

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

Rafael Cândido Domingos

APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA
– PLS e iPLS EM CONJUNTO COM A ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE
QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE VALSARTANA

Manaus

2019

Rafael Cândido Domingos

APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA
– PLS e iPLS EM CONJUNTO COM A ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE
QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE VALSARTANA

Dissertação apresentada 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, na área de concentração: Métodos Analíticos e estudos Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio dos Santos Farias.

Manaus

2019

D671a Domingos, Rafael Cândido
Aplicação de métodos quimiométricos de calibração multivariada - PLS e iPLS em conjunto com a espectroscopia Raman para análise qualitativa e quantitativa de polimorfos de valsartana / Rafael Cândido Domingos. 2019
73 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Valsartana. 2. biodisponibilidade. 3. calibração. 4. regressão. I. Farias, Marco Antonio dos Santos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“APLICAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA – PLS e iPLS EM CONJUNTO COM A ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE POLIMORFOS DE VALSARTANA”

Rafael Cândido Domingos

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 obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 10 de julho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



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



Dra. Tereza Cristina Souza de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas
Membro UFAM



Dra. Tatiane Pereira de Souza
Universidade Federal do Amazonas
Membro Externo/UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 10 de julho de 2019

AGRADECIMENTOS

A meus pais por terem me incentivado a estudar e terem feito tudo o possível para que eu tivesse as melhores condições para prosseguir nos estudos. Em especial para minha mãe, dona Rosa que acreditou em mim mais que eu mesmo e que sempre tem um bom conselho nas horas de desespero.

Aos meus irmãos, Rayana, João e Pedro por incentivarem nos estudos e por serem exemplos que a educação é sempre a melhor escolha.

Ao meu orientador, o professor Dr. Marco Antonio dos Santos Farias que aceitou como parte do seu grupo de pesquisa, pela paciência, ensinamentos e por ter possibilitado conhecer os mistérios e encantos da quimiometria.

Aos meus amigos Moacir, Henrique, Paulo (lisinho) e Thiago, pela amizade e companheirismo, e em especial para o meu amigo e companheiro de pesquisa Adonilson, que compartilhamos do mesmo desespero e aprendizado.

A minha diretora Lucicleide, por ter compreendido e ter sido flexível comigo para que eu desempenhasse minhas atividades do mestrado e todos os meus amigos Maria, Ari, Jhonson, Pedro, Felipe, Ricardo, Yara, Túlio, Aurea, Ana Paula e todos os outros que não estou lembrando no momento.

Ao professor Renato Lajarim do Grupo de Quimiometria Aplicada (UFSCar) por disponibilizar seu laboratório para realização das análises de espectroscopia Raman e ao pessoal da UFSCar: Bené, Cecília, Thaísa e Wallace.

Ao Laboratório de Materiais da Amazônia e Compósitos (LaMAC) pela realização das análises térmicas e Laboratório de Materiais (LabMat) pelas análises de difração de raios X.

RESUMO

A lei 9.787/1999, também conhecida como Lei dos Genéricos, possibilitou que indústrias farmacêuticas nacionais produzissem medicamentos com patentes expiradas. A Valsartana, substância desenvolvida pela *Ciba-Geigy* e comercializada pela *Novartis Pharmaceutical Company* com nome Diovan®, se tornou atrativa para indústria nacional após a lei dos genéricos pela sua importante aplicação no controle da hipertensão arterial. Esse fármaco é um inibidor da angiotensina e seus receptores, com classificação biofarmacêutica de classe II. Durante a produção de substâncias, incluindo medicamentos, há possibilidade da ocorrência do polimorfismo, que consiste na mudança do hábito cristalino do material. Nos fármacos este fenômeno impacta nas propriedades físico-químicas com consequência direta na biodisponibilidade. Várias são as condições que podem causar essa transição cristalina, fatores que vão da própria linha de produção, transporte e armazenamento do medicamento. Desta forma a *Food and Drug Administration* estabeleceu uma série de técnicas analítica para identificação de polimorfismo em fármacos. Neste trabalho foi empregada a técnica de espectroscopia Raman associada a ferramentas quimiométricas, tais como métodos de regressão multivariada (PLS e iPLS) para qualificação e quantificação de polimorfos de Valsartana. Foram utilizadas valsartana amorfa (comercialmente utilizada) e forma E (produzida na presença de água/etanol), que tiveram suas estruturas comprovadas através da difração de raios X, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura. As amostras com a mistura das duas formas de valsartana foram qualificadas e quantificadas na ausência e presença dos excipientes, por espectroscopia Raman associada a ferramenta quimiométrica de calibração multivariada – PLS e iPLS. O modelo de calibração obtido via regressão iPLS com os pré-tratamentos da primeira derivada Savitzky Golay e variação normal padrão apresentaram elevada capacidade preditiva para novas amostras, comprovadas pelos baixos valores de erro médio quadrático de validação cruzada e erro médio quadrático de predição, para o princípio ativo sem excipiente. O modelo de calibração para o princípio ativo junto aos excipientes também apresentou boa qualidade, evidenciado pelos baixos valores de erro médio quadrático de validação cruzada e erro médio quadrático de predição, comprovando sua capacidade de previsão de novas amostras, mesmo na presença dos excipientes. Logo, o método apresenta elevada

confiabilidade na análise de fármacos, baixo custo e versatilidade, podendo ser utilizada por indústrias farmacêuticas e órgãos regulamentadores no controle de qualidade de fármacos.

Palavras-chave: Valsartana, biodisponibilidade, calibração, regressão.

ABSTRACT

Law 9,787 / 1999, also known as the law of generics, allowed the national pharmaceutical industries to produce drugs with expired patents. Valsartan, substance developed by Ciba-Geigy and marketed by Novartis Pharmaceutical Company under the trade name Diovan®, has become attractive to the national industry after the law of generics for its important application in the control of hypertension. This drug is an inhibitor of angiotensin and its receptors, class II biopharmaceutical classification. During the production of substances, including drugs, there is a possibility of polymorphism, which is the change in the crystalline habit of the material. In pharmaceuticals, this phenomenon impacts physicochemical properties with a direct consequence in bioavailability, besides the judicial processes, once the polymorphs are patented. Various conditions are those that may be required for the energy transition, the factors that affect the production line, transport and storage of the drug. In this way the FDA has established a series of analytical techniques to identify polymorphism in drugs. In this work the technique of Raman spectroscopy associated with chemometric tools, such as multivariate regression (PLS and iPLS), was used for the qualification and quantification of Valsartan polymorphs. Amorphous polymorphic forms (commercially used) and E forms (produced in the presence of water / ethanol) were used, which had their structures proved by X-ray diffraction and by thermal analysis (TG and DSC). The samples were qualified and quantified in the absence and presence of the excipients by Raman spectroscopy associated to the multivariate calibration chemometric tool - PLS and iPLS. The calibration model obtained through the iPLS regression with the pre-treatments of the first derivative Savitzky Golay and standard normal variation presented high predictive capacity for new samples, proved by the low values of RMSECV and RMSEP, for the active principle without excipient. The calibration model for the active ingredient together with excipients also presented low values of RMSECV and RMSEP, evidencing its ability to predict new samples even in the presence of the excipients. Therefore, the method presents high reliability in the analysis of drugs, low cost and versatility, and can be used by pharmaceutical companies and regulatory agencies in drug quality control.

Key words: Valsartan, bioavailability, calibration, regression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Interdisciplinaridade da quimiometria.	16
Figura 2: Representação esquemática entre respostas instrumentais (X) e informações de interesse (Y) usadas para elaboração do modelo de calibração.	17
Figura 3: Esquema dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: a) escalar (uma única medida instrumental), b) vetor de dados, c) matriz de dados.	18
Figura 4: Ilustração teórica da validação de um modelo.	21
Figura 5: Apresentação esquemática das estruturas do polimorfo, amorfo e solvatomorfo.	24
Figura 6: Relação de medicamentos genéricos registrados por ano.	29
Figura 7: Gráfico de relação permeabilidade/solubilidade da classificação biofarmacêutica.	30
Figura 8: Estrutura molecular tridimensional e plana da valsartana.	30
Figura 9: Difração nos planos A e B.	34
Figura 10: Esquema do difratômetro de raios X.	35
Figura 11: Espalhamento elástico e inelástico de um feixe de radiação.	36
Figura 12: Representação esquemática dos espalhamentos elásticos e inelásticos.	37
Figura 13: Espectro Raman para o princípio ativo.	38
Figura 14: Difratoograma da análise de DRX para valsartana amorfa.	46
Figura 15: Difratoograma da análise de DRX para valsartana forma E.	46
Figura 16: Curvas térmicas de TG (a) e DSC (b) da valsartana amorfa.	47

Figura 17: Curvas térmicas TG e DSC da valsartana forma E.....	47
Figura 18: Espectros Raman para as formas polimórficas E (vermelha) e amorfa (preto).....	48
Figura 19: Espectro dos 11 níveis de concentração utilizados para elaboração da curva de calibração.	49
Figura 20: Gráfico do valor de RMSECV x LV's, em azul o amorfo e vermelho a forma E.....	50
Figura 21: Gráficos a e b correspondem aos valores mensurados pelos resíduos para as formas AM e E, respectivamente. Gráficos c e d correspondem aos valores reais pelos valores preditos para as formas AM e E, respectivamente. No modelo com pré-processamentos iPLS 1º d ^a (7 pontos) e SNV.	52
Figura 22: Intervalos selecionados no iPLS, correspondente ao modelo iPLS ⁵	55
Figura 23: Curvas de correlação entre os valores reais pelos valores preditos, onde os círculos são pontos de calibração e triângulos pontos de validação: (a) Amorfo e (b) forma E.....	57
Figura 24: Espectro dos excipientes e polimorfos, de baixo para cima: Crospovidona (verde), estereato de magnésio (cinza), dióxido de silício coloidal (vermelho), forma E (azul) e amorfo (preto).....	59
Figura 25: Espectro dos 11 níveis utilizados para construção da curva de calibração do API junto aos excipientes.	60
Figura 26: Gráfico do valor de RMSECV x LV's, para a mistura binária dos polimorfos na presença dos excipientes: Em azul forma AM e vermelho forma E.	61
Figura 27: Intervalos selecionados no modelo de calibração iPLS para a mistura binária de polimorfos junto aos excipientes.....	61
Figura 28: Curvas de correlação entre os valores reais pelos valores preditos para a mistura de polimorfos junto aos excipientes, onde os círculos são pontos de calibração e triângulos pontos de validação: (a) Amorfo e (b) forma E.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de concentração para as amostras de calibração e validação.	43
Tabela 2: Valores reais para as amostras de calibração e validação.....	44
Tabela 3: Parâmetros para as curvas de calibração composta por 11 níveis de concentração e 5 níveis de concentração para validação.	51
Tabela 4: Parâmetros para as curvas de calibração composta por 11 níveis de concentração e 4 níveis de concentração para validação.	54
Tabela 5: Parâmetros para o modelo desenvolvido com os pré-processamentos 1 ^o d ^b e SNV.....	56
Tabela 6: Parâmetros do modelo de calibração iPLS para mistura binária de polimorfos junto aos excipientes.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Forma amorfa
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient</i> (Ingrediente Farmacêutico Ativo)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSC	<i>Biopharmaceutical Classification System</i> (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)
CCD	Charge Coupled Device
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detecção por Arranjo de Diodos
DRX	Difração de Raios X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (Calorimetria Diferencial de Varredura)
ER	Espectroscopia Raman
FIA	Análise por injeção em fluxo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
iPLS	<i>Interval Partial Least Squares Regression</i> (Quadrados Mínimos Parciais por Intervalo de Tempo)
LABMAT	Laboratório de Materiais
LAMAC	Laboratório de Materiais da Amazônia e Compósitos
LV	<i>latent variables</i> (Variáveis latentes)
MIR	<i>Mid infrared</i> (Infravermelho Médio)
NIR	<i>Near infrared</i> (Infravermelho Próximo)
PCA	Análise de componente principal

PLS	<i>Partial Least Squares Regression</i> (Regressão por Mínimos Quadrados Parciais)
RMSEC	Erro médio quadrático de calibração
RMSECV	Erro médio quadrático de validação cruzada
RMSEP	Erro médio quadrático de predição
SNV	Padronização normal de sinal
SG	Savitsky Golay
SP	Sem pré-tratamento
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VAL	Valsartana
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i> (Análise Termogravimétrica)
VC	Validação cruzada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Modelos de calibração.....	16
1.1.1 PLS e iPLS	19
1.1.2 Parâmetros de qualidade do modelo.....	20
1.1.3 Pré-Tratamentos de dados.....	22
1.2 Polimorfismo na indústria farmacêutica.....	23
1. 2 Consequências na indústria farmacêutica.....	25
1. 3 Indústria do genérico, órgãos regulamentadores e quebra de patentes	27
1.4 Produção de fármacos genéricos.....	29
1. 5 Valsartana	29
1. 6 Técnicas de Análises	31
1. 6. 1 Técnicas Térmicas	32
1. 6. 2 Difração de Raios X.....	32
1. 6. 3 Espectroscopia Raman	35
2. OBJETIVO.....	40
2. 1 Geral.....	40
2. 2 Específicos	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3. 1 Materiais e Reagentes.....	41
3. 2 Preparação dos polimorfos.....	41
3. 3 Caracterização dos polimorfos	41

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Caracterização dos polimorfos via DRX, TGA e DSC	45
4.2 Caracterização e quantificação por Espectroscopia Raman	48
4.2.1 Princípio ativo na ausência excipiente.....	48
4.2.2 Princípio ativo na presença de excipientes	58
5. Conclusão	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

A quimiometria consiste numa área da química que envolve estatística, matemática e a própria química, que surgiu pela necessidade de extrair informações essenciais da amostra, que seriam mascarados pela enorme quantidade de dados que as técnicas analíticas moderna produzem. Suas principais aplicações consistem em calibração, validação, testes de significância, otimização de dados e procedimentos experimentais e maximização de extração de informações químicas dos dados experimentais (FERREIRA, 2015; GEMPERLINE, 2006).

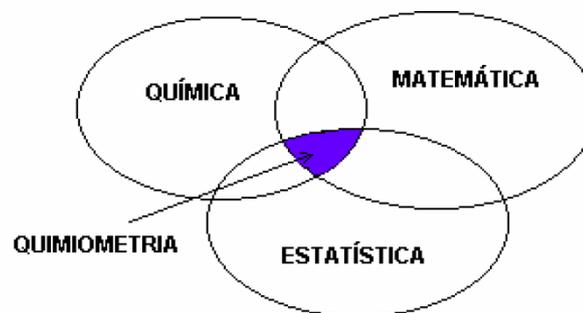


Figura 1: Interdisciplinaridade da quimiometria.
Fonte: Adaptado de Ferreira (2015).

A calibração multivariada tornou-se foco dos quimiometristas, uma vez que considerar múltiplas variáveis simultaneamente produz dados que seriam negligenciados em métodos univariados. Ao dar atenção a uma variável de cada vez a interação entre elas passa despercebida, informações que se mostram de grande valia. Logo são vantagens da calibração multivariada: A redução de ruído, já que diversas variáveis são analisadas ao mesmo tempo é possível identificar as responsáveis por sinais redundantes; Medições parcialmente seletivas, livres do efeito de sinais interferentes; Facilidade na identificação de amostras anômalas (GEMPERLINE, 2006; MARTENS; NAES, 1984).

1.1 Modelos de calibração

Um dos objetivos da análise química consiste em identificar as concentrações de analito em amostras, e para isso são utilizados instrumentos analíticos para fornecer estes dados. No entanto, estes equipamentos não fornecem estas concentrações como respostas, mas sim um conjunto de dados que dependem da natureza da técnica. Com estes dados são realizados cálculos para encontrar uma

expressão matemática que relacione os valores de concentração com os dados obtidos, logo esta expressão tem capacidade de quantificar a concentração de amostras que tenham sido analisadas no mesmo equipamento e sob as mesmas condições (FERREIRA et al., 1999; FERREIRA, 2015).

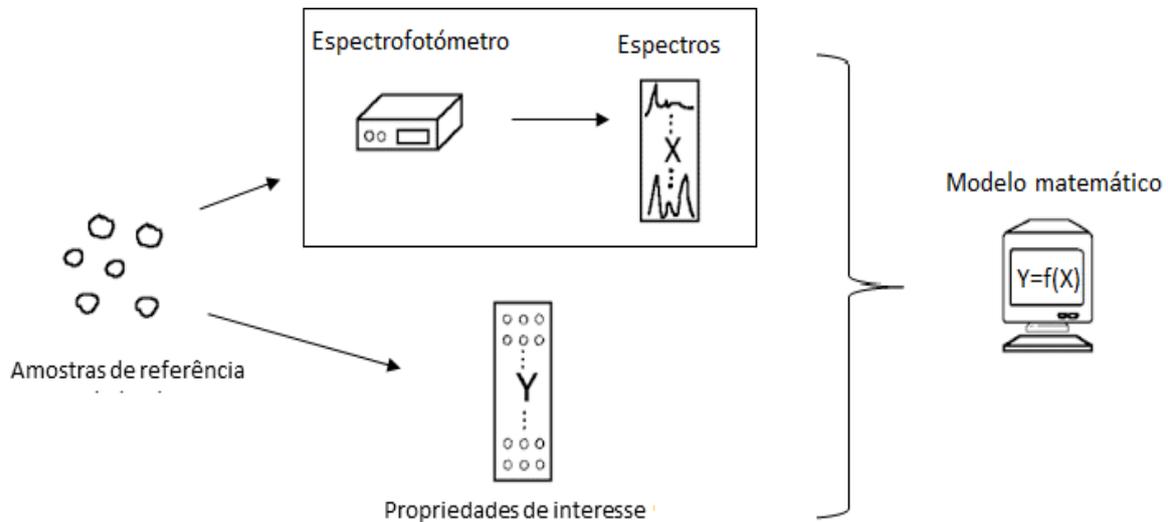


Figura 2: Representação esquemática entre respostas instrumentais (X) e informações de interesse (Y) usadas para elaboração do modelo de calibração.
Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (1999).

O processo de calibração pode ser definido como uma série de procedimentos, realizados sob condições específicas, que possuem relação matemática entre medidas instrumentais e valores das propriedades de interesse correspondentes realizados com padrões (NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

Os métodos de calibração possuem diferentes complexidades, que estão associados à dimensionalidade de seus dados. Assim podemos classificá-los em: ordem zero, primeira e segunda ordens (ROGGO; DEGARDIN; MARGOT, 2010). A figura 3 mostra os três tipos de dados utilizados nos três níveis de calibração, por um sistema de análise por Injeção em Fluxo com detecção por arranjos de diodos.

