

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DE REGRESSÃO iPLS EM CONJUNTO
COM A ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A ANÁLISE QUALITATIVA
E QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DO FÁRMACO CLORIDRATO DE
SERTRALINA**

Bolsista FAPEAM: Adonilson Fernandes Pinheiro

MANAUS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDOS AMBIENTAIS

**APLICAÇÃO DO MÉTODO DE REGRESSÃO iPLS EM CONJUNTO
COM A ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A ANÁLISE QUALITATIVA
E QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DO FÁRMACO CLORIDRATO DE
SERTRALINA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, com área de concentração: Métodos Analíticos e Estudos Ambientais.

Adonilson Fernandes Pinheiro, FAPEAM

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio dos Santos Farias

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P654a Pinheiro, Adonilson Fernandes
Aplicação do método de regressão iPLS em conjunto com a espectroscopia Raman para a análise qualitativa e quantitativa de polimorfos do fármaco cloridrato de sertralina / Adonilson Fernandes Pinheiro. 2019
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marco Antonio dos Santos Farias
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cloridrato de Sertralina. 2. Polimorfismo. 3. Espectroscopia Raman. 4. Quimiometria. I. Farias, Marco Antonio dos Santos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

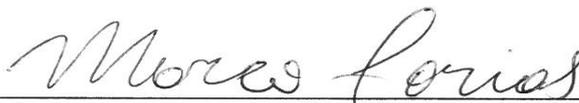
**“APLICAÇÃO DE MÉTODO DE REGRESSÃO IPLS EM
CONJUNTO COM A ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A
ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE POLIMORFOS
DO FÁRMACO CLORIDRATO DE SERTRALINA”**

Adonilson Fernandes Pinheiro

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 24 de abril de 2019.

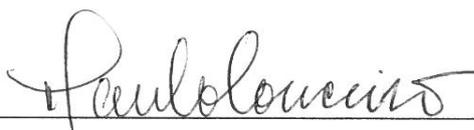
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Marco Antonio dos Santos Farias
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Dr.^a Juliana de Jesus Rocha Pardauil
Membro Externo/UFAM



Dr. Paulo Rogério da Costa Couceiro
Membro UFAM.

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 24 de abril de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a minha avó Maria Rodrigues de Lima (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter concedido o dom da vida e pela a oportunidade de cursar o mestrado, por me manter focado e firme durante essa caminhada árdua de dois anos para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Francisco Vital e Nilza Rodrigues, que apesar de terem baixo grau de escolaridade me ensinaram princípios primordiais para ser um cidadão de boa conduta.

Aos meus irmãos, em especial a Aldineia, Aldiane, Adonias e Vital Filho por terem acreditado no meu potencial e sempre terem me apoiado na minha caminhada em busca dos meus objetivos, pelo amor e carinho de todos.

Ao orientador prof. Dr. Marco Antonio dos Santos Farias pela a oportunidade concedida e pelos ensinamentos transmitidos durante esses dois anos de mestrado. Agradeço imensamente pela orientação, compreensão e paciência.

À minha namorada Oriane Andrade, pelo o amor, carinho, companheirismo e apoio.

Ao amigo de linha de pesquisa Rafael Cândido e aos colegas de curso, Wagner, Thiago, Moacir, Jelmir e Robson pela amizade e companheirismo.

Ao prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro da UFSCar por ter cedido o Laboratório do Grupo de Quimiometria Aplicada (GQA) para a realização das análises Raman e aos colegas Benedito, Cecília, Thaísa, Wilson, Camila, Karla e Wallace que compartilharam o espaço.

Ao Laboratório de Materiais (LabMat) pela realização das análises de DRX e ao Laboratório de Materiais da Amazônia e Compósitos (LaMAC) por ter realizado as análises térmicas.

À FAPEAM pela bolsa de estudo concedida.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação esquemática da estrutura de polimorfos, amorfo e solvato. | 2 |
| Figura 2: Estrutura molecular do cloridrato de sertralina em duas dimensões. | 8 |
| Figura 3: Sistema de classificação BCS. | 11 |
| Figura 4: Curva genérica para um experimento DSC. I) mudança de linha de base sem pico; II e III) picos endotérmicos; IV) pico exotérmico. | 15 |
| Figura 5: TGA dinâmico para ezetimiba hidratada (círculo) e ezetimiba anidra (quadrado). | 16 |
| Figura 6: Representação esquemática da difração de raios X por planos de átomos (A-A' e B-B'). | 18 |
| Figura 7: As 14 estruturas cristalinas possíveis para um sólido (redes de Bravais). | 20 |
| Figura 8: Esquema de um instrumento de Difração de raios X; T = fonte de raios X, S = amostra, C = detector e O = o eixo ao redor do qual giram a amostra e o detector. | 21 |
| Figura 9: Sensibilização do detector pelas linhas de difração referente aos planos do cristal. | 22 |
| Figura 10: Espectro de MIR para um API. | 25 |
| Figura 11: Espectro de NIR para um API. | 26 |
| Figura 12: Origens do Espalhamento Rayleigh e Raman. | 27 |
| Figura 13: Espectro Raman para um API. | 28 |
| Figura 14: Espectro Raman para 3 polimorfos do API sulfadiazina. | 32 |
| Figura 15: Representação dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados, (c) uma matriz de dados. | 34 |
| Figura 16: Difratoograma da análise de difração de raios X para o SRTL-I. | 49 |
| Figura 17: Difratoograma da análise de difração de raios X para o SRTL-ET. | 50 |
| Figura 18: Difratoograma da análise de difração de raios X para o SRTL-H. | 51 |
| Figura 19: Curvas das análises de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) dos polimorfos: (a) SRTL-I, (b) SRTL-ET e (c) SRTL-H do fármaco cloridrato de sertralina. | 53 |
| Figura 20: Análise da curva TGA para SRTL-I (linha retilínea) e SRTL-ET (linha tracejada). Em (a) é mostrado o gráfico em seu tamanho real e (b) o gráfico ampliado. | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 21: Análise da curva TGA para SRTL-I (linha retilínea) e SRTL-H (linha tracejada). Em (a) é mostrado o gráfico em seu tamanho real e (b) a imagem ampliada. | 56 |
| Figura 22: Espectro Raman para os polimorfos SRTL-I (preto), SRTL-ET (azul) e SRTL-H (vermelho) do fármaco cloridrato de sertralina. | 58 |
| Figura 23: Quantidade de variáveis selecionadas pelo modelo da mistura binária. Em cinza é mostrado que o modelo iPLS foi calculado selecionando o intervalo de variáveis de 240 a 280 (40 variáveis). | 61 |
| Figura 24: Valores da raiz quadrada do erro da validação cruzada (RMSECV) versus o número de variáveis latentes. | 62 |
| Figura 25: Valores reais versus valores preditos pelo modelo iPLS para a mistura binária dos polimorfos de cloridrato de sertralina: a) SRTL-I, b) SRTL-H. | 65 |
| Figura 26: Espectros Raman dos excipientes dióxido de silício, estearato de magnésio, amido e povidona. | 69 |
| Figura 27: Quantidade de variáveis selecionadas pelo modelo da mistura binária na presença de excipientes. Em cinza é mostrado que o modelo iPLS foi calculado selecionando o intervalo de variáveis de 550 a 600 (50 variáveis). | 70 |
| Figura 28: Valores da raiz quadrada do erro da validação cruzada (RMSECV) versus o número de variáveis latentes. | 71 |
| Figura 29: Valores reais versus valores preditos pelo modelo iPLS para a mistura binária dos polimorfos de cloridrato de sertralina na presença de excipientes: a) SRTL-I, b) SRTL-H. | 73 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: 28 formas conhecidas do cloridrato de sertralina e suas respectivas patentes..... | 9 |
| Tabela 2: Regiões espectrais do infravermelho. | 23 |
| Tabela 3: Massa em miligramas dos polimorfos de cloridrato de sertralina nas amostras de calibração e validação. Em parênteses a porcentagem em massa de cada polimorfo na amostra. | 45 |
| Tabela 4: Porcentagens e massas individuais em miligramas dos excipientes e APIs. | 46 |
| Tabela 5: Parâmetros analíticos para o modelo iPLS dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H com a realização de pré-tratamentos. | 63 |
| Tabela 6: Parâmetros analíticos para o modelo iPLS dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H sem a realização do pré-tratamento de dados..... | 66 |
| Tabela 7: Parâmetros analíticos para o modelo iPLS dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H..... | 72 |

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

- API** - Active Pharmaceutical Ingredient (Ingrediente Farmacêutico Ativo)
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BCS** - Biopharmaceutical Classification System (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)
- DSC** - Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)
- DRX** - Difração de Raios X
- FDA** - Food and Drug Administration (Administração de Drogas e Alimentos)
- FIR** - Far- infrared (infravermelho distante)
- HPLC** - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- HSM** - Hot Stage Microscopy (Microscopia com estágio com aquecimento)
- iPLS** – Interval Partial Least Squares Regression (regressão por quadrados mínimos parciais por intervalos)
- MIR** - Mid infrared (Infravermelho Médio)
- NIR** - Near infrared (Infravermelho Próximo)
- MLR** - Multiple Linear Regression (Regressão Linear Múltipla)
- NIPALS** - Non-linear iterative Partial Least Squares (Mínimos Quadrados Parciais Iterativo Não-linear)
- OSC** – Orthogonal Signal Correction (Correção Ortogonal de Sinal)
- PAT** - Process Analytical Technology (Tecnologia Analítica em Processo)
- PLS** - Partial Least Squares Regression (Regressão por Quadrados Mínimos Parciais)
- PCR** - Principal Component Regression (Regressão pelo método das Componentes Principais)
- RMSEC** - Root Mean Square Error of Calibration (Raiz Quadrada do Erro Médio de Calibração)
- RMSECV** - Root Mean Square Error of Cross Validation (Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada)
- RMSEP** - Root Mean Square Error of Prediction (Raiz Quadrada do Erro Médio de Predição)
- SNV** – Standard Normal Variate (Padronização Normal de Sinal)
- SRTL** - Cloridrato de Sertralina
- SSNMR** – Solid State Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido)
- TGA** - Thermogravimetric Analysis (Análise Termogravimétrica)

RESUMO

Os Ingredientes Farmacêuticos Ativos (APIs) presentes nos fármacos em estado sólido podem existir em mais de uma fase cristalina, configurando-se em um fenômeno conhecido como polimorfismo. Os polimorfos podem exibir diferentes valores em propriedades físico-químicas e farmacocinéticas como solubilidade, velocidade de dissolução, biodisponibilidade, além de poderem acarretar sérios problemas no processo de produção e afetar o efeito terapêutico pretendido pelo fármaco. Diversas técnicas de análise têm sido utilizadas para a identificação desse fenômeno, contudo ainda não há um método padrão pelos quais os órgãos reguladores se baseiam para a quantificação de polimorfos. A espectroscopia Raman apresenta muitas vantagens para este fim, pois não é destrutiva, não é invasiva, não requer preparação de amostras e os resultados são obtidos em minutos, além de possuir características de alta seletividade. Essa, dentre outras características, favorece a utilização dessa técnica para qualificação/quantificação simultânea de APIs e excipientes em medicamentos. Neste trabalho foi avaliado o emprego do método de calibração multivariada do tipo iPLS para a análise qualitativa e quantitativa em dados de espectroscopia Raman obtidos a partir de amostras de misturas polimórficas na presença e ausência de excipientes do fármaco cloridrato de sertralina. Nesse sentido, o primeiro passo foi sintetizar e confirmar as estruturas polimórficas pelas técnicas DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman. Em seguida, deu-se início a construção dos modelos baseado no planejamento de mistura binária entre o próprio API comercializado no medicamento (SRTL-I) e de seu hidrato (SRTL-H) sintetizado por meio da recristalização do solvato de etanol em água. Para melhorar o desempenho dos modelos, foi empregado diferentes algoritmos de pré-tratamentos para reduzir os efeitos das variações sistemáticas, sendo a normalização pela área, variação normal padrão (SNV) e correção ortogonal de sinal (OSC) os mais adequados para o conjunto de dados. O resultado do planejamento de misturas binárias das amostras de 50 mg (mistura de SRTL-I e SRTL-H), proporcionaram um modelo iPLS com erros de predição de 2,6 mg para o SRTL-I e de 2,4 mg para o SRTL-H. Para o planejamento de mistura binária com os excipientes comumente utilizados na formulação, apesar da presença desses interferentes, os resultados foram ainda mais promissores. Considerando a simulação dos polimorfos na presença de excipientes de um comprimido de cloridrato de sertralina com aproximadamente 300 mg, sendo 250 mg de excipientes e 50 mg de cloridrato de sertralina (mistura de polimorfos), os erros de predição foram de 1,42 mg para o SRTL-I e de 1,02 mg para o SRTL-H. Os resultados obtidos mostram que a espectroscopia Raman em combinação com o método de regressão iPLS são adequados para quantificar mistura binária de polimorfos de cloridrato de sertralina.

Palavras-chave: Cloridrato de Sertralina, Polimorfismo, Espectroscopia Raman, Quimiometria.

ABSTRACT

Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) present in solid-state drugs may exist in more than one crystalline phase, forming a phenomenon known as polymorphism. Polymorphs may exhibit different values in physico-chemical and pharmacokinetic properties such as solubility, dissolution rate, bioavailability, and may cause serious problems in the production process and affect the intended therapeutic effect of the drug. Several techniques of analysis have been used to identify this phenomenon, however there is still no standard method by which the regulatory bodies are based for the quantification of polymorphs. Raman spectroscopy has many advantages for this purpose, since it is not destructive, it is not invasive, it does not require preparation of samples and the results are obtained in minutes, besides having characteristics of high selectivity. This, among other characteristics, favors the use of this technique for the simultaneous qualification/quantification of APIs and excipients in medicines. In this work the use of the multivariate calibration method of the iPLS type was evaluated for qualitative and quantitative analysis of Raman spectroscopy data obtained from samples of polymorphic mixtures in the presence and absence of excipients of the drug sertraline hydrochloride. In this sense, the first step was to synthesize and confirm the polymorphic structures by the DRX, DSC, TGA and Raman spectroscopy techniques. Then, the construction of the models was started based on the planning of binary mixing between the API commercially available on the drug (SRTL-I) and its hydrate (SRTL-H) synthesized by recrystallization of the ethanol solvate in water. In order to improve the performance of the models, different pretreatment algorithms were used to reduce the effects of the systematic variations, being the normalization by area, standard normal variation (SNV) and orthogonal signal correction (OSC) of data. The result of planning binary mixtures of the 50 mg samples (SRTL-I and SRTL-H mixture) provided an iPLS model with prediction errors of 2.6 mg for SRTL-I and 2.4 mg for the SRTL-H. For planning binary mixing with the excipients commonly used in the formulation, despite the presence of these interferents, the results were even more promising. Considering the simulation of the polymorphs in the presence of excipients of a sertraline hydrochloride tablet of approximately 300 mg, 250 mg of excipients and 50 mg of sertraline hydrochloride (mixture of polymorphs), the prediction errors were 1.42 mg for the SRTL-I and 1.02 mg for the SRTL-H. The results obtained show that Raman spectroscopy in combination with the iPLS regression method are suitable to quantify binary mixture of sertraline hydrochloride polymorphs.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Considerações Gerais: Polimorfismo em fármaco | 1 |
| 1.2 Implicações do polimorfismo na indústria farmacêutica | 2 |
| 1.3 A indústria de genéricos e quebra de patentes | 5 |
| 1.4 Produção de fármacos genéricos..... | 7 |
| 1.4.1 Cloridrato de Sertralina | 7 |
| 1.5 Órgãos regulamentadores e técnicas analíticas utilizadas na identificação de polimorfos | 11 |
| 1.5.1 Análises Térmicas: DSC e TGA | 13 |
| 1.5.2 Difração de raios X..... | 17 |
| 1.5.2.1 Lei de Bragg..... | 18 |
| 1.5.3 Técnicas vibracionais: espectroscopia Infravermelho e Raman | 22 |
| 1.5.3.1 Diferenciação de formas polimórficas por espectroscopia Raman..... | 31 |
| 1.5.3.2 Métodos quimiométricos aplicados à espectroscopia Raman..... | 32 |
| 1.6 Metodologia Quimiométrica | 33 |
| 1.6.1 Calibração multivariada..... | 33 |
| 1.6.1.1 PLS e iPLS..... | 37 |
| 1.6.2 Parâmetros que avaliam a qualidade de um modelo de regressão multivariado | 38 |
| 2. OBJETIVOS | 41 |
| 2.1 Geral | 41 |
| 2.2 Específicos..... | 41 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 3.1 Amostras..... | 42 |
| 3.1.1 Excipientes..... | 42 |
| 3.1.2 Preparação dos polimorfos | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.1.3 Caracterização dos polimorfos..... | 43 |
| 3.1.4 Planejamento para a quantificação simultânea de mistura binária dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H usando espectroscopia Raman e o método de regressão multivariada do tipo iPLS..... | 44 |
| 3.1.5 Planejamento para a quantificação simultânea de mistura binária dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman e métodos de calibração multivariada do tipo iPLS | 46 |
| 3.2 Pré-tratamento dos dados e parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade do modelo | 47 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 4.1 Síntese e caracterização por DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman dos polimorfos SRTL-I, SRTL-ET e SRTL-H do fármaco cloridrato de sertralina | 49 |
| 4.1.1 Caracterização por DRX | 49 |
| 4.1.2 Caracterização por DSC | 52 |
| 4.1.3 Caracterização por TGA | 54 |
| 4.1.4 Caracterização por Espectroscopia Raman..... | 57 |
| 4.2 Quantificação simultânea de mistura binária, por meio de iPLS, dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H usando espectroscopia Raman. | 60 |
| 4.3 Quantificação simultânea da mistura binária, por meio de iPLS, dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H na presença de excipientes empregando espectroscopia Raman | 68 |
| 5. CONCLUSÃO | 75 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 76 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais: Polimorfismo em fármaco

A formulação de fármacos em estado sólido é constituída de princípio ativo e excipientes. O ingrediente farmacêutico ativo (API, do inglês *Active Pharmaceutical Ingredient*) é a substância responsável pelos efeitos terapêuticos pretendidos pelo medicamento, capaz de tratar um órgão ou tecido que tenha sofrido um processo patológico (BRASIL, 2010). Já, os excipientes promovem a proteção do API e garantem a sua liberação em local adequado no organismo, otimizando a ação terapêutica desejada pelo fármaco (ELDER et al., 2016).

Contudo, o fármaco durante o processo de produção, embalagem e estocagem pode sofrer algumas alterações dos componentes químicos presentes em sua formulação (TAYLOR & LANGKILDE, 2000). Dentre as possíveis alterações está a mudança na estrutura cristalina do API, configurando-se em um fenômeno conhecido como polimorfismo. Também pode passar pelo processo de solvatomorfismo, onde o API adsorve moléculas de um determinado solvente, como a água, em proporção estequiométrica.

Algumas definições para polimorfismo são relatadas na literatura, Anwar e Zahn (2017) o define como: “a capacidade de uma substância, de composição química constante, existir no estado sólido em mais de uma estrutura cristalina”. Enquanto, o termo solvatomorfismo, por outro lado, é mais adequado para designar formas cristalinas em que uma ou mais moléculas de solventes fazem parte da estrutura cristalina. Quando o solvente incluído na rede cristalina é a água, então o termo hidrato é mais adequado para designar esses sólidos (CALVO et al., 2018a; CHAVAN & KADAM, 2016). O solvatomorfismo também é referido de pseudopolimorfo (BRITAIN, 2012; GIRON, 1995).

Além disso, ainda há os sólidos amorfos, que diferentemente dos compostos cristalinos que apresentam ordem espacial em todas as três dimensões do espaço, os amorfos não possuem ordenação espacial de longo alcance na sua estrutura molecular (CALVO et al., 2018a). A Figura 1 representa esquematicamente a estrutura de polimorfos, amorfo e solvato.

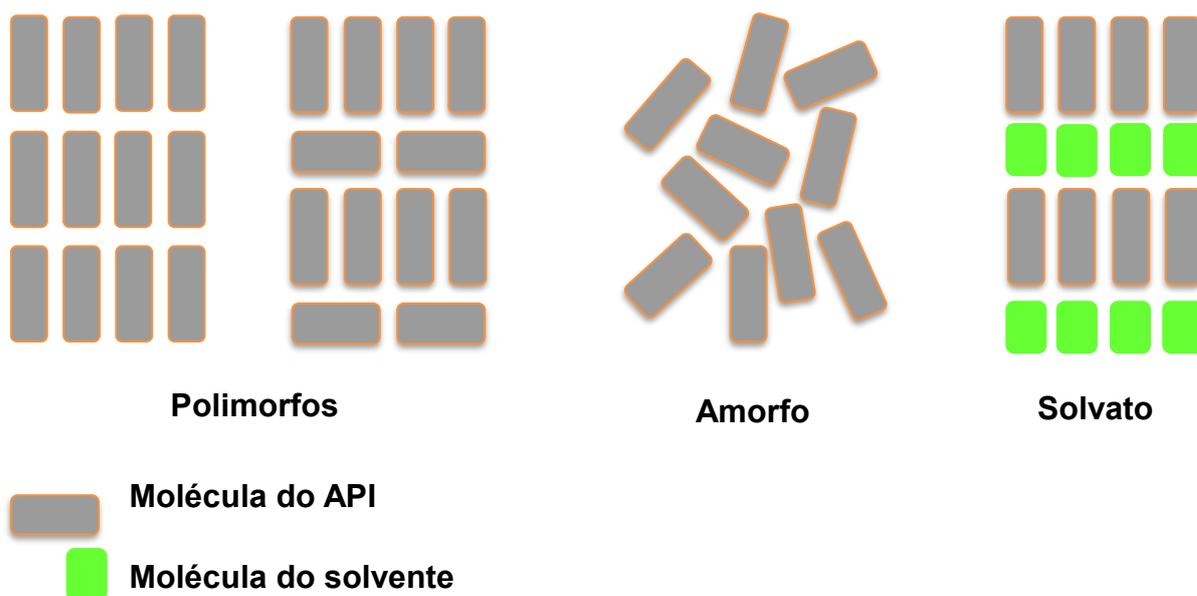


Figura 1: Representação esquemática da estrutura de polimorfos, amorfo e solvato.
 Fonte: Adaptado de Prado e Rocha (2015).

1.2 Implicações do polimorfismo na indústria farmacêutica

As diferenças na estrutura cristalina provocadas pelo fenômeno polimorfismo e solvatomorfismo induzem variações nas propriedades químicas e físicas do API como solubilidade, taxa de dissolução, ponto de fusão, densidade, morfologia do cristal, propriedades ópticas e mecânicas, entre outras (LEE et al., 2011). Essas alterações, por sua vez, podem ter um impacto significativo na biodisponibilidade, processabilidade (fluxo do pó, compressibilidade, entre outras) e estabilidade química e física que podem comprometer a qualidade do produto final (PRADO & ROCHA, 2015).

Dentre as propriedades que podem ser afetadas, destaca-se a biodisponibilidade. A biodisponibilidade pode ser descrita como uma relação entre a taxa de dissolução *in vivo* e a velocidade de absorção do fármaco (DE ARAUJO et al., 2012), conseqüentemente, quanto menor a taxa de dissolução menor será a velocidade de absorção no organismo (SINGHAL & CURATOLO, 2004). Portanto, a ocorrência de polimorfismo pode interferir de maneira direta na taxa de dissolução do API, alterando a quantidade do mesmo que se solubiliza e que é absorvida. E como o efeito terapêutico dos fármacos depende da sua concentração no sítio de ação, o

fenômeno polimorfismo pode comprometer a velocidade com que o fármaco é liberado no organismo.

Na indústria farmacêutica, o polimorfismo é considerado um fenômeno de grande importância, pois pode alterar diversas propriedades físico-químicas do fármaco, comprometendo o produto final. Haleblan e McCrone (1969) relataram sobre a relevância do polimorfismo em fármacos. Porém, somente em 1998 com o evento ocorrido com o fármaco Ritonavir é que as agências reguladoras como a FDA (Food and Drug Administration) reconheceram a importância de se fiscalizar a ocorrência de polimorfismo em fármacos. O caso Ritonavir é, sem sombras de dúvidas, o caso mais emblemático envolvendo a formação do polimorfismo em API sobre produtos farmacêuticos comerciais.

O Ritonavir (antirretroviral) é utilizado por pacientes portadores do vírus da AIDS. Segundo relatos da companhia Abbott® (empresa responsável pela sua fabricação) houve uma mudança na estrutura cristalina do API que estava afetando sua biodisponibilidade (BAUER et al., 2001). Essa ocorrência se deu, porque durante o seu desenvolvimento, era conhecida somente uma forma cristalina do ritonavir (forma I) que apresentava baixa solubilidade no organismo. Recorreu-se então a solução de encapsular o fármaco em uma cápsula gelatinosa contendo o fármaco dissolvido em solução hidroalcoólica, para aumentar sua solubilidade. Após dois anos de seu lançamento, houveram relatos de ineficácia clínica, sendo requerida a avaliação dos lotes que apresentavam falhas. O resultado da avaliação revelou uma segunda forma cristalina do Ritonavir, termodinamicamente mais estável e muito menos solúvel, que posteriormente ficou sendo conhecida como forma II (CHEMBURKAR et al., 2000; MORISSETTE et al., 2003). Como a venda anual do ritonavir estava estipulada em 250 milhões de dólares por ano, a sua retirada do mercado mundial, desencadeou um prejuízo financeiro de aproximadamente meio bilhão de dólares a companhia Abbott® (FARIAS, 2015).

Após o ocorrido, houve um aumento expressivo no número de artigos científicos relatando sobre a temática e propondo maneiras de identificar e quantificar polimorfos em comprimidos (FARIAS, 2015).

Alguns autores destacam que a maior parte dos compostos orgânicos e inorgânicos de importância farmacêutica podem existir em uma ou mais forma

cristalina, sendo cristalizados em diferentes tipos de empacotamento e/ou conformações (VIPAGUNTA et al., 2001). De forma ainda mais precisa, Stahly (2007) destaca que entre 80-90% os compostos orgânicos farmacêuticos podem sofrer mudanças na sua estrutura cristalina, que ocorrem quando são submetidos ao processo de fabricação, embalagem e estocagem. Exemplos de etapas da produção de sólidos farmacêuticos que podem provocar transições polimórficas são: redução do tamanho de partícula, granulação, secagem, compressão, revestimento, entre outras (ZHANG et al., 2004).

Essas possíveis transições entre as formas polimórficas podem causar problemas de formulação. Na indústria farmacêutica, a ocorrência inesperada de uma transição polimórfica pode gerar sérios problemas referentes a qualidade dos fármacos, causando atrasos no desenvolvimento da formulação, interrupções de fabricação ou cancelamento da comercialização (RAW et al., 2004).

Sendo assim, a escolha da formulação adequada é de suma importância na etapa de desenvolvimento do fármaco, uma vez que, estruturas cristalinas distintas acarretarão em diferentes propriedades físicas e químicas (SINGHAL & CURATOLO, 2004). Logo, a compreensão dos possíveis polimorfos que um API pode apresentar é indispensável para indicar o polimorfo mais apropriado para uma determinada formulação.

Embora um fármaco possa coexistir em duas ou mais formas polimórficas ou fases cristalinas, geralmente o polimorfo escolhido na linha de produção é o mais estável termodinamicamente, para garantir que não ocorra transição polimórfica ao longo de sua vida útil nas condições adversas ao qual é submetido no processo de produção e armazenamento do fármaco (SINGHAL & CURATOLO, 2004). No entanto, o polimorfo mais estável, exibe, normalmente, maior ponto de fusão, menor solubilidade e conseqüentemente menor biodisponibilidade (DE ARAUJO et al., 2012).

Os sólidos amorfos, apesar de sua instabilidade química, são de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, pois a sua dissolução em fluidos orgânicos é facilitada pelo o fato de seu estado energético ser maior do que quando em estrutura cristalina, minimizando assim, o gasto de energia para o rompimento de uma estrutura cristalina e a sua taxa de solubilidade torna-se mais elevada. No entanto, por serem instáveis a sua transição polimórfica pode ocorrer facilmente para uma estrutura

cristalina mais estável. Com isso, é possível afirmar que o uso de amorfos como API exigiria uma série de recursos na linha de produção, estocagem e transporte o que tornaria o produto final com preço mais elevado que o normal (FARIAS, 2015).

Há situações específicas, em que o desenvolvimento de uma forma metaestável ou amorfa pode ser justificado, em virtude do benefício médico alcançado. Essas situações incluem o aumento da taxa de dissolução ou maior concentração, de modo a obter uma rápida absorção pelo organismo, e ainda a situação em que a droga permanece amorfa apesar dos esforços extensos para cristalizar (SINGHAL & CURATOLO, 2004).

