

**Universidade Federal de Alfenas
Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Química**

ARIADNE MISSONO BRONDI

**DETERMINAÇÃO DE POLIMORFOS DE
FEXOFENADINA PELAS TÉCNICAS RAMAN, NIR E DRX**

**Alfenas/MG
2012**

ARIADNE MISSONO BRONDI

**DETERMINAÇÃO DE POLIMORFOS DE
FEXOFENADINA PELAS TÉCNICAS RAMAN, NIR E DRX**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan

**Alfenas/MG
2012**

Brondi, Ariadne Missono.

Determinação de polimorfos de fexofenadina pelas técnicas Raman, NIR e DRX / Ariadne Missono Brondi. - 2012.
95 f. -

Orientador: Marcello Garcia Trevisan
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.
Bibliografia.

1. Análise Espectral Raman. 2. Difração de Raios X. 3. Espectroscopia de Luz Próxima ao Infravermelho. 4. Análise Multivariada. I. Trevisan, Marcello Garcia. II. Título.

CDD: 543

ARIADNE MISSONO BRONDI

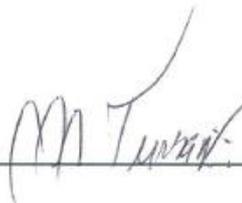
**DETERMINAÇÃO DE POLIMORFOS DE
FEXOFENADINA PELAS TÉCNICAS RAMAN, NIR E DRX**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 06/07/2012

Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____



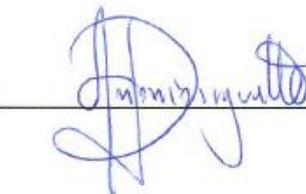
Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Assinatura: _____



Prof. Dr. Antonio Carlos Doriguetto
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: _____



Dedico a Deus, minha família e amigos que comigo compartilharam os prazeres e dificuldades desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo sublime dom da vida e por me dar forças para superar todas as minhas dificuldades, me guiando em todos os momentos. A Nossa Senhora pela poderosa e sempre fiel intercessão.

Aos meus pais, Carlos e Vilma, pelo amor e amizade incondicionais, pela compreensão de todos os momentos em que não pude me fazer presente, e pelo incentivo, não medindo esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, mostrando-me sempre a importância de lutar por aquilo que acredito.

Aos meus irmãos Ariane e Junior, pelo carinho, paciência, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu namorado Fábio por todo apoio, companheirismo e incentivo. Obrigada pelo carinho e pelas palavras que me reergueram quando perdia as forças.

Aos amigos Maria Cecília, Camila, Talita, Iara, Gabriel, Giovana, Bruno, Gabi, Eivelton, Pati e João Luiz pelo convívio, companheirismo e amizade.

A família PUCA (Pastoral Universitária Católica de Alfenas) pelo apoio e crescimento espiritual.

Ao Prof. Marcello Garcia Trevisan pela oportunidade de realização deste trabalho, orientação e paciência.

A Prof.^a Jerusa Simone Garcia pela colaboração.

Aos colegas do grupo de pesquisa Química Analítica Instrumental – UNIFAL-MG: Luiz, Sumaia, Pérciles, Fabiano, Josi, Isabela, Nathy, Mariana, Tamiris, Igor, Vítor, Ayla, Grazi, Carol, Tássia e Prof^o. Pedro pelo convívio, carinho, apoio e amizade.

Ao Laboratório de Quimiometria em Química Analítica (LAQQA - UNICAMP), em especial ao Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi, ao Guilherme Post Sabin e à Luciana Terra, pelo suporte nas medidas espectroscópicas NIR-Cl e Raman, e nas análises quimiométricas. Luciana e Thiago, agradeço por toda hospitalidade e amizade.

Ao Laboratório de Cristalografia (UNIFAL-MG) pelas medidas de difração de raios X por pó, FINEP (PROINFRA-O1/2007 – Conv.: 01.08.0562.00).

A CAPES e FAPEMIG (Processo APQ-02805-10) pelo suporte financeiro.

Ao grupo CIMED pela matéria-prima utilizada no desenvolvimento do trabalho, e por ter nos trazido o “problema” que motivou o desenvolvimento do mesmo.

A todos aqueles que torceram por mim e de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho.

“Sem amor, até a ciência perde a sua nobreza.”

Papa Bento XVI (2012)

RESUMO

Polimorfos orgânicos são comuns e apresentam diferentes propriedades físico-químicas entre si. Na pesquisa farmacêutica, o polimorfismo apresenta especial destaque por permitir que uma mesma molécula em uma determinada formulação farmacêutica sólida apresente solubilidade e estabilidade diferenciada. Tradicionalmente, a técnica mais empregada na caracterização de polimorfos é a difratometria de raios X. No entanto, com a preocupação da garantia da qualidade farmacêutica, técnicas de baixo custo, não destrutivas e portáteis, baseados em espectroscopia vibracional, estão sendo utilizadas no desenvolvimento de metodologias para caracterização polimórfica, tanto em matérias-primas quanto em produtos acabados. O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologias para a quantificação de duas formas polimórficas do cloridrato de fexofenadina em matéria prima e em formulação farmacêutica, sob a forma de pó e comprimido. Neste intuito, primeiramente, foi realizada a cristalização, caracterização e o estudo da estabilidade polimórfica do cloridrato de fexofenadina. Em seguida, a espectroscopia Raman e a difração de raios X por pó foram utilizadas, juntamente com regressão multivariada por PLS (*Partial Least Squares*), para a quantificação simultânea de dois polimorfos de cloridrato de fexofenadina em misturas de matéria-prima (primeira aplicação) e uma formulação farmacêutica em pó contendo celulose microcristalina, amido, estearato de magnésio, TiO_2 e povidona (segunda aplicação). Tanto na matéria-prima como na formulação farmacêutica em pó, a difração de raios X se mostrou mais exata que a espectroscopia Raman, apresentando valores de RMSECV e RMSEP inferiores e ajustes (R^2) mais adequados. E em uma terceira aplicação a espectroscopia NIR-CI (*Near Infrared Chemical Imaging*) combinada com PLS e MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*) permitiu a construção de mapas de distribuição de concentração e a determinação dos polimorfos de cloridrato de fexofenadina em comprimidos.

Palavras-chave: Análise Espectral Raman. Difração de Raios X. Espectroscopia de Luz Próxima ao Infravermelho. Análise Multivariada.

ABSTRACT

Organic polymorphs are common and present different physicochemical properties to each other. In pharmaceutical research, the polymorphism has a particular focus by allowing a molecule in a particular solid pharmaceutical formulation presents different solubility and stability. Traditionally, the most used technique in the characterization of polymorphs is the X-ray diffraction. However, in the interests of pharmaceutical quality assurance, low cost, non-destructive and handheld techniques, based on vibrational spectroscopy, have been used to develop methodologies for polymorphic characterization, both in raw materials and finished product. The main objective of this work was to develop methodologies to quantify the two polymorphic forms of fexofenadine hydrochloride in raw material and in pharmaceutical formulation, in the form of powder and tablet. To this end, firstly, we performed crystallization, characterization and study of polymorphic fexofenadine hydrochloride. Then, Raman spectroscopy and powder X-ray diffraction were used with multivariate regression PLS (*Partial Least Squares*), for the simultaneous determination of two polymorphs of fexofenadine hydrochloride in mixture of raw material (first application) and in a powder pharmaceutical formulation containing microcrystalline cellulose, starch, magnesium stearate, TiO₂ and povidone (second application). Both for raw material and powder pharmaceutical formulation, the X-ray diffraction shown to be more accurate than Raman spectroscopy, presenting lower values of RMSECV and RMSEP and most appropriated fitting (R^2). In a third application the NIR-CI (*Near Infrared Chemical Imaging*) spectroscopy coupled with PLS and MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*) allowed the construction of distribution maps of concentration and determination of polymorphs of fexofenadine hydrochloride in tablets.

Keywords: Spectrum Analysis Raman. X-Ray diffraction. Spectroscopy, Near-Infrared. Multivariate analysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das amostras de calibração.....	56
Tabela 2 -	Desempenho dos modelos de regressão univariada por Raman.....	57
Tabela 3 -	Desempenho dos modelos de regressão univariada por PXRD	58
Tabela 4 -	Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por Raman para as formas I e II do fexofenadina.HCl.....	59
Tabela 5 -	Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl.....	61
Tabela 6 -	Valores de referência e previstos pela técnica TG	64
Tabela 7 -	Composição das amostras de calibração.....	68
Tabela 8 -	Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por Raman para as formas I e II do fexofenadina.HCl.....	70
Tabela 9 -	Desempenho dos modelos de regressão PLS por PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl.....	72
Tabela 10 -	Composição dos comprimidos de calibração (1 a 30) e validação (31 a 40).....	78
Tabela 11 -	Desempenho do modelo de regressão PLS2 por NIR-Cl.....	80
Tabela 12 -	Valores de referência e valores previstos por PLS e MCR-ALS das concentrações das formas I e II de fexofenadina.HCl % (m/m) em comprimidos.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula geral da piperidina. Fexofenadina: R1=OH, R2=H, R3=COOH e n=3.....	19
Figura 2 -	Espectros de raios X característicos do molibdênio a 35kV. À direita o duplete $K\alpha_1/K\alpha_2$	24
Figura 3 -	Esquema representativo da derivação da Lei de Bragg.....	25
Figura 4 -	Representação esquemática do espalhamento Raman Stoke e anti-Stoke.....	28
Figura 5 -	Vibrações de deformação angulares.....	32
Figura 6 -	Vibrações de deformação axiais.....	32
Figura 7 –	Representação esquemática do oscilador harmônico simples. (a) Representação molécula diatômica, mola e duas esferas; (b) Curva de energia potencial em relação a vibração pelo modelo da mecânica quântica.....	33
Figura 8 -	Comportamento da energia potencial em relação à vibração molecular para o modelo do oscilador anarmônico.....	34
Figura 9 -	Esquema dos tipos de medida em IR. (A/B) Transmitância; (C) Refletância difusa; (D/E) Transfletância.....	35
Figura 10 -	(A) Espectros NIR do fexofenadina.HCl forma I, (B) primeira derivada dos espectros (C) segunda derivada dos espectros.....	39
Figura 11 -	Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para o modelo PLS.....	41
Figura 12 -	Representação esquemática do desdobramento dos dados obtidos por espectroscopia de imagem.....	45
Figura 13 -	Representação esquemática da construção de mapas de distribuição.....	46
Figura 14 -	Difratograma de raios X de pó das formas polimórficas do fexofenadina.HCl. $K\alpha_{Cu}$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$).....	49
Figura 15 -	Termograma dos polimorfos do fexofenadina.HCl: (a) Forma; I (b) Forma II.....	50
Figura 16 -	Espectros Raman das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl.....	51
Figura 17 -	Espectros NIR das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl.....	52
Figura 18 –	MEV da (A) forma I e (B) forma II do fexofenadina.HCl.....	52

Figura 19 - Difratoograma do fexofenadina.HCl formas I e II e da forma I após uma semana em estufa a $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 1\%$ U.R.....	53
Figura 20 - Regressões univariadas por Raman.	57
Figura 21 - Regressões univariadas por PXRD.....	58
Figura 22 - (a) Modelos de regressão PLS e (b) distribuição residual para a Forma I por Raman. Amostras de calibração (●) e validação (▼).....	62
Figura 23 - (a) Modelos de regressão PLS e (b) distribuição residual para a Forma I por PXRD. Amostras de calibração (●) e validação (▼).	63
Figura 24 - Regressão para quantificação da Forma II de fexofenadina.HCl por TG.....	65
Figura 25 - Espectro Raman das amostras de calibração e validação da formulação farmacêutica na forma de pó.	70
Figura 26 - Difratoogramas das amostras de calibração de formulação farmacêutica.....	72
Figura 27 - Modelos de regressão PLS e distribuição residual para a Forma I por Raman. Amostras de calibração (●) e validação (▼).	74
Figura 28 - Modelos de regressão PLS e distribuição residual para a Forma I por PXRD. Amostras de calibração (●) e validação (▼).....	75
Figura 29 - Modelos de regressão PLS para as formas polimórfica (A) I e (B) II por NIR-CI.	81
Figura 30 - Mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por PLS.	82
Figura 31 - Histogramas dos mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por PLS. Concentração por pixel x frequência de concentração.....	82
Figura 32 - Mapas de distribuição de concentração e concentrações médias das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por MCR-ALS.....	83
Figura 33 - Histograma dos mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por PLS. Concentração por pixel x frequência de concentração.....	84
Figura 34 - Segunda derivada dos espectros puros e espectros recuperados pelo MCR-ALS dos constituintes dos comprimidos.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Auto	<i>Autoscale</i> (Autoescalamento)
CLS	<i>Classical Least Squares</i> (Quadrados mínimos clássicos)
CM	<i>Mean Center</i> (Centrado na média)
DSC	<i>Diferencial Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria de varredura diferencial)
FIR	<i>Far Infrared</i> (Infravermelho distante)
FPA	<i>Focal Plane Array</i> (Matriz de plano focal)
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografia gasosa - Espectrometria de massa)
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> (Conferencia Internacional de Harmonização)
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
LCTF	<i>Liquid Cristal Tunable Filter</i> (Filtro sintonizável com cristal líquido)
LOF	<i>Lack of Fit</i> (Falta de ajuste)
LV	<i>Latent Variable</i> (Variável latente)
MCR-ALS	<i>Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares</i> (Resolução de curva multivariada - Quadrados mínimos alternados)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIR	<i>Mid Infrared</i> (Infravermelho médio)
MSC	<i>Multiplicative Signal Correction</i> (Correção multiplicativa de sinal)
NIPALS	<i>Non-linear Interactive Partial Least Squares</i>
NIR	<i>Near Infrared</i> (Infravermelho próximo)
NIR-CI	<i>Near Infrared - Chemical Imaging</i> (Espectroscopia de imagem química no infravermelho próximo)
PLS	<i>Partial Least Squares</i> (Quadrados mínimos parciais)
PXRD	<i>Powder X-ray Diffraction</i> (Difração de raios X por pó)

R²	Coeficiente de determinação
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> (Erro quadrático médio de calibração)
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> (Erro quadrático médio de validação cruzada)
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> (Erro quadrático médio de previsão)
SIMPLS	<i>Straightfroward Implementation of a Statically Inspired Modification of Partial Least Squares</i>
SNV	<i>Standard Normal Variate</i> (Variável normal padronizada)
SXRD	<i>Single-crystal X-ray Diffraction</i> (Difração de raios X por monocristal)
TG	<i>Termogravimetry</i> (Termogravimetria)
TG-MS	<i>Termogravimetry - Mass Spectrometry</i> (Análise Termogravimétrica - Espectrometria de massa)
UR	Umidade Relativa
XRD	<i>X-ray Diffraction</i> (Difração de raios X)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Cloridrato de fexofenadina	18
1.2	Polimorfismo em Fármacos	20
1.3	Caracterização e quantificação de polimorfos em fármacos	21
1.3.1	<i>Difratometria de raios X</i>	22
1.3.2	<i>Espectroscopia Raman</i>	27
1.3.3	<i>Espectroscopia de imagem no infravermelho próximo</i>	30
1.4	Estatística Multivariada (Quimiometria)	36
1.4.1	<i>Métodos de pré-processamento</i>	38
1.4.2	<i>Regressão por Quadrados Mínimos Parciais</i>	40
1.4.3	<i>Resolução de Curvas Multivariadas</i>	42
1.4.4	<i>Análise de imagem</i>	44
2	CRISTALIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE POLIMÓRFICA	47
2.1	Materiais e métodos	47
2.2	Resultados e discussão	49
2.3	Conclusão	53
3	APLICAÇÃO 1: ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE FEXOFENADINA.HCL EM MISTURAS DE MATÉRIA-PRIMA	54
3.1	Materiais e métodos	55
3.2	Resultados e discussão	57
3.3	Conclusões	65
4	APLICAÇÃO 2: ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE FEXOFENADINA.HCL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NA FORMA DE PÓ	67
4.1	Materiais e métodos	68
4.2	Resultados e discussão	69
4.3	Conclusões	76

5	APLICAÇÃO 3: ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE FEXOFENADINA.HCL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NA FORMA DE COMPRIMIDOS.....	77
5.1	 Materiais e métodos	78
5.2	 Resultados e discussão	80
5.3	 Conclusão	86
6	 CONCLUSÕES GERAIS.....	87
	 REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Quando se fala em química analítica as primeiras coisas que vêm em mente são caracterizar/identificar e quantificar espécies em um meio. Inicialmente, a química analítica se baseava na estequiometria das reações envolvidas na metodologia para a quantificação dos analitos, como nos métodos gravimétricos e volumétricos, também conhecidos como métodos clássicos. Com o desenvolvimento de equipamentos que permitiam mensurar parâmetros físicos, como carga elétrica e fenômenos óticos, iniciou-se o desenvolvimento de métodos instrumentais de análise, relacionando a medida de tais grandezas com a concentração, sendo necessária a construção de curvas de calibração. Com o advento dos computadores, tornou-se possível realizar a aquisição de um grande número de dados simultaneamente, como por exemplo, dados espectrais, os quais são fontes riquíssimas de informação química, e com a finalidade de se extrair o máximo de informações dos dados obtidos surgiram os métodos multivariados de análise. A Quimiometria é uma das áreas da Ciência Química e compreende o emprego e desenvolvimento destes métodos estatísticos, especificamente em dados de origem química (SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002).

Através da quimiometria foi, e ainda é, possível resolver muitos sistemas analíticos, outrora inviáveis. Um destes exemplos atuais é a quantificação de polimorfos de ingredientes farmacêuticos ativos em matrizes complexas, como medicamentos, através da técnica de difratometria de raios X (DATTA; GRANT, 2004; SILVA; IHA, 2010).

Apesar da Difratometria de raios X ser a técnica mais difundida de caracterização de polimorfos, as técnicas de espectroscopia vibracional, como Raman e Infravermelho, têm ganhado espaço na indústria farmacêutica, principalmente por apresentarem maior portabilidade, rapidez na aquisição de dados, além de serem capazes de realizar o monitoramento *on-line*, possuírem menor custo e maior facilidade de operação (DATTA; GRANT, 2004; HU et al., 2010). Porém, a análise quantitativa de formas polimórficas em formulações farmacêuticas utilizando técnicas espectroscópicas requer que o espectro de cada forma polimórfica seja diferente e que essas diferenças sejam conservadas na presença de qualquer diluente (excipiente) (PATEL; LUNER; KEMPER, 2000).

Embora as técnicas de espectroscopia vibracional e difração de raios X, juntamente com a quimiometria, apresentem potencial para a quantificação de polimorfos em formulações farmacêuticas, cada técnica tem as suas particularidades, o que será explorado neste trabalho.

No primeiro tópico encontramos uma introdução sobre conceitos teóricos das principais técnicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho: espectroscopia Raman, NIR-CI (*Near Infrared Chemical Imaging*), difratometria de raios X e quimiometria, além de ressaltar a importância do estudo de polimorfismo em fármacos.

No tópico 2, será apresentado como o fexofenadina.HCl forma II foi cristalizada a partir da forma I e a caracterização das mesmas. Além do estudo de estabilidade polimórfica, justificando a importância do presente estudo.

A primeira e segunda aplicações abordam o desenvolvimento de metodologias empregando a espectroscopia Raman e a difratometria de raios X por pó, juntamente com técnicas PLS (*Partial Least Squares*) para a quantificação das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl em matéria-prima e em formulação farmacêutica, respectivamente. A primeira aplicação aborda, também, a quantificação da forma polimórfica II do fexofenadina.HCl em matéria-prima por TG (Termogravimetria).

A terceira aplicação trata do desenvolvimento de metodologias quantitativas empregando a espectroscopia NIR-CI combinada com técnicas de análise multivariadas. Também foi abordada uma comparação entre os modelos PLS e MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*).

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Análise Química de Fármacos, Laboratório de Cristalografia (Difratômetro de raios X Ultima IV – Rigaku) e Laboratório Interdisciplinar de Química (SDT Q600 - TA Instruments Inc.), na UNIFAL-MG; do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica (*RamanStation* 400F - PerkinElmer e Espectrômetro SPECTRUM 100N FT-NIR acoplado com sistema de imagem Spotlight 400N FT-NIR - PerkinElmer) e Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica (MEV JEOL/JSM-6360), no Instituto de Química da UNICAMP, e possibilitou o desenvolvimento de metodologias capazes de identificar e quantificar as formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl em matéria-prima e em formulação farmacêutica.

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de metodologias para a quantificação de formas polimórficas em matéria prima e em determinada formulação farmacêutica na forma de pó e de comprimidos, empregando Difractometria de Raios X, Espectroscopia Raman e NIR-CI, juntamente com análise multivariada.

A primeira aplicação teve como objetivo, além de quantificar as formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl em matéria-prima, comparar as técnicas de espectroscopia Raman e PXRD, aliadas à análise multivariada (PLS) e à análise univariada, e comparar os diferentes métodos de pré-processamento utilizados entre si.

O objetivo da segunda aplicação foi quantificar as formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl em uma determinada formulação farmacêutica na forma de pó, contendo celulose microcristalina, amido, estearato de magnésio, TiO₂ e povidona, novamente, comparando as técnicas espectroscopia Raman e PXRD, aliadas à análise multivariada utilizando diferentes métodos de pré-processamento.

A terceira aplicação teve como objetivo a quantificação das formas polimórficas I e II de fexofenadina.HCl na superfície de comprimidos utilizando a técnica de imagem por NIR-CI, comparando os modelos PLS e MCR-ALS.

1.1 Cloridrato de fexofenadina

O cloridrato de fexofenadina (fexofenadina.HCl) é um anti-histamínico, que apresenta atividade anti-inflamatória, utilizado no tratamento de rinite alérgica, asma e outras manifestações alérgicas (RADHAKRISHNA; REDDY, 2002). A fexofenadina é um metabólito farmacologicamente ativo da terfenadina, e possui atividade seletiva antagonista dos receptores H₁ periféricos (RADHAKRISHNA; REDDY, 2002; AXELROD; BIELORY, 2008). No Brasil a fexofenadina é comercialmente conhecida como Allegra[®], do laboratório Sanofi-Aventis, administrada na forma de comprimidos de 60, 120 e 180 mg ou suspensão oral 6mg/mL. O *blockbuster* é um dos principais parâmetros que mensura o impacto econômico de um determinado medicamento. Para um medicamento alcançar o status de *blockbuster*, ela deve render mais que

\$1 bilhão em um ano (BLOCKBUSTER, 2011). O Allegra[®] conquistou este status em 2004 (WHITNEY, 2011).

O fexofenadina.HCl, (\pm)-4-[1-Hidroxi-4-[4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinil]butil]- α,α -dimetil benzeno acético ácido clorídrico, é um derivado da piperidina (HENTON et al., 1995), a qual possui a fórmula geral apresentada na Figura 1.

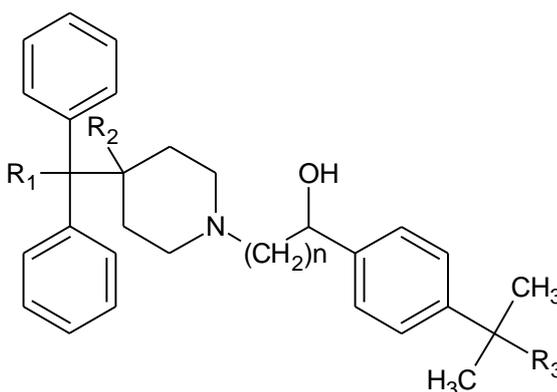


Figura 1 - Fórmula geral da piperidina. Fexofenadina: R1=OH, R2=H, R3=COOH e n=3.

Fonte: HENTON et al., 1995, p. 2.

São descritas cerca de 20 formas do fexofenadina.HCl em patentes, dentre as quais incluem as formas polimórficas, pseudopolimórficas e amorfas. Porém, as mais frequentemente encontradas são as formas anidras, I e III, e as formas hidratadas (hidratos), II e IV, sendo que nenhuma das formas polimórficas possui estrutura determinada (KOR; WIZEL, 2005).

Neste trabalho foram utilizadas uma forma anidra (Forma I) e uma hidratada (Forma II) do fexofenadina.HCl. Todas as formas apresentam atividade farmacêutica, porém a forma I é a mais desejada no medicamento, devido a sua biodisponibilidade (TREVISAN, 2010).

1.2 Polimorfismo em Fármacos

Polimorfismo, um termo derivado do grego, poli = muitas, morfismo = forma, pode ser definido como a capacidade de uma mesma substância existir em duas ou mais fases cristalinas, com células unitárias distintas e, conseqüentemente, diferentes conformações moleculares na rede cristalina (HU et al., 2010). Os solvatos, hidratos, sais e co-cristais são chamados de pseudopolimorfos, por apresentarem mais de um tipo de molécula no arranjo tridimensional. Os polimorfos “verdadeiros” apresentam a repetição de apenas uma molécula no retículo cristalino (MORISSETTE, 2004). São denominados solvatos os polimorfos que possuem molécula de solvente no retículo cristalino. Quando o solvente presente na estrutura for a água, o polimorfo passa a ser denominado hidrato. Nos sais a molécula age como um contra-íon, formando um sal. Os co-cristais são formados quando duas ou mais substâncias são cristalizadas em um mesmo retículo, por exemplo, o princípio ativo e um excipiente, ou dois princípios ativos. A forma amorfa também pode ser denominada pseudopolimorfo (BLANCO et al., 2005).

É conhecido que diferentes formas polimórficas apresentam diferenças relevantes em suas propriedades físico-químicas, como volume molar e densidade, propriedades óticas, condutividade elétrica e térmica, higroscopicidade, ponto de fusão e sublimação, solubilidade, dureza, velocidade de dissolução, transições eletrônicas, vibracionais, rotacionais e spin nuclear (DATTA; GRANT, 2004; SILVA; IHA, 2010).

O polimorfismo está relacionado ao estado cristalino. No entanto, as moléculas de um sólido podem estar distribuídas aleatoriamente no espaço (sólido amorfo), porém uma disposição ordenada e repetitiva (sólido cristalino) é mais provável, uma vez que é a situação de menor energia quando comparada a uma distribuição aleatória de átomos e moléculas interagindo fortemente (BRITAIN, 2000).