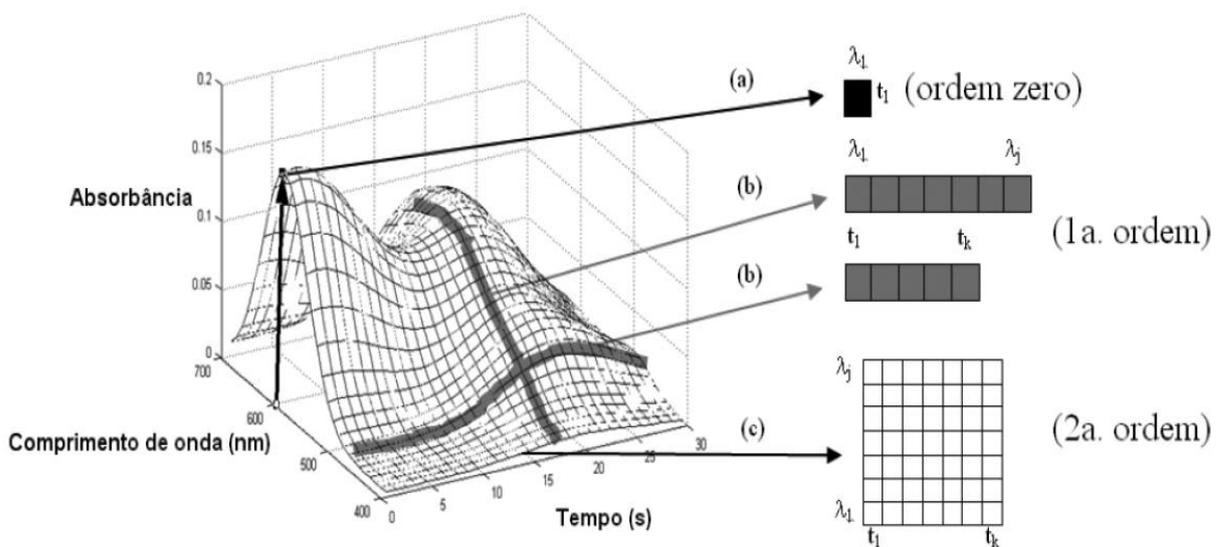


Figura 3: Esquema dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: a) escalar (uma única medida instrumental), b) vetor de dados, c) matriz de dados.

Fonte: Adaptado de Valderrama, Braga e Poppi (2009).

Nos modelos de ordem zero é utilizado uma única medida experimental para cada amostra (escalar), que consiste num modelo de calibração univariado. Podemos observar na figura 3 que ele corresponde a leitura da absorbância em um determinado comprimento de onda num dado tempo, que corresponde a um ponto na superfície de resposta. Fazem parte do conjunto de instrumentos que geram este tipo de resposta as medidas eletroquímicas, espectrofotométricas e cromatográficas, com monitoramento de um único ponto ou variável. Este tipo de calibração é mais utilizado em análises de rotina, mas requer que a grandeza a ser medida seja livre de interferentes que possam provocar algum tipo de desvio na sua relação com a propriedade de interesse (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Os métodos de calibração de primeira ordem utilizam um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Podemos observar na figura 3, que são obtidos dois dados, o monitoramento dos comprimentos de ondas (λ_1 a λ_j) em um determinado tempo e monitoramento de um dado comprimento de onda (λ_i) num dado intervalo de tempo (t_1 a t_k). Este tipo de método permite determinações simultâneas e análises mesmo na presença de interferentes, desde que eles estejam presentes nas amostras de calibração.

Estes tipos de dados são obtidos em técnicas espectrométricas e eletroquímicas na qual uma faixa espectral ou variação de potencial são realizadas.

São diversas as ferramentas para elaboração de modelos de calibração de primeira ordem, tendo destaque a Regressão por Componentes Principais (*Principal Component Regression*, PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares Regression*, PLS)(OLIVIERI; FABER; FERRÉ, 2006; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

A calibração de segunda ordem é utilizada em métodos que gerem uma matriz de dados para cada amostra. Como indicada na superfície da figura 10, cada amostra gera uma matriz de dimensões $j \times k$ (colunas \times linhas) (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

1.1.1 PLS e iPLS

O método dos mínimos quadrados parciais (PLS) é uma ferramenta de construção de modelos preditivos quando os fatores (ou variáveis) são muitos e altamente colineares, de tal forma que o modelo possua alta correlação entre variáveis dependentes (Y) com as independentes (X) (NØRGAARD et al., 2000). Desenvolvido nos anos 60 por Herman Wold como ferramenta econométrica, foi introduzido na área química por Svante Wold (HOSKULDSSON, 1998). Tem sido usado em diversas áreas, com destaque na calibração espectrométrica (TOBIAS, 1995).

O método de calibração PLS faz uso da técnica da análise de componentes principais, que reduz a dimensão dos dados, para posterior correlação entre a matriz de dados (X) e as propriedades de interesse (Y) (SOUZA et al., 2013). Estas matrizes são decompostas via PCA (*Principal Component Analysis*), que pode ser acompanhada nas equações 1 e 2, onde P e Q são os pesos das matrizes X e Y, H e U são os scores de X e Y, enquanto E e F são os resíduos de X e Y, respectivamente.

$$X = H P^T + E \quad (1)$$

$$Y = U Q^T + F \quad (2)$$

Os valores de H e U são otimizados até que se encontre um modelo linear com maior covariância entre as matrizes X e Y. Este procedimento é repetido para cada componente principal por meio de um processo iterativo buscando a máxima correlação entre as matrizes X e Y (FERREIRA, 2015). O cálculo é realizado assim como para as PCA's, no entanto os valores de Y também são levados em

consideração, sendo assim passam a ser denominadas variáveis latentes (*latent variables*, LV's) (SOUZA et al., 2013).

O número de variáveis latentes utilizadas no modelo geralmente é feito pelo método de validação cruzada *leave one out*. Neste procedimento é observado o número de LV's que apresenta o menor erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV), condição na qual os dados são expressos com maior capacidade preditiva. Após esta etapa o modelo de regressão pode ser construído. As equações da relação interna dos scores das matrizes X e Y (equação 3), coeficiente de calibração (equação 4) e a previsão (equação 5) podem ser vistas nas equações abaixo (GELADI; KOWALSKI, 1986):

$$U = B H \quad (3)$$

$$B = (H^T H)^{-1} H U \quad (4)$$

$$Y = H B Q^T \quad (5)$$

A regressão por mínimos quadrados parciais por intervalos (*intervals partial least squares*, iPLS) é uma extensão interativa que desenvolve modelos PLS utilizando intervalos da região espectral, trazendo informações importantes destes intervalos, tal que regiões com informações redundantes são removidas (NØRGAARD et al., 2000). São desenvolvidos modelos com os intervalos, que tem sua capacidade preditiva comparada com o modelo global, onde aqueles com menor erro de predição são selecionados (LEARDI; NØRGAARD, 2004; MEHMOOD et al., 2012)

1.1.2 Parâmetros de qualidade do modelo

A qualidade dos modelos depende da relação entre os valores reais e os valores preditos pelo mesmo, que podem ser avaliados mediante uma série de parâmetros que levam em relação as respostas experimentais e os valores esperados, dos quais podemos destacar os parâmetros: ajuste da curva (R^2 , $R^2 P$ e $R^2 VC$), erro médio quadrático de calibração (do inglês, RMSEC), erro médio quadrático de validação cruzada (do inglês, RMSECV) e erro médio quadrático de predição (do inglês, RMSEP) (NAGY et al., 2016). Estes parâmetros desempenham papel crucial na escolha do modelo, uma vez que eles são os responsáveis por atestar a capacidade de previsão de novas amostras pela curva de calibração.

A complexidade do modelo de calibração, como pode ser visto na figura 4, é essencial para gerar resultados confiáveis, pois um número baixo de variáveis latentes (LV's) resultará em subajuste, já que não irá considerar na totalidade as informações contidas nos dados, enquanto no caso de um número de LV's elevado pode ocorrer o superajuste, situação na qual o ruído e os erros de modelagem são elevados. Estas condições (subajuste e superajuste) podem gerar modelos bem ajustados, no entanto a capacidade preditiva não é boa. Desta forma é necessário um teste que indique o número adequado de LV's que devem compor o modelo (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001).

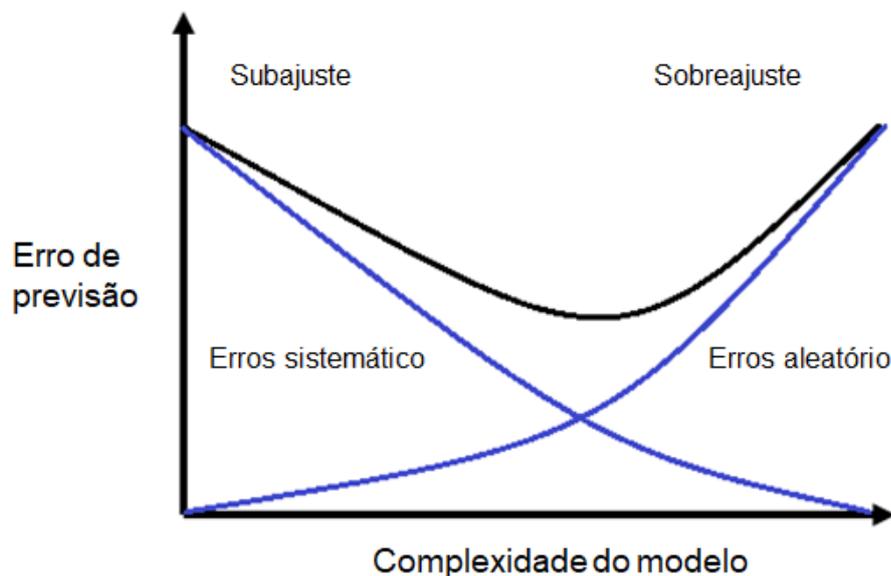


Figura 4: Ilustração teórica da validação de um modelo.
Fonte: Adaptado de Ferreira (2015).

A validação cruzada (*cross validation*) é o método mais utilizada para encontrar o número de LV's ideal (DE OLIVEIRA PENIDO et al., 2017). A validação tipo *leave one out* consiste no procedimento em que o modelo de calibração é obtido deixando uma amostra do conjunto de calibração de fora, tal que a capacidade preditiva do modelo é avaliada com esta amostra deixada de fora, sendo empregado um número crescente de variáveis latentes. Este procedimento é repetido para todas as amostras do conjunto de calibração e um erro de validação cruzada (RMSECV) é calculada para cada uma das variáveis conforme a equação 6 (BRERETON, 2007; SOUZA et al., 2013; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001):

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum(Y_p - Y_e)^2}{n}} \quad (6)$$

onde Y_p representa o valor previsto, Y_e o valor esperado para a propriedade de interesse e n corresponde ao número de amostras de calibração. O número de variáveis utilizado é aquele que apresenta o menor RMSECV.

Após a escolha das LV's é necessário avaliar a capacidade preditiva do modelo elaborado, que pode ser realizado por um conjunto de amostras que não fizeram parte do conjunto de calibração. Este procedimento gera o erro médio quadrático de predição, que é calculado pela equação 7, onde Y_p e Y_r , correspondem respectivamente a valor predito e real, enquanto A é o número de amostras de validação. Este parâmetro é muito importante para avaliar se o modelo tem capacidade preditiva para novas amostras, ou seja, ele indica a exatidão da curva (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum(Y_p - Y_r)^2}{A}} \quad (7)$$

1.1.3 Pré-Tratamentos de dados

Os dados experimentais de espectroscopia são submetidos a uma série de pré-processamentos antes de iniciar a aplicação de ferramentas quimiométricas, a fim de melhorar a qualidade dos dados em posse. Estes métodos são utilizados para reduzir as variações indesejáveis, constituídas de erros experimentais, erros de medida, erros de amostragem, dentre outras fontes de variabilidade, que não foram removidas durante a etapa de aquisição dos dados e podem impactar nos resultados finais (FERREIRA, 2015).

O pré-tratamento dos dados são divididos em duas categorias, que dependem de sua aplicação. Quando o tratamento é aplicado às amostras (linhas da matriz de dados) eles correspondem a técnicas de transformação, no entanto se forem aplicados às variáveis (coluna da matriz de dados) são técnicas de pré-processamento (BRERETON, 2007).

As técnicas de transformação são compostas por um conjunto de técnicas matemáticas com a finalidade de remover as variáveis aleatórias e sistemáticas

indesejáveis. A transformação dos dados pode se dar por técnicas de alisamento, que são utilizadas para destacar picos encobertos pela linha de base com muito ruído e compressão dos dados, ou técnicas de correção de linha de base (FERREIRA, 2015). Sua escolha deve ser realizada com bastante cuidado para que não se perder informações experimentais importantes.

São exemplos de métodos de pré-tratamentos:

- Variação normal padrão (*standard normal variate*, SNV): É apropriado para remover interferências de espalhamento multiplicativo da luz e do tamanho das partículas. Esta ferramenta calcula o desvio padrão de todas as variáveis para uma dada amostra, e todos os dados desta amostra são normalizados por este valor, de forma que o desvio padrão dessa amostra seja unitário. Ocorre uma normalização ponderada, levando em consideração os valores de cada amostra individualmente (WISE et al., 2006).
- Derivada Savitzky Golay (SG): É útil ao se analisar espectros de reflectância difusa, nos quais ocorrem deslocamento e inclinação da linha de base. Esta ferramenta consiste num filtro de média móvel, onde o ajuste é feito mediante quadrados mínimos de um polinômio (com certo grau) a uma janela móvel (segmento dos dados). Elevando o grau do polinômio ocorre melhor ajuste com os dados e descreve melhor a variação do sinal, no entanto isto é reflexo da modelagem do ruído. No caso da elevação do tamanho da janela ocorre diminuição do ruído, porém aumenta a distorção do sinal (FERREIRA, 2015; WISE et al., 2006). Desta forma é essencial a harmonia entre o tamanho da janela e o grau do polinômio.

1.2 Polimorfismo na indústria farmacêutica

Os medicamentos possuem finalidade profilática, terapêutica e de diagnóstico. Sendo composto por substância ativa que deve ser administrada ao paciente pela via mais adequada, transportada numa forma farmacêutica sólida, semissólida ou líquida. Dentre estas formas, a sólida é a mais utilizada como em comprimidos e cápsulas, devido a sua estabilidade físico-química mais elevada frente a outras formas (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007).

No entanto, os fármacos podem vir a sofrer alteração de seus componentes químicos durante o processo produtivo (TAYLOR; LANGKILDE, 2000). Em caso da mudança do hábito cristalino do fármaco dizemos que houve o fenômeno de polimorfismo ou solvatomorfismo, sendo que ambos os fenômenos causam mudanças nas propriedades físico-químicas do fármaco (PRADO; ROCHA, 2015).

São muitas as definições de polimorfismo encontradas na literatura, de acordo com Bauer (BAUER et al., 2001) o polimorfismo é a capacidade de um molécula existir em mais de uma forma cristalina com diferentes parâmetros de cela unitária. Mas podemos dizer que é a habilidade de uma substância existir no estado sólido com mais de uma estrutura cristalina diferente. No caso do solvatomorfismo temos estruturas cristalinas diferentes, que diferem da composição elementar devido a presença de uma ou mais moléculas de solvente em sua cela unitária (BRITTAIN, 2010).

Também há a possibilidade do sólido apresentar estrutura amorfa, que consiste em moléculas arranjadas de forma desordenada, que impossibilita a identificação de uma rede cristalina distinguível (RAW et al., 2004). Podemos observar as três estruturas (polimorfo, solvatomorfo e amorfo) na figura 5.

Vale ressaltar que as diferentes estruturas cristalinas e formas amorfas, implicam diretamente nas características físico-químicas dos sólidos. Uma vez que tais estruturas demandam de certa energia para obter estabilidade em suas conformações.



Figura 5: Apresentação esquemática das estruturas do polimorfo, amorfo e solvatomorfo.

Fonte: Adaptado de referência Prado e Rocha (2015) .

1. 2 Consequências na indústria farmacêutica

A ocorrência do polimorfismo ou solvatomorfismo resulta na mudança da estrutura cristalina, que provoca mudanças nas propriedades físico-químicas do Ingrediente Farmacêutico Ativo (API) como ponto de fusão, reatividade química, solubilidade, taxa de dissolução, propriedades óticas e mecânicas, pressão de vapor e densidade, (FDA, 2007; LIMBERGER, 2011). Estas alterações influenciam diretamente na biodisponibilidade do API, na processabilidade (está relacionada as propriedades do medicamento que podem ser influenciadas durante a fabricação) e estabilidade físico-química (FARMACOPÉIA, 2010; PRADO; ROCHA, 2015).

A biodisponibilidade é uma propriedade essencial dos fármacos, que pode ser descrito de forma simplificada como a velocidade de dissolução de um fármaco *in vivo* e a velocidade de absorção (ARAUJO et al. 2012), esta depende diretamente da taxa de dissolução e solubilidade do fármaco. Mudanças na estrutura do sólido acarretam diferenças na solubilidade e taxa de dissolução dos mesmos, logo temos que o polimorfismo influencia diretamente na biodisponibilidade do fármaco aumentando ou diminuindo sua absorção pelo organismo (RAW et al., 2004). Na literatura há relatos de mudança na biodisponibilidade do fármaco devido a sua forma polimórfica, como podemos ver em Aguiar et al. (1967) para o palmitato de cloranfenicol e Bauer et al. (BAUER et al., 2001) para a forma II do Ritonavir.

A importância do polimorfismo para indústria farmacêutica é notória, sendo mencionado 1969 por Haleblan e McCrone (1969) a respeito da relação entre estrutura polimórfica e a estabilidade das substâncias. No entanto passou a ter maior destaque em 1998 com o caso Ritonavir, ganhando atenção das agencias regulamentadoras a respeito da ocorrência do polimorfismo em fármacos.

Descoberto pela empresa Abbott®, o Ritonavir possui classificação IV de acordo com a classificação biofarmacêutica (BSC). É um inibidor de protease que age no último estágio da formação do HIV, impedindo a ação da enzima protease, fundamental para a clivagem das cadeias proteicas produzidas pela célula infectada (ALENCAR; BEDOR, 2006). Este não apresentava boa biodisponibilidade por via oral no estado sólido, logo o medicamento Norvir® foi formulado na forma de capsula mole contendo o fármaco dissolvido em meio hidroalcoólico. Pouco tempo depois lotes de Norvir® começaram a falhar no teste de dissolução. A análise desses lotes mostrou a

presença de um precipitado, que consistia numa segunda forma do Ritonavir, com solubilidade muito inferior ao esperado, que passou a ser conhecida como forma II (BAUER et al., 2001). Com isso foram recolhidos lotes que apresentaram o problema, e foram gastos tempo e esforços a fim de solucionar este problema, gerando grande prejuízo para a Abbott® (CHEMBURKAR et al., 2000).