Dessa forma, pelo fato de haver a possibilidade de ocorrência de transição polimórfica durante o processo de fabricação, embalagem e estocagem do API é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que identifique a transição polimórfica em tempo real, durante o processo de produção, de forma que haja um controle do polimorfismo de substâncias medicamentosas para garantir a qualidade, segurança e desempenho do produto final.

1.3 A indústria de genéricos e quebra de patentes

A lei sobre medicamentos genéricos (lei Nº 9.787, datada de 10/02/1999) impulsionou o crescimento da indústria de fármacos no Brasil. Essa lei descreve que o medicamento genérico deve ser similar ao fármaco de referência ou inovador, que se pretende ser como este intercambiável, sendo comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade. Geralmente os medicamentos genéricos são produzidos após a expiração ou renúncia da proteção da patente ou de outros direitos de exclusividade. Além disso, a lei destaca ainda, que os fármacos genéricos devem apresentar melhores condições de preços (ARAÚJO et al., 2010).

De acordo com o levantamento realizado pela revista “Exame” em maio de 2015, as dez maiores empresas do ramo no mercado brasileiro movimentaram um montante de 1,5 bilhões de dólares no primeiro trimestre de 2015 (EXAME, 2015). O valor mencionado dá uma ideia da relevância econômica do setor na economia brasileira.

Do ponto de vista comercial ou econômico a quebra da patente traz grande mudança na captação de recursos das empresas que desenvolveram o fármaco de referência e detiveram o direito de comercialização pelos anos que a patente assegurou o direito exclusivo de venda.

Em razão da concorrência estabelecida por conta da lei de medicamentos genéricos, as empresas detentoras do fármaco de referência recorreram a outros meios legais para garantir a liderança na venda de seus fármacos. Um dos recursos utilizados por tais empresas, afim de evitar a concorrência direta, é patentear polimorfo que apresenta: maior estabilidade, melhor biodisponibilidade, ou ainda melhor processabilidade, isto é, polimorfo que melhor se adéqua a linha de produção (MENDES et al., 2014).

É importante enfatizar que os anos de produção sem concorrência fazem com que a empresa do fármaco de referência tenha vantagem de realizar os estudos que indicam qual a melhor forma polimórfica de se obter para fins industriais e de biodisponibilidade, fazendo com que essa empresa esteja sempre um passo à frente da indústria de genéricos. Sendo assim, quando a patente do API está em vias de ser quebrada, a patente dos polimorfos que geram os melhores resultados para a formulação do fármaco é depositada, protegendo a empresa líder e garantindo o monopólio jurídico de comercialização por muito mais tempo. Como a forma polimórfica é patenteada pela empresa líder, a indústria de genéricos não pode produzir o mesmo polimorfo. Caso isso ocorra haverá uma série de implicações jurídicas que causará grande impacto econômico na indústria que faz o fármaco genérico.

Pelo que foi exposto até o momento justifica-se a pesquisa que desenvolva métodos analíticos para qualificar e quantificar as formas polimórficas presentes em uma formulação farmacêutica. Com esse método analítico em mãos, tanto a indústria de genéricos quanto os órgãos reguladores podem controlar a qualidade dos produtos a serem comercializados.

1.4 Produção de fármacos genéricos

Anualmente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) elabora uma lista de fármacos que tiveram suas patentes quebradas, ou vencidas pelo tempo, e que serão produzidos pela indústria de fármacos genéricos. A lista referente aos anos de 2010 até 2015 conta com 165 medicamentos inéditos, a grande maioria em estado sólido (ANVISA, 2017). Todos esses medicamentos possuem um fármaco de referência, possivelmente protegidos por patente para o polimorfo de maior biodisponibilidade e termodinamicamente estável para a manipulação na linha de produção.

1.4.1 Cloridrato de Sertralina

O cloridrato de sertralina está entre os fármacos que tiveram liberação da ANVISA para ser produzido na indústria nacional. Esse fármaco foi aprovado pela FDA sob a marca comercial Zolof® (AL-NIMRY & JABER, 2017). É utilizado para tratamento de depressão acompanhado de sintomas de ansiedade, sendo indicado para o tratamento de uma série de transtornos, como: transtorno obsessivo compulsivo (TOC), transtorno do estresse pós-traumático (TEPT) e transtorno de ansiedade social (Fobia Social) (ZHOU & FOLEY, 2004). Sua introdução ao mercado ocorreu em 1991 pela Pfizer, sendo em 2013, o antidepressivo mais prescrito e a segunda medicação psiquiátrica mais prescrita no mercado varejista dos EUA, com mais de 41 milhões de prescrições (ANERAO et al., 2016).

A fórmula molecular do cloridrato de sertralina é $C_{17}H_{18}Cl_3N$, sua massa molecular é de $342,7 \text{ g.mol}^{-1}$, sua nomenclatura IUPAC é cloridrato de cis-(1S, 4S)-4-(3,4-diclorofenil)-1,2,3,4-tetra-hidro-N-metil-1-nanftalenamina (ZHOU & FOLEY, 2004) e sua estrutura molecular em duas dimensões se apresenta na Figura 2.

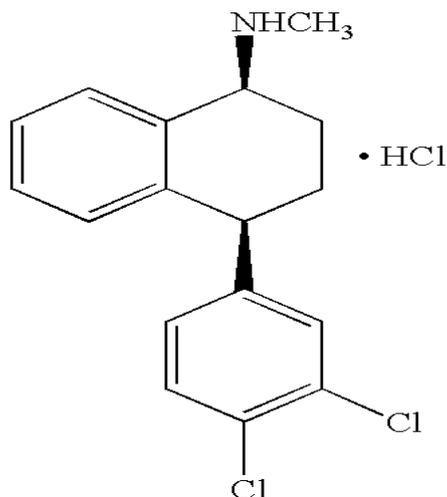


Figura 2: Estrutura molecular do cloridrato de sertralina em duas dimensões.
Fonte: Schwartz et al. (2002).

Existem registros de até 28 formas do cloridrato de sertralina, incluindo 17 polimorfos, 4 solvatos, 6 hidratos e uma fase amorfa, conforme descrito em patentes (ALMARSSON et al., 2003; CHAVAN & KADAM, 2016; HE et al., 2010). Portanto, é um composto farmacêutico que apresenta alta probabilidade de sofrer transição polimórfica (CHAVAN & KADAM, 2016; REMENAR et al., 2003). Essa transição pode ser facilitada durante a manipulação realizada na linha de produção e estocagem do fármaco.

O polimorfo I do cloridrato de sertralina (SRTL-I) é a forma utilizada comercialmente nos comprimidos (ALMARSSON et al., 2003). A Tabela 1 apresenta as 28 formas conhecidas do cloridrato de sertralina e suas respectivas patentes. Nas patentes são exemplificados os métodos de preparação e as técnicas de caracterização de cada forma polimórfica. Essas formas diferem entre si em sua estabilidade, propriedades físicas e químicas, dados espectrais e seus métodos de preparação.

Tabela 1: 28 formas conhecidas do cloridrato de sertralina e suas respectivas patentes.

| Polimorfos | Patentes |
|------------------------|-----------------|
| I | US 5,248,699 |
| II | US 5,248,699 |
| III | US 5,248,699 |
| IV | US 5,248,699 |
| V | US 5,248,699 |
| VI | WO 00/32551 A1 |
| VII | WO 00/32551 A1 |
| VIII | WO 00/32551 A1 |
| IX | WO 00/32551 A1 |
| X | WO 00/32551 A1 |
| XI | WO 00/32551 A1 |
| XII | WO 00/32551 A1 |
| XIII | WO 00/32551 A1 |
| XIV | WO 00/32551 A1 |
| XV | WO 00/32551 A1 |
| XVI | WO 00/32551 A1 |
| T1 | EP 0 928 784 A1 |
| CSC2 | WO 01/32601 A1 |
| Hidrato CSC1 | WO 01/32601 A1 |
| CSC1 90% RH molhado | WO 01/32601 A1 |
| CSC1 90% RH seco | WO 01/32601 A1 |
| CSC1 50% RH | WO 01/32601 A1 |
| CSC1 20% RH | WO 01/32601 A1 |
| CSC1 0% RH seco | WO 01/32601 A1 |
| Solvato de metanol | WO 01/32601 A1 |
| Solvato de etanol | WO 01/32601 A1 |
| Solvato de isopropanol | WO 01/32601 A1 |
| Amorfo | WO 00/32551 A1 |

Fonte: Almarsson et al. (2003).

Dentre os polimorfos, solvatos e hidratos mostrados na Tabela 1, dependendo das condições pelo qual o API é submetido no processo de produção, o polimorfo comercializado pode se converter facilmente em outras formas polimórficas. Essas condições incluem: exposição a determinados solventes (água, metanol, etanol, isopropanol, entre outros), exposição a diferentes condições de umidades relativa do ar, exposição a altas temperaturas, dentre outros fatores.

A forma III, por exemplo, é obtida a partir da exposição do SRTL-I em temperaturas em torno de 180 °C. A forma VI (SRTL-ET) é um solvato produzido a

partir da dissolução do STRL-I em álcool etílico. O SRTL-ET dar origem aos polimorfos V, VII e VIII (SCHWARTZ et al., 2002). A forma VII é obtida por meio da dissolução do SRTL-ET em água e também é classificado como um hidrato (ALMARSSON et al., 2003), aqui designado como SRTL-H. Os hidratos, geralmente apresentam uma taxa de dissolução menor do que os seus respectivos anidros (PUDIPEDDI; SERAJUDDIN, 2005). Adicionalmente, a secagem da forma SRTL-H em temperatura em torno de 50 °C origina-se o polimorfo IX (SCHWARTZ et al., 2002).

Dessa forma, é possível encontrar mais de uma forma polimórfica na formulação comercializada devido as características de produção do fármaco, o que justifica a importância de realizar análise do produto final para avaliar se ocorreu alguma transição durante o processo de produção.

Conforme descrito por Farias e Carneiro (2014a) a mudança de fase cristalina é facilitada no processo de granulação por via úmida, na qual é adicionada água ao processo para a formação de grânulos e essa granulação é alocada em um leito fluidizado, passando pelo processo de secagem seguido do processo de *Kiln drying*, onde a umidade é evaporada por troca de calor por meio de correntes de ar quente. Logo, existe a possibilidade de mais de uma forma polimórfica coexistir na mesma formulação. Além disso, as transições polimórficas ainda podem ocorrer por conta da transferência de umidade entre excipientes e API conforme evidenciado por alguns pesquisadores (FARIAS et al., 2016), onde comprovam que a hidratação do fármaco Ezetimiba foi promovida pela umidade presente em excipientes.

A FDA elaborou um Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS, do inglês *Biopharmaceutical Classification System*) que é amplamente aceito e citado em vários estudos. Esse sistema baseia-se na permeabilidade (absorção por parte dos tecidos) e a solubilidade do fármaco (capacidade de se solubilizar no organismo) e classifica os fármacos em quatro classes (FDA, 2015), como pode ser visualizado no gráfico exposto na Figura 3.

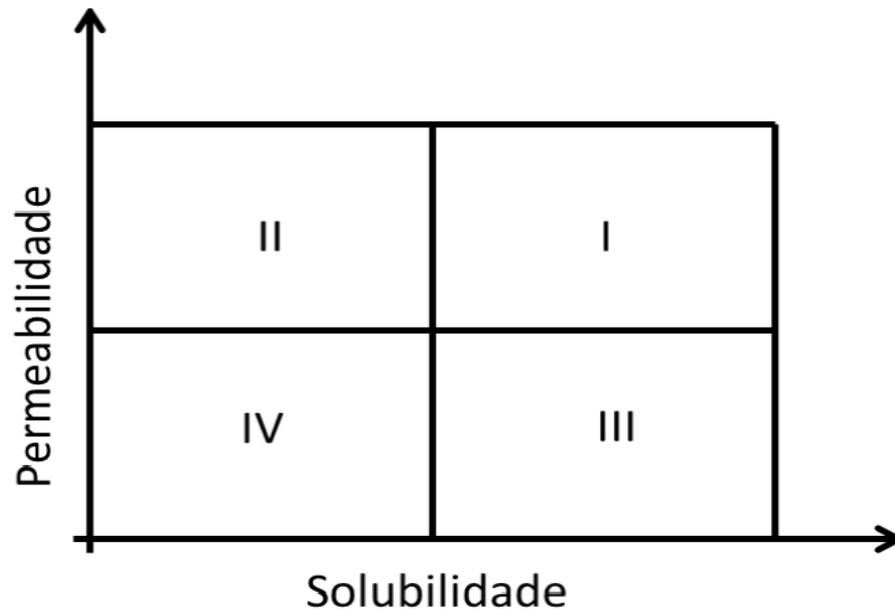


Figura 3: Sistema de classificação BCS.
Fonte: Farias (2015).

Conforme exposto no gráfico da Figura 3 pode-se observar que os fármacos de classe I possuem alta solubilidade e alta permeabilidade, na classe II os fármacos são pouco solúveis e altamente permeáveis, na classe III os fármacos são altamente solúveis e pouco permeáveis e na classe IV os fármacos são pouco solúveis e pouco permeáveis.

De acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica da FDA o cloridrato de sertralina comercializado pertence à classe II, sendo pouco solúvel e bem permeável (SUTTON et al., 2006). A sua solubilidade em água é de $3,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ à temperatura ambiente (WARRIER et al., 2012) e sua biodisponibilidade por administração via oral é de 44 % (AL-NIMRY & JABER, 2017). Logo, se ocorrer a transição polimórfica para um polimorfo de menor solubilidade haverá menor disponibilidade do API no organismo, prejudicando o tratamento médico proposto.

1.5 Órgãos reguladores e técnicas analíticas utilizadas na identificação de polimorfos

Leis e normas que regulamentam a indústria farmacêutica têm como objetivo proteger os consumidores, levando a uma produção sistemática de medicamentos para garantir qualidade, pureza e eficácia (RÄGO & SANTOSO, 2008). O órgão regulador mais importante em nível mundial é a FDA, que estabelece os

parâmetros de qualidade para os produtos comercializados nos Estados Unidos. No Brasil o órgão regulamentador é a ANVISA.

Como relatado anteriormente, devido aos problemas ocorridos com a transição polimórfica do Ritonavir a FDA lançou um guia, datado de 2007, com um conjunto de análises necessárias para se comprovar a qualidade do fármaco. Este guia destaca ainda a responsabilidade da empresa em controlar a fase cristalina caso a qualidade do produto final possa ser afetada (FDA, 2007).

Em geral, as instituições que elaboram farmacopeias são responsáveis por estabelecer os critérios de análise de fármacos, além de alguns atributos de controle de qualidade como porcentagem máxima e mínima permitidas do API num medicamento. A farmacopeia americana United States Pharmacopeia (USP) é a mais aceita ao redor do mundo (USP,2008). A FDA, órgão regulamentador americano, utiliza a USP como base para elaborar o conjunto de normas para controle de qualidade dos fármacos.

A USP apresenta diversos métodos analíticos para serem utilizados no controle de qualidade da matéria prima e do produto acabado, sendo a principal técnica a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE é absoluta entre as técnicas instrumentais utilizadas na indústria farmacêutica, estando presente na análise de pureza de matéria-prima, estudos de degradação, quantificação de impurezas, liberação de produto acabado, testes de dissolução entre outras análises (SUCHARA, 2007).

Contudo, a CLAE é uma técnica ineficaz para análise de polimorfismo devido ao fato deste ser uma característica de compostos orgânicos em estado sólido e a natureza das análises da CLAE ser em estado líquido (HENNIGAN; RYDER, 2013). Outras técnicas analíticas em conjunto são necessárias para análises de polimorfismo em fármacos como sugerido pela FDA (FDA, 2007):

Análises térmicas

- Análise Calorimétrica Exploratória (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*).
- Microscopia em estágio quente (HSM, do inglês *Hot Stage Microscopy*).
- Análise Termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric Analysis*).

Análises por difratometria

- Análise Difração de Raios X (DRX).

Análises espectroscópicas

- Espectroscopia vibracionais: Infravermelho Próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*); Infravermelho Médio (MIR, do inglês *Mid Infrared*) e Espectroscopia Raman.
- Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (SSNMR, do inglês *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*).

Contudo, a utilização de tais técnicas analíticas depende do tipo de informação que se deseja obter acerca do polimorfo (HU et al., 2010). Muitas vezes deseja-se conhecer as propriedades físico-químicas como, ponto de fusão, taxa de solubilidade, tipo de cristal formado entre outros. Nesse contexto necessita-se utilizar mais do que uma técnica analítica, como por exemplo, DSC e DRX. Porém, se o objetivo da análise for a quantificação de misturas polimórficas que pode ocorrer na linha de produção, pode-se utilizar espectroscopia NIR ou Raman (HENNIGAN & RYDER, 2013). No Brasil, a ANVISA sugere as técnicas analíticas citadas pela FDA, mas ainda não nomeou um método padrão para a quantificação de polimorfismo em fármacos (ANVISA, 2013). A seguir serão descritas uma breve revisão e conceitos teóricos das técnicas analíticas utilizadas para caracterização e quantificação de polimorfismo empregadas nessa pesquisa.

1.5.1 Análises Térmicas: DSC e TGA

A análise térmica pode ser definida como um conjunto de técnicas nas quais a propriedade da amostra a ser analisada é monitorada em função do tempo ou temperatura, em que a temperatura da amostra é submetida a uma programação controlada sob uma atmosfera específica (PINDELSKA et al., 2017).

As técnicas térmicas podem ser utilizadas para monitorar processos endotérmicos como: fusão, ebulição, sublimação, vaporização, dessolvatação, transições de fase sólido-sólido, e degradação química, assim também como

processos exotérmicos: cristalização e decomposição oxidativa. Além disso, podem ser utilizadas de forma adequada para o estudo de polimorfismo e solvatomorfismo em fármacos e excipientes, sendo empregadas como técnicas de rotina para estudos de pré-formulação e no controle de qualidade de substâncias medicamentosas (GIRON, 1995).

Dentre as técnicas de análises térmicas, destaca-se a DSC e a TGA, como sendo as mais comumente utilizadas para o estudo do polimorfismo e solvatomorfismo (PRADO & ROCHA, 2015). Essas técnicas podem ser empregadas na caracterização, avaliação de pureza, compatibilidade de formulação farmacêutica, identificação de polimorfismo, estabilidade e decomposição térmica de fármacos (OLIVEIRA et al., 2011). Esses métodos, de forma separada ou em conjunto, são frequentemente os primeiros passos para a pesquisa de polimorfismo e determinação de sua estabilidade, em virtude da rapidez com que se obtêm os resultados, sendo necessário apenas pequenas quantidades de amostras (GIRON, 1995).

Das duas técnicas térmicas supracitadas, a DSC é a técnica mais frequentemente utilizada, especialmente por sua velocidade, simplicidade e disponibilidade (SKOOG et al., 2009). A DSC mede a diferença de energia fornecida entre um material de referência e a amostra que se deseja fazer a análise térmica, em função de um programa de aquecimento ou resfriamento. Essa diferença de fluxo de calor entre a amostra e a referência é referente ao processo endotérmico ou exotérmico ocorrido na amostra (BERNAL et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011).

Os eventos térmicos ocorridos na análise de DSC são, geralmente, registrados em um gráfico de fluxo de calor versus temperatura ou tempo, chamado de termograma. Caso não haja nenhum evento térmico com a amostra, observa-se uma reta no termograma. Por outro lado, quando há algum evento exotérmico, com liberação de calor, é observado um pico para cima no termograma, verificando-se um aumento na temperatura durante o processo. Para um evento endotérmico, com absorção de calor, verifica-se a diminuição na temperatura da amostra, resultando em um pico em sentido oposto (BERNAL et al., 2002).

Dos três tipos de instrumentos de DSC (DSC de compensação de potências, DSC de fluxo de calor e DSC modulado), cujo suas definições e diferenças são encontradas nas referências (SKOOG et al., 2009; BERNAL et al., 2002), a Figura 4

apresenta uma curva típica resultante de um experimento DSC para uma amostra genérica. Uma discussão mais detalhada de como interpretar o termograma para análise qualitativa e quantitativa foi apresentada por Bernal e colaboradores (2002).

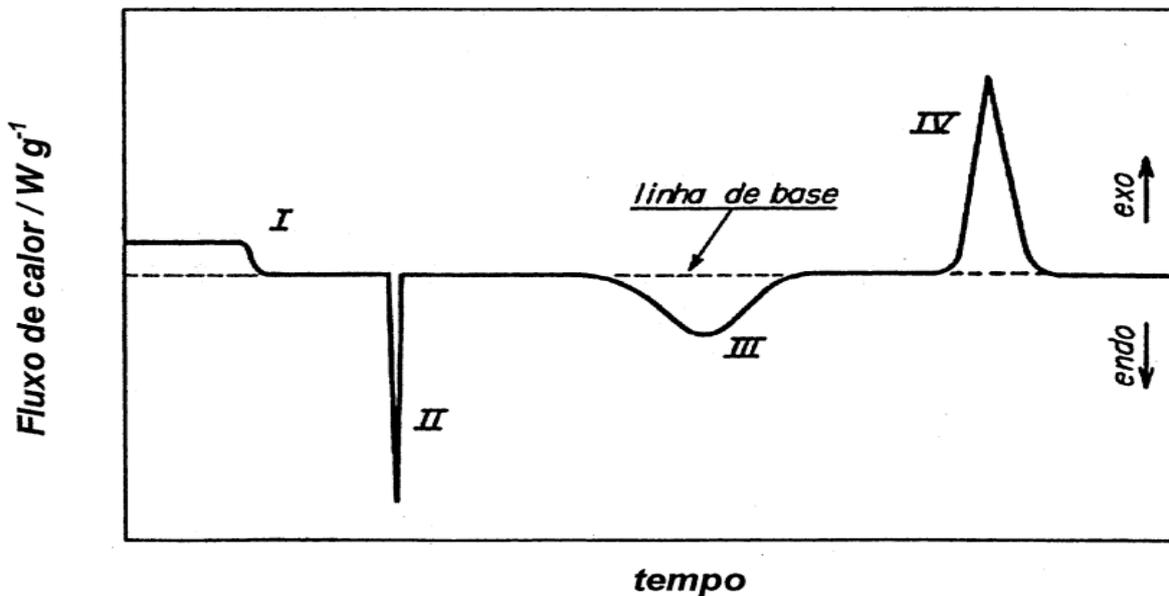


Figura 4: Curva genérica para um experimento DSC. I) mudança de linha de base sem pico; II e III) picos endotérmicos; IV) pico exotérmico.
Fonte: Bernal et al., 2002.

A DSC possui diversas aplicações. No setor farmacêutico, por exemplo, podem ser utilizadas para a caracterização térmica e determinação da pureza de fármacos, estudos de compatibilidade entre os constituintes da formulação e identificação de polimorfismo com determinação das entalpias de cada fase cristalina (OLIVEIRA et al., 2011). Adicionalmente, caso a transição de fase ocorra pela influência da temperatura, por meio de aquecimento ou resfriamento repetidos é possível determinar se tais transições são fenômenos enantiotrópicos reversíveis ou eventos monotrópicos irreversíveis (PINDELSKA et al., 2017).

Uma desvantagem da DSC é a dificuldade de interpretação da curva quando há mais de dois eventos térmicos ocorrendo de maneira sobreposta ou em temperaturas muito próximas (CHIENG et al., 2006). Logo, a diferenciação de polimorfos através de DSC pode ser falha e necessitar de outra técnica analítica.

A TGA é uma técnica térmica mais simples, na qual variação da massa da amostra em uma atmosfera controlada é determinada em função da temperatura ou tempo. Dois tipos de análise de TGA utilizados são: TGA dinâmico, onde “a amostra

é colocada sob as condições de um aumento contínuo de temperatura, geralmente linear com o tempo” e TGA isotérmico/estático, na qual “a amostra é mantida na condição/temperatura durante um período de tempo adequado o qual a variação na massa da amostra é medida” (PINDELSKA et al., 2017). A Figura 5 apresenta um exemplo de TGA dinâmico para o fármaco ezetimiba na sua forma anidra e hidratada.

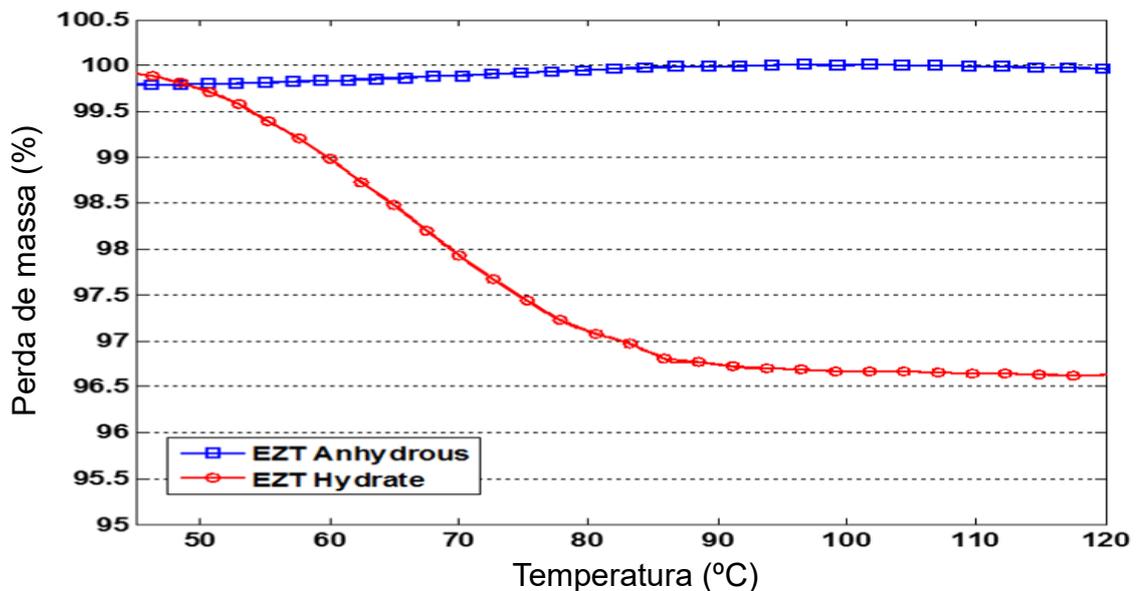


Figura 5: TGA dinâmico para ezetimiba hidratada (círculo) e ezetimiba anidra (quadrado).
Fonte: Adaptado de Farias et al., 2016.

As medidas de TGA fornece informações valiosas que podem auxiliar na caracterização dos eventos térmicos que envolvem perda ou ganho de massa, podendo obter informações úteis sobre a umidade e o conteúdo volátil de um determinado composto sólido (PINDELSKA et al., 2017). Isso faz da TGA uma excelente técnica para a quantificação de hidratos e solvatos, permitindo a sua distinção entre os seus respectivos anidros. À medida que a amostra vai sendo aquecida, a perda de massa ocorre de forma gradual, facilitando assim, o cálculo por meio da relação estequiométrica com base na perda de massa (GIRON, 1995). Contudo, a TGA fornece apenas informações sobre o conteúdo volátil da amostra, sem qualquer identificação elementar dos voláteis (HEALY et al., 2017).

Nesse sentido, a TGA pode ser utilizada como uma técnica complementar em conjunto com outras técnicas analíticas para a análise de formas cristalinas dos APIs, contribuindo para uma melhor confiabilidade dos resultados. A TGA foi aplicada com sucesso em alguns trabalhos na literatura referente ao estudo hidrato-anidro, bem

como no monitoramento da transição e na identificação de polimorfos (BEZERRA et al., 2016; FARIAS et al., 2016).

1.5.2 Difração de raios X

A difração de raios X é um método analítico bastante utilizado para determinação de materiais cristalinos, uma vez que reflete as diferenças na estrutura cristalina de um material sólido (CALLISTER JR. & RETHWISCH, 2010). Desde sua descoberta, por Von Laue, em 1912, a difração de raios X tem fornecido informações de grande relevância tanto para a ciência, quanto para a indústria, sendo uma forma prática e conveniente para identificação qualitativa de materiais cristalinos (SKOOG et al., 2009).

Para os sólidos farmacêuticos, a técnica é predominante utilizada para o estudo e caracterização de formulários de API. Como os padrões de difração de raios X diferentes correspondem a distintas estruturas cristalinas, estes padrões podem ser considerados como “impressões digitais” de formas cristalinas específicas, o que facilita a caracterização dos diferentes polimorfos que um API pode apresentar (PINDELSKA et al., 2017).

