



LUCIANA ASSIS TERRA

**AVALIAÇÃO DE TRANSFORMAÇÃO POLIMÓRFICA EM
COMPRIMIDOS DO FÁRMACO CARBAMAZEPINA POR
ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E
FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LUCIANA ASSIS TERRA

**AVALIAÇÃO DE TRANSFORMAÇÃO POLIMÓRFICA EM
COMPRIMIDOS DO FÁRMACO CARBAMAZEPINA POR
ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E
FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI JESUS POPPI

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM
QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA POR LUCIANA ASSIS TERRA, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
RONEI JESUS POPPI.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

iii

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

T275a Terra, Luciana Assis (1988-).
Avaliação de transformação polimórfica em comprimidos do fármaco carbamazepina por espectroscopia de imagem no infravermelho próximo e ferramentas quimiométricas / Luciana Assis Terra. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Quimiometria. 2. Imagem química. 3. Polimorfismo. 4. Carbamazepina. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of the polymorphic transformation in the tablets of the drug carbamazepine by near-infrared chemical imaging and chemometric tools

Palavras-chave em inglês:

Chemometric
Chemical image
Polymorphism
Carbamazepine

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Ronei Jesus Poppi [Orientador]
Jez Willian Batista Braga
Marco Aurélio Zezzi Arruda

Data de defesa: 21/02/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedico este trabalho à minha família,
em especial à minha Mãe,
Maria Lúcia, à minha irmã, *Daniela*, e
aos meus avós, *Jesuína e Orlando*, por
todo apoio, amor e por me fazerem
acreditar que tudo dará certo, mesmo
nos momentos mais incertos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos na realização de mais um sonho;

Ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi pela orientação, ensinamentos, amizade, paciência e confiança;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de Mestrado, à qual permitiu manter-me financeiramente;

À EMS pelo fornecimento do fármaco “Carbamazepina” juntamente com os excipientes necessários para o desenvolvimento da parte experimental do projeto;

Ao Douglas por todo apoio, compreensão e por estar sempre ao meu lado;

Aos meus parentes de Paulínia - SP: Tonho, Guiomar, Ana, João, Rayza, Raquel, Marcelo e Vitória por todo o carinho que têm comigo e por estarem sempre dispostos a ajudar;

Aos amigos que adquiri ao longo de minha vida e que mesmo longe estão sempre na torcida: Luana, Luíza, Nayanne, Suelen, Layla, Vanessa e Leoni;

Aos membros do laboratório de Quimiometria em Química Analítica (LAQQA) pelo companheirismo, amizade e alegre convívio: Márcia, Mariana; Thiago; Mônica; Guilherme Sabin, Guilherme Alexandrino, Guilherme Montovani, Paulo; André, Luciana Oliveira, Fabiana, Laila, Mariana Baptistão e Marina;

Aos técnicos Humberto e Rúbia por estarem sempre dispostos a ajudar seja qual for o problema ou dúvida;

À Prof. Dra. Solange e ao Prof. Dr. Fracassi pela oportunidade de participar do Programa de Estágio Docente (PED) na disciplina QA 282, na qual obtive conhecimentos práticos de como ensinar e também pude aprofundar meus conhecimentos em Química Analítica;

Às alunas do projeto PIC Júnior, Roberta Lopes Cavalcanti Perazzo e Sabrina Cristina Martins Mendes, pela oportunidade de orientação;

Aos alunos e professores do cursinho popular “TRIU”, no qual tenho ministrado aulas de Química desde 2012, um projeto social incrível. Agradeço em especial aos amigos Paulo, Douglas e Juliana;

Aos amigos da minha república da Moradia Estudantil da UNICAMP “Casa O3”: Samir, Andréia, Tiago e Joelma pela paciência, amizade e pelas inúmeras conversas sobre os mais diversos assuntos;

Aos amigos do Forró Casa do Lago, os quais transformam minhas noites de sexta-feira em momentos de pura alegria e diversão;

Aos amigos de Campinas pelos momentos de descontração: Gustavo, Laiane, Benedito, Rodrigo, Javier, Mônica, Cecília e Alexandre;

Aos demais professores e funcionários da UNICAMP que colaboraram de alguma forma para minha formação intelectual e também como cidadã.

E a todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho: OBRIGADA!

Curriculum Vitae

DADOS PESSOAIS

Nome: Luciana Assis Terra
Nascimento: 07/07/1988
Naturalidade: Piumhi - MG - Brasil
E-mail: lucianaaterra@yahoo.com.br
Estado Civil: Solteira

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Graduação: Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas - 30/07/2010.
Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL - MG, Alfenas - MG, Brasil.

EXPERIÊNCIAS PROFISSIONAIS NA ÁREA

- Professora voluntária da disciplina de Química no cursinho popular pré-vestibular TRIU - fevereiro de 2012 - atual.
- Orientação de Roberta Lopes Cavalcanti Perazzo e Sabrina Cristina Martins Mendes, alunas de Iniciação Científica Júnior, PIC, no período de agosto a setembro de 2012.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

- Programa de Estágio Docente – 03/2012 a 07/2012
Disciplina: QA 282 - Química Clássica
Curso: Química
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

- Estágio no Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Laboratório de Análises Quimiométricas em Química Analítica (LAQQA)
Duração: 04/2010 a 06/2010
Instituto de Química - UNICAMP
- Estágio no laboratório de Análises Físico-Químicas
Duração: 01/2010 a 03/2010
Serviço Autônomo de Água e Esgoto de Piumhi (SAAE);
- Monitoria Acadêmica - 08/2007 a 12/2007
Disciplina: Bioestatística
Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL - MG
- Monitoria Acadêmica - 03/2007 a 07/2007
Disciplina: Cálculo I
Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL - MG
- Iniciação Científica:
 - Título: Influência do tamanho amostral e de variâncias heterocedásticas no ajuste do modelo da isoterma de Langmuir-Freundlich.
Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beijo.
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
Período: 03/2009 a 02/2010.
 - Título: Avaliação do tamanho amostral na estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir e análise da capacidade de adsorção de antimônio pela casca de arroz.
Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beijo.
Coorientador: Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley.
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
Período: 03/2008 a 02/2009.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

- TERRA, L. A.; POPPI, R. J.. A study of the polymorphic transformation of carbamazepine tablets generated by heating using near-infrared chemical imaging and multi-way chemometric methodologies. *Talanta*. Artigo submetido para publicação.

TRABALHOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS

- TERRA, L. A.; POPPI, R. J.. Estudo de transformação polimórfica por aquecimento, com o tempo, em comprimido de carbamazepina por espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo e PARAFAC, 5º Congresso Ibero-americano de Química Analítica, Montevideu - Uruguai, 2012. Apresentação de trabalho na forma oral.

TRABALHOS EM EVENTOS NACIONAIS

- TERRA, L. A.; POPPI, R. J.. “Estudo de transformação polimórfica por aquecimento em comprimido de carbamazepina, por espectroscopia de imagem no infravermelho próximo e resolução multivariada de curvas”, 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão-SP, 2011. Apresentação de trabalho na forma oral e pôster;
- TERRA, L. A.; BEIJO, L. A.. “Avaliação do número de concentrações na estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir”, II Jornada Científica da UNIFAL-MG, UNIFAL-MG, Alfenas - MG, 2009, Apresentação de trabalho na forma de pôster;
- TERRA, L. A.; BEIJO, L. A.; TARLEY, C.R.T.. “Influência do tamanho amostral e do número de concentrações na estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir”, 54ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos - SP, 2009. Apresentação de trabalho na forma de pôster;

- TERRA, L. A.; BEIJO, L. A.; TARLEY, C.R.T.. “Influência do número de concentrações na estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir”, I Jornada Científica da UNIFAL-MG, UNIFAL-MG, 2008. Apresentação de trabalho na forma de pôster;
- TERRA, L. A.; BEIJO, L. A.; TARLEY, C.R.T.. “Avaliação de variâncias heterocedásticas na estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir”, XXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (ERSBQ) - Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2008. Apresentação de trabalho na forma de pôster;
- TERRA, L. A.; BEIJO, L. A.; TARLEY, C.R.T.. “Avaliação do tamanho amostral na estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir”, 53ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, Universidade Federal de Lavras (UFLA) - 2008. Apresentação de trabalho na forma de pôster.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE TRANSFORMAÇÃO POLIMÓRFICA EM COMPRIMIDOS DO FÁRMACO CARBAMAZEPINA POR ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

Autora: Luciana Assis Terra

Orientador: Ronei Jesus Poppi

A Espectroscopia de Imagem na região do Infravermelho Próximo juntamente com ferramentas quimiométricas foi utilizada para estudar a transformação polimórfica do fármaco carbamazepina (forma III para forma I) em formulações farmacêuticas do comprimido, geradas por aquecimento. Os mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e III da carbamazepina no comprimido foram estimados por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), Resolução Multivariada de Curvas (MCR) e Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC), assim como o perfil de concentração em função do tempo durante o aquecimento, comparando os resultados obtidos quanto à eficácia na quantificação das formas polimórficas. Para o estudo da homogeneidade da distribuição do fármaco ao longo do comprimido, foram construídos histogramas. O trabalho está dividido em duas partes: na primeira parte foi realizado o mapeamento completo de um comprimido antes e após o aquecimento a 160 °C, por 3 horas e os dados foram analisados por MCR. Na segunda parte do trabalho estudou-se a transformação polimórfica com o tempo a 140 °C, em que foi realizado o mapeamento da parte central do comprimido, sendo nesse caso obtidas imagens a cada hora, com tempo total de 7 horas. Os resultados mostraram que os métodos PLS, MCR e PARAFAC foram capazes de obter informações sobre a transformação polimórfica, sendo MCR e PARAFAC capazes de estudar o processo dinâmico envolvido. Além disso, o MCR também foi capaz de fornecer os mapas de distribuição de concentrações em cada tempo de aquisição de dados, acompanhando a transformação polimórfica na superfície do comprimido.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE POLYMORPHIC TRANSFORMATION IN THE TABLETS OF THE DRUG CARBAMAZEPINE BY NEAR-INFRARED CHEMICAL IMAGING AND CHEMOMETRIC TOOLS

Author: Luciana Assis Terra

Adviser: Ronei Jesus Poppi

The Near Infrared Chemical Imaging in conjunction with chemometric tools was used to study the polymorphic transformation of the drug carbamazepine (form III to form I) in pharmaceutical formulations tablets, generated by heating. The concentration distribution maps of the polymorphic forms I and III of carbamazepine in the tablet were estimated by Partial Least Squares (PLS), Multivariate Curve Resolution (MCR) and Parallel Factor Analysis (PARAFAC), as well as the concentration profile as a function of the heating time and the results were compared regarding the efficacy in quantification of the polymorphic forms. For the study of the homogeneity of distribution of the drug in the tablet, histograms were built. The work was divided into two parts: in the first part, it was conducted the mapping of the whole tablet before and after heating at 160 °C for 3 hours and the data were analysed by MCR. In the second part, it was studied the polymorphic transformation over the time at 140 °C. Images of the central part of the tablet were obtained every hour during 7 hours. The results showed that the PLS, MCR and PARAFAC were able to obtain information about the polymorphic transformation and the MCR and PARAFAC were able to study the dynamic process involved as well. Furthermore, the MCR provided the concentration distribution map at each time of data acquisition, providing the polymorphic transformation on the tablet surface.

LISTA DE SIGLAS

ALS *Alternating Least Squares* - Mínimos Quadrados Alternantes;

API *Active Pharmaceutical Ingredient* - Princípio Ativo Farmacêutico;

CBZ Carbamazepina;

CV *Cross Validation* - Validação Cruzada;

IR *Infrared* - Infravermelho;

LV *Latent Variable* - Variável Latente;

MCR *Multivariate Curve Resolution* - Resolução Multivariada de Curvas;

MIR *Middle Infrared* - Infravermelho Médio;

MSC *Multiplicative Scatter Correction* - Correção de Espalhamento Multiplicativo;

NIR *Near Infrared* - Infravermelho Próximo;

NIR-CI *Near Infrared - Chemical Imaging*- Imagem Química no Infravermelho Próximo

PARAFAC *Parallel Factor Analysis* - Análise de Fatores Paralelos;

PC *Principal Component* - Componente Principal;

PCA *Principal Component Analysis* - Análise de Componentes Principais;

PLS *Partial Least Squares* - Mínimos Quadrados Parciais;

PRXD *Powder X-Ray Diffraction* - Difração de Raios X de Pós;

RMSE *Root Mean Square Error* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático;

RMSEC *Root Mean Square Error of Calibration* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração;

RMSECV *Root Mean Square Error of Cross Validation* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada;

RMSEP *Root Mean Square Error of Prediction* - Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão;

SNV *Standard Normal Variate* – Variação Padrão Normal.

Lista de Tabelas

2.1	Excipientes e suas respectivas concentrações no comprimido de carbamazepina.	27
-----	--	----

Lista de Figuras

1.1	Fórmula estrutural da carbamazepina.	5
1.2	Formas polimórficas anidras da carbamazepina: triclínica (forma I) (A), trigonal (forma II) (B), monoclínica P (forma III) (C), e monoclínica C (IV) (D) [11].	6
1.3	Curva de Energia Potencial e níveis vibracionais para o oscilador anarmônico.	7
1.4	Hipercubo Espectral (A) de dados provenientes de uma análise de espectroscopia de imagem e a matriz desdobrada (B).	9
1.5	Decomposição de dados hiperespectrais em componentes principais por PCA.	12
1.6	Decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para o modelo PLS, a partir de dados hiperespectrais.	14
1.7	Esquema de decomposição de dados NIR-CI por MCR-ALS.	16
1.8	Esquema do sistema dinâmico de dados NIR-CI decomposto por MCR-ALS.	17
1.9	Modelo PARAFAC escrito como um modelo de Tucker3.	19
1.10	Esquema de sistema dinâmico de dados NIR-CI decomposto por PARAFAC.	19
2.1	Espectros FT-IR para as formas puras I (A) e III (B) da carbamazepina.	25
2.2	Difratogramas de raios X de pós das formas polimórficas da carbamazepina: (A) forma I e (B) forma III.	26
2.3	Espectros NIR da forma I (—), forma III (---), placebo (· · ·) e peça metálica (- - -).	29
2.4	Espectros NIR da forma I (—), forma III (---), placebo (· · ·) e peça metálica (- - -), após a segunda derivada.	30

2.5	Espectros puros NIR da forma I (—), forma III (—) e espectros recuperados (· · ·) para a forma I (A) e forma III (B), respectivamente.	32
2.6	Mapas de distribuição de concentração das formas I e III antes (a e b), e após o aquecimento (c e d), com os histogramas de concentração correspondentes.	33
3.1	Espectros da forma I (—), forma III (---) e placebo (· · ·).	39
3.2	Espectros da forma I (—), forma III (---) e placebo (· · ·), após a segunda derivada e corte.	39
3.3	(a) o primeiro dos três escores, antes (I), após 1 h (II) e após 2 h (III) de aquecimento a 140 °C, e (b) os pesos de PC 1 (—) e PC 2 (—) com os espectros puros de cada forma polimórfica (—).	40
3.4	Mapas de escores para os 1° e 2° componentes principais (PCs): inicial (A), após 1h (B) e após 2h de aquecimento a 140 °C para a forma I e III, respectivamente.	41
3.5	Mapas de distribuição de concentração da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H), por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.	42
3.6	Mapas de distribuição de concentração da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.	43
3.7	Histogramas de concentração da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.	44
3.8	Histogramas de concentração da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.	44
3.9	Mapas de distribuição de concentração da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por MCR.	45

3.10	Mapas de distribuição de concentração da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por MCR.	46
3.11	Mapas de distribuição de concentração corrigidos da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°, obtidos por MCR.	47
3.12	Mapas de distribuição de concentração corrigidos da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por MCR.	47
3.13	Histogramas das concentrações corrigidas da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140 °C, obtidos por MCR.	48
3.14	Histogramas das concentrações corrigidas da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140 °C, obtidos por MCR.	48
3.15	Concentração média corrigida das formas polimórficas I (—) e III (· · ·) obtidas por MCR ao longo do tempo, por aquecimento a 140 °C.	49
3.16	Diagnóstico de consistência do núcleo para o modelo PARAFAC.	50
3.17	Resíduos PARAFAC para o modo 2.	51
3.18	Mapa de distribuição dos pesos do PARAFAC para o modo amostral relacionado a forma I (A) e forma III (B).	51
3.19	Gráfico dos pesos do PARAFAC para o modo espectral para o fator 1 (---) e fator 2 (---) e os espectros puros da forma polimórfica I (—) e III (—).	52
3.20	Gráfico dos pesos do PARAFAC no modo temporal para o fator 1 (—) e fator 2 (· · ·), ao longo do tempo.	52

Sumário

1	INTRODUÇÃO	4
1.1	Polimorfismo em Fármacos	4
1.1.1	Importância do estudo de polimorfismo em fármacos	4
1.1.2	Carbamazepina	5
1.2	Espectroscopia de Imagem na região do Infravermelho Próximo	6
1.3	Métodos Quimiométricos	9
1.3.1	Análise de Componentes Principais (PCA)	11
1.3.2	Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	12
1.3.3	Resolução Multivariada de Curvas (MCR)	15
1.3.4	Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC)	17
2	MAPEAMENTO DAS FORMAS POLIMÓRFICAS EM COMPRIMIDO DE CARBAMAZEPINA ANTES E APÓS O AQUECIMENTO A 160 °C	22
2.1	Objetivos	22
2.2	Síntese Polimórfica	22
2.3	Caracterização Polimórfica	23
2.3.1	Espectroscopia no Infravermelho Médio	23
2.3.2	Difração de Raios X	23
2.3.3	Resultados e Discussão	24
2.4	Parte Experimental	24
2.4.1	Formulação dos comprimidos	27
2.4.2	Obtenção dos espectros	28
2.5	Resultados e Discussão	29
2.5.1	Pré-processamento de dados	29
2.5.2	Análise de dados	30
2.5.2.1	MCR	31
2.6	Conclusões	33

3	ESTUDO DA TRANSFORMAÇÃO POLIMÓRFICA EM COMPRIMIDO DE CARBAMAZEPINA COM O TEMPO A 140 °C	36
3.1	Objetivos	36
3.2	Parte Experimental	36
3.2.1	Formulação dos comprimidos	37
3.2.2	Obtenção dos espectros	37
3.3	Resultados e Discussão	38
3.3.1	Pré-processamento de dados	38
3.3.2	Análise dos dados	40
3.3.2.1	PCA	40
3.3.2.2	PLS	41
3.3.2.3	MCR	43
3.3.2.4	PARAFAC	49
3.4	Conclusões	53
4	CONCLUSÕES GERAIS	55
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	57
	Referências Bibliográficas	59

PREFÁCIO

A motivação para a realização deste trabalho na área de quimiometria fazendo uso da Espectroscopia de Imagem no Infravermelho Próximo no estudo do polimorfismo de fármacos é de crescente interesse dentro da Química Analítica. Este estudo está diretamente relacionado à saúde humana, já que o fenômeno do polimorfismo pode alterar a eficácia do medicamento não produzindo o efeito desejado quando da sua ingestão pelo paciente.

Neste trabalho foi estudado o polimorfismo do fármaco carbamazepina, pois é importante o estudo mais profundo da transformação polimórfica da forma III, forma comercial, para a forma I, uma vez que algumas propriedades físico-químicas são afetadas, tendo assim, eficácia reduzida.

As temperaturas utilizadas neste trabalho, 140 °C e 160 °C, são temperaturas altas que não são atingidas durante a produção e transporte do fármaco, mas sim, quando da realização de testes de estabilidade, testes estes em que o medicamento é submetido a condições extremas simulando o que ocorreria em temperaturas menores em um tempo maior.

O trabalho está dividido em cinco capítulos:

No primeiro capítulo - “Introdução” - foi realizada uma revisão bibliográfica sobre os tópicos: polimorfismo em fármacos, espectroscopia no Infravermelho Próximo de Imagem e métodos quimiométricos.

No segundo capítulo - “Mapeamento das formas polimórficas em comprimido de carbamazepina antes e após o aquecimento a 160 °C” - foram apresentadas as técnicas de caracterização utilizadas, Difração de raios X e espectroscopia no infravermelho para verificar as formas polimórficas em estudo: forma I e III. Apresenta também a parte experimental que está subdividida em formulação dos comprimidos e obtenção dos espectros. Os resultados e discussão apresentam os mapas de distribuição de concentração da superfície dos comprimidos antes e após a transformação polimórfica na temperatura de 160 °C. Para análise dos dados foi utilizado o método quimiométrico de Resolução Multivariada de Curvas (MCR), devido

ao fato que estavam disponíveis os espectros provindos da peça metálica utilizada como suporte para obtenção das imagens do comprimido, assim como os espectros de todos os constituintes da formulação farmacêutica.

