



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

EDUARDO MAIA PAIVA

**APLICAÇÃO DAS ESPECTROSCOPIAS RAMAN E TERAHERTZ
NO ESTUDO DE POLIMORFISMO EM FÁRMACOS E
CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO RAMAN**

Recife

2019

EDUARDO MAIA PAIVA

**APLICAÇÃO DAS ESPECTROSCOPIAS RAMAN E TERAHERTZ
NO ESTUDO DE POLIMORFISMO EM FÁRMACOS E
CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO RAMAN**

Tese 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)

Co-Orientador: Jarbas José Rodrigues Rohwedder (Unicamp, Brasil)

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2106

P149a Paiva, Eduardo Maia
Aplicação das espectroscopias raman e terahertz no estudo de polimorfismo em fármacos e construção de um espectrofotômetro raman/ Eduardo Maia Paiva. – 2019.
112 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Claudete Fernandes Pereira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCEN. Química. Recife, 2019.
Inclui referências.

1. Química Analítica. 2. Espectroscopia Raman. 3. Espectroscopia terahertz. 4. Calibração multivariada. I. Pereira, Claudete Fernandes (orientadora). II. Título.

543 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-82

EDUARDO MAIA PAIVA

APLICAÇÃO DAS ESPECTROSCOPIAS RAMAN E TERAHERTZ NO ESTUDO DE POLIMORFISMO DE FÁRMACOS E CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO RAMAN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Claudete Fernandes Pereira (Orientador)

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Ricardo Luiz Longo

Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Renato Lajarim Carneiro

Instituto de Química
Universidade Federal de São Carlos

Prof^a. Maria Fernanda Pimentel

Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Mônica Felts de La Roca Soares

Departamento de Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Pernambuco

***Dedico esse trabalho aos meus pais que sempre
acreditaram em meus potenciais em vencer as
etapas da vida.***

***À minha esposa Alianda Dantas, uma mulher
guerreira que sempre está do meu lado nos
principais momentos da minha vida.***

***A todos aqueles que contribuíram para a
realização deste trabalho.***

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais, *Humberto e Lúcia*, pela educação, apoio, carinho e a dedicação que me deram em toda minha formação acadêmica.

À minha esposa, *Alianda Dantas de Oliveira*, pelo amor, carinho e apoio nas horas difíceis da trajetória deste trabalho.

À minha orientadora *Prof^a Claudete Fernandes Pereira*, que acreditou em meu trabalho, pela sua imensa dedicação aos seus alunos e pela simpatia e paciência.

À meu Co-Orientador *Prof Jarbas José Rodrigues Rohwedder*, por ter me recebido em Campinas com grande dedicação, me orientado nas decisões para realização deste trabalho, pela simpatia e paciência.

Aos colegas *Carolina Santos, Vitor Hugo, Neirivaldo e Leandro*, pela amizade e pelos momentos de descontração que ocorreram neste período de desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas da Unicamp, *Rafael Gaspar, Eliane Namikushi, Rafael Ribessi, Diego Campassi, Cristiane Vidal, Thiago Neves, Emanueli, Francisco*, pela amizade e por ter me recebido no período e que passei na Unicamp-Campinas.

Ao *Carlos Eduardo*, da Unicamp, pela parceria no trabalho da desidratação da teofilina auxiliando com seus conhecimentos de cálculo teórico de sólidos cristalinos

Aos professores da Pós-Graduação em Química da UFPE que contribuíram para minha formação acadêmica.

À todos os meus amigos, pela compreensão, paciência e companheirismo.

Obrigado pelas contribuições diretas e indiretas que tornaram esse sonho possível. Meu carinho e gratidão.

RESUMO

Nesta tese foram desenvolvidos três trabalhos os quais estão divididos, de acordo com os objetivos, em Parte 1, 2 e 3. Na Parte 1 foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada para determinação dos teores dos polimorfos do mebendazol empregando três espectrofotômetros Raman: micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2 os quais possuem *spot* do laser de 3, 80 e 100 μm e resolução espectral de 3,9, 9 e 4 cm^{-1} , respectivamente. As amostras estudadas foram misturas ternárias variando os polimorfos A e C de 0 a 100% m/m e o polimorfo B de 0 a 30% m/m do mebendazol. Os melhores resultados foram obtidos com a configuração macro de tamanho de *spot* do laser alcançando valores de RMSEP de 1,68, 1,24 e 2,03% m/m para as formas A, B e C respectivamente. Tal desempenho superior deve-se à melhor reprodutibilidade e representatividade espectral do conteúdo total das misturas quando utilizada a configuração macro, sendo essa menos influenciada pela morfologia e tamanho das partículas do fármaco. A Parte 2 descreve a construção e avaliação de um espectrofotômetro Raman, que opera com variação do *spot* do laser e detecta na faixa espectral de 10 a 2000 cm^{-1} de deslocamento Raman. As misturas ternárias do mebendazol foram medidas nesse instrumento e foram obtidos, pelos modelos de calibração multivariada, valores de RMSEP de 2,78, 2,24 e 2,93% m/m para as formas A, B e C respectivamente. Na Parte 3 foi estudada a desidratação da Forma M (monoidratada) da teofilina utilizando dados espectroscópicos Raman e terahertz nas baixas frequências vibracionais, a fim de caracterizar o metaestado obtido durante o processo de desidratação. O estudo pretende propor uma estrutura desse metaestado, denominado de Forma III da teofilina, cuja existência foi reportada na literatura através de medidas de difração de raios-X de pó. Nesta tese são apresentados dados experimentais que serão, futuramente, usados como referência para cálculos quânticos computacionais.

Palavras-Chave: Espectroscopia Raman. Espectroscopia terahertz. Baixas frequências Vibracionais. Polimorfismo. Calibração multivariada.

ABSTRACT

In this thesis, three works were developed which are divided, according to the objectives, in Part 1, 2, and 3. In Part 1, multivariate calibration models were developed to determine the mebendazole polymorphs content using three Raman spectrophotometers: micro-Raman, macro-Raman1, and macro-Raman2 which have laser spot of 3, 80 and 100 μm and spectral resolution of 3.9, 9 and 4 cm^{-1} , respectively. The samples studied were ternary mixtures ranging from 0 to 100% w/w of polymorphs A and C and polymorph B from 0 to 30% w/w of mebendazole. The best results were obtained with the macro configuration reaching RMSEP values of 1.68, 1.24 and 2.03% w/w for Forms A, B, and C, respectively. Such superior performance was due to better reproducibility and spectral representativity of the total contents of the blends when using the macro configuration being less influenced by the morphology and particle size of the drug. Part 2 describes the construction and evaluation of a Raman spectrophotometer that operates with a variation of the laser spot and detects in the spectral range from 10 to 2000 cm^{-1} of Raman shift. The ternary mixtures of mebendazole were measured in this instrument and the RMSEP values of 2.78, 2.24 and 2.93% w/w for the A, B and C forms were obtained by the multivariate calibration models, respectively. In Part 3 the dehydration of Form M (monohydrate) of theophylline was studied using Raman and Terahertz spectroscopic data at the low-frequency vibrational range in order to characterize the metastate obtained during the dehydration process. The study intends to propose a structure of this metastate, denominated Form III of theophylline, which has been reported its existence in the literature through measurements of powder X-ray diffraction. In this thesis will be shown the experimental data which will be used as a reference for future results of theoretical quantum calculations.

Keywords: Raman spectroscopy. Terahertz spectroscopy. Vibrational low-frequencies. Polymorphism. Multivariate calibration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Classificação dos polimorfos hidratados quanto à estrutura da molécula de água. a) hidrato isolado (Exemplo: fluconazol monoidratado), b) hidrato canal simples (Exemplo: cafeína monoidratada), c) hidrato canal estendido (Exemplo: carbamazepina diidratada), d) hidrato canal planar (Exemplo: composto 1 (Kiang et al, 2008)), e) hidrato iônico (Exemplo: dipirona monoidratada). Os paralelepípedos azuis e as esferas vermelhas representam as moléculas orgânicas e da água, respectivamente. Em e) a esfera lilás representa o contraíon. 19
- Figura 2 - Diagrama genérico das energias dos estados fundamentais e excitado eletrônicos e vibracionais. Destaque para o espalhamento Raman Anti-Stokes e Stokes.... 26
- Figura 3 - Divisão do espectro eletromagnético quanto aos efeitos físicos da radiação com a matéria..... 28
- Figura 4 - Espectros Raman nas regiões de médias e baixas frequências vibracionais de dois polimorfos da Carbamazepina (a) (b) (Larkin et al., 2014). Espectro Raman experimental e calculado nas baixas frequências vibracionais mostrando os modos rotacionais puros do gás nitrogênio à 24°C (c) (Wang et al., 2014). 29
- Figura 5 - Espectros Raman na região das baixas frequências da forma amorfa (a & c) e da forma cristalina (b & d) dos fármacos Indometacina e Griseofulvina, respectivamente (Larkin et al., 2015; Smith et al., 2016). 30
- Figura 6: Modos longitudinais de emissão de laser de diodo (Newport, 2018). 34
- Figura 7 - Espectros de transmissão de filtros a) edge e b) notch para Raman com laser 785 nm. 35
- Figura 8 - Esquema mostrando a comparação entre os sinais filtrados para um laser 785 nm empregando um filtro Notch comum e um filtro para um filtro holográfico de Bragg. (Adaptado de Glebov et al., 2012). 37
- Figura 9 - Configuração óptica instrumental de um THz-TDS utilizando a) atraso mecânico e b) eletrônico (ASOPS). 40
- Figura 10 - Processo de detecção do pulso THz através do sistema eletro-óptico mostrando a dependência do plano de polarização detectado do laser em diferentes momentos coincidentes com o pulso THz quando incididos no cristal de ZnTe (Adaptado de Vieira, 2016). 41
- Figura 11 - Exemplo de gráficos valores de referência pelos valores de previsão mostrando 4 casos sendo a) resultados exatos e precisos, b) resultados exatos e imprecisos,

c) resultados inexatos e precisos e d) resultados inexatos e imprecisos. A bissetriz do gráfico representa um conjunto de resultados ideais.	43
Figura 12 - a) Imagem do espectrômetro Raman Horiba e b) pastilha da amostra localizada na lâmina do microscópio confocal. 1. Arranjo de CCD, 2. Triplo monocromador, 3. Microscópio confocal, 4. laser HeNe 633 nm.....	47
Figura 13 - Imagem do espectrômetro Raman portátil BW-TEK modelo TacticID-GP.....	48
Figura 14 - Imagem do espectrômetro Raman Perkin-Elmer RamanStation 400F.....	48
Figura 15 - Isômeros conformacionais predominantes nos polimorfos A (Tautômero 1) e C (Tautômero 2) do mebendazol.	52
Figura 16 - Micrografias dos polimorfos do mebendazol em pó. Polimorfo A (a-b), polimorfo C (c-d) e polimorfo B (e-f) com diferentes magnificações.	53
Figura 17 - Gráficos de distribuição de razão de aspecto, comprimento e largura para as formas A, B e C do mebendazol.	53
Figura 18 - Difratogramas dos polimorfos A, B e C do mebendazol (adaptado de Silva et al., 2015).	54
Figura 19 - Espectros Raman normalizados dos polimorfos puros do mebendazol nas regiões de baixas e médias frequências do Raman A linha tracejada em 200 cm ⁻¹ indica o limite entre as regiões de baixas e médias frequências do Raman.....	55
Figura 20 - Imagem da superfície de uma amostra na forma de pastilha obtida com o microscópio confocal. Os pontos amarelos indicam as posições onde os espectros Raman foram obtidos durante o mapeamento da amostra.	58
Figura 21 - Espectros das misturas binárias A e C do MBZ sendo em a) dados brutos, e dados pré-processados com b) MSC, c) SNV e d) WLS.	59
Figura 22 - Espectros sem (a) e com (b) a correção de alinhamento lateral, utilizando o algoritmo COW. A faixa espectral no gráfico foi reduzida somente para uma melhor visualização do efeito final do processo de correção.....	60
Figura 23 - Espectros pré-processados com correção da linha de base, alinhamento e suavização.	61
Figura 24 - Pesos (loadings) do modelo de calibração PLS2 para as misturas binárias dos polimorfos A e C do MBZ.	62
Figura 25 - Gráficos dos valores preditos versus valores de referência das validações interna e externa, para o modelo de calibração PLS2 das misturas binárias formas A e C do MBZ.	62

- Figura 26 - a) Espectros Raman dos polimorfos puros do MBZ na região de baixas frequências. b) espectros médios de três diferentes regiões de uma mesma pastilha da amostra contendo 80%, 12% e 8% m/m para as formas A, B e C do MBZ, respectivamente..... 64
- Figura 27 - a) Espectros dos polimorfos puros do MBZ medidos nos instrumentos a) micro-Raman, b) macro-Raman1 e c) macro-Raman2. Os espectros são médias de triplicatas medidas em diferentes regiões da amostra. 65
- Figura 28 - Espectros brutos (a), (b), (c) e espectros pré-processados (d), (e), (f) (2ª derivada) obtidos com os instrumentos micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2 (em triplicata) respectivamente. 66
- Figura 29 - Gráficos dos valores de referência versus valores previstos, das validações interna e externa, obtidos pelos modelos PLS para o polimorfo A (a), (d), (g), B (b), (e), (h) e C (c), (f), (i) empregando as misturas de amostras ternárias para micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2, respectivamente. 67
- Figura 30 - a) Espectros médios brutos das misturas binárias adquiridas com micro-Raman em triplicata. Gráficos dos valores de referência versus valores previstos, da validação interna e externas, obtidos pelos modelos PLS para os polimorfos A (b) e C (c). 71
- Figura 31 - (a) Micrografia da superfície da pastilha de uma mistura binária dos polimorfos A e C (1:1 % m/m) e (b) de uma mistura ternária (40%, 25% e 35% m/m A, B e C, respectivamente). A área destacada em vermelho indica o comportamento aglutinante do polimorfo B na superfície da mistura da pastilha..... 72
- Figura 32 - a) Imagem do espectrofotômetro Raman montado no laboratório. b) Desenho esquemático do sistema óptico. 1) laser, 2) filtros ASE, 3) espelho dicróico, 4) lente de abertura do spot, 5) espelho parabólico de 2" revestimento de prata, 6) espelho de prata, 7) lente da amostra, 8) amostra, 9) fenda de 0,6 mm, 10) lente colimadora, 11) filtros notch, 12) lente da fibra óptica e 13) fibra óptica 50 μm , 14) monocromador e 15) câmera CCD. 76
- Figura 33 - Espectro de emissão do Laser 785 nm com e sem filtro ASE. O círculo tracejado destaca a radiação ASE na curva azul e, que está ausente na curva vermelha. .. 77
- Figura 34 - Esquema exemplificando o ponto de foco do laser quando o feixe incide na lente de forma a) colimada ou b) divergente. c) Esquema exemplificando os parâmetros para obtenção de um feixe colimado baseado no ângulo de divergência. γ_1 é a

fonte de luz, y_2 é a imagem colimada e θ_2 é o ângulo de divergência do feixe colimado.....	78
Figura 35 - Espectros Raman adquiridos com o espectrometro construído no laboratório. a) ácido acetilsalicílico, b) amoxicilina, c) azitromicina, d) cafeína, e) carbamazepina FIII, f) cefaclor, g) diclofenaco, h) dipirona sódica monoidratada, i) DL-valina, j) griseofulvina, k) ibuprofeno, l) mebendazol FA, m) paracetamol FII, n) teofilina FII, o) teofilina FM.	79
Figura 36 - Espectros de transmissão do par de filtros notch BHF utilizando uma lâmpada de tungstênio.	80
Figura 37 - Dados espectrais brutos (a) e pré-processados com a 2ª derivada (b) adquiridos com o espectrômetro Raman construído na faixa espectral de -200 a 1800 cm ⁻¹	81
Figura 38 - Gráficos dos valores de referência versus valores previstos, da validações interna e externa, obtidos pelos modelos PLS para o polimorfo A (a), B (b) e C (c) empregando o espectrofotômetros Raman construído com spot do laser de 3000 μm	82
Figura 39 - Desenhos esquemáticos das principais interações intermoleculares, ligações de hidrogênio, formadas nos polimorfos II e M da teofilina. Uma molécula da teofilina também é mostrada destacando os principais átomos que formam ligações de hidrogênio forte.	85
Figura 40 - Projeções das células unitárias dos polimorfos II (a) e M (b – c) da THEO. O traço vermelho, verde e azul identificam as direções e os tamanhos “a”, “b” e “c” da célula unitária, respectivamente. Em c) é destacado o túnel formado pelas moléculas de água na direção “a” do polimorfo M. CSD code: a) BAPLOT01 e b-c) THEOPH01.....	86
Figura 41 - Acompanhamento temporal do espectro Raman para conversão do polimorfo II no M da teofilina sob 100% de RH (Adaptado de Amado et al., 2007).	87
Figura 42 - a) Difrátogramas das Forma II, M e metaestado da THEO. Transformação de fases sólidas com aquecimento, utilizando a Forma M (b) e o metaestado (c) como material de partida (Adaptado de Phadnis e Suryanarayanan, 1997).	88
Figura 43 - Difrátogramas das Forma II e M da THEO e da evolução da desidratação para os processos utilizando a a) secagem em leito fluidizado e b) PXRD com variação de temperatura da amostra (Adaptado: Airaksinen et al., 2004).....	89

Figura 44 - a) Espectros THz da transição de fase sólida-sólida da Forma M para II, da teofilina, sob aquecimento. Picos finos na região entre 80 e 120 cm ⁻¹ são atribuídos aos modos rotacionais da água eliminada durante o processo de desidratação (Zeitler et al., 2007). b) espectros THz das Formas II e M da teofilina (Jørgensen et al., 2009).	90
Figura 45 - Micrografias das partículas dos polimorfos II (a-b) e M (c-d) da teofilina com diferentes magnificações.	93
Figura 46 - Difratomogramas dos polimorfos II e M da THEO.	94
Figura 47 - Fotografias dos monocristais a) hidratados e b) desidratados com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada, da Forma M da THEO.	94
Figura 48 - Curvas TG (a – b) e DTA (c – d) das amostras em forma de pó e monocristais, antes e depois da desidratação com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada.	95
Figura 49 - Espectros no infravermelho médio dos polimorfos II e M da THEO destacando as principais ligações químicas intramoleculares e suas bandas no espectro vibracional.	96
Figura 50 - Espectros Raman dos polimorfos II e M da THEO na região espectral de 10 a 1350 cm ⁻¹ registrados com o espectrômetro Raman construído no laboratório. Os dados foram normalizados para uma melhor visualização das diferenças espectrais.	97
Figura 51 - Imagens de difração de raios x de monocristais da a) Forma M e do b) cristal desidratado.	99
Figura 52 - a) Espectros THz das Forma M, M desidratada e II da THEO. b) Espectros THz adquiridos durante a desidratação. Destaque para o espectro do reidratado marcado em vermelho que é igual ao da Forma M.	100
Figura 53 - Espectro THz da Forma M à 100 K (Adaptado de Tomerini, 2012).	100
Figura 54 - a) espectro Raman da Forma M e M desidratada. b) espectros Raman durante a desidratação e reidratação da THEO monoidratada.	102
Figura 55 - a) PXRD, b) Raman, c) FT-IR dos polimorfos II, M e III da teofilina. Destaca-se nos espectros de FT-IR a presença e ausência de bandas de vibração de água nas Formas M e III, respectivamente.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação quanto à solubilidade aquosa de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos (Censi et al., 2015).	18
Tabela 2 - Atribuição dos modos vibracionais Raman que formam ligações de hidrogênio nos polimorfos do mebendazol (deslocamento Raman em cm^{-1}) (Ayala et al., 2008).	56
Tabela 3 - Resultados do modelo de calibração PLS2 para as misturas binárias A e C do MBZ empregando a região espectral de 10 a 350 cm^{-1}	61
Tabela 4 - Resultados dos modelos PLS, empregando misturas ternárias, para os três polimorfos do MBZ empregando os três espectrofotômetros Raman.	68
Tabela 5 - Resultados dos modelos PLS empregando as medidas micro-Raman em triplicata e as amostras de misturas binárias dos polimorfos A e C do MBZ.	71
Tabela 6 - Resultados dos modelos PLS, empregando misturas ternárias dos polimorfos A, B e C do MBZ empregando o espectrofotômetro Raman construído com spot do laser de $3000 \mu\text{m}$	82
Tabela 7 - Parâmetro de rede do monocristal da Forma M reportado na literatura (Fucke et al., 2012), da Forma M sintetizada e do produto desidratado.	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ASE -	Emissão espontânea amplificada
ATR -	Reflexão total atenuada
BHF -	Grade Holográfica de Bragg (<i>Bragg Holographic Grating</i>)
CCD -	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge coupled device</i>)
COW -	<i>Correlation Optimization Warping</i>
Laser -	Amplificação da luz por emissão estimulada da radiação
LFRS -	Espectroscopia Raman nas baixas frequências vibracionais
LOD -	Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
MBZ -	Mebendazol
MIR -	Espectroscopia no infravermelho médio
MSC -	Correção Multiplicativa de Sinal (<i>Multiplicative Scatter Correction</i>)
NA -	Abertura numérica
NAS -	Sinal Analítico Líquido
NIR -	Espectroscopia no infravermelho próximo
PIF -	Processos Industriais Farmacêuticos
PLS -	Regressão por mínimos quadrados parciais
PXRD -	Difratometria de Raios X de pós
RH -	Umidade Relativa
RMSEP -	Raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada
RMSEP -	Raiz quadrada do erro médio quadrático da previsão
SNV -	Variação Padrão Normal (<i>Standard Normal Variate</i>)
THEO -	Teofilina
THz -	Terahertz
USP -	Farmacopéia dos Estados Unidos
VDOS -	Densidade de estados vibracionais
WLS -	Minimos quadrados ponderados

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	24
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	ESPECTROSCOPIA RAMAN	25
2.1.1	Espectroscopia raman na região das baixas e médias frequências vibracionais	28
2.2	INSTRUMENTAÇÃO RAMAN	33
2.3	ESPECTROSCOPIA NO TERAHERTZ	38
2.4	QUIMIOMETRIA	41
2.4.1	Modelo de calibração mutivariada	41
2.4.2	Figuras de mérito	42
2.4.3	Pré-Processamento dos Dados	44
3.	ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE DOS POLIMORFOS DO MEBENDAZOL	46
3.1	INSTRUMENTOS E MEDIDAS RAMAN	46
3.2	AMOSTRAS (MEBENDAZOL)	49
3.3	TRATAMENTOS QUIMIOMÉTRICO E ESTATÍSTICO DOS DADOS	50
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PARTE 1 DOS OBJETIVOS	51
3.4.1	Caracterização do Mebendazol	51
3.4.2	Aplicando medidas micro-Raman na região das baixas frequências vibracionais.	57
3.4.3	Comparando medidas micro- e macro-Raman utilizando instrumento Raman portátil e de bancada	64
3.4.4	Influência das morfologias e tamanhos das partículas do MBZ nas medidas micro-Raman	69
3.5	CONCLUSÃO DA PARTE 1 DOS OBJETIVOS	72

4.	CONSTRUÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO RAMAN .	74
4.1	COMPONENTES DO ESPECTRÔMETRO RAMAN.....	74
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PARTE 2 DOS OBJETIVOS	75
4.2.1	Construção do espectrofotômetro Raman	75
4.2.2	Modelos de calibração multivariada utilizando espectros do espetrômetro Raman construído.....	80
4.3	CONCLUSÃO DA PARTE 2 DOS OBJETIVOS.....	82
5.	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS POLIMORFOS DA TEOFILINA.....	84
5.1	DESIDRATAÇÃO DA TEOFILINA MONOIDRATADA (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA).....	84
5.2	AMOSTRAS (TEOFILINA).....	91
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PARTE 3 DOS OBJETIVOS	92
5.3.1	Caracterização das amostra da Teofilina.....	92
5.3.2	Análise do monocristal hidratado e desidratado da Teofilina	97
5.3.3	Estudo da desidratação da teofilina monoidratada empregando espectroscopia Raman e Terahertz.....	99
5.4	CONCLUSÃO DA PARTE 3 DOS OBJETIVOS.....	104
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106

1. INTRODUÇÃO

Acredita-se que boa parte dos fármacos, também chamados de Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), apresentem polimorfismo que é a capacidade de um composto apresentar diferentes hábitos cristalinos. Dentre eles estima-se que um terço possa formar hidratos em que moléculas de água compõem a estrutura cristalina. Os polimorfos de um IFA podem ser formados espontaneamente ou intencionalmente como é o caso de muitos dos co-cristais e sais de IFAs. Além de hidratos, os polimorfos podem ser classificados como anidros (quando o cristal é formado apenas pela molécula do IFA), solvatos (quando um solvente faz parte da célula unitária), co-cristalinos (quando duas ou mais moléculas compõem a célula unitária, sendo que estas duas formam fases sólidas quando estão sozinhas), como sais (quando um íon do IFA forma um sal com um contra-íon) e amorfos (quando o sólido não apresenta organização estrutural) (Brittain, 2009).

As diferentes formas cristalinas de um composto farmacêutico afetam suas características físico-químicas dentre elas higroscopicidade, volume molar, ponto de fusão, solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade termodinâmica, dureza, reologia, entre outras. Como exemplo, a compressão de um comprimido é diretamente afetada pela densidade de seus compostos. Os hidratos, por exemplo, possuem menor densidade do que sua forma anidra dada pelos espaços criados devido à presença da água na célula unitária. O processo de compressão é ajustado para uma densidade esperada dos sólidos do medicamento (IFA + excipientes) e, portanto, se há a presença de uma fase polimórfica diferente daquela esperada os comprimidos podem apresentar falhas afetando a sua qualidade.

Um dos maiores problemas enfrentados no desenvolvimento de novas drogas é a baixa biodisponibilidade. É comum novos compostos candidatos a medicamentos apresentarem baixa solubilidade em água ou em soluções ácidas aquosas, que são os ambientes químicos em que esses compostos são expostos no sistema gástrico. A solubilidade afeta diretamente a biodisponibilidade e, por sua vez, a eficácia do medicamento. De acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP – United States Pharmacopoeia) o IFA pode ser classificado em relação a sua solubilidade em água como mostrado na Tabela 1. Esse problema de solubilidade é mais preocupante visto que mais de 40% das novas drogas sintetizadas são praticamente insolúveis em água ($< 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Takagi *et al.*, 2006).

Tabela 1: Classificação quanto à solubilidade aquosa de acordo com a Farmacopeia dos Estados Unidos.

Classificação	Solubilidade (mg.mL ⁻¹)
Livre solubilidade	100-1000
Solúvel	33-100
Moderadamente solúvel	10-33
Ligeiramente solúvel	1-10
Muito ligeiramente solúvel	0,1-1
Praticamente insolúvel	< 0,1

Fonte: Censi e Di Martino, 2015)

A forma mais comum de aumentar a taxa de dissolução dos compostos farmacêuticos é diminuir o tamanho das partículas a fim de aumentar a superfície de contato do sólido com o meio de dissolução. No entanto, formas mais eficientes foram sendo desenvolvidas como o descobrimento de novas fases polimórficas dos compostos farmacêuticos, síntese de sais dos fármacos, solvatos, co-cristais e a utilização de carreadores do medicamento como supramoléculas (por exemplo ciclodextrinas) e polímeros (Censi e Di Martino, 2015). Além disso, a conversão do sólido em fase amorfa tem se tornado uma opção para alguns fármacos uma vez que essa fase é mais solúvel do que a cristalina (Douroumis e Fahr, 2013).

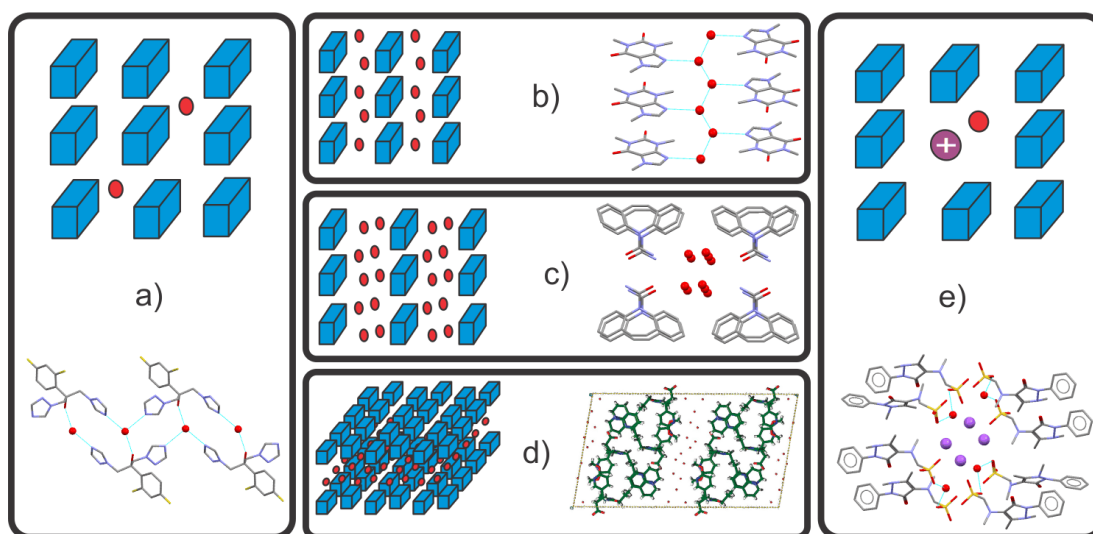
Para exemplificar, a griseofulvina é um IFA com propriedades antifúngicas que possui alta permeabilidade celular, mas sua forma cristalina possui baixa solubilidade aquosa. A fim de melhorar sua biodisponibilidade a indústria farmacêutica estuda o uso desse composto em fase amorfa. O problema de usar a fase amorfa de um composto é que ela se converte na forma cristalina com o tempo. Com base nisso, Mah *et al.* (2015) estudaram a estabilidade da fase amorfa da griseofulvina sob diversos níveis de umidade e temperatura utilizando espectroscopia Raman como técnica de análise. Os autores verificaram que com dez dias de estocagem em 30 °C a cristalinidade total aumentou de 1% para 10%.

Antes chamados de pseudopolimorfos, os solvatos (incluindo os hidratos) são hoje nomeados de solvatomorfos (Brittain, 2009). Os solvatomorfos do tipo hidratado possuem sua própria classificação (de acordo com Morris) referente à disposição das moléculas de água na rede cristalina (Figura 1), que são: hidratos isolados (quando as moléculas de água não possuem interações intermoleculares entre si); hidratos tipo canal (quando as moléculas de água formam canais ao longo do cristal por meio de ligações de hidrogênio; esses canais podem ser do tipo simples, estendido ou planos. No primeiro caso é formado apenas uma sequência de moléculas de água, no segundo por mais de uma sequência de moléculas de água, e, por fim, os canais planares que são formados por uma camada de moléculas de água em um plano do cristal); hidratos iônicos (as moléculas de água interagem com algum contra-íon do fármaco presente

no cristal) (Morris e Hornado, 1993). Na Figura 1 são mostrados exemplos de IFAs hidratados e suas classificações.

Os polimorfos hidratados do tipo canal em geral possuem um equilíbrio termodinâmico menos estável comparado com os hidratos isolados. Isso ocorre pois os canais facilitam a mobilidade da molécula de água permitindo a desidratação do cristal. Os polimorfos hidratados isolados apresentam bandas estreitas nos eventos de perda da água na calorimetria exploratória diferencial. Também, apresentam uma banda estreita referente ao estiramento da ligação O-H da água no espectro de infravermelho. Em ambos os casos, os polimorfos hidratados do tipo canal apresentam banda larga.

Figura 1 - Classificação dos polimorfos hidratados quanto à estrutura da molécula de água. a) hidrato isolado (Exemplo: fluconazol monohidratado), b) hidrato canal simples (Exemplo: cafeína monohidratada), c) hidrato canal estendido (Exemplo: carbamazepina dihidratada), d) hidrato canal planar (Exemplo: composto **1** (Kiang *et al.*, 2009)), e) hidrato iônico (Exemplo: dipirona sódica monohidratada). Os paralelepípedos azuis e as esferas vermelhas representam as moléculas orgânicas e da água, respectivamente. Em e) a esfera lilás representa o contraíon.



Fonte: Paiva (2019).

As operações unitárias farmacêuticas são os principais responsáveis pelas transformações de fase sólida entre os polimorfos de um IFA. Tais processos podem induzir transformações polimórficas para anidros metaestáveis ou a formação de hidratos por meio da hidratação. Também pode induzir a conversão do IFA na forma mais estável que pra alguns casos pode ser indesejada. O processo de granulação úmida é amplamente utilizado na indústria farmacêutica. Essa operação unitária consiste de uma leito fluidizado onde é depositado o medicamento em pó sob um contra fluxo de um líquido composto por água e polímeros. Esse líquido tem a função de aglomerar o pó do fármaco com a finalidade de formar grânulos com

tamanhos controlados (Suresh *et al.*, 2017). A simples presença da água nesse processo pode induzir a transformação de fase de diversos compostos que apresentem solvatomorfos do tipo hidratado.