Os raios X são radiações eletromagnéticas de altas energias e comprimentos de ondas pequenos, correspondendo a um intervalo de comprimento de onda que varia de cerca de 10^{-5} Å a 100 Å ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$) (SKOOG et al., 2009). Para a difração, o tipo de raio X utilizado é aquele que possui radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre 0,05 a 0,25 nm, comprimentos de onda da mesma ordem de grandeza da distância interatômica em cristais (HASHEMI & SMITH, 2012).

Quando um feixe de raios X incide na superfície de um material sólido, parte desse feixe será dispersa em todas as direções pelos elétrons que estão associados a cada átomo ou íon que se encontra na trajetória do feixe. Quando as ondas eletromagnéticas espalhadas estão em fase, há uma interferência construtiva (isto é, quando os pontos máximos de uma onda se coincidem com os pontos máximos de outra, de forma que a amplitude da onda resultante é maior que as que lhe deram origem). Por outro lado, quando as ondas eletromagnéticas estão fora de fase há uma interferência destrutiva (ou seja, quando os pontos máximos de uma onda ocupam os

pontos mínimos de outra, e vice-versa, de maneira que as amplitudes correspondentes se cancelam ou se anulam mutuamente) (CALLISTER JR. & RETHWISCH, 2010).

Portanto, somente as ondas eletromagnéticas que sofrerão interferência construtiva criam um padrão de difração onde se pode retirar informações acerca do sólido. Esse padrão de difração está diretamente relacionado à distância que separa os planos em um cristal e pode ser descrito segundo a lei de Bragg.

1.5.2.1 Lei de Bragg

As condições necessárias para a difração de raios X para um arranjo regular de átomos são que o espaçamento interatômico deve ser aproximadamente o mesmo que o comprimento de onda de radiação e que os centros de espalhamento da radiação incidente devem estar espacialmente distribuídos em um arranjo periódico (SKOOG et al., 2009).

A Figura 6 mostra um esquema que exemplifica como pode ocorrer o fenômeno da difração, onde pode-se observar dois planos atômicos paralelos A-A' e B-B', os quais possuem índices de Miller h , k e l , e que estão separados por uma distância interplanar d_{hkl} .

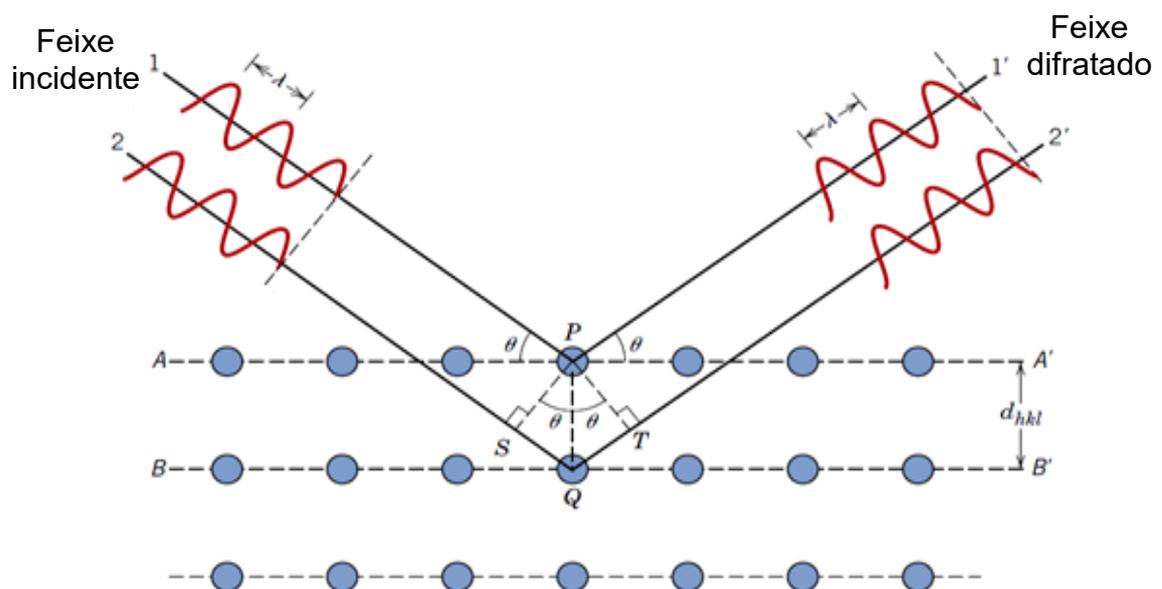


Figura 6: Representação esquemática da difração de raios X por planos de átomos (A-A' e B-B').
Fonte: Adaptado de Callister Jr. e Rethwisch (2010).

Considerando que um feixe de raios X paralelo, com mesmo comprimento de onda (monocromático) λ e em fase, incide sobre os planos A-A' e B-B' em um ângulo θ , e que dois raios nesse feixe, identificados como 1 e 2, são refletidos pelos átomos P e Q. Se o feixe 2 incidente em Q sofrer difração e percorrer um caminho ótico (δ) maior que o feixe 1 difratado em P, haverá uma interferência construtiva das ondas difratadas se a distância entre os planos A-A' e B-B' forem um número inteiro, n , de comprimentos de onda incidente. Assim, pode-se dizer que a diferença de caminho ótico entre os planos A-A' e B-B' é dada por:

$$n\lambda = \delta \quad (1)$$

Na Figura 6 vê-se que a diferença de caminhos óticos dos feixes incidentes e difratados nas trajetórias 1-P-1' e 2-Q-2', bem como a distância d_{hkl} entre os planos A-A' e B-B' pode ser dada por:

$$\delta = \overline{SQ} + \overline{QT} = 2 \overline{QT} \quad (2)$$

Por meio das equações 1 e 2, e as relações geométricas obtêm-se a seguinte dedução:

$$\frac{\delta}{2} = \overline{PQ} \text{ sen } \theta \quad (3)$$

$$\delta = 2 d_{hkl} \text{ sen } \theta \quad (4)$$

$$n\lambda = 2 d_{hkl} \text{ sen } \theta \quad (5)$$

A Equação 5 é de fundamental importância e é conhecida como Lei de Bragg, onde n é a ordem de reflexão ou ordem de difração, que pode ser qualquer número inteiro (1,2,3,...). Através dessa equação é possível relacionar o comprimento de onda dos raios X e o espaçamento interatômico ao ângulo do feixe difratado, caso a Lei de Bragg não seja satisfeita, temos uma interferência de natureza destrutiva com feixe difratado de muita pouca intensidade (CALLISTER JR. & RETHWISCH, 2010).

É importante destacar, que não é possível determinar a estrutura de um cristal tomando como base somente a Lei de Bragg. Sua aplicação está associada as possíveis maneiras que um feixe de raios X monocromático em fase é incidido e

difratado no retículo cristalino. Logo, os padrões de difração estão diretamente associados ao arranjo cristalino do sólido. Em 1848, Auguste Bravais demonstrou que apenas 14 estruturas eram possíveis, que resultam da combinação dos sete retículos cristalinos primitivos, conhecidos como redes de Bravais (CALESTANI, 2002). As redes de Bravais estão ilustradas na Figura 7.

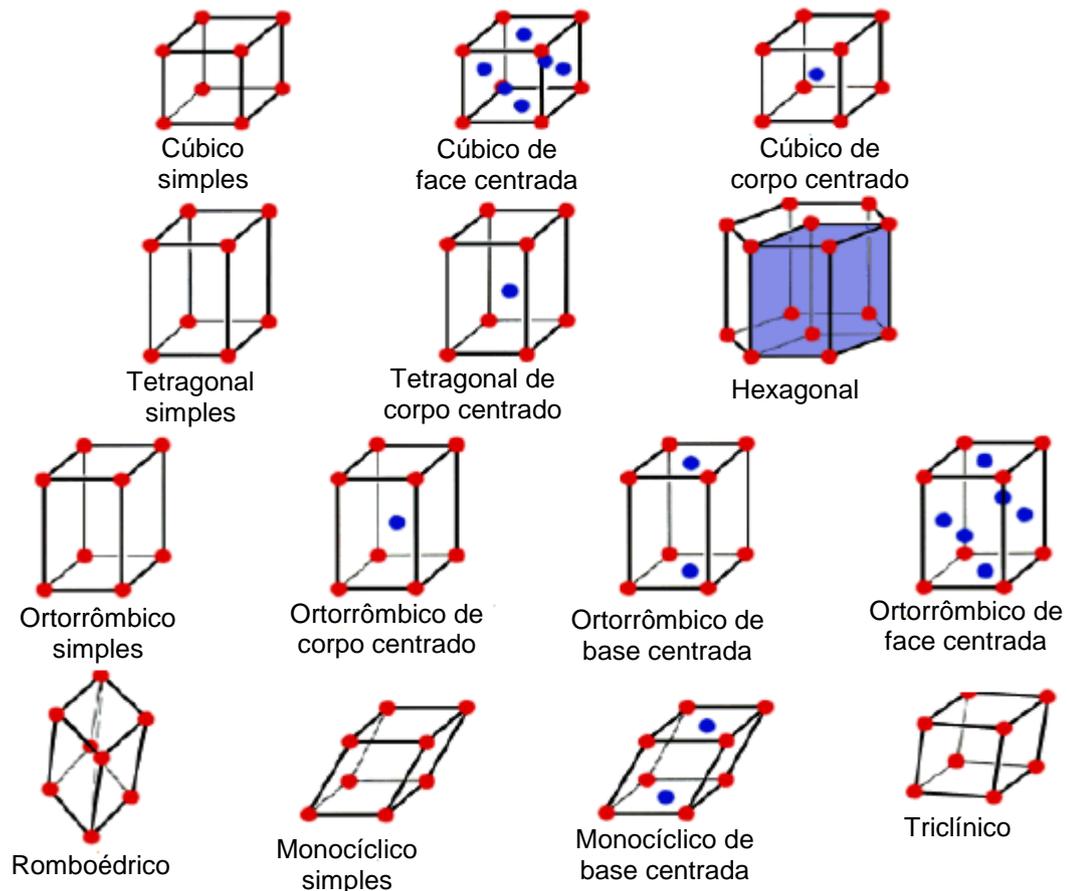


Figura 7: As 14 estruturas cristalinas possíveis para um sólido (redes de Bravais).
Fonte: Adaptado de Kadam e Chavan (2016).

Como pode ser observado na Figura 6 a distância entre os dois planos de átomos vizinhos e paralelos é uma função dos índices de Miller (h , k e l), assim como do (s) parâmetro (s) de rede, sendo representados por a , b e c para o caso de estruturas cúbicas. Em estruturas cristalinas com simetria cúbica possuem a relação descrita na equação 6 (CALLISTER JR. & RETHWISCH, 2010):

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (6)$$

onde a é o parâmetro de rede.

Essa relação permite o cálculo das distâncias entre os planos de um cristal. Existem relações semelhantes a Equação 6, contudo mais complexas, para os outros sistemas cristalinos incluídos na Figura 7, o que permite a elucidação completa a estrutura do cristal.

A Figura 8 representa esquematicamente as características do aparato experimental do instrumento de difração de raios X. Na Figura 8 vê-se que um feixe de raios X monocromático é gerado no ponto T e atinge a amostra no ponto S e as intensidades dos feixes difratados na amostra são detectados no ponto C. O detector e a amostra estão interligados mecanicamente, de tal modo que uma rotação da amostra por um ângulo θ é acompanhada proporcionalmente de uma rotação 2θ pelo detector por meio do eixo O, isto garante que o ângulo de incidência e de reflexão sejam mantidos iguais um ao outro, assegurando que a lei de Bragg seja satisfeita (CALLISTER JR. & RETHWISCH, 2010).

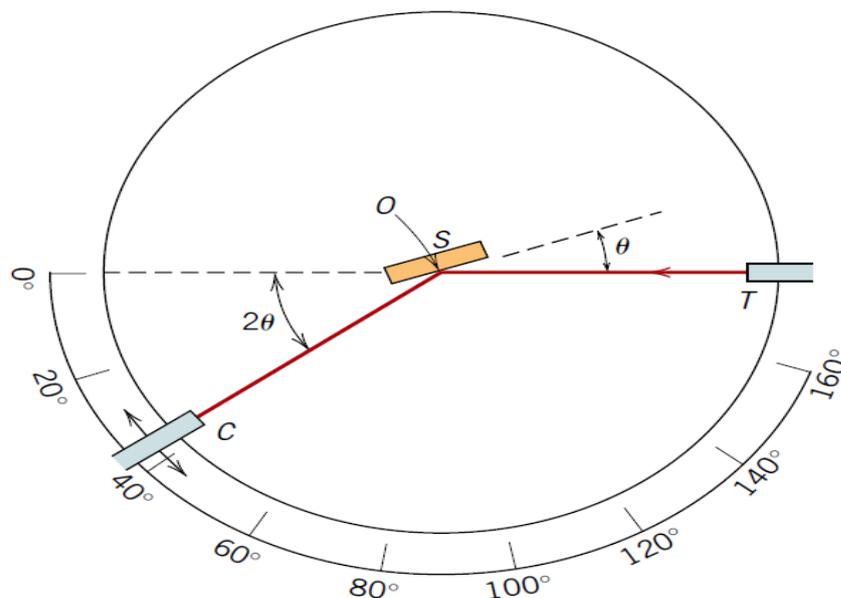


Figura 8: Esquema de um instrumento de Difração de raios X; T = fonte de raios X, S = amostra, C = detector e O = o eixo ao redor do qual giram a amostra e o detector.
Fonte: Callister Jr. e Rethwisch (2010).

A difração ocorre em todas as direções e forma um cone de difração, onde cada plano do cristal reflete um cone diferente e a variação no ângulo de incidência da radiação na amostra faz com que apareça vários padrões de difração. Apesar da difração dos raios X ser tridimensional, o detector é bidimensional, logo o padrão que se observa no detector é algo parecido com o que se observa na Figura 9, onde cada

linha à esquerda e à direita é referente à difração de um determinado plano cristalográfico.

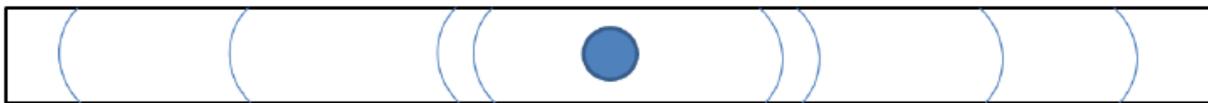


Figura 9: Sensibilização do detector pelas linhas de difração referente aos planos do cristal.
Fonte: Farias (2015).

1.5.3 Técnicas vibracionais: espectroscopia Infravermelho e Raman

Desde do início da década de 1990, a espectroscopia Raman evoluiu consideravelmente para se tornar uma técnica promissora para análise de materiais farmacologicamente importantes no estado sólido, encontrando muitas aplicações na indústria farmacêutica tais como identificação de polimorfos, determinação quantitativa de API (CALVO et al., 2018a) e distribuição do API em comprimidos por mapeamento Raman (ZHANG et al., 2005).

A espectroscopia Raman pode ser utilizada em laboratórios para aplicações de controle de qualidade, mas também para análise on-line em projetos de “Tecnologia Analítica em Processo” (PAT, do inglês, *Process Analytical Technology*) (CHEN et al., 2008; DE BEER et al., 2008). Outras ferramentas analíticas clássicas tem sido utilizadas para identificação de fármacos e de falsificações de fármacos, tais como cromatografia líquida (YAO et al., 2007), ressonância magnética nuclear (PINDELSKA et al., 2017) e espectroscopia no infravermelho próximo (DE PEINDER et al., 2008; DOWELL et al., 2008; KANDPAL et al., 2017; ROGGO et al., 2007; VREDENBREGT et al., 2006).

Conforme relatado até o momento existe uma grande quantidade de técnicas analíticas que podem ser utilizadas para identificação e quantificação de polimorfos. No entanto, se faz necessário para atender as necessidades da indústria farmacêutica, o estudo de métodos analíticos que sejam rápidos o suficiente para que se gerem dados com velocidade compatível ao ritmo de produção das indústrias afim de se evitar prejuízos (CALVO et al., 2018a), bem como utilizar técnicas que permitam o uso em campo, sendo então portáteis, com o menor custo possível e que ainda gerem poucos resíduos. Dentre as técnicas sugeridas pela FDA apenas as técnicas

de espectroscopia vibracionais são capazes de atender aos requisitos supracitados, uma vez que a CLAE não discrimina polimorfismo e as técnicas de raios X não possuem aparelhos que possam ser transportados à campo.

A espectroscopia Raman é uma técnica rápida se comparada com as técnicas cromatográficas (HENNIGAN & RYDER, 2013). Normalmente é necessário menos de 1 minuto para que a amostra seja analisada, além de ser uma técnica que não é destrutiva, não invasiva, portanto, é possível ser usado em aplicações de monitoramento em tempo real (CALVO et al., 2018a). Comparando a espectroscopia NIR com a Raman, a última possui seletividade bastante superior a primeira, sendo possível encontrar picos seletivos para cada substância que compõe o fármaco (ROGGO et al., 2010). Frente as técnicas de espectroscopia vibracional (NIR e MIR) a espectroscopia Raman apresenta algumas vantagens que serão evidenciadas a seguir e para tanto será apresentada uma breve elucidação de como as técnicas de espectroscopia vibracional funcionam.

As técnicas espectroscópicas baseiam-se na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria. A espectroscopia vibracional engloba a faixa eletromagnética do espectro que vai de 12800 a 10 cm^{-1} , região na qual as ligações químicas em moléculas vibram (SKOOG et al., 2009). Essa região espectral pode ser subdividida em 3 regiões: infravermelho distante (FIR, do inglês *Far-infrared*), infravermelho médio e infravermelho próximo. As faixas de comprimento de onda, número de onda para as distintas regiões do infravermelho, bem como as suas frequências são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2: Regiões espectrais do infravermelho.

| Região | Comprimento de onda (λ), μm | Número de onda ($\bar{\nu}$) cm^{-1} | Frequências (ν), Hz. |
|----------|---|--|---|
| Próximo | 0,78 a 2,5 | 12800 a 4000 | $3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$ |
| Médio | 2,5 a 50 | 4000 a 200 | $1,2 \times 10^{14} - 6,0 \times 10^{12}$ |
| Distante | 50 a 1000 | 200 a 10 | $6,0 \times 10^{12} - 3,0 \times 10^{11}$ |

Fonte: Skoog; Holler; Crouch (2009).

A região vibracional do infravermelho de interesse na química, inclui radiação com número de onda entre 4000 a 400 cm^{-1} . A espectroscopia por infravermelho está

associada com a absorção de energia, dessa forma quando uma molécula é atingida por um feixe de radiação eletromagnética nessa região do espectro, a mesma irá absorvê-la causando mudança nos seus modos vibracionais. Essas vibrações induzidas pela radiação compreendem frequências vibracionais de estiramentos e dobramento das ligações das moléculas (PAVIA et al., 2015).

No infravermelho, as moléculas só absorvem as frequências de radiação equivalentes as frequências vibracionais naturais das mesmas, e a energia absorvida aumenta a intensidade dos movimentos vibracionais de suas ligações (PAVIA et al., 2015). Essas frequências podem ser descritas de maneira simplista por um modelo de mola no qual os átomos de uma molécula encolhem e se alongam em torno de uma posição de equilíbrio (GENDRIN et al., 2008). E como as vibrações dos átomos ocorrem em valores específicos de frequência, característicos de grupos funcionais que constituem as espécies químicas, a espectroscopia de absorção no infravermelho vem sendo uma técnica bastante valiosa na caracterização de materiais (PAVIA et al., 2015).

Contudo, um impasse dessa técnica é que apenas moléculas que possuem momento dipolo elétrico podem absorver radiação no infravermelho, dessa forma, para haver transferência de energia, uma ligação deve apresentar um dipolo elétrico que mude na mesma frequência do campo eletromagnético da radiação incidente, alterando assim, os modos de vibração (PAVIA et al., 2015).

Na espectroscopia de NIR e MIR os espectros relacionam a energia absorvida à cada comprimento de onda. O espectro de NIR é resultante de combinações de vibrações químicas nas moléculas, bem como da sobreposição dessas vibrações (overtones), já o espectro de MIR é resultante de uma quantidade menor de energia onde a frequência de energia é suficiente apenas para que as moléculas vibrem e rotacionem (CHALMERS et al., 2002), o espectro de MIR pode ser observado na Figura 10. Neste espectro pode-se observar que os picos são numerosos e finos devido as transições fundamentais, permitindo o reconhecimento de grupos funcionais e, portanto, da molécula.

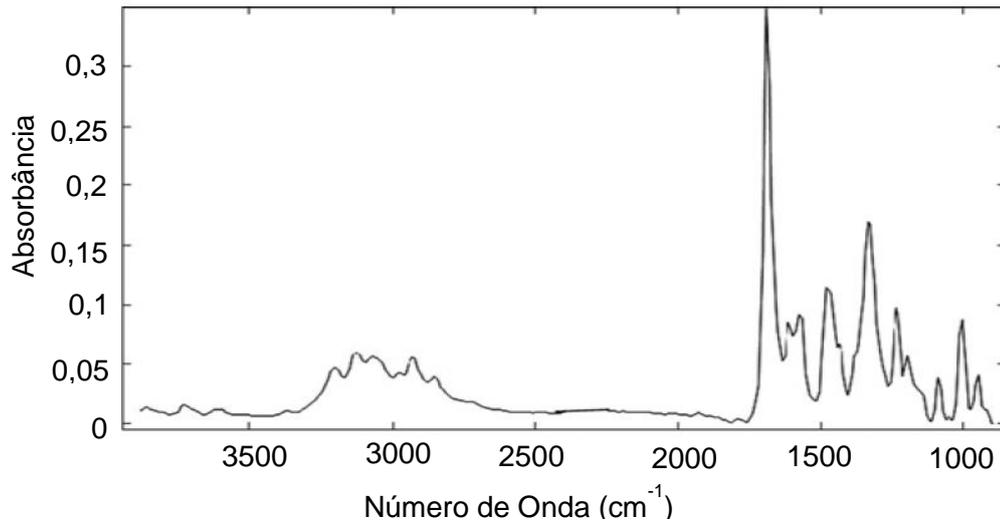


Figura 10: Espectro de MIR para um API.
Fonte: Adaptado de Gendrin et al., 2008.

Porém, também se observa que a intensidade dos sinais é alta, o que indica uma alta absorção de energia, logo pode ocorrer a saturação do sinal e, portanto, deve-se, muitas vezes, realizar uma diluição da amostra em uma matriz que não absorva nessa faixa de energia.

Já no espectro de NIR, na Figura 11, temos uma janela espectral menor com picos alargados e sobrepostos, tornando difícil uma clara identificação dos grupos funcionais. Quando se utiliza a técnica de NIR geralmente recorre-se a uma análise estatística para identificação e quantificação de uma determinada substância. Nessa técnica a absorção de energia por parte das moléculas não é tão acentuada como em MIR e não há saturação do sinal, logo não se faz necessário nenhum preparo da amostra e, portanto, a técnica não precisa destruir a amostra para realizar a análise. As análises podem ser realizadas em recipientes de vidro, que não é detectado em NIR, e em alguns recipientes plásticos dependendo da região espectral analisada (GENDRIN et al., 2008).

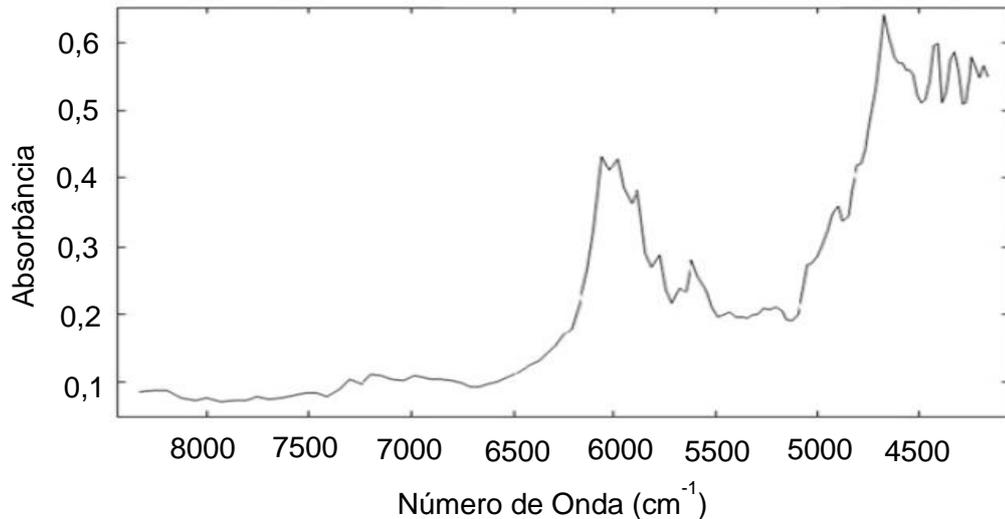


Figura 11: Espectro de NIR para um API.
 Fonte: adaptado de Gendrin et al., 2008.

A espectroscopia por Raman gera informações químicas semelhantes as geradas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho e também é uma técnica de espectroscopia vibracional. A diferença entre elas está relacionada na natureza do fenômeno físico envolvido, uma vez que, diferentemente do infravermelho que observa os modos vibracionais associados com a absorção, a espectroscopia Raman baseia-se na observação de fótons espalhados que ocorrem como resultado da passagem da luz pela amostra (FARIA et al., 2002).

Na espectroscopia Raman as amostras são iluminadas por um feixe de luz monocromática, geralmente um laser. Quando o feixe de luz atinge a amostra há um espalhamento da luz. A diferença da radiação incidente e espalhada é resultado da interação da luz com as moléculas da amostra, onde as estruturas químicas das moléculas determinam o espalhamento através da vibração das ligações moleculares. Esse espalhamento pode ocorrer de duas maneiras: espalhamento elástico (Rayleigh) ou inelástico (Efeito Raman), o segundo pode ainda ter comprimentos de onda mais curto ou mais longo de energia da fonte de luz incidente, gerando o espalhamento Stokes e anti-Stokes, respectivamente (SGOOK et al., 2009). As duas formas de espalhamentos podem ser evidenciadas esquematicamente na Figura Raman 12.

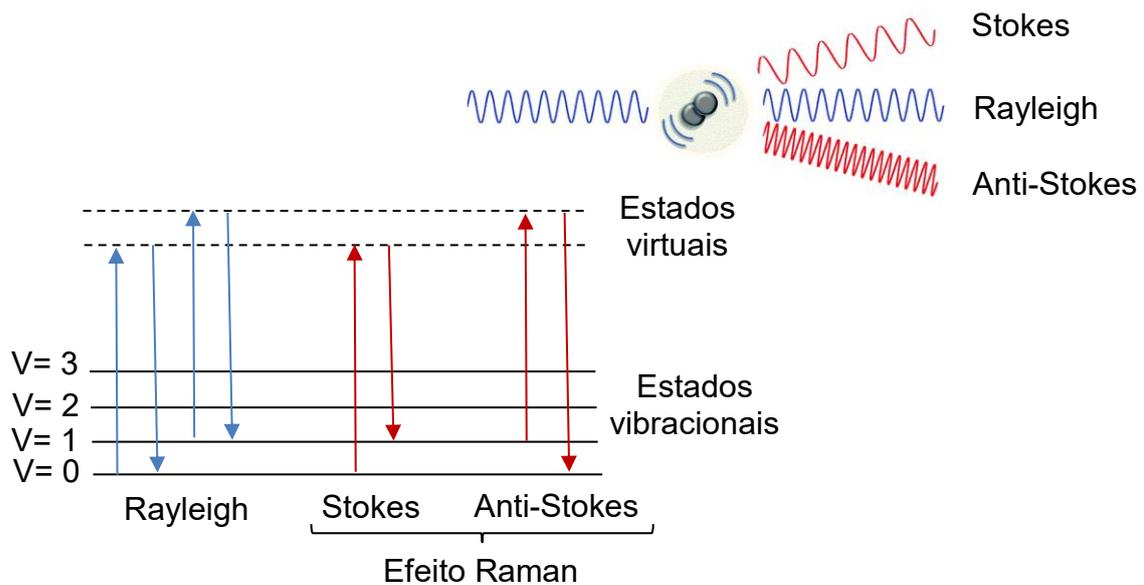


Figura 12: Origens do Espalhamento Rayleigh e Raman.
 Fonte: Adaptado de Farias (2015); Tipping et al., 2016.

Conforme pode ser evidenciado na Figura 12, no espalhamento Rayleigh, a radiação espalhada e o feixe incidente têm a mesma frequência, não havendo transferência de energia entre os fótons incidentes na amostra e os fótons provenientes do espalhamento, logo nenhuma informação vibracional molecular estará nele contida (SKOOG et al., 2009).