No terceiro capítulo - “Estudo da transformação polimórfica em comprimido de carbamazepina com o tempo a 140 °C” - foi apresentada toda a parte experimental utilizada para formulação dos comprimidos e obtenção dos espectros. Os resultados e discussão apresentam as ferramentas quimiométricas PCA, PLS, MCR e PARAFAC necessárias para análise dos dados. Neste estudo foi mapeada somente uma área central do comprimido para facilitar a análise dos dados e para evitar interferência dos espectros da peça metálica. Nesse caso foi realizado um acompanhamento da transformação polimórfica com o tempo.

É importante ressaltar que foram estudadas duas temperaturas distintas no capítulo 2 e 3, pois no primeiro estudo (temperatura de 160 °C) o intuito era somente observar o que ocorria na superfície do comprimido de carbamazepina antes e após o aquecimento, verificando assim a transformação polimórfica de forma mais rápida. Já na segunda parte era de interesse estudar todo o processo dinâmico envolvido durante a transformação polimórfica, observando assim a conversão da forma III na forma I, com o tempo, a cada mapeamento realizado.

No quarto capítulo - “Conclusões Gerais” - foram apresentadas as conclusões referentes aos dois estudos realizados: estudo do comprimido todo a 160 °C e da parte central do comprimido, a 140 °C. Estão apresentadas as vantagens de cada método quimiométrico utilizado e também uma comparação entre os métodos multimodo MCR com matriz aumentada e PARAFAC, para o estudo a 140 °C.

Esta dissertação encerra-se com o quinto capítulo - “Perspectivas Futuras” - em que é apresentada novas possibilidades e ideias para uma possível continuação dos estudos nesta área.

Por fim segue uma lista de “Referências Bibliográficas” em que são apresentados os trabalhos encontrados na literatura que contribuíram para a elaboração desta dissertação.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Polimorfismo em Fármacos

O polimorfismo é definido como a tendência de uma substância em existir em diferentes estados cristalinos. Formas polimórficas apresentam as mesmas propriedades físicas nos estado líquido e gasoso, mas no estado sólido podem apresentar diferenças em propriedades como solubilidade, ponto de fusão, calor de fusão, índice de refração, densidade, condutividade, dureza, cor, estabilidade, higroscopicidade e reações do estado sólido [1].

Os diferentes arranjos cristalinos nos polimorfos surgem quando o fármaco cristaliza em diferentes formas e/ou diferentes conformações. A ocorrência de polimorfismo é bastante comum entre as moléculas orgânicas e um grande número de medicamentos que apresentam polimorfismo têm sido observado e catalogado ultimamente [2, 3, 4]. Aproximadamente 33 % dos compostos orgânicos e 80 % dos medicamentos comercializados exibem polimorfismo sob condições experimentalmente acessíveis [5].

Termodinamicamente, uma das formas polimórficas de uma substância apresentará uma maior estabilidade. Por isso o polimorfo mais estável tende a ser a forma mais abundante desse composto, podendo haver conversões de uma forma cristalina para outra, sendo elas espontâneas ou não. Polimorfos podem ser detectados por técnicas de caracterização tais como, espectroscopia no infravermelho (IR), difração de raios X, entre outras [6].

1.1.1 Importância do estudo de polimorfismo em fármacos

O estudo do polimorfismo em fármacos é muito importante na indústria farmacêutica. Dessa forma, tem sido extensivamente investigado, devido ao seu possível impacto sobre a qualidade e eficácia das formulações farmacêuticas. Para avaliar estes aspectos é necessário conhecer o número de formas polimórficas existentes do princípio ativo, a estabilidade relativa de todas elas e se as formas metaestáveis

podem ser estabilizadas [7].

A grande importância do controle do polimorfismo no desenvolvimento de compostos bioativos de utilidade terapêutica está principalmente relacionada às diferenças de solubilidade, apresentadas pelos diferentes polimorfos, as quais podem afetar diretamente a biodisponibilidade do fármaco e, portanto, sua eficácia. Apesar dos grandes investimentos feitos pela indústria farmacêutica, ainda não foi possível prever todos os polimorfos estáveis de um Composto Farmacêutico Ativo (*Active Pharmaceutical Ingredient*, API). Esta dificuldade se deve a conversão de polimorfos menos estáveis termodinamicamente em polimorfos mais estáveis [7].

1.1.2 Carbamazepina

Foi escolhido para estudo das transformações polimórficas o fármaco carbamazepina juntamente com os excipientes pois dentre os fármacos descritos na literatura que se apresentam sob a forma cristalina e possuem polimorfismo, a carbamazepina (CBZ), cuja estrutura está apresentada na Figura 1.1, é uma das que se destacam pelo impacto que os diferentes polimorfos causam no seu perfil de dissolução e biodisponibilidade.

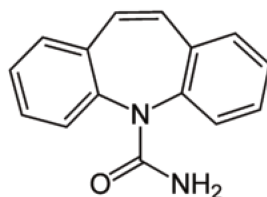


Figura 1.1: Fórmula estrutural da carbamazepina.

A CBZ é um agente efetivo utilizado para controlar a epilepsia e tratar a neuralgia do trigêmeo, as enfermidades maníacas depressivas e os pacientes que apresentam crises convulsivas generalizadas tônico-clônicas. Foi descoberta em 1953 pelo químico Walter Schindler, na Basileia, Suíça [8].

A CBZ é caracterizada por ser um pó branco-amarelado com ponto de fusão entre 189 e 193 °C, sendo praticamente insolúvel em água e éter, levemente solúvel em etanol e acetona e solúvel em propileno glicol e clorofórmio [9].

A CBZ está disponível em formulações farmacêuticas tais como: comprimidos, cápsulas e suspensões orais. Para esse composto já foram descritas na literatura [10], pelo menos, quatro formas polimórficas anidras: triclínica (forma I) (A), trigonal (forma II) (B), monoclinica P (forma III) (C), e monoclinica C (IV) (D), conforme apresentado na Figura 1.2.

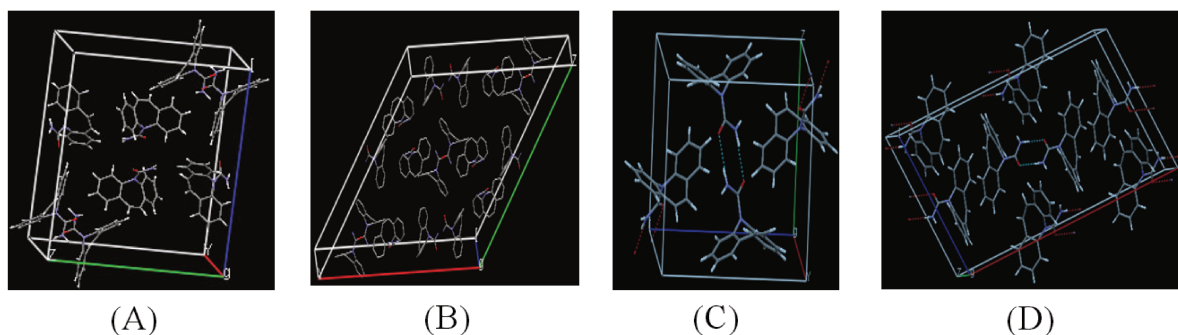


Figura 1.2: Formas polimórficas anidras da carbamazepina: triclínica (forma I) (A), trigonal (forma II) (B), monoclinica P (forma III) (C), e monoclinica C (IV) (D) [11].

Os medicamentos fabricados com CBZ utilizam o polimorfo III que apresenta um menor tempo de absorção pelo organismo, o que é devido (entre outros fatores) à sua maior velocidade de dissolução [12].

1.2 Espectroscopia de Imagem na região do Infravermelho Próximo

Historicamente a descoberta da região do Infravermelho Próximo (do inglês – Near - Infrared, NIR) em 1800 é atribuída a Herschel que conseguiu separar o espectro eletromagnético com o auxílio de um prisma, e observou o aumento acentuado da temperatura além do comprimento de onda do visível, isto é, na região do vermelho, hoje chamada de Infravermelho Próximo e definida como o intervalo de comprimentos de onda de 700 a 2500 nm , correspondentes a faixa de números de onda de 12800 a 4000 cm^{-1} [13]. Nesta região, as ocorrências de transições eletrônicas são raras. De fato, as ocorrências espectrais observadas nesta região se devem quase que totalmente às bandas de absorção relacionadas aos sobretons de transições fundamentais que ocorrem no Infravermelho Médio (*Middle Infrared*,

MIR) e às combinações de transições que ocorrem também naquela região. O que determina a ocorrência e as propriedades espectrais, ou seja, frequência e intensidade das bandas de absorção NIR, são a anarmonicidade e a ressonância de Fermi [14].

O modelo da mecânica quântica de um oscilador anarmônico, Figura 1.3, assume que a curva de energia das oscilações moleculares é afetada pelas interações intramoleculares, as vibrações em torno da posição de equilíbrio são assimétricas e os espaçamentos entre os níveis de energia que a molécula pode atingir não são idênticos, mas diminuem com o aumento da energia.

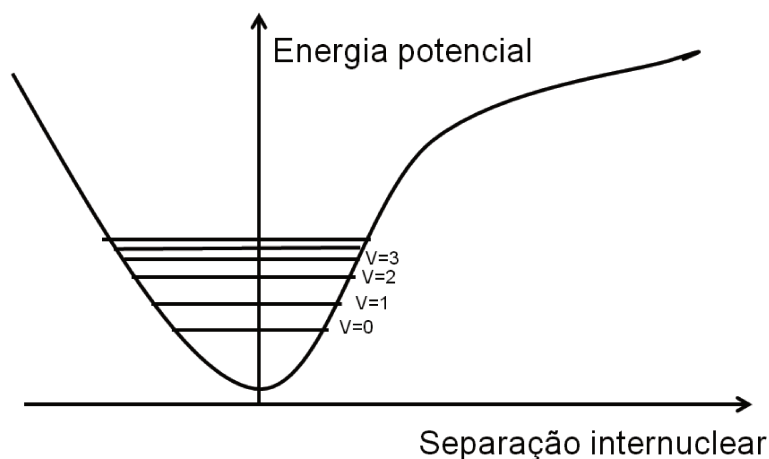


Figura 1.3: Curva de Energia Potencial e níveis vibracionais para o oscilador anarmônico.

Bandas de combinação entre 1900 e 2500 nm são resultado de interações vibracionais, ou seja, suas frequências e intensidades são a soma dos múltiplos de cada frequência de interação. Um tipo especial de interação configuracional, chamada de ressonância de Fermi, ocorre quando moléculas poliatômicas possuem acidentalmente dois diferentes estados vibracionais que possuem a mesma energia e interagem entre si [14].

As bandas de absorção NIR são de 10 a 100 vezes mais fracas que suas correspondentes do estado fundamental no infravermelho médio. A diminuição de sensibilidade devido às transições fracas observadas, não se constitui em grande desvantagem, uma vez que fontes de radiação intensas e detectores de alta eficiência estão disponíveis para uso nesta região espectral. Além disso, o fato das

ocorrências não apresentarem alta intensidade, permite o uso da técnica em amostras nas quais um alto teor de água se encontra presente [15]. O baixo coeficiente de absorção possibilita uma alta profundidade de penetração na amostra, permitindo um ajuste da espessura da amostra (caminho ótico). Essa é uma vantagem analítica, uma vez que permite a análise direta da absorção e do espalhamento da amostra, tais como em líquidos ou sólidos turvos nos modos de transmitância ou absorbância sem pré-processamentos adicionais.

Vantagens como obtenção de espectros em curto período de tempo, não produção de resíduos químicos, ser não invasiva e não requerer preparo de amostra tem motivado o desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando a técnica de espectroscopia NIR em indústrias [16].

A espectroscopia de Imagem na região do Infravermelho Próximo (*Near - Infrared - Chemical Imaging*, NIR-CI) [17] é uma poderosa extensão da espectroscopia NIR convencional, fornecendo informações, de forma não destrutiva, dos parâmetros de interesse da superfície da amostra, na forma de comprimido, juntamente com a faixa de distribuição espacial de cada espécie. NIR-CI tem tido como principal aplicação a análise quantitativa de materiais de diversas áreas como agricultura, farmacêutica e petroquímica, entre outras [16]. A técnica tem sido aplicada a diferentes compostos farmacêuticos para avaliar, por exemplo, dissolução do comprimido [18], uniformidade dos componentes [19], distribuição polimórfica [20] ou estudos de processos [21]. A espectroscopia de imagem inclui a medida de um espectro completo por unidade da superfície da amostra (pixel) e o resultado pode ser visualizado como um arranjo tridimensional de dados denominado hiper-cubo espectral, onde duas das três dimensões são as coordenadas x, y do pixel e a terceira corresponde aos números de onda do espectro. Normalmente, para aplicação dos métodos quimiométricos, os dados devem ser organizados em uma matriz de dados em duas dimensões, nas quais as linhas são os espectros relacionados aos diferentes pixels, conforme apresentado na Figura 1.4.

Para se obter espectros NIR de boa qualidade é necessário que a amostra se apresente de forma adequada, especialmente com amostras sólidas, uma vez que os efeitos de variações na densidade de empacotamento ou posicionamento da amos-

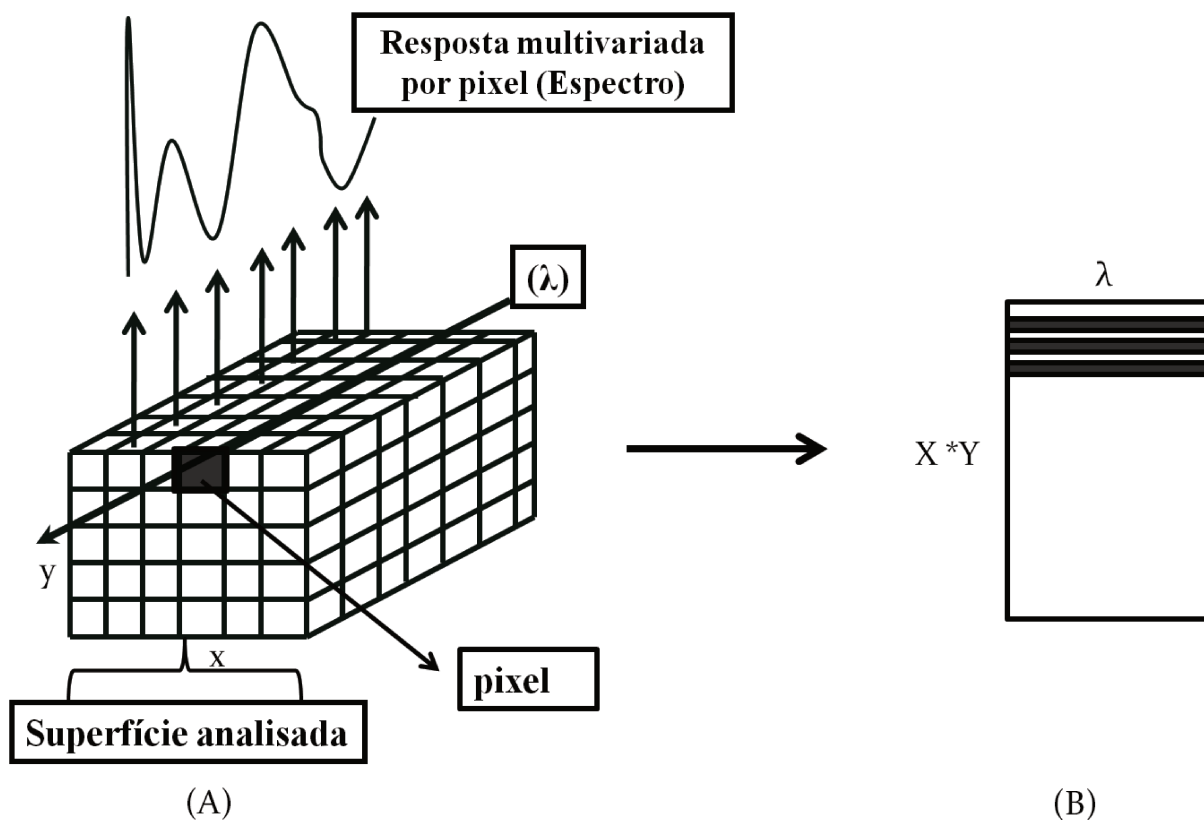


Figura 1.4: Hipercubo Espectral (A) de dados provenientes de uma análise de espectroscopia de imagem e a matriz desdobrada (B).

tra podem ser grandes fontes de erro na obtenção dos espectros [22].

Devido à grande quantidade de dados gerados, a alta sobreposição espectral e baixa intensidade dos sinais, para que uma metodologia baseada na espectroscopia NIR possa ser implementada com eficácia, é necessária a utilização de métodos quimiométricos [23].

1.3 Métodos Quimiométricos

Com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, torna-se necessária a utilização de análise de dados mais elaborados do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades, por exemplo) com os resultados desejados (concentrações, por exemplo).

As análises quantitativas que eram realizadas na maioria das vezes por "via

úmida" como titulação, precipitação e reações específicas, que são demoradas e muitas vezes pouco exatas e precisas, estão cada vez mais sendo substituídas por técnicas instrumentais como: ressonância magnética nuclear, espectroscopia vibracional (infravermelho médio, infravermelho próximo, espectroscopia Raman), espectroscopia no visível/ultravioleta, espectrometria de massas, cromatografia, etc., que aliam a velocidade de análise com uma boa qualidade de resultados. Nessas técnicas instrumentais a concentração do analito não é obtida diretamente, mas sim uma grande quantidade de sinais (curvas, picos) que podem ser convertidos através de uma relação matemática nas concentrações das várias espécies presentes [24].

Muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais se podem medir muitas variáveis simultaneamente, ao se analisar uma amostra qualquer. Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental em dados químicos de interesse requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas constituem no momento a melhor alternativa para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema [24].

Interferências espectrais podem ocorrer devido ao espalhamento de luz, variações de caminho ótico e ruído que se originam devido à variação física das amostras ou efeitos instrumentais. Para corrigir esses efeitos faz-se necessário o uso de ferramentas matemáticas de pré-processamento de dados, realizado antes da modelagem multivariada. Alguns dos métodos de pré-processamento utilizados são Correção de Espalhamento Multiplicativo (*Multiplicative Scatter Correction*, MSC) [25], Variação Padrão Normal (*Standard Normal Variate*, SNV) [26] e 2ª Derivada de Savitzky - Golay [27].

A pesquisa na área de Quimiometria abrange o desenvolvimento e aplicação de diferentes métodos estatísticos e matemáticos em dados de origem química. Diferentes metodologias quimiométricas têm sido aplicadas em NIR-CI para extrair informações relevantes sobre a superfície da amostra, como a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) [28] e Resolução Multivariadas de Curvas (do inglês - *Multivariate Curve Resolution*, MCR) [29]. Quando uma calibração de dados é possível de ser realizada, a calibração multivariada ba-

seada em regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) [30] pode ser utilizada. Entretanto, se um conjunto de hipercubos espectrais é adquirido em diferentes tempos ou condições, esse sistema dinâmico pode ser investigado usando métodos quimiométricos multimodo como a Análise de Fatores Paralelos (*Parallel Factor Analysis*, PARAFAC) e MCR com matriz aumentada [31].

1.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) é utilizada para analisar as interações dentro de um conjunto de variáveis (altura de picos cromatográficos, valores de absorvâncias, etc.) ou objetos (amostras, compostos químicos, espectros, etc.). É uma ferramenta quimiométrica que permite extrair, de um determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Este conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz (dados bidimensionais), onde as linhas são as amostras e as colunas as variáveis. O principal objetivo da PCA [32] é a redução do número de variáveis originais gerando uma nova representação destas variáveis pelas componentes principais (PCs), que são combinações lineares das variáveis originais.

A PCA transforma a matriz de dados originais $\mathbf{X}_{(n \times p)}$ formada por n objetos e p variáveis, no produto de duas matrizes menores, conforme mostra a equação 1.1,

$$\mathbf{X}_{(n \times p)} = \mathbf{T}_{(n \times q)} \mathbf{P}'_{(q \times p)} + \mathbf{E}_{(n \times p)} \quad (1.1)$$

em que \mathbf{T} é a matriz de escores, \mathbf{P} é a matriz dos pesos, \mathbf{E} é a matriz dos resíduos e q é o número de componentes principais incluídas na análise. Como q normalmente é menor que p ou n , uma matriz maior é transformada em duas matrizes menores tornando a análise da matriz \mathbf{X} mais simples.

A Figura 1.5 mostra a aplicação da análise de componentes principais para dados de imagem hiperespectrais obtidas nos tempos de 1 até o tempo n ($1 \rightarrow t_n$).