A teofilina, um composto com propriedades broncodilatadoras, é um exemplo de IFA que possui fase cristalina monohidratada do tipo canal simples. Durante sua fabricação, a forma hidratada é produzida e, na etapa de secagem da granulação úmida todo o conteúdo deve ser transformado na forma anidra cineticamente estável, denominado de polimorfo II (Bobrovs *et al.*, 2015). No entanto, Airaksinen *et al.*, 2004, demonstraram, utilizando dados de difração de raios-X com variação da temperatura, que a transformação pode não ser completa. Foi demonstrado que até 20% de impurezas podem permanecer no final do processo à 90 °C. Essa impureza é composta por um metaestado cristalino da teofilina que é observado em temperaturas entre 30 e 50 °C. Phadnis e Suryanarayanan, 1997, sugerem que este metaestado consiste do polimorfo monohidratado desidratado, ou seja, composta pela teofilina no arranjo monoclinico da forma hidratada, porém com espaços vazios deixados pelos canais das moléculas de água e, portanto, essa forma polimórfica é instável nas condições ambientes, pois é facilmente reidratada. Por fim, os autores mostram que a mistura de fases contendo o metaestado e a Forma II (estado cinético), se mantêm até 140 °C. Até o momento, nenhum trabalho propôs uma estrutura desse metaestado, denominado por alguns trabalhos de Forma III da teofilina. Isso se deve à dificuldade de obtenção de um monocristal com qualidade suficiente para aquisição de dados de difração de raios-X de monocristais. Neste caso, a espectroscopia Raman junto com cálculos quânticos computacionais, podem ser boas estratégias para a possível elucidação da estrutura desse metaestado.

Um caso bastante complexo, e por isso muito estudado, são as transformações de fase sólida da carbamazepina di-hidratada. Esse IFA, utilizado no tratamento da epilepsia, possui 4 polimorfos anidros conhecidos e uma fase diidratada do tipo canal estendido (Figura 1c). A desidratação da forma diidratada pode levar à formação da estrutura amorfa nas condições de pressão de vapor <7,6 torr à 44 °C, enquanto que à 44 °C e pressão de vapor >7,6 torr a forma polimórfica triclinica é formada. Já a forma monoclinica é formada pela desidratação nas condições com pressão de vapor saturado e 90°C (Ceolin *et al.*, 1997; Han e Suryanarayanan, 1998; Himes *et al.*, 1981). Meyer *et al.*, 1992, reportaram a falha no tratamento terapêutico da epilepsia onde os autores atribuíram à falta de controle da formação do polimorfo diidratos da carbamazepina durante a estocagem desses medicamentos (Kogermann *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 1992).

O mebendazol (MBZ) é um IFA que possui atividade anti-helmíntica e apresenta três formas cristalinas anidras denominadas como Formas A, B e C as quais foram bastante estudadas. É um IFA importante para a saúde mundial, pois a WHO (*World Health Organization*) estima que um quarto da população mundial sofra com infestações parasitárias intestinais. O MBZ está presente na lista da WHO como medicamento essencial para a saúde pública, pois é um anti-helmíntico de amplo espectro, possui baixo custo de produção, alta eficiência e fácil administração. O controle das formas polimórficas presentes no medicamento de MBZ é bastante importante, principalmente, pelo fato de que a presença de mais de 30% da forma A na formulação torna o medicamento inativo (Legesse *et al.*, 2004). A forma C é preferível pela indústria farmacêutica, pois apesar de possuir mesma atividade que a forma B, sua toxicidade é menor (Brits *et al.*, 2010; Garbuio *et al.*, 2014; Rodriguez-Caabeiro *et al.*, 1987).

As curvas de análise térmica mostram que a Forma A do MBZ é a termodinamicamente estável (Calvo *et al.*, 2016; De Villiers *et al.*, 2005). No entanto, as três formas polimórficas são estáveis à temperatura ambiente e, por isso, podem coexistir no medicamento o que vem sendo demonstrado em estudos de comprimidos comerciais (Ayala *et al.*, 2008; Liebenberg *et al.*, 1998).

A técnica mais usual para distinção das formas cristalinas de fármacos é a difração de raios-X de pós (PXRD). No trabalho de Villiers *et al.*, 2005, foi desenvolvido um estudo a fim de analisar as transformações cristalinas da forma C do MBZ em função da temperatura e compressão, acompanhado por PXRD. Os autores concluíram que a forma C é estável até 179°C, convertendo-se na forma A acima dessa temperatura. A análise de compressão, que também pode ocasionar aumento da temperatura local, demonstrou que nenhuma conversão ocorreu aplicando-se uma pressão de até 306 MPa (22 ton/pol²) por 15 segundos.

Outro meio de identificação das formas polimórficas do MBZ é baseado em técnicas de dissolução, pois a taxa de dissolução de cada forma cristalina é diferente em diversos tipos de solução. O método de dissolução USP 30 é adotado pela farmacopeia brasileira e americana (USP) e usa como meio de dissolução o ácido clorídrico e o laurilsulfato de sódio como surfactante. Esse teste é utilizado para diversos IFAs que apresentam baixa taxa de dissolução em soluções aquosas. Entretanto, muitos autores afirmam que o método de dissolução USP 30 não é capaz de identificar as formas cristalinas do MBZ e, por isso, propõem modificações no teste padrão da USP (Honorato *et al.*, 2012; Swanepoel *et al.*, 2003).

Swanepoel *et al.*, 2003, demonstraram que para o método USP as três formas do MBZ apresentam solubilidade equivalentes (maior que 94%). No entanto, quando removido o

surfactante do meio de dissolução as diferenças são mais significativas sendo 75% para forma C, 37% para B e 20% para A.

Visto que a qualidade dos produtos farmacêuticos é diretamente afetada pelas mudanças de fases polimórficas, é de suma importância conhecer intimamente a natureza química desses sólidos, seus mecanismos físico-químicos de transformação entre fases sólidas, bem como as operações unitárias farmacêuticas que provocam tais transformações. As espectroscopias vibracionais são ótimas ferramentas de estudo desses mecanismos de transformação sólida, pois proporcionam uma informação a nível molecular além da estrutural. Além disso, podem ser acopladas às operações unitárias para o monitoramento em tempo real da composição dos produtos farmacêuticos.

Diversos trabalhos na literatura demonstram o uso das espectroscopias vibracionais para a análise do MBZ (Calvo *et al.*, 2016; Kachrimanis *et al.*, 2010). Ayala *et al.*, 2008, avaliaram a habilidade das espectroscopias no infravermelho médio (MIR), próximo (NIR) e Raman na distinção das formas polimórficas do MBZ. No trabalho foram avaliados medicamentos comercializados no Brasil e na Alemanha. As três técnicas vibracionais citadas são sensíveis às vibrações das ligações intramoleculares (médias frequências no caso do MIR e Raman). Tais técnicas foram capazes, de forma indireta, de distinguir os polimorfos do MBZ. Formas cristalinas diferentes mudam o ambiente das ligações intramoleculares provocando deslocamentos na frequência de vibração, por exemplo, na banda de estiramento da ligação N-H no NIR e na banda de estiramento das ligações C=O e C-H nos espectros MIR e Raman. Esses deslocamentos na energia de vibração são mais pronunciados nesses tipos de ligações químicas, pois as mesmas formam ligações de hidrogênio na rede cristalina que influenciam suas frequências de vibração. Também pode ser observado um alargamento ou estreitamento das bandas, dependendo da forma cristalina, provocado pela mudança na densidade vibracional de estados (VDOS). A região referente às vibrações de combinação do NIR também sofre uma série de alterações nas bandas de acordo com a forma polimórfica. Os resultados do trabalho de Ayala *et al.*, 2008, demonstraram que os medicamentos comercializados no Brasil apresentaram as três formas polimórficas do MBZ, enquanto que os medicamentos obtidos no mercado alemão apresentaram somente a forma C, como recomendado. O autor justifica a melhor qualidade do medicamento comercializado na Alemanha pelo fato da farmacopeia europeia adotar o uso da espectroscopia MIR no controle de qualidade, tornando mais rápido, acessível e eficaz a caracterização desse IFA no processo industrial.

Também utilizando espectroscopia vibracional, Silva *et al.*, 2015, desenvolveram modelos de calibração multivariada, empregando a regressão por mínimos quadrados parciais

(do inglês *Partial Least Squares* – PLS), para determinação dos teores dos polimorfos do MBZ na matéria prima utilizando as espectroscopias NIR e MIR por meio de medidas de reflectância difusa e reflectância total atenuada (ATR), respectivamente. Os teores dos polimorfos A e C variaram nas misturas de 0 a 100% m/m, enquanto aqueles do polimorfo B variaram de 0 a 30% m/m. Os melhores valores alcançados para o erro de previsão dos modelos (RMSEP % m/m) foram de 2,37%, 1,23% e 1,48% para as Formas A, B e C, respectivamente, utilizando a espectroscopia NIR.

Ainda na região espectral do NIR, utilizando três diferentes equipamentos portáteis, Silva *et al*, 2017, demonstraram que os modelos PLS foram equivalentes aos calculados com os dados do equipamento de bancada. As amostras testadas foram as mesmas amostras utilizadas no trabalho anterior de Silva *et al.*, 2015. Valores de RMSEP de 1,01%, 2,09% e 2,41% m/m, para as formas A, B e C, respectivamente, foram alcançados com um dos equipamentos NIR portátil utilizado no estudo.

As formas polimórficas do MBZ (A, B e C) também foram analisadas pela espectroscopia terahertz, que é uma técnica de absorção no infravermelho distante (0,3 a 6 THz – 10 a 200 cm^{-1}). Essa técnica é bastante utilizada para análise de IFAs sólidos visto que é uma região espectral rica em informações das vibrações da rede cristalina (modos fônons de vibração). Silva *et al.*, 2017, desenvolveram modelos de calibração multivariada (PLS) utilizando misturas ternárias dos polimorfos do MBZ. Valores de RMSEP de 1,5%, 1,2% e 1,8% m/m foram obtidos para os polimorfos A, B e C, respectivamente.

Diversos trabalhos na literatura chamam a atenção para um parâmetro importante quando se deseja realizar medidas de espalhamento Raman de fármacos para fins quantitativos, que é a região iluminada pelo laser sobre a amostra, *spot* do laser (Shin e Chung, 2013). Nesses trabalhos são demonstradas estratégias em que um *spot* do laser macro (*spot* do laser superior a 80 μm de diâmetro) é aplicado (Hennigan e Ryder, 2013; Kim *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017, 2015, 2014) e são empregados instrumentos que operam somente na região das médias frequências vibracionais (200 a 1900 cm^{-1}). Portanto, até o momento, não são encontrados espectrofotômetros Raman comerciais com configuração macro e que acesse a região das baixas frequências vibracionais. Assim, o desenvolvimento de instrumentos Raman que operem nessa região espectral e empreguem *spot* de laser macro torna-se relevante.

Baseado nos trabalhos citados, as espectroscopias vibracionais possuem características adequadas para a análise de formas polimórficas de IFAs, sendo essas técnicas comumente aplicadas empregando quimiometria, que é uma matéria que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para análise de dados químicos de natureza multivariada.

1.1. OBJETIVOS

Neste trabalho as espectroscopias Raman e terahertz foram aplicadas para a análise qualitativa e quantitativa de formas polimórficas de fármacos. A tese está dividida em três partes:

- **Parte 1** Emprego da espectroscopia Raman para análise das misturas dos polimorfos do mebendazol:
 - **Parte 1a** - Aplicando medidas micro-Raman na região das baixas frequências vibracionais;
 - **Parte 1b** - Comparando medidas micro- e macro-Raman utilizando instrumento Raman portátil e de bancada.
- **Parte 2** Construção e aplicação de um espectrofotômetro Raman que opera nas regiões das baixas e médias frequências vibracionais e com variação de *spot* do laser;
- **Parte 3** Estudo da desidratação e reidratação da teofilina monohidratada utilizando as espectroscopias Raman e terahertz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados aspectos teóricos sobre temas comuns para os capítulos seguintes desta tese que são: espectroscopia Raman, instrumentação Raman, espectroscopia terahertz e quimiometria.

2.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

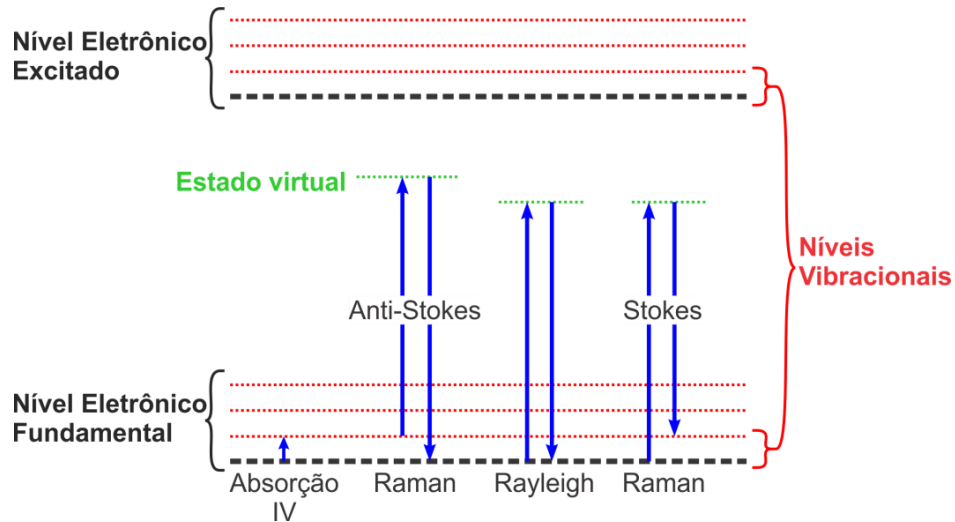
O uso do espalhamento da luz para medidas espectroscópicas foi descoberto e descrito no ano de 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman. O efeito foi observado quando C. V. Raman fez incidir um feixe monocromático de luz visível em uma amostra e percebeu que além do espalhamento com o mesmo comprimento de onda da radiação incidente (espalhamento elástico), uma pequena parcela da luz espalhada possuía comprimentos de onda diferente do feixe incidente (espalhamento inelástico).

Vários fenômenos podem ocorrer quando um fóton incide em uma molécula, como a absorção, transmissão, emissão, reflexão, refração e espalhamento. Enquanto que na absorção a energia de um fóton infravermelho pode ser absorvida completamente e utilizada para promover uma transição vibracional, no caso do espalhamento da luz, o fóton, geralmente na região do visível, é aniquilado e instantaneamente outro é espalhado em uma direção qualquer. Quando o espalhamento ocorre com energias diferentes a do fóton incidente, significa que parte dessa energia foi utilizada para excitar um estado vibracional de uma molécula. Por exemplo, utilizando uma fonte de excitação com comprimento de onda de 532 nm (18796 cm^{-1}), uma molécula que possua um grupamento carbonila, deverá espalhar um fóton com comprimento de onda em torno de 585 nm (17094 cm^{-1}), pois a diferença, 1702 cm^{-1} , se encontra na região do estiramento desse tipo de ligação química. Dessa forma, detectando os fótons espalhados na região próxima ao do laser incidente é possível obter indiretamente um espectro vibracional (Keresztury, 2002).

O espalhamento da luz ocorre independente do comprimento de onda incidente e pode se manifestar de três formas: o espalhamento elástico (também chamado de Rayleigh) que possui mesmo comprimento de onda da fonte, e os espalhamentos inelásticos, chamados de espalhamento Raman, que podem ser do tipo Stokes e Anti-Stokes (Figura 2). O espalhamento Stokes ocorre quando a radiação espalhada possui menor energia (maior comprimento de onda) que a radiação incidente de forma que, a diferença das energias dos dois feixes de radiação é igual a diferença de energia de uma transição vibracional. O espalhamento Anti-Stokes ocorre

quando o feixe incidente atinge uma molécula que já se encontra em um estado vibracional excitado e, por isso, a radiação espalhada inelasticamente possui maior energia (menor comprimento de onda) que aquela da radiação incidente, i.e. sua energia é a soma da energia do feixe incidente mais a energia do relaxamento da vibração. A probabilidade de ocorrência do espalhamento Anti-Stokes é menor que o Stokes, pois necessita de moléculas no estado vibracional excitado e, à temperatura ambiente, a população no estado excitado é menor que aquela que está no estado fundamental. De modo geral, o fóton incidente promove uma excitação para um estado virtual, espalhando outro fóton via modelo Anti-Stokes ou Stokes (Skoog *et al.*, 2009).

Figura 2 - Diagrama genérico das energias dos estados fundamentais e excitado eletrônicos e vibracionais. Destaque para o espalhamento Raman Anti-Stokes e Stokes.



Fonte: Paiva (2019).

O modelo teórico que descreve o efeito do espalhamento Raman é dado pela Equação 1:

$$\vec{\mu}' = \bar{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi c \tilde{\nu}_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_{k0} \vec{E}_0 \times [\cos(2\pi c(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k)t) + \cos(2\pi c(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_k)t)] \quad (1)$$

onde $\vec{\mu}'$ é o momento de dipolo induzido, $\vec{E}_0$ é o campo elétrico da radiação incidente, $\bar{\alpha}_0$ é o tensor de polarizabilidade da molécula na geometria de equilíbrio, $\left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_k} \right)_0$ é a derivada do tensor de polarizabilidade fora do equilíbrio, Q_k é a coordenada normal do k -ésimo modo vibracional,

$\tilde{\nu}_0$ e $\tilde{\nu}_k$ são os números de onda da radiação incidente e do k -ésimo modo vibracional, respectivamente (Keresztury, 2002).

A Equação 1 possui três cossenos com diferentes argumentos, ou seja, significa que o dipolo induzido pode oscilar com três diferentes números de onda: $\tilde{\nu}_0$, $(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_k)$ e $(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k)$. O primeiro cosseno é parte do termo da equação que descreve o espalhamento Rayleigh que não tem relação com nenhuma coordenada normal de qualquer modo vibracional. O segundo termo, que possui os dois cossenos restantes, descreve os espalhamentos Raman Stokes ($\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_k$) e Anti-Stokes ($\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_k$) (Keresztury, 2002).

A regra de seleção do espalhamento Raman é diferente da espectroscopia de absorção no infravermelho. Para que a absorção ocorra, pelo menos uma das componentes do momento de dipolo elétrico da molécula deve mudar durante a vibração, ou seja, quando a derivada do momento de dipolo difere de zero $\left[\left(\frac{\partial \mu_i}{\partial Q_k}\right)_0 \neq 0\right]$. Dessa forma, o campo elétrico do fóton incidente pode entrar em ressonância com o movimento vibracional da ligação e, assim, promovê-lo para um estado energético excitado. Quanto maior for a variação do dipolo da molécula com o modo normal, mais intensa será a banda de absorção no espectro da região do infravermelho e, por esse motivo, a banda da carbonila no espectro do infravermelho é intensa.

Na teoria do espalhamento Raman a variação do tensor de polarizabilidade com a vibração molecular é quem determina a atividade do espalhamento Raman. Portanto, se um modo vibracional possui $\left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_k}\right)_0 \neq 0$ ele é ativo no Raman, se $\left(\frac{\partial \bar{\alpha}}{\partial Q_k}\right)_0 = 0$ não é ativo, pois cancela todo o segundo termo da Equação 1. Diferente do processo de absorção, no espalhamento não há a necessidade de um dipolo, pois o fóton incidente provoca um dipolo instantâneo na ligação química perturbando a polarizabilidade da nuvem eletrônica (Keresztury, 2002).

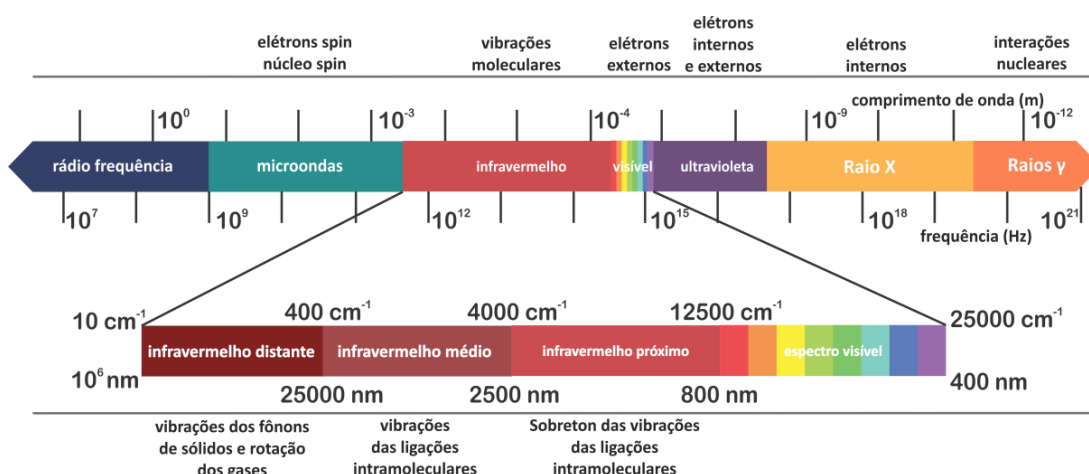
A sensibilidade da espectroscopia Raman depende da natureza da amostra. Moléculas que possuem ligação química com intenso dipolo e elétrons pouco deslocalizados, como no caso da ligação O-H da água, são menos susceptíveis à perturbação da sua polarizabilidade e por isso a água, que possui uma intensa banda no espectro de absorção na região do infravermelho, no Raman sua banda é pouco intensa. Já moléculas com maior volume eletrônico e elétrons bastante deslocalizados, como nos compostos aromáticos, são mais susceptíveis à perturbação da polarizabilidade e, portanto, mais sensível ao espalhamento Raman (Skoog *et al.*, 2009).

A espectroscopia Raman é muito utilizada no estudo de IFAs, pois esses compostos possuem estruturas cristalinas de compostos aromáticos que apresentam intensas bandas tanto na faixa das médias quanto na de baixas frequências do Raman.

2.1.1 Espectroscopia Raman na região das baixas e médias frequências vibracionais

O espectro eletromagnético é dividido em regiões espectrais de acordo com o efeito físico de interação da radiação com a matéria (Figura 3). O espalhamento Raman é uma espectroscopia vibracional, ou seja, as bandas do espectro possuem energias compreendidas na faixa do infravermelho (10 a 4000 cm^{-1}). No entanto, o espectro Raman é medido indiretamente, pois a região espectral mais explorada para a operação das fontes de excitação e detectores está localizada na faixa do visível e/ou infravermelho próximo (500 a 1100 nm).

Figura 3 - Divisão do espectro eletromagnético quanto aos efeitos físicos da radiação com a matéria.



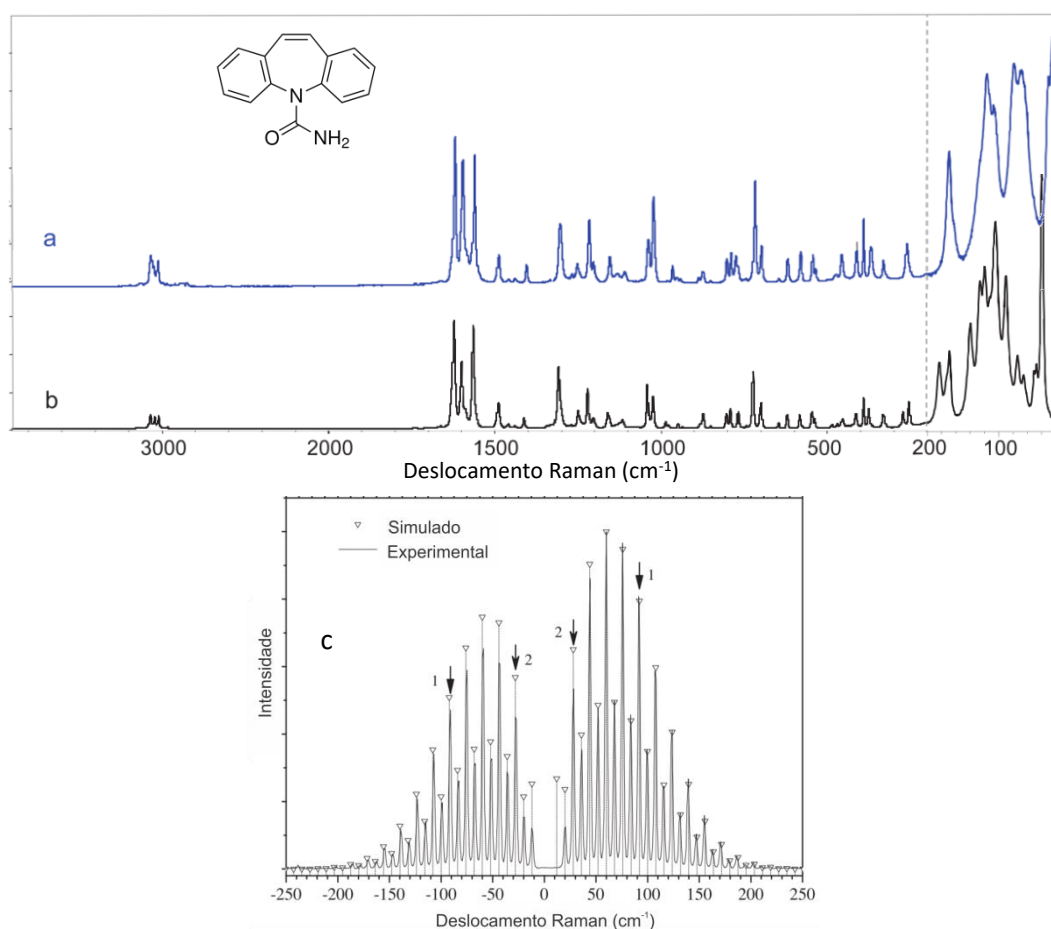
Fonte: Paiva (2019).

A espectroscopia Raman tradicional compreende a região de 200 a 4000 cm^{-1} do espectro infravermelho que também pode ser chamada de região das médias frequências vibracionais. Nessa região espectral são observadas bandas das vibrações das ligações intramoleculares. Ainda nessa faixa espectral se encontra a região de impressão digital (200 a 1000 cm^{-1}) que assim é chamada, pois nela são observadas bandas relativas aos movimentos vibracionais coletivos do esqueleto da molécula, sendo assim bem específicas de cada substância.

A região do espectro vibracional Raman de baixa frequência, ou baixa energia vibracional, também é conhecida como a região do terahertz ($0,3$ a 6 THz – 10 a 200 cm^{-1}).

Nessa faixa espectral são observadas bandas referentes às vibrações dos modos fônons de cristais, modos vibracionais intermoleculares, tais como as ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, tanto em líquidos como em sólidos, bem como o espectro rotacional de gases como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Espectros Raman nas regiões de médias e baixas frequências vibracionais de dois polímeros da carbamazepina (a – Forma II) (b – Forma III) (Larkin *et al.*, 2014). Espectro Raman experimental e calculado nas baixas frequências vibracionais mostrando os modos rotacionais puros do gás nitrogênio à 24 °C (c).



Fonte: (Wang *et al.*, 2014).

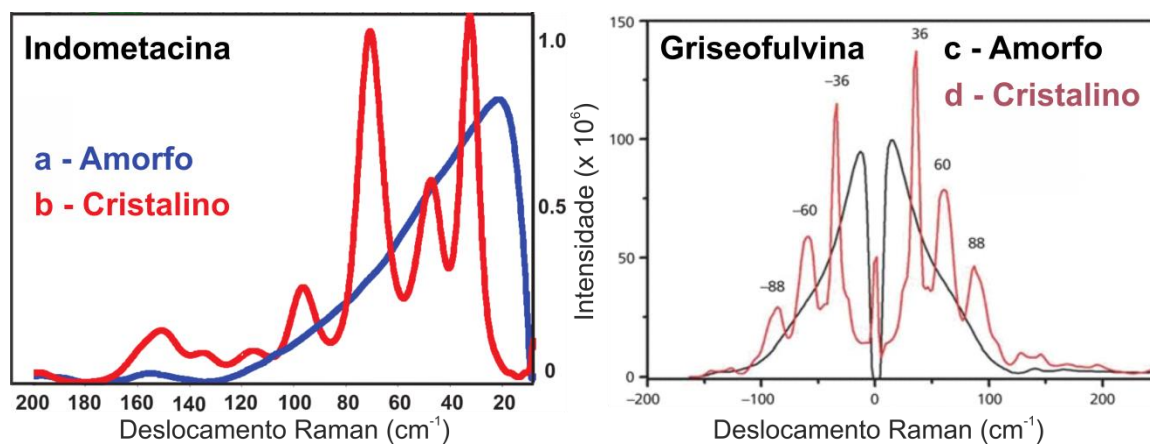
Nas últimas duas décadas, a espectroscopia Raman na região de baixas frequências (Low Frequency Raman Spectroscopy - LFRS) tem ganho bastante relevância para as ciências farmacêuticas, visto que muitos fármacos apresentam polimorfismo. A espectroscopia vibracional de baixas frequências é sensível às diferentes formas polimórficas como mostrado, por exemplo, na Figura 4 para dois polímeros da carbamazepina. Pode-se observar que na região das médias frequências (200 a 4000 cm⁻¹) os espectros dos polímeros são bastante

semelhantes, no entanto, são bem distintos na região dos fônons (10 a 200 cm^{-1}) surgindo assim, uma região de impressão digital relacionada com a estrutura cristalina.

Em um estudo desenvolvido por Larkin *et al.*, 2014, foi demonstrado a aplicabilidade da LFRS na caracterização de polimorfos de diversos fármacos com grandes grupos aromáticos. Nesse estudo foram caracterizados os polimorfos dos fármacos: Forma II e III da carbamazepina; cocristais do IFA apixaban com o ácido fumárico, ácido succínico e D,L ácido málico; a Forma II e a monohidratada da teofilina bem como a cafeína anidra.

Além de ser capaz de diferenciar formas cristalinas, a LFRS também pode caracterizar o estado amorfo de um composto. O espectro de cristais orgânicos, como já mostrado, possui bandas intensas e distintas de cada forma cristalina. No entanto, a forma amorfa apresenta um comportamento espectral comum a todos os sólidos amorfos. No lugar de bandas bem definidas, surge uma banda larga com uma longa calda que cobre boa parte da região das baixas frequências (10 a 120 cm^{-1}), devido ao aumento da densidade de estados vibracionais (VDOS). Na Figura 5 são mostrados dois casos comparando os espectros Raman da forma cristalina e amorfa dos compostos indometacina (Figuras 5a e 5b) e a griseofulvina (Figuras 5c e 5d).

Figura 5 - Espectros Raman na região das baixas frequências da forma amorfa (a & c) e da forma cristalina (b & d) dos IFAs indometacina e griseofulvina, respectivamente.



Fonte: Larkin *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016.

Ainda não se sabe exatamente a origem dessa banda característica dos compostos amorfos na espectroscopia Raman de baixas frequências. Também ainda não são totalmente compreendidas as regras de seleção para sólidos amorfos que faz com que essa banda seja observada no espectro Raman e não apareça no espectro de absorção como na espectroscopia THz. Trabalhos publicados na literatura associam essa banda ao pico de bóson (*boson peak*), porém esse fato não foi devidamente comprovado. O pico de bóson não é responsável pela

banda larga por completo, pois sua origem é estritamente do excesso de VDOS acima do nível de Debye (Larkin *et al.*, 2015; Parrott e Zeitler, 2015; Sibik e Zeitler, 2016).

Outra peculiaridade da região das baixas frequências vibracionais, Raman e THz, é a atribuição das bandas espectrais às espécies envolvidas na vibração molecular. Nas médias frequências, é possível identificar através de tabelas as bandas dos estiramentos e deformações de diversos tipos de ligações químicas para diferentes compostos. No caso do espectro Raman e THz na região de baixas frequências, não é possível prever a frequência de vibração de um modo fônon sem a utilização de ferramentas da química e física teórica. Cada caso deve ser estudado isoladamente utilizando cálculos teóricos, a fim de determinar o movimento vibracional molecular responsável por uma determinada banda no espectro. Para uma melhor comparação desses resultados teóricos vibracionais com os espectros experimentais, em geral, os experimentais são adquiridos em baixas temperaturas (7 K), uma vez que, na temperatura ambiente (298 K), os espectros de baixas frequências apresentam sobreposições. Nessa temperatura, há uma contração da célula unitária deslocando algumas bandas para maiores frequências, além de estreitá-las pelo fato de levar os modos vibracionais para o estado fundamental (Ayala, 2007; Day *et al.*, 2006; Takahashi e Ishikawa, 2013).