Como o polimorfismo é uma característica observada na fase sólida, e grande parte das formulações farmacêuticas, cerca de 80%, se apresenta na forma sólida, o estudo de polimorfismo é de grande interesse para a indústria farmacêutica, devido à possibilidade de transformação parcial ou total de um polimorfo em outro, durante os processos de produção, embalagem, estocagem e transporte (DATTA; GRANT,

2004). Tal preocupação ocorre devido às diferentes propriedades físico-químicas dos polimorfos, como citado anteriormente, uma vez que elas podem interferir diretamente no mecanismo de absorção do fármaco pelo organismo, atuando na sua eficácia terapêutica (SILVA; IHA, 2010). Assim, as diferentes formas polimórficas podem apresentar igual biodisponibilidade, sendo bioequivalentes e serem terapeuticamente ativas, ou possuírem diferentes níveis de biodisponibilidade, sendo não bioequivalentes, podendo ser, terapeuticamente, uma menos ativa que a outra, ou ainda inativa, ou possuir elevada biodisponibilidade, chegando a níveis considerados tóxicos para o organismo (CAPUCHO; MASTROIANNI; CUFFINI, 2008).

O polimorfismo de substâncias pode ser identificado e caracterizado utilizando técnicas de difração de raios X (XRD – *X-ray Diffraction*), espectroscopia no infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do estado sólido, espectroscopia Raman ou análise térmica, entre outras. As técnicas espectroscópicas como NIR (*Near InfraRed*) e Raman têm ganhado espaço na indústria farmacêutica por serem técnicas de identificação de relativo baixo custo, robustez, fácil uso e portabilidade, com possibilidade de emprego de bibliotecas espectrais (BLANCO et al., 2005; REICH, 2005).

1.3 Caracterização e quantificação de polimorfos em fármacos

Uma das técnicas mais apropriadas para diferenciar as formas polimórficas é a difração de raios X por pó (PXRD: *Powder X-ray Diffraction*) ou monocristal (SXRD: *Single-crystal X-ray Diffraction*) (BRITTAİN, 2000; BLANCO; VILLAR, 2003). A análise dos difratogramas obtidos nos experimentos de SXRD permite distinguir os diferentes arranjos dos átomos nos sólidos, permitindo a determinação estrutural, determinando com exatidão os ângulos e comprimentos de ligações. A PXRD pode ser usada para determinação do grau de cristalinidade, análise quantitativa das fases dos sólidos polimórficos e estudo da cinética das reações no estado sólido (BRITTAİN, 1995; DATTA; GRANT, 2004).

As técnicas de análise térmica, como DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) distinguem polimorfos com base nas transições de fase que estes sofrem durante o

aquecimento e podem ser usadas para obter informações adicionais com respeito a estas transições de fase, como o ponto de fusão, solvatação, cristalização, transição vítrea e estabilidade (INPI, 2010). Já os solvatos e hidratos são principalmente caracterizados pela técnica de TG (*Thermogravimetry*), obtendo-se os valores de perda de massa, que indicam a estequiometria molar entre solvato:solvente, e a temperatura de perda, que indica, aproximadamente, qual o solvente envolvido no solvato. A identificação do solvente também pode ser realizada por GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) ou TG-MS (THRELFALL, 1995).

Técnicas espectroscópicas no estado sólido (Infravermelho, Raman e RMN) têm se tornado parte integral das técnicas físicas de caracterização de sólidos farmacêuticos. As espectroscopias vibracionais no Infravermelho e Raman são técnicas que também fornecem respostas espectrais relacionadas à estrutura cristalina de moléculas orgânicas. Estes espectros são, frequentemente, característicos de cada uma das formas polimórficas em que uma substância se apresenta, podendo-se estabelecer relações inclusive quantitativas (BRAGA; POPPI, 2004; INPI, 2010; ROCHA et al., 2011).

A farmacopeia americana (USP, 2007) cita os seguintes testes para a análise de polimorfos: determinação do ponto de fusão, registro do espectro Raman e na região do infravermelho, análises térmicas (TG e DSC), dissolução e difração de raios X. Sendo esta última a mais difundida, porém ainda é uma técnica considerada lenta, não sendo ideal para o controle de qualidade (BLANCO et al., 2005; REICH, 2005). A indústria farmacêutica requer alternativas mais ágeis para este tipo de análise, e técnicas capazes de atender às exigências da rotina de controle de qualidade são as baseadas em espectroscopia vibracional (HU et al., 2010).

1.3.1 Difractometria de raios X

Os raios X são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda na ordem de Angstroms. Eles apresentam propriedades típicas de ondas como polarização, interferência e difração, da mesma forma que a luz e todas as outras radiações eletromagnéticas. Os raios X foram descobertos por Roentgen em 1895 na Universidade de Wurzburg, na Alemanha. Os raios X receberam esse nome por

sua natureza não ser ainda bem conhecida na época (EISBERG; RESNICK, 1979; PADILHA; AMBRÓZIO FILHO, 2004).

Os raios X são produzidos quando um feixe de elétrons de alta energia, acelerados por uma diferença de potencial de alguns milhares de volts, é freado ao atingir o alvo. A desaceleração dos elétrons, freados pelo material do alvo, causa a emissão de um espectro contínuo de radiação eletromagnética, segundo a física clássica. O espectro contínuo de raios X é frequentemente chamado *bremstrahlung*, do alemão *brem* = desaceleração e *strahlung* = radiação. O processo *bremstrahlung* não ocorre apenas em tubos de raios X, mas sempre que elétrons acelerados colidem com a matéria (EISBERG; RESNICK, 1979).

No tubo de geração de raios X os elétrons são emitidos de um cátodo aquecido e, em seguida, por meio de uma voltagem aplicada entre o cátodo e o ânodo, os elétrons são acelerados atingindo-se energias cinéticas da ordem de 10^4 eV, e por fim colidem contra o ânodo. Ao atravessar os átomos do ânodo, elétrons do feixe passam, eventualmente, próximos a elétrons de subcamadas internas, e devido à interação coulombiana entre os elétrons do feixe e o atômico, este último pode receber energia suficiente para ser retirado de um nível de energia negativo e ser ejetado do átomo, deixando o átomo em estado excitado. O átomo volta ao estado fundamental ao emitir um conjunto de fótons de alta energia e, portanto, de alta frequência, que pertence a seu espectro de raios X. O espectro total emitido por um tubo de raios X consiste num espectro discreto superposto a um contínuo, como ilustrado na Figura 2. O espectro contínuo ocorre devido ao processo de *bremstrahlung*, o qual é dependente da energia do feixe de elétrons; e o espectro discreto, ou característico, contém os comprimentos de onda característicos do metal do ânodo (EISBERG; RESNICK, 1979; PADILHA; AMBRÓZIO FILHO, 2004).

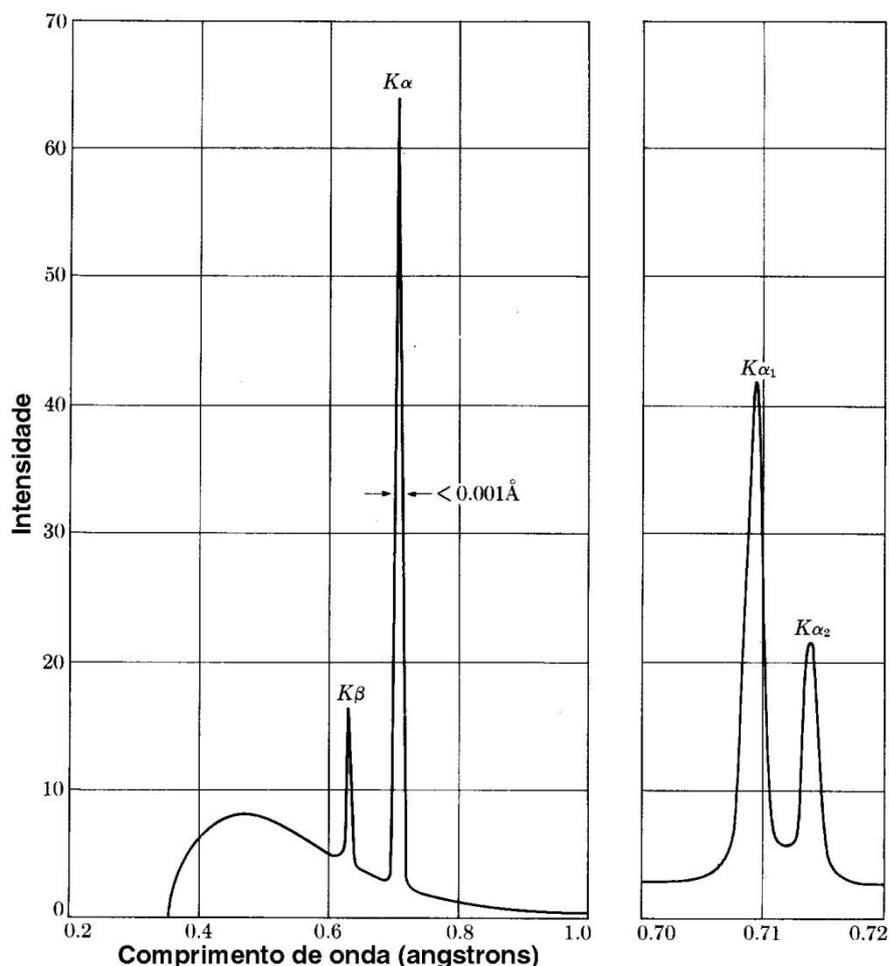


Figura 2 - Espectros de raios X característicos do molibdênio a 35kV. À direita o duplete $K\alpha_1/K\alpha_2$.

Fonte: PADILHA; AMBRÓZIO FILHO, 2004, p. 57.

Para se obter melhores resultados o feixe de raios X deve ter um único comprimento de onda e serem tão paralelos quanto possível. Para isso utilizam-se filtros, monocromadores e colimadores. Os filtros são laminas metálicas finas que são colocadas no caminho do feixe, capazes de absorver a radiação contínua e o $K\beta$, a radiação característica $K\alpha$ é apenas levemente atenuada. Isto nos permite obter somente a radiação $K\alpha$. Um monocromador é um monocristal muito estável que age como uma grade de difração que torna a radiação tão monocromática quanto possível, é possível obter apenas a radiação $K\alpha_1$. Um colimador é um tubo com tubos menores (0,5 mm), que reduz a dispersão do feixe de raios X e limita o diâmetro do feixe (NAIK, 2010).

A difração de raios X é uma das principais técnicas de caracterização estrutural de materiais cristalinos. Na difração de raios X os átomos do cristal agem como um arranjo tridimensional de centros de difração para a onda eletrônica,

espalhando os elétrons em certas direções características (EISBERG; RESNICK, 1979; DATTA; GRANT, 2004).

A difração de raios X permite obter informações sobre o empacotamento cristalino, possibilitando a determinação estrutural exata e por isso é uma das principais técnicas utilizadas no estudo de polimorfismo. Considerando os planos atômicos de um cristal, as condições para que ocorra difração de raios X (interferências construtivas) vão depender da diferença de caminho percorrido pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Essa condição é expressa pela Lei de Bragg (Equação 4), a qual pode ser deduzida a partir do arranjo geométrico ilustrado pela Figura 3 (EISBERG; RESNICK, 1979; CULLITY; STOCK, 2001; NAIK, 2010).

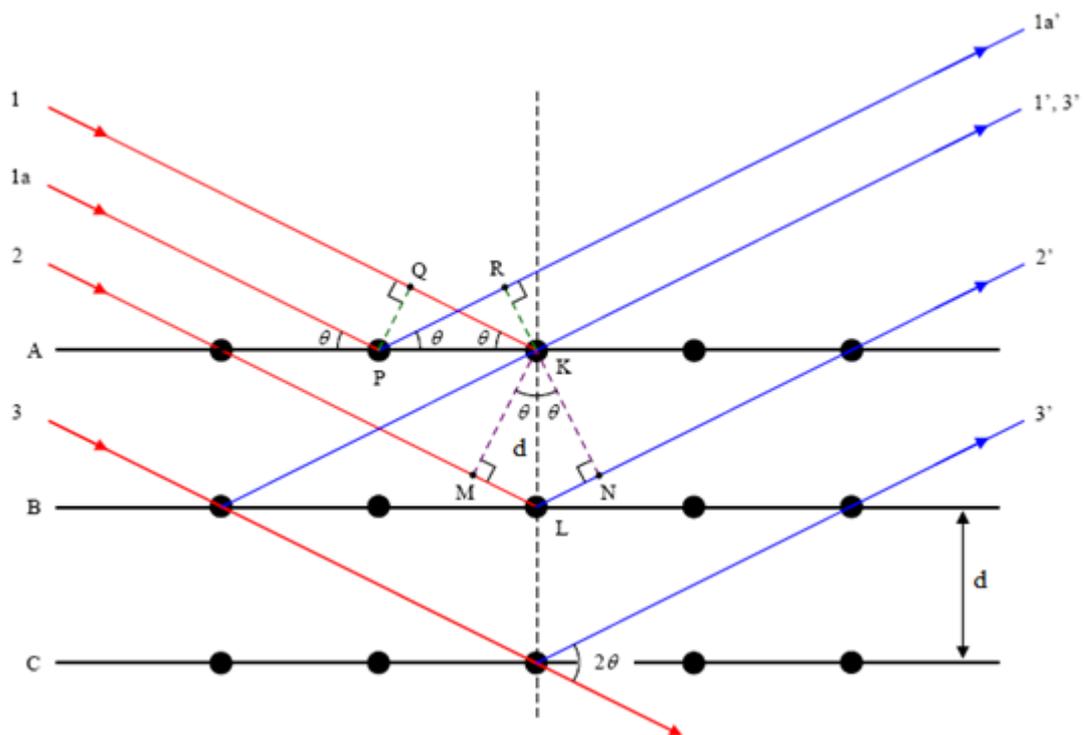


Figura 3 - Esquema representativo da derivação da Lei de Bragg.

Fonte: CULLITY; STOCK, 2001, p. 92.

Tomando o triângulo retângulo MLK, temos que d é a hipotenusa. Dessa forma podemos calcular a distância ML de acordo com a Equação 1:

$$ML = d \operatorname{sen}\theta \quad \text{(Equação 1)}$$

Os raios do feixe incidente estão sempre em fase e paralelos até o ponto no qual o feixe incide na camada do átomo K e nas camadas adjacentes L. Os raios que incidem sobre o átomo L deve viajar a distancia extra $ML+LN$ para permanecerem adjacentes e paralelos. Para que os raios do feixe permaneçam em fase, essa distância extra deve ser um múltiplo inteiro (n) do comprimento de onda (λ) em Angstrom(Å).

$$n\lambda = ML + LN \quad \text{(Equação 2)}$$

Como $ML=LN$, temos que:

$$n\lambda = 2ML \quad \text{(Equação 3)}$$

Substituindo a Equação 1 na Equação 3 temos a Equação que descreve a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad \text{(Equação 4)}$$

onde: λ corresponde ao comprimento de onda dos raios X em Angstrom (Å), n a um número inteiro (ordem de difração), d é a distância interplanar e θ é o ângulo de incidência ou reflexão do feixe incidente (CULLITY; STOCK, 2001).

Neste trabalho fez-se uso da difratometria de raios X de pó, a qual possui como desvantagens a sobreposição de picos devido às condições de simetria, a resolução experimental limitada (na maioria dos equipamentos), e principalmente devido à orientação preferencial, distribuição não aleatória dos cristais na amostra, que se orientam de acordo com o plano cristalográfico preferencial. A orientação preferencial pode ser evitada com o preparo adequado da amostra (como o controle granulométrico dos cristais ou com o uso de tubo capilar), ou corrigido matematicamente, com o uso de softwares para a aplicação dos algoritmos apropriados. O método de Rietveld é capaz de fazer tais correções, permitindo a determinação estrutural e a quantificação das fases cristalinas da amostra. Porém, o método de Rietveld não é de fácil aplicação e requer, para análise quantitativa de fases, que a estrutura cristalina de cada fase seja conhecida (WILL, 2006).

1.3.2 Espectroscopia Raman

Quando a radiação passa por um meio, ela pode ser absorvida ou espalhada pelas espécies presentes. O espalhamento da radiação pode ocorrer de maneira elástica, quando a frequência da radiação espalhada é idêntica à da radiação incidente, denominado espalhamento Rayleigh; ou de forma inelástica, quando há um deslocamento para uma frequência maior ou menor em relação à frequência da radiação incidente, denominado espalhamento Raman. O primeiro pesquisador a descrever o fenômeno de espalhamentos inelásticos foi Chandrasekhara Venkata Raman, em 1928, pesquisa pela qual recebeu o prêmio Nobel da Física de 1930 (RAMAN ; KRISHNAN, 1928; EISBERG; RESNICK, 1979).

O espalhamento Raman pode ser entendido como o redirecionamento da radiação incidente ao encontrar um obstáculo com uma mudança de frequência (BRERETON, 2003). No processo de fluorescência, a frequência da radiação incidente é igual à frequência de absorção das moléculas espalhadoras da matéria, um fenômeno de ressonância onde a molécula é levada a um estado excitado e, após um breve tempo, reemite luz numa frequência diferente. No efeito Raman, a frequência da radiação espalhada é diferente da frequência da radiação incidente, mas esta frequência incidente não está relacionada com alguma frequência característica da molécula espalhadora, a diferença de frequência ν' entre a radiação incidente e espalhada no efeito Raman é característica de transições vibracionais na molécula espalhadora (BRITAIN, 1995; INPI, 2010).

O fenômeno de espalhamento da radiação pode ser descrito pela perturbação da nuvem eletrônica, resultando em uma separação de cargas nas moléculas, conhecida como momento de dipolo induzido. A oscilação do momento de dipolo induzido é manifestada através da fonte de radiação incidente, que é capaz de provocar o espalhamento da radiação (LARKIN, 2011).

Ao incidir uma radiação intensa e monocromática com frequência ν , observa-se que a maior parte da radiação espalhada é emitida com frequência ν idêntica à da radiação incidente (espalhamento Rayleigh), processo conhecido como espalhamento elástico. Entretanto, há também o espalhamento de radiação com frequência diferente da radiação incidente, $\nu \pm \nu'$ (espalhamento Raman), processo

conhecido como espalhamento inelástico. Quando a frequência ν' é menor que ν , temos um deslocamento conhecido como espalhamento Stoke, e quando a frequência ν' é maior que ν , temos um deslocamento conhecido como espalhamento anti-Stoke. É possível notar na Figura 4 que o espalhamento Rayleigh é mais intenso, devido à maior probabilidade de transferência de energia para moléculas no estado fundamental e à reemissão retornando ao estado fundamental; seguido do espalhamento Raman Stoke e, por fim, o espalhamento Raman anti-Stoke, devido à maior probabilidade da molécula se encontrar inicialmente no estado fundamental do que em algum nível vibracional excitado (EISBERG; RESNICK, 1979; HOLLAS, 2004; DENK, 2005).

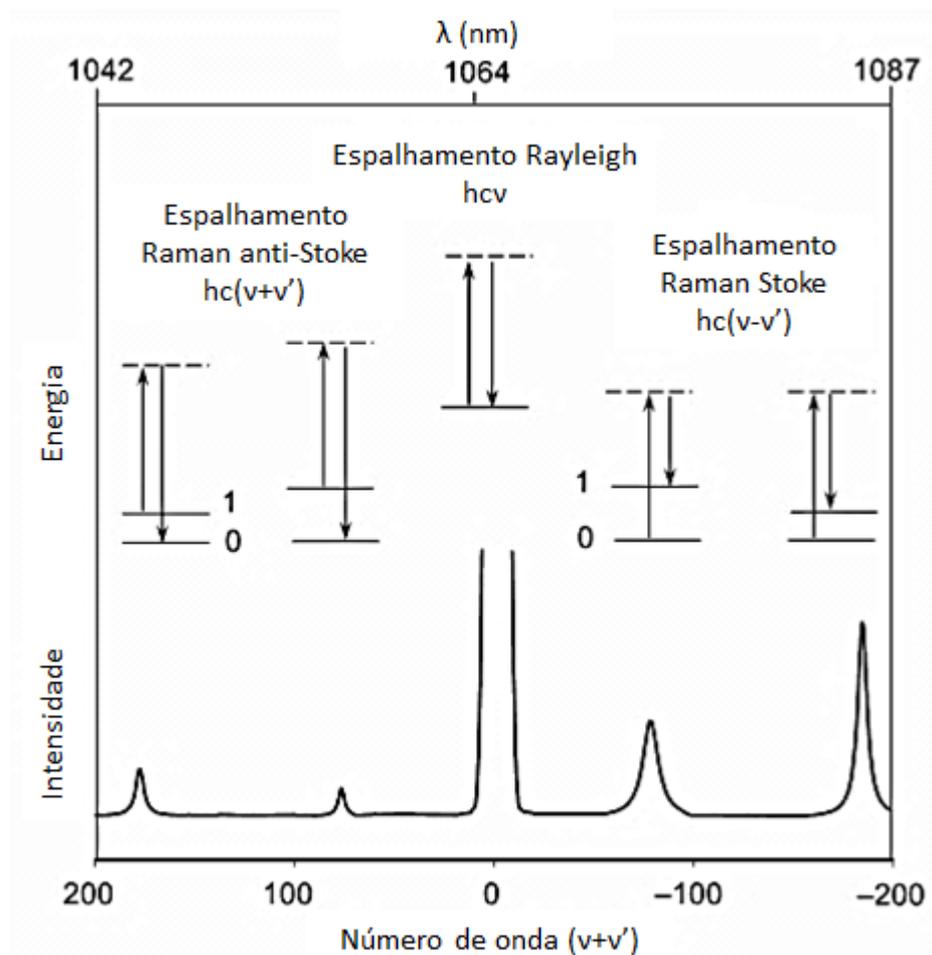


Figura 4 - Representação esquemática do espalhamento Raman Stoke e anti-Stoke.

Fonte: Adaptado de DENK, 2005.

Supondo que um feixe de radiação com frequência ν (Hz) incida sobre uma amostra. O campo elétrico E pode ser descrito pela Equação 5:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu t) \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde E_0 é a amplitude da onda. Como já discutido anteriormente, a onda eletromagnética incidente induz um momento de dipolo durante a interação da radiação com a matéria. O momento de dipolo induzido é dado por:

$$m = \alpha E = E_0 \cos(2\pi\nu t) \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde α é uma constante de proporcionalidade denominada polarizabilidade da ligação. Essa constante é uma medida da deformação da ligação em um campo elétrico.

Para ser ativa no Raman, α de uma ligação precisa variar em função da distância entre os núcleos.

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde α_0 é a polarizabilidade da ligação na distancia internuclear de equilíbrio r_{eq} e a separação internuclear em qualquer instante r .

A variação na separação internuclear se altera com a frequência da vibração ν' e é dada por:

$$r - r_{eq} = r_m \cos(2\pi\nu' t) \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde r_m é a separação internuclear máxima em relação à posição de equilíbrio.

Substituindo a Equação 8 na Equação 7 temos:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) r_m \cos(2\pi\nu' t) \quad \text{(Equação 9)}$$

Assim, o momento de dipolo induzido pode ser descrito como na Equação 10.

$$m = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu t) + E_0 r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos(2\pi\nu t) \cos(2\pi\nu' t) \quad \text{(Equação 10)}$$

Lembrando que:

$$\cos x \cos y = [\cos(x + y) \cos(x - y)]/2 \quad \text{(Equação 11)}$$

Temos que:

$$m = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu - \nu')t] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos[2\pi(\nu + \nu')t] \quad \text{(Equação 12)}$$

O primeiro termo da Equação 12 representa o espalhamento Rayleigh, espalhamento elástico. O segundo e terceiro termos correspondem aos espalhamentos Stokes e anti-Stokes, respectivamente. É notável que para que ocorra o espalhamento Raman é necessário que “ $\partial\alpha/\partial r$ ” na Equação 12 seja diferente de zero, uma vez que o deslocamento do modo vibracional dos átomos corresponde a um modo vibracional que resulta na mudança de polarizabilidade (SKOOG; HOOLER; NIEMAN, 2002).

Por ser uma técnica não destrutiva e relativamente rápida, a espectroscopia Raman tem se tornado atraente para a indústria farmacêutica, além de permitir o uso de equipamentos portáteis.

1.3.3 Espectroscopia de imagem no infravermelho próximo

Em 1800, a radiação infravermelha foi descrita por Herschel. Ele separou o espectro eletromagnético com um prisma e mediu a temperatura de cada cor, observando um acréscimo de temperatura na região além do vermelho visível. Posteriormente, esta região foi denominada como infravermelho próximo (REICH, 2005).

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e das micro-ondas e é dividida em três regiões:

infravermelho próximo (NIR: *Near Infrared*) de 12820 a 4000 cm^{-1} , infravermelho médio (MIR: *Mid Infrared*) de 4000 a 400 cm^{-1} e infravermelho distante (FIR: *Far Infrared*) de 400 a 33 cm^{-1} (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1981; REICH, 2005).

A radiação infravermelha da faixa de aproximadamente 10000 a 100 cm^{-1} (Infravermelho próximo e médio) converte-se em energia vibracional molecular quando absorvida. O processo é quantizado, porém o espectro vibracional consiste em uma série de bandas ao invés de linhas, isso ocorre pois cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional, assim as linhas se sobrepõem dando lugar às bandas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1981).

Os átomos de uma molécula nunca estão imóveis. Existem dois tipos de vibrações moleculares: as deformações angulares (Figura 5) e as deformações axiais (Figura 6). A vibração de deformação angular corresponde a variações de ângulo de ligação, a qual pode ser internamente em um conjunto de átomos ou de um grupo de átomos em relação à molécula como um todo. A vibração de deformação axial é um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação, de forma que a distância interatômica aumente e diminua alternativamente. As vibrações fundamentais não alteram a posição do centro de gravidade da molécula. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente à radiação infravermelha. Para absorver radiação infravermelha, a molécula precisa sofrer alteração do momento de dipolo decorrente dos movimentos vibracionais e rotacionais (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1981; REICH, 2005).