Em espectroscopia de imagem, os pesos correspondem à dimensão espectral

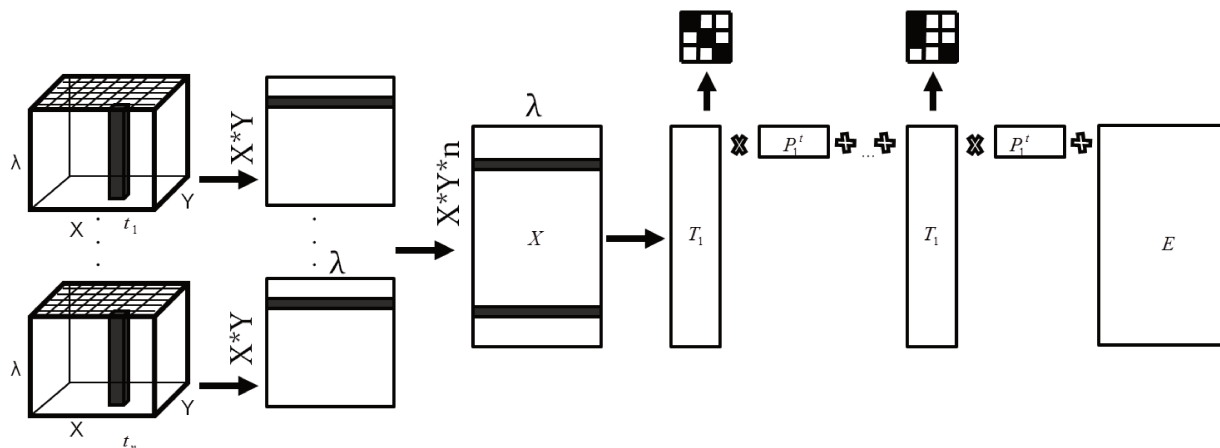


Figura 1.5: Decomposição de dados hiperespectrais em componentes principais por PCA.

dos dados, que contém o peso de cada variável (número de onda) e os escores trazem, para cada pixel, valores que estão correlacionados à similaridade de cada substância em cada pixel.

1.3.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

No PLS, a matriz de respostas instrumentais (\mathbf{X}) é relacionada à matriz da propriedade de interesse (\mathbf{Y}). Essas informações são utilizadas ao mesmo tempo na fase de construção do modelo de calibração. As matrizes de dados iniciais são decompostas em pesos e escores. Os espectros originais podem ser considerados como combinações lineares dos pesos e os escores estão relacionados à localização da amostra na matriz de dados [30].

As matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas pela Análise de Componentes Principais, representadas pelas equações 1.2 e 1.3,

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E} \quad (1.2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^t + \mathbf{F} \quad (1.3)$$

em que \mathbf{T} e \mathbf{U} são as matrizes escores ; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as matrizes de pesos e \mathbf{E} e \mathbf{F} são as matrizes contendo os resíduos.

Uma relação linear entre os dois blocos é realizada correlacionando os escores de componente a cada vez, utilizando o modelo linear, descrito na equação 1.4

$$\mathbf{U}_h = \mathbf{b}_h \mathbf{T}_h \quad (1.4)$$

em que “ h ” é o número da componente principal.

Para que a covariância de \mathbf{T} e \mathbf{U} seja maximizada deve-se buscar um modelo onde as matrizes dos resíduos \mathbf{E} e \mathbf{F} sejam as menores possíveis e, ao mesmo tempo, conseguir uma relação linear ótima entre \mathbf{T} e \mathbf{U} . No PLS isto é obtido por uma leve mudança nos valores dos escores, de forma a produzir a melhor relação possível. Nesta etapa as componentes principais deixam de possuir este nome, sendo denominadas de variáveis latentes, pois elas não mais descrevem a máxima variância dos dados.

A Figura 1.6 apresenta a decomposição em variáveis latentes das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} para o modelo PLS, a partir de uma série de imagens hiperespectrais de calibração e validação (onde se aplica o modelo construído a nova matriz de dados para validar o modelo desenvolvido) e posteriormente é feita a etapa de previsão, em que os mapas de distribuição de concentração de cada um dos constituintes presentes na amostra analisada são construídos a cada tempo, por exemplo.

Após o modelo ter sido desenvolvido é feita a validação com novas amostras. Um dos métodos quimiométricos mais utilizados na determinação do número de variáveis latentes é o método de validação cruzada que é baseado na avaliação da grandeza dos erros de previsão comparando com os valores das variáveis dependentes das amostras do conjunto de calibração quando as mesmas não participam da construção do modelo de regressão.

No procedimento de validação cruzada *leave-one-out* (“deixe uma fora”) o PLS separa uma das amostras de calibração e a usa como validação. Isto é feito até que todas as amostras de calibração sejam usadas como amostra de validação.

Em paralelo pode-se realizar a validação com um conjunto externo que deve apresentar amostras com valores que compreendam o intervalo de dados do conjunto de calibração e que devem apresentar desempenho muito semelhante em

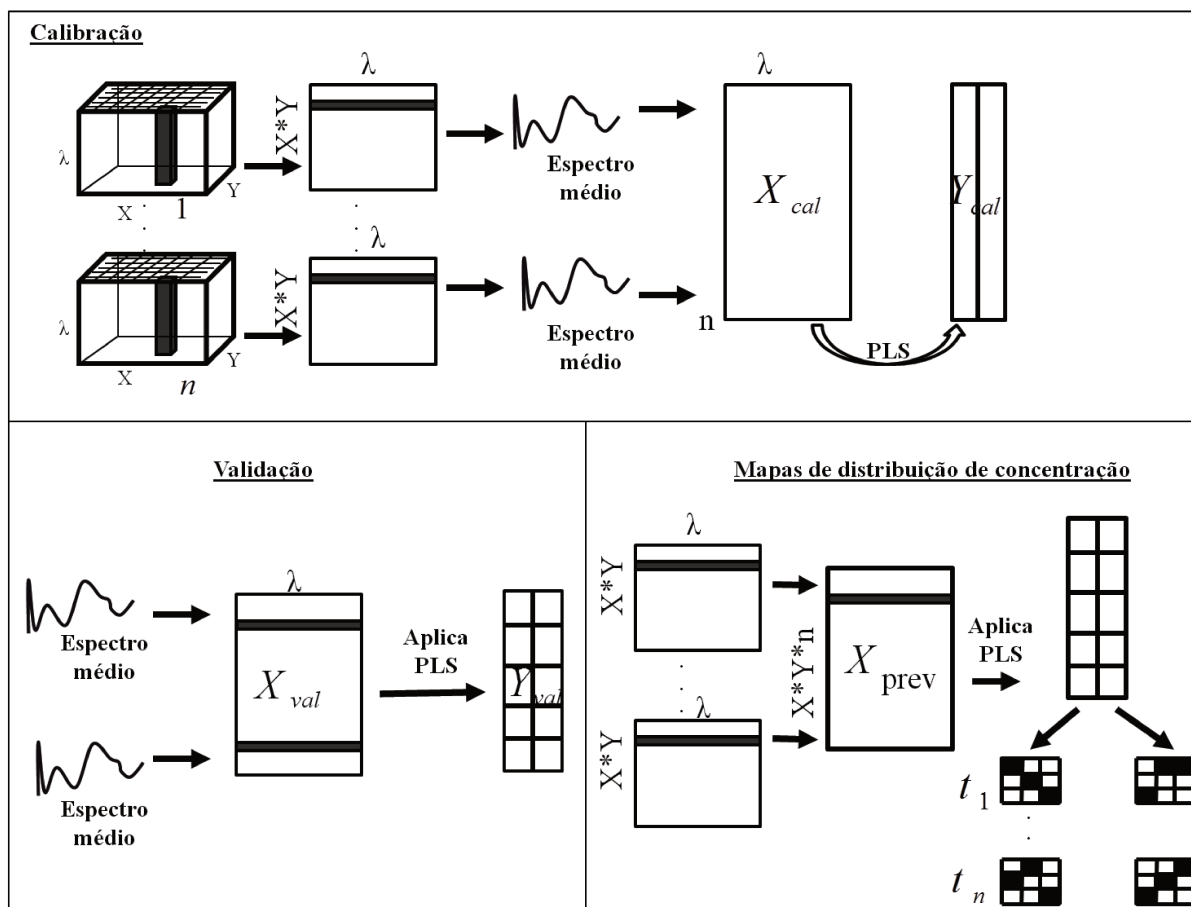


Figura 1.6: Decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para o modelo PLS, a partir de dados hiperespectrais.

todos os parâmetros de avaliação dos modelos de calibração.

Para calcular o erro dos modelos de calibração utiliza-se a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático (do inglês - Root Mean Square Error, RMSE), conforme equação 1.5, onde n é o número de espectros (amostras), y_i e \hat{y}_i são os valores esperados de concentração e os valores estimados pelo modelo PLS, respectivamente.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n-1} (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (1.5)$$

Pode-se obter, de acordo com a equação 1.5, a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração (*Root Mean Square Error of Calibration, RMSEC*), neste caso o número de graus de liberdade é dado por $n-1$, Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (*Root Mean Square Error of Cross Vali-*

ation, RMSECV) ou Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão (*Root Mean Square Error of Prediction, RMSEP*).

Os resultados do perfil de concentração podem ser redobrados em mapas de distribuição de concentração ou perfis de concentração no tempo, como apresentado na Figura 1.6.

1.3.3 Resolução Multivariada de Curvas (MCR)

O MCR é um método utilizado para prever os valores de concentração, assim como os espectros puros dos componentes dentro da amostra, a partir de uma matriz de dados que contém os dados instrumentais. A análise de dados por MCR pode ser realizada sobre uma única matriz de dados ou sobre diferentes matrizes simultaneamente. Este pode ser visto como um método de resolução de sinais que obtém os perfis puros dos componentes dentro de uma mistura de componentes.

O método MCR-ALS faz a decomposição bilinear da matriz de dados (**D**) para se obter as matrizes de concentração (**C**) e a matriz de espectros puros (**S'**), de acordo com a equação 1.6, em que **E** é a matriz de erros.

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}' + \mathbf{E} \quad (1.6)$$

No processo de otimização por ALS para encontrar os melhores valores de **C** e **S** para se obter um erro mínimo, é possível adicionar restrições como: não negatividade, unimodalidade e *closure* (balanço de massa), sendo estas aplicadas a concentração e/ou espectros. Essas possibilidades fazem o MCR diferente de outras ferramentas quimiométricas, uma vez que um significado físico é obtido. A porcentagem de variância explicada pelo modelo, o resíduo e o coeficiente de variação entre o espectro obtido e o espectro puro das espécies são usados como parâmetros para avaliar a eficiência do modelo.

O MCR é baseado na decomposição bilinear dos dados realizada pelo algoritmo de Mínimos Quadrados Alternantes (*Alternating Least Squares, ALS*) [33], que resulta no isolamento, resolução e quantificação das fontes de variação dos

dados. Este assume sucessivamente que os pesos entre dois modos (conjunto de índices pelos quais o arranjo de dados pode ser desdobrado) são conhecidos e então estima os parâmetros do último modo desconhecido por mínimos quadrados. Este é um algoritmo iterativo cuja finalização ocorre apenas quando a diferença relativa nos ajustes entre duas iterações sucessivas estiver abaixo de um determinado limite. Na análise de dados de imagens hiperespectrais, inicialmente o cubo de dados é decomposto, como mostrado na Figura 1.7.

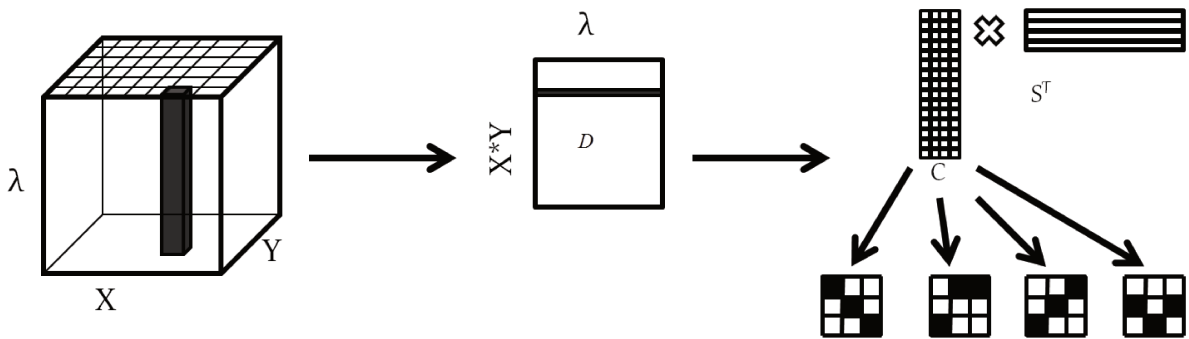


Figura 1.7: Esquema de decomposição de dados NIR-CI por MCR-ALS.

A decomposição de dados por MCR pode ser realizada em uma única matriz de dados ou em diferentes matrizes simultaneamente, chamada de matriz aumentada. Essas matrizes podem ser empilhadas no sentido das colunas (direção das concentrações) gerando uma nova matriz. O MCR com matriz aumentada pode ser obtido em situações de aquisição de dados por NIR-CI em diferentes tempos ou condições. Outra possibilidade é a de colocar as matrizes no sentido das linhas (direção das variáveis) gerando a matriz aumentada, no caso de aquisição de dados por diferentes técnicas. Para o caso de dados NIR-CI, o MCR pode ser aplicado depois de desdobrar as matrizes do hiper-cubo de dados e colocá-las empilhadas, considerando estas matrizes como sendo única. Os resultados do perfil de concentração podem ser redobrados em mapas de distribuição de concentração ou perfis de tempo como mostrado na Figura 1.8.

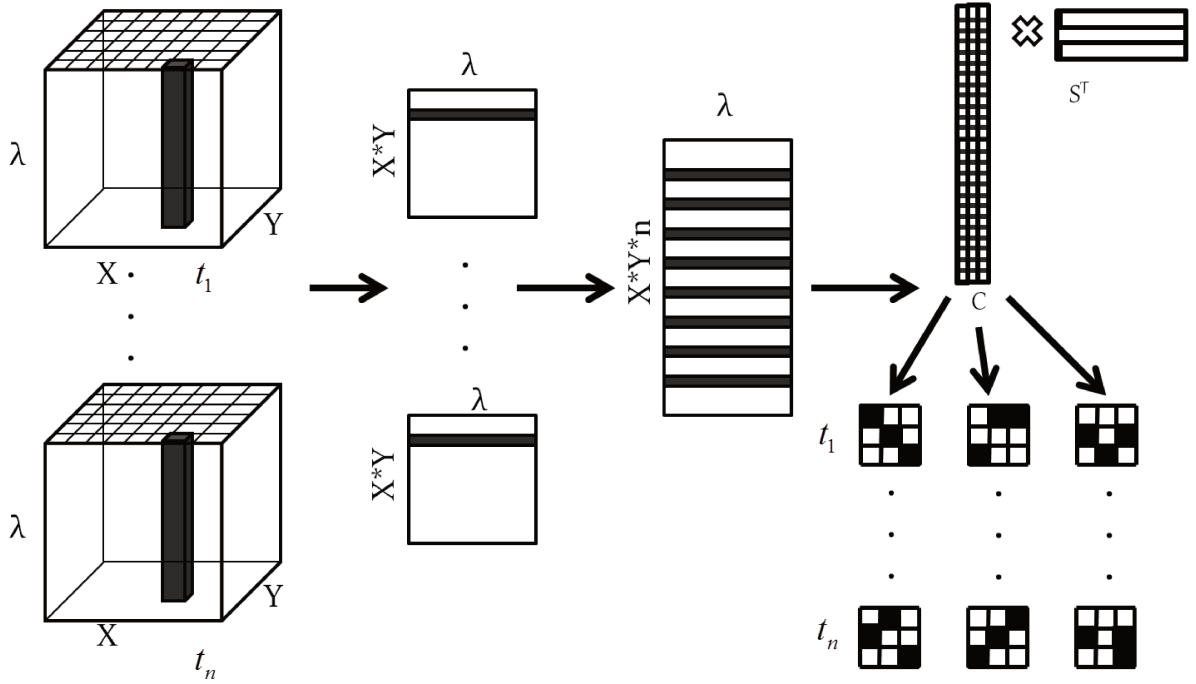


Figura 1.8: Esquema do sistema dinâmico de dados NIR-CI decomposto por MCR-ALS.

1.3.4 Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC)

A PARAFAC é um método de decomposição n-dimensional onde os dados são transformados em conjuntos de tríades ou componentes trilineares, que descrevem de uma forma mais concisa o arranjo original. Um dado tensor $\underline{\mathbf{X}}$ é decomposto em duas contribuições, uma sistemática, descrita por F conjuntos de produtos externos (tríades), contendo os elementos a_{if} , b_{jf} e c_{kf} , respectivamente [34], e um não modelável (e_{ijk}) representando os desvios do modelo com relação aos dados originais. O modelo trilinear é obtido para minimizar a soma dos quadrados dos resíduos, e_{ijk} , de acordo com o modelo apresentado na equação 1.7,

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (1.7)$$

em que F é o número de fatores (fontes independentes de variação) no modelo. O modelo PARAFAC pode ser representado também pela matriz na equação 1.8, onde as matrizes A , B e C tem, respectivamente, as dimensões $I \times F$, $J \times F$ e $K \times F$, e o símbolo $|\otimes|$ representa o produto de Khatri-Rao:

$$X = \mathbf{A}(C| \otimes |B)^t + \mathbf{E} \quad (1.8)$$

As principais vantagens do PARAFAC são a habilidade de fornecer uma única solução, que é independente da rotação, e todos os fatores serem estimados simultaneamente, ao contrário da PCA, em que os componentes são estimados um a cada vez. Isto ocorre porque os componentes do modelo não são ortogonais portanto, dependem uns dos outros.

Adicionalmente, uma etapa importante na análise em PARAFAC é a escolha do número de fatores. Este número pode ser estimado por diferentes processos como estimativas baseadas em conhecimento a priori do sistema, com respeito à variância explicada pelo modelo, por métodos de reamostragem ou por diagnóstico de consistência do núcleo (CONCORDIA) [35].

O CONCORDIA é baseado na interpretação do PARAFAC como um modelo Tucker3 restrito. Uma possível generalização do modelo de componentes principais para dados de duas entradas é usar uma matriz núcleo não diagonal $\underline{\mathbf{G}}$. O modelo Tucker3 de $\underline{\mathbf{X}}$ (P, Q, R), em que a notação (P, Q, R) é usada para indicar que o modelo tem P, Q, R fatores em três entradas diferentes. A representação gráfica do modelo Tucker3 é dada pela Figura 1.9. O Tucker3 é aplicado aos parâmetros do modelo PARAFAC estimados e, se houver consistência trilinear, os elementos da superdiagonal do tensor central têm valores próximos de um e os demais elementos valores próximos a zero. Um diagnóstico de consistência do núcleo é um indicativo do ajuste do modelo criado, sendo mais próximo de 100 % quanto melhor ou mais estável for este ajuste, pois a estrutura de tal modelo será trilinear [36].

Os dados de NIR-CI podem ser adquiridos em diferentes tempos (ou condições) e serem modelados como uma matriz de 3 “modos” (conjunto de índices pelos quais o arranjo de dados pode ser desdobrado) pelo desdobramento da dimensão espacial em cada tempo (ou condição) e organizando as matrizes desdobradas, em todos os tempos (ou condições), para formar uma matriz de 3 modos como apresentado na Figura 1.10.

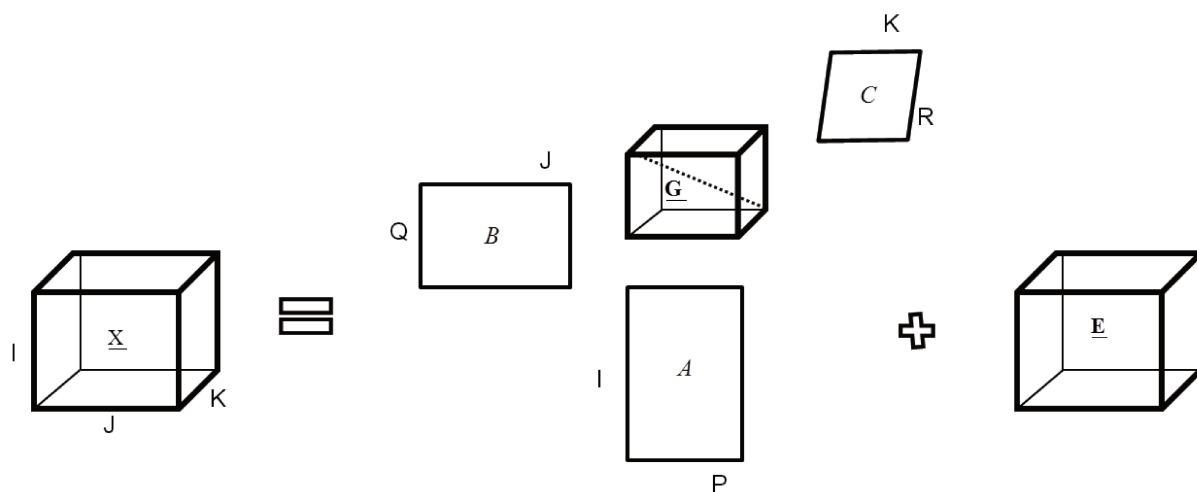


Figura 1.9: Modelo PARAFAC escrito como um modelo de Tucker3.

