

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
LAQQA – LABORATÓRIO DE QUIMIOMETRIA EM QUÍMICA ANALÍTICA



Estudo de polimorfismo em medicamentos utilizando técnicas espectroscópicas
aliadas a métodos quimiométricos

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: WERICKSON FORTUNATO DE CARVALHO ROCHA

ORIENTADOR: Prof. Dr. RONEI JESUS POPPI

CAMPINAS – SP

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

R582e Rocha, Werickson Fortunato de Carvalho.
Estudo de polimorfismo em medicamentos utilizando técnicas espectroscópicas aliadas a métodos quimiométricos / Werickson Fortunato de Carvalho Rocha. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Polimorfismo. 2. Quimiometria. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Study of polymorphism in drugs using spectroscopic techniques coupled with chemometric methods

Palavras-chaves em inglês: Polymorphism, Chemometrics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Ronei Jesus Poppi (orientador), Marcelo Martins de Sena (IQ-UFMG), Marcos Flores Ferrão (IQ-UFRGS), Maria Izabel Maretti Silveira Bueno (IQ-UNICAMP), Fábio Augusto (IQ-UNICAMP), Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 30/09/2010

Dedico este trabalho aos meus
queridos pais, Adonias Maciel Rocha e
Sônia Maria de Carvalho Rocha.
Obrigado pelo amor, pelo apoio e
pela torcida em toda
minha trajetória que está só começando.

Prólogo

Não ousou escrever que as palavras que se seguem são totalmente minhas ou então que as ideias sejam puros frutos dos meus pensamentos, senão são apenas uma compilação de tudo que tenho visto, ouvido, sentido e vivido nestes últimos vinte e nove anos. Pois, como já escreveu Marcel , em sua tese, “*Não escrevo nada que já não tenha lido antes em algum lugar*”, ou algo assim.

E, se ao invés de ter dito, **Deus** tivesse escrito...

⁰No princípio o tudo era nada, e o nada era tudo o que existia. Então, Deus escreveu:

$$u_m = H_0 \cdot r$$

...e, de um único ponto do nada, surgiu o novo tudo, com suas dimensões espaciais e temporais. E Ele viu que isso era bom.

¹O novo tudo era ainda muito parecido com o nada do antigo tudo. Então, Deus escreveu:

$$\begin{aligned}\vec{\nabla} \cdot \vec{E} &= \frac{\rho}{\epsilon_0} & \vec{\nabla} \cdot \vec{B} &= 0 \\ \vec{\nabla} \times \vec{E} &= -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} & \vec{\nabla} \times \vec{B} &= \mu_0 \vec{J} + \epsilon_0 \mu_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}\end{aligned}$$

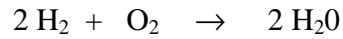
...e fez-se a luz. E Ele viu que isso também era bom: primeiro dia.

²A luz era maravilhosa, mas não havia o que ser iluminado. Então, Deus escreveu:

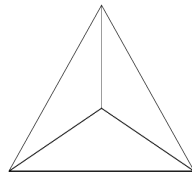
$$\begin{aligned}\hat{H}\psi(x) &= E\psi(x) \\ F &= \frac{mMG}{d^2}\end{aligned}$$

...e se formaram as poeiras cósmicas que se uniram gerando corpos celestes, inclusive um denominado por Ele de “Terra”. E Ele viu que isso era bom: segundo dia.

³Mas àquele novo corpo não caberia uma eternidade vazia e sem propósitos. Então, Deus escreveu:

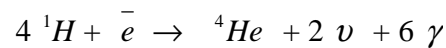


...e fez-se a água. E Ele escreveu ainda:



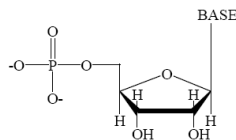
...e, aos aglomerados destes, chamou de continentes. E Ele viu que isso era bom: terceiro dia.

⁴Mas as Suas criações ainda caminhavam isoladas e não se encontravam em um ponto comum. Então, Deus escreveu:



...e fizeram-se as estrelas, iluminando e aquecendo seus arredores por todo o Universo, inclusive o corpo chamado Terra. E Ele viu que isso era bom: quarto dia.

⁵Mas tudo era ainda tão triste. Então, Deus escreveu:



...e fez-se a vida e toda a sua diversidade. E Ele viu que isso era bom: quinto dia.

⁶Mas Deus sentia que sua obra ainda estava incompleta. Então, Deus moldou uma criação especial e, ao invés de escrever ou simplesmente dizer, Ele deu seu coração e amor a estes seres...

...que foram diferenciados entre homens e mulheres. E Ele viu que isso era bom: sexto dia.

⁷Ao sétimo dia, Deus viu que tudo que havia feito era bom e estava exausto. Então, Ele descansou e se esqueceu (...ou não) de contar aos homens o que era e como funcionava o novo tudo...

...e fez-se a ciência.

Para ler mais...

0 A Lei de Hubble descreve os movimentos galácticos e é a base da Teoria de Expansão do Universo. Vide: Hawking, S.; “*O Universo numa Casca de Noz*”, 2ª ed.; Mandarin, São Paulo, 2002, pp. 76-77.

1 As Equações de Maxwell são extensões das Leis de Gauss, da indução de Faraday e de Ampère e descrevem o comportamento da luz, bem como sua interação com a matéria. Vide: Halliday, D.; Resnick, R.; Walter, J.; “*Fundamentos de Física - v.3: Eletro-magnetismo*”, 4ª ed.; LTC Editora, Rio de Janeiro, 1996, pp. 309-316.

2 A Equação de Schrödinger descreve as evoluções temporais de sistemas físicos definidos pela Mecânica Quântica, que caracterizam a matéria. Vide: McQuarrie, D.A.; Simon, J.D.; “*Physical Chemistry: A molecular approach*”, University Science Books, Sausalito, Estados Unidos, 1997, pp.73-75.

A Lei da Gravitação Universal de Newton define a força de atração entre dois corpos devido às suas massas. Vide: Halliday, D.; Resnick, R.; Walter, J.; “*Fundamentos de Física - v.1: Mecânica*”, 4ª ed.; LTC Editora, Rio de Janeiro, 1996, pp. 86-87.

3 A água foi primeiramente formada pela reação entre os gases hidrogênio e oxigênio, iniciada por raios elétricos. Vide: Atkins, P.; Jones, L.; “*Princípios de Química: Questionando a vida moderna e o meio ambiente*”, 3ª ed., Bookman Editora, São Paulo, 2006. E mais: Teixeira, W.; de Toledo, C.M.; Fairchild, T.R.; Taioli, F. (organizadores); “*Decifrando a Terra*”, Oficina de Textos, São Paulo, 2000.

A crosta terrestre é composta essencialmente pelos elementos Si e O que formam, dentre outras, as estruturas dos tectossilicatos. Vide: Shriver, D.F.; Atkins, P.W.; “*Química Inorgânica*”, 3ª ed., Bookman Editora, São Paulo, 2003, pp. 395-400. E mais: Teixeira, W.; de Toledo, C.M.; Fairchild, T.R.; Taioli, F. (organizadores); “*Decifrando a Terra*”, Oficina de Textos, São Paulo, 2000.

4 A energia das estrelas provém da fusão nuclear de quatro átomos de H, formando um átomo de He e partículas subatômicas. Vide: Halliday, D.; Resnick, R.; Walter, J.; “*Fundamentos de Física - v.4: Ótica e física moderna*”, 4ª ed.; LTC Editora, Rio de Janeiro, 1996, pp. 285-289.

5 Os ribonucleotídeos se unem formando os ácidos ribonucléicos (RNA), um dos componentes essenciais à auto-replicagem de moléculas, propriedade na qual se baseia a vida. Vide: Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W.; “*Fundamentos de Bioquímica*”, Artmed Editora, São Paulo, 2002, p. 43-50.

6 Inúmeras formas do amor de Deus são narradas na Bíblia Sagrada.

7 O sétimo dia Ele nos deixou como incentivo ao conhecimento e à busca de Seus maiores mistérios.

A CRIAÇÃO

No princípio, Deus criou os céus e a terra. A terra estava informe e vazia; as trevas cobriam o abismo e o Espírito de Deus pairava sobre as águas.

Deus disse: “Faça-se a luz!” E a luz foi feita. Deus viu que a luz era boa, e separou a luz das trevas. Deus chamou à luz DIA, e às trevas NOITE. Sobreveio a tarde e depois a manhã: foi o primeiro dia.

Deus disse: “Faça-se um firmamento entre as águas, e separe ele umas das outras.” Deus fez o firmamento e separou as águas que estavam debaixo do firmamento daquelas que estavam por cima. E assim se fez, Deus chamou ao firmamento CÉUS. Sobreveio a tarde e depois a manhã: foi o segundo dia.

Deus disse: “Que as águas que estão debaixo dos céus se ajuntem num mesmo lugar, e apareça o elemento árido.” E assim se fez. Deus chamou o elemento árido TERRA, e ao ajuntamento das águas MAR. E Deus viu que isso era bom.

Deus disse: “Produza a terra plantas, ervas que contenham semente e árvores frutíferas que dêem fruto segundo a sua espécie e o fruto contenha a sua semente.” E assim foi feito. A terra produziu plantas, ervas que contêm semente segundo a sua espécie, e árvores que produzem contendo o fruto a sua semente. E Deus viu que isso era bom. Sobreveio a tarde e depois a manhã: foi o terceiro dia.

Deus disse: “Façam-se luzeiros no firmamento dos céus para separar o dia da noite; sirvam eles de sinais e marquem o tempo, os dias e os anos; e resplandeçam no firmamento dos céus para iluminar a terra.” Deus fez os dois grandes luzeiros: o maior para presidir ao dia, e o menor para presidir à noite; e fez também as estrelas. Deus colocou-os no firmamento dos céus para que iluminassem a terra, presidissem ao dia e à noite, e separassem a luz das trevas. E Deus viu que isso era bom. Sobreveio a tarde e depois a manhã: foi o quarto dia.

Deus disse: “Pululem as águas de uma multidão de seres vivos, e voem aves sobre a terra, debaixo do firmamento dos céus.” Deus criou os monstros marinhos e toda a multidão de seres vivos que enchem as águas, segundo a sua espécie, e todas as aves segundo a sua espécie. E Deus viu que isso era bom. E Deus os abençoou. “Frutificai, disse ele, e multiplicai-vos, e enchei as águas do mar, e que as aves se multipliquem sobre a terra.” Sobreveio a tarde e depois a manhã: foi o quinto dia.

Deus disse: “Produza a terra seres vivos segundo a sua espécie: animais domésticos, répteis e animais selvagens, segundo a sua espécie.” E assim se fez. Deus fez os animais selvagens segundo a sua espécie, os animais domésticos igualmente, e da mesma forma todos os animais, que se arrastam sobre a terra. E Deus viu que isso era bom.

Então Deus disse: “Façamos o homem à nossa imagem e semelhança. Que ele reine sobre os peixes do mar, sobre as aves dos céus, sobre os animais domésticos e sobre toda a terra, e sobre todos os répteis que se arrastam sobre a terra.” Deus criou o homem à sua imagem; criou-o à imagem de Deus, criou o homem e a mulher. Deus os abençoou: “Frutificai, disse ele, e multiplicai-vos, enchei a terra e submetei-a. Dominai sobre os peixes do mar, sobre as aves dos céus e sobre todos os animais que se arrastam sobre a terra.” Deus disse: “Eis que eu vos dou toda a erva que dá semente sobre a terra, e todas as árvores frutíferas que contêm em si mesmas as sua semente, para que vos sirvam de alimento. E a todos os animais da terra, a todas as aves dos céus, a tudo que se arrasta sobre a terra, e em que haja sopro de vida, eu dou toda a erva verde por alimento.”

E assim se fez. Deus contemplou toda a sua obra, e viu que tudo era muito bom. Sobreveio a tarde e depois a manhã. foi o sexto dia.

Assim foram acabados os céus, a terra e todo o seu exército. Tendo Deus terminado no sétimo dia a obra que tinha feito, descansou do seu trabalho. Ele abençoou o sétimo dia e o consagrou, porque nesse dia repousara de toda a obra da Criação.

Tal é a história da criação dos céus e da terra.

Gn 1, 1-31; 2, 1-4.

Frases

"Na maioria das vezes, um pepino é somente um pepino."

(Sigmund Freud)

"Viva cada dia de sua vida como se fosse o último, pois um dia desses vai ser mesmo."

(Alfred E. Newman)

"Não há nada mais vergonhoso do que alguém ser honrado pela fama dos antepassados e não pelo merecimento próprio."

(Platão)

"Um amigo é alguém que gosta de você, apesar do seu sucesso."

(Murilo Felisberto)

"Há duas coisas infinitas: o Universo e a tolice dos homens."

(Albert Einstein)

"Os vivos são e serão sempre, cada vez mais, governados pelos mais vivos."

(Barão de Itararé)

"Aquilo que você mais sabe ensinar, é o que você mais precisa aprender..."

(Richard Bach)

"O maior enganado é aquele que engana a si próprio."

(Ralph Waldo Emerson)

"Um gênio é uma pessoa de talento que faz toda a lição de casa."

(Thomas A. Edison)

"Muita luz é como muita sombra: não deixa ver."

(Carlos Catañeda)

"Engraçado, costumam dizer que tenho sorte. Só eu sei que quanto mais eu me preparo mais sorte eu tenho."

(Anthony Robbins)

"O sentido da vida consiste em que não tem nenhum sentido dizer que a vida não tem sentido."

(Niels Bohr)

"É preciso viver, não apenas existir."

(Plutarco)

"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las."

(Aristóteles)

"No caráter, na conduta, no estilo, em todas as coisas, a simplicidade é a suprema virtude."

(Henry Wadsworth)

"Se você rouba idéias de um autor, é plágio. Se você rouba de muitos autores, é pesquisa."

(Wilson Mizner)

"As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam."

(Bernard Shaw)

"A verdade é a melhor camuflagem. Ninguém acredita nela."

(Max Frisch)

"O homem esquece mais facilmente a morte do pai do que a perda do patrimônio."

(Nicolau Maquiavel)

"Errar é humano, mas quando a borracha se gasta mais do que o lápis, você está positivamente exagerando."

(J. Jenkis)

"É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe."

(Epiteto)

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário."

(Albert Einstein)

"Posso não concordar com nenhuma das palavras que você disser, mas defenderei até a morte o direito de você dizê-las."

(Voltaire)

"O mundo é um lugar perigoso de se viver, não por causa daqueles que fazem o mal, mas sim por causa daqueles que observam e deixam o mal acontecer."

(Albert Einstein)

"Se matamos uma pessoa somos assassinos. Se matamos milhões de homens, celebram-nos como heróis."

(Charles Chaplin)

"A vantagem de ter péssima memória é divertir-se muitas vezes com as mesmas coisas boas como se fosse a primeira vez."

(Friedrich Nietzsche)

"Na vingança e no amor a mulher é mais bárbara do que o homem."

(Friedrich Nietzsche)

"O verdadeiro homem quer duas coisas: perigo e jogo. Por isso quer a mulher: o jogo mais perigoso."

(Friedrich Nietzsche)

"O amor é o estado no qual os homens têm mais probabilidades de ver as coisas tal como elas não são."

(Friedrich Nietzsche)

Para finalizar....se quer algo, dependa o mínimo possível do outro, pois esse pode não poder te ajudar no momento em que você mais precisar....

(Werickson Fortunato de Carvalho Rocha)

Agradecimentos

Ao professor Dr. Ronei Jesus Poppi pela oportunidade de realização desse trabalho, pela orientação, confiança, paciência, convivência e amizade.

Aos colegas do grupo LAQQA, IQ-Unicamp e da Moradia estudantil da Unicamp: Bruno Bernado Galindo Lopes, José Cicero Calheiros, André Luis Rosa, André Murari, Deleon, Adriana, Renato Andrade, Ebénezer, Marcelo Cordeiro, Diorginis, Paulo Henrique Março, Fidelis, Luizão, Wanderson, Bonniek, Clécio, Guilherme Sabin, Luiz e Mônica,

Aos colegas do colégio Ágape: Marquinho, Marcel, Hugo, Marcelo, Guilherme, Samantha, Farley, Rodrigo, Rita e Lucy.

A minha família, meus pais Adonias Maciel Rocha e Sônia Maria de Carvalho Rocha, meu irmão Adson Batista de carvalho Rocha.

Ao professor Alejandro Olivieri pela recepção e ensinamentos de quimiometria durante os quase dois meses que fiquei na Argentina.

À minha namorada Michele pela convivência, amor e companheirismo durante os quase 7 anos de convivência: obrigado por tudo.

À minha tia Célia pela estadia durante um mês em sua casa. Obrigado pela hospedagem, amizade e companheirismo.

À toda minha família por estar sempre presente em todos os momentos e por me colocar no caminho certo.

Ao Cnpq pelo financiamento desse projeto.

À Unicamp e ao Estado de São Paulo por fornecer toda estrutura física, tecnológica, e humana para realização deste trabalho.

Aos funcionários, colegas e amigos do Instituto de Química da Unicamp e a todas as pessoas que, de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho e para esta nova etapa de minha vida concluída, os meus sinceros agradecimentos.

CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome: Werickson Fortunato de Carvalho Rocha

Naturalidade: Pompéu-MG

e-mail: wfrocha@inmetro.gov.br

Formação

Graduação: Química-Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Especialização: Análise de risco ambiental-Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Petróleo brasileiro (Petrobras) e Agência nacional do petróleo (ANP)

Mestrado: Química Analítica- Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Formação complementar

2010 – 2010 Validação de Métodos de Ensaio. (Carga horária: 12h).

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial-RJ, INMETRO, Brasil.

2010 – 2010 Introdução à Metrologia Química. (Carga horária: 30h).

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial-RJ, INMETRO, Brasil

2010 – 2010 Treinamento operacional do cromatógrafo líquido.

(Carga horária: 8h).

2010 – 2010 Aplicações da espectroscopia TeraHertz. (Carga horária: 15h).

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.

2010 – 2010 Material de referência certificado. (Carga horária: 16h).

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial-RJ, INMETRO, Brasil.

2010 – 2010 Cálculo de incerteza de medições. (Carga horária: 24h).

Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial-RJ,
INMETRO, Brasil.

2009 – 2009 RMN no planejamento e avaliação de fármacos. (Carga horária:
6h). Sociedade Brasileira de Química.

2009 – 2009 Espectroscopia vibracional "Prof.Oswaldo Sala". (Carga horária:
18h). Universidade de São Paulo.

2006 – 2006 *Uncertainty estimation in multivariate and multiway*. (Carga horária:
10h). 10th *International Conference on Chemometrics in Analytical*.

2006 – 2006 *Basic Chemometrics*. (Carga horária: 10h).

10th *International Conference on Chemometrics in Analytical*.

Experiência profissional

Pesquisador Tecnologista- Área: Quimiometria

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial-RJ,
INMETRO, Brasil.

Diretoria de Metrologia Científica e Industrial.

Av. N. S. das Graças 50 Xerém

URL da homepage: www.inmetro.gov.br

Prêmios

a) CAMO Best Poster Award at the Congres Chimimetrie 2009, CAMO Software, CCCTA-Centre de Compétence en Chimie et Toxicologie Analytiques.

b) Euroanalysis XV - Grant, Comissão organizadora do Euroanalysis-Innbruck-Áustria.

c) 12th Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry - Grant, Comissão organizadora do CAC.

Artigos

1. Oliveira, I.K.; Rocha, W.F.C.; Poppi, R.J.; Application of near infrared spectroscopy and multivariate control charts for B2 (Biodiesel Diesel). *Analytica Chimica Acta*.
2. Rocha, W.F.C.; Ferrão, M.F.; Poppi, R.J.; Modelos de regressão empregando iPLS e DRIFTS para determinação de Carbamazepina em medicamento. *Tecnológica*.
3. Rocha, W.F.C.; Poppi, R.J.; Multivariate control charts based on net analyte signal (NAS) for characterization of the polymorphic composition of Piroxicam using near infrared spectroscopy. *Microchemical Journal*.
4. Rocha, W.F.C.; Sabin, G.P.; Março, P.H.; Poppi, R.J.; Quantitative analysis of Piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*.
5. Rocha, W.F.C.; Rosa, A.L.; Martins, J.A; Poppi, R.J.; Determination and validation of nimesulide in pharmaceutical formulation by near infrared spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.
6. Rocha, W.F.C.; Rosa, A.L.; Martins, J.A; Poppi, R.J.; Multivariate control charts based on net analyte signal and near infrared spectroscopy for quality monitoring of nimesulide in pharmaceutical formulations. *Journal of molecular structure*.

Resumo

Autor: Werickson Fortunato de Carvalho Rocha

Orientador: Ronei Jesus Poppi

O estudo do fenômeno de polimorfismo em fármacos é muito importante na indústria farmacêutica. Dessa forma, tem sido extensivamente investigado, devido ao seu impacto sobre a qualidade e eficácia das formulações farmacêuticas.

Neste trabalho, três novas metodologias para o controle de qualidade de polimorfismo em fármacos foram propostas. O desenvolvimento, desses métodos, visa tomar as análises de controle de qualidade na indústria farmacêutica mais prática, rápida e sem a necessidade de consumo de reagentes com alto grau de toxicidade.

Na primeira metodologia foi proposta a caracterização da composição polimórfica do fármaco Piroxicam em formulações farmacêuticas utilizando cartas de controle multivariadas baseada no cálculo do sinal analítico líquido e da espectroscopia na região do infravermelho próximo. Nesse caso, foi possível a identificação da presença das diferentes formas polimórficas nas formulações farmacêuticas.

Em uma segunda metodologia, no qual também foi utilizado o fármaco Piroxicam, procurou-se realizar a quantificação e a distribuição de duas formas polimórficas através da espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo aliado ao método quimiométrico PLS. Os resultados mostraram que para ambos os modelos desenvolvidos os valores de RMSEP (%(m/m)) estão abaixo de 4%. Também foi possível obter a informação da distribuição espacial dos diferentes polimorfos nas formulações farmacêuticas.

Na última metodologia utilizou-se da espectroscopia Raman e das cartas de controle multivariadas para identificação no fármaco Carbamazepina de adulteração em excipiente, transformação de formas polimórficas por humidade e detecção de diferentes formas polimórficas. Foi possível identificar a presença e a transformação dos diferentes polimórficos presentes, além da sua correta identificação.

ABSTRACT

Author: Werickson Fortunato de Carvalho Rocha

Adviser: Ronei Jesus Poppi

The study of the polymorphism phenomenon in drugs is very important in the pharmaceutical industry. Thus, it has been extensively investigated because of its impact on the pharmaceutical formulations quality and effectiveness.

In this work, three new methods for quality control of polymorphism in drugs were proposed. The development of these methods, aims to make the analysis of quality control in the pharmaceutical industry more practical, faster and without the need of reagent consumptions with a high degree of toxicity.

In the first method it was proposed the characterization of Piroxican polymorphic composition in pharmaceutical formulations using multivariate control charts based on the calculation of the net analytical signal and the near infrared spectroscopy. In that case, it was possible to identify the presence of different polymorphic forms of the drug in the pharmaceutical formulations.

In a second method, in which it was also used Piroxicam, there was an attempt to carry out the quantification and distribution of two polymorphic forms through the near-infrared imaging spectroscopy technique and PLS chemometric method. The results showed that for both models developed the RMSEP values (% (m / m)) are below 4%. It was also possible to distinguish the information from local and global distributions of different polymorphics in pharmaceutical formulations.

In the last method it was used Raman spectroscopy and multivariate control charts to identify adulteration in excipients, polymorphic forms change by humidity and the detection of different polymorphic forms in the Carbamazepine drug.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xxi
LISTA DE TABELAS.....	xxix
LISTA DE FIGURAS.....	xxxix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância do estudo de polimorfismo na indústria farmacêutica.....	3
1.2 Tipos de polimorfismo em medicamentos.....	5
1.3 Estabilidades relativas dos polimorfos.....	7
1.4 Fármacos escolhidos	10
1.5 Objetivos.....	11
1.5.1 Geral.....	11
1.5.2 Específico.....	11
1.6 Referência bibliográfica do capítulo 1.....	12
2. FUNDAMENTOS E ASPECTOS QUANTITATIVOS DAS ANÁLISES ESPECTRÓSCOPICAS.....	13
2.1 Espectroscopia vibracional.....	15
2.1.1 Princípios básicos da espectroscopia no infravermelho.....	16
2.1.2 Princípios básicos da espectroscopia Raman	20
2.2 Espectroscopia de imagem.....	24
2.3 Referência bibliográfica do capítulo 2.....	26

3. MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	29
3.1 Calibração.....	31
3.2 Cartas de controle.....	33
3.2.1 Cartas de controle univariadas.....	34
3.2.2 Cartas de controle multivariadas.....	35
3.2.2.1 Sinal Analítico Líquido (NAS).....	35
3.2.2.2 Espaço do interferente.....	38
3.2.2.3 Vetor Interferente.....	39
3.2.2.4 Vetor Regressão NAS.....	39
3.2.2.5 Cálculo dos limites estatísticos para as cartas NAS, Interferente e Resíduos.....	40
3.2.2.6 Carta de Controle NAS.....	41
3.2.2.7 Carta de Controle do Interferente.....	42
3.2.2.8 Carta de Controle do Resíduo.....	44
3.2.2.9 Validação das Cartas de Controle (Modelo).....	46
3.2.2.9.1 Carta de controle NAS para novas amostras.....	46
3.2.2.9.2 Carta de controle do interferente para novas amostras.....	46
3.2.2.9.3 Carta de controle dos resíduos para novas amostras.....	48
3.3 Método Quimiométrico PLS para análise de imagens.....	48
3.3.1 Construção do modelo de calibração PLS.....	50
3.3.2 Validação do modelo PLS.....	51
3.3.3 Construção do mapa de distribuição de concentração.....	52
3.4 Referência bibliográfica do capítulo 3.....	54

4. CONSTRUÇÃO DAS CARTAS DE CONTROLE MULTIVARIADAS BASEADA NO CÁLCULO DO SINAL ANALÍTICO LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO POLIMÓRFICA DO FÁRMACO PIROXICAM UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

4.1 Parte experimental.....	59
4.2 Resultados e discussões.....	61
4.3 Conclusão.....	69
4.4 Referência bibliográfica do capítulo 4.....	70

5. ANÁLISE QUANTITATIVA DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DAS FORMAS POLIMÓRFICAS I E II DO FÁRMACO PIROXICAM ATRAVÉS DA MICROESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E DO MÉTODO QUIMIOMÉTRICO PLS

5.1 Parte experimental.....	73
5.2 Resultados e discussões.....	75
5.3 Conclusão.....	80
5.4 Referência bibliográfica do capítulo 5.....	81

6. UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E DAS CARTAS DE CONTROLE MULTIVARIADAS BASEADA NO CÁLCULO DO SINAL ANALÍTICO LÍQUIDO PARA IDENTIFICAÇÃO NO FÁRMACO CARBAMAZEPINA DE: ADULTERAÇÃO NO EXCIPIENTE, TRANSFORMAÇÃO DE FORMAS POLIMÓRFICAS POR UMIDADE E DETECÇÃO DE POLIMORFOS DIFERENTES

6.1 Parte experimental.....	85
6.2 Resultados e discussões.....	89
6.3 Conclusão.....	96
6.4 Referência bibliográfica do capítulo 6.....	97
7. CONCLUSÕES.....	99
7.1 Conclusão geral.....	101
8. ANEXOS.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão do espectro eletromagnético na região do infravermelho em três partes principais.

Tabela 2. Composição dos grupos estudados.

Tabela 3. Parâmetros encontrados pelos modelos PLS desenvolvidos.

Tabela 4. Composição das amostras das diferentes formas polimórficas da Carbamazepina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Energia Livre (ΔG) versus Temperatura (ΔT) para um Sistema Enantiotrópico. a) Entalpia da fase líquida; b) Entalpia do polimorfo II; c) Entalpia do polimorfo I; d) Energia livre de Gibbs para o polimorfo I; e) Energia livre de Gibbs para o polimorfo II; f) Energia livre de Gibbs para a fase líquida.

Figura 2. Diagrama de Energia Livre (ΔG) versus Temperatura (ΔT) para um Sistema Monotrópico. a) Entalpia da fase líquida; b) Entalpia do polimorfo II; c) Entalpia do polimorfo I; d) Energia livre de Gibbs para o polimorfo II; e) Energia livre de Gibbs para o polimorfo I; f) Energia livre de Gibbs para a fase líquida.

Figura 3. a) Fórmula estrutural do Piroxicam; b) Fórmula estrutural da Carbamazepina.

Figura 4. Comportamento da energia potencial em relação à vibração molecular para os modelos. a) oscilador harmônico e b) anarmônico.

Figura 5. Modos vibracionais de uma molécula de geometria angular.

Figura 6. Representação do espalhamento da luz em uma espécie que apresenta um momento dipolo induzido devido à interação com uma radiação eletromagnética incidente.

Figura 7. Representação esquemática de uma imagem multiespectral mostrando a intensidade dos pixels que formam uma imagem química em função do comprimento de onda.

Figura 8. Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: a) escalar (uma única medida instrumental), b) vetor de dados e c) matriz de dados.

Figura 9. Representação da carta de controle univariada.

Figura 10. Decomposição do sinal instrumental em sinal analítico líquido (NAS) e Interferentes.

Figura 11. Decomposição do sinal instrumental (\mathbf{r}) em um vetor NAS (\mathbf{r}_k^*), vetor interferente (\mathbf{r}_{INT}) e vetor resíduo (\mathbf{r}_{RES}).

Figura 12. Ilustração do desenvolvimento do espaço interferente utilizando dois componentes principais.

Figura 13. Projeção do sinal instrumental, \mathbf{r} , no espaço interferente obtendo-se o vetor interferente, \mathbf{r}_{INT} .

Figura 14. Representação da Carta de Controle NAS.

Figura 15. Representação da Carta de Controle Interferente.

Figura 16. Representação da Carta de Controle Resíduo.

Figura 17. Representação da Carta de Controle NAS.

● Amostras de Calibração; ▲ Amostras de Validação.

Figura 18. Representação da Carta de Controle Interferente.

● Amostras de Calibração; ▲ Amostras de Validação.

Figura 19. Representação da Carta de Controle Resíduo.

● Amostras de Calibração; ▲ Amostras de Validação.

Figura 20. Representação da etapa de calibração multivariada do modelo PLS utilizando os dados obtidos por espectroscopia de imagem.

Figura 21. Representação da etapa de validação do modelo PLS utilizando os dados obtidos por espectroscopia de imagem.

Figura 22. Representação da etapa de construção do mapa de distribuição de concentração da espécie de interesse.

Figura 23. Difratogramas de raios-x em pó das formas polimórficas do Piroxicam: **a)** Forma I (prisma); **b)** Forma II (agulha); **c)** Forma III.

Figura 24. Micrografia das formas polimórficas do Piroxicam: **a)** Forma I (prisma); **b)** Forma II (agulha); **c)** Forma III.

Figura 25. Espectros de infravermelho próximo para as três diferentes formas polimórficas do Piroxicam.

Figura 26. Divisão do espectro da amostra: vetor NAS, vetor interferente (INT) e vetor resíduo (RES).

Figura 27. Representação das cartas NAS, interferente e resíduo. (●) Amostras do grupo A; (○) Amostras do grupo B; (+) Amostras do grupo C e (*) Amostras do grupo D.

Figura 28. Diagnóstico dos vetores resíduos e interferentes. **(a)** vetores interferentes para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo B); **(b)** vetores resíduos para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para

as amostras fora de controle (- - amostras do grupo B); **(c)** vetores interferentes para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo C); **(d)** vetores resíduos para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo C).

Figura 29. Planejamento experimental.

Figura 30. Espectros de infravermelho próximo para as formas polimórficas I e II do Piroxicam.

Figura 31. Valores de referência versus valores previstos pelo modelo PLS para forma polimórfica I. Amostras de calibração (●) e validação (Δ).

Figura 32. Valores de referência versus valores previstos pelo modelo PLS para forma polimórfica II. Amostras de calibração (●) e validação (Δ).

Figura 33. Mapas de distribuição de concentração obtidos através dos modelos PLS desenvolvidos para as formas polimórficas I e II do fármaco Piroxicam.

Figura 34. Espectros de espalhamento Raman para as formas polimórficas I, II, III e IV da Carbamazepina.

Figura 35. Difrátogramas de raios-x em pó das formas polimórficas I, II, III e IV da Carbamazepina.

Figura 36. Micrografia das formas polimórficas da Carbamazepina. a) Forma I ; b) Forma II ; c) Forma III ; d) Forma IV.

Figura 37. Representação das cartas NAS, interferente e resíduo. (●) Amostras do grupo 1; (*) amostras do grupo 2; (O) amostras do grupo 3; (+) amostras do grupo 4; () amostras do grupo 5; (×) amostras do grupo 6; (★) amostras do grupo 7; (▼) amostras do grupo 8; (◇) amostras do grupo 9; (●) amostras do grupo 10.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Importância do estudo de polimorfismo na indústria farmacêutica

Muitos princípios ativos farmacêuticos existentes na forma de comprimidos exibem polimorfismo, que é definido como a capacidade de uma mesma substância existir em uma ou mais fases cristalinas, com diferentes células unitárias e, conseqüentemente, com arranjos moleculares distintos [1-3]. Como resultado, essas substâncias apresentam mudanças nas propriedades físicas, termodinâmicas, espectroscópicas, interfaciais e mecânicas [1-3], com características distintas de dissolução, ocasionando alterações na biodisponibilidade. Para os fármacos pouco solúveis, a velocidade de dissolução das diferentes formas polimórficas é o fator limitante da sua absorção. Como os polimorfos originam-se de diferentes arranjos das moléculas ou íons no retículo cristalino e apresentam diferentes energias de interação no estado sólido e sob um dado conjunto de condições, pode ocorrer a transição polimórfica, ou seja, a forma polimórfica de maior energia tende a se transformar na forma de menor energia. A eficácia terapêutica dos fármacos está diretamente relacionado ao tipo de forma polimórfica presente no produto final, o que pode produzir, em casos extremos, efeitos farmacológicos tóxicos. Dessa forma, o seu controle é muito importante pela indústria farmacêutica.

A avaliação da estabilidade de um polimorfo deve ser avaliada durante os estudos de pré-formulação, fase em que devem ser identificadas e determinadas as possíveis transições polimórficas que podem ocorrer em função do tempo e da temperatura de armazenamento, do tipo de processo de compressão e da redução do tamanho de partículas, as quais podem interferir na eficácia e segurança do produto final [4].

No processo de síntese de fármacos, em geral, a sequência de eventos segue a seguinte ordem: síntese, purificação, cristalização, secagem e estocagem do fármaco. Durante esses processos, há a possibilidade de ocorrência de transformações polimórficas, o que faz que seja necessária a identificação das características físico-químicas do fármaco, bem como possíveis presenças de

contaminantes, resíduos de solvente e de substâncias relacionadas à síntese do fármaco.