Grande parte das moléculas orgânicos e inorgânicos relevantes para a indústria farmacêutica ocorre em uma ou mais formas cristalinas, que resultam do tipo de empacotamento durante a cristalização ou de diferentes conformações (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001). Estas mudanças podem acarretar variações na propriedade dos fármacos, comprometendo sua ação no organismo, assim como causar transtornos à sua formulação, fabricação e comercialização. Mutações na forma cristalina do API podem ocorrer durante os processos de fabricação, como por exemplo, redução do tamanho de partícula, granulação, secagem, compressão, entre outras, e no transporte e estoque do mesmo (JOIRIS et al., 1998; ZHANG et al., 2004).

A ocorrência de transição de estrutura cristalina pelo fármaco deve ser sempre levada em consideração ao se desenvolver o medicamento, pois cada polimorfo apresenta as moléculas ou íons arranjados no retículo cristalino de formas diferentes, que resulta em energias de interação distintas. Logo as formas polimórficas tendem a sofrer transformação para a forma cristalina de menor energia, que é a mais estável (LIMBERGER, 2011). Temos que a estrutura cristalina preferida para a linha de produção geralmente é a mais estável, pois diminui a probabilidade de ocorrência do polimorfismo durante os processos por qual o fármaco passa, mas essa estrutura por ser mais estável apresenta ponto de fusão mais elevado, menor solubilidade resultando em menor biodisponibilidade (PRADO; ROCHA, 2015).

Os sólidos amorfos têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas por terem sua dissolução acelerada em fluidos orgânicos, pois estes não necessitam de energia para romper a estrutura cristalina. Isso proporciona uma taxa de solubilidade mais elevada. No entanto, os sólidos amorfos apresentam baixa estabilidade que facilita a mudança de sua estrutura para outras mais estáveis. Logo a utilização de API com estrutura amorfa demandaria de cuidados especiais na linha de produção, transporte e estocagem do fármaco, cuidados estes que encarecerem o

produto final (FARIAS, 2015). Mas em alguns fármacos é justificável a utilização da forma amorfa pois apresentam taxa de dissolução elevada ocasionando assimilação mais rápida pelo organismo e em casos de resistência à formar estruturas cristalinas (GIRON, 1995; SINGHAL; CURATOLO, 2004).

A possibilidade de ocorrência de transição polimórfica do princípio ativo no medicamento durante os processos de produção, transporte e armazenamento faz-se necessário o desenvolvimento de novas técnicas para identificação deste fenômeno rapidamente, possibilitando a tomada de decisões a fim de controlar e minimizar a ocorrência deste fenômeno.

1. 3 Indústria do genérico, órgãos regulamentadores e quebra de patentes

No Brasil os medicamentos de referência, genérico e similar são tratados pela lei 9.787/1999, que incentivou o crescimento da indústria farmacêutica no Brasil. De acordo com a revista exame, as indústrias farmacêuticas arrecadaram cerca de 66 bilhões de reais no período de abril de 2015 a março de 2016 (RAPORPOT, 2017). Isso nos dá uma ideia da importância do setor para economia brasileira. Nesse contexto, vale ressaltar a relevância econômica da quebra de patente, uma vez que todo o lucro da comercialização de determinado medicamento ficava apenas com a empresa detentora da patente, após essa quebra outras empresas passaram a poder comercializar tais medicamentos. Devido à concorrência gerada por conta da lei dos medicamentos genéricos, as empresas líderes recorreram a recursos legais para assegurar a liderança na venda de seus medicamentos. Um destes recursos é patentear os polimorfos do princípio ativo que melhor se adequam a linha de produção.

É importante ressaltar que as empresas líderes possuem vantagens na identificação dos polimorfos que melhor se adequam a linha de produção, pois elas possuem anos de experiência trabalhando no desenvolvimento, adaptação e identificação de moléculas de tais fármacos. Logo as empresas líderes estão um passo à frente da indústria de genéricos. Sendo assim, quando a patente do princípio ativo está prestes a ser quebrada, as empresas detentoras da patente já entram com processo para depositar novas formas polimórficas que apresentam melhores resultados, permitindo a liderança no que se refere ao princípio ativo sempre.

A indústria de genéricos não pode produzir os polimorfos que possuem suas patentes fechadas, pois isso pode acarretar uma série de implicações jurídicas, implicando em grande impacto econômico (FARIAS, 2015). Pelo que foi exposto até aqui é totalmente justificável a pesquisa que desenvolva métodos analíticos para qualificar e quantificar as formas polimórficas presentes em formulações farmacêuticas. Uma vez desenvolvida tal técnica, tanto a indústria de genéricos quanto os órgãos reguladores poderão controlar de forma mais eficaz a qualidade dos produtos farmacêuticos a serem comercializados.

Depois dos problemas ocorridos com a transição de formas polimórficas do Ritonavir a FDA (*Food and Drug Administration*) lançou um guia, datado em 2007, com uma série de análises necessárias para comprovar a qualidade dos fármacos (BAUER et al., 2001).

As farmacopeias são elaboradas por instituições responsáveis por estabelecer critérios de análise de fármacos e medicamentos, além de atributos como controle da variação de porcentagem de API permitida em fármacos. A USP – *United States Pharmacopeia* é a farmacopeia mais utilizada hoje em dia. A FDA utiliza a USP como base para a elaboração de normas para o controle de qualidade dos fármacos e medicamentos.

A USP indica uma série de métodos analíticos para no controle de qualidade da matéria prima e em medicamentos, tendo como destaque a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Técnicas cromatográficas são geralmente aplicadas a medicamentos para análise de isomeria, impurezas, solvente residual, excipientes, produtos de degradação, entre outros (SWARTZ; KRULL, 1998; ZHANG et al., 2016). Esta técnica é amplamente utilizada na indústria farmacêutica para vários tipos de análise, devido a sua elevada robustez (LUO et al., 2018). No entanto a técnica demanda de tempo no preparo da amostra, a obtenção das respostas é mais lenta, gera de resíduos e dificuldade de realizar análises em campo (HENNIGAN; RYDER, 2013; HWANG et al., 2005). No que se refere a análise de polimorfos, há o infortúnio dos polimorfos serem compostos orgânicos em estado sólido e as análises da CLAE serem executadas em estado líquido, no qual interação entre os solventes e o sólido farmacêutico pode promover uma variação polimórfica.

Outras técnicas são utilizadas em conjunto para caracterização de polimorfismo em fármacos (PRADO; ROCHA, 2015).

1.4 Produção de fármacos genéricos

Todos os anos a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publica uma lista com os fármacos que tiveram suas patentes quebradas, ou expiradas devido ao tempo, e que passam a ser produzidos pelas indústrias de genéricos. A figura 6 indica o número de medicamentos genéricos registrados por ano (ANVISA, 2017), dos quais 165 destes são medicamentos inéditos registrados entre de 2010 até 2015, dos quais a maioria encontra-se em estado sólido. Todos esses medicamentos possuem um fármaco de referência, provavelmente seus polimorfos que apresentam condições físico-químicas mais adequadas (para linha de produção) e os que apresentam biodisponibilidade elevada são patenteados, assim como seus produtos de degradação.

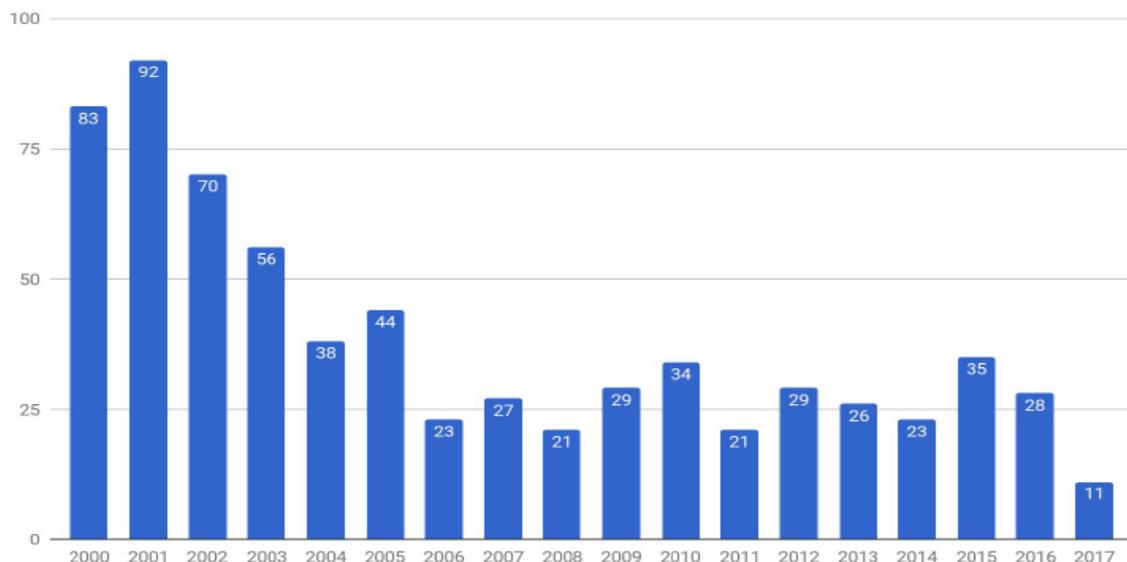


Figura 6: Relação de medicamentos genéricos registrados por ano.

Fonte: Adaptado de referência ANVISA (2017).

1.5 Valsartana

Os medicamentos são compostos pelos ingredientes farmacêuticos ativos (API), que são submetidos a uma série de estudos, a fim de obter informações necessárias para o desenvolvimento de uma formulação do fármaco com biodisponibilidade e estabilidade adequada (JÚLIO et al., 2013). Estes quando no

estado sólido recebem uma classificação biofarmacêutica (BSC), que leva em consideração a taxa de dissolução, solubilidade e permeabilidade intestinal. Podemos observar na figura 7, que os fármacos classificados como I possuem alta solubilidade e permeabilidade, II possuem baixa solubilidade e alta permeabilidade, III possui alta solubilidade, mas baixa permeabilidade e IV possui baixa solubilidade e permeabilidade (YU et al., 2002).

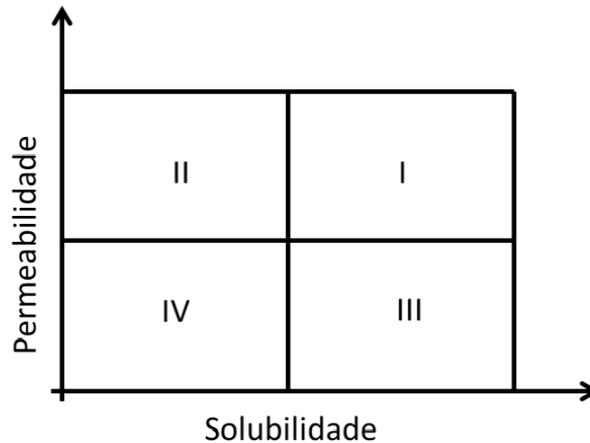


Figura 7: Gráfico de relação permeabilidade/solubilidade da classificação biofarmacêutica.

Fonte: Adaptado de Farias (2015).

A valsartana (VAL), conhecida também por N-(1-carboxy-2-methyl-prop-1-yl)-N-pentanoyl-N-[2'-(1H-tetrazol-5-yl)bi-phenyl-4-ylmethyl]-amine, possui fórmula molecular $C_{24}H_{29}N_5O_3$, e sua fórmula estrutural está descrita na figura 4 (SAYDAM, TAKKA, 2007; CHASHMNIAM, TAFAZZOLI, 2017).

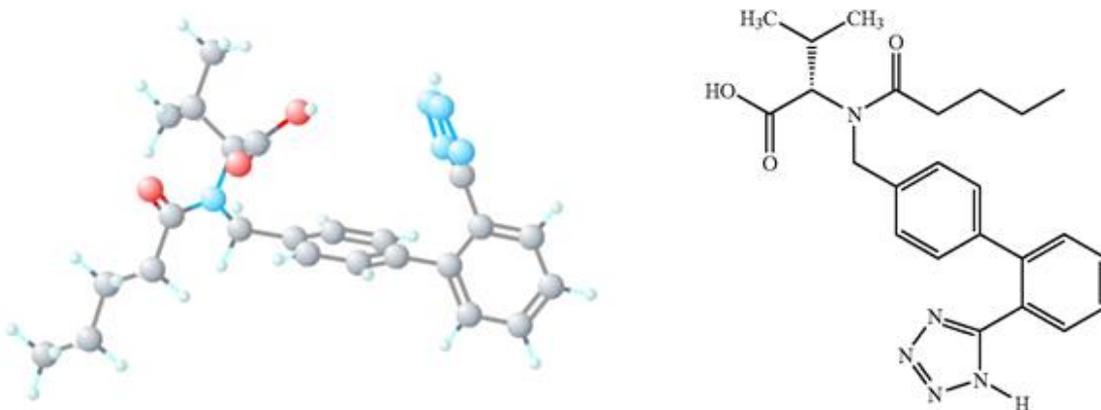


Figura 8: Estrutura molecular tridimensional e plana da valsartana.

Descoberta por Ciba-Geigy e posteriormente comercializada por Novartis Pharmaceutical Company, foi aprovada pela FDA em 1996 e comercializada com o nome de Diovan®, na forma de cápsulas e comprimidos, prescritos nas dosagens 40, 80, 160 e 320 mg. Ela faz parte da classe dos agentes antagonistas do receptor

angiotensina – II com atividade anti-hipertensiva (SIDDIQUI et al., 2011). Este inibe a ação da angiotensina nos seus receptores, evitando o aumento da pressão arterial (IRONS; KUMAR, 2003).

A valsartana possui BSC II com baixa solubilidade, de 1,406 mg/L em água, mas alta permeabilidade (CAPPELLO, 2006), que refletem numa biodisponibilidade de aproximadamente 23 % (FLESCH; MÜLLER; LLOYD, 1997). Sua forma amorfa apresenta taxa de dissolução mais elevada que as formas cristalinas devido a maior energia livre neste tipo de ordenação (WANG et al., 2013). Esta estrutura apresenta maior estabilidade devido as conformações cis-trans que as moléculas apresentam, que dificultam a formação das ligações de hidrogênio, que são responsáveis pela configuração cristalina (GUINET et al., 2017; LI et al., 2007; SKOTNICKI et al., 2016).

Nos medicamentos a VAL é encontrado majoritariamente na forma amorfa que possui característica higroscópica, mas baixa estabilidade química, que requer cuidado redobrado no seu armazenamento (WANG et al., 2013). A valsartana apresenta-se em muitas formas polimórficas e amorfo. Dentre os muitos trabalhos que citam estas formas, podemos citar a US 7105557-B2 (RUKHAMAN et al., 2006), que descreve o processo para a preparação da valsartana nas formas I, II, VI, VII, IX, X, XI, XIII e amorfa, a patente US 20080261959 A1 (KUMAR et al., 2008) refere-se as formas cristalinas A, B, C e D da valsartana, enquanto o trabalho de Wang et al. (2013) descreve a recristalização da valsartana nas formas cristalina E e o solvato F.

A comercialização global do Diovan® arrecadou 6 bilhões de dólares em vendas em 2011 (SIDDIQUI et al., 2011). A valsartana pode ser encontrada nos medicamentos de duas maneiras, sendo o único princípio ativo do fármaco ou associada a outros API's, tais como hidrocloreotiazida e besilato de amlodipina (SIDDIQUI et al., 2011).

1. 6 Técnicas de Análises

A elevada tendência à transição polimórfica nas etapas de produção de comprimidos levou a FDA a sugerir técnicas a serem utilizadas no controle de qualidade dos fármacos durante o processo produtivo, tais como cristalográficas (difração de raios X), térmicas (termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória) e espectroscópicas vibracionais (BRITAIN, 2001; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011; FDA, 2007).

1. 6. 1 Técnicas Térmicas

As análises térmicas monitoram as propriedades físico-químicas dos compostos em relação à variação de temperatura, à medida que esta é elevada de forma programada sob atmosfera controlada. Este tipo de técnica pode ser utilizada para identificação de grau de pureza do analito, polimorfismo, solvatação, degradação e quantificação de misturas polimórficas (CRAIG; READING, 2006).

Técnicas de análises térmicas têm sido empregadas há bastante tempo para caracterização de fármacos, no entanto dentre este conjunto de técnicas apenas duas se destacam para o estudo do polimorfismo em fármacos, a calorimetria diferencial exploratória (DSC, do inglês *diferencial scanning calorimetry*) e a análise termogravimétrica (TGA, do inglês *thermogravimetric analysis*). A TG foi sugerida como uma técnica alternativa para análise de pureza, estabilidade e decomposição térmica. No caso da DSC houve citações de sua utilização no estudo do ponto de fusão, transição cristalina e polimorfismo. Ambas as técnicas foram citadas nas Farmacopeias Americana, Britânica e Europeia (OLIVEIRA; YOSHIDA; LIMA GOMES, 2011).

A termogravimetria consiste no monitoramento da perda de peso da amostra em função da variação de temperatura. Esta técnica é empregada para análise de degradação, no entanto é majoritariamente utilizada em processos de dessolvatação (BRITAIN, 2001).

A DSC mede a diferença de temperatura entre a amostra e um material de referência, quando submetido a um programa de elevação de temperatura controlado. A ideia da técnica é identificar a ocorrência de processos endotérmicos e/ou exotérmico (BRITAIN, 2001). Possuindo utilização na área farmacêutica associada a caracterização de pureza de fármacos, estudos de compatibilidades dos constituintes de formulações e identificação de polimorfismo (OLIVEIRA; YOSHIDA; LIMA GOMES, 2011).

1. 6. 2 Difração de Raios X

O fenômeno de raios-X foi descoberto pelo físico alemão Wilhelm Conrad Rontgen em 1895, que percebeu uma forma de radiação que podia atravessar inúmeros materiais sólidos, que vieram a ser conhecidos como raios-X (FONSECA

FILHO; CARVALHO, 2013). Sendo o intervalo de comprimento de onda deste tipo de radiação variando 10^{-5} Å a 100 Å (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

A difratometria de raios-X (DRX) é uma técnica de caracterização bastante empregada em análises de estruturas cristalinas, utilizando radiação da ordem de 0,1 nm, que corresponde a distância entre dois pontos de redes característico de cristal. Isso permite que a mesma seja utilizada para caracterização de estruturas sólidas em diversas áreas de aplicação (FONSECA FILHO; CARVALHO, 2013). Na indústria farmacêutica esta técnica é utilizada junto a técnicas espectroscópicas, tais como infravermelho (IR) e Raman, para identificação de ocorrência do fenômeno de polimorfismo (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

Quando um feixe de raios-X incide na superfície de um cristal com ângulo θ , parte desta é espalhada pelos elétrons dos átomos ou íons da superfície deste cristal. A parte não difratada penetra na segunda camada do cristal gerando novo espalhamento, no entanto parte desta radiação não espalhada passa para a próxima camada interna e assim sucessivamente. A radiação que é dispersa quando possuem o mesmo comprimento de onda e estão em fase geram interferência construtiva, no entanto quando possuírem o mesmo comprimento de onda, mas não estão em fase, irão gerar interferência destrutiva (CALLISTER, 2001).