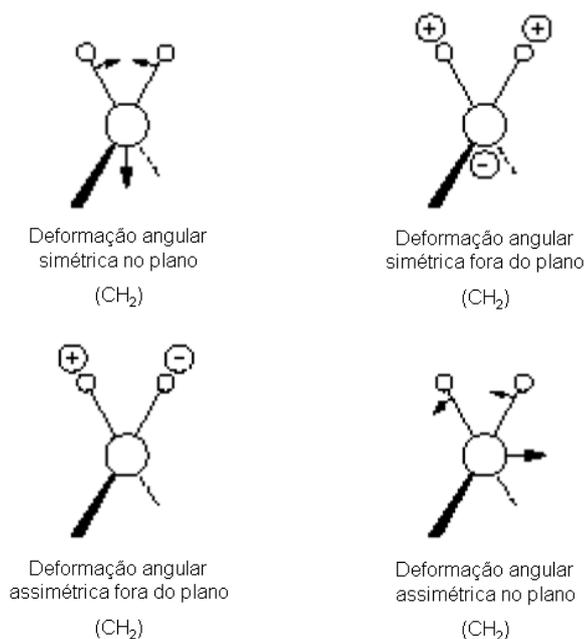


Figura 5 - Vibrações de deformação angulares.

Fonte: SILVERSTEIN et al., 1981, p. 166.

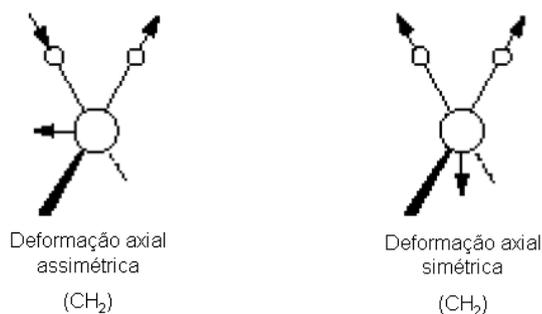


Figura 6 - Vibrações de deformação axiais.

Fonte: SILVERSTEIN et al., 1981, p. 166.

Os modos vibracionais moleculares podem ser explicados pelo modelo de um oscilador harmônico. No caso de moléculas diatômicas simples (Figura 7.a), em que consideramos a ligação entre os dois átomos como uma mola ligando duas esferas, podemos calcular a frequência (Equação 13) e energia potencial (Equação 14) pelo modelo clássico do oscilador harmônico (ABRAMS, 1992).

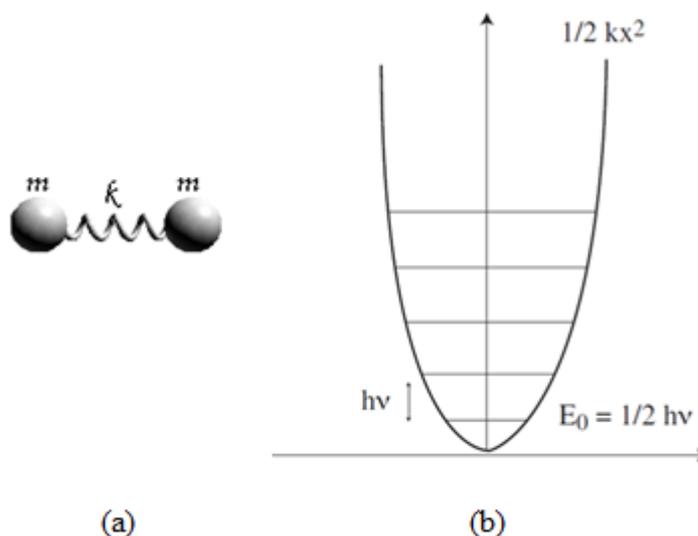


Figura 7 – Representação esquemática do oscilador harmônico simples.

(a) Representação molécula diatômica, mola e duas esferas;

(b) Curva de energia potencial em relação a vibração pelo modelo da mecânica quântica.

Fonte: ABRAMS, 1992.

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad \text{(Equação 13)}$$

$$E = \frac{1}{2} kx^2 = h\nu \quad \text{(Equação 14)}$$

Onde k é a constante de força ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$), m é a massa (g) dos átomos envolvidos, h é a constante de Planck e x é o deslocamento da mola. Dessa forma, temos que a energia é dependente do quanto a mola estica ou é comprimida, podendo assumir qualquer valor e, portanto a molécula pode absorver energia em qualquer comprimento de onda.

Porém, os movimentos vibracionais são quantizados, e, portanto, as únicas transições permitidas são descritas pelos níveis de energia determinados pela Equação 15.

$$E = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad \text{(Equação 15)}$$

Onde n é o número quântico (0, 1, 2, 3, ..., n).

A maioria das moléculas não é composta apenas por dois átomos, por isso o modelo harmônico (Figura 7.b) é limitado. Os elétrons sofrem influências de átomos e grupos vizinhos, influenciando no estiramento, comprimento e ângulo de ligação, e, portanto, na frequência de vibração das ligações químicas. Essas diferenças específicas de cada molécula é que proporcionam que cada uma delas tenha um espectro característico. O modelo anarmônico conduz a desvios que descrevem melhor as vibrações moleculares, pois quando a distância entre os átomos aumenta, há um decréscimo na força de restauração e, portanto, da energia potencial (Figura 8), esse fenômeno pode ser descrito pela Equação 16. É observado que quando a distância interatômica aumenta, a energia potencial se aproxima daquela em que ocorre a quebra da ligação (BURNS; CIURCZAK, 2001).

$$E = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu - \left(n + \frac{1}{2}\right)^2 \nu\chi \quad \text{(Equação 16)}$$

Onde χ é a constante de anarmonicidade.

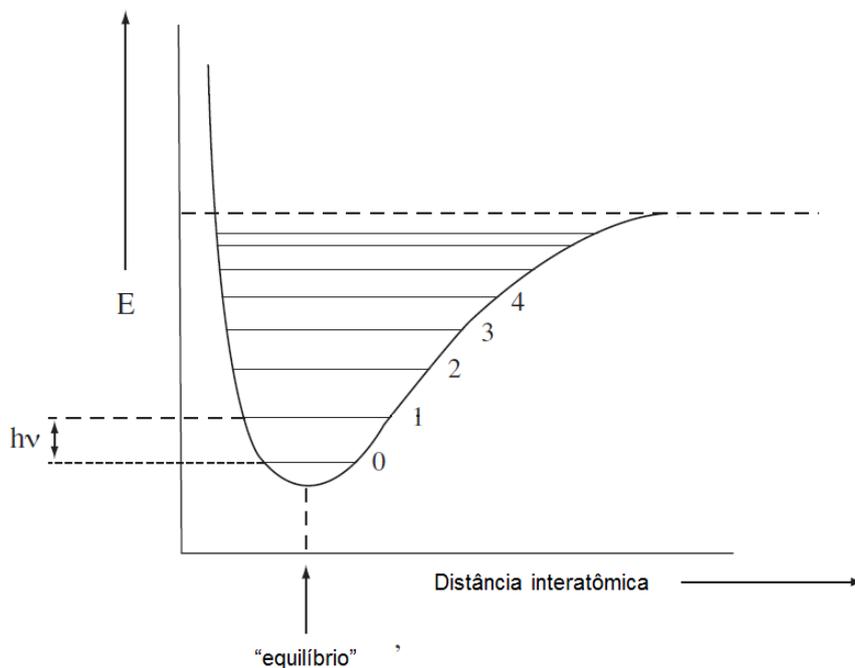


Figura 8 - Comportamento da energia potencial em relação à vibração molecular para o modelo do oscilador anarmônico.

Fonte: ABRAMS, 1992.

As análises por IR podem ser realizadas mensurando-se a transmitância, refletância difusa ou transfletância, como indicado no esquema da Figura 9. O espectro NIR é uma consequência da absorbância da radiação devido à vibrações moleculares (sobreposições e vibrações fundamentais) de ligações de átomos de hidrogênio, como C–H, N–H, O–H (LUYPAERT; MASSART; VANDER HEYDEN, 2007).

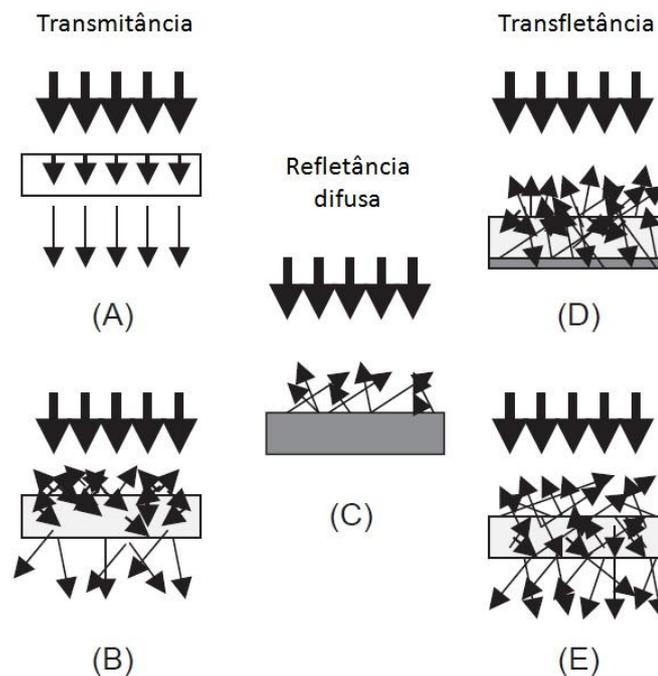


Figura 9 - Esquema dos tipos de medida em IR.
(A/B) Transmitância;
(C) Refletância difusa;
(D/E) Transfletância.

Fonte: REICH, 2005, p. 1113.

Na última década, a espectroscopia NIR tem tido grande aceitação na indústria farmacêutica para avaliação de matéria prima, controle de qualidade do produto, caracterização de polimorfos, e monitoramento de processos, detectando possíveis transformações no produto nas etapas de embalagem e estocagem. Isso devido a espectroscopia NIR ser uma técnica rápida e não destrutiva, que provê uma determinação simultânea em qualquer amostra, além da amostra poder ser analisada sem nenhum tipo de preparo ou com preparo mínimo, evitando etapas que podem induzir a erros. Outra vantagem diz respeito a possibilidade de utilizar sondas de fibra ótica, a previsão de parâmetros químicos e físicos a partir de um único

espectro, e o relativo baixo custo da análise (BLANCO et al., 2005; REICH, 2005; LUYPAERT; MASSART; VANDER HEYDEN, 2007).

NIR-CI (Espectroscopia de imagem química no infravermelho próximo) é a combinação da espectroscopia NIR com o processamento digital de imagem. Um sistema de NIR-CI é composto basicamente por uma fonte de iluminação, um sistema ótico, um seletor de comprimento de onda, e uma matriz de plano focal (FPA). Os dados são coletados através da gravação de uma série de imagens sobre o FPA do NIR em cada posição do comprimento de onda selecionado por um codificador espectral, como um filtro sintonizável com cristal líquido (LCTF) ou um interferômetro (REICH, 2005; SMITH, 2012).

Um espectro de NIR é registrado em cada pixel da imagem da amostra, resultando em um conjunto de dados tridimensional, conhecido como cubo hiper-espectral, onde os eixos x e y representam informações espaciais e o eixo z informações espectrais (REICH, 2005; ROCHA et al., 2011).

Sobre a instrumentação há basicamente duas abordagens diferentes. A primeira é o método de varredura do comprimento de onda. Amostra e câmera permanecem estacionárias e uma única imagem é captada por comprimento de onda. A segunda, conhecida como método “*push-broom scanning*” requer movimentos relativos entre amostra e câmera, a fim de fazer uma varredura da superfície da amostra, sendo registrado um espectro por pixel da imagem (REICH, 2005).

NIR-CI é uma técnica que vem ganhando espaço na pesquisa farmacêutica pelo fato de poder ser utilizada na identificação e quantificação dos polimorfos presentes e de sua distribuição. Outras vantagens dizem respeito à possibilidade de visualizar a distribuição espacial das espécies químicas na amostra e ao fato de ser um estudo rápido e não destrutivo (REICH, 2005; AMIGO et al., 2008; ROCHA et al., 2011).

1.4 Estatística Multivariada (Quimiometria)

O principal objetivo da química analítica quantitativa é determinar a concentração de uma ou mais espécies presentes no meio. Quando se utilizam

técnicas instrumentais de análise, a concentração é determinada indiretamente por meio de uma relação com os valores de determinadas propriedades físico-químicas do sistema de interesse, essa prática é conhecida como calibração. A calibração pode ser definida como uma série de operações matemáticas que estabelecem, sob determinadas condições, uma relação entre as medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse (concentração de determinada espécie) (BRERETON, 2003).

Com o avanço da instrumentação e automação dos métodos analíticos, uma grande quantidade de dados começou a ser gerada muito rapidamente. Com a possibilidade de adquirir uma vasta quantidade de dados de forma rápida e com o mínimo esforço, surge o obstáculo de como analisar todos os dados adquiridos e extrair o máximo de informações relevantes, para isso os químicos começaram a fazer uso de métodos matemáticos e estatísticos (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005). Assim foi criada uma nova área da química analítica, a quimiometria. A quimiometria pode ser definida como a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos para a análise de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (OTTO, 2007). A área da química analítica para qual a quimiometria mais contribuiu foi a espectroscopia molecular (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Entre os métodos de calibração existentes, com certeza, os mais conhecidos são os métodos univariados, também chamados de calibração de ordem zero. Neste caso, tem-se apenas uma medida instrumental por amostra, ou seja, apenas um escalar para cada amostra. Os modelos univariados são de fácil aplicação e validação, porém são de restrita aplicação, pois não são livres de interferentes que possam provocar desvios entre resposta analítica e a concentração (FERREIRA et al., 1999; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005).

Nos métodos de calibração multivariada, duas ou mais medidas instrumentais são relacionadas com a propriedade de interesse. Métodos de calibração de primeira ordem fornecem um vetor de dados para cada amostra, enquanto os de segunda ordem fornecem uma matriz de dados por amostra. Em situações onde a determinação de um analito é dificultada ou impedida devido à presença de interferentes, o uso de calibração multivariada permite a modelagem desses interferentes junto com o analito de interesse. As vantagens potenciais da determinação direta são rapidez, redução de uso de reagentes, baixo custo e

simplificação no preparo da amostra, diminuindo as possibilidades de erro causadas pela manipulação. Nos últimos anos, as principais aplicações desta estratégia estiveram no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e em análises clínicas. Tornaram-se possíveis a determinação simultânea direta de vários princípios ativos em um mesmo produto farmacêutico e a determinação de fármacos em amostras complexas, tais como plasma, soro e urina, sem necessidade de separação prévia dos constituintes (FERREIRA et al., 1999; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005; RAVN; SKIBSTED; BRO, 2008).

1.4.1 Métodos de pré-processamento

Antes de construir os modelos de regressão, faz-se necessário a utilização de métodos de pré-processamento para muitos conjuntos de dados. Os métodos de pré-processamento têm como objetivo linearizar as respostas das variáveis e remover fontes de variância que não são de interesse na análise. A linearização dos conjuntos de dados é importante, pois os modelos, em geral, requerem que os dados sejam lineares, além das respostas lineares serem mais fáceis de modelar que as não lineares. Ao realizar uma calibração, quanto maior a relação sinal-ruído melhor, pois isto permite extrair as menores características do conjunto de dados, assim os métodos de pré-processamento também têm o objetivo de intensificar os sinais de interesse e minimizar os ruídos. Logo, pré-processamento é, em geral, a modificação de dados feita antes de construir um modelo ou de outra forma de analisar esses dados (HANSEN, 2001; WISE et al., 2006).

Neste trabalho foram utilizados os métodos de pré-processamento segunda derivada, normalização, SNV (*Standard Normal Variate*) e MSC (*Multiplicative Signal Correction*), combinados com autoescalamento, centragem na média ou sem nenhum tipo de dimensionamento.

As derivadas são comumente utilizadas para remover sinais e alterações da linha base sem importância química. Como podemos ver na Figura 10 a primeira derivada removeu a variação da linha de base. A segunda derivada acentua as características de maior frequência. As variações restantes são devido às diferenças químicas entre as amostras. Um importante aspecto das derivadas é que elas não

afetam as relações lineares entre os dados, isso porque as derivadas são operadores lineares (WISE et al., 2006).

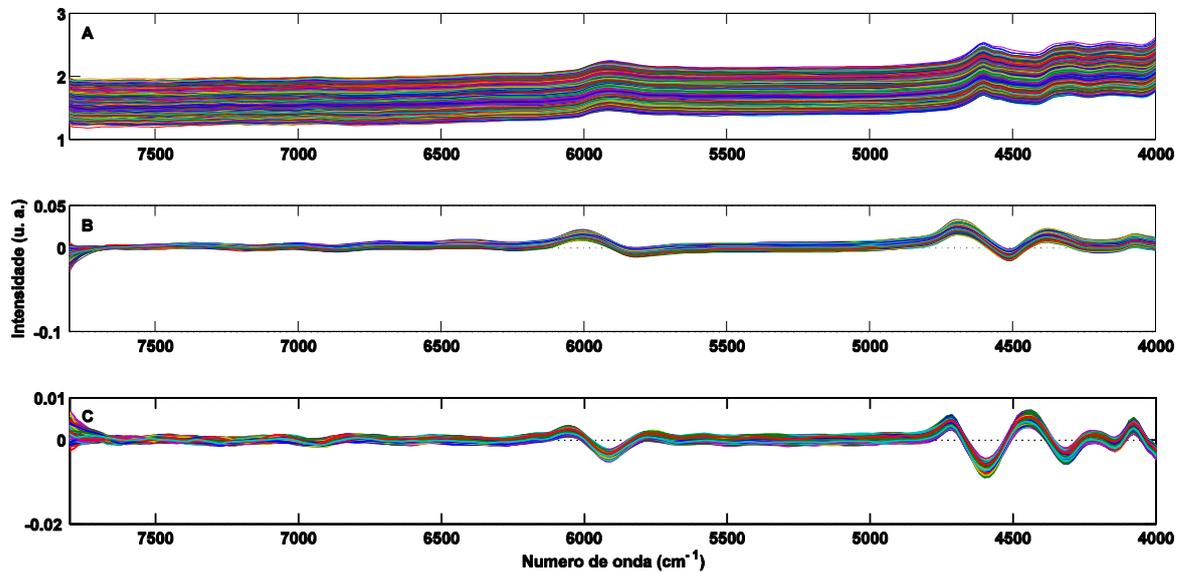


Figura 10 - (A) Espectros NIR do fexofenadina.HCl forma I,
(B) primeira derivada dos espectros
(C) segunda derivada dos espectros.

Fonte: Do autor.

A normalização de cada amostra é comumente utilizada quando há variação na escala e/ou linha de base. Neste trabalho todas as variáveis foram normalizadas para o valor máximo de intensidades espectral igual a 1 (WISE et al., 2006).

O SNV é uma normalização ponderada. O SNV calcula o desvio padrão de todas as variáveis para uma dada amostra, e todos os dados desta amostra são normalizados por este valor, de modo que o desvio padrão dessa amostra seja unitário ($s = 1$). Essa normalização é ponderada considerando os valores de cada amostra individualmente (WISE et al., 2006).

O MSC é um método de pré-processamento que inibe os efeitos de escala e de alteração de linha de base. Essa correção é realizada com a regressão de um espectro medido contra um espectro de referência (espectro médio do conjunto de dados), de modo que cada espectro se ajuste ao espectro médio. Os dados de cada amostra são normalizados pelo espectro médio do conjunto de dados (WISE et al., 2006; KACHRIMANIS; BRAUN; GRIESSER, 2007; HU et al., 2010).

Na centragem na média, a média de cada variável é calculada e então subtraída de todos os valores do conjunto de dados da variável em questão. No

autoescalamento, a centragem na média é seguida pela divisão dos conjuntos de dados de cada variável pelo seu respectivo desvio padrão (WISE et al., 2006).

1.4.2 Regressão por Quadrados Mínimos Parciais

O método de regressão PLS (Quadrados Mínimos Parciais, do inglês, *Partial Least Squares*) é o método mais robusto e utilizado em regressões de dados multivariados. Os modelos PLS não requerem o conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras, porém esta informação pode ajudar na construção e interpretação do modelo. Os dados para a construção do modelo PLS são organizados em dois blocos: a matriz **X**, com os vetores de respostas instrumentais, e a matriz **Y**, com os vetores referentes as propriedades de interesse. As matrizes **X** e **Y** são decompostas simultaneamente (Figura 11) em uma soma de *h* variáveis latentes, como nas Equações de 13 a 16 (BRAGA, 2004; SENA; TREVISAN; POPPI, 2005):

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad \text{(Equação 13)}$$

$$\mathbf{X} = \sum t_h p'_h + \mathbf{E} \quad \text{(Equação 14)}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad \text{(Equação 15)}$$

$$\mathbf{Y} = \sum u_h q'_h + \mathbf{F} \quad \text{(Equação 16)}$$

Onde:

- **T** e **U** são as matrizes de escores das matrizes **X** e **Y**, respectivamente;
- **P** e **Q** são as matrizes dos pesos das matrizes **X** e **Y**, respectivamente;
- e **E** e **F** são os resíduos dos conjuntos **X** e **Y**, respectivamente, que correspondem aos dados que não puderam ser modelados.

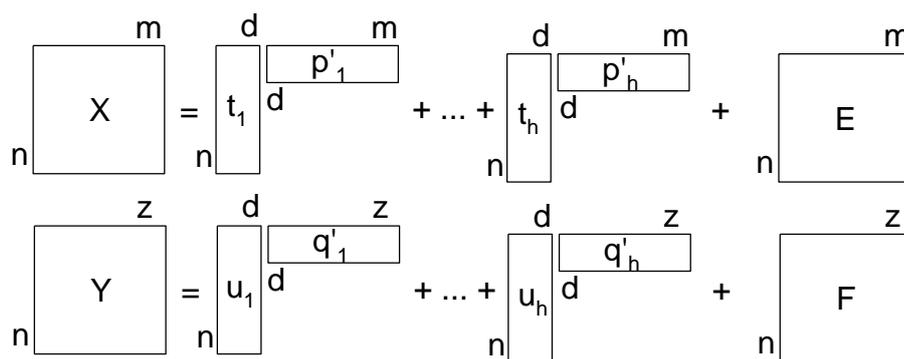


Figura 11 - Representação esquemática da decomposição em variáveis latentes das matrizes X e Y para o modelo PLS.

Fonte: Adaptado de Braga, 2004, p. 36.

A correlação entre os dois blocos **X** e **Y** é simplesmente uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão linear, tal como descrito na Equação 17:

$$u_h = b_h t_h \quad \text{(Equação 17)}$$

para h variáveis latentes, sendo que os valores de b_h são agrupados na matriz diagonal **B**, que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores **U** de **Y** e a matriz de escores **T** de **X**.

A melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de **X** e **Y**.

A matriz Y pode ser calculada de u_h ,

$$Y = TBQ' + F \quad \text{(Equação 18)}$$

e a concentração de novas amostras prevista a partir dos novos escores, **T***, substituídos na Equação 18:

$$Y = T^*BQ' \quad \text{(Equação 19)}$$

Nesse processo, é necessário achar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (*Cross Validation*), no qual o erro mínimo de previsão é determinado (SENA; TREVISAN; POPPI, 2005). Deve ser mencionada ainda, a diferenciação entre PLS1,

em que a regressão é feita para uma variável dependente de cada vez (a matriz \mathbf{Y} é um vetor coluna), e PLS2, onde todas as variáveis dependentes são calculadas simultaneamente (ROCHA et al., 2011).

A decomposição das Equações 14 e 16 pode ser feita por diversas formas, tais como pelos algoritmos *NIPALS* (*Nonlinear Interactive Partial Least Squares*) ou *SIMPLS* (*Straightforward Implementation of a Statistically Inspired Modification of the PLS*) (GELADI; KOWALSKI, 1986; de JONG, 1993). Geralmente, o algoritmo SIMPLS é utilizado em conjunto com o PLS. Desta forma, o método PLS é o mais empregado método para regressão multivariada, mostrando-se eficiente em conjuntos de dados onde há muitas variáveis e estas com alta correlação acrescida de ruído aleatório. O método tem sido empregado em diversas áreas de pesquisa e tecnológicas, como química analítica, ecologia, agricultura, ciência dos alimentos, medicina e industrial (RAVN; SKIBSTED; BRO, 2008).

O desempenho dos modelos construídos é avaliado pelos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE) dos resíduos, definido como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{(Equação 20)}$$

Onde: y_i é o valor de referência, \hat{y}_i é o valor previsto e n é o número de amostras. RMSE pode ser denominado erro quadrático médio de calibração (RMSEC), erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) e erro quadrático médio de previsão (RMSEP).

1.4.3 Resolução de Curvas Multivariadas

O MCR (Resolução de Curvas Multivariadas, do inglês, *Multivariate Curve Resolution*) pode ser definido como um modelo que tem como objetivo descrever a evolução de medidas experimentais de amostras multicomponentes através da contribuição de seus componentes puros. O principal objetivo da resolução de curvas é a determinação de informações qualitativas. Porém, um modelo ideal deve

ser capaz de fornecer informações qualitativas e quantitativas (TAULER; SMILDE; KOWALSKI, 1995; de JUAN; TAULER, 2006).

Diferente de outros métodos, o MCR não depende de uma curva de calibração, relacionando o espectro (X) com as concentrações (Y) dos componentes de interesse. No MCR apenas são fornecidos os espectros puros dos componentes da amostra e, com a imposição de algumas restrições, pode-se obter as concentrações dos constituintes cujos espectros puros forem fornecidos (de JUAN; TAULER, 2006).

