



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



VITOR HUGO DA SILVA

**USO DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA ANÁLISE
DE POLIMORFOS**

Recife

2018

VITOR HUGO DA SILVA

**USO DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA ANÁLISE
DE POLIMORFOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora:

Claudete Fernandes Pereira (UFPE, Brasil)

Recife

2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Elaine Freitas CRB4-1790

S586u Silva, Vitor Hugo da
Uso da espectroscopia vibracional na análise de polimorfos/ Vitor Hugo da Silva. – 2018.
106 f. ; fig., tab.

Orientadora: Claudete Fernandes Pereira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN.
Química Fundamental. Recife, 2018.
Inclui referências.

1. Química Analítica. 2. Polimorfismo. 3. Mebendazol. 4. Espectroscopia Vibracional. I. Claudete Fernandes Pereira. (Orientadora). II. Título.

543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2018-75

VITOR HUGO DA SILVA

USO DA ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA ANÁLISE DE POLIMORFOS

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovado em: 17 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Claudete Fernandes Pereira (Orientadora)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Célio Pasquini
Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Everaldo Paulo de Medeiros
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa - Algodão

Prof. Dra. Fernanda Araújo Honorato
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Considero que todo sucesso e êxito são construídos através das colaborações e auxílio recebidos durante a trajetória. Eu não cheguei aqui sozinho e todos aqui agradecidos contribuíram fundamentalmente para minha formação.

Prof. Claudete Fernandes, muito obrigado por acreditar em mim e me apresentar os caminhos que me fizeram um profissional digno deste trabalho. Obrigado pelas discussões, auxílio, apoio e excelente supervisão. Sua trajetória e conselhos sempre me impulsionam. Obrigado pela acolhida desde do Mestrado e ter me ajudado a ser um Doutor.

Prof. Asmund Rinnan, obrigado pela acolhida e auxílio durante meu intercambio na Universidade de Copenhague, a quem também sou grato. As suas discussões e pensamento rápido foram essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Prof. Maria Fernanda Pimentel, obrigado por ter acreditado em mim desde quando eu era apenas um garoto entrando na Iniciação Científica. Como em toda minha carreira, a sua competência profissional forneceu muitas bases para meu desenvolvimento. Obrigado pelo apoio, ideias, discussões e incentivo a ir adiante.

Prof. Celio Pasquini, obrigado por ter aberto as portas do seu laboratório na UNICAMP para que grande parte deste trabalho pudesse ser realizado. Suas ideias e nossas discussões foram primordiais para o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação.

Dr. Everaldo, obrigado por ter aberto as portas da Embrapa Algodão – PB – para a aquisição das imagens analisadas neste trabalho.

Prof. Ivani Malvestiti, obrigado por ter aberto seu laboratório para a realização das recristalizações das amostras. Seu apoio gerou muitos frutos.

Prof Lamartine, obrigado por ter aberto seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Suas ideias e estímulo foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. A Jailson, excelente estudante de Iniciação Científica que me auxiliou grandemente neste trabalho.

Ao Laboratório de Combustíveis – LAC – sou eternamente grato. Esse ambiente e as pessoas que fazem esse lugar foram sem medida fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

Ao CPNq e CAPES pelas bolsas concedidas no Brasil e exterior. Ao INCTAA e NUQAPE pelo incentivo ao projeto. A UFPE e Universidade de Copenhague pelo suporte institucional.

Pai e Mãe, vocês talvez nunca fizeram ideia do quanto seus esforços na minha educação poderia resultar. Obrigado por sempre terem me fornecido alicerce para chegar até aqui e ir além.

Aos meus amigos acadêmicos, Carolina, Alianda, Eduardo, Neirivaldo, Danilo, Rafaela e Francielson, por todas as discussões, conselhos e colaboração na minha formação e na minha vida.

A Hugo, pelo companheirismo, suporte e incentivo a minha formação.

Aos meus amigos da vida, Roberta, Romulo e Wagner, muito obrigado por todo incentivo.

Aos amigos que fiz na Dinamarca, Rodrigo, Andrezza, Aris, Altair, Viola, Klavs, Dillen, Nicola, Alessandro e Álvaro, por todas as cervejas científicas.

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento de métodos analíticos para determinar quantitativamente as formas polimórficas do mebendazol tanto na matéria prima quanto nos comprimidos utilizando as espectroscopias no Infravermelho Próximo (NIR) e Terahertz (THz). No estudo com a matéria prima, modelos de calibração multivariada baseados na regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foram desenvolvidos em misturas ternárias dos polimorfos utilizando espectros NIR e THz adquiridos em equipamentos de bancada e portáteis. Todas as metodologias utilizadas forneceram resultados satisfatórios para quantificação dos polimorfos. A espectroscopia THz apresentou maior sensibilidade analítica fornecendo os menores erros de predição por acessar diretamente informações cristalográficas dos materiais. Dentre os equipamentos portáteis NIR, um deles apresentou resultados bastante promissores e comparáveis aos obtidos com o equipamento de bancada. Transferência de calibração multivariada também foi avaliada entre os equipamentos NIR de bancada e o melhor equipamento portátil. De acordo com os resultados obtidos, a transferência de calibração entre os equipamentos é possível e os resultados da recalibração completa com o instrumento portátil são comparáveis aos obtidos com equipamento de bancada. Os métodos desenvolvidos para análise da matéria prima demonstraram eficiência e flexibilidade para o controle da qualidade desses materiais. No estudo com os comprimidos, modelos MCR-ALS e PLS foram construídos nas imagens hiperespectrais NIR (HSI-NIR) para quantificar globalmente e localmente os polimorfos do MBZ. Formulações simplificadas foram construídas utilizando as misturas ternária dos polimorfos do MBZ, celulose microcristalina (MCC) e estearato de magnésio (MgSt). Os resultados demonstraram que a melhor ferramenta quimiométrica para quantificação dos polimorfos nas imagens depende dos objetivos desejado. Para quantificação global, modelos PLS são mais precisos. Para quantificação local (mapas de distribuição), MCR-ALS apresentou mapas de distribuição mais quimicamente significativos. Na quantificação global, os resultados utilizando HSI-NIR foram comparáveis aqueles utilizando os espectros convencionais. Por fim, modelos de regressão clássica (CLS) utilizando os espectros puros e o sinal analítico líquido (NAS) obtidos por meio desses espectros puros e recuperados pelo MCR-ALS também foram avaliados para quantificação dos polimorfos. Os modelos construídos com NAS (MCR-ALS) forneceram os melhores resultados. Esse modelo é dependente dos resultados do MCR-ALS para serem construídos. Porém, com base neste estudo, os resultados mostram novas possibilidades para utilização do CLS com NAS para realizar tais quantificação.

Palavras Chaves: Mebendazol. Polimorfismo. Espectroscopia Vibracional. Calibração Multivariada.

ABSTRACT

This work describes the development of analytical methods to quantify the MBZ polymorphs in raw materials and tablets using near infrared (NIR) and terahertz (THz) spectroscopies. For the raw materials, multivariate calibration models based in partial least square (PLS) regression were developed with the polymorphs ternary mixture using THz spectra and NIR spectra acquired in benchtop and handheld instruments. These techniques provided efficient results for quantifying MBZ polymorphs in raw materials. Among these techniques, THz showed better analytical sensibility with lower prediction errors due to access directly the crystallographic information about the materials. Among the three handheld NIR instruments used, one of them showed comparable results with these obtained with the benchtop NIR instrument. Calibration transfer was also performed between the benchtop and handheld NIR instruments. According to the results, models transference is possible. The results obtained for complete recalibration of the handheld instrument and those for the benchtop are comparable. The methods developed demonstrated a flexible, easy, cheap and fast way for quality control of MBZ polymorphs in incoming material. For the study with tablets, MCR-ALS and PLS models were built for quantifying MBZ polymorphs globally and over the tablets using NIR hyperspectral images (HSI-NIR). Simplified formulations were made using the MBZ polymorphs, microcrystalline cellulose (MCC) and magnesium stearate (MgSt). These results indicate that the optimal multivariate model using hyperspectral images depend on the goal of the analysis. For global quantification, PLS models were more accurate. For local quantification (distribution maps), MCR-ALS gave more chemical meaningful distribution maps for all polymorphs. HSI-NIR results for global quantification also showed comparable results with these obtained by using conventional spectra. Finally, classical least squares (CLS) was evaluated for quantifying the polymorphs using HSI-NIR with the pure spectra and the net analyte signal (NAS) obtained using the pure spectra and the recovered by the MCR-ALS for all components. The models developed with the NAS (MCR-ALS) evidence the best results. This model is dependent of the MCR-ALS results to be developed. However, these results showed a possible way to use CLS with the NAS to perform these quantifications.

Keywords: Mebendazole. Polymorphism. Vibrational Spectroscopy. Multivariate Calibration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Mebendazol.	22
Figura 2 - Micrografias dos pós dos polimorfos A (a–b), C (c–d) e B (e–f) do MBZ com diferentes magnitudes (PAIVA <i>et al.</i> , 2018).....	24
Figura 3 - Espectro eletromagnético entre as ondas de rádio e radiação ultravioleta-visível (adaptado de EL HADDAD <i>et al.</i> , 2013).....	28
Figura 4 - Modos vibracionais em uma molécula com três átomos (OLIVEIRA, 2013).....	30
Figura 5 - Diagrama de energia potencial para os (a) osciladores harmônicos e (b) anarmônicos (adaptado de PASQUINI, 2003).....	31
Figura 6 - Modo de medida por reflectância difusa.....	32
Figura 7 - Representação estrutural de um hipercubo (adaptado de SACRÉ <i>et al.</i> , 2014)....	33
Figura 8 - Desdobramento de uma imagem química tridimensional para matriz bidimensional	33
Figura 9 - Ajuste do polinômio com janela de 13 pontos. O valor suavizado do ponto 7 é mostrado como X (adaptado de BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).....	41
Figura 10 - Representação geométrica da decomposição do sinal analítico em NAS e interferentes (adaptado de FERRÉ; FABER, 2003).	48
Figura 11 - Esquema de calibração e predição para análise quantitativa simultânea em imagens hiperespectrais por MCR-ALS (adaptado de PIQUERAS <i>et al.</i> , 2012).	53
Figura 12 - Esquema simplificado e geral da construção dos modelos PLS desenvolvidos neste trabalho e da transferência de calibração.	59
Figura 13 - Esquema simplificado e geral do tratamento de dados realizado na HSI-NIR.....	60
Figura 14 - Espectros NIR dos polimorfos puros do MBZ adquiridos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR.	62

Figura 15 - Espectros NIR brutos das misturas ternárias do polimorfos do MBZ adquiridos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTIR.....	64
Figura 16 - Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR para quantificação do polimorfo A.	67
Figura 17 - Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR para quantificação do polimorfo B.....	67
Figura 18 - Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR para quantificação do polimorfo C.....	68
Figura 19 - Espectros NIR das amostras de predição antes e após padronização pelo método RS e a diferença espectral entre eles para o polimorfo A.	70
Figura 20 - Espectros NIR das amostras de predição antes e após padronização pelo método RS e a diferença espectral entre eles para o polimorfo B.	70
Figura 21 - Espectros NIR das amostras de predição antes e após padronização pelo método RS e a diferença espectral entre eles para o polimorfo C.	71
Figura 22 - Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos após padronização reversa para quantificação dos polimorfos (a) A, (b) B e (c) C do MBZ.....	72
Figura 23 - Espectro THz bruto dos polimorfos do MBZ (a) e suas misturas (b).....	73
Figura 24 - Difratoograma dos polimorfos do MBZ.	74
Figura 25 - Espectro THz derivativo (SG, polinômio de 2ª ordem e janela de 51 pontos) das misturas do MBZ. Região espectral eliminada em destaque.	75

Figura 26 - Gráfico dos valores de referência versus predito para os melhores modelos de regressão desenvolvidos para quantificação dos polimorfos (a) A, (b) B e (c) C do MBZ.....	77
Figura 27 - Coeficientes de regressão para os melhores modelos PLS calculados pra quantificação do polimorfo B e C.....	78
Figura 28 - (a) Espectros NIR dos componentes puros e excipientes dos comprimidos. (b) Espectros médios NIR de cada comprimido.....	79
Figura 29 - Espectros NIR pré-processados (linha) e os espectros recuperados pelo MCR-ALS (linha tracejada) com seus respectivos coeficientes de correlação.....	82
Figura 30 - Gráfico dos valores de referência versus predito obtidos pelos modelos PLS e MCR-ALS para quantificação dos polimorfos do MBZ.....	85
Figura 31 - Coeficientes de regressão dos modelos PLS para os polimorfos do MBZ.....	86
Figura 32 - Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M4.....	88
Figura 33 - Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M10.....	89
Figura 34 - Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M16.....	90
Figura 35 - Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M01.....	91
Figura 36 - Espectro pré-processado do MCC e o coeficiente de regressão PLS para o polimorfo C.....	92
Figura 37 - Espectros derivativos puros NIR e NAS obtidos por meio dos espectros puros e recuperados pelo modelo MCR-ALS para todos os componentes dos comprimidos.....	94

Figura 38 - Gráficos dos valores de referência versus predito pelos modelos CLS desenvolvidos com os espectros puros e NAS obtidos por meio dos espectros puros e recuperados pelo modelo MCR-ALS..... 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção de cada polimorfo do MBZ nas misturas.	55
Tabela 2 - Resultados dos melhores modelos PLS para determinação dos polimorfos do MBZ utilizando equipamentos NIR portáteis e de bancada. O valor em parênteses refere-se o número de variáveis latentes utilizadas nos modelos de regressão.....	65
Tabela 3 - Capacidade preditiva dos modelos para MicroNIR 1700 e FTNIR utilizando métodos de padronização direta e reversa para predição das amostras. O valor em parênteses refere-se ao número de variáveis latentes utilizada nos modelos de regressão.	69
Tabela 4 - Resultados do modelo PLS para quantificação dos polimorfos MBZ utilizando os espectros THz derivados (0,4 – 4,4 THz). Os valores entre parênteses referem-se ao número de variáveis latentes utilizada nos modelos de regressão.....	75
Tabela 5 - Resultados do modelo PLS para quantificação dos polimorfos MBZ utilizando os espectros THz derivados (0,4 – 3,0 THz). Os valores entre parênteses referem-se ao número de variáveis latentes utilizada nos modelos de regressão.....	76
Tabela 6 - Resultado dos modelos PLS e MCR-ALS na quantificação dos polimorfos do MBZ nos comprimidos utilizando HSI-NIR. O número em parênteses indica o número de variáveis latentes utilizada pelos modelos PLS.....	83
Tabela 7 - Resultado dos modelos CLS para quantificação dos polimorfos do MBZ nos comprimidos utilizando os espectros puros e NAS obtidos a partir dos espectros puros e recuperado pelo modelo MCR-ALS.	95

LISTA DE ABREVIATURAS

APS	Algoritmo das projeções sucessivas
ASOPS	Amostragem óptica assíncrona de alta velocidade
CLS	Regressão pelo método dos mínimos quadrados clássicos
DFT	Teoria da densidade funcional
DS	Padronização direta
EFA	Análise Evolucionaria de Fatores
FIR	Infravermelho distante
GA	Algoritmo genético
HSI	Imagens Hiperespectrais
IFA	Insumo farmacêutico ativo
iPLS	Regressão por mínimos quadrados parciais por intervalos
JK	Jack-Knife
KS	Kennard-Stone
LOD	Limite de detecção
LOF	Falta de Ajuste
LVF	Filtro linear variável
MBZ	Mebendazol
MCC	Celulose Microcristalina
MCR-ALS	Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes
MgSt	Estearato de Magnésio
MIR	Infravermelho médio
MLR	Regressão linear múltipla
MSC	Correção multiplicativa de sinal
MVC1	Calibração Multivariada de Primeira Ordem
NAS	Sinal Analítico Líquido
NIR	Infravermelho próximo
NIRA	Acessório de reflectância difusa
OMS	Organização mundial da saúde
P	Equipamento primário
PAT	Tecnologia analítica de processos

PCR	Regressão por componentes principais
PE	Polietileno
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais
PTFE	Politetrafluoretileno
PXRD	Difração de raios X de pó
RMSECV	Erro médio quadrático de validação cruzada
RMSEP	Erro médio quadrático de predição
ROI	Região de Interesse
RS	Padronização reversa
S	Equipamento secundário
SNV	Variação normal padrão
SPXY	Partição de amostras baseados na distância \mathbf{X} - y
SW	Stepwise
THz	Terahertz
UATR	Reflectância total atenuada universal
UV-Vis	Ultravioleta visível
VL	Variável Latente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	21
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1	MEBENZADOL.....	22
3.1.1	Formas polimórficas do mebendazol	23
3.1.2	Caracterização e identificação das formas polimórficas do mebendazol.....	25
3.2	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	27
3.2.1	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR).....	29
3.2.2	Espectroscopia Terahertz (THz)	34
3.3	UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA THZ, EQUIPAMENTOS NIR PORTÁTEIS E HSI-NIR NA ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS	35
3.4	QUIMIOMETRIA	37
3.4.1	Planejamento e otimização de experimentos.....	38
3.4.2	Pré-processamento de dados.....	39
3.4.3	Calibração multivariada	42
3.4.4	Seleção de amostras	45
3.4.5	Seleção de variáveis	46
3.4.6	Transferência de calibração	47
3.4.7	Sinal Analítico Líquido	48
3.4.8	Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes ..	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1	AMOSTRAS	54
4.2	AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS	55
4.2.1	Espectros NIR	55
4.2.1.1	Equipamentos portáteis e de bancada.....	55
4.2.1.2	Equipamento de Imagem.....	56
4.2.2	Espectros THz.....	57
4.3	ANÁLISE DE DADOS E SOFTWARES	57

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1	QUANTIFICAÇÃO DE POLIMORFOS UTILIZANDO INSTRUMENTOS PORTÁTEIS E TRANSFERÊNCIA DE CALIBRAÇÃO	62
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE POLIMORFOS POR ESPECTROSCOPIA THZ.....	72
5.3	QUANTIFICAÇÃO DOS POLIMORFOS EM COMPRIMIDOS POR HSI-NIR	79
6	CONCLUSÃO.....	98
7	PERSPECTIVAS.....	99
	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A espectroscopia vibracional é amplamente utilizada na investigação de produtos farmacêuticos devido às características associadas a essa região do espectro eletromagnético (12800- 10 cm^{-1}) que permitem tanto a identificação quanto a quantificação de diferentes tipos de materiais farmacêuticos. A espectroscopia vibracional permite análises rápidas, com pouco ou sem preparo de amostra e medidas não destrutivas (BRITAIN, 2009a; CHALMERS; DENT, 2006). Na literatura são descritos métodos analíticos com diferentes aplicações na determinação de parâmetros farmacêuticos críticos ao longo de todos os estágios da produção de fármacos no estado sólido, como a identificação e quantificação de polimorfos (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011). Esses métodos têm utilizado especialmente a espectroscopia vibracional no infravermelho médio (MIR: *Middle Infrared*), próximo (NIR: *near infrared*) e espalhamento Raman (BUNACIU; ABOUL-ENEIN; DANG, 2015).

No caso da espectroscopia NIR, trata-se de uma técnica que permite análises *in-*, *on-* e *at-line*, utilizando essencialmente equipamentos de bancada, no controle e monitoramento de processos farmacêuticos, atendendo às iniciativas da tecnologia analítica de processos (PAT: *process analytical technology*) (JAMRÓGIEWICZ, 2012; LUYPAERT; MASSART; VANDER HEYDEN, 2007). Atualmente, a miniaturização dos instrumentos NIR tem aberto novas perspectivas na utilização desses equipamentos na análise de fármacos. Do ponto de vista prático, o uso de equipamentos portáteis no monitoramento da qualidade de matérias primas e nas etapas de produção de um fármaco é bastante atraente.

Indiscutivelmente, equipamentos de bancada apresentam melhor reprodutibilidade do comprimento de onda, maior resolução espectral e relação sinal-ruído que equipamentos portáteis (CHASE, 2002; PAIVA *et al.*, 2015). No entanto, esses equipamentos portáteis fornecem uma combinação de flexibilidade com eficiência para controle da qualidade e monitoramento de produção de fármacos. Além disso, a aplicação de técnicas de transferência de calibração torna possível a utilização de instrumentos portáteis, em diferentes lugares ao longo de uma linha de produção e/ou laboratórios farmacêuticos, com erros equivalentes aos obtidos com os modelos desenvolvidos com equipamentos de bancada. Isso oferece uma alternativa econômica e prática ao desenvolvimento de modelos individuais para cada instrumento (BLANCO *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2016).

Além da recente miniaturização dos equipamentos, câmeras têm sido associadas a instrumentos convencionais e a aquisição de imagens hiperespectrais (HSI: *hyperspectral image*) tornou-se possível. Nos sistemas HSI, um espectro é medido para cada pixel da imagem

e uma matriz com três dimensões é gerada (X, Y e λ). Além da informação química (informação espectral) obtida nas imagens, informação espacial sobre a amostra como a distribuição de um Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) em um comprimido torna-se viável (GENDRIN; ROGGO; COLLET, 2008). A utilização dessas imagens hiperespectrais em diferentes aplicações farmacêuticas tem sido demonstrada com eficiência na determinação de IFA (CRUZ et al., 2009) e sua degradação em comprimidos (FRANÇA et al., 2016), transição de múltiplos estados sólidos de fármacos (ALEXANDRINO et al., 2017) e na análise de comprimidos farmacêuticos (SABIN et al., 2011). As HSI são relevantes para análise de qualidade de um produto farmacêutico final, como um comprimido.

Tratando-se de fármacos no estado sólido, principalmente aqueles que apresentam polimorfismo, a espectroscopia NIR acessa indiretamente suas informações cristalográficas por observar perturbações na frequência de vibração natural das moléculas causada pelas diferenças de empacotamento na rede cristalina (BRITTAIN, 2009a). Mais recentemente, espectros de absorção na região Terahertz (THz) têm se tornado mais fáceis de serem obtidos, resultando no desenvolvimento de novos métodos na análise de fármacos por ser uma fonte direta de informações da rede cristalina de um polimorfo, e acessar modos vibracionais de baixas frequências (vibrações intermoleculares) (BAXTER; GUGLIETTA, 2011; EL HADDAD et al., 2013). No entanto, essa região ainda é pouco explorada e há poucos trabalhos que utilizam a espectroscopia THz em análises quantitativas de polimorfos.

Dentre os inúmeros fármacos que apresentam polimorfismo, há o mebendazol (MBZ), um anti-helmíntico de amplo espectro bastante utilizado nos programas de desparasitação em países em desenvolvimento (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; HONORATO *et al.*, 2012). O MBZ possui três formas polimórficas (A, B e C) com diferentes propriedades físicas, químicas e terapêuticas. O polimorfo A não possui efeito anti-helmíntico quando excede 30% da formulação e o polimorfo B demonstra maior solubilidade entre os três polimorfos e está associado a uma alta toxicidade. O polimorfo C é farmacêuticamente preferível por apresentar solubilidade apropriada para assegurar a biodisponibilidade e não apresenta as desvantagens dos polimorfos A e B (COSTA *et al.*, 1991; DE VILLIERS *et al.*, 2005; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; HONORATO *et al.*, 2012). No entanto, todos os polimorfos do MBZ são encontrados nos IFAs e nas formulações comercializadas (ABOUL-ENEIN; BUNACIU; FLESCHEIN, 2002; AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; FROEHLICH; GASPAROTTO, 2005; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010). Portanto, é essencial quantificar cada polimorfo do MBZ em todas as etapas do processo de

produção do fármaco, desde a matéria prima até o produto final, para assegurar que o polimorfo apropriado está sendo utilizado pela indústria e comercializado.

Considerando os aspectos descritos, este trabalho avalia (1) o desempenho analítico de instrumentos NIR portáteis para quantificação de polimorfos (A, B e C) do mebendazol (MBZ) no Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) utilizando modelos de calibração multivariada; (2) a transferência dos modelos multivariados desenvolvidos utilizando-se espectros medidos em um equipamento de bancada para um portátil; (3) desenvolver um método multivariado para quantificação de polimorfos do MBZ em misturas ternárias utilizando espectroscopia THz; (4) propõe um método analítico utilizando HSI na região NIR para determinação e distribuição dos polimorfos do MBZ em comprimidos.

2 OBJETIVOS

- a) Avaliar o desempenho analítico de equipamentos NIR portáteis para quantificação dos polimorfos do MBZ no IFA utilizando calibração multivariada;
 - a.1. Avaliar três diferentes equipamentos portáteis NIR na quantificação dos polimorfos do MBZ por meio de modelos multivariados por Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS: *Partial Least Squares*).

- b) Realizar a transferência dos modelos multivariados desenvolvidos em equipamento de bancada para o equipamento portátil;
 - b.1. Avaliar diferentes técnicas de transferência de modelos de calibração tal como Padronização Direta e Reversa para correção das diferenças espectrais entre o equipamento portátil e de bancada.

- c) Desenvolver método analítico multivariado baseado na regressão PLS para quantificação dos polimorfos do MBZ utilizando a espectroscopia THz;

- d) Desenvolver método analítico multivariado para quantificação dos polimorfos do MBZ em comprimidos utilizados HSI-NIR.
 - d.1. Avaliar a utilização do PLS e Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes (MCR-ALS: *Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*) para quantificação dos polimorfos do MBZ em comprimidos teste.
 - d.2. Avaliar a regressão por mínimos quadrados clássicos (CLS: *Classical Least Square*) com os espectros puros dos componentes e seus respectivos Sinal Analítico Líquido (NAS: *Net Analyte Signal*) para quantificação dos polimorfos do MBZ em comprimidos teste.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 MEBENZADOL

O mebendazol (Éster metílico do ácido N-(6-benzoil-1H-benzimidazol-2-il)carbâmico (MBZ), Figura 1) é um anti-helmíntico de ampla ação utilizado no combate as infecções parasitárias do lúmen intestinal. Esse fármaco é ativo no tratamento de infecções simples ou mistas causadas por diversos parasitas tanto em humanos quanto em animais (COSTA *et al.*, 1991; AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977). O MBZ apresenta-se na forma de pó branco a ligeiramente amarelado, é praticamente insolúvel em diversos solventes tal como água, clorofórmio, cloreto de metileno, etanol, éter etílico e ácido mineral. No entanto, apresenta solubilidade em ácido fórmico (FARMACOPÉIA, 2010).

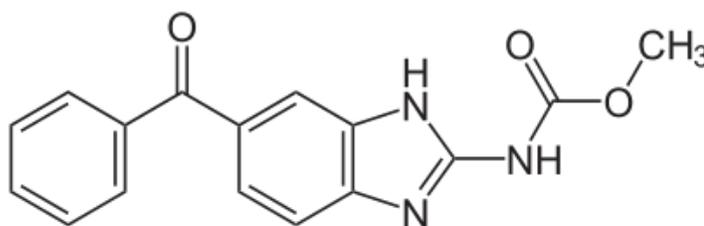


Figura 1. Estrutura química do Mebendazol.

Além do seu amplo espectro e alta eficiência, o MBZ é um medicamento de baixo custo e poucos efeitos colaterais. Por essa razão, o MBZ está incluído na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e tem sido amplamente utilizado em países em desenvolvimento em seus programas nacionais de desparasitação (HONORATO *et al.*, 2012; TORLESSE; CROMPTON; SAVIOLI, 2003).

Considerando o amplo uso desse fármaco no tratamento das infecções parasitárias em humanos, tem surgido a preocupação de se acompanhar a qualidade desse medicamento para identificar o surgimento de qualquer resistência ao fármaco. Uma baixa qualidade do fármaco pode reduzir sua eficiência e, conseqüentemente, comprometer os programas de desparasitação que o utilizam. Além da qualidade do fármaco, a produção das formulações também deve atentar para que os medicamentos, na sua maioria na forma de comprimidos, não sejam comercializados variando propriedades importantes que afetam os resultados terapêuticos como pureza, a desintegração, dissolução e biodisponibilidade. Além disso, outra propriedade que pode alterar a eficiência de um fármaco é o polimorfismo (HONORATO *et al.*, 2012).

Polimorfismo é a característica de um composto de existir em duas ou mais formas cristalinas com diferentes arranjos e/ou conformações de suas moléculas. Ou seja, são as diferentes formas cristalinas apresentadas pela mesma substância. Esse fenômeno é bastante comum em compostos farmacêuticos (cerca de 80% dos fármacos) e sua existência faz com que os mesmos apresentem diferentes propriedades físicas e químicas. Essas diferentes propriedades encontradas nos diferentes polimorfos surgem devido às diferenças no empacotamento molecular nas dimensões, forma, simetria, capacidade (número de moléculas) e volume das células unitárias do sólido. Já as diferenças nas propriedades mecânicas dos cristais são originadas pelas diferenças existentes nas propriedades de empacotamento e nas energias de interação intermoleculares (propriedades termodinâmicas) entre os polimorfos (PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009; BRITAIN, 2009b; LOHANI; GRANT, 2006).

No caso do MBZ, esse fármaco apresenta três formas polimórficas com propriedades físicas, químicas e terapêuticas distintas entre elas, as quais serão apresentadas e destacadas nas próximas subseções.

3.1.1 Formas polimórficas do mebendazol

O MBZ no estado sólido apresenta três formas polimórficas denominadas de polimorfos A, B e C. Esses polimorfos apresentam diversas características química, físicas e terapêuticas individuais sem que haja mudança na sua composição química (COSTA *et al.*, 1991; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003).

Os pós dos polimorfos do MBZ apresentam algumas diferenças em seus aspectos e texturas, formando aglomerados facilmente. O polimorfo B é um pó de fluxo solto, mais livre, enquanto os polimorfos A e C são mais agregados (SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003). Além dessas diferenças visíveis, são encontrados na literatura diversos estudos que comprovam as diferenças cristalográficas e morfológicas desses materiais (FERREIRA *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2009; PAIVA *et al.*, 2018). Apenas as estruturas dos polimorfos A e C são elucidadas e ambos apresentam sistemas cristalinos tricíclicos com cristais acirculares. Os cristais desses polimorfos crescem preferencialmente numa direção que é determinada pelas suas ligações de hidrogênio (FERREIRA *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2009). A cristalografia do polimorfo B ainda não foi elucidada e o mesmo apresenta cristais com estrutura lamelar em forma de discos. Os cristais do polimorfo B apresentam tamanho de partícula heterogêneo e isso está associado à rápida transição da fase solubilizada para fase

sólida. Estas informações morfológicas dos polimorfos do MBZ são os principais fatores nas diferenças das propriedades físicas e química dos mesmos. A Figura 2 apresenta micrografias dos polimorfos em diferentes magnitudes.

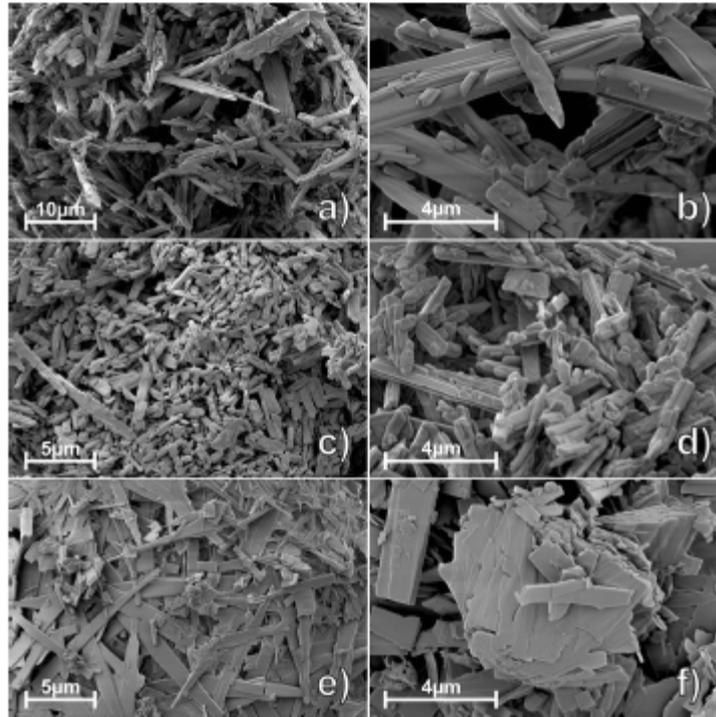


Figura 2. Micrografias dos pós dos polimorfos A (a–b), C (c–d) e B (e–f) do MBZ com diferentes magnitudes (PAIVA *et al.*, 2018).