A cristalização é um processo extensamente utilizado pela indústria farmacêutica química para a obtenção de fármacos e excipientes durante estágios iniciais ou finais da purificação e separação dos compostos, e é esse processo que define o grau de pureza química e as propriedades físicas da substância que está sendo isolada, tais como tamanho e forma da partícula, estrutura cristalina e grau de imperfeições na mesma. Existem diversas estratégias que são aplicadas pela indústria farmacêutica para que, durante a cristalização, se obtenha uma determinada substância com o índice de pureza especificado, apresentando o máximo de rendimento. Tais estratégias envolvem o controle de fenômenos e características físicas, termodinâmicas e físico-químicas intrínsecas ao fármaco como a nucleação, estabilidade termodinâmica e solubilidade.

No controle do processo de cristalização, os principais pontos a serem avaliados são as taxas de nucleação e de crescimento do cristal [5]. Deve-se levar em consideração a importância do papel de cada solvente e impureza presentes no processo de cristalização, pois esses têm influência direta na possível formação de polimorfos durante a purificação do material. Dependendo do sistema de solventes a ser utilizado, a diferença de estabilidade termodinâmica de um composto em relação aos outros permite a sua separação, de modo que o polimorfo mais solúvel e menos estável se cristalice antes.

Devido às diferentes propriedades termodinâmicas entre os polimorfos, de um sistema dimórfico, por exemplo, pode-se controlar a maior obtenção de uma das formas pela ação da temperatura. O resfriamento do sistema pode levar à formação da forma I, sendo a II solúvel neste sistema. A separação pode ser realizada por filtração ou por um maior abaixamento da temperatura, o que aumentaria a nucleação do polimorfo I.

Alguns sistemas levam à obtenção de um sólido que se apresenta como a mistura das formas cristalina e forma amorfa. Nestes casos, a quantificação da forma cristalina da mistura, medição esta chamada de grau de cristalinidade, é um fator importante a ser controlado, especialmente pela possibilidade de ocorrência

de polimorfismo e pseudo-polimorfismo em um mesmo sistema. Esse último ocorre quando a hidratação da estrutura cristalina.

O grau de cristalinidade de um fármaco pode ser estabelecido por técnicas como a difratometria de raio-X [6] e a calorimetria diferencial exploratória [7]. Essas técnicas são capazes de detectar alterações nas formas cristalinas, apontando a presença de formas polimórficas metaestáveis ou parcelas amorfas do fármaco. Outras técnicas que podem ser utilizadas para identificação e caracterização de formas polimórficas são: a ressonância magnética nuclear de alta resolução (RMN) [8], a espectroscopia na região do infravermelho (IR) [9] e a espectroscopia Raman [10].

1.2 Tipos de polimorfismo em medicamentos

Baseados em diferenças nas propriedades termodinâmicas, os polimorfos podem ser classificados em um dos dois tipos: enantiotrópico ou monotrópico. Um sistema é enantiotrópico quando a mudança de uma forma cristalina para outra é de caráter reversível. Por outro lado, um sistema é monotrópico se a mudança da forma cristalina acontece em uma única direção, quer dizer, de forma irreversível. Do ponto de vista termodinâmico, o cristal passa sempre de uma forma menos estável a uma forma mais estável. Do ponto de vista da indústria farmacêutica, a forma mais estável não é sempre a mais desejada, pois uma forma com estabilidade termodinâmica maior, isto é, menos solúvel, terá por conseguinte menor biodisponibilidade. Recordemos que as transições nos sistemas enantiotrópicos são reversíveis, porque elas podem acontecer em ambos os sentidos, do mais estável para menos estável ou vice-versa, dependendo da droga em questão e dos tratamentos térmicos aos quais esteja exposta [11]. Segundo Burger e Ramberger [12] e Vippagunta [13], é possível estabelecer controles úteis para se determinar qualitativamente a natureza enantiotrópica e monotrópica das relações entre polimorfos como, por exemplo, controle do calor de transição, controle do calor de fusão e controle da densidade. Um aspecto importante é determinar a existência, ou não, de uma temperatura de transição entre duas

formas polimórficas. Essa temperatura pode ser atingida em etapas diferentes de elaboração de um produto farmacêutico, por exemplo, pelo calor recebido durante a trituração, granulação ou armazenamento. Nessa temperatura, ambas as formas apresentam energia livre idênticas, podendo coexistir, apresentar solubilidades iguais em qualquer solvente ou apresentar pressões de vapor iguais. Se pelo uso dos controles for determinado que uma droga específica seja enantiotrópica ou monotrópica, então a próxima etapa é definir termodinamicamente a propriedade estável ou metaestável de cada fase da substância como uma função da temperatura. É necessário então, saber em que condições de inter-conversão obtém-se uma forma estável. A forma termodinamicamente mais estável apresenta, abaixo da sua temperatura de fusão, a menor energia livre, correspondente à menor solubilidade ou pressão de vapor [13-14].

Durante a pré-formulação de um fármaco, como já dito anteriormente, é importante identificar o polimorfo que é estável à temperatura ambiente e determinar qual das transições polimórficas ocorre dentro da gama de temperaturas usadas nos estudos de estabilidade e durante o processamento (secagem, moagem, etc.). As variações de energia livre entre polimorfos podem ser controladas usando várias técnicas a diferentes temperaturas, em que um composto polimórfico é caracterizado preferencialmente por meio de diagramas de fase, tais como: temperatura “versus” energia livre; pressão “versus” temperatura; solubilidade “versus” temperatura; taxa de dissolução “versus” temperatura. Em geral, esses diagramas contêm uma grande quantidade de informações de forma compacta e podem fornecer uma ferramenta visual facilmente interpretável das complexas relações entre os polimorfos [14]. Nas Figuras 1 e 2, são mostrados diagramas de temperatura “versus” energia livre de Gibbs para sistemas polimórficos. Uma forma mais direta de determinar a temperatura de transição é por observação microscópica das amostras ou ainda por meio da calorimetria diferencial de varredura, pois obtém-se a temperatura de fusão dos diferentes polimorfos [11].

1.3 Estabilidades relativas dos polimorfos

A estabilidade relativa dos polimorfos depende de suas energias livres, bem como a do polimorfo mais estável que tem uma menor energia livre. Sob um cenário de condições experimentais definidas (com exceção dos pontos de transição), apenas um polimorfo tem uma menor energia livre. Este polimorfo é a forma termodinamicamente mais estável e os outros polimorfos são determinados como uma forma metaestável. Uma forma metaestável é aquela que é instável termodinamicamente, mas tem uma existência finita como resultado de uma taxa relativamente lenta de transformação [15].

No diagrama da Figura 1 as curvas “a”, “b” e “c” representam respectivamente, a entalpia para a fase líquida, para o polimorfo II e para o polimorfo I, enquanto que as curvas “d”, “e” e “f” representam respectivamente, a energia livre de Gibbs para o polimorfo I, para o polimorfo II e para a fase líquida. Este diagrama representa uma situação para um sistema enantiotrópico, para dois polimorfos I e II, onde as curvas “d” e “e” cruzam-se na temperatura de transição (T_1) que se localiza abaixo do ponto de fusão dos respectivos polimorfos I e II, respectivamente, representados nesta figura pelas temperaturas T_2 e T_3 . Nesse ponto os dois polimorfos podem coexistir como misturas em equilíbrio, tendo a mesma estabilidade. Na relação termodinâmica enantiotrópica, como descrito anteriormente, os polimorfos convertem-se um no outro de forma reversível. A intersecção da curva “f” com as curvas “d” e “e” definem o ponto de fusão desses polimorfos.

No diagrama da Figura 1, o polimorfo I é a forma mais estável, pois abaixo do ponto de transição dos polimorfos é o que apresenta a menor energia livre de Gibbs, presumivelmente à temperatura ambiente. Existe uma tendência termodinâmica para a forma menos estável se transformar na forma mais estável.

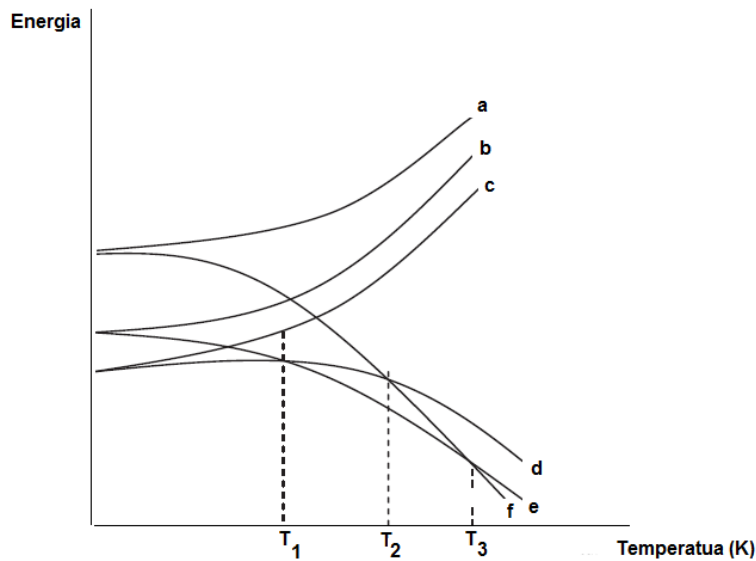


Figura 1 - Diagrama de Energia Livre (ΔG) versus Temperatura (ΔT) para um Sistema Enantiotrópico. a) Entalpia da fase líquida; b) Entalpia do polimorfo II; c) Entalpia do polimorfo I; d) Energia livre de Gibbs para o polimorfo I; e) Energia livre de Gibbs para o polimorfo II; f) Energia livre de Gibbs para a fase líquida .

No diagrama da Figura 2 as curvas “d” e “e” representam a energia livre de Gibbs, respectivamente, para o polimorfo II e para o polimorfo I, enquanto que as outras curvas têm o mesmo significado da Figura 1. O diagrama da Figura 2 representa uma situação para um sistema monotrópico, onde não há ponto de transição abaixo dos pontos de fusão dos polimorfos I e II. O que é representado pela ausência do cruzamento das curvas “d” e “e”. Nestas condições, para a relação termodinâmica monotrópica, os dois polimorfos I e II não se convertem um no outro, sendo o polimorfo I mais estável em todas as temperaturas.

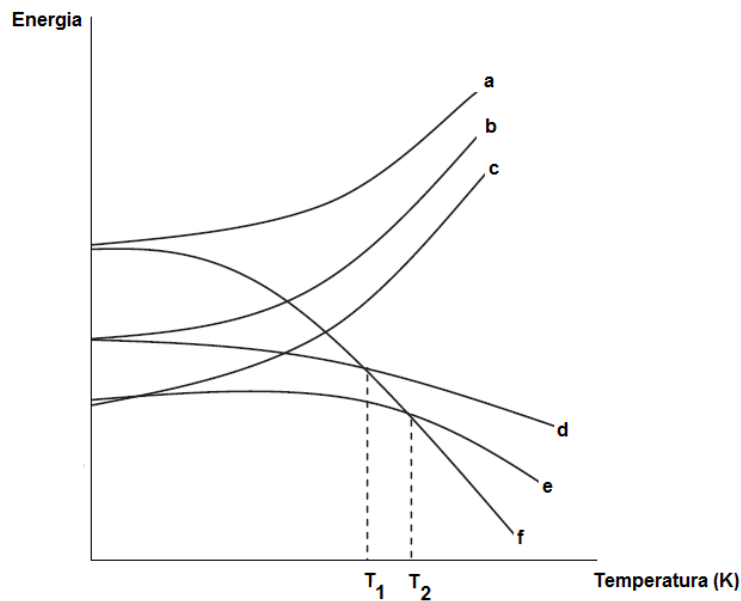


Figura 2 - Diagrama de Energia Livre (ΔG) versus Temperatura (ΔT) para um Sistema Monotrópico. a) Entalpia da fase líquida; b) Entalpia do polimorfo II; c) Entalpia do polimorfo I; d) Energia livre de Gibbs para o polimorfo II; e) Energia livre de Gibbs para o polimorfo I; f) Energia livre de Gibbs para a fase líquida.

Na indústria farmacêutica, a forma metaestável é, algumas vezes, desejável em relação a suas propriedades especiais, tais como alta biodisponibilidade, melhor comportamento durante a trituração e compressão, ou menor higroscopicidade. No entanto, uma forma metaestável tem uma tendência termodinâmica em reduzir sua energia livre pela sua transformação na forma estável. Tais transformações polimórficas são muitas vezes prejudiciais para a eficácia da formulação. Além do mais, nos processos de produção e processamento farmacêutico, tais como compactação, moagem, granulação úmida e secagem, podem também ocorrer transições polimórficas. A extensão da transição polimórfica depende das condições de processamento e da estabilidade relativa dos polimorfos em questão. A termodinâmica nos fornece um quadro no qual a estabilidade relativa dos polimorfos pode ser determinada [15]. Portanto, apenas no ponto da transição termodinâmica é que duas formas polimórficas podem coexistir em misturas em equilíbrio; em outra temperatura as tendências termodinâmicas conduziram a transformação para a forma mais estável. Isso

implica que, exceto na temperatura de transição, os polimorfos terão uma existência limitada [14].

1.4 Fármacos escolhidos

Nesta tese foi escolhido os fármacos Carbamazepina e Piroxicam, que apresentam polimorfismo, para o presente estudo, ambos doados pela empresa farmacêutica EMS-Sigma Pharma. O Piroxicam [16] é um antiinflamatório usado para aliviar os sintomas da artrite reumatóide, osteoartrite, dismenorréia primária e dor pós-operatória, enquanto que a Carbamazepina [17] é um antipsicótico antiepiléptico usado para o tratamento de epilepsia, neuralgia trigeminal e na síndrome de abstinência do álcool. O Piroxicam apresenta quatro formas polimórficas denominadas formas I, II, III e forma IV (forma hidratada) que podem ser obtidas através do processo de cristalização em soluções saturadas com diferentes solventes [18].

Neste trabalho foi utilizado as formas I, II e III do Piroxicam, pois não conseguiu-se obter a forma IV. A forma I do Piroxicam é a que apresenta atividade farmacêutica, pois é estável a temperatura ambiente e possui uma alta solubilidade e biodisponibilidade.

Já para a Carbamazepina, que também possui quatro formas polimórficas: forma I, forma II, forma III e a forma IV (dihidratada), conseguiu-se a obtenção de todas as formas polimórficas utilizando diferentes solventes [17]. No que refere-se a atividade farmacêutica é a forma III da Carbamazepina que é responsável para o tratamento. A Figura 3 mostra a fórmula estrutural do Piroxicam e da Carbamazepina.

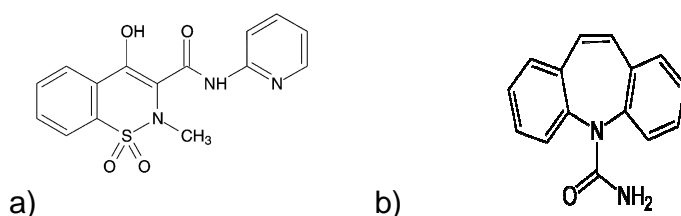


Figura 3. a) Fórmula estrutural do Piroxicam; b) Fórmula estrutural da Carbamazepina.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese foi desenvolver novos métodos analíticos para o estudo de polimorfismo em medicamentos utilizando as técnicas de espectroscopia, microespectroscopia na região do infravermelho próximo e espectroscopia Raman aliados a métodos quimiométricos em três diferentes aplicações.

1.5.2 Objetivos específicos

- Construir cartas de controle multivariadas baseada no cálculo do sinal analítico líquido para caracterizar a composição polimórfica do fármaco piroxicam utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo.

- Realizar análise quantitativa de formulações farmacêuticas das formas polimórficas I e II do fármaco piroxicam através da microespectroscopia na região do infravermelho próximo e do método quimiométrico PLS.

- Utilizar a espectroscopia raman e as cartas de controle multivariadas baseada no cálculo do sinal analítico líquido para identificar: adulteração no excipiente, transformação de formas polimórficas por umidade e detecção de polimorfos diferentes para o fármaco carbamazepina.

1.6 Referência bibliográfica do capítulo 1

1. J. Haleblian, W. McCrone, J.Pharm. Sci. 58 (1969) 911-929.
2. J.K. Haleblian, J.Pharm. Sci. 64 (1975) 1269-1288.
3. Y. T. Sohn, S. H. Kim, Arch. Pharm. Res. 31 (2008) 231-234.
4. M. Karjalainen, S. Airaksinen, J. Rantanen, J. Aaltonen, J. Yliruusi, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 27–32.
5. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Princípios de análise instrumental, Porto Alegre, 2002.
6. K. Dohi, F. Kaneko, T. Kawaguchi, J. Cryst. Growth 237 (2002) 2227–2232.
7. R. Bottom, Int. J. Pharm, 192 (1999) 47-53.
8. M.T. Zell, B. E. Padden, D. J. W. Grant, S. A. Schroeder, K.L. Wachholder, I. Prakash, E. J. Munson, Tetrahedron 56 (2000) 6603-6616.
9. J. Aaltonen, J. Rantanen, S. Siiriä, M. Karjalainen, A. Jørgensen, N. Laitinen, M. Savolainen, P. Seitavuopio, M. Louhi-Kultanen, J. Yliruusi, Anal. Chem. 75 (2003) 5267–5273.
10. C.J. Strachan, D. Pratiwi, K. C. Gordon , T. Rades J. Raman Spectrosc. 35 (2004) 347 – 352.
11. H. A. L. Lachman, J. L. Lieberman, Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica, Lisboa, 2001.
12. A. Burger, R. Ramberger, Microchim. Acta 2 (1979) 273–316.
13. H. Vippagunta, Adv. Drug Deliv. Rev., 48 (2001), 3-26.
14. J. Bernstein, Engineering of Crystalline Materials Properties, Netherlands, 2008.
15. R. Hilfikeri, Polymorphism in the Pharmaceutical Industry, 2006.
16. A. R. Sheth, S. Bates, F. X. Muller, D. J. W. Grant, Cryst. Growth Des. 4 (2004) 1091-1098.
17. C. Rustichelli, J.Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 41-54.
18. F. Vrečer, M. Vrbinc, A. Meden, Int. J. Pharm. 253 (2003) 3–15.

CAPÍTULO 2

**FUNDAMENTOS E ASPECTOS QUANTITATIVOS DAS
ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS**

2.1 Espectroscopia vibracional

Denomina-se espectroscopia vibracional a técnica de análise na qual se utiliza a radiação eletromagnética para estudar o comportamento vibracional de moléculas, observando-se a absorção ou espalhamento dessa radiação [1]. A absorção da radiação ocorre na região do infravermelho, que vai de 12.800 a 10 cm^{-1} , quando uma molécula sofre variação no seu momento de dipolo elétrico como consequência do seu movimento vibracional ou rotacional. Já o espalhamento da radiação, ocorre quando a energia da radiação monocromática incidente é levemente modificada pela interação inelástica com um dos modos de vibração da molécula [2]. Em uma molécula, o número de vibrações, a descrição dos modos vibracionais e sua atividade em cada tipo de espectroscopia vibracional (Raman e infravermelho) podem ser previstas a partir da sua simetria e da aplicação da teoria de grupo. Embora ambas as espectroscopias estejam relacionadas às vibrações moleculares, os mecanismos de origem dos espectros correspondentes são totalmente distintos. Em decorrência disso, os espectros obtidos apresentam diferenças significativas, um exemplo disso é que quando há a ocorrência de um mesmo pico nos espectros Raman e no infravermelho, observa-se que o seu tamanho relativo é diferente em cada um dos dois. Existe, também, o caso em que um determinado pico aparece em um tipo de espectro e é totalmente ausente no outro. Devido a essas diferenças, a espectroscopia no infravermelho é mais eficiente em alguns casos, enquanto em outros a espectroscopia Raman oferece espectros mais úteis. De modo geral, pode-se dizer que as espectroscopias Raman e infravermelho são técnicas complementares [3].

A espectroscopia vibracional tem sido utilizada para a distinção de compostos que apresentam polimorfismo em diversos fármacos [4,5]; tais exemplos são os trabalhos publicados com espectroscopia de reflectância difusa no infravermelho (DRIFT-IR) [6,7], a espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho utilizando transformada de Fourier (ATR-FTIR) [8,9], a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) [10,11] e a espectroscopia Raman

[12-15]. Há outras técnicas para o estudo de polimorfismo, tais como a microscopia óptica e a determinação do ponto de fusão, mas essas não apresentam a resolução necessária para diferenciar formas polimórficas em diversos fármacos.

Uma breve discussão sobre as teorias envolvidas em cada tipo de espectroscopia será agora apresentada.

2.1.1 Princípios básicos da espectroscopia no infravermelho

A maioria dos compostos orgânicos e inorgânicos possui ligações covalentes, que absorve radiação na região do infravermelho [1,16]. A Tabela 1 ilustra a porção desta faixa no espectro eletromagnético e a sua divisão em três partes [2,17].

Tabela 1. Divisão do espectro eletromagnético na região do infravermelho em três partes principais.

Região	Comprimento de onda/Frequência	Característica
Infravermelho próximo	0,8-2,5 μm (12500-4000 cm^{-1})	Região harmônica/cominação
Infravermelho médio	2,5-50 μm (4000-200 cm^{-1})	Região de vibração-rotação
Infravermelho distante	50-1000 μm (200-10 cm^{-1})	Região de rotação

Para absorver radiação infravermelha, a molécula precisa sofrer variação do momento de dipolo como consequência dos movimentos vibracional ou rotacional, como já dito anteriormente. Por isso, por exemplo, tanto o gás cloro como o iodo não possuem espectros de infravermelho, pois o momento de dipolo resultante é igual a zero em ambos os casos. Na temperatura ambiente, a maioria das moléculas está no nível de energia vibracional fundamental. Átomos ou grupos de átomos são deslocados um em relação ao outro numa frequência que é diretamente proporcional à constante de força de ligação e inversamente proporcional à massa reduzida [1,18]. No caso de moléculas diatômicas simples, é possível calcular as frequências vibracionais tratando a molécula como um oscilador harmônico. A frequência da vibração é dada por:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1)$$

onde “ ν ” é a frequência (vibrações por segundo), “ k ” é a constante de força (N.m^{-1}), isto é, a força de estiramento e de restauração entre dois átomos e “ μ ” é a massa reduzida por molécula (kg); μ é definido pela relação:

$$\mu = \text{massa reduzida}, \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}, \quad \text{“}m_1\text{” e “}m_2\text{” massas dos átomos em}$$

gramas/mol.

É costume, entretanto, caracterizar as bandas de absorção em unidades de números de ondas “ $\bar{\nu}$ ” que são expressas em centímetros recíprocos (cm^{-1}). Às vezes, comprimentos de onda “ λ ” medidos em micrômetros (μm) são utilizados. A relação entre as duas quantidades é:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (2)$$

onde “ c ” é a velocidade da luz no vácuo. Então:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3)$$

A frequência é diretamente proporcional à energia, de acordo com a equação 4. Esta energia pode ser transferida a partir de um fóton de um dado comprimento de onda (λ).

$$E = h\bar{\nu} = \frac{hc}{\lambda} \quad (4)$$

E = energia

h = constante de Planck

$\bar{\nu}$ = frequência

λ = comprimento de onda

O modelo clássico mais simples empregado para explicar a interação entre a radiação e a matéria na região do infravermelho é representado por uma molécula diatômica, no qual os átomos são representados como duas esferas maciças “ m_1 ” e “ m_2 ” conectadas com uma mola com uma constante de força “ k ”.

Quando uma ligação da molécula que possui momento dipolar vibra, ocorre uma variação do momento dipolar e surge um campo que pode interagir com o campo elétrico associado à radiação. Ocorre transferência de energia e resulta em uma variação da amplitude da vibração molecular e a consequência é a absorção de radiação. [2]

Sabe-se que à temperatura ambiente, a maioria das moléculas encontra-se no estado fundamental. Quando se irradia uma quantidade de energia na região do infravermelho, pode-se excitar a molécula para um estado de energia superior. A molécula passa para um nível vibracional superior. Mais ainda, a teoria quântica indica que as únicas transições que poderiam ocorrer seriam aquelas em que o número quântico vibracional muda de uma unidade, isto é, $\Delta v = \pm 1$ [16,19], essa característica é denominada de regra de seleção.

A variação de energia entre o estado fundamental de uma molécula e o primeiro estado de energia vibracional corresponde à frequência da radiação eletromagnética na região do infravermelho médio (2,5 μm a 16 μm), enquanto a diferença entre o estado fundamental e o segundo estado de energia se refere à radiação do infravermelho próximo (750 nm a 2,5 μm). Esta última propriedade é

utilizada para fornecer espectros do infravermelho próximo, que correspondem a intensidades menores: são denominadas de sobretons, ou combinações de modos vibracionais ($\nu \approx \nu_1 + \nu_2$). As chamadas bandas proibidas são 10 a 1000 vezes mais fracas do que as bandas fundamentais [16]. Essas bandas só ocorrem devido à anarmonicidade do modelo de níveis de energia, ou seja, à propriedade de um oscilador anarmônico.

No modelo harmônico, Figura 4.a, existem limitações, pois este não descreve o comportamento de repulsão coulombiana entre os dois núcleos à medida que dois átomos se aproximam. Esta repulsão produz uma força que age na mesma direção da força de restauração da ligação; assim espera-se que a energia potencial aumente mais rapidamente do que o observado no modelo do oscilador harmônico. Na situação oposta, em que a distância entre os átomos aumenta, há um decréscimo na força de restauração e, portanto, da energia potencial. É observado quando a distância interatômica se aproxima daquela em que ocorre a quebra da ligação.

O comportamento anarmônico conduz a desvios de dois tipos, o primeiro deles é que os níveis de energia não são iguais, como pode ser visto na Figura 4.b. O segundo tipo de desvio provocada pela anarmonicidade é que a regra de seleção não é seguida rigorosamente.

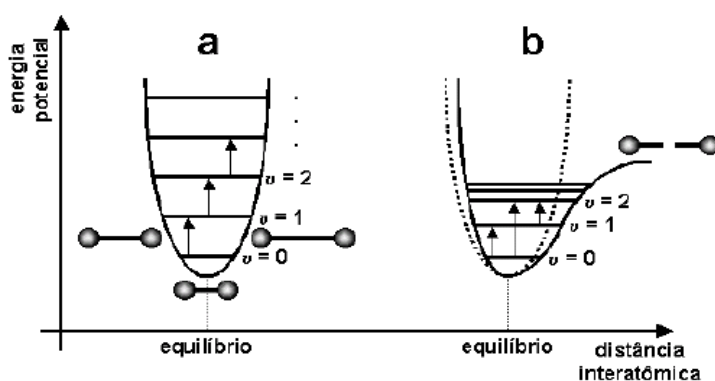


Figura 4. Comportamento da energia potencial em relação à vibração molecular para os modelos do (a) oscilador harmônico e (b) anarmônico.

Em alguns casos, de acordo com o número de átomos, podemos prever quantos modos vibracionais a molécula possui: $3N-6$ e $3N-5$ para moléculas lineares, onde “N” é o número de átomos. A seguir observam-se alguns exemplos na Figura 5:

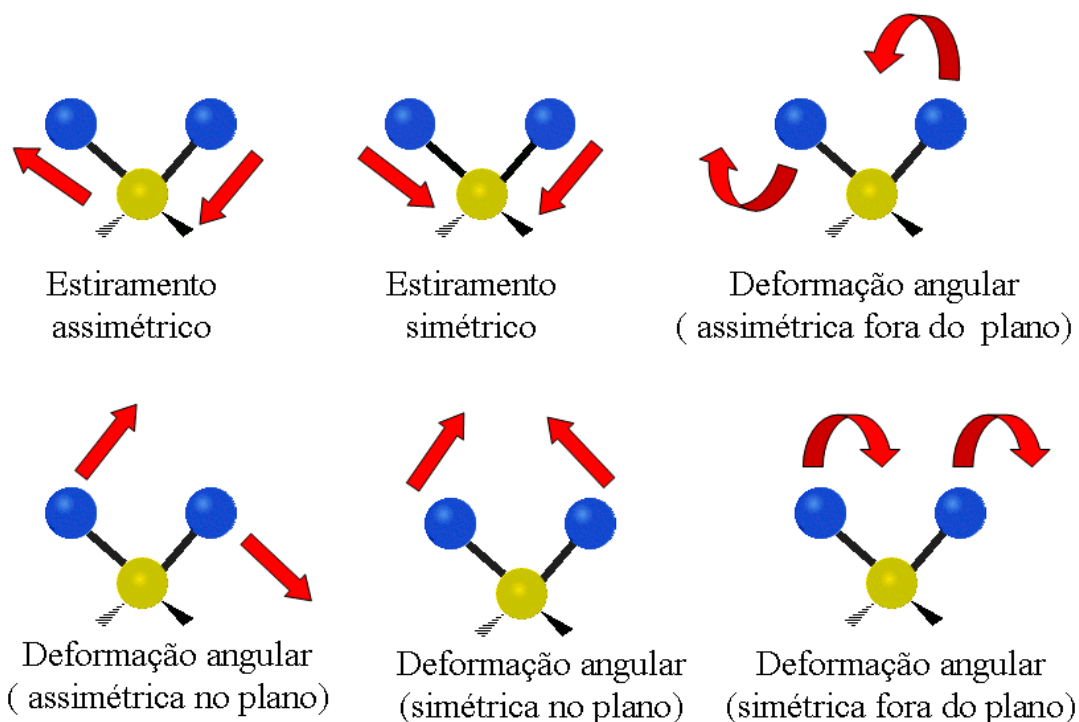


Figura 5. Modos vibracionais de uma molécula de geometria angular.

2.1.2 Princípios básicos da espectroscopia Raman

O espalhamento da luz, conhecido como espalhamento Raman, pode ser entendido como o redirecionamento da luz, que pode ocorrer quando uma onda eletromagnética, isto é, um raio de luz incidente encontra um obstáculo, ou seja, um sólido, líquido ou um gás, que é capaz de espalhar a radiação. Como a onda eletromagnética incidente interage com a matéria, as órbitas dos elétrons que

constituem o interior das moléculas são perturbadas periodicamente com a mesma frequência “ ν_0 ” do campo elétrico da onda incidente. A perturbação da nuvem eletrônica resulta em uma separação de carga dentro das moléculas, que é conhecido como momento dipolo induzido. A oscilação do momento dipolo induzido é manifestada através da fonte de radiação incidente que é capaz de provocar o espalhamento da luz. A maior parte da luz espalhada é emitida com frequência idêntica “ ν_0 ” à da luz incidente, processo conhecido como espalhamento elástico [20]. Entretanto, há também o espalhamento de luz com frequência diferente da luz incidente, processo conhecido como espalhamento inelástico. O espalhamento Raman é um exemplo de espalhamento inelástico. A Figura 6, abaixo, demonstra o processo de espalhamento da luz através de uma interação complexa entre a radiação eletromagnética incidente e a estrutura atômica ou molecular de um material.

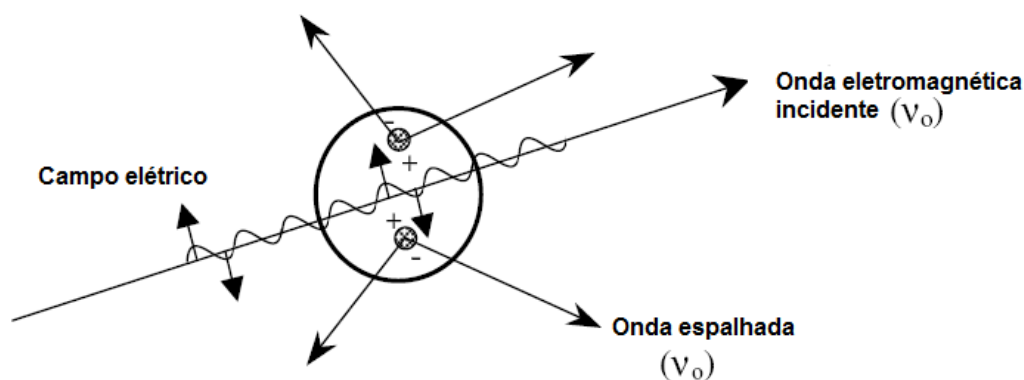


Figura 6. Representação do espalhamento da luz em uma espécie que apresenta um momento dipolo induzido devido à interação com uma radiação eletromagnética incidente.

Como já discutido anteriormente, uma onda eletromagnética incidente induz um momento de dipolo durante a interação do material com a luz. A intensidade do momento de dipolo induzido, “P”, é representado pela equação,

$$P = \alpha \bar{E} , \quad (5)$$

Em que “ α ” é a polarizabilidade e “ \bar{E} ” é o campo elétrico da onda eletromagnética incidente. A polarizabilidade é uma propriedade do material que depende da estrutura molecular e da natureza da ligação [21,22]. Para a onda eletromagnética incidente, o campo elétrico pode ser expresso da seguinte forma:

$$\bar{E} = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t), \quad (6)$$

Em que “ ν_0 ” é a frequência em Hertz (Hz) da onda incidente. Substituindo a equação (6) na equação (5), uma vez que o momento dipolo induzido depende do tempo, temos:

$$P = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (7)$$

Como a habilidade de perturbar a nuvem eletrônica de uma estrutura molecular depende da localização relativa dos átomos individuais, concluí-se que a polarizabilidade é uma função da posição instantânea dos átomos presentes na molécula. Para uma ligação molecular, os átomos individuais são confinados em modos vibracionais específicos, em que os níveis de energia vibracionais são quantizados de uma maneira similar às energias dos elétrons. A energia de um modo vibracional particular é dada pela equação:

$$E_{vib} = \left(j + \frac{1}{2}\right) h \nu_{vib} \quad (8)$$

Em que “ j ” é o número quântico vibracional ($j=0, 1, 2, \dots$), “ ν_{vib} ” é a frequência do modo vibracional, e “ h ” é a constante de Planck. O deslocamento físico dos átomos “ dQ ” sobre a sua posição de equilíbrio, deve-se a um modo vibracional particular, que pode ser expresso através da equação 9.

$$dQ = Q_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (9)$$

Onde “ Q_0 ” é o deslocamento sobre a posição de equilíbrio. Para uma molécula diatômica simples, por exemplo, N_2 , o deslocamento máximo é aproximadamente 10% do comprimento da ligação. Para pequenos deslocamentos, a

polarizabilidade pode ser aproximada por uma expansão da série de Taylor representada pela equação 10.

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} dQ \quad (10)$$

Onde “ α_0 ” é a polarizabilidade do modo molecular na posição de equilíbrio. Baseado no deslocamento vibracional representado pela equação 9, a polarizabilidade pode ser representado pela equação 11:

$$\alpha = \alpha_0 + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} Q_0 \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (11)$$

Finalmente, a equação 11 pode ser substituída na equação 5 dando origem a equação 12.

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{\partial \alpha}{\partial Q} Q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_{vib} t) \quad (12)$$

Através de uma relação trigonométrica, a equação 12 pode ser reescrita dando origem a equação 13 a seguir.