A difração de raios X por cristais foi tratada por W. L. Bragg como expresso na figura 9. Podemos observar que o feixe de radiação incide na superfície de um cristal com ângulo θ e que é difratada por sua interação com os átomos P e Q. Logo se a distância:

$$SQ + QT = n\lambda \quad (8)$$

onde n é um valor inteiro, teremos que a radiação espelhada será em fase. Isto possibilita o cristal a refletir radiação.

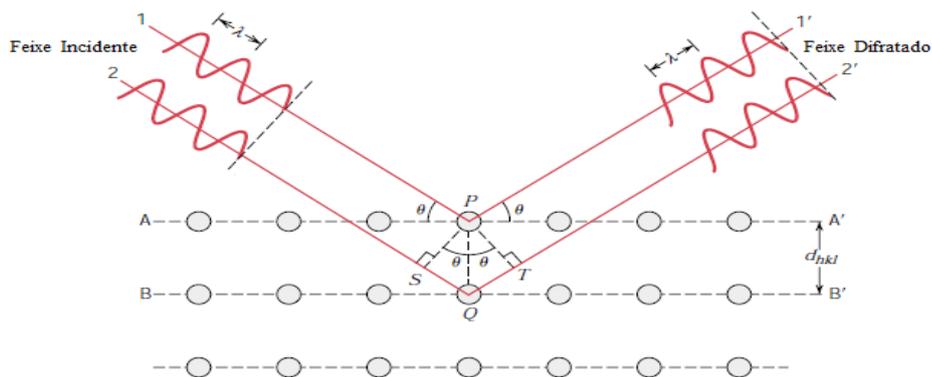


Figura 9: Difração nos planos A e B.

Fonte: Adaptado de referência Callister (2001).

A equação 9 relaciona o comprimento de onda dos raios x e o espaçamento interplanar do cristal (d). Esta equação é conhecida como equação de Bragg. Temos que se a radiação não satisfaz a lei de Bragg, ocorrerá interferência destrutiva da radiação difratada.

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (9)$$

Temos ainda que a distância entre dois planos adjacentes de átomos é função dos índices de Miller (h , k e l) assim como dos parâmetros de rede, que correspondem as letras a , b e c . Logo podemos conhecer a estrutura de um cristal, calculando a estrutura a distância entre os planos de um cristal através da equação 10.

$$d_{h,k,l} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} \quad (10)$$

A análise de DRX é feita num difratômetro, um aparelho que determina os ângulos nos quais a amostra (em pó) consegue difratar a radiação. Podemos observar o esquema de um difratômetro na figura 10. A amostra S , está depositada no formato de uma placa plana, sustentada de forma que seja possível rotações em torno do eixo O . A fonte de geração dos raios X monocromáticos é identificado no ponto T , onde a intensidade dos feixes difratados são identificados no detector C . Para que seja feita uma varredura no ângulo de incidência de radiação, a fonte ou a porta amostra se move, pois, cada ângulo 2θ gera um padrão de difração.

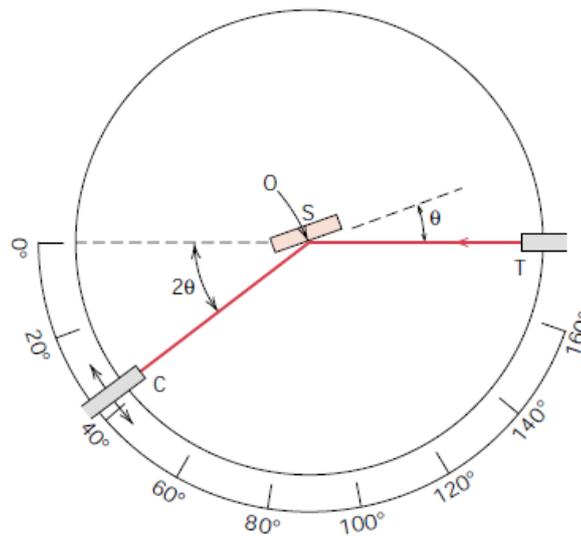


Figura 10: Esquema do difratômetro de raios X.

Fonte: Adaptado da referência Callister (2001).

1. 6. 3 Espectroscopia Raman

As técnicas espectroscópicas são baseadas na interação entre a amostra e a radiação. Esta técnica é dividida em diversos fenômenos, que dependem do tipo de interação radiação-amostra. As técnicas espectroscópicas vibracionais fazem parte deste grande grupo, diferindo das outras técnicas pela natureza da radiação incidente, que consiste na radiação infravermelho. Esta radiação que se encontra nessa região do espectro consegue causar efeitos de vibração nas moléculas que apresentam ligação covalente. Para isto é necessário que as moléculas não possuam momento dipolo.

A espectroscopia Raman é uma técnica muito versátil que permite análise em diversas matrizes. Esta técnica depende do fenômeno de espalhamento inelástico da luz, que foi descrito inicialmente por Venkata Raman em 1928 (FARIA; AFONSO; EDWARDS, 2002). Este fenômeno está associado a variação do momento dipolo induzido na molécula pela ação do campo elétrico da radiação incidente, que possibilita sua aplicação a moléculas homonucleares e as que não possuem momento dipolo (ROGGO; DEGARDIN; MARGOT, 2010; SALA, 2008).

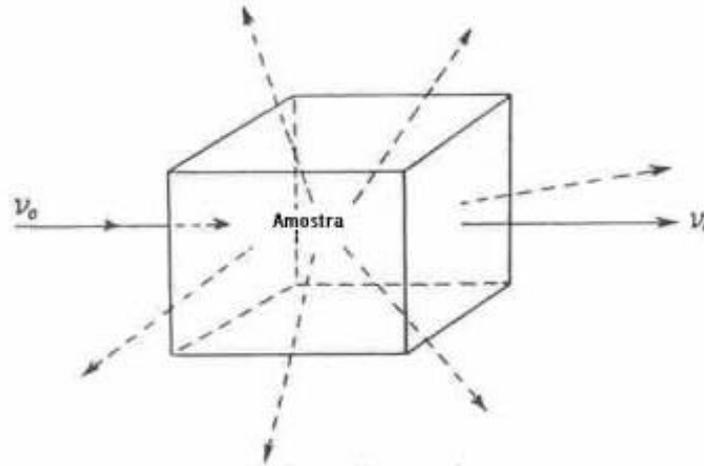


Figura 11: Espalhamento elástico e inelástico de um feixe de radiação.

Fonte: Retirado de Alcantara (2001).

Quando um feixe de luz monocromática de frequência ν_0 é irradiado sobre uma determinada matéria, maior parte desta radiação vai atravessá-la, no entanto, uma pequena fração desta luz, cerca de 0,1%, é espelhada pelo material em diversas direções (figura 11). Esta radiação espalhada contém fótons com a mesma frequência da radiação incidente ν_0 , e fótons com frequência diferente dos incidentes ($\nu_0 - \nu'$ ou $\nu_0 + \nu'$). Quando a radiação espalhada possui a mesma frequência da fonte de excitação, ou seja, um espalhamento elástico, dizemos que houve um espalhamento Rayleigh. Já nos espalhamentos inelásticos pode haver espalhamento com frequência menor que da radiação incidente, que chamamos de espalhamento Stokes e espalhamento com frequência maior que da radiação incidente, que chamamos de espalhamento Anti-Stokes.

Podemos observar na figura 12, que no espalhamento Stokes o fóton espalhado possui energia menor que o fóton incidente, devido a parte desta energia ser transferida para à matéria, que retoma o estado vibracional de maior energia. Já no espalhamento Anti-Stokes o fóton espalhado tem frequência maior que a do fóton incidente, pois o processo de espalhamento cedeu energia, que foi retirado da matéria e transformada em energia do campo de radiação (RODRIGUES; GALZERANI, 2012; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

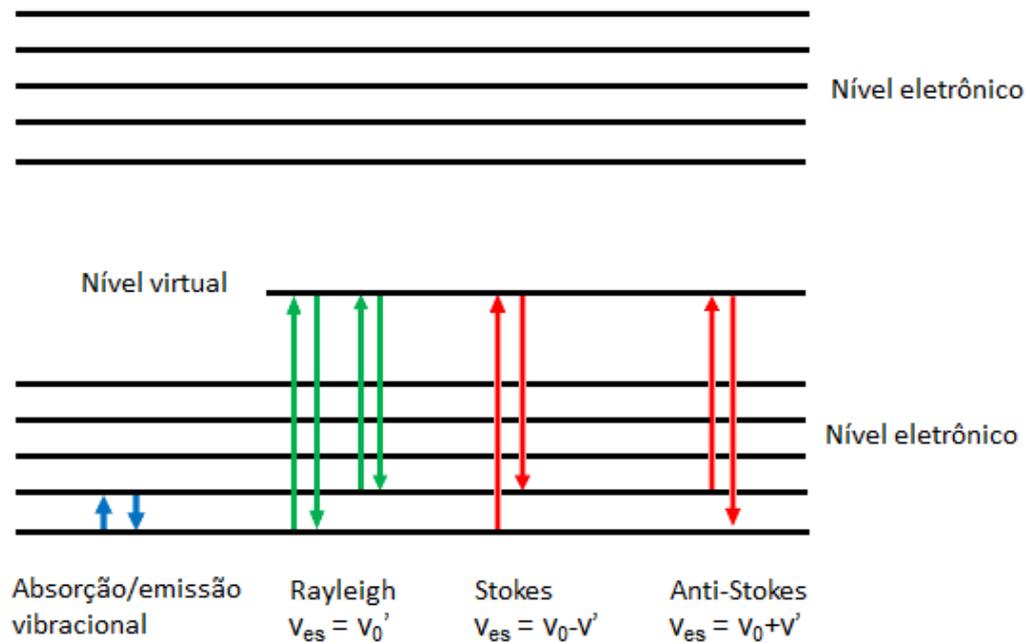


Figura 12: Representação esquemática dos espalhamentos elásticos e inelásticos.

Da radiação espalhada, somente a inelástica possui efeito Raman na análises, sendo que estas equivalem a 0,0001% da radiação espalhada, que o configura como um fenômeno de baixa intensidade (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Os espectros infravermelho e Raman estão relacionados a medição da vibração molecular associada a mudanças de energia rotacional. O que os difere é que a atividade vibracional nos espectros Raman não é uma mudança no momento dipolo da molécula, como é o caso da espectroscopia infravermelho, mas sim uma mudança na polarizabilidade (SALA, 2008). Isso a torna extremamente atrativa para análise de polimorfismo em fármacos, pois estes encontram-se associados com excipientes, que geralmente apresentam caráter polar pronunciado. Logo excipientes como Crospovidona, Estereato de Magnésio, Celulose Microcristalina, Hipromelose, entre outros, apresentariam intensidade de sinal muito baixa em comparação a dos API, que são moléculas altamente polarizáveis.

A figura 13 mostra um espectro Raman de um API, onde podemos observar que há um grande conjunto de picos bem definidos em uma janela espectral ampla. Estes picos possuem boa seletividade, que facilita a identificação de grupos funcionais da molécula em questão. Vale ressaltar que a espectroscopia Raman é uma técnica complementar a NIR e MIR, um bom exemplo disso está no sinal analítico gerado

pelas ligações S-S e C=C que tem baixa intensidade em MIR e elevado sinal no Raman (GENDRIN; ROGGO; COLLET, 2008). Um diferencial da utilização da espectroscopia Raman está na possibilidade de realizar análises através de recipientes de vidro ou plástico, que faz com que a técnica não necessita de preparo de amostra (BORIO et al., 2007; DE BEER et al., 2007).

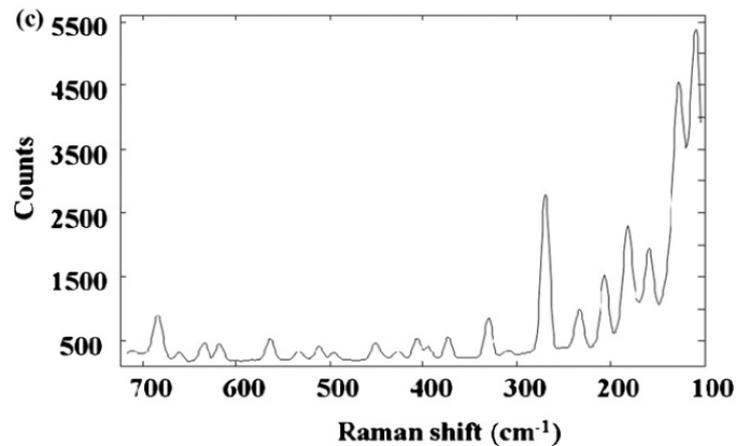


Figura 13: Espectro Raman para o princípio ativo.

Fonte: Adaptado de Gendrin, Roggo e Collet (2008).

O instrumento de espectroscopia Raman consiste numa fonte de laser, um sistema de iluminação da amostra e um espectrofotômetro apropriado. O laser é um oscilador óptico que emite fótons de alta potência, monocromáticas e unidirecionais. Esta intensidade elevada é necessária para promover o espalhamento Raman com intensidade suficiente para ser medido com uma aceitável relação sinal-ruído. No entanto deve-se tomar cuidado com a fonte de excitação, que pode provocar fotodecomposição ou fluorescência (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

A fonte de laser pode ser distribuída na amostra através de um sistema óptico convencional de espelhos e lentes, que possibilita a focalização em uma pequena área da amostra e recolhe a luz dispersa resultante. A coleta do espalhamento da luz é providencial na ER devido a fragilidade deste efeito. A coleção óptica deve ser posicionada com um bom ângulo de abertura e o mais próximo da amostra possível (KALANTRI; SOMANI; MAKHIJA, 2010).

Após ser capturado e filtrado, o sinal espalhado é focalizado para o espectrofotômetro, que através de seu sistema interno de grades de difração irá separar o sinal espalhado em suas componentes principais, direcionando-as a uma

câmera CCD que capta estes sinais separados e envia-os para o computador sob a forma de espectros.

A espectroscopia Raman vem ganhando relevância no tocante a sua utilização, onde podemos identificar sua aplicação em diversos ramos, sendo algumas de suas aplicações a análise qualitativa de vinhos e laticínios (MAGDAS et al., 2018; NEDELJKOVIC et al., 2017), quantificação de partículas aerossóis na atmosfera (SIEPKA et al., 2018), análise de transição de fase de compostos farmacêuticos (FARIAS; SOARES; CARNEIRO, 2016; HÉDOUX; GUINET; DESCAMPS, 2011), dentre outros. Isso mostra o elevado potencial desta técnica para análise qualitativa e quantitativas de compostos.

2. OBJETIVO

2. 1 Geral

Avaliar o emprego de técnicas quimiométricas de calibração multivariada, como PLS e iPLS em dados de espectroscopia Raman obtidos de amostras de misturas binárias dos polimorfos de valsartana na presença e ausência dos excipientes.

2. 2 Específicos

- Sintetizar polimorfos de valsartana;
- Caracterizar estes polimorfos por DRX, DSC, TGA e espectroscopia Raman;
- Quantificar misturas polimórficas de valsartana através de espectroscopia Raman com auxílio métodos de calibração multivariada do tipo PLS e iPLS;
- Quantificar misturas de polimorfos de valsartana na presença de excipientes utilizados no medicamento comercial, mediante espectroscopia Raman com auxílio de métodos de calibração multivariada do tipo PLS e iPLS.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1 Materiais e Reagentes

Foram utilizados o API comercial de valsartana, solventes para recristalização dos polimorfos (etanol e tolueno), acessórios gerais para análises químicas como vidrarias e micropipetas, agitador magnético com aquecimento (Uniscience).

Os excipientes utilizados foram Crospovidona, Estereato de Magnésio e Dióxido de Silício Coloidal para confecção das amostras (na presença de excipientes). Os mesmos foram gentilmente adquiridos junto ao Grupo de Quimiometria Aplicada do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Análises de PLS e iPLS foram realizadas através do software 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.

3. 2 Preparação dos polimorfos

Inicialmente foi realizado um levantamento bibliográfico para encontrar os possíveis polimorfos de valsartana que poderiam ser sintetizados com o API obtido, assim como os procedimentos necessários para sua preparação. Os polimorfos foram escolhidos de acordo com o material para síntese, levando em consideração os solventes que são utilizados na preparação do fármaco, pois diferentes formas polimórficas são obtidas pela recristalização em diferentes solventes. A seguir temos a descrição da produção do polimorfo da forma F.

O polimorfo forma F foi sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Wang et al. (2013) para obtenção da forma E, onde foram pesados 2 g de valsartana comercial e adicionados a 20 ml de uma solução de água/etanol (1:2). A mistura foi aquecida a 50 °C e posta sob agitação (400 rpm) por 3 dias. A mistura foi posta para secar em papel filtro, permanecendo em repouso por 2 dias, resultando num sólido branco com aspecto cristalino.

3. 3 Caracterização dos polimorfos

A valsartana comercial e polimorfo obtido, foram inicialmente caracterizadas por difração de raios X e técnicas de análises térmicas (TGA e DSC), afim de atestar

a natureza amorfa da valsartana comercial e formação da estrutura polimórfica E. Após esta etapa inicial de caracterização, ambas as formas foram submetidas a caracterização por espectroscopia Raman.

As análises de difração de raios X foram realizadas no difratômetro de raios X da Panalytical, modelo Empyrean, com fonte de cobre (comprimento de onda de 0,154 nm), potência de 40 kV e corrente de emissão de 30 mA. As amostras foram analisadas na faixa de 5 a 45° (2 θ), com velocidade de varredura de 0,2° min⁻¹. Aparelho localizado no LABMAT (UFAM).

As análises termogravimétricas e calorimetria de varredura diferencial foram realizadas no aparelho SDT Q600 Ta Instrument. As amostras de 10 mg foram depositadas no cadinho de alumina de 90 microlitros sem tampa, e submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, com fluxo de gás nitrogênio de 30 mL.min⁻¹ e faixa de temperatura analisada de 10 a 500 °C. Aparelho localizado nas dependências do LAMAC (UFAM).

A análise de espectroscopia Raman foi realizada no espectrômetro B&W Tek i-Raman modelo BWS 415-785 H com laser acoplado a um microscópio BAC 151, com fonte de laser de 785 nm e resolução espectral de 3,5 cm⁻¹. A faixa espectral utilizada foi de 110 a 1100 cm⁻¹, com tempo de aquisição de 60 segundos. A potência do laser foi ajustada de forma a obter a melhor relação sinal/ruído para cada amostra, ficando entre 30 e 50 mW para a mistura dos polimorfos e 50 a 80 mW para mistura de polimorfos na presença dos excipientes. Foi utilizada uma lente de 40x no microscópio acoplado ao espectrômetro Raman.