No espalhamento do tipo Stokes, a radiação espalhada tem menor frequência do que a radiação incidente, ou seja, o fóton espalhado é menos energético em comparação com fóton incidente, e isso ocorre porque parte da energia da radiação incidente é transferida à molécula da amostra que retorna a um estado vibracional de maior energia. Em contraste, no espalhamento anti-Stokes a molécula já se encontra no estado vibracional excitado, neste caso a radiação espalhada é maior que a radiação incidente, pois há uma transferência de energia da molécula da amostra para o fóton da luz incidente (SKOOG et al., 2009).

Dentre os dois tipos de espalhamento, apenas o inelástico (Stokes e anti-Stokes) fornece o efeito Raman observado nas análises, porém uma pequena parcela infinitesimal ($1/10^9$ até $1/10^6$) é espalhado em comprimentos de onda menores ou maiores, portanto um espalhamento inelástico, que está associado às vibrações das ligações químicas ou distorção das nuvens eletrônicas das moléculas que é detectado e dá origem ao espectro Raman (GENDRIN et al., 2008).

O fato de a Espectroscopia Raman lidar com a polarizabilidade da molécula a torna muito atrativa para análise de polimorfismo no produto final, que está agregado com excipientes que em sua maioria são sais ou moléculas que possuem ligações muito polarizadas, sendo assim as moléculas de excipientes como Croscamelose sódica, Celulose microcristalina, Estearato de Magnésio, Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), Lactose monohidratada, Laurilsulfato de Sódio, Povidona entre outros, apresentariam uma intensidade de sinal muito baixa quando comparadas ao sinal do API, que são moléculas altamente polarizáveis.

Na Figura 13 observa-se um espectro Raman de um API, vê-se que há um conjunto grande de picos bem definidos em uma larga janela espectral, estes picos são bem seletivos e diferentemente da espectroscopia NIR, torna-se fácil identificar os grupos funcionais e a molécula em questão. A espectroscopia Raman é uma técnica complementar ao NIR e MIR, um bom exemplo está no sinal analítico gerado por ligações como S-S e C=C que são muito fracas em MIR e está entre as mais fortes em Raman (CHALMERS et al., 2002). Uma grande vantagem da espectroscopia Raman está na possibilidade de se realizar análises através de recipientes plásticos ou vítreos devido a potência da fonte de luz utilizada na técnica, logo não é necessário preparo de amostra, contudo pode ocorrer fluorescência devido ao campo magnético gerado pela fonte de luz e isso pode atrapalhar a detecção do sinal Raman (CALVO et al., 2018a; HENNIGAN & RYDER, 2013).

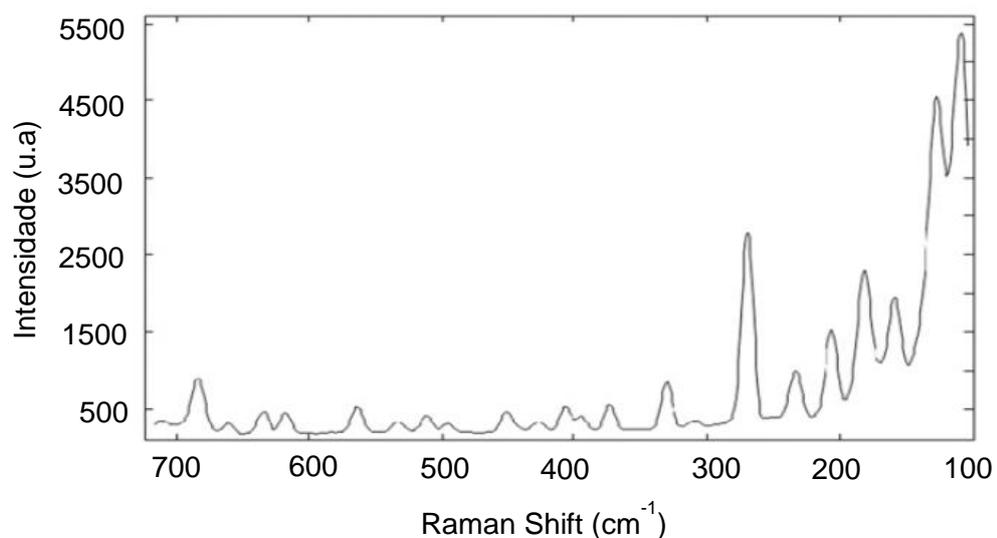


Figura 13: Espectro Raman para um API.
Fonte: Adaptado de GENDRIN et al., 2008.

Micro espectrômetros Raman, NIR e MIR consistem de 4 partes principais (HARRIS, 2012):

- i. Fonte de Luz.
- ii. Monocromadores.
- iii. Detector.
- iv. Parte Óptica.

- *Fonte de luz*

Em MIR e NIR geralmente se usa uma única fonte policromática de fonte térmica, onde um sólido inerte é aquecido entre 1500-2200 K irradiando uniformemente na região espectral do infravermelho. No MIR o sólido utilizado é o Carvão de Tungstênio e no NIR um filamento de Tungstênio. No Raman o laser é a fonte de excitação e as fontes típicas de excitação na região visível do espectro são 488 nm (azul), 514 nm (verde), 632 nm (vermelho). No NIR, os comprimentos de onda mais utilizados são 785 nm, 830 nm e 1064 nm. A escolha do comprimento de onda depende das propriedades de estado sólido da amostra e sua fluorescência. Comprimentos de onda mais longos previnem a fluorescência, mas também fazem com que a intensidade do espalhamento seja diminuída, já que a absorção de luz na espectrometria Raman ocorre com a quarta potência do comprimento de onda.

- *Monocromadores*

As diferentes técnicas desenvolvidas para selecionar o comprimento de onda que se deseja monitorar apresentam suas vantagens e desvantagens, sendo elas: Transformada de Fourier (FT), filtro ajustável e espectrômetros com grade de difração. Esses são os 3 principais tipos de espectrômetros vibracionais.

Os espectrômetros do tipo FT coletam informação de vários comprimentos de onda simultaneamente, entre suas inúmeras vantagens estão:

- Rápida aquisição perante a faixa espectral analisada (tipicamente 1s).
- Alta resolução espectral, menor que 2 cm^{-1} .
- Alta energia disponível para o detector, porque não há uso de fendas.

- Alta reprodutibilidade dos comprimentos de onda por conta da utilização do laser como espectro de referência.

As três técnicas, MIR, NIR e Raman podem utilizar o interferômetro com Transformada de Fourier.

Os espectrômetros com filtros são úteis para coletar informação sobre um comprimento de onda específico, fazendo com que os espectrômetros com filtros dispensem dispositivos móveis, diversos filtros podem ser dispostos em uma espécie de roda para que diversos comprimentos de onda possam ser selecionados. Uma outra alternativa é o filtro ajustável que controla eletronicamente a transmissão espectral aplicando-se uma voltagem. Filtros são usados principalmente em NIR e Raman com o objetivo de associar o espectro a imagem (GENDRIN et al., 2008).

Já a grade de difração possui um grande número de fendas em paralelo, separadas por uma distância equivalente ao comprimento de onda da luz. Quando um feixe de luz policromático atinge a grade, é dispersado em várias direções e o ângulo em que ocorre a dispersão depende do comprimento de onda. Os detectores são de ponto único, sendo assim apenas um ponto espectral é obtido por posição da grade, o espectro completo é obtido girando-se a grade obtendo-se todos os pontos. Detectores em linha permitem que vários comprimentos de onda sejam captados de uma só vez e fendas na entrada e saída da grade fazem com que não haja luz paralisada. Contudo, a característica desse dispositivo não permite que muita luz atinja o detector, prejudicando a resolução do espectro, este dispositivo também é utilizado em NIR e Raman.

- *Detector*

Fotodetectores são os mais utilizados em NIR e MIR para captar o sinal após a separação do comprimento de onda. No NIR é utilizado Sulfeto de Chumbo (PbS), Antimonato de Índio (InSb), Arsenato de Gálio e Índio (InGaAs) não congelado. Em MIR, Telureto de Mercúrio e Cádmio (HgCdTe) é o mais utilizado devido à larga sensibilidade espectral (de 2 a 20 μm dependendo da proporção entre Cd/Hg). Os detectores de Raman são em sua maioria 2D detectores de carga acoplados.

- *Parte Óptica*

Os espectrômetros são equipados com microscópios para ter resolução espacial. As opções de aumento dependem do objetivo do estudo, tipicamente são aumentos da ordem de 6, 15 e 32x. São utilizados em MIR e NIR na ordem de 20, 50 e 100x no Raman que geralmente são montados com uma abertura confocal para ajustar a profundidade do feixe e, portanto, analisar apenas alguns micrometros da amostra. Tal procedimento também serve para analisar a amostra em diferentes profundidades, permitindo que se analise para além da superfície da mesma.

Dessa maneira, vê-se que as técnicas de MIR e NIR apresentam menores vantagens na análise à fármacos do que a espectroscopia Raman, a primeira sofre com a interferência gerada no sinal devido a faixa de energia em que trabalha e necessita manipulação da amostra, a segunda sofre com sobreposição de bandas devido ao alargamento de pico, além de apresentar forte sinal às moléculas que são excipientes, o que prejudicaria a análise do produto final, conforme anteriormente discutido. Logo, a espectroscopia Raman se torna atrativa porque pode, a um mesmo tempo, lidar com o monitoramento da linha de produção de uma fábrica, bem como pode ser utilizada para análise de produtos finais em farmácias e estoques.

1.5.3.1 Diferenciação de formas polimórficas por espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman pode identificar um polimorfo ou gerar informação quantitativa sobre uma mistura de polimorfos (KACHRIMANIS et al., 2007; MAZUREK & SZOSTAK, 2009). A habilidade da espectroscopia Raman discriminar polimorfos tem sido demonstrada em vários artigos: diferentes estruturas cristalinas normalmente apresentam deslocamentos nas frequências e mudança na intensidade de espectros, os quais podem ser avaliados qualitativa ou quantitativamente por métodos quimiométricos de análise de componentes principais ou quadrados mínimos parciais. A sensibilidade que a espectroscopia Raman possui para polimorfos, faz desta uma técnica promissora para análise da estrutura cristalina de API (HAUSMAN et al., 2005; KARABAS et al., 2007; XIE et al., 2008).

A Figura 14 apresenta um exemplo de variação espectral em função do polimorfismo de um API.

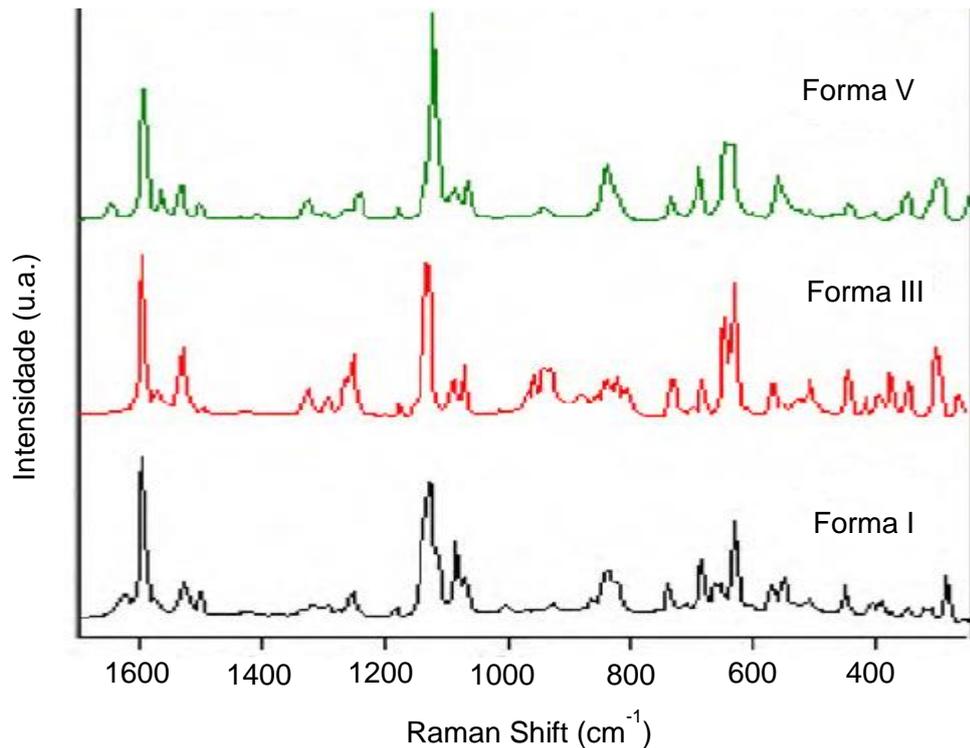


Figura 14: Espectro Raman para 3 polimorfos do API sulfadiazina.
Fonte: Adaptado de Hu et al., 2010.

1.5.3.2 Métodos quimiométricos aplicados à espectroscopia Raman

Assim como na espectroscopia NIR, a espectroscopia Raman depende de métodos quimiométricos para que possa ser utilizada em métodos quali/quantitativos (CALVO et al., 2018a, 2018b; HEINZ et al., 2007; PIQUERAS et al., 2014), isso porque o sinal originado da amostra será uma combinação dos sinais de todas as substâncias que compõe a amostra, diferentemente da cromatografia que separa compostos antes de obter os sinais. Como será visto na *revisão bibliográfica* adiante, a maioria das aplicações envolvendo a espectroscopia Raman emprega algum método matemático para análise dos dados. Esses métodos levam em consideração o espectro como um todo, e não somente intensidades em números de onda discretos. Tais métodos são chamados métodos de primeira ordem, como será apresentado na seção *Metodologia Quimiométrica*.

1.6 Metodologia Quimiométrica

Devido a capacidade dos instrumentos analíticos de adquirir rapidamente grandes quantidades de dados, aumentou também a procura por recursos matemáticos e estatísticos capazes de converter essa enorme quantidade de dados em informação química útil. Nesse contexto surgiu a quimiometria, sendo que o seu desenvolvimento inicial andou de mãos dadas com o desenvolvimento da computação científica e envolveu principalmente o uso de métodos estatísticos multivariados para a análise de dados de química analítica (BRERETON, 2007).

O termo quimiometria foi inicialmente criado por Svante Wold em 1971, que a definiu como “a arte de extrair informação química relevante de dados produzidos em experimentos químicos” (WOLD, 1995). Outro grande contribuinte para o surgimento e desenvolvimento da quimiometria foi Kowalski (BRERETON, 2014).

Desse modo, a quimiometria surgiu como uma ferramenta que possui a capacidade de maximizar a qualidade da informação acessível a partir das amostras, por meio da sua habilidade em converter dados aparentemente não relacionados e incompreensíveis (envolvendo muitas centenas de variáveis), em informações valiosas sobre o estado de um sistema químico (CALVO et al., 2018b).

No ambiente farmacêutico, os métodos quimiométricos já demonstraram sua capacidade para monitorar a cristalização do fármaco, bem como o seu potencial de detectar e quantificar ingredientes farmacêuticos ativos em suas formas de dosagem, além de identificar medicamentos falsificados a partir de dados espectrais (CALVO et al., 2018b).

1.6.1 Calibração multivariada

As ferramentas quimiométricas podem ser utilizados em dados multivariados tanto para objetivos qualitativos (análise exploratória e reconhecimento de padrões) quanto para quantitativos (calibração) (FERREIRA, 2015).

O processo de calibração pode ser definido como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação matemática entre medidas

instrumentais e valores da propriedade de interesse correspondentes realizados em padrões, como a concentração de uma amostra, por exemplo.

Os métodos de calibração existentes podem ser divididos quanto à complexidade ou dimensionalidade dos dados, e são classificados como: ordem zero, primeira e segunda ordem (OLIVIERI et al., 2006). Na Figura 15 vê-se uma ilustração esquemática dos três tipos de dados utilizados nos três níveis de calibração citados, obtidos através de um sistema de análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção por arranjo de diodos (DAD).

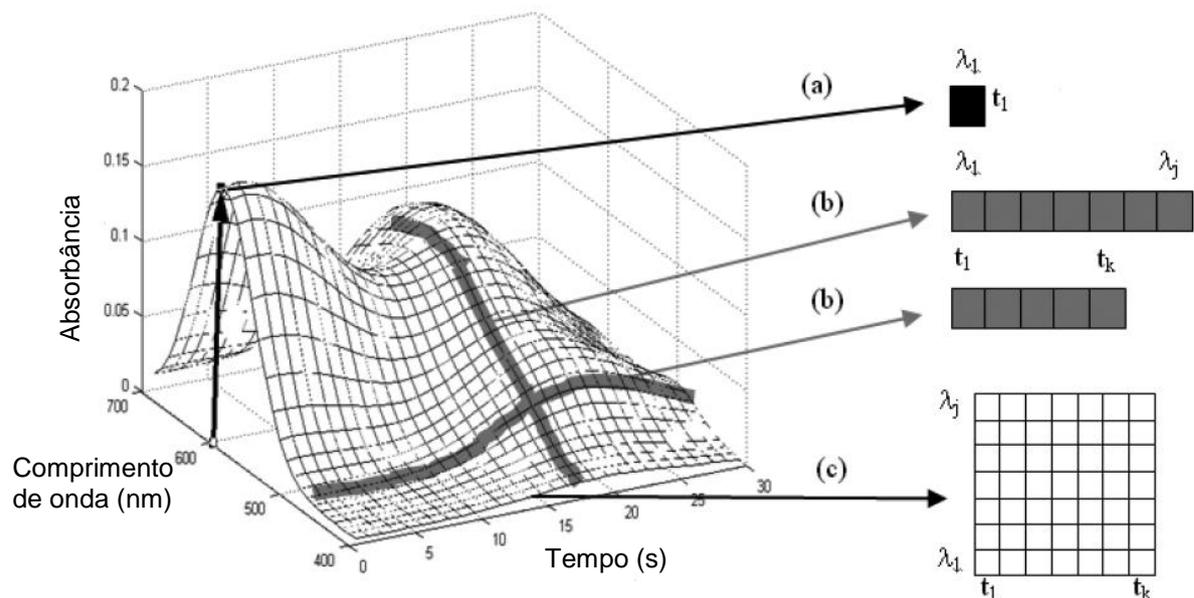


Figura 15: Representação dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados, (c) uma matriz de dados.
Fonte: Adaptado de Valderrama et al., 2009.

Em modelos de calibração de ordem zero apenas uma medida é feita por amostra, isto é, um único valor é obtido por amostra, sendo então uma calibração univariada. Segundo o exemplo mostrado na Figura 15, ele é representado por um ponto na superfície, que corresponde à leitura da absorbância em um comprimento de onda λ_1 em um tempo t_1 . Exemplos típicos de instrumentos que geram esse tipo de dado incluem medidas eletroquímicas, espectrofotométricas ou cromatográficas, com monitoramento de um único ponto ou variável. Calibrações de ordem zero são as mais aplicadas em análises de rotina, contudo sua aplicação requer que a grandeza que é medida diretamente, por exemplo, absorbância de um composto, seja livre de

interferentes que possam provocar desvios entre sua relação com a propriedade de interesse (VALDERRAMA et al., 2009).

Métodos de calibração de primeira ordem fazem uso de um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Pelo exemplo, na Figura 15, são possíveis dois tipos de dados:

- Monitoramento de um comprimento de onda λ_1 nos tempos t_1 a t_k .
- Monitoramento dos comprimentos de onda de λ_1 a λ_j em um determinado tempo.

Exemplos de dados multivariados incluem medidas espectrométricas e eletroquímicas em que se monitora uma determinada faixa espectral ou de variação de potencial. Esses métodos possibilitam análises mesmo na presença de interferentes (desde que esses interferentes tenham sido levados em consideração nos procedimentos de calibração), determinações simultâneas e análises sem resolução (OLIVIERI et al., 2006; VALDERRAMA et al., 2009).

Diversos modelos de calibração multivariada têm sido utilizados tais como: Regressão pelo método das Componentes Principais (PCR, do inglês *Principal Component Regression*), Regressão Linear Múltipla (MLR, do inglês *Multiple Linear Regression*) e Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares Regression*). Esses modelos têm apresentado ótimos resultados, com aplicações em diversas áreas, como no tratamento de dados de NIR em análises de bebidas, madeiras, polímeros, produtos farmacêuticos e agrícolas, entre outros (ŠEHIĆ et al., 2010). Porém, sua utilização requer um considerável número de amostras de calibração.

Calibrações de segunda ordem são construídas para métodos que geram uma matriz de dados por amostra. Como é mostrado na Figura 15, uma matriz de dimensões $j \times k$, que define a superfície ilustrada na figura é obtida para cada amostra. Uma vantagem do método de calibração de segunda ordem é a possibilidade de determinar espécies de interesse na presença de interferentes, mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras do procedimento de calibração, sendo particularmente atraentes para determinações em amostras complexas (CALVO et al., 2018b; VALDERRAMA et al., 2009).

Como a espectroscopia Raman gera um espectro por amostra (um vetor de dados), devem ser utilizados métodos de calibração de primeira ordem, ainda que seja possível aplicar métodos de ordem zero utilizando apenas um comprimento de onda.

Métodos espectroscópicos de emissão, luminescência e espalhamento geram intensidade de sinal proporcional à concentração do analito presente (HARRIS, 2012). Assim um espectro Raman pode ser descrito vetorialmente como mostrado na equação 7:

$$D_{m \times n} = C_{m \times p} \times S_{p \times n} \quad (7)$$

onde D são os espectros Raman, com a intensidade de espalhamento dos números de onda de 1 a n para m amostras, C é a concentração dos p analitos nas m amostras e S é a constante espectral, ou seja, o espectro puro, unitário dos p analitos, com números de onda.

Uma etapa de grande relevância para qualidade do modelo é o pré-tratamento de dados que antecede o uso da regressão multivariada na construção dos modelos. Dessa forma, após a sua coleta, para que os dados sejam interpretados e modelados aplicando as ferramentas quimiométricas é necessário que os mesmos sejam (FERREIRA, 2015):

- (1) Organizados em uma matriz X constituída de linhas (referente as amostras) e colunas (referente as variáveis como o número de onda de um espectro no infravermelho, por exemplo);
- (2) Visualizados por meio de gráficos com o intuito de verificar como os dados estão distribuídos antes de iniciar as análises;
- (3) Utilizados métodos de pré-tratamentos. Este último pode ainda ser aplicado às amostras (Transformação) e às variáveis (Pré-processamento).

Com a finalidade de realizar o pré-tratamento do conjunto de dados, os métodos de pré-tratamento são escolhidos adequadamente de acordo com as características espectrais coletados pela técnica instrumental (Espectroscopia Raman, por exemplo), tendo a devida atenção em não comprometer as características originais dos espectros.

Esse procedimento, geralmente é necessário e tem o objetivo de reduzir as variações indesejáveis, como o ruído, que não são removidas durante a aquisição de dados e que não serão eliminadas naturalmente durante a análise, mas que podem influenciar os resultados finais, conseqüentemente, podendo diminuir a capacidade de previsão do modelo (FERREIRA, 2015).

1.6.1.1 PLS e iPLS

Diferentemente da PCA (que possui finalidade exploratória, embora possa ser utilizada para quantificação), os métodos dos quadrados mínimos parciais são métodos essencialmente quantitativos, nos quais é necessário realizar calibração prévia para quantificar as espécies de interesse.

O método de regressão multivariada PLS é o mais popular e o mais utilizado em quimiometria (FERREIRA, 2015; BRERETON, 2000). Este fato se deve à sua praticidade de uso e a capacidade de lidar com sobreposições de banda, colinearidade e interações dentro das amostras e, sendo, portanto, um modelo que pode ser utilizado em calibração de dados de espectroscopia NIR e Raman (CALVO et al., 2018b).

O método de regressão PLS podem gerar modelos robustos, desde que as amostras utilizadas para testar o modelo contenham informações químicas semelhantes aos dados originais, tomando como base que as previsões são essencialmente estatísticas (BRERETON, 2000). Este método multivariado associado a espectroscopia Raman já foi empregado para quantificação de mistura binária e ternária de polimorfos em fármacos, tendo a obtenção de modelos robustos e com erros de predição aceitáveis (FARIAS & CARNEIRO, 2014b; HEINZ et al., 2007; HU et al., 2010; TIAN et al., 2007).

O PLS se assemelha ao PCR, diferindo na maneira com que as componentes principais são calculadas. No PCR o cálculo das componentes principais é realizado utilizando somente as repostas instrumentais (matriz X), sem levar em consideração informações provenientes das concentrações (matriz Y). Já no PLS as componentes principais, denominadas “variáveis latentes” (VL) são calculadas usando tanto as

respostas instrumentais, como as informações das concentrações (FERREIRA et al., 1999).

O PLS é calculado de maneira iterativa, onde cada variável latente, que correlaciona X e a propriedade de interesse Y, é obtida buscando a correlação máxima entre os escores T e U das matrizes X e Y (FERREIRA, 2015), como mostrado nas equações 8 e 9. Desse modo, o PLS assume um compromisso entre a explicação da variância em X e a obtenção da maior correlação com Y (SOUZA et al., 2013).

$$X = TP^T + E \quad (8)$$

$$Y = UQ^T + F \quad (9)$$

onde P e Q são os pesos (loadings), T e U são os escores, E e F são os resíduos das matrizes X e Y, respectivamente.

Após a otimização dos escores das matrizes de T e U, os loadings são calculados e, finalmente os coeficientes de regressão que entrarão na combinação linear para gerar o modelo PLS. A otimização dos escores, bem como a demonstração através de equações foram detalhados por Farias (2015). O algoritmo comumente utilizado na construção do modelo PLS é iterativo conhecido como NIPALS (do inglês *Nonlinear iterative partial least squares*). Também há outros algoritmos que foram propostos com o objetivo de realizar os cálculos de maneira mais rápida e melhorar a compreensão do método (FERREIRA 2015).

Já a Regressão por Quadrados Mínimos Parciais por Intervalos (iPLS, do inglês *Interval Partial Least Squares Regression*) é uma extensão do modelo PLS no qual os espectros da matriz X são divididos em n partes, e são executados modelos PLS com cada uma dessas partes ou com combinações destas. Este artifício permite ao PLS encontrar regiões espectrais mais lineares e com menos ruído, às quais proporcionarão um menor erro de calibração (NORGAARD et al., 2000).

1.6.2 Parâmetros que avaliam a qualidade de um modelo de regressão multivariado

Determinar a eficácia de um modelo quimiométrico é considerada um dos problemas mais importantes na área da calibração multivariada, pois o principal

objetivo do modelo construído é usar uma função matemática dos dados experimentais para prever uma determinada propriedade de interesse (BRERETON, 2007). Com esse propósito, alguns parâmetros estatísticos são calculados a partir do conjunto de dados para medir a qualidade e eficiência do modelo. E os parâmetros mais comuns que podem ser adotados como critério de avaliação do modelo de regressão multivariada são: Raiz Quadrada do Erro Médio de Calibração (RMSEC, do inglês *Root Mean Square Error of Calibration*), Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada (RMSECV, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*), Raiz Quadrada do Erro Médio de Predição (RMSEP, do inglês *Root Mean Square Error of Prediction*) e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) (BRERETON, 2007; FERREIRA, 2015).

A verificação do erro do parâmetro RMSECV é dos meios que pode ser utilizado para estimar o número ideal de variáveis latentes na construção do modelo. Nesse contexto, a determinação do número de variáveis latentes é realizada por meio da validação interna cruzada com o método designado *leave-one-out* (“uma por vez”) (FERREIRA, 2015; SOUZA et al., 2013). Nessa abordagem, somente uma amostra do conjunto de calibração é retirada por vez, e o modelo é calculado com as amostras restantes. Em seguida, a propriedade de interesse da amostra retirada é prevista pelo modelo e comparado com o respectivo valor experimental, onde é calculado o valor residual. O mesmo procedimento se repete para as demais amostras e a raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (Equação 10) é calculado para cada número de variáveis latentes usado no modelo (SOUZA et al., 2013). O número de variáveis latentes a serem utilizados do modelo final será aquele que corresponderá ao menor valor de RMSECV (FERREIRA, 2015).

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (y_p - y_e)^2}{n}} \quad (10)$$

onde y_p é representa o valor experimental (propriedade de interesse), y_e o valor previsto de concentração e n o número de amostras de calibração.

Após a escolha do número ideal de variáveis latentes é importante verificar se o modelo é capaz de prever novas amostras (conjunto de validação) com valores de concentração diferentes do que foi testado no conjunto de calibração e que sejam previamente conhecidos, pois de acordo com Ferreira (2015) “todo esforço investido

na construção de um modelo de calibração só é compensado ao se fazer a previsão da propriedade de interesse em novas amostras”. Para isso, ainda de acordo com a autora, deve-se tomar algumas precauções necessárias para o bom desempenho do modelo:

- As novas amostras devem ser preparadas de maneira similar ao conjunto de calibração e que os dados devem ser coletados no mesmo instrumento, com emprego dos mesmos procedimentos experimentais e pré-tratamentos de dados;
- Os intervalos de concentração das novas amostras devem estar dentro da faixa do conjunto de calibração no modelo final;
- O modelo será ineficaz em prever a propriedade de interesse de novas amostras se houver interferentes que não estavam presentes no conjunto de calibração, por isso é importante verificar a presença de impurezas não modeladas para evitar erros de previsões futuras.