Matematicamente o método MCR é baseado na Equação 21 (JAUMOT et al., 2005):

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad \text{(Equação 21)}$$

Onde, em medidas espectroscópicas, \mathbf{D} contém os espectros medidos das amostras, \mathbf{C} as concentrações e \mathbf{S}^T os espectros puros recuperados de cada constituinte, sendo estes baseados nos espectros puros previamente fornecidos na construção do modelo, o T sobrescrito significa a transposta da matriz \mathbf{S} . \mathbf{E} é a matriz de resíduos não explicados pelo modelo e, idealmente, deve ser próximo ao erro experimental (JAUMOT et al., 2005).

O MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*) resolve a Equação 21 utilizando o algoritmo de Quadrados Mínimos Alternados (ALS), calculando a concentração \mathbf{C} e recuperando os espectros puros \mathbf{S}^T , de forma a se ajustarem à matriz \mathbf{D} de dados experimentais da amostra. Durante a otimização por ALS algumas restrições podem ser impostas, como a não negatividade, unimodalidade e balanço de massa. A convergência é alcançada quando pelo menos dois ciclos de interação consecutivos não apresentam diferença significativa de desvio padrão dos resíduos entre os dados experimentais e os calculados pelo ALS (JAUMOT et al., 2005; de JUAN; TAULER, 2006).

As figuras de mérito do procedimento de otimização são porcentagem da falta de ajuste (LOF – *Lack of Fit* – Equação 22), porcentagem da variância explicada (R^2 - coeficiente de determinação entre os espectros puros e espectros recuperados – Equação 23) e o desvio padrão dos resíduos em relação aos dados experimentais (Equação 24) (JAUMOT et al., 2005).

$$LOF(\%) = 100 \sqrt{\frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad \text{(Equação 22)}$$

$$R^2 = \frac{\sum_{ij} d_{ij}^2 - \sum_{ij} e_{ij}^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2} \quad \text{(Equação 23)}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{ij} e_{ij}^2}{n_{linhas} - n_{colunas}}} \quad \text{(Equação 24)}$$

Onde d_{ij} são os elementos da matriz \mathbf{D} e e_{ij} são os resíduos da diferença entre os valores experimentais e os recuperados pelo MCR-ALS, n_{linhas} e $n_{colunas}$ número de linhas e colunas da matriz \mathbf{D} (JAUMOT et al., 2005).

O MCR-ALS permite a análise simultânea de várias amostras. A Equação 21 pode ser expandida permitindo que várias amostras sejam analisadas simultaneamente, como mostra a Equação 25 (JAUMOT et al., 2005):

$$\begin{bmatrix} D^1 \\ D^2 \\ \vdots \\ D^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C^1 \\ C^2 \\ \vdots \\ C^n \end{bmatrix} S^T + \begin{bmatrix} E^1 \\ E^2 \\ \vdots \\ E^n \end{bmatrix} \quad \text{(Equação 25)}$$

1.4.4 Análise de imagem

A imagem é obtida diretamente da superfície do comprimido (Figura 12.A), de forma que obtemos um arranjo de dados tridimensionais, onde x e y são as coordenadas espaciais e z os comprimentos de onda (λ). Logo, temos um espectro para cada pixel da amostra (Figura 12.B) (ROCHA et al., 2011).

O arranjo tridimensional de dados, de cada amostra, é desdobrado eliminando-se uma das dimensões espaciais, de modo a obtermos uma matriz $((yx) \times \lambda)$. A informação sobre a posição de cada pixel é mantida nas linhas da matriz (Figura 12.C) (ROCHA et al., 2011).

Com os dados desdobrados, obtém-se o espectro médio de cada matriz $((yx) \times \lambda)$. Cada espectro médio representa uma amostra na construção do modelo de

regressão. Assim os espectros médios de cada comprimido são usados para obter a matriz (**X**) que será relacionada com as concentrações conhecidas dos constituintes de interesse (**Y**), no caso do PLS (Figura 12.D) (ROCHA et al., 2011). Para o método MCR-ALS não é necessário obter o espectro médio de cada comprimido, de forma que $\mathbf{D} = ((yx) \times \lambda)$ (de JUAN; TAULER, 2006).

Uma representação esquemática da construção do mapa de distribuição é apresentado na Figura 13, as etapas de A a C são iguais às da construção do modelo. Na construção do mapa de distribuição da concentração, após aplicar o modelo PLS à amostra e prever as concentrações de um determinado constituinte por pixel (Figura 13.D), é realizado o rearranjo dos pixels, de modo a obtermos uma matriz ($y \times x \times C$), onde C é a concentração por pixel do constituinte de interesse. A partir dessa matriz é possível construir o mapa de distribuição das concentrações, formando uma imagem para o composto de interesse (Figura 13.E) (ROCHA et al., 2011). Para o MCR os mapas de distribuição da concentração podem ser construídos a partir do rearranjo dos pixels da matriz de concentração C (de JUAN; TAULER, 2006).

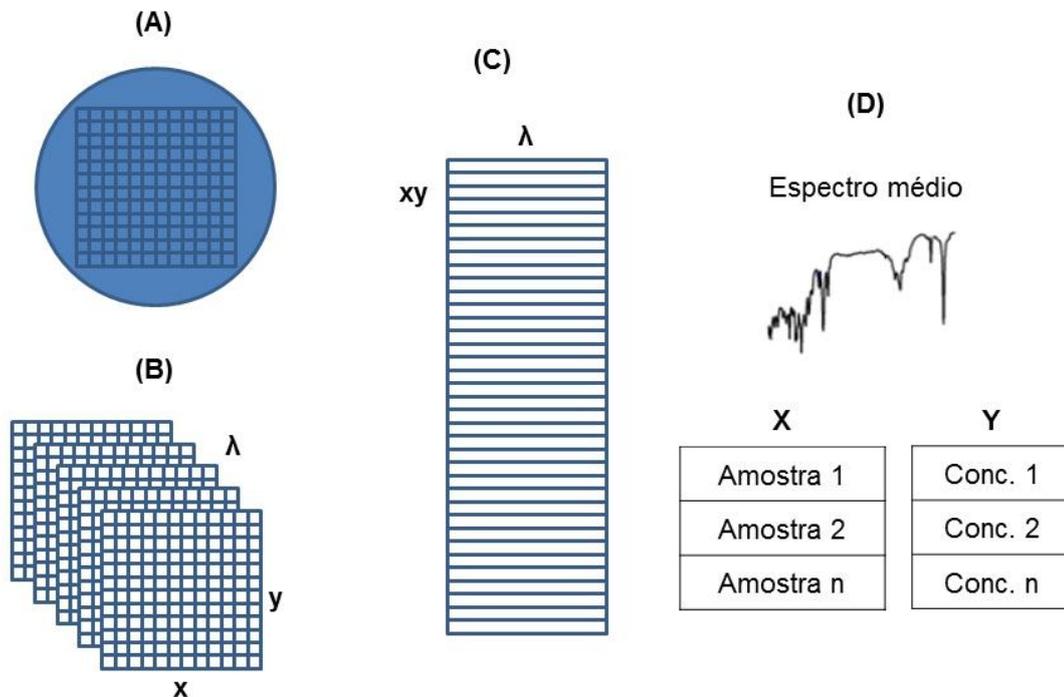


Figura 12 - Representação esquemática do desdobramento dos dados obtidos por espectroscopia de imagem.

Fonte: Adaptado de ROCHA et al., 2011, p.199.

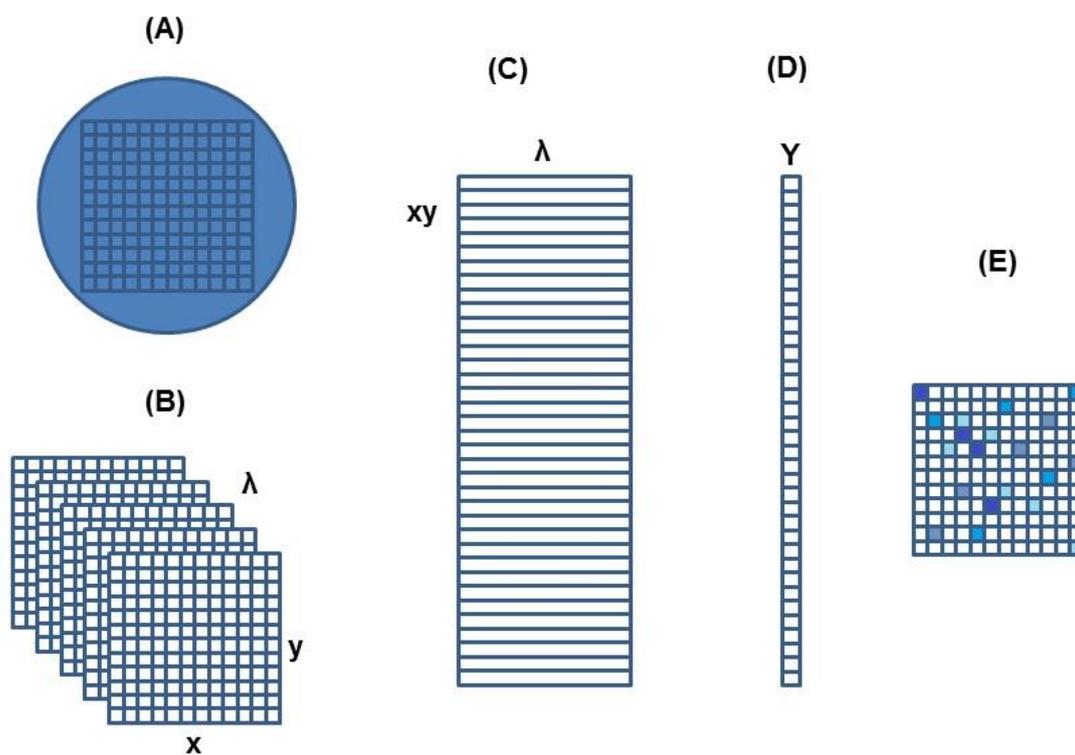


Figura 13 - Representação esquemática da construção de mapas de distribuição.

Fonte: Adaptado de ROCHA et al., 2011, p.199.

2 CRISTALIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE ESTABILIDADE POLIMÓRFICA

As diferentes formas polimórficas exibem diferentes estabilidades termodinâmicas, assim um polimorfo é mais estável que outro em determinadas condições. Quando em condições inadequadas, um polimorfo pode se converter em outro, evoluindo para a forma mais estável, porém esse processo é lento (BLANCO et al., 2005).

Durante o processo de preparo, embalagem, estocagem e transporte de um medicamento pode ocorrer transformação parcial ou total de um polimorfo em outro (DATTA; GRANT, 2004). A temperatura e o nível de umidade são fatores críticos que podem favorecer a conversão de uma forma polimórfica em outra (BLANCO et al., 2005).

Os objetivos desta primeira etapa foram a obtenção da forma polimórfica II do fexofenadina.HCl, caracterizar a forma polimórfica do fexofenadina.HCl que nos foi fornecida e a forma obtida no laboratório, e avaliar a estabilidade do fexofenadina.HCl forma I (forma utilizada no preparo do medicamento) frente a determinada condição ambiental.

2.1 Materiais e métodos

Neste trabalho, o fármaco fexofenadina.HCl foi obtido por doação pela empresa grupo CIMED S/A, Pouso Alegre, MG (Ind - Swift). Antes de iniciar o estudo, foi obtido o difratograma de raios X de pó do fármaco, seguido da comparação do resultado obtido com a literatura (HENTON et al., 1995).

A forma polimórfica II foi preparada a partir da forma polimórfica I e também caracterizada por PXRD. A forma II foi obtida pela cristalização, através da lenta evaporação de uma solução saturada de fexofenadina.HCl em etanol e água deionizada em sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Brasil), a qual foi aquecida à 70°C até completa solubilização e a seguir deixada em repouso à temperatura

ambiente (25°C) por uma semana, seguida de filtração e secagem em estufa a 50°C overnight (HENTON et al., 1995).

As formas polimórficas I e II foram caracterizadas no difratômetro de raios X Ultima IV – Rigaku com fonte de Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), de 5 a 55 °2 θ utilizando uma voltagem de 40 Kv, corrente de 30 mA, velocidade de varredura de 1 °2 $\theta \text{ min}^{-1}$ e fenda de 10 mm.

A caracterização por análise termogravimétrica (TG), para verificar a presença ou ausência de água, assim como o grau de hidratação, foi realizada em equipamento modelo SDT Q600, marca TA Instruments Inc, na faixa de temperatura de 25 a 600 °C com rampa de 5 °C min^{-1} e vazão de N₂ de 50 mL min^{-1} , utilizando 5 mg de amostra.

A análise quantitativa de formas polimórficas em formulações farmacêuticas utilizando técnicas espectroscópicas requer que o espectro de cada forma polimórfica seja diferente (PATEL; LUNER; KEMPER, 2000). Além disso, a espectroscopia Raman requer que a molécula em estudo possua momento de dipolo induzido (LARKIN, 2011). Por isso, inicialmente, obteve-se os espectros Raman das formas I e II para avaliar a possibilidade de utilizar esta técnica nos estudos propostos. Os espectros Raman foram obtidos em equipamento modelo *RamanStation* 400F, marca PerkinElmer equipado com laser de diodo de 785nm e um acessório para sólidos na faixa de 2000 a 200 cm^{-1} , usando 4 *coadd scans* e resolução 1 cm^{-1} .

Diferentemente da espectroscopia Raman, a espectroscopia na região do infravermelho requer que a molécula possua momento de dipolo diferente de zero. Também foram obtidos os espectros NIR das formas I e II para avaliar a possibilidade de utilizar esta técnica nos estudos propostos. Os espectros foram obtidos em um Espectrômetro SPECTRUM 100N FT-NIR acoplado com sistema de imagem Spotlight 400N FT-NIR da PerkinElmer. Cada espectro foi obtido com 2 varreduras na região de 7800 a 4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 32 cm^{-1} .

A morfologia das formas polimórficas I e II foram verificadas por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), utilizando o MEV JEOL/JSM T-300 com o acessório BEI e voltagem de aceleração eletrônica de 5 kV. A amostra revestida de ouro foi colocada em base metálica utilizando fita adesiva dupla-face.

Os estudos de estabilidade devem ser conduzidos sob as condições recomendadas pela Internacional Conference on Harmonization (ICH) de acordo

com as zonas climáticas. O fexofenadina.HCl forma I foi mantido em estufa a $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $75 \pm 1\%$ U.R. (Umidade Relativa) por uma semana e, então, analisado por PXRD (ICH, 2003; JÚLIO et al., 2012).

2.2 Resultados e discussão

A Figura 14 mostra os difratogramas das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl. Picos em $5,96$; $14,12$ e $15,00^\circ 2\theta$ são específicos da forma I e em $11,26$; $13,32$ e $13,72^\circ 2\theta$ são específicos da forma II. Os difratogramas das formas I e II obtidos nesse trabalho são semelhantes aos publicados na literatura (HENTON et al., 1995).

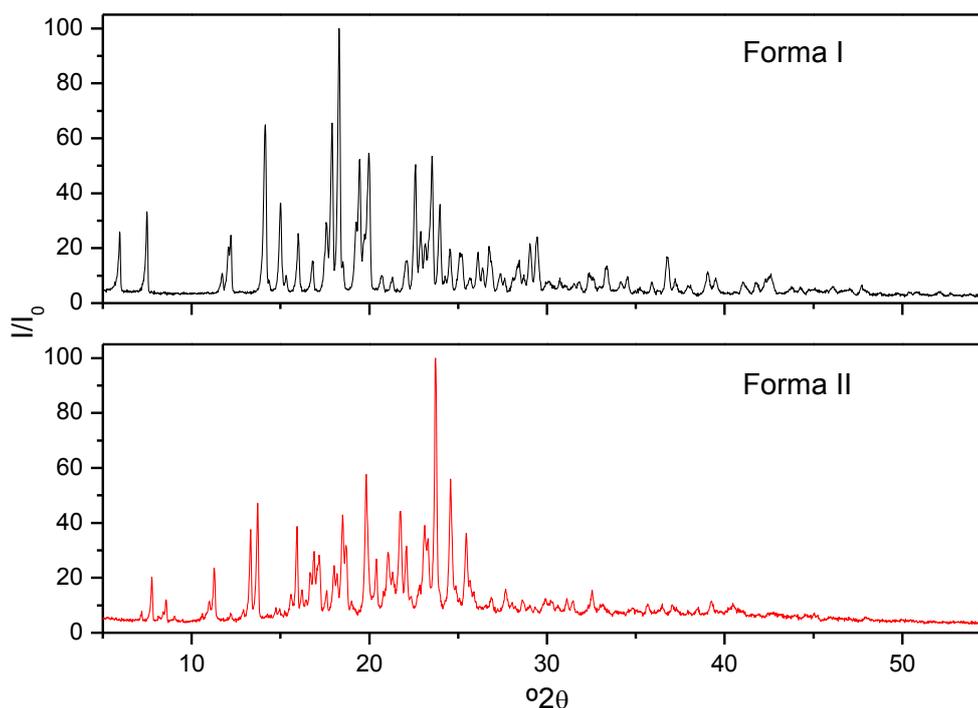


Figura 14 - Difratograma de raios X de pó das formas polimórficas do fexofenadina.HCl. K α Cu ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$).

Fonte: Do autor.

Sabendo-se que a forma polimórfica I é anidra e a II hidratada fez-se a caracterização por TG. No termograma do polimorfo I (Figura 15.a) verificamos que

não há perda de massa na faixa de temperatura referente à desidratação, confirmando que esta é a forma anidra, enquanto no termograma do polimorfo II (Figura 15.b) verificamos que há perda de massa de aproximadamente 6,6% (m/m), indicando que esta é um dihidrato.

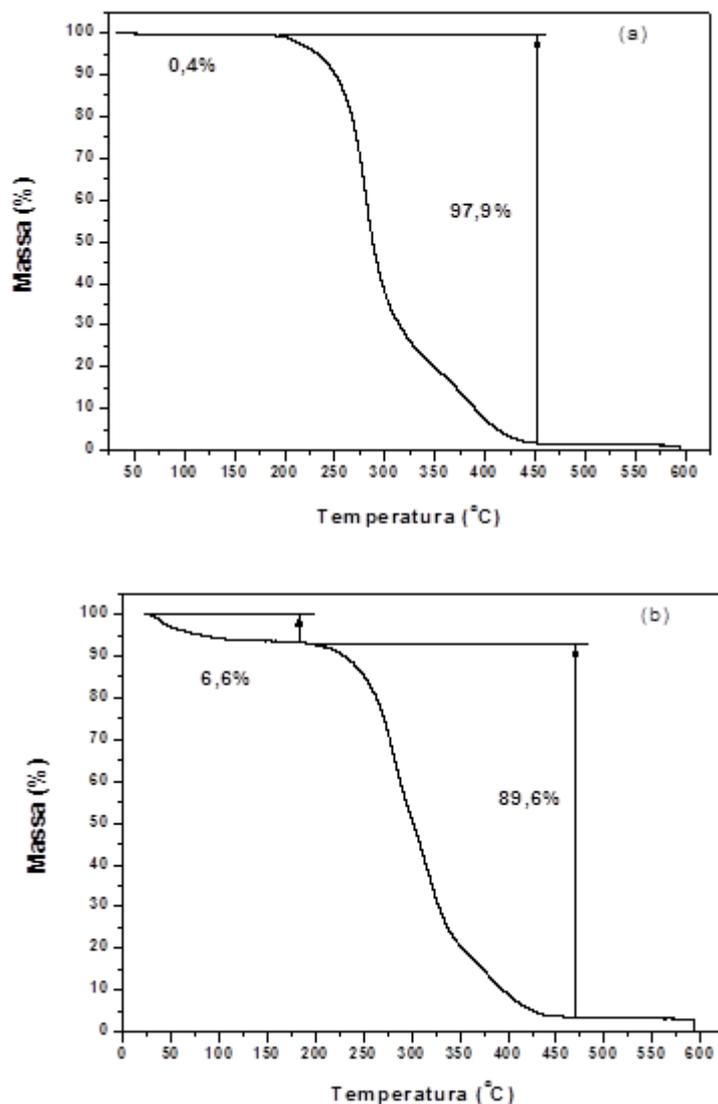


Figura 15 - Termograma dos polimorfos do fexofenadina.HCl:
(a) Forma I
(b) Forma II.

Fonte: Do autor.

No espectro Raman (Figura 16), as bandas 257, 474 e 778 cm^{-1} podem ser usadas para identificar a forma I, enquanto as bandas 270, 436 e 789 cm^{-1} para identificar a forma II. Podem-se observar diferenças espectrais entre as formas

cristalinas em outras regiões, sendo então possível utilizar a espectroscopia Raman no estudo proposto.

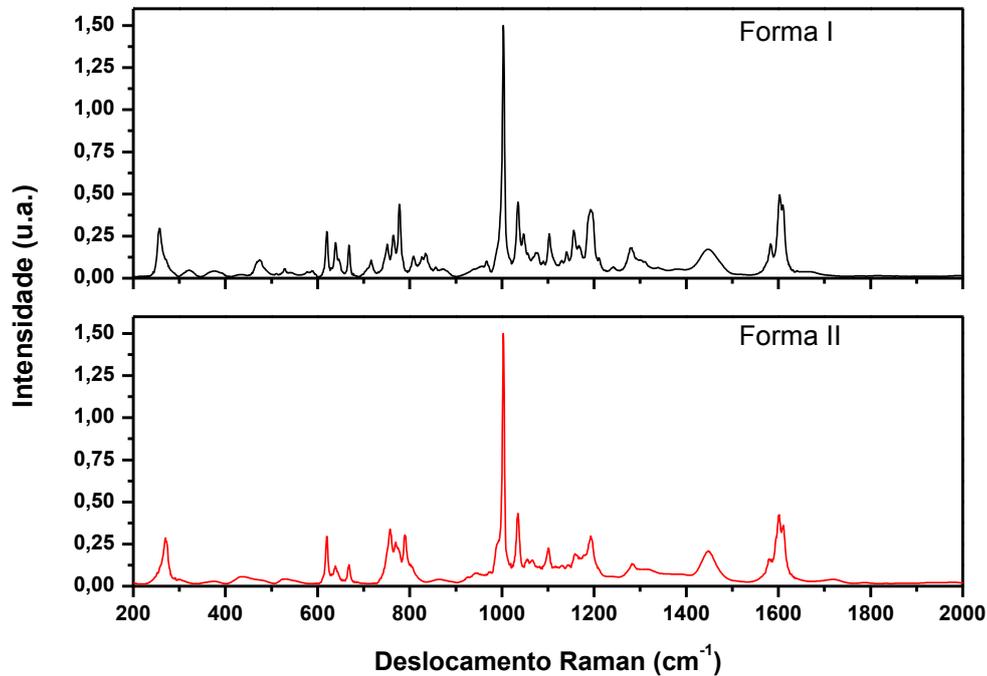


Figura 16 - Espectros Raman das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl.

Fonte: Do autor.

No espectro NIR (Figura 17) observa-se a presença de bandas no espectro do fexofenadina.HCl forma II que não estão presentes no espectro do fexofenadina.HCl forma I. As bandas em 7000 e em 5150 cm^{-1} no espectro NIR da forma II indicam a presença das moléculas de água na estrutura da forma II. Sendo que a banda em 7000 cm^{-1} ocorre devido ao estiramento OH e, em 5150 cm^{-1} , devido à combinação do estiramento OH com a deformação angulas de OH, característica de H_2O .

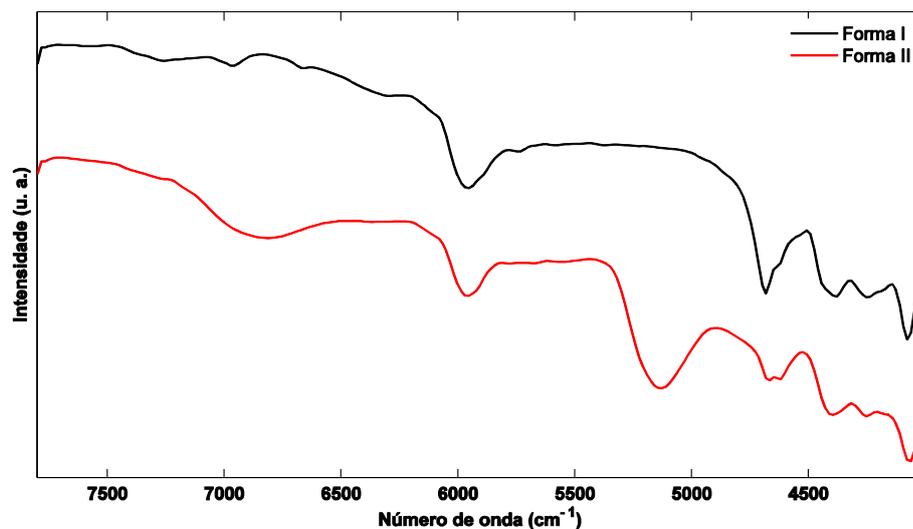


Figura 17 - Espectros NIR das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl.

Fonte: Do autor.

As diferenças morfológicas das formas I e II do fexofenadina.HCl podem ser verificadas na Figura 18. A forma I (Figura 18.A) possui o hábito de prisma, enquanto a forma II (Figura 18.B) possui o hábito de agulha.

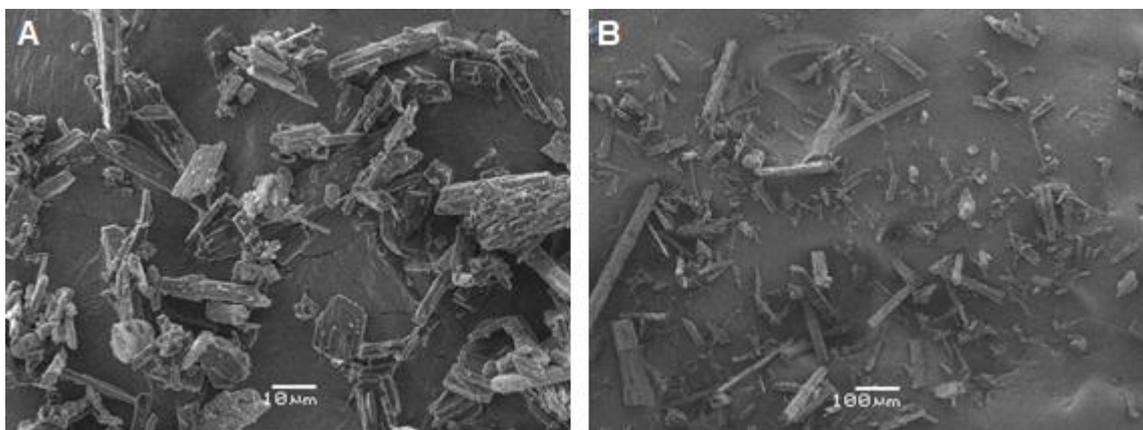


Figura 18 – MEV da (A) forma I e (B) forma II do fexofenadina.HCl.