3. 4 Planejamento experimental para quantificação de polimorfos de valsartana

Para a preparação do modelo de calibração foi realizado um planejamento de misturas binárias das duas estruturas de valsartana, que se encontram descritas na tabela 1. Este conjunto de concentrações foram realizadas de forma a simular a variação máxima das concentrações que poderiam ser encontradas em fármacos.

Tabela 1: Valores de concentração para as amostras de calibração e validação.

Amostras	Polimorfos (mg)	
	Amorfa	Forma F
Amostras 1	40,00	0,00
Amostras 2	36,00	4,00
Amostras 3	32,00	8,00
Amostras 4	28,00	12,00
Amostras 5	24,00	16,00
Amostras 6	20,00	20,00
Amostras 7	16,00	24,00
Amostras 8	12,00	28,00
Amostras 9	8,00	32,00
Amostras 10	4,00	36,00
Amostras 11	0,00	40,00
	6,00	34,00
	14,00	26,00
Amostras para validação	18,00	22,00
	22,00	18,00
	34,00	6,00

As formas polimórficas foram previamente pesadas segundo o planejamento experimental descrito na tabela 1. Os valores reais obtidos na etapa da pesagem estão expressos na tabela 2, os quais foram posteriormente homogeneizadas em almofariz de ágata com pistilo por 7 minutos, com cuidado para aplicar o mínimo de pressão

possível durante o processo, de forma a evitar o fenômeno do polimorfismo nesta etapa.

Tabela 2: Valores reais para as amostras de calibração e validação.

Amostras	Polimorfos (mg)	
	Amorfa	Forma F
Amostras 1	40,40	0,00
Amostras 2	36,06	4,54
Amostras 3	32,06	8,48
Amostras 4	28,26	12,16
Amostras 5	24,42	15,94
Amostras 6	20,16	20,16
Amostras 7	16,14	24,28
Amostras 8	12,44	28,20
Amostras 9	8,04	32,48
Amostras 10	4,60	35,96
Amostras 11	0,00	40,30
	6,10	34,28
	14,0	25,82
Amostras para validação	18,02	21,98
	21,78	17,96
	34,20	6,20

A preparação das amostras na presença de excipientes foi realizada de acordo com a bula do fármaco Diovan®, no qual foi escolhida a concentração do princípio

ativo referente a 40 mg. Foram produzidos 16 comprimidos simulados com as concentrações de cada polimorfo variando de 0,0 a 40 mg, com as mesmas concentrações expressas na tabela 1, onde cada amostra possui excipiente indicado para comprimido comercial, compostas por princípio ativo (40,0 mg), Crospovidona (15 mg), dióxido de silício (2,5 mg) e estereato de magnésio (15 mg). As concentrações dos excipientes foram escolhidas de acordo com o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (2009). É importante salientar que o objetivo deste trabalho não é a produção fidedigna do medicamento, mas sim observar se os excipientes encontrados no fármaco comercial irão influenciar os sinais dos API's.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos polimorfos via DRX, TGA e DSC

As duas formas da valsartana foram submetidas as técnicas de caracterização tais como difração de raio X, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura, afim de comprovar que a forma adquirida comercialmente corresponde a forma amorfa e a forma obtida pela recristalização em solução de água/etanol, é realmente a forma E. É importante ressaltar a caracterização por estas técnicas, pois são sugeridas pela FDA (2007) para análise de fármacos.

A figura 14 mostra o difratograma da valsartana comercial, onde podemos observar a ausência de picos característicos conforme descrito na patente US 7,105,557 B2 (RUKHAMAN et al., 2006), que caracteriza a forma amorfa da valsartana.

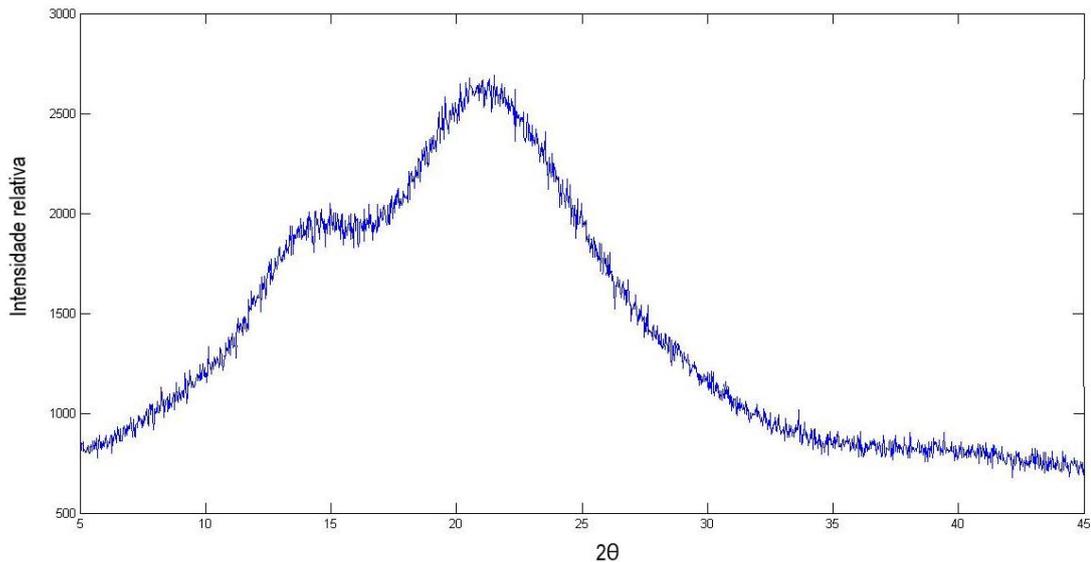


Figura 14: Difratograma da análise de DRX para valsartana amorfa.

A valsartana recristalizada na presença da solução água/etanol corresponde ao processo de preparação da forma F da VAL, a figura 15 traz o difratograma para o polimorfo obtido. Os picos característicos em torno de 9,40, 10,84, 11,62, 14,02, 17,82, 18,76, 26,58 e 31,2, correspondem aos picos padrões da forma E da valsartana, que é uma forma altamente cristalina (WANG et al., 2013). Logo mesmo o procedimento realizado sendo para preparação da forma cristalina F, o que foi gerado foi a forma também cristalina E, que foi confirmada por análise térmica (TGA e DSC).

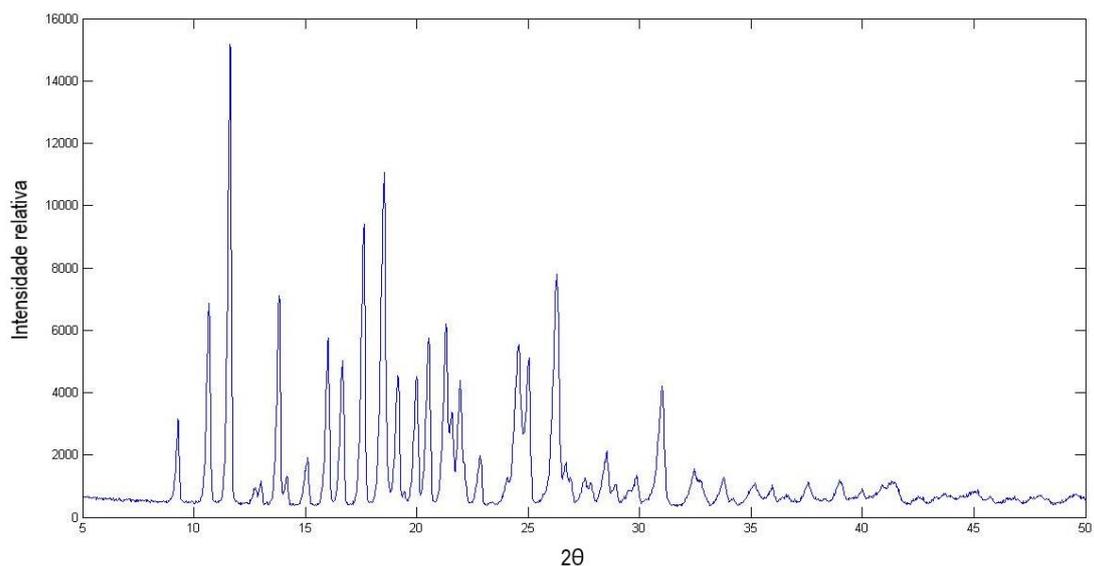


Figura 15: Difratograma da análise de DRX para valsartana forma E.

Na figura número 16 temos as curvas térmicas TGA e DSC obtidas para valsartana amorfa. Na curva TGA, figura 17 a), é possível identificar três regiões de

perda de massa, sendo o primeiro evento de perda no intervalo entre 40 – 80 °C e perda 1,6 % da massa, possivelmente devido à perda de solventes residuais. O segundo intervalo se deu 155 – 265 °C e teve perda de 13,8 % da massa e o terceiro ocorreu à 265-500 °C com perda de 76,7 % da massa, sendo os dois últimos eventos correspondentes a decomposição do material (JÚLIO et al., 2013; SKOTNICKI et al., 2013).

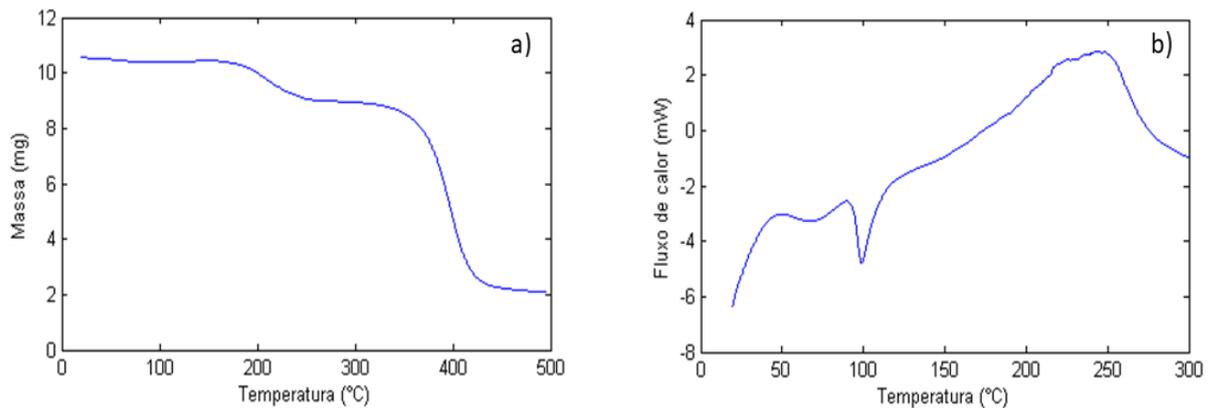


Figura 16: Curvas térmicas de TG (a) e DSC (b) da valsartana amorfa.

O gráfico de DSC da valsartana, figura 16 b), nos permite observar a ocorrência de dois eventos endotérmicos, sendo o primeiro pico em 68°C, correspondendo a perda de solventes residuais. O segundo evento endotérmico ocorreu com pico em 99° C resultado da transição vítrea da valsartana e início da decomposição (JÚLIO et al., 2013; SKOTNICKI et al., 2013; TRAN et al., 2012).

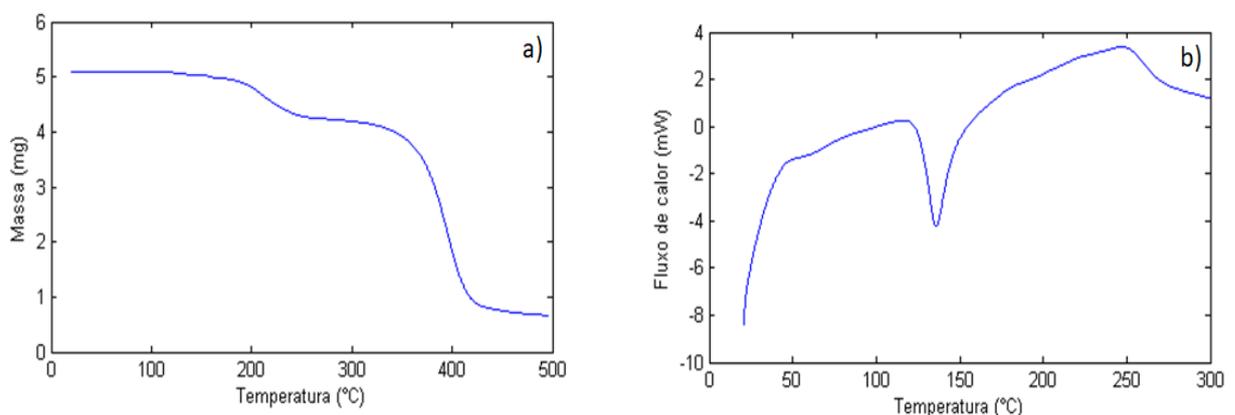


Figura 17: Curvas térmicas TG e DSC da valsartana forma E.

A figura 17 traz as curvas térmicas (TGA e DSC) para a forma E. A amostra apresenta uma pequena perda de massa (figura 17 a)) com início em 133° C, provavelmente devido a presença de solvente residual. A 158° C essa perda de massa

se intensifica indicando a decomposição da amostra (WANG et al., 2013). A curva de DSC, figura 17 b), apresentou um pico endotérmico em 136 °C, que corresponde a fusão da valsartana (WANG et al., 2013).

4.2 Caracterização e quantificação por Espectroscopia Raman

4.2.1 Princípio ativo na ausência excipiente

Na figura 18 podemos observar o espectro da forma amorfa da valsartana e da forma E da mesma. É visível a diferença entre os espectros das amostras, pois cada material apresenta um arranjo cristalino diferente, tendo um modelo vibracional próprio, onde a técnica (espectroscópica Raman) gera padrões únicos de pico específico em relação ao deslocamento Raman e intensidade relativa, sendo esse padrão espectral (único para cada material) denominado *fingerprints* (D'IPPOLITO et al., 2015; PANKIN et al., 2018). Desta forma é possível sua utilização para qualificação e quantificação da valsartana.

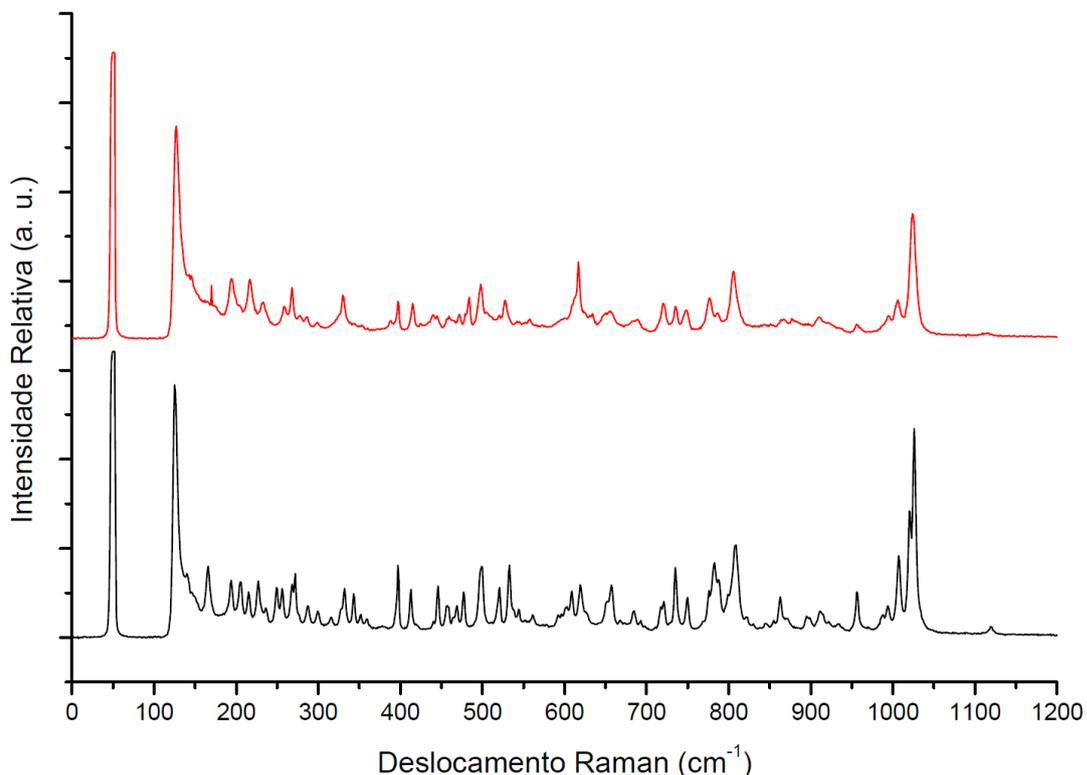


Figura 18: Espectros Raman para as formas polimórficas E (vermelha) e amorfa (preto).

Os dados utilizados para elaboração do modelo foram submetidos a pré-tratamentos, a fim de remover as variações indesejáveis que podem influenciar nos resultados. Inicialmente foi realizada a média das réplicas para cada amostra, e

posteriormente estes valores médios foram normalizados resultando em um único espectro para cada nível de concentração. A figura 19 mostra os 11 espectros (referente a cada nível de concentração) normalizados que originaram o nosso modelo.

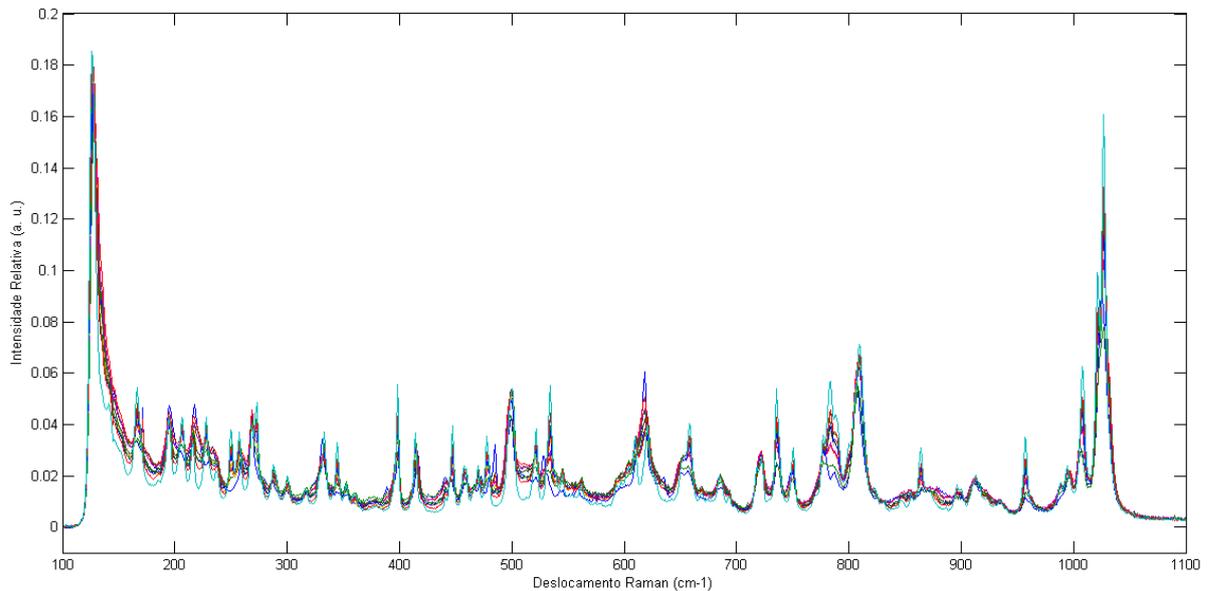


Figura 19: Espectro dos 11 níveis de concentração utilizados para elaboração da curva de calibração.