O parâmetro utilizado para verificar o erro de previsão de novas amostras é o RMSEP e é definido matematicamente conforme evidenciado na Equação 11 (FERREIRA, 2015):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(y_p - \hat{y}_p)^2}{P}} \quad (11)$$

na qual y_p é o valor real (valor experimental) da propriedade de interesse, \hat{y}_p é o valor estimado pelo o modelo e P é o número de amostra do conjunto de validação.

Uma maneira relativamente simples de verificar se o modelo apresenta sub ou superajuste é comparando os valores de RMSECV com os valores de RMSEP. Se esses dois parâmetros apresentarem valores semelhantes, isto significa que o modelo é robusto (BRERETON, 2000; NAGY et al., 2016). Em outras palavras, os valores similares de RMSECV e RMSEP nos diz que os valores calculados pelo modelo realmente condizem com os valores experimentais e que o modelo é capaz de prever novas amostras.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o emprego do método de calibração multivariada do tipo iPLS para a análise qualitativa e quantitativa em dados de espectroscopia Raman obtidos a partir de amostras de misturas polimórficas com e sem excipientes do fármaco cloridrato de sertralina.

2.2 Específicos

- Sintetizar e caracterizar por DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman os polimorfos SRLT-I, SRLT-ET e SRLT-H do fármaco cloridrato de sertralina.
- Quantificar simultaneamente mistura binária dos polimorfos SRLT-I e SRLT-H do fármaco cloridrato de sertralina usando espectroscopia Raman e método calibração multivariada para a construção do modelo do tipo iPLS para misturas na presença e na ausência de excipientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

3.1.1 Excipientes

Para o fármaco cloridrato de sertralina, normalmente são encontrados medicamentos comerciais contendo os seguintes excipientes: croscamelose sódica, celulose microcristalina, amido, lactose monohidratada, povidona, dióxido de titânio, dióxido de silício, hipromelose, estearato de magnésio e macrogol. Vale ressaltar que dependendo da indústria de genéricos responsável por sua fabricação, os excipientes usados no fármaco podem ser distintos. Para a preparação dos comprimidos neste estudo foram utilizados os excipientes mais comuns, sendo: amido, estearato de magnésio, povidona e dióxido de silício.

3.1.2 Preparação dos polimorfos

Para a preparação dos polimorfos, primeiramente foi realizado uma busca na literatura (patentes e artigos) dos possíveis polimorfos que podem surgir a partir do polimorfo comercializado como API, bem como os procedimentos experimentais para a sua preparação. Os polimorfos utilizados para a quantificação simultânea com e sem excipientes foram obtidos através de processos de recristalização em diferentes solventes que possam causar a transição polimórfica, de tal maneira que simulasse as possíveis condições naturais a qual o API é submetido, em especial no processo de produção do comprimido nas indústrias farmacêuticas. Segue abaixo a descrição da preparação dos polimorfos STRL-ET e STRL-H.

O cloridrato de sertralina comercializado (STRL-I) foi adquirido por companhia farmacêutica e utilizado como recebido.

O SRTL-ET foi produzido a partir do SRTL-I. A síntese do solvato de etanol foi realizada pesando-se 2,0 g de cloridrato de sertralina e adicionando 40 mL de álcool etílico à amostra em um bécker de 50 mL. A solução foi agitada com agitador

magnético (400 rpm) à temperatura ambiente durante 24 h. Em seguida, em papel filtro, o precipitado da mistura foi filtrado e lavado com álcool etílico e seco por 4 h.

O hidrato foi preparado dissolvendo 1,0 g do SRTL-ET em 5 mL de água Milli-Q em um bécker de 10 mL com auxílio de um agitador magnético (300 rpm) por 2 h à temperatura ambiente. O precipitado foi filtrado e lavado com água Milli-Q e seco à temperatura ambiente por 24 h.

3.1.3 Caracterização dos polimorfos

Os polimorfos do cloridrato de sertralina foram caracterizados por DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman.

O difratômetro de raios X foi da Panalytical, modelo Empyrean, com fonte de Cobre (comprimento de onda de 0,154184 nm) com potencial de 40 kV e corrente de emissão de 40 mA. As amostras foram analisadas na faixa de 5 a 45° (2θ) para os polimorfos SRTL-I e SRTL-ET e de 3 a 45° (2θ) para o SRTL-H com velocidade de varredura de 0,2° min^{-1} .

Para as análises com espectroscopia Raman utilizou-se espectrômetro Raman B&W Tek λ -Raman modelo BWS 415-785H (Newark, New Jersey, USA) acoplado a um microscópio BAC151, com fonte de laser de comprimento de onda de 785 nm e resolução espectral de 3,5 cm^{-1} . Para a preparação do modelo de regressão iPLS utilizou-se a faixa espectral entre 110 a 1100 cm^{-1} , com tempo de aquisição do espectro de 60 segundos. A potência do laser foi ajustada para obter a melhor relação sinal-ruído variando de 30 a 50 mW para a mistura binária de polimorfos sem excipientes e de 50 a 80 mW para a mistura binária de polimorfos com excipientes. Foi utilizada uma lente de 40x no microscópio.

As análises térmicas tanto da Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) quanto da Termogravimetria (TGA) foram realizadas em um analisador térmico SDT Q600 Ta Instrument. As amostras foram aferidas a aproximadamente 10 mg, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com fluxo de gás N_2 (N 5,0) de 30 mL.min^{-1} e a faixa de temperatura analisada foi de 25 a 300 $^{\circ}\text{C}$. O cadinho utilizado nos testes foi o de alumina de 90 microlitros sem tampa.

3.1.4 Planejamento para a quantificação simultânea de mistura binária dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H usando espectroscopia Raman e o método de regressão multivariada do tipo iPLS

O planejamento experimental para o conjunto de calibração de mistura binária foi utilizado empregando os polimorfos SRTL-I e SRTL-H, onde as proporções em massa da mistura polimórfica variou com intervalos de 5 mg para cada componente, de 0 a 50 mg. Para o conjunto de calibração foram preparadas 11 amostras (mistura de SRTL-I e SRTL-H) conforme mostrado na Tabela 3. E para testar a qualidade e a eficiência do modelo também foram preparadas 5 amostras para o conjunto de validação. A quantidade de cada componente desse conjunto foi diferente das amostras do conjunto anterior, de tal modo que as concentrações dos polimorfos fossem distintos dos pontos utilizados na curva de calibração, iniciando com 7 mg e, a partir da segunda amostra variando com intervalo de 10 mg, sendo a última com acréscimo de 6 mg em relação a amostra anterior.

As massas dos polimorfos foram medidas individualmente em frascos devidamente identificados e suas massas e porcentagens das misturas binárias são mostradas na Tabela 3. Depois da pesagem, as amostras foram homogeneizadas levemente (para minimizar a possibilidade de transição polimórfica) por aproximadamente 7 minutos em um almofariz de ágata e com o auxílio de um pistilo. Esse procedimento foi realizado afim de garantir a homogeneização completa da mistura.

Tabela 3: Massa em miligramas dos polimorfos de cloridrato de sertralina nas amostras de calibração e validação. Em parênteses a porcentagem em massa de cada polimorfo na amostra.

| Polimorfos de Cloridrato de Sertralina | | | |
|--|----------|---------------|---------------|
| Conjunto | Amostras | SRTL-I | SRTL-H |
| Calibração | 01 | 50,3 (100,0%) | 0,0 |
| | 02 | 45,5 (89,5%) | 5,38 (10,5%) |
| | 03 | 40,0 (80,3%) | 9,80 (19,7) |
| | 04 | 35,0 (70,1%) | 14,90 (29,9%) |
| | 05 | 29,9 (59,9%) | 20,00 (40,1%) |
| | 06 | 24,9 (49,9%) | 25,0 (50,1%) |
| | 07 | 19,8 (39,7%) | 30,10 (60,3%) |
| | 08 | 15,2 (30,2%) | 35,20 (69,8%) |
| | 09 | 10,3 (20,5%) | 39,9 (79,5%) |
| | 10 | 5,1 (10,2%) | 45,1 (89,8%) |
| | 11 | 0,0 | 49,9 (100,0%) |
| Validação | 01 | 42,9 (85,8%) | 7,1 (14,2%) |
| | 02 | 33,2 (66,0%) | 17,1 (34,0%) |
| | 03 | 23,3 (46,3%) | 27,1 (53,7%) |
| | 04 | 12,9 (25,8%) | 37,1 (74,2%) |
| | 05 | 7,5 (14,8%) | 43,2 (85,2%) |

Para a aquisição de dados da combinação binária dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H foram coletados 10 espectros Raman em cada amostra de calibração e validação. Os espectros foram adquiridos em diferentes pontos da superfície das amostras, esse artifício foi realizado com a finalidade de minimizar os problemas relacionados a micro-heterogeneidade da amostra devido ao pequeno tamanho de área sensibilizada pelo laser. Os espectros de cada amostra foram tabulados em uma matriz X, visualizados, seguido pela estimativa da média para a obtenção de único espectro, representativo da amostra.

3.1.5 Planejamento para a quantificação simultânea de mistura binária dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H na presença de excipientes utilizando espectroscopia Raman e métodos de calibração multivariada do tipo iPLS

Para a preparação dos comprimidos primeiramente foi consultado a bula do fármaco Zoloft® para verificar os excipientes utilizados na formulação. Como a proporção dos excipientes não são descritas na bula, foi consultado o *Handbook of pharmaceutical excipients* (ROWE et al., 2009) para encontrar as proporções aceitáveis em uma formulação. Cada comprimido tem massa de aproximadamente 300 mg, sendo 250 mg de excipientes e 50 mg de cloridrato de sertralina (mistura de polimorfos), o que equivale em porcentagem a 83,4% e 16,6%, respectivamente. Na Tabela 4 é mostrado os valores teóricos das massas e porcentagens dos APIs e excipientes utilizados na simulação do comprimido. Vale ressaltar, que o objetivo não foi produzir os comprimidos com a mesma composição de excipientes do Zoloft®, mas verificar se esses excipientes podem interferir no sinal dos APIs.

Tabela 4: Porcentagens e massas individuais em miligramas dos excipientes e APIs.

| Excipientes | Porcentagem (%) | Massa em miligramas (mg) |
|-----------------------|-----------------|--------------------------|
| Amido | 25 | 75,0 |
| Estearato de Magnésio | 23,4 | 70,0 |
| Povidona | 25 | 75,0 |
| Dióxido de Silício | 10 | 30,0 |
| APIs | 16,6 | 50,0 |
| Total | 100 | 300,0 |

Em um papel manteiga foram pesadas as massas dos excipientes mostrados na Tabela 4 para 16 amostras. Os excipientes foram transferidos, um a um, para tubo falcon de 100 mL e, em seguida foram agitados em um vórtex por 7 minutos para a obtenção de uma mistura homogênea. Após a mistura, foram pesados dezesseis porções de 250 mg de excipientes e armazenados em eppendorf para o conjunto de calibração e validação.

Depois de pesados, os APIs (mistura binária mostrado na Tabela 3) e os excipientes foram homogeneizados suavemente por aproximadamente 7 minutos utilizando um almofariz de ágata com o auxílio de um pistilo e, em seguida foram

pressionadas de forma manual para realização da análise. Esse critério foi adotado afim de garantir a homogeneização completa da mistura e minimizar a possibilidade de ocorrência de transição polimórfica, visto que em experiências anteriores a utilização do pastilhador sob pressão para obtenção dos comprimidos, os resultados não foram satisfatórios.

Foram produzidas 11 amostras (mistura dos polimorfos e excipientes) para construir o modelo de calibração e 5 amostras para validar o modelo. O número relativamente baixo de amostras se deve ao fato de que existe somente duas fontes de variação para o espectro de espalhamento Raman entre as amostras, que são os dois polimorfos, já que a concentração de excipientes é constante em todas amostras. Os excipientes são moléculas polares ou sais, que devido a característica da alta polaridade vão apresentar espectro Raman com baixa intensidade.

Para a aquisição de dados da mistura binária na presença de excipientes também foram realizadas 10 replicatas de espectros Raman para cada uma das amostras de calibração e validação. Os espectros foram adquiridos em pontos aleatórios na superfície das amostras. Os espectros de cada amostra foram organizados e visualizados, seguido pela a realização da média para a obtenção de um espectro médio, representativo da amostra.

3.2 Pré-tratamento dos dados e parâmetros utilizados para a avaliação da qualidade do modelo

Os espectros médios das amostras do conjunto de calibração e validação tanto do planejamento da mistura binária sem excipientes como na presença de excipientes foram primeiramente centrados na média. Em seguida, diferentes métodos de pré-tratamentos foram testados com intuito de remover as informações físicas e/ou instrumentais que não estão relacionadas à informação química de interesse da amostra (concentração).

Para o planejamento de mistura binária dos polimorfos, os parâmetros estatísticos que medem a qualidade do modelo foram avaliados comparando os espectros médios que foram submetidos ao pré-tratamento com aqueles que foram somente centrados na média antes da modelagem. Dentre os pré-tratamentos

testados, a normalização pela área, a Padronização Normal de Sinal (SNV, do inglês *Standard Normal Variate*) e a Correção Ortogonal de Sinal (OSC, do inglês *Orthogonal Signal Correction*) mostrou-se mais adequado para o conjunto de dados, garantindo que os espectros contivessem apenas as informações químicas relacionadas a propriedade de interesse e, conseqüentemente apresentando os menores valores de erros de predição.

Assim como no conjunto de dados das amostras sem excipientes, também foram testados diferentes pré-tratamentos para a mistura de polimorfos na presença de excipientes e optou-se pelos os métodos de normalização pela área, SNV e OSC, sendo estes os que mais se ajustaram ao conjunto de dados.

O número ótimo de variáveis latentes para a construção dos modelos iPLS do conjunto de calibração dos dois tipos de planejamento foi determinado usando o procedimento de validação interna cruzada do tipo *leave-one-out*, por meio da verificação dos erros de RMSECV.

O desempenho dos modelos de calibração iPLS foram avaliados verificando os erros médios quadráticos para calibração (RMSEC) e validação (RMSECV), bem como os seus coeficientes de determinação (R^2). A capacidade preditiva dos modelos construído foi avaliada pelo erro médio quadrático de predição (RMSEP) e pelo seu coeficiente de determinação (R^2) obtidos a partir do conjunto de amostras externas, diferente do usado nos estágios de calibração. Por fim, para verificar se houve ou não superajustes nos modelos, os valores de RMSECV foram comparados com os valores de RMSEP.

As análises por iPLS foram realizadas utilizando o toolbox PLS_Toolbox 8.2 (S/N: 1f-c843-3d0c) da Eigenvector, disponível para MATLAB na versão R2017a (9.2.0.556344), com número de licença 40565580.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização por DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman dos polimorfos SRLT-I, SRLT-ET e SRLT-H do fármaco cloridrato de sertralina

Após a síntese, as formas polimórficas do cloridrato de sertralina foram caracterizadas e confirmadas por DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman. Foi observado que os padrões DRX, os termogramas e os espectros dos três polimorfismos mostram diferenças significativas e que essas técnicas são adequadas para análises qualitativas.

4.1.1 Caracterização por DRX

O cloridrato de sertralina comercializado, SRLT-I, exibe padrão de difração de raios X com picos característicos em ângulos de difração 2θ de 7,1; 12,7; 14,1; 15,3; 15,7; 21,2; 23,4; $26,3 \pm 0,2$ graus (polimorfo I da referência SYSKO et al., 1993). Como pode ser visto na Figura 16, o SRLT-I apresentou picos de difração de raios X apontados (para efeitos didáticos os picos característicos foram marcados com setas).

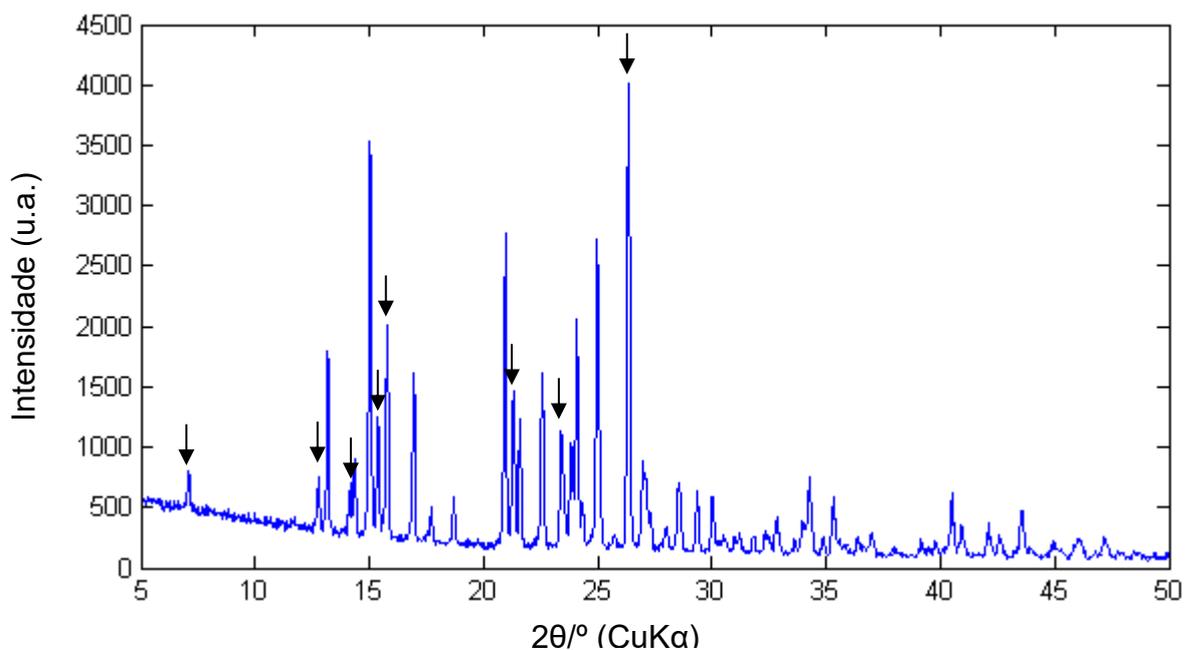


Figura 16: Difratograma da análise de difração de raios X para o SRLT-I.
Fonte: Próprio autor.

A forma cristalina produzida a partir da recristalização do SRTL-I com álcool etílico apresenta picos de difração de raios X característicos em ângulos 2θ de 7,3; 12,1; 12,7; 14,0; 15,6; 17,6; 20,1; 20,6; 21,9; 22,7; 23,0; 23,8; 24,3; 25,4; $26,3 \pm 0,2$ graus (polimorfo VI da referência SCHWARTZ et al., 2002). Na Figura 17 são apontados os picos característicos de difração de raios X obtidos experimentalmente, que foram consistentes com os picos de difração do SRTL-ET.

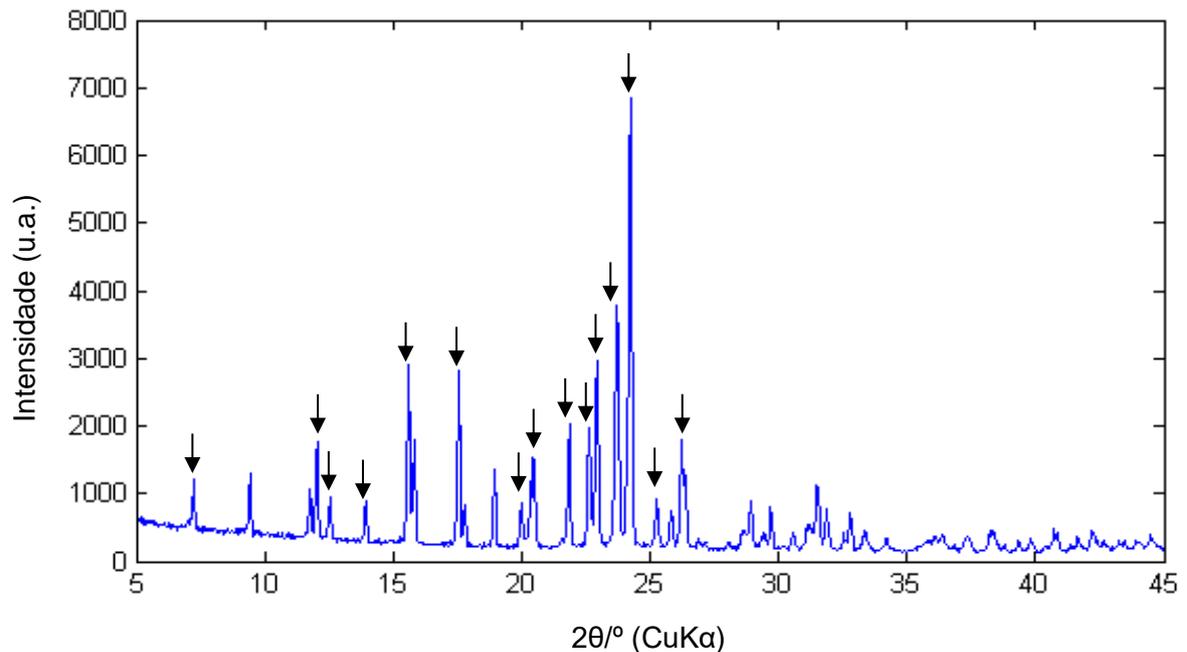


Figura 17: Difratograma da análise de difração de raios X para o SRTL-ET.
Fonte: Próprio autor.

A fase cristalina produzida através do SRTL-ET com água apresenta picos de difração de raios X com um pico de intensidade forte em aproximadamente em $4,0 \pm 0,2$ graus e picos com intensidade média em 8,0; 11,6; 12,0; 13,8; 16,5; 20,0; 22,8; 24,1; 25,0; 26,6; 30,7; $34,7 \pm 0,2$ graus (polimorfo VII da referência SCHWARTZ et al., 2002). Os picos de difração de raios X obtidos experimentalmente foram consistentes com os picos de difração do SRTL-H, como mostrado na Figura 18.

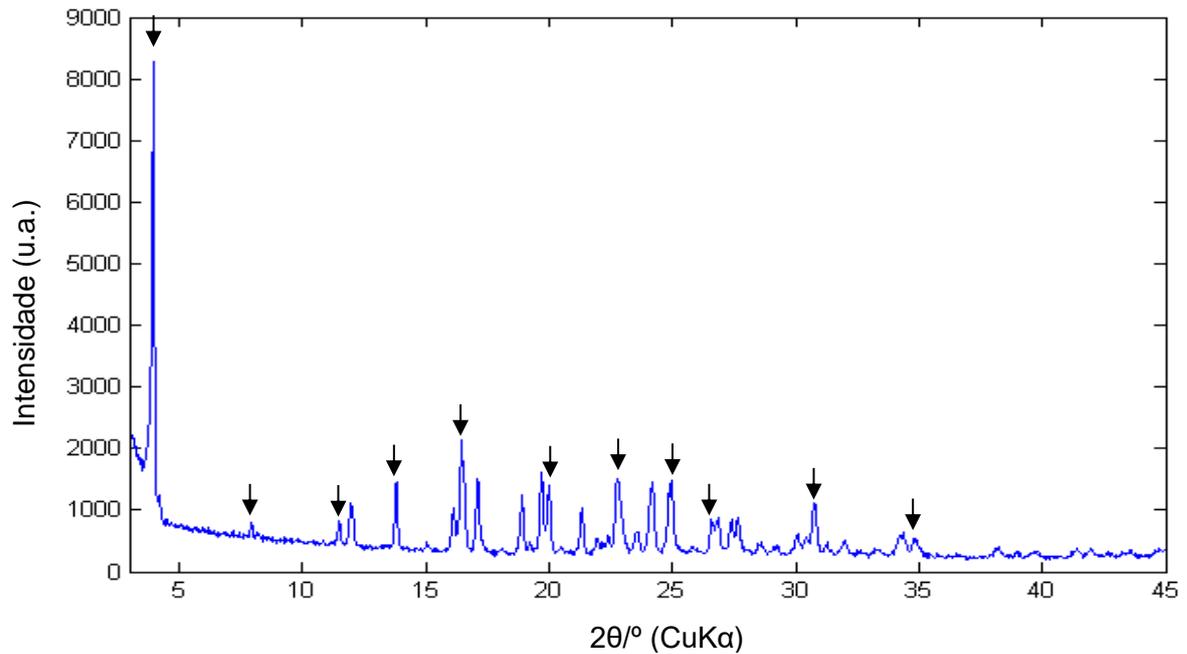


Figura 18: Difratograma da análise de difração de raios X para o SRTL-H.
Fonte: Próprio autor.

Conforme mostrado nas Figuras 16, 17 e 18 para as análises de difração de raios X dos três polimorfos de cloridrato de sertralina, é possível notar que há diferenças significativas dos perfis gráficos. Todos os difratogramas foram comparados com os dados descritos na literatura (ALMARSSON et al., 2003), confirmando a estrutura dos polimorfos SRTL-I, SRTL-ET e SRTL-H, além de indicar que os polimorfos foram sintetizados corretamente.

Apesar da difração de raios X ser uma técnica clássica para análise do estado sólido e para a caracterização do polimorfismo, contudo essa técnica pode apresentar alguns problemas quando se trata da quantificação de polimorfos, incluindo a orientação preferencial dos cristais, a embalagem e a espessura da amostra (HU et al., 2010). Quando comparada com a espectroscopia Raman para a quantificação de mistura binária de polimorfos de carbamazepina, esta última mostrou superioridade e mais confiável, pois problemas como tamanho de partícula diferente, morfologia e distribuição espacial das duas formas polimórficas influenciaram de maneira menos significativa na dispersão Raman do que a difração de raios X (TIAN et al., 2007). Além disso, a quantificação de fase amorfa, sem uma rede de cristal, também é problemática pelo fato desta fase não apresentar padrão de difração.

4.1.2 Caracterização por DSC

Na Figura 19 é apresentado as curvas de DSC, onde pode ser visualizado o perfil térmico das três formas polimórficas do cloridrato de sertralina (SRTL-I, SRTL-ET e SRTL-H). Na curva de DSC do SRTL-I (Figura 19a) é evidenciado dois picos endotérmicos: o primeiro é resultante da transição polimórfica do polimorfo I para o polimorfo III em aproximadamente 215 °C e, o segundo, centrado em 246 °C é responsável pela fusão do fármaco. Resultados similares foram obtidos por outros autores (SYSKO et al., 1993).

Para o SRTL-ET, diferentemente do polimorfo I, a Figura 19b exibe um pico endotérmico por volta de 70 a 100 °C, indicando a dessolvatação da molécula de etanol, associado a uma perda de massa pela TGA (Figura 20). Estes valores são comparáveis aos reportados anteriormente para este solvato (SCHWARTZ et al., 2002). Após a liberação da molécula de etanol, a curva apresenta processo semelhante ao SRTL-I.

E para o SRTL-H (Figura 19c), vê-se que antes da fusão do fármaco em 246 °C há dois eventos endotérmicos, sugerindo a desidratação gradual do SRTL-H. O primeiro evento, ocorre em temperatura relativamente baixa, entre 30 a 90 °C, indicando a liberação das moléculas de água que estão inseridas na superfície do composto. Por outro lado, o segundo evento, presente na faixa de 97 a 130 °C mostra que houve a necessidade de uma maior quantidade de energia para o desprendimento das moléculas de água presentes na estrutura do retículo cristalino.