As características mencionadas acima mostram que a espectroscopia Raman, especialmente a região das baixas frequências vibracionais, é uma técnica bastante informativa para o estudo de fármacos cristalinos. De fato, a espectroscopia Raman é uma técnica versátil amplamente utilizada para analisar produtos farmacêuticos devido às suas vantagens, como a pequena quantidade de amostra necessária para realizar uma análise, pouca ou nenhuma preparação de amostra e pelo fato da amostra não ser destruída durante a análise (Kachrimanis *et al.*, 2007). Além disso, essa técnica pode ser aplicada usando sondas para monitoramento de processo ou empregando instrumentos portáteis, proporcionando flexibilidade e velocidade. Pode acessar modos vibracionais que não são possíveis na espectroscopia de infravermelho e tem menor influência da banda de água, tornando-a uma técnica espectroscópica interessante para problemas de caracterização ou quantificação.

Em geral, os espectrofotômetros Raman são acoplados a microscópios para medições de amostras sólidas. Microscópios confocais têm uma alta resolução espacial que permite uma investigação de partículas bastante pequenas, independentemente das partículas vizinhas. A amostra é iluminada usando a radiação do laser e uma lente objetiva, em que o tamanho dessa região iluminada (*spot* do laser) pode chegar à 1 μm de diâmetro ou menor. Além disso, há uma profundidade de penetração onde a radiação laser interage com as camadas inferiores da amostra em função da abertura numérica da lente objetiva (NA), comprimento de onda do laser

(λ) e índice de refração da amostra (Gordon e McGoverin, 2011). Portanto, a área amostrada durante uma análise de uma amostra fazendo uso de um micro-Raman é bem pequena. Para algumas aplicações analíticas, no entanto, medidas que representem a composição global da amostra são necessárias a fim de obter as concentrações relativas dos componentes presentes na mistura.

Existem algumas estratégias para cobrir uma área maior da amostra e obter medidas confiáveis para análise quantitativa. Os dados podem ser obtidos calculando-se a média dos espectros Raman obtidos a partir de um mapeamento da amostra, medindo-se os espectros enquanto a amostra é rotacionada ou aumentando a área iluminada pela fonte de radiação (*spot* do laser superior a 80 μm) (Shin e Chung, 2013). A estratégia de mapeamento, geralmente empregada com um micro-Raman, é demorada, pois os espectros de vários pontos em uma amostra devem ser adquiridos. Além disso, as amostras requerem uma homogeneização cuidadosa para o mapeamento devido à alta resolução espacial do micro-Raman. Assim, estratégias como a iluminação macro podem ser mais interessantes para aplicações analíticas em amostras farmacêuticas. Alguns trabalhos apresentam aplicações de medidas macro-Raman em problemas farmacêuticos, por exemplo, na quantificação de mistura polimórfica (Hennigan e Ryder, 2013), de IFAs em comprimidos (Kim *et al.*, 2006), análise qualitativa de IFAs respiráveis (Wang *et al.*, 2014), e composição a granel de produções farmacêuticas (Wang *et al.*, 2017, 2015).

Em geral, os trabalhos acima mencionados indicaram que uma iluminação de área ampla e/ou um tamanho de partícula reduzido podem superar alguns problemas quando empregada uma medida micro-Raman. Mais investigações precisam ser feitas sobre o tamanho das partículas e a influência da morfologia nessas medidas Raman para produzir análises quantitativas farmacêuticas confiáveis. Além disso, vale ressaltar que os métodos descritos na literatura até o momento, utilizaram espectrofotômetros Raman de bancada em suas análises quantitativas. Atualmente, os instrumentos Raman portáteis estão sendo bastante utilizados para análises farmacêuticas. Seu tamanho torna os instrumentos portáteis facilmente aplicáveis a processos industriais tornando-os bastante atrativos para tais finalidades. Além disso, os instrumentos Raman portáteis geralmente empregam medições com iluminação macro e são adequados para aplicações em campo. A viabilidade de instrumentos Raman portáteis tem sido demonstrada para uso em diversas aplicações, como na determinação da porcentagem de liberação e potência de fármacos (Navin *et al.*, 2017) e testes de medicamentos não aprovados/falsificados (Tondepu *et al.*, 2017).

2.2 INSTRUMENTAÇÃO RAMAN

Os espectrômetros Raman possuem quatro principais partes para seu funcionamento: o laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) utilizado como fonte de excitação do espalhamento da radiação; os filtros responsáveis por separar o espalhamento Rayleigh do Raman; o monocromador que tem o papel de isolar os comprimentos de onda espalhados para detecção; e o detector dos comprimentos de onda espalhados.

O deslocamento Raman é calculado referente ao comprimento de onda da radiação incidente. Essa última deve possuir algumas características adequadas para tal finalidade, entre elas: ser bastante estável quanto à potência luminosa, possuir banda de emissão estreita e ser estável quanto ao comprimento de onda emitido. Tais características são encontradas nos lasers gasosos como, por exemplo, o de HeNe (633 nm) e, por isso, são largamente usados nos espectrômetros Raman. Porém, laser no estado gasoso, no geral, possui grandes dimensões físicas e baixa potência luminosa quando comparado ao laser no estado sólido como os baseados em diodos semicondutores. Esses, por sua vez, possuem tamanhos reduzidos e maior potência de radiação, ideais para uso em instrumentos portáteis. Os lasers de diodo semicondutor 785 nm (GaAlAs – arseneto de gálio e alumínio) e o 532 nm (segundo harmônico do Nd:YAG – granada de alumínio e ítrio dopado com neodímio) são os mais utilizados nos espectrômetros Raman dispersivos, que são os que usam grades de difração como elemento monocromador. Ainda existem os Espectrômetros Raman de Transformada de Fourier (FT-Raman) que usam o laser de Nd:YAG com emissão em 1064 nm (Pan *et al.*, 2002).

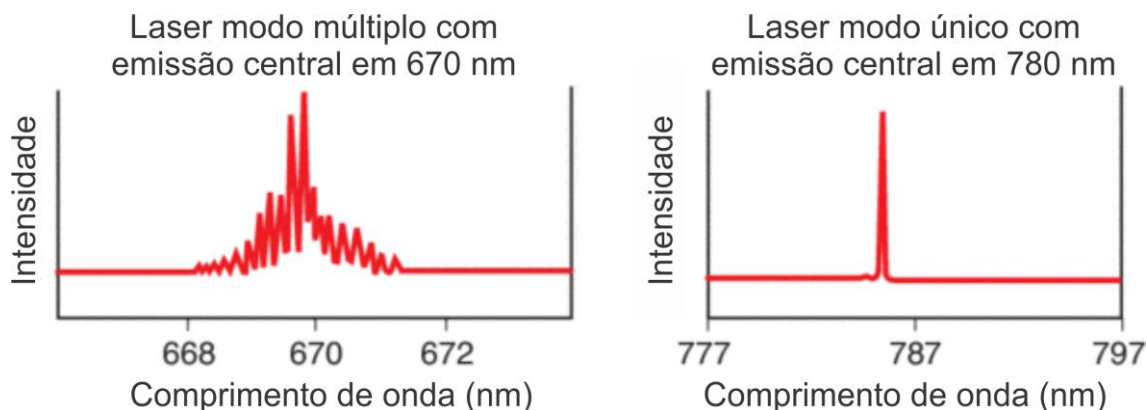
Apesar de o espalhamento Raman ocorrer independente do comprimento de onda incidente, a escolha do laser a ser utilizado no sistema Raman deve levar em conta alguns efeitos paralelos desejados e indesejados. O espalhamento inelástico é um efeito raro, cerca de 1 para cada 10^6 fótons incidentes produzem fótons Raman. Quanto menor for o comprimento de onda do fóton incidente, mais fótons espalhados são gerados, pois a eficiência do espalhamento Raman é proporcional à λ^{-4} , onde λ é o comprimento de onda do laser. Em contrapartida, esses comprimentos de onda mais energéticos irão produzir fluorescência em muitas moléculas, que é o efeito mais indesejado na espectroscopia Raman, pois é de alta intensidade mascarando o espalhamento Raman.

Atualmente, a maior parte dos espectrômetros Raman utiliza laser no infravermelho próximo (1064, 830 e/ou 785 nm). A baixa energia dos fótons na região NIR reduz a possibilidade da fluorescência. Já a baixa eficiência do espalhamento desses fótons é contornada com o aumento da potência luminosa (> 100 mW) do laser NIR. Porém, há um limite de potência luminosa a ser usada para que não haja a degradação da amostra. Existem

amostras bastante sensíveis à degradação, portanto, um sistema que utilize um laser com emissão em 450 nm permite o uso de uma potência menor ($< 3 \text{ mW}$) sendo mais adequado para essa situação. Como pode ser verificado, existe um compromisso entre a eficiência do espalhamento, potência luminosa, sensibilidade da amostra e os efeitos da fluorescência que deve ser levado em consideração na escolha do melhor laser para cada tipo de amostra. De maneira geral, o laser no infravermelho próximo atende à maioria das amostras (Keresztury, 2002).

Os lasers em geral, podem ser classificados em modo espacial simples e multimodo onde a diferença se dá pelo número de modos longitudinais (que são modos múltiplos de $(\lambda_0)^2/2nL$, onde L e n são o tamanho e o índice de refração da cavidade e λ_0 é o comprimento de onda central) que são emitidos pela cavidade do laser como mostrado na Figura 6 para os dois casos.

Figura 6 - Modos longitudinais de emissão de laser de diodo.

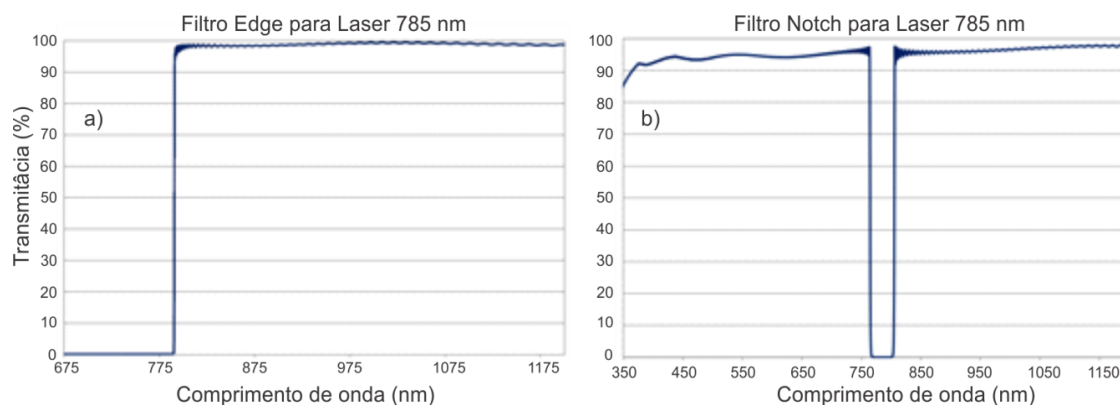


Fonte: Newport, 2019.

Para detecção das baixas frequências vibracionais um laser de modo simples é necessário, pois as emissões vizinhas de um laser multimodo vão encobrir os fótons Raman espalhados próximos ao comprimento de onda central de excitação.

Como a maior quantidade da luz espalhada tem o mesmo comprimento de onda da luz incidente, a qual não tem informações vibracionais da amostra, filtros devem ser utilizados para cortar a radiação Rayleigh e evitar a saturação do detector. Dois tipos de filtros são utilizados, o *edge* e o *notch*. O filtro *edge*, como o nome sugere, possui uma zona de transição de máxima para mínima transmitância (ou vice-versa), de forma que para um lado da fronteira ele corta toda a faixa do espectro e para o outro lado deixa passar o espectro. A Figura 7a mostra um filtro *edge* comum utilizado em espectrômetros Raman com a finalidade de cortar os comprimentos de onda abaixo de 785 nm.

Figura 7 - Espectros de transmissão de filtros a) *edge* e b) *notch* para Raman com laser 785 nm.



Fonte: Paiva (2019).

Já o filtro *notch*, corta uma banda estreita do espectro da radiação espalhada e transmite para ambos os lados dessa banda (Figura 7b) e, por isso, permite a aquisição dos espectros Stokes e Anti-Stokes do espalhamento Raman, ao contrário do filtro *edge* que permite apenas que as bandas Stokes ou Anti-Stokes sejam registradas.

Para a espectroscopia Raman nas baixas frequências vibracionais um sistema de corte da radiação Rayleigh mais sofisticado é requerido. Os filtros *notch* convencionais possuem largura de banda ou faixa de corte muito larga (em torno de 15 nm ou 80 cm^{-1} de deslocamento Raman) de forma que todos os comprimentos de onda espalhados de 10 a 80 cm^{-1} são filtrados junto com a radiação Rayleigh, ou seja, toda essa informação é perdida e o espectro é registrado a partir de 80 cm^{-1} .

Alguns filtros alcançam faixas menores de corte permitindo registrar o espectro Raman a partir de 50 cm^{-1} , mas as principais informações dos modos fônons vibracionais de cristais orgânicos estão compreendidas entre 10 e 50 cm^{-1} . Portanto, o método mais usual para registrar os comprimentos de onda muito próximos da linha do laser é utilizando um sistema de triplo monocromador de grade de difração e, assim, medir o espectro Raman de baixa frequência a partir de 5 cm^{-1} .

O sistema de tripla grade aumenta muito a distância focal do monocromador e, portanto, o espectro é difratado o suficiente ao ponto de ser possível realizar um corte spectral muito próximo ao laser. Esse sistema possui a vantagem de registrar o espectro com alta resolução ($< 0,5 \text{ cm}^{-1}$). As desvantagens são a necessidade de um maior tempo de integração devido à pouca luz que chega ao detector, o impedimento da aquisição simultânea do espalhamento Stokes e Anti-Stokes, bem como um equipamento de maior custo e tamanho físico.

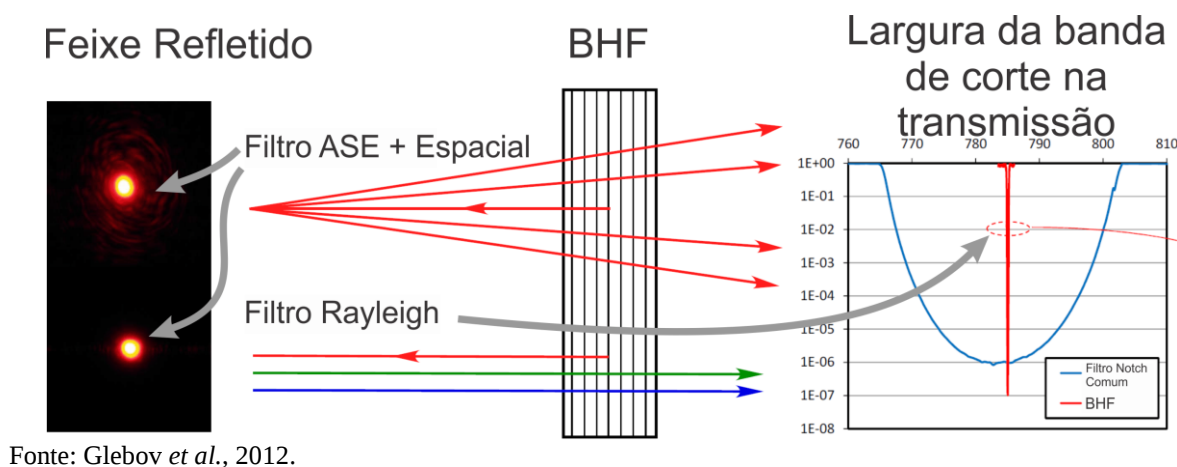
Outra maneira menos usual, é utilizando um filtro de vapor de iodo molecular, onde uma vez estabilizado à certa temperatura, absorve uma fina banda spectral.

Recentemente, foram desenvolvidos filtros *notch* ultrafinos capazes de obter o mesmo desempenho espectral alcançado pelo uso da tripla grade de difração, sem apresentar as desvantagens desta montagem óptica (Glebov *et al.*, 2012; Moser e Havermeier, 2009). Esse filtro pode ser acoplado aos espectrofotômetros Raman com único monocromador ou até no FT-Raman. Tal dispositivo consiste de um vidro PTR (do inglês Photo-Thermo-Reflective) em que é desenhado holograficamente uma grade em seu interior de forma que os espaçamentos entre as ranhuras dessa grade definem o comprimento de onda que sofrerá a difração de Bragg, ou seja, a rejeição do espalhamento Rayleigh. Por esse motivo são chamados de filtro holográfico de Bragg (Bragg Holographic Filter – BHF). A banda de corte desse tipo de filtro é de 1 nm de largura e, dessa forma, é possível adquirir espectro Raman a partir de 5 cm^{-1} . Na prática, o filtro é projetado para refletir, em um determinado ângulo, um certo comprimento de onda enquanto o restante da faixa espectral não sofre difração, sendo então transmitida (Figura 8).

Mesmo um laser de modo simples precisa ser filtrado quanto à sua emissão espontânea amplificada (ASE - *Amplified Spontaneous Emission*). A ASE produz um halo em torno da emissão central do laser que encobre os fótons espalhados na região das baixas frequências vibracionais. Além disso, um laser de diodo contém feixes divergentes, como mostrado na Figura 8 que também devem ser eliminados a fim de evitar reflexões dentro do equipamento e assim, melhorar a qualidade da detecção do espalhamento Raman. Os filtros holográficos de Bragg também são utilizados para tais finalidades. Para tanto, o laser é incidido em um BHF onde a reflexão capturada estará “limpa” espectralmente, devido à difração de Bragg, e espacialmente, pois feixes incidentes em ângulos diferentes do ângulo especificado são transmitidos. Essas características do BHF são essenciais para construção de um espectrofotômetro Raman que detecta as baixas frequências vibracionais. Dessa forma, os filtros ASE e *notch* possuem a mesma tecnologia, difração de Bragg, porém são destinados para finalidades diferentes.

A espectrometria Raman é a única técnica capaz de registrar com facilidade o espectro vibracional completo de uma amostra ($5\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$) (Ayala, 2007). Entretanto, um espectro Raman completo requer somente uma pequena faixa espectral que pode ser na região do NIR ou visível, dependendo do laser de excitação. Utilizando-se, por exemplo, laser com emissão em 633 nm, todo o espectro Raman é registrado com os fótons espalhados entre 633 nm e 850 nm ($0\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$). Portanto, o monocromador deve ter uma alta resolução espectral para ser capaz de distinguir os fótons espalhados nessa estreita faixa, especialmente na região das baixas frequências vibracionais.

Figura 8 - Esquema mostrando a comparação entre os dois modos de uso dos filtros BHF: Captando a radiação refletida e assim filtrada espacialmente e da radiação ASE ou captando a radiação transmitida e assim filtrada da radiação Rayleigh.



O tipo de monocromador mais usado nos espectrômetros Raman dispersivos é o Czerny-Turner. A região de 5 a 200 cm^{-1} está compreendida em uma faixa estreita de aproximadamente 15 nm do espectro visível. Portanto, para uma resolução espectral de 1 cm^{-1} de deslocamento Raman o monocromador deve ter uma resolução de 0,06 nm (Pelletier, 2002).

Outro sistema muito utilizado é baseado em interferômetro e transformada de Fourier (FT-Raman). O funcionamento é o mesmo que os utilizados nos FT-NIR e FT-MIR. A fonte é incidida na amostra, que no caso do Raman é um laser 1064 nm, e os comprimentos de onda espalhados são coletados pelo interferômetro e um espectro no domínio do tempo é adquirido. Utilizando a transformada de Fourier, o espectro no domínio das frequências é obtido (Chase, 2002).

Uma terceira forma de seleção dos comprimentos de onda é utilizando a grade *echelle* combinada com arranjo matricial de CCD (*Charge-Coupled Device*). A grade *echelle*, que significa escada em francês, difrata a radiação em um padrão, onde a primeira linha da matriz de CCD detecta uma parcela do espectro difratado, a segunda linha do CCD detecta a parcela seguinte e, assim por diante até que a última parcela seja detectada pela última linha da matriz de CCD. Dessa forma, é possível obter com um único registro, ampla faixa espectral mantendo a boa resolução, sem partes móveis e garantindo maior velocidade de aquisição do espectro (Pommier *et al.*, 2002).

A maior parte dos instrumentos Raman dispersivos operam na região espectral entre 300 e 1000 nm. É nessa região em que os detectores CCD possuem maior eficiência. Os arranjos de CCD possuem uma série de características que os tornam ideais para seu uso nos espectrômetros

Raman. São dispositivos pequenos, apropriados para instrumentos portáteis. Possuem alta densidade de pixels por área, o que aumenta a resolução espectral. Algumas tecnologias melhoram sua eficiência quântica (EQ) para até 95%. A EQ está relacionada com o aproveitamento de fótons que alcançam o detector. Alta EQ é um pré-requisito para os instrumentos Raman (valores maiores que 70% são requeridos). Também, a alta EQ permite menor tempo de integração e, desta forma, maior velocidade de aquisição dos dados é alcançada. Pode ser utilizado sem a necessidade de refrigeração o que o torna atraente para os equipamentos portáteis (Skoog *et al.*, 2009; Pommier *et al.*, 2002). Já o FT-Raman utiliza detector de germânio ou InGaAs que são mais eficientes na região do NIR (> 1000 nm) do que o CCD.

2.3 ESPECTROSCOPIA NO TERAHERTZ

A espectroscopia terahertz (THz) é uma técnica de absorção no infravermelho distante (10 a 200 cm^{-1} ou $0,3$ a 6 THz) que surgiu no início dos anos 90, mas somente a partir da década dos anos 2000 é que a técnica passou a ganhar maior interesse na área da química analítica. Essa técnica vibracional veio preencher uma lacuna no espectro eletromagnético antes não alcançada pelos instrumentos ópticos baseados em interferômetros (FT-FIR – *Fourier Transform Far Infrared*), uma vez que estes apresentavam melhores desempenhos acima de 5 THz (166 cm^{-1}) (Baxter e Guglietta, 2011).

Assim como a espectroscopia Raman nas baixas frequências vibracionais, a espectroscopia THz também traz informações sobre os modos vibracionais de rede cristalina (fônons) e os modos rotacionais dos gases. Segue a mesma regra de seleção observada para a região do infravermelho convencional, em que o modo vibracional necessita de variação de dipolo para haja absorção da radiação incidente. No caso de modos rotacionais dos gases a molécula necessita ter dipolo permante para na absorção acontecer.

Em geral, os cristais orgânicos apresentam bandas intensas nessa região espectral. Por este motivo, assim como o Raman nas baixas frequências vibracionais, a espectroscopia THz foi bastante exploradas por trabalhos relacionados à estudos de fármacos, como nas transformações de fase sólida da carbamazepina (Zeitler *et al.*, 2007), determinação da cristalinidade da microcelulose (Vieira e Pasquini, 2014), quantificação dos polimorfos do MBZ (Silva *et al.*, 2017) e caracterização de cinco polimorfos do sulfatiazol (Zeitler *et al.*, 2006) entre outros.

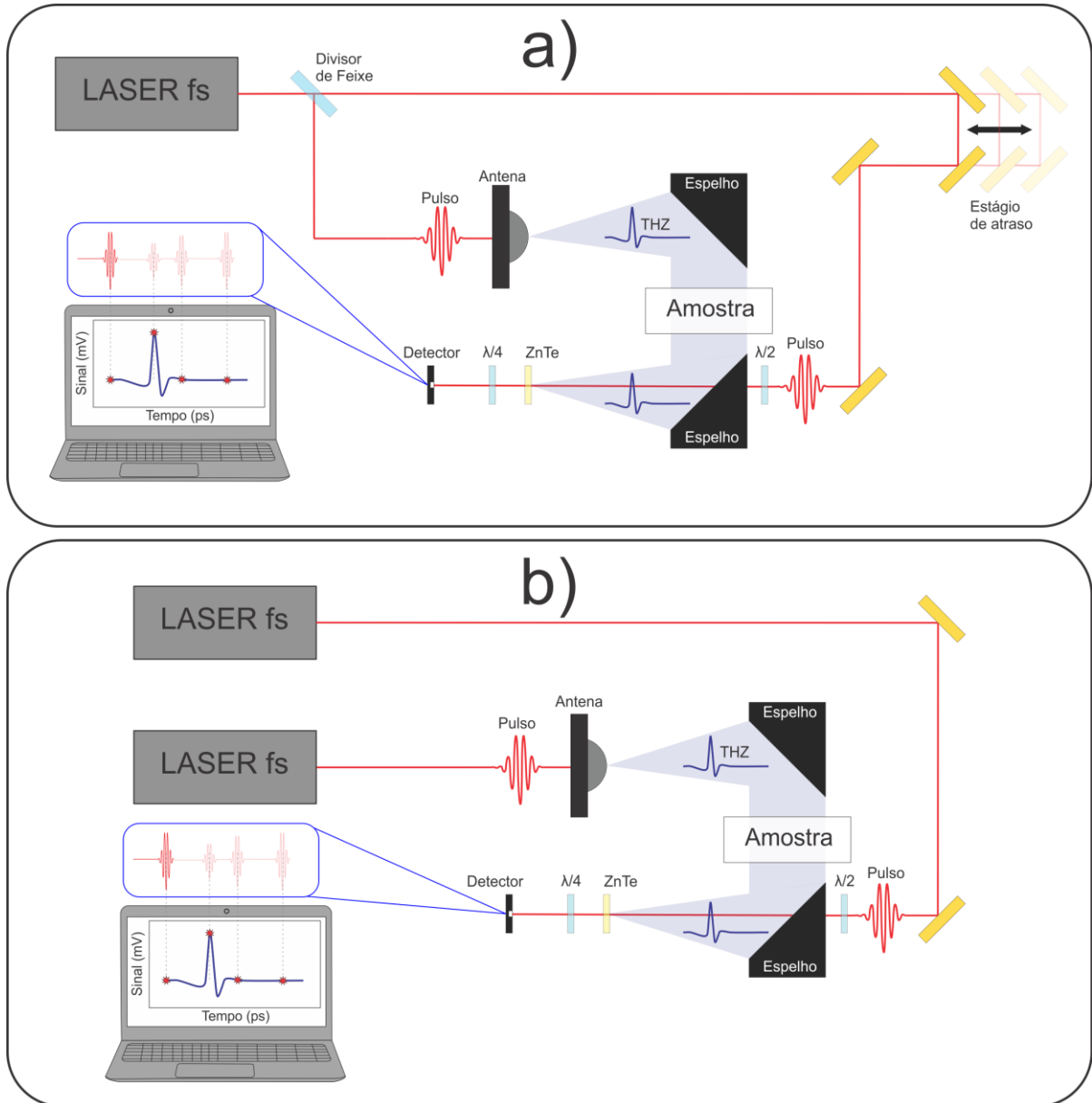
As principais tecnologias que permitiram o surgimento da espectroscopia THz foram o laser pulsante ultra-rápido (femtosegundos de largura de banda de pulso) e a antena fotocondutiva baseada em semicondutores. Quando um pulso de um laser de femtosegundos é incidido em uma antena fotocondutiva, essa emite um pulso largo, na região do espectro THz, devido à recombinação das cargas do semicondutor que estava previamente sob uma diferença de potencial elétrico (Dhillon *et al.*, 2017). A detecção do pulso THz também pode ser feita utilizando-se uma antena fotocondutiva, mas a detecção eletroóptica é mais sensível e, por isso, mais utilizada. Esses sistemas instrumentais de detecção possuem uma grande vantagem frente aos bolômetros utilizados como detectores do sistema FT-FIR, os quais precisam ser resfriados à baixíssimas temperaturas (Zeitler, 2016).

A Figura 9 mostra um esquema de duas configurações instrumentais típicas utilizadas pelos espectrômetros THz. Em ambos, a detecção é realizada em função do tempo e, por isto, é chamada de espectroscopia THz no domínio do tempo (THz-TDS – *Terahertz time domain spectroscopy*). No caso da configuração da Figura 9a, o atraso temporal é feito por um estágio mecânico no pulso do laser de detecção. Já o da configuração mostrada na Figura 9b, que utiliza a tecnologia ASOPS (*asynchronous optical sampling*), o atraso temporal é feito eletronicamente mantendo dois lasers ultra-rápidos sob um atraso fixo entre seus pulsos para que a varredura temporal no pulso THz seja realizada. A detecção eletro-óptica é utilizada em ambas as configurações.

O funcionamento do instrumento com o estágio mecânico inicia-se com a geração de pulsos ultra-rápidos emitidos pelo laser. Um divisor de feixes divide o feixe para dois caminhos onde um é conduzido para a antena de geração do pulso THz. O pulso largo THz produzido é conduzido por espelhos com recobrimento metálico, geralmente ouro, passando pela amostra e sendo focalizada no cristal de ZnTe do sistema de detecção. A outra metade do pulso do laser é conduzida e também focada no cristal de ZnTe. O pulso THz quando percorre o cristal apresenta um comportamento birrefringente que permite um desvio no plano da luz polarizada do pulso do laser de detecção. A amplitude do desvio de polarização do laser é função da amplitude do pulso THz e esse sinal do laser, dependente do sinal THz, é detectado em diferentes momentos ao longo do tempo utilizando o atraso mecânico, como mostra a Figura 10. No caso da configuração que utiliza o atraso eletrônico, um sistema eletrônico é utilizado para travar um atraso de pulso entre dois diferentes lasers ultra-rápidos e a detecção é similar ao sistema mecânico, mas com a vantagem de que a amostragem do pulso THz é feita em mais pontos e, por isso, a resolução é maior. Além disso, por se tratar de um sistema sem partes

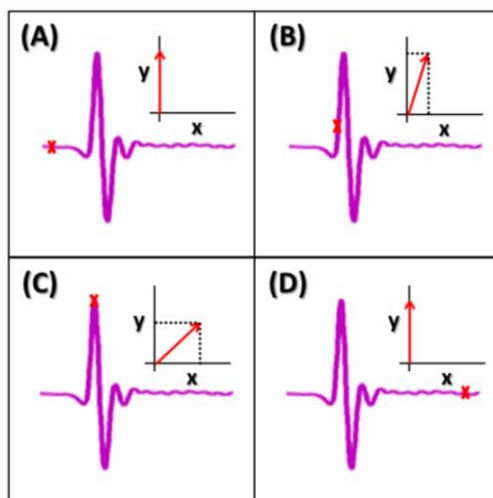
móveis, a precisão da medida também é melhor. No entanto, esse sistema tem maior custo pelo uso de dois lasers ultra-rápidos.

Figura 9 - Configuração óptica instrumental de um THz-TDS utilizando a) atraso mecânico e b) eletrônico (ASOPS).



Fonte: Paiva (2019).

Figura 10 - Processo de detecção do pulso THz através do sistema eletro-óptico mostrando a dependência do plano de polarização detectado do laser em diferentes momentos coincidentes com o pulso THz quando incididos no cristal de ZnTe.



Fonte: Vieira, 2016.

2.4 QUIMIOMETRIA

Nas décadas de 70 e 80 a tecnologia começou a crescer exponencialmente e, acompanhando essa evolução, os espectrofotômetros geravam cada vez mais dados para análises químicas. Também nesta época, a difusão dos microcomputadores permitiu uma maior capacidade de desenvolver cálculos mais complexos com maior velocidade. Essas eram as últimas engrenagens que faltavam para o desenvolvimento da quimiometria como matéria nos cursos de química (Barros Neto *et al.*, 2006). Dessa maneira os químicos puderam extrair mais informações físico-químicas dos dados analíticos gerados pelas técnicas instrumentais, especialmente das espectroscopias vibracionais.

A quimiometria utiliza métodos estatísticos e matemáticos a fim de extrair informação química de dados multivariados. Divide-se em três grandes áreas: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões/classificação e calibração multivariada (Brereton, 2003), das quais somente essa última foi utilizada e será discutida nesta tese.

2.4.1 Modelo de Calibração Multivariada

Atualmente, a maioria das análises espectrofotométricas de multicomponentes tem sido realizada utilizando métodos de calibração multivariada, os quais permitem a determinação da concentração ou parâmetro físico-químico de vários analitos simultaneamente em uma amostra (Araujo *et al.*, 2001).

A regressão baseada nos mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares* – PLS) é o método mais utilizado para diversas finalidades na química analítica multivariada. Esse método decompõe os dados multivariados a fim de encontrar a maior covariância entre a matriz de dados espectrais, por exemplo, e o vetor contendo os valores do parâmetro de interesse da amostra (comumente a concentração do analito) (Ferreira, 2017).