Com os espectros em mãos foi realizada a elaboração dos modelos de calibração multivariada PLS, que foram submetidos a uma série de pré-tratamentos para remoção de variação indesejável nos dados, para identificar os que geravam melhor ajuste e menor erro para o modelo. Para as nossas curvas os que apresentaram melhores resultados foram o SNV (padronização normal de sinal) e primeira derivada Savitzky-Golay (SG) com polinômio de 2° ordem. No entanto apenas os pré-tratamentos não nos forneceram um modelo com boas características preditivas. Logo, foi realizada a calibração por iPLS, que nos forneceu resultados mais adequados. A tabela 3 fornece os parâmetros das curvas de calibração obtidas de acordo com os pré-tratamentos, PLS e iPLS.

A escolha do número de variáveis latentes (LV) é uma etapa de extrema importância para o modelo de calibração. O número de LV's incorreto pode ocasionar subajuste ou sobreajuste do modelo, onde, para ambos os casos, o modelo estará com bons parâmetros, porém com pouca capacidade preditiva, o que é um paradoxo (NAGY et al., 2016; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Para os utilizados modelos a escolha do número de LV's foi realizada mediante a validação cruzada

(*leave one out*) indicando o número de 2 LV's para todos os modelos elaborados. Na figura 20 podemos observar a variação do erro de validação cruzada em função do número de variáveis latentes, sendo que o erro mínimo se dá para 2 LV's. Isso indica que as 2 LV's são capazes de explicar as informações físico-químicas relevantes (FARKAS et al., 2015). A utilização de um número excessivo de LV's faz com que o ruído seja modelado, desta forma a capacidade de previsão de novas amostras será menor (BRERETON, 2007). Essa escolha se manteve para todos modelos adquiridos, o que era de se esperar já que trabalhamos com dois polímeros.

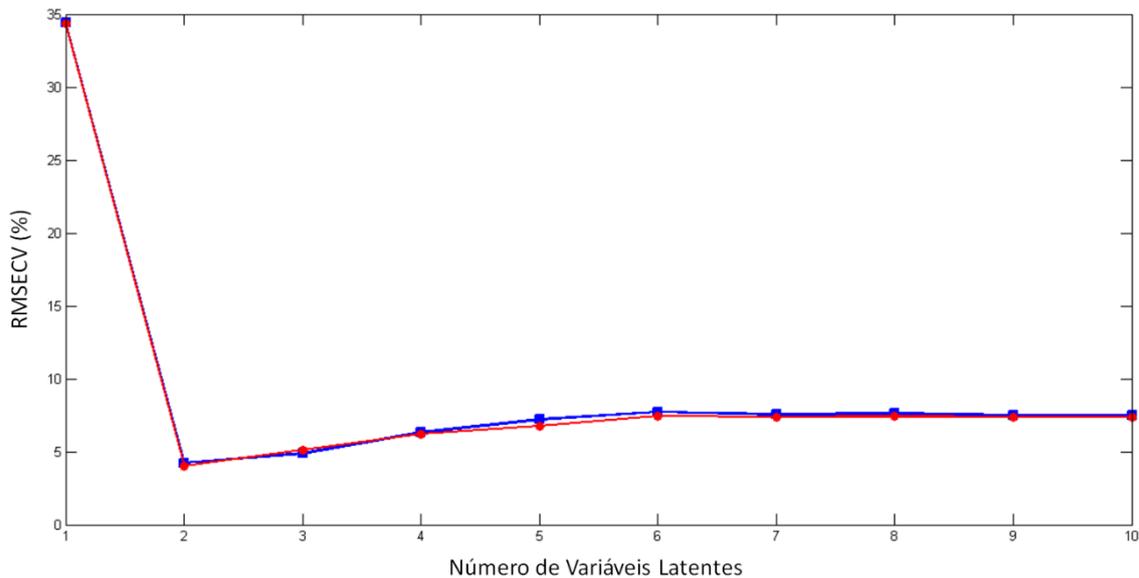


Figura 20: Gráfico do valor de RMSECV x LV's, em azul o amorfo e vermelho a forma E.

Os modelos obtidos para a mistura binária de valsartana nas proporções descritas na tabela 2, são constituídos pelo conjunto de calibração composto por 11 pontos, enquanto o de validação é composto por 5 pontos. A tabela 3 traz informações a respeito do número de LV's, erro de calibração, erro de validação, erro de predição e ajustes para algumas das curvas construídas. Foram elaborados diversos modelos, onde podemos acompanhar a melhora dos parâmetros de acordo com a aplicação dos pré-processamentos e suas combinações, assim como a utilização do iPLS. O modelo PLS desenvolvido com ausência de pré-tratamentos (SP) apresentou curva de correlação R^2 (VC) de 0,86 (AM) e 0,87 (E), indicando uma baixa correlação entre os valores mensurados e os preditos, no entanto o modelo desenvolvido com os pré-tratamentos 1° derivada SG e SNV apresentaram uma melhora sutil nos valores de R^2 (VC), que são 0,91 (AM) e 0,92 (E). No caso do modelo iPLS com os pré-tratamentos, é visível a melhora no índice de correlação R^2 (VC), de 0,97 (AM) e 0,98

(E), quando comparado aos modelos similares desenvolvidos via PLS. A mesma melhora pode ser observada para os outros parâmetros, como no caso do RMSEC caiu de 8,13 % na curva SP para 4,02 % na curva iPLS (1^o *d* e SNV) para forma AM, enquanto que para a forma E essa diminuição foi de 7,76 % para 4,41 %.

O RMSECV para as duas formas polimórficas também apresentou redução, comparando os modelos SP com o iPLS (1^o *d*^a e SNV), onde os valores caíram 12,43 % para 5,39 % para forma AM, enquanto a redução foi de 11,77 % para 4,93 % na forma E, evidenciando a qualidade do modelo. O valor do RMSEP também apresentou uma redução ao comparar os modelos à medida que são submetidos a pré-tratamentos, no entanto o valor continuou extremamente elevado.

Tabela 3: Parâmetros para as curvas de calibração composta por 11 níveis de concentração e 5 níveis de concentração para validação.

Pré-tratamentos	LV	RMSEC (%)		RMSECV (%)		RMSEP (%)		R ² (VC)		R ² (P)	
		AM	E	AM	E	AM	E	AM	E	AM	E
SP	2	8,11	7,76	12,43	11,77	45,79	44,87	0,85	0,87	0,06	0,08
1 ^o <i>d</i> ^a	2	10,16	7,32	11,82	10,18	43,85	44,09	0,86	0,89	0,01	0,11
1 ^o <i>d</i> ^a , SNV	2	7,66	7,28	9,93	9,09	44,66	42,65	0,91	0,92	0,01	0,02
iPLS, 1 ^o <i>d</i> ^a , SNV	2	4,02	4,41	5,39	4,93	40,48	38,84	0,97	0,97	0,13	0,12

AM – Forma Amorfa; E – Forma E; SP – Sem pré-processamento; 1^o *d*^a – Primeira derivada (de 7 pontos); iPLS – Intervalos [281-310, 581-610 e 821-850].

O valor bastante elevado de RMSEP para o modelo iPLS (1^o *d*^a e SNV), tabela 3, indica que o modelo tem baixa capacidade preditiva. Este parâmetro avalia a capacidade do modelo prever novas amostras, no trabalho, representadas pelas 5 amostras de validação. O RMSEP para a forma amorfa é de 40,48 % em massa (equivalente a 16,2 mg) e 38,84 % em massa para a forma E (equivalente a 15,5 mg), considerando uma massa de API de 40 mg. No entanto, os valores de RMSECV

indicam uma boa capacidade preditiva, já que este parâmetro é obtido através da validação cruzada, tipo *leave one out*, onde uma amostra do conjunto de calibração é retirada e o modelo é construído com o restante das amostras, e é feita a previsão desta amostra (retirada) empregando um número crescente de variáveis latentes, sendo este procedimento repetido para todas as amostras resultando num erro médio de validação cruzada, que corresponde a capacidade do modelo prever estes pontos deixados de fora (FERREIRA, 2015; SOUZA et al., 2013; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Desta forma, foi analisado os resíduos de todas as amostras (calibração e validação), que pode ser acompanhado na figura 21 a) e 21 b).

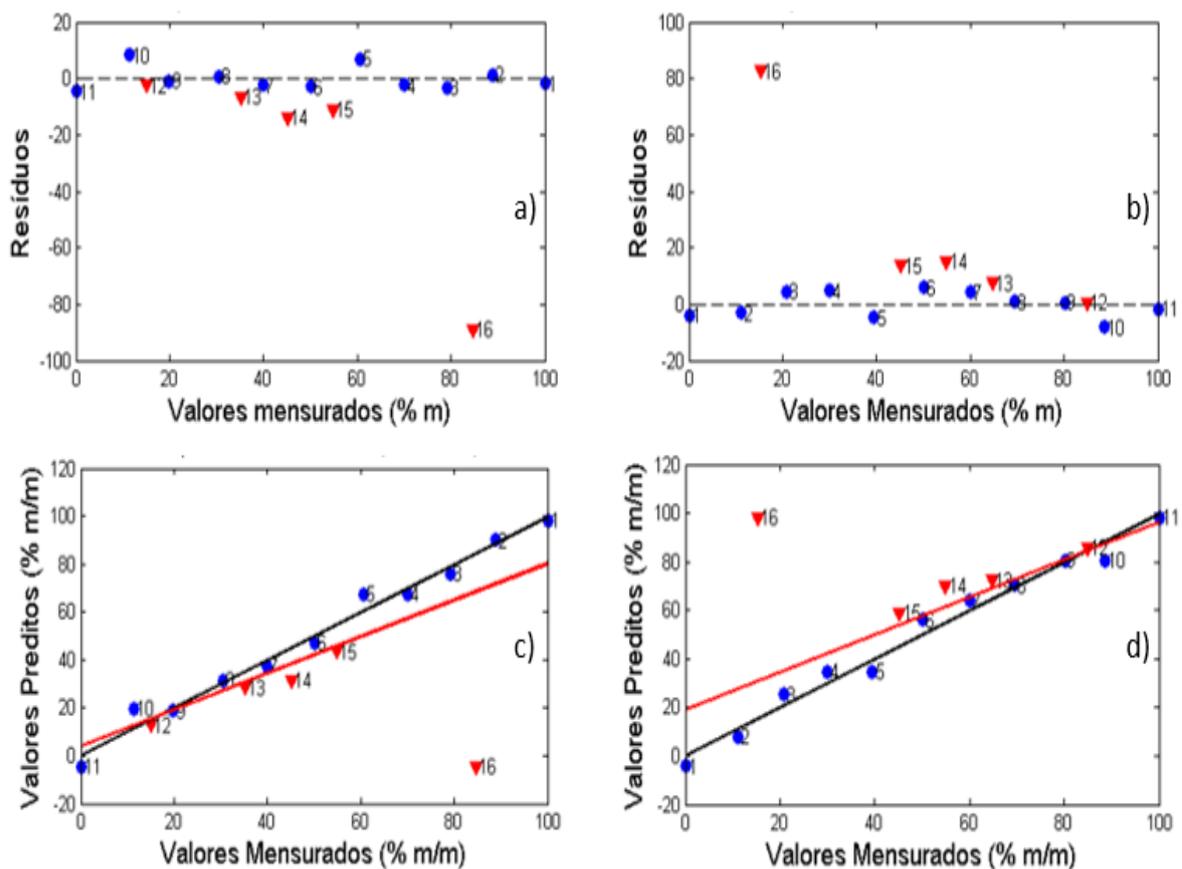


Figura 21: Gráficos a e b correspondem aos valores mensurados pelos resíduos para as formas AM e E, respectivamente. Gráficos c e d correspondem aos valores reais pelos valores preditos para as formas AM e E, respectivamente. No modelo com pré-processamentos iPLS 1^o d^a (7 pontos) e SNV.

Podemos identificar a alta carga residual da amostra 16, que é reflexo da diferença entre os valores reais e previstos (PEREIRA FILHO, 2015), estas consequências podem ser observadas nas curvas de correlação (R^2 P), figura 21 c), onde temos o ponto 16 influenciando no ajuste da curva com os pontos de validação (vermelha) quando comparada com a reta modelo (preta) da forma amorfa. Na figura

21 d), podemos constatar a mesma influência da amostra 16 também é vista para a forma E, onde temos o afastamento da curva com os pontos de validação (vermelha) da curva do modelo (preta). Com valores de R^2 de predição da ordem de 0,13 para forma AM e 0,12 para forma E, desencadeadas pela amostra 16, ela representa uma amostra anômala (*outlier*). Esta amostra é responsável pelo baixo desempenho referente a capacidade de predição do modelo, pois as outras amostras apresentam resíduos baixos, logo não são responsáveis pelo baixo valor do R^2 (P). Sendo assim esta amostra foi removida do nosso conjunto de validação deixando-o com 4 níveis.

Tabela 4: Parâmetros para as curvas de calibração composta por 11 níveis de concentração e 4 níveis de concentração para validação.

Pré-tratamentos	Número de LV's	SP	1 ^o d ^a	1 ^o d ^b	SNV	1 ^o d ^a , SNV	1 ^o d ^b , SNV	iPLS ¹ , 1 ^o d ^b , SNV	iPLS ² , 1 ^o d ^b , SNV	iPLS ³ , 1 ^o d ^b , SNV	iPLS ⁴ , 1 ^o d ^b , SNV	iPLS ⁵ , 1 ^o d ^b , SNV	iPLS ⁶ , 1 ^o d ^b , SNV	iPLS ⁷ , 1 ^o d ^b , SNV
		AM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
RMSEC	AM	8,91	7,99	8,51	7,40	5,06	6,27	4,85	4,06	4,20	4,34	4,23	3,45	3,51
	E	7,69	7,43	7,69	6,35	4,84	5,22	5,75	4,42	4,54	4,53	4,39	3,72	3,58
RMSECV	AM	13,87	11,71	13,40	10,91	6,63	9,27	5,59	4,89	5,21	5,32	5,29	4,16	4,24
	E	11,26	10,95	11,78	8,89	5,36	7,18	6,38	5,17	5,29	5,15	5,12	4,32	4,11
RMSEP	AM	5,28	7,48	7,83	4,67	4,59	4,08	7,04	5,38	5,70	5,87	5,60	3,37	3,96
	E	4,18	3,45	3,08	4,90	5,67	4,91	8,08	6,98	7,43	7,19	7,34	3,90	4,15
R ² (VC)	AM	0,82	0,87	0,83	0,88	0,96	0,91	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98
	E	0,87	0,88	0,87	0,92	0,97	0,95	0,96	0,97	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98
R ² (P)	AM	0,94	0,97	0,97	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97
	E	0,98	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97

AM – Forma Amorfa; E – Forma E; SP – Sem pré-processamento; 1^o d^a (Primeira derivada, polinômio de segunda ordem numa janela de sete pontos); 1^o d^b (Primeira derivada, polinômio de segunda ordem numa janela de treze pontos) iPLS¹: Corresponde ao intervalo 601-650 nm, para 2 LV's e janela de 50 pontos; iPLS²: Corresponde aos intervalos 201-250 e 1001-1050 nm, para 2 LV's e janela de 50 pontos; iPLS³: Corresponde ao intervalo 201-280 nm, para 2 LV's e janela de 40 pontos; iPLS⁴: Corresponde ao intervalo 211-270 nm, para 2 LV's e janela de 30 pontos; iPLS⁵: Corresponde aos intervalos 176-200, 326-350, 551-575 e 1076-1100 nm, para 2 LV's e janela de 25 pontos; iPLS⁶: Corresponde aos intervalos 181-200, 321-340 e 561-580 nm,

Os novos modelos foram elaborados com os mesmos 11 níveis de calibração, enquanto as amostras de validação passaram a ser apenas 4 devido a eliminação do outlier, amostra 16, observada no gráfico dos resíduos. Os parâmetros de erros e ajustes das curvas podem ser observados na tabela 4, sendo evidente a expressiva melhora nos valores de RMSEP.

É possível acompanhar a melhora do modelo à medida que os pré-tratamentos vão sendo aplicados, sendo visível a qualidade dos modelos pelos valores de ajuste da curva, que em sua maioria apresentaram valores superiores a 0,90, indicando que os valores preditos pelo modelo são muito próximos dos valores reais (MILLER; MILLER, 2010). Vale destacar que a primeira derivada Savitzky Golay para janela de treze pontos ($1^{\text{º}}\text{d}^{\text{b}}$) apresenta valores de erros e ajustes mais satisfatórios em relação a de sete pontos ($1^{\text{º}}\text{d}^{\text{a}}$), situação na qual há sinergia entre tamanho da janela e grau do polinômio (WISE et al., 2006). Para elaboração do iPLS foi utilizada as condições ideais de pré-tratamentos encontradas para o PLS, desta forma foram utilizadas apenas a $1^{\text{º}}\text{d}^{\text{b}}$. Ainda de acordo com a tabela 4, é visível que todos os modelos iPLS apresentaram qualidade superior aos PLS, com valores de erro de predição menores e valores de ajuste da curva maiores.

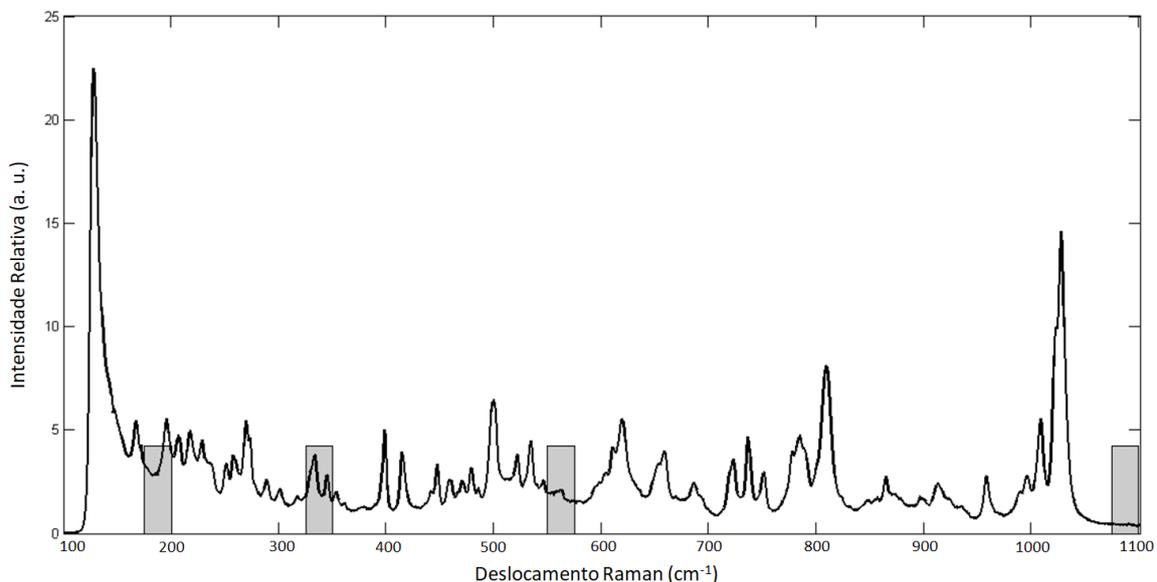


Figura 22: Intervalos selecionados no iPLS, correspondente ao modelo iPLS⁵.