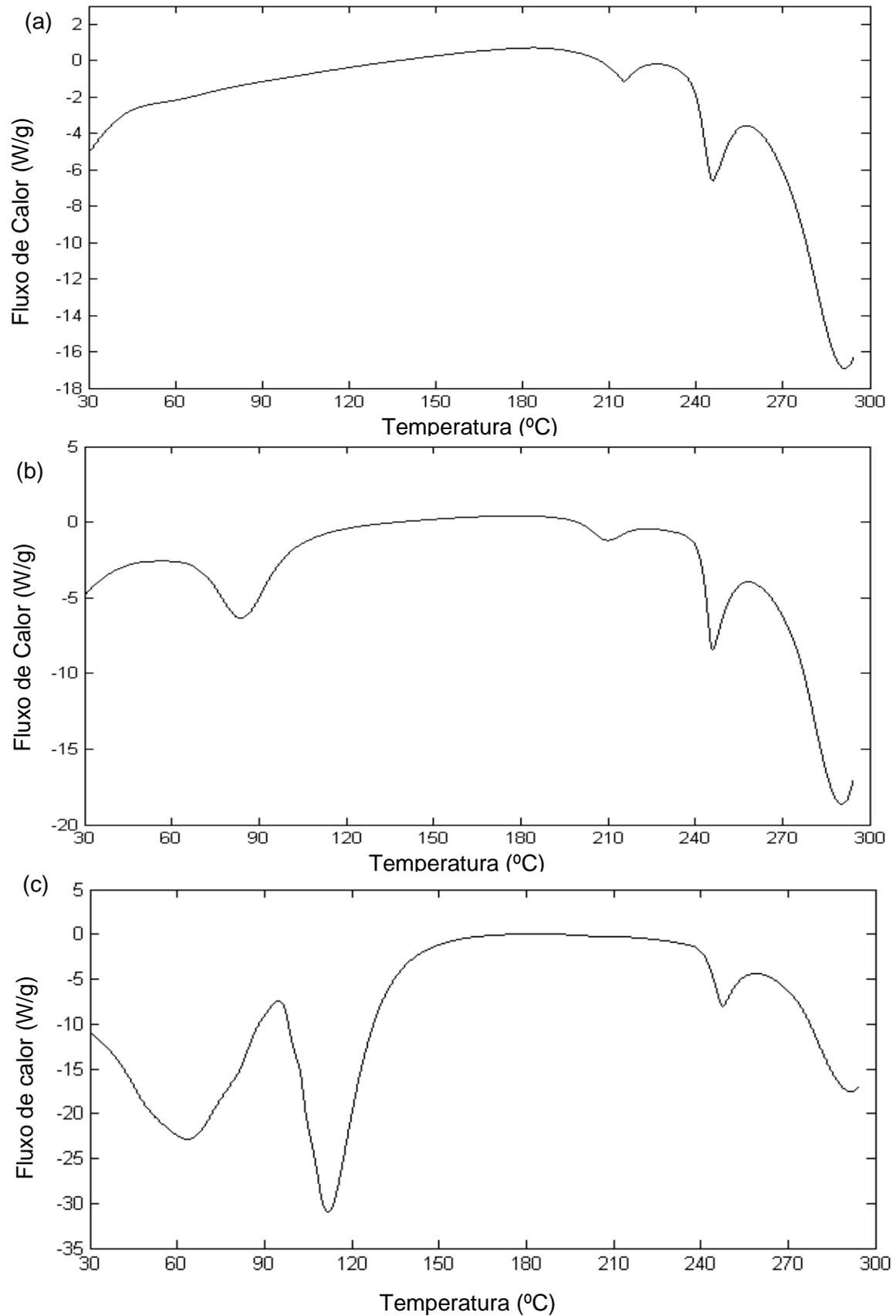


Figura 19: Curvas das análises de Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) dos polimorfos: (a) SRTL-I, (b) SRTL-ET e (c) SRTL-H do fármaco cloridrato de sertralina.
Fonte: Próprio Autor.

A caracterização térmica por DSC é importante na análise de eventos térmicos envolvendo transição polimórfica, assim também como nos processos de dessolvatação dos solvatos e hidratos (CAVALLARI et al., 2016). Todavia, para fins quantitativos, especialmente quando se trata da mistura de polimorfos, a análise se torna mais complexa. Com o aumento da temperatura durante as análises, há o risco da ocorrência de transição de fase de polimorfos distintos em temperaturas semelhantes, dificultando a interpretação dos dados, ou ainda a possibilidade de fusão de algum polimorfo induzir a solubilização de toda a amostra. Esses fatores podem levar a erros de quantificação de mistura polimórficas (ATEF et al., 2012).

Resultados imprecisos para quantificação por DSC tanto da mistura dos polimorfos I e III da carbamazepina quanto da mistura das formas α e γ da indometacina já foram relatados (MCGREGORA et al., 2004; ATEF et al., 2012). Por outro lado, esta técnica já demonstrou resultados satisfatórios para a quantificação de mistura binária de polimorfos do fármaco Sulfamerazina, com a otimização da taxa de aquecimento (LI et al., 2011). Contudo, os mesmos autores destacam ainda que, apesar da simplicidade da técnica, a presença de impurezas pode produzir mudanças imprevisíveis no processo de transformação de fase ou eventos térmicos que interferem ou se sobrepõem ao pico da mudança de fase, resultando na quantificação não confiável do conteúdo polimórfico. Portanto, o método DSC, pode ser inconveniente para quantificar mistura polimórfica na presença de excipientes (no caso dos comprimidos).

4.1.3 Caracterização por TGA

A Figura 20 apresenta a análise da curva TGA para confirmar a presença de moléculas de etanol na estrutura cristalina do cloridrato de sertralina. A ampliação do gráfico do perfil termogravimétrico do SRTL-ET (Figura 20b) mostra perda de massa de aproximadamente 0,99 mg (11,5 %) entre 40 e 90 °C, o que não é observado para o SRTL-I, que a massa permaneceu constante. Pela perda de massa e a conversão da massa perdida em mol é possível estimar o número de moléculas de etanol, por meio da relação estequiométrica entre as moléculas de etanol e SRTL-I. A quantidade de etanol desprendido do composto foi de $2,2 \times 10^{-5}$ mol e massa resultante após a dessolvatação correspondeu a $2,5 \times 10^{-5}$ mol.

A proporção encontrada entre as moléculas de etanol e SRTL-I foi de 0,9:1, estimando a dessolvatação de uma molécula de etanol (1:1). A massa molecular do solvato SRTL-ET é de $388,7 \text{ g.mol}^{-1}$, onde as moléculas de etanol correspondem a 11,8 % de sua massa. O valor estimado pela literatura da perda de massa correspondeu a 11,2 % (SCHWARTZ et al., 2002).

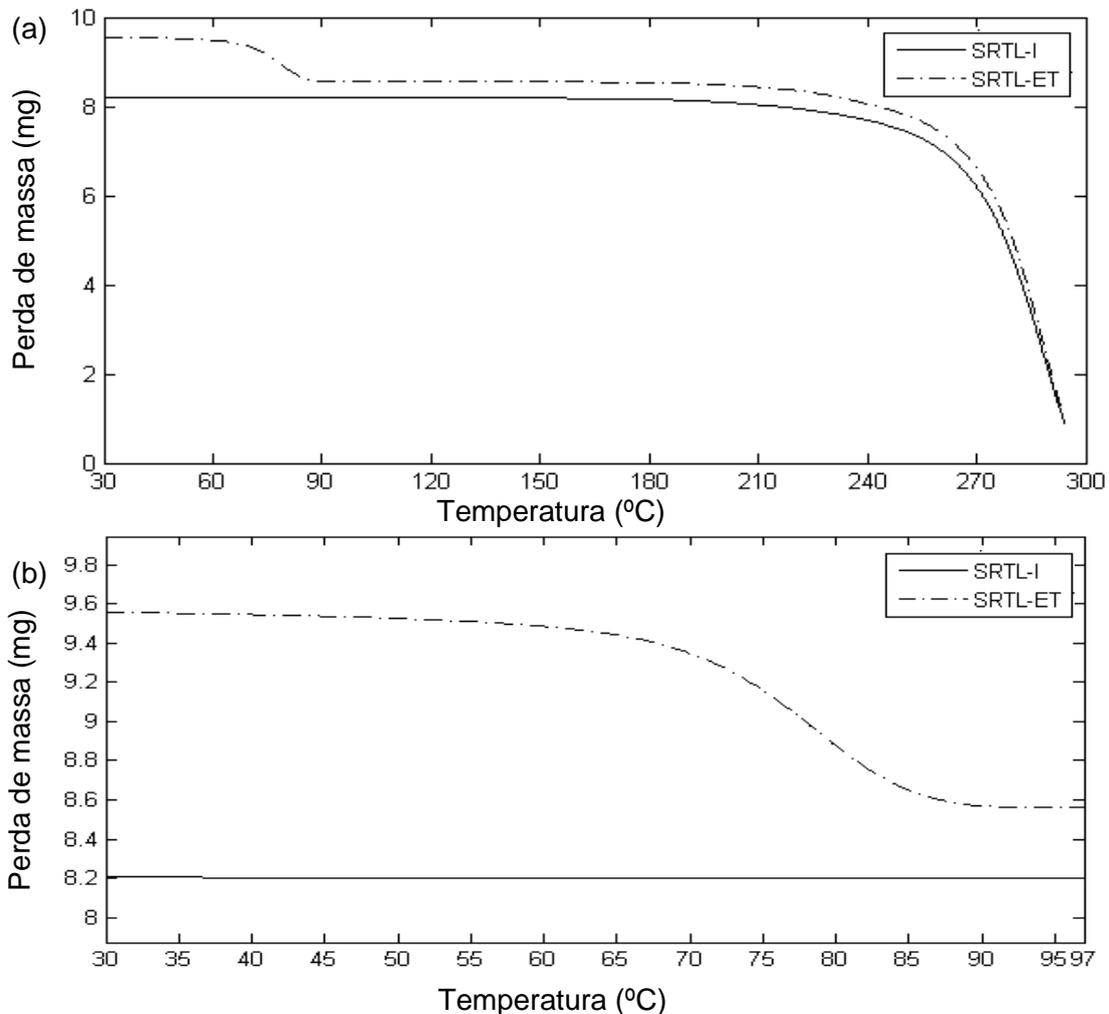


Figura 20: Análise da curva TGA para SRTL-I (linha retilínea) e SRTL-ET (linha tracejada). Em (a) é mostrado o gráfico em seu tamanho real e (b) o gráfico ampliado.
Fonte: Próprio autor.

O SRTL-H, assim como na análise de DSC, o perfil da curva TGA (Figura 21a) mostra que a desidratação ocorreu em duas etapas. Pela ampliação do gráfico (Figura 21b) é possível observar que a primeira etapa ocorre entre 30 a 80 °C e está associada a uma perda de massa de 2,18 mg, ao passo que a segunda etapa, entre 93 e 118 °C, produz uma perda de massa de 2,11 mg.

Considerando que na primeira etapa a perda de massa está possivelmente relacionada as moléculas de água presentes na superfície do cristal e que na segunda etapa as moléculas de água se encontram inseridas no retículo cristalino, a quantidade de moléculas de água desprendidas na segunda etapa correspondem a $1,2 \times 10^{-4}$ mol e a massa resultante após a desidratação nessa etapa correspondeu a $2,1 \times 10^{-5}$ mol. A proporção encontrada entre as moléculas de água e SRTL-I foi de 5,7:1, sugerindo um composto hexahidratado (6:1). A massa molecular do cloridrato de sertralina hexahidratado é de $450,7 \text{ g.mol}^{-1}$, na qual as moléculas de água correspondem a 24 %. O valor encontrado experimentalmente foi de 22,3 %

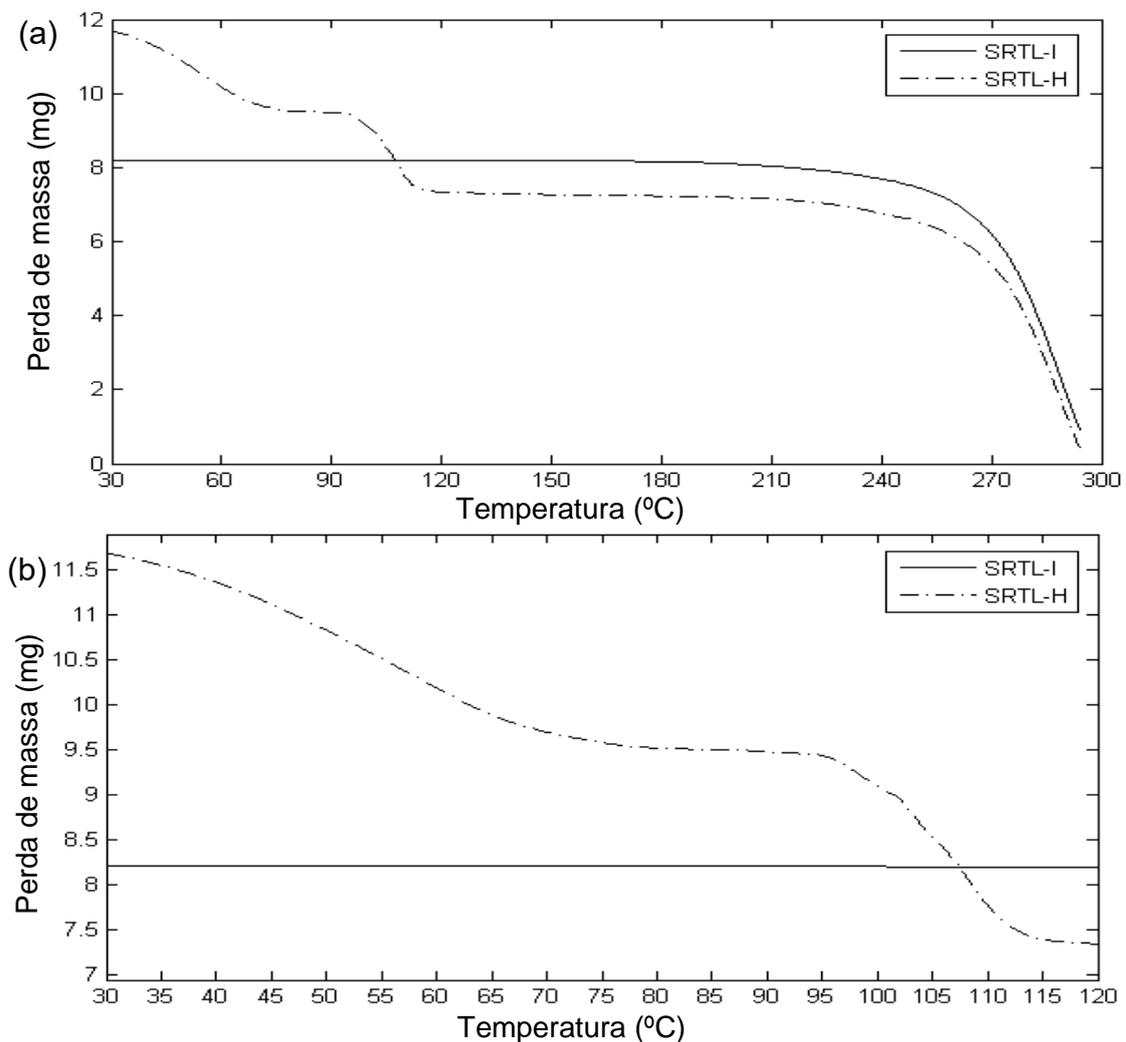


Figura 21: Análise da curva TGA para SRTL-I (linha retilínea) e SRTL-H (linha tracejada). Em (a) é mostrado o gráfico em seu tamanho real e (b) a imagem ampliada.

Fonte: Próprio autor.

A caracterização por TGA é de grande relevância, em especial quando se trata de solvatos e hidratos, pois é possível verificar a relação estequiométrica (CAVALLARI et al., 2016). Nesse trabalho a TGA foi utilizada como uma técnica complementar para confirmar a caracterização dos polimorfos, uma vez que os fármacos analisados são compostos orgânicos com moléculas de solventes inseridas na sua estrutura cristalina.

4.1.4 Caracterização por Espectroscopia Raman

Como exposto na revisão bibliográfica a espectroscopia Raman apresenta vantagens distintas na análise de materiais sólidos quando comparado com as técnicas apresentadas anteriormente, incluindo a preparação mínima da amostra, a natureza não destrutiva da medição e a possibilidade de a análise ser realizada em frascos de vidro ou plástico.

A espectroscopia Raman, diferentemente da espectroscopia no IR, exibe intensidade espectral mais forte para moléculas aromáticas e moléculas contendo átomos polarizáveis, além de ser menos sensível à presença de água (HU et al., 2010). Alguns trabalhos são apresentados na literatura mostrando a habilidade dessa técnica em discriminar polimorfos, bem como a sua capacidade para a quantificação de misturas polimórficas em combinação com métodos de regressão multivariada na presença ou não de excipientes (CALVO et al., 2018; FARIAS & CARNEIRO, 2014a, 2014b; HEINZ et al., 2007; HENNIGAN & RYDER, 2013; HU et al., 2010).

Os espectros Raman do cloridrato de sertralina das formas polimórficas SRTL-I (preto), SRTL-ET (azul) e SRTL-H (vermelho) podem ser evidenciados na Figura 22. Embora os espectros sejam semelhantes entre si, é possível observar algumas diferenças, especialmente nas bandas contidas nos intervalos entre 120 – 280 cm^{-1} , 320 – 390 cm^{-1} , 440 – 530 cm^{-1} e 720 – 800 cm^{-1} .

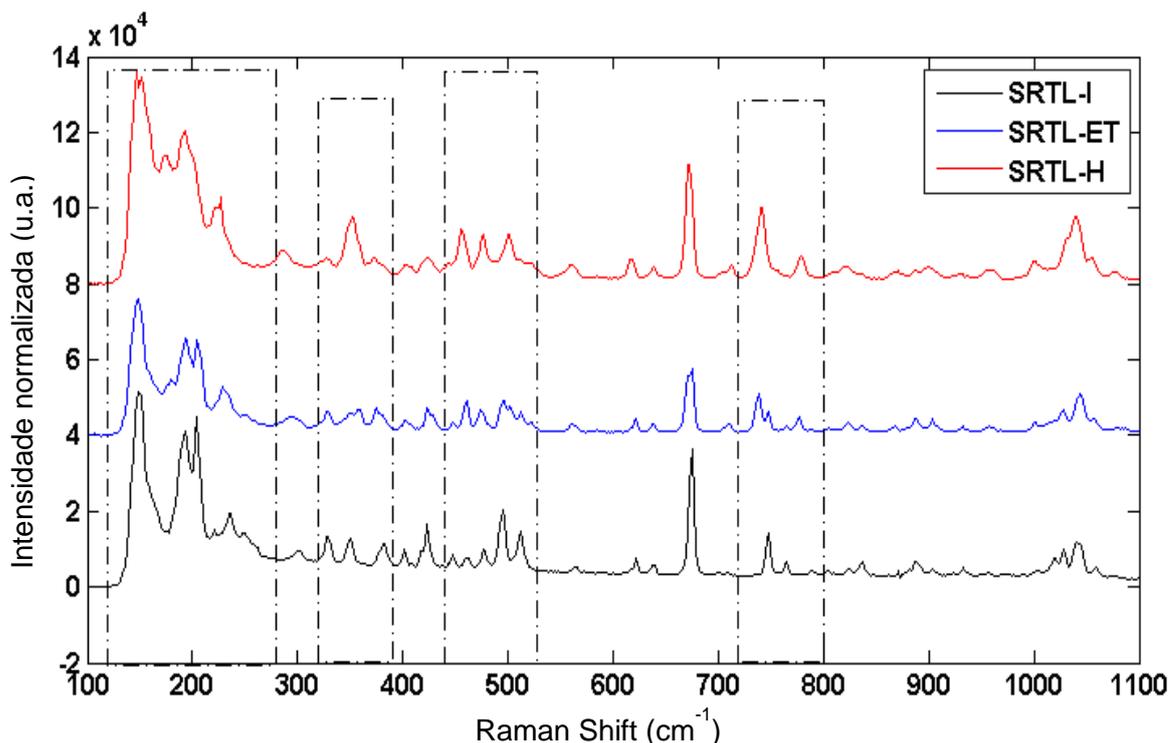


Figura 22: Espectro Raman para os polimorfos SRTL-I (preto), SRTL-ET (azul) e SRTL-H (vermelho) do fármaco cloridrato de sertralina.
Fonte: Próprio autor.

A região entre $265 - 385 \text{ cm}^{-1}$ apresenta deformações fora do plano para anéis aromáticos dissubstituídos por cloro (SOCRATES, 2001). Como mostrado nos espectros essa é uma das regiões que apresenta picos diferentes entre os três espectros.

Entre $800 - 900 \text{ cm}^{-1}$ temos vibrações de média intensidade referente aos álcoois devido ao estiramento C-C-O. Entre $800 - 960 \text{ cm}^{-1}$ vibração de torção da hidroxila. Entre $570 - 710 \text{ cm}^{-1}$ vibração fora do plano da hidroxila (SOCRATES, 2001).

Na espectroscopia Raman, todos esses modos de vibração têm intensidade baixa ou moderada. Considerando que o etanol se encontra em pequena quantidade no polimorfo, a intensidade de seu sinal na espectroscopia Raman será ainda mais atenuada. É possível observar esses picos entre os intervalos $440 - 530 \text{ cm}^{-1}$, onde tem intensidade relativamente menor no solvato de etanol, além de ter o formato dos picos diferentes em relação as outras duas formas polimórficas.

Entre 310 e 410 cm^{-1} há picos de intensidade média e fraca referente a amina secundária presente na molécula de cloridrato de sertralina (SOCRATES, 2001). Observe que, nessa região, os picos são distintos para os três espectros, revelando

que as interações entre as moléculas de etanol e água, interferem nos modos de vibração da amina secundária.

No pico entre $660 - 690 \text{ cm}^{-1}$, vê-se uma grande diferença entre os espectros das referidas moléculas. No solvato de etanol esse pico apresenta um desdobramento em dois picos. O número de onda em que ocorre o pico também é diferente quando se compara o espectro Raman das moléculas anidra e hidratada, sendo que a molécula anidra apresenta um deslocamento para número de onda maiores. Esses picos são referentes ao modo de vibração da hidroxila fora do plano ($570 - 710 \text{ cm}^{-1}$) (SOCRATES, 2001).

Como descrito até o momento, os três polimorfos foram devidamente caracterizados, confirmando as mudanças de fase de cada estrutura. A partir de então, deu-se prosseguimento do trabalho com o passo do planejamento das misturas polimórficas e utilizando a espectroscopia Raman em combinação com o método de regressão multivariado iPLS para quantificação das misturas. A ideia inicial foi um planejamento de misturas ternárias dos polimorfos SRTL-I, SRTL-ET e SRTL-H, contudo após o tratamento dos dados e a construção do modelo iPLS observou-se que os resultados não condiziam com a metodologia proposta, apresentando erros elevados de todos os parâmetros utilizados para medir a eficiência do modelo (RMSEC, RMSECV, RMSEP e R^2), não obtendo resultados satisfatórios.

Acredita-se que as maiores fontes de erros foram causadas pela ocorrência da transição polimórfica do solvato de etanol para polimorfo comercializado (SRTL-I), sendo este energeticamente mais estável. Observou-se que o modelo com duas variáveis latentes (vetores independentes) fez com que o modelo se ajustasse. Ao retornar para a base de dados coletadas, viu-se que o espectro Raman do solvato de etanol não estava presente nos dados coletados no comprimido. Dessa forma, conclui-se que o solvato de etanol havia sofrido transição de fase para a forma I, transformando o modelo ternário em um modelo binário, daí a necessidade de apenas duas variáveis latentes. As possíveis explicações para tal mudança podem ter sido ocorridas durante: a homogeneização dos polimorfos através da pressão do pistilo no almofariz; pressão utilizada para formação dos comprimidos no pastilhador (1 tonelada) e o tempo de exposição da amostra no laser (60 s). Além disso, ainda há os

fatores mais difíceis de controlar como a temperatura ambiente, umidade atmosférica e incidência de luz.

É importante ressaltar que, em virtude da falta de recursos instrumentais e do pouco tempo para o término do trabalho proposto, não foi possível confirmar através de dados experimentais todos os fatores apontados acima que podem ter levado a erros de quantificação da mistura ternária. Desse modo, optou-se em realizar o planejamento de mistura binária para a quantificação dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H.

4.2 Quantificação simultânea de mistura binária, por meio de iPLS, dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H usando espectroscopia Raman.

As amostras do conjunto de calibração e validação foram preparadas de acordo com o planejamento de mistura binária descrito na seção de materiais e métodos. Antes da construção do modelo de regressão iPLS e após a centralização dos dados na média, foram testados diferentes métodos de pré-tratamentos em várias combinações com objetivo de reduzir os efeitos de variações sistemáticas que não são inerentes a informação química das amostras, mas que podem influenciar diretamente no desempenho do modelo. Dentre os pré-tratamentos testados, a combinação da normalização pela área, o SNV e a OSC mostraram-se mais adequados para os espectros Raman coletados, fornecendo menores valores de RMSEP e, portando, escolhidos para construção do modelo final.

A normalização pela área foi usada como uma estratégia para retirar a influência das oscilações de intensidade de sinal que podem ocorrer nas análises, causados principalmente pela diferença do tamanho de partículas dos polimorfos, sendo um fenômeno essencialmente físico (HEINZ et al., 2007). Esse método foi utilizado tanto nos espectros individuais como nos espectros médios com a finalidade de fazer com que os espectros tenham o mesmo peso e mantenham a relação entre os picos (HWANG et al., 2005).

Complementando a normalização pela área, o SNV também foi utilizado com o propósito de corrigir os espectros dos efeitos aditivos e multiplicativos, pois o SNV tem a capacidade de minimizar os efeitos de dispersão da luz pela remoção de

deslocamentos e declives nos espectros causados pelo o espalhamento da luz intrínseca às amostras sólidas (FEARN et al., 2009).

Já a OSC foi empregada para melhorar a linearidade entre os dados espectrais (matriz X) e os dados de concentração dos polimorfos (matriz Y), visto que essa ferramenta é capaz de remover apenas variações sistemáticas da matriz X que não está relacionada à matriz Y (WOLD et al., 1998).

Em seguida, um modelo iPLS foi aplicado para extrair informação quantitativa dos espectros registrados. O iPLS aprimora a qualidade do modelo PLS, pois apenas os intervalos de variáveis que apresentam maior variância, são usados (NORGAARD et al., 2000). Uma grande vantagem do iPLS é a sua eficiência de eliminar variáveis não lineares, ruídos e variáveis que não estão relacionadas à discriminação dos polimorfos (FARIAS & CARNEIRO, 2014a). Todas essas vantagens otimizam a qualidade do modelo e, conseqüentemente, melhora o seu poder de predição. Na Figura 23 é destacada seleção de 40 variáveis (240 a 280) escolhidas para calcular o modelo iPLS. Portanto, a faixa espectral escolhida pelo modelo que melhor correlaciona os espectros Raman com a concentração dos polimorfos compreende a região entre 350 - 390 cm^{-1} .

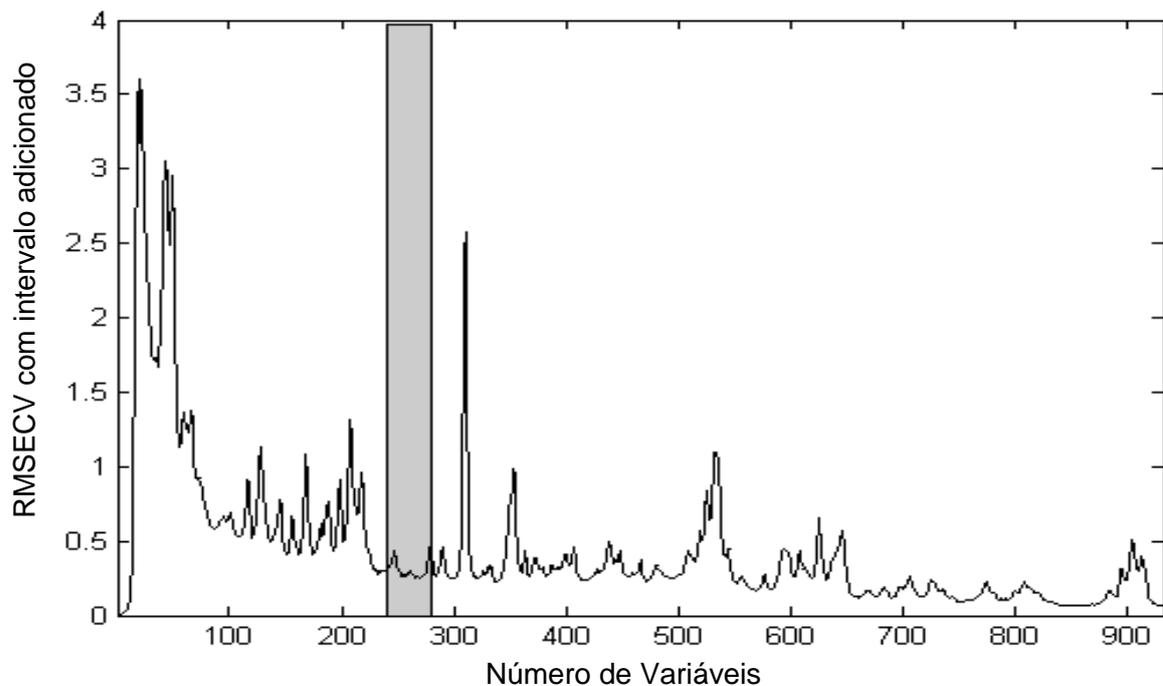


Figura 23: Quantidade de variáveis selecionadas pelo modelo da mistura binária. Em cinza é mostrado que o modelo iPLS foi calculado selecionando o intervalo de variáveis de 240 a 280 (40 variáveis).
Fonte: Próprio autor.