Na literatura também são encontrados diversos trabalhos que demonstram as diferenças existentes entre os polimorfos do MBZ quanto às suas propriedades físicas, químicas e terapêuticas (CHAROENLARP *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 1991; DE VILLIERS *et al.*, 2005; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977). Costa *et al.* realizaram um estudo com as formas polimórficas do MBZ e comprovaram diferenças significativas nas propriedades físicas, físico-químicas e de toxicidade entre elas. Em teste de solubilidade em ácido clorídrico 0,03 mol/L, o resultado apresentou a seguinte ordem: B ($0,0733 \pm 0,0020$ mg/mL) > C ($0,0360 \pm 0,0008$ mg/mL) > A ($0,0123 \pm 0,0007$ mg/mL). Em relação à toxicidade, as evidências experimentais mostraram resultados com a mesma ordem da solubilidade, sendo o polimorfo B mais tóxico entre eles. A avaliação dos espectros de infravermelho (IV) e difratogramas de raios-X das amostras evidenciou bandas e raias características das três formas polimórficas, sendo os polimorfos A e C com maior cristalinidade. Uma Análise Térmica Diferencial (ATD) também foi realizada e observou-se que o polimorfo A é termodinamicamente estável e que os

polimorfos metaestáveis, polimorfo C e B, se convertem na forma estável em altas temperaturas (COSTA et al., 1991). Resultado semelhante também foi observado nos trabalhos realizados por Himmelreich, Rawson e Watson e De Villiers *et al.* Ambos observaram que o aumento da temperatura e umidade fazem com que haja uma conversão das formas polimórficas C e B na forma A em temperaturas acima de 170°C e 200°C, respectivamente (HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; DE VILLIERS *et al.*, 2005).

Um estudo utilizando as formas A e C do MBZ e placebo em 958 crianças em idade escolar na Tailândia foi realizado por Charoenlarp *et al.* afim de observar o desempenho terapêutico do fármaco no programa de desparasitação. O estudo evidenciou que quando o fármaco é administrado utilizando o polimorfo A e seu teor supera 30% na formulação, o mesmo não apresenta eficácia anti-helmíntica e seu desempenho é semelhante ao placebo. Portanto, há dependência na eficácia do efeito anti-helmíntico do MBZ em função do seu polimorfo e proporção (CHAROENLARP *et al.*, 1993).

Por apresentar solubilidade suficiente que axibe excelente biodisponibilidade do fármaco sem associação à toxicidade, como o polimorfo B, e não apresentar os problemas proveniente da polimorfo A quanto à solubilidade, o polimorfo C é farmaceuticamente preferível. Apesar de ser um dos polimorfos metaestáveis, o polimorfo C é bastante estável à temperatura ambiente e a aproximadamente 179° C (DE VILLIERS *et al.*, 2005; HONORATO *et al.*, 2012; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010). No entanto, todas as formas polimórficas do MBZ são encontradas nas matérias primas e nas formulações comercializadas em todo mundo (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010).

Diante do exposto, métodos analíticos têm sido desenvolvidos para caracterização e identificação dos polimorfos do MBZ. Esses métodos são desenvolvidos, principalmente, para a matéria prima utilizando técnicas destrutivas.

3.1.2 Caracterização e identificação das formas polimórficas do mebendazol

As formas polimórficas do MBZ estão diretamente relacionadas com a eficiência terapêutica do IFA. Ensaio e testes para caracterização e identificação do MBZ têm sido desenvolvidos e acrescidos nas farmacopeias como etapa dos procedimentos para garantia da qualidade do fármaco.

A Farmacopeia Brasileira, em sua monografia, dispõe de uma série de testes a serem utilizados na garantia da qualidade do MBZ. Dentre os ensaios publicados está o teste de

dissolução, também descrito na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP: *United State Pharmacopeia*), que pode ser utilizado na identificação das formas polimórficas do IFA devido a sua solubilidade limitada em água e em solventes orgânicos (HONORATO *et al.*, 2012). O meio para dissolução descrita na Farmacopeia Brasileira utiliza 1% de lauril sulfato de sódio (LSS) em 900 mL de ácido clorídrico 0,1 mol/L (FARMACOPÉIA, 2010). No entanto, o LSS utilizado no teste diminui o poder discriminante das formas polimórficas do MBZ, impedindo a diferenciação entre as mesmas. Na literatura são encontrados diversos trabalhos que comprovam que o teste proposto pela USP não é sensível para diferenciação dos polimorfos do MBZ (SWANEPOEL *et al.*, 2003; SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003).

Em 2003, Swanepoel *et al.* propuseram uma modificação na metodologia da USP retirando o LSS da dissolução. Os resultados demonstraram diferenças nos perfis de dissolução das três formas polimórficas do MBZ, diferente da metodologia descrita na farmacopeia americana (SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003).

O teste de dissolução modificado, apesar de discriminar as formas polimórficas do MBZ, é laborioso, lento e só pode ser utilizado na matéria prima. Esse teste não pode ser aplicado nos comprimidos devido à introdução de fatores adicionais do processo de formulação que afetam diretamente a solubilidade (excipiente, dureza, tamanho de partícula, entre outros) (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008). Alternativamente, outras técnicas analíticas têm sido reportadas para caracterização e identificação dos polimorfos do MBZ tanto na matéria prima quanto no medicamento. As técnicas analíticas mais utilizadas para esse fim são: Difração de Raios-X de pó (PXRD: *Powder X-ray Diffraction*) (KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010; KARASHIMA *et al.*, 2014), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC: *Differential Scanning Calorimetry*) (DE VILLIERS *et al.*, 2005; SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003), Infravermelho Médio (MIR: *Medium Infrared*) (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2008; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010), Infravermelho Próximo (NIR: *Near Infrared*) (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008), Raman (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; HONORATO, Sara B. *et al.*, 2012) e Análise Termogravimétrica (TGA: *Thermal Gravimetric Analysis*) (KARASHIMA *et al.*, 2014).

Dentre as técnicas citadas, a PXRD é considerada a mais confiável para diferenciação de polimorfismo. Esta técnica produz uma impressão digital com numerosos picos cujas posições correspondem aos espaçamentos periódicos dos átomos no sólido. A técnica é utilizada para caracterização de polimorfismo porque diferentes estruturas cristalinas na célula unitária, em geral, dão origem a diferentes posições de pico no difratograma. Além disso, a boa

separação entre os picos no PXRD permite a análise de misturas entre os polimorfos (RODRÍGUEZ-SPONG et al., 2004). No entanto, quando os padrões de referência das formas puras do pó não estão disponíveis, torna-se difícil esse tipo de análise por não se saber, se o padrão a ser utilizado é proveniente de uma mistura ou material puro (LEE, 2014).

Para acessar as informações químicas relevantes das formas polimórficas de fármacos, as técnicas espectroscópicas vibracionais são bastante utilizadas. Dentre essas, técnicas como o MIR, NIR, Raman e Terahertz (THz) são extremamente poderosas para diferenciação de substâncias polimórficas no estado sólido e, além disso, incluem conjuntamente informações físicas e químicas das mesmas. A maioria desses métodos não fornece diretamente informações da rede cristalina, como o PXRD, mas fornecem informações estruturais das moléculas através das interações intermoleculares e intramoleculares observadas nessas formas de análise (BRITAIN, 2009a; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

Dentre as vantagens apresentadas pelas técnicas espectroscópicas vibracionais está a possibilidade de estudos qualitativos e quantitativos, visto que todas as bandas dos espectros podem ser associadas às características específicas da molécula investigada. As medidas podem ser realizadas com uma pequena quantidade de amostra, num curto período de tempo, sem destruição da amostra, e, no caso do NIR e THz, podem ser aplicadas diretamente no processo de fabricação dos fármacos por meio do uso de sondas (CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

3.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

A espectroscopia vibracional emprega fenômenos de absorção e emissão de energia radiante associados aos movimentos vibracionais das moléculas. Esse tipo de espectroscopia é caracterizada pela região da radiação eletromagnética com número de onda entre 12.800 a 10 cm^{-1} , sendo subdividida (Figura 3) nas regiões do infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR), infravermelho distante (FIR: *far infrared*) e terahertz (THz) (BAXTER; GUGLIETTA, 2011; BUNACIU; ABOUL-ENEIN; DANG, 2015; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

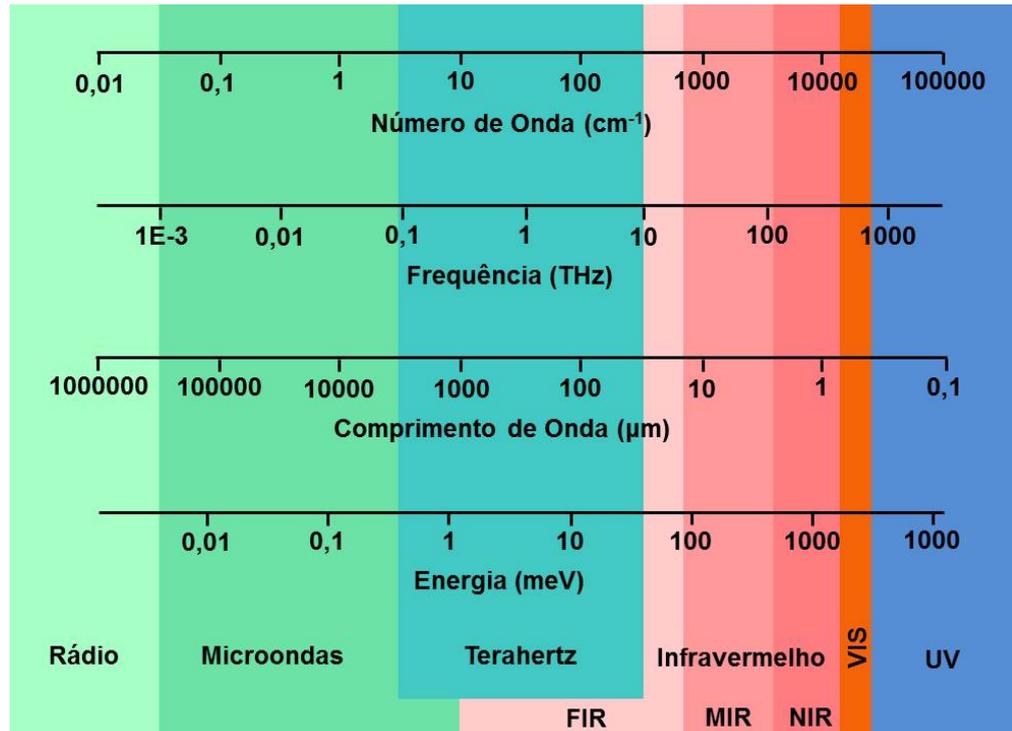


Figura 3. Espectro eletromagnético entre as ondas de rádio e radiação ultravioleta-visível (adaptado de EL HADDAD *et al.*, 2013).

Essa subdivisão da espectroscopia vibracional acontece devido a cada uma das suas regiões do espectro eletromagnético apresentarem características diferentes. Essas diferenças estão associadas à energia do fóton da radiação (Equação 1) em cada uma das regiões e às mudanças provocadas nos estados vibracionais das moléculas por esses fótons.

$$E_f = h \frac{c}{\lambda} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, h é a constante de Planck, c é velocidade da luz e λ é o comprimento de onda da radiação (PASQUINI, 2003).

A espectroscopia vibracional já tem sido amplamente utilizada em análises quantitativas e qualitativas em diversos tipos de materiais, com naturezas diversas, por apresentar uma série de vantagens como, simplicidade, rapidez, não destrutividade das amostras, pouco ou quase nenhum preparo de amostra, além de agregar informações físicas e químicas do material analisado (BRITAIN, 2009a). Na indústria farmacêutica, por exemplo, já é bastante difundido o uso da espectroscopia vibracional na caracterização e quantificação dos fármacos, baseado especialmente em metodologias que utilizam espectroscopia NIR e MIR. Mais recentemente, com o desenvolvimento de instrumentação apropriada, a obtenção de espectros de absorção na

região THz tornou-se mais fácil e novos métodos têm sido desenvolvidos utilizando essa região espectral no acesso a informações da cristalinidade dos materiais de interesse farmacêutico, como os polimorfos (CALVO; MAGGIO; KAUFMAN, 2018a; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

3.2.1 Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR)

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é um tipo de espectroscopia vibracional com números de onda na faixa de 12.800 a 4.000 cm^{-1} ($780 - 2500\text{ nm}$). Essa região do espectro eletromagnético é bastante difundida para fins farmacêuticos e industriais decorrentes das características inerentes a essa região espectral tal como rapidez, e análises não destrutivas. Além disso, a instrumentação NIR permite que a mesma seja implementada em linhas de processos industriais com a utilização de sondas com fibras ópticas, atendendo às iniciativas da tecnologia analítica de processos (PAT) e aumentando a aplicabilidade dessa espectroscopia no setor industrial (PASQUINI, 2003).

Para que uma molécula absorva radiação infravermelha é necessário que haja uma variação no momento de dipolo decorrente dos seus movimentos vibracionais ou rotacionais (Figura 4). Nessa condição, o campo elétrico alternado associado à radiação eletromagnética interage com a molécula e ocasiona uma variação na amplitude de seus movimentos vibracionais. Para isso ocorrer, a frequência da radiação incidente nas moléculas deve ser igual à frequência de vibração natural das mesmas (PASQUINI, 2018; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

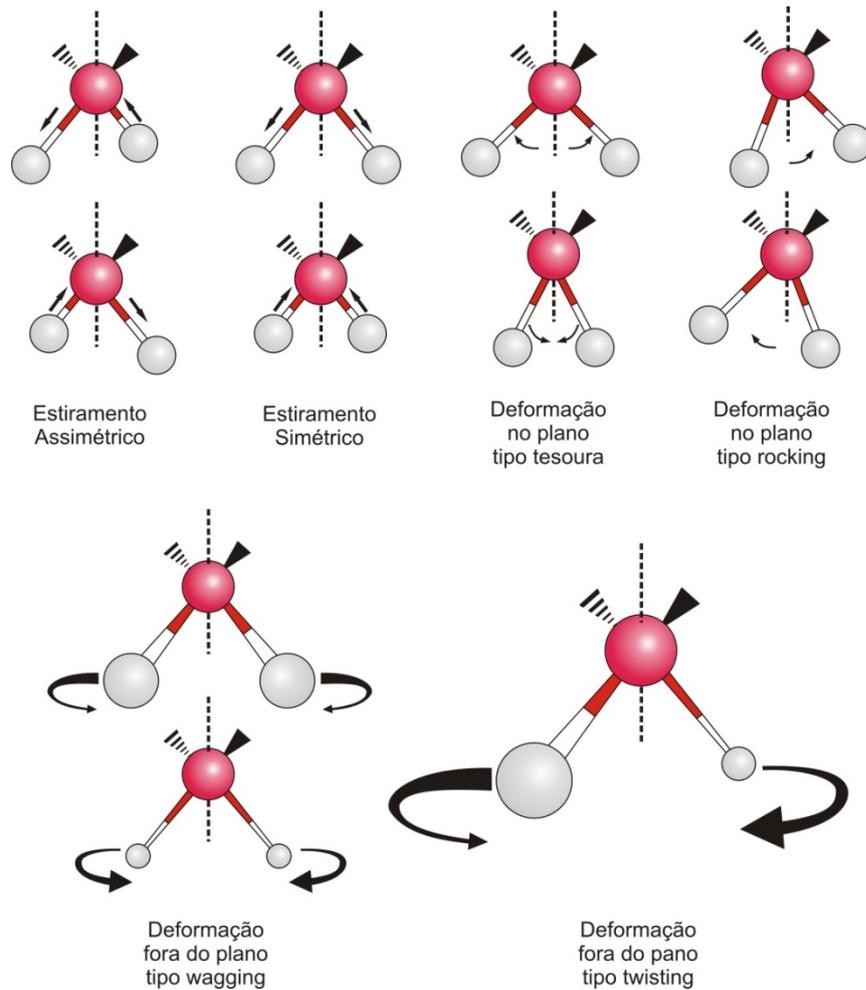


Figura 4. Modos vibracionais em uma molécula com três átomos (OLIVEIRA, 2013).

As bandas de absorção observadas na região NIR podem ser explicadas através do modelo do oscilador anarmônico. Nesse modelo, duas massas são conectadas por uma mola oscilando em torno da posição de equilíbrio. Esse modelo diferencia-se do oscilador harmônico para explicar sistemas moleculares reais e por levar em consideração: as forças de repulsão coulômbica entre os átomos quando estão muito próximos e a ruptura da sua ligação quando estão muito afastados (Figura 5). No modelo do oscilador anarmônico, as diferenças entre os níveis vibracionais adjacentes vão diminuindo à medida que o número quântico vibracional aumenta. Além disso, são previstas transições com $\Delta v = \pm 2$ ou ± 3 (sobretons) e a existência de bandas de combinação, que possuem frequências maiores e intensidades menores que aquelas das transições fundamentais (PASQUINI, 2003, 2018; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

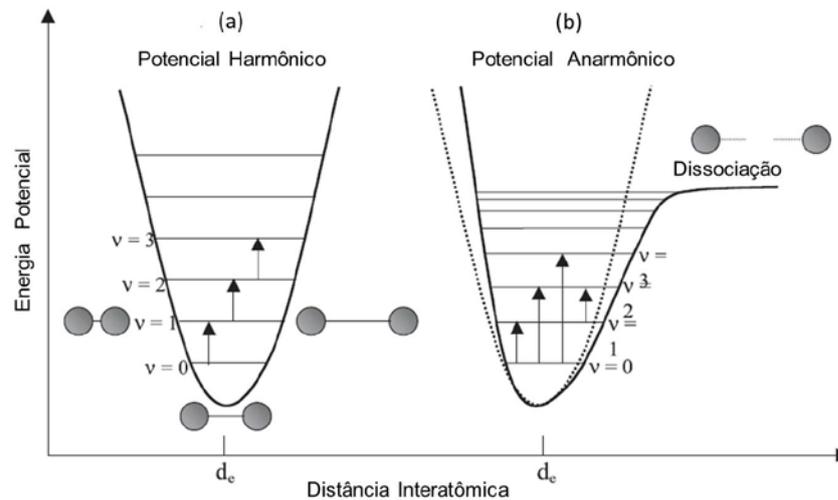


Figura 5. Diagrama de energia potencial para os (a) osciladores harmônicos e (b) anarmônicos (adaptado de PASQUINI, 2003)

As bandas de absorção observadas nessa região espectral são largas, possuem intensidades bastante fracas e com muita sobreposição. Devido a isso, os espectros NIR são difíceis de interpretar e extrair informação relevante da amostra. Para tanto, ferramentas quimiométricas (análise multivariada) são utilizadas para determinações qualitativas e quantitativas de compostos (BLANCO *et al.*, 1998; BRITTAIN, 2009a; PASQUINI, 2018).

No que se refere aos instrumentos, um espectrofotômetro NIR é constituído de componentes ópticos semelhantes aos utilizados na região espectral do Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Sendo assim, os componentes empregados são simples, robustos, relativamente baratos e menos sensíveis à umidade do ar que outros instrumentos na faixa do infravermelho médio. Para amostras sólidas, como o caso de materiais farmacêuticos que apresentam polimorfismo, uma das formas de medida mais comum é a reflectância difusa, como ilustrada na Figura 6 (PASQUINI, 2003).

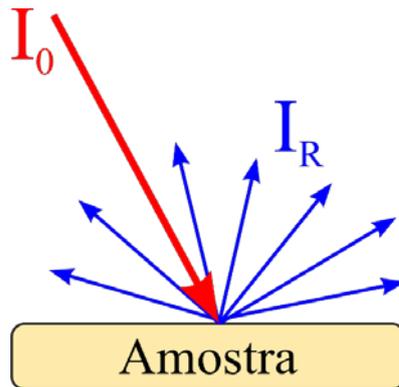


Figura 6. Modo de medida por reflectância difusa.

No modo de medida por reflectância difusa (Figura 6), a radiação penetra na camada superficial do sólido espalhando radiação em todas as direções. A medida da reflectância é calculada pela razão entre a intensidade da radiação refletida pela amostra e a intensidade da radiação refletida por um material não absorvente em toda a faixa espectral observada. Dessa forma, o sinal analítico tem influência da radiação espalhada e absorvida pelos grânulos do sólido (PASQUINI, 2003).

Outra forma de medida dos espectros NIR é por meio de imagens hiperespectrais (HSI: *hyperspectral image*) ou imagens químicas. Essa forma de medida tem sido bastante utilizada nos últimos anos e diversas aplicações analíticas na área farmacêutica têm sido desenvolvidas com sucesso, por adicionar às análises informações sobre a superfície do material (SACRÉ et al., 2014). Nas HSI, a menor dimensão espacial de uma imagem, o pixel, é associada a uma informação espectral. No caso das imagens hiperespectrais na região do infravermelho próximo (HSI-NIR), cada pixel da imagem é representado por um espectro NIR, como ilustrado na Figura 7. A matriz de dados de uma imagem química é chamada de hipercubo e representa o mapa de absorbância da superfície analisada para cada comprimento de onda (PRATSMONTALBÁN; DE JUAN; FERRER, 2011).

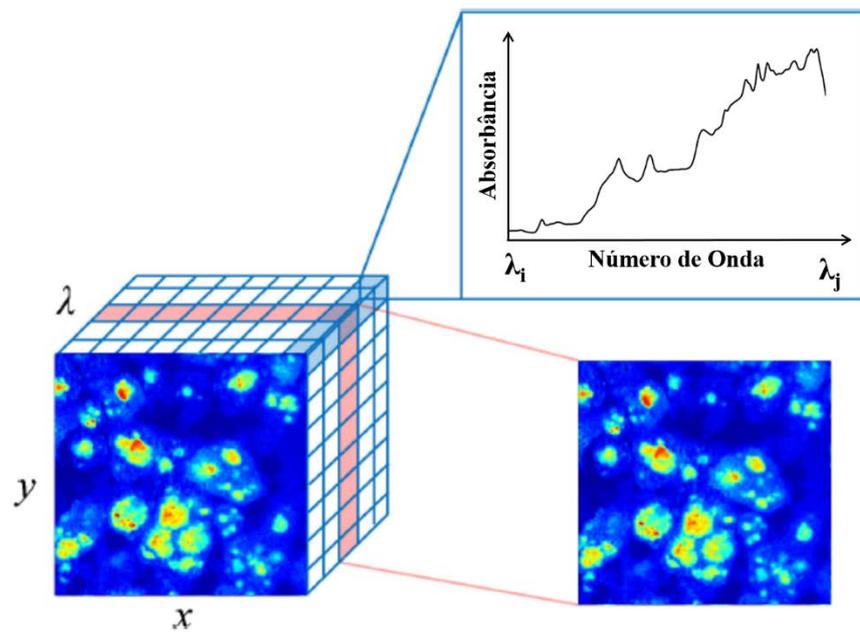


Figura 7. Representação estrutural de um hiper-cubo (adaptado de SACRÉ *et al.*, 2014).

Para aplicação de análise multivariada em HSI-NIR, o hiper-cubo necessita ser desdobrado para uma matriz de dados bidimensional. Após desdobramento, os mesmos procedimentos de análise multivariada aplicados a dados bidimensionais podem ser utilizados para desenvolvimento dos métodos analíticos. Com o desdobramento, cada pixel será considerado com uma amostra e os dados são estruturados como na Figura 8.

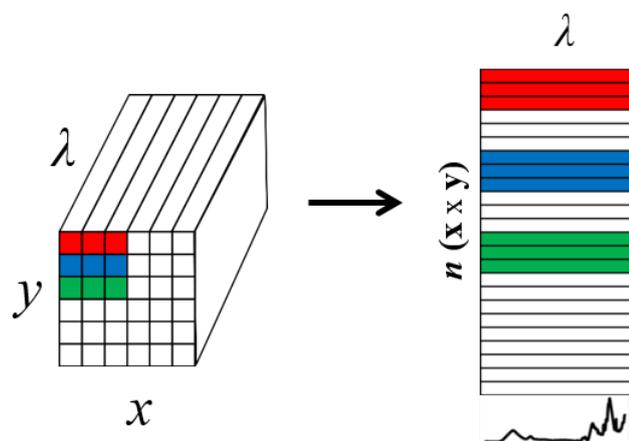


Figura 8. Desdobramento de uma imagem química tridimensional para matriz bidimensional.

Tratando-se de materiais no estado sólido, como os polimorfos, vale ressaltar que as informações coletadas pela espectroscopia NIR é indireta por não acessar a cristalografia do

material analisado. No entanto, as diferentes estruturas cristalinas das moléculas do material perturbam energeticamente seus modos vibracionais, apresentando mudanças nos perfis espectrais dos mesmos, decorrentes dessas mudanças conformacionais das moléculas (CHAVAN et al., 2017). No cenário farmacêutico do estado sólido, a espectroscopia NIR é utilizada em grande escala para identificação de insumos, determinação de homogeneidade dos ativos e excipientes com eficiência (BLANCO et al., 1998; LUYPAERT; MASSART; VANDER HEYDEN, 2007).

3.2.2 Espectroscopia Terahertz (THz)

A espectroscopia Terahertz (THz) é um tipo de espectroscopia vibracional e rotacional na faixa de frequências entre 0,1 e 10 THz (3,3 a 333 cm^{-1}). Essa região espectral era conhecida como lacuna terahertz (THz gap) pelo fato de, até alguns anos atrás, não haver instrumentação adequada para aquisição de espectros nessa região. No entanto, através do advento de lasers com pulsos ultrarrápidos e de antenas fotocondutivas baseadas em semicondutores, tornou-se possível o desenvolvimento de espectrômetros THz no domínio do tempo (THz-TD: *Terahertz time domain*) e, desde então, essa região tem sido amplamente explorada (BAXTER; GUGLIETTA, 2011; VIEIRA, 2016; WU; KHAN, 2012).

A radiação na região THz é obtida pela excitação de portadores de cargas em um material semiconductor (antena fotocondutiva geradora) por meio de um pulso de laser em femtosegundos, com energia mais alta que a energia da transição da banda de valência para a banda de condução (banda proibida) do semiconductor. Esses pulsos podem ser detectados por um receptor de antena ultrarrápido (antena fotocondutiva receptora), proporcionando, simultaneamente, a informação da amplitude e fase de cada componente do espectro, onde, posteriormente, serão utilizados para obtenção do coeficiente de absorção e índice de refração. A amplitude e a fase de cada componente espectral são obtidas a partir da atenuação, atraso e distorção do pulso THz transmitido através da amostra. Para se obter um espectro THz confiável e de alta qualidade, a amostra sólida deve ser misturada a um pó fino de polietileno (PE) ou politetrafluoretileno (PTFE) de alta densidade e comprimidos em pastilhas para aquisição dos espectros de absorção. Esses polímeros geralmente são utilizados nessas misturas por serem bons aglutinantes e transparentes na região do THz. (BRITTAIN, 2009; SHEN, 2011; WU; KHAN, 2012).

Os fenômenos observados na região espectral THz estão relacionados aos modos vibracionais de baixa frequência como torções, fônons, interações intermoleculares (força de

van der Waals, ligações de hidrogênio e/ou interação OH- π) e interações intramoleculares envolvendo vários átomos (vibração da molécula inteira). A detecção desses modos vibracionais é extremamente útil para caracterização de materiais no estado sólido por acessar diretamente informações da rede cristalina e provocar mudanças nos perfis espectrais dos mesmos pelas modificações conformacionais apresentadas em cada estrutura. Devido a isso, a região espectral THz tem sido explorada na investigação de materiais no estado sólido de interesse farmacêutico, como os polimorfos (BRITAIN, 2009; EL HADDAD *et al.*, 2013; SHEN, 2011; STRACHAN *et al.*, 2005).

Além das características citadas, as medidas na espectroscopia THz apresentam outras vantagens: aquisição de espectros com alta qualidade em pouco tempo; não é sensível a aquecimento da amostra por utilizar baixa potência da radiação; e não são esperados efeitos fotoquímicos nessa região espectral, visto que, a energia do fóton é bem menor que dos raios-X e luz UV (SHEN, 2011).

Assim como na espectroscopia NIR, a radiação THz tem sido relatada na literatura para a identificação, reconhecimento e classificação de amostras e na análise quantitativa de uma diversidade de substâncias com o uso de métodos multivariados de análise (SHEN, 2011; STRACHAN *et al.*, 2005).

3.3 UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA THZ, EQUIPAMENTOS NIR PORTÁTEIS E HSI-NIR NA ANÁLISE QUANTITATIVA DE POLIMORFOS

Em termos de aplicação analítica quantitativa, a espectroscopia THz é uma tecnologia emergente e sua adequação na determinação de polimorfos tem sido pouco explorada com apenas alguns trabalhos encontrados na literatura (HISAZUMI *et al.*, 2011; KING; BUCHANAN; KORTER, 2011; OTSUKA *et al.*, 2010; STRACHAN *et al.*, 2005). Otsuka *et al.* desenvolveram um método analítico para os polimorfos do ácido mefenâmico (polimorfo I e II) utilizando espectros THz e modelos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (OTSUKA *et al.*, 2010). King *et al.* quantificaram e identificaram quantidade relativas de dois polimorfos do diclofenaco em misturas por espectroscopia THz e teoria da densidade funcional (DFT: *Density Functional Theory*). Os resultados demonstraram que a espectroscopia THz é adequada para análise quantitativa e a DFT fornece estimativas razoáveis das frequências observadas nos espectros (KING; BUCHANAN; KORTER, 2011). Hisazumi *et al.* propuseram um método para determinar a fração de teofilina anidra e monohidratada e suas taxas de dissolução aplicando espectroscopia THz e regressão PLS (HISAZUMI *et al.*, 2011). O

potencial da espectroscopia THz na quantificação de polimorfos e cristalinidade de fármacos foi demonstrado por Strachan *et al.* Os autores estudaram os polimorfos da carbamazepina e maleato de analapril, formas cristalinas e amorfas da indometacina e fenoprofeno de cálcio nas formas cristalinas e líquido cristalinas em misturas binárias por regressão PLS (STRACHAN *et al.*, 2005).

Como descrito, os trabalhos realizados até o momento estudaram a cristalinidade dos materiais em misturas binárias e, na maioria das vezes, sem a totalidade de formas cristalinas que o fármaco apresenta. No entanto, as precisões das quantificações em misturas polimórficas dependem de diversos fatores como: o número possível de polimorfos contidos nas misturas; a complexidade e a proximidade dos espectros de absorção dos polimorfos e entre eles. Portanto, há a necessidade de explorar misturas dos polimorfos em sua totalidade para observar o desempenho analítico da metodologia proposta frente a todos os polimorfos.

Tratando-se do uso dos equipamentos NIR portáteis na análise de fármacos, a eficiência dos mesmos já tem sido demonstrada com bastante sucesso na literatura. Alcalá *et al.* identificaram ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico e cafeína em formulações farmacêuticas e discriminaram entre fármacos autênticos e ilegais utilizando equipamento NIR portátil (ALCALÀ *et al.*, 2013). Singh *et al.* monitoraram o processo de fabricação de comprimidos aplicando equipamento NIR portátil e ferramentas de PAT (SINGH *et al.*, 2014). Identificação de insumo farmacêutico ativo (IFA) utilizando instrumento NIR portátil e ferramentas quimiométricas para classificação em larga escala e transferência de modelos foram realizados por Sun *et al.* (SUN *et al.*, 2016). No entanto, até o momento, nenhum trabalho demonstrou a viabilidade do uso de equipamentos NIR portáteis para quantificação e determinação de polimorfos em materiais farmacêuticos, embora equipamentos de bancada já tenham sido utilizados com sucesso para esse propósito (BLANCO *et al.*, 2000, 2004; CALVO; MAGGIO; KAUFMAN, 2018b).