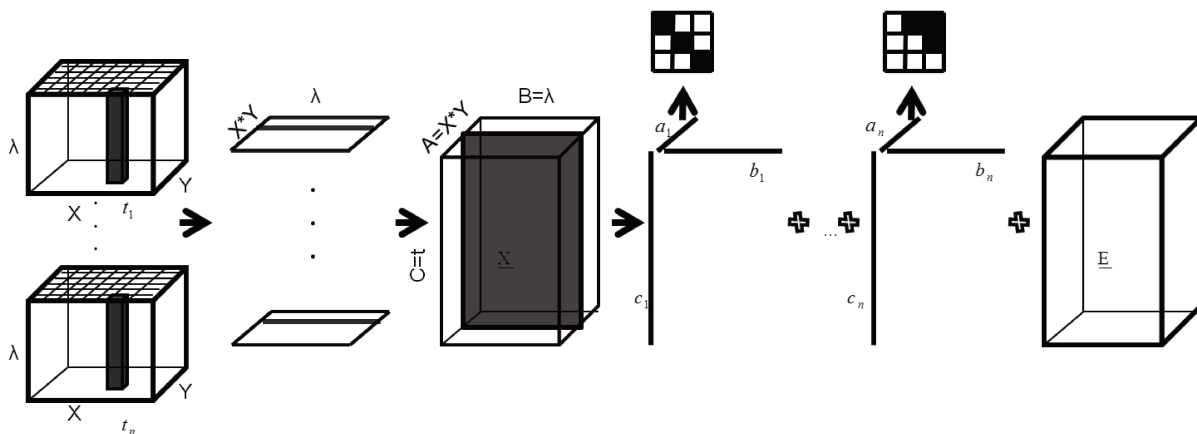


Figura 1.10: Esquema de sistema dinâmico de dados NIR-CI decomposto por PARAFAC.

O PARAFAC pode ser aplicado para decompor o arranjo tridimensional em três novas matrizes de pesos (A, B e C) com elementos relativos, cada uma delas a um modo. A modelagem ocorre de maneira a minimizar a soma dos quadrados dos resíduos no modelo. No presente estudo o modo A refere-se ao modo amostral, o modo B se refere ao modo espectral e o modo C ao modo temporal. As amostras podem ser redobradas para se obter o mapa de distribuição de cada fator. O algoritmo utilizado na solução do modelo PARAFAC, assim como no modelo MCR, é o algoritmo dos Mínimos Quadrados Alternantes.

Os resultados do perfil de concentração da transformação polimórfica da carbamazepina podem ser redobrados em mapas de distribuição dos fatores como

mostrado na Figura 1.10.

Capítulo 2

MAPEAMENTO DAS FORMAS POLIMÓRFICAS EM COMPRIMIDO DE CARBAMAZEPINA ANTES E APÓS O AQUECIMENTO A 160 °C

2 MAPEAMENTO DAS FORMAS POLIMÓRFICAS EM COMPRIMIDO DE CARBAMAZEPINA ANTES E APÓS O AQUECIMENTO A 160 °C

2.1 Objetivos

O trabalho experimental está dividido em duas partes, sendo que na primeira parte, apresentada neste capítulo, objetiva-se: utilizar a espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo para avaliar a transformação polimórfica da carbamazepina existente na forma III (forma comercial) para a forma I em dois tempos: antes (25 °C) e após 3 h de aquecimento a 160 °C, a temperatura de aquecimento foi escolhida de acordo com [10], realizando para tanto o mapeamento do comprimido todo de carbamazepina; utilizar a ferramenta quimiométrica MCR para análise dos dados; estudar as mudanças na distribuição de cada polimorfo na superfície do comprimido pela comparação das imagens antes e após aquecimento para cada forma polimórfica; quantificar as formas polimórficas antes e após aquecimento; construir histogramas para estudo da homogeneidade da distribuição do fármaco no comprimido. Além disso, é realizada a caracterização polimórfica das formas I e III da carbamazepina.

2.2 Síntese Polimórfica

A carbamazepina na forma I foi obtida através do aquecimento da carbamazepina na forma III durante 4 horas, em estufa, na temperatura de 170 °C, para garantir que toda a massa de carbamazepina fosse transformada na forma I [37]. Posteriormente as formas polimórficas foram encaminhadas para a caracterização pelo uso das técnicas Espectroscopia do Infravermelho Médio e Difração de Raios X.

2.3 Caracterização Polimórfica

2.3.1 Espectroscopia no Infravermelho Médio

A espectroscopia no Infravermelho Médio tem sido uma das técnicas mais utilizadas na identificação de polimorfos, principalmente por ser uma técnica robusta e disponível em muitos laboratórios [38].

A radiação infravermelha provoca movimentos vibracionais de átomos ou grupo de átomos de compostos orgânicos. Estas vibrações dão origem à absorção em regiões características na região do infravermelho - a absorção de energia em uma molécula orgânica será característica do tipo de ligações e átomos presentes em um grupo funcional - grupos funcionais específicos absorvem em regiões características.

A espectroscopia no infravermelho é utilizada como técnica de caracterização polimórfica já que por meio de alterações espectrométricas (aparecimento, desaparecimento e deslocamento de bandas ou aumento ou diminuição de sua intensidade) é possível relacionar o número de onda à porcentagem de transmitância detectada pelo equipamento e assim definir a qual polimorfo corresponde o espectro obtido.

2.3.2 Difração de Raios X

A metodologia de determinação da estrutura molecular e da estrutura cristalina, chamada cristalografia de raios X, baseia-se no fenômeno de difração que ocorre devido à interação da radiação eletromagnética com a matéria cristalina. Hoje em dia são utilizados para análise de cristais, raios X de comprimento de onda bem determinados, produzidos por um tubo de raios X e selecionados por difração. Quando este feixe definido difrata em um cristal desconhecido, a medida do ângulo de difração do raio emergente permite elucidar a distância dos átomos no cristal e, conseqüentemente, a estrutura cristalina. Os ângulos dos feixes resultantes da difração são lidos pelo equipamento e processados por computador, que calcula e mostra as prováveis configurações dos átomos no cristal. Esse método de análise é

muito utilizado com o objetivo da análise estrutural e caracterização de polimorfos e solvatos [39].

2.3.3 Resultados e Discussão

Como técnica de caracterização das formas polimórficas da carbamazepina foi utilizada a técnica de espectroscopia no infravermelho médio e difração de raios X. Os espectros de infravermelho estão apresentados na Figura 2.1.

Pode-se observar pela análise da Figura 2.1 (A e B) que existe uma série de diferenças espectrais entre as formas I e III da carbamazepina. Elas apresentam diferenças nos picos entre 3500 e 3450, 1720 e 1630, 1620 e 1575, 1415 e 1320, 1160 e 1145, 890 e 860, 808 e 796, 785 e 750 cm^{-1} e um pico entre 960 e 945 cm^{-1} . Borcka, L. et al. [40] descrevem que estas bandas com máximos em 955 e 1273 correspondem provavelmente a substituição 1,2 do anel aromático e estiramento da ligação N-H em aminas aromáticas. Na Figura 2.2 está apresentada a outra técnica de caracterização utilizada neste trabalho: Difração de Raios X de Pós (*Powder X-Ray Diffraction*, PRXD), para as formas polimórficas.

A Figura 2.2 mostra que os picos característicos de cada polimorfo aparecem em regiões distintas. Alguns dos picos característicos da forma III, Figura 2.2 (B), ocorrem em valores de $2\theta = 14,9; 15,5; 15,8; 27,2; 27,5$ e $32,0^\circ$ e para o polimorfo I, Figura 2.2 (A), pode-se citar os picos característicos em $2\theta = 6,1; 8,0; 8,7; 9,4; 12,25; 19,8$ e $22,8^\circ$. Os resultados encontrados por FT-IR e PXRD estão de acordo com os encontrados na literatura [37], evidenciando assim a utilização das formas polimórficas de forma correta, quando do estudo da transformação polimórfica da forma III para a forma I.

2.4 Parte Experimental

A metodologia do trabalho está dividida em duas partes: na primeira parte foi realizada a formulação dos comprimidos, parte em que se detalharam todas as etapas

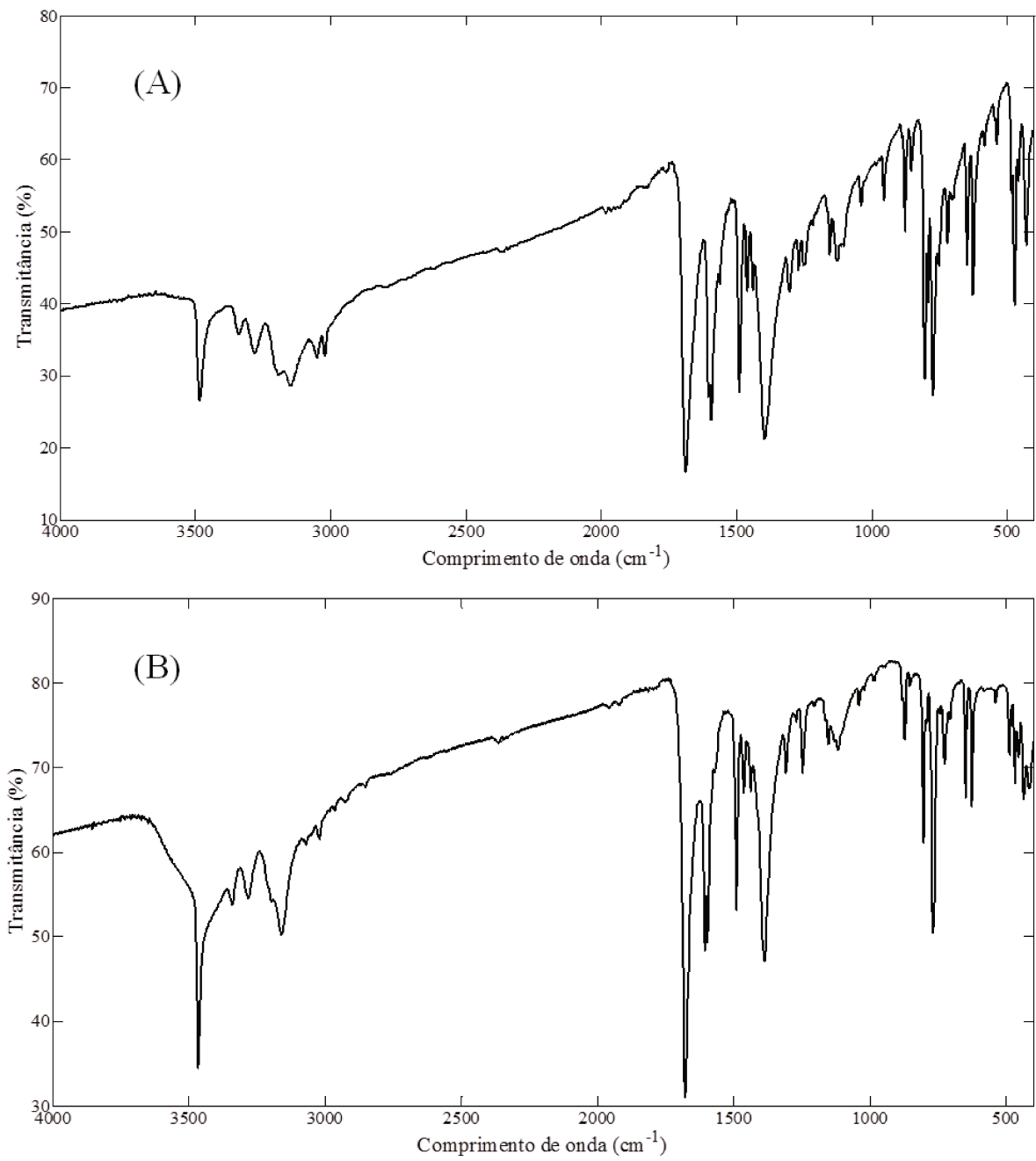


Figura 2.1: Espectros FT-IR para as formas puras I (A) e III (B) da carbamazepina.

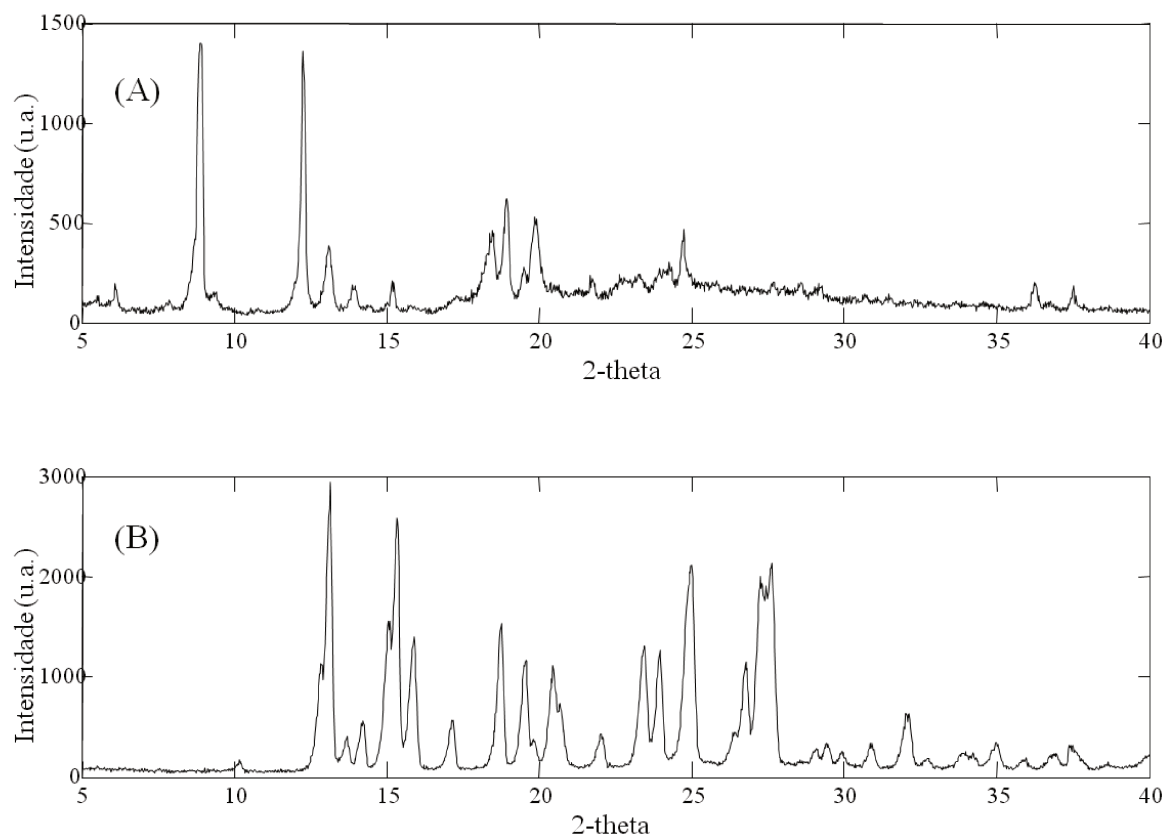


Figura 2.2: Difratoformas de raios X de pós das formas polimórficas da carbamazepina: (A) forma I e (B) forma III.

envolvidas desde a pesagem até a obtenção do comprimido final. Já na segunda parte, foram obtidos os espectros por NIR-CI, etapa em que foram informadas as dimensões da área de interesse mapeada, juntamente com todas as condições utilizadas pelo equipamento para se obter os espectros correspondentes, em unidade de refletância, que posteriormente foram transformados em $\log(1/R)$.

2.4.1 Formulação dos comprimidos

Neste trabalho de estudo do polimorfismo do fármaco carbamazepina com a utilização de ferramentas quimiométricas não se pode deixar de mencionar que a forma polimórfica I do fármaco foi obtida a partir do produto comercial cedido pela EMS Sigma Pharma, em que o fármaco se apresenta na forma polimórfica III.

Os comprimidos de carbamazepina foram formulados com 35,7 % de forma I (100 mg), 35,7 % de forma III (100 mg) e 28,6 % de excipientes (80 mg). Esta formulação esta de acordo com os valores utilizados pela indústria farmacêutica, de acordo com a Tabela 2.1. Estes excipientes possuem as seguintes funções: Celulose Microcristalina é utilizada como diluente, Polividona apresenta capacidade formadora de filme, Dióxido de Silício para evitar o excesso de umidade da mistura dos componentes, Croscarmelose Sódica como desagregante e Estearato de Magnésio como lubrificante.

Excipientes	Quantidade para 1 comprimido (280,00 mg)
Celulose Microcristalina (Cel)	7,8 mg (2,8%)
Polividona (Plv)	52,8 mg (18,9%)
Dióxido de Silício (SiO_2)	2,0 mg (0,7%)
*Croscarmelose Sódica (Crosc)	14,0 mg (5,0%)
Estearato de Magnésio (Est)	3,4 mg (1,2%)

*Croscarmelose sódica corresponde a um polímero com ligações cruzadas das carboximetilcelulose.

Tabela 2.1: Excipientes e suas respectivas concentrações no comprimido de carbamazepina.

No preparo da formulação farmacêutica de carbamazepina, a forma I, a forma III e excipientes foram pesados em balança analítica com precisão de 0,0001 g

e agitados em vórtex por dois minutos. Depois disso, as amostras com massa total de 280 mg foram prensados a 2 toneladas em uma prensa mecânica para a formação dos comprimidos. O comprimido obtido foi então colocado sobre uma peça metálica, que contém um orifício de mesmas dimensões do comprimido, e levado ao espectrômetro de imagem para o mapeamento da área de interesse.

2.4.2 Obtenção dos espectros

Os comprimidos foram analisados no espectrômetro SPECTRUM 100 N FT-NIR acoplado ao sistema de imagem da PerkinElmer Spotlight 400 N, em que, para cada análise, o comprimido foi colocado sobre uma peça metálica e esse sobre o estágio de posicionamento do equipamento. O comprimido todo foi mapeado, necessitando assim de uma área de 225 mm^2 , utilizou-se tamanho de pixel de $50 \mu\text{m}$, obtendo um total de 90000 espectros para cada imagem de 300×300 pixels. Cada espectro foi obtido utilizando 2 varreduras na região de números de onda de 7800 a 4000 cm^{-1} usando uma resolução espectral de 32 cm^{-1} (239 pontos). Antes de realizar a medida espectroscópica do comprimido o foco foi ajustado e o “branco” da análise foi obtido incidindo a radiação sobre uma peça de ouro polido, pois este apresenta refletância próxima de 100 %, espectro este que será subtraído do espectro original posteriormente obtido para cada comprimido. Os dados foram obtidos em porcentagem de refletância e depois convertidos para $\log(1/R)$.

Inicialmente foram obtidas 2 imagens, antes e após o aquecimento a $160 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 horas, possibilitando assim o estudo da transformação polimórfica da carbamazepina da forma III para a forma I. Os dados obtidos foram então analisados por MCR. Todos os cálculos foram efetuados no software Matlab 7.9®, utilizando os toolboxes PLS toolbox 6.2 do Eigenvector e MCR Toolbox disponibilizado por [41].

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Pré-processamento de dados

Como pré-processamento dos dados espectrais, apresentados na Figura 2.3, foi aplicada a segunda derivada aos dados iniciais, visto que a derivada elimina os efeitos de deslocamento de linha de base e intensifica as diferenças espectrais. Também foram testados alguns intervalos espectrais para escolha daquele que conduzisse aos resultados de concentração mais próximos do valor esperado, ou seja, com menor erro, sem perda de informações espectrais. A região selecionada foi de 7800 a 5400 cm^{-1} (150 variáveis) juntamente com o pré-processamento pela segunda derivada está apresentado na Figura 2.4. Nesta região é observada a ocorrência do primeiro e terceiro sobreton de banda de estiramento de N-H de aminas, primeiro sobreton de banda de estiramento de C-H em aromáticos e primeiro sobreton de banda de estiramento de C-N, em aminas.