A escolha do número de variáveis latentes do modelo de regressão iPLS construído foram obtidas por meio da validação interna cruzada do tipo *leave-one-out*. A Figura 24 apresenta os valores da raiz quadrada do erro da validação cruzada (RMSECV) versus o número de variáveis latentes.

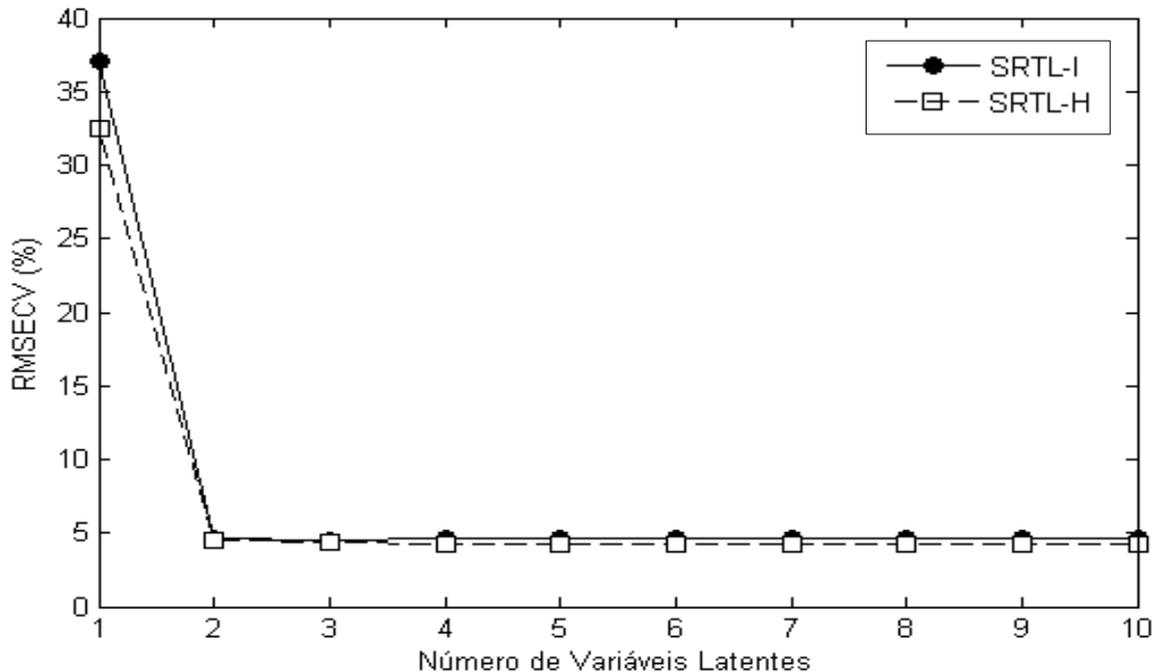


Figura 24: Valores da raiz quadrada do erro da validação cruzada (RMSECV) versus o número de variáveis latentes.

Fonte: Próprio autor.

A escolha do número ideal de variáveis latentes é uma etapa de grande importância para o cálculo de outros parâmetros que são utilizados na avaliação da qualidade e confiabilidade do modelo, evitando assim, o seu sub ou sobreajuste e, garantindo um melhor desempenho nas previsões. Sendo assim, um número insuficiente de variáveis latentes, pode deixar de explicar informações importantes para o parâmetro de interesse, ocasionando o seu subajuste. Por outro lado, o seu excesso pode adicionar informações irrelevantes como ruídos e interferências, conduzindo ao sobreajuste do modelo (FERREIRA, 2015).

Através da avaliação do gráfico da Figura 24 é possível observar que apenas duas variáveis latentes são suficientes para explicar a maior parte de variação dos dados, não havendo variância significativa com inclusão de novos fatores no modelo, indicando que dois é o número ótimo. A variância explicada para os dados da matriz X (espectros) e da matriz Y (valores de concentrações das formas polimórficas) no

modelo iPLS, utilizando duas variáveis latentes, foi de 99,68 %, para o bloco X e 99,92 % para o bloco Y. Adicionalmente, é importante destacar que a escolha de duas variáveis latentes já era esperada, tendo em vista que as variações espectrais ocorrerão em virtude da variação de concentração da mistura binária dos dois polimorfos (SRTL-I e SRTL-H) nas amostras.

A validação cruzada por si só não é um parâmetro que garante à qualidade e eficiência do modelo. É recomendado testar o modelo com um conjunto de amostras de “teste” totalmente independentes, além da validação cruzada (BRERETON, 2007). Por isso, depois de construir o modelo de calibração com o número ideal de variáveis latentes, um conjunto de validação foi preparado com o objetivo de testar a robustez do modelo obtido. Assim, cinco amostras foram avaliadas com concentrações distintas do conjunto de calibração. O teste com amostras externas é importante, pois avalia se os parâmetros adquiridos com o modelo construído são reproduzíveis, o que confirma a capacidade do modelo em realizar novas previsões.

Se o modelo for robusto o conjunto de validação apresentará valores de erros de predição (RMSEP) semelhantes aos valores de erro de validação cruzada (RMSECV), o que demonstra o não sob ou sobreajuste do modelo (BRERETON, 2000; NAGY et al., 2016). Na Tabela 5 é exposto os parâmetros estatísticos utilizados para analisar a qualidade do modelo iPLS com a realização de pré-tratamento dos dados.

Tabela 5: Parâmetros analíticos para o modelo iPLS dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H com a realização de pré-tratamentos.

| Parâmetros | Polimorfos | |
|----------------------------------|------------|--------|
| | SRTL-I | SRTL-H |
| RMSEC (%) | 2,01 | 1,10 |
| RMSECV (%) | 4,66 | 4,46 |
| RMSEP (%) | 5,20 | 4,88 |
| R ² Calibração | 0,996 | 0,999 |
| R ² Validação Cruzada | 0,979 | 0,981 |
| R ² Predição | 0,982 | 0,991 |

Legenda: Intervalos utilizado no modelo: 350 - 390 cm⁻¹; Pré-tratamento: Normalizado pela área, SNV e OSC.

Na Tabela 5 é mostrado que os valores de RMSECV são de 4,66 % e 4,46 % para os polimorfos SRTL-I e SRTL-H, respectivamente. Enquanto que os valores de RMSEP foram de 5,20 % para o SRTL-I e de 4,88 % para o SRTL-H. Os erros de predição estão muito próximos dos erros de calibração por validação cruzada, demonstrando que o modelo não apresenta sobreajuste e que é capaz de prever concentrações de novas amostras. O polimorfo hidrato foi o que apresentou uma ligeira diferença no erro de predição em relação ao seu respectivo anidro, mas pouco significativa.

A Tabela 5 apresenta também os valores dos coeficientes de determinação, na qual pode ser observado uma boa correção dos R^2 dos erros de Calibração, Validação Cruzada e de Predição. Dentre os coeficientes de determinação cabe destacar o R^2 do erro de predição, apresentado graficamente na Figura 25. Nesse caso, as amostras apresentam resíduos (diferença entre o valor calculado pelo modelo e o valor real do polimorfo na amostra) baixos, com R^2 de 0,982 para o SRTL-I (Figura 25a) e 0,991 para o SRTL-H (Figura 25b). Portanto, o modelo de calibração adquirido com somente 11 amostras, realizado de acordo com um planejamento de misturas binárias, é um modelo capaz de calcular as possíveis concentrações de dois polimorfos em uma situação real, que por ventura podem surgir na linha de produção.

Para uma melhor compreensão do erro médio de predição, partindo do princípio que cada amostra contém 50 mg como mostrado no conjunto de calibração na Tabela 3, o erro médio de predição para os polimorfos SRTL-I e SRTL-H seria de 2,6 mg e 2,4 mg, respectivamente. Logo, o modelo apresenta uma capacidade de predição com erro em torno de 2,5 mg. É importante ressaltar que esses erros poderiam ser ainda menores com o aumento do número de amostras do conjunto de calibração e um maior número de leitura espectrais por amostra, diminuindo o risco do problema da heterogeneidade.

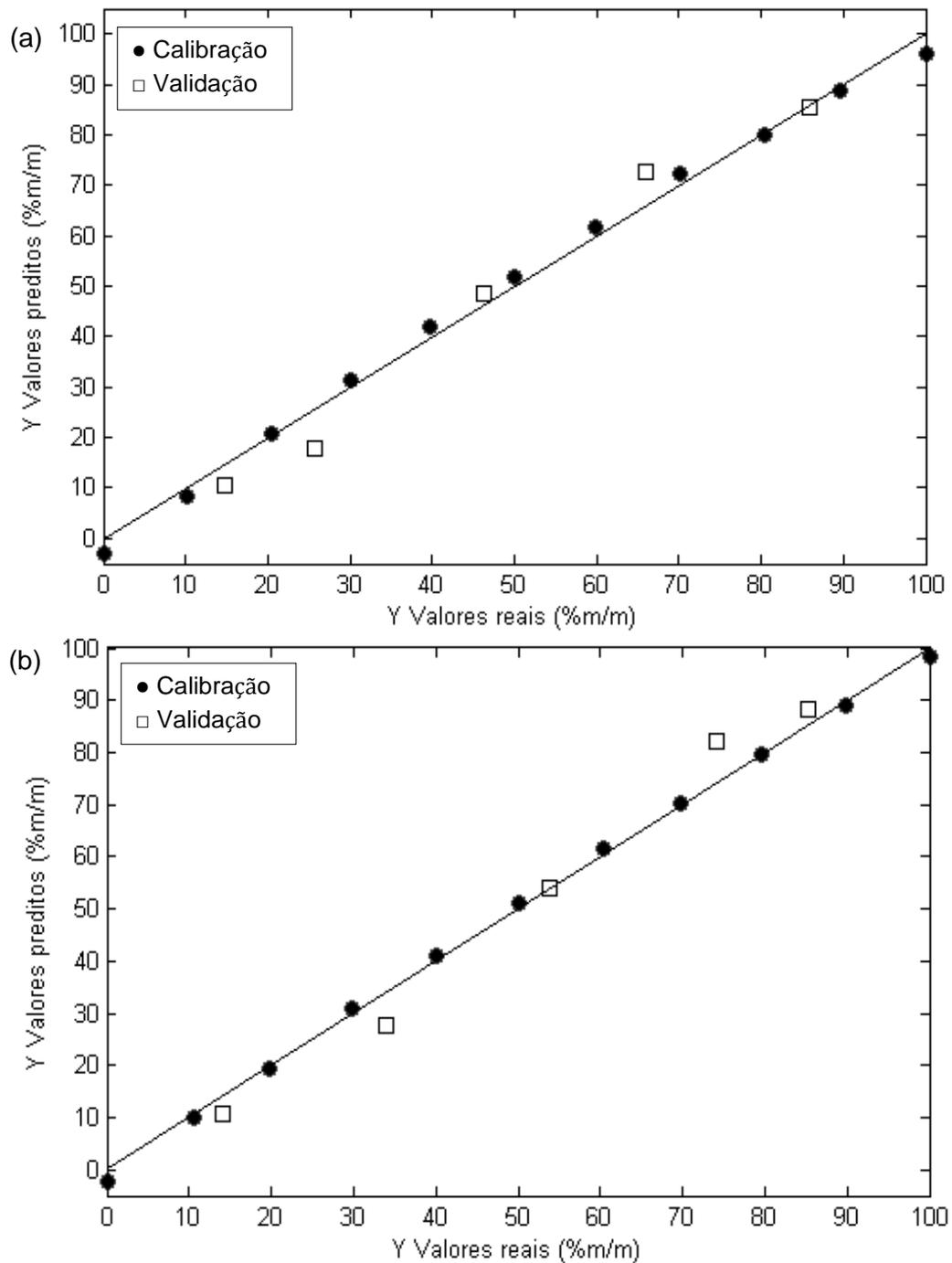


Figura 25: Valores reais versus valores preditos pelo modelo iPLS para a mistura binária dos polimorfos de cloridrato de sertralina: a) SRTL-I, b) SRTL-H.
Fonte: Próprio autor.

Na Tabela 6 é destacado o quanto a não escolha de um pré-tratamento adequado pode influenciar diretamente na qualidade e no bom desempenho do modelo. Vê-se que, mesmo utilizando o modelo do tipo iPLS e com a escolha de duas variáveis latentes, o quadro dos resultados muda drasticamente de configuração quando os dados dos espectros Raman não são devidamente tratados.

Para o SRTL-H, o RMSEC e o RMSECV são relativamente baixos, sendo de 5,61 % e 6,83 %, respectivamente. O mesmo não é observado para o erro de predição com o valor de 16,2 %, apresentando uma baixa capacidade de determinar concentração de novas amostras. O R^2 para este parâmetro foi de 0,80 acusando alto valor residual. Enquanto o polimorfo SRTL-I, todos os parâmetros que avalia a qualidade do modelo foram substancialmente maiores quando comparado com os resultados dos dados tratados. O erro de validação cruzada para esse polimorfo foi de 17,2 %, e os erros de predição para as amostras externas foram ainda maiores (18,5 %). O coeficiente de determinação baixo relava uma diferença bem expressiva entre o valor calculado pelo o modelo e o valor real, com valor residual muito alto. Desse modo, evidencia-se que quando as informações espectrais não são submetidas ao tratamento adequado antes da construção do modelo, aumenta também a probabilidade de haver a distorção do mesmo, reduzindo sua capacidade de predição e elevando os erros de quantificação.

Tabela 6: Parâmetros analíticos para o modelo iPLS dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H sem a realização do pré-tratamento de dados.

| Parâmetros | Polimorfos | |
|-------------------------|------------|--------|
| | SRTL-I | SRTL-H |
| RMSEC (%) | 14,5 | 5,61 |
| RMSECV (%) | 17,2 | 6,83 |
| RMSEP (%) | 18,5 | 16,2 |
| R^2 Calibração | 0,74 | 0,80 |
| R^2 Validação Cruzada | 0,74 | 0,95 |
| R^2 Predição | 0,74 | 0,80 |

Legenda: Intervalos utilizado no modelo: [710 - 760; 860 - 960] cm^{-1} ; com os dados somente centrados na média.

A espectroscopia Raman assim como as demais técnicas instrumentais apresentas anteriormente tem as suas limitações e peculiaridades. Tais características podem influenciar nos erros de predição e, conseqüentemente afetar no desempenho do modelo.

A homogeneidade da amostra, conforme apontado por alguns pesquisadores (HEINZ et al., 2007; HU et al., 2010), é uma fonte de erro que deve ser levado em consideração quando se trata da quantificação de misturas polimórficas por

espectroscopia Raman. A homogeneidade pode ser influenciada pela densidade, morfologia, tamanho e orientação preferida das partículas (HEINZ et al., 2007; TIAN et al., 2007). Para amostras não homogêneas a área sensibilizada pelo laser do microscópio pode ser um problema na representatividade da amostra.

Na espectroscopia Raman, o microscópio direciona o feixe de laser monocromático à superfície da amostra. O laser, geralmente, possui uma área de análise de 1 mm^2 , atingindo uma profundidade de alguns poucos decímetros de milímetros. Essa característica faz com que a informação coletada em um espectro, por se referir a um volume de amostra muito pequeno, não seja representativa de toda a amostra (FARIAS & CARNEIRO, 2014b). O pequeno tamanho amostral e a heterogeneidade da amostra já foi apontado como a principal fonte de erro de quantificação por espectroscopia Raman (XIE et al., 2008; CAMPBELL et al., 2002).

Além disso, a variação da resposta do instrumento ainda pode ser influenciada por flutuações da intensidade do laser, radiação de corpo negro e efeitos de fluorescência da amostra que pode causar alterações na linha de base e obscurecimento parcial do sinal Raman (HEINZ et al., 2007). Em casos mais extremos ainda pode haver a possibilidade da ocorrência de transição polimórfica durante a análise devido ao aquecimento da amostra ocasionado pela a fonte de laser (HENNIGAN & RYDER, 2013).

Todas essas características oriundas da técnica e de como as análises são realizadas podem levar a um modelo de calibração multivariada com baixa capacidade de predição, o que justifica, em parte, as diferenças dos parâmetros estatísticos que mede a eficiência do modelo entre os dados espectrais com e sem o pré-tratamento. Daí a importância da escolha de um pré-tratamento adequado para construção do modelo.

4.3 Quantificação simultânea da mistura binária, por meio de iPLS, dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H na presença de excipientes empregando espectroscopia Raman

A quantificação por meio do planejamento de mistura binária dos APIs do fármaco cloridrato de sertralina na presença de excipientes teve o objetivo de verificar se a espectroscopia Raman é capaz de quantificar os polimorfos SRTL-I e SRTL-H e se os excipientes podem interferir no sinal dos seus respectivos espectros. Desse modo, possibilitando a simulação de uma situação real em uma indústria farmacêutica. Com essa finalidade, um modelo de regressão multivariada do tipo iPLS foi construído com 11 amostras calibração e 5 amostras de validação, obedecendo um planejamento de mistura binária com excipientes (Vide Tabela 3). Afim de evitar problemas de micro-heterogeneidade nas análises Raman foram coletados 10 espectros por amostra e escolhendo o espectro médio como representativo da amostra. Em seguida, os espectros foram corrigidos, sendo a normalização pela área, o SNV e OSC os métodos de pré-tratamentos que mais se adequaram ao conjunto de dados e que apresentaram menores valores de erros de predição.

Foi discutido anteriormente (Seção 1.5.3) que os excipientes apresentam sinal Raman de menor intensidade quando comparado com o sinal dos APIs em virtude de serem sais ou moléculas que possuem ligações muito polarizadas. Na Figura 26 é mostrado os sinais espectrais dos excipientes comumente utilizados na formulação (amido, estearato de magnésio, povidona e dióxido de silício), na qual é possível observar que o estearato de magnésio é o excipiente que apresenta uma maior quantidade de picos e de maior intensidade. Mesmo que haja sobreposição de bandas resultante da mistura de sinais de APIs e excipientes, o método quimiométrico PLS é capaz de lidar com dados dessa natureza (CALVO et al., 2018b). Como já relatado, o PLS é um método de regressão de primeira ordem que consegue quantificar misturas complexas, mesmo na presença de interferentes (se estiverem presentes na fase de calibração) (OLIVIERI et al., 2006).

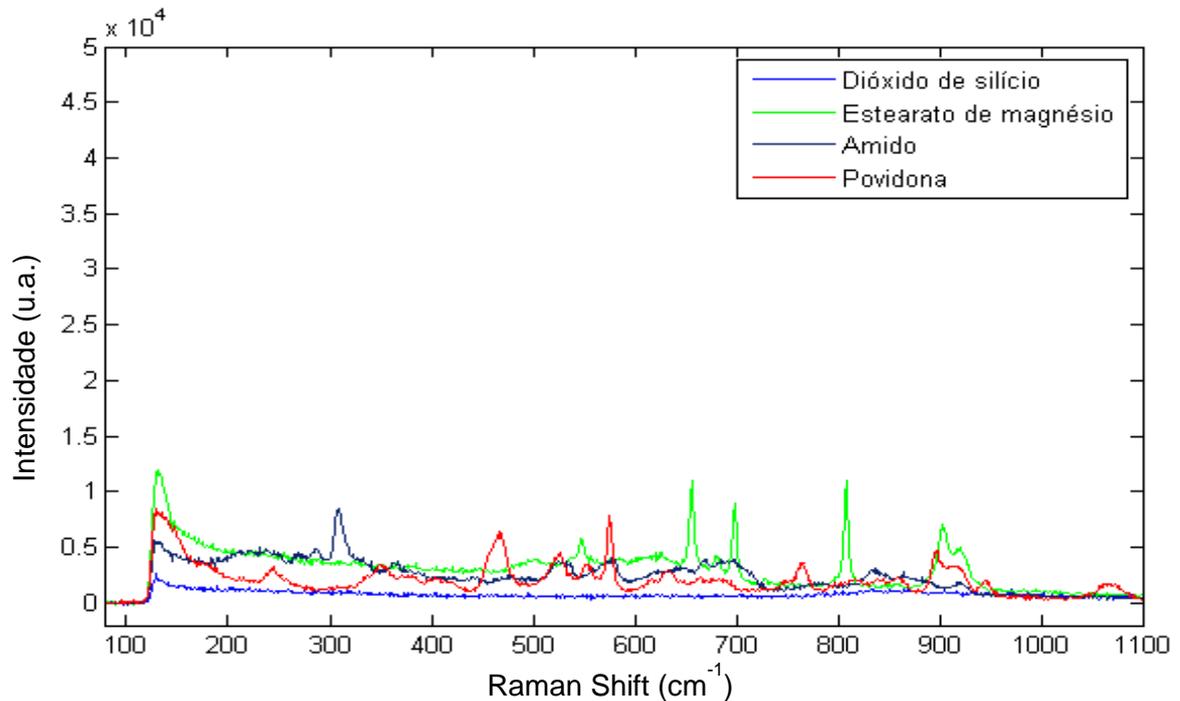


Figura 26: Espectros Raman dos excipientes dióxido de silício, estearato de magnésio, amido e povidona.

Fonte: Próprio autor.

A Figura 27 destaca a quantidade de variáveis (50 variáveis) escolhidos para a construção do modelo de regressão, compreendendo a seleção da variável 550 a 600, que corresponde a faixa espectral de 660 – 710 cm^{-1} . Muito embora haja diferenças perceptíveis nos espectros Raman das formas SRTL-I e SRTL-H, conforme evidenciado na caracterização dos polimorfos por Raman (Figura 22), não necessariamente o modelo iPLS irá escolher exatamente intervalos onde a diferença é perceptível.

Antes de selecionar as variáveis, o iPLS inicia calculando modelos PLS individuais, cada um utilizando apenas um dos intervalos de variáveis pré-definidos, ou seja, para cada intervalo de variáveis definidos para um dado conjunto de dados será calculado um modelo PLS separadamente. Aquele ou aqueles intervalos que apresentarem menores erros de RMSECV serão os intervalos selecionados para construção do modelo de calibração. Essa seleção pode ser uma ou um conjunto de variáveis adjacentes (WISE et al., 2006). Aqui, a quantidade de variáveis em destaque na Figura 27 selecionado pelo o modelo compreende uma região espectral que melhor correlaciona as variáveis da matriz X com a concentração da matriz Y, essa escolha é baseada na variação das intensidades dos espectros médios que está diretamente

relacionada à mudança na proporção dos polímeros em cada amostra.

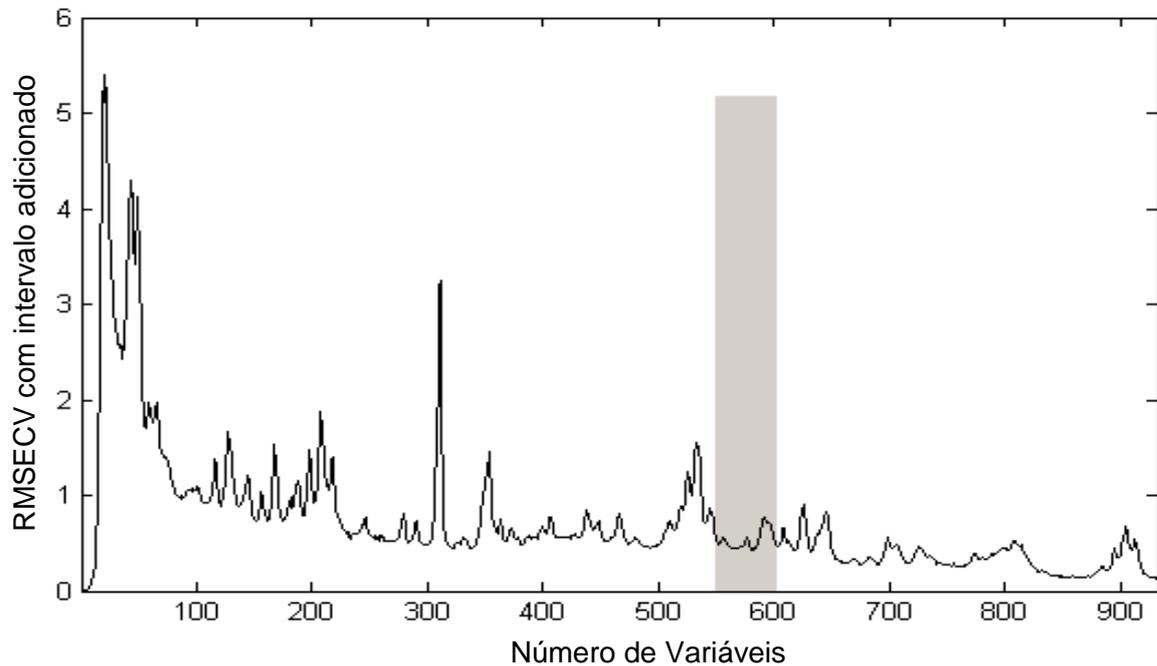


Figura 27: Quantidade de variáveis selecionadas pelo modelo da mistura binária na presença de excipientes. Em cinza é mostrado que o modelo iPLS foi calculado selecionando o intervalo de variáveis de 550 a 600 (50 variáveis).

Fonte: Próprio autor.

O número ótimo de variáveis latentes a ser utilizado na construção do modelo iPLS foi realizada utilizando a validação interna cruzada do tipo *leave-one-out*. As informações dos valores do erro quadrático médio da validação cruzada versus o número de variáveis latentes são evidenciadas na Figura 28.

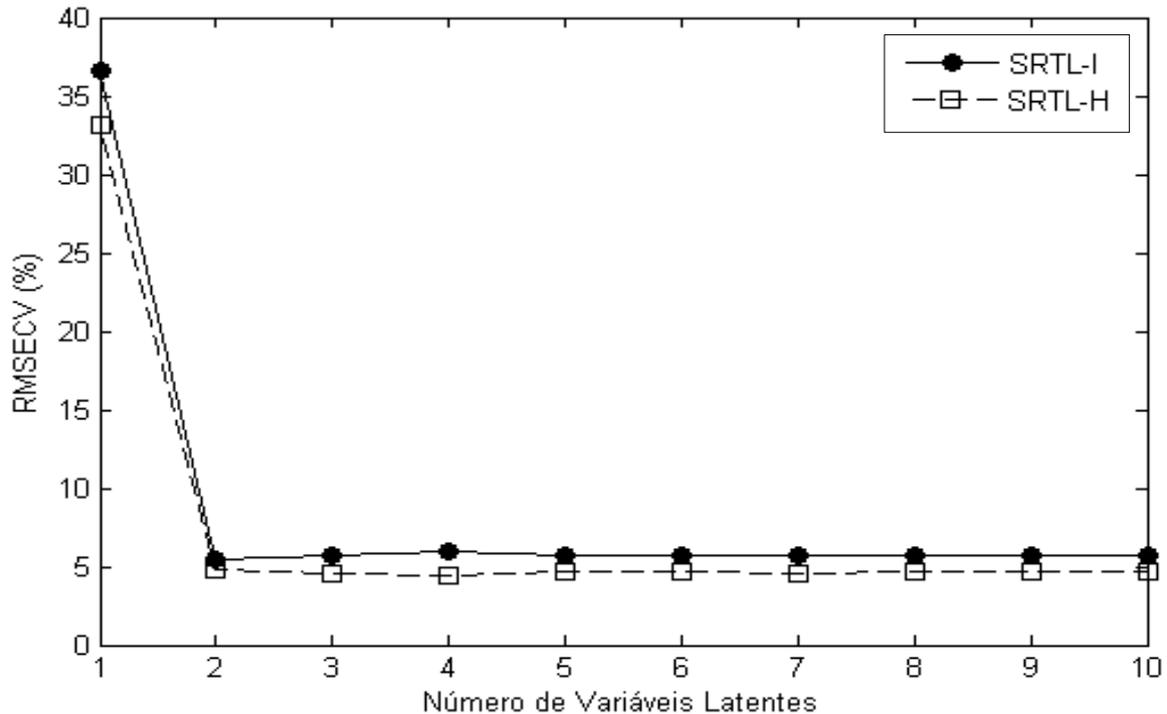


Figura 28: Valores da raiz quadrada do erro da validação cruzada (RMSECV) versus o número de variáveis latentes.

Fonte: Próprio autor.

Por meio dos resultados apresentados na Figura 28 é visível que os erros de RMSECV mínimo foi apresentado na segunda variável latente, indicando que 2 é o número ótimo de variáveis latentes. Outra informação importante é que duas variáveis latentes foram capazes de explicar uma variância total de 99,48 % dos dados. Logo, utilizou-se duas variáveis latentes na construção do modelo de calibração.