A utilização eficiente de imagens hiperespectrais com aplicação farmacêutica tem sido demonstrada em diversos trabalhos encontrados na literatura. Porém, para quantificação de polimorfos, apenas alguns trabalhos são relatados. Rocha *et al.* descreveram um método analítico para quantificar dois polimorfos do piroxicam em comprimido utilizando HSI-NIR e regressão PLS. Os autores determinaram a concentração local e global nos comprimidos com erros abaixo de 4% m/m (ROCHA *et al.*, 2011). Siddiqui *et al.* desenvolveram modelos baseados na regressão PLS para predição de polimorfos de nimodipina em misturas de pós usando HSI-NIR (SIDDIQUI *et al.*, 2013). Schonbicher *et al.* avaliaram o uso de imagens hiperespectrais para quantificação dos polimorfos de furosemida em misturas ternárias usando

regressão PLS. Os resultados obtidos com as imagens foram comparáveis àqueles obtidos usando equipamentos convencionais MIR, NIR e Raman (SCHÖNBICHLER et al., 2013). Brondi *et al.* avaliaram a distribuição dos polimorfos da fenofenadina em comprimidos através de HSI-NIR. Modelos PLS e MCR-ALS foram avaliados e comparados para quantificação dos polimorfos. Os autores concluíram que o MCR-ALS quantifica eficientemente os polimorfos, mas o PLS recupera melhor a concentração. Nesse trabalho, os modelos foram avaliados apenas através dos parâmetros de regressão para comparar a exatidão na determinação (BRONDI et al., 2014).

De acordo com os trabalhos descritos, a regressão PLS foi a técnica mais utilizada. No entanto, quando comparados com o MCR-ALS, apenas os parâmetros de regressão foram utilizados. Desse modo, é necessário avaliar as técnicas também através dos mapas de distribuição, ou seja, analisar a capacidade preditiva dos modelos no próprio comprimido. No caso da análise de polimorfos, os perfis espectrais entre eles são similares e suas análises bastante complicadas. Uma detalhada comparação entre as duas ferramentas quimiométricas mais comuns (MCR-ALS e PLS) na quantificação de polimorfos utilizando HSI-NIR se faz necessária. Além disso, a utilização do sinal analítico líquido (NAS: *Net Analytical Signal*) para determinação de polimorfos parece bem promissor. O NAS de um analito é diretamente correlacionado com sua concentração e pode ser obtido também através dos espectros puros dos componentes de uma mistura. Tratando-se de produto farmacêutico, a indústria tem conhecimento de todos os componentes envolvidos na mistura e, assim, pode utilizar de forma prática essa informação para quantificar os polimorfos. Na literatura não foram encontradas publicações referentes a utilização dessa informação em HSI-NIR.

3.4 QUIMIOMETRIA

O crescente desenvolvimento de tecnologias analíticas computadorizadas, como os métodos espectroscópicos, permitiu que dados de natureza química fossem gerados com mais rapidez, com grande quantidade de variáveis e, conseqüente, maior quantidade de informação atrelada às amostras. Para a extração de maior quantidade de informação desses dados analíticos multivariados surgiu a quimiometria, a qual utiliza métodos estatísticos e matemáticos para essa finalidade (FERREIRA, 1999).

A quimiometria está dividida em três grandes áreas: (i) planejamento e otimização de experimentos; (ii) reconhecimento de padrões e classificação; e (iii) calibração multivariada.

Além dessas áreas citadas, a quimiometria contempla etapas importantíssimas que precedem a análise multivariada, como o pré-processamento dos dados e seleção de amostras e variáveis.

3.4.1 Planejamento e otimização de experimentos

Planejamento e otimização de experimentos consiste na utilização de ferramentas estatísticas para esquematizar e/ou aprimorar experimentos, de forma que seja extraído o máximo de informação do sistema em estudo com o menor número de experimentos possíveis. Para isso, diversas técnicas podem ser utilizadas e a escolha da mais adequada dependerá dos objetivos a serem alcançados e da quantidade de experimentos que podem ser realizados. Dentre as técnicas de planejamento e otimização de experimentos, o planejamento de misturas foi utilizado neste trabalho.

O planejamento de misturas consiste na determinação das proporções dos componentes ou variáveis num sistema para ajuste de modelo matemático que descreva a influência desses componentes nas repostas desse sistema. Esse tipo de planejamento envolve a execução de um número de experimentos que seja necessário para ajustar o modelo matemático desejado e que permita determinar os parâmetros de influência com o mínimo de erro (COSCIONE; DE ANDRADE; MAY, 2005).

No planejamento de misturas cada componente no sistema é tratado como uma variável (variável da mistura) que não é independente das demais, pois o somatório das proporções dos componentes deve ser igual a unidade (100%), como demonstrado na Equação 2:

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (\text{Equação 2})$$

onde q é o número de componentes da mistura e x_i são as proporções dos componentes na mistura (COSCIONE; DE ANDRADE; MAY, 2005; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A Equação 2 retira um grau de liberdade das proporções por não poder assumir qualquer valor (tem que ser igual a 1). Para especificar a composição da mistura, é necessário apenas fixar as proporções de $q-1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 1. Portanto, para modificar as propriedades de uma mistura mudando a sua formulação, as novas proporções têm que continuar obedecendo a Equação 2 (COSCIONE; DE ANDRADE; MAY, 2005; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

3.4.2 Pré-processamento de dados

No processo de modelagem matemática para determinação e/ou classificação de alguma propriedade em dados instrumentais, é indispensável a realização de um pré-processamento de dados para eliminação ou redução de fontes informativas que não estejam relacionadas com a propriedade de interesse. Essas fontes de informação podem ser provenientes do equipamento utilizado, das condições experimentais, da forma de análise, entre outros. Quando não eliminadas, essas fontes de informações irrelevantes podem prejudicar os modelos matemáticos a serem desenvolvidos por esconderem as informações relacionadas com a propriedade de interesse (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; ROGGO et al., 2007).

As técnicas de pré-processamento dos dados podem atuar tanto nas variáveis instrumentais quanto nas amostras. Diversas técnicas são utilizadas para ambos os sentidos, sendo necessário conhecer bem os efeitos de cada pré-processamento nos dados instrumentais e avaliar como eles se comportarão após a correção. Na direção das amostras, destacam-se as técnicas: variação normal padrão (SNV: *Standard Normal Variation*), correção multiplicativa de espalhamento (MSC: *Multiplicative Scatter Correction*), suavização, derivada e correção de linha de base (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Já na direção das variáveis, a centralização na média é uma das técnicas mais utilizadas em dados espectrais. Neste trabalho, todas as técnicas citadas foram aplicadas nos dados afim de escolher a melhor técnica para determinação do componente de interesse.

As técnicas de pré-processamento MSC e SNV geralmente são utilizadas quando o conjunto de dados espectrais apresenta variabilidade provocada pelo espalhamento da radiação na amostra. Esse tipo de efeito físico ocorre com bastante frequência em análises com material sólido, como no caso deste trabalho. A correção espectral por MSC é realizada a partir de uma regressão por mínimos quadrados construída em cada espectro em relação ao espectro médio (referência), conforme apresentado nas Equações 3 e 4:

$$x_{orig} = b_0 + b_{ref,1} x_{ref} + e \quad (\text{Equação 3})$$

$$x_{corr} = \frac{x_{orig} - b_0}{b_{ref,1}} = x_{ref} + \frac{e}{b_{ref,1}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, x_{orig} é o vetor da amostra original, x_{ref} é o vetor de referência, x_{corr} é o vetor da amostra original corrigida, e é o vetor de resíduos e b_0 e $b_{ref,1}$ são os parâmetros que estimam os efeitos

aditivos e multiplicativos, respectivamente, determinados pela regressão realizada (RINNAN et al, 2009).

Já no SNV, os espectros individualmente são centrados na média e divididos pelos seus respectivos desvios padrão, conforme Equação 5:

$$x_{corr} = \frac{x_{org} - a_0}{a_1} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde, a_0 e a_1 são os valores médio e o desvio padrão dos valores, respectivamente, do espectro a ser corrigido (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Vale ressaltar que em ambas as técnicas, MSC e SNV, a fonte de variação é eliminada e os espectros permanecem com formato semelhante ao original.

A suavização é um método utilizado para reduzir matematicamente ruídos aleatórios de alta frequência a fim de aumentar a relação sinal/ruído. Para essa finalidade, existem diferentes filtros a serem aplicados, tais como: média móvel, Savitsky-Golay, transformada de Fourier e transformada Wavelet. Neste trabalho, foi utilizada a suavização com filtro Savitsky-Golay. Nele, um polinômio de baixa ordem é ajustado aos pontos de um intervalo (janela) no espectro pelo método dos mínimos quadrados. Posteriormente, os dados na janela escolhida serão utilizados para calcular o valor de suavização para a variável referente ao ponto central da janela (Figura 9). A escolha do tamanho da janela consiste em uma etapa importante na suavização, pois, janelas com muitos pontos podem suavizar (arredondar) demais as bandas provocando perda de informação espectral, enquanto janelas menores podem não eliminar suficientemente o ruído espectral (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

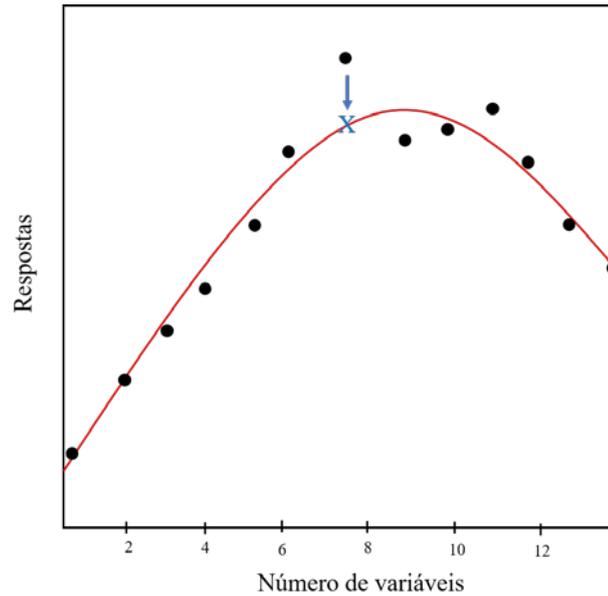


Figura 9. Ajuste do polinômio com janela de 13 pontos. O valor suavizado do ponto 7 é mostrado como X (adaptado de BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

A derivada, por sua vez, é uma técnica amplamente utilizada para correção de problemas espectrais relativos à variação de linha de base, além de melhorar a visualização de bandas sobrepostas. A primeira derivada remove deslocamentos horizontais da linha de base (efeitos aditivos) e a segunda derivada elimina uma variação linear (inclinada) da linha de base (efeitos multiplicativos). No entanto, a aplicação da derivada provoca um aumento no ruído espectral, sendo necessária a utilização conjunta de filtros de suavização, como o filtro de Savitzky-Golay (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

Considerando os pré-processamentos aplicados às variáveis, destaca-se a centralização na média. Essa técnica consiste na translação de eixos (variáveis) para o valor médio de cada um deles e, dessa forma, a média de todas as variáveis torna-se zero. Para isso, o valor médio de cada variável é calculado e esse valor é subtraído de cada um dos valores que corresponde a variável, tal como apresentado na Equação 6:

$$x_{corr,ij} = x_{ij} - \bar{x}_j \quad (\text{Equação 6})$$

Onde, $x_{corr,ij}$ é o elemento i corrigido da variável j , x_{ij} é o elemento i original da variável j e \bar{x}_j é o valor médio da variável j .

3.4.3 Calibração multivariada

A calibração multivariada é uma das áreas da quimiometria mais bem difundidas e utilizadas na química analítica para quantificação de propriedades de interesse em dados multivariados. Essa área consiste na construção de modelos matemáticos que relacionam dados instrumentais com a concentração do analito ou outras propriedades de interesse das amostras (FERREIRA, 1999).

O processo de calibração multivariada ocorre em três etapas: calibração, validação e predição. A etapa de calibração é constituída pela construção do modelo matemático que relaciona a matriz de dados instrumentais com a propriedade de interesse da amostra. A etapa de validação é caracterizada pela avaliação dos modelos desenvolvidos por meio de ferramentas de diagnósticos. Já na etapa de predição, amostras desconhecidas (que não participaram das etapas anteriores) serão utilizadas para predição da propriedade de interesse nos modelos previamente construídos e validados (OLIVEIRA, 2013; SIMÕES, 2008). Para isso, diversos métodos matemáticos podem ser utilizados, sendo a Regressão Linear Múltipla (MLR: *Multiple Linear Regression*), a Regressão por Componentes Principais (PCR: *Principal Component Regression*) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS: *Partial least-Squares*) as ferramentas mais empregadas (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Entre as técnicas descritas, a regressão PLS foi a utilizada neste trabalho.

A regressão PLS é um método de calibração multivariada inverso e recebe essa classificação pelo fato da propriedade de interesse ser tratada como uma função da resposta instrumental, conforme demonstrado na Equação 7:

$$c = \mathbf{R}b \quad (\text{Equação 7})$$

Onde, o vetor c contém a informação da propriedade de interesse, \mathbf{R} é a matriz das respostas instrumentais e o vetor b corresponde aos coeficientes do modelo.

A resolução da Equação 7 torna-se bastante difícil quando a matriz \mathbf{R} é não invertível, como no caso de dados espectroscópicos em que há bastante colinearidade das variáveis. Para resolver esse problema, a matriz \mathbf{R} é substituída por uma matriz (\mathbf{U}) que seja a combinação linear das variáveis em \mathbf{R} , eliminando, assim, a redundância das variáveis e tornando a nova matriz invertível. No caso da regressão PLS, a matriz \mathbf{U} será composta pela projeção das amostras em um novo sistema de eixos (variáveis latentes - VL) formado por vetores que descrevem a máxima covariância entre todas as combinações lineares da matriz \mathbf{R} e o vetor c , conforme descrito na Equação 8.

$$c = \mathbf{U}b \quad (\text{Equação 8})$$

A matriz de VLs (\mathbf{U}) é calculada tanto com a informação instrumental (Matriz \mathbf{R}) quanto com a propriedade de interesse (vetor c) da seguinte maneira (Equação 9):

$$\mathbf{R} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T \quad (\text{Equação 9})$$

onde, \mathbf{V} é a matriz dos loadings (influência de cada variável original na construção das VLs) e \mathbf{S} é a matriz diagonal dos valores singulares. Os elementos da matriz diagonal contêm a quantidade de covariância descrita em cada VL. A propriedade ortonormal da matriz \mathbf{V} ($\mathbf{V}^T\mathbf{V} = \mathbf{I}$) pode ser utilizada para resolver a Equação 9 para \mathbf{U} e tem-se a Equação 10.

$$\mathbf{U} = \mathbf{R}\mathbf{V}\mathbf{S}^{-1} \quad (\text{Equação 10})$$

Através da Equação 10 e das propriedades ortonormais em \mathbf{U} é possível resolver a Equação 8 para o vetor b (Equação 11)

$$\hat{b} = \mathbf{U}^{-T}c \quad (\text{Equação 11})$$

Esse vetor de coeficientes de regressão estimado pode ser utilizado para prever a concentração de uma amostra desconhecida. Para isso, o vetor de VLs das amostras desconhecidas (u_{des}) deve ser calculado através medidas das amostras desconhecidas (r_{des}), com as matrizes \mathbf{S} e \mathbf{V} do modelo construído, conforme Equação 12.

$$u_{des} = r_{des}\mathbf{V}\mathbf{S}^{-1} \quad (\text{Equação 12})$$

Por fim, é possível estimar a concentração de uma amostra desconhecida através dos vetores u_{des} e \hat{b} utilizando a Equação 13:

$$\hat{c} = u_{des}\hat{b} \quad (\text{Equação 13})$$

Na construção dos modelos de calibração multivariada, uma das etapas mais importantes é a escolha da quantidade de VLs que serão utilizadas na matriz \mathbf{U} . O tamanho dessa matriz é extremamente importante para estabilização do processo de inversão. Ordinariamente, as VLs são escolhidas sequencialmente, da mais alta covariância descrita para a menor. A determinação da quantidade de VLs a ser utilizada pelos modelos é realizada no processo de validação. Em geral, a validação cruzada total (Full Cross Validation) é um dos

procedimentos de avaliação mais difundidos e utilizados. Esse método consiste na retirada de uma amostra do conjunto de calibração, constrói-se um modelo com as amostras remanescentes e, assim, se prevê a amostra retirada no modelo construído. O procedimento é repetido até que todas as amostras sejam utilizadas na predição. O número ótimo de VLs será aquele que obtiver o menor erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV: *Root Mean Square Error of Cross Validation*), que pode ser determinado pela Equação 14:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_{cal,n} - \hat{y}_{cal,m})^2}{n_{cal}}} \quad (\text{Equação 14})$$

onde, $y_{cal,n}$ corresponde ao valor do parâmetro ou propriedade de interesse, $\hat{y}_{cal,n}$ o valor do parâmetro estimado pelo modelo e n_{cal} , o número total de amostras utilizada na calibração (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

A capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos é avaliada em função do erro médio quadrático de predição (RMSEP: *Root Mean Square Error of Prediction*) utilizando as amostras que não participaram da modelagem (conjunto de validação externa), conforme a Equação 15:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{pred}} (y_{pred,n} - \hat{y}_{pred,m})^2}{n_{pred}}} \quad (\text{Equação 15})$$

onde, $y_{pred,n}$ é o valor do parâmetro ou propriedade de interesse, $\hat{y}_{pred,n}$ o valor do parâmetro estimado pelo modelo e n_{pred} , o número total de amostras utilizadas na etapa de predição (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

Na construção dos modelos de calibração multivariada, deve-se utilizar um conjunto de amostras representativas com o máximo de informação a respeito das propriedades de interesse nas mesmas. O conjunto amostral deve apresentar faixa de variação dos vetores y excedendo a variação esperada nas amostras desconhecidas, apresentar valores de y uniformemente distribuídos em toda faixa de variação e em número suficiente para dar confiabilidade ao modelo de calibração.

O conjunto de validação externa também deve apresentar as características descritas acima. No entanto, a faixa de variação do conjunto de validação externa não deve extrapolar a faixa de variação das amostras de calibração. Técnicas quimiométricas de seleção de amostras

podem ser aplicadas para escolha adequada do grupo de amostras a serem utilizadas na calibração e validação externa.

3.4.4 Seleção de amostras

Um algoritmo clássico na quimiometria para seleção de amostras é o Kennard-Stone (KS). Nesse algoritmo, as distâncias euclidianas entre pares de amostras são calculadas e aquele par que apresentar a maior distância é selecionado. Para as amostras remanescentes, a distância mínima com respeito às amostras já selecionadas é calculada. Em seguida, a amostra com a maior distância mínima é escolhida, e o procedimento é repetido até que um determinado número de amostras seja selecionado. Tal distância é descrita como $d_x(p, q)$ entre \mathbf{X} -vetores de cada par (p, q) de amostras, como descrita na Equação 16:

$$d_x(p, q) = \sqrt{\sum_{j=1}^J [x_p(j) - x_q(j)]^2}; \quad p, q \in [1, N] \quad (\text{Equação 16})$$

onde, $x_p(j)$ e $x_q(j)$ representam as respostas instrumentais no j -ésimo comprimento de onda para o par de amostras p e q (GALVÃO et al., 2005).

Como extensão do KS, o algoritmo de Partição de Amostras Baseado nas Distâncias \mathbf{X} - y (SPXY: Sample Set Partitioning Based on Joint \mathbf{X} - y Distances) leva em consideração a variabilidade da matriz \mathbf{X} e vetor y . Nesse caso, cada distância $d_y(p, q)$ pode ser calculada para cada par (p, q) de amostras, conforme descrito na Equação 17 (GALVÃO et al., 2005).

$$d_y(p, q) = \sqrt{(y_p - y_q)^2} = |y_p - y_q|; \quad p, q \in [1, N] \quad (\text{Equação 17})$$

Para assegurar a igualdade de importância para a distribuição das amostras no espaço de \mathbf{X} e y , as distâncias $d_x(p, q)$ e $d_y(p, q)$ são divididas pelos seus valores máximos no conjunto de dados, obtendo-se assim uma distância $\mathbf{X}y$ normalizada, conforme descrito na Equação 18 (GALVÃO et al., 2005).

$$d_{x,y}(p, q) = \frac{d_x(p,q)}{\max_{p,q \in [1,N]} d_x(p,q)} + \frac{d_y(p,q)}{\max_{p,q \in [1,N]} d_y(p,q)}; \quad p, q \in [1, N] \quad (\text{Equação 18})$$

3.4.5 Seleção de variáveis

Métodos de seleção de variáveis são geralmente utilizados para escolher variáveis mais informativas com relação ao parâmetro a ser estimado e excluir variáveis não relevantes dos modelos de calibração multivariada. Por meio das técnicas utilizadas, modelos mais simples e mais robustos para análise de rotina podem ser construídos e os problemas de dimensionalidade apresentados por alguns métodos de calibração podem ser solucionados. (MEHMOOD et al., 2012; XIAOBO et al., 2010).

Uma série de algoritmos vem sendo utilizada para essa finalidade, dentre os quais se destacam o algoritmo genético (GA: *Genetic Algorithm*), o *stepwise* (SW), o algoritmo de projeções sucessivas (APS: *Successive Projections Algorithm*), a regressão por mínimos quadrados parciais por intervalos (*iPLS: Interval Partial Least Squares Regression*) e o algoritmo Jack-Knife (JK). Dentre os algoritmos destacados, o *iPLS* e o JK foram utilizados neste trabalho.

No JK, a variância dos coeficientes de regressão é calculada (Equação 19) e a seleção de variáveis é realizada por meio de teste de significância. Um teste-*t* avalia a significância dos valores estimados para cada coeficiente de regressão dos modelos desenvolvidos, obtendo um nível de significância correspondente a cada variável. Por fim, as variáveis relacionadas com os coeficientes de regressão significativos serão aquelas selecionadas (WESTAD; MARTENS, 2000).

$$s^2b = \left(\sum_{m=1}^M (b - b_m)^2 \right) \left(\frac{N-1}{N} \right) \quad (\text{Equação 19})$$

onde, N é o número de amostras, s^2b é a incerteza estimada do coeficiente de regressão (variância do coeficiente de regressão), b é o coeficiente de regressão para o número ótimo de fatores utilizando todas as N amostras e b_m é o coeficiente de regressão para o número de fatores utilizando todas as amostras exceto as que foram deixadas de fora na validação cruzada.

No *iPLS*, a informação instrumental é dividida em faixas equidistantes e modelos de calibração PLS são construídos para cada subintervalo. Através desse algoritmo é possível avaliar a relevância da informação instrumental em cada subdivisão e, assim, identificar e selecionar faixas de variáveis que melhor modelam a propriedade de interesse com o menor erro associado (MEHMOOD et al., 2012).

3.4.6 Transferência de calibração

Modelos de calibração multivariada podem ter alguns problemas ou tornarem-se inválidos quando variações não incluídas na construção dos modelos sejam introduzidas nos espectros. Essas variações podem ser decorrentes de mudanças na composição das amostras, das condições experimentais ou instrumentais ao longo do tempo, assim como a troca e/ou utilização de outros equipamentos que não participaram da construção dos modelos. Para solucionar tais situações, métodos de transferência de calibração são alternativas bastante práticas. Os métodos de transferência de calibração consistem na adaptação dos modelos de calibração ou das respostas instrumentais (padronização) entre equipamentos ou no momento em que houve mudanças das condições experimentais, instrumentais ou amostrais (HONORATO *et al.*, 2007).

Diferentes métodos são propostos para a transferência dos modelos de calibração, destacando-se a padronização direta (DS: *direct standardization*) e padronização reversa (RS: *reverse standardization*). Nesses métodos, os espectros do equipamento primário (P) são comparados àqueles obtidos em outro equipamento (secundário – S) para obter uma matriz de correção (F) que permita que todos os instrumentos tenham o mesmo espectro. A matriz F é calculada através da Equação 20:

$$\mathbf{X}_P = \mathbf{X}_S \mathbf{F} \quad (\text{Equação 20})$$

Onde, \mathbf{X}_P é matriz dos espectros do instrumento primário, \mathbf{X}_S é matriz dos espectros secundários e \mathbf{F} é a matriz de correção. Quando o número de amostras excede o número de variáveis, a matriz \mathbf{F} pode ser obtida pela inversão de \mathbf{X}_S . No entanto, quando a matriz é retangular, mais variáveis que amostras, a matriz \mathbf{F} é obtida através dos vetores de regressão em modelos PLS, por exemplo (HONORATO *et al.*, 2007).

A matriz \mathbf{F} é estimada com o objetivo de produzir a correção espectral (X^a) de uma amostra nova medida no equipamento S como se ela tivesse sido medida no equipamento P, conforme Equação 21.

$$\mathbf{X}^a = \mathbf{X}_S \mathbf{F} \quad (\text{Equação 21})$$

Esse procedimento descrito por meio da Equação 21 refere-se ao método DS. Após a etapa de padronização, os espectros padronizados são utilizados para predizer a propriedade de interesse nos modelos construídos no instrumento P. Já no método RS, o procedimento acontece

por um caminho inverso, pois a padronização ocorrerá para transformar os espectros medidos no instrumento P como se eles tivessem sido medidos no instrumento S. Neste caso, a matriz de correção (**F**) obtida é aplicada em todas as amostras de calibração do equipamento P, tornando todos os espectros medidos no P semelhantes aos obtidos no secundário. Após isso, um novo modelo de calibração será construído para que os espectros do instrumento S sejam diretamente utilizados para prever a propriedade de interesse. Embora o método RS requiera mais tempo, ele é mais prático por permitir o uso direto dos espectros medidos no equipamento secundário, sem a necessidade da etapa de padronização dos mesmos (HONORATO *et al.*, 2007; LIMA; BORGES, 2002).

3.4.7 Sinal Analítico Líquido

O sinal analítico líquido (NAS: *Net Analyte Signal*) é definido como a parte do sinal analítico medido que é ortogonal ao sinal dos interferentes. Os interferentes nesse contexto são todos os componentes presentes no sinal analítico exceto o analito de interesse. O vetor NAS deve ser único para o analito de interesse e isso implica que ele seja ortogonal ao sinal dos interferentes, como ilustrado na Figura 10 (BRO; ANDERSEN, 2003; LORBER; AND; KOWALSKI, 1997).

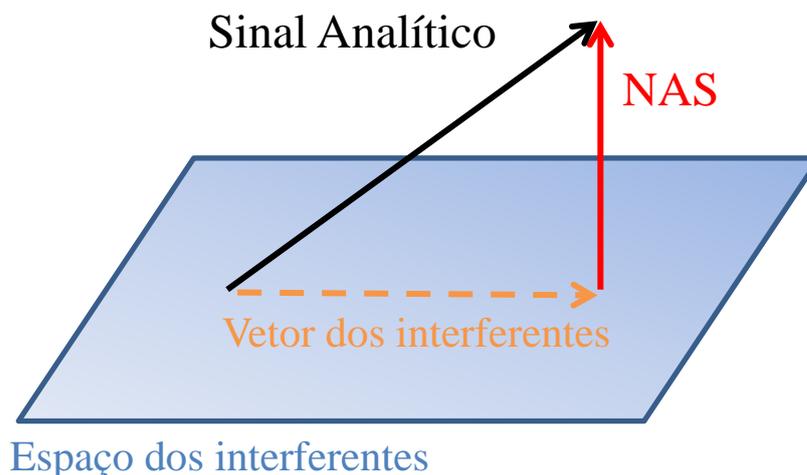


Figura 10. Representação geométrica da decomposição do sinal analítico em NAS e interferentes (adaptado de FERRÉ; FABER, 2003).

O NAS fornece informação exclusiva do analito de interesse e apresenta direta proporcionalidade a concentração do mesmo. Além disso, o NAS fornece informações sobre segmentos específicos do espectro relacionado com um analito específico. Na literatura são

encontradas diversas aplicações para o NAS, tal como detecção de outliers, seleção de variáveis, pré-processamento de dados, construção de modelos de calibração e cálculo de figuras de mérito em modelos de calibração multivariada.

O cálculo do NAS pode ser realizado principalmente de duas maneiras, através dos coeficientes de regressão de uma calibração multivariada (os interferentes não são conhecidos) e por meio dos espectros puros (os interferentes são conhecidos) (SARRAGUÇA; LOPES, 2009). Tratando-se de formulações farmacêuticas, todos os componentes envolvidos nas misturas são conhecidos e o cálculo do NAS pode ser realizado através dos espectros puros.

Para o cálculo do NAS, separa-se a contribuição do sinal analítico em duas partes independentes, conforme Equação 22:

$$x = x_k + x_{-k} \quad (\text{Equação 22})$$

onde, x é o vetor do sinal analítico, x_k é a parte do vetor do sinal analítico referente ao analito k (NAS) e o x_{-k} é o vetor do sinal analítico correspondente ao espaço dos interferentes (todos os componentes exceto o analito k) (FERRÉ; FABER, 2003).

O espaço dos interferentes pode ser calculado de diversas maneiras tal como utilizando os espectros puros dos interferentes. Já o vetor dos interferentes pode ser computado pela projeção do sinal analítico (x) no espaço dos interferentes, conforme Equação 23.

$$x_{-k} = S_{-k} (S_{-k}^T S_{-k})^{-1} S_{-k}^T x \quad (\text{Equação 23})$$

onde S_{-k} é a matriz contendo os espectros puros exceto para o componente k (BROWN, 2004).

Resolvendo as equações 22 e 23, obtém-se o vetor NAS para o analito de interesse. Esse procedimento pode ser repetido para determinação do NAS de todos os componentes de uma formulação farmacêutica, por exemplo. Nesses casos, determina-se o NAS de um dos componentes utilizando o seu próprio espectro puro e os demais componentes como interferentes (BROWN, 2004).

Uma das aplicações do NAS é a sua utilização para construção de modelos de calibração multivariada clássico (Regressão pelo método dos mínimos quadrados clássicos - CLS). No método de calibração multivariada clássico, o sinal analítico é uma função linear dos espectros puros do sistema em estudo com a concentração dos mesmos. No CLS, o sinal analítico é decomposto conforme Equação 24.

$$\mathbf{X} = \mathbf{CS} + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 24})$$

Onde \mathbf{X} ($n \times \lambda$) é a matriz do sinal analítico, \mathbf{C} ($n \times c$) é a matriz de concentrações, \mathbf{S} ($c \times \lambda$) é a matriz dos espectros puros e \mathbf{E} ($m \times \lambda$) é matriz dos resíduos dos dados não explicados pelo modelo. Para determinar a concentração de uma amostra desconhecida, resolve-se a Equação 24 e a mesma pode ser escrita conforme a Equação 25:

$$\mathbf{C} = \mathbf{XS}^T(\mathbf{SS}^T)^{-1} \quad (\text{Equação 25})$$

Observando a Equação 25, pode-se afirmar que a pseudo-inversa dos espectros puros ($\mathbf{S}^T(\mathbf{SS}^T)^{-1}$) funciona como coeficientes de regressão em modelos CLS. Dessa forma, a Equação 25 torna-se semelhante a Equação 7 apresentada anteriormente na sessão de calibração multivariada. Portanto, as Equações 24 e 25 podem ser escritas conforme Equações 26 e 27.

$$\mathbf{C} = \mathbf{XB} + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 26})$$

$$\mathbf{B} = \mathbf{S}^T(\mathbf{SS}^T)^{-1} \quad (\text{Equação 27})$$

No CLS, os coeficientes de regressão (Matriz B) podem ser substituídos pelo NAS devido a equivalência existente entre eles. As colunas da matriz B para dados normalizados são ortogonais às linhas da matriz S exceto para o a analito de interesse devido $\mathbf{SB} \equiv \mathbf{I}$. Por meio dessa equivalência, o NAS pode ser utilizado em substituição ao B nos modelos CLS (BRO; ANDERSEN, 2003; BROWN, 2004; LORBER; KOWALSKI, 1997). Dessa forma, quando conhecidos os espectros puros de uma mistura (formulação farmacêutica, por exemplo) pode-se construir modelos CLS através dos mesmos. Dependendo do tipo de espectroscopia utilizada, como a espectroscopia NIR, problemas de especificidade espectral são bastante frequentes. Então, modelos CLS podem ser construídos utilizando o NAS nos seus cálculos por apresentar informações mais específicas sobre os analitos de interesse.