Na figura 22 temos os intervalos, 176-200, 326-350, 551-575 e 1076-1100 cm^{-1} , selecionados pelo iPLS para o modelo de calibração iPLS⁵ ($1^{\text{º}}\text{d}^{\text{b}}$ e SNV), que correspondem as regiões espectrais com maior variância em relação a diferença

espectral das formas polimórficas, que apresentam menor erro de previsão, logo são responsáveis pelas informações físico-químicas relevantes da amostra (MEHMOOD et al., 2012; NØRGAARD et al., 2000). Podemos observar que a maioria das variáveis foram omitidas, o que nos leva a crer que estas podem conter muita informação redundante a respeito do material (FARKAS et al., 2015; FERREIRA, 2015). Desta forma a utilização do iPLS mostra-se mais adequada para a elaboração da nossa curva de calibração. A tabela abaixo (tabela 5) traz os parâmetros do modelo iPLS da curva de calibração descrita acima (iPLS⁵, 1º d^b e SNV), feito com intervalos indicados na figura 23, evidenciando a melhor combinação de parâmetros dentre os modelos desenvolvidos para mistura binária do API.

Tabela 5: Parâmetros para o modelo desenvolvido com os pré-processamentos 1º d^b e SNV.

Parâmetros	Polimorfo	
	Amorfo	Forma E
RMSEC (% m)	3,45	3,72
RMSECV (% m)	4,16	4,32
RMSEP (% m)	3,37	3,90
R ² (VC)	0,98	0,98
R ² (P)	0,98	0,98

Na tabela 5 podemos observar os valores de erro de predição de 3,37 % para a forma amorfa e erro de 3,90 % para forma E. A forma AM apresentou erro de validação cruzada de 4,16 % enquanto a forma E apresentou 4,33 %. Vale ressaltar que para ambas as formas os valores de RMSEP e RMSECV foram próximos, um indicativo de que não houve superajuste ou sobreajuste, de forma que o valor predito é próximo do valor real (FERREIRA, 2015; GELADI; KOWALSKI, 1986). Essa correlação é indicada pelo alto valor de R² para ambas as formas, que foi de 0,98, podendo ser observado na figura 23, onde estão os gráficos dos valores reais pelos preditos.

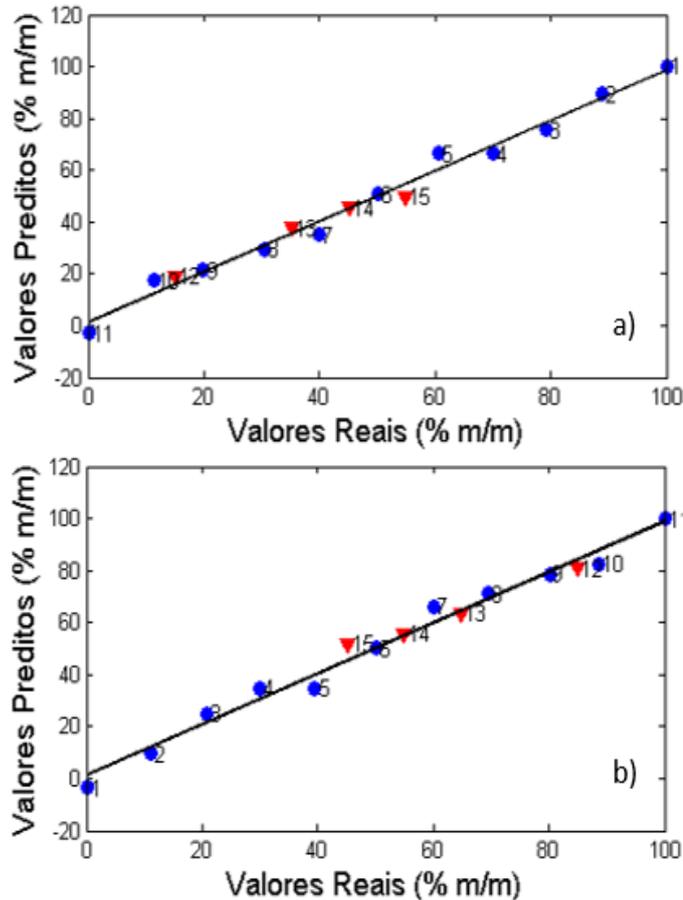


Figura 23: Curvas de correlação entre os valores reais pelos valores preditos, onde os círculos são pontos de calibração e triângulos pontos de validação: (a) Amorfo e (b) forma E.

O modelo de calibração elaborado com 11 amostras de calibração mostra-se capaz de prever novas amostras de valsartana nas formas AM e E. Considerando cada amostra contendo 40 mg do API, o modelo conseguiria prever a massa da forma E de valsartana com uma variação de 1,56 mg (3,90 % em massa), enquanto a capacidade de previsão para forma AM teria uma variação de 1,35 mg (3,37 % em massa).

As fontes dos erros de predição podem ser de diversas naturezas, tendo destaque a característica da técnica, onde um feixe de laser monocromático incide sob a superfície da amostra, onde a área atingida é muito pequena, cerca de 1 mm^2 , assim como a profundidade do feixe na superfície da amostra ser de alguns milímetros, dessa forma a área da amostra analisada é muito pequena em relação a área total da mesma. Com a intenção de minimizar esta problemática foram obtidos 10 espectros (replica) de forma a maximizar a cobertura da superfície da amostra.

Vale ressaltar que um número maior de réplicas, em diferentes pontos, teria melhor representatividade da amostra.

4.2.2 Princípio ativo na presença de excipientes

O mesmo processo de qualificação e quantificação foi realizado para o API junto aos excipientes, com a finalidade de avaliar a capacidade preditiva do modelo frente ao fármaco comercial. A bula do medicamento valsartana (40 mg) da empresa EMS foi consultada para a identificação dos excipientes, sendo utilizados crospovidona, estereato de magnésio e dióxido de silício coloidal. É importante ressaltar que os outros excipientes indicados na bula não foram utilizados devido a indisponibilidade, porém o objetivo do trabalho não era elaborar uma cópia fiel do genérico, mas sim a capacidade do modelo qualificar e quantificar os polimorfos na presença dos excipientes. Estes foram proporcionados de acordo com o Handbook de Excipientes, que indica a proporção de cada um deles em relação a massa do comprimido (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

A figura 24 mostra o espectro Raman dos excipientes utilizados no trabalho junto ao espectro das formas polimórficas da valsartana (AM e E). As ligações químicas das substâncias possuem frequências vibracionais específicas, que são refletidas em padrões espectrais singulares para diferentes materiais (DE OLIVEIRA PENIDO et al., 2017; PANKIN et al., 2018), como pode ser visto na figura 24. Como estes padrões espectrais são únicos, eles podem ser utilizados na qualificação e quantificação das formas polimórficas da valsartana na presença de diferentes excipientes (D'IPPOLITO et al., 2015).

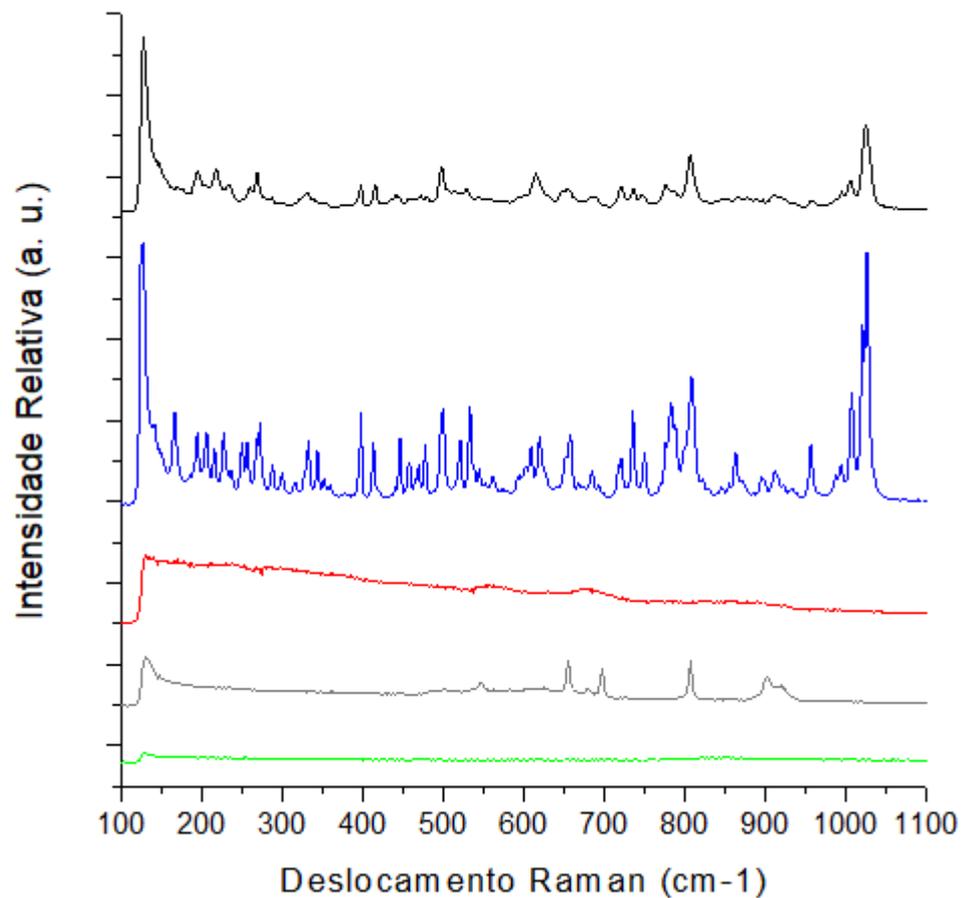


Figura 24: Espectro dos excipientes e polimorfos, de baixo para cima: Crospovidona (verde), estereato de magnésio (cinza), dióxido de silício coloidal (vermelho), forma E (azul) e amorfo (preto).

Para cada nível de concentração foram retirados dez espectros, afim de fornecer o máximo de representatividade da amostra, sendo feita a média e posteriormente a normalização para gerar um espectro médio para cada nível de concentração. O conjunto de calibração é composto por 11 amostras, enquanto o de validação é composto por 5 amostras. Na figura 25 temos os onze espectros médios que compõem o conjunto de calibração.

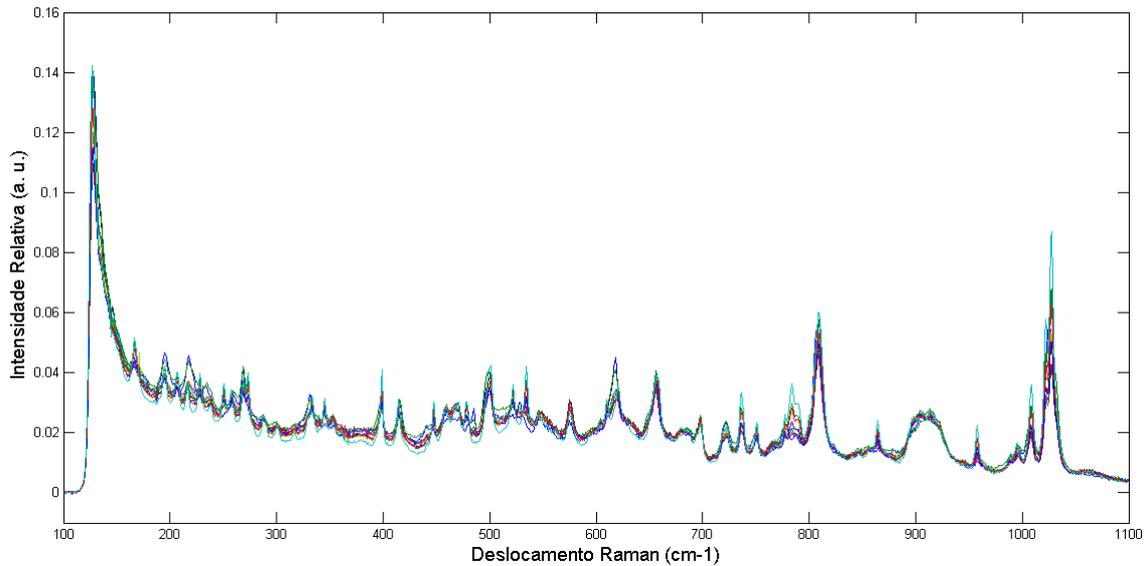


Figura 25: Espectro dos 11 níveis utilizados para construção da curva de calibração do API junto aos excipientes.

Os dados foram submetidos a uma série de pré-tratamentos para identificar o arranjo que permite os melhores parâmetros (RMSEC, RMSECV, RMSEP e R^2) de qualidade do modelo. Os melhores resultados foram obtidos pela primeira derivada Savitzky Golay (com polinômio de segunda ordem e intervalo de 13 pontos) e a padronização normal de sinal.

Através da validação cruzada foi obtido o número de variáveis latentes que melhor representam os dados. A figura 26 traz a variação do erro de validação cruzada em relação ao número de LV's, onde é possível identificar que duas variáveis latentes apresentam o menor RMSECV para as formas AM e E. É importante frisar que a utilização de um número excessivo de LV's faz com que mais resíduo seja modelado, pois no cálculo de cada variável latente é gerada uma certa quantidade de resíduo, resultando numa menor capacidade de previsão para novas amostras (BRERETON, 2007; FARIAS, 2015; SOUZA et al., 2013). O número de variáveis latentes, duas, indicada pela validação cruzada já era esperado, visto que as variações espectrais dependem apenas das concentrações dos polimorfos nas amostras, visto que os excipientes possuem sua composição e concentração invariáveis em todas as amostras.

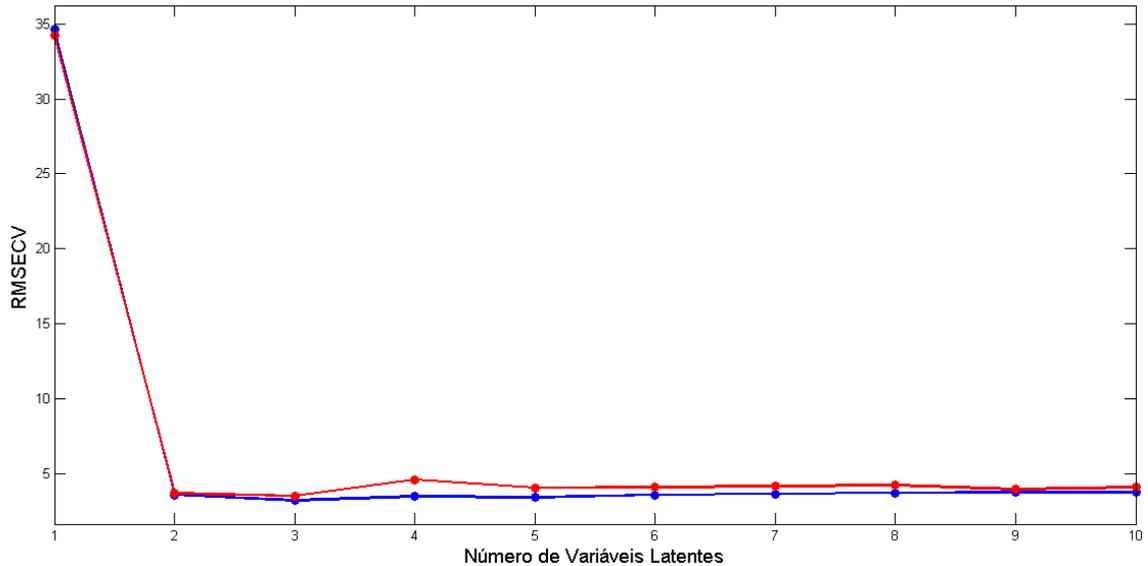


Figura 26: Gráfico do valor de RMSECV x LV's, para a mistura binária dos polimorfos na presença dos excipientes: Em azul forma AM e vermelho forma E.

Os modelos de calibração PLS foram elaborados pelo utilizando o arranjo de pré-tratamentos que fornece os melhores parâmetros de qualidade. Com estas condições ideais foram elaborados modelos de calibração iPLS com intervalos de 20 pontos. A figura 27 traz os intervalos 181-200, 221-240, 321-360, 401-440, 601-640, 721-740 e 981-1000 nm, que fornecem a melhor condição de previsão para o modelo. Vale destacar que a maioria das variáveis foram omitidas devido a elevada quantidade de informações redundantes (NØRGAARD et al., 2000).

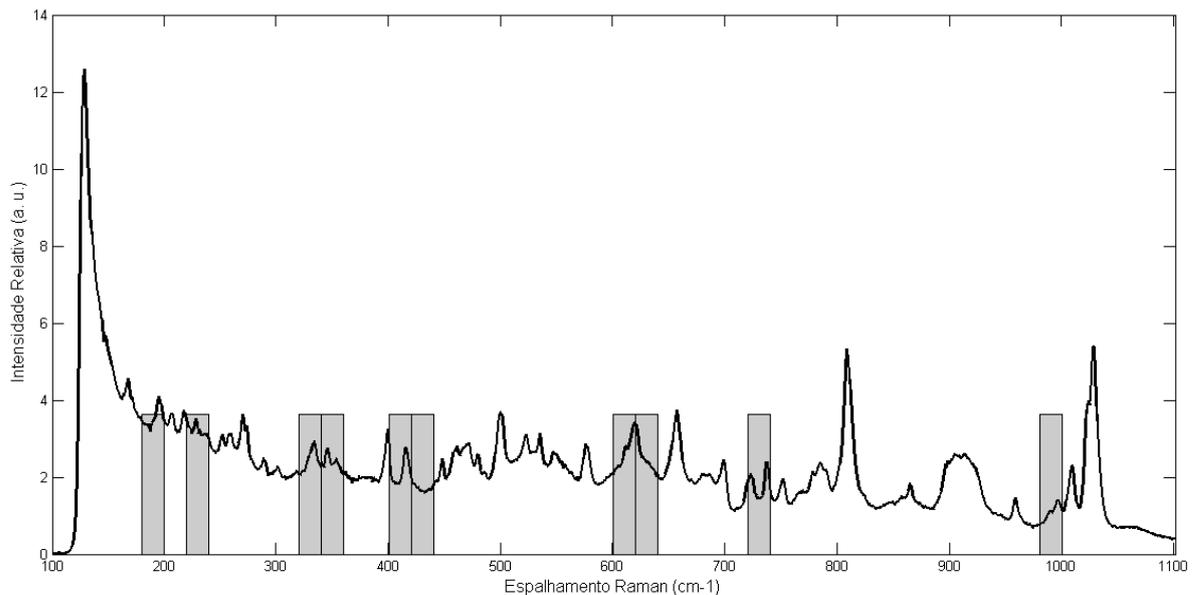


Figura 27: Intervalos seleccionados no modelo de calibração iPLS para a mistura binária de polimorfos junto aos excipientes.