Fonte: Do autor.

Comparando o difratograma do fexofenadina.HCl forma I antes e após permanecer uma semana em estufa a $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e $75 \pm 1\%$ U.R. e da forma II (Figura 19), pode-se observar que após uma semana em estufa o difratograma apresentou deslocamento de alguns picos, indicando a presença de mais de uma fase cristalina, provavelmente uma mistura das formas I e II, além da alteração da linha base e intensa sobreposição de picos, indicando a provável presença de fase

amorfa. Essa alteração no difratograma indica a instabilidade do fexofenadina.HCl forma I.

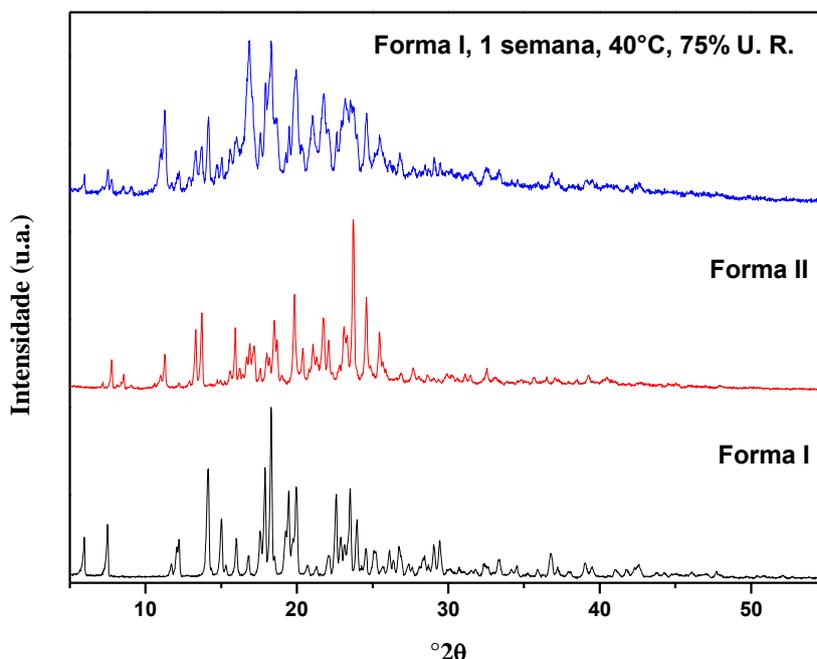


Figura 19 - Difratograma do fexofenadina.HCl formas I e II e da forma I após uma semana em estufa a $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 1\%$ U.R.

Fonte: Do autor.

2.3 Conclusão

De acordo com os padrões de raios X obtidos, em comparação com dados já apresentados na literatura, podemos afirmar que o fexofenadina.HCl cedido pela CIMED se encontra na forma polimórfica I, e a cristalizada se trata da forma polimórfica II. Isto foi confirmado pela TG, pela qual foi confirmado a forma I ser anidra e a forma II dihidratada.

Os espectros Raman, NIR e os padrões de difração de raios X das formas polimórficas em estudo apresentaram diferenças entre si, o que torna possível a utilização destas técnicas na quantificação dessas fases polimórficas.

A instabilidade do fexofenadina.HCl forma I em ar úmido justifica a relevância do presente trabalho.

3 APLICAÇÃO 1: ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE FEXOFENADINA.HCL EM MISTURAS DE MATÉRIA-PRIMA

O polimorfismo de substâncias é motivo de preocupação na indústria farmacêutica devido às diferentes propriedades físico-químicas que as formas polimórficas apresentam, podendo ocasionar alterações na sua eficácia terapêutica (SILVA; IHA, 2010). Deve-se ter cuidado com as condições termodinâmicas as quais o fármaco é exposto para evitar transformações polimórficas durante os processos de produção, embalagem, estocagem e transporte (DATTA; GRANT, 2004).

A técnica mais difundida na caracterização de polimorfos é a difratometria de raios X, por fornecer informações sobre o empacotamento cristalino. No entanto, a quantificação é muitas vezes prejudicada pelo efeito da orientação preferencial e pela dificuldade em se separar os picos de difração de um único componente (LI; CHOW; TAN, 2011). A quantificação por PXRD pode ser realizada pelo método de Rietveld, uma metodologia que necessita de computador e software adequados, além de informações cristalográficas bem definidas das fases polimórficas em questão (WILL, 2006).

Devido ao crescente interesse da indústria farmacêutica no estudo de polimorfismo, pesquisadores têm buscado desenvolver metodologias cada vez mais simples, rápidas, precisas e exatas, e de baixo custo. Com isso, as técnicas espectroscópicas têm ganhado espaço na indústria farmacêutica, principalmente por apresentarem maior portabilidade, rapidez na aquisição de dados, além de possuírem a possibilidade de realizar o monitoramento *on-line*, menor custo e maior facilidade de operação.

Vários autores já relataram a quantificação de polimorfos em misturas binárias e ternárias contendo os polimorfos de determinado fármaco utilizando técnicas espectroscópicas, tais como Espectroscopia Raman (KACHRIMANIS; BRAUN; GRIESSER, 2007; CHIENG et al., 2009; HU et al., 2010), NIR (BLANCO et al., 2006; HU et al., 2010) e Refletância Total Atenuada no Infravermelho (HU et al., 2010), aliadas à análise multivariada com sucesso. Porém, a quantificação de polimorfos utilizando a difratometria de raios X aliada à análise multivariada é recente, havendo poucos relatos (TIAN et al., 2007; CHIENG et al., 2009; NÉMET et al., 2009; ZIÉMONS et al., 2011). Chieng et al. (2009) obtiveram sucesso ao quantificar

cloridrato de ranitidina, Német et al. (2009), famotidina, Ziémons et al.(2011), fluconazol, e Tian et al. (2007), carbamazepina, entre outros, utilizando a PXRD aliada à análise multivariada.

O principal objetivo desta primeira aplicação é comparar as técnicas espectroscopia Raman e PXRD, aliadas à análise multivariada por PLS2 para a quantificação das formas polimórficas I e II de fexofenadina.HCl em matéria-prima. Outro objetivo da aplicação em questão foi comparar as análises univariadas e multivariada, e comparar os diferentes métodos de pré-processamento utilizados entre si. Outro objetivo foi a quantificação da Forma II por TG, através da porcentagem de perda de massa relativa à desidratação.

3.1 Materiais e métodos

Neste trabalho, foi usado o mesmo princípio ativo (fexofenadina.HCl) cedido pela empresa CIMED, que corresponde à forma polimórfica I, e a forma polimórfica II obtida por cristalização por lenta evaporação do solvente, para as quais já foram descritas as caracterizações no tópico 2. Dez amostras contendo o fármaco nas diferentes formas polimórficas I e II foram preparadas em um intervalo de 5 a 95% de cada forma polimórfica, todas com massa total de 60 mg. Destas dez amostras preparadas, sete são de calibração e três de validação. As concentrações de cada forma polimórfica estão indicadas na Tabela 1.

Todas as amostras foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AY220) e homogeneizadas em vortex durante 5 minutos. Os espectros Raman das amostras, na forma de pó, foram obtidos em equipamento modelo *RamanStation* 400F da PerkinElmer equipado com laser de diodo de 785 nm e um acessório para sólidos na faixa de 2000 a 200 cm^{-1} , usando 4 *coadd scans* e resolução 1 cm^{-1} , em triplicata. Os padrões de difração de raios X foram obtidos no difratômetro de raios X modelo Ultima IV, marca Rigaku com fonte de Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), de 5 a 55 $^{\circ}2\theta$ utilizando uma voltagem de 40 Kv, corrente de 30 mA, velocidade de varredura de 1 $^{\circ}2\theta \text{ min}^{-1}$ e fenda de 10 mm, em triplicata. As curvas TG para quantificação da Forma II foi realizada em equipamento SII EXSTAR TG/DTA 7300, na faixa de temperatura de

30 a 150 °C, com rampa de 5 °C min⁻¹ e vazão de N₂ de 100 mL min⁻¹, utilizando aproximadamente 7 mg de amostra.

Tabela 1 - Composição das amostras de calibração

Amostra	Forma I % (m/m)	Forma II % (m/m)
A 1	95,14	4,86
A 2	90,28	9,72
A 3	85,02	14,98
A 4	80,13	19,87
A 5	69,68	30,32
A 6	60,00	40,00
A 7	45,00	55,00
A 8	35,00	65,00
A 9	19,53	80,47
A 10	4,97	95,03

A análise multivariada dos dados foi realizada no software Matlab (versão 7.0, The MathWorks) utilizando o PLS toolbox 5.8 (Eigenvector Co.). Na construção dos modelos de calibração PLS2 foram utilizados todos os pontos do difratograma de raios X de pó (5 a 55 °2θ) e a região de 2000 a 200 cm⁻¹ do espectro Raman. Tanto os difratogramas quanto os espectros foram submetidos a diferentes métodos de pré-processamento. Os pré-processamentos empregados nos dados obtidos por espectroscopia Raman foram: 1) normalização; 2) normalização e MSC (*Multiplicative Signal Correction*); 3) normalização e SNV (*Standard Normal Variate*); 4) normalização e 2ª derivada; 5) normalização, 2ª derivada e MSC; e 6) normalização, 2ª derivada e SNV. Os pré-processamento empregados nos difratogramas de raios X por pó foram: 1) MSC; 2) SNV; 3) normalização; 4) normalização e 2ª derivada e 5) sem pré-processamento. Todos combinados a três métodos de dimensionamento (autoescalamento, centrado na média e sem dimensionamento).

O número de variáveis latentes (LVs) foi determinado pela validação cruzada “*leave-one-out*”. O desempenho dos modelos obtidos pelas diferentes metodologias de pré-processamento foi avaliado pelos valores do coeficiente de determinação (R²) e do erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV) e do erro quadrático médio de previsão (RMSEP) (KACHRIMANIS; BRAUN; GRIESSER, 2007).

3.2 Resultados e discussão

Primeiramente, construiu-se os modelos univariados utilizando a altura dos picos e das bandas seletivas do PXRD e do espectro Raman, com a finalidade de realizar uma comparação com os modelos multivariados. Os resultados dos modelos de regressão univariada para quantificação das formas polimórficas I e II por espectroscopia Raman estão apresentados na Tabela 2. A Figura 20 apresenta as regressões univariadas por espectroscopia Raman.

Tabela 2 - Desempenho dos modelos de regressão univariada por Raman

	cm ⁻¹	RMSEP (% m/m)	R ²	Equação
Forma I	257	5,3513	0,9685	$y = 0,0015x + 0,0672$
	474	37,6239	0,3768	$y = 0,0003x + 0,0393$
	778	8,3032	0,9261	$y = 0,0026x + 0,0627$
Forma II	270	14,4407	0,8126	$y = 0,0013x + 0,0701$
	436	27,8564	0,5199	$y = 0,0012x + 0,0083$
	789	10,1246	0,9023	$y = 0,0013x + 0,0337$

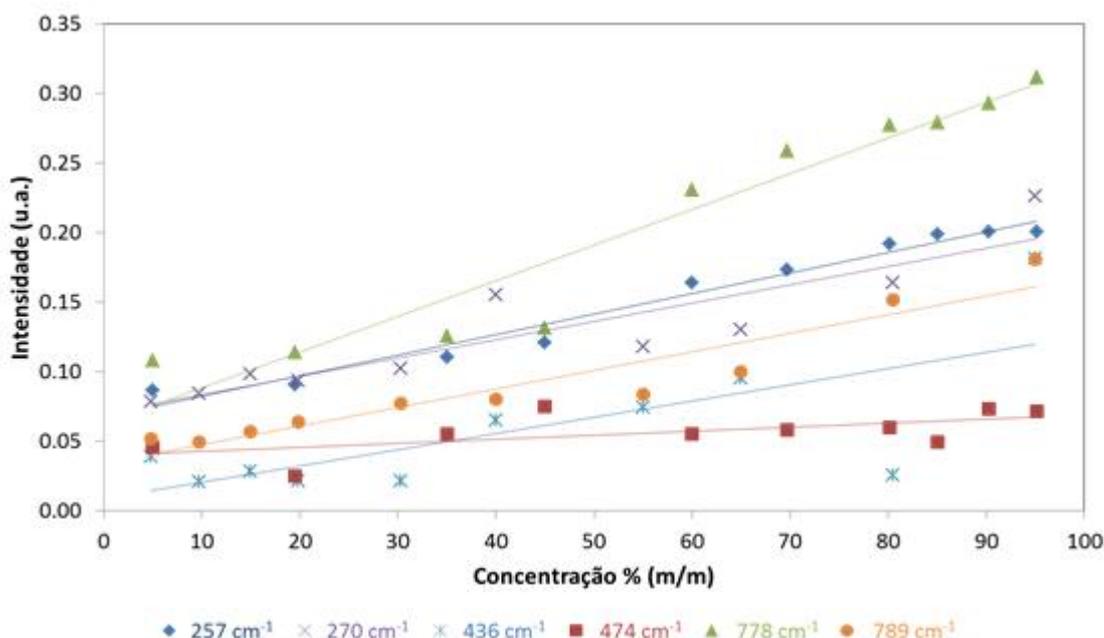


Figura 20 - Regressões univariadas por Raman.

Fonte: Do autor.

Os resultados dos modelos de regressão univariada para quantificação das formas polimórficas I e II por PXRD estão apresentados na Tabela 3. A Figura 21 apresenta as regressões univariadas por PXRD.

Tabela 3 - Desempenho dos modelos de regressão univariada por PXRD

	$^{\circ}2\theta$	RMSEP (% m/m)	R^2	Equação
Forma I	5,96	5,7269	0,9624	$y = 22,429x + 42,436$
	14,12	1,7998	0,9963	$y = 52,326x + 634,74$
	15	3,3506	0,9874	$y = 29,914x + 467,82$
Forma II	11,26	31,6898	0,9288	$y = 16,807x + 74,236$
	13,32	51,9296	0,9271	$y = 28,753x + 340,43$
	13,72	5,4646	0,9671	$y = 38,121x + 803,51$

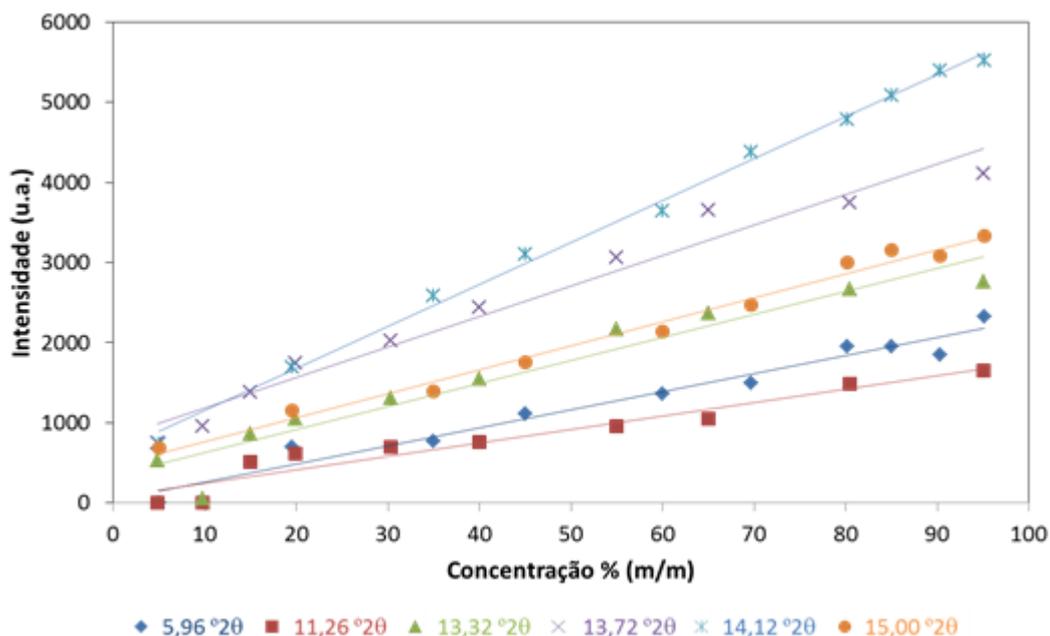


Figura 21 - Regressões univariadas por PXRD.

Fonte: Do autor.

Os resultados dos modelos de regressão PLS2 construídos com os dados obtidos por espectroscopia Raman estão apresentados na Tabela 4. A qualidade e desempenho dos modelos de acordo com o R^2 são relativamente boas, com valores maiores que 0,9775. De acordo com a Tabela 4 o melhor modelo de regressão foi construído utilizando pré-processamento normalização e SNV, com os espectros centrados na média, para ambas as formas, o qual apresentou maiores valores de

R^2 e menores RMSEP. Os mesmos valores de R^2 e RMSE foram obtidos para os modelos de quantificação da forma I e para os modelos da forma II. O modelo PLS2 foi construído usando 2 variáveis latentes para ambos os polimorfos. Esse número foi escolhido por ter apresentado o menor valor de RMSECV e explicar 95,0% da variância de **X** e 97,3% de **Y**. O RMSEP foi de 3,4%, para ambas as formas. Pode-se observar que há uma melhora significativa no desempenho dos modelos PLS2 quando se aplica os métodos de pré-processamento e dimensionamento, comparado a quando estes não são aplicados.

Quando comparados os modelos de regressão univariada com os modelos de regressão PLS2, pode-se observar que o PLS2 apresenta melhor R^2 e menor RMSEP, indicando um ganho no ajuste dos dados, e na exatidão da metodologia. As calibrações de ordem zero, que possuem apenas uma medida instrumental por amostra, não são livres de interferência, podendo haver desvios entre a intensidade do sinal com a concentração da forma polimórfica em questão. Em calibrações de primeira ordem, temos um vetor de dados para cada amostra, dessa forma podem-se modelar os interferentes juntamente com a forma polimórfica de interesse, diminuindo assim os desvios entre as medidas instrumentais e a concentração da forma polimórfica.

Tabela 4 - Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por Raman para as formas I e II do fexofenadina.HCl

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV Forma I/ Forma II	RMSEP Forma I/ Forma II	R^2 CV Forma I/ Forma II	R^2 P Forma I/ Forma II
Nenhum	Auto	3	17,1402/ 17,1402	37,9012/ 37,9012	0,7094/ 0,7094	0,0308/ 0,0308
Nenhum	CM	3	16,0693/ 16,0693	37,4692/ 37,4692	0,7424/ 0,7424	0,0303/ 0,0303
Nenhum	Nenhum	2	56,5587/ 24,3997	47,6680/ 48,2750	0,0001/0,5 994	0,0361/ 0,0353
Normalização	Auto	3	6,0577/ 6,0577	5,7401/ 5,7401	0,9627/ 0,9627	0,9807/ 0,9807
Normalização	CM	3	5,6487/ 5,6487	5,3527/ 5,3527	0,9674/ 0,9674	0,9815/ 0,9815
Normalização	Nenhum	3	7,0691/ 5,4381	4,6882/ 5,4037	0,9483/ 0,9701	0,9845/ 0,9781
Normalização e MSC	Auto	3	7,1531/ 7,1531	4,9898/ 4,9898	0,9478/ 0,9478	0,9773/ 0,9773
Normalização e MSC	CM	2	5,8764/ 5,8764	4,0423/ 4,0423	0,9644/ 0,9644	0,9812/ 0,9812

Tabela 4 - Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por Raman para as formas I e II do fexofenadina.HCI

(continuação)

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV	RMSEP	R ² CV	R ² P
			Forma I/ Forma II	Forma I/ Forma II	Forma I/ Forma II	Forma I/ Forma II
Normalização e MSC	Nenhum	3	5,8766/	4,0428/	0,9733/	0,9644/
			5,8763	4,0419	0,9733	0,9644
Normalização e SNV	Auto	3	7,2170/	4,1090/	0,9469/	0,9785/
			7,2170	4,1090	0,9469	0,9785
Normalização e SNV	CM	2	5,9480/	3,4293/	0,9785/	0,9839/
			5,9480	3,4293	0,9785	0,9839
Normalização e SNV	Nenhum	3	6,2694/	4,2001/	0,9595/	0,9789/
			5,8844	3,4356	0,9643	0,9848
Normalização e 2 ^a derivada	Auto	3	7,0215/	6,2515/	0,9591/	0,9932/
			7,0215	6,2515	0,9591	0,9932
Normalização e 2 ^a derivada	CM	2	5,8906/	4,0515/	0,9640/	0,9897/
			5,8906	4,0515	0,9640	0,9897
Normalização e 2 ^a derivada	Nenhum	3	6,5207/	4,3627/	0,9559/	0,9897/
			5,7864	4,3298	0,9653	0,9879
Normalização, 2 ^a derivada e MSC	Auto	3	6,6266/	6,1564/	0,9586/	0,9811/
			6,6266	6,1564	0,9586	0,9811
Normalização, 2 ^a derivada e MSC	CM	2	5,4909/	3,9915/	0,9687/	0,9876/
			5,4909	3,9915	0,9687	0,9876
Normalização, 2 ^a derivada e MSC	Nenhum	3	5,4902/	3,9918/	0,9687/	0,9876/
			5,4912	3,9915	0,9687	0,9876
Normalização, 2 ^a derivada e SNV	Auto	3	6,5199/	6,0942/	0,9604/	0,9817/
			6,5199	6,0942	0,9604	0,9817
Normalização, 2 ^a derivada e SNV	CM	2	5,3247/	4,1831/	0,9706/	0,9870/
			5,3247	4,1831	0,9706	0,9870
Normalização, 2 ^a derivada e SNV	Nenhum	3	5,4873/	4,2247/	0,9688/	0,9869/
			5,1534	4,2688	0,9725	0,9868

*Auto: autoescalamento; CM: centrado na média; LV: Variáveis latentes, CV: Validação cruzada, P: Previsão.

Os resultados dos modelos de regressão construídos com os dados obtidos por PXRD estão apresentados na Tabela 5. A qualidade e desempenho dos modelos de acordo com o R² foram relativamente satisfatórios, com valores maiores que 0,8996. Os mesmos valores de R² e RMSE foram obtidos para os modelos de quantificação da forma I e para os modelos da forma II. O melhor modelo de regressão foi construído utilizando nenhum método de pré-processamento com os dados centrados na média, para ambas as formas, por apresentar maior R² e menores RMSEP e RMSECV. O modelo PLS2 foi construído usando 3 variáveis latentes para ambos os polimorfos e explica 96,2% da variância de **X** e 99,9% de **Y**. O RMSEP foi de 1,4%.

Tabela 5 - Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV Forma I/ Forma II	RMSEP Forma I/ Forma II	R ² CV Forma I/ Forma II	R ² P Forma I/ Forma II
MSC	Auto	4	4,2179/ 4,2179	1,9437/ 1,9437	0,9848/ 0,9848	0,9950/ 0,9950
MSC	CM	4	2,0628/ 2,0628	2,9144/ 2,9144	0,9959/ 0,9959	0,9905/ 0,9905
MSC	Nenhum	2	2,9313/ 2,9329	2,9565/ 2,9603	0,9911/ 0,9911	0,9974/ 0,9974
SNV	Auto	3	1,6437/ 1,6437	2,7742/ 2,7742	0,9972/ 0,9972	0,9995/ 0,9995
SNV	CM	3	1,8061/ 1,8061	1,5846/ 1,5846	0,9966/ 0,9966	0,9963/ 0,9963
SNV	Nenhum	2	4,3745/ 5,0799	3,9395/ 1,9080	0,9805/ 0,9736	0,9902/ 0,9946
Nenhum	Auto	2	2,0639/ 2,0639	3,1874/ 3,1874	0,9958/ 0,9958	0,9991/ 0,9991
Nenhum	CM	3	1,8084/ 1,8084	1,4493/ 1,4493	0,9967/ 0,9967	0,9973/ 0,9973
Nenhum	Nenhum	2	3,0412/ 4,9329	3,6007/ 2,9637	0,9904/ 0,9915	0,9881/ 0,9942
Normalização	Auto	2	3,8730/ 3,8730	3,3838/ 3,3838	0,9845/ 0,9845	0,9962/ 0,9962
Normalização	CM	2	2,8877/ 2,8877	2,6894/ 2,6894	0,9914/ 0,9914	0,9978/ 0,9978
Normalização	Nenhum	2	10,8045/ 7,0448	7,2331/ 2,9332	0,8928/ 0,9508	0,9551/ 0,9899
Normalização e 2 ^a derivada	Auto	2	3,6258/ 3,6258	2,8738/ 2,8738	0,9886/ 0,9886	0,9895/ 0,9895
Normalização e 2 ^a derivada	CM	2	3,5061/ 3,5061	2,1440/ 2,1440	0,9875/ 0,9875	0,9972/ 0,9972
Normalização e 2 ^a derivada	Nenhum	2	10,8797/ 8,2005	8,0251/ 5,1973	0,8927/ 0,9338	0,9259/ 0,9699

*Auto: autoescalamento; CM: centrado na média; LV: Variáveis latentes, CV: Validação cruzada, P: Previsão.

As Figuras 22, 23 mostram as curvas dos valores previstos pelos valores de referência e os erros relativos calculados pelos dados obtidos por espectroscopia Raman e PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl utilizando o melhor modelo PLS obtido para cada metodologia. Pode-se observar que há uma boa relação linear entre os valores previstos e os valores medidos para ambas as formas polimórficas. Visto que os valores de RMSE são inferiores a 5%, pode-se afirmar que

a quantificação das formas polimórficas na matéria-prima é eficaz (ROCHA et al., 2011). Ambos os métodos analíticos utilizados, espectroscopia Raman e PXRD, combinados com os modelos de regressão PLS construídos se mostraram eficientes em quantificar as formas polimórficas nas misturas binárias.

