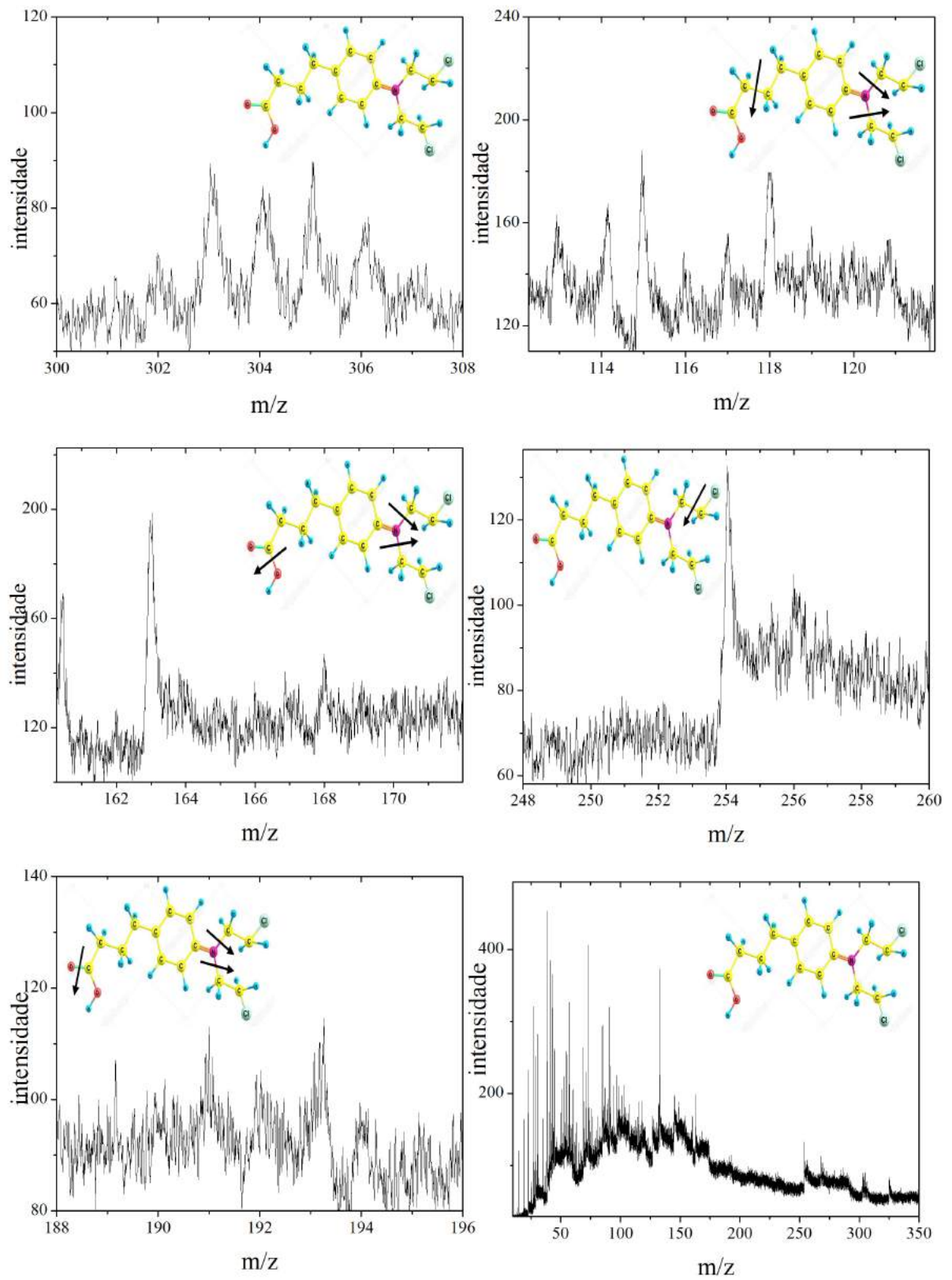


Figura 39: Espectros de massa do composto clorambucila e seus fragmentos iônicos para a técnica SIMS.

## 6 CONCLUSÃO

Para um medicamento servir à sua finalidade, este deve estar livre de impurezas ou outras interferências que podem prejudicar a sua qualidade e eficácia. Este estudo visou aplicar algumas técnicas analíticas de física atômica e molecular no teste do produto farmacêutico Leukeran. As amostras de Leukeran e do composto ativo clorambucila foram caracterizadas em termos de sua composição química, tanto em relação às suas superfícies quanto nas suas camadas mais internas.