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \frac{Q_0 E_0}{2} \right) \{ \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_{vib})t] + \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_{vib})t] \} \quad (13)$$

Analisando a equação 13, temos que o momento de dipolo induzido possui três frequências distintas, representadas por “ ν_0 ”, “ $(\nu_0 - \nu_{vib})$ ” e “ $(\nu_0 + \nu_{vib})$ ”, as quais resultam do espalhamento da radiação incidente. O primeiro termo dessa equação representa a frequência de espalhamento elástico, denominado espalhamento Rayleigh, correspondente à frequência da radiação incidente, enquanto os dois últimos termos representam o espalhamento inelástico no qual há um deslocamento para uma frequência maior e outro para uma frequência menor, em relação à frequência da radiação eletromagnética incidente. O espalhamento da luz refere-se a esses dois últimos termos da equação e é denominado

espalhamento Raman [22]. O deslocamento para frequência menor é conhecido como deslocamento Stokes, enquanto que o deslocamento para frequência maior é conhecido como deslocamento anti-Stokes. Vale ressaltar, porém, que a condição necessária para que ocorra o espalhamento Raman é que o termo “ $\frac{\partial \alpha}{\partial Q}$ ” da equação 13 seja diferente de zero. A interpretação física para essa condição é que o deslocamento vibracional dos átomos corresponde a um modo vibracional particular que resulta na mudança de polarizabilidade [22]. Chandrasekhara Venkata Raman foi o primeiro pesquisador a descrever esses diferentes espalhamentos inelásticos da luz, pesquisa pela qual recebeu o prêmio Nobel da física de 1930 [23].

2.2 Espectroscopia de imagem

Na espectroscopia clássica, um espectro reflete a informação da superfície de uma amostra que depende do tamanho da área atingida pela fonte de energia. No início da década de 1990, sistemas espectroscópicos de imagem química tornaram possíveis aquisições de espectros e informações espaciais simultaneamente, a chamada espectroscopia de imagem [24,25]. A localização espacial de espectros identifica espécies químicas na amostra e seu mapa de distribuição. A espectroscopia de imagem essencialmente combina espectroscopia e imagem digital [26]. Ela baseia-se na medida de um espectro completo por unidade da superfície da amostra (pixel).

A técnica mais utilizada até o início do ano 2000 era o “*point mapping*” [27], que consiste numa espectroscopia clássica com estágio de movimento. Nessa técnica, cada espectro obtido individualmente é reunido para a formação da imagem. Uma evolução deste conceito é a “*line imaging*” [28], que adquire informações espaciais e espectrais simultaneamente, porém ainda necessitando pré-definir a posição espacial para a cobertura de toda a área rastreada. Nos últimos dez anos, os detectores óticos denominados “*focal plane array*” [29], compostos por milhares de elementos formando uma matriz de pixels, têm

aumentado sua popularidade devido à possibilidade de fornecerem milhares de espectros (um por pixel) simultaneamente. Diversos estudos comparativos demonstraram o aumento de eficiência em relação ao tempos de obtenção de imagens multiespectrais. A Figura 7 representa um arranjo de dados tridimensional formado por uma imagem multiespectral [30,31], ou seja, uma imagem química.

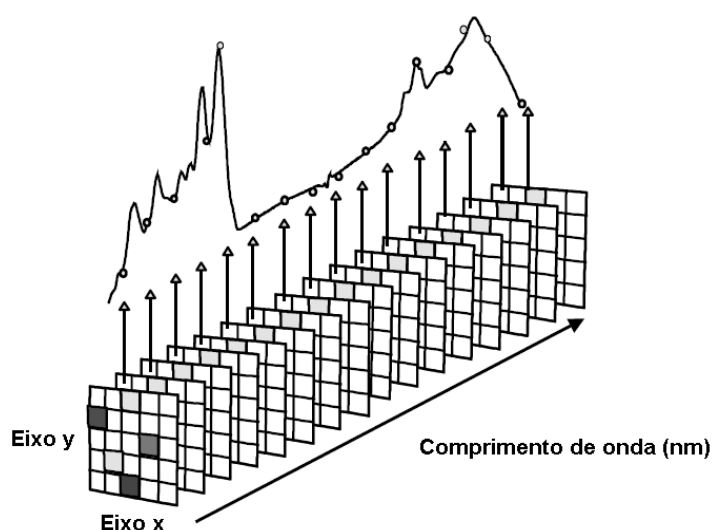


Figura 7. Representação esquemática de uma imagem multiespectral mostrando a intensidade dos pixels que formam uma imagem química em função do comprimento de onda.

A figura acima mostra a representação de uma imagem espectroscópica de uma amostra para a qual foi obtido um espectro por pixel. O conjunto de pixels pode ser visualizado como um arranjo tridimensional, onde as três dimensões são compostas pelas coordenadas espaciais (x e y), referentes ao posicionamento de cada pixel analisado na superfície, sendo a terceira dimensão, o comprimento de onda (λ). Nota-se, em destaque nesta Figura 7, que um espectro é associado com cada um dos pixels em uma posição (x e y) da imagem. Em cada pixel da imagem existe uma combinação de sinais descrita pela soma dos sinais puros de cada composto, ponderados por suas concentrações.

A espectroscopia de imagem ou microespectroscopia também pode ser usada para análise de formulações farmacêuticas, principalmente para detecção de mudanças de formas polimórficas. Clark e colaboradores [32] descreveram vários exemplos de aplicação da espectroscopia de imagem para detecção de polimorfismo em matéria-prima e impurezas em concentrações na faixa de 1% (m/m).

2.3 Referência bibliográfica do capítulo 2

1. C. Pasquini, J. Braz. Chem. Soc., 14 (2003) 198-219.
2. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Princípios de análise instrumental, São Paulo, 2002.
3. O. Sala, Fundamentos de espectroscopia Raman e no infravermelho, São Paulo, 1995.
4. H.G. Brittain, Cryst. Growth Des., 2008, 8 (7), 2588-2595.
5. K. Dohi, F. Kaneko, T. Kawaguchi, J. Cryst. Growth 237 (2002) 2227–2232.
6. S. Agatonovic-Kustrin, T. Rades, V. Wu, D. Saville, I.G. Tucker, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 741–750.
7. S. Agatonovic-Kustrin, T. Rades, V. Wu, D. Saville, I.G. Tucker, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 741–750.
8. R. Helmy, G.X. Zhou, Y.W. Chen, L. Crocker, T. Wang, R.M. Wenslow, Anal. Chem. 75 (2003) 605–611.
9. A. Salari, R.E. Young, Int. J. Pharm. 163 (1998) 157–166.
10. J. Aaltonen, J. Rantanen, S. Siiriä, M. Karjalainen, A. Jørgensen, N. Laitinen, M. Savolainen, P. Seitavuopio, M. Louhi-Kultanen, J. Yliruusi, Anal. Chem. 75 (2003) 5267–5273.
11. K. Pöllänen, A. Häkkinen, S.P. Reinikainen, J. Rantanen, M. Karjalainen, M. Louhi-Kultanen, L. Nyström, J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 275-284.
12. F. Tian, J. A. Zeitler, C. J. Strachan, D. J. Saville, K. C. Gordon, T. Rades, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 271-280.
13. C. J. Strachan, D. Pratiwi, K. C. Gordon, T. Rades, J. Raman Spectrosc. 35 (2004) 347–352.
14. S. Al-Dulaimi, A. Aina, J. Burley, CrystEngComm 12 (2010) 1038-1040.
15. D. E. Braun, S. G. Maas, N. Zencirci, C. Langes, N. A. Urbanetz, U. J. Griesser, Int. J. Pharm. 385 (2010) 29–36.
16. J. Coates, Appl. Spectrosc. ,10 (1999) 14-17.
17. P. Williams, K. Norris, Near-Infrared technology in the agriculture and food industries, Minnesota, 1998.
18. M. Blanco, I. Villarroya, Trends Anal. Chem., 21 (2002) 240-250.

19. F. E. Barton, *Spectroscopy Europe*, 13 (2002) 12-18.
20. N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 1990.
21. A. Derek, *The Raman Effect*, New York, 2002.
22. A. Weber, *Raman Spectroscopy of Gases and Liquids*, Berlin, 1979.
23. C. V. Raman, K. S. Krishnan, *Nature* 121 (1928) 501-502.
24. P. Geladi, H. Grahn, *Multivariate Image Analysis*, Chichester, 1996.
25. A. Juan, M. Maeder, T. Hanczewicz, R. Tauler, *J. Chemom.*, 22 (2008) 291–298.
26. A. Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Mader, *Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 70-79.
27. M. A. Harthcock, S. C. Atkin, *Appl. Spectrosc.*, 42 (1988) 449-455.
28. B. M. Patterson, G. J. Havrilla, *Appl. Spectrosc.*, 60 (2006) 1256-1266.
29. C. D. Tran, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 38 (2003) 133-153.
30. J. C. Chalmers, P. R. Griffiths, *Handbook of vibrational spectroscopy*, London, 2002.
31. J. Huang, H. Wium, K. B. Qvist, K. H. Esbensen, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 66 (2003) 141-158.
32. D. Clark, M. Henson, F. Laplant, S. Sasic, D. E. Pivonka, J. M. Chalmers, P. R. Griffiths, *Applications of Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Research and Development*, London, 2007.

CAPÍTULO 3

MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

3.1 Calibração

Na grande maioria dos casos, em química analítica, a propriedade de interesse a ser analisada é a concentração de uma espécie presente no meio. Contudo, quando se utilizam técnicas instrumentais de análise, a concentração é uma propriedade que não pode ser observada diretamente, sendo determinada indiretamente por meio de uma relação com outra grandeza, como por exemplo, a absorção ou emissão de luz, numa prática conhecida como calibração. O processo de calibração pode ser definido como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores da propriedade de interesse correspondentes obtidos em padrões [1].

Os métodos de calibração existentes podem ser divididos, quanto à complexidade ou dimensionalidade dos dados, em calibração de ordem zero, primeira e segunda ordem [1]. A Figura 2 mostra uma representação esquemática dos três tipos de dados utilizados nos três níveis de calibração citados para um sistema de análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detecção por arranjo de diodos (DAD).

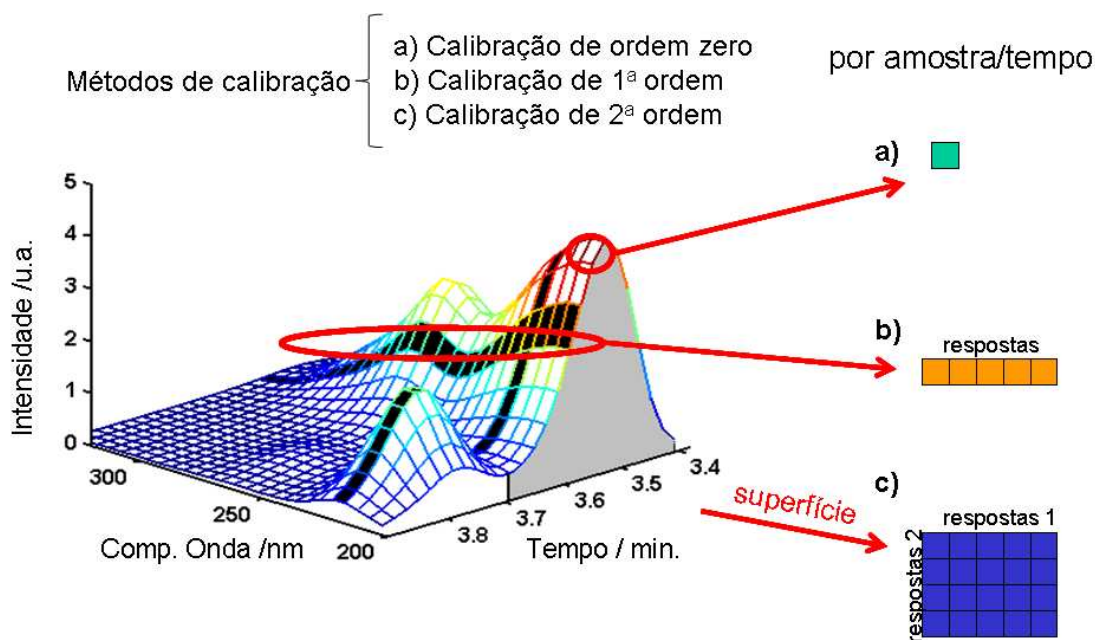


Figura 8. Representação esquemática dos diferentes tipos de dados em um sistema FIA-DAD: (a) escalar (uma única medida instrumental), (b) vetor de dados e (c) matriz de dados.

Em modelos de calibração de ordem zero é obtido um único valor escalar por amostra, sendo então utilizada a calibração univariada. A Figura 8 (parte a) apresenta um ponto na superfície, que corresponde à leitura da absorvância em um único comprimento de onda λ_1 e em um tempo t_1 . Um exemplo típico de instrumentos que geram esse tipo de dados inclui os fotômetros e espectrofotômetros com monitoramento de um único comprimento de onda. Esse tipo de calibração ainda é a mais aplicada em análises de rotina. Entretanto, a aplicação da calibração univariada requer que a grandeza que será medida, por exemplo, a absorvância de um composto, seja livre de interferentes que possam provocar desvios na sua relação com a propriedade de interesse.

Métodos de calibração de primeira ordem fazem uso de um vetor de medidas instrumentais para cada amostra. Através do exemplo da Figura 8 (parte b), é possível monitorar os comprimentos de onda λ_1 a λ_j em um determinado tempo. Exemplos de dados multivariados incluem as medidas espectrométricas em que se monitora uma determinada faixa espectral. Esses métodos possibilitam análises mesmo na presença de interferentes, desde que esses interferentes estejam presentes nas amostras de calibração, determinações simultâneas e análises sem resolução do sinal analítico. Diversos modelos de calibração multivariada vêm sendo utilizados para manipulação desses dados, tais como: Regressão Linear Múltipla (RLM), Regressão por Componentes Principais (PCR) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Esses modelos têm apresentado excelentes resultados, com aplicações em diversas áreas, como no tratamento de dados de infravermelho próximo em análises de bebidas, madeira, polímeros, produtos farmacêuticos e agrícolas [2].

Calibrações de segunda ordem são construídas para métodos que geram uma matriz de dados por amostra. Como é mostrado na Figura 8 (parte c), uma matriz de dimensões $j \times k$, que define a superfície destacada obtida para cada amostra.

Para a análise de "i" amostras, tem-se um tensor de dados \underline{X} de dimensões $i \times j \times k$. Esse tipo de dados é arranjado no formato amostra, variável e variável e pode ser gerado através de diversas técnicas como, por exemplo, a cromatografia

líquida ou gasosa com detecção por espectrometria de massas (HPLC-MS e CG-MS), fluorescência molecular de excitação e emissão, análise por injeção em fluxo com gradiente de pH e detecção por arranjo de diodos [3]. Esses métodos têm a grande vantagem de permitirem a determinação de espécies de interesse na presença de interferentes, mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras de calibração. Essa característica é a chamada vantagem de segunda ordem. Além disso, o perfil de cada composto linearmente independente, presente na amostra, pode ser estimado com dados de segunda ordem [3]. Diversos modelos de calibração multivariada para dados de segunda ordem vêm sendo utilizados, tais como: Resolução de Curvas Multivariadas (MCR) [4-5] e Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC) [6].

3.2 Cartas de controle

Processos são controlados efetuando-se medições de variáveis de interesse em pontos espaçados no tempo e registrando os resultados em cartas de controle. As cartas de controle são as ferramentas principais utilizadas no controle estatístico de processo e têm como objetivo detectar desvios de parâmetros representativos do processo, reduzindo a quantidade de produtos fora das especificações e os custos de produção. Sua utilização pressupõe que o processo seja estatisticamente estável, isto é, não haja presença de causas especiais sistemáticas de variação ou, ainda e de outra forma, que as sucessivas amostragens representem um conjunto de valores independentes ou não correlacionados. Esse pressuposto quase sempre não é atendido e muitas vezes leva à utilização das cartas de controle com limites inadequados e com a frequente ocorrência de alarmes (pontos fora ou próximos aos limites da carta) sem que, necessariamente, representem a presença de uma causa especial [7-9].

Os gráficos de controle representam uma das técnicas estatísticas que servem de apoio ao controle da qualidade de um processo, fornecendo evidências de suas variações tanto de caráter aleatório quanto de caráter determinável. Eles

permitem que se possa atuar no processo de forma preventiva, corrigindo possíveis desvios de qualidade, em tempo real, no momento em que eles estão ocorrendo, não deixando que a situação de possibilidade de ocorrência de não conformidade perdure e acabe com uma possível reprovação do lote final [10]. É importante destacar que um gráfico de controle não permite a identificação de quais são as causas especiais de variação que estão atuando em um processo fora de controle estatístico, mas ele processa e dispõe informações que podem ser utilizadas na identificação destas causas [11].

3.2.1 Cartas de controle univariadas

As cartas ou gráficos de controle univariada(o)s consistem em uma linha central que representa a média dos resultados (respostas) do processo, um par de limites de controle, um dos quais se localiza abaixo (limite inferior) e outro acima da linha central (limite superior), e valores característicos marcados no gráfico representando o estado de um processo. Se todos esses valores marcados estiverem dentro dos limites de controle, sem qualquer tendência particular e a disposição dos pontos dentro dos limites for aleatória, o processo é considerado sob controle. Entretanto, se os pontos incidirem fora dos limites de controle ou apresentarem uma disposição atípica, o processo é julgado fora de controle [12-13]. Os limites de controle dependem do limite de confiança, ou seja, em um mesmo processo pode-se ter limites distintos, por exemplo, com 95% ou mesmo um nível de confiança maior. A Figura 9 representa uma carta de controle univariada em que há uma única amostra fora de controle e os diferentes níveis de confiança que se pode estabelecer para construção dos limites de controle. Na Figura 9 está representado o limite de 95% de confiança.

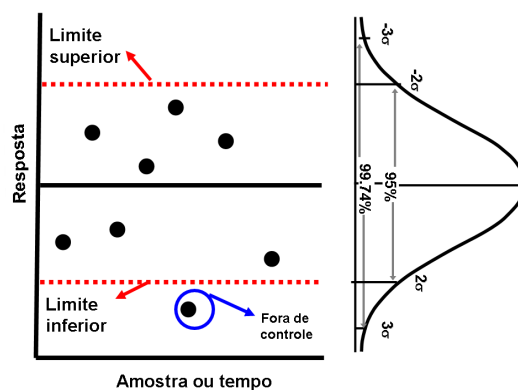


Figura 9. Representação da carta de controle univariada

3.2.2 Cartas de controle multivariadas

As cartas de controle multivariadas são úteis em situações em que se pretende monitorar mais de uma variável de um determinado processo ou produto simultaneamente. Os resultados das cartas de controle multivariadas e univariadas são particularmente diferentes quando se realiza o monitoramento simultâneo de variáveis correlacionadas; nestes casos o uso de cartas de controle multivariadas é recomendado. Nesta tese está sendo proposto a utilização das cartas de controle multivariadas baseadas no cálculo do sinal analítico líquido.

3.2.2.1 Sinal Analítico Líquido (NAS)

O sinal analítico líquido (NAS- do inglês, *net analyte signal*) é definido como a parte do vetor do espectro da amostra que é ortogonal a um subespaço chamado de espaço do interferente [14]. A Figura 10 mostra a representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS. O vetor NAS é diretamente proporcional à concentração do analito de interesse.

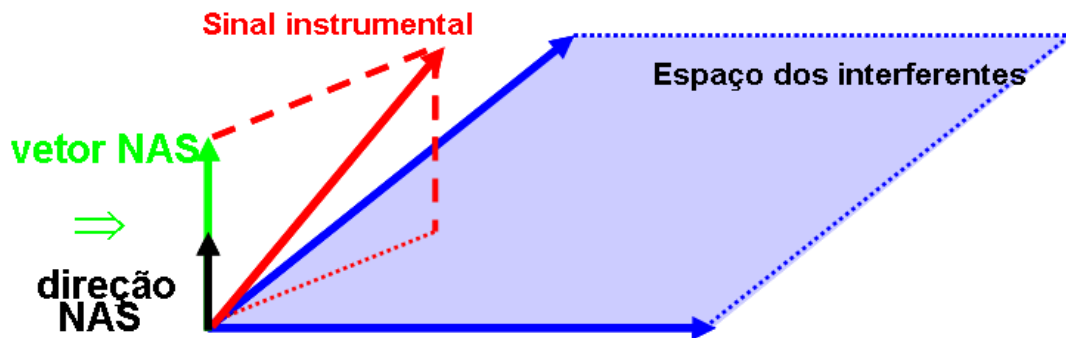


Figura 10. Decomposição do sinal instrumental em sinal analítico líquido (NAS) e Interferentes.

O analito no caso desta tese é o princípio ativo do fármaco, ou seja, a forma polimórfica do fármaco responsável pelo efeito farmacêutico desejado. Este modelo quimiométrico consiste na decomposição do sinal instrumental em três vetores: vetor interferente, descrevendo toda a variação devido aos interferentes (como os excipientes presentes nas formulações farmacêuticas), o vetor NAS, o do analito (fármaco) e o do vetor resíduo [15] (qualquer dado diferente do sinal do interferente e do analito e que idealmente deve conter somente variâncias aleatória-ruído instrumental) conforme mostrado na Figura 11.

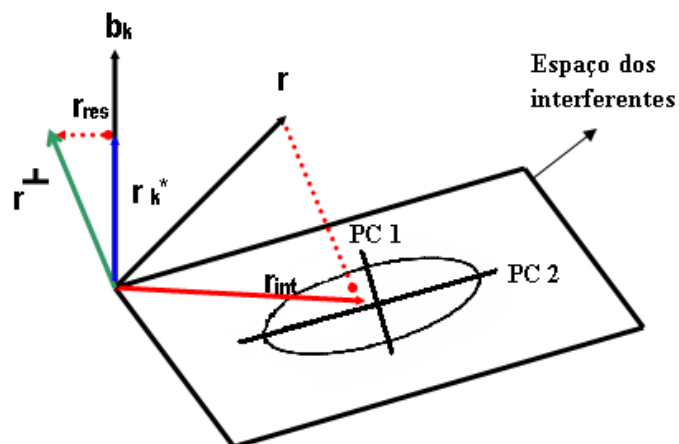


Figura 11. Decomposição do sinal instrumental (r) em um vetor NAS (r_{k^*}), vetor interferente (r_{INT}) e vetor resíduo (r_{RES}).

Para a construção das cartas de controle, são necessários dois conjuntos de dados:

- a) Amostras do placebo; todos os constituintes com exceção do analito (\mathbf{X}_k).
- b) Amostras da matriz (formulação) incluindo o analito.

Dessa forma, monitora-se esses três vetores simultaneamente, fazendo com que a informação do princípio ativo e do interferente possam ser monitoradas separadamente, porém simultaneamente. A próxima etapa para o desenvolvimento das cartas de controle é determinar os limites de controle, utilizando-se as amostras consideradas dentro das especificações (denominadas dentro de controle). A validação é realizada com novas amostras não utilizadas no desenvolvimento das cartas, as quais podem estar fora das especificações (denominadas fora de controle) ou dentro delas.

A primeira etapa do desenvolvimento do modelo quimiométrico é descrita pela construção do espaço (\mathbf{PP}^+), o qual é denominado de espaço do interferente [15]. Os vetores espectrais (espectros de infravermelho próximo ou Raman representados por um vetor) podem ser projetados no espaço do interferente. A partir do espaço do interferente, calcula-se o vetor NAS relacionado à concentração do analito. Dessa forma, pode-se dividir qualquer espectro \mathbf{r} ($J \times 1$) em três partes :

- Vetor NAS (\mathbf{r}_k^*): para cada analito k existe um vetor NAS.
- Vetor interferente (\mathbf{r}_{INT})
- Vetor residual (\mathbf{r}_{RES})

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_{INT} + \mathbf{r}_k^* + \mathbf{r}_{RES} \quad (14)$$

em que “J” refere-se ao número de variáveis.

3.2.2.2 Espaço do interferente

O espaço do interferente é construído através da análise de componentes principais (PCA), equação 15. A partir do PCA será fornecido o peso (\mathbf{P}), que define um modelo para o espaço do interferente.

$$\mathbf{X}_{-k} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (15)$$

Para a construção deste espaço, utilizam-se espectros (\mathbf{X}_{-k}) onde se coletam todas as informações espectrais, exceto as do analito de interesse. Nesta tese, o sinal instrumental utilizado para a construção do espaço do interferente refere-se às amostras do excipiente das formulações farmacêuticas. Esses espectros irão fornecer toda informação referente ao interferente. Os espectros dos interferentes são decompostos na matriz peso (\mathbf{P}^T) e em uma matriz de escores (\mathbf{T}), as quais representam respectivamente a contribuição de cada variável e de cada amostra do modelo PCA. Como a PCA irá fornecer várias componentes principais (PCs), deve-se selecionar um determinado número de PCs que possa representar uma quantidade suficiente de informação descritiva do fenômeno em estudo. As componentes principais selecionadas compoem a variação sistemática e as componentes restantes são denominadas de variação não sistemática. Utilizando-se, por exemplo, duas componentes principais, obtêm-se um plano, Figura 12.

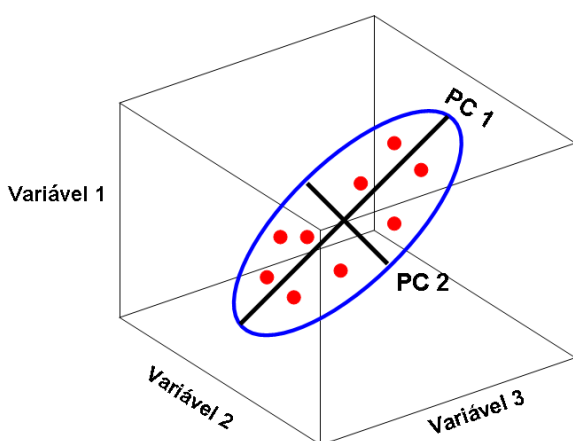


Figura 12. Ilustração do desenvolvimento do espaço interferente utilizando duas componentes principais.

3.2.2.3 Vetor Interferente

O próximo passo é a determinação do vetor interferente, r_{INT} , que contém a informação de todas as espécies presentes na amostra exceto a informação referente à espécie de interesse. Essa determinação é realizada através de uma projeção ortogonal baseada na operação matricial que estabelece que para uma matriz P qualquer, a matriz PP^+ (em que “+” indica a matriz pseudo inversa de Moore-Penrose) é uma matriz de projeção.

A equação que fornece o vetor interferente é:

$$r_{INT} = PP^+ r \quad (16)$$

onde r é o vetor com todas as informações espectrais e PP^+ define o espaço interferente, matriz de projeção. A Figura 13 ilustra a projeção do sinal instrumental, r , no espaço interferente para se determinar o componente do sinal que é referente a informação dos interferentes, r_{INT} .

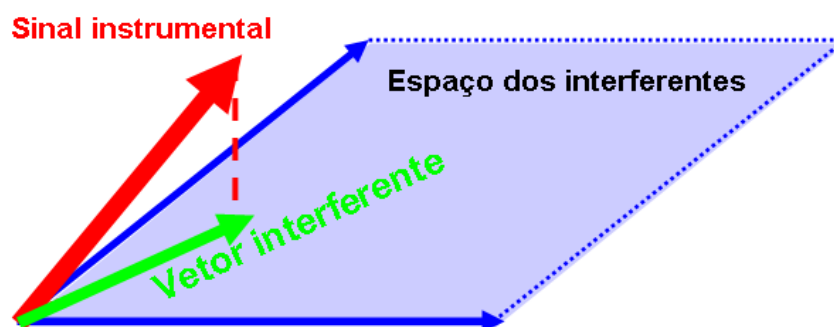


Figura 13. Projeção do sinal instrumental, r , no espaço interferente obtendo-se o vetor interferente, r_{INT} .

3.2.2.4 Vetor Regressão NAS

O sinal analítico líquido foi definido inicialmente como o vetor ortogonal ao espaço interferente. A parte ortogonal ao espaço interferente será definida por:

$$B_k = (I_j - PP^+) R \quad (17)$$

onde \mathbf{R} representa as informações espectrais de todos os constituintes das amostras e $(\mathbf{I}_j - \mathbf{P} \mathbf{P}^+)$ é a projeção ortogonal no espaço dos interferentes. Para determinar a direção do vetor de regressão NAS, calcula-se a média de todos os vetores ortogonais ao espaço interferente

$$\mathbf{b}_k = \frac{\sum_{i=1}^I \mathbf{B}_{k,i}}{I} \quad (18)$$

onde I é o número de amostras usadas para construir o modelo.

Esse vetor \mathbf{b}_k é denominado vetor de regressão NAS. O vetor NAS de qualquer espectro pode ser calculado pela sua projeção no vetor de regressão NAS:

$$\mathbf{r}_k^* = \mathbf{b}_k (\mathbf{b}_k^T \mathbf{b}_k)^{-1} \mathbf{b}_k^T \mathbf{r} \quad (19)$$

É importante notar, na figura 11, que existe uma pequena diferença entre \mathbf{r}^\perp e \mathbf{r}_k^* , que é o vetor resíduo. Então, como:

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_{\text{int}} + \mathbf{r}_k^* + \mathbf{r}_{\text{res}} \quad (20)$$

logo,

$$\mathbf{r}_{\text{res}} = \mathbf{r} - \mathbf{r}_{\text{int}} - \mathbf{r}_k^* \quad (21)$$

onde:

\mathbf{r}_{res} : vetor resíduo

\mathbf{r}_k^* : vetor NAS

\mathbf{r}_{int} : vetor interferente

\mathbf{r} : vetor de dados

3.2.2.5 Cálculo dos limites estatísticos para as cartas NAS, Interferente e Resíduos

Para o cálculo dos limites estatísticos das cartas NAS, interferente e resíduo, utilizam-se somente amostras que estão dentro de controle. Essas amostras são organizadas em uma matriz denominada (\mathbf{R}_{noc}) e possuem dimensão ($j \times l_{noc}$) em que " l_{noc} " é o número de amostras dentro de controle e " j " o número de variáveis espectrais. O subscrito "noc" (do inglês, "*normal operating condition*") indica que essa matriz só possui amostras dentro de controle [16].

3.2.2.6 Carta de Controle NAS

A projeção do espectro da amostra no vetor de regressão NAS é proporcional à concentração do analito na amostra. Essa projeção é denominada NAS [17]. Os limites estatísticos da carta NAS para cada amostra dentro de controle são calculados a seguir:

$$\mathbf{nas}_{noc} = \mathbf{R}_{noc}^T \mathbf{b}_k \quad (22)$$

onde \mathbf{nas}_{noc} é o vetor com os valores do NAS para cada amostra sob controle da matriz \mathbf{R}_{noc} . Calculando a média e o desvio-padrão do vetor \mathbf{nas}_{noc} , pode-se computar e graficar os limites estatísticos da carta NAS, como mostra a equação 23. Considerando o limite com 95% de confiança [18], temos:

$$\text{Limite}_{95\%} = \overline{\mathbf{nas}_{noc}} \pm 2s_{noc} \quad (23)$$

onde:

$\overline{\mathbf{nas}_{noc}}$: média do vetor \mathbf{nas}_{noc} que possui dimensão (1x1)

s_{noc} : desvio-padrão do vetor \mathbf{nas}_{noc} que possui dimensão (1x1)

Assume-se que os valores do NAS seguem uma distribuição normal, que pode ser detectada por um teste de normalidade. A figura 14 a seguir representa a carta NAS.

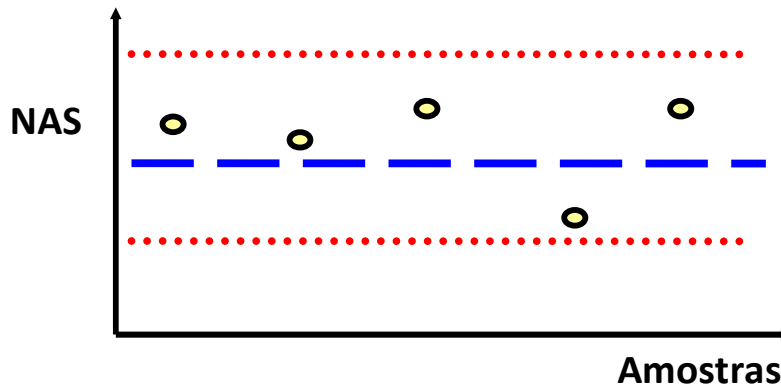


Figura 14. Representação da Carta de Controle NAS e dos limites de confiança.

3.2.2.7 Carta de Controle do Interferente

Todos os vetores que fazem parte da matriz R_{noc} têm uma fração projetada no espaço dos interferentes, como mostrado na Figura 11. Amostras futuras também devem ser projetadas nesse espaço. Dessa forma, amostras projetadas dentro do limite representado pela figura geométrica, que se aproxima de uma elipse, e que está graficada no espaço dos interferentes segundo a Figura 11, são denominadas dentro de controle, enquanto as amostras projetadas além desses limites são denominadas fora de controle. Vale lembrar que o espaço dos interferentes foi construído através do modelo PCA, no qual se usa a matriz de pesos, conforme mostrado na equação 15.

Novamente, na Figura 11, temos que as duas retas que se encontram dentro do limite referem-se às duas primeiras componentes principais da PCA. Sendo assim, pode-se dizer que a carta interferente é baseada na distância da projeção das amostras ao centro dos eixos formados pelas duas primeiras componentes principais. Para construir a carta interferente, primeiramente, deve-se projetar os vetores que são os espectros das amostras que estão dentro de controle no espaço dos interferentes, de acordo com a equação 24.

$$\mathbf{R}_{int} = \mathbf{P}\mathbf{P}^+ \mathbf{R}_{noc} \quad (24)$$

Onde:

\mathbf{R}_{int} : matriz interferente com dimensão $(j \times I_{noc})$

Então, é necessário calcular as novas coordenadas para esses interferentes em um novo sistema de eixos (matriz escore), da seguinte forma:

$$\mathbf{T}_{noc} = \mathbf{R}_{int}^T \mathbf{P} (\mathbf{P}^T \mathbf{P})^{-1} \quad (25)$$

Agora, a distância das amostras ao centro do eixo das duas componentes principais é calculada

$$\mathbf{d}_{noc,i} = \left(\mathbf{t}_{noc,i} - \bar{\mathbf{t}}_{noc} \right)^T \mathbf{S}^{-1} \left(\mathbf{t}_{noc,i} - \bar{\mathbf{t}}_{noc} \right) \quad (26)$$

onde

\mathbf{T}_{noc} : matriz escore com dimensão $(I_{noc} \times A)$, em que "A" é o número de componentes principais retidos no modelo PCA.

$\bar{\mathbf{t}}_{noc}$: valor médio para todos os vetores contidos na matriz \mathbf{T}_{noc} .