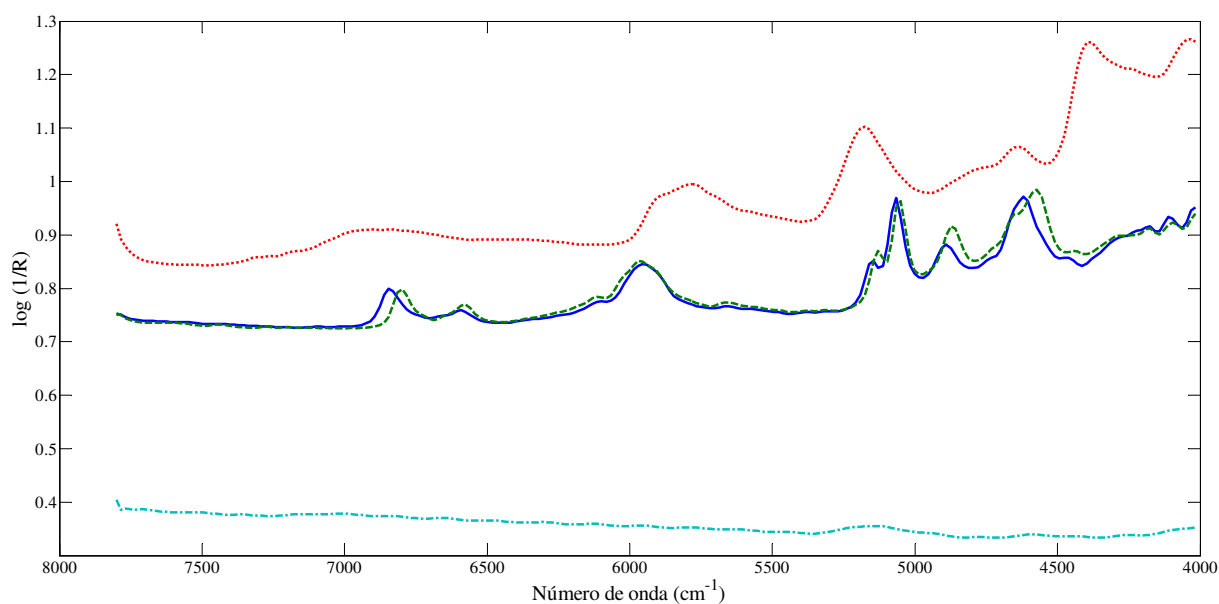


Figura 2.3: Espectros NIR da forma I (—), forma III (---), placebo (· · ·) e peça metálica (- - -).

A Figura 2.4 apresenta os espectros das duas formas polimórficas da carbamazepina (I e III), juntamente com o espectro da peça metálica, considerando que quando da leitura de todo o comprimido parte da área é correspondente à peça metálica, utilizada como suporte no NIR-CI.

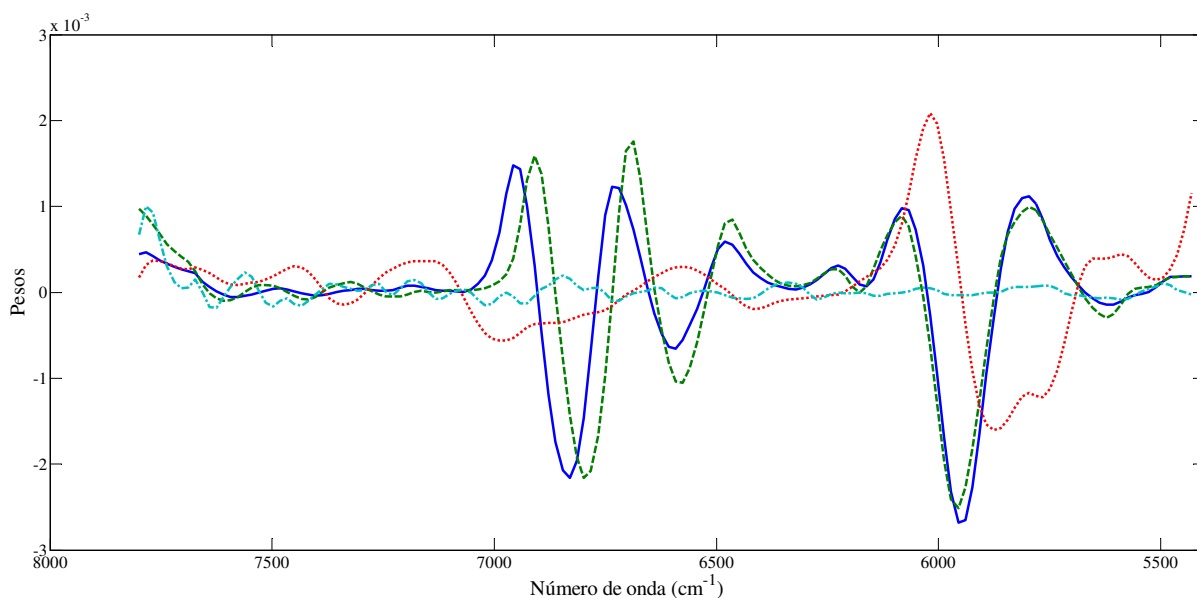


Figura 2.4: Espectros NIR da forma I (—), forma III (---), placebo (· · ·) e peça metálica (- · -), após a segunda derivada.

Pode-se observar que após a segunda derivada foi obtida uma melhor resolução, uma vez que as bandas em torno de 6800 cm^{-1} , que estavam praticamente sobrepostas, apresentaram sinais mais resolvidos tornando mais visível as diferenças existentes entre as formas polimórficas, o que facilitou o posterior processamento dos dados.

Após essa redução na dimensão das matrizes (de 239 para 150 variáveis), as mesmas matrizes foram centradas na média e só então foram construídos os modelos de calibração.

Após o pré-processamento dos dados obtidos por NIR-CI passou-se a etapa de análise dos dados com o MCR antes e após o aquecimento na temperatura de 160 °C , para todo o comprimido.

2.5.2 Análise de dados

Para o estudo da distribuição do fármaco do comprimido mapeado foi realizada a PCA das matrizes de dados antes e após aquecimento contudo, não foi possível qualquer conclusão a respeito das relações existentes entre as variáveis, devido à

interferência dos espectros da peça metálica. Observou-se somente a separação dos espectros da peça em um grupo e no outro os demais espectros devido aos diferentes valores de reflectância da peça metálica quando comparada aos espectros obtidos pelos excipientes e carbamazepina.

O mesmo ocorreu com o PLS porque os espectros da peça metálica são bem diferentes dos demais espectros referentes ao princípio ativo e excipientes, não permitindo assim a utilização de métodos de calibração, tais como PLS.

Devido à interferência da peça metálica a opção foi utilizar o MCR, pois este necessita somente de uma estimativa inicial dos espectros para se obter os mapas de distribuição de concentração.

2.5.2.1 MCR

O MCR foi a ferramenta quimiométrica utilizada a análise dos dados obtidos por NIR-CI, este é um método iterativo baseado nos mínimos quadrados e para ser inicializado é necessária uma estimativa inicial dos “espectros puros” presentes na amostra, Figura 2.3. Estes espectros foram obtidos das espécies puras para as formas polimórficas (I e III) e para o placebo (tudo menos o princípio ativo). Em seguida os espectros foram pré-processados com 2ª derivada de Savitzky-Golay com janela de 15 pontos, polinômio de segundo grau e selecionada a região de 7800 a 5400 cm^{-1} .

É importante ressaltar que, como o MCR é um método de resolução de curvas, tudo o que estiver homogêneo na amostra será considerado como sendo um único espectro ou composto. Nesse sentido, a expressão “espectro puro” aqui não se refere a um componente puro, mas sim, a soma de componentes que tenham constante em determinadas regiões da imagem, um exemplo seria o placebo que é formado por cinco excipientes que aqui são considerados como uma única substância.

Para a análise dos dados com MCR foi utilizada matriz aumentada dos dados. Dessa forma, duas matrizes antes ($t=0$) e após o aquecimento ($t=3h$), foram empilhadas no sentido das concentrações, como apresentado na Figura 1.8, sendo a

primeira matriz antes do aquecimento ($T=25^{\circ}\text{C}$) e a segunda matriz após o aquecimento ($T=160^{\circ}\text{C}$) por 3h. Esse procedimento foi utilizado para facilitar a obtenção dos espectros e mapas de distribuição de concentração devido ao fornecimento de um maior número de informações.

Por meio do ALS foram recuperadas estimativas da intensidade destes espectros em cada pixel, para a forma I e III respectivamente, utilizando como restrições a não negatividade da concentração e *closure* (balanço de massa) para da concentração.

A Figura 2.5 mostra a sobreposição dos espectros puros e dos espectros recuperados, obtidos pelo MCR, das formas I (A) e forma III (B) da carbamazepina em que é possível observar que os espectros são semelhantes.

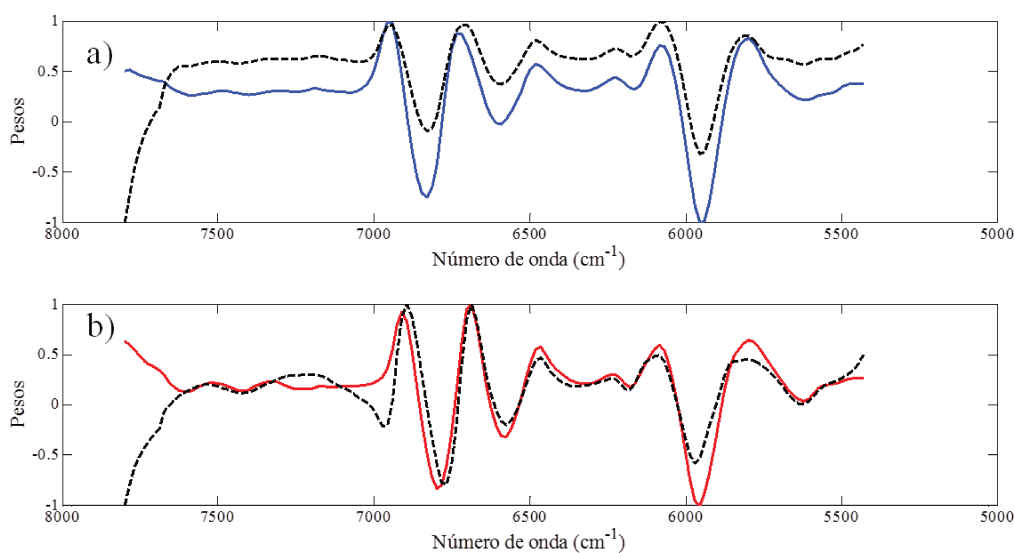


Figura 2.5: Espectros puros NIR da forma I (—), forma III (—) e espectros recuperados (· · ·) para a forma I (A) e forma III (B), respectivamente.

A Figura 2.5 mostra que o método MCR é um método adequado para se determinar e quantificar a carbamazepina presente no comprimido na forma I e forma III pois os espectros reais e recuperados são semelhantes.

A Figura 2.6 traz as imagens das estimativas dos mapas de distribuição de concentração obtidas pelo método MCR-ALS antes e após o aquecimento por 3h a 160°C levando em consideração os espectros da peça metálica porque é de interesse

que a imagem contenha o formato circular do comprimido.

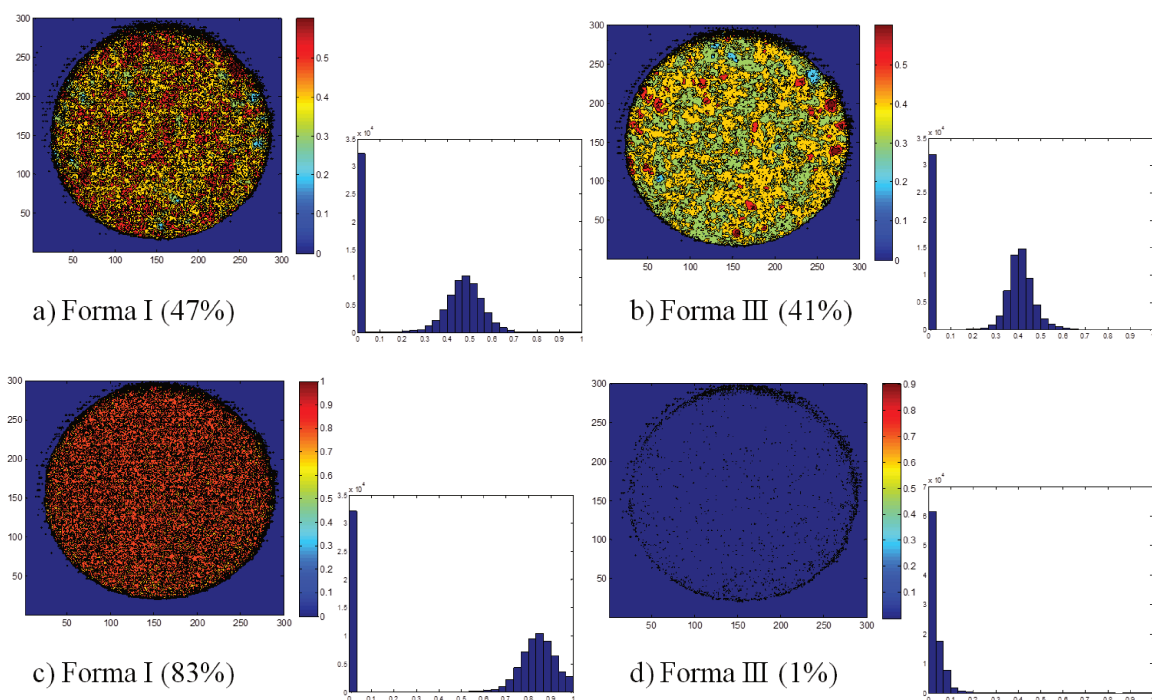


Figura 2.6: Mapas de distribuição de concentração das formas I e III antes (a e b), e após o aquecimento (c e d), com os histogramas de concentração correspondentes.

Pode-se observar pela análise da Figura 2.6 que após o aquecimento o fármaco na forma III diminui sua concentração inicial de 41 % para 1 % e que a forma I aumenta sua concentração de 47 % para 83 %, evidenciando assim a conversão da forma III para a forma I. Observa-se também a complementaridade dos mapas de distribuição de concentração quando se comparam as duas formas polimórficas. É possível observar que o MCR conseguiu diferenciar a parte interna, que contém as formas polimórficas, da parte externa, que contém a peça metálica. Pela análise dos histogramas, nos quais as concentrações seguem uma distribuição gaussiana, pode-se observar a homogeneidade da distribuição das formas polimórficas antes e após o aquecimento, mostrando assim uma conversão homogênea entre as formas.

2.6 Conclusões

Como conclusões deste capítulo pode-se dizer que o método MCR com ma-

triz aumentada conseguiu diferenciar entre os espectros referentes à forma I e a forma III na presença de espectros correspondentes a peça metálica. Foi possível recuperar os espectros referentes à peça metálica e localizá-lo na imagem. O método MCR permitiu o estudo da transformação polimórfica do fármaco e este foi eficiente para quantificar as formas polimórficas no comprimido todo de carbamazepina. O estudo da imagem da distribuição do fármaco na superfície do comprimido em cada pixel permitiu concluir que o fármaco está distribuído de forma relativamente homogênea neste.

Capítulo 3

**ESTUDO DA TRANSFORMAÇÃO
POLIMÓRFICA EM COMPRIMIDO DE
CARBAMAZEPINA COM O TEMPO A 140 °C**

3 ESTUDO DA TRANSFORMAÇÃO POLIMÓRFICA EM COMPRIMIDO DE CARBAMAZEPINA COM O TEMPO A 140 °C

3.1 Objetivos

Nesta segunda parte do trabalho, objetivou-se: utilizar a espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo para acompanhar a transformação polimórfica da carbamazepina da forma III para a forma I gerada por aquecimento a 140 °C com tempo total de 7 horas, com aquisição de dados em intervalos de tempo de uma hora; estudar as mudanças na distribuição de cada polimorfo na superfície do comprimido pela comparação das imagens com o aquecimento em uma parte central do comprimido, para cada forma polimórfica; construir histogramas para estudo da homogeneidade da distribuição do fármaco no comprimido; utilizar PCA para uma visão geral do comportamento dos dados; comparar os resultados dos mapas de distribuição de concentração obtidos pelos métodos de quantificação PLS e MCR com matriz aumentada para determinar a porcentagem de cada polimorfo no comprimido de carbamazepina; obter o perfil de concentração em função do tempo, e mapas de distribuição dos fatores durante o aquecimento do sistema, com uso do PARAFAC.

3.2 Parte Experimental

A metodologia do trabalho está dividida em duas partes: na primeira parte foi realizada a formulação dos comprimidos e na segunda parte foram obtidos os espectros por NIR-CI com o tempo, assim como apresentado na parte experimental do Capítulo 2.

3.2.1 Formulação dos comprimidos

Os comprimidos de carbamazepina foram formulados de acordo com a Tabela 2.1, apresentada no Capítulo 2.

Depois do comprimido pronto, de acordo com o apresentado no capítulo 2, este foi colocado sobre um suporte, que contém um orifício de mesmas dimensões do comprimido, e levado ao espectrômetro de imagem para o mapeamento da área central de interesse. Após a medida espectroscópica inicial este comprimido foi levado à estufa, estabilizada em 140 °C, por 1 h. Em seguida, foi levado ao NIR-CI para leitura da mesma área mapeada inicialmente. Esse procedimento foi repetido por mais seis vezes, totalizando 7 horas de aquecimento a 140 °C. Para que fosse possível mapear a mesma área os valores das coordenadas x, y e z do microscópio foram mantidos constantes em todas as análises espectroscópicas efetuadas, para posterior construção dos modelos.

3.2.2 Obtenção dos espectros

Os comprimidos foram analisados no espectrômetro SPECTRUM 100 N FT-NIR acoplado ao sistema de imagem da PerkinElmer Spotlight 400 N, em que, para cada análise, o comprimido foi colocado sobre um suporte e esse sobre o estágio de posicionamento do equipamento. Uma área central do comprimido foi mapeada, totalizando uma área de 25 mm². Para isso, utilizou-se tamanho de pixel de 50 µm, obtendo um total de 22500 espectros para cada imagem de 150 x 150 pixels. Cada espectro foi obtido utilizando 2 varreduras na região de números de onda de 7800 a 4000 cm^{-1} (239 pontos) usando uma resolução espectral de 32 cm^{-1} . Antes de realizar a medida espectroscópica do comprimido o foco foi ajustado e o “branco” da análise foi obtido incidindo a radiação sobre uma peça de ouro polido. Os dados foram obtidos em porcentagem de refletância e posteriormente convertidos para $\log(1/R)$.

As imagens obtidas durante o aquecimento a 140°C, por 7 horas, foram utilizadas para acompanhar a transformação polimórfica da carbamazepina e determinar

o perfil de concentração da transformação polimórfica. Os dados foram analisados por PCA, PLS, MCR e PARAFAC. Todos os cálculos foram efetuados no software Matlab 7.9®, utilizando os toolboxes: PLS toolbox 6.2 do Eigenvector e MCR Toolbox disponibilizado por R., Tauler [41].

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Pré-processamento de dados

Como pré-processamento dos dados espectrais iniciais, apresentados na Figura 3.1, foi aplicada a segunda derivada visto que há pequena quantidade de ruídos o que não prejudica sua aplicação, pois esta elimina os efeitos de deslocamento de linha de base e intensifica as diferenças espectrais. Também foram testados alguns intervalos espectrais para escolha daquele que conduzisse aos melhores resultados, sem perda de informações espectrais. A região selecionada foi de 7800 a 5400 cm^{-1} (150 variáveis) juntamente com o pré-processamento pela segunda derivada estão apresentados na Figura 3.2. Nesta região é observada a ocorrência do primeiro e terceiro sobreton de banda de estiramento de N-H de amins, primeiro sobreton de banda de estiramento de C-H em aromáticos e primeiro sobreton de banda de estiramento de C-N, em amins.

Pode-se observar que foi obtida uma melhor resolução das bandas após segunda derivada, pois as bandas em torno de 6800 cm^{-1} , que estavam praticamente sobrepostas, apresentaram sinais mais resolvidos tornando mais visível as diferenças existentes entre as formas polimórficas, o que facilita a posterior análise dos dados.

Após essa redução na dimensão das matrizes (de 239 para 150 variáveis), as mesmas matrizes foram centradas na média, com o objetivo de minimizar os efeitos externos obtidos durante a aquisição dos espectros tais como espalhamento, e só então foram construídos os modelos de calibração propriamente ditos.

Após o pré-processamento dos dados, passou-se à etapa de análise dos dados com as ferramentas quimiométrica PCA, PLS, MCR e PARAFAC.