3.4.8 Resolução Multivariada de Curvas com Mínimos Quadrados Alternantes

A resolução multivariada de curvas (MCR: *Multivariate Curve Resolution*) é uma ferramenta quimiométrica que tem como objetivo descrever misturas complexas através da

determinação das contribuições dos componentes puros presentes na mistura. O MCR tem o mesmo princípio que o CLS, no entanto, ele pode lidar com sistemas subdeterminados (quando não se conhece a totalidade de componentes de um sistema) e múltiplas fontes de ruídos. Diferentemente do CLS, o MCR não necessita dos espectros puros para seu cálculo e realiza múltiplas interações para melhor recuperar conjuntamente os perfis de concentração e espectral (IGNE; BONDI; AIRIAU, 2018).

A equação que descreve o MCR é a mesma utilizada no CLS e descrita pela Equação 24 apresentada na sessão anterior. Essa equação apresenta ambiguidade e múltiplas soluções são possíveis quando as matrizes de concentração ou espectros puros não são apresentados. Então, o MCR necessita otimizar uma resposta para diminuir os resíduos da decomposição do sinal analítico entre os perfis de concentração e espectral. Nessa etapa de otimização, um dos algoritmos mais utilizados é o Mínimos Quadrados Alternantes (ALS: *Alternating Least Square*). O ALS aplica restrições durante as resoluções para que os perfis espectrais e de concentração obedeçam determinadas propriedades químicas, físicas e/ou matemáticas tal como a não negatividade, que força que os perfis de concentração e/ou espectrais sejam formados por valores positivos, por exemplo. Existem outros tipos de restrições como unimodalidade, fechamento e seletividade que podem ser aplicados em diversos cenários e estão descritos na literatura (IGNE; BONDI; AIRIAU, 2018; JAUMOT; DE JUAN; TAULER, 2015).

Na etapa de otimização dos modelos MCR-ALS, o algoritmo necessita de uma estimativa da quantidade de componentes presentes na mistura e a estimativa inicial dos perfis espectrais ou dos perfis de concentração para encontrar as soluções. Existem diversas maneiras para estimar a quantidade de componentes na mistura tal como o número de componentes principais utilizado numa PCA para explicar a variabilidade dos dados, ou através de uma análise evolucionária de fatores (EFA: *Envolving Factor Analysis*). Já as estimativas iniciais dos perfis espectrais podem ser determinadas pelos loadings de uma PCA realizada nos dados, ou mesmo utilizar os espectros puros dos componentes quando se tem conhecimento deles. Através das estimativas iniciais, o algoritmo tenta solucionar a equação e utiliza as respostas para determinar os perfis de concentração ou espectrais, respectivamente, conforme Equações 25 e 28 (PIQUERAS et al., 2012).

$$S = (C^T C)^{-1} C^T X \quad (\text{Equação 28})$$

Onde, X ($n \times \lambda$) é a matriz do sinal analítico, S ($c \times \lambda$) é a matriz dos espectros puros e C ($n \times c$) é a matriz de concentrações.

O final do processo de iteração para otimização do MCR-ALS termina quando a reprodução da matriz X pelo modelo bilinear para os perfis de concentração ou espectral apresentam qualidade suficiente, minimizam a matriz residual e não apresentam nenhuma variação significativa dos resultados nos ciclos consecutivos. A falta de ajuste é um dos parâmetros utilizados para medir a qualidade do modelo construído (PIQUERAS et al., 2012).

Outra vantagem do MCR-ALS é a possibilidade de lidar com conjuntos de dados aumentados, concatenando diferentes matrizes de dados em condições diversas para aumentar a capacidade do modelo de resolver os componentes. Essa resolução simultânea de diversos conjuntos de dados é bastante utilizada em diversas situações assim como na análise de imagens hiperespectrais. Através disso, informações quantitativas globais e locais podem ser determinadas nas imagens utilizando os perfis de concentração e espectrais apropriadamente. Por exemplo, os perfis de concentração de um composto em particular em diferentes imagens podem ser obtidos pela comparação dos valores médios dos perfis de concentração relacionados com cada imagem em particular. Quando um valor de referência para concentração em cada imagem existe, os valores médios dos perfis de concentração obtidos pelo modelo MCR-ALS podem ser regredidos em função dos valores de referência e construir uma curva de calibração. A Figura 11 esquematiza essa quantificação baseada em modelos MCR-ALS (JAUMOT; GARGALLO; JUAN, 2005; PIQUERAS et al., 2012).

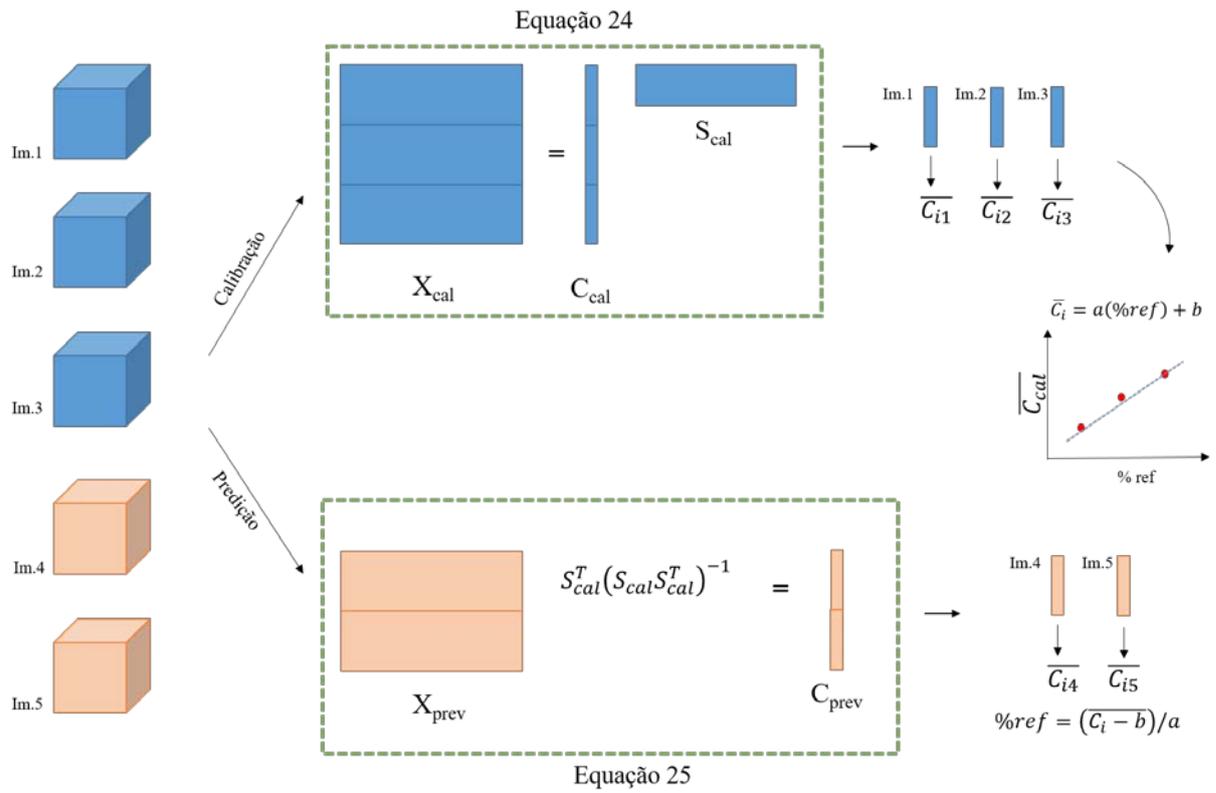


Figura 11. Esquema de calibração e predição para análise quantitativa simultânea em imagens hiperespectrais por MCR-ALS (adaptado de PIQUERAS *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Os polimorfos A e C do MBZ foram gentilmente cedidos pela Formil Química (São Paulo) e o polimorfo B obtido por recristalização, conforme descrito por Kachrimanis Rontogiani e Malamataris (2010) e Silva *et al.* (2015).

As espectroscopia MIR e difração de raios X de pó (PXRD: *Powder X-ray diffraction*) foram utilizadas para caracterização dos polimorfos do MBZ. Os espectros MIR foram registrados em um espectrofotômetro FTIR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) utilizando o acessório de reflectância total atenuada universal (UATR: *Universal Attenuated Total Reflectance*), na faixa espectral de 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e média de 32 varreduras. As análises de PXRD foram realizadas em um difratômetro modelo D8 Advance (Bruker) com radiação $K\alpha$ do cobre (1,54 Å), taxa de varredura de 0,02° 2 θ /s e faixa angular entre 5° e 35° 2 θ .

Um planejamento de misturas ternário foi realizado para preparar as misturas utilizadas em estudo anterior (20 amostras) (SILVA *et al.*, 2015) e outras 10 novas misturas foram preparadas para ampliar o conjunto amostral. Nessas 30 misturas, os polimorfos A e C variaram de 0 a 100% (m/m) e o polimorfo B entre 0 e 30% (m/m). Todas as misturas foram previamente peneiradas em malha com abertura de 355 μm (Mesh 45) antes de cada uma das análises.

Formulações farmacêuticas simplificadas foram preparadas utilizando as misturas apresentadas na Tabela 1 e os excipientes (Celulose Microcristalina – MCC – e Estearato de magnésio – MgSt) para realizar as análises por HSI-NIR. Todos os comprimidos com as misturas dos polimorfos, MCC e MgSt continham 50:49:1 m/m/m com peso total de 100 mg. Cada uma dessas misturas de pós foi misturada utilizando um vortex por 3 minutos em um recipiente de 15 mL para garantir homogeneidade nos comprimidos antes de prensá-los. As amostras foram prensadas em uma prensa mecânica a 2 ton/cm^2 e os comprimidos apresentaram 8,5 mm de diâmetro.

A Tabela 1 apresenta a proporção de cada polimorfo nas misturas.

Tabela 1. Proporção de cada polimorfo do MBZ nas misturas.

	Polimorfo A (m/m)	Polimorfo B (m/m)	Polimorfo C (m/m)
M1	85%	15%	0%
M2	0%	30%	70%
M3	70%	30%	0%
M4	43%	15%	43%
M5	100%	0%	0%
M6	50%	0%	50%
M7	0%	0%	100%
M8	0%	15%	85%
M9	35%	30%	35%
M10	75%	8%	17%
M11	60%	3%	37%
M12	19%	1%	80%
M13	30%	5%	65%
M14	1%	9%	90%
M15	80%	12%	8%
M16	25%	18%	57%
M17	10%	20%	70%
M18	40%	25%	35%
M19	60%	15%	25%
M20	17%	13%	70%
M21	20%	20%	60%
M22	90%	2%	8%
M23	33%	4%	63%
M24	27%	6%	67%
M25	22%	8%	70%
M26	15%	10%	75%
M27	12%	17%	71%
M28	7%	19%	74%
M29	5%	22%	73%
M30	3%	27%	70%

4.2 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS

4.2.1 Espectros NIR

4.2.1.1 Equipamentos portáteis e de bancada

Três diferentes equipamentos NIR portáteis foram utilizados para aquisição dos espectros das misturas. Dois equipamentos portáteis, MicroNIR 1700 e MicroNIR 2200 (JDSU), operando nas seguintes regiões espectrais: (1) 900 – 1650 nm (MicroNIR 1700) e (2)

1160 – 2170 nm (MicroNIR 2200). Esses equipamentos empregam lâmpadas de tungstênio, filtro linear variável (LVF: *Linear Variable Filter*) e um detector de InGaAs com 128 elementos. A resolução de ambos equipamentos é $< 1,25\%$ do centro de comprimento de onda, ou seja, para o MicroNIR 1700, em torno de 12,5 nm e para o MicroNIR 2200, em torno de 25 nm. Nesses instrumentos os espectros foram adquiridos com média de 50 varreduras e tempo de integração de 10 ms.

O terceiro instrumento NIR portátil utilizado neste estudo foi o NanoNIR (Texas Instruments), que opera na faixa espectral de 900-1700 nm. O equipamento é do tipo dispersivo com um módulo amostral de reflectância com dois filamentos de tungstênio. Uma linha de micro espelhos é utilizada como seletor de comprimento de onda com detector de único ponto de InGaAs. Cada espectro nesse equipamento foi adquirido no modo Hadamard como média de 10 varreduras e resolução de 7 nm.

Para efeito de comparação, um espectrofotômetro NIR de bancada, FTNIR Frontier (Perkin-Elmer), empregando o acessório de reflectância difusa (NIRA: *Near Infrared Reflectance Accessory*) foi utilizado. Os espectros foram adquiridos na faixa de 1200 – 4000 cm^{-1} (830 - 2500 nm), resolução de 4 cm^{-1} e média de 32 varreduras.

Todas as misturas foram colocadas num tubo de vidro sob o cristal de safira do acessório de reflectância no equipamento de bancada (FTNIR). Para todos os equipamentos portáteis, as amostras foram colocadas em placa de Petri sobre a janela de reflectância do dispositivo. Teflon foi utilizado como branco (reflectância total) em todos os equipamentos.

A reprodutibilidade do comprimento de onda em todos os instrumentos NIR foi determinado utilizando-se 10 espectros de talco mineral que apresenta intensa banda de absorção entre 1370 e 1420 nm. O comprimento de onda do pico nas medidas foi determinado pela equação da reta entre os pontos do espectro NIR derivativo (primeira derivada) quando o pico passa pelo zero. O desvio padrão do comprimento de onda do pico foi utilizado como medida da reprodutibilidade do comprimento de onda.

4.2.1.2 Equipamento de Imagem

As hiperespectrais foram coletadas utilizando o sistema de imagem SisuCHEMA (Specim) na faixa espectral de 900 a 2500 nm. As imagens foram coletadas com resolução espectral de 10 nm e resolução de amostragem por pixel de 6,3 nm. A lente utilizada nessas aquisições apresenta 10 mm de campo de visão e um tamanho de pixel de 30 x 30 μm .

4.2.2 Espectros THz

Os espectros THz foram adquiridos utilizando um espectrômetro THz no domínio do tempo (TH-TD: THz *time-domain*) com a tecnologia de amostragem óptica assíncrona de alta velocidade (ASOPS – *High Speed Asynchronous Optical Sampling*) da Lazer Quantum (HASSP-THZ). Cada espectro foi registrado como a média de 500 mil varreduras na faixa espectral de 0,05 – 6,0 THz.

Os espectros das misturas foram obtidos a partir de pastilhas de politetrafluoretileno (PTFE: *polytetrafluoroethylene*) contendo 15% m/m de cada mistura. Cada pastilha apresentava 12 mm de diâmetro e espessura média de 1 mm. Foram produzidas duas pastilhas por mistura e os espectros foram obtidos em duplicata para cada pastilha utilizando um amostrador rotatório (5 rpm) para obter espectros mais representativos de cada amostra. Todas as análises foram realizadas no foco do pulso THz com área de 0,5 mm. Purga com nitrogênio foi realizada antes das medidas até que a linha de absorção do vapor d'água fosse indistinguível do ruído. Um procedimento por transformada de Fourier foi realizada nos dados para convertê-los do domínio do tempo para o domínio das frequências e a média dos 4 espectros por mistura foi utilizada para construção dos modelos de calibração multivariada.

4.3 ANÁLISE DE DADOS E SOFTWARES

O conjunto amostral utilizado na construção dos modelos de calibração multivariada na matéria prima foi subdividido em conjunto de calibração e de predição contendo 70% e 30% do total de amostras, respectivamente. A subdivisão amostral foi realizada utilizando o algoritmo de partição de amostras baseado nas distâncias \mathbf{X} -y (SPXY: *sample set partitioning based on a joint X-y distance*).

Modelos de calibração multivariada baseados na regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foram construídos utilizando os espectros NIR e THz pré-processados. Diferentes estratégias de pré-processamento foram utilizadas em ambas regiões espectrais, tais como: Suavização com filtro SG (polinômio de 2ª ordem e janela com diferentes tamanhos); MSC; SNV; correção de linha de base (offset); e primeira e segunda derivadas (SG, polinômio de 2ª ordem e janela com diferentes tamanhos). Os modelos PLS foram construídos com e sem seleção de variáveis pelo algoritmo Jack-Knife (JK) utilizando diferentes faixas espectrais. O algoritmo PLS por intervalos (iPLS: *interval PLS*) foi aplicado aos espectros THz para identificar intervalos espectrais com maior correlação com os componentes estudados. Além disso, todos os espectros NIR e THz foram centrados na média antes da construção dos modelos

de regressão. A detecção de amostras anômalas (outliers) foi realizada através dos gráficos de escores e de resíduos em função da influência (leverage) tanto em X quanto em y.

O método de validação cruzada total (*full cross validation*) foi utilizado para validação dos modelos e selecionar o número de variáveis latentes. A capacidade preditiva dos modelos foi avaliada por meio dos valores de RMSEP obtidos com o conjunto de predição externo, ou seja, com amostras que não foram utilizadas na etapa de calibração. Um teste *F*, em um nível de 95% de confiança, foi utilizado para avaliar se havia diferenças estatisticamente significativas entre os valores de RMSEP dos modelos construídos para cada forma polimórfica nas regiões espectrais estudadas. Os valores de F_{cal} foram comparados com os valores de F_{crit} (0,95, v_1 , v_2), onde v é o número de amostras do conjunto de predição menos um. Um teste *t* com nível de 95% de confiança também foi realizado afim de avaliar a significância das tendências (bias) utilizando o conjunto de amostras de predição. Os valores de *t* foram calculados de acordo com a norma ASTM E-1655 para análise quantitativa multivariada, conforme equação (Equação 29) (ASTM E 1655-05, 2005).

$$t = \frac{|bias|\sqrt{n}}{\sqrt{RMSEP^2 - bias^2}} \quad (\text{Equação 29})$$

Por fim, faixas de limite de detecção (LOD: *Limit of detection*) foram calculadas por meio do algoritmo MVC1 (*Multivariate Calibration 1*) (OLIVIERI; GOICOECHEA; IÑÓN, 2004). O LOD neste algoritmo é calculado por faixa por assumir que o limite de detecção tem influência das concentrações dos demais componentes da mistura.

No estudo da transferência de calibração, as estratégias de padronização direta (DS: *direct standardization*) e reversa (RS: *reverse standardization*) foram testadas. A influência do número de amostras de transferência (1 - 12) também foi investigada. As amostras de transferência foram selecionadas através do algoritmo Kennard-Stone (KS). O instrumento primário (P) foi o equipamento NIR de bancada enquanto o secundário (S) um dos equipamentos NIR portáteis. A Figura 12 apresenta um esquema simplificado e geral da construção dos modelos PLS e de transferência de calibração desenvolvidos neste trabalho.

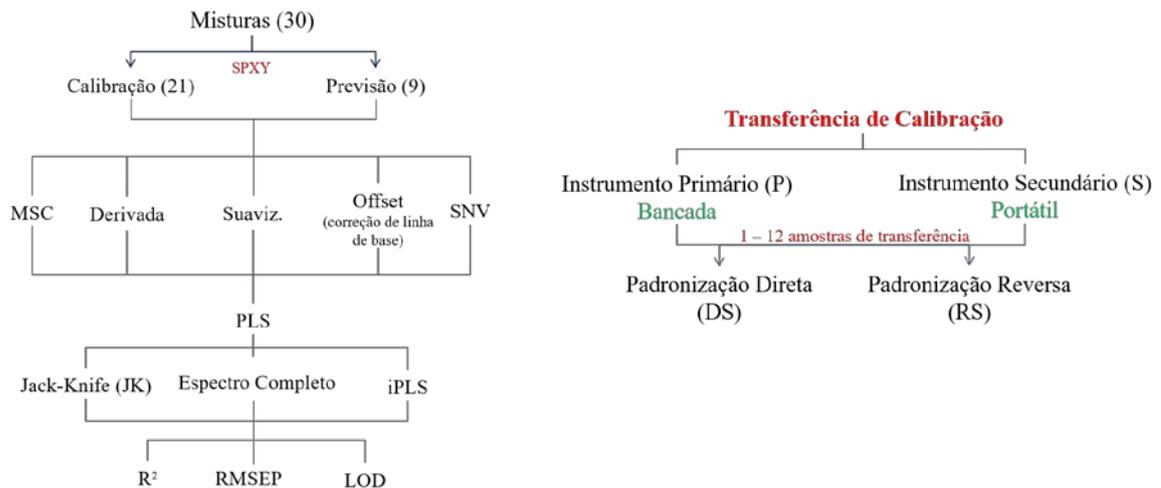


Figura 12. Esquema simplificado e geral da construção dos modelos PLS desenvolvidos neste trabalho e da transferência de calibração.

Para o estudo das HSI-NIR, inicialmente foi selecionado a região de interesse (ROI: *Region of Interest*) em cada uma das imagens para eliminar o fundo e utilizar no tratamento de dados apenas a superfície dos comprimidos. Esse pré-processamento espacial foi realizado através dos histogramas obtidos pelos gráficos dos escores de uma PCA. Em seguida, as imagens foram desdobradas em uma matriz 2D para aplicação dos métodos quimiométricos. As mesmas estratégias de pré-processamento utilizadas nas etapas anteriores do trabalho foram testadas nas imagens. Os comprimidos utilizados nas etapas de calibração e predição foram selecionados manualmente de forma que amostras contendo misturas parciais e de todos os polimorfos fossem contempladas, ou seja, misturas polimórficas binárias, ternárias e os polimorfos puros. Dessa forma, 15 comprimidos foram selecionados para calibração e 10 para predição. As mesmas amostras de calibração e predição foram utilizadas para construção dos modelos nas imagens. O quantitativo de amostras nesta etapa do trabalho foi reduzida devido a demanda computacional requerida nos cálculos.

Os modelos MCR-ALS foram desenvolvidos utilizando as HSI-NIR compactadas. A compressão pode ser realizada tanto na dimensão espacial quanto na espectral. Na compressão, os dados originais são substituídos por um valor médio entre uma determinada quantidade de pixels ou comprimentos de onda. A compressão foi utilizada para diminuir o tempo computacional e foi aplicada na dimensão espacial para reduzir o número de pixels por um fator de dois, ou seja, reduzir a imagem pela metade. Após a compressão, cada imagem apresentou cerca de 14.000 pixels. Os modelos MCR-ALS foram construídos com matriz aumentada em que as amostras de calibração foram organizadas uma abaixo da outra (column-wise). Os

espectros puros de cada componente foram utilizados como estimativas iniciais e foi aplicada a restrição de não negatividade nos perfis de concentração. A qualidade dos modelos foi avaliada através da falta de ajuste (LOF: *lack of fit*), variância explicada, resíduos e coeficiente de correlação entre os dados experimentais e recuperados pelo MCR-ALS. Por fim, uma regressão foi realizada com a concentração relativa média para cada imagem obtida pelo MCR-ALS e com a concentração global de cada polimorfo no comprimido. Dessa maneira, a concentração relativa obtida pelo MCR-ALS é convertida em concentração real através da linha de regressão. Os espectros recuperados pelo MCR-ALS foram utilizados na determinação dos perfis de concentração das amostras de predição. A qualidade da regressão desenvolvida foi avaliada através do RMSEC/RMSEP e dos parâmetros de regressão.

Os modelos PLS para imagens foram desenvolvidos utilizando os espectros médios pré-processados de cada comprimido. O mesmo procedimento utilizado na matéria prima foi utilizado nos modelos PLS para os comprimidos. Para efeito de comparação, modelo MCR-ALS foi avaliado também utilizando os espectros médios.

Os mapas de distribuição dos comprimidos para cada polimorfo foram obtidos utilizando as concentrações obtidas pelo PLS e MCR-ALS após conversão em valores reais. A Figura 13 apresenta um esquema simplificado do tratamento de dados realizados nas HSI-NIR.

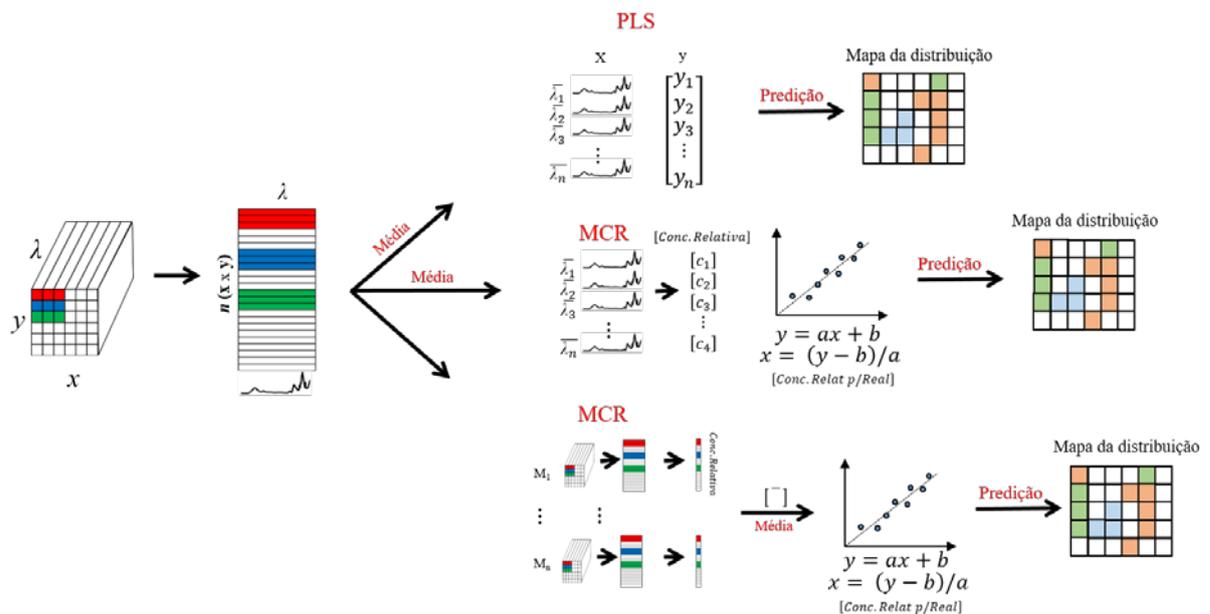


Figura 13. Esquema simplificado e geral do tratamento de dados realizado na HSI-NIR.

Modelos CLS também foram construídos nas HSI-NIR utilizando os espectros puros e os NAS obtidos por meio dos espectros puros e dos espectros recuperados pelo melhor modelo

MCR-ALS. Esses modelos foram avaliados de forma semelhante às etapas anteriores deste trabalho.

Todos os cálculos quimiométricos foram realizados utilizando-se os softwares Matlab R2010a versão 7.10.0.499, PLS Toolbox (Eigenvector Research), Hypertools Toolbox (MOBARAKI; AMIGO, 2018) e a interface MCR-ALS (JAUMOT; DE JUAN; TAULER, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 QUANTIFICAÇÃO DE POLIMORFOS UTILIZANDO INSTRUMENTOS PORTÁTEIS E TRANSFERÊNCIA DE CALIBRAÇÃO

A Figura 14 mostra os espectros NIR dos polimorfos A, B e C do MBZ nos três equipamentos portáteis e no instrumento de bancada. Embora o equipamento de bancada opere na faixa espectral de 800 a 2500 nm, apenas a faixa espectral igual àquelas dos equipamentos MicroNIR 1700 e NanoNIR (1080-1580 nm) é apresentada. A faixa espectral de trabalho utilizada do MicroNIR 2200 foi de 1420 a 1745 nm. As regiões espectrais remanescentes da faixa de trabalho dos equipamentos portáteis foram retiradas por não apresentarem sinais analíticos relevantes.

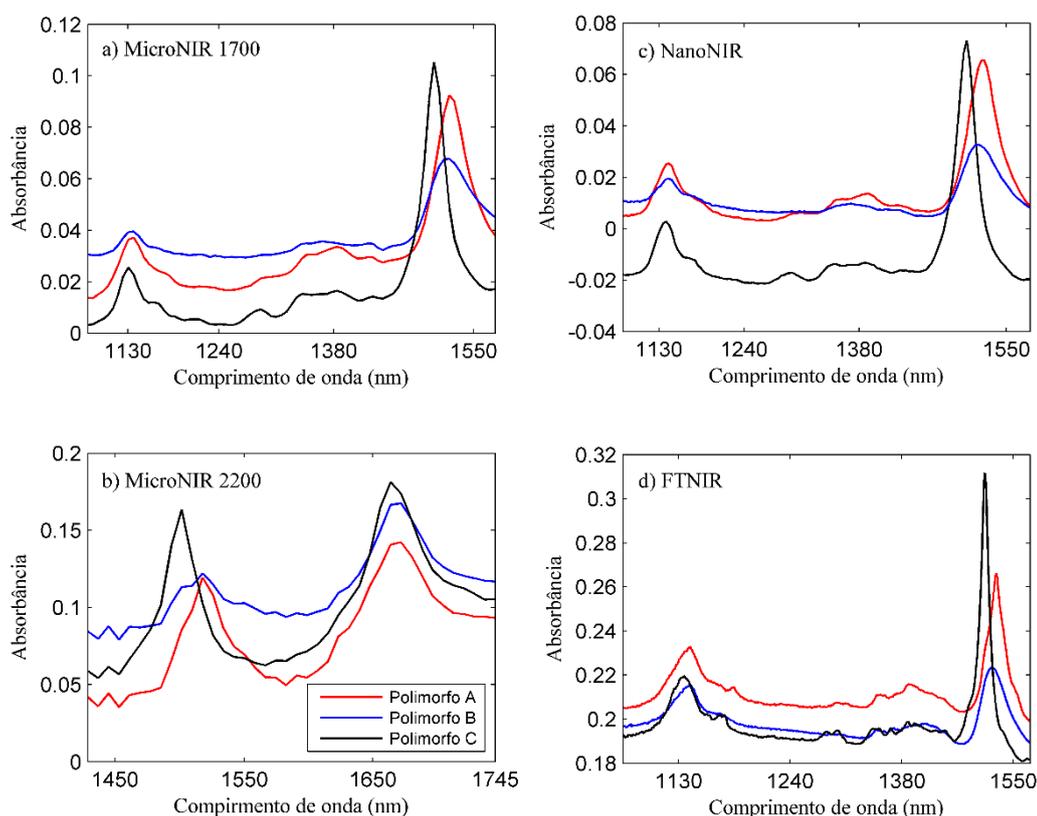


Figura 14. Espectros NIR dos polimorfos puros do MBZ adquiridos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR.

As bandas de absorção observadas nos espectros NIR dos polimorfos do MBZ estão associadas às combinações e sobretons dos estiramentos C-H e N-H das moléculas do fármaco. No entanto, nas regiões espectrais estudadas nos equipamentos portáteis não é possível observar

as bandas associadas às combinações. A banda associada ao primeiro sobretom do estiramento N-H é observada em torno de 1500 nm e está presente em todos os instrumentos. Essa banda é a principal característica nos espectros NIR para diferenciação dos polimorfos do MBZ. A diferença de largura e intensidade observada nessa banda espectral ocorre devido às diferenças de empacotamento existentes entre os polimorfos do MBZ provocadas pela força da ligação de hidrogênio em suas estruturas cristalinas (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008). Para o polimorfo B, a banda associada ao primeiro sobretom do estiramento N-H apresenta-se larga e sobreposta, tornando sua caracterização e determinação difíceis. Apenas no MicroNIR 2200 é possível observar a banda associada ao primeiro sobretom do estiramento C-H (1655 nm). Já a banda localizada em 1135 nm, relacionada ao segundo sobretom do estiramento C-H, pode ser observada nas faixas espectrais dos instrumentos MicroNIR 1700, NanoNIR e FTNIR.