A avaliação da estabilidade dos compostos quando expostos a diferentes condições de estresse, como agentes ionizantes e variações de temperatura, foi realizada. A investigação sugere que, em situações de estresse, as amostras sofrem modificações estruturais e químicas. O revestimento do fármaco mostrou ser de extrema importância para a manutenção das especificações estabelecidas, pois no momento que esteve presente nas amostras, os danos causados em situações de estresse foram menores. De uma forma geral, é recomendável seguir as condições de armazenamento do fabricante.

A massa de clorambucila contida em comprimidos do fármaco Leukeran foi determinada pela técnica de emissão de raios X induzida por prótons, e estavam de acordo com as especificações fornecidas pelo fabricante. A espessura do revestimento do Leukeran também foi extraída pela técnica de espectroscopia por retroespalhamento de Rutherford, e sua ordem de grandeza estava de acordo com estimativas análogas da literatura. O comprimido quando sujeito ao impacto de prótons em correntes altas (nA) sofre degradação visível, gerando um filme fino carbonizado em sua superfície. A técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X demonstrou que a molécula clorambucila sofre alteração em suas ligações químicas quando sujeita a degradação por temperatura. As ligações envolvendo o átomo de cloro, C-Cl, e oxigênio, C-O, são quebradas. Os fragmentos iônicos da clorambucila detectados e discutidos na literatura por outras técnicas de espectrometria de massa foram identificados no Leukeran, através da técnica de espectroscopia de massa por íons secundários. A análise se mostrou satisfatória, tendo em vista que o fármaco é composto por outras moléculas orgânicas que possuem imensas cadeias químicas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. D. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. *Quim Nova*, SciELO Brasil, v. 28, n. 1, p. 118–29, 2005.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, Wiley Online Library, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BURTON, J. et al. Potency and stability of compounded formulations of chlorambucil, melphalan and cyclophosphamide. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 15, p. 6, 01 2017.
- CHU, W.-K. *Backscattering spectrometry*. [S.l.]: Elsevier, 2012.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. [S.l.]: EdiPUCRS, 2007.
- DEPOSITPHOTOS. *Fotos, imagens vetoriais e vídeos royalty-free do banco de imagens*. 2018. Disponível em: <<https://br.depositphotos.com/search/chlorambucil.html>>. Acesso em: 12 de janeiro 2019.
- EISBERG, R. M. et al. *Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas*. 23. ed. Rio de Janeiro: Campus-Elsevier, 1994. 928 p.
- FERRAZ, H. G. *FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS: COMPRIMIDOS E COMPRIMIDOS REVESTIDOS*. Tese (Doutorado) — Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2006.
- GLAXOSMITHKLINE BRASIL LTDA. *Leukeran GlaxoSmithKline Brasil Ltda: Comprimidos revestidos 2mg*. 2005. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9446322015&pIdAnexo=2915766](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9446322015&pIdAnexo=2915766)>. Acesso em: 22 dezembro 2018.
- GROSS, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2. ed. Heidelberg: Springer Science & Business Media, 2006. 753 p.
- HOFFMANN, E. de; STROOBANT, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 3. ed. Chichester: Wiley, 2007. 502 p.
- INCA - MINISTERIO DA SAUDE. *Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil*. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 8 Fevereiro 2019.
- INCA - MINISTERIO DA SAUDE. *INCA - Quimioterapia*. 2018. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=101](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101)>. Acesso em: 12 Dezembro 2018.
- INSTITUTO VENCER O CÂNCER. *Tipos de câncer: Linfomas*. 2018. Disponível em: <<https://www.vencerocancer.org.br/tipos-de-cancer/linfomas-tipos-de-cancer/linfomas-o-que-e/>>. Acesso em: 31 Janeiro 2019.