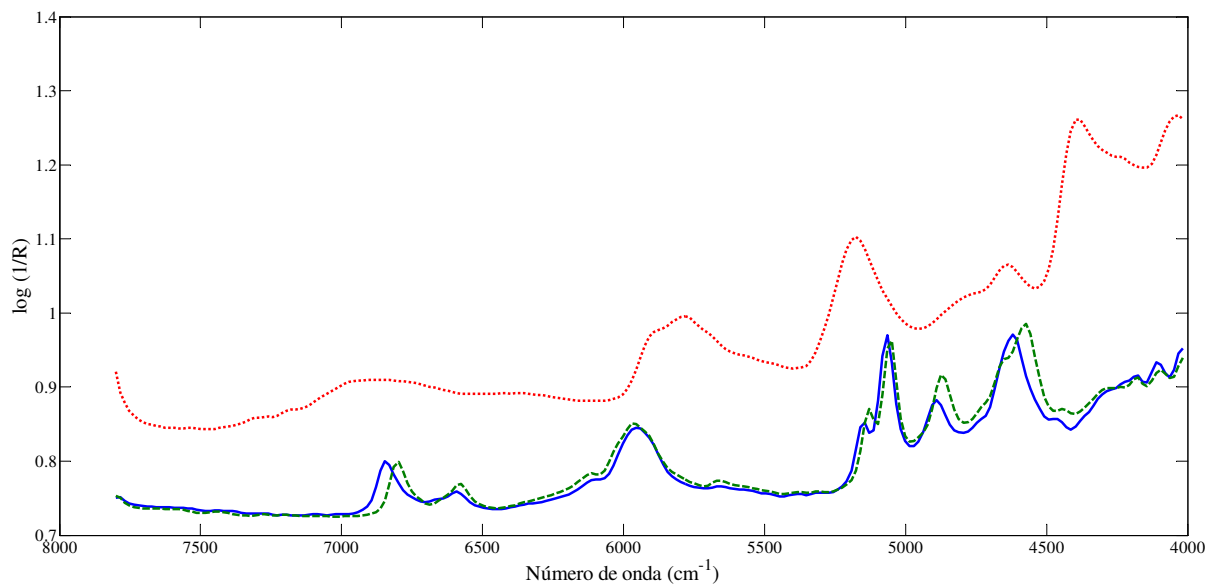


Figura 3.1: Espectros da forma I (—), forma III (---) e placebo (· · ·).

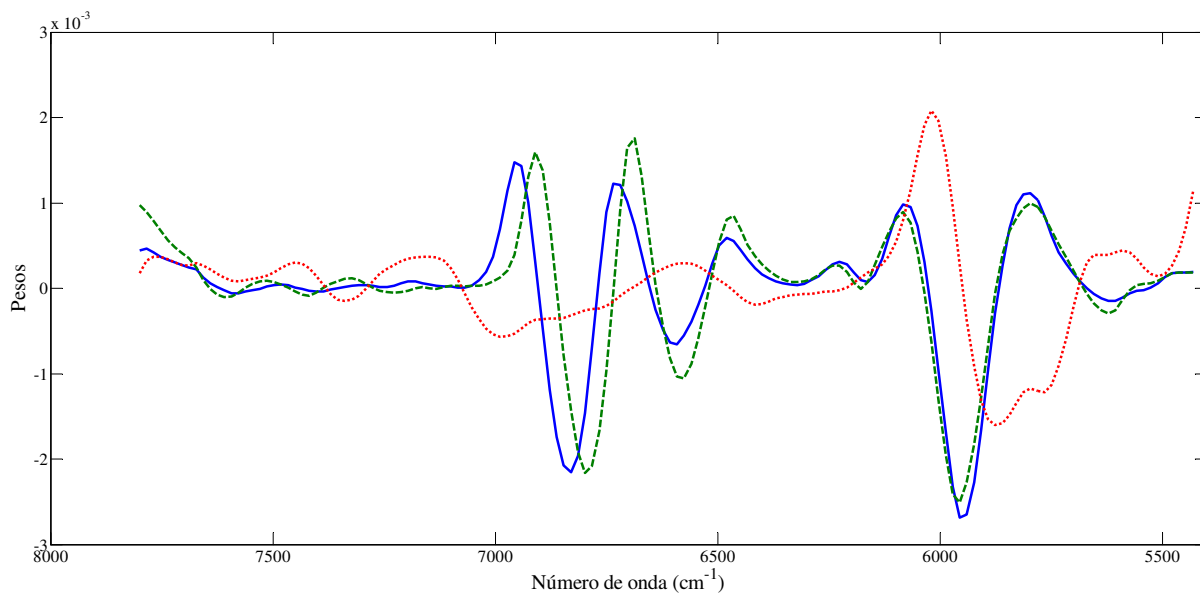


Figura 3.2: Espectros da forma I (—), forma III (---) e placebo (· · ·), após a segunda derivada e corte.

3.3.2 Análise dos dados

3.3.2.1 PCA

Para o estudo da transformação polimórfica foram realizadas medidas espectroscópicas NIR-CI somente da parte central do comprimido, ou seja, sem a parte metálica, devido ao tempo de aquisição das imagens, análise dos dados e interferência da peça metálica.

A Figura 3.3 apresenta o gráfico de escores dos três primeiros PCs para as amostras antes e após uma e duas horas de aquecimento a 140°C e os pesos obtidos. Na Figura 3.3 (a) em que é possível observar um deslocamento dos pixels referentes às amostras para uma maior concentração de forma I evidenciando assim a conversão da forma III em I com o aquecimento a 140°C.

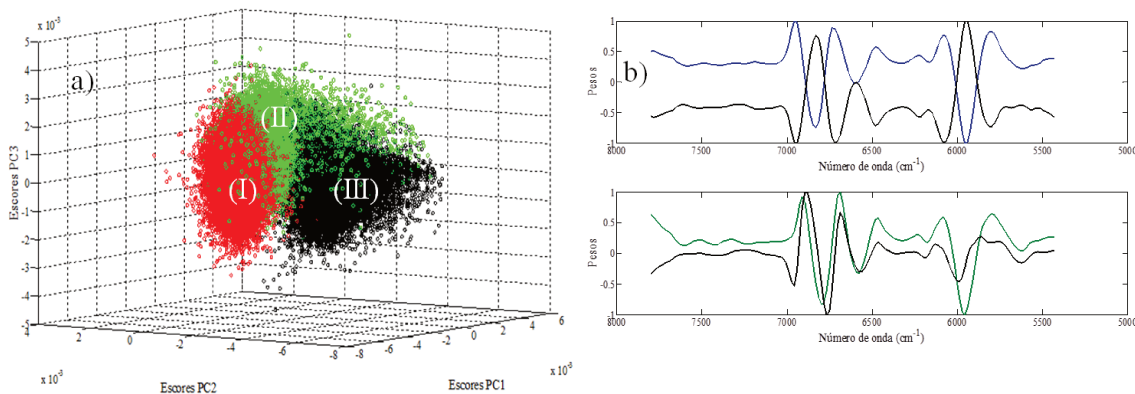


Figura 3.3: (a) o primeiro dos três escores, antes (I), após 1 h (II) e após 2 h (III) de aquecimento a 140 °C, e (b) os pesos de PC 1 (—) e PC 2 (—) com os espectros puros de cada forma polimórfica (—).

Já a Figura 3.3 (b) mostra os pesos obtidos para o 1º e 2º componente principal, juntamente com a respectiva comparação dos pesos com os espectros originais das formas polimórficas puras I e III em que se pode notar a sobreposição da maioria dos sinais dos espectros da forma III com PC 2. Já para o caso da forma I o espectro obtido para o PC 1 foi igual só que invertido devido ao sinal, mostrando que as bandas características aparecem na mesma posição. Os dois primeiros componentes principais conseguiram explicar 98,78 % da variância dos dados reduzindo o conjunto de dados iniciais a duas componentes principais. A Figura 3.4 apresenta

os mapas de escores dos 1º e 2º componentes principais, antes, após 1 hora e após 2 horas.

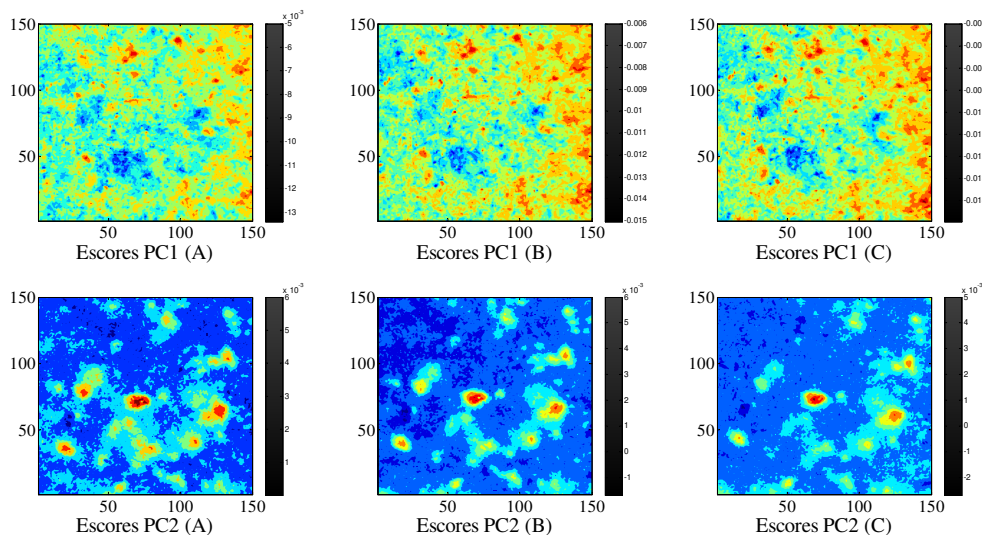


Figura 3.4: Mapas de escores para os 1º e 2º componentes principais (PCs): inicial (A), após 1h (B) e após 2h de aquecimento a 140 °C para a forma I e III, respectivamente.

Pode-se observar pela análise da Figura 3.4 a diminuição das regiões em que a forma III estava presente e um consequente aumento das regiões em que a forma I estava presente, evidenciando assim a transformação polimórfica da forma III para a forma I.

3.3.2.2 PLS

Para a análise de dados por PLS, foi utilizado um total de 47 amostras das quais 37 para o conjunto de calibração e 10 para validação externa. As amostras foram escolhidas baseadas no algoritmo de Kennard-Stone, que escolhe para a calibração as amostras que apresentam a maior variabilidade, fazendo com que este explique de forma satisfatória todo o espaço amostral. Para facilitar o cálculo e permitir uma melhor visualização dos dados a faixa de concentração utilizada para a calibração das formas I e III de carbamazepina que variaram de 0 mg a 224 mg para todas as amostras, e os excipientes tiveram valores fixos de 56 mg. O modelo PLS

construído utilizou seis variáveis latentes, que conseguiram explicar 99,2 % da variância dos dados originais em X (espectrais) e 92,2 % da variância para os dados em Y (concentrações de referência). Foi obtido RMSEC de 5,02 % e 5,37 % para a forma I e III, respectivamente, RMSECV de 6,07 % e 6,64 % para a forma I e III, respectivamente e RMSEP de 2,29 % e 7,29 %, para a forma I e III, respectivamente. Estes resultados mostram a eficiência do modelo de calibração desenvolvido, com baixos valores de erros tanto de calibração como de validação.

As Figuras 20 e 21 apresentam os mapas de concentrações para as formas polimórficas I e III, respectivamente, antes e após o aquecimento a 140°C, em que as concentrações conhecidas iniciais de cada forma polimórfica são de 35,7 %. Já as Figuras 22 e 23 apresentam os respectivos histogramas de concentração de carbamazepina para a forma I e III, respectivamente.

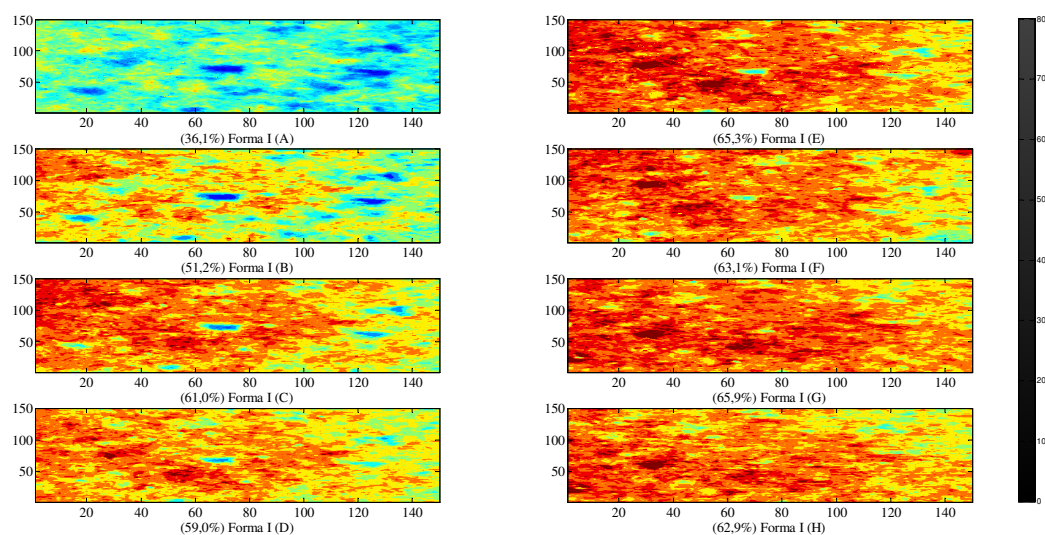


Figura 3.5: Mapas de distribuição de concentração da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H), por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.

Pode-se notar pela Figura 3.5 que a transformação polimórfica está ocorrendo no sentido de formação da forma I, visto que seus valores de concentração média aumentam no tempo.

Nota-se pela Figura 3.6 que a transformação polimórfica está ocorrendo no sentido de diminuição da forma III, visto que seus valores de concentração média

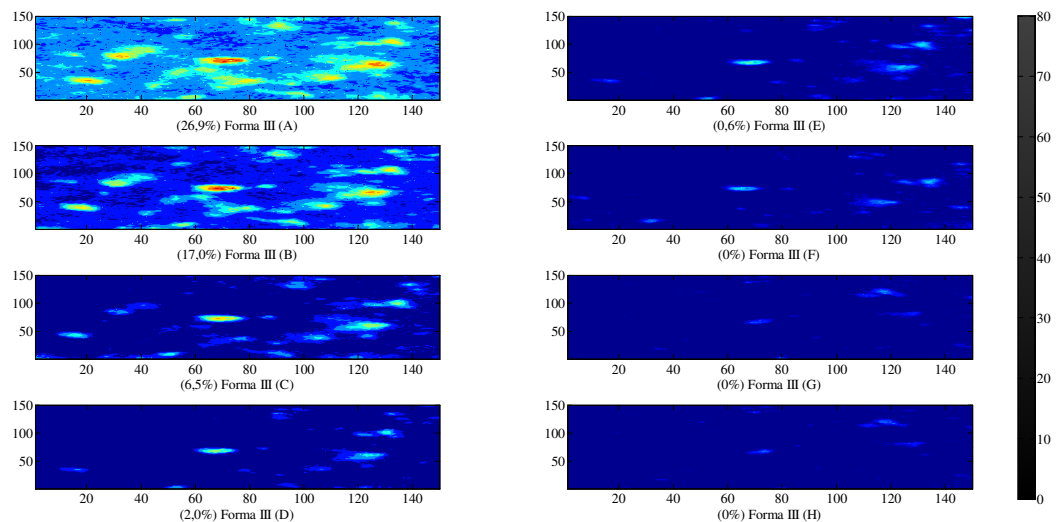


Figura 3.6: Mapas de distribuição de concentração da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.

diminuem no tempo.

Pela análise das Figuras 3.5 e 3.6 pode-se acompanhar a transformação da forma III na forma I a 140°C com o tempo, pois as regiões em que a forma III está presente vão desaparecendo e aparecendo no mapa de distribuição de concentração da forma I.

Pela análise das Figuras 3.7 e 3.8 é possível observar o deslocamento dos valores de concentração média para a esquerda, forma III, e para a direita, forma I, apresentando assim a conversão da forma III em I na temperatura de 140 °C, com o tempo.

3.3.2.3 MCR

O estudo da transformação polimórfica da forma III para a I foi realizado utilizando matriz aumentada, mas diferentemente do que foi feito no Capítulo 3 a temperatura de trabalho foi de 140 °C e as imagens espectrais foram obtidas em vários tempos (de 1 em 1 h). Neste estudo a matriz inicial de dimensões 90000 x 150 foi reduzida a dimensões 22500 x 150, portanto quando do redobramento da primeira dimensão

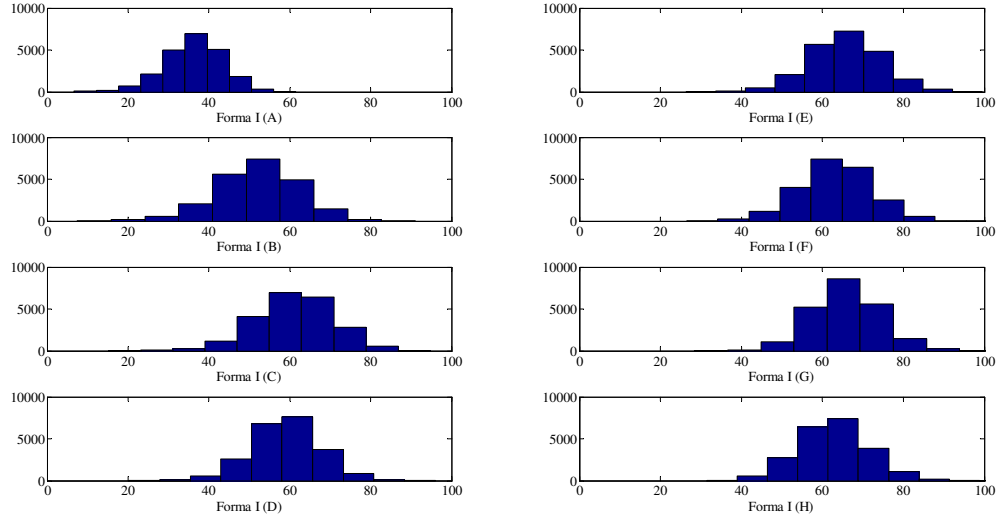


Figura 3.7: Histogramas de concentração da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.

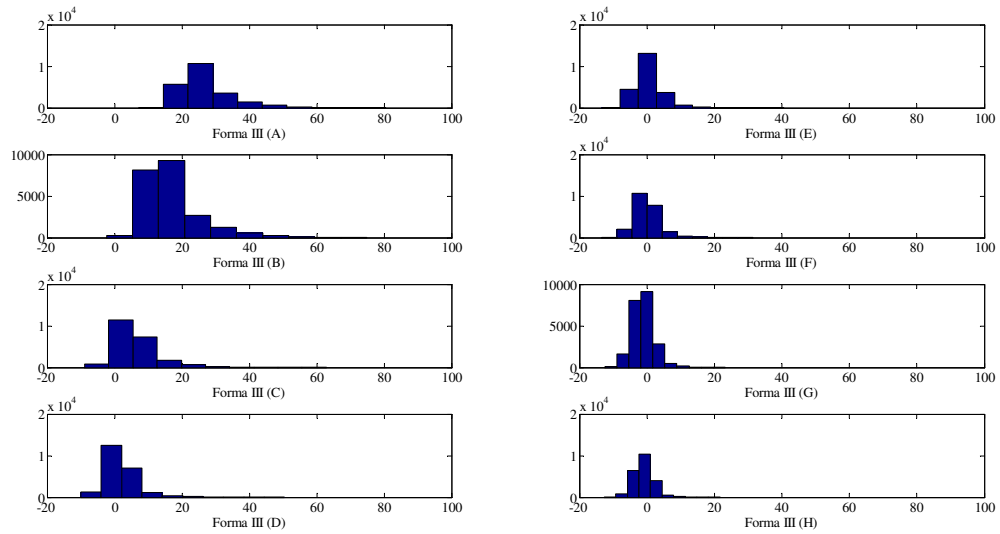


Figura 3.8: Histogramas de concentração da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por PLS.

(22500 amostras) para um arranjo tridimensional obtém-se imagens de dimensões 150 x 150 pixels. Assim uma matriz aumentada de dimensões 180 000 x 150 foi formada pelo empilhamento das matrizes obtidas em todos os tempos, como apresentado na Figura 6. A área analisada foi escolhida de forma que ela não

contivesse a região correspondente à peça metálica, para que fosse eliminada uma possível interferência.

No cálculo do MCR foram necessários o uso de 3 fatores, baseado nos resultados de PCA que indicaram 98,4 % de descrição da variância dos dados pelos 3 primeiros PCs. O processo foi inicializado usando os espectros puros das formas polimórficas e da mistura dos excipientes (placebo). Restrições como não negatividade e *closure*, que realiza o balanço de massa, foram aplicadas as concentrações e o critério de convergência adotado foi de 1 %.

As Figuras 3.9 e 3.10 apresentam os mapas de distribuição de concentração obtidos pelo método MCR-ALS para cada tempo de aquecimento a 140 °C.