A tabela 6 traz os parâmetros que indicam a qualidade do modelo de calibração calculado via iPLS para os intervalos acima. A forma E apresenta erro de predição 6,52 % enquanto o amorfo apresenta 6,13 %, enquanto o erro de validação cruzada para ambas formas é de 3,57 % para o AM e 3,68 % para forma E. É visível que os valores de RMSECV e RMSEP são muito próximos para cada forma polimórfica, indicativo que o modelo tem boa capacidade de prever novas amostras (FERREIRA, 2015; GELADI; KOWALSKI, 1986; SURRIBAS et al., 2006).

Tabela 6: Parâmetros do modelo de calibração iPLS para mistura binária de polimorfos junto aos excipientes.

Parâmetros	Polimorfo	
	Amorfo	Forma E
RMSEC (% m)	2,48	3,17
RMSECV (% m)	3,57	3,68
RMSEP (% m)	6,13	6,52
R ² (VC)	0,99	0,99
R ² (P)	0,95	0,95

iPLS: Corresponde aos intervalos 181-200, 221-240, 321-360, 401-440, 601-640, 721-740 e 981-1000 nm, para 2 LV's e intervalo de 20 pontos.

Os valores de ajuste da curva, de 0,95, para as duas formas polimórficas são reflexo do baixo resíduo do modelo, logo os valores preditos pelo modelo são muito próximos dos valores reais (PEREIRA FILHO, 2015). A correlação entre os valores reais e preditos podem ser vistos na figura 28, ressaltando a capacidade do modelo prever novas amostras.

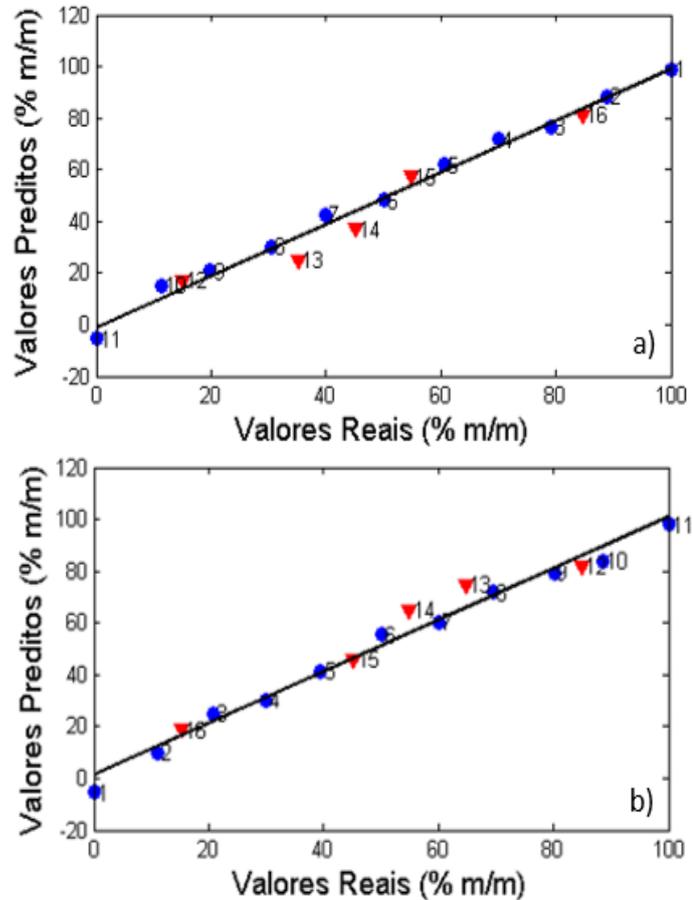


Figura 28: Curvas de correlação entre os valores reais pelos valores preditos para a mistura de polimorfos junto aos excipientes, onde os círculos são pontos de calibração e triângulos pontos de validação: (a) Amorfo e (b) forma E.

O modelo de calibração consegue prever a massa da forma AM da valsartana no comprimido simulado (mistura binária das duas formas da VAL junto aos excipientes), com erro de aproximadamente 2,45 mg em relação a massa total do princípio ativo, enquanto para forma E o erro seria de aproximadamente 2,61 mg em relação a massa total da API.

5. Conclusão

Os resultados dos modelos de calibração para a mistura binária da valsartana (amorfa e forma E) apresentaram elevada capacidade preditiva, evidenciando sua capacidade de aplicação prática. O modelo de calibração apresentou erro na capacidade de previsão para a forma AM de 1,35 mg do princípio ativo numa massa total de 40 mg, enquanto o erro para forma E foi de 1,56 mg. A mesma eficiência preditiva foi encontrada para o modelo de calibração da mistura binária dos polimorfos de valsartana na presença de excipientes, sendo observado um erro na capacidade de previsão de apenas 2,45 mg para forma AM e 2,61 mg para forma E, considerando a massa de 40 mg do API.

A capacidade preditiva do modelo para mistura binária dos polimorfos na presença de excipientes foi muito boa, mesmo que erro tenha aumentado em aproximadamente 55 % em comparação ao erro do modelo feito para o API na ausência dos excipientes. Mesmo com a inserção dos três excipientes o erro de predição ficou bem inferior a massa total do API. Essa variação quando comparada a massa total de um comprimido não ultrapassaria aproximadamente 0,85 %.

A utilização de ferramentas quimiométricas de calibração multivariada do tipo iPLS associado a espectroscopia Raman mostrou-se eficiente na qualificação e quantificação de misturas binárias de polimorfos de valsartana, tanto na presença quanto na ausência de excipientes. Sendo assim, é possível sua utilização em órgãos regulamentadores e indústrias farmacêuticas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. J.; KCR, J.; KINKEL, A. W.; SAMYN, J.C. Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 7, p. 847–853, 1 jul. 1967.

ALCANTARA, P. Espectroscopia Molecular. **Química Nova na Escola - Cadernos Temáticos**, v. Ed. Esp., n. 04, p. 24–30, 2001.

ALENCAR, J.; BEDOR, D. Caracterização e Propriedades Térmicas do Ritonavir para Qualificação de Fornecedores. **acta farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 170–176, 2006.

ANVISA. Medicamentos Genéricos Inéditos registrados por ano. 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/352400/3.1+N%C3%BAmero+de+Medicamentos+Gen%C3%A9ricos+In%C3%A9ditos+registrados/0713fdd3-86e9-4f3a-90c6-127f243c19bb>>. Acesso em: 12 jul. 2019.

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

BORIO, V. G. C.; MACHADO, N. C. S. S.; CECÍLIO, R. A. F.; NICOLAU, R. A.; SILVEIRA, J. L. Espectroscopia raman aplicada às ciências farmacêuticas: revisão de literatura. In: Encontro Latino americano de pós-graduação, São José dos campos, p. 1684–1687, 2007.

BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. [s.l.] Jhon Wiley & Sons, Ltd, 2007.

BRITAIN, H. G. **Solid-state analysis**. 1. ed. Milford, New Jersey: Academic Press, 2001. v. 3

BRITAIN, H. G. Polymorphism and Solvatomorphism 2008. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 3648–3664, 2010.

CALLISTER, J. W. D. **Fundamentals of Materials Science and Engineering**. 5° ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

CAPPELLO, B., DI MAIO, C., IERVOLINO, M., MIRO, A. Improvement of Solubility

and Stability of Valsartan by Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 54, p. 289-294, 2006.

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.

CHIENG, N.; RADES, T.; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 618–644, 2011.

CRAIG, D. Q. M.; READING, M. **THERMAL ANALYSIS OF PHARMACEUTICALS**. Taylor & F ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.

D'IPPOLITO, V.; ANDREOZZI, G. B.; BERSANI, D.; LOTTICI, P. P. Raman fingerprint of chromate, aluminate and ferrite spinels. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 12, p. 1255–1264, 2015.

DE BEER, T. R. M.; BAEYENS, Y.; HEYDEN, Y. V.; REMON, J. P.; VERVAET, F.; VERPOORT, F. Influence of particle size on the quantitative determination of salicylic acid in a pharmaceutical ointment using FT-Raman spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 3–4, p. 229–235, 1 mar. 2007.

PENIDO, C. A. F. O.; PACHECO, M. T. T.; NOVOTNY, E. H.; LEDNEV, I. SILVEIRA Jr, L. Quantification of cocaine in ternary mixtures using partial least squares regression applied to Raman and Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 48, n. 12, p. 1732–1743, 2017.

FARIA, D. L. A. DE; AFONSO, M. C.; EDWARDS, H. G. M. E. 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. D. 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. pg. 115, Tese de doutorado, Universidade Federal De São Carlos, São Carlos - SP, 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.

FARKAS, A.; VAJNA, B.; SÓTI, P. L.; NAGGY, Z. K.; PATAKI, H.; GUCHT, F. V.; MAROSI, G. Comparison of multivariate linear regression methods in micro-Raman spectrometric quantitative characterization. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 6, p. 566–576, 2015.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira, volume 1**. 5 ed. Brasília, Fundação Oswaldo Cruz, 2010. 523 p.

FDA. Guidance for Industry ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**, July, p. 13, 2007.

FERREIRA, M. M. C. ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. QUIMIOMETRIA I: CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA, UM TUTORIAL. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999.

FERREIRA, M. M. C. **QUIMIOMETRIA Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1. ed. Campinas-SP: UNICAMP, 2015.

FLESCHE, G.; MÜLLER, P.; LLOYD, P. Absolute bioavailability and pharmacokinetics of valsartan, an angiotensin II receptor antagonist, in man. **P. EJ Clin Pharmacol**, v. 52, p. 115–120, 1997.

FONSECA FILHO, H. D. DA; CARVALHO, G. A. L. Avanços em caracterização de amostras sólidas cristalinas através de Difractometria de Raios-X. **Periódicos Unifap**, v. 3, n. 1, p. 31–45, 2013.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R. Partial least-squares regression: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 185, p. 1–17, 1 jan. 1986.

GEMPERLINE, P. **Practical Guide to Chemometrics**. 2. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.

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, 4 nov. 2008.

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

GUINET, Y.; PACCOU, L.; DANÈDE, F.; DEROLLEZ, P. Structural description of the marketed form of valsartan : A crystalline mesophase characterized by nanocrystals and conformational disorder. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 209–216, 2017.

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.

HÉDOUX, A.; GUINET, Y.; DESCAMPS, M. The contribution of Raman spectroscopy to the analysis of phase transformations in pharmaceutical compounds. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1–2, p. 17–31, 2011.

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, 18 jan. 2013.

HWANG, M. S.; CHO, S.; CHUNG, H.; WOO, Y. A. 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.

IRONS, B. K.; KUMAR, A. Valsartan-induced angioedema. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 37, n. 7–8, p. 1024–1027, 2003.

JOIRIS, E.; MARTINO, P. D.; BERNERON, C.; GUYOT-HERMANN, A. M.; GUYOT, J. C. Compression Behavior of Orthorhombic Paracetamol. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1122–1130, 1998.

JÚLIO, T. A.; ZÂMARA, I. F.; GARCIA, J. S.; TREVISAN, M. G.; Compatibility and stability of valsartan in a solid pharmaceutical formulation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 645–651, 2013.

KALANTRI, P. P.; SOMANI, R. R.; MAKHIJA, D. T. Raman spectroscopy : A potential technique in analysis of pharmaceuticals. **Der Chemica Sinica**, v. 1, n. 1, p. 1–12,

2010.

KUMAR, A.; NIMBALKAR, M. M.; BHAYANI, P. J.; JHA, M. S.; DOSHI, V. C. **United States Patents US 2008/0261959 A1**, 2008.

LEARDI, R.; NØRGAARD, L. Sequential application of backward interval partial least squares and genetic algorithms for the selection of relevant spectral regions. **Journal of Chemometrics**, v. 18, n. 11, p. 486–497, 2004.

LI, F.; ZHANG, H.; JIANG, L.; ZHANG, W.; NIE, J.; FENG, Y.; YANG, M.; LIU, M. Dynamic NMR study and theoretical calculations on the conformational exchange of valsartan and related compounds. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 45, p. 929–936, 2007.

LIMBERGER, A. L. M. B. **Estudo Do Polimorfismo Em Diferentes Fármacos De Interesse Para a Indústria Farmacêutica: Cimetidina , Mebendazol E Paracetamol**.pg. 103, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

LUO, Z.; CHEN, X.; WANG, G.; DU, Z.; MA, X.; WANG, H.; YU, G.; LIU, A. LI, M.; PENG, W.; LIU, Y. Development of a validated HPLC method for the quantitative determination of trelagliptin succinate and its related substances in pharmaceutical dosage forms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 458–464, 1 jan. 2018.

MAGDAS, D. A.; GUYON, F.; FEHER, I.; PINZARU, S. C. Wine discrimination based on chemometric analysis of untargeted markers using FT-Raman spectroscopy. **Food Control**, v. 85, p. 385–391, 2018.

MARTENS, H.; NAES, T. Multivariate Calibration. In: **Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry**. 1984: Springer, Dordrecht, 1984. p. 147–156.

MEHMOOD, T. LILAND, K. H.; SNIPEN, L.; SÆBØ, S. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 118, p. 62–69, 15 ago. 2012.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. [s.l: s.n.].

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

NEDELJKOVIC, A.; TOMASEVIC, I.; MIOCINOVIC, J.; PUDJA, P. Feasibility of discrimination of dairy creams and cream-like analogues using Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, v. 232, p. 487–492, 2017.

NETO, B. DE B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856–865, set. 2002.

NØRGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J. P.; MUNCK, L.; ENGELSEN, S. B. Interval Partial Least-Squares Regression (*i* PLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 413–419, 31 mar. 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. UNCERTAINTY ESTIMATION AND FIGURES OF MERIT FOR MULTIVARIATE CALIBRATION (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem**, v. 78, n. 3, p. 633–661, 2006.

PANKIN, D.; KOLESNIKOV, I.; VASILEVA, A.; PILIP, A.; ZIGEL, V.; MANSHINA, A. Raman fingerprints for unambiguous identification of organotin compounds. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 204, p. 158–163, 2018.

PEREIRA FILHO, E. R. **PLANEJAMENTO FATORIAL EM QUÍMICA: Maximizando a obtenção de resultados**. 1. ed. São Carlos: Editpra da Universidade de São Carlos (EdUFSCar), 2015.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491–502, 2007.

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.

RAPORPOT, I. D. **Apesar da crise, indústria farmacêutica aumentou em 20% as contratações e continua crescendo.** Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/carreira/apesar-da-crise-industria-farmaceutica-aumentou-em-20-as-contratacoes-e-continua-crescendo/>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

RAW, A. S.; FURNESS, M. S.; GILL, D. S.; ADAMS, R. C.; HOLCOMBE, F. O. J.; 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.

RODRIGUES, A. D. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, 2012.

ROGGO, Y.; DEGARDIN, K.; MARGOT, P. Identification of pharmaceutical tablets by Raman spectroscopy and chemometrics. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 988–995, 15 maio 2010.

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

RUKHAMAN, I. et al. **United States Patent US 7,105,557 B2**, 2006.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2. ed. São Paulo - SP: Editora UNESP, 2008.

SIDDIQUI, N.; HUSAIN, A.; CHAUDHRY, L.; ALAM, M. S.; MITRA, M.; BHASIN, P. S. Pharmacological and pharmaceutical profile of gliclazide: A review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 4, p. 12–19, 2011.

SIEPKA, D.; UZU, G.; STEFANIAK, E. A.; SOBANSKA, S. Combining Raman microspectrometry and chemometrics for determining quantitative molecular composition and mixing state of atmospheric aerosol particles. **Microchemical Journal**, v. 137, p. 119–130, 2018.

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**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SKOTNICKI, M.; GAWEL, A.; CEBE, P.; PYDA, M. Thermal behavior and phase identification of Valsartan by standard and temperature-modulated differential scanning calorimetry. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 10, p. 1508–1514, 2013.

SKOTNICKI, M.; APPERLEY, D. C.; AGUILAR, J. A.; MILANOWSKI, B.; PYDA, M.; HODGKINSON, P. Characterization of Two Distinct Amorphous Forms of Valsartan by Solid-State NMR. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 211–222, 2016.

SOUZA, A. M.; BREITKREITZ, M. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROHWEDDER, J. J. J.; 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.

SURRIBAS, A.; AMIGO, J. M.; COELLO, J.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; MASPOCH, S. Parallel factors analysis combined with PLS regression applied to the on-line monitoring of *Pichia pastoris* cultures. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1281–1288, 2006.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validation of chromatographic methods. **Pharmaceutical Technology**, v. 22, n. 3, p. 104–119, 1998.

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.

TOBIAS, R. D. An introduction to partial least squares regression. **SAS Conference Proceedings: SAS Users Group International 20 (SUGI 20)**, p. 2–5, 1995.

TRAN, T. T. D.; TRAN, P. H. L.; PARK, J. B.; LEE, B. J. Effects of solvents and crystallization conditions on the polymorphic behaviors and dissolution rates of

valsartan. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 7, p. 1223–1230, 2012.

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.; BRITAIN, H. G.; GRANT, D. J. W. Crystalline solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 3–26, 16 maio 2001.

WANG, J. R.; WANG, X.; LU, L.; MEI, X. Highly Crystalline Forms of Valsartan with Superior Physicochemical Stability. **CRYSTAL GROWTH & DESIGN**, v. 13, p. 3261–3269, 2013.

WISE, B. M.; GALLAGHER, N. B.; BRO, R.; SHAVER, J. M.; WINDIG, W.; KOCH, R. S. **PLS_Toolbox 4.0 for use with MATLAB**. EIGENVECTOR RESEARCH INCORPORATED, 2006.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; LEE, V. H. L.; HUSSAIN, A. S. Biopharmaceutics classification system: The scientific basis for biowaiver extensions. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 7, p. 921–925, 2002.

ZHANG, G. G. Z.; LAW, D.; SCHMITT, E. A.; QIU, Y. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. v. 56, p. 371–390, 2004.

ZHANG, H.; SUN, L.; ZOU, L.; HUI, W.; LIU, L.; ZOU, Q.; OUYANG, P. Identification, characterization and HPLC quantification of process-related impurities in Trelagliptin succinate bulk drug: Six identified as new compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 18–27, 5 set. 2016.