Na Figura 14 também observa-se as diferenças de resolução espectral entre os equipamentos. Indiscutivelmente, os instrumentos portáteis apresentam resoluções piores quando comparadas ao equipamento de bancada. Além disso, vale ressaltar que as bandas espectrais observadas nos equipamentos portáteis são menos intensas e apresentam relações sinal-ruído menores que aquelas observadas no instrumento de bancada. Como observado na Figura 14, o MicroNIR 2200 apresenta piores resolução espectral e relação sinal-ruído entre os equipamentos portáteis. No teste realizado com Talco mineral para avaliar a reprodutibilidade do comprimento de onda, o MicroNIR 2200 apresentou a mais baixa reprodutibilidade do comprimento de onda (0,0448 nm) quando comparada aos instrumentos MicroNIR 1700 (0,0041 nm), NanoNIR (0,0185 nm) e FTNIR (0,0022 nm) no teste realizado com talco mineral.

A Figura 15 apresenta os espectros NIR das misturas ternárias dos polimorfos do MBZ adquiridos em todos os equipamentos utilizados neste trabalho. Efeito de espalhamento é observado nas medidas e esse efeito físico deve ser eliminado antes da construção dos modelos de regressão. O número de variáveis espectrais para os instrumentos estudados foram 1464 (FTNIR), 81 (MicroNIR 1700), 40 (MicroNIR 2200) e 143 (NanoNIR).

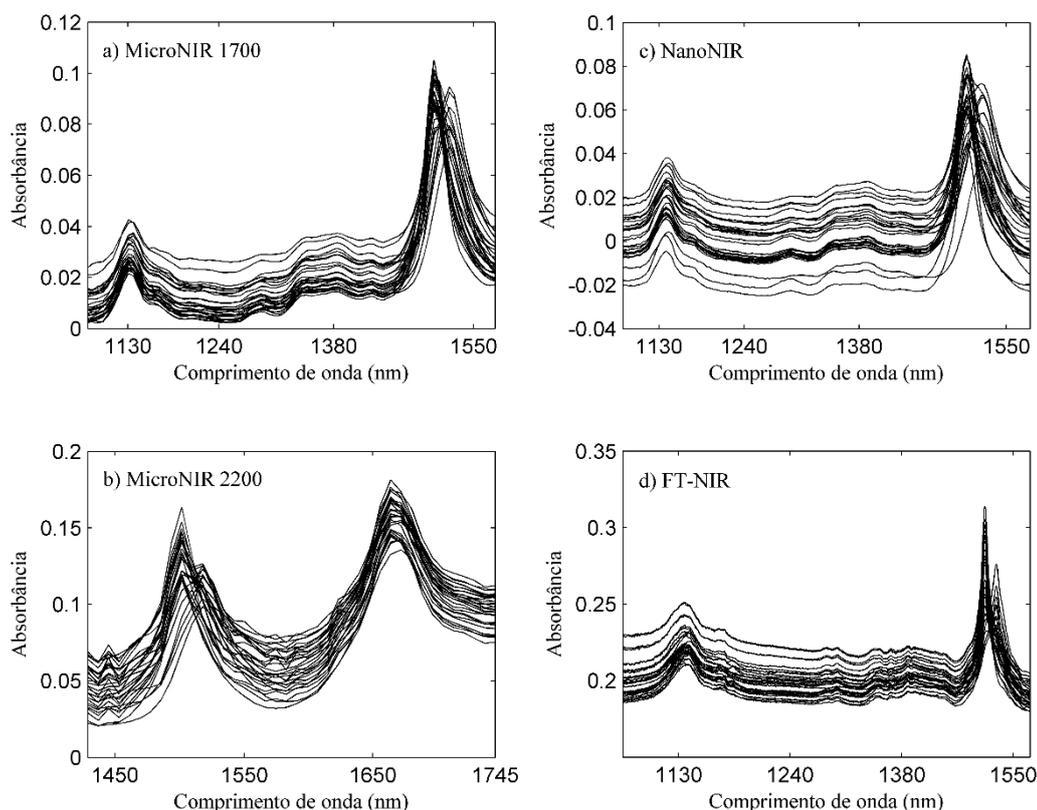


Figura 15. Espectros NIR brutos das misturas ternárias do polímeros do MBZ adquiridos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTIR.

A Tabela 2 apresenta os melhores resultados obtidos com os modelos PLS desenvolvidos com os instrumentos estudados utilizando diferentes estratégias de pré-processamento. Para o polímero A, o MicroNIR 1700 apresentou o menor valor de RMSEP (1,01% m/m) e o modelo foi construído utilizando o espectro derivativo (SG, polinômio de segunda ordem e janela de 5 pontos). Para o MicroNIR 2200, o valor de RMSEP (2,86% m/m) foi equivalente ao obtido com o equipamento de bancada, 2,14% m/m. O portátil NanoNIR apresentou o pior desempenho analítico com valor de RMSEP de 4,21% m/m. Conforme o teste F (95% de confiança) realizado, os resultados obtidos com os modelos desenvolvidos no MicroNIR 1700 são estatisticamente diferentes daqueles obtidos com os demais instrumentos. Este melhor desempenho analítico apresentado pelo MicroNIR1700 na predição do polímero A está provavelmente associada ao maior número de variáveis latentes (5) requeridas para explicar a variância dos dados quando comparado com o modelo construído com o equipamento de bancada (4 VLs).

Tabela 2. Resultados dos melhores modelos PLS para determinação dos polimorfos do MBZ utilizando equipamentos NIR portáteis e de bancada. O valor em parênteses refere-se o número de variáveis latentes utilizadas nos modelos de regressão.

Instrumentos / Modelos	Polimorfo A				Polimorfo B				Polimorfo C				
	R ²	RMSE (% m/m)	LOD (% m/m)	Pre-Proc.	R ²	RMSE (% m/m)	LOD (% m/m)	Pre-Proc.	R ²	RMSE (% m/m)	LOD (% m/m)	Pre-Proc.	
FTNIR	Cal	0,99	3,02 (4)	2,0 – 4,1	Suav. (15pts)	0,93	2,66 (5)	1,8 – 3,6	1ª Derivada	0,98	3,95 (4)	3,6 – 5,8	1ª Derivada
	Pred	0,99	2,14		MSC	0,98	1,77		(31pts)	0,99	2,12		(31pts)
MicroNIR 1700	Cal	0,99	3,60 (5)	3,9 – 5,5	1ª Derivada	0,95	2,16 (3)	3,6 – 5,1	MSC	0,98	3,83 (2)	5,6 – 7,7	1ª derivada
	Pred	0,99	1,01		(5pts)	0,97	2,09			(7pts)	0,99		2,41
MicroNIR 2200	Cal	0,97	4,96 (5)	4,3 – 9,4	Suav. (5pts)	0,91	3,04 (5)	3,2 – 5,5	Suav. (7pts)	0,99	3,30 (4)	4,1 – 6,7	Suav. (5pts)
	Pred	0,99	2,86		Baseline	0,93	3,33		Baseline	0,99	4,53		MSC
NIRscan Nano	Cal	0,97	5,02 (4)	4,3 – 8,6	MSC	0,91	3,05 (5)	5,2 – 6,6	MSC	0,99	3,24 (1)	5,4 – 5,6	Baseline
	Pred	0,99	4,21			0,97	2,49			0,99	4,36		

Para os polimorfos B e C, o MicroNIR 1700 apresentou valores de RMSEP de 2,09% m/m e 2,41% m/m, respectivamente. Esses resultados são estatisticamente similares aos resultados obtidos com o equipamento de bancada (1,77% m/m para o polimorfo B e 2,12% m/m para o polimorfo C), conforme teste *F* realizado. Além disso, os modelos desenvolvidos com MicroNIR 1700 requereram menos variáveis latentes para explicar a variância dos dados para os polimorfos B e C. Para os equipamentos MicroNIR 2000 e NanoNIR, os valores de RMSEP apresentados pelos modelos foram superiores a 2,50% m/m e 4,00% m/m para os polimorfos B e C, respectivamente. Os resultados obtidos com o MicroNIR 2200 para os polimorfos B e C são estatisticamente diferentes daqueles obtidos com os outros equipamentos. Somente para o polimorfo C o resultado obtido com o NanoNIR foi estatisticamente diferente daqueles obtidos com o MicroNIR1700 e equipamento de bancada.

As Figura 16-17 apresentam os gráficos dos valores de referência versus preditos obtidos pelos modelos PLS na quantificação dos polimorfos do MBZ utilizando espectros NIR. Para os polimorfos A e C, os coeficientes de determinação obtidos com os modelos PLS desenvolvidos em todos os instrumentos foram acima de 0,97. Por outro lado, para o polimorfo B, os valores de R^2 foram em torno de 0,91 e 0,98 para as etapas de calibração e predição, respectivamente.

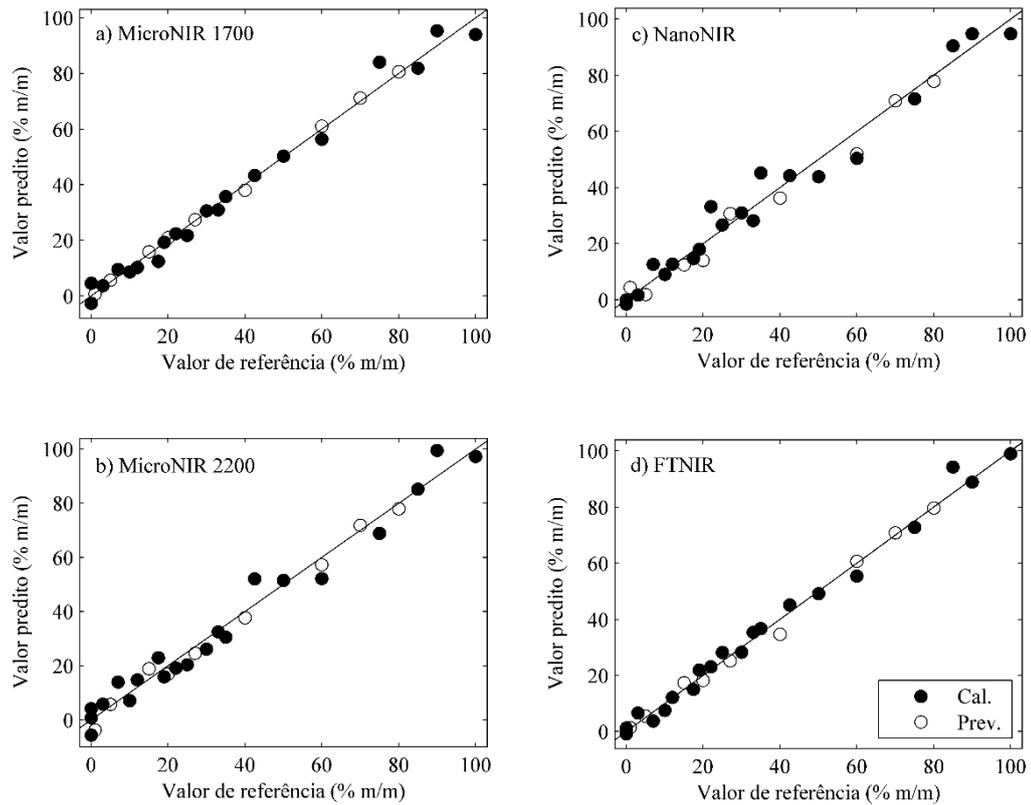


Figura 16. Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR para quantificação do polimorfo A.

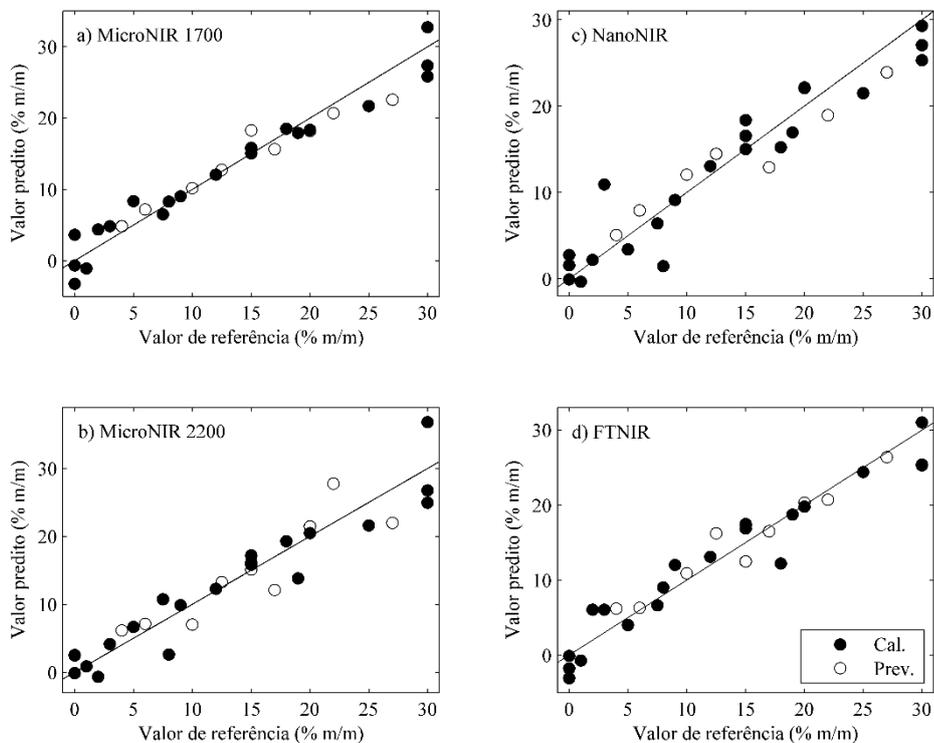


Figura 17. Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR para quantificação do polimorfo B.

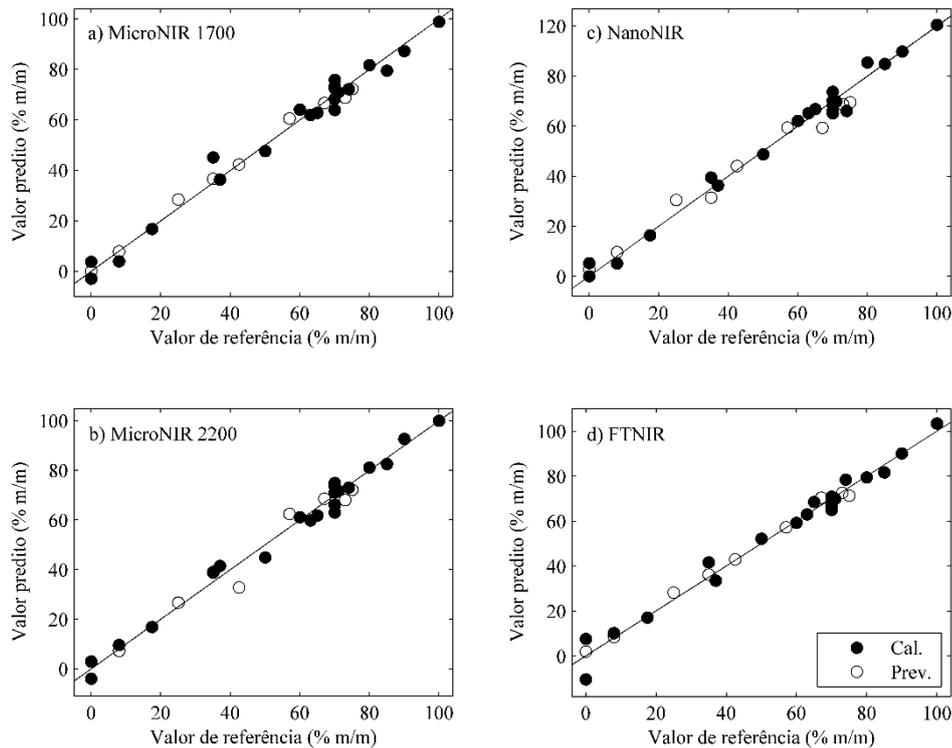


Figura 18. Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos utilizando os instrumentos (a) MicroNIR 1700, (b) MicroNIR 2200, (c) NanoNIR e (d) FTNIR para quantificação do polimorfo C.

Como pode ser observado nas Figura 16-18, as amostras estão aleatoriamente distribuídas em torno da bisetriz com dados mais dispersos para o polimorfo B. No entanto, não existe evidência de erro sistemático para nenhum dos modelos desenvolvidos, conforme teste t (95% de confiança) realizado. Essa dispersão apresentada para os modelos do polimorfo B está associada com a sobreposição espectral com o polimorfo A. Além disso, a banda espectral do polimorfo B é larga e de baixa intensidade, tornando difícil a sua quantificação nas misturas.

Em geral, o equipamento portátil MicroNIR 1700 tem um desempenho analítico similar ao equipamento de bancada para quantificação dos polimorfos do MBZ no IFA, quando usada a mesma região espectral. Além do mais, o desempenho desse equipamento portátil também é comparável aos resultados iniciais publicados (SILVA et al., 2015), que inclui as bandas de combinação (2000 – 2500 nm) nos modelos.

Considerando as faixas do LOD (Tabela 2), o MicroNIR 1700 alcançou valores maiores que aqueles obtidos com o equipamento de bancada. Essa sensibilidade maior apresentada pelo equipamento de bancada está relacionada com sua alta resolução espectral. Apesar da baixa sensibilidade do MicroNIR 1700, esse equipamento fornece uma abordagem simples e de baixo

custo no controle da qualidade de polimorfos no IFA. Além disso, as faixas de LOD estimadas também explicam os valores preditos negativos encontrados em alguns modelos.

Devido ao melhor desempenho analítico do MicroNIR 1700 entre os equipamentos portáteis, decidiu-se estudar a transferência de calibração entre esse instrumento e aquele de bancada. Para isso, o FTNIR foi escolhido como instrumento primário (P) e o MicroNIR 1700 como secundário (S).

A Tabela 3 resume os resultados de transferência de calibração utilizando as estratégias de padronização direta (DS) e reversa (RS), testando entre 1 e 12 amostras de transferência. Como pode ser observado na tabela, a estratégia RS apresentou melhor capacidade preditiva que a DS. O melhor resultado encontrado com o método RS deve-se, provavelmente, pela melhor eficiência na estratégia reversa uma vez que há redução de dimensionalidade/resolução dos espectros, ao contrário do que acontece no método DS. Os melhores resultados encontrados utilizaram entre 10 e 12 amostras de transferência. Para os polimorfos B e C, os resultados RS foram similares àqueles obtidos com a calibração completa do instrumento secundário, ou seja, os resultados de transferência foram semelhantes aos obtidos utilizando o próprio equipamento S (Tabela 2). Por outro lado, os resultados para o método RS para o polimorfo A foram piores que aqueles alcançados com a calibração completa do instrumento S, que requereu mais variáveis latentes.

Tabela 3. Capacidade preditiva dos modelos para MicroNIR 1700 e FTNIR utilizando métodos de padronização direta e reversa para predição das amostras. O valor em parênteses refere-se ao número de variáveis latentes utilizada nos modelos de regressão.

Modelos		Polimorfo A			Polimorfo B			Polimorfo C		
		R ²	RMSE (% m/m)	Amost. Trans.	R ²	RMSE (% m/m)	Amost. Trans.	R ²	RMSE (% m/m)	Amost. Trans.
DS	Pred.	0,99	3,55 (4)	8	0,95	3,68 (5)	12	0,99	5,32 (4)	12
RS	Cal.	0,99	2,79 (3)	12 ^a	0,95	2,15 (3)	10 ^a	0,99	3,41 (2)	10 ^b
	Pred.	0,99	2,77		0,97	2,07		0,99	2,32	

^a MSC

^b 1ª Derivada (7pts)

As Figura 19-21 apresentam os espectros dos equipamentos primários e secundários antes da padronização e os espectros das amostras de calibração do instrumento P após padronização pelo método RS. Como pode ser observado, os espectros padronizados do FTNIR são bastante similares aos medidos no equipamento portátil para todos os polimorfos, demonstrando a eficiência da técnica para transferência dos modelos de calibração.

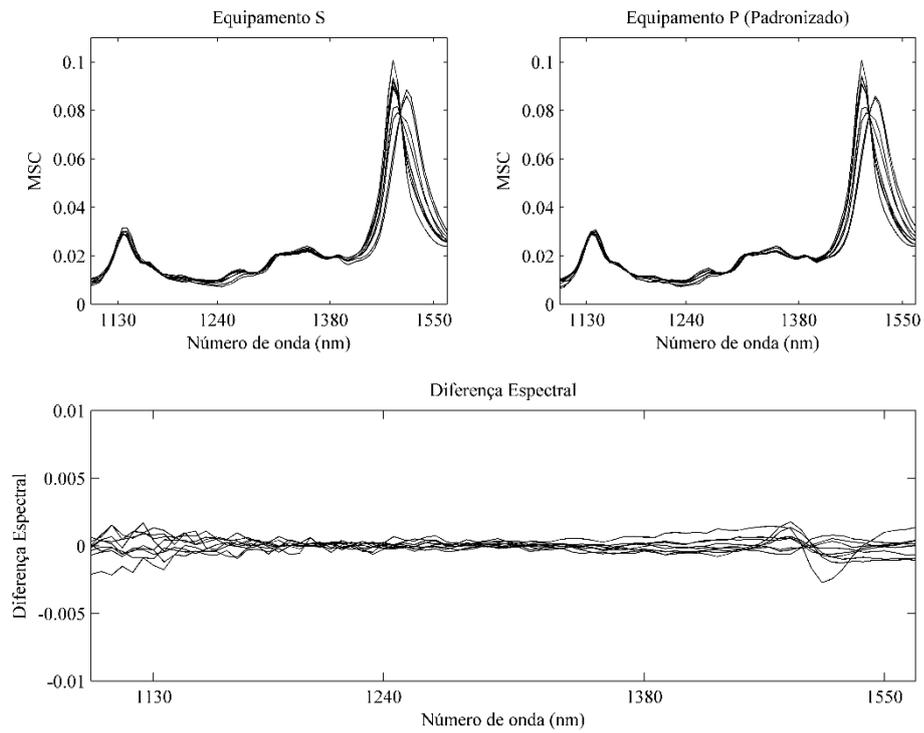


Figura 19. Espectros NIR das amostras de predição antes e após padronização pelo método RS e a diferença espectral entre eles para o polimorfo A.

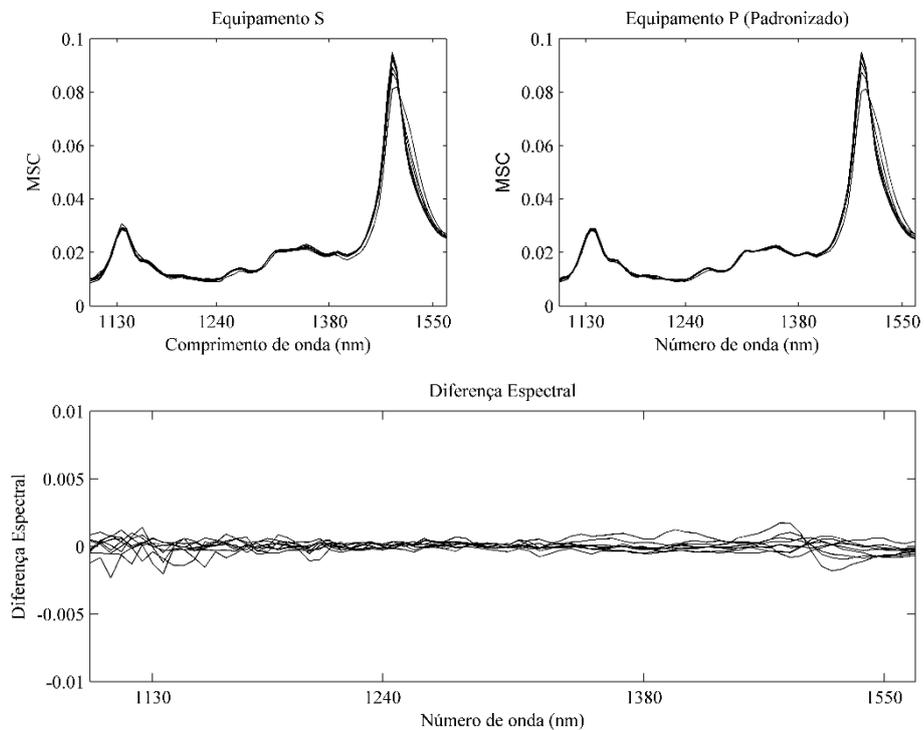


Figura 20. Espectros NIR das amostras de predição antes e após padronização pelo método RS e a diferença espectral entre eles para o polimorfo B.

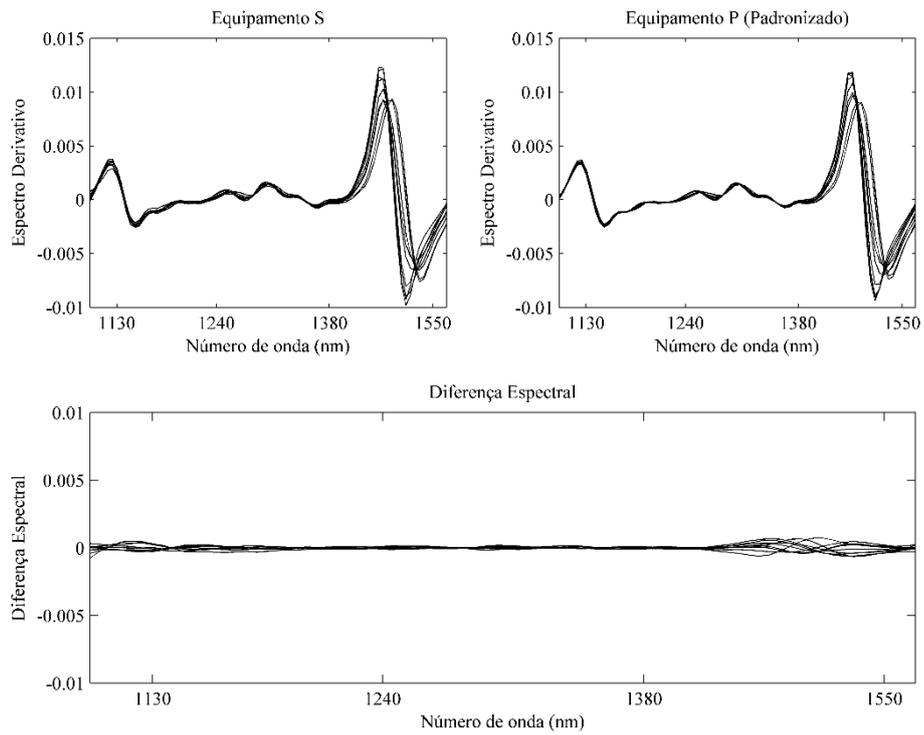


Figura 21. Espectros NIR das amostras de predição antes e após padronização pelo método RS e a diferença espectral entre eles para o polimorfo C.

A Figura 22 apresenta os gráficos dos valores de referência versus preditos pelos modelos PLS obtidos na quantificação dos polimorfos do MBZ após RS. Observa-se que todos os pontos estão distribuídos ao longo da bissetriz. Conforme teste t realizado, não há evidências de erros sistemáticos nos resultados alcançados.

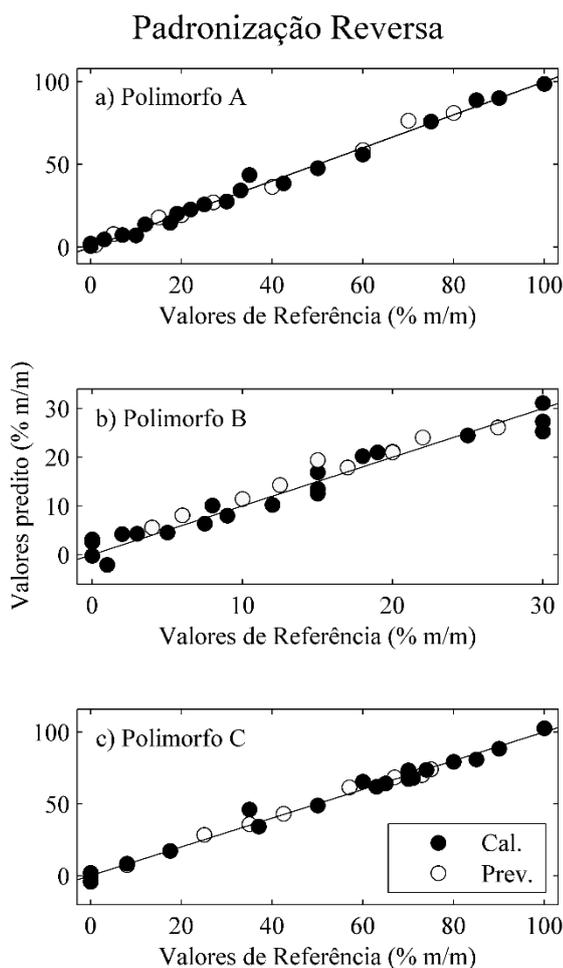


Figura 22. Gráfico dos valores de referência versus predito para os modelos de regressão desenvolvidos após padronização reversa para quantificação dos polimorfos (a) A, (b) B e (c) C do MBZ.

Os resultados alcançados confirmam a eficiência do uso de instrumentos portáteis como uma ferramenta simples, rápida e fácil para quantificação dos polimorfos do MBZ no IFA. Além disso, a transferência de calibração permite que modelos desenvolvidos no instrumento de bancada possam ser usados nos instrumentos portáteis. Por fim, vale a pena ressaltar que para uso em rotina, o método RS é recomendado por usar os modelos PLS diretamente e não requerer a padronização dos espectros das novas amostras.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE POLIMORFOS POR ESPECTROSCOPIA THZ

A Figura 23a mostra os espectros THz dos polimorfos do MBZ na faixa espectral de trabalho de 0,4 a 4,8 THz. A parte inicial do espectro foi retirada por apresentar alto ruído

instrumental e a região acima de 4,8 THz por apresentar alto ruído além de sinais de absorção do PTFE.

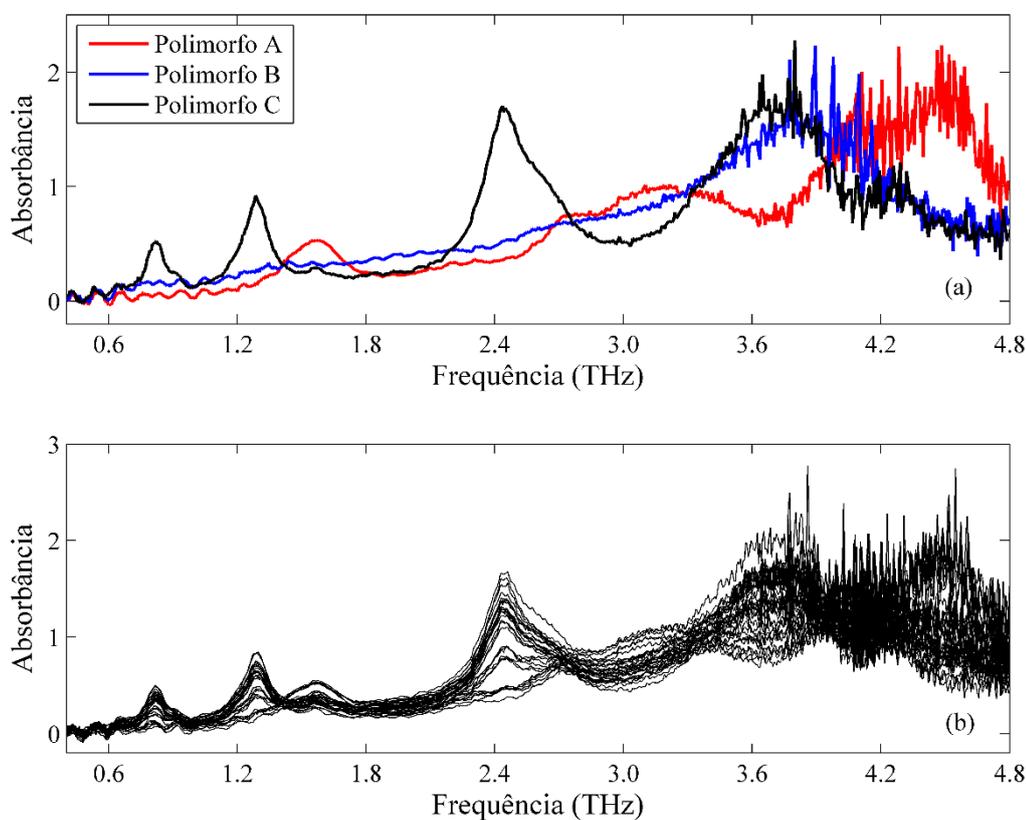


Figura 23. Espectro THz bruto dos polimorfos do MBZ (a) e suas misturas (b).