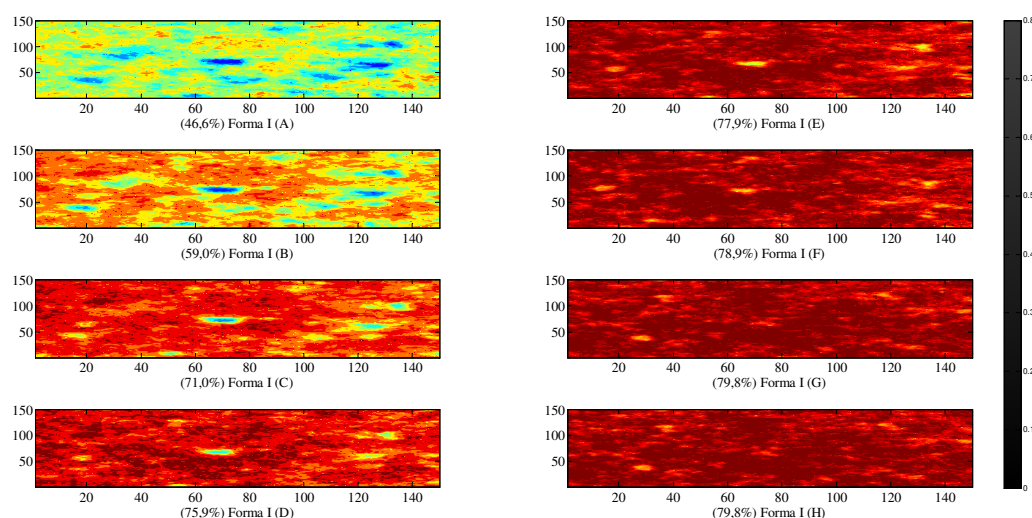


Figura 3.9: Mapas de distribuição de concentração da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por MCR.

Pela análise das Figuras 3.9 e 3.10 pode-se observar que após 3 horas houve a conversão da forma III para a forma I na temperatura de 140 °C, mesma conclusão obtida a 160 °C só que neste caso avaliou-se a transformação polimórfica gradativamente com o tempo e sem a adição de um quarto espectro puro referente à peça metálica, o que facilita a análise.

Para melhorar os resultados apresentados pelo MCR foi realizada uma correção nos valores de concentração como proposto por Piqueiras, *et. al.* [42]. Neste caso

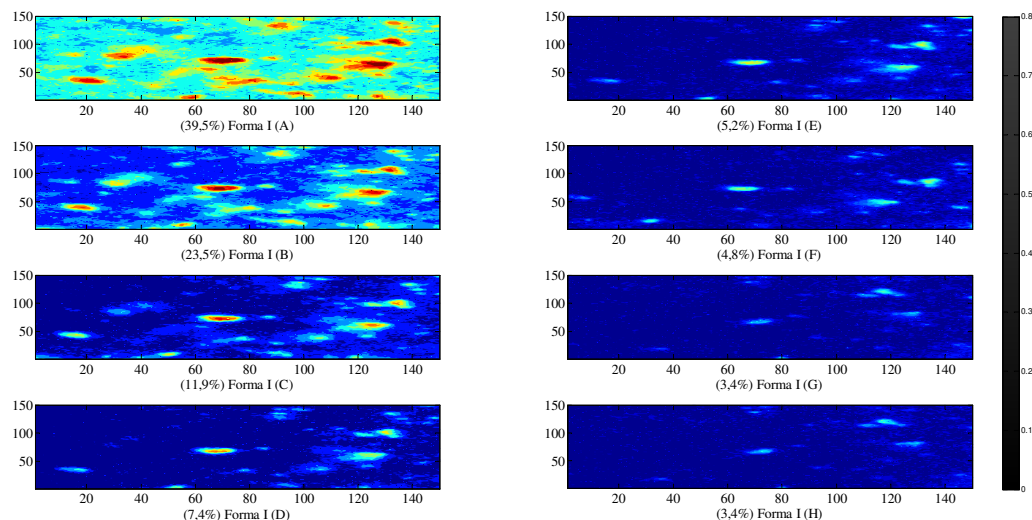


Figura 3.10: Mapas de distribuição de concentração da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por MCR.

um modelo linear univariado é construído entre os valores conhecidos de concentração e os estimados pelo MCR, nesta calibração foram utilizadas 37 amostras. Após a construção do modelo, aplica-se a equação de correção aos valores de concentração previstos em cada pixel e obtêm-se os novos mapas de distribuição de concentração corrigidos para a forma I e forma III, respectivamente, como apresentados nas Figuras 3.11 e 3.12.

Os histogramas dos valores de frequência previstos em função da concentração corrigida estão apresentados nas Figuras 3.13 e 3.14, para a Forma I e III, respectivamente.

Observa-se assim, nas Figuras 3.13 e 3.14 um deslocamento do pico de concentração para a direita, para a forma I, e para a esquerda, para a forma III, evidenciando o aumento dos pixels com os valores de concentração da forma I e diminuição dos pixels com os valores de concentração da forma III. Os histogramas retratam a homogeneidade da distribuição das formas polimórficas no comprimido, qualidade esta desejável, em todo o comprimido, quando da venda e consumo deste fármaco para evitar que a eficácia deste seja comprometida.

A Figura 3.15 apresenta o comportamento da concentração média dos dois

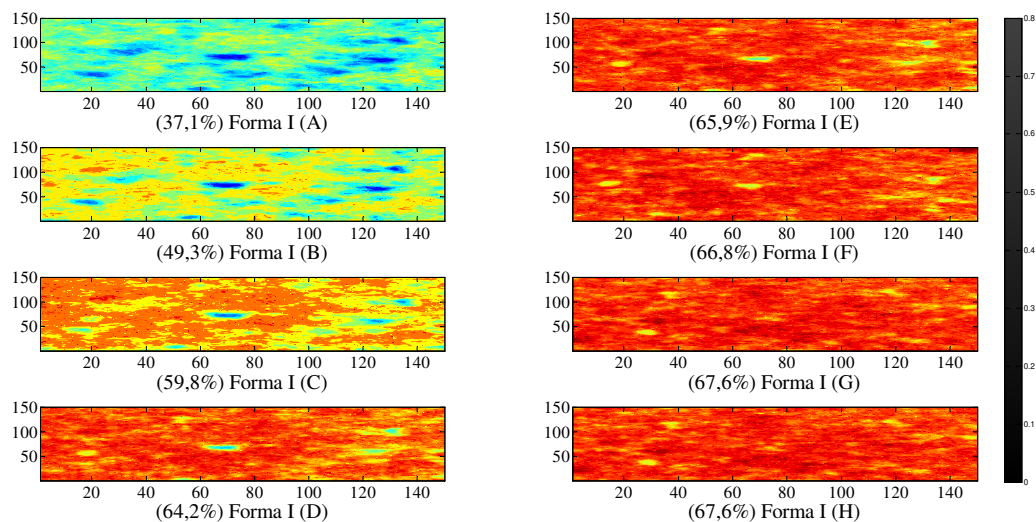


Figura 3.11: Mapas de distribuição de concentração corrigidos da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°, obtidos por MCR.

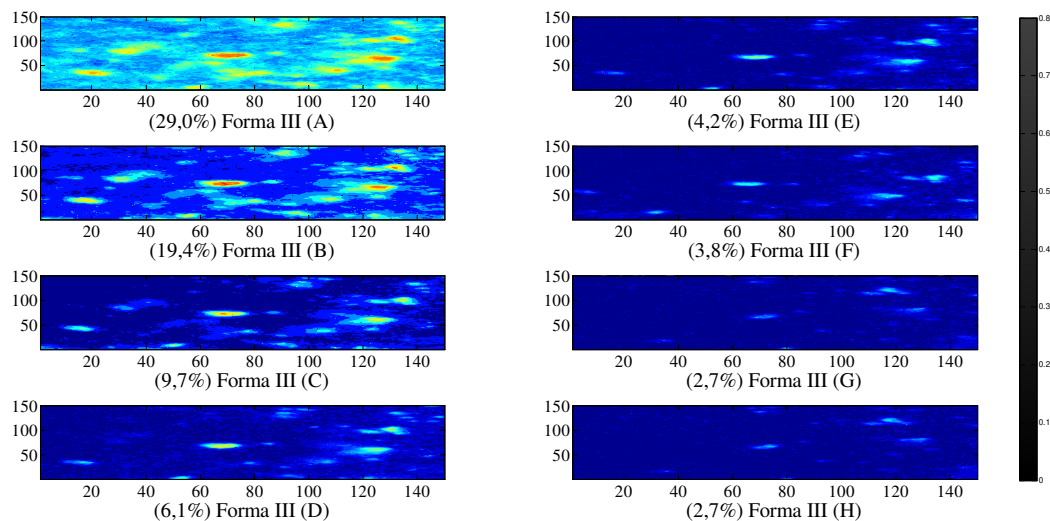


Figura 3.12: Mapas de distribuição de concentração corrigidos da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140°C, obtidos por MCR.

polimorfos com o tempo, obtido pelo modo de concentração do MCR.

Pode-se notar pela análise da Figura 3.15, a conversão da forma III na forma I com o tempo. Portanto pode-se afirmar que o MCR é uma técnica viável para a análise e avaliação da transformação polimórfica que ocorre com a carbamazepina,

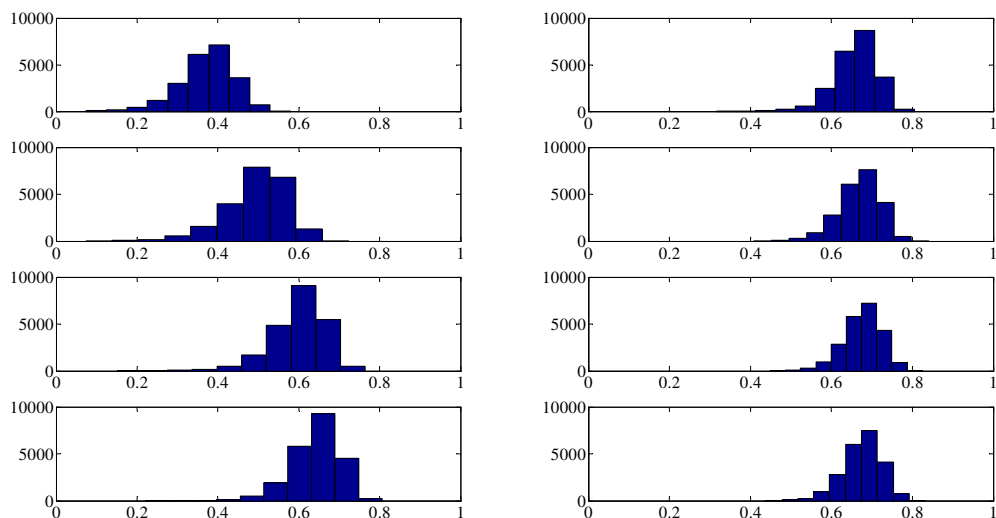


Figura 3.13: Histogramas das concentrações corrigidas da forma I: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140 °C, obtidos por MCR.

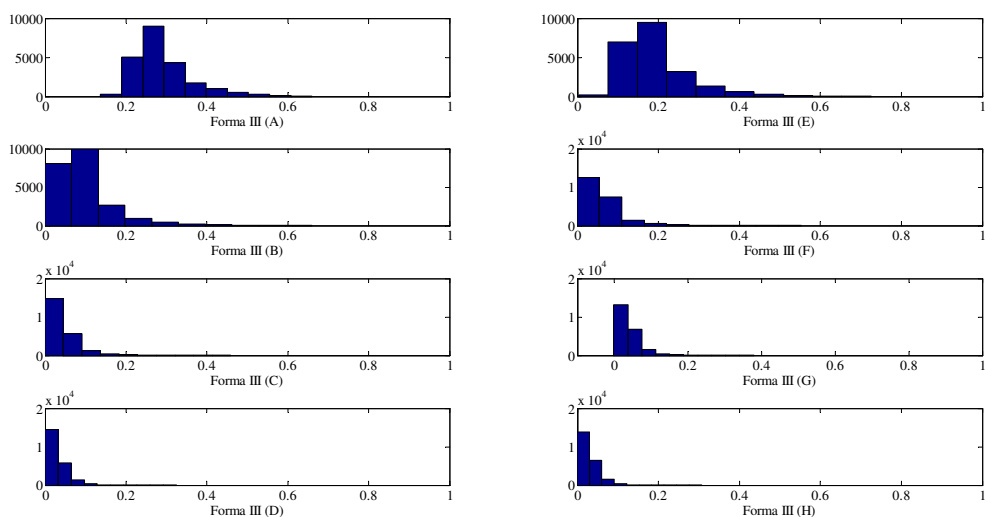


Figura 3.14: Histogramas das concentrações corrigidas da forma III: inicial (A) e após: 1h (B), 2h (C), 3h (D), 4h (E), 5h (F), 6h (G) e 7h (H) por aquecimento a 140 °C, obtidos por MCR.

visto que não é necessário um método de calibração, como no PLS, necessitando somente dos espectros puros das formas polimórficas e excipientes além da matriz de dados de interesse. Além disso, se for efetuado a correção das concentrações, somente poucas amostras são necessárias.

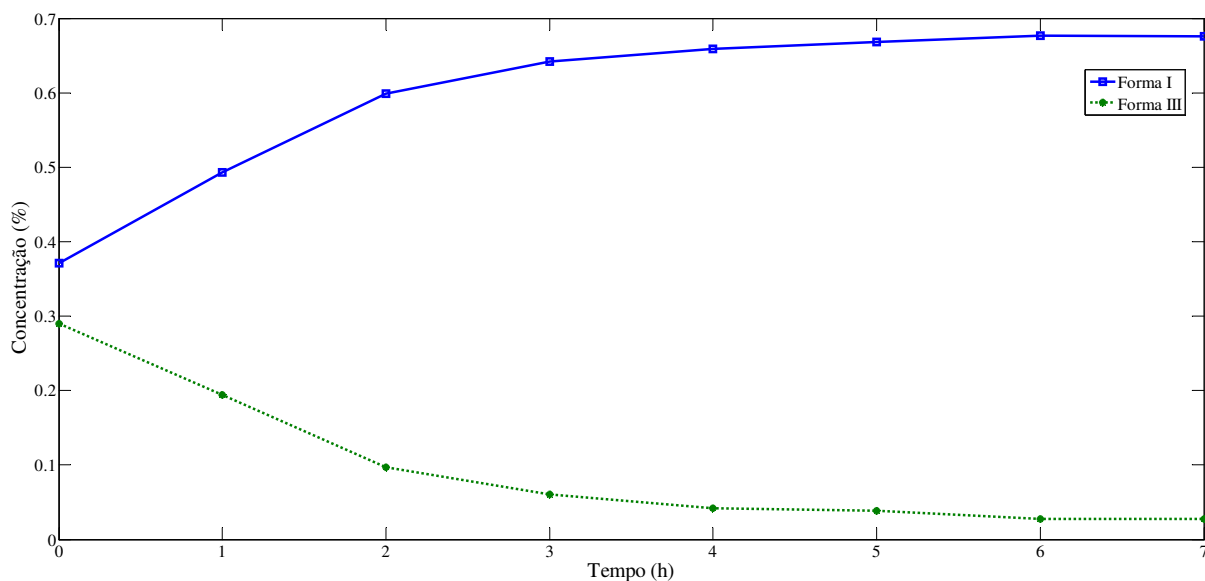


Figura 3.15: Concentração média corrigida das formas polimórficas I (—) e III (· · ·) obtidas por MCR ao longo do tempo, por aquecimento a 140 °C.

3.3.2.4 PARAFAC

Para a utilização do PARAFAC, o conjunto de dados foi constituído por três modos: amostral, espectral e temporal. Para montar o arranjo tridimensional empilhou-se as 8 matrizes obtidas (22500 x 150), para cada tempo, por meio do desdobramento das matrizes originais em um arranjo tridimensional (150 x 150 x 150) obtidas por NIR-CI. Dessa forma, o arranjo tridimensional formado tinha dimensões iguais a 22500 x 150 x 8, ou seja, 22500 variáveis no modo amostral, 150 variáveis no modo espectral e 8 variáveis no modo temporal.

A seleção de dois fatores para a construção do modelo PARAFAC foi baseada na consistência do núcleo, como pode-se observar pela análise da Figura 3.16.

Neste caso, percebe-se pela análise da 3.16 que com a utilização de 2 fatores têm-se um modelo trilinear praticamente perfeito com valores de 1 para os primeiros fatores e zero para os demais. Este resultado pode ser entendido lembrando que o PARAFAC é uma simplificação do modelo Tucker3 e de forma resumida, quando utilizam-se 2 fatores, tem-se para a superdiagonal do arranjo tridimensional do núcleo (core) valores iguais a 1 e valores iguais a zero nas demais posições.

O método utilizado, PARAFAC, foi então aplicado a esse arranjo, com restrição

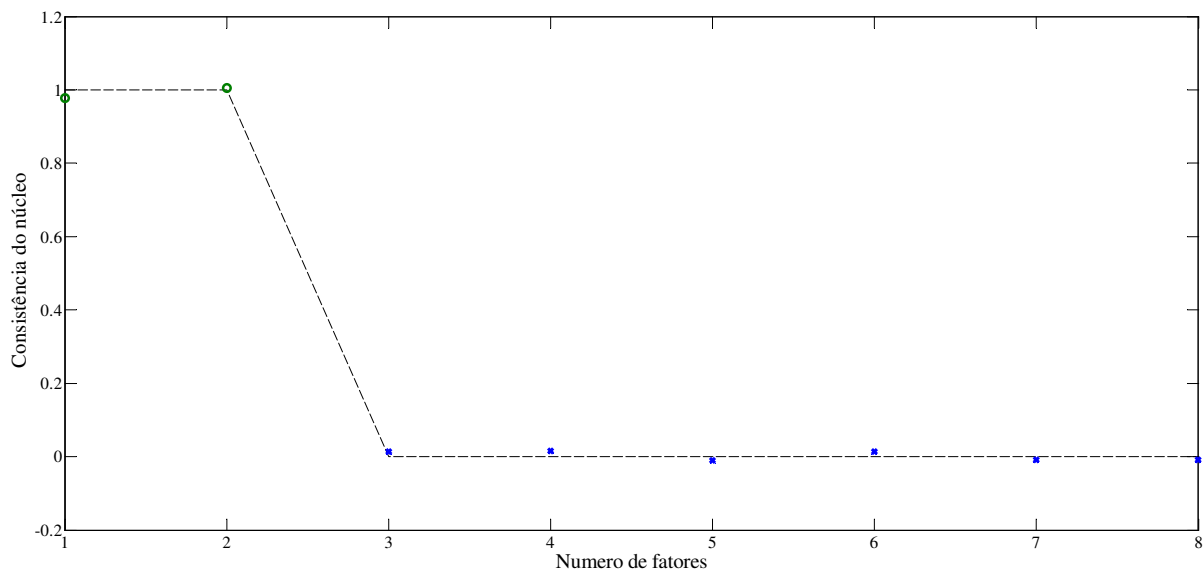


Figura 3.16: Diagnóstico de consistência do núcleo para o modelo PARAFAC.

de não negatividade das concentrações, totalizando 96,46 % de variância explicada e um diagnóstico de consistência do núcleo de 100 %.

No PARAFAC, os fatores podem ser interpretados como as espécies que possuem perfis independentes em uma das dimensões. Como temos 3 espécies possíveis (forma I, forma III e placebo), o mais correto seria utilizar 3 fatores. Nessa aplicação, o placebo está constante e assim têm-se apenas duas espécies com variação. Assim, pode-se concluir que o sinal do placebo ficou distribuído entre os dois componentes e no resíduo. A Figura 3.17 mostra a somatória dos quadrados dos resíduos do PARAFAC para o modo 2, obtido pela diferença entre os espectros reais e os espectros obtidos para cada um dos fatores utilizados.

Pela análise da Figura 3.17 pode-se concluir, pelas regiões em que as bandas aparecem, que o PARAFAC assume que as bandas referente ao placebo estão presente no resíduo. O PARAFAC faz esta suposição pois distingue somente duas espécies, utiliza dois fatores, confirmada pela consistência do núcleo de 100 %. A análise do modelo pode ser feita visualmente pelos gráficos dos fatores de cada um dos modos e observando a semelhança entre os espectros dois fatores obtidos e os espectros da forma I e forma III. Estes gráficos podem ser vistos nas Figuras 3.18, 3.19 e 3.20, referentes aos modos amostral, espectral e temporal, respectivamente.