Essa decomposição dos dados cria duas outras matrizes chamadas de matriz de pesos e matriz de escores com a diferença que essas carregam a variância conjunta da matriz **X** e vetor **y**. Em linhas gerais, essa decomposição matemática cria um novo sistema de coordenadas cartesianas chamadas de Variáveis Latentes (VL). Tal sistema possui origem situada na média dos dados multidimensionais sendo que agora seus eixos apontam para os sentidos da covariância dos dados multidimensionais. Dessa forma, a primeira VL aponta para o sentido de maior covariância, a segunda VL para o sentido de segunda maior covariância ortogonal a primeira VL e assim por diante. O PLS é aplicado na matriz de dados espectrais **X** e no vetor **y** conforme mostra a equação 2 e 3:

$$\begin{aligned} \mathbf{X} &= \mathbf{TP} + \mathbf{E} & 2 \\ \mathbf{y} &= \mathbf{Tq} + f & 3 \end{aligned}$$

onde **T** é a matriz de escores que contém os valores das projeções das amostras no sistema de eixos das VLs. **P** e **q** contém os pesos da matriz **X** e vetor **y**, respectivamente, **E** e **f** são as matrizes dos resíduos da decomposição dos dados (Souza *et al.*, 2013).

Durante a regressão com o PLS, uma etapa de validação interna do modelo é feita sendo o método da validação cruzada total (*leave one out*) a mais empregada. Em um conjunto com *n* amostras, são construídos *n* modelos de calibração onde cada modelo possui *n-1* amostras e, portanto, todas as amostras são previstas pelo modelo em que ela ficou de fora. Já a validação externa, usa-se amostras conhecidas, que não participaram da etapa de calibração, para que sejam previstas suas concentrações e assim ser possível a avaliação do poder de predição do modelo de calibração multivariada.

2.4.2 Figuras de Mérito

A avaliação do desempenho dos modelos de calibração multivariada é feita através das figuras de mérito multivariadas. São elas: Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada (RMSECV), Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Previsão

(RMSEP), Sensibilidade Analítica (Anal SEN), coeficiente de correlação (R^2), Limite de Detecção (LOD), Viés (Bias) entre outras.

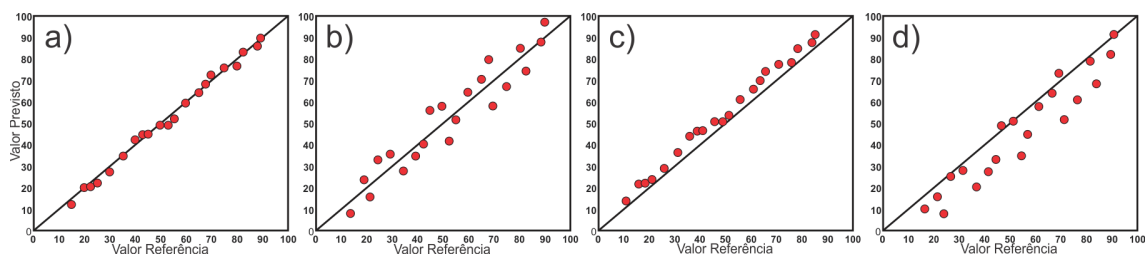
A fim de apresentar uma forma visual de algumas das figuras de mérito mencionadas acima, a Figura 11 mostra quatro gráficos. Na Figura 2.10a são representados resultados exatos e precisos, Figura 11b exatos e imprecisos, Figura 11c inexatos e precisos e Figura 11d inexatos e imprecisos. A bissetriz do gráfico representa um conjunto de resultados ideais, também chamada de reta ideal.

O RMSECV e RMSEP são calculados de acordo com a equação 4:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad 4$$

onde n é o número de amostras, y_i e $\hat{y}_i$ são os valores de referência e previstos, respectivamente, para cada amostra i . Tais valores refletem o quão próximos, em módulo, estão os resultados referente aos valores esperados, reta ideal. Nos exemplos da Figura 11, pode ser visualizado que o exemplo da Figura 11a possui menor RMSE uma vez que apresenta menor dispersão dos dados em torno da bissetriz (Olivieri, 2015; Valderrama *et al.*, 2009).

Figura 11 - Exemplo de gráficos valores de referência pelos valores de previsão mostrando quatro casos sendo a) resultados exatos e precisos, b) resultados exatos e imprecisos, c) resultados inexatos e precisos e d) resultados inexatos e imprecisos. A bissetriz do gráfico representa um conjunto de resultados ideais.



Fonte: Paiva, 2019.

O *bias* é uma medida que reflete se o conjunto de resultados apresenta erro sistemático. Um *bias* próximo de zero indica que não há erro sistemático no modelo, que seria o caso das Figura 11a e 2.10b (Olivieri, 2015; Valderrama *et al.*, 2009).

O valor de R^2 informa a porcentagem de variância explicada do modelo sendo que quanto mais próximo de 1 for esse valor mais ajustadas serão as futuras previsões feitas por esse modelo. Entre os quatro casos exemplificados na Figura 11, a 11a apresenta o valor mais próximo de 1 em relação aos outros casos (Olivieri, 2015; Valderrama *et al.*, 2009).

A sensibilidade analítica reflete o quanto o modelo consegue discriminar concentrações consecutivas do analito na amostra. Quanto maior for o valor da Anal SEN mais sensível é o modelo (Olivieri, 2015).

O LOD de um modelo multivariado é calculado baseado no conceito do sinal analítico líquido (do inglês *Net Analytical Signal* – NAS). Um espectro contém centenas ou milhares de variáveis espectrais variando conforme os componentes das amostras. O NAS é um subconjunto de sinais (variáveis espectrais), dentro do total de variáveis espectrais existente, que possui máxima correlação com o analito de interesse (y) e máxima ortogonalidade com os demais componentes químicos das amostras. Mesmo assim, o NAS sofre variações devido à matriz da amostra e por isso o LOD multivariado se apresenta como uma faixa e não um valor único, pois o NAS não é 100% ortogonal à matriz da amostras (Allegrini e Olivieri, 2014).

2.4.3 Pré-Processamento dos Dados

De forma geral, durante o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada, etapas de pré-processamento dos dados são necessárias. Os dados espectrais obtidos pelos espectrofotômetros, além de carregarem informações químicas dos componentes das amostras, também trazem informações decorrentes de efeitos físicos das amostras, como por exemplo espalhamento e refração da luz. Se o objetivo for extrair informação puramente química, esses efeitos físicos, que são inerentes à medida espectroscópica, devem ser minimizados para não serem contabilizados na variância dos dados durante a etapa de modelagem. No entanto, todos os métodos de pré-processamento dos dados devem ser utilizados com parcimônia para que a informação desejada não seja alterada.

Um dos efeitos físicos mais comuns observados nas medidas de reflectância ou espalhamento Raman de materiais sólido é o espalhamento da radiação que provoca deslocamentos na linha de base dos espectros. Sua origem depende do índice de refração da amostra, do comprimento de onda incidente, tamanho e forma das partículas, cristalinidade da amostra, fluorescência, entre outros artefatos (Ferreira, 2015).

Existem diversos algoritmos matemáticos que tem como papel minimizar tal variação da linha de base. Dentre eles, os mais utilizados são Correção de espalhamento multiplicativo (do inglês *Multiplicative Scatter Correction* - MSC), Variação Normal Padrão (do inglês *Standard Normal Variate* - SNV), mínimos quadrados ponderados (do inglês *Weighted Least Squares* - WLS) e 1ª ou 2ª Derivada com filtro de suavização Savitzky–Golay.

O MSC e SNV são algoritmos muito semelhantes e por isso o resultado obtido do espectro corrigido utilizando esses processamentos também é semelhante para muitos os casos. Ambos os métodos são indicados para correção de comportamentos aditivos e multiplicativos da linha de base espectral e mantêm o perfil espectral o que facilita a interpretação dos dados durante a modelagem (Ferreira, 2015).

A 1ª derivada é indicada para correção o efeito aditivo da linha de base enquanto a 2ª derivada corrige tanto o efeito aditivo como multiplicativo. No entanto, a derivada é extremamente sensível ao ruído do sinal espectral e, por isso, necessariamente é aplicada com algum filtro de suavização dos dados (Ferreira, 2015).

As medidas de espalhamento Raman, além de serem afetadas com efeitos aditivos e multiplicativos, também são afetadas pela curvatura da linha de base devido à fluorescência. Um algoritmo eficiente em corrigir uma variação da linha de base devido à um sinal de fundo (fluorescência) é o método WLS. Primeiramente, o WLS ajusta uma linha de base para cada espectro através de um polinômio de baixa ordem, ou essa linha de base de referência pode ser dada como entrada no cálculo. Com base nessa linha de referência, o método ajusta iterativamente pontos vizinhos do espectro que estão acima e abaixo dessa linha de referência. O comportamento da variação da linha de base de um espectro ocasionado por fluorescência, em geral, é curvo e por isso polinômios de ordem 2 ou 3 são comumente utilizados para ajustar a linha de referência.

Outro artefato que deve ser corrigido nos dados espectrais Raman é o desalinhamento dos dados ao longo do eixo x dos espectros. Os espectrofotômetros calculam o deslocamento Raman pela diferença entre o número de onda do fóton espalhado menos o incidente (emissão do laser). Quando um laser de diodo é utilizado pode ocorrer um leve deslocamento no máximo da banda de emissão em relação à dias anteriores, alterando o valor 0 cm^{-1} da escala de deslocamento Raman, de forma que esse deslocamento será refletido ao longo do espectro e, por isso, deve ser corrigido. Esse artefato não tem como ser eliminado fisicamente, mas pode ser minimizado matematicamente nos dados espectrais. Diversos algoritmos podem ser utilizados para esse alinhamento espectral onde dentre eles, o *Correlation Optimization Warping* (COW) foi o utilizado neste trabalho. Esse método encontra uma correlação ótima entre segmentos de variáveis espectrais e um espectro de referência, os quais os parâmetros tamanho do segmento e espectro de referência, são definidos pelo analista. O resultado é a construção de um vetor de deslocamento que é depois aplicado nos dados para realização da correção.

3. ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA ANÁLISE DOS POLIMORFOS DO MEBENDAZOL

Neste capítulo serão apresentadas a parte experimental, os resultados e as discussões sobre a Parte 1 dos objetivos que se refere ao emprego da espectroscopia Raman para análise quantitativa de misturas dos polimorfos do mebendazol. Duas aplicações serão abordadas neste capítulo: 1) emprego da região espectral das baixas frequências vibracionais (10 a 350 cm^{-1}); 2) comparação entre medidas realizadas envolvendo macro- e micro-Raman visando avaliar os seus efeitos em determinações quantitativas dos polimorfos.

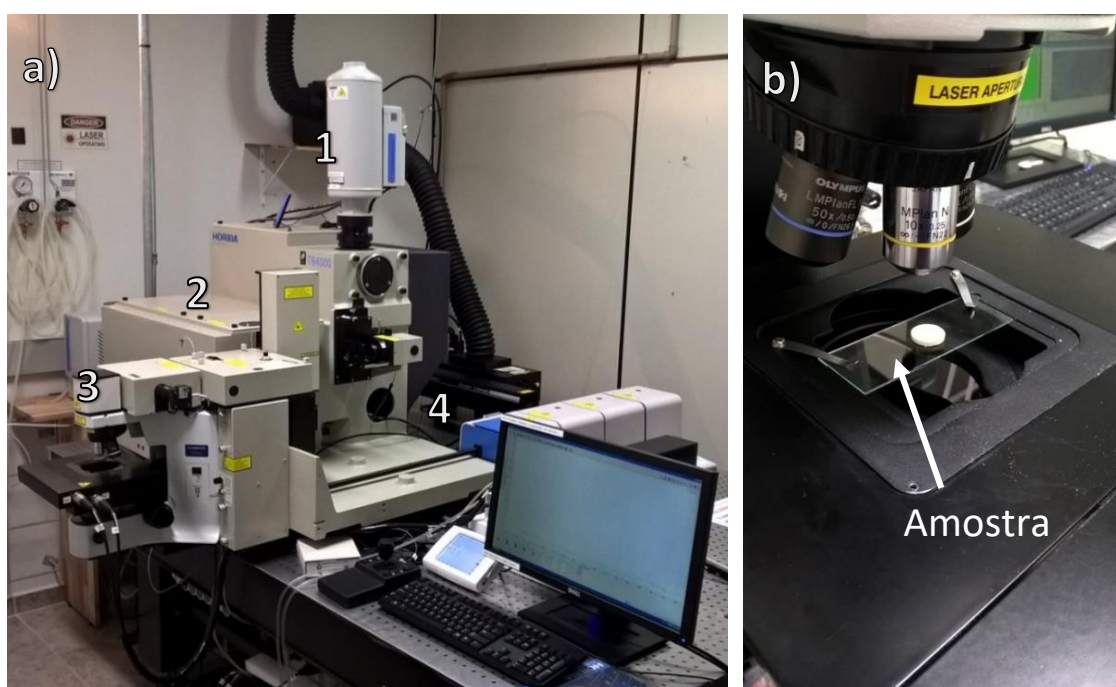
3.1 INSTRUMENTOS E MEDIDAS RAMAN

Três instrumentos Raman foram utilizados para obtenção dos espectros Raman. O primeiro foi um espectrofotômetro Raman de bancada (denominado de **micro-Raman** devido ao tamanho do seu *spot* do laser) da Horiba/Jobin-Yvon modelo T64000 (Figura 12). Esse instrumento pertence ao Instituto de Química (IQ) da Unicamp e encontra-se instalado no Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho e Raman. É baseado em triplo monocromador de grade de difração para acessar a região das baixas frequências vibracionais. Porém, a região das médias frequências vibracionais (200 a 2000 cm^{-1}) também pode ser medida neste instrumento. O laser utilizado foi de HeNe com emissão em 633 nm e potência de 5 mW . O compartimento de amostra consiste de um microscópio confocal onde foram utilizadas lentes objetivas com aumento de $10\times$ com abertura numérica (NA) $0,25$ e outra com aumento de $4\times$ com $NA = 0,10$. O *spot* do laser é calculado pela equação $d = 1,22 \times \lambda/NA$ onde " λ " é o comprimento de onda do laser e " d " é o diâmetro da região circular. Portanto, com a lente de $10\times$ e $4\times$ os *spots* do laser foram de $3,1$ e $7,7\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente. A fenda do sistema confocal controla a resolução espacial no eixo z , no sentido da profundidade de penetração da radiação. Ela foi totalmente aberta a fim de maximizar o volume da amostra analisada e, assim, obter maior representatividade da mistura dos polimorfos. O detector desse instrumento é um arranjo de CCD resfriado com nitrogênio líquido.

Visando obter um espectro médio representativo da amostra, na Parte 1a foi feito mapeamento na forma de uma matriz quadrada com 7×7 pontos. Na Parte 1b o mapeamento foi realizado também em forma de uma matriz quadrada, porém com 3×3 pontos. Ainda na Parte 1b a diagonal da matriz 3×3 foi utilizada para a obtenção de médias de triplicatas para

comparação das medidas micro- e macro-Raman. Em ambos os mapeamentos os pontos estavam espaçados a cada 100 μm . O tempo de integração por ponto de análise foi de 60 segundos. A resolução espectral das medidas adquiridas para a Parte 1a, que compreendeu a faixa espectral de 10 a 350 cm^{-1} , foi de aproximadamente 2 cm^{-1} , pois foi utilizada uma grade de 1200 l/mm. Já as medidas adquiridas para a Parte 1b, obtidas na faixa de 176 a 1900 cm^{-1} , a resolução espectral foi de 3,9 cm^{-1} , pois foi utilizada uma grade de difração de 600 l/mm.

Figura 12 - a) Imagem do espectrômetro Raman Horiba e b) pastilha da amostra localizada na lâmina do microscópio confocal. 1. Arranjo de CCD, 2. Triplo monocromador, 3. Microscópio confocal, 4. laser HeNe 633 nm.



Fonte: Paiva, 2019.

O segundo instrumento utilizado foi um espectrofotômetro Raman portátil (denominado de **macro-Raman1**) da BW-TEK modelo TacticID-GP (Figura 13) o qual é um instrumento dispersivo que utiliza um laser de diodo com emissão em 785 nm, potência máxima de 300 mW e um detector de arranjo de CCD. A resolução espectral foi de aproximadamente 9 cm^{-1} e a faixa espectral de 176 a 2900 cm^{-1} . O tempo de integração é controlado pelo instrumento sendo um valor fixo não informado pelo fabricante. As medidas foram realizadas em triplicata em diferentes lugares da amostra a fim de contornar eventuais problemas de homogeneidade na pastilha. O tamanho do *spot* do laser deste instrumento é fixo com tamanho de 80 μm de diâmetro.

Figura 13 - Imagem do espectrômetro Raman portátil BW-TEK modelo TacticID-GP.



Fonte: Paiva, 2019.

O terceiro instrumento foi um espectrofotômetro Raman de bancada (denominado de **macro-Raman2**) do tipo dispersivo e baseado em grade *echelle*, da marca Perkin-Elmer modelo RamanStation 400F (Figura 14). Tal instrumento está instalado no Laboratório de Quimiometria em Química Analítica (LAQQA) do IQ-Unicamp. O laser também é de diodo com emissão em 785 nm e 250 mW de potência. As medidas realizadas neste instrumento foram com resolução espectral de 4 cm^{-1} , na faixa espectral de 160 a 3500 cm^{-1} , sendo realizadas medidas em triplicatas em regiões diferentes da amostra. O tempo de integração de cada replicata foi de 10 segundos e o *spot* do laser foi de $100\text{ }\mu\text{m}$. O equipamento trabalha no modo *backscattering*, ou seja, coleta o espalhamento em 180° em relação ao ângulo de incidência do laser.

Figura 14 - Imagem do espectrômetro Raman Perkin-Elmer RamanStation 400F.



Fonte: Paiva (2019).

3.2 AMOSTRAS (MEBENDAZOL)

Os polimorfos A e C do mebendazol foram cedidos pela indústria farmacêutica Formil Química. A forma B foi recristalizada em laboratório de acordo com o método descrito no trabalho de Kachrimanis *et al.*, 2010, no qual a forma C foi solubilizada em clorofórmio sob aquecimento (70°C) e a solução foi rota-evaporada à baixa pressão.

As três formas polimórficas foram caracterizadas utilizando um difratômetro de raios-X de pós (PXRD) modelo D8 Advance da Bruker, o qual utiliza fonte de cobre com emissão $K\alpha$ 1,54 Å. As medidas foram adquiridas com um tempo de escanamento de 2,00 °/min com passo de 0,02° na faixa de 3–35° 2 θ em temperatura ambiente (Silva *et al.*, 2017).

Para as análises de microscopia com o objetivo de caracterizar a morfologia e tamanho de partícula, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura da marca FEI modelo Quanta FEG 250.

Medidas de tamanho de partículas e razão de aspecto foram realizadas utilizando as micrografias e um software de tratamento de imagens digitais (ImageJ). O procedimento para se determinar os tamanhos das partículas utilizando o ImageJ começa pela calibração da régua digital no software, ou seja, com uma ferramenta de desenho, faz-se um traço do tamanho exato da barra micrométrica de cada micrografia. O software calcula quantos pixels há no traço desenhado, de forma que essa quantidade de pixels corresponderá ao tamanho em micrômetros. Uma vez calibrado desenham-se traços nas dimensões das partículas da imagem micrográfica e o software registra quantos micrômetros tem cada traço. A razão de aspecto é calculada pela razão entre o comprimento e a largura da partícula.

Espectros Raman para dois diferentes conjuntos de misturas de polimorfos do MBZ foram obtidos. No primeiro caso, um conjunto de misturas binárias das formas A e C foi preparado variando ambas as formas de 0 a 100% m/m em intervalos de 5% m/m totalizando assim 20 misturas. Mais 10 misturas foram preparadas para compor as amostras de validação externa (previsão).

O segundo conjunto, preparado em trabalho anterior (Silva *et al.*, 2015), consistiu 30 misturas ternárias nas quais as formas A e C variaram suas concentrações de 0 a 100% m/m, enquanto a forma B variou de 0 a 30% m/m.

As misturas binárias e ternárias dos polimorfos do MBZ mencionadas acima foram comprimidas para formação de pastilhas. As misturas sólidas foram previamente misturadas em um almofariz de ágata para garantir sua homogeneidade. As pastilhas foram preparadas aplicando-se uma pressão de 6 toneladas por 5 segundos. As pastilhas obtidas mediram 13 mm

de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura. Uma massa de 200 mg das misturas binárias e ternárias foi empregada no preparo das pastilhas.

3.3 TRATAMENTOS QUIMIOMÉTRICO E ESTATÍSTICO DOS DADOS

Diversas técnicas de pré-processamentos foram aplicadas aos espectros Raman. Portanto, abaixo seguem os melhores tratamentos para cada caso.

Para os espectros adquiridos com o micro-Raman nas baixas frequências vibracionais foram testados os pré-processamentos MSC, SNV e WLS para correção da linha de base. Para o alinhamento lateral das bandas foi aplicado o algoritmo COW.

No caso dos dados adquiridos na região das médias frequências vibracionais com os três instrumentos, o pré-processamento utilizado foi a 2ª derivada com filtro Savitzky–Golay com polinômio de 2ª ordem e janela de suavização de 15 pontos (2ªDerSG).

O método de calibração utilizado nos dois casos foi a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) com a diferença que para o conjunto de dados de misturas ternárias foi aplicado o PLS1 (modela um parâmetro por modelo) e para as misturas binárias PLS2 (modela mais de um parâmetro em um único modelo). O PLS2 só é recomendado para casos em que os parâmetros modelados tenham alta correlação, que é o caso das misturas binárias. A validação interna dos modelos de calibração foi realizada utilizando-se a validação cruzada. Em todos os casos os dados foram centrados na média.

Por ser um conjunto mais simples, as misturas binárias foram preparadas já se estabelecendo quais eram as amostras de calibração (21) e validação externa (9) diretamente no planejamento das misturas. No caso das amostras ternárias foi utilizado o método de seleção de amostras SPXy (do inglês *Sample set Partitioning based on joint X-y distances*) para definição dos conjuntos de calibração e validação externa (Galvão *et al.*, 2005).

Os modelos de calibração multivariada foram avaliados de acordo com suas figuras de mérito RMSEC, RMSECV, RMSEP, R^2 , Bias, Anal SEN e LOD esses dois últimos calculados utilizando-se o algoritmo MVC1 que é baseado no sinal analítico líquido (NAS) (Olivieri *et al.*, 2004).

Para os casos em que foram identificadas amostras anômalas, os gráficos dos escores e resíduo versus influência em X e y foram utilizados como critério de exclusão do modelo. Teste- F com 95% de confiança foi utilizado para avaliar diferenças estatísticas entre os valores de RMSEP dos modelos de calibração multivariada obtidos com os diferentes instrumentos Raman. O teste consiste do cálculo do $F_{calc} = RMSEP_{maior}^2 / RMSEP_{Menor}^2$. Essa relação foi

comparada com o valor crítico $F_{crit}(n, n, 0,95)$, onde n é o número de amostras nos conjuntos de previsão. Para o teste de significância, utilizado para avaliar a presença de erro sistemático no modelo, um teste t, com 5% de significância, foi aplicado nas amostras de validação externa (Filgueiras *et al.*, 2014).

Todos os cálculos foram processados utilizando-se os *softwares* The Unscrambler® 10 (CAMO), MATLAB R2010a® (Mathworks) e PLS-Toolbox® (Eingevector).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PARTE 1 DOS OBJETIVOS

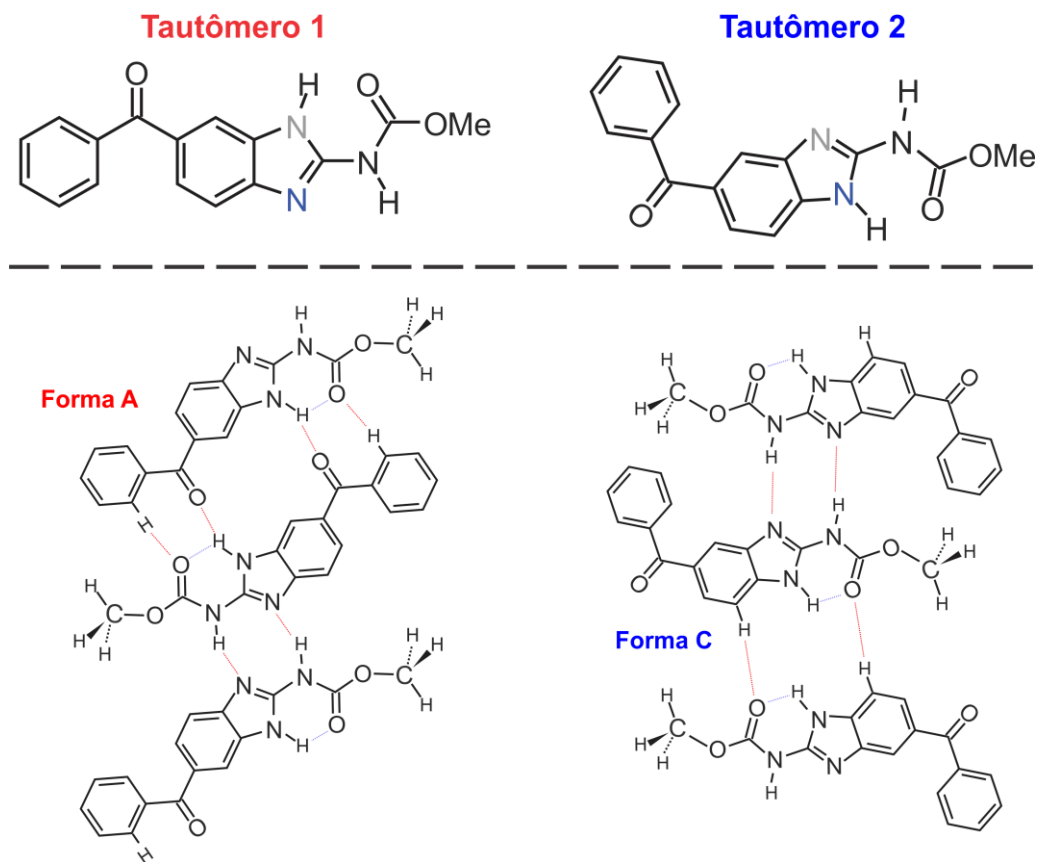
3.4.1 Caracterização do Mebendazol

O mebendazol, (5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il) – ácido carbâmico metil éster, possui três formas polimórficas anidras (A, B e C). As diferentes formas cristalinas desse composto ocorrem devido ao tautomerismo e às diferentes conformações da molécula. Somente as formas A e C já foram elucidadas quanto às suas estruturas cristalinas. Na Figura 15 são mostrados os isômeros conformacionais da molécula do mebendazol para as formas polimórficas A e C. Em ambas as formas, a célula unitária é triclinica (Ferreira *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2009).

As principais interações intermoleculares da estrutura cristalina dos polimorfos A e C do MBZ são as ligações de hidrogênio que faz crescer lâminas do cristal e os empacotamentos $\pi - \pi$ entre os anéis aromáticos de lâminas vizinhas na direção perpendicular às ligações de hidrogênio.

Como pode ser observado na Figura 15, o padrão das ligações de hidrogênio em ambas as formas A e C faz com que o cristal cresça muito mais em uma direção que nas outras. Portanto, as partículas das formas A e C tomam a forma acicular e isso é comprovado pelas micrografias da Figuras 16a, b, c e d. Também é possível observar que as partículas das duas formas possuem certo grau de policristalinidade, pois as partículas possuem defeitos e mudanças de direção no crescimento do cristal. Essa informação é importante na hora de interpretar os espectros vibracionais e difratogramas.

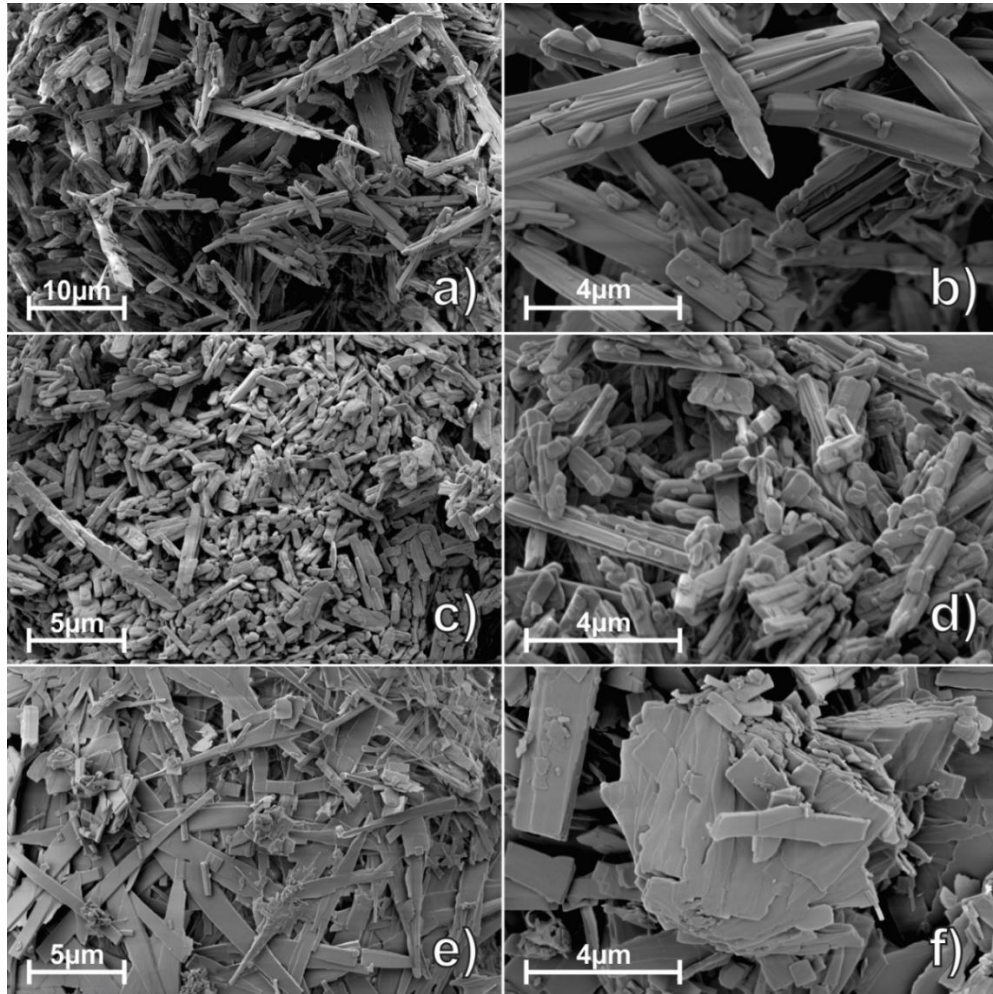
Figura 15 - Isômeros tautoméricos predominantes nos polimorfos A (Tautômero 1) e C (Tautômero 2) do mebendazol.



Fonte: Paiva, 2019.

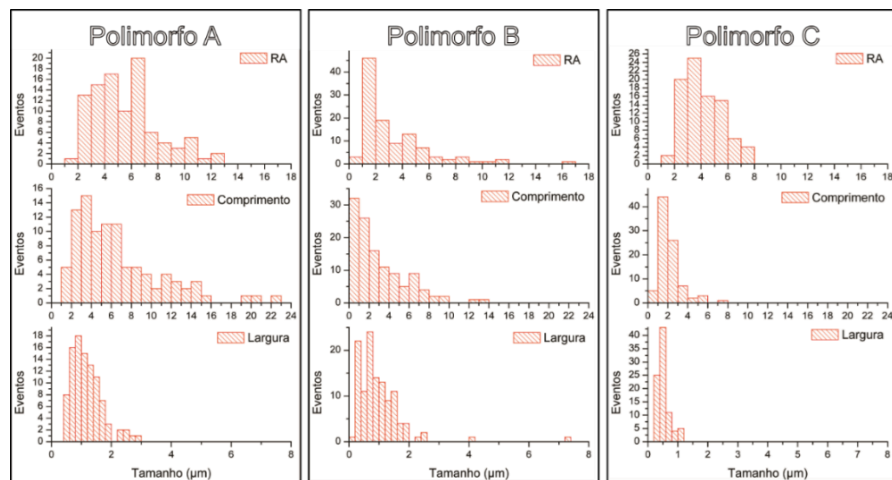
Outra informação que podemos tirar das micrografias é a distribuição de tamanho de partículas. A Forma A possui bastonetes maiores que a Forma C. Por outro lado, a distribuição de tamanhos de partículas da Forma C é mais homogênea (Figura 17). Por ser a matéria prima do medicamento e por ser praticamente insolúvel (solubilidade $< 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) a amostra do polimorfo C sedido pela Formil Química foi micronizada e peneirada. A finalidade de diminuir o tamanho da partícula é aumentar a área superficial e principalemtn e a energia superficial que permitirá uma maior interação com o solvente que por sua vez aumentará a taxa de dissolução. A razão de aspecto (RA), calculada pela razão entre o comprimento e a largura da partícula, é maior na forma A que na C (Figura 17). Partículas com alta RA tendem a se empacotarem em orientações preferenciais.

Figura 16 - Micrografias dos polímeros do mebendazol em pó. Polímero A (a-b), polímero C (c-d) e polímero B (e-f) com diferentes ampliações.



Fonte: Paiva (2019).