Como pode ser observado na Figura 23a, os perfis espectrais dos polimorfos são facilmente distinguíveis e apresentam bandas de absorção únicas para cada um deles. O polimorfo A apresenta um sinal de baixa intensidade em torno de 1,6 THz e uma banda larga em 4,4 THz. O polimorfo B exibe apenas uma banda larga centrada em torno de 3,8 THz e seu perfil espectral se assemelha a uma amostra com alto grau de amorficidade. No entanto, o difratograma do polimorfo B (Figura 24) revela sua cristalinidade e seus picos largos e de baixa intensidade no PXRD indicam a presença de pequenos cristalitos e/ou micro deformações na rede cristalina (KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010). Essas características morfológicas do polimorfo B, que também mostra partículas irregulares, indicam que suas moléculas estão provavelmente em diferentes ambientes químicos através do cristal e, conseqüentemente, a sua banda no espectro THz apresenta característica larga. Já o polimorfo C exibe quatro sinais de mais alta absorção em torno de 0,8, 1,3, 2,4 e 3,6 THz. Essas diferenças espectrais encontradas nos espectros THz estão associadas com as forças intermoleculares,

como a ligação de hidrogênio e vibrações dos cristais, como resultado das diferenças de empacotamento entre as estruturas cristalinas dos polimorfos do MBZ. Vale ressaltar que uma atribuição de picos mais apropriada requer uma profunda análise teórica.

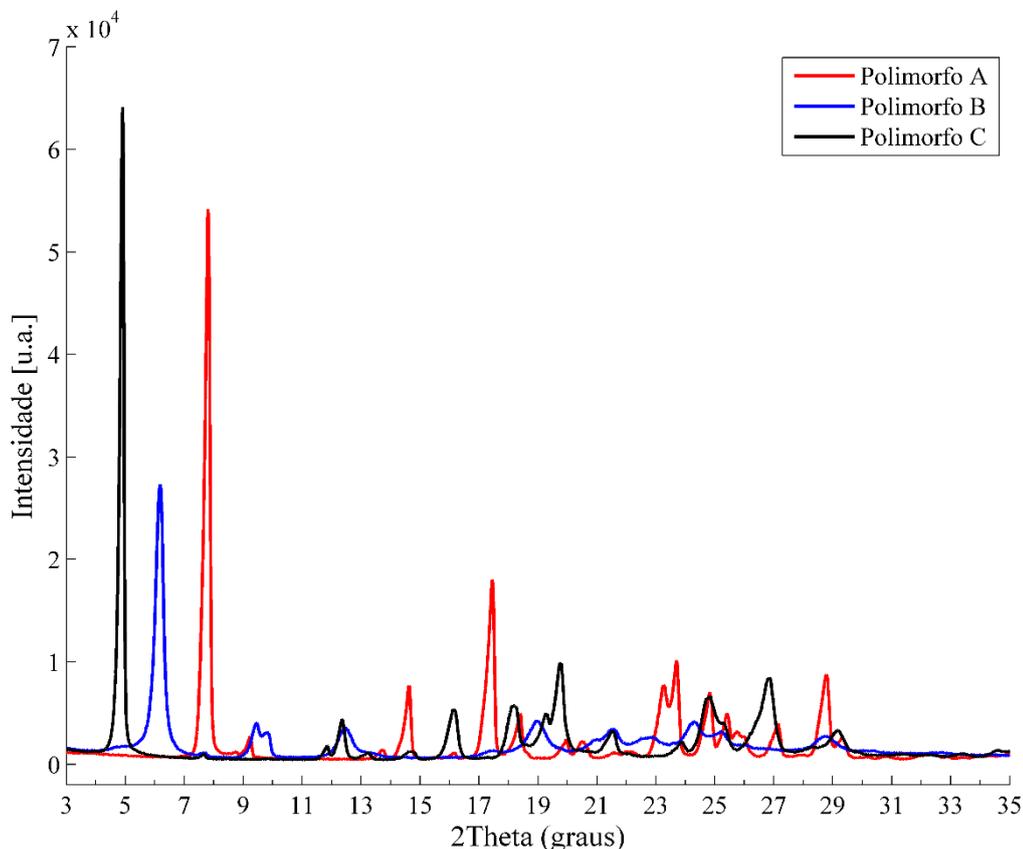


Figura 24. Difratograma dos polimorfos do MBZ.

Na Figura 23b observa-se os espectros THz das misturas usadas neste trabalho. Para baixas frequências ($< 3,0$ THz), o espectro THz apresenta oscilações periódicas típicas de efeito etalon, causada pelas múltiplas reflexões dentro da pastilha. Como este efeito físico não está relacionado com a composição das amostras, ele foi removido utilizando filtros de suavização. Acima de $3,0$ THz, ruídos de alta frequência são observados, sendo esses uma característica do espectrômetro utilizado. Comportamento semelhante também é observado no espectro do branco, confirmando essa característica instrumental nessa região. Esses ruídos de alta frequência também podem ser reduzidos utilizando filtros de suavização. Suavização com filtro SG foi aplicada nos espectros para minimizar ambos os efeitos físicos encontrados. Além disso, efeito de espalhamento da radiação foi verificado nos espectros THz e isso foi removido aplicando MSC, SNV e primeira derivada.

Os modelos de regressão PLS foram construídos utilizando os espectros THz pré-processados em diferentes faixas espectrais. Entre as diferentes estratégias de pré-processamento e faixas espectrais avaliadas, a primeira derivada (SG, polinômio de 2ª ordem e janela de 51 pontos) apresentou os resultados mais satisfatórios (Tabela 4) utilizando a faixa de 0,4 a 4,4 THz (Figura 25). Os modelos requereram apenas duas variáveis latentes para explicar mais de 98% da variância dos dados.

Tabela 4. Resultados do modelo PLS para quantificação dos polímeros MBZ utilizando os espectros THz derivados (0,4 – 4,4 THz). Os valores entre parênteses referem-se ao número de variáveis latentes utilizada nos modelos de regressão.

	Polímero A		Polímero B		Polímero C	
	R ²	RMSE (% m/m)	R ²	RMSE (% m/m)	R ²	RMSE (% m/m)
Calibração	0,99 (2)	2,6	0,94 (2)	2,5	0,99 (2)	1,7
Pred v isão	0,99	2,1	0,98	1,2	0,99	1,8

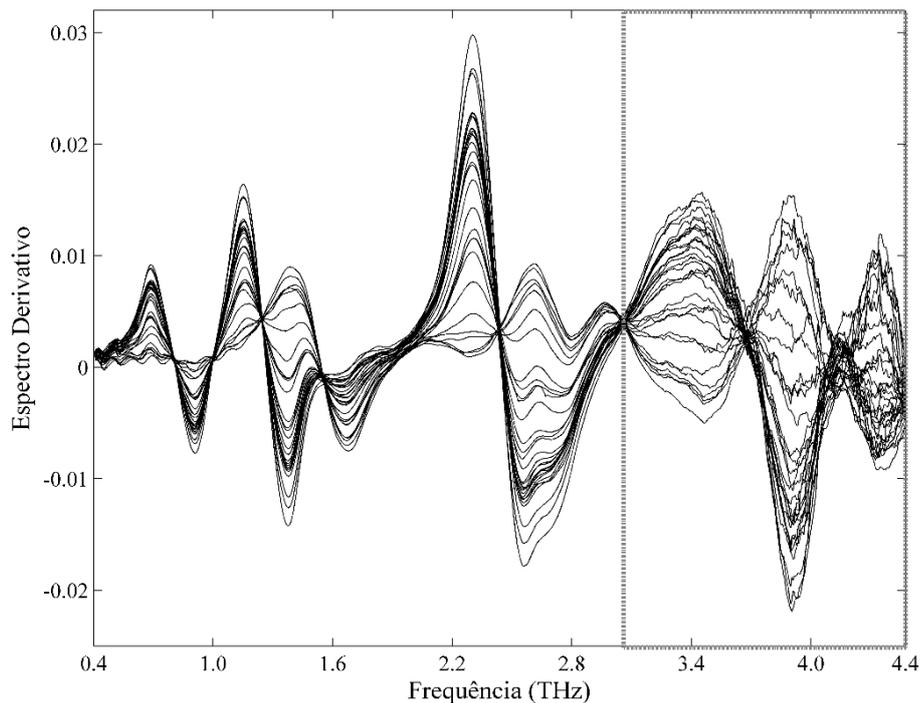


Figura 25. Espectro THz derivativo (SG, polinômio de 2ª ordem e janela de 51 pontos) das misturas do MBZ. Região espectral eliminada em destaque.

Como observado na Figura 25, mesmo utilizando janela de suavização mais larga para eliminar os ruídos de alta frequência, ela não funcionou completamente para frequências acima de 3,0 THz. Considerando esse resultado, foi avaliado o uso da região espectral entre 0,4 e 3,0

THz para quantificação dos polimorfos do MBZ. A Tabela 5 resume os melhores resultados obtidos utilizando-se essa região pré-processada com a primeira derivada (SG, polinômio de 2ª ordem e janela de 27 pontos). Uma quantidade de pontos menor foi utilizada na janela de suavização nessa região espectral por não apresentar ruídos de alta frequência.

Tabela 5. Resultados do modelo PLS para quantificação dos polimorfos MBZ utilizando os espectros THz derivados (0,4 – 3,0 THz). Os valores entre parênteses referem-se ao número de variáveis latentes utilizada nos modelos de regressão.

	Polimorfo A		Polimorfo B		Polimorfo C	
	R ²	RMSE (% m/m)	R ²	RMSE (% m/m)	R ²	RMSE (% m/m)
Calibração	0.99 (2)	2.7	0.96 (4)	2.0	0.99 (1)	2.6
Predição	0.99	1.5	0.98	1.2	0.99	2.4

Para o polimorfo A, o uso da região espectral reduzida melhorou o desempenho analítico dos modelos PLS, em que a capacidade preditiva do modelo apresentou 1,5% m/m de RMSEP. Esse modelo requereu duas VLs e coeficiente de determinação de 0,99. Por outro lado, o resultado do polimorfo C mostrou RMSEP de 2,4% m/m, que foi pior que o resultado encontrado na região espectral de 0,4 a 4,4 THz (RMPSE de 1,8% m/m). Além disso, valor de RMSEP similar foi observado para o polimorfo B, embora o modelo alcançado seja mais complexo por requerer 4 VLs. Considerando o princípio da parcimônia, a faixa espectral mais ampla foi escolhida por requerer menos VLs.

Para os melhores modelos de regressão, a faixa de LOD calculada foi 2,7 – 4,3% m/m, 2,9 – 4,0% m/m e 2,4 – 3,1% m/m, para os polimorfos A, B e C, respectivamente. A Figura 26 apresenta os gráficos dos valores de referência versus preditos para os melhores modelos PLS obtidos na quantificação dos polimorfos do MBZ. As amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno da bissetriz e não há evidência de erros sistemáticos, conforme teste *t* realizado (95% de confiança). A alta dispersão observada para o gráfico do polimorfo B já era esperada devido a banda larga encontrada no espectro THz para essa forma cristalina, que apresenta sobreposição de banda com o sinal do polimorfo C. Portanto, sua quantificação é mais difícil nas misturas.

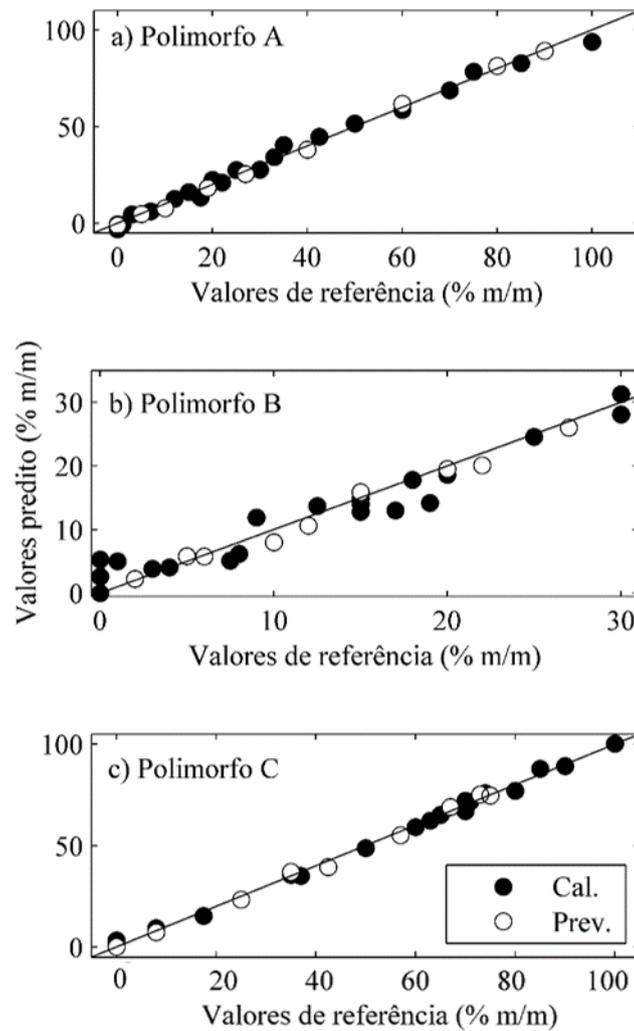


Figura 26. Gráfico dos valores de referência versus predito para os melhores modelos de regressão desenvolvidos para quantificação dos polimorfos (a) A, (b) B e (c) C do MBZ.

A Figura 27 mostra os coeficientes de regressão dos melhores modelos para os polimorfos B e C, que tem sobreposição de banda ao longo da faixa espectral (0,4 – 4,4 THz). Esses coeficientes de regressão apresentam sinais opostos e tem uma similaridade de 65%. A banda em 2,4 THz tem a maior contribuição para ambos modelos PLS, e é utilizada para caracterização do polimorfo C. Esse comportamento qualitativo sugere que o modelo para o polimorfo B utiliza informações relacionadas aos outros polimorfos para sua quantificação, uma vez que não há banda que diferencie essa forma polimórfica das demais.

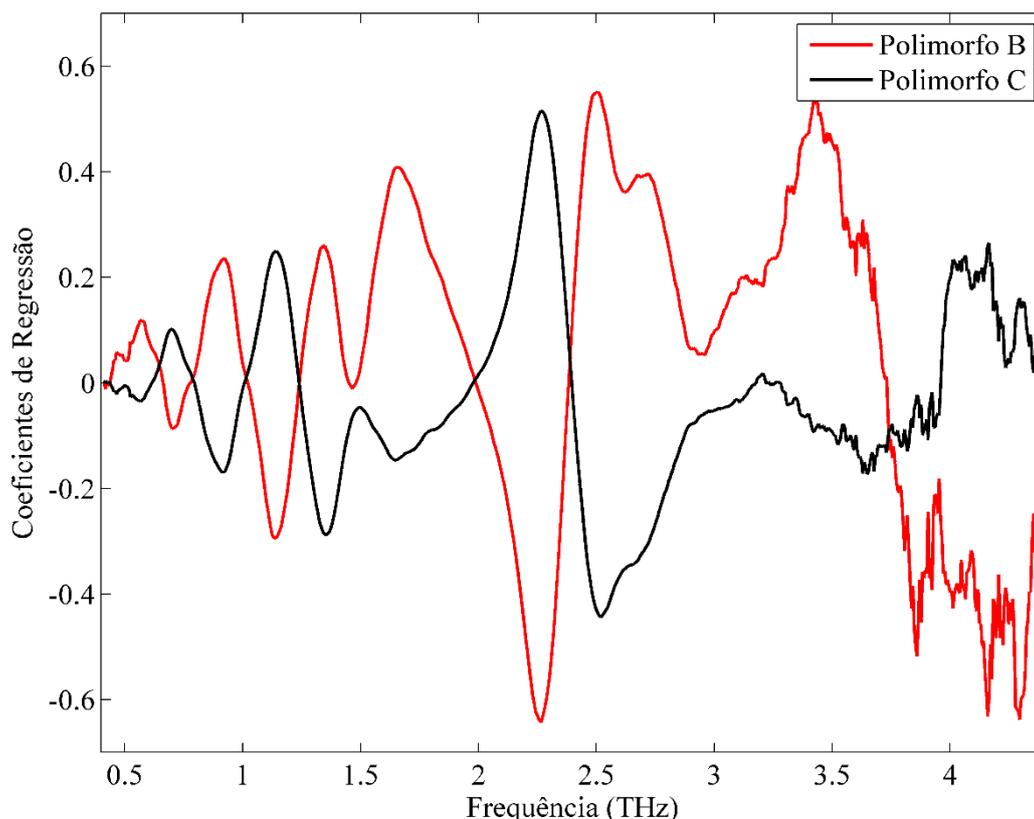


Figura 27. Coeficientes de regressão para os melhores modelos PLS calculados para quantificação do polímero B e C

Para identificação de faixas espectrais e/ou variáveis mais relevantes nos espectros THz para predição dos polímeros do MBZ, os algoritmos *i*PLS e JK foram aplicados. No entanto, não houve melhora nos modelos de calibração utilizando as faixas espectrais e variáveis selecionadas por esses algoritmos.

Os resultados obtidos quando comparados com os métodos analíticos previamente publicados utilizando espectroscopia NIR e MIR (equipamento de bancada) (KACHRIMANIS; RONGOIANNI; MALAMATARIS, 2010; SILVA et al., 2015) mostraram que a espectroscopia THz, em geral, tem um melhor desempenho analítico. As capacidades preditivas dos modelos empregando espectroscopia MIR foram piores que aquelas encontradas com a espectroscopia THz. No caso da espectroscopia NIR, para os polímeros A e B, os resultados obtidos por este trabalho mostraram menores erros de predição. Para o polímero C, os erros de predição são comparáveis. Além disso, o máximo da faixa do LOD calculado para o método THz é menor que aqueles descritos por outras espectroscopias vibracionais. Esses resultados reforçam a hipótese de que a espectroscopia THz-TDS é capaz de acessar diretamente

informações associadas aos modos vibracionais da rede cristalina, enquanto que o infravermelho obtém informações cristalinas indiretamente, via perturbações causadas em vibrações intramoleculares de energia mais alta.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS POLIMORFOS EM COMPRIMIDOS POR HSI-NIR

Na Figura 28 observa-se os espectros NIR dos componentes puros, excipientes e comprimidos utilizados neste trabalho. Apesar da câmera utilizada operar entre 900 e 2500 nm, os espectros foram reduzido para a faixa de trabalho de 1060 a 2350 nm para eliminar o alto ruído instrumental apresentado nas bordas dos espectros.

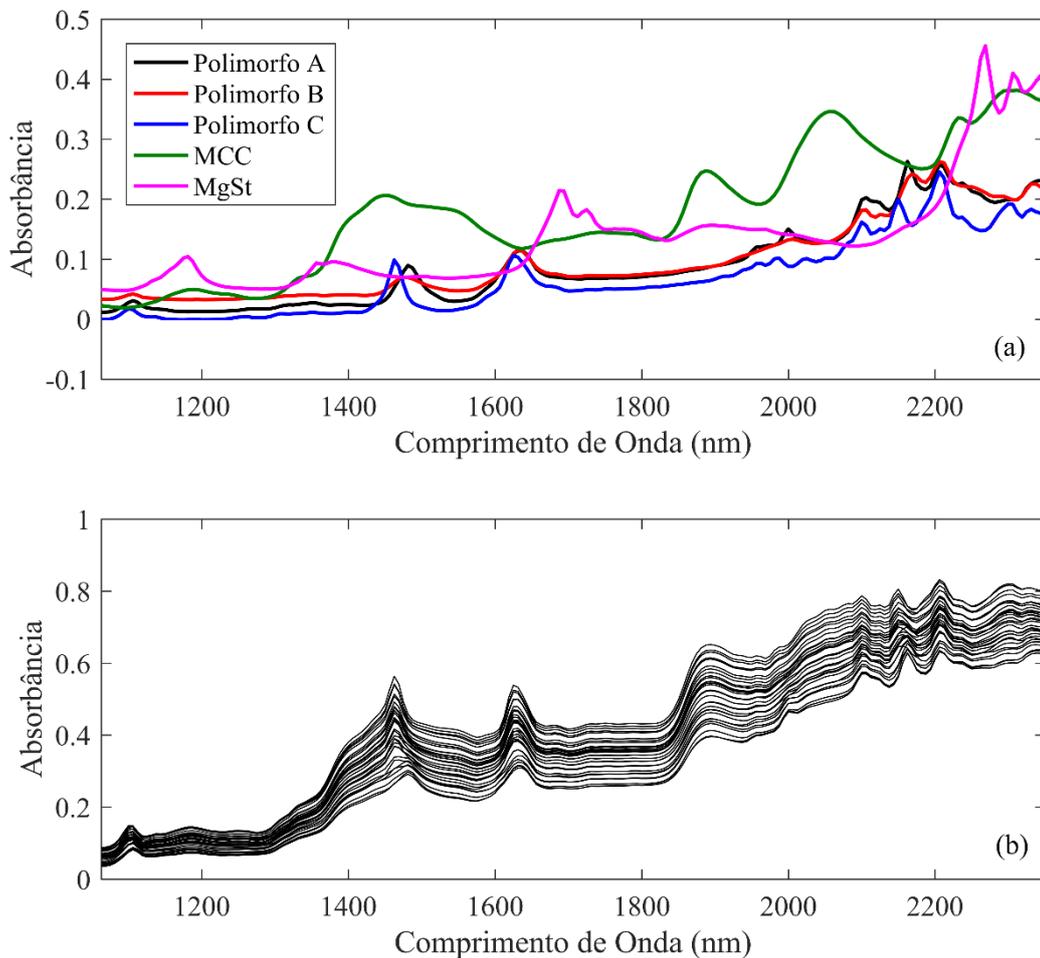


Figura 28. (a) Espectros NIR dos componentes puros e excipientes dos comprimidos. (b) Espectros médios NIR de cada comprimido.

Na Figura 28a observa-se o perfil espectral NIR médio de cada componente dos comprimidos e suas bandas de absorção características. É possível observar as principais bandas utilizadas na caracterização dos polimorfos do MBZ como o primeiro sobretono do estiramento N-H e o primeiro e segundo sobretons do estiramento C-H. Diferentemente dos espectros NIR obtidos com os equipamentos portáteis, a região de combinação do estiramento C-H e N-H, bandas acima de 2000 nm, estão presentes na região de trabalho utilizada. Vale ressaltar a importância dessa região espectral para distinção dos polimorfos A e B devido a sobreposição dos seus perfis espectrais. Na região de combinação as diferenças entre ambos perfis espectrais são mais evidentes.

A MCC apresenta bandas de absorção em torno de 1500 nm, 1900 nm e 2100 nm relacionadas com o primeiro e segundo sobretono do estiramento O-H e sua deformação, respectivamente. O espectro da MCC apresenta bandas bastante largas e muita sobreposição nas principais bandas utilizadas para diferenciar os polimorfos. A dose da MCC nos comprimidos é fixa (50% m/m) e sua informação não varia nos espectros médios dos comprimidos. No entanto, a variabilidade espectral da MCC é observada nos pixels devido sua concentração variar na superfície dos comprimidos. Por fim, o perfil espectral do MgSt apresenta bandas de absorção próximo de 1150 nm e 1700 nm relacionadas ao primeiro e segundo sobretons do estiramento C-H, respectivamente. Além disso, bandas de combinação do MgSt também são observados em torno de 2280 nm.

A Figura 28b apresenta os espectros médios de todos os comprimidos utilizados neste trabalho. Como pode ser observado, as principais informações encontradas estão relacionadas aos polimorfos do MBZ e a MCC. Não é possível observar claramente informação relativa ao MgSt devido a sua baixa concentração nos comprimidos (1% m/m). Ainda, observa-se nos espectros médios efeito de espalhamento da radiação bastante típico nessa forma de aquisição de espectros. Como esse efeito físico não está relacionado com a composição química dos comprimidos, ele foi removido através das técnicas de pré-processamento.

Diferentes técnicas de pré-processamento foram avaliadas nos espectros das imagens para quantificar os polimorfos do MBZ utilizando MCR-ALS e regressão PLS. Entre as diferentes estratégias avaliadas, a segunda derivada utilizando filtro de suavização Savitzky-Golay com janela de 15 pontos e polinômio de segunda ordem apresentou os melhores resultados baseado na capacidade preditiva dos modelos PLS e MCR-ALS.

Os modelos MCR-ALS foram construídos utilizando duas diferentes estratégias, (1) com todos os espectros NIR depois da redução da dimensão dos dados (data binning) e com (2) seus respectivos espectros médios. Essa segunda estratégia foi aplicada afim de utilizar as

mesmas condições aplicadas na regressão PLS, espectros médios. No entanto, a primeira estratégia apresentou melhores resultados na recuperação dos espectros e, conseqüentemente, melhores determinações dos polimorfos devido a maior variabilidade espectral incluída neste modelo. Além disso, a primeira estratégia permite a utilização da restrição de igualdade para melhor eficiência na resolução do MCR-ALS, uma vez que espectros de referência de todos os componentes exceto MCC foram utilizados para aumentar a matriz. A Figura 29 apresenta os espectros NIR pré-processados e os espectros recuperados pelo melhor modelo MCR-ALS com seus respectivos coeficientes de correlação. Os componentes majoritários dos comprimidos apresentaram correlação acima 0,94 e o MgSt apresentou correlação de 0,76. Esses resultados demonstram excelente otimização dos componentes dos comprimidos através do MCR-ALS, levando em consideração a complexidade dos dados e baixa concentração do MgSt nas amostras.

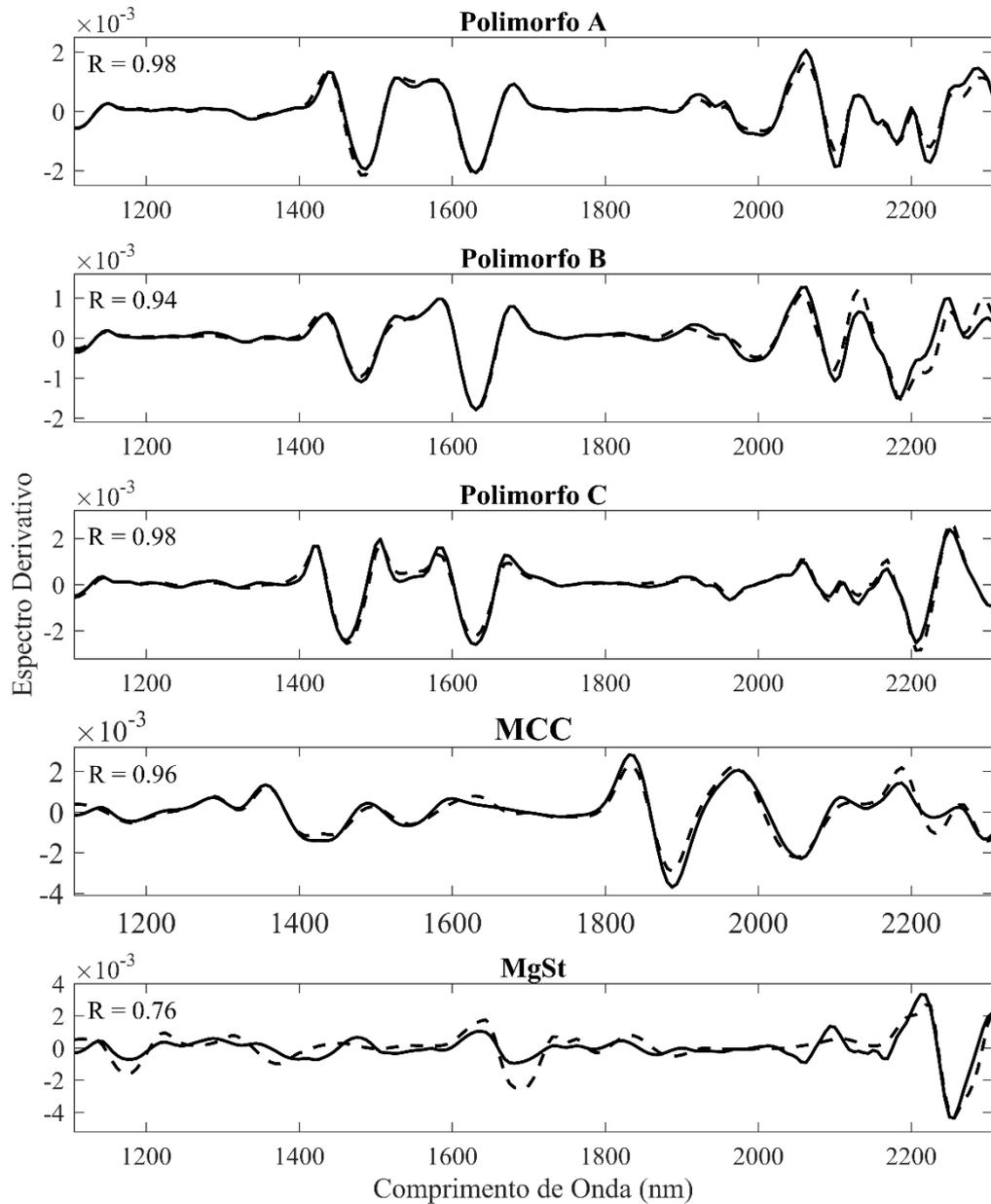


Figura 29. Espectros NIR pré-processados (linha) e os espectros recuperados pelo MCR-ALS (linha tracejada) com seus respectivos coeficientes de correlação.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a quantificação global dos polimorfos do MBZ nos comprimidos utilizando MCR-ALS e PLS.

Tabela 6. Resultado dos modelos PLS e MCR-ALS na quantificação dos polimorfos do MBZ nos comprimidos utilizando HSI-NIR. O número em parênteses indica o número de variáveis latentes utilizada pelos modelos PLS.

	Polimorfo A					Polimorfo B					Polimorfo C				
	RMSEC (% m/m)	R ²	RMSEP (% m/m)	R ²	LOD (% m/m)	RMSEC (% m/m)	R ²	RMSEP (% m/m)	R ²	LOD (% m/m)	RMSEC (% m/m)	R ²	RMSEP (% m/m)	R ²	LOD (% m/m)
PLS	1,65 (4)	0,99	1,71	0,98	2,06	1,09 (4)	0,95	1,00	0,96	2,15	1,28 (3)	0,99	1,12	0,99	2,29
MCR-ALS	2,87	0,97	4,56	0,95	6,65	1,59	0,91	2,87	0,88	5,10	1,64	0,99	2,22	0,96	4,62

Observando a Tabela 6, percebe-se que para todos os polimorfos os modelos PLS apresentaram melhores resultados na determinação da concentração global dos comprimidos. Os modelos PLS apresentaram baixos erros de calibração e de predição quando comparados aos resultados do MCR-ALS. Provavelmente, a melhor performance analítica na determinação global utilizando PLS está relacionada a utilização dos espectros médios na construção dos modelos, ou seja, apenas informações gerais sobre os comprimidos foram incluídas nos modelos. Por outro lado, os modelos MCR-ALS foram construídos levando em consideração a informação local dos componentes e a concentração global foi obtida através de uma regressão realizada após a construção dos modelos. Isso significa que o MCR-ALS pode ser mais preciso em relação a determinação local dos componentes do comprimido em toda imagem. Além disso, para a determinação local (mapas de distribuição), qualquer variabilidade não identificada no espectro médio pode afetar os mapas de distribuição dos modelos PLS. Portanto, a análise dos parâmetros de regressão (Tabela 6) não são suficientes para avaliar a performance analítica dos modelos desenvolvidos nas diferentes técnicas quimiométricas para determinações locais. Dessa forma, uma avaliação dos mapas de distribuição se faz necessária uma vez que os modelos aplicados indicam que pode haver diferença quanto a determinação local.