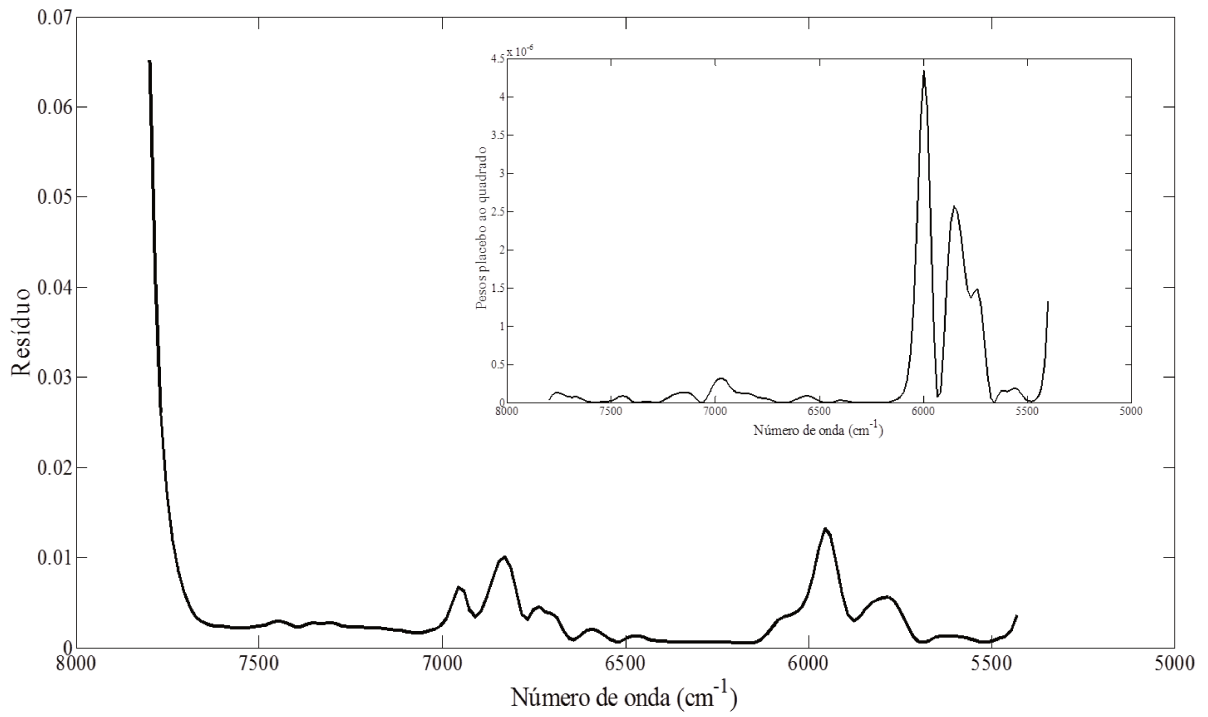


Figura 3.17: Resíduos PARAFAC para o modo 2.

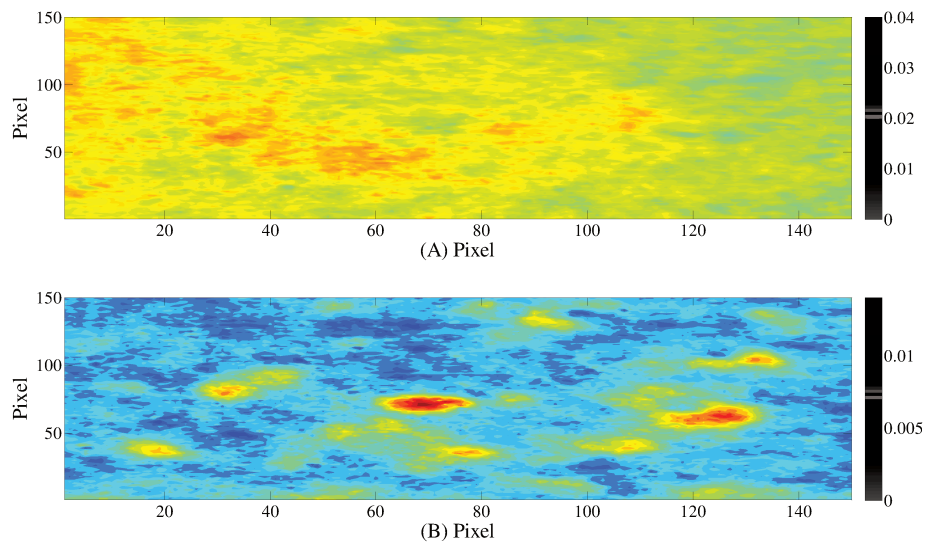


Figura 3.18: Mapa de distribuição dos pesos do PARAFAC para o modo amostral relacionado a forma I (A) e forma III (B).

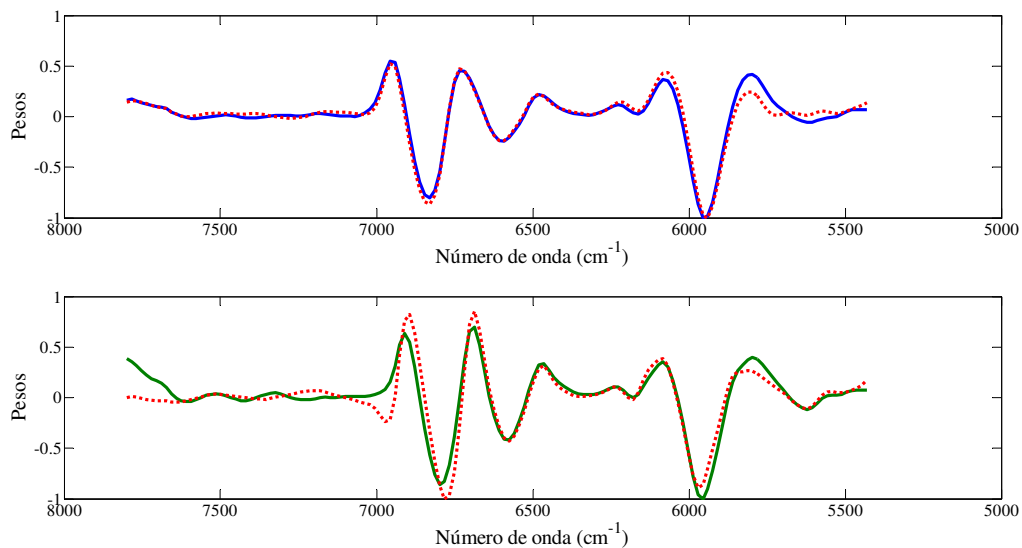


Figura 3.19: Gráfico dos pesos do PARAFAC para o modo espectral para o fator 1 (---) e fator 2 (---) e os espectros puros da forma polimórfica I (—) e III (—).

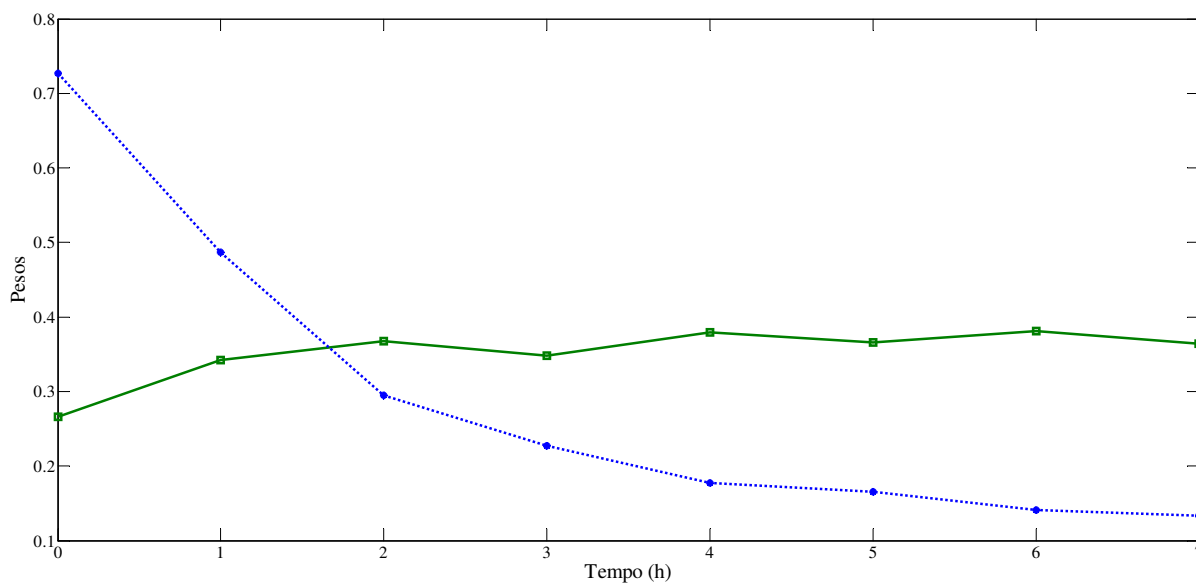


Figura 3.20: Gráfico dos pesos do PARAFAC no modo temporal para o fator 1 (—) e fator 2 (· · ·), ao longo do tempo.

Pela análise da 3.18 pode-se observar a complementaridade dos mapas de distribuição, mostrando assim que o método PARAFAC foi um método eficiente para explicar o comportamento das amostras quanto à intensidade em cada pixel, pois regiões mais intensas no primeiro mapa estão com menos intensas no segundo

mapa, ou seja, onde há forma I não há forma III e vice-versa.

Nota-se na Figura 3.19, que o PARAFAC conseguiu recuperar os espectros das formas I e III de maneira satisfatória, pois estes se assemelham aos espectros reais das formas polimórficas.

Ao visualizar a Figura 3.20, que apresenta o modo temporal, é possível perceber claramente o comportamento oposto entre os dois fatores, onde o primeiro aumenta e o segundo diminui com o tempo e que após 3 h de aquecimento as formas polimórficas tornam-se praticamente constantes mostrando que este tempo foi suficiente para que a transformação polimórfica ocorresse quase que totalmente.

3.4 Conclusões

Deste capítulo, pode-se concluir que com a ferramenta PCA foi possível visualizar um comportamento geral dos dados e que os métodos PLS e MCR foram eficientes para quantificar as formas polimórficas de carbamazepina. Além disso, o MCR possui vantagem quando comparado ao PLS principalmente por não necessitar de uma etapa de calibração. Ao se comparar MCR e PARAFAC é possível observar vantagens em cada um destes métodos: o MCR permite obter os valores de concentração média e/ou concentração em cada pixel com apenas um tempo já o PARAFAC possui a vantagem de permitir a obtenção de todas as dimensões de interesse de uma única vez. Ambos MCR matriz aumentada e PARAFAC permitem estudar o perfil de concentração durante a transformação polimórfica, vantagens estas relevantes dependendo do interesse do pesquisador.

O estudo da distribuição do fármaco na superfície do comprimido permitiu concluir que o fármaco está distribuído de forma homogênea neste. Outra consideração é a de que o método proposto por Piqueiras, *et. al.* [42], foi eficiente para corrigir os valores de concentração em cada pixel, valores estes mais exatos quando comparados aos valores esperados de concentração média das formas polimórficas de carbamazepina.

Capítulo 4

CONCLUSÕES GERAIS

4 CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que há um grande potencial de aplicação da espectroscopia de imagem no NIR para o estudo de transformações polimórficas de fármacos. A técnica quimiométrica PCA não conseguiu explorar o comportamento dos dados de forma adequada para o caso em que se estudou o comprimido todo, no capítulo 3. O mesmo ocorreu para o PLS, que não conseguiu quantificar o teor de carbamazepina no comprimido todo. Essa dificuldade encontrada pelos métodos PCA e PLS é devida à interferência dos espectros da peça metálica, que são diferentes dos demais.

Já para o caso em que se estudou somente a parte central do comprimido, estudo da transformação polimórfica com o tempo a 140°C, foi possível, com o uso da PCA observar o comportamento dos dados com o aquecimento, evidenciando a conversão dos polimorfos.

Os métodos PLS e MCR conseguiram identificar e quantificar as formas polimórficas I e III do fármaco carbamazepina, com suas respectivas distribuições espaciais no comprimido, possibilitando o estudo da homogeneidade da distribuição do fármaco no comprimido. Os resultados também mostram que os métodos MCR e PARAFAC foram capazes de retirar informações sobre a transformação polimórfica da carbamazepina no comprimido, no processo dinâmico estudado. Já o MCR possibilitou construir o mapa de distribuição de concentração a cada tempo durante a aquisição de dados, permitindo o estudo da transformação polimórfica da carbamazepina na superfície do comprimido pelo aquecimento no tempo. O PARAFAC se mostrou um método apropriado para uso na análise de dados de imagem do comprimido de carbamazepina, pois estima os parâmetros de interesse (concentração, espectral e temporal) simultaneamente.

Portanto, pode-se dizer que os resultados obtidos foram promissores, indicando que a metodologia proposta da utilização de métodos multimodo como MCR matriz aumentada e PARAFAC para análise de processos dinâmicos em espectroscopia de imagem é apropriada.

Capítulo 5

PERSPECTIVAS FUTURAS

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras têm-se:

1) validar as concentrações médias de Carbamazepina no estudo temporal a 140 °C utilizando como técnica a Difração de Raios X, pois esta possibilita uma maior diferenciação entre as formas polimórficas tornando o estudo mais rápido e fácil de ser interpretado;

2) estudar o perfil de dissolução para observar como o fármaco se comporta no sistema em estudo;

3) desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos para propor um método que favoreça sua dissociação;

4) realizar mapeamento da superfície do comprimido para monitoramento da transformação polimórfica em tempo real;

5) utilização de outras técnicas quimiométricas de ordem superior para estudo de sistemas dinâmicos de imagem;

6) expandir este estudo para outros fármacos que apresentam polimorfismo e cujo espectros são diferenciáveis por NIR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- [1] A. LLINÁS E J. M. GOODMAN, “Polymorph control: past, present and future,” *Drug discovery today*, vol. 3, pp. 198-210, 2008.
- [2] L. BORKA E J. K. HALEBLIAN, “Crystal polymorphism of pharmaceuticals,” *Acta Pharm.*, vol. 40, pp. 71-94, 1990.
- [3] M. KUHNERT-BRANDSTÄTTER, *Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals*, Pergamon: Oxford, 1971.
- [4] L. BORKA, “Review on crystal polymorphism of substances in the European Pharmacopoeia,” *Pharm. Acta Helv.*, vol. 66, pp. 16-22, 1991.
- [5] R. HILFIKER, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, Weinheim: Wiley - VCH, 2006.
- [6] T. L. THRELFALL, “ChemInform Abstract: Analysis of Organic Polymorphs. A Review,” *Analyst*, vol. 120, pp. 2435-2460, 1995.
- [7] R. P. C. PROHENS, “Polimorfismo en la Industria Farmacéutica,” em *El Farmacéutico*, Barcelona, Universitat de Barcelona, 2007, pp. 58-68.
- [8] A. G. GILMAN, L. S. GOODMAN E A. GILMAN, *As bases Farmacológicas da Terapêutica.*, New York: McGraw Hil, 2003.
- [9] U. P. C. EUROPEAN, “European Pharmacopeia,” p. 2958, 2002.
- [10] A. L. GRZESIAK, M. K. LANG E A. J. MATZGER, “Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I,” *Pharm. Sci.*, vol. 92, n. 11, p. 2260, 2003.
- [11] W. G. GALVÃO, *Carbamazepina no estado sólido e sua susceptibilidade polimórfica*, Goiânia-GO: Dissertação de Mestrado, 2009.

- [12] M. OTZUCA, H. HASEGAWA E Y. MATSUDA, “Effect of polymorphic forms of bulk powders on pharmaceutical properties of Carbamazepine granules,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 47, p. 856, 1999.
- [13] P. WILLIAMS, K. NORRIS E Z. W.S., “Influence of temperature on estimation of protein and moisture in wheat by near-infrared reflectance,” *Cereal Chem.*, vol. 59, pp. 473-480, 1982.
- [14] C. PASQUINI, “Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical applications,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 14, pp. 198-219, 2003.
- [15] A. KATHRYN, L. BUNDING E S. C. JOHNSONA, “Comparison of Mid-IR with NIR in Polymer Analysis,” em *Applied Spectroscopy Reviews*, Boca Raton, Taylor e Francis, 2006, pp. 231-284.
- [16] D. A. BURNS E E. W. CIURCZAK, *Handbook of near-infrared analysis*, Boca Raton: CRC Press, 2008.
- [17] C. RAVN, E. SKIBSTED E R. BRO, “Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms - Comparing common calibration approaches,” *J. Pharm. Biom. Anal.*, vol. 48, pp. 554-561, 2008.
- [18] Y. YANG, A. GUPTA, A. S. CARLIN, P. J. FAUSTINO, R. C. LYON, C. D. ELLISON, B. ROTHMAN E M. A. KHAN, “Comparative stability of repackaged metoprolol tartrate tablets,” *Int. J. Pharm.*, pp. 92-97, 2010.
- [19] G. P. SABIN, M. C. BREITKREITZ, A. M. SOUZA, P. FONSECA, L. CALEFE, M. MOFFA E R. J. POPPI, “Analysis of pharmaceutical pellets: An approach using near-infrared chemical imaging,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 706, pp. 113-119, 2011.
- [20] W. F. C. ROCHA, G. P. SABIN, P. H. MARÇO E R. J. POPPI, “Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral

imaging and chemometrics,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 106, pp. 198-204, 2011.

- [21] J. M. AMIGO, J. CRUZ, M. BAUTISTA, S. MASPOCH, J. COELLO E M. BLANCO, “Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis,” *Trends in Anal. Chem.*, vol. 27, pp. 696-713, 2008.
- [22] A. CANDOLFI, D. MASSART E S. HEUERDING, “Investigation of sources of variance which contribute to NIR-spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations,” *Anal. Chim. Acta.*, vol. 345, pp. 185-196, 1997.
- [23] K. R. BEEBE, R. J. PELL E B. SEASHOLTZ, *Chemometrics - A Pratical Guide*, New York: Wiley, 1998.
- [24] R. J. POPPI, “A Quimiometria,” LAQQA - UNICAMP, [Online]. Available: <http://laqqa.iqm.unicamp.br/Quimiometria.html>. [Acesso em 11/ 12/ 2012].
- [25] P. GELADI, D. MACDOUGALL E H. MARTENS, “Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 39, p. 491, 1985.
- [26] R. J. BARNES, M. S. DHANOA E S. LISTER, “Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 43, p. 772–777, 1989.
- [27] A. SAVITZKY E M. J. E. GOLAY, “Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures,” *Anal. Chem.*, vol. 36, pp. 1627-1639, 1964.
- [28] F. CLARKE, “Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 34, pp. 25-35, 2004.
- [29] A. DE JUAN, R. TAULER, R. DYSON, C. MARCOLLI, M. RAULT E M. MAEDER, “Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combina-

tion for global and local sample analysis,” *Trends in Anal. Chem.*, vol. 23, pp. 70-79, 2004.

- [30] P. GELADI E B. R. KOWALSKI, “Partial Least-Squares Regression: A tutorial,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 185, pp. 1-17, 1986.
- [31] A. A. GOWENA, F. MARINI, C. ESQUERRE, C. O’DONNELL, G. DOWNEYA E J. BURGER, “Time series hyperspectral chemical imaging data: Challenges, solutions and applications,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 705, p. 272, 2011.
- [32] S. WOLD, K. ESBENSEN E P. GELADI, “Principal component analysis,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 2, pp. 37-52, 1987.
- [33] A. DE JUAN E R. TAULER, “Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 36, pp. 163-176, 2006.
- [34] R. BRO, “Exploratory study of sugar production using fluorescence spectroscopy and multi-way analysis,” *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, vol. 46, pp. 133-147, 1999.
- [35] R. BRO E H. A. L. KIERS, “A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models,” *J. Chemom.*, vol. 17, p. 274, 2003.
- [36] M. M. SENA E R. J. POPPI, *Aplicação de métodos quimiométricos de primeira e segunda ordem na determinação direta de fármacos por espectroscopia molecular*, Campinas: Tese de doutorado, 2004.
- [37] C. RUSTICHELLI, G. GAMBERINI, V. FERIOLO, M. C. GAMBERINI, R. FICARRA E S. TOMMASINI, “Solid-state study of polymorphic drugs: Carbamazepine,” *J. Pharm. Biom. Anal.*, vol. 23, pp. 41-54, 2000.

- [38] B. RODRIGUES-SPONG, C. P. PRICE, A. JAYASANKAR, A. J. MARZGER E N. RODRIGUEZ-HORNEDO, "General principles of pharmaceutical solid polymorphs: a supramolecular perspective," *Adv. Drug Deliv. Reviews*, vol. 56, pp. 241-274, 2004.
- [39] M. KARJALAINEN, S. AIRAKSINEN, J. RANTANEN, J. AALTONEN E J. YLIRUUSIA, "Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray powder diffraction.," *J. Pharm. Biom. Anal.*, vol. 39, pp. 27-32, 2005.
- [40] L. BORKA, A. LONMO E R. WINSNES, "Semiquantitative IR spectroscopy of the crystal polymorphs of carbamazepine - a special case in the Ph. Eur. and USP," *Pharm. Acta Helv.*, vol. 67, p. 231, 1992
- [41] R. TAULER, "Multivariate Curve Resolution," [Online]. Available: http://www.ub.edu/mcr/web_mcr/literature.html. [Acesso em 20 /12 /2012].
- [42] S. PIQUERAS, J. BURGER, R. TAULER E A. DE JUAN, "Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 117, pp. 169 - 182, 2012.