Figura 17 - Gráficos de distribuição de razão de aspecto, comprimento e largura para as formas A, B e C do mebendazol.

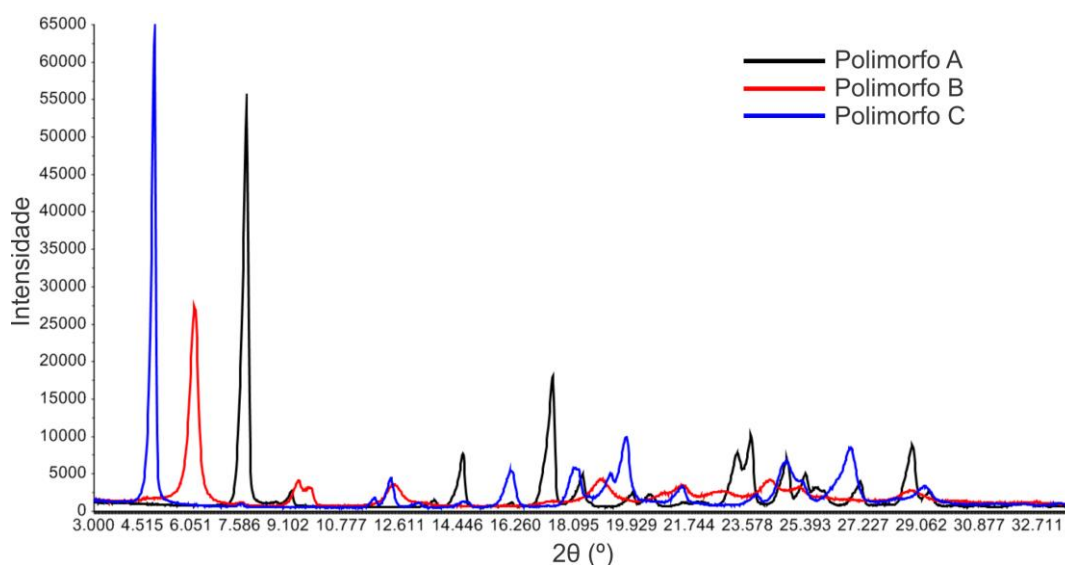


Fonte: Paiva (2019).

A forma B do mebendazol, cuja estrutura cristalina ainda não foi elucidada, possui cristais irregulares. Sua estrutura possui um maior grau de policristalinidade que as demais formas. Diversas morfologias são encontradas nas micrografias desse material como mostradas nas Figuras 16e e 16f. A maior parte do material apresenta-se em forma de placas ou lascas, as quais formam estruturas lamelares.

A recristalização da forma B é realizada em solução supersaturada do MBZ em clorofórmio a qual é rota-evaporada à 70°C. O mebendazol é pouco solúvel em clorofórmio e, por esse motivo, a passagem da forma solubilizada para fase sólida é rápida ocasionando defeitos no crescimento do cristal. Por esses motivos, há uma grande variedade morfológica das partículas, variedade de tamanho de partícula e micro-deformações na rede cristalina (Kachrimanis *et al.*, 2010). Esse maior grau de policristalinidade e defeitos na rede cristalina do polimorfo B são refletidos no difratograma (Figura 18) provocando picos menos intensos e mais largos.

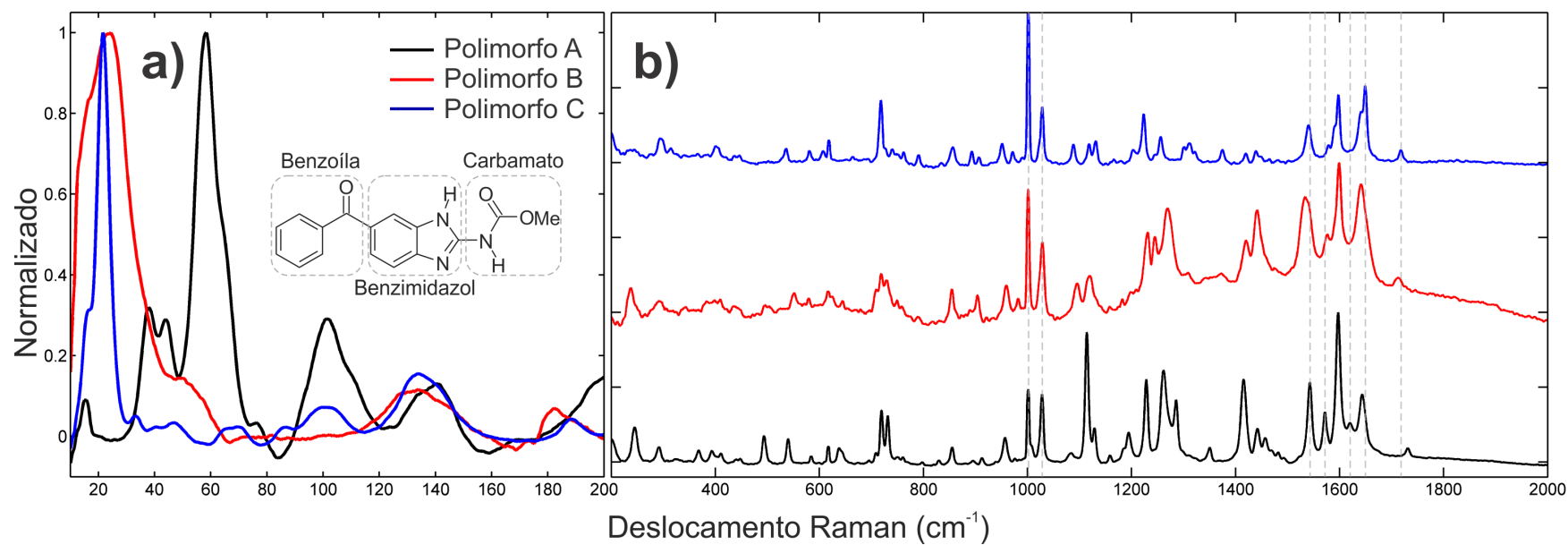
Figura 18 - Difratogramas dos polimorfos A, B e C do mebendazol (adaptado de SILVA *et al.*, 2017).



Fonte: Paiva (2019).

Os espectros Raman dos polimorfos puros do MBZ nas regiões de baixas (10 a 200 cm^{-1}) e médias (200 a 2000 cm^{-1}) frequências vibracionais são mostrados na Figura 16. Tais espectros tiveram suas intensidades relativas normalizadas para uma melhor compreensão espectral.

Figura 19 - Espectros Raman, normalizados pelo máximo, dos polimorfos puros do mebendazol nas regiões de (a) baixas (10 a 200 cm^{-1}) e (b) médias (200 a 2000 cm^{-1}) frequências do Raman.



Fonte: Paiva (2019).

As principais diferenças observadas nos espectros das médias frequências vibracionais dos polimorfos do MBZ resultam das vibrações dos grupos funcionais que realizam ligações de hidrogênio como mostrado a seguir: estiramento da carbonila (C=O) dos grupos benzoíla e carbamato; estiramento da imina (C=N) do grupo benzimidazol; deformação angular da amina secundária (N-H) dos grupos benzimidazol e carbamato. A Tabela 2 apresenta essas atribuições de bandas dos polimorfos MBZ no espectro Raman. No entanto, as bandas observadas em 1002 e 1027 cm^{-1} são decorrentes dos modos vibracionais do anel aromático do grupo benzoíla, onde não são observados deslocamentos entre os espectros dos polimorfos do MBZ porque esses modos vibracionais não são afetados pela rede cristalina. Mais diferenças espectrais podem ser observadas na faixa de impressão digital (176-1000 cm^{-1}) (Ayala *et al.*, 2008).

Table 2 - Atribuição dos modos vibracionais Raman que formam ligações de hidrogênio nos polimorfos do mebendazol (deslocamento Raman em cm^{-1}).

Modo Vibracional	Polimorfo A	Polimorfo B	Polimorfo C
$\nu(\text{C=O})$ Carbamato	1731	1712	1718
$\nu(\text{C=O})$ Benzoíla	1644	1641	1648
$\nu(\text{C=N})$ Benzimidazol	1620	-	1640 (ombro)
$\delta(\text{N-H})$ Benzimidazol	1572	1576	1579 (ombro)
$\delta(\text{N-H})$ Carbamato	1543	1534	1540

Fonte: (Ayala *et al.*, 2008).

Como podem ser observadas, as bandas nas regiões de baixas frequências são mais intensas que aquelas da região de médias frequências. Isso ocorre por se tratar de um sistema com maior polarizabilidade, ou seja, um centro com maior secção de choque e, por isso, melhor espalhador da luz.

O espectro Raman da Forma B possui uma banda larga com máximo em 27 cm^{-1} . Apesar de parecer com a banda característica dos compostos amorfos, baseado no difratograma pode-se dizer que esse composto é cristalino. Portanto, a banda pode ter relação com a densidade de estados vibracionais (VDOS), devido ao grau de policristalinidade e defeitos nas partículas desse material. Outras bandas menos intensas e mais sobrepostas (55 cm^{-1} e 134 cm^{-1}) são observadas, indicando que deve haver modos fônons nesta fase cristalina, que devem ter alta VDOS. Já os polimorfos A e C apresentam bandas mais estreitas na região das baixas frequências vibracionais indicando um maior caráter cristalino desses polimorfos.

O número de modos vibracionais fônons ópticos, aqueles ativos no Raman e IR, de um cristal molecular é calculado pela equação $6Z - 3$, onde Z é o número de moléculas na célula

unitária primitiva. Essa equação diz que, existem $6Z$ modos fônons, dos quais $6Z - 3$ são fônons ópticos, e 3 são fônons acústicos que não são ativos no Raman e no IR (Larkin *et al.*, 2014). No caso das formas A e C, essas possuem duas moléculas na célula unitária e, portanto, 9 modos fônons ópticos. No espectro experimental podem ser observadas 7 bandas para as formas A e C na região das baixas frequências. Na temperatura ambiente, alguns modos fônons vibracionais podem estar sobrepostos de forma que esse número pode não coincidir com o valor teórico.

3.4.2 Aplicando medidas micro-Raman na região das baixas frequências vibracionais.

Para testar a espectroscopia Raman nas baixas frequências vibracionais na análise dos polimorfos do MBZ, primeiramente foi aplicado o conjunto de misturas binárias que são as que contêm somente os polimorfos A e C. No equipamento empregado neste estudo, o micro-Raman, a amostra é colocada sobre a lâmina do microscópio confocal, cujo volume amostral da medida é muito pequeno. Em um microscópio confocal a região iluminada pelo laser no plano xy, *spot* do laser, é limitada pela abertura numérica (NA) da lente objetiva e pela fenda confocal. Neste caso, a fenda foi totalmente aberta restando a limitação da lente. Portanto, o cálculo para determinar o tamanho do *spot* do laser é realizado segundo a Equação 4, a qual é função do comprimento de onda do laser (λ) e da NA da lente (Gordon e McGoverin, 2011).

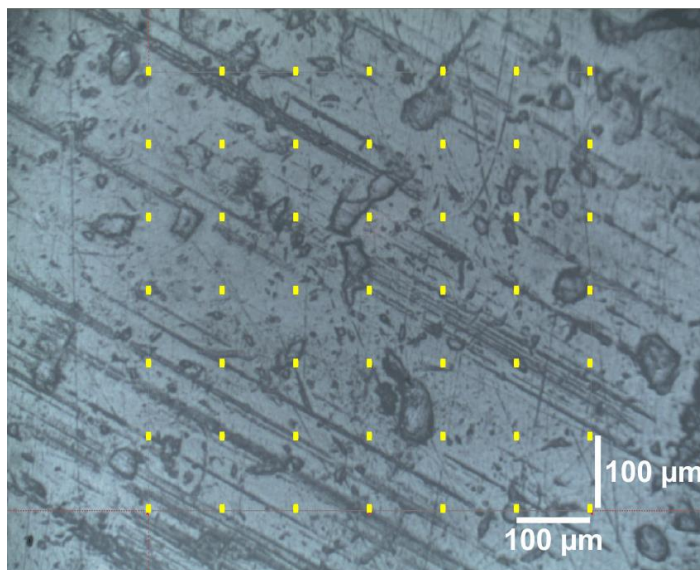
$$d = (1,22 \lambda)/NA \quad 4$$

Já na direção do eixo z, a profundidade da região iluminada pelo laser é função do comprimento de onda, da abertura confocal, do índice de refração e densidade da amostra, tamanho e morfologia das partículas entre outros parâmetros, sendo então bastante difícil de ser determinado.

Os primeiros espectros foram obtidos empregando uma lente objetiva com ampliação de 10x. Considerando a abertura numérica dessa lente de 0,25 e o comprimento de onda do laser de 633 nm, obtém-se, segundo a Equação 4, um spot do laser de 3,08 μm . Nessas condições, a obtenção de um único espectro por amostra com esse volume amostral não seria uma abordagem representativa da mistura uma vez que a área acessada pela luz é da ordem de grandeza das dimensões dos cristais dos polimorfos, como mostrado anteriormente (Figura 16). Portanto, um mapeamento da amostra foi realizado visando obter um espectro médio com maior representatividade da proporção da mistura analisada (Figura 20). A Figura 20 mostra os pontos

onde os espectros Raman foram obtidos na superfície de uma pastilha preparada a partir da mistura dos polimorfos A e C do MBZ. No total, 49 espectros foram obtidos por amostra, sendo que o tempo de obtenção de cada espectro foi de 60 s.

Figura 20 - Imagem da superfície de uma amostra na forma de pastilha obtida com o microscópio confocal. Os pontos amarelos indicam as posições onde os espectros Raman foram obtidos durante o mapeamento da amostra.



Fonte: Paiva, 2019.

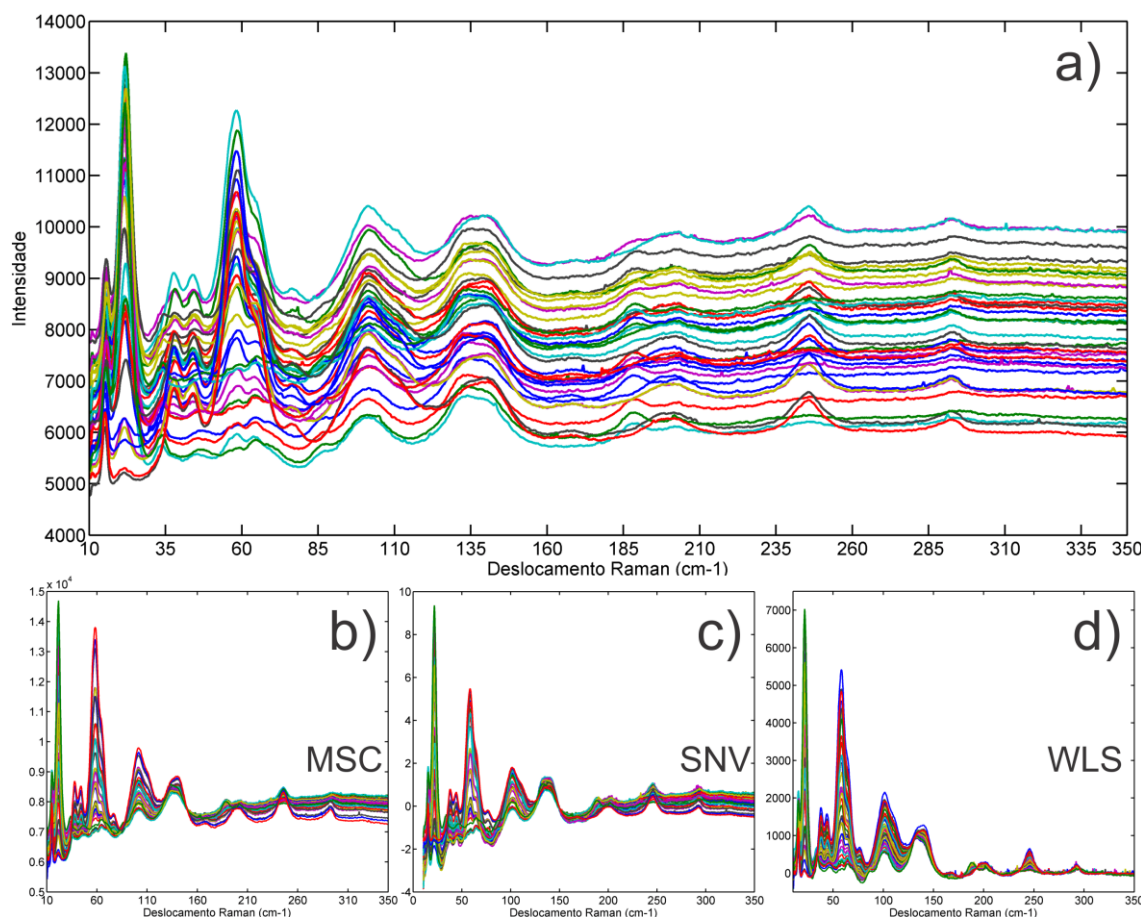
Os espectros Raman, em geral, apresentaram picos finos (*spikes*) devido às falhas eletrônicas do detector no instante da medida. Isso é comumente observado quando um longo tempo de integração é aplicado. Esses artefatos são de origem aleatória e dificilmente ocorrem duas vezes seguidas em um mesmo pixel do detector. Entretanto, como consequência do cálculo da média dos 49 espectros obtidos durante o mapeamento da amostra, esses artefatos foram minimizados.

A Figura 21a apresenta os espectros médios das 30 misturas binárias do MBZ, os quais contêm 884 variáveis espectrais na faixa de 10 a 350 cm^{-1} . Como pode ser observado, os espectros médios possuem variações na linha de base que devem ser corrigidas, visto que essas variações não contêm informações químicas dos constituintes das amostras.

Os algoritmos MSC, SNV e WLS foram testados. Nas Figuras 21b, c e d são mostrados os espectros corrigidos pelos métodos de pré-processamento testados para correção da variação da linha de base. A correção mais efetiva das variações nas linhas de bases foi obtida com o WLS. Esse pré-processamento é indicado para casos onde a linha de base varia curvilinearmente

ao longo do espectro, que é o caso desses espectros e esse comportamento é típico da fluorescência.

Figura 21 - Espectros das misturas binárias A e C do MBZ sendo em a) dados brutos, e dados pré-processados com b) MSC, c) SNV e d) WLS.

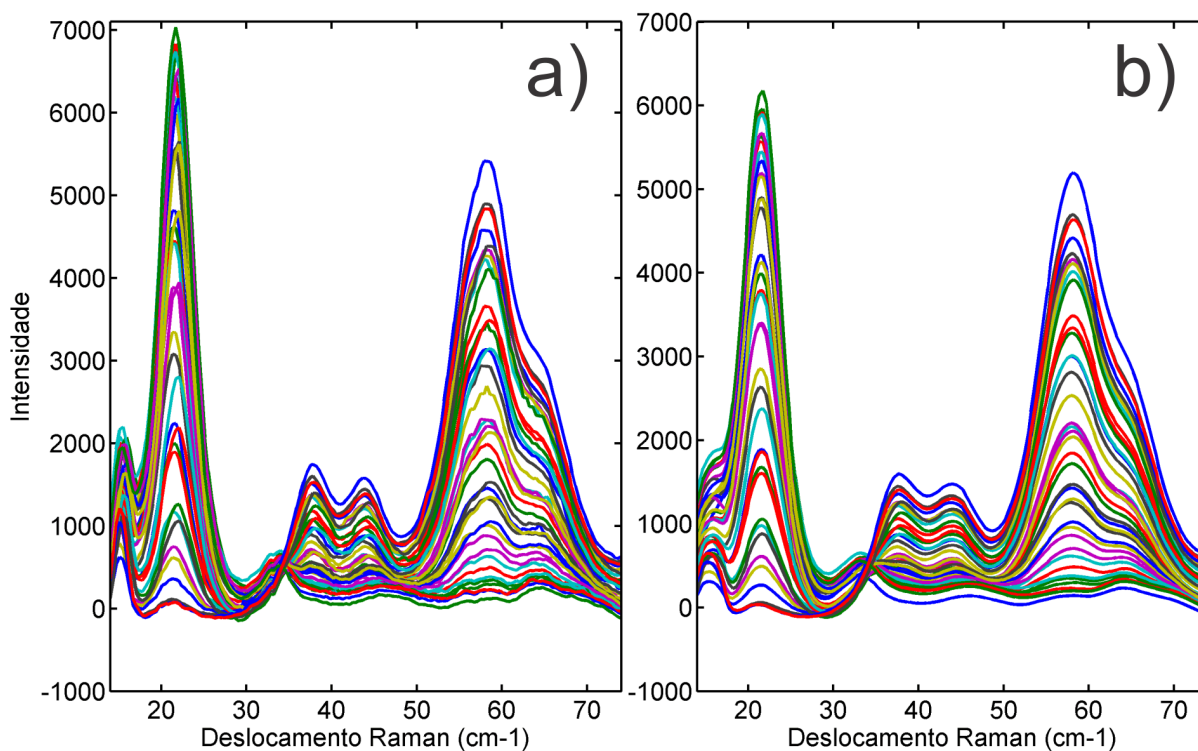


Fonte: Paiva, 2019.

Outro artefato a ser corrigido nos dados espectrais Raman é o deslocamento lateral de bandas decorrente da variação do máximo de emissão do laser em dias consecutivos de análise. Os espectrômetros calculam o deslocamento Raman em relação ao comprimento de onda do laser. Se houver qualquer deslocamento no pico de emissão do laser, esse deslocamento será refletido no espectro Raman e deve ser corrigido. Esse efeito é mais comum em medidas espaçadas ao longo de dias, onde o laser é ligado e desligado diversas vezes apresentando um deslocamento em seu pico de emissão. Esse artefato não tem como ser eliminado fisicamente, mas pode ser minimizado matematicamente nos dados espectrais. O algoritmo utilizado no presente trabalho foi o COW. A Figura 22 mostra o resultado do alinhamento, no qual foi utilizado seguimentos de 50 variáveis espectrais. Para melhor visualização do efeito da correção

obtida empregando o algoritmo COW, somente uma parcela da faixa espectral, restrita à faixa de 14 a 74 cm^{-1} é mostrada na Figura 22.

Figura 22 - Espectros sem (a) e com (b) a correção de alinhamento lateral, utilizando o algoritmo COW. A faixa espectral no gráfico foi reduzida somente para uma melhor visualização do efeito final do processo de correção.



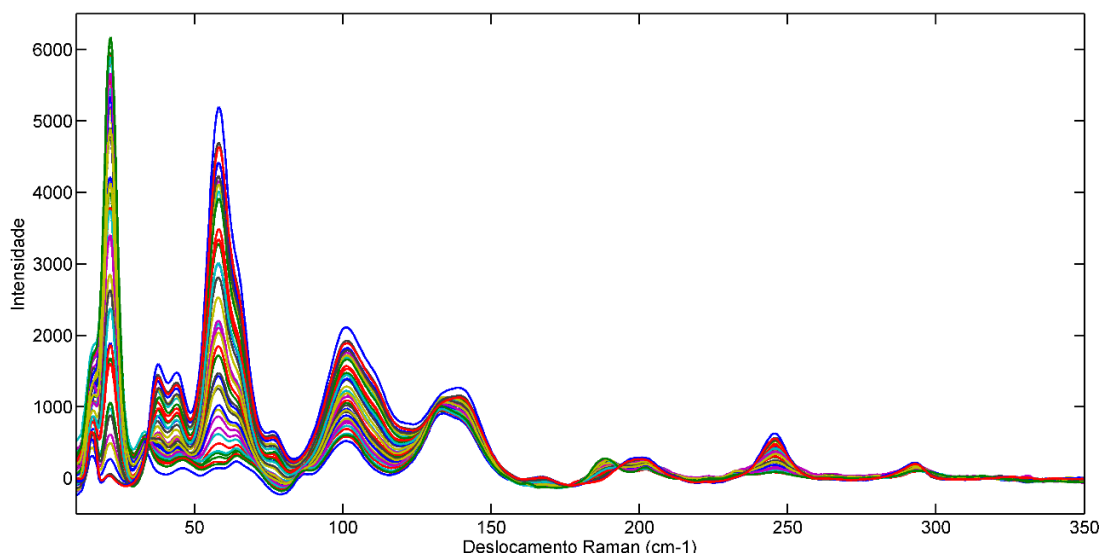
Fonte: Paiva, 2019.

Por fim, os dados foram suavizados utilizando o filtro Savitzky–Golay com janela de 9 pontos a fim de minimizar o ruído instrumental que é observado nos espectros. Os espectros resultantes são mostrados na Figura 23. Nesses espectros, pode-se observar uma grande variação nas intensidades das bandas principais das formas A (58 cm^{-1}) e da C (22 cm^{-1}) nos espectros formando uma região de impressão digital dos cristais. As bandas secundárias também apresentam boa variação de intensidade, uma vez que, o planejamento das misturas binárias vai alternando as concentrações de um polimorfo para outro. A correção de linha de base foi bem sucedida assim como a suavização e o alinhamento. Tais dados espectrais foram então utilizados no ajuste dos modelos de calibração multivariada.

Por se tratar de amostras que contêm somente duas espécies nas misturas, a estratégia foi utilizar a modelagem PLS2 pelo fato que as variações espectrais dos dois componentes estarem correlacionadas. Desse modo, é possível modelar simultaneamente os dois componentes das misturas. Como podem ser observados no gráfico dos pesos (loadings), (Figura 24), esses apresentam contribuições positivas e negativas dependendo da forma polimórfica analisada, de

maneira que os pesos mais significativos correspondem às duas bandas principais (Forma A $\rightarrow$ 58 cm^{-1} e Forma C $\rightarrow$ 22 cm^{-1}). Portanto, é esperado que resultados semelhantes para o modelo de calibração sejam obtidos para os dois polimorfos, conforme apresentado na Tabela 3.

Figura 23 - Espectros pré-processados com correção da linha de base, alinhamento e suavização.



Fonte: Paiva, 2019.

Tabela 3 - Resultados do modelo de calibração PLS2 para as misturas binárias A e C do MBZ empregando a região espectral de 10 a 350 cm^{-1} .

Figuras de mérito	Modelo	Anal Sen ^c	R ²	RMSE ^d (% m/m)	Bias	LOD ^f (% m/m)
Polimorfo A	CV ^a	8,71	0,9946	2,31 (2) ^e	0,05	2,76-3,82
	P ^b		0,9914	2,62	0,61	
Polimorfo C	CV ^a	8,71	0,9946	2,31 (2) ^e	-0,05	2,76-3,82
	P ^b		0,9914	2,62	-0,61	

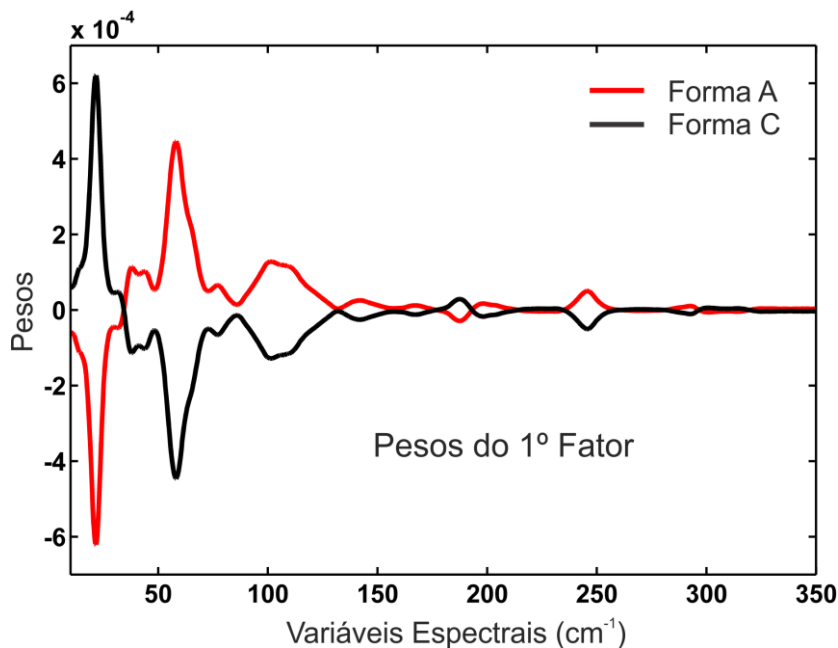
a. Validação Cruzada; b. Previsão; c. Sensibilidade Analítica; d. Raiz quadrada do erro médio quadrático;

e. Variáveis Latentes; f. Limite de detecção.

Fonte: Paiva, 2019.

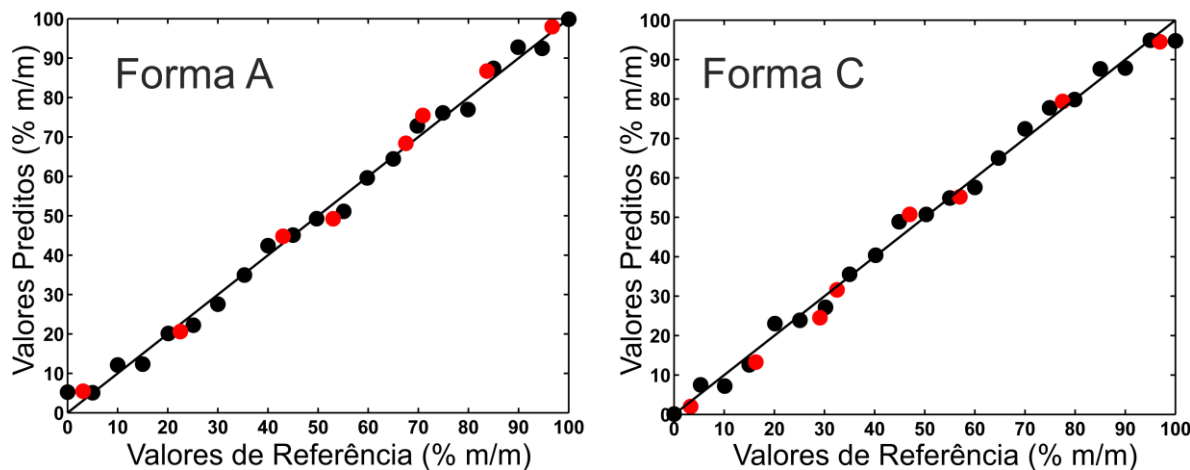
A Figura 25 mostra os gráficos dos valores preditos pelo modelo versus valores de referência. Os valores de referência são as porcentagens mássicas calculadas de acordo com as pesagens no preparo das misturas. Como pode ser observado há uma distribuição aleatória dos dados em torno da bisetriz do gráfico, não havendo evidências da presença de erros sistemáticos. O modelo de calibração apresentou, para ambas as formas polimórficas, valor de RMSEP (2,62% m/m), R² de validação (0,9914) e LOD (2,76-3,82% m/m) satisfatórios e comparáveis aos da literatura.

Figura 24 - Pesos (loadings) do modelo de calibração PLS2 para as misturas binárias dos polimorfos A e C do MBZ.



Fonte: Paiva, 2019.

Figura 25 - Gráficos dos valores preditos versus valores de referência das validações interna (●) e externa (●), para o modelo de calibração PLS2 das misturas binárias formas A e C do MBZ.



Fonte: Paiva, 2019.

Uma vez que os modelos com as misturas binárias apresentaram resultados que atendem às necessidades para quantificar a presença das diferentes formas polimórficas do MBZ no IFA, o próximo passo foi testar o mesmo procedimento analítico na análise de um conjunto de amostras contendo misturas ternárias dos polimorfos A, B e C do MBZ.