Considerando o LOD dos modelos desenvolvidos (Tabela 6), aqueles obtidos por meio da regressão PLS apresentaram valores menores que aqueles apresentados pelo MCR-ALS. Esses resultados indicam a melhor sensibilidade dos modelos PLS para quantificação global dos polimorfos em comprimidos. Além disso, os resultados PLS obtidos utilizando HSI-NIR são comparáveis com os resultados obtidos nas etapas anteriores deste trabalho utilizando a espectroscopia NIR. Nesta comparação, deve-se considerar que nos comprimidos a concentração dos polimorfos é a metade da concentração do estudo com a matéria prima devido a presença dos excipientes que corresponde 50% do comprimido. Esse resultado demonstra a adequabilidade e viabilidade do uso de equipamentos de imagem para quantificação global dos polimorfos na presença de excipientes nos comprimidos.

A Figura 30 apresenta os gráficos dos valores de referência versus predito para os modelos resumidos na Tabela 6. Todas as amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno da bissetriz e não há evidência de erro sistemático, conforme teste *t* realizado (95% de confiança). Entre as técnicas quimiométricas utilizadas, o MCR-ALS apresentou maior dispersão e isso era esperado pela forma como os modelos foram desenvolvidos. Entre os polimorfos, o polimorfo B apresentou maior dispersão das amostras e isso era esperado devido a sua sobreposição espectral com o polimorfo A, tornando sua quantificação mais difícil.

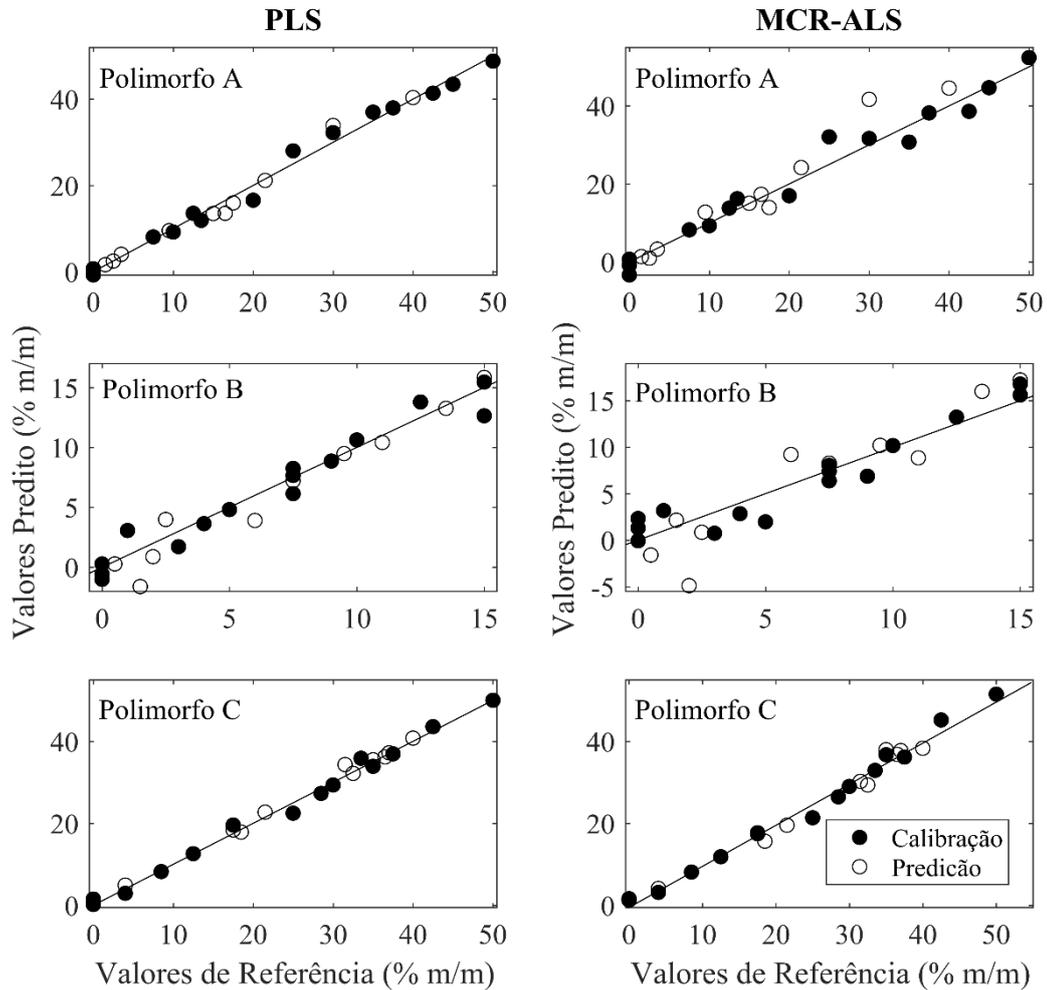


Figura 30. Gráfico dos valores de referência versus predito obtidos pelos modelos PLS e MCR-ALS para quantificação dos polimorfos do MBZ.

Para garantir que os modelos PLS estavam utilizando a informação associada com o respectivo polimorfo, o sinal analítico líquido (NAS) dos espectros recuperados pelo MCR-ALS foram calculados e comparados aos coeficientes de regressão dos modelos PLS. O coeficiente de correlação entre o NAS e o coeficiente de regressão PLS foi de 78% para os polimorfos A e B, e 59% para o polimorfo C. As maiores diferenças entre o NAS e os coeficientes de regressão para cada polimorfo estão relacionados aos menores picos utilizados durante a quantificação dos modelos PLS. Esses picos menos informativos nos coeficientes de regressão são referentes aos excipientes dos comprimidos.

A Figura 31 apresenta os coeficientes de regressão dos modelos PLS desenvolvidos para a quantificação dos polimorfos do MBZ. Segundo os coeficientes de regressão, a principal

região utilizada para quantificação dos polímeros A e B é a região das bandas de combinação. Além disso, o polímero C apresenta altos valores para os coeficientes de regressão relacionados ao primeiro sobreton do estiramento N-H. Essas regiões espectrais observadas mostram uma concordância com as regiões espectrais utilizadas na caracterização de cada polímero do MBZ. É importante notar que devido a sobreposição espectral dos polímeros A e B na região do primeiro sobreton do estiramento N-H, os modelos PLS utilizam a região de combinação na quantificação por apresentar pequenas diferenças entre os perfis espectrais desses polímeros (Figura 28).

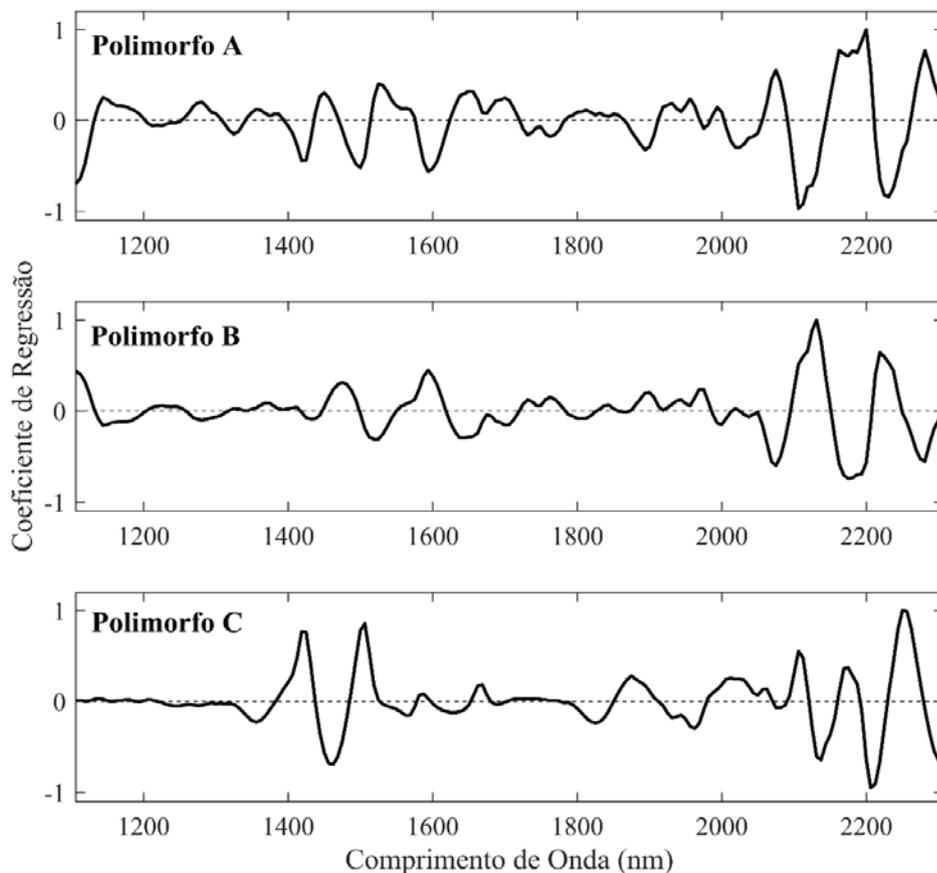


Figura 31. Coeficientes de regressão dos modelos PLS para os polímeros do MBZ.

Para avaliar a distribuição local dos polímeros nos modelos PLS e MCR-ALS, diversas imagens de diferentes comprimidos foram recuperadas utilizando os modelos desenvolvidos. Figura 32-34 mostram os mapas de distribuição para os polímeros e seus histogramas para os comprimidos M04, M10 e M16 (Tabela 1).

Antes de analisar as imagens, é necessário destacar as diferenças dos pós entre os polímeros, uma vez que a comparação deve ser unicamente qualitativa. Todos os polímeros

do MBZ são aderentes e formam aglomerados facilmente, sendo o polimorfo B aquele com o menor grau de aglomeração (SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003). Uma vez que os comprimidos utilizados neste trabalho são apenas misturas de pós, é esperado que as amostras carreguem as características naturais dos pós. Portanto, os pós com maior grau de aglomeração (polimorfos A e C) devem se apresentar na forma de cluster nos comprimidos. Para os outros componentes dos comprimidos, uma mistura mais homogênea é esperada.

Os mapas de distribuição e os histogramas apresentados nas Figura 32-34 revelam algumas diferenças entre os modelos quimiométricos utilizados. Para os polimorfos A e B, o modelo MCR-ALS apresentou histogramas mais largos quando comparados aos apresentados pelos modelos PLS, embora esse tenha apresentado excelente precisão na quantificação global. Com os modelos MCR-ALS é possível observar os aglomerados nos mapas de distribuição para esses polimorfos. Esses aglomerados indicam uma alta concentração desse pó nessa região, demonstrando a heterogeneidade do comprimido. Além disso, a alta concentração local desses aglomerados indicam que histogramas mais largos são mais coerentes. Já os mapas de distribuição observados pelo PLS para esses mesmos polimorfos indicam que a superfície do comprimido é homogênea. Os coeficientes de regressão apresentados anteriormente (Figura 31) mostrou que a região de combinação é o mais importante para quantificação dos polimorfos A e B, e essa região espectral (2000 – 2200 nm) é bastante sobreposta com as bandas largas da MCC (Figura 28). Como os modelos PLS utilizam o espectro médio, a informação da MCC não varia e qualquer variabilidade desse excipiente no comprimido não é levada em consideração. Já os mapas de distribuição apresentados pelo MCR-ALS claramente mostram essa variabilidade, fazendo a predição pelo PLS mais difícil e menos realística. Além disso, a determinação local do polimorfo B pelos modelos PLS é ainda mais difícil devido às baixas concentrações desse polimorfo nos comprimidos ($\leq 30\%$ m/m) e sobreposição de suas bandas de absorção com aquelas da MCC.

Para o polimorfo C, os mapas de distribuição apresentaram resultados opostos àqueles obtidos para os outros polimorfos. Os modelos PLS mostraram histogramas mais largos e visualização mais clara dos aglomerados. Para esse polimorfo, as duas principais regiões utilizadas para sua quantificação, segundo os coeficientes de regressão PLS, são altamente sobrepostas com o espectro do MCC. Dessa forma, quando a concentração do polimorfo C decresce no comprimido, observa-se um pronunciamento da informação espectral do MCC nessa mesma região. Portanto, é evidente que o modelo utilizado para entender a variabilidade local dos componentes dos comprimidos pode dificultar a interpretação dos mapas de distribuição, como observado para a mistura binária M1 (Figura 35).

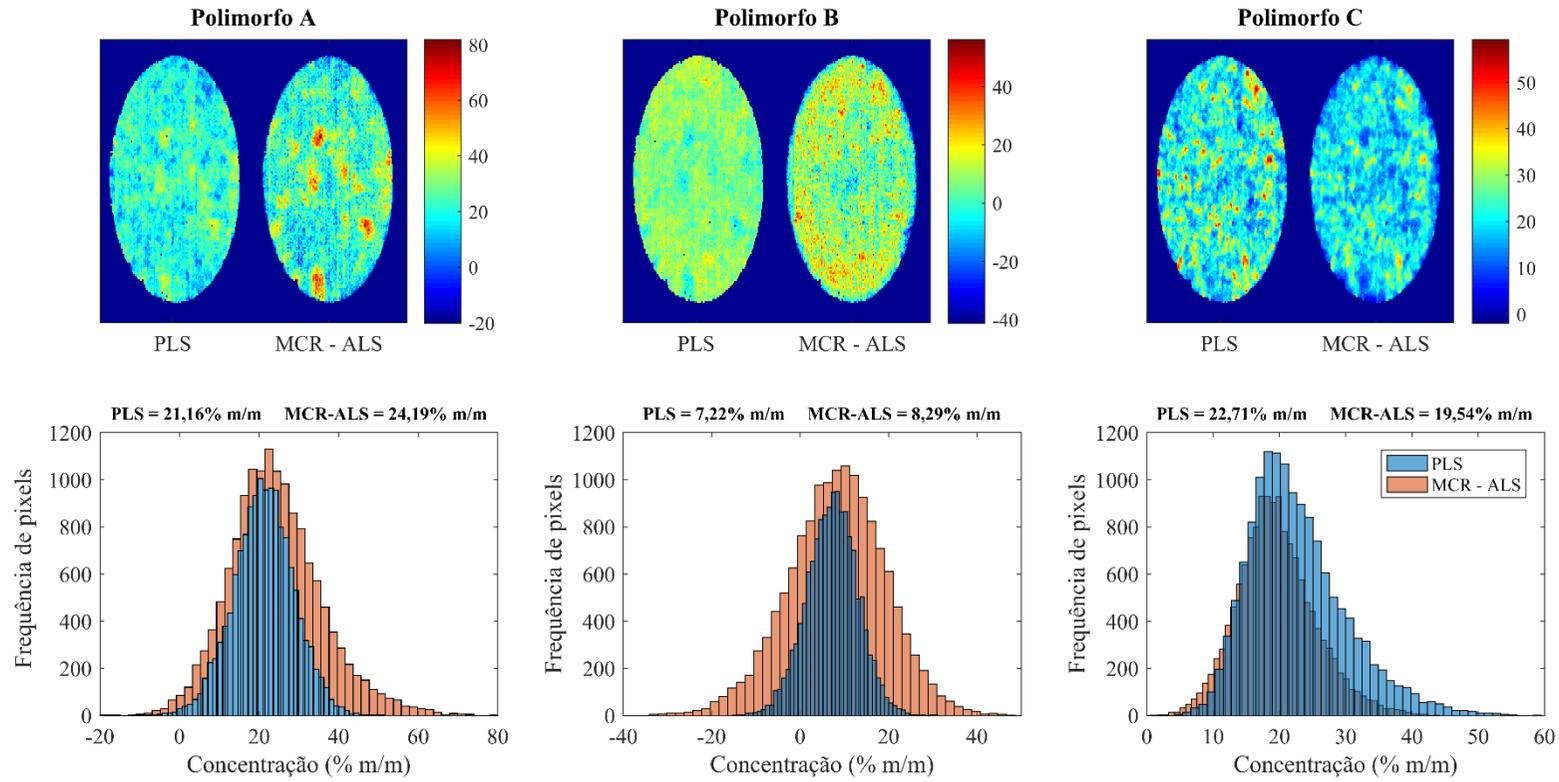


Figura 32. Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M4.

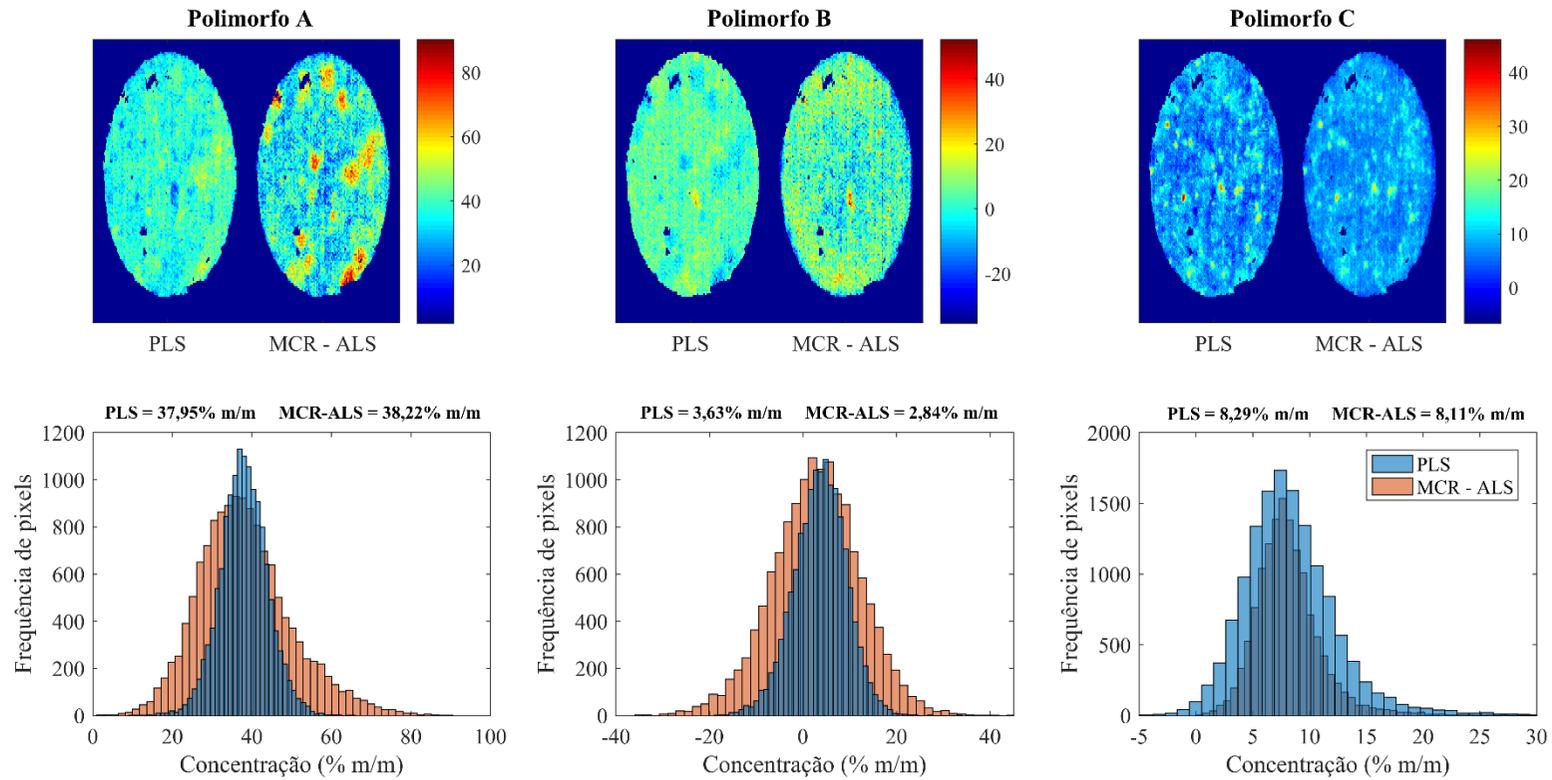


Figura 33. Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M10.

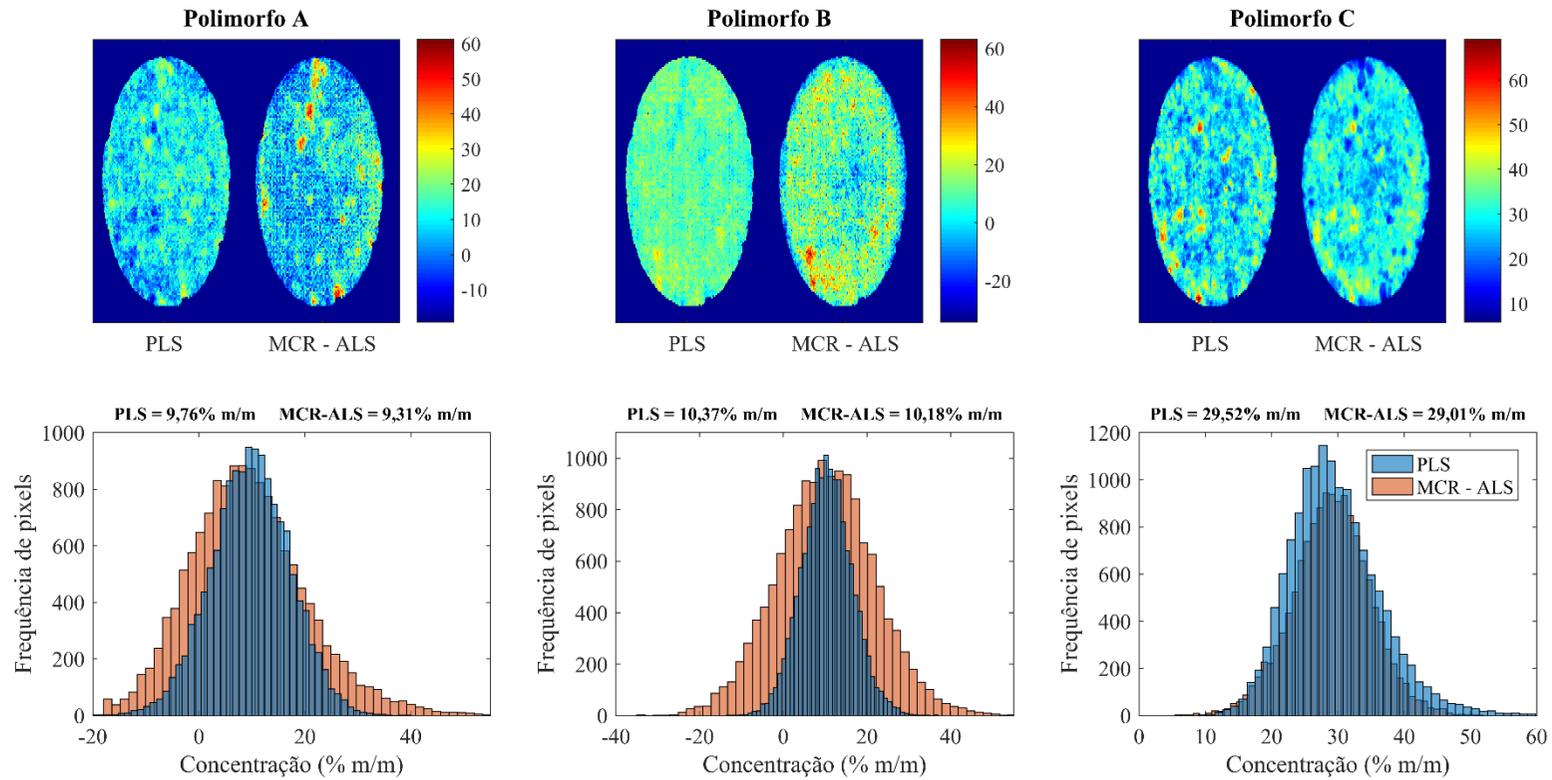


Figura 34. Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M16.

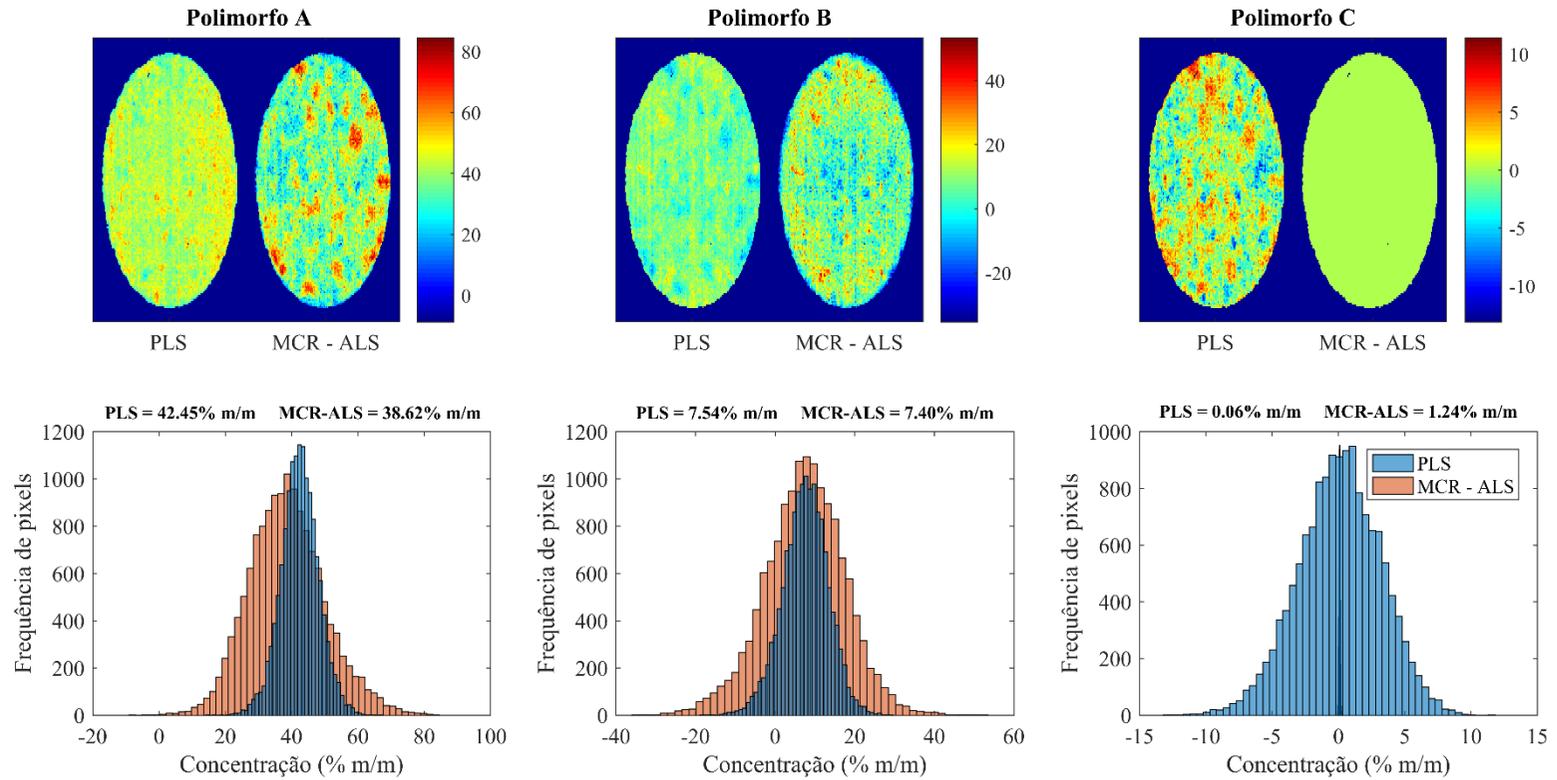


Figura 35. Mapas de distribuição e seus histogramas de frequência de pixels para os polimorfos do MBZ para a amostra M01.

A Figura 35 mostra um comprimido sem o polimorfo C. Como pode ser observado, o mapa de distribuição para esse polimorfo por PLS demonstrou alguns aglomerados na superfície da imagem, embora sua concentração global seja precisa (0,06% m/m). Observa-se que o mapa de distribuição para o polimorfo C é similar ao observado para o polimorfo A. No entanto, o coeficiente de regressão PLS não está observando informação relativa ao polimorfo A. O modelo de regressão PLS observa a falta de MCC na amostra, que para esse comprimido é similar ao mapa de distribuição do polimorfo A devido a sua alta concentração nesse comprimido. O coeficiente de regressão PLS para o polimorfo C evidencia uma banda em torno de 1900 nm (Figura 28) relacionada com o MCC e essa região apresenta contribuição negativa no modelo (Figura 36).

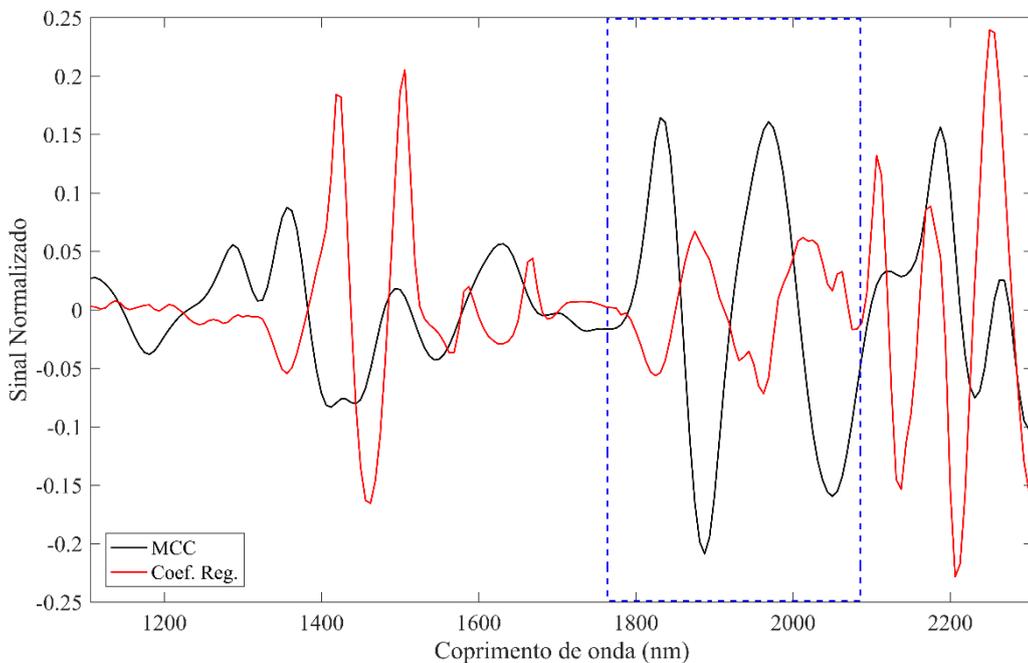


Figura 36. Espectro pré-processado do MCC e o coeficiente de regressão PLS para o polimorfo C.

Esses resultados demonstram que os modelos MCR-ALS são mais eficientes para quantificação local dos polimorfos do MBZ em comprimidos. Como o MCR-ALS decompõe os dados, os seus mapas de distribuição apresentam resultados mais realísticos.

Resultados semelhantes e os mesmos comportamentos foram observados para todos os polimorfos nos demais comprimidos. Embora o foco desta parte do trabalho esteja relacionando à quantificação dos polimorfos, a distribuição dos excipientes sobre os comprimidos somente é possível com os modelos MCR-ALS. Os mapas de distribuição para o excipiente majoritário,

MCC, foram analisados e todos eles mostraram concordância com os outros compostos, ou seja, áreas com grande concentração de outros componentes mostraram baixa concentração nos mapas de distribuição do MCC. Devido à baixa concentração do MgSt, seus mapas de distribuição demonstram não haver esse componente nos comprimidos. Vale ressaltar que quando testado MCR-ALS sem esse componente, os resultados obtidos não foram satisfatórios e os espectros de todos os componentes não foram bem recuperados.

Como a técnica de calibração multivariada direta apresentou resultados mais satisfatórios para a quantificação local, avaliou-se a quantificação dos polimorfos do MBZ por CLS utilizando tanto os espectros puros quanto os NAS obtidos a partir dos espectros puros e recuperados pelo MCR-ALS.