Vale ressaltar ainda, que a inclusão de novas variáveis latentes não incorpora informação concreta suficiente para alterar os valores de RMSECV, o que já era esperado, uma vez que as variações espectrais são resultados apenas da variação da concentração dos dois polímeros presentes nas amostras e que a concentração dos excipientes permaneceu constante, portanto, não contribuindo para variação dos sinais espectrais Raman.

Após a escolha do número ideal de variáveis latentes, um conjunto de validação externa foi desenvolvido para avaliar a capacidade do modelo em classificar novas amostras contendo misturas binárias e os excipientes comumente presentes na formulação do fármaco. Quantificar novas amostras é uma boa maneira de investigar a verdadeira eficácia de um modelo construído e confirmar a eliminação bem-sucedida

do superajuste (NAGY et al., 2016). Neste caso, foram preparadas 5 amostras com combinações binárias de concentrações distintas do conjunto de calibração.

Na Tabela 7 pode ser visualizado que o SRTL-I apresentou erro de predição (RMSEP) ligeiramente maior dentre os dois polimorfos, com o valor de 2,84 % e seu erro de validação cruzada (RMSECV) foi de 5,49 %. Já o SRTL-H, os valores de RMSEP e RMSECV foram, respectivamente, de 2,07 e 4,81 %. Comparando os valores desses dois parâmetros utilizados para medir a eficiência e a qualidade do modelo é possível observar que a diferença entre eles é de um pouco mais que 2 %, demonstrando erros muito próximos. Já foi destacado por alguns autores (BRERETON, 2000; NAGY et al., 2016) a importância de comparar esses dois parâmetros, haja visto que uma diferença expressiva nos seus valores pode levar, na maioria das vezes, a construção de um modelo com respostas enganosas e excessivamente otimista. Dessa forma, é possível afirmar que o modelo iPLS construído é robusto e reproduzível, pois é capaz de prever concentrações diferentes das que foi treinado.

Tabela 7: Parâmetros analíticos para o modelo iPLS dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H.

| Parâmetros | Polimorfos | |
|---|--|--|
| | SRTL-I | SRTL-H |
| RMSEC (%) | 1,94 ^a (0,32 ^b) | 1,04 ^a (0,17 ^b) |
| RMSECV (%) | 5,49 ^a (0,91 ^b) | 4,81 ^a (0,80 ^b) |
| RMSEP (%) | 2,84 ^a (0,47 ^b) | 2,07 ^a (0,34 ^b) |
| R ² Calibração ^c | 0,996 | 0,999 |
| R ² Validação Cruzada ^c | 0,971 | 0,978 |
| R ² Predição ^c | 0,991 | 0,998 |

Legenda: ^a valores de erros considerando a massa do polimorfo relacionado a massa total de cloridrato de sertralina; ^b valores entre parênteses consideram os erros da massa do polimorfo relacionado a massa total do comprimido; ^c os coeficientes de determinação mostram a correlação entre os valores reais e os valores preditos.

Na Figura 29 é possível observar uma boa correlação linear entre os valores reais e os valores preditos pelo modelo, calculado por iPLS, para os dois polimorfos. O coeficiente de determinação do erro de predição mostrado na Tabela 7 é de 0,991 para o SRTL-I (Figura 29a) e de 0,998 para o SRTL-H (Figura 29b). Os valores de R² mostram que os valores residuais são pequenos, portanto, isso significa que os

valores previstos pelo modelo são muito próximos dos valores reais, demonstrando que o modelo apresenta uma boa capacidade de prever novas amostras.

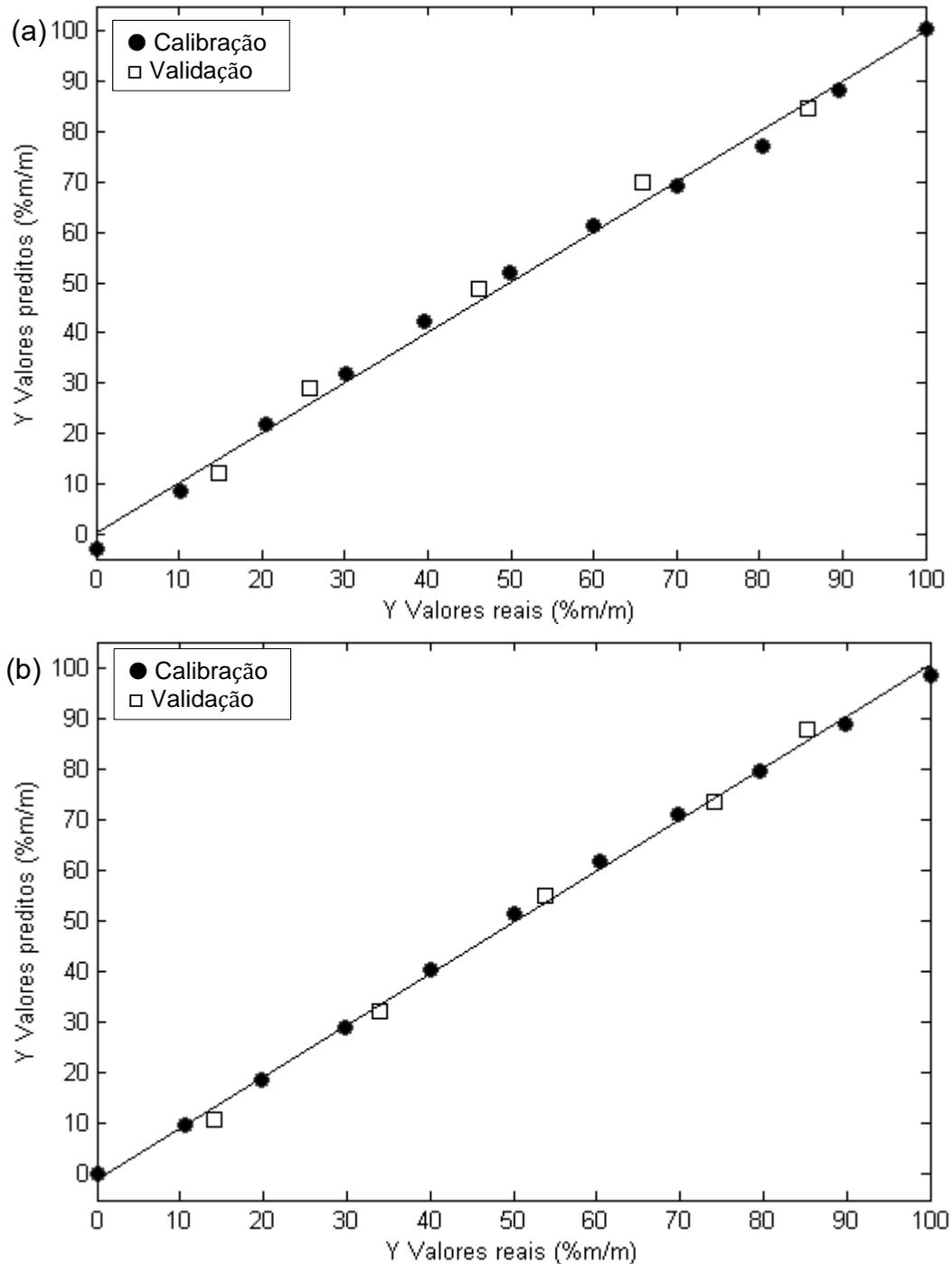


Figura 29: Valores reais versus valores preditos pelo modelo iPLS para a mistura binária dos polimorfos de cloridrato de sertralina na presença de excipientes: a) SRTL-I, b) SRTL-H. Fonte: Próprio autor.

A simulação proposta nesse trabalho foi referente a um comprimido do cloridrato de sertralina de aproximadamente 300 mg, sendo 250 mg de excipientes e 50 mg de cloridrato de sertralina (mistura de polimorfos), o que equivale em porcentagem a 83,4 % (excipientes) e 16,6 % (mistura de polimorfos). Se toda a massa do comprimido for considerada, teríamos um erro de predição de apenas 0,47 % para o polimorfo I e de 0,34 % para o seu hidrato. Portanto, seria possível quantificar as formas cristalinas do princípio ativo, mesmo na presença de excipientes, com um erro em torno de 0,5 % (relação massa/massa), o que equivale a 1,5 mg da massa total do comprimido.

É importante ressaltar que os erros referentes aos parâmetros utilizados para medir a eficiência do modelo iPLS podem estar diretamente associados as peculiaridades da própria técnica, assim também a maneira como as análises são realizadas, como discutido no item anterior. Outro ponto importante a ser destacado é que existem comprimidos de cloridrato de sertralina de até 100 mg do princípio ativo, com esse aumento na relação entre o API e seus excipientes, o modelo poderia obter resultados ainda melhores.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o modelo de calibração construído baseado no planejamento de mistura binária dos polimorfos SRTL-I e SRTL-H apresentou erros de predição em torno de 2,5 mg para amostras de 50 mg. Enquanto no planejamento de mistura binária na presença de excipientes mais comuns utilizados na formulação, mesmo com esses interferentes, os resultados foram ainda melhores, proporcionando erros de predição com valores por volta de 0,5 % (ou de 1,5 mg) relacionado à massa total do comprimido.

Em uma aplicação real, os erros de predição poderiam ser ainda menores com a utilização de um número maior de amostras para o conjunto de calibração e com o aumento do número de replicatas de espectros Raman por amostra, diminuindo o problema da micro-heterogeneidade.

Este estudo comprovou que a espectroscopia Raman associada ao método de regressão do tipo iPLS tanto para o planejamento binário de polimorfos sem excipientes como na presença de excipientes é uma alternativa possível e viável para análise quantitativa de polimorfos de cloridrato de sertralina em produtos farmacêuticos comercializados, uma vez que foi capaz de gerar modelos robustos, reproduzíveis e com baixo erros de predição. Dessa forma, podendo ser atrativa para a indústria farmacêutica e órgãos reguladores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-NIMRY, S. S.; JABER, M. A. Preparation and Optimization of Sertraline Hydrochloride Tablets with Improved Dissolution Through Crystal Modification. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 4, p. 1190–1202, 2017.

ALMARSSON, Ö; HICKEY M. B.; PETERSON, M. L.; MORISSETTE S. L.; SOUKASENE S.; MCNULTY C.; TAWA, M.; MACPHEE J. M.; REMENAR, J. F. High-Throughput Surveys of Crystal Form Diversity of Highly Polymorphic Pharmaceutical Compounds. **Crystal Growth and Design**, v. 3, n. 6, p. 927–933, 2003.

ANERAO, A.; TELANGE, V.; BONDRE, N.; JOHN, S.; DIGHE, V.; JAGUSHTE, R.; PRADHAN, N. Synthesis, Characterization, Identification and Quantification of Sertraline Hydrochloride Related Impurities. **Medicinal chemistry**, v. 6, n. 11, p. 674–681, 2016.

ANVISA. Workshop Validação de Metodologia Analítica – GGMed/ANVISA. p. 1–13, 2013.

ANVISA. Medicamentos genéricos: estatísticas e listas. 2017. Página inicial. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos-genericos-registrados>>. Acesso em: 10 de dez. de 2017.

ANWAR, J.; ZAHN, D. Polymorphic phase transitions: Macroscopic theory and molecular simulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 47–70, 2017.

ARAÚJO, L. U.; ALBUQUERQUE, K. T. DE; KATO, K. C.; SILVEIRA, G. S.; MACIEL, N. R.; SPÓSITO, P. A.; BARCELLOS, N. M. S.; SOUZA, J. DE; BUENO, M.; STORPIRTIS, S. Medicamentos Genéricos no Brasil: Panorama Histórico e Legislação. **REV PANAM Salud Publica**, v. 28, n. 5, p. 480–92, 2010.

ATEF, E. CHAUHAN, H.; PRASAD, D.; KUMARI, D.; PIDGEON, C. Quantifying Solid-State Mixtures of Crystalline Indomethacin by Raman Spectroscopy Comparison with Thermal Analysis. **ISRN Chromatography**, v. 2012, p. 6, 2012.

BAUER, J.; SPANTON S.; HENRY R.; QUICK J.; DZIKI, W.; PORTER, W.; MORRIS, J. Ritonavir: An Extraordinary Case of Conformational Polymorphism. **Pharm. Res.**, v. 18, n. 6, p. 859–866, 2001.

BERNAL, C.; COUTO B.; BREVIGLIERI, A. T.; CAVALHEIRO, S. G.; TADEU, E. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

BEZERRA, B. P.; FONSECA, J. C.; OLIVEIRA, Y. S. DE; SANTANA, M. S. A. DE; SILVA, K. F.; ARAÚJO, B. S.; AYALA, A. P. Phase transitions in secnidazole: Thermal stability and polymorphism studied by X-ray powder diffraction, thermal analysis and vibrational spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 90–96, 1 set. 2016.

BRASIL, M. DAS S. A. N. DE V. S. Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial da União**,

v. 1, p. 546, 2010.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125–2154, 2000.

BRERETON, R.G. **Applied Chemometrics for Scientists**. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

BRERETON, R. G. A short history of chemometrics: a personal View. **Journal of Chemometrics**, v. 28, p. 749–760, 2014.

BRITTAIN, H. G. Polymorphism and Solvatomorphism 2010. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 2, p. 464–484, 1 fev. 2012.

CALESTANI, G. Introduction to crystallography. **Advances in Imaging and Electron Physics**, v. 123, p. 29–70, 1 jan. 2002.

CALLISTER JR., W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. 8^a ed. United States: John Wiley & Sons, 2010.

CALVO, N.; BALZARETTIC, N. M.; ANTONIO, M.; KAUFMAN, T. S.; MAGGIO, R. M. Chemometrics-assisted study of the interconversion between the crystalline forms of nimodipine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 158, p. 461–470, 2018.

CALVO, N. L.; MAGGIO, R. M.; KAUFMAN, T. S. Chemometrics-assisted solid-state characterization of pharmaceutically relevant materials. Polymorphic substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 518–537, 2018a.

CALVO, N. L.; MAGGIO, R. M.; KAUFMAN, T. S. Characterization of pharmaceutically relevant materials at the solid state employing chemometrics methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 538–564, 2018b.

CAVALLARI, C.; TARTERINI, F.; FINI, A. Thermal characterization of some polymorph solvates of the anti-inflammatory/anti-cancer sulindac. **Thermochimica Acta**, v. 633, p. 129–139, 2016.

CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS, P. R. **Handbook of vibrational spectroscopy**. 1^a ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

CHAVAN, R.; KADAM, K. Influence of solid-state chemistry in drug substances in pharmaceutical products. A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 4, n. 44, p. 102–105, 2016.

CHEMBURKAR, S. R.; BAUER, J.; DEMING, K.; SPIWEK H.; PATEL K.; MORRIS, J.; HENRY, R.; SPANTON, S.; DZIKI, W.; PORTER W.; QUICK, J.; BAUER P.; DONAUBAUER, J.; NARAYANAN B. A.; SOLDANI, M.; RILEY, D.; MCFARLAND, K. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late stages of bulk drug process development. **Organic Process Research and Development**, v. 4, n. 5, p. 413–417, 2000.

CHEN, Z. P.; FEVOTTE, G.; CAILLET, A.; LITTLEJOHN, D.; MORRIS, J. Advanced calibration strategy for in situ quantitative monitoring of phase transition processes in suspensions using FT-Raman spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 17, p.

6658–6665, 2008.

CHIENG, N.; ZUJOVIC, Z.; BOWMAKER G.; RADESA, T.; SAVILLE D. Effect of milling conditions on the solid-state conversion of ranitidine hydrochloride form 1. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, n. 1–2, p. 36–44, 2006.

DE ARAUJO, G. L. B.; PITALUGA, A. JR.; ANTONIO, S. G.; DE SANTOS, C. O. P.; MATOS J. DO R. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 27–36, 2012.

DE BEER, T. R. M.; C.; DEJAEGHER, B.; WALCZAK, B.; VERCRUYSSSE P.; BURGGRAEVE A.; LEMOS A.; DELATTRE L.; HEYDEN, Y. V.; REMONE, J.P.; VERVAET, C.; BAEYENS, W.R.G. Raman spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for the in-line monitoring and understanding of a powder blending process. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 772–779, 2008.

DE PEINDER, P.; VREDENBREGT, M.J.; VISSER, T.; DE KASTE, D. Detection of Lipitor® counterfeits: A comparison of NIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4–5, p. 688–694, 2008.

DOWELL, F. E.; MAGHIRANG, E. B.; FERNANDEZ, FACUNDO M.; NEWTON P. N.; GREEN, M. D. Detecting counterfeit antimalarial tablets by near-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 1011–1014, 2008.

ELDER, D. P.; KUENTZ, M.; HOLM, R. Pharmaceutical excipients - Quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 88–99, 2016.

EXAME. **As 10 farmacêuticas que mais venderam genéricos até março**. 2015. Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/negocios/as-10-farmaceuticas-que-mais-venderam-genericos-ate-marco/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

FARIA, D. L. A. DE; AFONSO, M. C.; EDWARDS, H. G. M. Espectroscopia Raman : Uma nova luz no estudo de bens culturais. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 12, p. 249–267, 2002.

FARIAS, M. A. DOS S. **Aplicação de Métodos Quimiométricos de Calibração e Resolução Multivariada de Curvas em Espectroscopia Raman para Análise Qualitativa e Quantitativa de Polimorfismo em Carbamazepina, Clopidogrel e Ezetimiba**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 100. 2015.

FARIAS, M. A. DOS S.; SOARES, F. L. F.; CARNEIRO, R. L. Crystalline phase transition of ezetimibe in final product, after packing, promoted by the humidity of excipients: Monitoring and quantification by Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 121, p. 209–214, 2016.

FARIAS, M. A. DOS S.; CARNEIRO, R. Simultaneous quantification of three polymorphic forms of carbamazepine in the presence of excipients using raman spectroscopy. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14128–14138, 2014a.

FARIAS, M. A. DOS S.; CARNEIRO, R. L. Simultaneous Quantification of Three Polymorphic Forms of Carbamazepine Using Raman Spectroscopy and Multivariate Calibration. **Analytical Letters**, v. 47, p. 1043-1051, 2014b.

FDA. Guidance for Industry ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism: Chemistry, Manufacturing, and Controls Information. **Center for Drug Evaluation and Research**, p. 13, 2007.

FDA. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. **Center for Drug Evaluation and Research**, p. 1–16, 2015.

FEARN, T.; RICCIOLI, C.; VARO, A. G.; GINEL, J. E. G. On the geometry of SNV and MSC. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, p. 22–26, 2009.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1^a ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.

GENDRIN, C.; ROGGO, Y.; COLLET, C. Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 3, p. 533–553, 2008.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1–59, 1995.

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

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HASHEMI, J.; SMITH, W. F. **Fundamentos de Engenharia e Ciências dos Materiais**. 5^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

HAUSMAN, D. S.; CAMBRON, R. T.; SAKR, A. Application of on-line Raman spectroscopy for characterizing relationships between drug hydration state and tablet physical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, n. 1–2, p. 19–33, 2005.

HE, Q.; ROHANI, S.; ZHU, J.; GOMAA, H. Sertraline racemate and enantiomer: Solid-state characterization, binary phase diagram, and crystal structures. **Crystal Growth and Design**, v. 10, n. 4, p. 1633–1645, 2010.

HEALY, A. M.; WORKU, Z. A.; KUMAR, D.; MADI, A. M. Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 25–46, 2017.

HEINZ, A.; SAVOLAINEN, M.; RADES, T.; STRACHAN, C. J. Quantifying ternary mixtures of different solid-state forms of indomethacin by Raman and near-infrared spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 182–192, 2007.

HENNIGAN, M. C.; RYDER, A. G. Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 163–171, 2013.

HU, Y.; ERXLEBEN, A.; RYDER, A. G.; MCARDLE, P. 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.

HWANG, M. S.; CHO, S.; CHUNG, H.; WOO, Y. Nondestructive determination of the ambroxol content in tablets by Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, n. 2, p. 210–215, 2005.

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.

KADAM, K. P.; CHAVAN, R. P. Evaluation of Various Polymorphs by Different Techniques and Their Characterization A Review. **The International Journal of Engineering and Science (IJES)**, v. 5, n. 6, p. 29–34, 2016.

KANDPAL, L. M.; TEWARI, J.; GOPINATHAN, N.; STOLEE, J.; STRONG, R.; BOULAS, P.; CHO, B. K. Quality assessment of pharmaceutical tablet samples using Fourier transform near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Infrared Physics & Technology**, v. 85, p. 300–306, 2017.

KARABAS, I.; ORKOULA, M. G.; KONTOYANNIS, C. G. Analysis and stability of polymorphs in tablets: The case of Risperidone. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1382–1386, 2007.

LEE, A. Y.; ERDEMIR, D.; MYERSON, A. S. Crystal Polymorphism in Chemical Process Development. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 259–280, 2011.

LI, Y.; SHAN, P.; 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.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantification of atorvastatin calcium in tablets by FT-Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 168–172, 2009.

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

MENDES, D. R. F.; OLIVEIRA, M. A. C. DE; PINHEIRO, A. A. As Patentes de Segundo Uso e de Formas Polimórficas e o Projeto de Lei nº 5.402/2013. **Revista Eletrônica do Mestrado em Direito da UFAL**, v. 5, n. 2, p. 29-46, 2014.

MORISSETTE, S. L.; SOUKASENE, S.; LEVINSON D.; CIMA, M. J.; ALMARSSON, O. Elucidation of crystal form diversity of the HIV protease inhibitor ritonavir by high-throughput crystallization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2180–2184, 2003.

NAGY, B.; FARKAS, A.; BALOGH, A.; PATAKI, H.; VAJNA, B.; NAGY ZSOMBOR K.; GYÖRGY, MAROSI. Quantification and handling of nonlinearity in Raman micro-spectrometry of pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 236–246, 2016.

NORGAARD L.; SAUDLAND A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J. P.; MUNCK, L.; ENGELSEN S. B. Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy. **Society for Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 413-419, 2000.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; LIMA GOMES, E. C. DE. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1224–1230, 2011.

OLIVIERI, A. C.; FABER, N. K. M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS J. H.; MARK, H. Uncertainty Estimation and Figures of Merit for Multivariate Calibration (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 633–661, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA**. 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PINDELSKA, E.; SOKAL, A.; KOLODZIEJSKI, W. Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 117, p. 111–146, 2017.

PIQUERAS, S.; DUPONCHELB, L.; TAULERC, R.; JUAN DE A. Monitoring polymorphic transformations by using in situ Raman hyperspectral imaging and image multiset analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 819, p. 15–25, 2014.

PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Estado sólido na indústria farmacêutica: Uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2080–2112, 2015.

PUDIPEDDI, M.; SERAJUDDIN, A. T. M. Trends in solubility of polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 5, p. 929–939, 2005.

RÄGO, L.; SANTOSO, B. Drug Regulation: History, Present and Future. **Drug Benefits and Risks: International Textbook of Clinical Pharmacology**, p. 65–77, 2008.

RAW, A. S.; FURNESS M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C. HOLCOMBE JR, F. O.; YU L. X. Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 397–414, 2004.

REMENAR, J. F.; MACPHEE, J. M.; LARSON, B. K.; TYAGI, V. A.; HO, J. H.; MCILROY, D. A.; HICKEY, M. B.; SHAW, P. B.; ALMARSSON. Salt Selection and Simultaneous Polymorphism Assessment via High-Throughput Crystallization: The Case of Sertraline. **Organic Process Research and Development**, v. 7, n. 6, p. 990–996, 2003.

ROBERTS, S. N. C.; WILLIAMS, A. C.; GRIMSEY I. M.; BOOTH, S. W. Quantitative analysis of mannitol polymorphs. FT-Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1135–1147, 2002.

ROGGO, Y.; CHALUS, P.; MAURER, L.; MARTINEZ, C. L.; ELIE, E. A.; JENT, N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 3 SPEC. ISS., p. 683–700, 2007.

ROGGO, Y.; DEGARDIN, K.; MARGOT, P. Identification of pharmaceutical tablets by Raman spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 988–995, 2010.

ROWE, R.; SHESKEY, P.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009.

SCHWARTZ, E. R.; YEHUD, T. N.; TEL-AVIV, A. L.; MENDELOVICI, M.; ARONHIME J.; REHOVOT, B.; SINGER, C.; SABA, K.; VALDMAN, E.; TIKVA, P. Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Petah Tiqva (IL). **Sertraline Hydrochloride Polymorphs**. US Pat. 6500987B1, 31 dez. 2002.

ŠEHIĆ, S.; BETZA, G.; HADZIDEDIC, S.; EL-ARINIC, S. K.; LEUENBERGER, H. Investigation of intrinsic dissolution behavior of different carbamazepine samples. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, n. 1–2, p. 77–90, 2010.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. Drug polymorphism and dosage form design: A practical perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 335–347, 2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SOCRATES, G. **Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies**. 3ª ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

SOUZA, A. M. DE.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. R.; POPPI R. J. Experimento Didático de Quimiometria para Calibração Multivariada na Determinação De Paracetamol em Comprimidos Comerciais Utilizando Espectroscopia no Infravermelho Próximo: Um Tutorial, Parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.

STAHLY, G. P. Diversity in single- and multiple-component crystals. the search for and prevalence of polymorphs and cocrystals. **Crystal Growth and Design**, v. 7, n. 6, p. 1007–1026, 2007.

SUCHARA, E. A. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Determinação de Fármacos em Fluidos Biológicos e Amostras Ambientais por Cromatografia Líquida e Gasosa**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal De Santa Catarina. Florianópolis, p. 145, 2007.

SUTTON, S. C.; EVANS, L. A.; FORTNER, J. H.; MCCARTHY, J. M.; SWEENEY, K. Dog colonoscopy model for predicting human colon absorption. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 7, p. 1554–1563, 2006.

SYSKO R. J.; DOUGLAS J.; ALLEN, M. Pfizer Inc., New York, N.Y. **Sertraline Polymorph**. US Pat. 5248699, 28 set. 1993.

TAYLOR, L. S.; LANGKILDE, F. W. Evaluation of solid-state forms present in tablets by Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 10, p. 1342–

1353, 2000.

TIAN, F.; ZHANG F.; SANDLER, N.; GORDON, K.C.; MCGOVERIN, C.M.; STRACHAN, C.J.; SAVILLE, D.J., RADES, T. 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.

TIPPING, W. J.; LEE, M.; SERRELS A.; BRUNTON, V. G.; HULME A. N. Stimulated Raman scattering microscopy: an emerging tool for drug discovery. **Chem. Soc. Rev**, v. 45, n. 8, p. 2075–2089, 2016.

USP. **USP NF 2008 (United States Pharmacopeia/National Formulary)**. Ed. Pck Slp. United States Pharmacopeial, 2008.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

VIPPAGUNTA, S. R.; BRITTAI, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3–26, 2001.

VREDENBREGT, M. J.; TIP, L. B.; HOOGERBRUGGE, R.; BAREND, D.M.; KASTE, D. DE. Screening suspected counterfeit Viagra® and imitations of Viagra® with near-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 4, p. 840–849, 2006.

WARRIER, D.; ZAGADE, A.; SHAIKH, A.; PAWAR, Y.; KUMBHAR, S. An In-Vitro Evaluation for the Effect of B -Cyclodextrin and PVP-K 30 on Drug Release Pattern of Sertraline Hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 407–413, 2012.

WISE, B. M.; SHAVER, J. M.; GALLAGHER, N. B.; WILLEM, W.; BRO, R.; KOCH, R. S. **PLS_Toolbox Version 4.0 for use with MATLAB™**. Estados Unidos: Eigenvector Research, Inc., 2006.

WOLD, S. Chemometrics ; what do we mean with it , and what do we want from it ? **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 30, p. 109–115, 1995.

WOLD, S.; ANTTI, H.; LINDGREN, F.; OHMAN J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, p. 175–185, 1998.

XIE, Y.; TAO, W.; MORRISON, H.; CHIU, R.; JONA, J. FANG, J.; CAUCHON, N. Quantitative determination of solid-state forms of a pharmaceutical development compound in drug substance and tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, n. 1–2, p. 29–36, 2008.

YAO, J.; SHI, Y. Q.; LI, Z. R.; JIN, S. H. Development of a RP-HPLC method for screening potentially counterfeit anti-diabetic drugs. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 853, n. 1–2, p. 254–259, 2007.

ZHANG, G. G. Z.; LAWA, D.; SCHMITT, E. A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage

forms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 371–390, 2004.

ZHANG, L.; HENSON, M. J.; SEKULIC, S. S. Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 2, p. 262–278, 2005.

ZHOU, M. X.; FOLEY, J. P. Analytical method for the quantitation of sertraline hydrochloride stereoisomers by electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, n. 1–2, p. 13–23, 2004.