Em relação aos erros percentuais (resíduos) dos ajustes, para ambas as formas polimórficas mostradas nas Figuras 22.b, 23.b, esses apresentam uma distribuição aleatória, o que indica ajustes adequados.

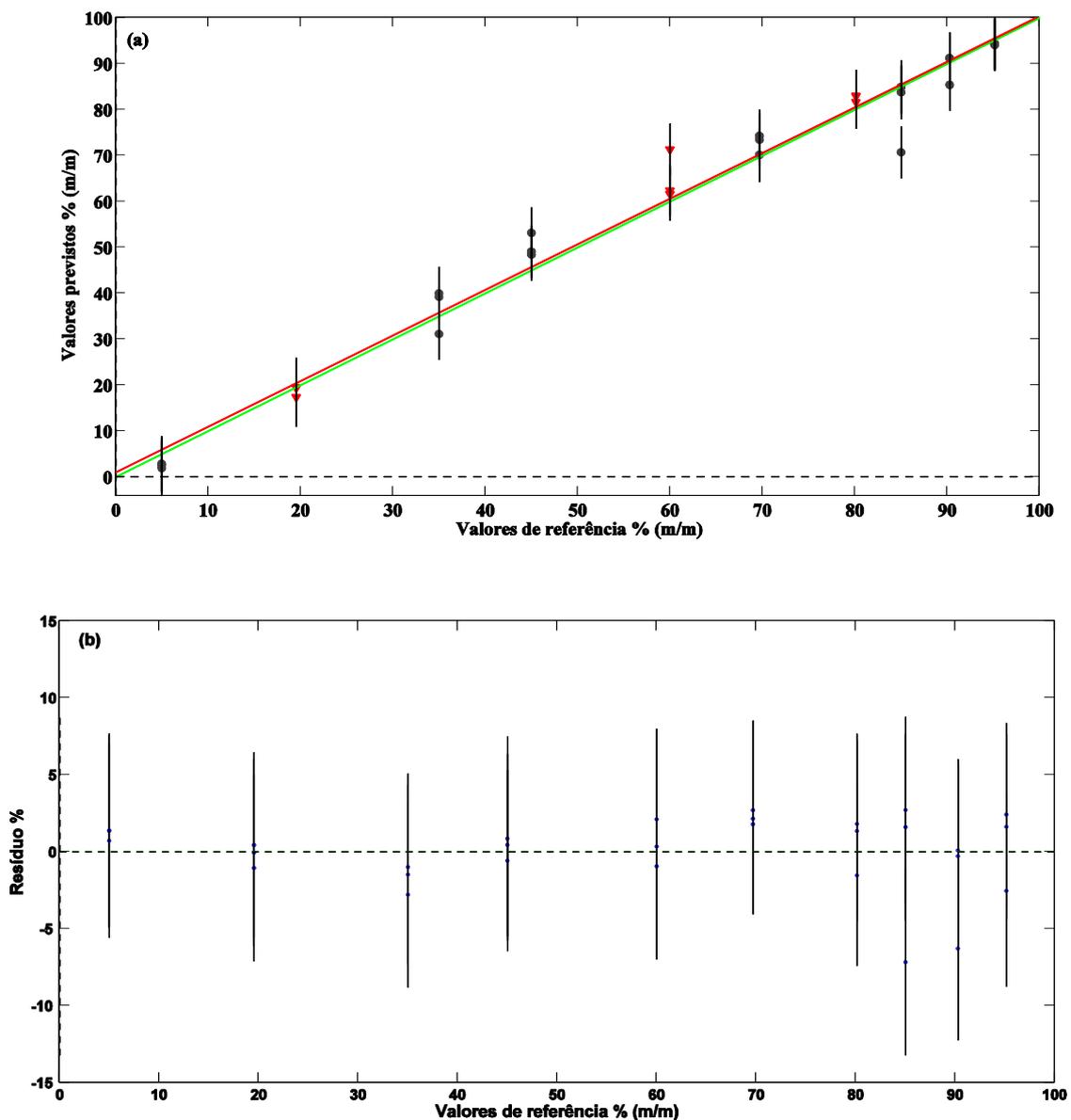


Figura 22 - (a) Modelos de regressão PLS e (b) distribuição residual para a Forma I por Raman. Amostras de calibração (●) e validação (▼).

Fonte: Do autor.

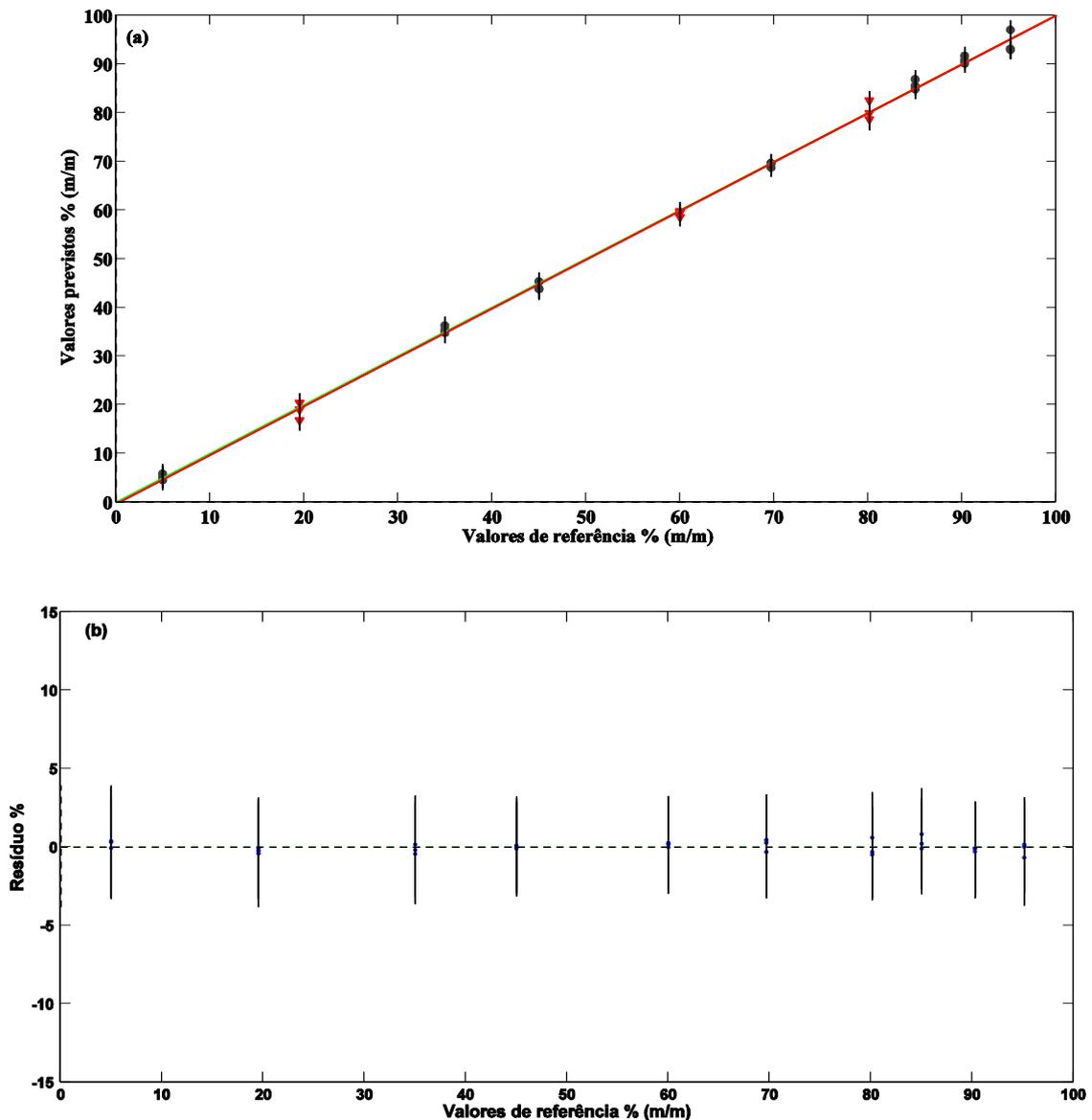


Figura 23 - (a) Modelos de regressão PLS e (b) distribuição residual para a Forma I por PXRD. Amostras de calibração (●) e validação (▼).

Fonte: Do autor.

PXRD apresentou valores de RMSECV e RMSEP inferiores aos da espectroscopia Raman, tendo melhor exatidão. A homogeneidade da amostra é mais crucial para a espectroscopia Raman do que para a PXRD. Segundo Chieng et al. (2009), outros autores já relataram que a homogeneidade da amostra é uma das principais fontes de erro em estudos envolvendo espectroscopia Raman, pois o laser possui uma pequena área amostral ($50 \mu\text{m}^2$). Por outro lado, a homogeneidade da amostra não é relevante nas análises por PXRD. Deve-se atentar que metodologias

de homogeneização muito enérgicas podem causar alterações no estado físico da amostra, inclusive transformações polimórficas.

A PXRD fornece informações sobre o empacotamento cristalino, sendo uma das principais técnicas utilizadas no estudo de polimorfismo. No entanto, a espectroscopia Raman apresenta maior portabilidade, possui a possibilidade de realizar o monitoramento *on-line* e menores custos (CHIENG et al., 2009). Outra vantagem a ser destacada é o tempo de aquisição dos dados, pois cada espectro Raman foi obtido em 4 segundos (4 *coadd scans* x 1 segundo), enquanto a PXRD leva 50 min por aquisição.

A técnica TG é tradicionalmente uma técnica de caracterização, sendo que a quantificação não é considerada trivial. Foi considerada, para a construção da curva de calibração, a perda de massa até a temperatura de 140 °C. Os resultados da quantificação da Forma II estão apresentados na Tabela 6. A quantificação da Forma I é complementar à da Forma II, uma vez que esta não apresenta perda de massa na região da curva TG considerada, mas essa complementariedade só pode ser considerada quando se conhece que não há presença de outras substâncias. A curva analítica (Equação 25 e Figura 24) apresentou linearidade satisfatória ($R^2 = 0,9946$) e RMSE de 2,27%.

Tabela 6 - Valores de referência e previstos pela técnica TG

Amostra	Referência		Previsto	
	Forma I % (m/m)	Forma II % (m/m)	Forma I % (m/m)	Forma II % (m/m)
1	100	0	100,25	-0,25
2	75,78	24,22	75,97	24,03
3	59,94	40,06	61,42	38,59
4	49,15	50,85	46,85	53,15
5	35,70	64,30	38,12	61,89
6	23,90	76,10	19,66	80,34
7	0	100	2,19	97,81

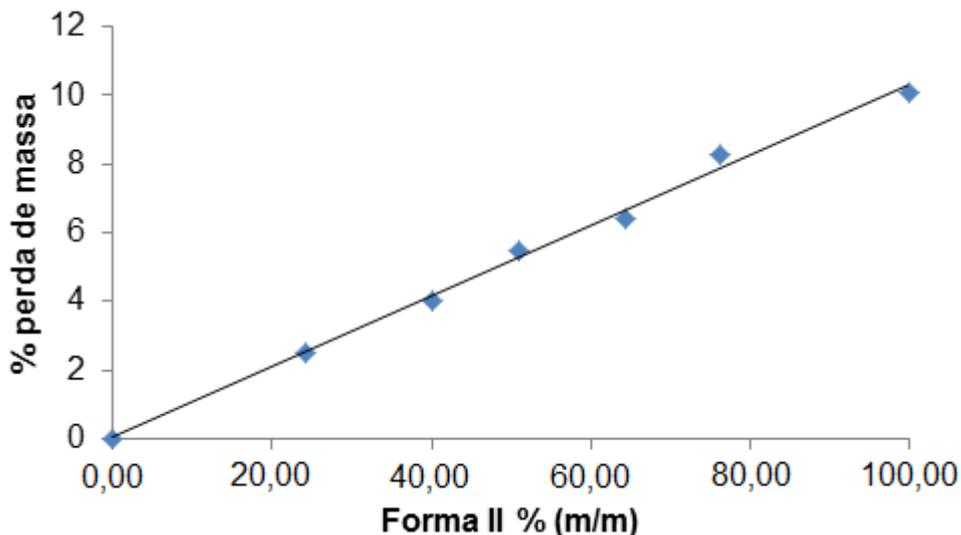


Figura 24 - Regressão para quantificação da Forma II de fexofenadina.HCl por TG.

Fonte: Do autor.

$$y = 0.103x + 0,0254 \quad \text{(Equação 26)}$$

Onde: y é a porcentagem de perda de massa e x é a porcentagem de massa de Forma II presente na amostra.

3.3 Conclusões

O modelo multivariado PLS2 se mostrou superior aos modelos univariados, apresentando melhor ajuste dos dados. A espectroscopia Raman e a PXRD aliadas ao modelo de regressão PLS2 podem ser utilizados na identificação e quantificação de contaminações provenientes da forma II de fexofenadina.HCl (hidrato) na forma I (anidra), podendo ser empregada no controle de qualidade em farmoquímicas e/ou em locais de armazenamento. O modelo de regressão PLS2 construído com os dados obtidos por PXRD apresentou melhor ajuste dos dados e exatidão que o construído com os dados obtidos por espectroscopia Raman. Por outro lado, a espectroscopia Raman possui vantagens como o baixo custo, portabilidade, fácil operação e não radioatividade.

A técnica TG mostrou-se capaz de quantificar a Forma II de fexofenadina.HCl em amostras de matéria-prima, podendo ser empregada como uma técnica alternativa. Porém, esta é uma técnica passível de erro pela presença de água proveniente de umidade, ou de outros componentes presentes na amostra.

4 APLICAÇÃO 2: ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE FEXOFENADINA.HCL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NA FORMA DE PÓ

Há um crescente interesse por parte da indústria farmacêutica no desenvolvimento de metodologias capazes de caracterizar e quantificar as formas polimórficas em produtos acabados e em algumas etapas do processo de produção, como por exemplo na mistura de princípio ativo e excipiente na forma de pó, antes da etapa de compressão, devido à possibilidade de ocorrer transformações polimórficas durante esse processo (LI; CHOW; TAN, 2011).

A análise quantitativa de formas polimórficas em formulações farmacêuticas utilizando técnicas espectroscópicas requer que o espectro de cada forma polimórfica seja diferente e que essas diferenças sejam mantidas na presença de qualquer diluente (excipiente) (PATEL; LUNER; KEMPER, 2000).

A maioria dos estudos, já relatados na literatura, envolve a quantificação de formas polimórficas em matéria-prima, como visto no Capítulo 3. São poucos os estudos que relatam a quantificação de polimorfos na presença de excipientes (PATEL; LUNER; KEMPER, 2000; MOORE; COGDILL; WILDFONG, 2009; RUMONDOR; TAYLOR, 2010). Patel; Luner; Kemper (2010) relataram a quantificação das formas polimórficas I e II do sulfametoxazol na presença de cloreto de sódio, celulose microcristalina e lactose e em mistura 1:1 de celulose microcristalina e lactose, utilizando espectroscopia de refletância no infravermelho próximo. Rumondor; Taylor (2010) realizaram estudos com a finalidade de quantificar o princípio ativo cristalino em presença de outros componentes por PXRD, neste caso eles utilizaram apenas uma forma cristalina da felopidina, fase cristalina, na presença da polivinilpirrolidona, fase amorfa. Moore; Cogdill; Wildfong (2009) realizaram estudos envolvendo misturas quaternárias, contendo duas formas polimórficas e dois materiais amorfos, os excipientes lactose e celulose microcristalina, lactose e amido ou celulose microcristalina e amido, comprimidas.

O objetivo desta segunda aplicação é comparar as técnicas espectroscopia Raman e PXRD, aliadas à análise multivariada por PLS para a quantificação das formas polimórficas I e II de fexofenadina.HCl em formulação farmacêutica. Diferente dos estudos relatados na literatura, em que o princípio ativo se encontra na

presença de apenas um ou dois excipientes, este estudo buscou se aproximar do que a indústria farmacêutica encontra no seu dia a dia, tentando se assemelhar ao máximo do medicamento comercial.

4.1 Materiais e métodos

Neste trabalho, foi utilizado o mesmo princípio ativo (fexofenadina.HCl) cedido pela empresa CIMED, que corresponde a forma polimórfica I, e a forma polimórfica II obtida por cristalização por lenta evaporação do solvente, para as quais já foram descritas no tópico 2. Para este estudo foram preparadas dez misturas contendo as formas polimórficas I e II na presença de excipientes (Celulose microcristalina, amido, estearato de magnésio, TiO_2 e povidona). Todas com massa total de 100 mg. Destas, sete amostras compunham o conjunto de calibração e três o conjunto de validação. As concentrações de cada constituinte estão indicadas na Tabela 7. A relação princípio ativo : excipientes (27,27% : 72,73%) foi estabelecida de acordo com o medicamento comercial.

Tabela 7 - Composição das amostras de calibração

Amostra	Forma I	Forma II	Celulose	Amido	Estearato de magnésio	TiO_2	PVP
	% (m/m)						
A1	25,74	1,31	57,16	9,76	1,01	2,01	3,01
A2	24,67	2,66	56,95	9,72	1,00	2,00	3,00
A3	23,30	4,10	56,89	9,71	1,00	2,00	2,99
A4	22,01	5,46	56,83	9,70	1,00	2,00	2,99
A5	19,03	8,28	56,96	9,73	1,00	2,00	3,00
A6	16,30	10,87	57,07	9,74	1,00	2,01	3,00
A7	12,24	14,96	57,04	9,74	1,00	2,01	3,00
A8	9,56	17,76	56,95	9,72	1,00	2,00	3,00
A9	5,34	22,00	56,93	9,72	1,00	2,00	3,00
A10	1,35	25,80	57,09	9,75	1,00	2,01	3,00

Primeiramente, foi preparado um *pool* dos excipientes. Todas as amostras foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AY220) e homogeneizadas em

vortex durante 5 minutos. Os espectros Raman das amostras, na forma de pó, foram obtidos no *RamanStation 400F*–PerkinElmer equipado com laser de diodo de 785nm e um acessório para sólidos na faixa de 2000 a 200 cm^{-1} , usando 4 *coadd scans* e resolução 1 cm^{-1} . Os difratogramas foram obtidos no difratômetro de raios X Ultima IV – Rigaku com fonte de Cu K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), de 5 a 55 $^{\circ}2\theta$ utilizando uma voltagem de 40 Kv, corrente de 30 mA, velocidade de varredura de 1 $^{\circ}2\theta \text{ min}^{-1}$ e fenda de 10 mm.

A análise multivariada dos dados foi realizada no software Matlab (versão 7.0, The MathWorks) utilizando o PLS toolbox 5.8 (Eigenvector Co.). Na construção dos modelos de calibração PLS2 foram utilizados todo o padrão de difração de raio x de pó (5 a 55 $^{\circ}2\theta$) e a região de 2000 a 200 cm^{-1} do espectro Raman. Tanto os difratogramas quanto os espectros foram submetidos a diferentes métodos de pré-processamento. Os pré-processamentos empregados nos dados obtidos por espectroscopia Raman foram: 1) normalização; 2) normalização e MSC; 3) normalização e SNV; 4) normalização e 2ª derivada; 5) normalização, 2ª derivada e MSC; e 6) normalização, 2ª derivada e SNV. Os pré-processamento empregados nos difratogramas de raios X de pó foram: 1) MSC; 2) SNV; 3) normalização; 4) normalização e 2ª derivada e 5) sem pré-processamento. Todos combinados a 3 métodos de dimensionamento (autoescalamento, centrado na média e sem dimensionamento).

O número de variáveis latentes (LVs) foi determinado pela validação cruzada “*leave-one-out*”. O desempenho dos modelos obtidos pelas diferentes metodologias de pré-processamento foi avaliado pelos valores do coeficiente de determinação (R^2) e do erro quadrático médio (RMSE) dos resíduos (HU, 2010).

4.2 Resultados e discussão

Os espectros das amostras de calibração de formulação farmacêutica são apresentados na Figura 25. Os resultados dos modelos de regressão PLS2 construídos com os dados obtidos por espectroscopia Raman estão apresentados na Tabela 8. A qualidade e desempenho dos modelos de acordo com o R^2 são relativamente satisfatórios. O melhor modelo de regressão foi construído utilizando

pré-processamento normalização, 2ª derivada e SNV e centrado na média, para ambas as formas, por apresentar melhor R^2 e menores RMSECV e RMSEP. O modelo PLS2 foi construído usando 2 variáveis latentes para ambos os polimorfos. Esse número foi escolhido por ter apresentado o menor valor de RMSECV e explica 31,79% da variância de X e 99,31% de Y . O valor de RMSEP foi de 2,7% para a forma I e 2,8 para a forma II.

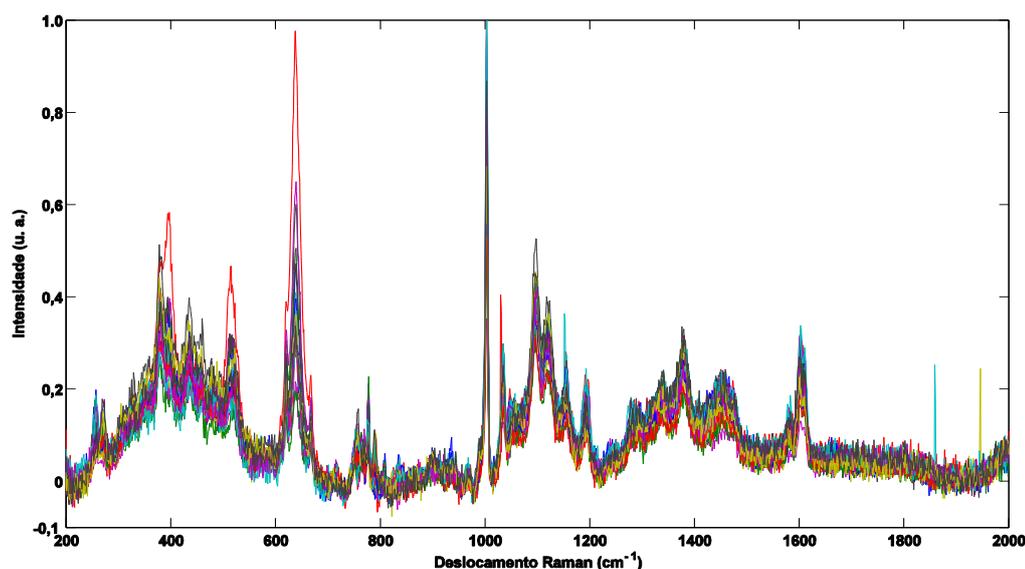


Figura 25 - Espectro Raman das amostras de calibração e validação da formulação farmacêutica na forma de pó.

Fonte: Do autor.

Tabela 8 - Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por Raman para as formas I e II do fexofenadina.HCl

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV Forma I/ Forma II	RMSEP Forma I/ Forma II	R^2 CV Forma I/ Forma II	R^2 P Forma I/ Forma II
Normalização	Auto	3	4,0400/ 4,0275	2,8738/ 2,8824	0,8639/ 0,8644	0,9393/ 0,9448
Normalização	CM	3	3,6900/ 3,6672	3,6412/ 3,6874	0,8388/ 0,8407	0,9286/ 0,9343
Normalização	Nenhum	3	5,0949/ 4,0022	6,3806/ 6,5921	0,6403/ 0,8012	0,3467/ 0,8293
Normalização e MSC	Auto	3	3,6654/ 3,6489	3,3384/ 3,4229	0,9073/ 0,9082	0,9361/ 0,9386
Normalização e MSC	CM	3	3,0091/ 2,9929	4,3217/ 4,4485	0,9101/ 0,9114	0,9230/ 0,9242
Normalização e MSC	Nenhum	3	3,3957/ 3,3762	4,2799/ 4,4074	0,8623/ 0,8634	0,9199/ 0,9210

Tabela 8 - Desempenho dos modelos de regressão PLS2 por Raman para as formas I e II do fexofenadina.HCl

(continuação)

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV Forma I/ Forma II	RMSEP Forma I/ Forma II	R ² CV Forma I/ Forma II	R ² P Forma I/ Forma II
Normalização e SNV	Auto	3	3,6737/ 3,6599	3,0606/ 3,1187	0,9059/ 0,9064	0,9438/ 0,9484
Normalização e SNV	CM	3	3,0110/ 2,9989	3,1942/ 3,2658	0,9110/ 0,9118	0,9561/ 0,9611
Normalização e SNV	Nenhum	3	3,2708/ 3,3301	2,7895/ 4,7066	0,8805/ 0,8693	0,9122/ 0,9127
Normalização e 2ªderivada	Auto	2	3,9720/ 3,9541	3,2136/ 3,2017	0,8576/ 0,8587	0,8374/ 0,8422
Normalização e 2ªderivada	CM	2	2,9397/ 2,9158	3,5154/ 3,5435	0,8947/ 0,8963	0,9176/ 0,9206
Normalização e 2ªderivada	Nenhum	2	5,1137/ 3,2490	4,9500/ 5,7798	0,6616/ 0,8601	0,5591/ 0,8069
Normalização, 2ªderivada e MSC	Auto	2	3,0069/ 2,9929	3,6067/ 3,6524	0,9471/ 0,9475	0,9317/ 0,9340
Normalização, 2ªderivada e MSC	CM	2	2,0011/ 1,9982	3,6347/ 3,6886	0,9628/ 0,9625	0,9606/ 0,9615
Normalização, 2ªderivada e MSC	Nenhum	2	2,2197/ 2,2242	4,2934/ 4,3922	0,9612/ 0,9598	0,9286/ 0,9276
Normalização, 2ªderivada e SNV	Auto	2	2,9886/ 2,9751	2,8696/ 2,8935	0,9500/ 0,9504	0,9518/ 0,9558
Normalização, 2ªderivada e SNV	CM	2	1,9797/ 1,9766	2,7155/ 2,7600	0,9650/ 0,9648	0,9847/ 0,9869
Normalização, 2ªderivada e SNV	Nenhum	2	2,1440/ 2,2291	2,6065/ 4,3891	0,9630/ 0,9591	0,9752/ 0,9305

*Auto: autoescalamento; CM: centrado na média; LV: Variáveis latentes, CV: Validação cruzada, P: Previsão.