A Figura 37 apresenta os espectros puros para cada componente dos comprimidos e seus respectivos NAS obtidos com os espectros puros e recuperados pelo MCR-ALS. Todos os NAS apresentaram correlação com seus próprios espectros de partida e zero correlação com os demais, demonstrando eficiência na determinação do NAS. Para todos os componentes, os diferentes NAS obtidos são bastante semelhantes apresentando correlação em torno de 70%. A semelhança entre os diferentes NAS obtidos para um mesmo componente já era previsto devido à alta correlação entre os espectros puros e recuperados pelos MCR-ALS, como pode ser observado na Figura 29.

Para os polimorfos A e B, os NAS obtidos apresentaram correlação de 47% e 43%, respectivamente, com os seus respectivos espectros de partida. Observando a Figura 37, percebe-se que uma mesma banda apresenta correlação positiva para um polimorfo e negativa para o outro com seus respectivos espectros puros, de forma que os NAS para ambos polimorfos são opostos e apresentam $R = -0,81$. Comportamento semelhante foi observado nos modelos PLS em todas as partes deste trabalho devido à alta correlação e sobreposição espectral para esses polimorfos na região NIR. No caso do THz, em que essa sobreposição e correlação espectral acontece entre os polimorfos B e C, os coeficientes de regressão PLS apresentam para esses polimorfos perfis opostos.

Os NAS para os demais componentes, polimorfo C, MCC e StMg, são bem correlacionados com seus respectivos espectros de partida, principalmente para as bandas mais importantes às suas quantificações, como observado na Figura 37.

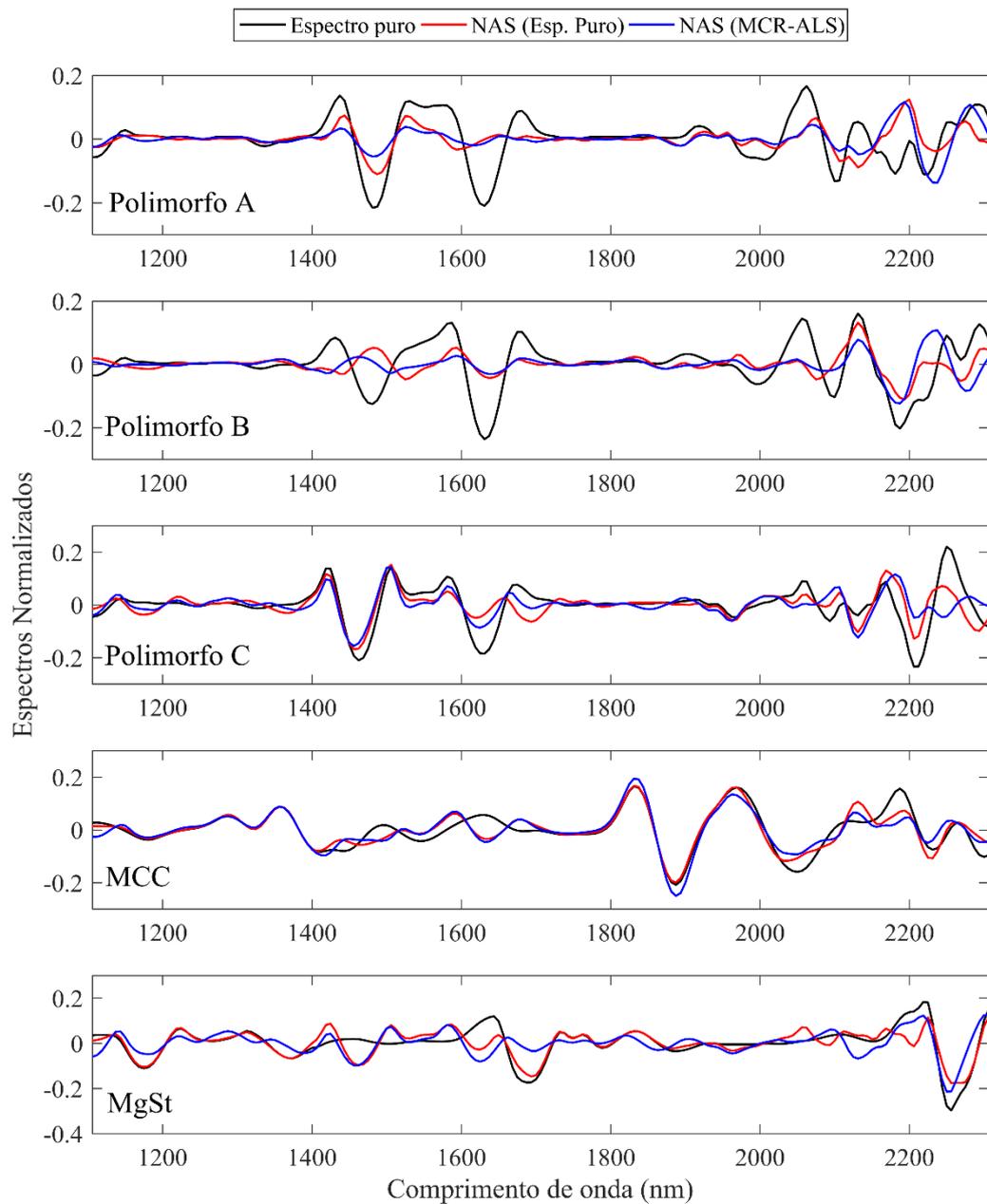


Figura 37. Espectros derivativos puros NIR e NAS obtidos por meio dos espectros puros e recuperados pelo modelo MCR-ALS para todos os componentes dos comprimidos.

A Tabela 7 apresenta os resultados para quantificação global dos polimorfos nos comprimidos por CLS utilizando os espectros puros e os NAS obtidos por meio dos espectros puros e espectros recuperados pelo MCR-ALS.

Tabela 7. Resultado dos modelos CLS para quantificação dos polimorfos do MBZ nos comprimidos utilizando os espectros puros e NAS obtidos a partir dos espectros puros e recuperado pelo modelo MCR-ALS.

	Polimorfo A					Polimorfo B					Polimorfo C				
	RMSEC (% m/m)	R ²	RMSEP (% m/m)	R ²	LOD (% m/m)	RMSEC (% m/m)	R ²	RMSEP (% m/m)	R ²	LOD (% m/m)	RMSEC (% m/m)	R ²	RMSEP (% m/m)	R ²	LOD (% m/m)
Puro	2,28	0,98	4,16	0,98	6,89	6,92	0,35	5,82	0,85	32,69	1,27	0,99	1,68	0,99	3,65
NAS (Puro)	2,28	0,98	4,18	0,98	6,97	7,99	0,35	7,69	0,85	37,16	1,23	0,99	1,68	0,99	3,52
NAS (MCR-ALS)	2,84	0,97	4,48	0,95	6,70	1,76	0,89	2,75	0,70	5,13	1,66	0,99	2,15	0,97	4,65

Analisando a Tabela 7, percebe-se que, de forma geral, os modelos CLS construídos com NAS obtidos por meio dos espectros recuperados pelos MCR-ALS apresentam os melhores resultados. Para os polímeros A e C, não há diferença significativa entre os modelos desenvolvidos para quantificação global dos polímeros do MBZ. As capacidades preditivas dos modelos são bastante semelhantes para esses polímeros. Já para o polímero B, os modelos desenvolvidos com os espectros puros e o NAS (Puro), não apresentaram resultados satisfatórios com erros de predição e calibração bem maiores que aqueles apresentados pelos NAS obtidos com os espectros recuperados do MCR-ALS.

Comparando os resultados do CLS com o MCR-ALS, percebe-se que há uma concordância entre os resultados dos modelos MCR-ALS com CLS calculado com NAS (MCR-ALS). Semelhantemente, os resultados CLS utilizando os espectros puros e o NAS (puro) são bastante similares. Apesar do CLS ser uma das bases do MCR-ALS e os espectros recuperados serem bem correlacionados com os espectros puros, as restrições do ALS e a solução conjunta dos perfis espectrais e de concentração nos modelos MCR-ALS, faz dessa técnica mais eficiente para a quantificação dos polímeros, apresentando resultados melhores. Devido a isso, provavelmente, os NAS obtidos através desses espectros recuperados apresentaram resultados mais satisfatórios para quantificação dos polímeros entre as estratégias utilizando a regressão clássica.

A Figura 38 apresenta os gráficos dos valores de referências versus os valores preditos pelos modelos CLS. Observa-se que para os polímeros A e C as amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno da bissetriz e não há evidência de erro sistemático, conforme teste t realizado (95% de confiança), para todos os modelos desenvolvidos. Para o polímero B, apenas para o modelo utilizando o NAS (MCR-ALS) as amostras estão distribuídas em torno da bissetriz. Para aqueles modelos calculados com os espectros puros e NAS (puro), as amostras estão bastante dispersas e com presença de erro sistemático de acordo com o teste t (95% de confiança).

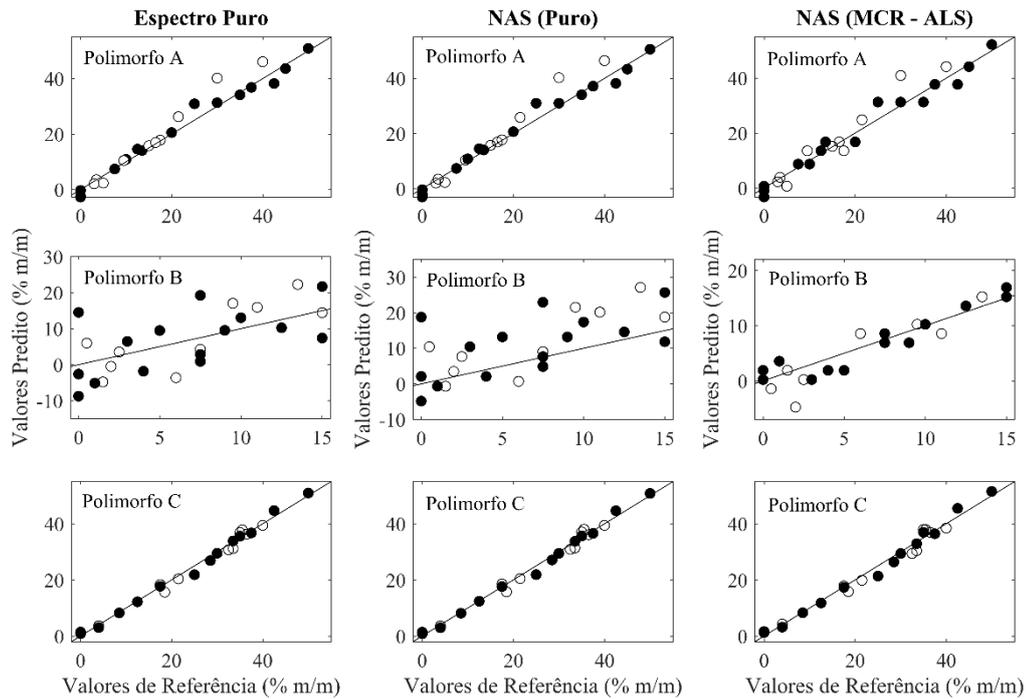


Figura 38. Gráficos dos valores de referência versus predito pelos modelos CLS desenvolvidos com os espectros puros e NAS obtidos por meio dos espectros puros e recuperados pelo modelo MCR-ALS.

O CLS é uma estratégia mais simples que o MCR-ALS, principalmente pelo tempo computacional exigido. No cálculo do MCR-ALS para esse tipo de matriz, necessita-se de algumas horas para alcançar a otimização. Uma vez otimizado, as previsões são realizadas em segundos. No entanto, o CLS realizado com a mesma matriz é calculado em segundos. Então, considerando que em processos farmacêuticos, as informações de todos os componentes sempre são conhecidas, e é possível o acesso aos seus espectros puros também, o CLS é uma boa alternativa de utilização com NAS para realizar a quantificação dos polimorfos. Neste trabalho, o CLS foi calculado na condição que apresentou o melhor resultado nos modelos MCR-ALS e PLS, utilizando espectros derivativos. Outras estratégias de pré-processamento também devem ser avaliadas nos cálculos do NAS e CLS para avaliar condições onde apenas com os espectros puros obtenha-se resultados mais satisfatórios para quantificação dos polimorfos. Alcançada essa condição, o CLS mostra-se uma ferramenta mais eficiente e mais rápida que o MCR-ALS. Devido aos resultados obtidos aqui, os mapas de distribuição não foram plotados por não mostrarem nenhuma vantagem do CLS frente às estratégias utilizadas anteriormente, uma vez que os seus resultados dependem do MCR-ALS que por si só já demonstra eficiência na quantificação.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho avaliou a adequabilidade e praticidade do uso de três equipamentos NIR portáteis no monitoramento da qualidade dos polimorfos do MBZ no IFA. Além disso, descreveu um método analítico utilizando espectroscopia THz e calibração multivariada para mesma finalidade. Para isso, modelos de regressão PLS para quantificar os polimorfos do MBZ e métodos de transferência de calibração utilizando equipamentos NIR portátil e de bancada foram aplicados. Por fim, uma metodologia analítica foi desenvolvida para quantificação de forma global e local os polimorfos do MBZ em comprimidos utilizando HSI-NIR.

No estudo com os equipamentos NIR portáteis, o MicroNIR 1700 demonstrou a melhor performance analítica entre os portáteis com resultados similares ao equipamento de bancada. Esses resultados demonstraram que os modelos desenvolvidos com o instrumento NIR de bancada pode ser transferido para o portátil. Entre os métodos de transferência testados, a padronização reversa (RS) foi mais eficiente com resultados semelhantes ao da calibração completa. O método desenvolvido demonstrou flexibilidade e eficiência para o controle da qualidade dos polimorfos do MBZ.

No estudo com a espectroscopia THz, os resultados obtidos com a regressão PLS demonstraram a eficiência da metodologia para quantificação dos polimorfos do MBZ. Além disso, a espectroscopia THz apresentou a melhor sensibilidade analítica na quantificação quando comparado com outras espectroscopias vibracionais utilizada neste trabalho e descritas na literatura. Tais resultados estão relacionados ao acesso direto da espectroscopia THz à rede cristalina do cristal.

Para quantificação dos polimorfos em comprimidos utilizando HSI-NIR, modelos MCR-ALS e PLS foram comparados. Na quantificação global, os modelos PLS apresentaram melhores desempenhos analíticos. Os melhores resultados globais encontrados pelos modelos PLS decorre do fato desses modelos terem sido desenvolvidos apenas com informações gerais sobre os comprimidos (espectro médio). Para quantificação local, analisando os mapas de distribuições, o MCR-ALS forneceu resultados mais quimicamente significativos para todos os polimorfos. Os resultados apresentados pelos modelos MCR-ALS devem-se a inclusão de mais informações espectrais sobre as amostras nos modelos e perceber qualquer variabilidade não refletida no espectro médio. Por fim, modelos CLS utilizando os espectros puros e os NAS obtidos por meio desses espectros puros e recuperados pelo MCR-ALS também foram avaliados para quantificação dos polimorfos. Os modelos construídos com NAS (MCR-ALS) apresentaram melhores resultados e mostram uma estratégia promissora para o uso do NAS.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar diferentes pré-processamentos no cálculo do NAS e CLS para quantificação dos polimorfos do MBZ;
- Utilizar as técnicas vibracionais testadas para desenvolver métodos analíticos para determinação de outros produtos farmacêuticos que apresentam polimorfismo.

REFERÊNCIAS

- ABOUL-ENEIN, H Y; BUNACIU, A; FLESCHEIN, S. Analysis of mebendazole polymorphs by Fourier transform IR spectrometry using chemometric methods. **Biopolymers**, v. 67, n. 1, p. 56–60, 2002.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S; GLASS, B D; MANGAN, M; SMITHSON, J. Analysing the crystal purity of mebendazole raw material and its stability in a suspension formulation. **International journal of pharmaceutics**, v. 361, n. 1–2, p. 245–50, 2008.
- ALCALÀ, M; BLANCO, M; MOYANO, D; BROAD, N W; O'BRIEN, N; FRIEDRICH. Qualitative and quantitative pharmaceutical analysis with a novel handheld miniature near-infrared spectrometer. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 21, n. 6, p. 445–457, 2013.
- ALEXANDRINO, G L; AMIGO, J M; KHORASANI, M R; RANTANEN, J; FRIDERICHSEN, A V; POPPI, R J. Unveiling multiple solid-state transitions in pharmaceutical solid dosage forms using multi-series hyperspectral imaging and different curve resolution approaches. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 161, p. 136–146, 2017.
- ASTM E 1655-05. **Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ASTM International, 2005
- AYALA, A P; SIESLER, H W; CUFFINI, S L. Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole : a vibrational spectroscopy investigation. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 39, n. March, p. 1150–1157, 2008.
- BAXTER, J B; GUGLIETTA, G W. Terahertz Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4342–4368, 2011.
- BEEBE, K R.; PELL, R J.; SEASHOLTZ, M B. **Chemometrics: A Practical Guide**. New York: Wiley-Interscience, 1998.
- BLANCO, M; VALDÉS, D; BAYOD, M S; FERNANDEZ-MARI, F; LLORENTE, I. Characterization and analysis of polymorphs by near-infrared spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 502, n. 2, p. 221–227, 2004.
- BLANCO, M; COELLO, J; ITURRIAGA, H; MASPOCH, S; PÉREZ-MASEDA, C. Determination of polymorphic purity by near infrared spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 407, n. 1–2, p. 247–254, 2000.
- BLANCO, M; COELLO, J; ITURRIAGA, H; MASPOCH, S; DE LA PEZUELA, C. Near-infrared spectrometry in the pharmaceutical industry. **The Analyst**, v. 123, n. August, p. 135–150, 1998.
- BRITTAIN, H G. Vibrational Spectrometry. In: BRITTAIN, H. (Org.). **Polymorph. Pharm. Solids**. Vol. 192 Drugs Pharm. Sci. 2. ed. New York: Informa Helthcare, p. 347–380, 2009a.
- BRITTAIN, H G. Theory and Principles of Polymorphic Systems. In: BRITTAIN, Harry G. (Org.). . **Polymorph. Pharm. Solids**. Vol. 192 Drugs Pharm. Sci. 2. ed. New York: Informa

Healthcare, p. 1–23, 2009b.

BRO, R; ANDERSEN, C M. Theory of net analyte signal vectors in inverse regression. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 12, p. 646–652, 2003.

BRONDI, A M; TERRA, L A; SABIN, G P; GARCIA, J S; POPPI, R J. Mapping the Polymorphic Forms of Fexofenadine in Pharmaceutical Tablets Using near Infrared Chemical Imaging. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 22, n. 3, p. 211–220, 2014.

BROWN, C D. Discordance between net analyte signal theory and practical multivariate calibration. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 15, p. 4364–4373, 2004.

BUNACIU, A A; ABOUL-ENEIN, H Y; DANG, V. Vibrational spectroscopy used in polymorphic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 14–22, 2015.

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

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

CHALMERS, J.M.; DENT, G. Vibrational Spectroscopy Methods in Pharmaceutical Solid-state Characterization. In: HILFIKER, Rolf (Org.). **Polymorph. Pharm. Ind.** Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

CHAROENLARP, P et al. Efficacy of Single-Dose Mebendazole, Polymorphic Forms A and C, in the Treatment of Hookworm and Trichuris Infections. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 24, n. 4, p. 712–6, 1993.

CHAROENLARP, P; WAIKAGUL, J; MUENNOO, C; SRINOPHAKUN, S; KITAYAPORN, D. Efficacy of single-dose mebendazole, polymorphic forms A and C, in the treatment of Hookworm and Trichuris infections. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health**, v. 24, n. 4, p. 712–716, 1993.

CHASE, B. Fourier transformer near-infrared Raman spectroscopy. In: CHALMERS, JM; GRIFFITHS, PR (Org.). **Handob. Vib. Spectrosc. 1 theory Instrum.** Chichester: John Wiley & Sons, p. 522–533, 2002.

CHAVAN, R B; BHARGAVI, N; LODAGEKAR, A; SHASTRI, N R. Near infrared spectroscopy: a tool for solid state characterization. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 12, p. 1835–1843, 2017.

CHIENG, N; RADES, T; AALTONEN, J. An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 55, n. 4, p. 618–44, 2011.

COSCIONE, A R; DE ANDRADE, J C; MAY, G M. O modelamento estatístico de misturas: Experimento tutorial usando voltametria de redissolução anódica. **Quimica Nova**, v. 28, n. 6, p. 1116–1122, 2005.

COSTA, J; FRESNO, M; GUZMÁN, L; IGUAL, A; OLIVA, J; VIDAL, P; PÉREZ, A; PUJOL, M. Polymorphic forms of Mebendazole: Analytical Aspects and Toxicity. **Circular Farmaceutica**, v. 49, p. 415–424, 1991.

CRUZ, J; BAUTISTA, M; AMIGO, J M; BLANCO, M. Nir-chemical imaging study of acetylsalicylic acid in commercial tablets. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 473–478, 2009.

DE VILLIERS, M M; TERBLANCHE, R J; LIEBENBERG, W; SWANEPOEL, E; DEKKER, T G; SONG, M. Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 38, n. 3, p. 435–41, 2005.

EL HADDAD, J; BOUSQUET, B; CANIONI, L; MOUNAIX, P. Review in terahertz spectral analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 98–105, 2013.

FARMACOPÉIA, Brasileira. **Farmacopeia Brasileira**. 5^a ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FERRÉ, J; FABER, N (Klaas) M. Net analyte signal calculation for multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 69, n. 1–2, p. 123–136, 2003.

FERREIRA, F F; ANOTNIO, S G; ROSA, P C P; PAIVA-SANTOS, C O. Crystal structure determination of mebendazole form A using high-resolution synchrotron x-ray powder diffraction data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1734–1744, 2010.

FERREIRA, Márcia M. C. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 8, 1999.

FRANÇA, L M; PIMENTEL, M F; SIMÕES, S S; JUNIOR, S G; PRATS-MONTALBÁN, J M; FERRER, A. NIR hyperspectral imaging to evaluate degradation in captopril commercial tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 104, p. 180–188, 2016.

FROEHLICH, P E.; GASPAROTTO, F S. Mebendazol : identificação das formas polimórficas em diferentes matérias-primas e medicamentos (referência e genéricos) disponíveis no mercado nacional. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 205–210, 2005.

GALVÃO, R K H; ARAUJO, M C U; JOSÉ, G E; PONTES, M J C; SILVA, E C; SALDANHA, T C B. A method for calibration and validation subset partitioning. **Talanta**, v. 67, n. 4, p. 736–40, 2005.

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

HIMMELREICH, M; RAWSON, B J; WATSON, T R. Polymorphic Forms of Mebendazole. **Australian Journal of Pharmaceutical Sciences**1, v. 6, n. 4, p. 123–125, 1977.

HISAZUMI, J; SUZUKI, T; NAKAGAMI, H; TERADA, K. Quantification of Pharmaceutical Polymorphs and Prediction of Dissolution Rate Using Theophylline Tablet by Terahertz Spectroscopy. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 442–446, 2011.

HONORATO, F A; NETO, B B; MARTINS, M N; GALVÃO, R W H; PIMNETEL, M F. Transferência de calibração em métodos multivariados. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1301–1312, 2007.

HONORATO, S B; FARFAN, S; VIANA, A; FILHO, J M; CAMARÃO, G C; FECHINEM F V; MORAES, M E A; MORAES, M O; FERRO, M; DABBENE, V; CUFFINI, S L; AYALA, A P. Polymorphism Evaluation in Generic Tablets containing Mebendazole by Dissolution Tests. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 2, p. 220–227, 2012.

IGNE, B; BONDI, R W; AIRIAU, C. Multivariate Data Analysis for Enhancing Process Understanding, Monitoring, and Control—Active Pharmaceutical Ingredient Manufacturing Case Studies. **Multivar. Anal. Pharm. Ind.** p. 185–210, 2018.

JAMRÓGIEWICZ, M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 1–10, 2012.

JAUMOT, J; DE JUAN, A; TAULER, R. MCR-ALS GUI 2.0: New features and applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 140, p. 1–12, 2015.

JAUMOT, J; GARGALLO, R; JUAN, A D. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS : a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 76, p. 101–110, 2005.

KACHRIMANIS, K; RONTOGIANNI, M; MALAMATARIS, S. Simultaneous quantitative analysis of mebendazole polymorphs A-C in powder mixtures by DRIFTS spectroscopy and ANN modeling. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 3, p. 512–20, 2010.

KARASHIMA, M; KIMOTO, K; KOJIMA, T; IKEDA, Y. Rational polymorph screening based on slow cooling crystallization of poorly soluble mebendazole. **Journal of Crystal Growth**, v. 390, p. 30–37, 2014.

KING, M D.; BUCHANAN, W D; KORTER, T M. Identification and quantification of polymorphism in the pharmaceutical compound diclofenac acid by terahertz spectroscopy and solid-state density functional theory. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 10, p. 3786–3792, 2011.

LEE, E H. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1–13, 2014.

LIMA, F S G; BORGES, L E P. Evaluation of standardisation methods of near infrared calibration models. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 10, n. 4, p. 269–278, 2002.

LOHANI, S; GRANT, D J W. Thermodynamics of Polymorphs. In: HILFIKER, Rolf (Org.). **Polymorph. Pharm. Ind.** 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, p. 21–42, 2006.

LORBER, A; FABER, K; KOWALSKI, B R. Net Analyte Signal Calculation in Multivariate Calibration. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 8, p. 1620–1626, 1997.

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

MARTINS, F T; NEVES, P P; Ellena, J; Camí, G E; Brusau, E V; Narda, G E. Intermolecular contacts influencing the conformational and geometric features of the pharmaceutically preferred mebendazole polymorph C. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 7, p. 2336–2344, 2009.

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

MOBARAKI, N; AMIGO, J M. HYPER-Tools. A graphical user-friendly interface for hyperspectral image analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 172, p. 174–187, 2018.

NETO, B B; SCARMINIO, I S; BRUNS, R E. **Como Fazer Experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Brookman, 2010.

OLIVEIRA, A D. **Monitoramento in-line da etapa de esterificação ácida do processo de produção de biodiesel**. Departamento de Química Fundamental. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

OLIVIERI, A C; GOICOECHEA, H C.; IÑÓN, F. MVC1: An integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 73, n. 2, p. 189–197, 2004.

OTSUKA, M; NISHIZAWA; SHIBATA, J; ITO, M. Quantitative Evaluation of Mefenamic Acid Polymorphs by Terahertz-Chemometrics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 9, p. 4048–4053, 2010.

PAIVA, E M; SILVA, V H; POPPI, R J; PEREIRA, C; ROHWEDDER, J J R. Comparison of macro and micro Raman measurement for reliable quantitative analysis of pharmaceutical polymorphs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 157, p. 107–115, 2018.

PAIVA, E M; ROHWEDER, J J R; PASQUINI, C; PIMENTEL, M F; PEREIRA, C F. Quantification of biodiesel and adulteration with vegetable oils in diesel/biodiesel blends using portable near-infrared spectrometer. **Fuel**, v. 160, p. 57–63, 2015.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8–36, 2018.

PASQUINI, C. Review Near Infrared Spectroscopy : Fundamentals , Practical Aspects and Analytical Applications. **Spectroscopy**, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PIQUERAS, S; BURGER, J; TAULER, R; JUAN, A D. Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 117, p. 169–182, 2012.

PRATS-MONTALBÁN, J. M.; DE JUAN, A.; FERRER, A. Multivariate image analysis: A review with applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 107, n. 1, p. 1–23, 2011.

PUROHIT, R; VENUGOPALAN, P. Polymorphism : An Overview. **Resonance**, v. 14, n. 9, p. 882–893, 2009.

RINNAN, Å; BERG, F V D; ENGELSEN, S B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, nov. 2009.

ROCHA, W F C; SABIN, G P; MARCO, P H; POPPI, R J. Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 106, n. 2, p. 198–204, 2011.

RODRÍGUEZ-SPONG, B; PRICE, C P; JAYASANKAR, A; MATZGER, A J; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 3, p. 241–74, 2004.

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

SABIN, G P; BREITKREITZ, M C; SOUZA, A M; FONSECA, P; CALEFE, L; MOFFA, M; POPPI, R J. Analysis of pharmaceutical pellets: An approach using near-infrared chemical imaging. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 113–119, 2011.

SACRÉ, P.-Y; DE BLEYE, C; CHAVEZ, P F; NETCHACOVITCH, L; HUBERT, Ph; ZIEMONS, E. Data processing of vibrational chemical imaging for pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 123–140, 2014.

SARRAGUÇA, M C; LOPES, J A. The use of net analyte signal (NAS) in near infrared spectroscopy pharmaceutical applications: Interpretability and figures of merit. **Analytica Chimica Acta**, v. 642, n. 1–2, p. 179–185, 2009.

SCHÖNBICHLER, S A; BITTNER, L K H; WEISS, A K H; GRIESSER, U J; PALLUA, J D; HUCK, C W. Comparison of NIR chemical imaging with conventional NIR, Raman and ATR-IR spectroscopy for quantification of furosemide crystal polymorphs in ternary powder mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, p. 616–625, 2013.

SHEN, Y. Terahertz pulsed spectroscopy and imaging for pharmaceutical applications: a review. **International journal of pharmaceutics**, v. 417, n. 1–2, p. 48–60, 2011.

SIDDIQUI, A; RAHMAN, Z; SAYEED, V A; KHAN, M A. Chemometric evaluation of near infrared, fourier transform infrared, and raman spectroscopic models for the prediction of nimodipine polymorphs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 11, p. 4024–4035, 2013.

SILVA, V H; GONCALVEZ, J L; VASCONCELOS, F V C; PIMENTEL, M F; PEREIRA, C F. Quantitative analysis of mebendazole polymorphs in pharmaceutical raw materials using near-infrared spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 115, p. 587–593, 2015.

SIMÕES, S S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrometria NIR e calibração multivariada**. Departamento de Química. 97 f. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

SINGH, R; SAHAY, A; KARRY, K M; MUZZIO, F; IERAPETRITOU, M;

RAMACHANDRAN, R. Implementation of an advanced hybrid MPC-PID control system using PAT tools into a direct compaction continuous pharmaceutical tablet manufacturing pilot plant. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 38–54, 2014.

SKOOG, D A; HOLLER, F J; CROUCH, S R. **Princípios da Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Brookman, 2006.

STRACHAN, C J; TADAY, P F; NEWNHAM, D A; GORDEON, K C; ZEITLER, J A; PEPPER, M; RADES, T. Using terahertz pulsed spectroscopy to quantify pharmaceutical polymorphism and crystallinity. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 94, n. 4, p. 837–46, 2005.

SUN, L; HSIUNG, C; PEDERSON, C G; ZOU, P; SMITH, V; GUTEN, M; O'BRIEN, N. Pharmaceutical Raw Material Identification Using Miniature Near-Infrared (MicroNIR) Spectroscopy and Supervised Pattern Recognition Using Support Vector Machine. **Applied Spectroscopy**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2016.

SWANEPOEL, E.; LIEBENBERG, Wi.; DE VILLIERS, M.M. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 345–349, 2003.

SWANEPOEL, E; LIEBENBERG, W; DEVARAKONDA, B; DE VILLIERS, M M. Developing a discriminating dissolution test for three mebendazole polymorphs based on solubility differences. **Pharmazie**, v. 58, n. 2, p. 117–121, 2003.

TORLESSE, H; CROMPTON, D W T; SAVIOLI, L. Anthelmintic treatment during pregnancy. In: CROMPTON, D.W.T. et al. (Org.). . **Control. Dis. due to helminth Infect.** Geneva: World Health Organization, p. 135–142, 2003.

VIEIRA, F S. **Espectroscopia Terahertz: Instrumentação E Aplicações**. Instituto de Química. 142 f. Universidade Estadual de Campinas, 2016.

WESTAD, F; MARTENS, H. Variable selection in near infrared spectroscopy based on significance testing in partial least squares regression. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, v. 8, p. 117–124, 2000.

WU, H; KHAN, M. THz spectroscopy: An emerging technology for pharmaceutical development and pharmaceutical Process Analytical Technology (PAT) applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1020, p. 112–120, 2012.

XIAOBO, Z; JIEWEN, Z; POVEY, M J W; HOLMES, M; HANPIN, M. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. **Analytica chimica acta**, v. 667, n. 1–2, p. 14–32, 2010.