\mathbf{S} : denota a matriz de covariância centrada na média dos escores com dimensão $(A \times A)$.

$\mathbf{t}_{noc,i}$: vetor escore com dimensão $(1 \times A)$

$d_{noc,i}$: distância dos interferentes ao centro dos eixos formados pelas duas primeiras componentes principais.

Dessa forma, o limite com 95% confiança para a carta interferente pode ser calculado e graficado na Figura 15 :

$$D_{limite,95\%} = F_{0,95}(A, I_{noc} - A) \left[\frac{A \left(I_{noc}^2 - I_{noc} \right)}{I_{noc} (I_{noc} - A)} \right] \quad (27)$$

onde

$F_{0,95}$: valor da distribuição F com 95% de confiança em que o índice $[A, (I_{noc}-A)]$ refere-se ao número de graus de liberdade.

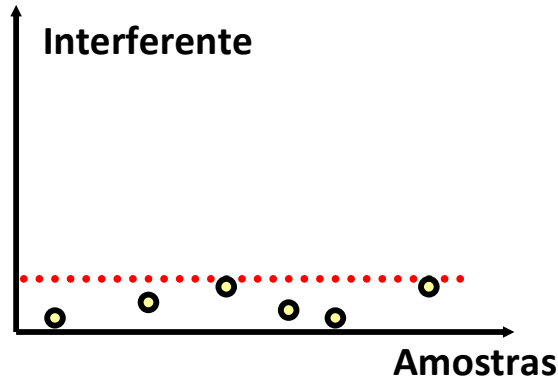


Figura 15. Representação da Carta de Controle Interferente e do limite de confiança.

3.2.2.8 Carta de Controle do Resíduo

A carta resíduo baseia-se na parte do sinal que não é modelada pelo modelo e pelo limite estatístico-Q [19]. De acordo com a Figura 11, temos que o resíduo provém da decomposição do vetor que é ortogonal ao vetor interferente (\mathbf{r}^T). Vale ressaltar que, a partir da decomposição desse vetor, temos como resultado o vetor NAS e o vetor resíduo. Para o cálculo do resíduo, é necessário o cálculo da matriz NAS (equação 28) e da matriz interferente (equação 24). Dessa forma, calcula-se a matriz resíduo, segundo a equação 29.

$$\mathbf{R}_{noc}^* = \mathbf{b}_k \left(\mathbf{b}_k^T \mathbf{b}_k \right)^{-1} \mathbf{b}_k^T \mathbf{R}_{noc} \quad (28)$$

Onde:

\mathbf{R}_{noc}^* : matriz NAS que possui dimensão $(j \times l_{noc})$

$$\mathbf{R}_{res} = \mathbf{R}_{noc} - \mathbf{R}_{int} - \mathbf{R}_{noc}^* \quad (29)$$

Então, de acordo com Jackson e Mudholkar [19], é calculado o resíduo Q_{noc} da seguinte forma:

$$Q_{noc} = \mathbf{R}_{res}^T \mathbf{R}_{res} \quad (30)$$

onde:

\mathbf{Q}_{noc} : matriz com dimensão $(I_{noc} \times I_{noc})$.

A diagonal da matriz \mathbf{Q}_{noc} contém os valores Q-estatístico que serão graficados na carta resíduo. O limite de confiança para carta Q [19] é calculado e plotado na Figura 16 conforme as equações 31, 32 e 33.

$$Q_{\alpha} = \theta_1 \left[\frac{c_{\alpha} \sqrt{2\theta_2} h_0^2}{\theta_1} + 1 + \frac{\theta_2 h_0 (h_0 - 1)}{\theta_1^2} \right]^{h_0} \quad (31)$$

Onde

C_{α} : desvio-padrão normal

$$\theta_i = \sum_{j=k+1}^n \lambda_j^i \quad i: 1, 2 \text{ e } 3 \quad (32)$$

“k” corresponde ao número de componentes principais retidos no modelo e “n” ao número total de componentes principais (ou o número total de amostras).

$$h_0 = 1 - \left(\frac{2\theta_1\theta_3}{3\theta_2^2} \right) \quad (33)$$

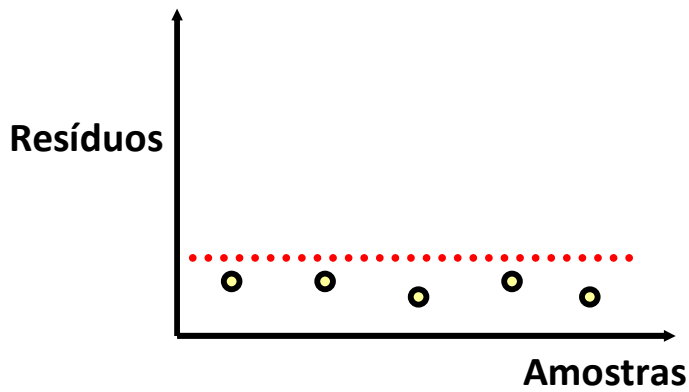


Figura 16. Representação da Carta de Controle Resíduo e do limite de confiança.

3.2.2.9 Validação das Cartas de Controle (Modelo)

3.2.2.9.1 Carta de controle NAS para novas amostras

O valor NAS é calculado de acordo com a equação 28 e graficado na carta NAS de calibração, segundo a Figura 17.

$$nas_{novo} = \mathbf{R}_{novo}^T \mathbf{b}_k \quad (34)$$

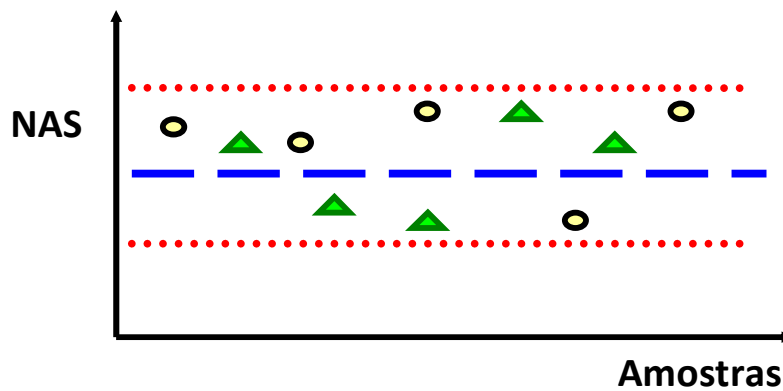


Figura 17. Representação da Carta de Controle NAS e dos limites de confiança.

● Amostras de Calibração; ▲ Amostras de Validação

3.2.2.9.2 Carta de controle do interferente para novas amostras

O valor dos interferentes para as novas amostras são calculados e graficados na carta interferente de calibração, de acordo com a Figura 18 através das equações 35, 36 e 37.

$$\mathbf{R}_{\text{int,novo}} = \mathbf{P}\mathbf{P}^T \mathbf{R}_{\text{novo}} \quad (35)$$

$$\mathbf{T}_{\text{novo}} = \mathbf{R}_{\text{novo}}^T \mathbf{P} \left(\mathbf{P}^T \mathbf{P} \right)^{-1} \quad (36)$$

$$\mathbf{d}_{\text{novo},i} = \left(t_{\text{novo},i} - \bar{t}_{\text{novo}} \right)^T \mathbf{S}^{-1} \left(t_{\text{novo},i} - \bar{t}_{\text{novo}} \right) \quad (37)$$

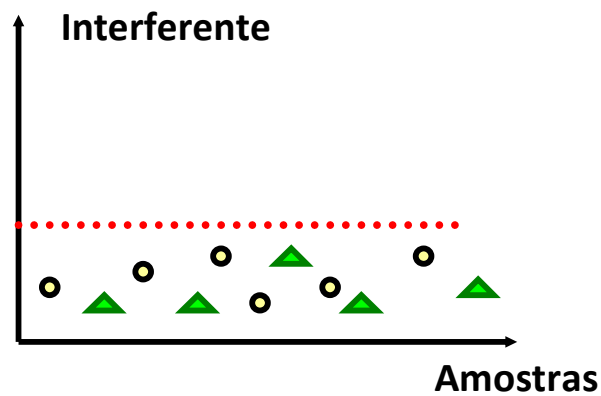


Figura 18. Representação da Carta de Controle Interferente e do limite de confiança.

● Amostras de Calibração; ▲ Amostras de Validação

3.2.2.9.3 Carta de controle dos resíduos para novas amostras

Também os resíduos das novas amostras são calculados e graficados na carta resíduo de calibração, como mostrado na Figura 19 através das equações 38, 39 e 40 a seguir.

$$\mathbf{R}_{novo,k}^* = \mathbf{b}_k \left(\mathbf{b}_k^T \mathbf{b}_k \right)^{-1} \mathbf{b}_k^T \mathbf{R}_{novo} \quad (38)$$

$$\mathbf{R}_{res,novo} = \mathbf{R}_{novo} - \mathbf{R}_{int,novo} - \mathbf{R}_{novo,k}^* \quad (39)$$

$$\mathbf{Q}_{novo} = \mathbf{R}_{res,novo}^T \mathbf{R}_{res,novo} \quad (40)$$

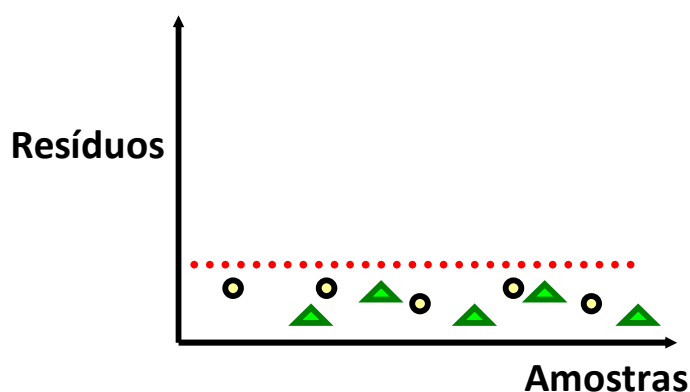


Figura 19. Representação da Carta de Controle Resíduos e do limite de confiança.

● Amostras de Calibração; ▲ Amostras de Validação

3.3 Método quimiométrico PLS para análise de imagens

O PLS, do inglês "*partial least squares*", é o método mais usado em calibração multivariada. Os dados para a construção do modelo PLS são organizados em dois blocos, da seguinte forma: os vetores de respostas instrumentais obtidos para cada amostra são organizados em uma matriz $\mathbf{X}_{n,m}$, de variáveis independentes, em que "n" representa o número de amostras e "m" o número de variáveis espectrais. Os valores referentes à propriedade de interesse são organizados em um vetor \mathbf{y} correspondente a cada amostra da matriz $\mathbf{X}_{n,m}$

[20]. A matriz e o vetor são decompostos em seus respectivos escores e pesos mais uma matriz de resíduos correspondente aos dados originais que não puderam ser modelados. Após a decomposição, que pode ser realizada, por exemplo, através do algoritmo NIPALS [21], uma relação linear é estabelecida entre os escores de \mathbf{X} e os escores de \mathbf{Y} . O modelo de decomposição para o método PLS pode ser representado por [20]:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}_A \mathbf{P}_A^T + \mathbf{E}_X \quad (41)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U}_A \mathbf{Q}_A^T + \mathbf{E}_y \quad (42)$$

em que: \mathbf{T}_A e \mathbf{U}_A correspondem aos escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. \mathbf{P}_A^T e \mathbf{Q}_A^T são os pesos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. \mathbf{E}_X e \mathbf{E}_y correspondem aos resíduos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. “A” é o número de variáveis latentes do modelo.

Dezenas de aplicações utilizando modelos PLS podem ser encontradas para fármacos na literatura, demonstrando o potencial do PLS para modelagem de dados multivariados [22-23]. Nesta tese, foi utilizado o método PLS para o estudo de polimorfismo em fármacos através de dados obtidos pela técnica de espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo. Como os dados obtidos por essa técnica são do tipo (o, o, v), ou seja, [objeto (posição y), objeto (posição x) e variável (comprimento de onda- λ)] é necessário realizar o desdobramento dos dados em uma matriz ((yx) \times λ) de duas dimensões para se construir o modelo de calibração multivariada PLS [24]. Para melhor entendimento da utilização do método PLS utilizando a espectroscopia de imagem será mostrado os dois estágios necessários para a construção do modelo PLS e um terceiro estágio necessário para a construção do mapa químico do polimórfico ou dos constituintes presentes no medicamento. As Figuras 20 a 22 representam cada etapa desses diferentes estágios.

3.3.1 Construção do modelo de calibração PLS

O primeiro estágio consiste em construir o modelo de calibração conforme mostram os passos a seguir e encontra-se representado na Figura 20.

- a) A imagem é obtida diretamente da superfície do comprimido e consiste de um arranjo tridimensional de dados, em que x e y são os eixos das coordenadas espaciais característica da superfície do comprimido e z é o eixo que representa o comprimento de onda (λ). Logo, em cada pixel da imagem, a primeira dimensão representa a posição no eixo x , a segunda dimensão representa a posição no eixo y e a terceira dimensão representa o espectro obtido.
- b) No próximo passo, para cada amostra, o arranjo tridimensional de dados é desdobrado através da eliminação de uma dimensão espacial, resultando em uma matriz $((yx) \times \lambda)$. A informação sobre a posição do pixel é mantida nas linhas da matriz;
- c) Com os dados desdobrados, o espectro médio da matriz $((xy) \times \lambda)$ é obtido. Cada espectro médio irá representar uma amostra na construção do modelo de regressão;
- d) Desta maneira, os espectros médios de cada comprimido são usados para obter a matriz (\mathbf{X}) que será relacionada com a concentração conhecida do composto de interesse (\mathbf{y}) utilizando, agora, dados de primeira ordem;

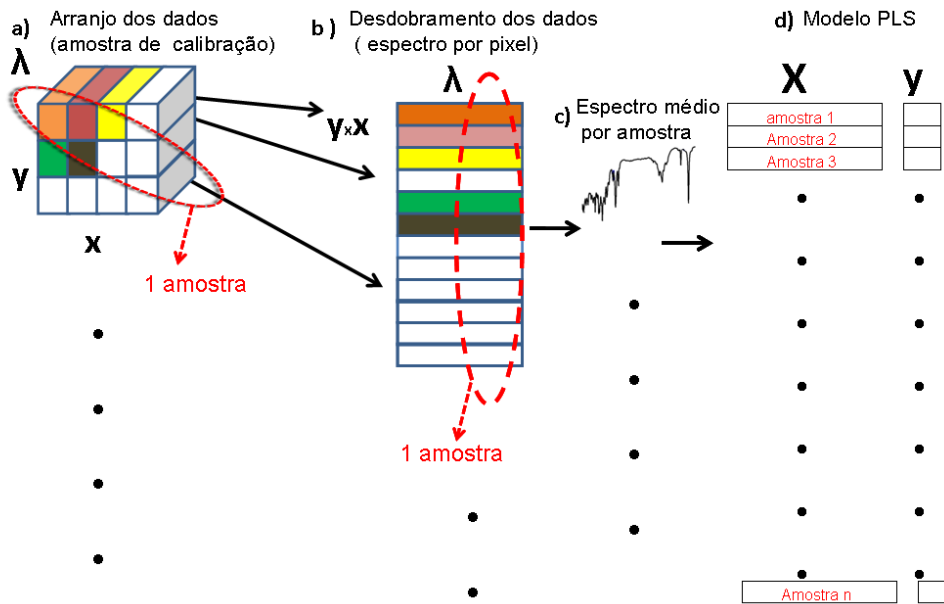


Figura 20. Representação da etapa de calibração multivariada do modelo PLS utilizando os dados obtidos por espectroscopia de imagem.

3.3.2 Validação do modelo PLS

O segundo estágio consiste em validar o modelo de calibração conforme mostram os passos a seguir descritos na Figura 21. No processo de validação, os estágios e), f) e g) representados na Figura 21 são realizados como feitos em a), b) e c) da Figura 20, porém usando amostras de validação. Já no estágio h), o modelo de calibração PLS para a propriedade de interesse é usado para prever a concentração das amostras de validação.

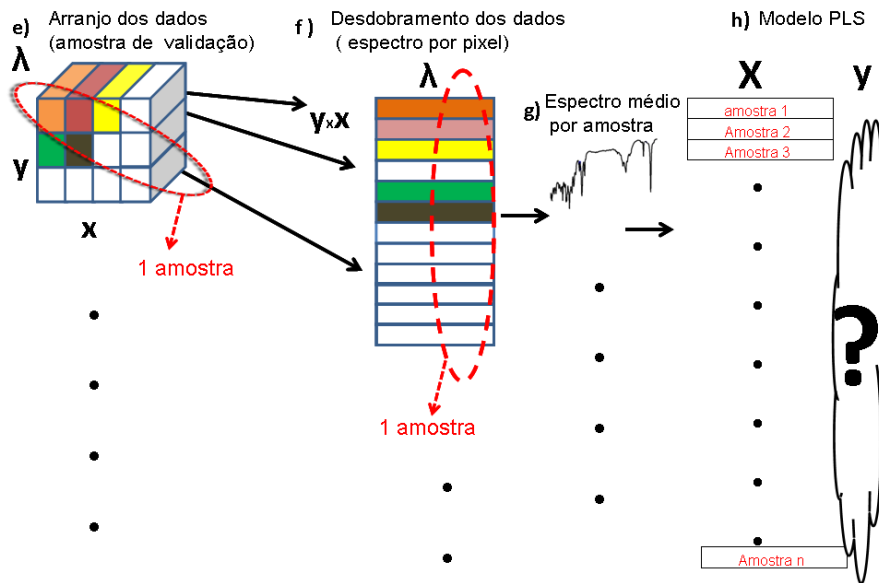


Figura 21. Representação da etapa de validação do modelo PLS utilizando os dados obtidos por espectroscopia de imagem.

3.3.3 Construção do mapa de distribuição de concentração

Para a construção dos mapas de distribuição de concentração, utilizam-se os modelos de calibração desenvolvidos. Neste terceiro estágio, utilizam-se amostras para previsão da propriedade de interesse (concentração) nos pixels. Na Figura 22, está representada uma amostra na qual se pode determinar o mapa químico dos constituintes presentes, desde que se construa anteriormente o modelo de calibração correspondente.

Primeiramente, são utilizados os modelos de calibração desenvolvidos para a previsão nos pixels da imagem. Logo, será prevista a propriedade de interesse

(concentração) para a espécie de interesse em cada pixel da imagem. A espécie de interesse poderá ser o princípio ativo ou o excipiente que compõem as formulações farmacêuticas. Dessa forma, quando se quer prever o princípio ativo, utiliza-se o modelo de calibração desenvolvido para o princípio ativo. Já quando se quer prever o excipiente, utiliza-se o modelo de calibração desenvolvido para o excipiente. Na Figura 22 mostra diferentes modelos PLS que se pode construir para a construção do mapa de distribuição de concentração da espécie de interesse. Se existir 5 excipientes na formulação farmacêutica e um princípio ativo é necessário que se construa 6 modelos de calibração, de acordo com a Figura 20, para cada um dos constituintes presentes. Nesta tese foi desenvolvido um modelo de calibração PLS para cada um dos dois polimórficos mais importante do fármaco Piroxicam. O resultado que se obtém após a utilização dos modelos PLS são vetores que possuem a concentração por pixel da espécie para a qual se pretende construir o mapa de distribuição. A Figura 22 mostra na sua parte superior a representação de um vetor, o qual é composto pela concentração por pixel para cada um dos constituintes que pretende-se construir o mapa de distribuição de concentração. Após isso, é feito o rearranjo da propriedade de interesse (concentração) obtida de cada pixel para a espécie de interesse para que se tenha o mapa de distribuição de concentração dos pixels, formando uma imagem para o composto de interesse.

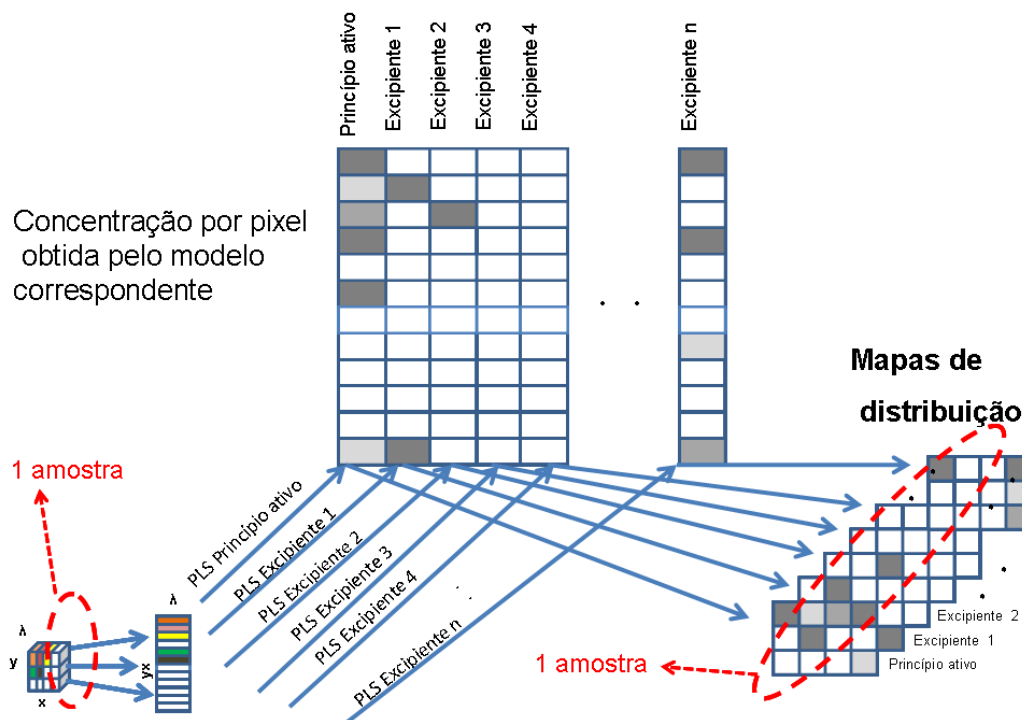


Figura 22. Representação da etapa de construção do mapa de distribuição de concentração da espécie de interesse.

Antes de iniciar os próximos tópicos da tese, é necessário frisar a comparação das Figuras 20 e 21 com a Figura 22. Nas Figuras 20 e 21, cada imagem está relacionada com um valor da propriedade de interesse que neste caso é a concentração. Considerando que tenhamos 50 amostras (imagens) teremos 50 valores de concentração. Já a Figura 22, mostra como construir o mapa de distribuição da concentração do composto de interesse através do mapeamento da amostra utilizando o modelo de calibração construído. Agora, o objetivo é quantificar a concentração de um constituinte, em cada pixel da imagem. Dessa forma, cada pixel representará uma amostra, ou seja, se a imagem possuir 100x100 pixels, haverá para essa imagem 10.000 valores da propriedade de interesse, ou seja, um valor para cada pixel (amostra). Essa diferença é fundamental para a compressão das diferenças nos procedimentos de quantificação quando se quer mapear as concentrações em uma determinada amostra.

3.4 Referência bibliográfica do capítulo 3

1. M. M. Sena, M. G. Trevisan, R. J. Poppi, *Quim. Nova*, 28 (2005) 910-920.
2. D. A. Burns, E. W. Ciurczak, *Handbook of near-infrared analysis*, 2001.
3. K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 782-791.
4. A. Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler, *J. Chemom.*, 22 (2008) 291–298.
5. R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 30 (1995) 133-146.
6. M.M. Sena, M.G. Trevisan, R.J. Poppi, *Talanta*, 68 (2006) 1707-1712.
7. D.C. Montgomery, *Introduction to Statistical Quality Control*, New York, 1996.
8. J. E. Jackson, *Statistical Process Control in Manufacturing*, New York, 1991
9. J.R. Hair, J.F. Anderson, R.E. Tatham, *Multivariate Data Analysis*, 1995.
10. B. Skagerber, J.F. Macgregor, *J. Chemom.*, 5 (1992) 345-360.
11. T. Kourti, J.F. Mcgregor, *J. Qual. Tech.*, 28 (1996) 409-428.
12. H. Hotelling, *Techniques of Statistical Analysis*, New York, 1947.
13. A.J. Duncan, *Quality Control And Industrial Statistics*, 1986
14. A. Lorber, N. M. Farber, B. R. Kowalski, *Anal Chem.* 69 (1997) 1620-1626.
15. E. T. S. Skibsted, H. F. M. Boelens, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, N. W. Broad, D. R. Rees, D. T. Witte *Anal. Chem.* 77 (2005) 7103-7114.
16. H. J. Ramaker, N. M. Sprang, *Statistical batch process monitoring*, University Amsterdam, tese de doutorado, 2004.
17. A. Lorber, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1167-1175.
18. J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, New York, 2000.
19. J. E. Jackson, G. S. Mudholkar, *Technometrics* 21 (1979) 341-49.
20. H. Martens, T. Naes, *Multivariate calibration*, New York, 1996.
21. P. Geladi, B. R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, 185 (1986) 1-17.
22. P. Damiani, A. J. Nepote, M. Bearsotti, A. C. Olivieri, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2798-2806.
23. A. B. Moreira, I. L. T. Dias, G. Oliveira-Neto, E. A. G. Zagatto, M. M. C. Ferreira, L. T. Kubota, *Talanta*, 67 (2005) 65-69.
24. J. Huang, H. Wium, K. B. Qvist, K. H. Esbensen, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 66 (2003) 141-158.

CAPÍTULO 4

**CONSTRUÇÃO DAS CARTAS DE CONTROLE
MULTIVARIADAS BASEADAS NO CÁLCULO DO SINAL
ANALÍTICO LÍQUIDO PARA AVALIAÇÃO DA
COMPOSIÇÃO POLIMÓRFICA DO FÁRMACO PIROXICAM
UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO
PRÓXIMO**

4. Aplicação 1: Construção das cartas de controle multivariadas baseadas no cálculo do sinal analítico líquido para avaliação da composição polimórfica do fármaco Piroxicam utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo.

4.1 Parte experimental

Neste trabalho, o fármaco Piroxicam foi obtido através da doação pela empresa farmacêutica EMS-Sigma Pharma. Antes de iniciar o estudo, foi obtido o difratograma de difração de raios-x do fármaco em pó, seguida da comparação do resultado obtido com a literatura [1,2]. As formas polimórficas II e III foram preparadas a partir da forma polimórfica I e também caracterizadas pela técnica de difração de raios-x em pó. A forma II (agulha) foi obtida pela cristalização, através da evaporação de uma solução saturada de Piroxicam (forma I) em etanol a temperatura ambiente [3], enquanto que a forma III foi obtida pela mesma solução, porém através do resfriamento da solução em um banho de gelo seguido de filtração [3].

Sessenta e duas amostras contendo o princípio ativo (Piroxicam) nas suas diferentes formas polimórficas I, II e III foram preparadas em excipiente (celulose, lauril sulfato de sódio, estereato de magnésio, croscarmelose, povidona e lactose) e 10 amostras denominadas de placebo, as quais possuem somente o conteúdo presente no excipiente, foram também preparadas. Todas essas amostras com massa total de 400mg foram divididas em 4 grupos: grupo A, grupo B, grupo C e grupo D. As amostras do grupo A, um total de 10, possuem na sua constituição somente a forma polimórfica I em diferentes concentrações, na presença de excipientes. Essas amostras são denominadas sob controle. As amostras dos grupos B e C possuem somente as formas polimórficas II e III, respectivamente, em diferentes concentrações na presença de excipientes. Já o grupo D é composto por 35 amostras que possuem a forma polimórfica I na presença de excipiente. As amostras pertencentes aos grupos B-D foram utilizadas para

validação enquanto que as amostras do grupo A para a calibração. As faixas de concentração de cada composto adicionado nesses grupos estão mostrados na tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Composição dos grupos estudados

Grupo	Forma I ((%)m/m)	Forma II ((%)m/m)	Forma III ((%)m/m)	Excipiente ((%)m/m)
A	30-40	0	0	70-60
B	0	20-25	0	80-75
C	0	0	15-20	85-80
D	30-40	0	0	70-60

Todas as amostras foram pesadas em uma balança analítica e misturadas em vortex durante 5 minutos. Após isso, todas as amostras foram colocadas em um moinho de facas por mais um minuto. Finalmente, elas foram homogenizadas em um vortex por mais 1 minuto. Os espectros das amostras, na forma de pó, foram obtidos em um espectrômetro Thermo Nicolet Antaris equipado com uma fonte de tungstênio no módulo de esfera de integração com detector de AsInGa. A aquisição dos espectros foi realizada na faixa de 4.000 a 10.000 cm^{-1} , usando 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} . As formas polimórficas I, II e III foram caracterizadas por um difratômetro de raios-x Shimadzu XRD 6000 com fonte de $\text{Cu K}\alpha$ emitindo em 1.5406 Å, utilizando uma voltagem de 40Kv, corrente de 30 mA e velocidade de varredura de $2^\circ 2\theta/\text{min}$. A análise dos dados foi realizada no programa Matlab versão 6.5 utilizando rotinas desenvolvidas neste trabalho.

4.2 Resultados e discussões

A técnica de difração de raios-x é muito útil para análise de polimorfismo do fármaco Piroxicam na forma de pó, pois as diferentes formas polimórficas desse fármaco apresentam diferentes difratogramas. Os difratogramas das formas polimórficas I, II e III, obtidas neste trabalho, estão mostrados na Figura 23 e são similares aos publicados na literatura [1,2].

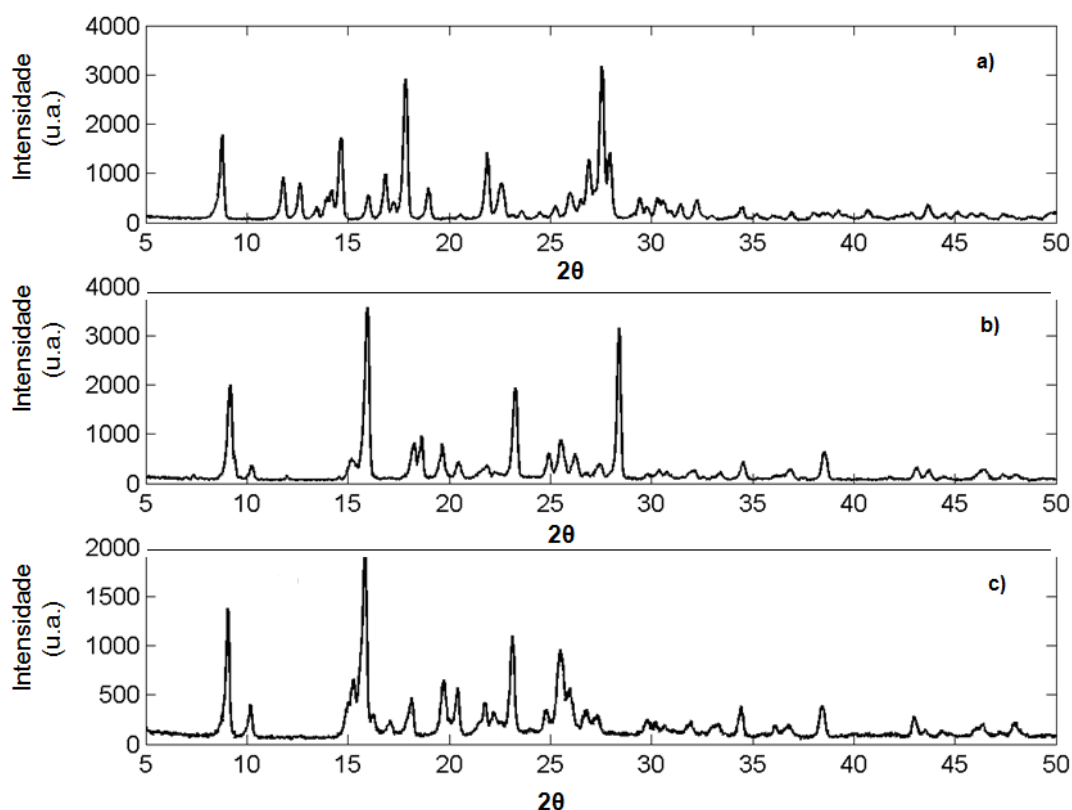


Figura 23. Difratogramas de raios-x em pó das formas polimórficas do Piroxicam: **(a)** Forma I (prisma); **(b)** Forma II (agulha); **(c)** Forma III.

Uma análise mais detalhada da estrutura dos cristais dos diferentes polimorfos pode confirmar ou refutar se as diferentes formas polimórficas do fármaco Piroxicam realmente foram obtidas. Então, antes da construção das cartas de controle, foi realizada a caracterização das três diferentes formas polimórficas do Piroxicam obtidas por difração de raios-x utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados, quando comparados com a literatura [4], confirmam a obtenção das três diferentes formas polimórficas. Na

Figura 24, parte a, pode-se visualizar os cristais no formato de um prisma que compõem a forma polimórfica denominada forma I ou forma prismática [4]. Já na Figura 24, parte b, é mostrada a forma polimórfica II também conhecida como forma de agulhas, pois os seus cristais são pontiagudos, o que faz lembrar agulhas. O polimorfo III, mostrado na Figura 24, parte c, possui cristais cujo as formas não se parecem totalmente com prismas e nem com agulhas. Na literatura pesquisada, não foi encontrada outra designação para o polimorfo III, ou seja, sempre esse polimorfo é citado como forma polimórfica III.

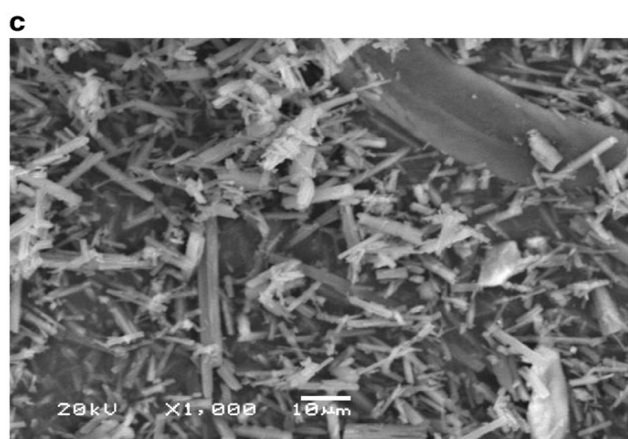
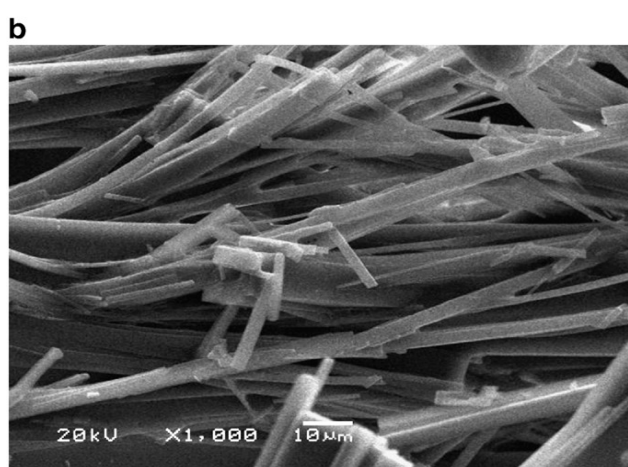
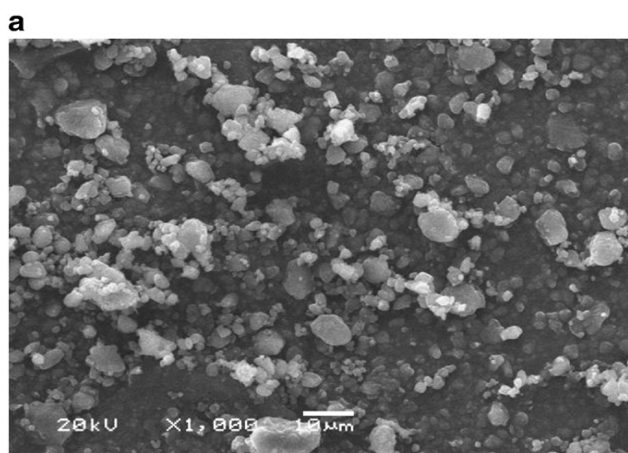


Figura 24. Micrografia das formas polimórficas do Piroxicam: **(a)** Forma I (prisma) ; **(b)** Forma II (agulha) ; **(c)** Forma III.