Os difratogramas das amostras de calibração de formulação farmacêutica são apresentados na Figura 26. Os resultados dos modelos de regressão construídos com os dados obtidos por PXRD estão apresentados na Tabela 9. De acordo com R², os modelos apresentaram ajustes adequados. O melhor modelo de regressão foi construído sem a utilização de pré-processamento e centrado na média, para ambas as formas, por apresentar melhor R² e menores RMSECV e RMSEP. O modelo PLS2 foi construído usando 3 variáveis latentes para ambos os polimorfos e explica 86,26% da variância de **X** e 99,69% de **Y**. O valor de RMSEP foi de 1,1%.

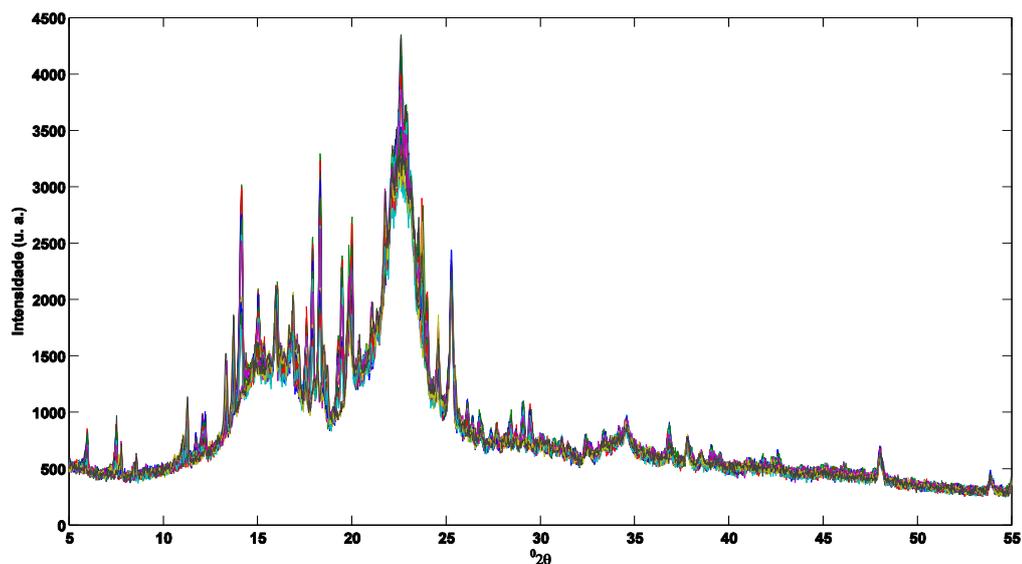


Figura 26 - Difrátogramas das amostras de calibração de formulação farmacêutica.

Fonte: Do autor.

Tabela 9 - Desempenho dos modelos de regressão PLS por PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV Forma I/ Forma II	RMSEP Forma I/ Forma II	R ² CV Forma I/ Forma II	R ² P Forma I/ Forma II
MSC	Auto	2	1,2239/ 1,1950	1,3125/ 1,2571	0,9854/ 0,9863	0,9854/ 0,9882
MSC	CM	3	0,8762/ 0,8276	2,0471/ 2,0745	0,9895/ 0,9907	0,9206/ 0,9146
MSC	Nenhum	3	0,9577/ 0,9215	1,1523/ 1,2146	0,9874/ 0,9883	0,9828/ 0,9806
SNV	Auto	2	1,3064/ 1,2685	2,3573/ 2,2935	0,9842/ 0,9855	0,9482/ 0,9546
SNV	CM	3	0,8767/ 0,8279	1,8063/ 1,8439	0,9895/ 0,9907	0,9366/ 0,9310
SNV	Nenhum	3	0,9651/ 0,9005	1,1670/ 1,2558	0,9872/ 0,9888	0,9769/ 0,9845
Nenhum	Auto	3	1,3619/ 1,3218	1,3548/ 1,2518	0,9858/ 0,9872	0,9816/ 0,9859
Nenhum	CM	3	0,9586/ 0,9087	1,1080/ 1,1354	0,9874/ 0,9886	0,9805/ 0,9885
Nenhum	Nenhum	3	1,0279/ 1,0024	1,7616/ 1,8202	0,9854/ 0,9861	0,9557/ 0,9859
Normalização	Auto	3	1,5008/ 1,4974	6,5817/ 6,5940	0,9691/ 0,9691	0,6798/ 0,6873
Normalização	CM	3	1,0523/ 1,0306	3,2416/ 3,2634	0,9846/ 0,9852	0,8962/ 0,8988

Tabela 9 - Desempenho dos modelos de regressão PLS por PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl

(continuação)

Pré-processamento	Dimensio namento*	LV's	RMSECV Forma I/ Forma II	RMSEP Forma I/ Forma II	R ² CV Forma I/ Forma II	R ² P Forma I/ Forma II
Normalização	Nenhum	3	1,1260/ 0,9876	3,7506/ 1,9495	0,9823/ 0,9864	0,7685/ 0,9739
Normalização e 2 ^a derivada	Auto	2	1,3860/ 1,3678	1,5800/ 1,6246	0,9822/ 0,9828	0,9561/ 0,9508
Normalização e 2 ^a derivada	CM	2	1,2500/ 1,2243	1,7579/ 1,8254	0,9782/ 0,9790	0,9615/ 0,9575
Normalização e 2 ^a derivada	Nenhum	2	1,9868/ 1,7902	2,4670/ 3,4943	0,9462/ 0,9557	0,9609/ 0,7993

*Auto: autoescalamento; CM: centrado na média; LV: Variáveis latentes, CV: Validação cruzada, P: Previsão.

É possível notar que a aplicação de SNV e MSC forneceram resultados similares. Isso ocorre devido às equações destes procedimentos terem a mesma forma, porém enquanto SNV é aplicado a cada espectro separadamente, o MSC usa o espectro médio do conjunto de dados (KACHRIMANIS; BRAUN; GRIESSER, 2007; HU et al., 2010).

As Figuras 27, 28 mostram as curvas dos valores previstos pelos valores de referência e os erros relativos calculados pelos dados obtidos por espectroscopia Raman e PXRD para as formas I e II do fexofenadina.HCl, utilizando o melhor modelo PLS obtido para cada metodologia. Pode-se observar que há uma boa relação linear entre os valores previstos e os valores medidos para ambas as formas polimórficas. Os valores de RMSE são inferiores a 10%, portanto pode-se inferir que a quantificação das formas polimórficas na formulação farmacêutica é eficaz (ROCHA et al., 2011). Ambos os métodos analíticos utilizados, espectroscopia Raman e PXRD, combinados aos modelos de regressão PLS obtidos se mostraram eficientes em quantificar as formas polimórficas na formulação farmacêutica descrita.

Em relação aos erros percentuais (resíduos) dos ajustes, para ambas as formas polimórficas mostradas nas Figuras 27.b, 28.b, esses apresentam uma distribuição aleatória, o que indica ajustes adequados.

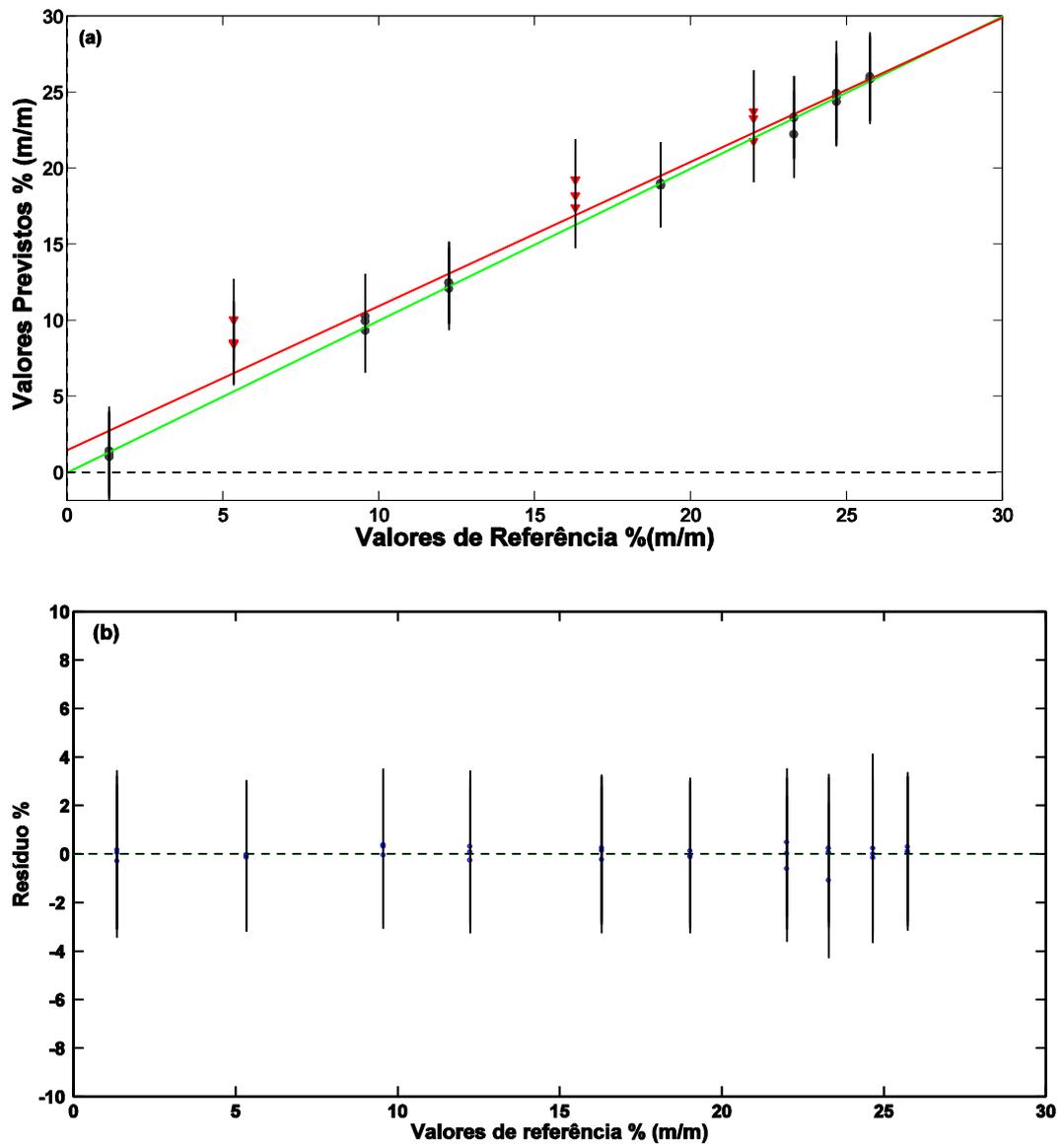


Figura 27 - Modelos de regressão PLS e distribuição residual para a Forma I por Raman. Amostras de calibração (●) e validação (▼).

Fonte: Do autor.

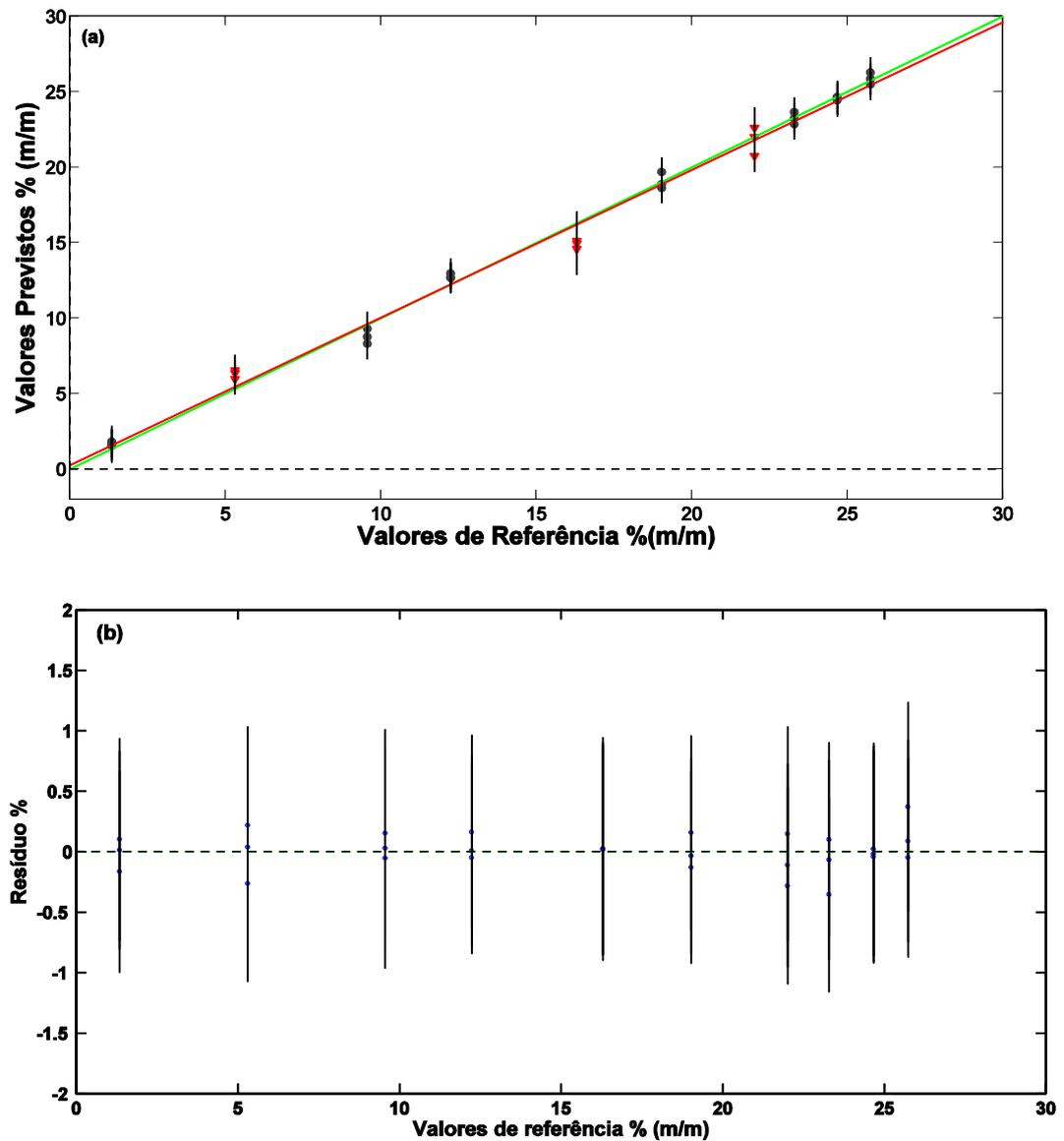


Figura 28 - Modelos de regressão PLS e distribuição residual para a Forma I por PXRD. Amostras de calibração (●) e validação (▼).

Fonte: Do autor.

A PXRD apresentou valores de RMSECV e RMSEP inferiores aos da espectroscopia Raman, possuindo melhor exatidão.

4.3 Conclusões

Um novo método para quantificação das formas polimórficas I (anidra) e II (hidrato) de fexofenadina.HCl em determinada formulação farmacêutica foi apresentado. Tanto a PXRD como a espectroscopia Raman aliadas à regressão PLS se mostraram eficientes na quantificação das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl na formulação farmacêutica proposta, podendo ser empregada na detecção de contaminação proveniente da forma II na forma I, na presença de excipientes, podendo ser empregada no controle de qualidade na indústria farmacêutica, mediante prévia validação analítica da metodologia. Da mesma forma que a aplicação anterior, o modelo de regressão PLS construído com os dados obtidos por PXRD apresentou melhor sensibilidade que o construído com os dados obtidos por espectroscopia Raman.

5 APLICAÇÃO 3: ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE FEXOFENADINA.HCL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA NA FORMA DE COMPRIMIDOS

NIR-CI (Near-infrared chemical imaging) é uma poderosa extensão da espectroscopia tradicional. Ela oferece uma grande quantidade de informação da superfície da amostra de forma não destrutiva. Além de identificar e quantificar os analitos de interesse, o NIR-CI permite obter informações sobre a distribuição espacial dos constituintes da amostra com a utilização de métodos quimiométricos (SIESLER, 1991).

A técnica de NIR-CI ainda é considerada uma técnica emergente, havendo um número limitado de trabalhos publicados, porém cada vez mais frequentes. Muitos dos trabalhos se concentram no desenvolvimento de algoritmos capazes de transformar os espectros coletados na informação de interesse. Os trabalhos envolvendo fármacos se concentram em discutir sobre a homogeneidade de pós e comprimidos, composição, polimorfismo e morfologia dos constituintes em comprimidos, e alterações espaciais na sua degradação (REICH, 2005; RAJALAHTI; KVALHEIM, 2011). Em uma revisão realizada por Rajalahti; Kvalheim (2011) apenas 8 dos 72 trabalhos citados envolvem NIR-CI.

A análise quantitativa de amostras farmacêuticas utilizando NIR-CI tem sido realizada com o uso de técnicas quimiométricas como PLS, a qual necessita de uma calibração, e métodos que não dependem de uma calibração prévia, como CLS (Classical Least Squares) e MCR-ALS (CRUZ et al., 2009).

O objetivo desta terceira aplicação é realizar a análise por NIR-CI combinadas com análise multivariada por PLS e por MCR-ALS para quantificação e determinação da distribuição das formas polimórfica I e II do fexofenadina.HCl em comprimidos.

5.1 Materiais e métodos

No desenvolvimento desta terceira aplicação foi utilizado o princípio ativo (fexofenadina.HCl) cedido pela empresa CIMED, que corresponde a forma polimórfica I, e a forma polimórfica II obtida por cristalização por lenta evaporação do solvente, para as quais já foram descritas no tópico 2.

Foram preparados 40 comprimidos contendo as formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl e excipientes (Celulose microcristalina, amido, estearato de magnésio, TiO₂ e povidona), sendo 30 de calibração e 10 de validação. As concentrações de cada constituinte estão indicadas na Tabela 10. A relação princípio ativo : excipientes (27,27% : 72,73%) foi estabelecida de acordo com o medicamento disponível no mercado.

Tabela 10 - Composição dos comprimidos de calibração (1 a 30) e validação (31 a 40)

Comprimido	Forma I % (m/m)	Forma II % (m/m)	Placebo % (m/m)
1	27,25	0,00	72,75
2	27,00	0,27	72,73
3	26,71	0,53	72,76
4	26,35	0,80	72,85
5	25,95	1,34	72,71
6	25,37	1,88	72,75
7	25,06	2,17	72,77
8	24,49	2,72	72,79
9	23,19	4,08	72,73
10	21,79	5,46	72,75
11	20,45	6,81	72,74
12	19,07	8,19	72,75
13	17,72	9,54	72,74
14	16,34	10,91	72,75
15	15,00	12,27	72,73
16	13,67	13,64	72,69
17	12,27	15,00	72,73
18	10,92	16,34	72,74
19	9,54	17,73	72,73

Tabela 10 - Composição dos comprimidos de calibração (1 a 30) e validação (31 a 40)

(continuação)

Comprimido	Forma I % (m/m)	Forma II % (m/m)	Placebo % (m/m)
20	8,16	19,08	72,76
21	6,81	20,45	72,74
22	5,46	21,80	72,74
23	4,08	23,18	72,74
24	0,89	24,93	74,18
25	1,91	25,38	72,70
26	1,36	25,91	72,73
27	0,82	26,37	72,81
28	0,55	26,67	72,79
29	0,27	26,97	72,76
30	0,00	27,25	72,75
31	24,56	2,42	73,02
32	23,98	3,28	72,74
33	19,63	7,63	72,75
34	17,43	9,80	72,77
35	14,44	12,83	72,73
36	12,82	14,44	72,74
37	10,62	16,64	72,74
38	5,99	21,28	72,73
39	4,37	22,89	72,74
40	2,18	25,08	72,74

Todas as amostras foram pesadas em balança analítica (Shimadzu AY220 e Sartorius CP2P), homogeneizada em vortex durante 5 minutos e comprimidas em prensa hidráulica a 2 ton/cm². Cada comprimido teve massa total de 304 mg.

Os comprimidos foram analisados em um Espectrômetro SPECTRUM 100N FT-NIR acoplado com sistema de imagem Spotlight 400N FT-NIR da PerkinElmer. Cada espectro foi obtido com 2 varreduras na região de 7800 a 4000 cm⁻¹, com resolução espectral de 32 cm⁻¹. A área analisada foi de 64mm², com pixels de dimensão 50 µm x 50 µm, obtendo então uma imagem de 160 x 160 pixels. Logo, por comprimido foi obtida uma matriz de 25600 espectros por 239 variáveis. Também foram obtidos espectros das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl e de cada excipiente puro.

Antes de realizar a leitura das amostras, o foco foi ajustado e foi obtido o branco espectral. Para obter o branco o foco da radiação foi ajustado em uma placa de ouro polido.

Os espectros de reflectância (R) foram transformados em espectros de absorvância ($\log(1/R)$) antes da utilização de procedimentos quimiométricos. O pré-processamento empregado foi a 2ª derivada. A análise multivariada dos dados foi realizada no software Matlab (versão 7.0, The MathWorks) utilizando o PLS toolbox 5.8 (Eigenvector Co.) e o MCR-ALS toolbox (JAUMOT et al., 2005).

5.2 Resultados e discussão

Primeiramente, foi construído o modelo PLS-2, utilizando o espectro médio das imagens obtidas. O modelo PLS foi construído com 2 variáveis latentes, 30 amostras de calibração e 10 de validação. Esse número foi escolhido por apresentar o menor valor de RMSECV (1,52%) e explicar 93,38% da variância de **X** e 98,08% da variância de **Y** para ambas as formas. O número de variáveis latentes foi determinado pela validação cruzada “*leave-one-out*”.

A Figura 29 mostra os resultados obtidos pelo modelo PLS construído para as formas polimórficas I e II. É possível notar uma concordância entre os valores previstos pelo modelo e os valores de referência, o que é confirmado pelo valor de R^2 , apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Desempenho do modelo de regressão PLS2 por NIR-CI

Polimorfo	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R^2 Cal	R^2 CV	R^2 P
Forma I	1,35	1,51	1,94	0,9814	0,9766	0,9543
Forma II	1,35	1,52	1,92	0,9809	0,9759	0,9571

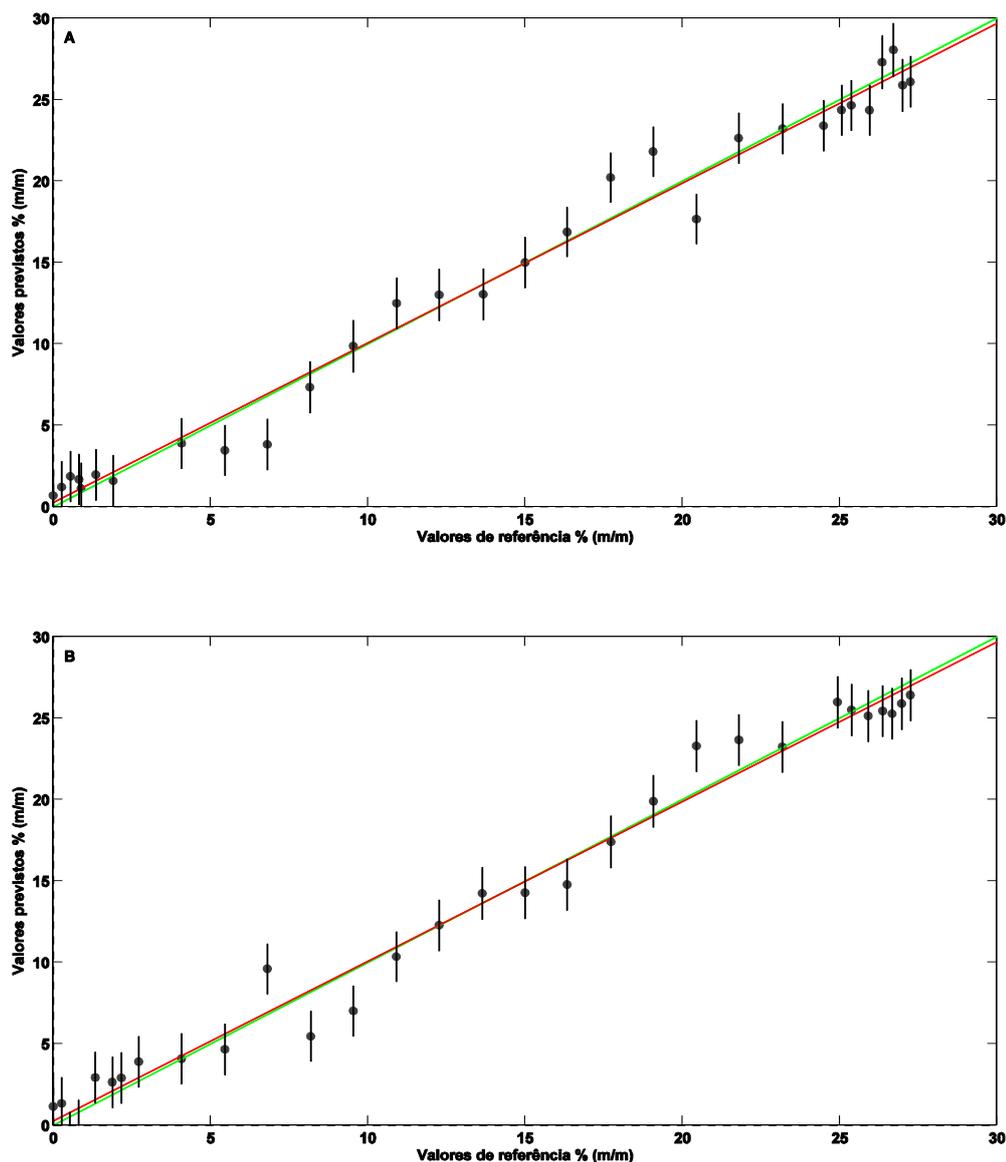


Figura 29 - Modelos de regressão PLS para as formas polimórfica (A) I e (B) II por NIR-CI.