Na Figura 26a são apresentados os espectros puros das três formas obtidos com o espectrômetro micro-Raman utilizando a lente objetiva de 10x, aplicando o mapeamento em iguais condições experimentais realizadas para as misturas binárias. Como pode ser observado

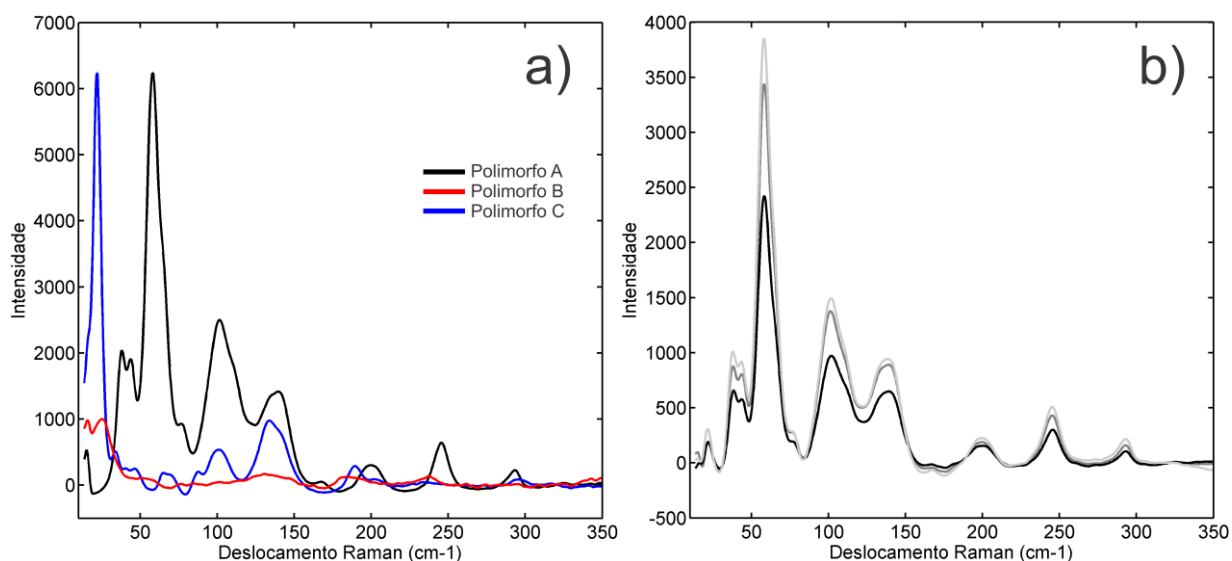
o espectro Raman da forma B possui intensidades relativas muito baixas de forma que suas bandas ficam sobrepostas pelos espectros das formas A e C. Outro fato que merece ser considerado é que o espectro mostrado na Figura 26a corresponde a forma pura do polimorfo B, enquanto que nas misturas ternárias a concentração deste componente varia de 0 a 30%, indicando que as banda de espalhamento terão, na melhor das situações, intensidades aproximadamente 3 vezes menores daquelas observadas na Figura 26a. Assim, sua informação espectral será bastante atenuada quando comparada aos polimorfos A e C.

Todavia, poder-se-ia esperar que o modelo fosse capaz de calibrar a forma B, uma vez que existem pequenas regiões onde apresentam sinais para os quais não há bandas dos componentes A e C. No entanto, os modelos construídos para as misturas ternárias apresentaram piores resultados àqueles mostrados anteriormente para as misturas binárias, com valores de RMSEP, por exemplo, acima de 7% m/m para os polimorfos A e C maior que 4% m/m para forma B. Acredita-se que esses resultados sejam decorrentes da não reprodutibilidade dos espectros em regiões diferentes da mesma amostra, conforme pode ser observado na Figura 26b, que mostra espectros do mapeamento em três regiões distintas de uma mesma pastilha. A amostra em questão contém a proporção de 80%, 12% e 8% m/m para as formas A, B e C do MBZ, respectivamente.

Esses resultados, com as misturas ternárias, nos leva a considerar que o tamanho do *spot* do laser do micro-Raman pode estar afetando a reprodutibilidade espectral desejada para a análise quantitativa. Neste sentido, um segundo teste foi realizado repetindo as mesmas condições experimentais, mas utilizando uma lente objetiva com ampliação de 4x e NA de 0,10 resultando em um *spot* do laser de 7,7 μm . Assim, esperava-se que com maior volume amostral houvesse melhor reprodutibilidade dos espectros e, conseqüentemente, melhores valores de RMSEP para os modelos calibração. Entretanto, os resultados obtidos foram semelhantes àqueles obtidos com a lente de ampliação de 10x.

Uma vez que o tamanho de 7,7 μm de *spot* do laser é o máximo obtido pelo micro-Raman, e mesmo com esse *spot* os resultados ainda não foram o suficiente para a reprodutibilidade espectral desejada, foi então planejado um experimento envolvendo outros espectrômetros Raman que apresentam tamanho de *spot* do laser $> 80 \mu\text{m}$, cujos resultados e discussão serão mostrados a seguir.

Figura 26 - a) Espectros Raman dos polímeros puros do MBZ na região de baixas frequências. b) espectros de três diferentes regiões de uma mesma pastilha da amostra contendo 80%, 12% e 8% m/m para as formas A, B e C do MBZ, respectivamente.

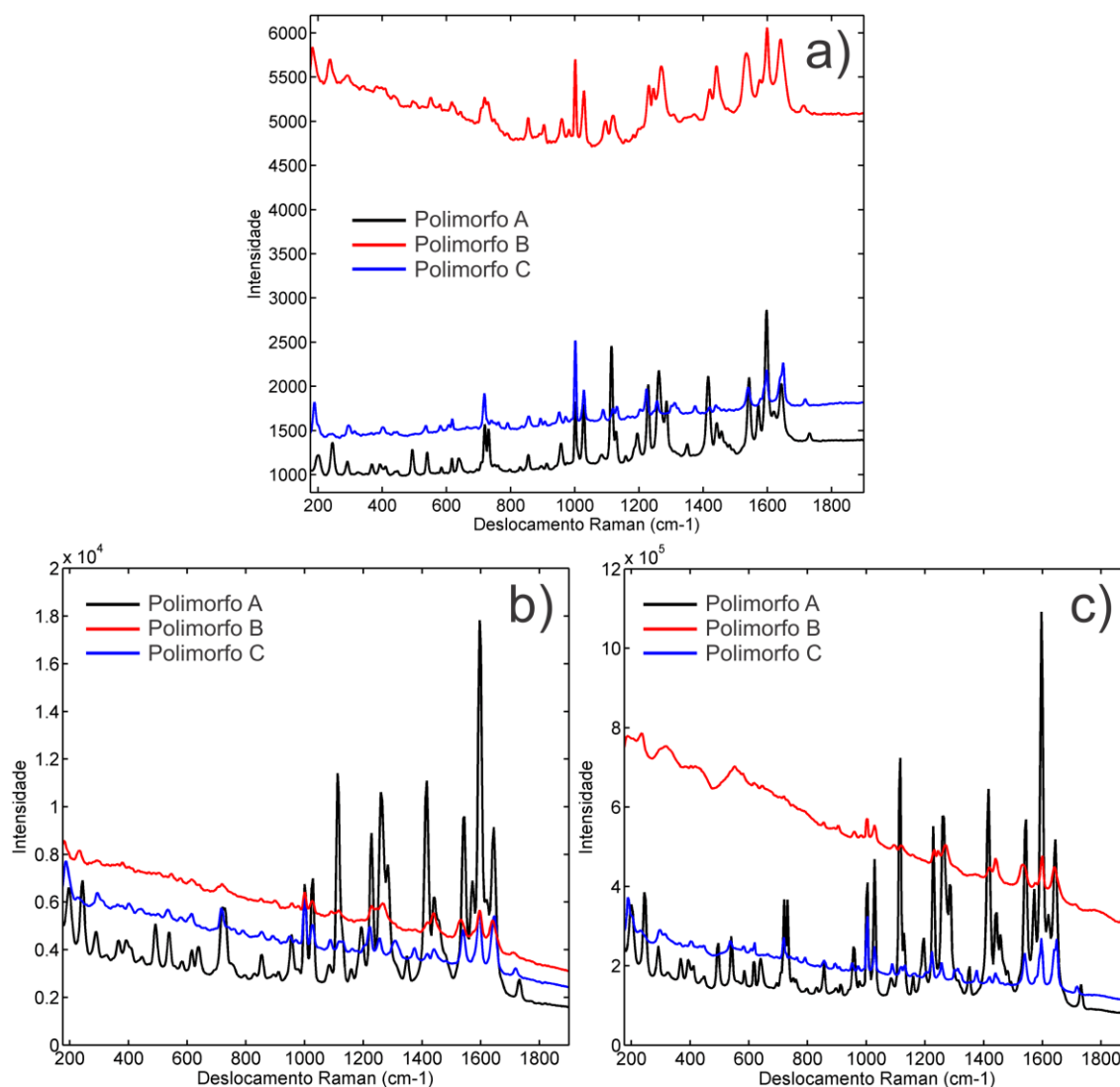


Fonte: Paiva, 2019.

3.4.3 Comparando medidas micro- e macro-Raman utilizando instrumento Raman portátil e de bancada.

Diante dos problemas enfrentados nas medidas em que uma pequena área de iluminação da amostra foi aplicada, medidas com outros instrumentos com maiores áreas de amostragem foram realizadas. Para tanto, dois instrumentos macro-Raman foram introduzidos nas análises das misturas ternárias do MBZ: o macro-Raman1 com *spot* do laser de 80 μm e resolução espectral de 9 cm^{-1} e o macro-Raman2 com *spot* de 100 μm e resolução espectral de 4 cm^{-1} , enquanto que o micro-Raman apresenta *spot* de 3 μm (lente de 10x) e resolução espectral de 3,9 cm^{-1} (grade de 600 l/mm). Inicialmente as medidas adquiridas com os 3 instrumentos foram realizadas em triplicata para fins de comparação. A Figura 27 mostra os espectros Raman dos polímeros puros do MBZ medidos nos equipamentos micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2. Como os espectrômetros macro-Raman1 e macro-Raman2 não medem nas baixas frequências vibracionais, a faixa espectral de trabalho neste experimento de comparação foi de 176 a 1900 cm^{-1} .

Figura 27 - a) Espectros dos polimorfos puros do MBZ medidos nos instrumento a) micro-Raman, b) macro-Raman1 e c) macro-Raman2. Os espectros são médias de triplicatas medidas em diferentes regiões da amostra.



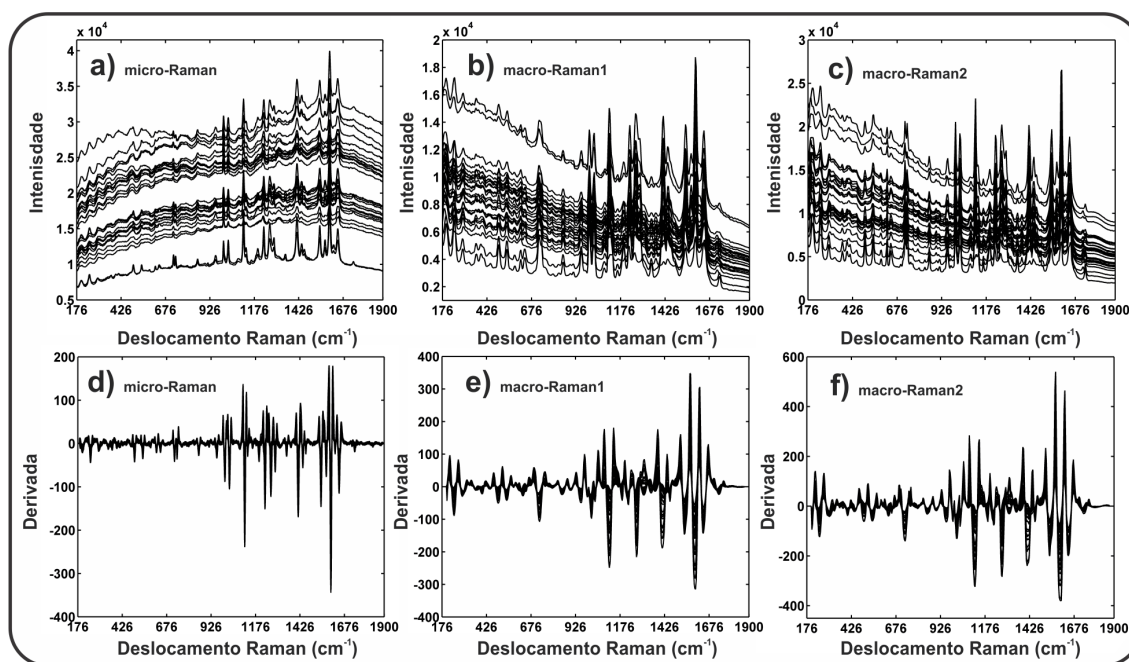
Fonte: Paiva, 2019.

As Figuras 28a, b e c mostram os espectros médios de triplicatas das misturas ternárias dos polimorfos do MBZ adquiridos com os instrumentos micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2, respectivamente. As replicatas foram medidas em diferentes regiões da pastilha. Alguns artefatos, como *spikes* e ruído instrumental, foram minimizados ao se obter os espectros médios das réplicas.

Como pode ser visto na Figura 28a, os espectros brutos de micro-Raman apresentam uma curvatura na linha de base causada por fluorescência quando o laser de 633 nm foi usado. Vale ressaltar que o laser utilizado em ambos os macro-Raman (785 nm) minimizou a influência da fluorescência nos espectros. Os espectros Raman mostram um efeito de dispersão da linha de base causado pelo espalhamento difuso, o qual foi minimizado utilizando a 2ª derivada (Figuras 28d, e e f).

A Tabela 4 resume os resultados obtidos com os modelos PLS utilizando os espectrofotômetros Raman estudados para as misturas ternárias. Esses modelos foram desenvolvidos visando minimizar o RMSECV e o RMSEP, tomando cuidado para que os modelos não fossem sobreajustados. A Tabela 4 demonstra isso, mostrando que todos os modelos apresentaram valores de RMSEC menores que RMSECV. Em geral, os modelos necessitaram de 3 ou 4 variáveis latentes para descrever a variabilidade dos dados dos espectros Raman relacionados à composição da mistura polimórfica. Provavelmente, essas variáveis latentes também levaram em conta informações sobre tamanho e morfologia dos cristais dos polimorfos.

Figura 28 - Espectros brutos (a), (b), (c) e espectros pré-processados (d), (e), (f) (2ª derivada) obtidos com os instrumentos micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2 (em triplicata) respectivamente.



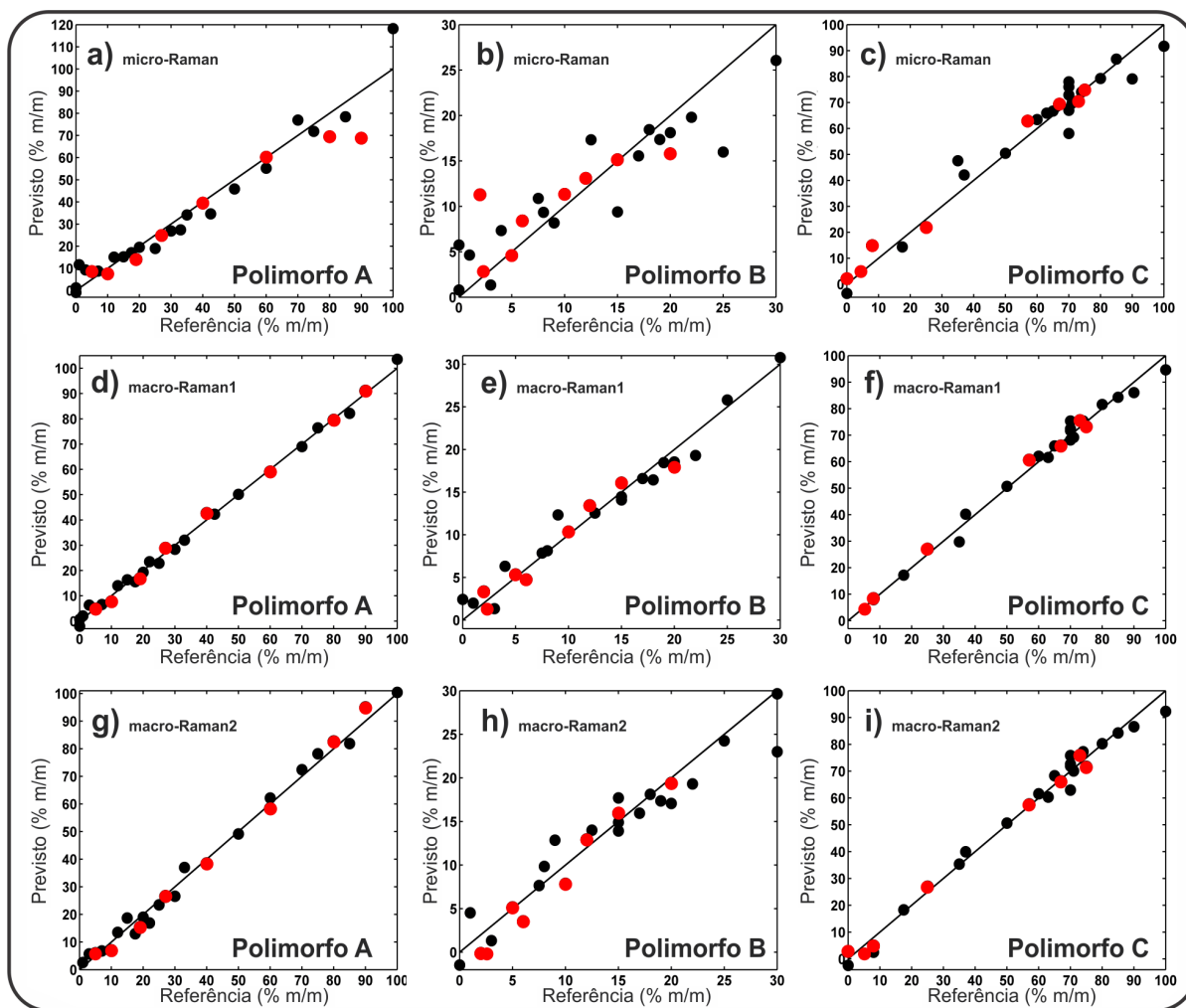
Fonte: Paiva, 2019.

De acordo com o teste F, os valores de RMSEP do micro-Raman e macro-Raman1 obtidos para a determinação do polimorfo A, em triplicata, são estatisticamente diferentes a um nível de confiança de 95%. O mesmo resultado ocorreu quando se comparou o RMSEP entre o micro-Raman e o macro-Raman1 para a determinação do conteúdo do polimorfo B. Para os demais casos, sempre em triplicata, os valores do RMSEP foram estatisticamente semelhantes, com nível de confiança de 95%.

Os gráficos dos valores previstos versus os de referência são mostrados nas Figuras 29a, d e g (para o polimorfo A), nas Figuras 29b, e e h (para o polimorfo B) e nas Figuras 29c, f e i

(para o polimorfo C) empregando o micro-Raman , macro-Raman1 e macro-Raman2, respectivamente. Como pode ser visto, as amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno da linha ideal, indicando que não há evidências de erros sistemáticos. O teste t utilizado para avaliação de *bias* confirmou isso, mostrando que nenhum dos modelos desenvolvidos apresentou erros sistemáticos para o conjunto de predição.

Figura 29 - Gráficos dos valores de referência versus valores previstos, da validações interna (●) e externa (●), obtidos pelos modelos PLS para o polimorfo A (a), (d), (g), B (b), (e), (h) e C (c), (f), (i) empregando as misturas de amostras ternárias para micro-Raman, macro-Raman1 e macro-Raman2, respectivamente.



Fonte: Paiva, 2019.

Tabela 4 - Resultados dos modelos PLS, empregando misturas ternárias, para os três polímeros do MBZ empregando os três espectrofotômetros Raman.

Polimorfo A							
Instr.	Modelo	Anal SEN ^c	RMSEC ^d (% m/m)	R ²	RMSE ^f (% m/m)	Bias	LOD ^g (% m/m)
micro-Raman 3 rep	CV ^a	3,37	3,50 (2) ^e	0,9594	6,26 (2) ^e	0,24	4,18-6,22
	p ^b			0,9156	8,72	-4,74	
micro-Raman 9 rep	CV ^a	3,14	0,78 (5) ^e	0,9733	4,36 (5) ^e	0,20	1,44-2,86
	p ^b			0,9847	3,70	-1,22	
macro-Raman1 3 rep	CV ^a	6,89	1,23 (3) ^e	0,9968	1,76 (3) ^e	3x10 ⁻³	1,49-3,10
	p ^b			0,9968	1,68	-0,06	
macro-Raman2 3 rep	CV ^a	10,06	1,79 (4) ^e	0,9927	2,72 (4) ^e	0,26	2,08-5,14
	p ^b			0,9917	2,73	-0,26	
Polimorfo B							
Instr.	Modelo	Anal SEN ^c	RMSEC ^d (% m/m)	R ²	RMSE ^f (% m/m)	Bias	LOD ^g (% m/m)
micro-Raman 3 rep	CV ^a	2,57	0,77 (4) ^e	0,8451	3,64 (4) ^e	-0,24	1,76-2,75
	p ^b			0,6935	3,19	1,05	
micro-Raman 9 rep	CV ^a	4,49	1,22 (4) ^e	0,9422	2,27 (4) ^e	-0,24	1,77-3,70
	p ^b			0,8574	2,18	0,43	
macro-Raman1 3 rep	CV ^a	5,28	0,99 (4) ^e	0,9719	1,50 (4) ^e	0,07	1,53-3,00
	p ^b			0,9535	1,24	0,18	
macro-Raman2 3 rep	CV ^a	2,39	1,83 (2) ^e	0,9244	2,53 (2) ^e	0,39	3,27-4,82
	p ^b			0,9251	1,58	-0,77	
Polimorfo C							
Instr.	Modelo	Anal SEN ^c	RMSEC ^d (% m/m)	R ²	RMSE ^f (% m/m)	Bias	LOD ^g (% m/m)
micro-Raman 3 rep	CV ^a	1,95	3,27 (3) ^e	0,9440	5,99 (3) ^e	0,12	7,32-10,20
	p ^b			0,9821	3,94	1,66	
micro-Raman 9 rep	CV ^a	3,61	2,10 (4) ^e	0,9727	4,19 (4) ^e	0,08	4,65-7,06
	p ^b			0,9878	3,25	0,61	
macro-Raman1 3 rep	CV ^a	3,73	1,91 (4) ^e	0,9916	2,80 (4) ^e	-0,07	3,28-5,61
	p ^b			0,9952	2,03	0,94	
macro-Raman2 3 rep	CV ^a	10,15	2,74 (3) ^e	0,9840	3,57 (3) ^e	-0,35	5,15-8,38
	p ^b			0,9930	2,47	0,09	

a. Validação cruzada; b. Previsão; c. Sensibilidade analítica; d. Raiz quadrada do erro médio quadrático da calibração; e. Número de variáveis latentes; f. Raiz quadrada do erro médio quadrático; g. Limite de detecção.

Em geral, o desempenho obtido com a configuração micro-Raman foi pior que o obtido com ambos os macro-Raman, como pode ser visto nas Figuras 29a, b e c, em que os valores preditos são mais dispersos em relação à linha ideal. Portanto, menor precisão, maiores valores de LOD e menor Anal SEN foram obtidos para polimorfos do MBZ. Isto pode ser associado com o menor tamanho do spot e não com a resolução espectral, uma vez que os resultados do macro-Raman2 (resolução espectral de 4 cm^{-1}), que têm resolução espectral similar ao micro-Raman (resolução espectral de $3,9\text{ cm}^{-1}$), foram melhores que os do micro-Raman.

Os valores de RMSEP obtidos pelo instrumento macro-Raman1 foram 1,68%, 1,24% e 2,03% m/m para os polimorfos A, B e C, respectivamente. Esses resultados são comparáveis aos descritos na literatura usando espectroscopias de infravermelho próximo e médio (Silva *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2017). O intervalo dos valores de LOD obtidos, para o instrumento macro-Raman1, foram de 1,53-3,00%, 1,49-3,10% e 3,28-5,61% m/m para os polimorfos A, B e C, respectivamente. O cálculo de LOD, de acordo com o método usado (Allegrini e Olivieri, 2014), leva em consideração as variações no espectro derivadas dos componentes que não são o analito de interesse. Por esse motivo, o LOD é apresentado como um intervalo e não como um valor único.

Os coeficientes de regressão do PLS foram analisados e, todos os modelos apresentaram perfis semelhantes em toda a região espectral. Portanto, todas as informações espectrais do Raman foram importantes para quantificar os polimorfos de MBZ.

A Tabela 4 também mostra os resultados para micro-Raman empregando medidas do mapeamento com 9 pontos/replicatas (3×3). Com um aumento de pontos analisados no mapeamento esperava-se que os resultados apresentassem uma melhora nos valores de previsão, o que indicaria que o spot do laser é o parâmetro que mais influencia na obtenção de espectros reprodutivos e representativos da mistura. Como pode ser observado, uma melhoria geral nos resultados foi alcançada, mas exigiu um longo tempo de análise (~ 9 min). Além disso, o RMSEP do modelo de validação com o micro-Raman e 9 pontos/replicatas é estatisticamente diferente quando comparado ao valor do RMSEP do modelo com o macro-Raman1 e 3 repetições.

3.4.4 Influência das morfologias e tamanhos das partículas do MBZ nas medidas micro-Raman

Para entender a influência da morfologia e tamanho das partículas nas medidas com a configuração micro-Raman, foram realizadas medidas utilizando novamente as misturas

binárias que contêm somente os polimorfos A e C, aplicando somente 3 replicatas e na faixa espectral de 176 a 1900 cm^{-1} .

Como mostrado nas Figuras 16 e 17, esse dois polimorfos do MBZ possuem um formato acicular, ou seja, o crescimento do cristal é maior em uma direção devido ao padrão de ligação de hidrogênio. Além disso, o tamanho de partícula do polimorfo A é de 10 μm de comprimento e 1 μm de largura, em média, enquanto o polimorfo C é de 2 μm de comprimento e 0,5 μm de largura, em média. Já o polimorfo B apresenta uma estrutura lamelar com lascas e partículas em forma de placa. Essa distribuição heterogênea no tamanho das partículas do polimorfo B pode estar associada à sua rápida transição da fase solubilizada para a fase sólida durante a recristalização. Essa informação cristalográfica sobre os polimorfos do MBZ é muito importante na caracterização dos espectros Raman e na interpretação das informações coletadas com medidas micro-Raman.

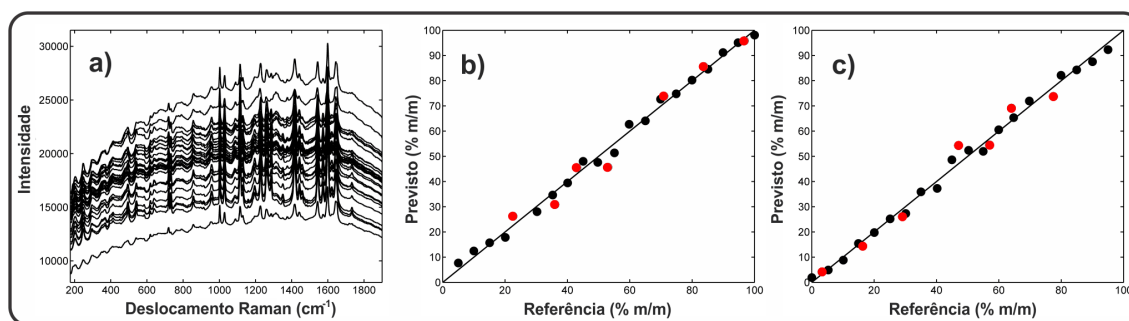
Considerando que os modelos obtidos com a configuração micro-Raman apresentaram os piores erros de previsão para polimorfos de MBZ para as misturas ternárias, foi realizado um estudo complementar para avaliar a influência do tamanho e da morfologia ao utilizar o tamanho de *spot* de 3 μm . Para tanto, novos modelos de PLS foram desenvolvidos empregando as misturas binárias dos polimorfos A e C, que possuem morfologias similares e são diferentes do polimorfo B.

A Figura 30a mostra os espectros médios das amostras binárias em triplicata adquirida com o micro-Raman. Para o pré-processamento desses espectros foi utilizado o mesmo método aplicado anteriormente para as misturas ternárias (2ª derivada) devido às variações semelhantes no padrão da linha de base.

As Figuras 30b e 30c mostram os gráficos dos valores previstos obtidos com o modelo PLS versus os de referência. Como pode ser visto, as amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno da linha ideal e não apresentam erros sistemáticos de acordo com o teste *t* utilizado para avaliação de *bias*.

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos utilizando modelos de calibração multivariada PLS para misturas binárias com o micro-Raman. Os valores de RMSECV e RMSEP para esses modelos de calibração foram de 1,98% e 4,00% m/m, respectivamente para os polimorfos A e C. Os valores R^2 e *bias* para validações internas e externas mostram que os dados foram melhor ajustados ao de referência quando comparados com os modelos obtidos com misturas ternárias em triplicata, empregando o micro-Raman. Além disso, as faixas de LOD foram pelo menos duas vezes menores que as faixas de LOD com as misturas ternárias.

Figura 30 - a) Espectros médios brutos das misturas binárias adquiridas com micro-Raman em triplicata. Gráficos dos valores de referência versus valores previstos, da validação interna (●) e externas (●), obtidos pelos modelos PLS para os polímeros A (b) e C (c).



Fonte: Paiva, 2019.

Tabela 5 - Resultados dos modelos PLS empregando as medidas micro-Raman em triplicata e as amostras de misturas binárias dos polímeros A e C do MBZ.

Conjunto	Modelo	Polímero A				Polímero C			
		R ²	RMSE ^d (% m/m)	Bias	LOD ^e (% m/m)	R ²	RMSE ^d (% m/m)	Bias	LOD ^e (% m/m)
micro-Raman	CV ^a	0,99	1,98 (3) ^c	0,09	1,96-3,11	0,99	1,98 (3) ^c	-0,09	1,77-2,98
3 rep									
Mist. Binárias	P ^b	0,97	4,00	-0,31		0,97	4,00	0,31	

a. Validação cruzada; b. Previsão; c. Variáveis latentes; d. Raiz quadrada do erro médio quadrático; e. Limite de detecção

Fonte: Paiva, 2019.

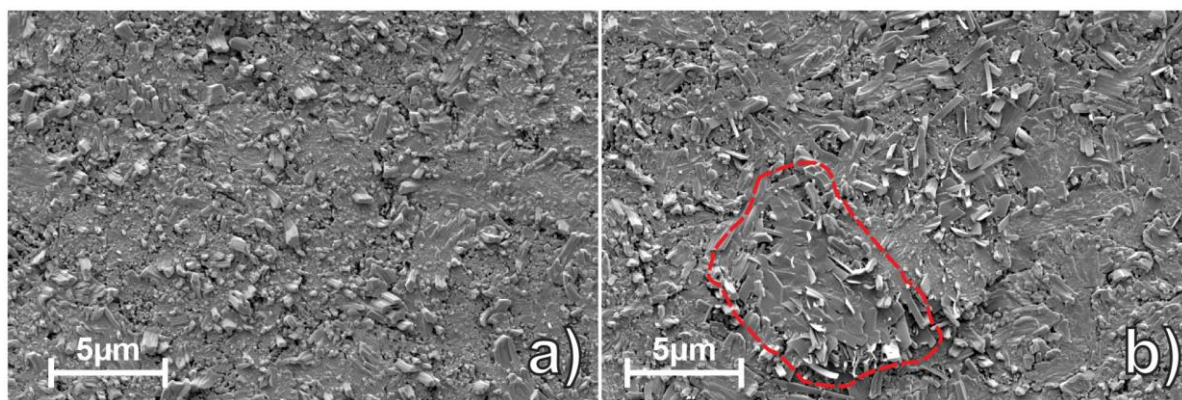
Os polímeros A e C foram amostras fornecidas pela indústria farmacêutica e tiveram melhor qualidade de distribuição de tamanho de partícula. O material fornecido foi micronizado e as análises microscópicas mostraram uma distribuição de tamanho de partícula mais homogênea. Embora o polímero B recristalizado tenha sido peneirado, a distribuição de tamanho das partículas não chegaria a qualidade comparada ao processo industrial farmacêutico. Portanto, o tamanho das partículas influenciou a análise, uma vez que o volume da amostra analisado com a configuração micro-Raman é da mesma ordem de grandeza que as partículas.

A natureza morfológica das partículas também influenciou a medida com micro-Raman. Os polímeros A e C são semelhantes a bastonetes. Durante o processo de compressão das pastilhas as partículas se encaixam em orientações preferenciais e se posicionam lado a lado. Então, as partículas dos polímeros A e C se acomodam bem juntas devido às semelhanças de formato de partícula e, assim, apresentando uma melhor homogeneidade das misturas. Isto pode ser visto na micrografia de superfície da pastilha para a mistura binária de polímeros A e C (50:50 % m/m) mostrados na Figura 31a. Como pode ser visto, não é possível identificar

claramente as partículas de cada polimorfo. Como as dimensões laterais das partículas foram, em média, 1 e 0,5 μm , para os polimorfos A e C, respectivamente, a radiação incidente teve maior chance de atingir essas duas formas simultaneamente produzindo um sinal espectral mais representativo da mistura.

O polimorfo B possui uma morfologia diferente e, por essa razão, as partículas não se aglutinaram muito bem com as partículas dos polimorfos A e C do MBZ. Portanto, o polimorfo B forma estruturas lamelares consigo mesma, apresentando tamanhos de até 7 μm de largura. Isso pode ser visto na Figura 31b (destacada em vermelho circulado), que é uma micrografia de superfície de uma pastilha de uma mistura ternária. Aqui, é fácil identificar as partículas do polimorfo B devido à sua superfície lisa e devido ao seu comportamento aglutinante. Assim, a radiação do laser deve ter atingido regiões da amostra onde a composição local não refletia a proporção total. Portanto, os espectros resultantes não mostraram uma reprodutibilidade e representatividade geral do conteúdo da mistura como desejado.