A Figura 25 mostra os diferentes espectros de infravermelho próximo obtidos. Nesta é possível notar picos em diferentes regiões e com intensidades diferentes ao longo do espectro para as diferentes formas polimórficas.

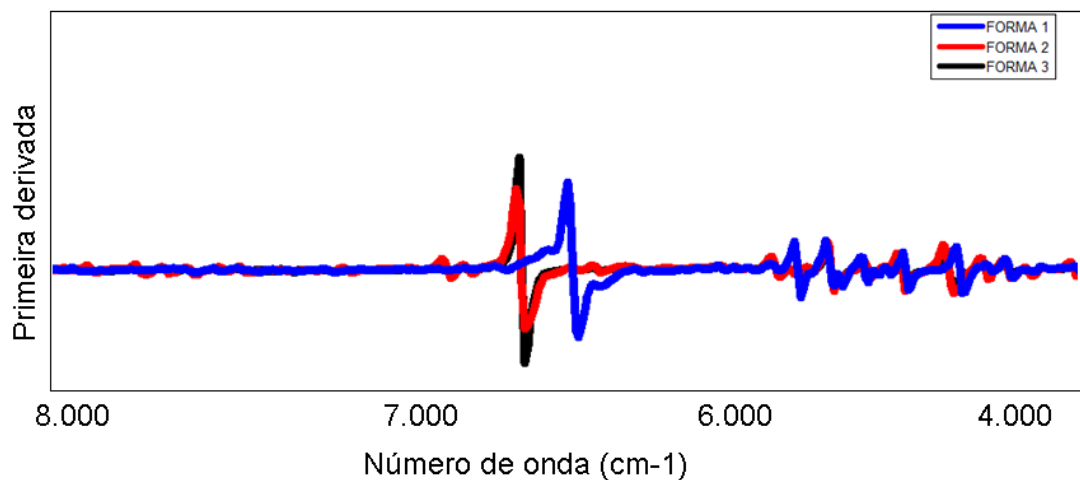


Figura 25. Espectros de infravermelho próximo para as três diferentes formas polimórficas do Piroxicam.

Após a confirmação das três diferentes formas polimórficas do Piroxicam, as amostras foram preparadas de acordo com a tabela 2. Para a construção das cartas de controle, primeiramente os espectros foram pré-processados utilizando a primeira derivada. A análise de componentes principais foi aplicada à matriz placebo para a construção do espaço dos interferentes, sendo que duas componentes principais foram usadas. Através da utilização de duas componentes, foi possível explicar 99,95% da variância total dos dados.

Utilizando as amostras do grupo A (amostras sob controle) contendo somente o polimorfo I, o vetor de regressão NAS foi calculado e a decomposição dos espectros foi realizada em vetor NAS, vetor interferente e vetor resíduo, conforme mostrado na Figura 26.

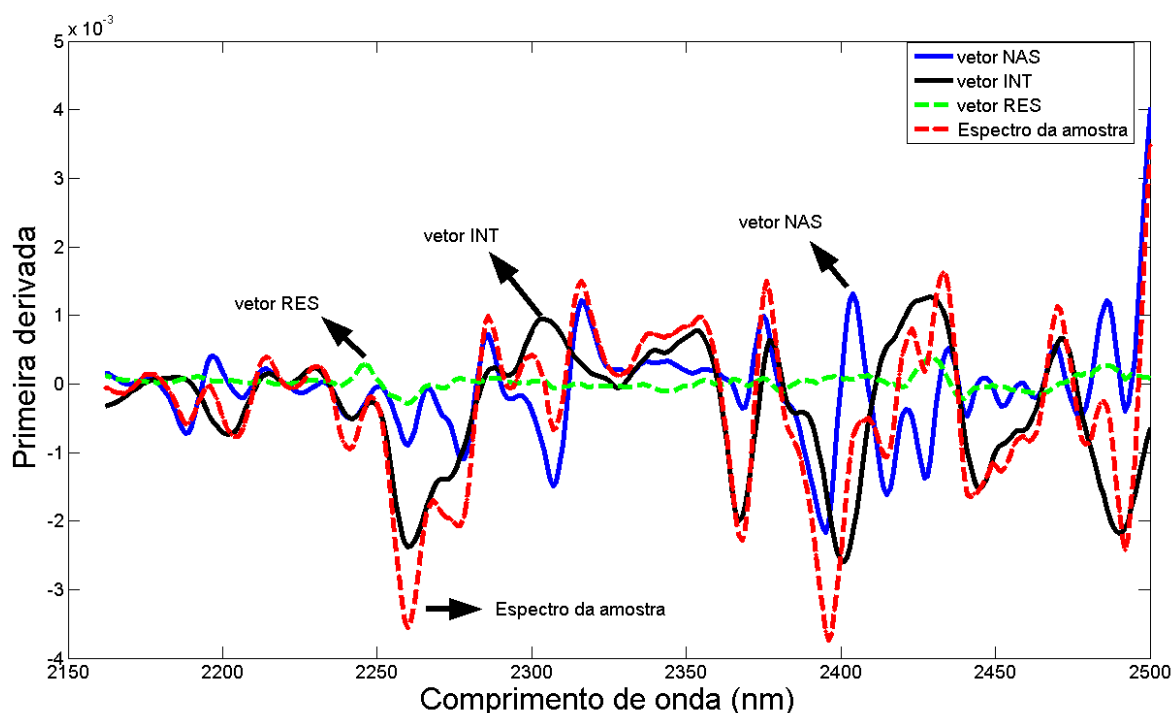


Figura 26. Divisão do espectro da amostra: vetor NAS, vetor interferente (INT) e vetor resíduo (RES).

Após isso, os limites de confiança para cada carta de controle foram calculados, utilizando, somente as amostras do grupo A. Através da carta NAS, os limites inferior e superior, da forma polimórfica I, foram calculados considerando uma variação na concentração de $\pm 10\%$ da formulação comercial que é 30% (m/m). Dessa forma, o limite superior refere-se a 33% (m/m) e o limite inferior a 27% (m/m). Amostras que possuem concentração entre esses limites são consideradas dentro de controle em relação a essa variável. Em termos de NAS os valores de concentrações dos limites obtidos são 1.26×10^{-4} e 2.28×10^{-4} . Em relação a carta interferente o limite foi calculado de acordo Skibsted e Oliveira [5-6], obtendo-se o valor de 0,004, enquanto para a carta resíduo o limite foi calculado como sugere Jackson [7], resultando no valor de $1,08 \times 10^{-5}$, considerando o nível de 95% de confiança. A Figura 27, a seguir, mostra as cartas de controle desenvolvidas. Como todas as 10 amostras presentes no grupo A estão dentro dos limites das cartas NAS, interferente e resíduo, elas são classificadas como amostras dentro de controle.

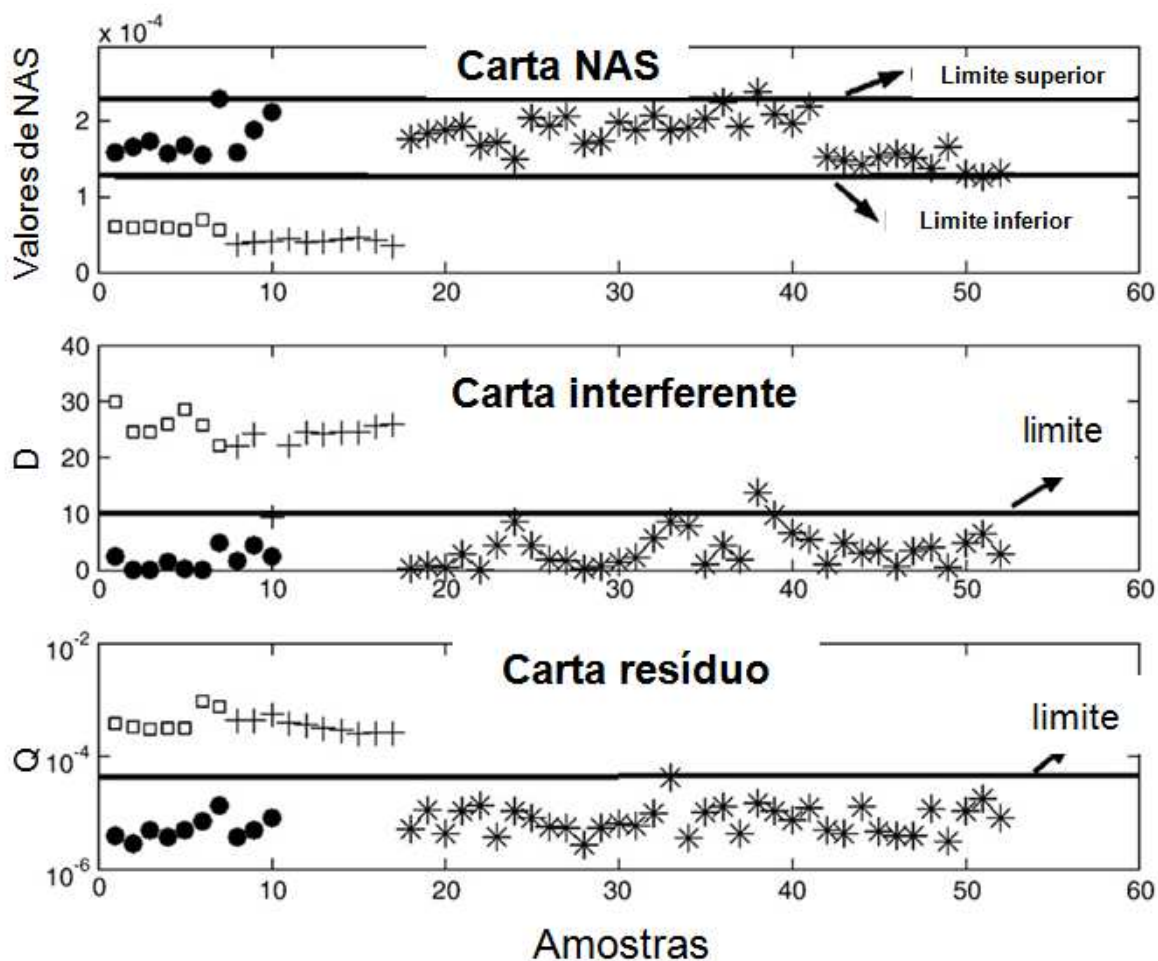


Figura 27. Representação das cartas NAS, interferente e resíduo. (●) Amostras do grupo A; (○) Amostras do grupo B; (+) Amostras do grupo C e (*) Amostras do grupo D.

As amostras do grupo B e C estão fora de controle, pois apresentam-se fora dos limites estipulados pelas cartas NAS, interferente e resíduo. Isso é esperado, uma vez que essas amostras foram preparadas com diferentes formas polimórficas. Considerando a carta interferente, essas amostras estão fora de controle devido ao fato delas possuírem na sua composição as formas polimórficas II e III, que estão ausentes nas amostras do grupo A. Dessa forma, é possível concluir que a carta interferente é capaz de identificar a presença de diferentes formas polimórficas nas formulações farmacêuticas. Para confirmar

esse fato, uma análise dos vetores interferentes e resíduos, pode ser realizada para as amostras sob controle (grupo A) e para as amostras fora de controle (grupos B e C). A Figura 28 mostra os vetores interferentes e resíduos das amostras dentro e fora de controle.

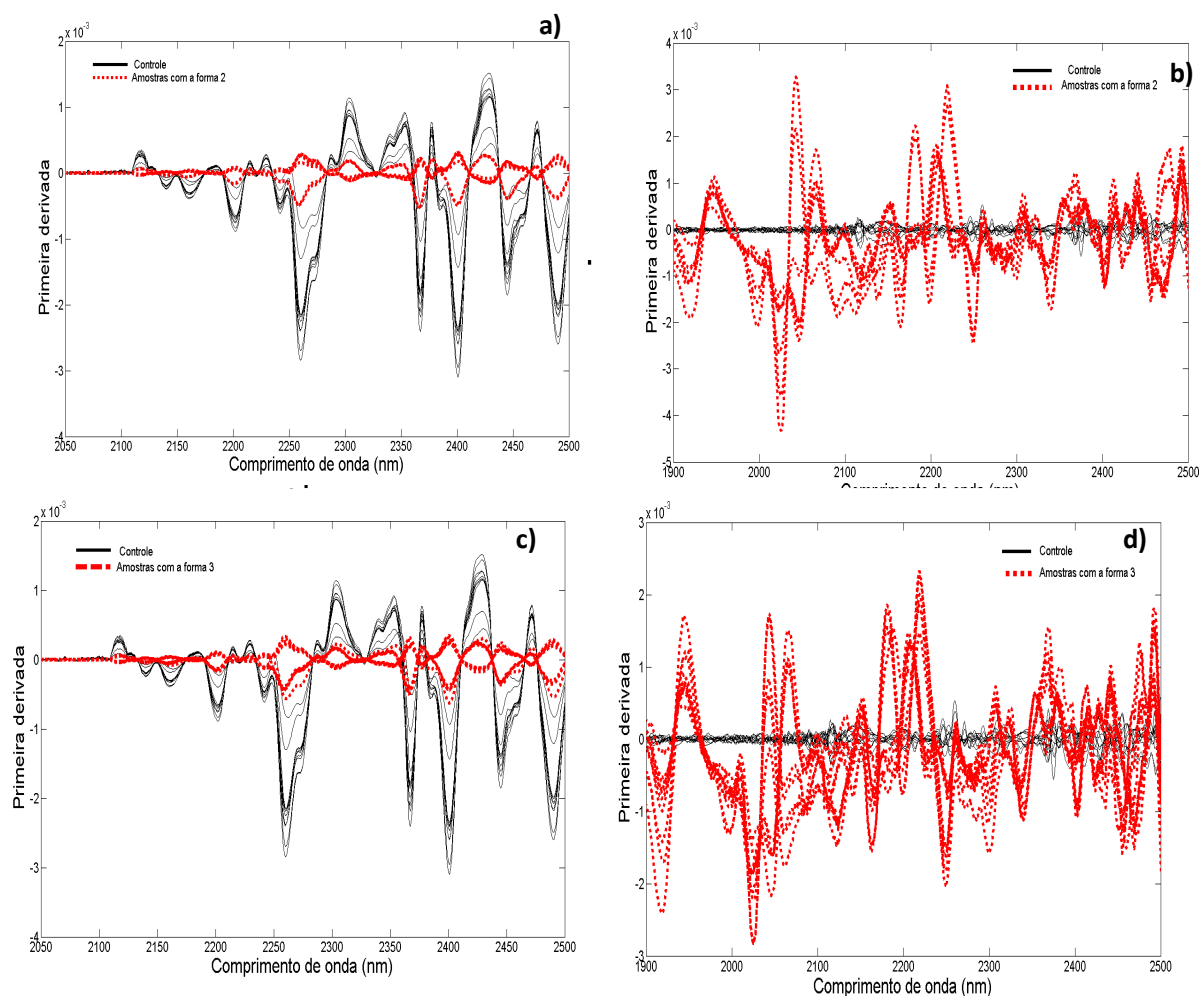


Figura 28. Diagnóstico dos vetores resíduos e interferentes. **(a)** vetores interferentes para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo B); **(b)** vetores resíduos para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo B); **(c)** vetores interferentes para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo C); **(d)** vetores resíduos para as amostras dentro de controle (— amostras do grupo A) e para as amostras fora de controle (- - amostras do grupo C).

É possível notar que nas Figuras 28a e 28c, os vetores interferentes das amostras que estão dentro e fora de controle possuem diversas regiões com diferentes intensidades, o que é causado pela presença das formas polimórficas II e III do Piroxicam. Esse fato confirma que a carta interferente é capaz de distinguir as amostras que estão dentro e fora de controle. Com respeito à carta resíduo, as amostras dos grupos B e C são indicadas na Figura 27 como fora de controle. Isto significa que essas amostras não foram modeladas corretamente, pois a diferença entre os valores previstos e os valores de referência dessas amostras de Piroxicam estão acima do resíduo estipulado pelo modelo padrão que foi construído com as amostras do grupo A. Do ponto de vista químico, esse resultado pode ser explicado pela presença de informação das novas formas polimórficas (II e III), que estão ausentes nas amostras sob controle. A confirmação desse fato pode ser verificado pela análise das Figuras 28b e 28d. Nessas figuras, pode ser visto claramente a diferença entre os vetores resíduos das amostras que estão dentro e fora de controle. Como os vetores resíduos apresentam intensidade mais elevada para as amostras do grupo B e C, pode-se supor que uma parte do vetor NAS está contida no vetor resíduo. A causa exata desse fato é difícil de determinar, porém os resultados encontrados pelas cartas de controle multivariadas mostraram um diagnóstico eficaz das amostras conforme e não-conforme. Praticamente todas as amostras do grupo D foram classificadas como dentro de controle, uma vez que têm a forma polimórfica I na sua constituição. Também é possível observar que a amostra 38 foi classificada indevidamente na carta NAS e na carta interferente como fora de controle. O motivo disso é que essa amostra possui uma alta concentração da forma polimórfica I na sua constituição, o que faz com que ela seja classificada como fora de controle nas cartas NAS e interferente.

4.3 Conclusão

As cartas de controle multivariadas mostraram ser uma ferramenta simples e poderosa para estudo de polimorfismo em medicamento utilizando dados obtidos através da técnica de espectroscopia no infravermelho próximo, o que possibilitou a detecção de amostras fora de conformidade (fora de controle). O procedimento é simples e pode ser utilizado para o monitoramento da produção de Piroxicam, pois só requer amostras dentro de controle. Nenhum modelo quantitativo e nenhuma análise exaustiva foram necessários durante a construção das cartas de controle. No caso estudado, a metodologia foi capaz de avaliar a presença das formas polimórficas do fármaco Piroxicam em relação à especificação presente nas amostras que possuíam a forma polimórfica I.

4.4 Referência bibliográfica do capítulo 4

1. F. Vrečer, M. Vrbinc, A. Meden, *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 3–15.
2. A. R. Sheth, S. Bates, F. X. Muller, D. J. W. Grant *Cryst. Growth Des.* 5 (2005) 571-578.
3. J.W. Braga, Tese de mestrado, (2004).
4. A. R Sheth, S. Bates, F. X. Muller, D. J. W. Grant, *Cryst. Growth Des.*, 6 (2004) 1091–1098.
5. E. T. S. Skibsted, H. F. M. Boelens, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, N. W. Broad, D. R. Rees, D. T. Witte, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7103.
6. I. K. de Oliveira, W. F. C. Rocha, R. J. Poppi, *Anal. Chim. Acta*, 642 (2009) 217-221.
7. J. E. Jackson, G. S. Mudholkar, *Technometrics* 21 (1979) 341-49.

CAPÍTULO 5

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS DAS FORMAS POLIMÓRFICAS I E II
DO FÁRMACO PIROXICAM ATRAVÉS DA
MICROESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E DO MÉTODO
QUIMIOMÉTRICO PLS**

5. Aplicação 2: Análise quantitativa de formulações farmacêuticas das formas polimórficas I e II do fármaco Piroxicam através da microespectroscopia na região do infravermelho próximo e do método quimiométrico PLS.

5.1 Parte experimental

Neste trabalho, foi usado o mesmo princípio ativo (Piroxicam) obtido da empresa EMS-Sigma Pharma, que corresponde a forma polimórfica I, para a qual já foi descrita a sua caracterização no primeiro estudo. Dessa forma, não será novamente relatado nesta segunda aplicação.

Para esse segundo estudo foram preparadas 55 formulações farmacêuticas contendo as formas polimórficas I e II na presença do mesmo excipiente utilizado no primeiro estudo, porém com quantidades diferentes de cada um dos constituintes. Todas as amostras foram pesadas em uma balança analítica com precisão de 0,0001 g e misturadas por 5 minutos em recipientes de 5 mL. Logo em seguida, as amostras, com um total de 280 mg cada, foram comprimidas em uma prensa hidráulica sob pressão de 6 ton/cm² para a formação dos comprimidos. Um planejamento experimental foi realizado com o objetivo de cobrir a maior parte da concentração de todos os constituintes presentes na formulação farmacêutica. A concentração da forma polimórfica I foi preparada na faixa de 1% (m/m) a 90 % (m/m) para as formulações farmacêuticas, enquanto que para a forma II as concentrações variaram de 1% (m/m) a 85% (m/m). A Figura 28 mostra o planejamento experimental realizado em que todas as amostras possuem um total de 280 mg.

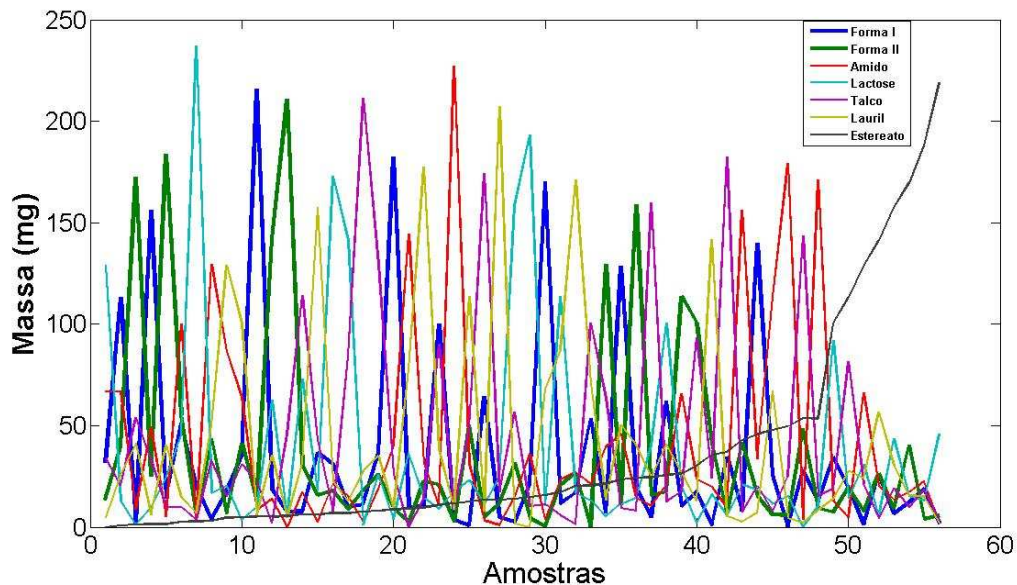


Figura 29. Planejamento experimental

Os comprimidos foram analisados em um FT-NIR Spotlight da PerkinElmer. Uma área de 5 mm x 5 mm foi analisada usando um tamanho de pixel de dimensão 50 μm x 50 μm , obtendo-se um total de 10.000 espectros para cada imagem cuja dimensão é de 100 x 100 pixels. Cada espectro foi obtido com 8 varreduras em uma região de números de onda de 7800 – 4000 cm^{-1} usando uma resolução espectral de 16 cm^{-1} . Os espectros de refletância (R) foram transformados para $\log(1/R)$ antes da utilização dos procedimentos quimiométricos. Após a aquisição das imagens, o arranjo de dados tridimensional foi desdobrado e o pré-processamento da matriz realizado.

Todos os cálculos foram feitos no software Matlab 7.9[®] (The Mathworks, Natick, MA), utilizando um computador com sistema operacional Windows Vista com 64 bits e 8 GB de memória RAM. Para o tratamento dos dados foi utilizado rotinas desenvolvidas neste trabalho. O tempo de processamento para cada imagem foi cerca de 30 segundos.

5.2 Resultados e discussões

Os resultados para a caracterização das diferentes formas polimórficas através da microscopia eletrônica de varredura e da difração de raios-x, já foram descritas na primeira aplicação.

A espectroscopia na região do infravermelho próximo também pode ser usado para análise de polimorfismo em Piroxicam. As formas polimórficas I e II do Piroxicam exibem diferenças pronunciadas em seus espectros de infravermelho próximo, como mostrado na Figura 29 a seguir. Os espectros das formas polimórficas I e II do Piroxicam, obtidos, são praticamente idênticos aos publicados na literatura [1].

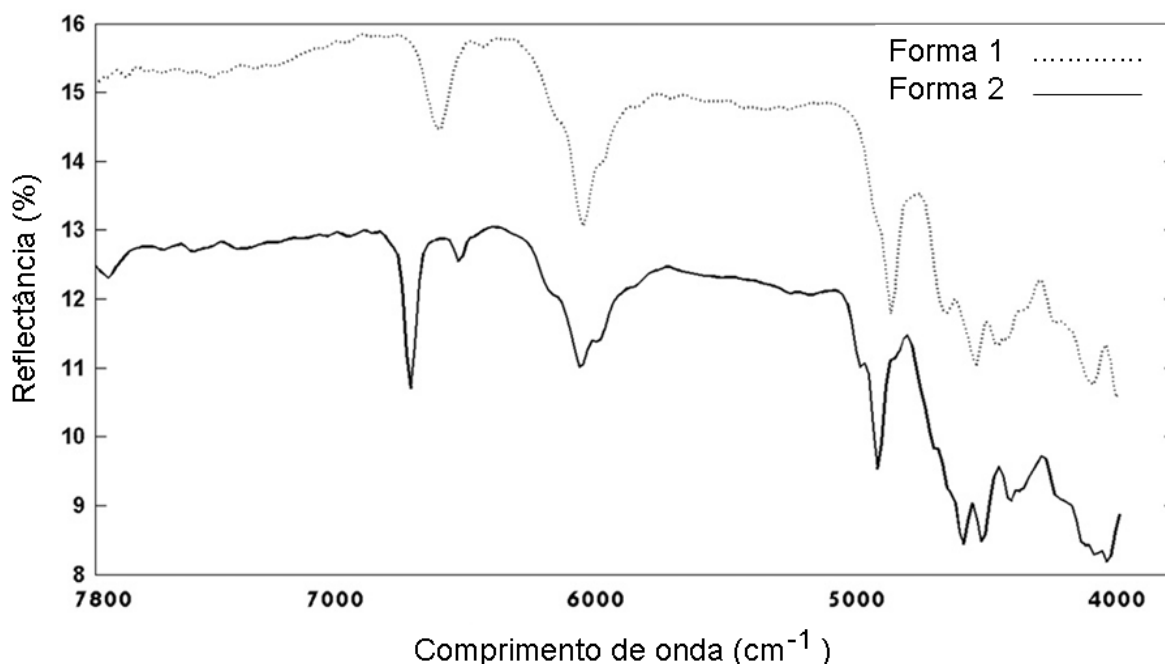


Figura 30. Espectros de infravermelho próximo para as formas polimórficas I e II do Piroxicam.

Após a caracterização das diferentes formas polimórficas, foi realizada a construção dos modelos PLS. A primeira etapa para a construção do modelo foi dividir os comprimidos em dois grupos: calibração (30 amostras) e validação (25 amostras) usando o algoritmo de Kennard-Stone [2]. Então, os modelos PLS-1 foram construídos para a quantificação das duas formas polimórficas do fármaco

Piroxicam. Para a construção do modelo, o espectro médio das imagens obtidas foi utilizado. Os modelos PLS foram construídos usando 4 variáveis latentes para ambos os polimorfos. Esse número foi escolhido porque apresentou o menor valor de RMSECV (Erro quadrático médio de validação cruzada) e explica 90,30% da variância de **X** e 98,02% de **y** para a forma I e 86,21% da variância de **X** e 97,22% de **y** para a forma II. A validação cruzada foi realizada no modo “*leave-one-out*”.

Neste estudo foi utilizada uma região de interesse (ROI) do inglês, “*Region of interest*” composta por 10.000 pixels, logo não foi realizada a detecção de pixels *outliers*, que podem estar presentes. Isso ocorre porque foi utilizado um grande número de espectros para a construção do modelo de calibração. Além disso, foi utilizado um detector com arranjo linear. Esse tipo de detector adquire os dados varrendo toda a superfície do comprimido, evitando assim que ocorra problemas na obtenção dos pixels que irão compor a imagem. No entanto, Burger e Geladi [3], utilizando um detector CCD e analisando uma região de interesse (ROI) composta por poucos pixels, sugerem a análise da presença de pixels *outliers* antes da construção dos modelos.

Diversos preprocessamentos e suas combinações foram testadas. Os resultados que mostraram melhores estimativas para as formas polimórficas I e II foram a combinação de primeira derivada [4], correção ortogonal do sinal [5] e *detrend* [6]. Diversos modelos PLS-2 também foram desenvolvidos para a quantificação das formas polimórficas, mas apresentaram resultados inferiores aos modelos PLS-1 construídos.

As Figuras 30 e 31, a seguir, mostram os resultados obtidos pelos modelos PLS desenvolvidos para as formas polimórficas I e II. É possível notar uma concordância entre os valores de referência e os valores previstos pelo modelo. É interessante notar que a maioria dos pontos nestas figuras, para ambas formas polimórficas, estão em baixas concentrações. Isto é esperado, uma vez que foram usados diversos compostos (Piroxicam e excipientes), cujos teores foram variados aleatoriamente com o objetivo de cobrir uma larga faixa de concentração para todos os compostos presentes, conforme mostrado no planejamento experimental da Figura 28.

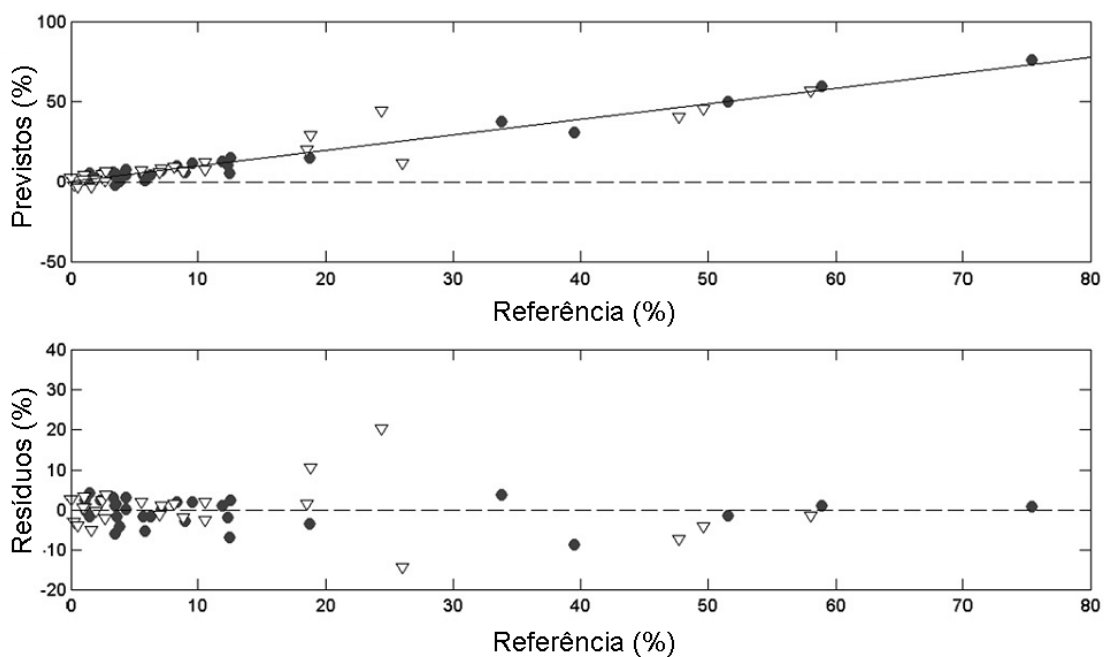


Figura 31. Valores de referência versus valores previstos pelo modelo PLS para forma polimórfica I. Amostras de calibração (●) e validação (Δ).

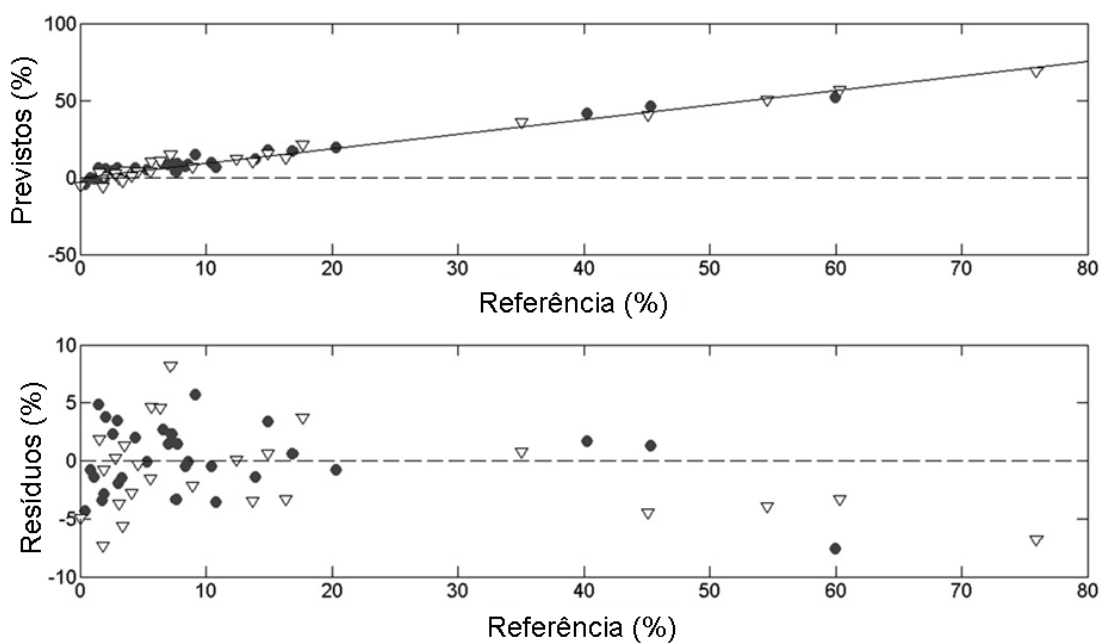


Figura 32. Valores de referência versus valores previstos pelo modelo PLS para forma polimórfica II. Amostras de calibração (●) e validação (Δ).