Fonte: Do autor.

Os valores de RMSEC e RMSEP estão abaixo de 2% (m/m), então podemos inferir a eficiência do modelo para quantificar as formas polimórficas presentes da superfície do comprimido, visto que esses valores são inferiores a 10% (m/m) (ROCHA et al., 2011).

Através da reconstrução das imagens dos comprimidos utilizando o modelo PLS construído foi possível verificar a distribuição das formas polimórficas presentes na superfície do comprimido. A Figura 30 mostra o mapa de concentração das formas polimórficas ao longo da superfície do comprimido, na área analisada. Podemos observar que as imagens são complementares.

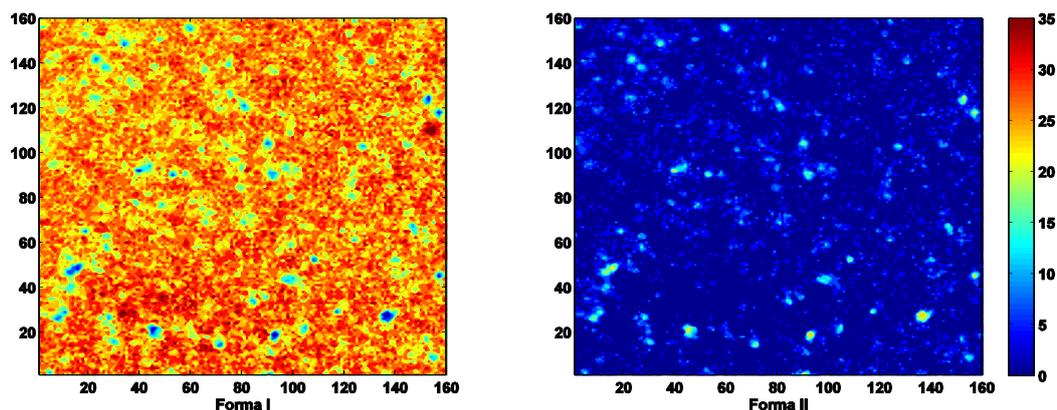


Figura 30 - Mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por PLS.

Fonte: Do autor.

Os histogramas para cada componente de um comprimido são apresentados na Figura 31. O histograma mostra a concentração por pixel do comprimido contra a frequência de concentração. Pode-se verificar que as concentrações seguem distribuição normal (gaussiana), logo se pode inferir que há uma distribuição homogênea dos constituintes do comprimido ao longo da superfície.

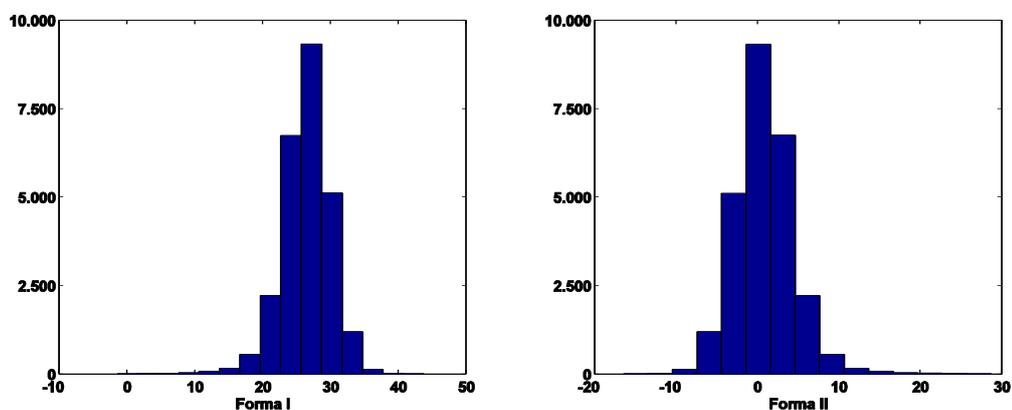


Figura 31 - Histogramas dos mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por PLS. Concentração por pixel x frequência de concentração.

Fonte: Do autor.

No MCR-ALS não são necessárias amostras de calibração. Para que o algoritmo possa convergir para o erro mínimo são necessárias estimativas iniciais, como o uso dos espectros puros dos constituintes das amostras. Outras restrições foram utilizadas para decompor a matriz corretamente, como a não-negatividade das

concentrações, o que impõe que os perfis de concentrações dos componentes sejam sempre positivos e o balanço de massa constante e igual a 1, representando a totalidade da concentração (CRUZ et al., 2009).

As amostras foram analisadas por MCR-ALS utilizando matriz aumentada. Os resultados estão apresentados nas Figuras 32 e 33. Na Figura 32 observamos os mapas de concentração e suas respectivas concentrações médias por comprimido. Notamos que a escala de cores do MCR na representação das concentrações no mapa possui apenas valores maiores que zero, isso ocorre devido à restrição imposta de não-negatividade da concentração. Quando comparados os mapas de distribuição das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl de um determinado comprimido, observa-se que as imagens são complementares.

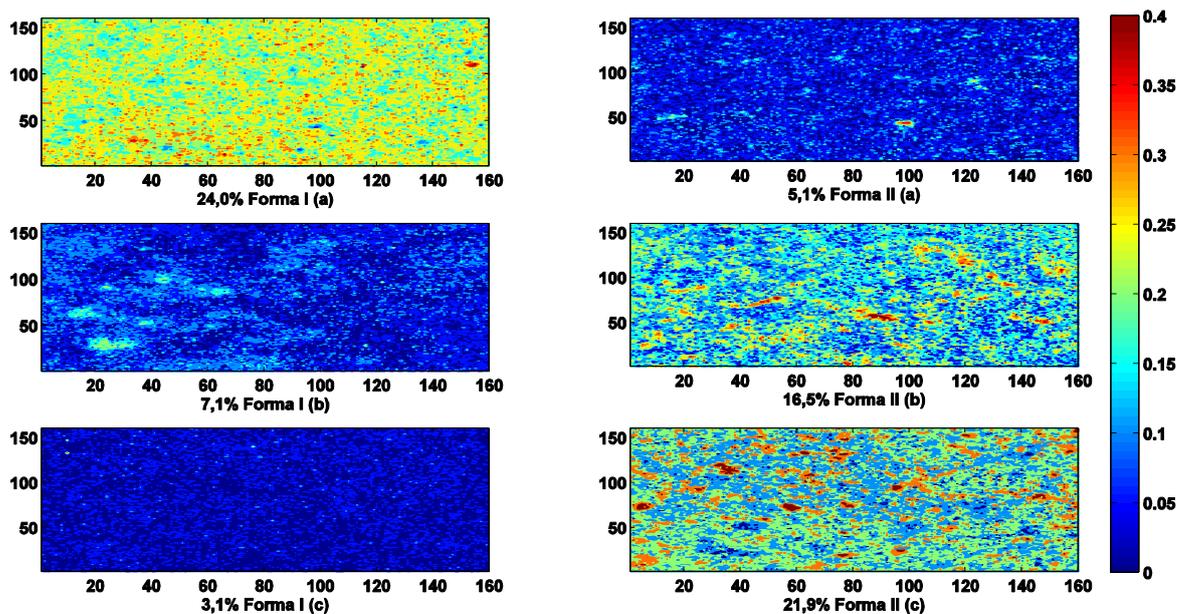


Figura 32 - Mapas de distribuição de concentração e concentrações médias (% (m/m)) das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por MCR-ALS.

Fonte: Do autor.

No histograma (Figura 33) pode-se verificar que as concentrações seguem distribuição normal, havendo distribuição homogênea dos constituintes do comprimido ao longo da superfície, assim como verificado no modelo PLS.

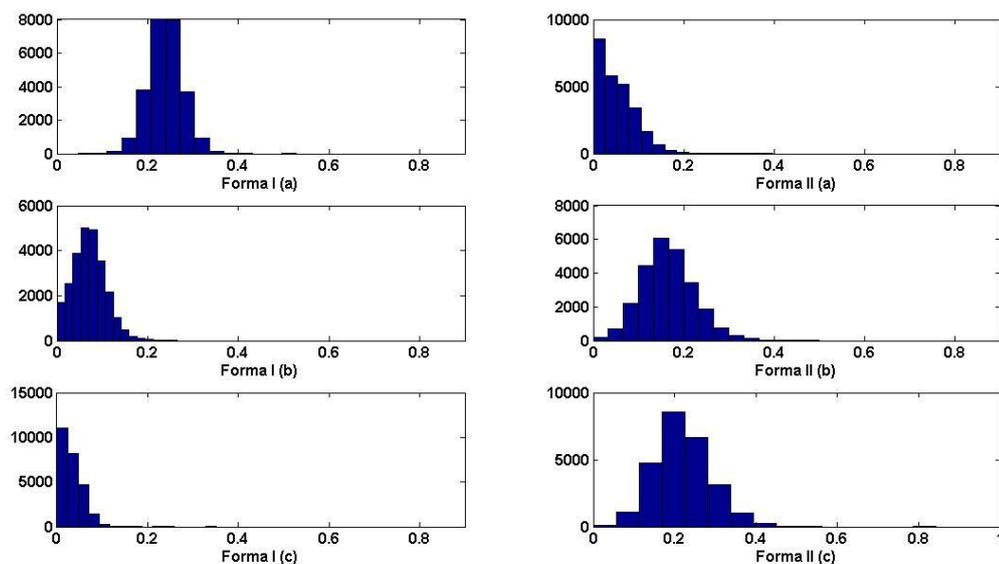


Figura 33 - Histograma dos mapas de distribuição de concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl obtidos por PLS. Concentração por pixel x frequência de concentração.

Fonte: Do autor.

A decomposição do MCR-ALS foi satisfatória, com 7,11% de LOF (*Lack of Fit* – Falta de ajuste) e R^2 (coeficiente de determinação entre os espectros puros e espectros recuperados) de 0,9851. Os perfis dos espectros puros e dos espectros recuperados por MCR-ALS são apresentados na Figura 34. Os espectros estão de acordo com entre si.

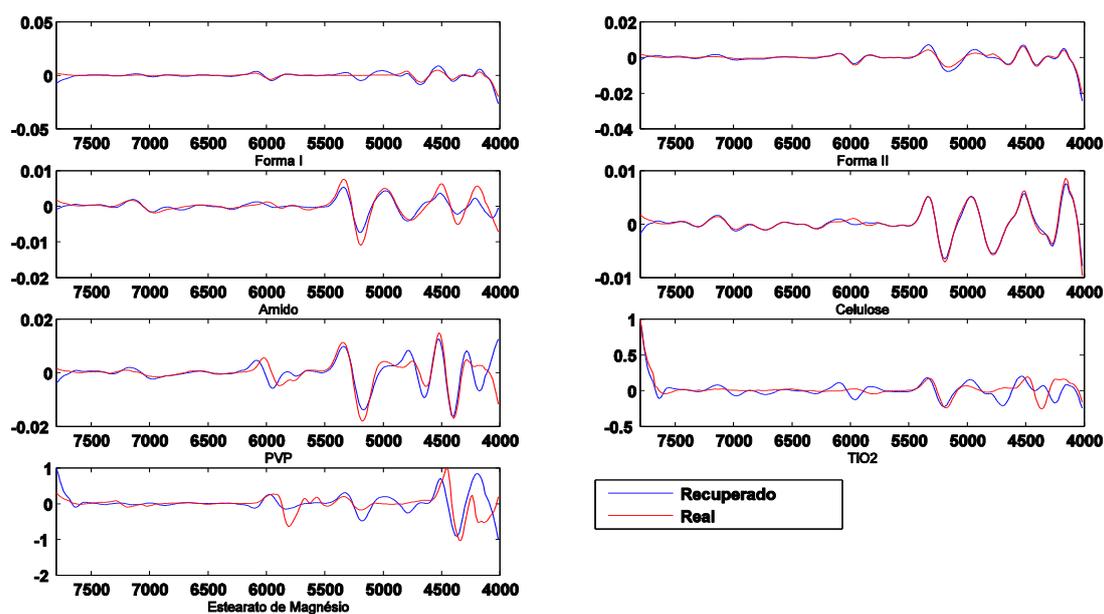


Figura 34 - Segunda derivada dos espectros puros e espectros recuperados pelo MCR-ALS dos constituintes dos comprimidos.

Fonte: Do autor.

Tabela 12 - Valores de referência e valores previstos por PLS e MCR-ALS das concentrações das formas I e II de fexofenadina.HCl em comprimidos

Amostra	Referência		PLS		MCR-ALS	
	Forma I (%m/m)	Forma II (%m/m)	Forma I (%m/m)	Forma II (%m/m)	Forma I (%m/m)	Forma II (%m/m)
1	24,56	2,42	26,43	0,87	24,0	5,1
2	23,98	3,28	24,10	3,19	21,7	5,0
3	19,63	7,63	18,66	8,61	15,3	10,1
4	17,43	9,80	17,08	10,18	13,7	10,7
5	14,44	12,83	13,08	14,18	10,0	13,4
6	12,82	14,44	12,56	14,69	8,9	14,9
7	10,62	16,64	11,59	15,65	7,1	16,5
8	5,99	21,28	7,17	20,06	4,0	18,2
9	4,37	22,89	6,93	20,30	3,2	18,4
10	2,18	25,08	6,88	20,36	3,1	21,9

A Tabela 12 apresenta os valores de referência e os valores previstos pelos modelos PLS e MCR-ALS. Verifica-se que ambos os métodos aplicados apresentam concordância entre os valores previstos e os de referência, havendo maior erro quanto menor a concentração presente no comprimido. O PLS, por utilizar curva de calibração, apresentou melhor recuperação das concentrações das formas

polimórficas I e II do fexofenadina.HCl em comprimidos, porém o MCR-ALS apresentou resultados satisfatórios sem a necessidade de curva de calibração. Observa-se para ambos os métodos maiores desvios para as amostras que apresentam menores concentrações de Forma I ou II.

5.3 Conclusão

Comprimidos sintéticos foram analisados por NIR-CI com a finalidade de determinar a distribuição e a concentração das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl em cada comprimido utilizando PLS e MCR-ALS.

A combinação de NIR-CI com análises multivariadas como PLS e MCR-ALS se mostraram ferramentas adequadas para obter informações sobre a distribuição das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl ao longo da superfície do comprimido, com a vantagem da não necessidade de preparo da amostra, podendo o comprimido ser diretamente analisado de maneira não destrutiva para a obtenção dos espectros.

Tanto a combinação de NIR-CI com PLS, como por MCR-ALS, se mostraram adequadas para aplicação no controle de qualidade de comprimidos. Sendo que o MCR-ALS se mostra mais vantajoso por não necessitar de curva de calibração.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O polimorfismo pode ser identificado e caracterizado utilizando XRD, espectroscopia no infravermelho, RMN do estado sólido, Raman, análise térmica, entre outras. Nas aplicações descritas neste estudo foram utilizadas PXRD e espectroscopia Raman, combinadas com a regressão multivariada PLS, e NIR-CI combinada com PLS e MCR-ALS.

Tais técnicas (espectroscopia Raman, NIR-CI e PXRD) geram uma grande quantidade de dados, demandando a necessidade de computador e software adequados para a extração de informações significativas e precisas dos dados obtidos.

PXRD e espectroscopia Raman, combinadas com a regressão PLS, podem ser utilizadas na caracterização e quantificação dos polimorfos I e II tanto na matéria-prima como na formulação farmacêutica. Os modelos podem ser considerados eficientes, visto que possuem valores de RMSE inferiores a 5% e R^2 próximos a 1. Os resíduos apresentam distribuição aleatória, indicando que os modelos possuem ajustes adequados.

Tanto na matéria-prima como na formulação farmacêutica a PXRD apresentou valores de RMSECV e RMSEP inferiores aos da espectroscopia Raman, tendo melhor exatidão.

A PXRD é mais sensível ao empacotamento cristalino (orientação preferencial), enquanto para a espectroscopia Raman a homogeneidade da amostra é uma das principais fontes de erro, considerando que o laser incidente é bastante pontual e mais passível de erros referentes à baixa homogeneidade da amostra. No entanto, a espectroscopia Raman tem ganhado espaço na indústria farmacêutica por apresentar maior portabilidade, maior velocidade de aquisição de dados em relação ao PXRD, possuir a possibilidade de realizar o monitoramento *on-line* ou *at-line*, com menor custo e maior facilidade de operação.

A combinação de espectroscopia NIR-CI com análises multivariadas como PLS e MCR-ALS se mostraram ferramentas adequadas para obter informações sobre a distribuição das formas polimórficas I e II do fexofenadina.HCl ao longo da superfície do comprimido, com a vantagem da não necessidade de preparo da amostra, podendo o comprimido ser diretamente levado à obtenção dos espectros.

As concentrações médias das formas polimórficas puderam ser facilmente calculadas. Ambos os métodos utilizados (PLS e MCR-ALS) se mostraram adequadas para aplicação no controle de qualidade de comprimidos. Sendo que o MCR-ALS se mostra mais vantajoso por não necessitar de curva de calibração.

REFERÊNCIAS

ABRAMS, C. B. **Infrared spectroscopy tutorial and reference**. PerkinElmer, 1992.

AMIGO, J. M., et al. Study of pharmaceutical samples by NIR chemical-image and multivariate analysis. **Trends in analytical chemistry**, v. 27, n.8, p. 696-713, 2008.

AXELROD, D.; BIELORY, L. Fexofenadine hydrochloride in the treatment of allergic disease: a review. **Journal of asthma and allergy**, v. 1, p. 19-29, 2008.

BLANCO, M., et al. Near infrared spectroscopy in the study of polymorphic transformations. **Analytica chimica acta**, v. 567, n.2, p. 262-268, 2006.

BLANCO, M., et al. Application of NIR spectroscopy in polymorphic analysis: Study of pseudo-polymorphs stability. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 94, n.6, p. 1336-1342, 2005.

BLANCO, M.; VILLAR, A. Development and validation of a method for the polymorphic analysis of pharmaceutical preparations using near infrared spectroscopy. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 92, p. 823-830, 2003.

BLOCKBUSTER drug. Disponível em:
<<http://www.investopedia.com/terms/b/blockbuster-drug.asp#axzz1YbO4Xsgw>>.
Acesso em: 21 set. 2011.

BRAGA, J. W. B. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada, aplicada na determinação de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo**. 2004. 153 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepone by infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 93, n.8, p. 2124-2134, 2004.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. p.

BRITTAIN, H. G. **Physical characterization of pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker, 1995. 424 p.

BRITTAIN, H. G. **Polymorphism in pharmaceutical solids**. New York: Marcel Dekker, 2000. 640 p.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of Near-Infrared analysis**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2001. 814 p.

CAPUCHO, H. C.; MASTROIANNI, P. C.; CUFFINI, S. Farmacovigilância no Brasil: a relação entre polimorfismo de fármacos, efetividade e segurança dos medicamento. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n.3, p. 277-283, 2008.

CHIENG, N., et al. Quantitative solid-state analysis of three solid forms of ranitidine hydrochloride in ternary mixtures using Raman spectroscopy and X-ray powder diffraction. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, n.1, p. 18-25, 2009.

CRUZ, J., et al. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. **Talanta**, v. 80, n.2, p. 473-478, 2009.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-ray diffraction**. 3. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2001. 664 p.

DATTA, S.; GRANT, D. J. W. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. **Nature reviews drug discovery**, v. 3, n.1, p. 42-57, 2004.

de JONG, S. SIMPLS: an alternative approach to partial least squares regression. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 18, n.3, p. 251-263, 1993.

de JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 36, n.3-4, p. 163-176, 2006.

DENK, M. K. Historical development of vibrational spectroscopy. Disponível em: <http://131.104.156.23/Lectures/CHEM_207/vibrational_spectroscopy>. Acesso em: 10 abr. 2012.

EISBERG, R. M.; RESNICK, R. **Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. Rio de Janeiro: Campus, 1979. 928 p.

FERREIRA, M. M. C., et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial Least Squares Regression: a tutorial. **Analytica chimica acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

HANSEN, P. W. Pre-processing method minimizing the need for reference analysis. **Journal of chemometrics**, v. 15, p. 123-131, 2001.

HENTON, D. R., et al. Processes for preparing anhydrous and hydrate forms of antihistaminic piperidine derivatives, polymorphs and pseudomorphs thereof, **WO 95/31437**, 1995.

HOLLAS, J. M. **Modern Spectroscopy**. 4. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. 452 p.

HU, Y., et al. Quantitative analysis of sulfathiazole polymorphs in ternary mixtures by attenuated total reflectance infrared, near-infrared and Raman spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 53, n.3, p. 412-420, 2010.

ICH, Stability testing of new drug substances and products. Proceedings of the International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 2003.

INPI Proposta de diretrizes para exame de pedidos de patentes de novas formas polimórficas. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/patente/discussoes-tecnicas/polimorfismo>>. Acesso em: 28 out. 2010.

JAUMOT, J., et al. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 76, n.1, p. 101-110, 2005.

JÚLIO, T. A., et al. Compatibility of sildenafil citrate and pharmaceutical excipients by thermal analysis and LC–UV. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, 2012, 8 p. DOI: 10.1007/s10973-012-2292-8.

KACHRIMANIS, K.; BRAUN, D. E.; GRIESSER, U. J. Quantitative analysis of paracetamol polymorphs in powder mixtures by FT-Raman spectroscopy and PLS regression. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 43, n.2, p. 407-412, 2007.

KOR, I.; WIZEL, S. Crystalline forms of fexofenadine hydrochloride and processes for their preparation, **US2005/0256163**, 2005.

LARKIN, P. J. **Infrared and Raman spectroscopy**: Principles and spectral interpretation. Oxford: Elsevier, 2011. 230 p.

LI, Y.; CHOW, P. S.; TAN, R. B. H. Quantification of polymorphic impurity in an enantiotropic polymorph system using differential scanning calorimetry, X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. **International journal of pharmaceutics**, v. 415, p. 110-118, 2011.

LUYPAERT, J.; MASSART, D. L.; VANDER HEYDEN, Y. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 72, n.3, p. 865-883, 2007.

MOORE, M. D.; COGDILL, R. P.; WILDFONG, P. L. D. Evaluation of chemometric algorithms in quantitative X-ray powder diffraction (XRPD) of intact multi-component consolidated samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n.3, p. 619-626, 2009.

MORISSETTE, S. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n.3, p. 275-300, 2004.

NAIK, P. V. **Principes of physics**. 4. ed. New Delhi: PHI Learning, 2010. 364 p.

NÉMET, Z., et al. Quantitative determination of famotidine polymorphs: X-ray powder diffractometric and Raman spectrometric study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n.2, p. 338-346, 2009.

OTTO, M. **Chemometrics**: statistics and computer application in analytical chemistry. Weinheim: John Wiley & Sons, 2007. 328 p.

PADILHA, A. F.; AMBRÓZIO FILHO, F. **Técnicas de análise microestrutural** São Paulo: Hemus, 2004. 192 p.

PAPA BENTO XVI. **Reflexão sobre o sentido da medicina e da pesquisa científica**. Universidade Católica do Sagrado Coração em 03 maio 2012. (informação verbal).

PATEL, A. D.; LUNER, P. E.; KEMPER, M. S. Quantitative analysis of polymorphs in binary and multi-component powder mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. **International journal of pharmaceuticals**, v. 206, p. 63-74, 2000.

RADHAKRISHNA, T.; REDDY, G. O. Simultaneous determination of fexofenadine and its related compounds by HPLC. **Journal of pharmaceutical biomedical analysis**, v. 29, p. 681-690, 2002.

RAJALAHTI, T.; KVALHEIM, O. M. Multivariate data analysis in pharmaceuticals: A tutorial review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n.1-2, p. 280-290, 2011.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. The Raman effect – inelastic insight. **Nature**, v. 121, p. 501-502, 1928.

RAVN, C.; SKIBSTED, E.; BRO, R. Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms—Comparing common calibration approaches. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, n.3, p. 554-561, 2008.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, n.8, p. 1109-1143, 2005.

ROCHA, W. F. D. C., et al. Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 106, n.2, p. 198-204, 2011.

RUMONDOR, A. C. F.; TAYLOR, L. S. Application of Partial Least-Squares (PLS) modeling in quantifying drug crystallinity in amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, n.1-2, p. 155-160, 2010.

SENA, M. M.; TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. PARAFAC: Uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. **Química nova**, v. 28, p. 910-920, 2005.

SIESLER, H. W. Near- Infrared Spectroscopy of Polymers. **Makromolekulare chemie. macromolecular symposia**, v. 52, n.1, p. 113-129, 1991.

SILVA, G. D.; IHA, K. Polimorfismo: caracterização e estudo das propriedades de uma fase cristalina. **Journal of aerospace technology and management**, v. 2, n.3, p. 331-338, 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1981. 460 p.

SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SMITH, R. B. **Introduction to Hyperspectral Imaging**. Nebraska: MicrolImages, 2012. 23 p.

TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSKI, B. Selectivity, local rank, three way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. **Journal of chemometrics**, v. 9, p. 31-58, 1995.

THRELFALL, T. L. Analysis of organic polymorphs – a review. **Analyst**, v. 120, p. 2435-2460, 1995.

TIAN, F., et al. Influence of sample characteristics on quantification of carbamazepine hydrate formation by X-ray powder diffraction and Raman spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n.3, p. 466-474, 2007.

TREVISAN, M. G. **Relatório de caracterização polimórfica: Fexofenadina.HCl**. Instituto Cláudia Marques, 2010. 8 p.

USP. The United States Pharmacopeia, **USP 30-NF25**, 2007

WHITNEY, A. Drug discovery program. Disponível em:
<<http://drugdiscovery.georgetown.edu/about/vision/>>. Acesso em: 21 set. 2011.

WILL, G. **Powder Diffraction: The Rietveld method and the two-stage method**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. 224 p.

WISE, B. M., et al. **Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo**. Wenatchee: Eigenvector Research, 2006. 414 p.

ZIÉMONS, E., et al. Determination of binary polymorphic mixtures of fluconazole using near infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction: A comparative study based on the pre-validation stage results. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n.5, p. 1208-1212, 2011.