- JOHANSSON, S. A. et al. *Particle-induced X-ray emission spectrometry (PIXE)*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 1995. v. 133.
- LIMA, A. R. *Construção de nanoestruturas e caracterização por SEM e RBS*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2008.
- LIMANDRI, S. et al. Pixe facility at centro atômico bariloche. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, Elsevier, v. 318, p. 47–50, 2014.
- MENEZES, D. d. O. *Análise química e mineralógica do meteorito Allende pelas técnicas de XPS e PIXE*. 58 p. Monografia (Bacharelado em Química) — Instituto Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.
- NAUMKIN ANNA KRAUT-VASS, S. W. G. A. V.; POWELL, C. J. *NIST Standard Reference Database 20, Version 4.1*. Disponível em: <<https://srdata.nist.gov/xps/>>, year=2012,.
- OLIVEIRA, D. P. A. P. G. de. *DESSORÇÃO IÔNICA INDUZIDA EM ÁLCOOIS E ÁCIDOS: RELEVÂNCIA PARA COMETAS, SUPERFÍCIES PLANETÁRIAS E GRÃOS ESTELARES*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.
- PODGORŠAK, E. B. *Radiation physics for medical physicists*. 2. ed. Heidelberg: Springer, 2006. 745 p.
- RAYSPEC. *RAYSPEC SDD – WINDOW MATERIAL AND THICKNESS*. 2018. Disponível em: <<https://www.rayspec.co.uk/x-ray-detectors/silicon-drift-detectors/sgx-sdd-window-material-thickness/>>. Acesso em: 22 de março 2019.
- RIUL, S.; AGUILLAR, O. M. Quimioterapia antineoplásica: revisão da literatura. *REME rev. min. enferm*, v. 3, n. 1/2, p. 60–67, 1999.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P.; QUINN, M. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 917 p.
- SANTOS, H. C. d. *Análise de elementos traço em amostras de sedimento da região do rio Toledo*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2009.
- SANTOS, S. B. d. *Elementos traço em soro sanguíneo medidos pelos métodos PIXE e ICP-MS*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2007.
- TABACNIKS, M. H. *Análise de filmes finos por pixe e rbs*. Instituto de Física-USP, 1997.
- TABACNIKS, M. H. *Os elementos na matéria*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2005.
- TAUHATA, L. et al. *Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos - 9ª revisão novembro/2013 - Rio de Janeiro - IRD/CNEN*. 2013. Disponível em: <[http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/45/073/45073465.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/_Public/45/073/45073465.pdf)>.
- THE DRUGBANK DATABASE. *Identification: Chlorambucil*. 2018. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00291>>. Acesso em: 22 dezembro 2018.
- VERMA, H. R. *Atomic and Nuclear Analytical Methods*. 1. ed. Heidelberg: Springer, 2007. 375 p.

## ANEXO A. Medidas recentes

Nos últimos meses do desenvolvimento deste trabalho foram realizadas medidas do fármaco Leukeran utilizando a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura, do inglês, Scanning Electron Microscope (SEM). O princípio da técnica consiste em utilizar um feixe de elétrons para explorar a superfície do composto. A exploração é feita ponto a ponto, através de linhas sucessivas. O sinal é transmitido para uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com a varredura do feixe incidente. O SEM fornecer rapidamente informações cruciais sobre a morfologia, além de identificar os elementos químicos presentes na amostra sólida (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

As medidas SEM do Leukeran são exibidas nas figuras 40 e 41. A primeira figura mostra o quimioterápico degradado a uma temperatura de 60°C e a segunda figura trata-se do Leukeran sem sua película protetora e degradado a mesma temperatura.

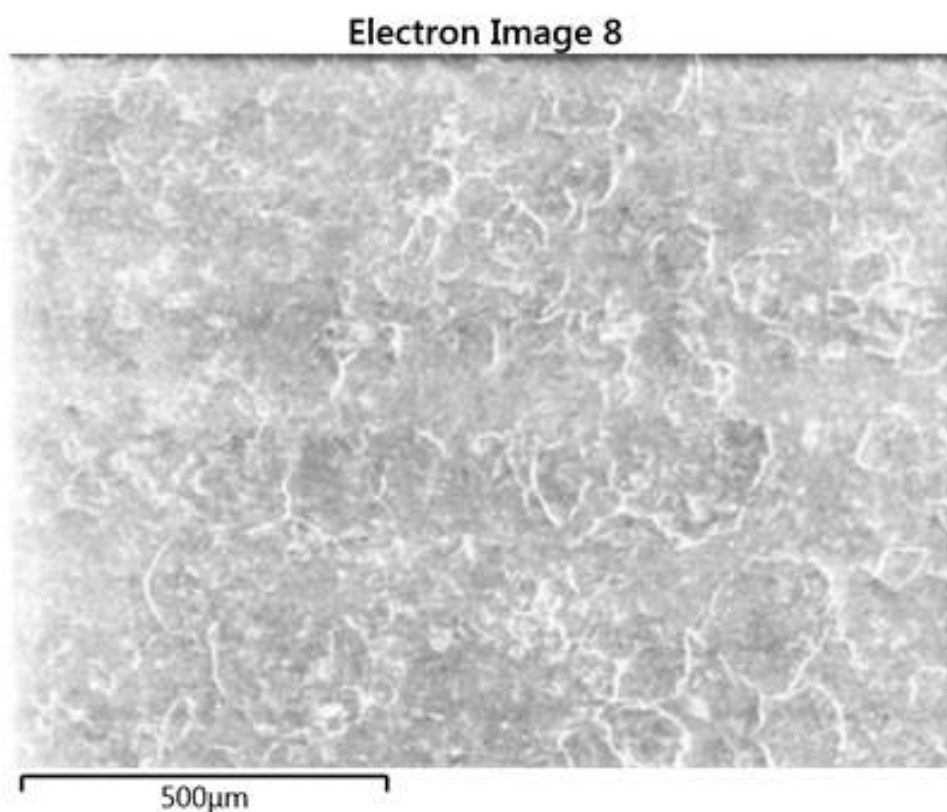


Figura 40: Superfície do Leukeran com o revestimento após a degradação por temperatura.