A tabela 3 mostra os resultados para os modelos PLS desenvolvidos para a determinação das formas polimórficas I e II do fármaco Piroxicam.

Tabela 3. Parâmetros encontrados pelos modelos PLS desenvolvidos.

	RMSEC* (%)	RMSECV* (%)	RMSEP* (%)	R² _{calibração}	R² _{validação}	Bias
Forma I	3,25	4,07	3,72	0,98	0,98	- 0,50
Forma II	2,92	3,89	3,66	0,96	0,96	0,10

***RMSEC**: Erro quadrático médio de calibração; ***RMSECV**: Erro quadrático médio de validação cruzada; ***RMSEP**: Erro quadrático médio de validação; **R²**: coeficiente de correlação entre os valores de referências e previstos; **Bias**: diferença entre a média populacional e o seu valor verdadeiro.

Na tabela 3, os valores de RMSEC e RMSEP estão abaixo de 4% (m/m). Visto que esses valores são menores que 10% (m/m) e similares, pode-se inferir que a quantificação das formas polimórficas presentes nas formulações farmacêuticas é eficaz [7]. Além disso, para essa comparação, um teste F foi realizado com 95% de confiança, considerando que a hipótese nula estabelece que não existem diferenças significativas entre as variâncias para a determinação das formas polimórficas. Para o teste F foi usada a seguinte expressão [8]:

$$F = \frac{(RMSEP_{FORMA1})^2}{(RMSEP_{FORMA2})^2} = \frac{(3,72)^2}{(3,66)^2} = 1,03 \quad (43)$$

O valor encontrado para o teste F foi 1,03. O valor crítico para esse teste com 95% de confiança é 1,98 [9]. Como o valor calculado é menor que o valor crítico, a hipótese nula é válida. O número de graus de liberdade usado para o teste F foi 24 tanto para o numerador como para o denominador.

Em relação aos erros percentuais (resíduos) dos ajustes, para ambas as formas polimórficas mostradas nas Figuras 30 e 31, esses apresentam uma distribuição aleatória, o que indica um ajuste adequado. O cálculo desses resíduos foi realizado através da seguinte expressão:

$$resíduos(\%) = \left(\frac{y_{ref} - y_{pred}}{y_{ref}} \times 100 \right) \quad (44)$$

onde y_{ref} representa os valores de referência para a concentração de Piroxicam e y_{pred} representa os valores previstos pelo modelo. Nota-se, nas Figuras 30 e 31, que a maioria das amostras de validação, para ambas as formas polimórficas, possuem resíduos menores que 6% (m/m), que é aceitável para essa determinação [7].

O estudo da distribuição das formas polimórficas presentes nas formulações farmacêuticas foi realizado através da reconstrução das imagens dos comprimidos utilizando os modelos PLS desenvolvidos. A Figura 32 mostra ambas as formas polimórficas na superfície dos comprimidos analisados.

Comparando a Figura 32 obtida através da técnica de microespectroscopia na região do infravermelho próximo com as suas respectivas microscopias eletrônicas mostradas nos itens a) e b) da Figura 24 é possível observar a tendência de agrupamento dos diferentes cristais das formas polimórficas I e II. A primeira refere-se a forma prismática e a segunda a forma de agulha. A importância desse resultado é fundamental para o controle de qualidade do produto final, pois mostra a extensão que esses agrupamentos ocorrem, como bem sua influência em estudos de biodisponibilidade.

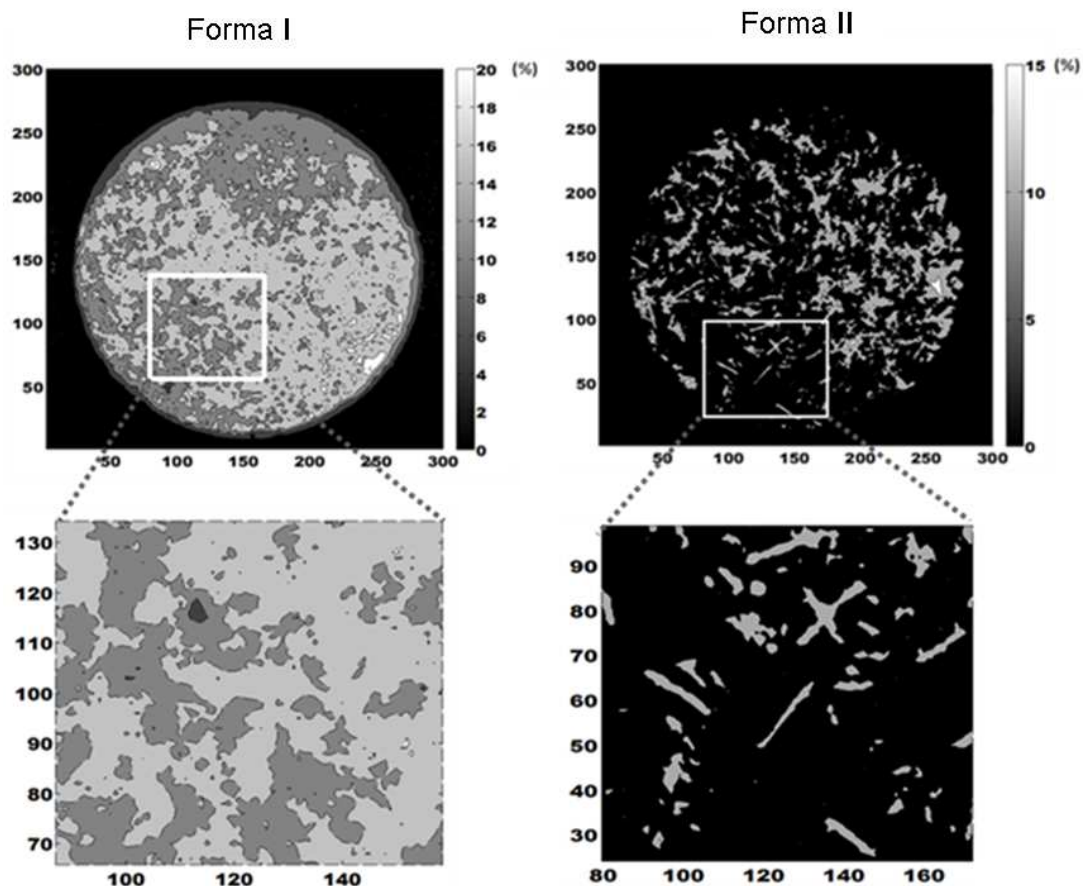


Figura 33. Mapas de distribuição de concentração obtidos através dos modelos PLS desenvolvidos para as formas polimórficas I e II do fármaco Piroxicam.

5.3. Conclusão

Um novo método para estudar a distribuição das diferentes formas polimórficas do medicamento Piroxicam foi apresentado. Através do teste-F foi possível concluir que os modelos desenvolvidos para as formas polimórficas I e II não possuem diferença significativa para a quantificação das formas polimórficas com 95% de confiança. Além disso, verificou-se a distribuição dos polimórfos nas diferentes formulações. Desse modo, a metodologia sugerida é útil e pode ser empregada para o estudo de tamanho de partículas e detecção de interferências em processos de controle de qualidade na indústria farmacêutica.

5.4 Referência bibliográfica do capítulo 5

1. F. Vrečer, M. Vrbinc, A. Meden, *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 3–15.
2. R.W. Kennard, L.A. Stone, *Technometrics* 11 (1969) 137–148.
3. J. Burger, P. Geladi, *J. Chemometr.* 20 (2006) 106–119.
5. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777
6. B. Li, A.J. Morris, E.B. Martin, *J. Chemometr.* 16 (2002) 556–561.
7. The United States Pharmacopoeia, 25rd revision, U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, 2002.
8. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Orlando, 1992.
9. M. Ottho, *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Weinheim, 1999.

CAPÍTULO 6

**UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN E DAS
CARTAS DE CONTROLE MULTIVARIADAS BASEADA NO
CÁLCULO DO SINAL ANALÍTICO LÍQUIDO PARA
IDENTIFICAÇÃO NO FÁRMACO CARBAMAZEPINA DE:
ADULTERAÇÃO NO EXCIPIENTE, TRANSFORMAÇÃO DE
FORMAS POLIMÓRFICAS POR UMIDADE E DETECÇÃO
DE DIFERENTES POLIMORFOS**

Aplicação 3: Utilização da espectroscopia Raman e das cartas de controle multivariadas baseada no cálculo do sinal analítico líquido para identificação no fármaco Carbamazepina de: adulteração no excipiente, transformação de formas polimórficas por umidade e detecção de diferentes polimorfos.

6.1 Parte experimental

Nesta terceira aplicação, o fármaco utilizado foi a Carbamazepina, a qual também foi obtida da EMS-Sigma Pharma. Antes de iniciar o estudo, o fármaco recebido foi caracterizado através das técnicas de difração de raios-x em pó, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman, seguidas de comparação dos resultados obtidos com a literatura [1-3]. A forma determinada foi a forma polimórfica III pura, que é usada para a comercialização do produto na forma de medicamento. As formas polimórficas I, II e a forma dihidratada (forma IV) foram obtidas da forma polimórfica III. A forma polimórfica I foi obtida por aquecimento em uma estufa a 170°C, durante 5 horas. Já a forma polimórfica II foi obtida pela cristalização da Carbamazepina em uma solução de etanol, por adição de água gelada, seguida de resfriamento em um freezer a -5°C, durante 24 horas. Após isso, foi realizado uma filtração a vácuo, seguida de secagem a temperatura ambiente. A forma polimórfica IV foi obtida através da hidratação da forma polimórfica III em um béquer sob agitação, durante 24 horas seguido de secagem.

Trinta e nove amostras contendo diferentes concentrações do princípio ativo (Carbamazepina) nas suas diferentes formas polimórficas I, II, e III e na forma dihidratada (forma IV) foram preparadas em excipiente (celulose, dióxido de silício, estereato de magnésio, croscarmelose e povidona). Também foram preparadas 10 amostras denominadas de placebo, as quais possuem somente o conteúdo presente no excipiente. Todas essas amostras com massa total de 300 mg foram divididas em 11 grupos. As amostras do grupo 1, num total de 20, possuem na sua composição somente a forma polimórfica III na presença de

excipiente e foram denominadas amostras sob controle. Os grupos denominados de 2 a 9 possuem alterações, em relação às amostras sob controle (grupo 1), que serão mostradas na tabela 4 e são denominados como fora de controle. O grupo 10 é composto por 5 amostras que possuem a forma polimórfica III na presença de excipiente, enquanto que as amostras que compõem o grupo 11 são as amostras que possuem somente o excipiente (placebo).

A quantidade de cada composto adicionado nesses grupos e as suas respectivas especificações são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Composição das amostras contendo diferentes formas polimórficas da Carbamazepina.

Grupo	Quantidade	Forma I (%)	Forma II (%)	Forma III (%)	Forma IV (%)	Excipiente (%)
1	20	0	0	65-95	0	35-5
2*	3	0	0	76-79*	0	12-10*
3	3	0	0	86-87	0	14-13
4	3	7-10	0	78-80	0	15-10
5	3	0	10-11	77-79	0	13-10
6	3	0	0	78,5-79,5	9-11	12,5-9,5
7	3	0	0,1-1,0	76-79	0	23,9-20,0
8	3	0,1-1,0	0	76-79	0	23,9-20
9	3	0	0	76-79	0,1-1,0	23,9-20
10	5	0	0	76-79	0	24-21
11	10	0	0	0	0	100

* Às amostras do grupo 2 foi adicionado ácido esteárico na faixa 12-11% (m/m).

As amostras do grupo 2 possuem a composição do excipiente alterada. Nessas amostras, foi adicionado o excipiente denominado ácido esteárico, na faixa de 11-12 % (m/m), o qual não estava presente no excipiente

das amostras sob controle (amostras do grupo 1). As amostras do grupo 3 foram submetidas a uma câmara climática construída em laboratório e foram retiradas da câmara em diferentes tempos, para obtenção dos espectros Raman. A primeira amostra ficou submetida a 24 horas na câmara climática com atmosfera saturada de água, a segunda amostra ficou submetida a 36 horas e a terceira ficou durante 48 horas. Já os grupos 4 a 6 possuem a forma polimórfica III e uma segunda forma polimórfica I, II, ou IV, ou seja, possuem duas formas polimórficas presentes. O grupo 4 possui as formas polimórficas I e III; o grupo 5 possui as formas polimórficas II e III e o grupo 6 possui as formas polimórficas III e IV. Com o objetivo de estudar qual a concentração mínima presente das formas polimórficas I, II e IV que o método é capaz de identificar nas amostras sob controle, foram preparadas três novos grupos de amostras denominados grupos 7, 8 e 9, todas com concentrações entre 0,1% (m/m) a 1% (m/m) da forma polimórfica ausente no grupo de controle (grupo 1). A composição destes grupos é apresentada na tabela 4.

Para a obtenção dos espectros Raman, foi utilizado um espectrômetro Perkim Elmer Raman Station 400F com fonte de excitação em 785 nm e potência de 300 mW. O tempo de exposição do laser empregado foi de 5 segundos por amostra. Os deslocamentos Raman foram obtidos na faixa de 95 a 3800 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . O equipamento possui um detector CCD que opera a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas amostras foram analisadas em forma de pó. A análise dos dados foi realizada no programa Matlab versão 6.5 utilizando rotinas desenvolvidas neste trabalho.

6.2 Resultados e discussões

Primeiramente, foi realizada a caracterização da Carbamazepina através das técnicas de espectroscopia Raman, difração de raios-x em pó e microscopia eletrônica de varredura. Encontrou-se que o fármaco apresentava-se na forma polimórfica III quando comparado com a literatura disponível [1-3]. Após isso, as diferentes formas polimórficas da Carbamazepina foram obtidas e caracterizadas. Os resultados estão mostrados nas Figuras 33 a 35.

A Figura 33 mostra os espectros Raman das formas polimórficas I a IV. Nota-se, nesta figura, que as diferentes formas polimórficas apresentam diferenças nas posições de picos e nas intensidades Raman. Para caracterizar essas diferenças, foram utilizadas as referências [1-3] para atribuição dos principais modos vibracionais que diferenciam as quatro formas polimórficas. Para exemplificar, pode-se citar as bandas características da forma polimórfica I que são representadas pelo estiramento (C-H) do anel aromático na região 3061 cm^{-1} , estiramento (C-H) não-aromático na região 3024 cm^{-1} . Já a forma polimórfica III mostrou bandas relacionadas ao estiramento assimétrico fraco (C-H) no anel aromático na região de 3071 cm^{-1} , estiramento fraco (C-N) na região 987 cm^{-1} e deformação angular fora do plano do anel aromático em 559 cm^{-1} . Na Figura 33, é possível notar a presença dessas bandas, entre outras, o que permite concluir que as diferentes formas polimórficas foram obtidas.

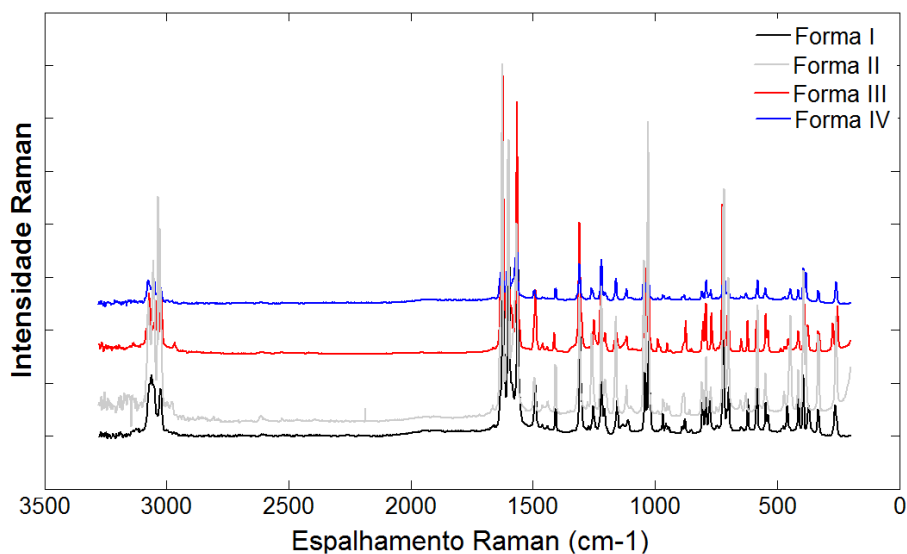


Figura 34. Espectros de espalhamento Raman para as formas polimórficas I, II, III e IV da Carbamazepina.

A técnica de difração de raios-x em pó é uma técnica poderosa para identificação de fases sólidas cristalinas. Uma vez que cada fase possui um único padrão exclusivo, é possível identificar as diferentes formas polimórficas da Carbamazepina. As formas I, II, III e IV mostraram padrões semelhantes aos encontrados na literatura [1,4-7]. Dessa forma, pode-se concluir que houve sucesso na obtenção das quatro diferentes formas polimórficas. A Figura 34 mostra os difratogramas das quatro formas polimórficas.

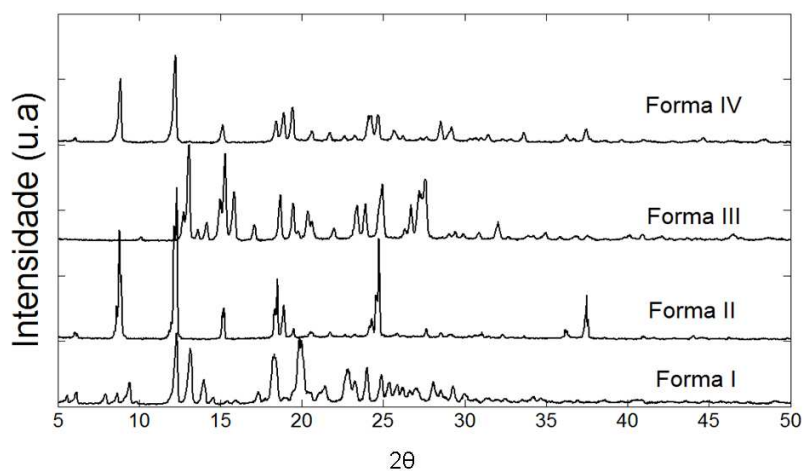


Figura 35. Difratogramas de raios-x em pó das formas polimórficas I, II, III e IV da Carbamazepina.

Para confirmar os resultados obtidos pelas técnicas Raman e de difração de raios-x, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura das diferentes formas polimórficas. Através dos resultados mostrados na Figura 35, pode-se concluir que os cristais das formas polimórficas I e II correspondem ao formato de agulhas. Porém, os cristais da forma polimórfica I apresentam-se mais empacotados do que os cristais da forma II. Isso deve-se aos diferentes processos de cristalização responsáveis pela formação de cada um dos polimorfos [1,3]. As formas III e IV possuem os cristais na forma prismática. Devido a pequena magnificação usada na micrografia, não é possível distinguir o cristal que sofreu hidratação do cristal que não sofreu hidratação, porém os espectros Raman e os difratogramas, mostrados anteriormente, confirmam a diferença das formas polimórficas III e IV.

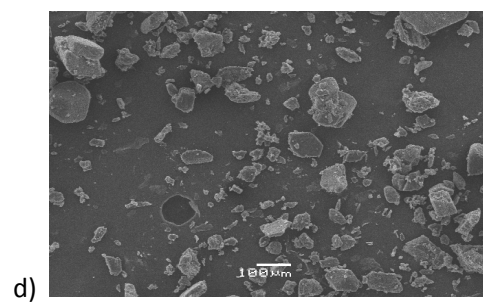
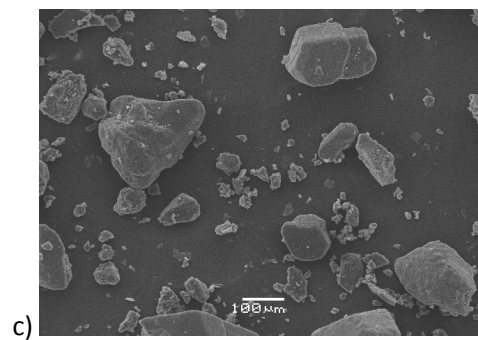
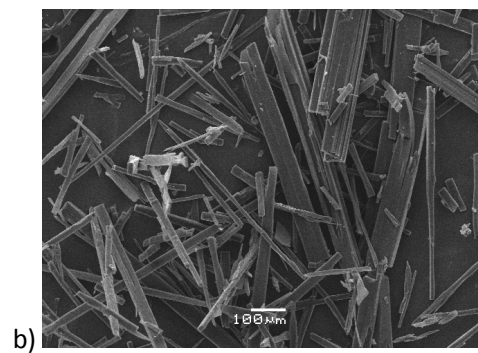
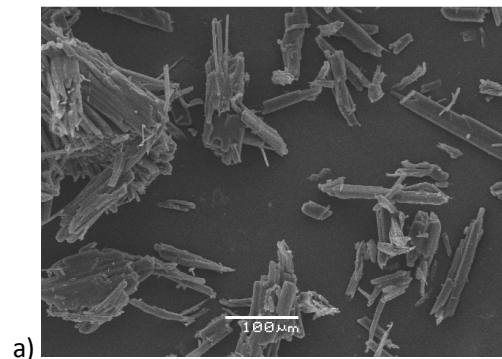


Figura 36. Micrografia das formas polimórficas da Carbamazepina. a) Forma I ; b) Forma II ; c) Forma III ; d) Forma IV.

Após a caracterização das diferentes formas polimórficas da Carbamazepina, foram construídas as cartas de controle multivariadas com as amostras sob controle, ou seja, as amostras do grupo 1. Para a construção das cartas de controle multivariadas, foi necessário utilizar a correção da linha de base através do pré-processamento SNV (*“standard normal variate”*). Então, os limites para a carta NAS encontrados foram $9,0 \cdot 10^{10}$ (inferior) e $2,3 \cdot 10^{11}$ (superior). Já para a carta interferente, o limite encontrado foi 9,4, enquanto que para a carta resíduo o valor obtido para o limite foi de $6,2 \cdot 10^{-1}$. A amostra que estiver pelo menos um valor fora desses limites em qualquer uma das cartas será considerada fora de controle. A Figura 36 mostra as cartas de controle desenvolvidas. Como todas as 20 amostras presentes no grupo 1 estão dentro dos limites das cartas NAS, interferente e resíduo, essas são denominadas dentro de controle. As amostras do grupo 2 estão fora de controle na carta interferente, pois essas possuem adulteração dos excipientes, ou seja, presença do ácido esteárico que não está presente no excipiente das amostras de controle. As amostras do grupo 3 têm a mesma composição das amostras 10, 11 e 12 pertencentes ao grupo 1, mas foram expostas à umidade. Pelos resultados encontrados, pode-se notar que essas amostras ficaram fora da carta NAS. Isso pode ser explicado pelo começo da transformação da forma polimórfica III para a forma polimórfica IV (dihidratada), pois sabe-se que a forma polimórfica III sofre hidratação e consequente transformação para a forma polimórfica IV [3]. Dessa forma, há cada vez menos a presença da forma polimórfica III, o que é detectado pela diminuição dos valores na carta NAS. Na carta interferente, essas amostras também se apresentaram fora do limite estipulado. Como há a formação de uma nova forma polimórfica nessas amostras (formação da forma IV através da forma III), a carta interferente detecta essa alteração.

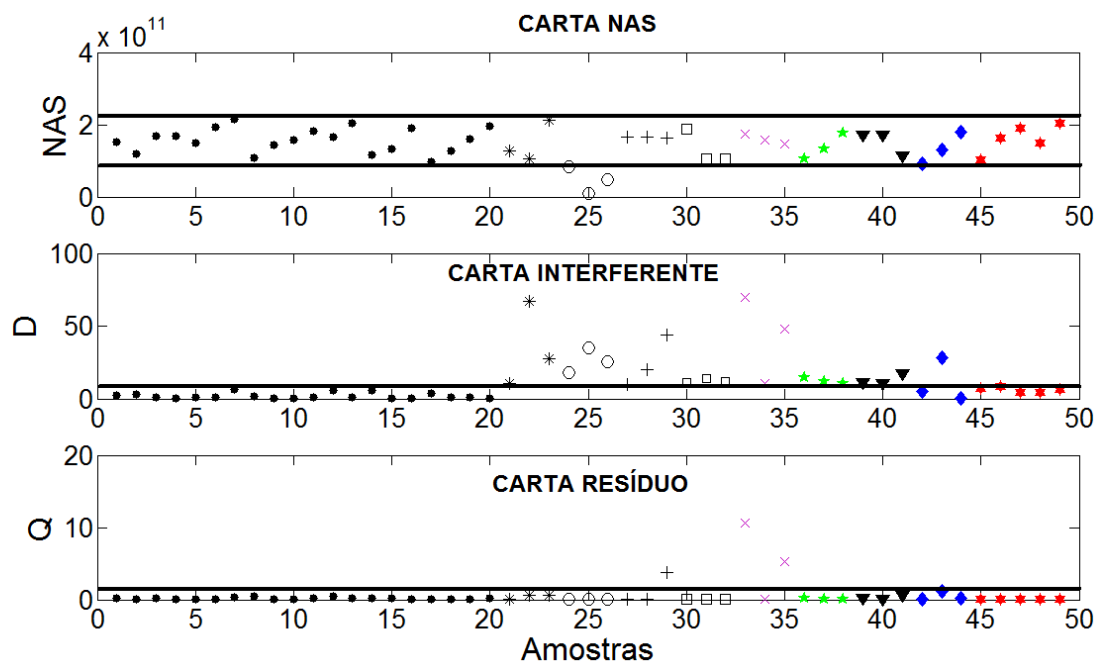


Figura 37. Representação das cartas NAS, interferente e resíduo. (●) Amostras do grupo 1; (*) amostras do grupo 2; (O) amostras do grupo 3; (+) amostras do grupo 4; (□) amostras do grupo 5; (×) amostras do grupo 6; (★) amostras do grupo 7; (▼) amostras do grupo 8; (◇) amostras do grupo 9; (★) amostras do grupo 10.

Em relação aos resultados apresentados pelos grupos 4, 5 e 6, nota-se que todas as amostras que compõem esses grupos estão fora de controle nas cartas interferentes, porém estão dentro de controle na carta NAS. Como essas amostras estão fora dos limites de pelo menos uma carta, elas são classificadas como fora de controle. Os resultados encontrados mostram que as amostras que compõem os grupos 4, 5 e 6 apresentam a forma polimórfica III dentro dos limites estabelecidos pela carta NAS. Os resultados da carta interferente desses mesmos grupos, ou seja, grupos 4, 5 e 6 mostram que as cartas de controle multivariadas desenvolvidas foram capazes de detectar a presença de uma nova substância que não estava presente nas amostras do grupo 1. Através do planejamento experimental realizado para esses grupos, mostrado na tabela 4, conclui-se que as cartas de controle desenvolvidas são capazes de identificar a presença das formas polimórficas I, II e IV, ausentes nas amostras do grupo 1. Existe uma amostra do grupo 4 e duas amostras do grupo 6 fora do limite estipulado pela carta resíduo. Isso ocorre porque essas amostras possuem resíduo padrão maior

que o estipulado pelas amostras do grupo 1. Como essas amostras possuem em sua constituição a presença de uma nova forma polimórfica, pode-se inferir que uma parte da informação referente à composição dessa nova forma polimórfica não foi detectada pela carta interferente, e sim, pela carta resíduo.

Com o intuito de estudar se as cartas de controle multivariadas desenvolvidas eram capazes de detectar baixas concentrações das formas polimórficas I, II e IV na presença da forma polimórfica III, foram preparados novos grupos de amostras (grupos 7, 8 e 9) com concentrações entre 0,1% (m/m) e 1,0% (m/m) das formas polimórficas I, II e IV, na presença da forma polimórfica III. De acordo com a tabela 4 e com os resultados apresentados na Figura 36, pode-se notar que todas as amostras que compõem esses grupos estão dentro de controle da carta NAS, o que está de acordo com o planejamento experimental da tabela 4. Além disso, pode-se concluir, através da análise da Figura 36, que a carta interferente é capaz de identificar a presença de 0,1% (m/m), 0,5% (m/m) e 1,0% (m/m) das formas polimórficas I e II na presença da forma polimórfica III, pois todas as amostras dos grupos 7 e 8 estão fora de controle na carta interferente. Considerando as amostras que compõem o grupo 9, apenas a amostra de composição 1,0% (m/m) da forma polimórfica IV foi detectada na carta interferente. As amostras de composições 0,1% (m/m) e 0,5% (m/m) da forma polimórfica IV não foram capazes de ser detectadas na carta interferente. Isso pode ser explicado pelo tamanho das partículas dos cristais que compõem a forma polimórfica IV. Analisando as microscopia das diferentes formas polimórficas mostradas na Figura 35, pode-se concluir que o tamanho de partícula da forma polimórfica IV (prisma) é menor do que o tamanho das formas I e II (agulhas). Dessa forma, apesar das amostras de composição 0,1% (m/m) e 0,5% (m/m) que pertencem ao grupo 9 terem a mesma quantidade das amostras dos grupos 7 e 8, elas não podem ser detectadas, pois apresentam os seus cristais de tamanho menor.

Em relação, à carta de resíduos todas as amostras dos grupos 7, 8 e 9 estão dentro do limite estipulado, o que faz com que essas apresentem resíduo padrão semelhante ao modelo construído com as amostras do grupo 1.

Os resultados apresentados na Figura 36 demonstram que as amostras que compõem o grupo 10 são consideradas dentro de controle, pois apresentam-se dentro dos limites estipulados nas três cartas. Isso era esperado, pois essas amostras possuem composição semelhante às amostras do grupo 1, conforme mostrado na tabela 4.

6.3. Conclusão

A metodologia proposta de utilização das cartas de controle multivariadas com dados obtidos através da espectroscopia Raman foi capaz de monitorar os valores de NAS (analito), interferentes e resíduos das amostras de Carbamazepina, simultaneamente. Sendo assim, foi possível identificar as alterações das especificações das formulações farmacêuticas ocasionadas por umidade, presença de uma diferente forma polimórfica e identificação de adulteração com ácido esteárico no excipiente o que permitiu classificar as amostras que estavam dentro e fora de controle. Além disso, foi possível identificar a presença de 0,1% (m/m) das formas polimórficas I e II presentes na formulação farmacêutica baseada na forma III.

6.4 Referência bibliográfica do capítulo 6

1. C. Rustichelli, G. Gamberini, V. Ferioli, M.C. Gamberini, R. Ficarra, S. Tommasini J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 41-54.
2. L. E. O'Brien, P. Timmins, A. C. Williams, P. York, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 335-340.
3. F. Tian, J. A. Zeitler, C.J. Strachan, D.J. Saville, K.C. Gordon, T. Rades, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 271-280.
4. H. Kala, U. Haack, P. Pollandt, G. Brezesinski, Acta Pharm. Technol. 32 (1986) 72-77.
5. F. U. Krahn, J. B. Mielck, Pharm. Acta Helv. 62 (1987) 247-254.
6. M.M. J. Lowes, M.R. Caira, A.P. Lotter, J.G. Van Der Watt, J. Pharm. Sci. 76 (1987) 744-752.
7. J. Dugue, R. Ceolin, J.C. Rouland, F. Lepage, Pharmaceut Acta Helv, 66 (1991) 307-310.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

7.1 Conclusão geral

O estudo do polimorfismo ganhou, nas últimas décadas, grande importância para a indústria farmacêutica. O conhecimento do tipo de polimorfismo que um fármaco apresenta e suas diferenças estruturais enfatizam a necessidade de seu estudo, sobretudo na pesquisa por novos fármacos e no estudo de pré-formulações.

Uma contribuição significativa e importante para análise de polimorfismo, utilizando microespectroscopia, espectroscopia na região do infravermelho próximo e espectroscopia Raman, em formulações farmacêuticas, foi claramente demonstrado nesta tese. Existe, entretanto, um número de limitações e cuidados necessários a ser considerados quando se utiliza essas técnicas para estudo de polimorfismo. A precaução da utilização da microespectroscopia é que a aquisição dos dados gera uma grande quantidade de dados espectrais, demandando um computador com uma capacidade de processamento relativamente superior aos computadores domésticos. Além disso, são necessárias ferramentas quimiométricas para extrair informações precisas e significativas dos dados gerados. Já para a utilização da espectroscopia Raman, a espécie a ser analisada deve apresentar polarizabilidade quando interage com a radiação, enquanto que, na utilização da espectroscopia na região do infravermelho próximo, a espécie deve possuir variação efetiva no momento de dipolo durante a sua vibração ou rotação.

Nesta tese, foi abordado duas aplicações utilizando as cartas de controle multivariadas e uma aplicação utilizando o PLS. Nas aplicações realizadas com as cartas de controle multivariadas, uma com a espectroscopia na região do infravermelho próximo e a outra com a espectroscopia Raman, os resultados mostraram que foi possível a detecção de diferentes formas polimórficas presentes nas formulações farmacêuticas de modo qualitativo, tanto para os polimorfos da Carbamazepina como do Piroxicam. No estudo realizado com a Carbamazepina, também foi detectada mudança na formulação do excipiente e a transformação da forma polimórfica III para a forma polimórfica I, ocasionada por

hidratação. A aplicação utilizando o método quimiométrico PLS foi realizada com o fármaco Piroxicam. Os resultados mostraram que foi possível realizar a quantificação dos principais polimorfos em formulações farmacêuticas. Além disso, foi possível mapear e estudar a distribuição dos diferentes polimorfos presentes nas formulações farmacêuticas desse fármaco.

Dessa forma, a tese demonstra que o polimorfismo, considerado um dos responsáveis pelas diferenças nas propriedades físico-químicas dos compostos, como solubilidade, dureza e índice de refração, pode ser estudado utilizando técnicas espectroscópicas e métodos quimiométricos. Logo, a tese desenvolvida apresenta diferentes metodologias que podem ser usadas para monitorar mudança na biodisponibilidade de fármacos ocasionadas pela mudança de formas polimórficas que podem existir. Sendo assim, a tese apresenta uma contribuição significativa para a indústria farmacêutica, pois demonstra que é possível controlar o polimorfo que irá para o mercado.