Figura 31 - (a) Micrografia da superfície da pastilha de uma mistura binária dos polimorfos A e C (50:50 % m/m) e (b) de uma mistura ternária (40%, 25% e 35% m/m A, B e C, respectivamente). A área destacada em vermelho indica o comportamento aglutinante do polimorfo B na superfície da mistura da pastilha.



Fonte: Paiva, 2019.

3.5 CONCLUSÃO DA PARTE 1 DOS OBJETIVOS

Neste capítulo da tese foi possível avaliar o desempenho da espectroscopia Raman na análise qualitativa e quantitativa dos polimorfos do MBZ.

A espectroscopia Raman na região de baixas frequências, empregada na Parte 1a, mostrou-se eficaz para realização de análise quantitativa das misturas binárias dos polimorfos A e C, devido sua alta sensibilidade de discriminação das formas polimórficas cristalinas de fármacos. Para o caso das misturas ternárias as medidas não foram adequadas para análise quantitativa, uma vez que utilizando microscópio confocal tornou-se difícil a aquisição de espectros representativos da mistura. Um sistema macro-Raman, ou seja, aplicando-se um

maior spot do laser, pode ser a solução para melhorar a reprodutibilidade e representatividade das medidas espectrais na região das baixas frequências e, assim, obter melhores resultados nos modelos de calibração multivariada.

Foram desenvolvidos modelos analíticos multivariados para quantificar polimorfos de MBZ empregando três espectrofotômetros Raman com diferentes resoluções espectrais e tamanhos de *spot* do laser (micro- e macro-Raman). O espectrofotômetro micro-Raman utilizado, possui a configuração com maior resolução espectral e menores tamanhos de *spot* de laser ($3,9\text{ cm}^{-1}$ e $3\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente) entre os três instrumentos estudados. Esse instrumento apresentou os piores resultados para os modelos de regressão para a quantificação de polimorfos de MBZ, utilizando medidas em triplicata, pois sua configuração foi mais sensível à morfologia e ao tamanho das partículas dos diferentes materiais. Para alcançar melhores resultados de regressão com o instrumento micro-Raman, foi necessário um mapeamento com mais repetições (9 replicatas), porém, o tempo de análise foi maior diminuindo a frequência analítica sem ganho significativo nos resultados. Por outro lado, o macro-Raman2, que possui uma resolução espectral similar ao micro-Raman, mas com um tamanho de *spot* 33 vezes maior (4 cm^{-1} e $100\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente), apresentou valores de RMSEP três vezes menores. Resultados de regressão semelhantes aos obtidos para o macro-Raman2 foram obtidos com o macro-Raman1, que possui uma resolução espectral duas vezes menor e um *spot* do laser 27 vezes maior (9 cm^{-1} e $80\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente) do que o *spot* de laser do micro-Raman2. Estes resultados indicaram que o tamanho do spot do laser é o fator mais importante para quantificar polimorfos de MBZ com diferentes morfologias e tamanhos de partículas usando espectrofotômetros Raman.

Por fim, o uso de um pequeno tamanho do *spot* de laser para medidas do espalhamento Raman pode não fornecer informações sobre a composição total das misturas sólidas, mas apenas informações locais. Portanto, uma área de iluminação do laser mais ampla resulta em espectros mais reprodutivos e representativos das misturas para uma análise de quantificação confiável.

4. CONSTRUÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO RAMAN

Como mostrado no Capítulo 3 desta tese, o tamanho do *spot* do laser é um fator bastante importante quando se deseja desenvolver método analítico quantitativo para determinação de polimorfos de fármacos utilizando a espectroscopia Raman. Portanto, neste Capítulo será descrita a construção e aplicação de um espectrofotômetro Raman que permite a variação do *spot* do laser de 3 a 3000 μm e que acessa a região das baixas e médias frequências vibracionais tanto Stokes como anti-Stokes. Além disso, por se tratar de um equipamento que foi projetado para operar com filtros *notch* do tipo BHF, a intensidade da radiação espalhada que alcança o detector é maior do que àquelas observadas em instrumentos que operam com triplo monocromador, o que reduz bastante o tempo de aquisição dos espectros.

4.1 COMPONENTES DO ESPECTRÔMETRO RAMAN

Para construir um espectrofotômetro Raman que possa atender aos requisitos necessários para uma análise química quantitativa, foi previamente selecionado uma série de componentes visando deixar o equipamento o mais versátil possível.

Um laser com emissão em 785 nm foi selecionado uma vez que minimiza o efeito de fluorescência para boa parte das amostras. O laser é da marca Cobolt modelo 08-01 com emissão em $784,8 \pm 0,5$ nm com potência variável de 1 a 500 mW controlada por software. O modo espacial é do tipo simples. Contém isolador óptico para evitar danos devido à radiação refletida.

Dois conjuntos de filtros foram utilizados na montagem do equipamento. O primeiro conjunto é composto por dois filtros BHF ASE, ambos com valor de densidade óptica igual a 4 (marca Optigrate - RFS-785-OD4-11M), cuja finalidade é suprimir a emissão espontânea amplificada. O segundo conjunto de filtros é formado por mais dois filtros BHF do tipo *notch* e foram utilizados para filtrar a radiação Rayleigh. Como mencionado no Capítulo 2, tanto os filtros ASE como os *notch* possuem a mesma tecnologia que é o uso da difração de Bragg para reflexão de um determinado comprimento de onda. Porém, são utilizados para finalidades diferentes, que são a “limpeza” espectral e espacial do feixe do laser (filtro ASE) e para rejeição do espalhamento Rayleigh (filtro *notch*).

Foram utilizadas lentes sendo uma do tipo objetiva de 10x (Thorlabs - RMS10X-PF) e outra do tipo esférica com diâmetro de 2 polegadas e distância focal de 32 mm (Thorlabs -

ACL50832U-B) para focar a radiação do laser na amostra, bem como para coletar a radiação espalhada. Diversos dispositivos ópticos como lentes, espelhos e fibra óptica foram utilizados no instrumento e serão melhor descritos na parte experimental.

Todos esses componentes ópticos foram dimensionados para que apresentassem transmitância/reflectância máxima para a região espectral de trabalho do instrumento (600 a 950 nm).

O monocromador (Andor/Oxford SR-500i-C-SIL) é do tipo Czerny-Turner, com 500 mm de distância focal com espeelhos de prata e grade de difração de alumínio, a qual possui 600 linhas/mm e máxima eficiência de difração em 750 nm. Nesse monocromador foi acoplada uma câmera CCD (Andor/Oxford iDUS 416 – DU416A-LDC-DD) utilizada para a detecção do sinal espectral que possui um sensor matricial de 256 x 2000 pixels, o qual possui uma eficiência quântica de 95% em 750 nm.

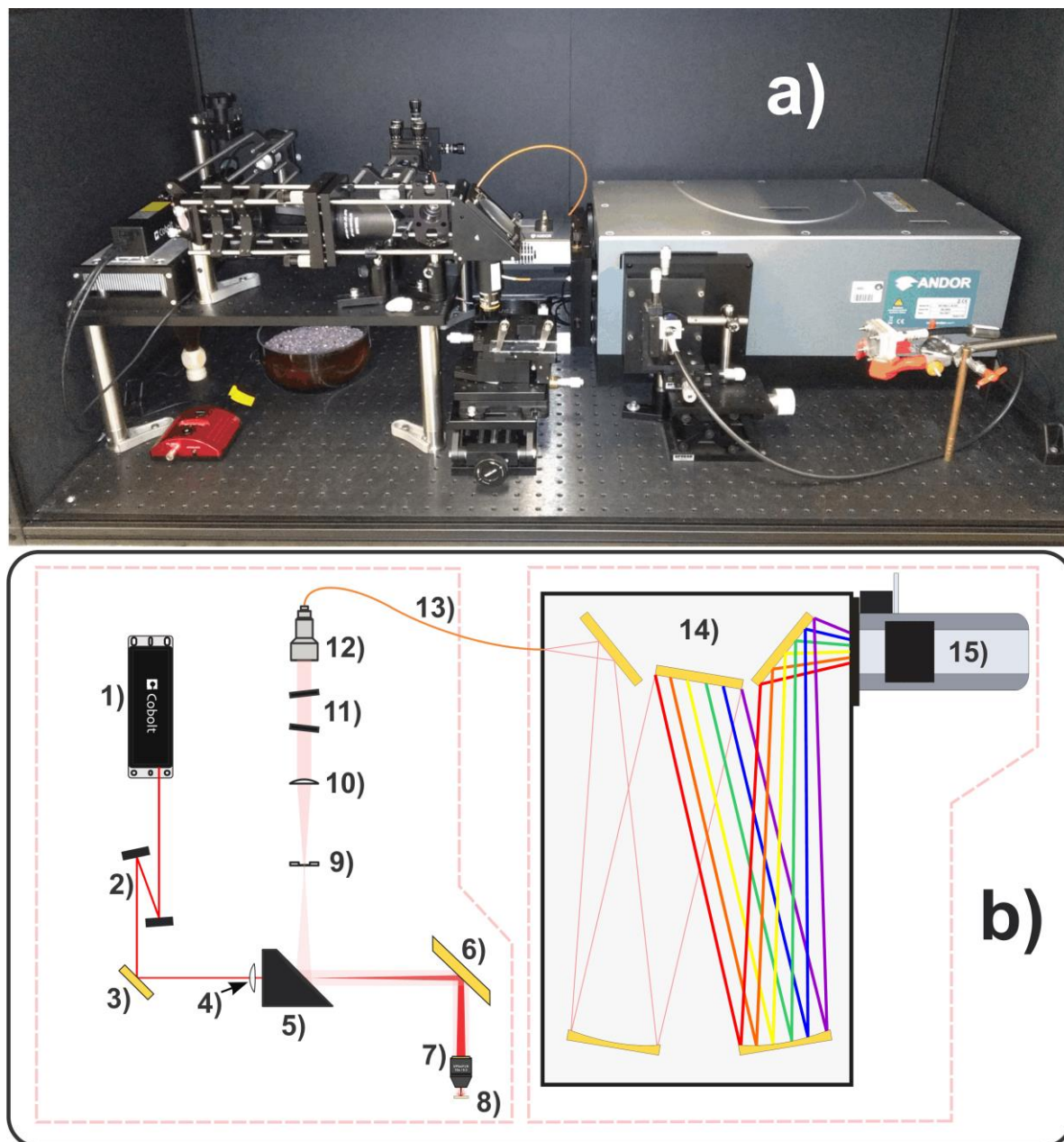
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PARTE 2 DOS OBJETIVOS

4.2.1 Construção do espectrofotômetro Raman

A Figura 32a mostra uma foto do espectrômetro Raman construído, enquanto na Figura 32b é mostrado um desenho esquemático do instrumento, destacando as principais partes ópticas. Essas partes são os componentes ópticos responsáveis pela etapa de excitação da amostra, filtração e coleta da radiação espalhada assim como o monocromador e a câmera CCD responsáveis pela separação e detecção do espectro. Todo o instrumento foi construído em mesa óptica e dentro de uma caixa escura para evitar que a radiação visível do ambiente interfira nas medidas espectrais.

A radiação emitida pelo laser (1) é refletida pelos filtros ASE (2), e refletida por um espelho dicróico (3) em direção a lente (4) que tem a função de aumentar o *spot* do laser (opcional). O feixe do laser continua seu caminho passando por uma fenda circular de 3,2 mm de diâmetro do espelho parabólico (5), é refletido no espelho de prata (6) e é incidido na lente que foca a radiação na amostra (7). A radiação espalhada é coletada e colimada pela lente da amostra no espelho de prata (6), que reflete essa radiação no espelho parabólico (5) cuja a função é focar a radiação na fenda (9). A radiação que passa pela fenda é colimada por uma lente (10) de forma que a radiação colimada passa pelos dois filtros *notch* (11) para ser, finalmente, focada na fibra óptica (13) através da lente (12). A fibra óptica conduz a radiação para a entrada do monocromador (14) que dispersa a radiação sobre a câmera CCD (15).

Figura 32 - a) Imagem do espectrofotômetro Raman montado no laboratório. b) Desenho esquemático do sistema óptico. 1) laser, 2) filtros ASE, 3) espelho dicróico, 4) lente de abertura do *spot*, 5) espelho parabólico de 2" revestimento de prata, 6) espelho de prata, 7) lente da amostra, 8) amostra, 9) fenda de 0,6 mm, 10) lente colimadora, 11) filtros *notch*, 12) lente da fibra óptica e 13) fibra óptica 50 μm , 14) monocromador e 15) câmera CCD.



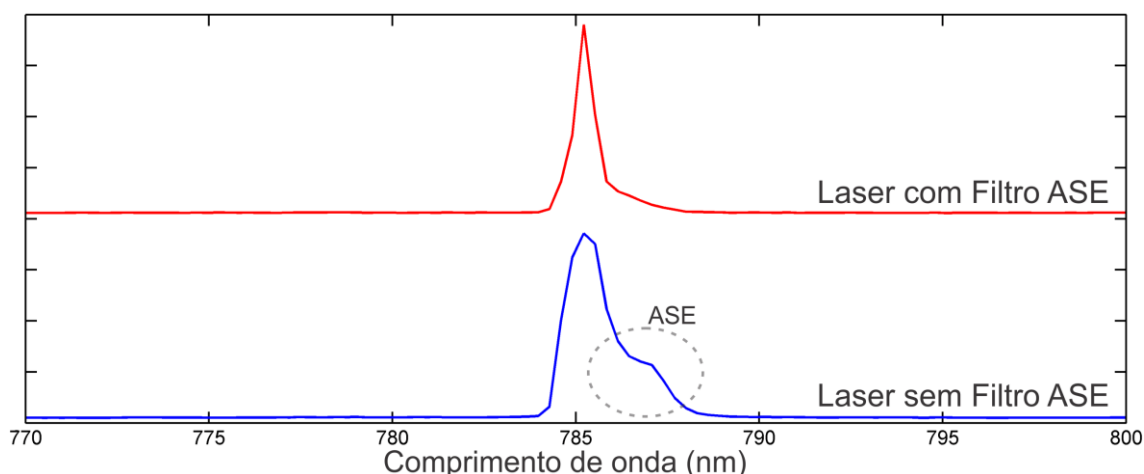
Fonte: Paiva, 2019.

No geral, o projeto do espectrofotômetro Raman visou construir um instrumento que detectasse a faixa espectral de 10 a 2000 cm^{-1} e que fosse capaz de variar o tamanho do *spot* do laser, a fim de ser útil para finalidades analíticas quantitativas. Essas duas características não são encontradas juntas em espectrofotômetros Raman comerciais. Nesse ponto, uma série de cuidados foram tomados na escolha dos componentes do espectrofotômetro Raman. Como já foi dito, o espalhamento Raman é um fenômeno raro onde sua ocorrência decresce muito com

o aumento do comprimento de onda de excitação. Além disso, a abertura do *spot* do laser diminui muito a potência efetiva na região iluminada. Ainda, o laser necessita ser do tipo modo simples e possuir banda de emissão estreita o suficiente para não encobrir a região das baixas frequências vibracionais. Portanto, as especificações de fábrica do laser escolhido são 500 mW de potência máxima, emissão em $784,8 \pm 0,5$ nm.

Filtros ASE foram utilizados para suprimir a radiação ASE do laser e o resultado dessa filtragem é mostrada na Figura 33, que mostra os espectros de emissão do laser com e sem o filtro. A densidade óptica (OD), ou seja, a capacidade de atenuação da radiação, desses filtros com tecnologia BHF são de 4 OD e, por esse motivo, são utilizados dois filtros ASE (8 OD) para que a radiação ASE seja atenuada na ordem de 10^8 vezes.

Figura 33 - Espectro de emissão do Laser 785 nm com (→) e sem (→) filtro ASE. O círculo tracejado destaca a radiação ASE na curva azul e, que está ausente na curva vermelha.

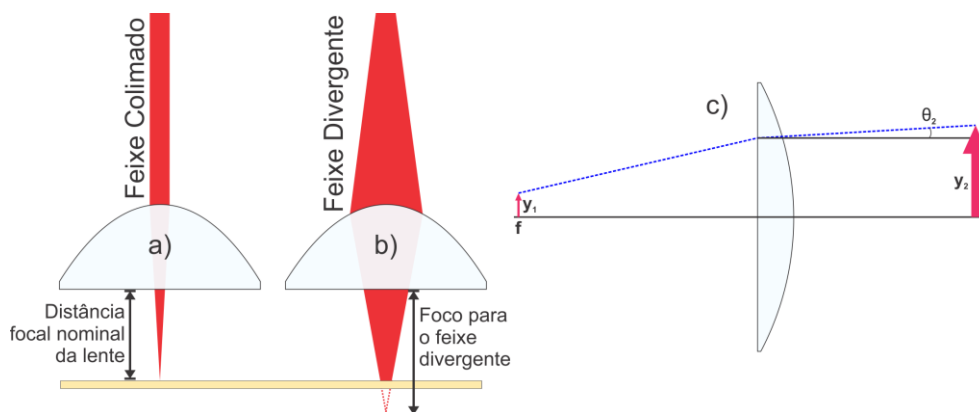


Fonte: Paiva, 2019.

A variação do *spot* do laser foi realizada utilizando uma lente (4) no caminho do feixe do laser posicionada antes do espelho parabólico. O feixe do laser, antes colimado, torna-se divergente ao atravessar essa lente, de forma que quando atinge a lente da amostra (7) será focalizado depois do valor nominal de foco da lente. Dessa forma, na distância focal nominal da lente, posição ajustada para aquisição do espalhamento Raman, a região iluminada pelo laser será maior (Figura 44b) que aquela se o feixe do laser estivesse colimado (Figura 44a). Esse sistema é opcional, ou seja, pode ser retirado para trabalhar no sistema convencional com o feixe colimado. Para a abertura do *spot* do laser quatro lentes foram adquiridas, sendo 3 lentes do tipo *meniscus* com distância focal de 300 mm, 200 mm e 100 mm e outra do tipo plano convexa de 50 mm de foco. A ideia dessa configuração é que quanto menor for a distância focal

da lente (4), maior será o ângulo de divergência do laser e maior será o *spot* do mesmo na posição nominal de foco da lente da amostra.

Figura 34 - Esquema exemplificando o ponto de foco do laser quando o feixe incide na lente de forma a) colimada ou b) divergente. c) Esquema exemplificando os parâmetros para obtenção de um feixe colimado baseado no ângulo de divergência. y_1 é a fonte de luz, y_2 é a imagem colimada e θ_2 é o ângulo de divergência do feixe colimado.



Fonte: Paiva, 2019.

Para sua maior eficiência, os filtros *notch*, assim como os filtros ASE, necessitam de ajustes finos de seus ângulos em relação ao feixe incidente. Como se trata de uma difração de Bragg, o ângulo dos filtros é ajustado para máxima reflexão da radiação do laser, no caso dos filtros ASE, ou para máxima rejeição do espalhamento Rayleigh, no caso dos filtros *notch*. Portanto, a eficiência desse tipo de filtro é altamente dependente da qualidade de colimação do feixe incidente. Para os filtros *notch* utilizados, o ângulo de divergência deve ser ≤ 2 mrad ($\leq 0,1^\circ$).

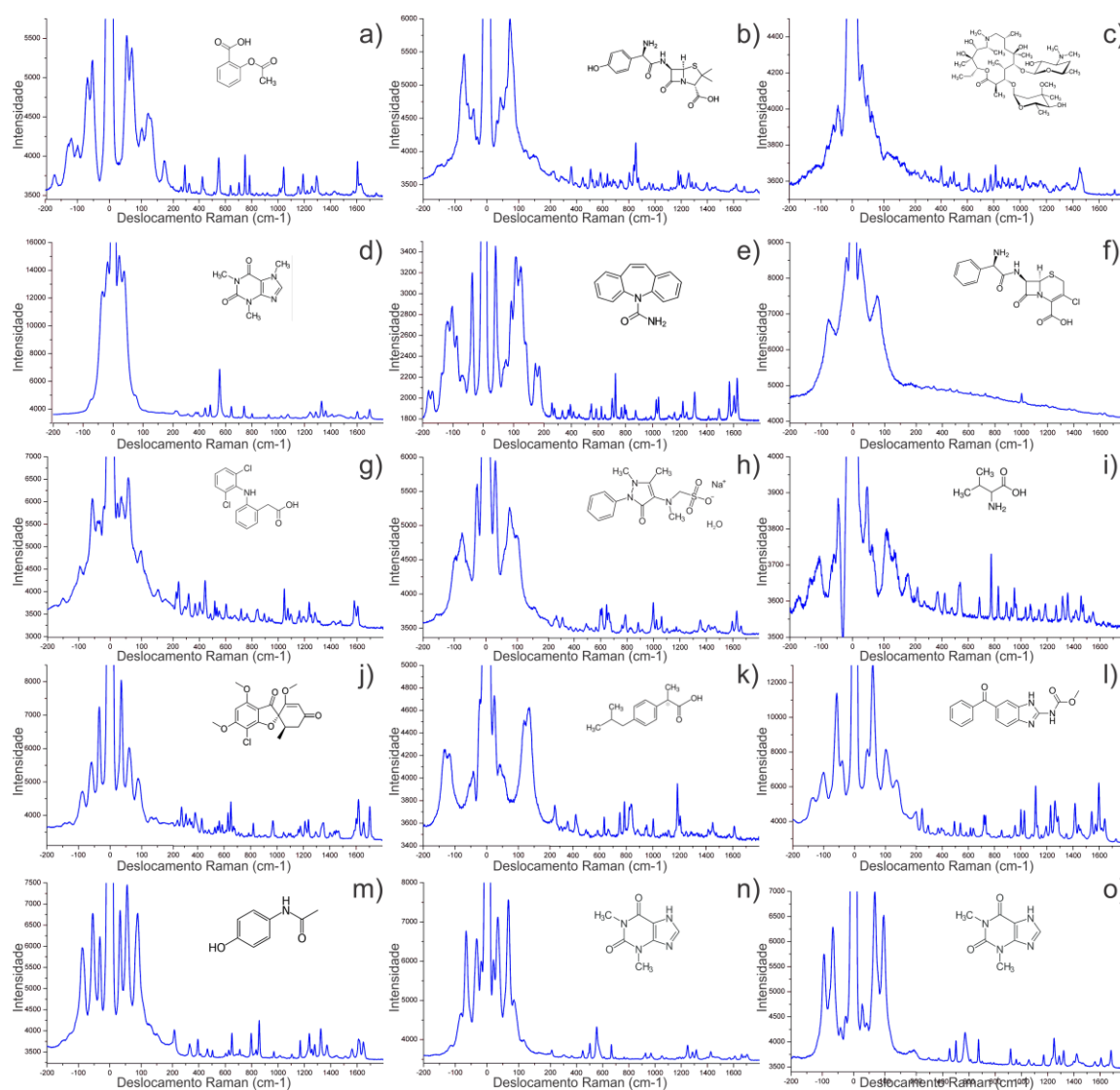
A Figura 44c mostra alguns parâmetros importantes para obtenção de um feixe colimado que são, o tamanho da fonte de luz (y_1) e o foco da lente (f). Quanto menor for y_1 e maior for f , menor será o ângulo de divergência do feixe colimado (θ_2) de acordo com a equação 5:

$$\theta_2 = y_1/f \quad (5)$$

No caso do espectrômetro Raman construído, y_1 é o diâmetro da fenda circular (9) (0,6 mm de diâmetro) e a lente em questão possui 75 mm de distância focal nominal (10), portanto, $\theta_2 = 8$ mrad. Apesar desse valor ser maior que o recomendado pelo fabricante (≤ 2 mrad) os espectros obtidos apresentaram resultados satisfatórios alcançando a faixa espectral de -200 a -15 cm^{-1} e 10 a 1800 cm^{-1} , como mostrado na Figura 35 para diversos produtos farmacêuticos. Como pode ser observado, o sistema permite também a detecção do espalhamento Anti-Stokes.

No entanto, a região útil Anti-Stokes ficou limitada até -200 cm^{-1} devido à queda de eficiência de transmissão dos filtros *notch*.

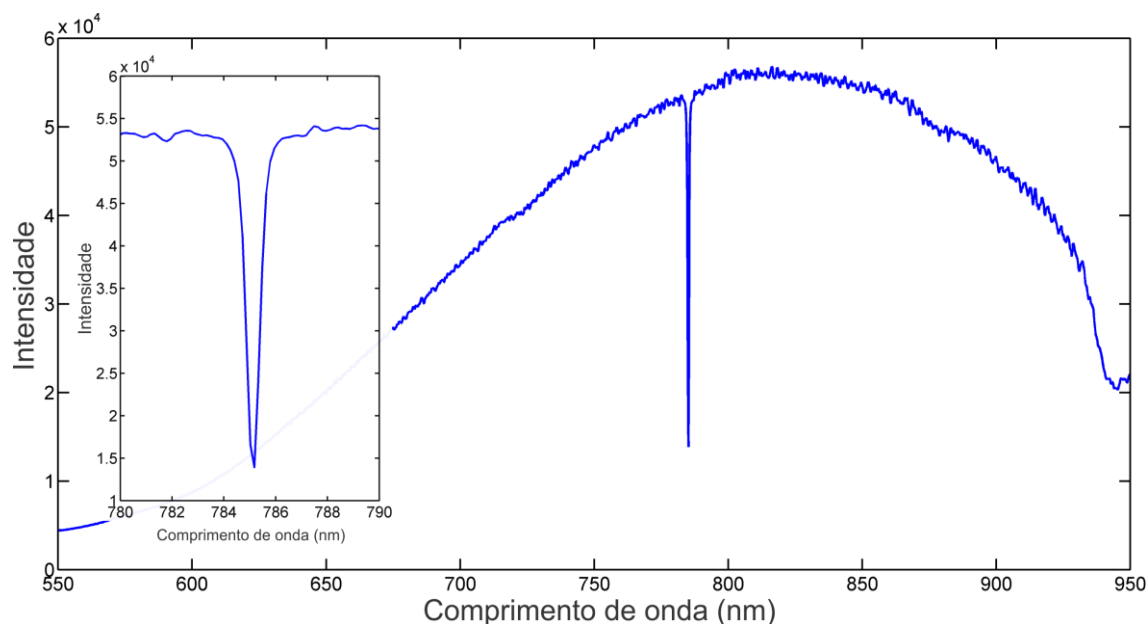
Figura 35 - Espectros Raman adquiridos com o espectrometro construído no laboratório. a) ácido acetilsalicílico, b) amoxicilina, c) azitromicina, d) cafeína, e) carbamazepina FIII, f) cefaclor, g) diclofenaco, h) dipirona sódica monoidratada, i) DL-valina, j) griseofulvina, k) ibuprofeno, l) mebendazol FA, m) paracetamol FII, n) teofilina FII, o) teofilina FM.



Fonte: Paiva, 2019.

Na Figura 36 é mostrado um espectro de transmissão do par de filtros *notch* utilizando uma lâmpada de tungstênio como fonte. Como pode ser observado, a banda de rejeição desses filtros é bastante estreita permitindo que a partir de 786 nm (nesse caso $\sim 16\text{ cm}^{-1}$ de deslocamento Raman Stokes), sejam detectados os fótons espalhados.

Figura 36 - Espectros de transmissão do par de filtros *notch* BHF utilizando uma lâmpada de tungstênio.



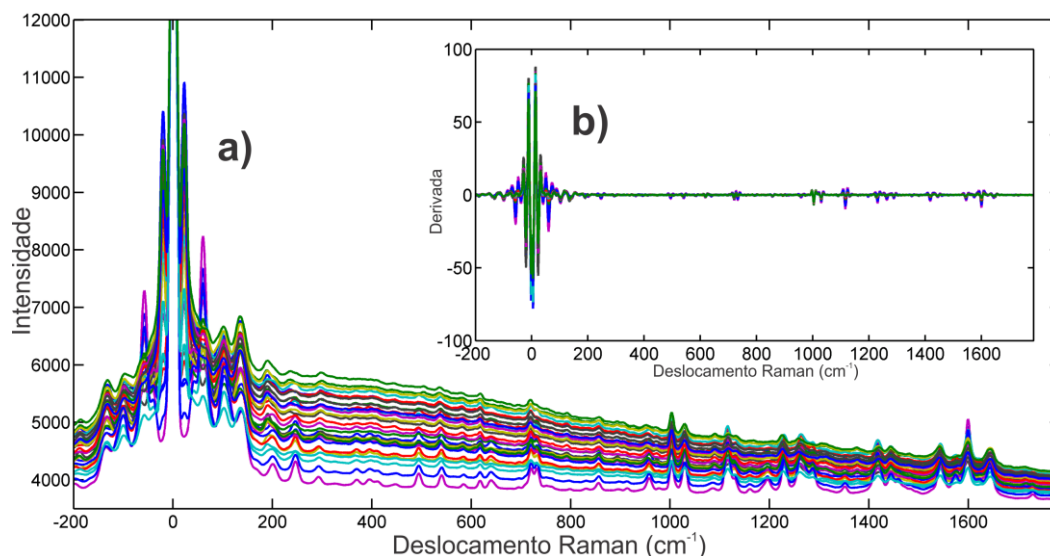
Fonte: Paiva, 2019.

4.2.2 Modelos de calibração multivariada utilizando espectros do espectrômetro Raman construído

Para avaliar o desempenho do espectrômetro Raman construído, espectros das misturas ternárias do MBZ foram adquiridos. Os espectros foram adquiridos na faixa espectral de -200 à 1800 cm^{-1} em triplicatas, em diferentes regiões da amostra. O *spot* do laser foi de aproximadamente $3000\text{ }\mu\text{m}$ que é o valor máximo permitido utilizando a lente de abertura de 50 mm de distância focal. Para tanto, a lente da amostra foi a esférica de 32 mm de distância focal e $2''$ de diâmetro. Para um *spot* grande, esta lente, esférica teve um melhor desempenho, pois seu maior tamanho permite um melhor aproveitamento da luz espalhada aquele obtido para a lente objetiva de $10\times$.

Para obter a posição de foco da amostra em relação à lente, primeiro é utilizado o feixe colimado do laser, ou seja, sem a lente divergente, para ajustar o máximo de sinal espectral. Uma vez ajustado o sinal, a lente divergente é posicionada e o espectro é adquirido. Foi utilizado um tempo de integração de 10 s . Os melhores resultados foram obtidos aplicando a 2^{a} derivada com janela de suavização de 15 pontos. Os espectros médios das triplicatas dos dados brutos são mostrados na Figura 37a. Como pode ser observada a linha de base apresentou variações decorrentes de efeitos aditivos, multiplicativos e devido à fluorescência, que juntas são bastante complexas de serem corrigidas. A melhor correção foi obtida aplicando a 2^{a} derivada com janela de suavização de 15 pontos. (Figura 37b).

Figura 37 - Dados espectrais brutos (a) e pré-processados com a 2ª derivada (b) adquiridos com o espectrômetro Raman construído na faixa espectral de -200 a 1800 cm^{-1} .



Fonte: Paiva, 2019.

A Tabela 6 mostra os resultados dos modelos de calibração multivariada, aplicando o PLS, para determinação dos teores dos polimorfos do MBZ nas misturas ternárias. Amostras anômalas foram identificadas através dos gráficos de influência e retiradas da modelagem. Os valores de RMSEP para os polimorfos A, B e C do MBZ foram de 2,78, 2,24 e 2,93% m/m, respectivamente. Os valores de *bias* em todos os modelos indicam que não há erros sistemáticos nas medidas segundo o teste t aplicado com 95% de confiança. A faixa de LOD para as formas A, B e C foram de 2,23-3,93, 1,80-3,38 e 5,48-7,22% m/m, respectivamente.

Na Figura 38 são mostrados os gráficos dos valores preditos pelo modelo PLS versus os valores de referência na validação interna e na validação externa (predição) para os três polimorfos do MBZ. As amostras estão distribuídas aleatoriamente em torno da reta ideal indicando que não há erros sistemáticos.

Tais resultados foram semelhantes àqueles obtidos com o macro-Raman1 e macro-Raman2 e são melhores que os obtidos com o micro-Raman. Isso indica mais uma vez que a abertura do *spot* do laser é um parâmetro importante para a análise quantitativa dos polimorfos do MBZ. No entanto, pode existir um limite do tamanho do *spot* em que não há mais ganho de precisão e exatidão dos dados espectrais. Vale a pena mencionar que mais testes no sistema instrumental, bem como no procedimento de aquisição dos dados espectrais, devem ser feitos para verificar este comportamento.