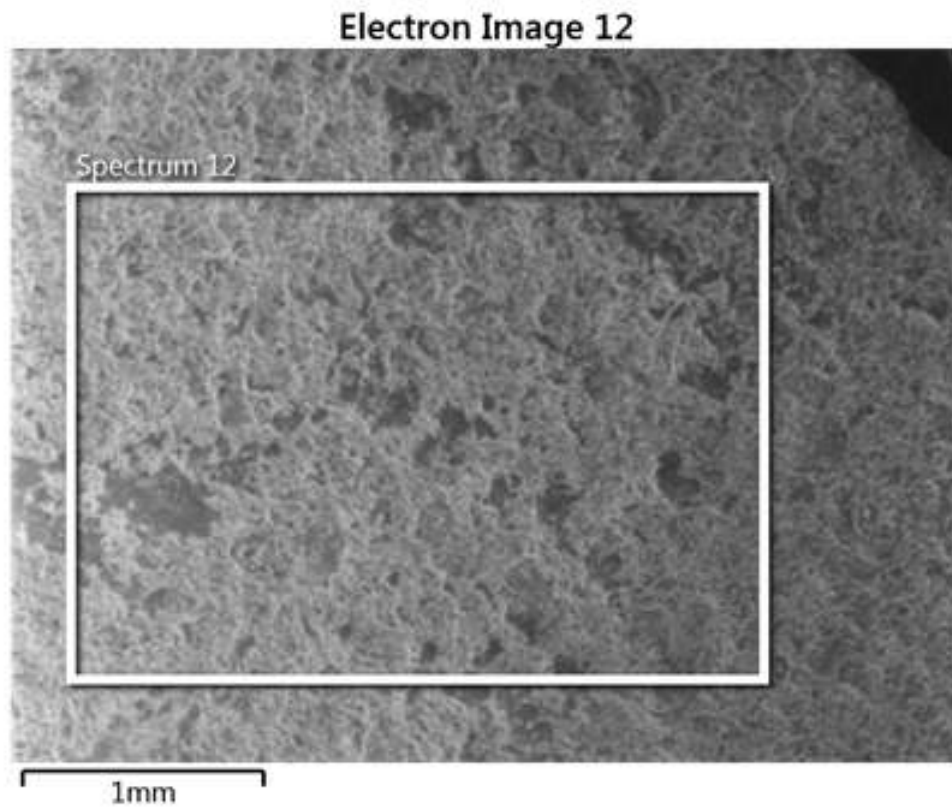


Figura 41: Superfície do Leukeran sem o revestimento após a degradação por temperatura.

A análise identificou, que após a degradação do composto, a amostra sem revestimento foi a que sofreu o maior dano. Houve diferenças significativas nas concentrações dos elementos de cada amostra. Este resultado sugere que o revestimento do fármaco possui uma função protetora, pois adere aos átomos que sofrem as quebras de ligações após a degradação do composto.

## ANEXO B. Medidas de incertezas

### B.1 PIXE

As incertezas associadas ao cálculo das concentrações dos elementos, em cada amostra, são fornecidas pelo software GUPIX. Para cada fit do espectro, é calculado as incertezas das concentrações de cada elementos. Não houve variações das medidas após a repetição do fit para a mesma amostra. E de uma forma geral, as incertezas ficaram em torno de 1% a 10%, sendo 1% para os maiores valores e 10% para os menores valores.

### B.2 RBS

As incertezas associadas ao cálculo da perda de energia do íon do Leukeran são fornecidas pelo software SIMNRA. A tabela 36 exibe a quantidade de cada elemento e sua respectiva incerteza na primeira camada da amostra, ou seja, no revestimento do Leukeran.

Tabela 36: Quantidade de cada elemento e suas respectivas incertezas na camada da amostra referente ao revestimento do quimioterápico.

Elemento	Quantidade	Incerteza
C	81599,3	$\pm 5023,58$
O	69196,3	$\pm 4260,00$
Ti	1728,04	$\pm 106,385$
Fe	6515,02	$\pm 401,091$

Após o fit, a perda de energia é calculada. O valor fornecido pelo software foi de 412 keV.