ANEXOS



Multivariate control charts based on net analyte signal (NAS) for characterization of the polymorphic composition of Piroxicam using near infrared spectroscopy

Werickson Fortunato de Carvalho Rocha, Ronei Jesus Poppi *

Institute of Chemistry, State University of Campinas (Unicamp), CP 6154, 13084-971 Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2009

Received in revised form 18 January 2010

Accepted 19 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

Piroxicam

Near infrared spectroscopy

Net analyte signal

Multivariate control charts

ABSTRACT

Near infrared spectroscopic and multivariate statistical control charts based on the net analyte signal (NAS) were applied to the polymorphic characterization of Piroxicam samples. Three different polymorphic forms (I, II and III) were studied, using X-ray powder diffraction (XRPD) and scanning electron microscopy as reference techniques. Samples containing form I were considered inside the quality specifications and forms II and III were impurities. Three control charts were developed: the NAS chart that corresponds to the analyte of interest (polymorphic form I), the interference chart that corresponds to the contribution of other compounds in the sample and the residual chart that corresponds to nonsystematic variation. From the limits estimated for each chart using samples inside the quality specifications, it was possible to identify samples that did not present polymorphic form I. The use of multivariate control charts provides a rapid evaluation of purity and the polymorphic composition of pharmaceutical formulations based on Piroxicam.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Many pharmaceutical solids exhibit polymorphism, which is frequently defined as the ability of a substance to exist as two or more crystalline phases that have different arrangements and/or conformations of the molecules in the crystal lattice [1–3]. Thus, in the strictest sense, polymorphs are different crystalline forms of the same pure substance in which the molecules have different arrangements and/or different conformations of the molecules. As a result, polymorphic solids have different unit cells and hence display different physical properties, including those due to packing, and various thermodynamic, spectroscopic, interfacial, and mechanical properties [1–3].

Fundamentally the method used to give the structural information on a solid material is X-ray powder diffraction (XRPD) [4]. The X-ray technique, whether performed using single crystals or powdered solids, is concerned mainly with structural analysis and is therefore eminently suited for the characterization of polymorphs and solvates. An external examination of crystals reveals that they often contain facets, and that well-formed crystals are completely bound by flat surfaces. Planarity of this type is not commonly encountered in nature, and it was quickly deduced that the morphological characteristics of a crystal are inherent in its interior structure. In fact, the microscopic form of a crystal depends critically on structural arrangements at the atomic or molecular level; the underlying factor

controlling crystal formation is the way in which atoms and molecules can pack together. A review of crystallography from the pharmaceutical viewpoint is available [5].

Infrared spectroscopy has been used for the polymorphic distinction of compounds and presents some advantages in relation to classical techniques for polymorphic analysis, since it is generally fast, cheaper, can be automated and can reduce the need for solvents and toxic reagents associated with wet chemical methods. Examples of

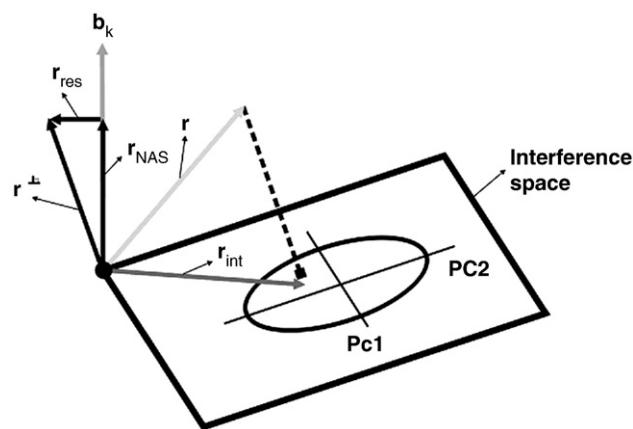


Fig. 1. Schematic overview of the separation of the spectrum r into three different contributions, the NAS values indicated by the vector r_{NAS} , the composition of the excipients indicated by the vector r_{INT} in the interference space, and the residuals indicated by vector r_{res} , perpendicular to of the regression vector NAS b_k .

* Corresponding author. Tel./fax: +55 19 35213126.

E-mail address: ronei@iqm.unicamp.br (R.J. Poppi).

Table 1
Data sets composition.

Sample set	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)	Excipient (%)
A	30–40	0	0	70–60
B	0	20–25	0	80–75
C	0	0	15–20	85–80
D	30–40	0	0	70–60

this application are diffuse reflectance infrared (DRIFT-IR), attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) and near infrared (NIR) [6–12].

Multivariate methods can help the analyst to extract the relevant qualitative or quantitative information from spectra, and these methods can help when deriving rapid methods for quality control [13–15]. In this sense, multivariate control charts have been used for quality monitoring using infrared spectroscopy [16,17]. The basis of this approach is to build an empirical model of a set of measurements obtained under normal operating conditions (NOC). Using this model, statistical confidence limits are calculated. New measurements are projected onto this model, and the statistics calculated should be within the confidence limits. Recently, new multivariate control charts based on the net analyte signal have been proposed to perform multivariate quality monitoring [18]. The advantage of these charts is that systematic variation in the product due to the analyte (or property) of interest is separated from the remaining systematic variation due to all other compounds in the matrix. This enhances the ability to flag products out of statistical control.

Piroxicam (4-hydroxy-2-methyl-*N*-(2-pyridyl) 2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide) is a nonsteroidal antiinflammatory and analgesic drug [19] that presents an interesting case of polymorphism. Three polymorphic forms (I, II and III) and one monohydrate form can be obtained by crystallization from saturated solutions in various solvents [20]. Since polymorphism can change the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of Piroxicam [21], it is important to develop quality control methodologies for the polymorphic determination of this drug.

The aims of this work were to build and to validate multivariate control charts based on the net analyte signal for quality monitoring of the polymorphic compositions of a pharmaceutical formulation based on Piroxicam using near infrared spectroscopy. For this purpose, firstly, a study using XRPD and microscopy was carried out to characterize the different forms of Piroxicam that crystallize under different conditions. Secondly, the multivariate control charts were developed and validated.

2. Theory

The basis for the development of the control charts is represented in Fig. 1 where a sample spectrum (vector \mathbf{r}) is split into three different contributions: \mathbf{r}_{NAS} (NAS vector), \mathbf{r}_{INT} (interference vector) and \mathbf{r}_{res} (residual vector):

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_{\text{NAS}} + \mathbf{r}_{\text{INT}} + \mathbf{r}_{\text{RES}} \quad (1)$$

The NAS vector corresponds to the analyte of interest [22]; all the remaining information not including the analyte is explained by the interference vector and the information that could not be explained by either NAS or the interference vectors will be in the residual vector. The subspace is called the interference space. Spectra of blank samples or spectra of the pure interferences can be used to span the interference space. The interference space can be found by applying principal component analysis (PCA) to mean-centered sets of blank (or interfering constituent) spectra:

$$\mathbf{R}_{-k} = \mathbf{P}\mathbf{T}^T + \mathbf{E} \quad (2)$$

where \mathbf{R}_{-k} is the mean-centered spectra, \mathbf{P} is the loadings that define the model for the interference space, \mathbf{T} is the scores and \mathbf{E} is a matrix of the residuals. Then the interference vector can be computed by projecting the vector \mathbf{r} into the interference space:

$$\mathbf{r}_{\text{INT}} = \mathbf{P}\mathbf{P}^+ \mathbf{r} \quad (3)$$

where \mathbf{P}^+ is the pseudo-inverse of the loading matrix.

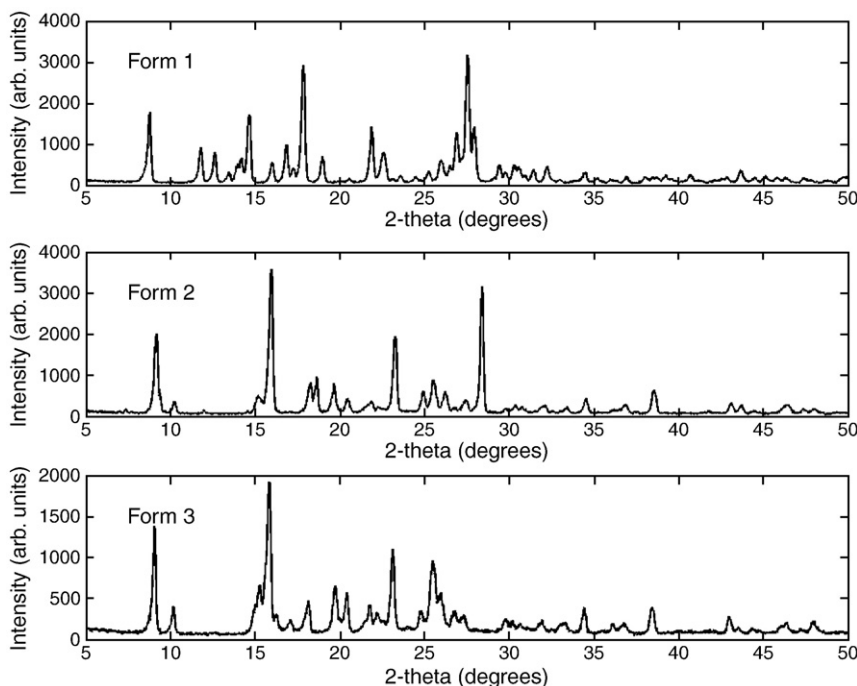


Fig. 2. Powder X-ray diffractograms of crystal forms of Piroxicam: (1) form I; (2) form II; and (3) form III.

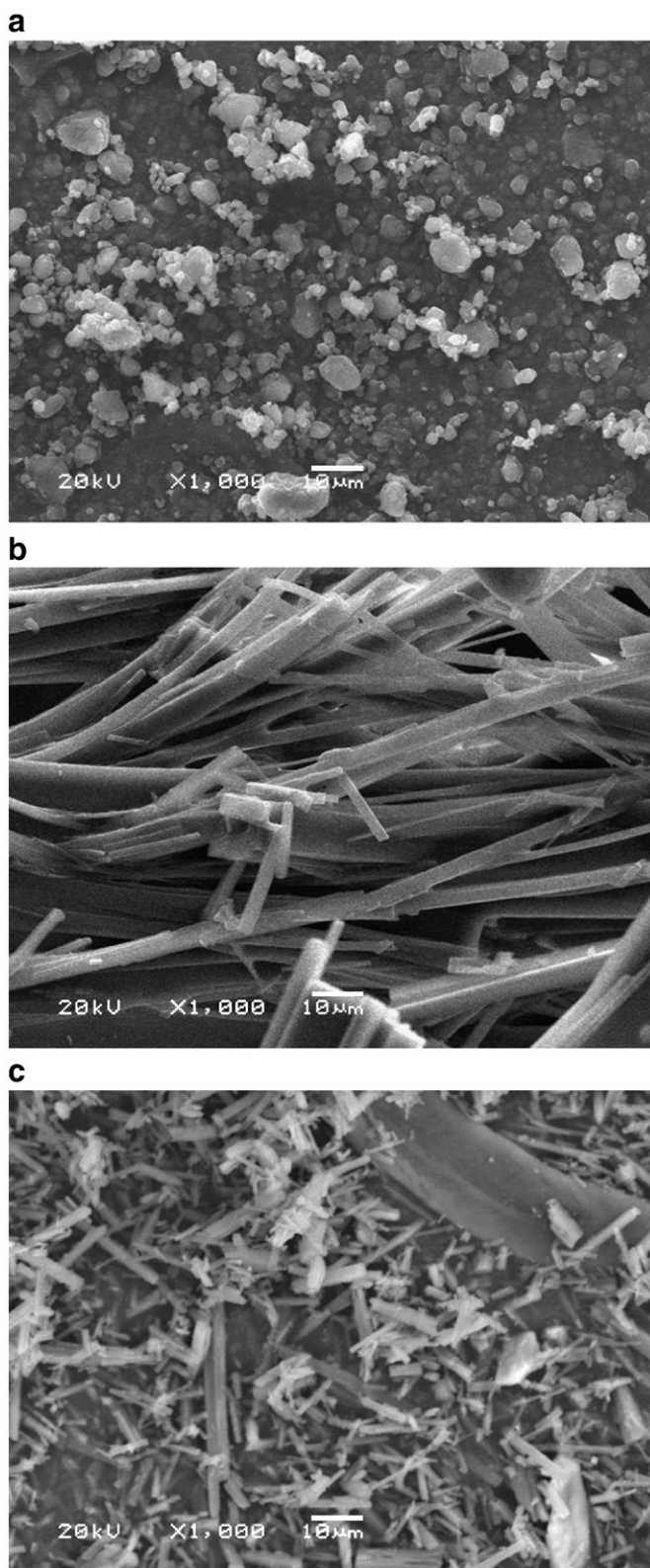


Fig. 3. Optical micrographs of Piroxicam crystals. (a) Prisms of form I obtained as raw material, (b) needles of form II from absolute ethanol at room temperature and (c) form III crystallized from a saturated Piroxicam solution in absolute ethanol at dry ice temperature.

There is another way to perform the calculation of the interference space when spectra of the pure interferences are not available. In this situation samples containing mixtures of excipient and analyte can be

used. Thus, the matrix \mathbf{R}_{-k} can be obtained by computing the matrix which is orthogonal to the space spanned by the analyte.

The NAS can be assessed by first computing the part of \mathbf{R} (matrix of the spectra) orthogonal to the interference space \mathbf{P} :

$$\mathbf{B}_k = (\mathbf{I} - \mathbf{P}\mathbf{P}^+) \mathbf{R} \quad (4)$$

where \mathbf{I} is the identity matrix with dimensions equal to the number of spectra in \mathbf{R} . Since \mathbf{B}_k contains a set of orthogonal vectors not all in the same direction to the interference space, the average vector \mathbf{b}_k is used to define a unique direction in multivariate space:

$$\mathbf{b}_k = \frac{\sum_{i=1}^I \mathbf{B}_i}{I} \quad (5)$$

where \mathbf{b}_k is called the NAS regression vector.

The NAS vector can be calculated by a projection of spectrum \mathbf{r} onto the regression vector:

$$\mathbf{r}_{\text{NAS}} = \mathbf{b}_k (\mathbf{b}_k^T \mathbf{b}_k)^{-1} \mathbf{b}_k^T \mathbf{r} \quad (6)$$

Finally the residual vector \mathbf{r}_{res} can be calculated by:

$$\mathbf{r}_{\text{res}} = \mathbf{r} - (\mathbf{r}_{\text{NAS}} + \mathbf{r}_{\text{INT}}) \quad (7)$$

2.1. Control charts

In any production process, regardless of how carefully it is maintained, a certain amount of natural variability will always exist. A process is said to be statistically “in-control” when it operates with only chance causes of variation. On the other hand, when assignable causes are present, then we say that the process is statistically “out of control.” To elaborate control charts, a set of “under-control” samples is necessary, where it is known that they are inside the quality specifications. These samples form a spectral matrix called \mathbf{R}_{NOC} , where NOC means “normal operating conditions”. The \mathbf{R}_{NOC} is split into the NAS, interference and residual contributions as formulated above. Then limits are calculated to describe the expected normal variation of the “under-control” samples of each contributor.

The NAS vector corresponds to the analyte of interest and it is directly related to the analyte concentration. It can then be used to

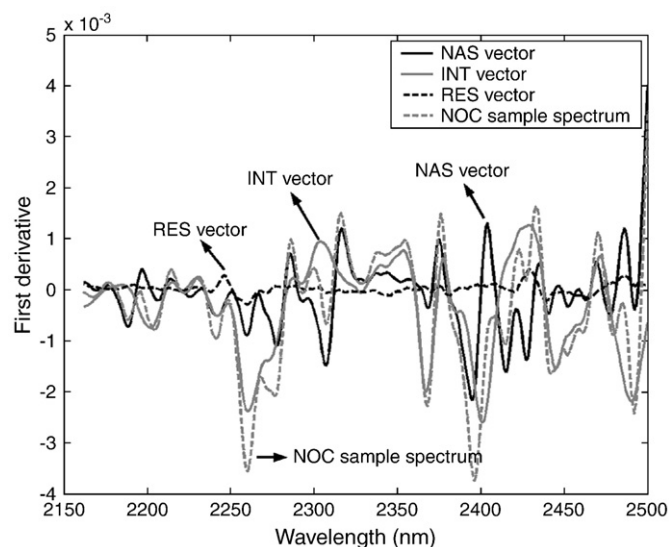


Fig. 4. NOC sample spectrum and corresponding NAS, INT, and RES vectors.

build a control chart that reflects the amount of analyte in the samples. Limits are derived from the standard deviation of the mean NAS vector (nas_{NOC}) and they are calculated by using 95% confidence, from the mean of nas_{NOC} and standard deviation of nas_{NOC} :

$$Limit_{95\%} = \overline{nas}_{NOC} \pm 2 \cdot S_{NOC} \quad (8)$$

where \overline{nas}_{NOC} is the mean of nas_{NOC} and S_{NOC} is the standard deviation of nas_{NOC} .

The interference charts are built by projecting the R_{NOC} matrix on the interference space. It is expected that the projected “under-control” spectra (called R_{INT}) occupies a restricted region of the interference space. When new samples, also “under-control”, are projected on the interference space, they should also be projected on the same region. Samples “out of control” will be distant from this region. The distance of the projection of a spectrum into the interference space can be used to build the control chart. The d -statistic [23] can be used to check if new samples have the same covariance as the “under-control” samples.

The residual chart is obtained after the calculation of NAS and interference vectors as formulated in Eq. (2). The limits of the control charts are calculated based on Q -statistics [23]. Q -statistics are used to verify if the residual for new samples is not due only to random noise, since it is expected that the residuals for “under-control” samples only contain normally distributed random noise. Large values for Q -statistics of new samples indicate the presence of systematic noise and they are “out of control”.

3. Experimental

In this work, Piroxicam from EMS Sigma Pharma (Brazil) was used, which was found to correspond to form I by comparison with PXRD spectra [20]. Forms II and III were prepared from form I. Form II (needles) was obtained by crystallization from a saturated Piroxicam solution in absolute ethanol (aliphatic alcohol) at room temperature while form III was obtained from a saturated Piroxicam solution in absolute ethanol cooled on dry ice [20].

Sixty-two samples containing the active principle (Piroxicam) having polymorphic forms I, II and III were prepared in excipient (cellulose, sodium lauryl sulphate, magnesium stearate, carmellose, povidone and lactose) and 10 blank samples only containing the excipients were also prepared. From these samples, all with total weights of 400 mg, four different data sets were produced (sets A, B, C and D). Sample set A, with 10 samples, refers to the “under-control” samples (form I); while the sample set B, with 7 samples (form II) and sample set C, with 10 samples (form III), are “out of control” samples. Sample set D is “in-control” (form I), with 35 samples. The amounts of each compound added to form sets A to D are described in Table 1. Data analysis was performed in Matlab version 6.5 (The Mathworks Inc.) using routines developed in our laboratory.

All the samples were weighted on an analytical balance with an accuracy of 0.00001 g and mixed for 5 min in 5 ml recipients. After that, all the Piroxicam samples were put in a knife mill for 1 min. Then the samples were vortexed for 1 min. Spectra were collected with a Thermo Nicolet Antaris FT-NIR Analyser, equipped with a tungsten filament source, integration sphere module and an AsInGa detector. The acquisition of the spectra was accomplished in the range of 4000 to 10,000 cm^{-1} using 32 scans and a resolution of 4 cm^{-1} .

The pure forms I, II and III were characterized by PXRD (Ni filtered, Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406$), voltage 40 kV, current 30 mA, angular speed 2°/min, angular range 5° < 2 θ < 50°).

4. Result and discussion

X-ray powder diffraction proved to be very useful in analyzing the polymorphism of Piroxicam as the polymorphs exhibit substantial differences in the X-ray powder diffraction spectra. The X-ray powder diffraction data for forms I, II and III correspond to those published in the literature [20]. Fig. 2 shows these differences.

A detailed analysis of crystal structures can confirm or refute that the compounds are the same as those of the crystalline powder under investigation. Optical micrograph data confirm the existence of three distinct crystal modifications of Piroxicam. Three polymorphs of

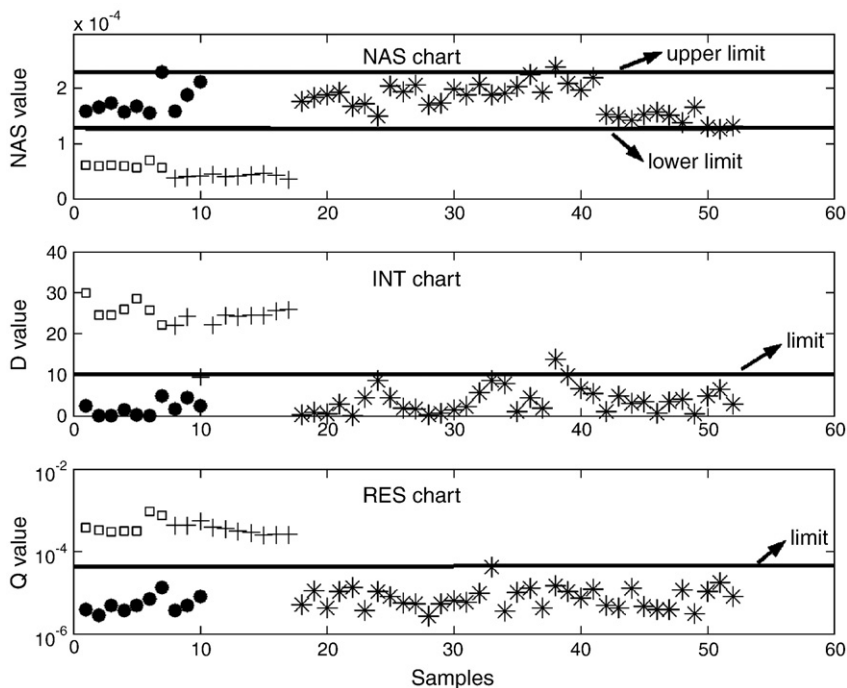


Fig. 5. Samples in control charts. (a) NAS chart, (b) interference chart and (c) residue chart. (*) NOC samples, (□) out of control samples with form II, (+) out of control samples with form III and (*) in-control samples with form I.

Piroxicam, prisms (Fig. 3a), needles (Fig. 3b) and form III (Fig. 3c), commonly crystallized from a saturated solution, are clearly observed.

After the confirmation of the I, II and III pure Piroxicam polymorphic forms, samples were prepared according to Table 1 and the control charts were constructed. For the construction of control charts, first the spectra were pre-processed by using the first derivative.

Principal component analysis (PCA) was applied to the placebo matrix (10 blank samples) for the construction of the interference space in which two main components were used. This number was chosen because it presented a lower root mean squares error of cross-validation (RMSECV) and explains 99.95% of the data variance.

Using data set A (“under-control” samples), the NAS regression vector was calculated and the decomposition of each spectrum was performed. For this, Eqs. (3), (6) and (7) were used. Fig. 4 shows the signals for the NAS, interference and residue vectors from in-control samples (data set A). The number of samples in data set A (10 samples) can be considered enough for the control charts development, since the samples were prepared under the same conditions and analyzed in the same equipment that makes them homogeneous.

After the step of spectral decomposition generating the NAS, interference and residual vectors, the confidence limits were calculated for each chart. For this, only the under-control samples (data set A) were used.

Using the NAS chart, the upper and lower confidence limits of Piroxicam polymorphic form I concentration in the samples were determined, set at 27% (w/w) and 33% (w/w), respectively, taking into account the variation of $\pm 10\%$ of the concentration of the active principle in the trade drug, which is 30% (w/w). Samples that have a concentration between these limits are within control with respect to this variable. The model can be formulated as a pseudo-univariate one, using the NAS values and these limits are 1.26×10^{-4} and 2.28×10^{-4} . However, in this case, these limits are in NAS values, and no longer in concentration. The confidence limit for the interference chart was calculated according Skibsted et al. [18] obtaining the value of 10.04 while for the residue chart it was calculated according Fuchs [23] resulting in the value of 1.08×10^{-5} , considering 95% of confidence.

Fig. 5 shows the control charts developed. As all 10 samples of data set A are within control (samples that were chosen for model development), the values of NAS, interference and residue of these

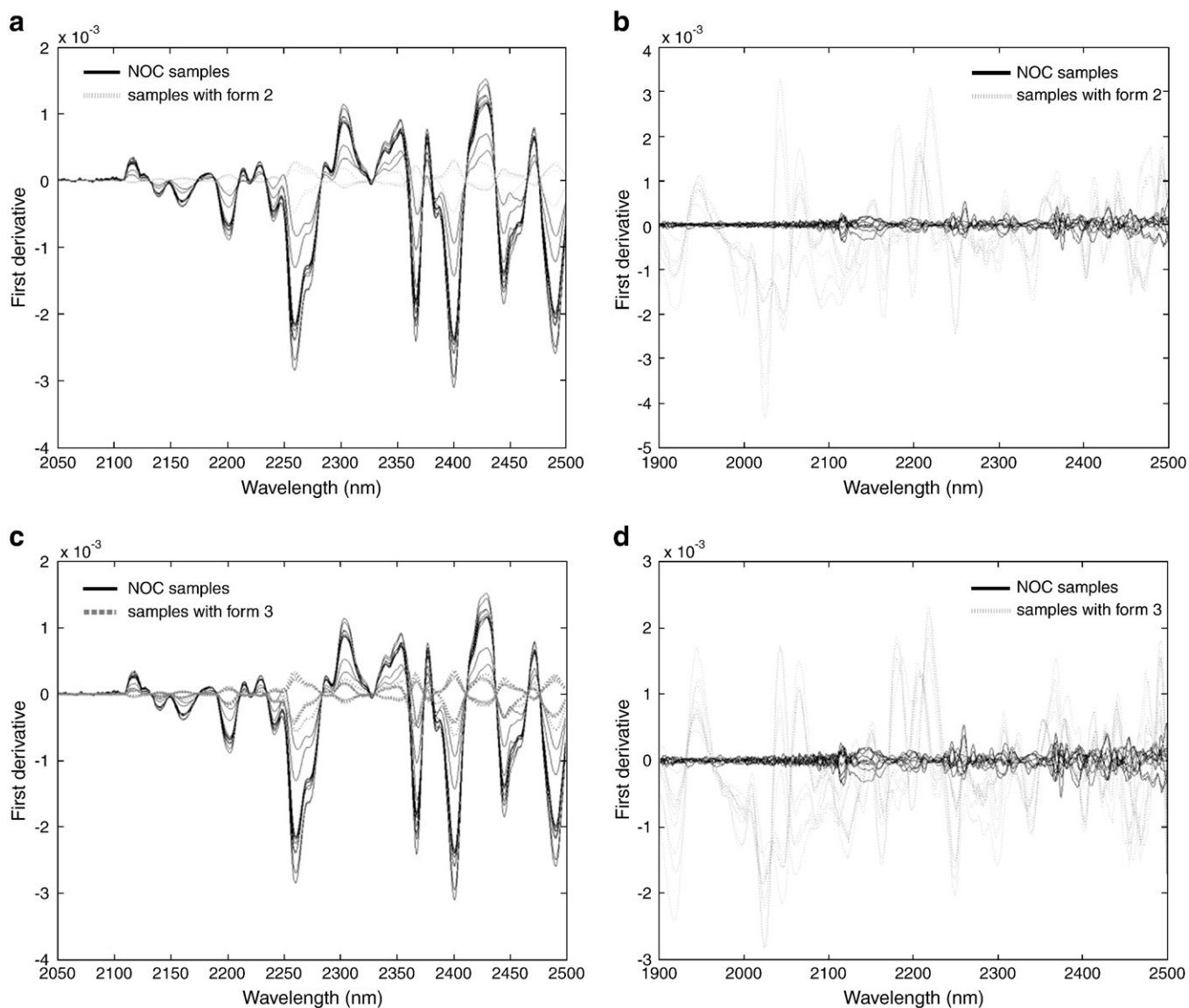


Fig. 6. Diagnostic of RES vectors and INT vectors. (a) Interference vectors for NOC samples (— sample set A) and for out of control samples (--- sample set C), (b) residue vectors for NOC samples (— sample set A) and for out of control samples (--- sample set B), (c) Interference vectors for NOC samples (— sample set A) and for out of control samples (--- sample set C) and (d) residue vectors for NOC samples (— sample set A) and for out of control samples (--- sample set C).

mixtures are within the limits defined by the three charts. It is possible to note in Fig. 5 that samples from data set B and data set C are outside the NAS, interference and residue charts, which is in agreement with what was expected, since these samples were prepared in the laboratory with different Piroxicam polymorphic forms. Considering the interference chart, it is possible to infer that these samples are out of control, which may be explained by the fact that they have in their composition the polymorphic forms II and III, absent in the under-control samples (data set A). Thus it is possible to conclude that the interference chart is able to identify the presence of different polymorphic forms in the pharmaceutical formulation. To confirm this statement, an analysis of the interference vectors and residues of the in- and out control samples was performed.

In Fig. 6a and b the interference vectors of the inside and outside of control samples are shown. It is possible to notice in these figures that there are several regions with different intensities between the in- and out of control samples caused by the presence of the Piroxicam polymorphic forms II and III, respectively, which confirms that the interference chart was able to distinguish the in- and out of control samples.

With respect to the residues chart, samples from data sets B and C, indicated in Fig. 5, are out of control. This means that these samples were not shaped properly, because the difference between the predicted and the reference values for Piroxicam are above the model standard residue. This can be explained by the presence of the new polymorphic forms absent in the under-control samples. This can be seen in Fig. 6c and d by the difference of the residue vector of the in- and out of control samples. As the residual values are very high for data B and C, one can assume that part of the NAS vector is modeled by the residual vector. The exact cause of these high residual values is difficult to determine, but the results show improved diagnostics using the multivariate control chart.

Practically all samples from data set D were classified as in-control, since they have polymorphic form I and only sample 38 was wrongly classified in NAS and interference charts. The reason is that this sample has a higher Piroxicam concentration, despite being constituted by polymorphic form I, generating an out control sample in these charts.

5. Conclusion

The multivariate control chart method provides a simple and powerful tool to evaluate polymorphism from near infrared spectra, since abnormal samples could be easily detected. The procedure is fast and adjustable for monitoring the production of Piroxicam, because it requires only samples under-control to model development. Using these multivariate control charts it was possible to identify samples that were in- and out of control. No quantitative model was developed and no exhaustive analysis must be performed during model development. In the case studied, the methodology was able to identify Piroxicam polymorphic forms different from the pattern normally present in specifications relative to form I of Piroxicam.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas (IIPF) for fellowships and financial support for this research project.

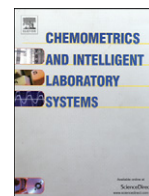
References

- [1] J. Haleblan, W. McCrone, Pharmaceutical applications of polymorphism, *J. Pharm. Sci.* 58 (1969) 911–929.
- [2] J.K. Haleblan, Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications, *J. Pharm. Sci.* 64 (1975) 1269–1288.
- [3] Y.T. Sohn, S.H. Kim, Polymorphism and pseudopolymorphism of acyclovir, *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 231–234.
- [4] M. Karjalainen, S. Airaksinen, J. Rantanen, J. Aaltonen, J. Yliruusi, Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray powder diffraction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 27–32.
- [5] J.A. Biles, Crystallography. Part I, *J. Pharm. Sci.* 51 (1962) 499–509.
- [6] R. Helmy, G.X. Zhou, Y.W. Chen, L. Crocker, T. Wang, R.M. Wenslow, Characterization and quantitation of amorphous drug substance polymorphs by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 75 (2003) 605–611.
- [7] A. Salari, R.E. Young, Application of attenuated total reflectance FTIR spectroscopy to the analysis of mixtures of pharmaceutical polymorphs, *Int. J. Pharm.* 163 (1998) 157–166.
- [8] K. Dohi, F. Kaneko, T. Kawaguchi, X-ray and vibrational spectroscopic study on polymorphism of trielaidin, *J. Cryst. Growth* 237 (2002) 2227–2232.
- [9] J. Aaltonen, J. Rantanen, S. Siiriä, M. Karjalainen, A. Jørgensen, N. Laitinen, M. Savolainen, P. Seitavuopio, M. Louhi-Kultanen, J. Yliruusi, Polymorph screening using near-infrared spectroscopy, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5267–5273.
- [10] J.W.B. Braga, R.J. Poppi, Figures of merit for the determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 2124–2134.
- [11] K. Pöllänen, A. Häkkinen, S.P. Reinikainen, J. Rantanen, M. Karjalainen, M. Louhi-Kultanen, L. Nyström, IR spectroscopy together with multivariate data analysis as a process analytical tool for inline monitoring of the crystallization process and solid state analysis of the crystalline product, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 275–284.
- [12] S. Agatonovic-Kustrin, T. Rades, V. Wu, D. Saville, I.G. Tucker, Determination of polymorphic forms of ranitidine-HCl by DRIFTS and XRPD, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 741–750.
- [13] J.V. Kresta, J.F. MacGregor, T.E. Marlin, Multivariate statistical monitoring of process operating performance, *Can. J. Chem. Eng.* 69 (1991) 35–47.
- [14] E. Yashchin, Statistical control schemes-methods, applications and generalizations, *Int. Stat. Rev.* 61 (1993) 41–66.
- [15] J.F. MacGregor, T. Kourti, Statistical process-control of multivariate processes, *Contr. Eng. Pract.* 3 (1995) 403–414.
- [16] M. Li Vigni, C. Durante, G. Foca, A. Marchetti, A. Ulrici, M. Cocchi, Near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods for monitoring flour performance in an industrial bread-making process, *Anal. Chim. Acta* 642 (2009) 69–76.
- [17] I.K. de Oliveira, W.F.C. Rocha, R.J. Poppi, Application of near infrared spectroscopy and multivariate control charts for monitoring biodiesel blends, *Anal. Chim. Acta* 642 (2009) 217–221.
- [18] E.T.S. Skibsted, H.F.M. Boelens, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, N.W. Broad, D.R. Rees, D.T. Witte, Net analyte signal based statistical quality control (NAS-SQC), *Anal. Chem.* 77 (2005) 7103.
- [19] P.C. Damiani, M. Bearzotti, M. Cabezon, A.C. Olivieri, Spectrofluorometric determination of piroxicam, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 233–236.
- [20] F. Vrečer, M. Vrbinč, A. Meden, Characterization of piroxicam crystal modifications, *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 3–15.
- [21] A.R. Sheth, S. Bates, F.X. Muller, D.J.W. Grant, Polymorphism in piroxicam, *Cryst. Growth Des.* 4 (2004) 1091–1098.
- [22] A. Lorber, N.M. Farber, B.R. Kowalski, Net analyte signal calculation in multivariate calibration, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1620–1626.
- [23] C. Fuchs, Y. Benjamini, Multivariate profile charts for statistical process control, *Technometrics* 36 (1994) 182–195.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemolab

Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics

Werickson Fortunato de Carvalho Rocha, Guilherme Post Sabin, Paulo Henrique Março, Ronei Jesus Poppi*

Institute of Chemistry, University of Campinas, P.O. Box 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2009
 Received in revised form 19 April 2010
 Accepted 23 April 2010
 Available online xxxx

Keywords:

Polymorphism
 Piroxicam
 Hyperspectral imaging
 Partial least squares

ABSTRACT

It has been recognized that crystal polymorphism is an important factor related to the physicochemical and biological properties of drug substances and formulations. In this work, the piroxicam polymorphic forms 1 and 2 were studied using near-infrared chemical imaging (NIR-CI) technology to map the distribution of both species in pharmaceutical formulations. In this direction, the partial least squares (PLS) method was used to construct calibration models of concentrations per pixel of the sample. The RMSEP results for both models of the polymorphic forms remained below 4% (w/w). It was also possible to distinguish local and global information of the constituents through this method. These results seem to be a suitable tool for quality process control and final product quality assurance.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the pharmaceutical industry the polymorphic form of a drug is very relevant as it affects the solubility, potentiality, dissolution, shelf life and bioavailability. Therefore, polymorphism screening is an important issue in the pharmaceutical industry. Much effort has been expended by regulatory authorities and patent attorneys to determine whether polymorphs exist [1]. There are many methods for monitoring the transformation of polymorphs, such as: solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy (SS-NMR) [2,3], thermal gravimetric analysis (TGA) [4], optical spectroscopy such as mid-infrared (IR), near-infrared (NIR), Raman, and terahertz pulsed spectroscopy (TPS) [5,6], differential scanning calorimetry (DSC) [7] and X-ray powder diffraction (XRPD) [7].

Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) is an emerging technology within the pharmaceutical industry which can be used for rapidly estimating polymorphic composition and for polymorphism screening. The advantage of NIR-CI for these tasks is that NIR-CI adds spatial distribution information to the spectral information by combining traditional NIR spectroscopy with digital imaging [8–10]. Thus, NIR-CI has been successfully applied for drug identification [11,12] and quantification [13,14], for visualizing manufacturing problems and process effects on dissolution [15–19] and for estimating homogeneity [20–22]. Dubois et al. [23] and El-Hagrasy et al. [24] have used NIR-CI for the identification and characterization of counterfeit drug products.

In NIR-CI, a NIR spectrum is recorded in each pixel of the sample image resulting in a hyperspectral data cube. Translating the spectral signature from each pixel into, for example, chemical concentrations will generate a set of chemical images showing the distribution of each ingredient within the sample matrix. This visualization of the internal structure and elucidation of the distribution and cluster size of each constituent in the sample are valuable in formulation development and manufacturing of solid dosage forms as well as for troubleshooting quality defects. NIR-CI has the potential to provide increased process and product understanding which goes well with the process analytical technology (PAT) initiative of the FDA [25].

In this work, attempts were made to apply chemometric methods to imaging analysis of pharmaceutical formulations for quantification and distribution of polymorphic forms in the drug piroxicam. Piroxicam is a nonsteroidal antiinflammatory and analgesic drug that presents an interesting case of polymorphism. Three polymorphic forms (1, 2 and 3) and one monohydrate form can be obtained by crystallization from saturated solutions in various solvents. Fig. 1 shows the structural formula of piroxicam.

In our study, PLS models were developed for the piroxicam polymorph (forms 1 and 2) and the excipient for determination of the distribution and quantification of the polymorphic forms in the product, as well as of the excipients.

2. Theory

Partial least squares (PLS) method is an indirect calibration that does not require individual spectra of each analyte and interference to be known in advance. It is a regression method that relates a matrix of

* Corresponding author.

E-mail address: ronei@iqm.unicamp.br (W. Fortunato de Carvalho Rocha).

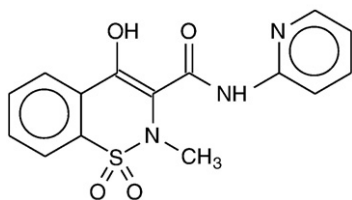


Fig. 1. Structural formula of piroxicam.

spectra (\mathbf{X}) with a vector of reference values (\mathbf{y}). PLS requires a calibration data set composed of several samples spanning an appropriate concentration range to build a model for new predictions. In its simplest form, a linear model specifies the (linear) relationship

between a dependent (response) variable \mathbf{y} , and a set of predictor variables, the x , so that:

$$y = b_0 + b_1x_1 + bx_2 + \dots + b_px_p. \quad (1)$$

In this equation b_0 is the regression coefficient for the intercept and the b_i values are the regression coefficients (for variables 1 through p) computed from the data. The method aims to identify the underlying factors, or linear combination of the x variables, which best model the \mathbf{y} dependent variables. PLS can deal efficiently with data sets where there are many variables that are highly correlated and involving substantial random noise. The differentiation between PLS1, where the regression is made to one dependent variable at a time (\mathbf{y} is a column vector), and PLS2, where all dependent variables are calculated simultaneously should also be mentioned. The method has been applied in many areas

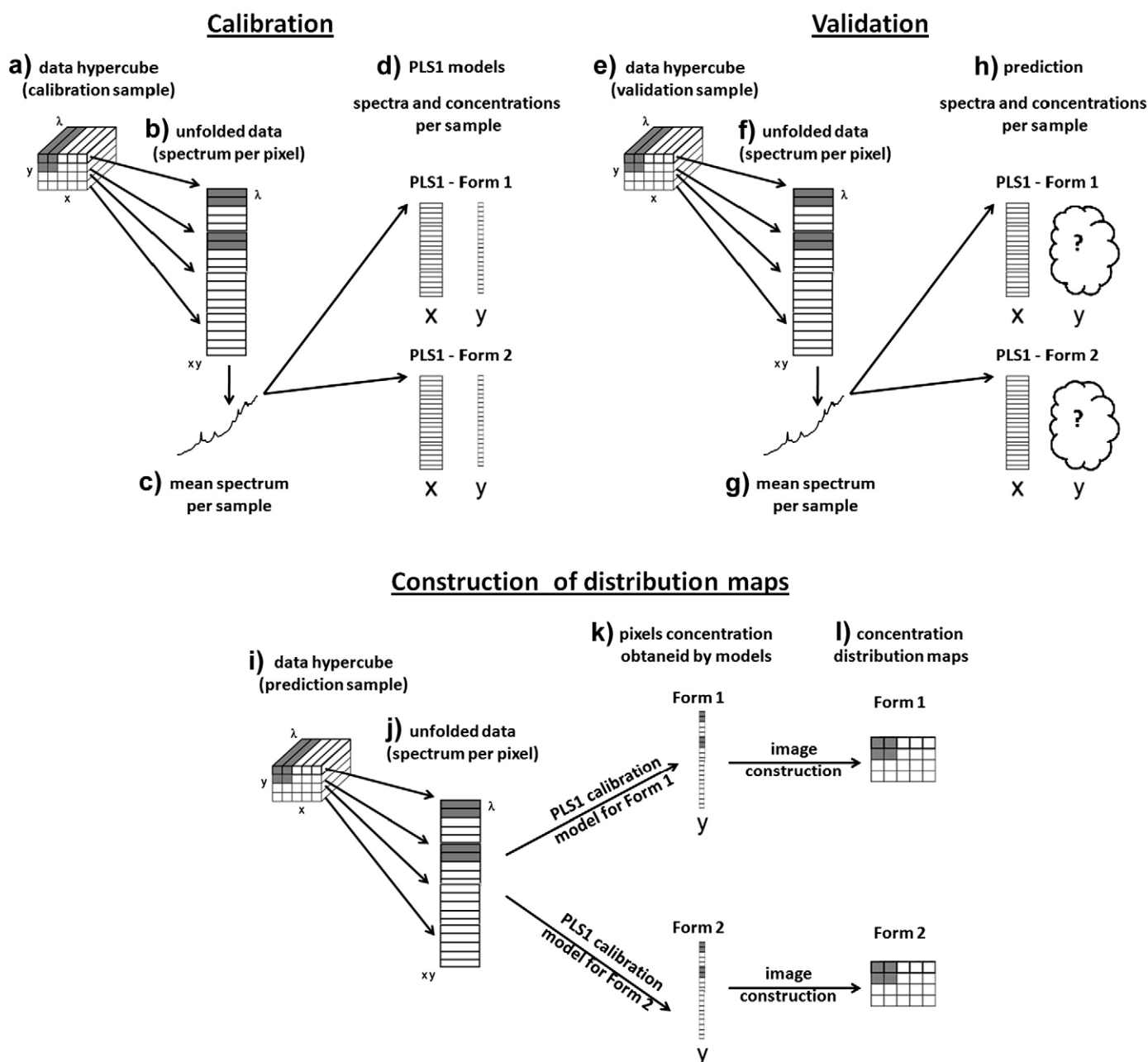


Fig. 2. Data transformation and calibration steps to obtain the distribution maps. (a) Calibration, (b) prediction and (c) reconstruction of distribution maps.

of research and technology such as: analytical chemistry, ecology, agriculture, food science, medicine and industry. PLS has been used for the study of hyperspectral data for pharmaceutical formulations [26].

Fig. 2 shows the image acquisition and data transformation necessary to obtain the distribution maps of the compounds using PLS according to the following stages:

Calibration

- The image is obtained directly from the surface of the tablet and consists of spectral hypercube of raw data, where the x and y axes are the spatial coordinates characteristic of the drug surface and the z axis is the wavelength (λ). Thus, for each pixel image there is a whole spectrum in the third dimension;
- In the next step, for each sample, the data are unfolded by spatial dimension elimination, resulting matrix $((xy) \times \lambda)$. The information about the pixel position is maintained on the rows of the that matrix;
- With the unfolded data, a mean spectrum of the matrix is obtained to represent each sample in the regression model;
- Thus, mean spectra, one for each tablet, are used to obtain a matrix (\mathbf{X}) that is related to the known concentration of the compounds of interest (\mathbf{y});

Validation

In the validation process, the stages e), f) and g) are performed like a), b) and c) using validation sample.

- The calibration models by partial least squares (PLS1), for forms 1 and 2, are used to predict the concentrations of the validation samples.

Construction of distribution maps

In the image prediction, the stages i) and j) are performed like a) and b) and the calibration models are used for prediction of the pixels.

- Both response vectors (\mathbf{y}) are obtained for each polymorphic form. In this stage, the response vectors represent the concentrations per pixel.
- Finally, the concentration distribution maps are obtained through the rearrangement of the pixels, forming one image for each polymorphic form.

3. Material and methods

In this work, piroxicam from EMS Sigma Pharma (Brazil) was used, which was found to correspond to form 1 by comparison with PXRD

spectra [7]. Form 2 was prepared from form 1. Form 2 (needles) was obtained by the crystallization from a saturated piroxicam solution in absolute ethanol (an aliphatic alcohol) at room temperature. Fifty-five pharmaceutical formulations containing the two polymorphic forms and the excipients (lactose, NaHCO_3 , talc, starch, and magnesium stearate) were made. All the samples were weighted in analytical balance with an accuracy of 0.00001 g and mixed for 5 min in 5 ml recipients. After that, the samples with total weights of 400 mg were pressed in a mechanical press under pressure of 0.5 ton for the formation of tablets.

An experimental design was performed in order to cover most of the concentration for all constituents present. The concentrations of form 1 were prepared in the range from 1% (w/w) to 90% (w/w) for pharmaceutical formulations while for form 2 the concentrations were from 1% (w/w) to 85% (w/w). Tablets were analyzed on a NIR line mapping system SPECTRUM 100 N FT-NIR Spectrometer coupled with a Spotlight 400 N FT-NIR Imaging System by PerkinElmer. This spectrometer is equipped with linear MCT detector array and it was used to acquire the NIR spectra under N_2 purge. An area of $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ was analyzed using pixel size $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, obtaining a total of 10,000 spectra for each image of 100×100 pixels. Each spectrum was the average of 8 scans in the wavelength region $7800\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ (i.e. 239 data points) using 16 cm^{-1} spectral resolution. The reflectance spectra (R) were transformed to $\log(1/R)$ prior to chemometric procedures.

After acquisition of images, the three-way data was unfolded and the pre-processing was accomplished.

The first step for model development was to split the tablets into a calibration set (30 samples) and a validation set (25 samples) using the Kennard–Stone algorithm [27]. Thus, PLS1 models were built for the quantification of two polymorphic forms of piroxicam. For model development, the mean spectra of the obtained images were used. All chemometric computation was made using home written mfiles running under Matlab 7.0® (The Mathworks, Natick, MA) environment.

The pure forms 1 and 2 were characterized by PXRD (Ni filtered, $\text{Cu K}\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5406$), voltage 40 kV, current 30 mA, angular speed $2^\circ/\text{min}$, and angular range $5^\circ < 2\theta < 50^\circ$).

4. Results and discussion

X-ray powder diffraction proved to be useful for analysis of the polymorphism of piroxicam, since these forms exhibit substantial differences in the X-ray powder diffraction spectra. The X-ray powder diffraction data for forms 1 and 2 correspond to those published in the

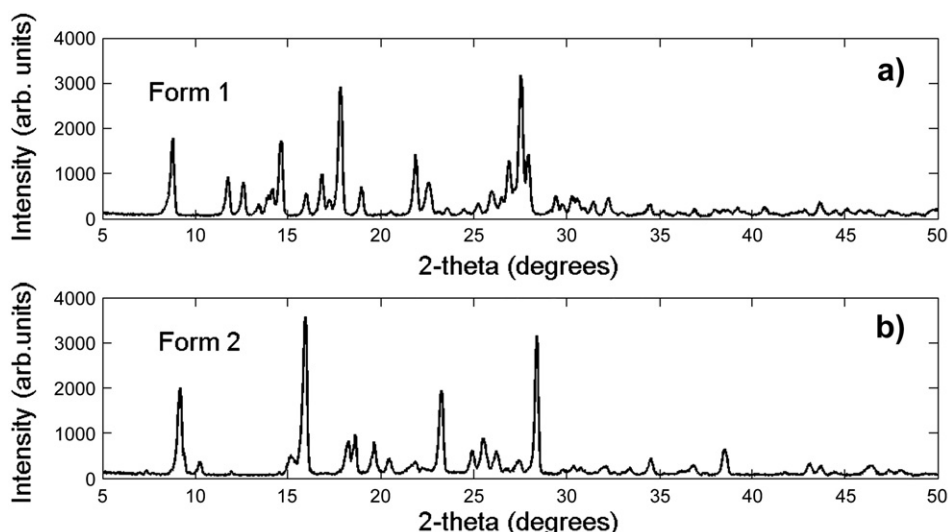


Fig. 3. Powder X-ray diffractograms of crystal forms of piroxicam: (a) form 1 and (b) form 2.

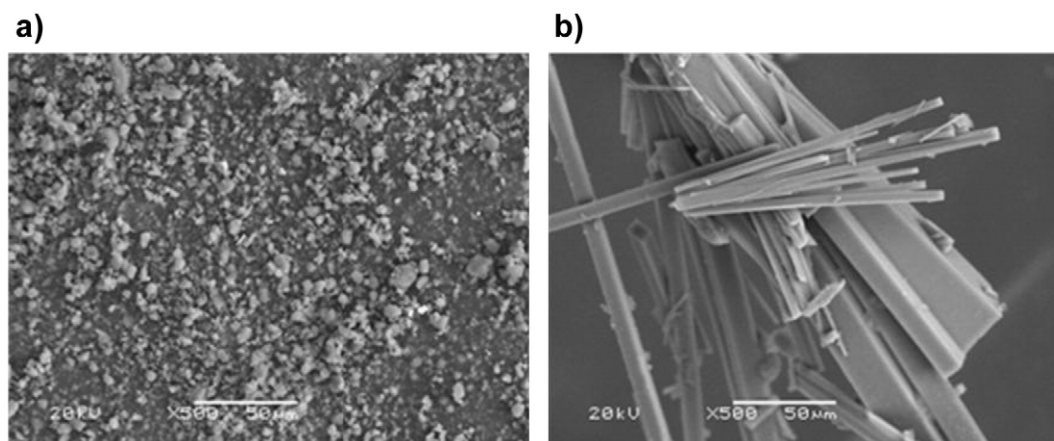


Fig. 4. Optical micrographs of piroxicam crystals. (a) Prisms of form 1 obtained as raw material and (b) needles of form 2 from absolute ethanol at room temperature.

literature [7]. Fig. 3 shows these differences. A detailed analysis of crystal structures can confirm or refute that the compounds are the same as those of the crystalline powder under investigation. Optical micrograph data confirm the existence of two distinct crystal modifications of piroxicam. Two polymorphs of piroxicam, prisms (Fig. 4a) and needles (Fig. 4b), commonly crystallized from saturated solution, are clearly observed.

Near-infrared spectroscopy can also be used for polymorphism analysis of piroxicam. The piroxicam forms 1 and 2 exhibit pronounced differences in their near-infrared spectra as shown in Fig. 5. The NIR spectra of forms 1 and 2 are also practically identical to those published in the literature [7].

After the confirmation of pure piroxicam polymorphic forms 1 and 2, mixtures of them in excipient were prepared. After that, PLS-1 models were developed for each of the polymorphic forms (1 and 2) and excipient. The hyperspectral mean spectrum for each of the 30 calibration samples was first calculated. The PLS models were built using 4 latent variables, in order to avoid over fitting or lack of fit to quantify polymorphic forms in both models. This number was chosen because it presented a lower root mean squares error of cross-validation (RMSECV) and explains 90.30% of X variance and 98.02% of y for form 1 and 86.21% of X variance and 97.22% of y for form 2. Cross-validation was performed by leave-one-out cross-validation.

In this study, a region of interest (ROI) represented by 10,000 pixels was used and therefore, in the model development the pixel outliers

were not evaluated, since a large number of samples were used for calibration. In addition, we used a detector (linear) that works by scanning surface area of the tablet, preventing the damage in the pixel image. However, Burger and Geladi [28], using a focal plane array detector and analyzing a small region of interest, suggest outlying pixel analysis.

Several pre-processing and their combinations were tested. The results showed that the best estimates for both forms 1 and 2 were a combination of detrend [29], orthogonal signal correction [30] and first derivative [28]. Several PLS-2 models have also been developed for the quantification of polymorphic forms, but worst results than the PLS-1 models were observed.

In Figs. 6 and 7 the measured values are shown against the predicted ones using the PLS models developed. It is possible to note a good fit between the reference values and the ones predicted by the models. It is interesting to note that most points are in low concentrations. This is expected, since we used several compounds (piroxicam and excipients) that were varied in order to cover the large range of concentration for all compounds. Table 1 shows the results for the PLS models developed for the determination of forms 1 and 2.

In Table 1, the RMSEC and RMSEP values are below 4%, related to the models presented in Figs. 6 and 7. Therefore, since the values obtained are similar to the models, they can be considered suitable for the quantification of the polymorphic forms present in pharmaceutical formulations. Besides, for this comparison, a F -test [31] was

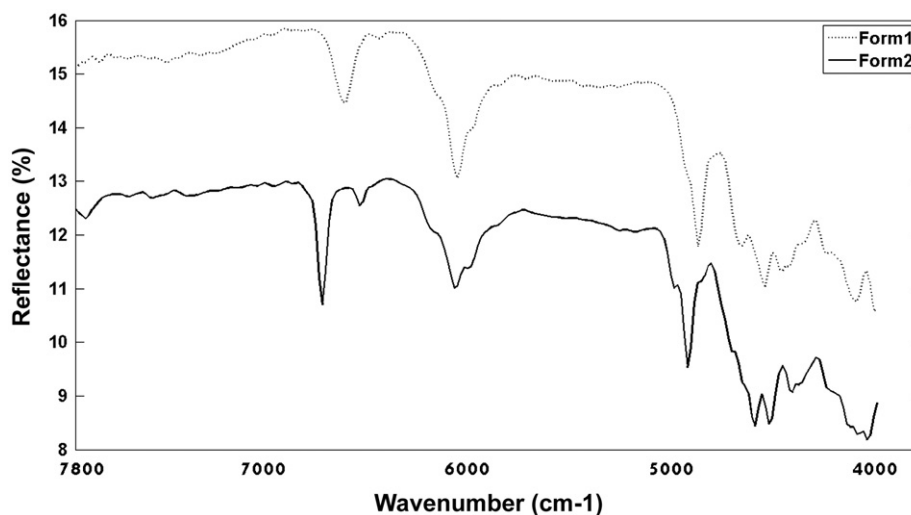


Fig. 5. NIR spectra of crystal forms of piroxicam.

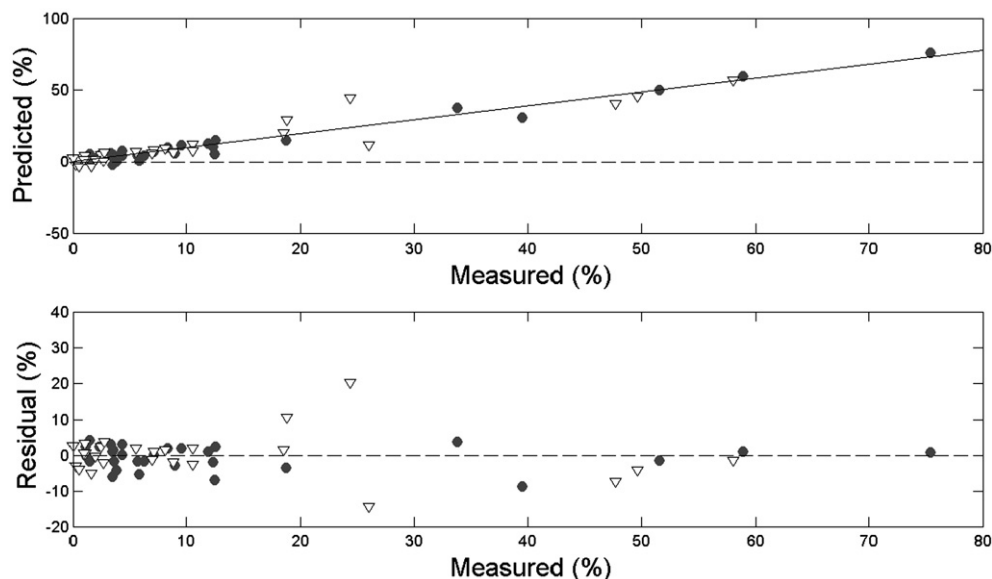


Fig. 6. Plot of predicted versus reference values for form 1 piroxicam by PLS. Calibration (●) and validation (▽) samples.

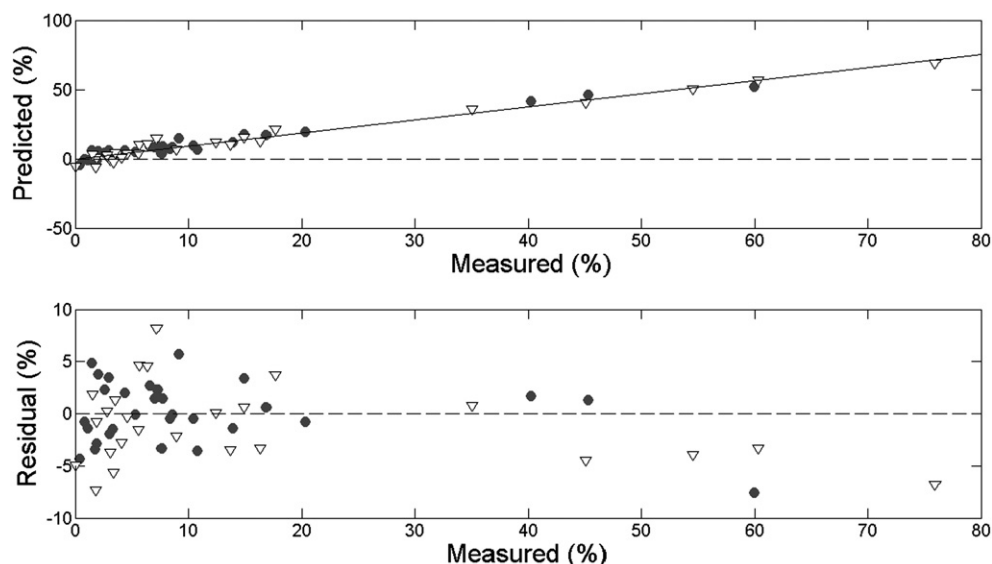


Fig. 7. Plot of predicted versus reference values for form 2 piroxicam by PLS. Calibration (●) and validation (▽) samples.

performed with 95% of confidence level ($p=0.05$), considering the null hypothesis in which there is no significant difference in errors for the determination of polymorphic forms pharmaceutical formulations given by the two models. For the F -test the following expression was used:

$$F = \frac{(RMSEP_{FORM1})^2}{(RMSEP_{FORM2})^2} = \frac{(3.72)^2}{(3.66)^2} = 1.03 \quad (2)$$

where RMSEP is the root mean square error of prediction [32].

The value found for the F -test was 1.03. The critical value of t is 1.98 ($p=0.05$) and since the calculated value is less than critical value, the null hypothesis is retained: the determination of both polymorphic forms does not give significantly different errors in the pharmaceutical formulations prepared. The degree of freedom used for the F -test was equal to 24 in both numerator and denominator for both equations.

The percentile errors concerning these fits are shown in Figs. 6 and 7. In these figures, the residues present a random distribution, indicating a

suitable fit. The calculation of the residuals was performed by using Eq. (3):

$$residual(\%) = \left(\frac{\mathbf{y}_{ref} - \mathbf{y}_{pred}}{\mathbf{y}_{ref}} \times 100 \right) \quad (3)$$

where \mathbf{y}_{ref} contains the reference values for the concentration of piroxicam and \mathbf{y}_{pred} is the value predicted by the model. The majority of predicted samples have errors lower than 6%, which are acceptable for this determination.

Table 1
Results obtained for the quantification of polymorphic forms.

	RMSEC (%)	RMSECV (%)	RMSEP (%)	$R^2_{calibration}$	$R^2_{validation}$	Bias
Form 1	3.25	4.07	3.72	0.98	0.98	-0.50
Form 2	2.92	3.89	3.66	0.96	0.96	0.10

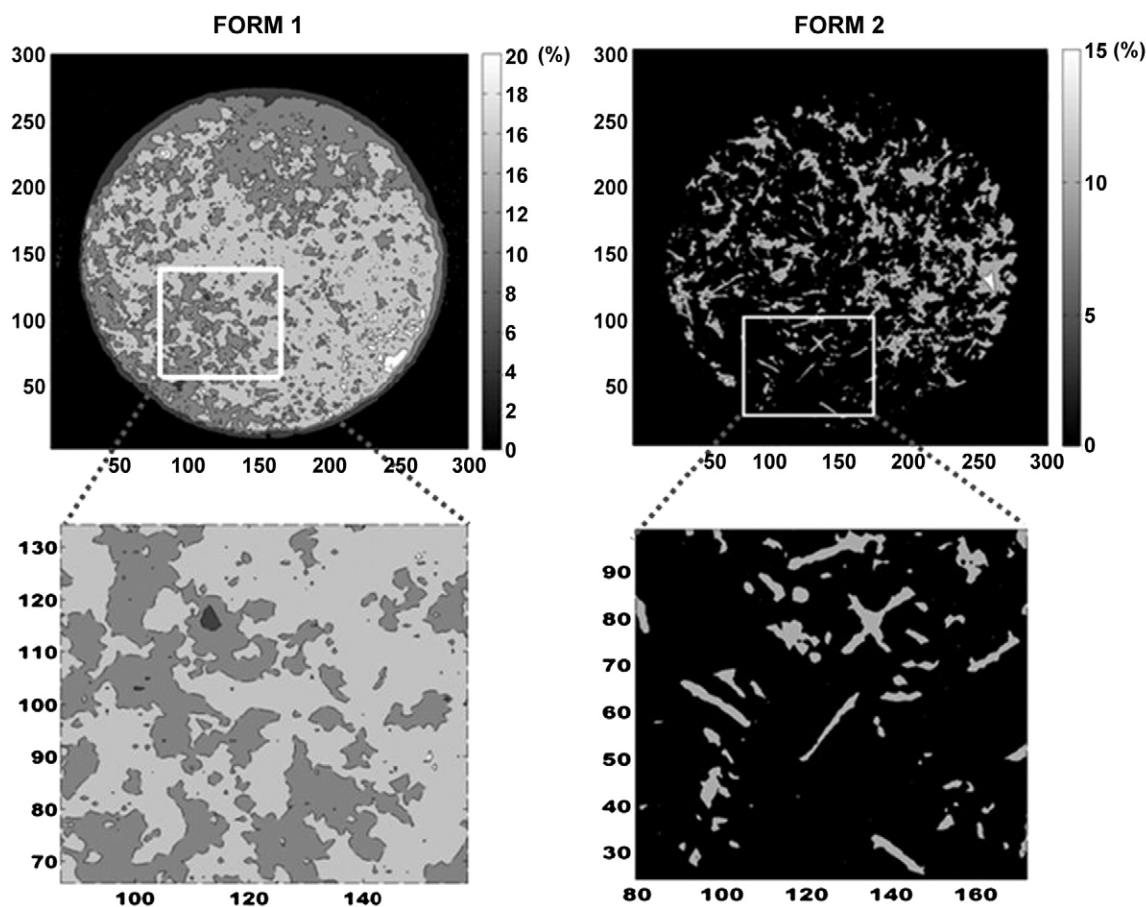


Fig. 8. PLS distribution maps of the polymorphic forms. The detail is an expanded view.

The study of the distribution of polymorphic forms contained in pharmaceutical formulations was made through the reconstruction of images using the PLS models. Fig. 8 shows both piroxicam polymorphic forms on the surface of a tablet. In expansions in Fig. 8, it is possible to compare the polymorphic forms 1 and 2 and their respective optical micrographs in Fig. 4. Using NIR-CI it is possible to observe a tendency for the clustering of two different crystal groups. The first refers to prism shape and the other to needles. This observation is important for final product quality control, because it shows the extent to which these clusters occur, as well as their influence on bioavailability studies.

5. Conclusion

A method to perform concentration map distribution of piroxicam polymorphs from hyperspectral data was presented. It is possible to obtain information with excellent chemical precision per pixel of image by the PLS method. Through the *F*-test it was possible to conclude that the models for polymorphic forms 1 and 2 have the same prediction errors within 95% of confidence level. This indicates that it is possible to differentiate the physical and chemical characteristics of the active ingredient piroxicam enabling the possibility of using NIR-CI for obtaining global and local information of the samples studied.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (proc. 2006/07309-3), CNPq and CAPES for fellowships and financial support of their research projects.

References

- [1] J.K. Halebian, W. McCrone, Pharmaceutical applications of polymorphism, *J. Pharm. Sci.* 58 (1969) 911–929.
- [2] P.A. Tishmack, Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy pharmaceutical applications, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 441–474.
- [3] T.B. Robert, D.M. Sperger, P.K. Isbester, E.J. Munson, Solid state NMR spectroscopy in pharmaceutical research and analysis, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 977–984.
- [4] Y. Ikeda, T. Hirayama, K. Terada, Application of thermally stimulated current measurement to the polymorphic characterization of drug substances, *Thermochim. Acta* 31 (2005) 195–199.
- [5] M.C. Gamberini, C. Baraldi, A. Tinti, C. Rustichelli, V. Ferioli, G. Gamberini, Solid state characterization of chloramphenicol palmitate: Raman spectroscopy applied to pharmaceutical polymorphs, *J. Mol. Struct.* 785 (2006) 216–224.
- [6] M. Blanco, A. Villar, Development and validation of a method form the polymorphic analysis of pharmaceutical preparations using near infrared spectroscopy, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 823–830.
- [7] F. Vrečer, M. Vrbinc, A. Meden, Characterization of piroxicam crystal modifications, *Int. J. Pharm.* 253 (2003) 3–15.
- [8] C.A. Anderson, J.K. Drennen, E.W. Ciurczak, Pharmaceutical applications of near-infrared spectroscopy, in: D.A. Burns, E.W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of Near-infrared Analysis*, CRC Press, Boca Raton, 2007, pp. 585–612.
- [9] G. Reich, Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1109–1143.
- [10] J. Burger, P. Geladi, Hyperspectral NIR imaging for calibration and prediction: a comparison between image and spectrometer data for studying organic and biological samples, *Analyst* 131 (2006) 1152–1160.
- [11] F. Clarke, Extracting process-related information from pharmaceutical dosage forms using near infrared microscopy, *Vib. Spectrosc.* 34 (2004) 25–35.
- [12] E.N. Lewis, J. Schoppelrei, E. Lee, Near-infrared chemical imaging and the PAT initiative, *Spectroscopy* (2004) 26–34.
- [13] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 533–553.
- [14] E. Lee, W.X. Huang, P. Chen, E.N. Lewis, R.V. Vivilecchia, High-throughput analysis of pharmaceutical tablet content uniformity by near-infrared chemical imaging, *Spectroscopy*. 21 (2006) 24–31.
- [15] Y. Roggo, A. Edmond, P. Chalut, M. Ulmschneider, Infrared hyperspectral imaging for qualitative analysis of pharmaceutical solid forms, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 79–87.

- [16] J. Dubois, E.N. Lewis, Advanced troubleshooting of dissolution failure, 2009, pp. 38–45, Available from: www.pharmaceuticalonline.com.
- [17] L. Makein, L.H. Kidder, E.N. Lewis, M. Valleri, Non-destructive evaluation of manufacturing process changes using near infrared chemical imaging, *NIR news* 19 (2008) 11–15.
- [18] Y. Roggo, N. Jent, A. Edmond, P. Chalus, M. Ulmschneider, Characterizing process effects on pharmaceutical solid forms using near-infrared spectroscopy and infrared imaging, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61 (2005) 100–110.
- [19] B.J. Westenberger, C.D. Ellison, A.S. Fussner, S. Jenney, R.E. Kolinski, T.G. Lipe, R.C. Lyon, T.W. Moore, L.K. Revelle, A.P. Smith, J.A. Spencer, K.D. Story, D.Y. Toler, A.M. Wokovich, L.F. Buhse, Quality assessment of internet pharmaceutical products using traditional and non-traditional analytical techniques, *Int. J. Pharm.* 306 (2005) 56–70.
- [20] R.C. Lyon, D.S. Lester, E.N. Lewis, E. Lee, L.X. Yu, E.H. Jefferson, A.S. Hussain, Near-infrared spectral imaging for quality assurance of pharmaceutical products: analysis of tablets to assess powder blend homogeneity, *AAPS Pharm. Sci. Technol.* 3 (2002) 1–15.
- [21] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, C. Collet, Monitoring galenical process development by near infrared chemical imaging: one case study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 828–838.
- [22] E.N. Lewis, J.E. Carroll, F. Clarke, A near infrared view of pharmaceutical formulation analysis, *NIR news* 12 (2001) 16–18.
- [23] J. Dubois, J.C. Wolff, J.K. Warrack, J. Schoppelrei, E.N. Lewis, NIR chemical imaging for counterfeit pharmaceutical products analysis, *Spectroscopy* (2007) 40–46.
- [24] A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen III, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298–1307.
- [25] U.S. Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry, PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, FDA (CDER), (2004). Available from: www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm.
- [26] C. Ravn, E. Skibsted, R. Bro, Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms – comparing common calibration approaches, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 554–561.
- [27] R.W. Kennard, L.A. Stone, Computed aided design of experiment, *Technometrics* 11 (1969) 137–148.
- [28] J. Burger, P. Geladi, Hyperspectral NIR imaging regression part 2: dataset preprocessing diagnostic, *J. Chemometr.* 20 (2006) 106–119.
- [29] B. Li, A.J. Morris, E.B. Martin, Orthogonal signal correction: algorithmic aspects and properties, *J. Chemometr.* 16 (2002) 556–561.
- [30] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777.
- [31] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, Orlando, 1992.
- [32] M. Ottho, *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.