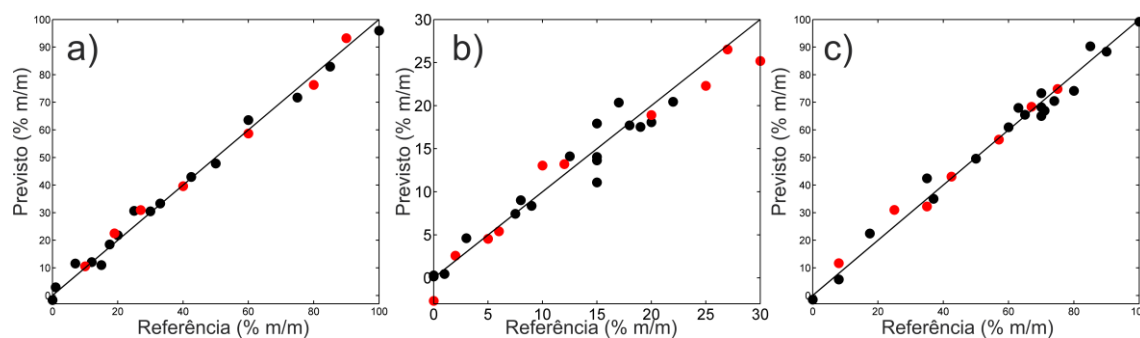
Tabela 6 - Resultados dos modelos PLS, empregando misturas ternárias dos polímeros A, B e C do MBZ empregando o espectrofotômetro Raman construído com *spot* do laser de 3000 μm .

Instr.	Modelo	Polímero A				
		Anal SEN ^c	R ²	RMSE ^e (% m/m)	Bias	LOD ^f (% m/m)
Raman construído 3 replicatas <i>spot</i> 3000 μm	CV ^a		0,99	2,91 (3) ^d	-0,06	
	p ^b	4,85	0,99	2,78	0,84	2,23-3,93
Instr.	Modelo	Polímero B				
		Anal SEN ^c	R ²	RMSE ^e (% m/m)	Bias	LOD ^f (% m/m)
Raman construído 3 replicatas <i>spot</i> 3000 μm	CV ^a		0,94	1,77 (4) ^d	-0,09	
	p ^b	20,64	0,95	2,24	-0,79	1,80-3,38
Instr.	Modelo	Polímero C				
		Anal SEN ^c	R ²	RMSE ^e (% m/m)	Bias	LOD ^f (% m/m)
Raman construído 3 replicatas <i>spot</i> 3000 μm	CV ^a		0,98	3,73 (2) ^d	-0,06	
	p ^b	5,21	0,98	2,93	1,18	5,48-7,22

a. Validação cruzada; b. Previsão; c. Sensibilidade analítica; d. Número de variáveis latentes; e. Raiz quadrada do erro médio quadrático; f. Limite de detecção.

Fonte: Paiva, 2019.

Figura 38 - Gráficos dos valores de referência versus valores previstos, das validações interna (●) e externa (●), obtidos pelos modelos PLS para o polímero A (a), B (b) e C (c) empregando o espectrofotômetro Raman construído com *spot* do laser de 3000 μm .



Fonte: Paiva, 2019.

4.3 CONCLUSÃO DA PARTE 2 DOS OBJETIVOS

Neste capítulo da tese foi descrita a construção e avaliação de um espectrofotômetro Raman que pode operar com diferentes tamanhos de *spot* do laser e que pode obter espectros nas regiões das baixas e médias frequências vibracionais.

O instrumento Raman construído apresentou eficiência na aquisição de espectros na faixa espectral de 10 a 2000 cm^{-1} , para diversos fármacos, devido ao uso dos filtros BHF (*notch*

e ASE) de banda ultra-fina e ao alinhamento óptico necessário para o bom funcionamento dos mesmos.

Também, o espectrofotômetro Raman construído apresentou desempenho semelhante aos instrumentos comerciais macro-Raman¹ e macro-Raman² na aplicação para determinação dos polimorfos do MBZ por meio de calibração multivariada. Reforçando o fato de que o tamanho do *spot* do laser é um parâmetro importante para análise quantitativa de polimorfos de fármacos.

Os resultados obtidos a partir do espectrofotômetro construído no laboratório foram melhores que àqueles obtidos com o micro-Raman, o qual apresenta um custo estimado 5 vezes maior. Além disso, o tempo de obtenção dos espectros com o espectrofotômetro construído comparado ao tempo do micro-Raman, em condições que levem a resultados semelhantes de RMSEP, é 180 vezes menores, o que é importante para aplicações analíticas ou para seu emprego diretamente em processo de produção de fármacos.

5. ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DOS POLIMORFOS DA TEOFILINA

Neste capítulo da tese serão discutidos os resultados referente à análise qualitativa dos polimorfos II e M da teofilina (THEO) bem como um estudo sobre a desidratação do polimorfo M da teofilina com ênfase nos resultados espectroscópicos Raman e Terahertz (Parte 3 dos objetivos). O estudo pretende além de abordar a atribuição espectral da região das baixas frequências vibracionais, definir uma estrutura do produto da desidratação o qual existem evidências de sua existencia na literatura, porém, ainda não foi sugerido uma estrutura cristalina da mesma. Portanto, a seguir será abordada uma introdução sobre os estudos reportados na literatura sobre a desidratação do polimorfo M da teofilina, mostrando as evidências de um metaestado, denominado em alguns trabalhos de polimorfo III da teofilina.

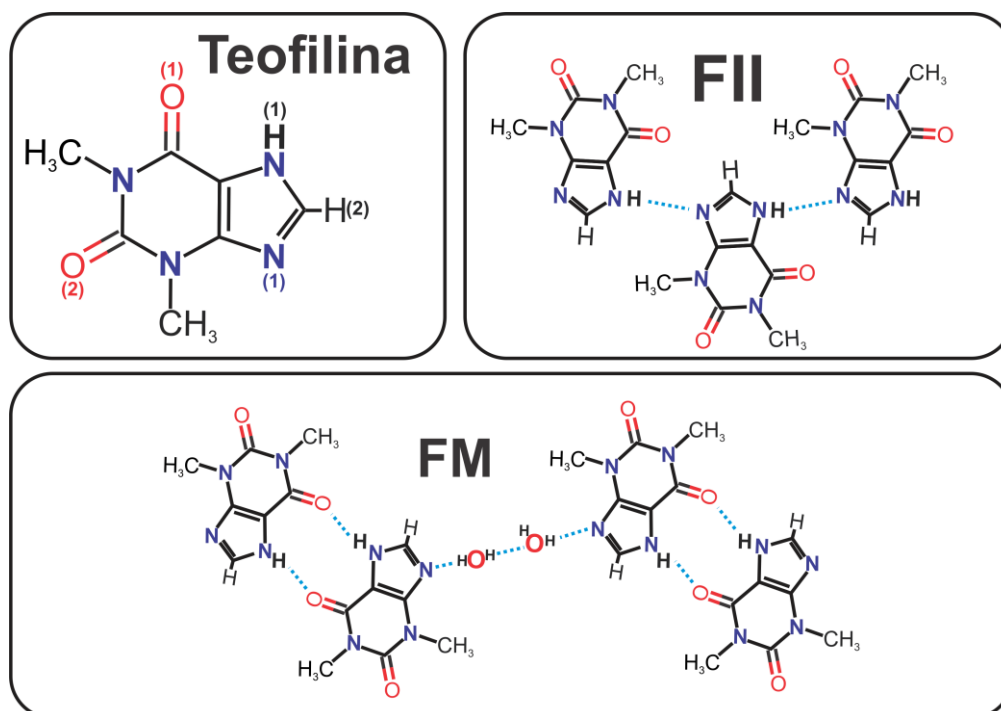
5.1 DESIDRATAÇÃO DA TEOFILINA MONOIDRATADA (REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)

A THEO possui 5 polimorfos anidros reportados na literatura (I, II, III, IV e V) e um solvatomorfo monoidratado chamado de Forma M (Bobrovs *et al.*, 2015; Khamar *et al.*, 2002; Eddleston *et al.*, 2013). O polimorfo I é o mais estável à altas temperaturas e é sintetizado aquecendo o polimorfo II à 270 °C. Uma vez formado possui estabilidade à temperatura ambiente. A Forma II é o produto cinético dentre os polimorfos da THEO e, também é estável à temperatura ambiente. Apesar de existir os outros polimorfos anidros, o polimorfo II é comumente chamado de forma anidra da THEO nos artigos por ser a forma polimórfica mais comum à temperatura ambiente. O polimorfo IV é a forma termodinamicamente estável e sua síntese ocorre por meio de transformação de fase sólido-sólido mediada por solvente (metanol). Entretanto, esse polimorfo não é simples de ser obtido (Fucke *et al.*, 2012). A Forma V foi recristalizada utilizando a Forma II como material de partida e nitrometano como solvente.

As duas formas polimórficas da THEO mais relevantes são a Forma II e a Forma M, pois a Forma II é o polimorfo utilizado para produção do medicamento e esses dois polimorfos se interconvertem facilmente, dependendo das condições de temperatura e umidade relativa (RH) do ambiente. A Figura 39 mostra um esquema do padrão das ligações de hidrogênio dos polimorfos II e M da teofilina, bem como mostra uma molécula da teofilina destacando os principais átomos formadores dessa interação intermolecular. O polimorfo II possui somente um padrão de ligação de hidrogênio onde envolve o N(1) e o H(1). Já o polimorfo

monohidratado (FM) é formado por dímeros de moléculas de teofilina, ligados por interações de hidrogênio entre o O(1) e H(1) onde os dímeros são intercalados por duas moléculas de água que se ligam, por meio de ligações de hidrogênio, com o N(1) da teofilina. As moléculas de água formam um corredor perpendicular ao plano mostrado na Figura 39 e, por isso, o polimorfo M é um hidrato do tipo canal simples.

Figura 39 - Desenhos esquemáticos das principais interações intermoleculares, ligações de hidrogênio, formadas nos polimorfos II e M da teofilina. Uma molécula da teofilina também é mostrada destacando os principais átomos que formam ligações fortes de hidrogênio.



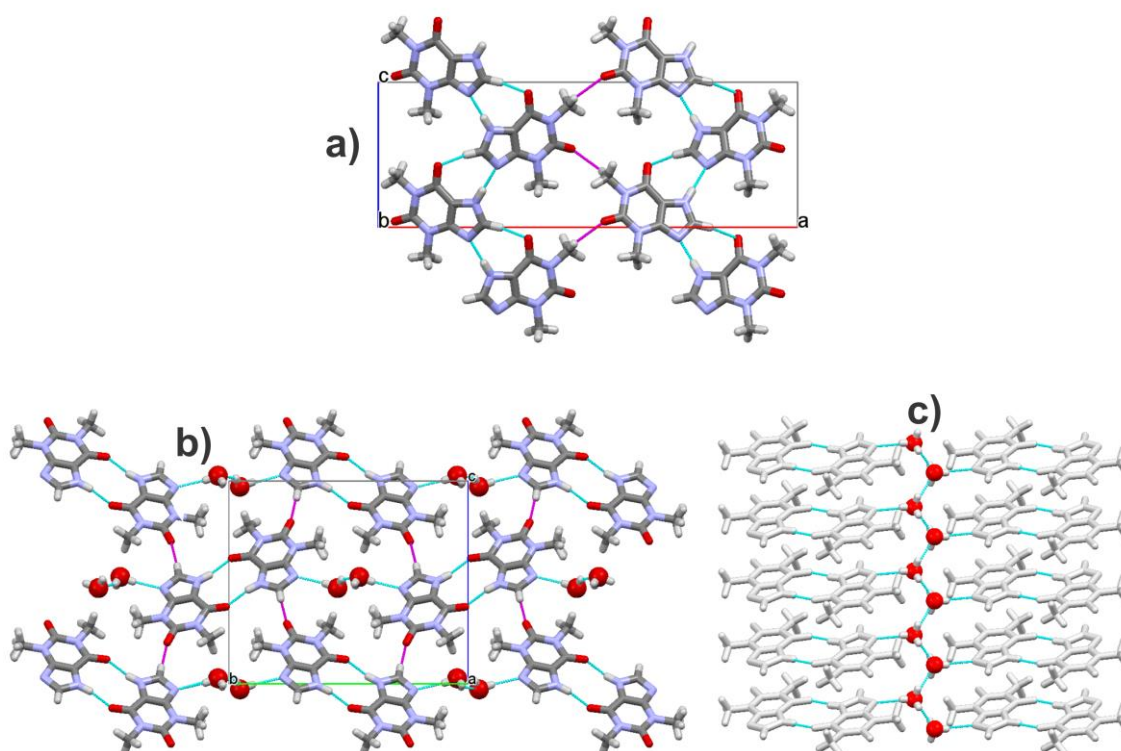
Fonte: Paiva, 2019.

Esses polimorfos da teofilina possuem suas estruturas cristalinas elucidadas sendo seus sistemas cristalinos ortorrômbico para o polimorfo II (Fucke *et al.*, 2012) e monoclinico para o polimorfo M (Sun *et al.*, 2002). As células unitárias de cada um desses polimorfos são mostradas na Figura 40. Essas formas polimórficas possuem sobreposições de planos das moléculas da teofilina na direção “b” para o polimorfo II e “a” para o polimorfo M (Figuras 40a e 40b). As distâncias dessas camadas interplanares são de 3,37 Å para os polimorfo II e 3,26 Å para o M, indicando empilhamento $\pi - \pi$, mas apresentando deslocamentos paralelos (Fucke *et al.*, 2012).

O padrão das ligações de hidrogênio fortes (linhas tracejadas na cor azul claro da Figura 40) das formas polimórficas aqui mostradas fazem com que lâminas sejam formadas nos planos “b-c” e “a-b” para os polimorfos II e M, respectivamente. Ligações de hidrogênio mais fracas

(linhas tracejadas na cor magenta da Figura 40) se formam entre essas lâminas que são as direções de menor crescimento dos cristais. Além disso, na Figura 40c pode ser melhor observado o canal formado pelas moléculas de água, na direção “a”, para o polimorfo M, típico de hidratos do tipo canal.

Figura 40 - Projeções das células unitárias dos polimorfos II (a) e M (b – c) da THEO. O traço vermelho, verde e azul identificam as direções e os tamanhos “a”, “b” e “c” da célula unitária, respectivamente. Em c) é destacado o túnel formado pelas moléculas de água na direção “a” do polimorfo M.



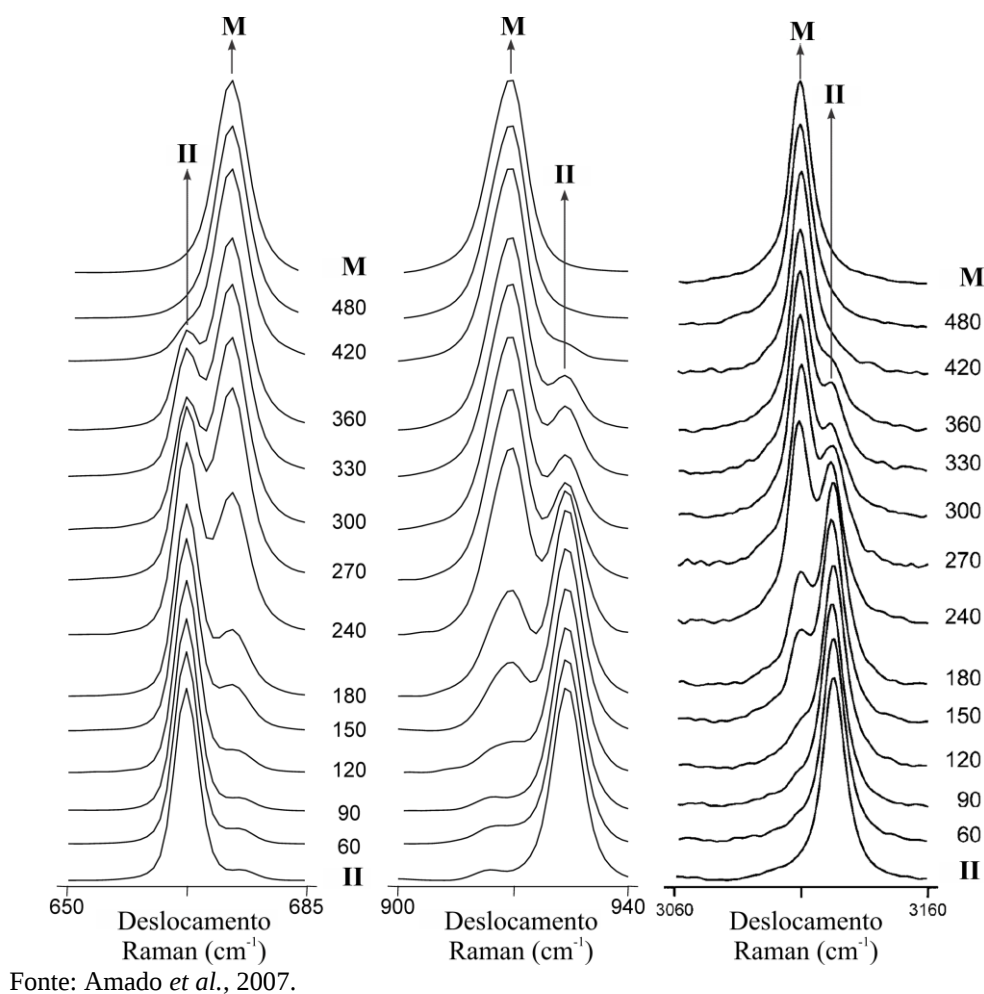
Fonte: CSD code: a) BAPLOT01 e b-c) THEOPH01.

Os processos de transformação de fase sólido-sólido da THEO já foram bastante estudados por diversos grupos de pesquisas. É de suma importância o conhecimento detalhado desses mecanismos de transformação, a fim de evitá-los durante os processos de fabricação dos medicamentos e durante sua estocagem.

Amado *et al.*, 2007, realizaram experimentos onde uma amostra da teofilina, Forma II, ficou exposta sob uma RH de 100% em um vaso fechado e, espectros Raman foram obtidos ao longo do tempo durante 10 horas (600 min). A Figura 41 mostra a evolução dos espectros Raman, obtidos à 22 °C, em três regiões isobésticas. Pode ser observado que já com 60 min, um ombro na região da banda da Forma M começa a se formar e com 480 min a conversão é praticamente completa. Segundo os autores, o mecanismo ocorre em uma única etapa. As

moléculas de água adsorvidas nas partículas difundem para dentro do cristal formando canais, isto permite várias nucleações em posições aleatórias para formação e depois crescimento da Forma M.

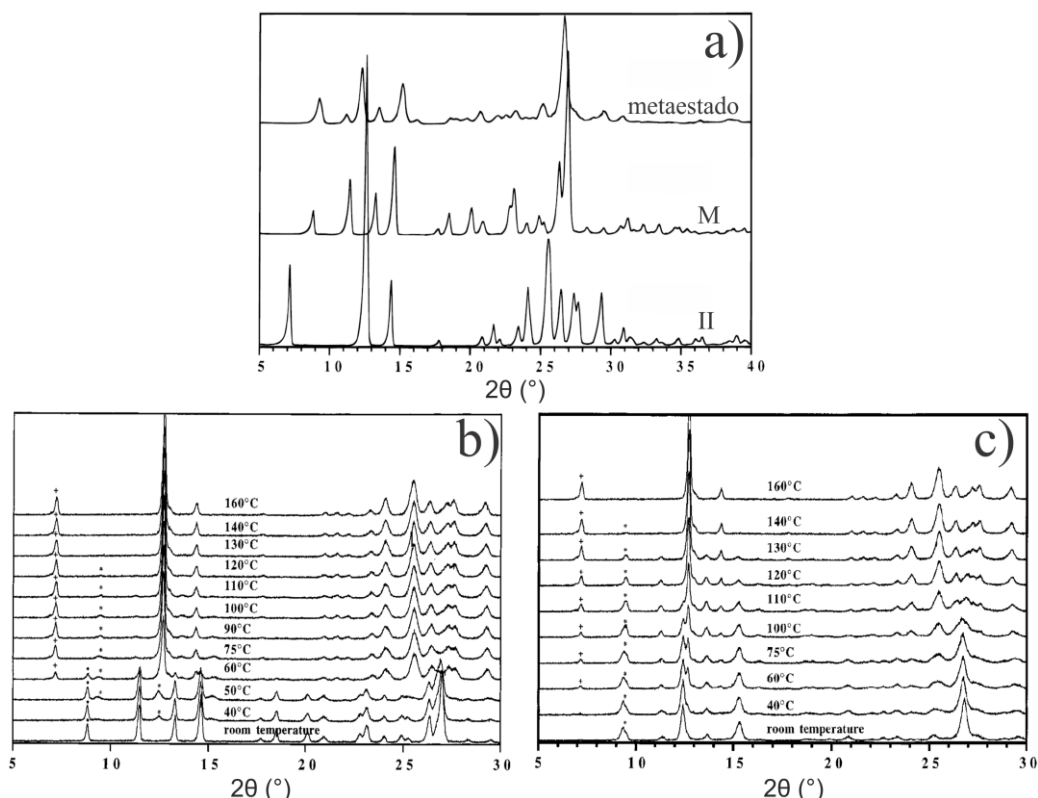
Figura 41 - Acompanhamento temporal, em minutos, do espectro Raman para conversão do polimorfo II no M da teofilina sob 100% de RH.



A existência de um metaestado da THEO (posteriormente denominado de polimorfo III) foi primeiro reportado pelo trabalho de Phadnis e Suryanarayanan em 1997, onde foi realizado um experimento da desidratação da Forma M para obtenção da Forma II. O metaestado não é observado durante a hidratação da Forma II para formação do polimorfo M. No experimento ao longo do tempo e com aquecimento, foi observado um padrão de difração de raios X de pó diferente do encontrado para as Formas M e II da THEO (Figura 42). Os picos de difração desse metaestado começam a aparecer à 40 °C (picos marcados com asterisco na Figura 42b) e desaparecem à 130 °C. Em um segundo experimento (Figura 42c), foi utilizado o metaestado como material de partida e o comportamento foi semelhante ao experimento anterior. Os autores

sintetizaram o metaestado utilizando a Forma M como material de partida, sob uma pressão reduzida ($< 0,05$ torr) à temperatura ambiente, durante 12 h. Segundo os autores essa nova forma cristalina é um produto de transição da transformação sólido-sólido entre as Forma M e II.

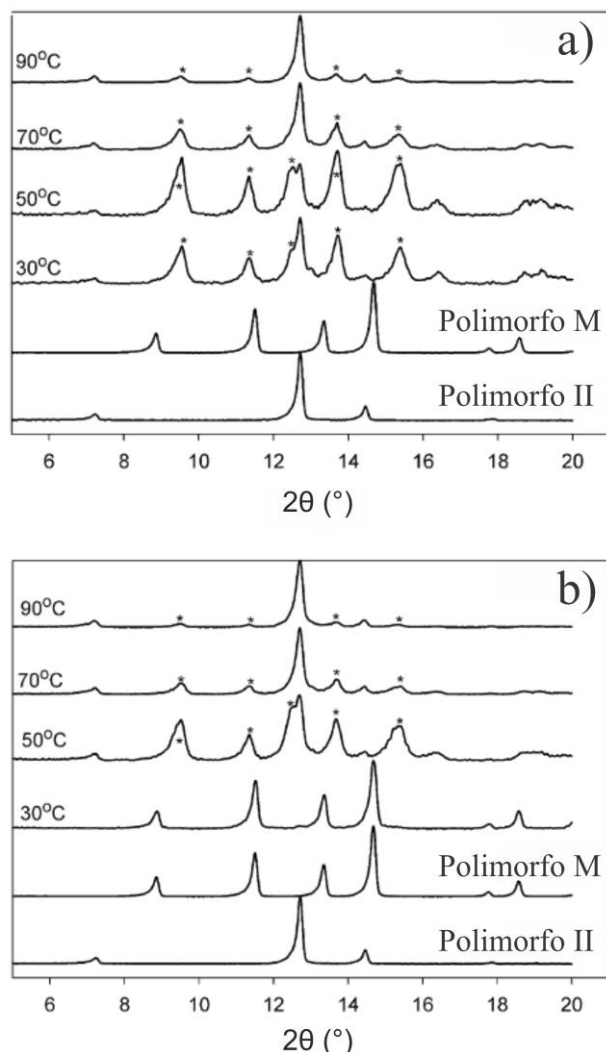
Figura 42 - a) Difratogramas das Forma II, M e metaestado da THEO. Transformação de fases sólidas com aquecimento, utilizando a Forma M (b) e o metaestado (c) como material de partida.



Fonte: Phadnis e Suryanarayanan, 1997.

Airaksinen *et al.*, 2004, também estudaram a desidratação da Forma M para obtenção da Forma II, com o objetivo de investigar a eficiência dos processos industriais farmacêuticos. Foram estudados dois métodos de secagem, sendo um por secagem em leito fluidizado e outro utilizando PXRD com variação de temperatura da amostra. A Figura 43 mostra os difratogramas das Formas II e M da THEO e a evolução do processo de desidratação para ambos os processos de secagem em função da temperatura. Pode ser observado que além do padrão de difração das Formas II e M, um terceiro padrão, chamado de metaestado, é observado durante o processo onde seus principais picos estão marcados com asteriscos. Os planos marcados são em 9,4, 11,3, 12,5, 13,5 e 15,4° 2θ . Segundo os autores, esse metaestado só ocorre durante a desidratação da Forma M e à temperaturas acima de 30 °C.

Figura 43 - Difratogramas das Forma II e M da THEO e da evolução da desidratação para os processos utilizando a) secagem em leito fluidizado e b) PXRD com variação de temperatura da amostra.



Fonte: Airaksinen *et al.*, 2004.

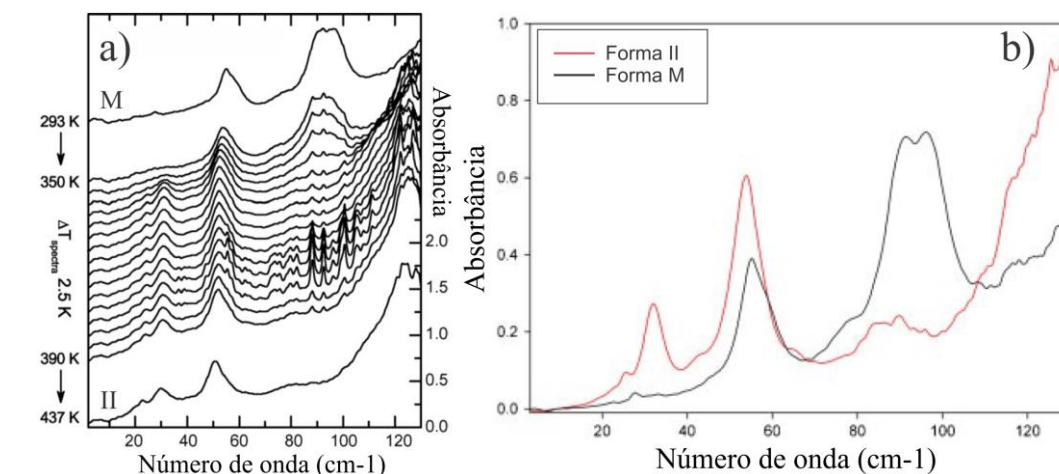
Outros trabalhos também evidenciam a existência desse mesmo metaestado (chamado de Forma III, I* ou A*) durante a conversão da Forma M na Forma II baseado em medidas PXRD (Karjalainen *et al.*, 2005; Nunez *et al.*, 2006; Matsuo e Matsuoka, 2007; Khamar *et al.*, 2012). Como descrito por Sun *et al.*, 2002, a estrutura cristalina da Forma M é formada por dímeros da teofilina contendo um centro de inversão. Esta estrutura expõe o N(1), que é um forte aceptor de hidrogênio e, por isso, a molécula de água se liga com este sítio da molécula da THEO.

Segundo Fucke *et al.*, 2012, o mecanismo de desidratação da Forma M ocorre em duas etapas. A primeira acontece com a saída inteira de colunas de moléculas de água pelo rompimento da ligação de hidrogênio entre as águas e o N(1) da THEO. Isto ocorre, pois a ligação HOH---N(1) é mais fraca do que a interação homomérica entre as moléculas de água.

Portanto, essa primeira etapa deve ser a formadora do metaestado e, por isso, sua estrutura deve ser bastante semelhante ao da Forma M, ou seja, mantendo-se a estrutura empilhada dos dímeros, mas com buracos deixados pela saída da água. Isso é evidenciado pelo trabalho de Vora *et al.*, 2004, no qual é mostrado que os espectros NIR da Forma M e do metaestado são semelhantes. Na segunda etapa, a estrutura de dímeros colapsa dando mobilidade para as moléculas da THEO formarem a estrutura da Forma II, que é mais estável que a da Forma M e do metaestado.

Zeitler *et al.*, 2007, estudou a transformação da Forma M da teofilina para a Forma II, sob aquecimento, utilizando espectros medidos com um espectrômetro THz. Mais uma vez, a transformação para a Forma II ocorreu, mas neste caso não foi observada a presença do metaestado durante a transição de fase (Figura 44). Os autores propõem a hipótese de que durante a transição, a concentração desse metaestado é muito baixa para ser observada pelo THz. Além disso, durante o aquecimento são observados picos finos que são decorrentes do espectro rotacional do vapor de água. O vapor de água, neste caso, originou-se a partir da evaporação da água do cristal.

Figura 44 - a) Espectros THz da transição de fase sólida-sólida da Forma M para II, da teofilina, sob aquecimento. Picos finos na região entre 80 e 120 cm^{-1} são atribuídos aos modos rotacionais da água eliminada durante o processo de desidratação (Zeitler *et al.*, 2007). b) espectros THz das Formas II e M da teofilina.



Fonte: Jørgensen *et al.*, 2009.

Até o momento nenhum trabalho determinou a estrutura e os parâmetros de rede deste metaestado (Forma III). Essa forma cristalina é bastante instável e muito dependente das condições do experimento para sua obtenção e, por isso, difícil de se obter seu monocristal. Também nenhum trabalho utilizou a região das baixas frequências vibracionais do espectro Raman para esse estudo. Os trabalhos comentam que esse metaestado reabsorve facilmente o

vapor d'água do ambiente. Mas, não demonstram isto com experimentos ficando dúvidas se o processo de reabsorção reconstitui o cristal da Forma M integralmente. Esse comportamento é importante, pois pode fornecer informações importantes sobre o mecanismo da desidratação desse cristal. Dessa forma, seria possível saber se a estrutura de dímeros da teofilina colapsa devido aos canais vazios deixados pela saída das moléculas de água.

5.2 AMOSTRAS (TEOFILINA)

Para este experimento amostras de dois polimorfos da teofilina (THEO) foram analisadas. O polimorfo II foi adquirido na Sigma-Aldrich (Theophylline anhydrous $\geq 90\%$, powder – T1633). O polimorfo M foi sintetizado em laboratório de acordo com o método descrito no trabalho de Pinon *et al.*, 2015.

A síntese do polimorfo M consiste de uma recristalização em água. O polimorfo II (1 g) é solubilizado em água ultrapura (50 mL), à aproximadamente 60 °C sob forte agitação. Após totalmente solubilizado, ou seja, solução límpida, deixou-se o sistema resfriar lentamente para a temperatura ambiente (~ 20 °C), sob agitação contínua, por um período de 24 h. O precipitado formado foi filtrado e deixado secar à temperatura ambiente.

As duas amostras da THEO foram caracterizadas utilizando PXRD, absorção no infravermelho médio com acessório de reflectância total atenuada (FT-IR-ATR) e Microscopia eletrônica de varredura (MEV). O difratômetro de raios X foi um Shimadzu, modelo XRD7000, com fonte Cu K α $\lambda = 1,54180$ Å, voltagem de 40 kV, corrente de 30 mA e faixa 5° a 50° 2 θ . O espectrofotômetro FT-IR-ATR foi da marca Agilent, modelo Cary 630, resolução 4 cm⁻¹, faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹, e 64 scans por amostra, utilizando ATR com cristal de diamante. As micrografias foram registradas utilizando um microscópio eletrônico de varredura da marca Jeol, modelo J6360 LV.

Foram sintetizados monocristais da Forma M da teofilina para análise em um difratômetro de raios-X de monocristais visando determinar os parâmetros da célula unitária e sua estrutura cristalina. A síntese consistiu de solubilizar 100 mg da Forma II da teofilina em 5mL de água ultrapura e deixar secar a solução no becker à temperatura ambiente. O mesmo monocristal da Forma M utilizado para medição no difratômetro de raios-X de monocristais, foi submetido à um fluxo contínuo de nitrogênio por 24 h em câmara fechada, para promover desidratação e para também ser analisado. O equipamento foi da marca Bruker modelo Apex com câmera CCD, fonte de radiação de Mo K α $\lambda = 0,71073$ Å, resolução de 8,33 pixels por mm² e temperatura à 296 K.

Análises termogravimétricas (do inglês *Thermogravimetric* - TG e *Diferencial Thermogravimetric Analysis* – DTA) foram realizadas a fim de avaliar se o processo de desidratação com fluxo contínuo de nitrogênio gasoso, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada, foi suficiente para eliminação de toda a água do cristal da Forma M para todos os experimentos em que requeriram a amostra desidratada. Para esses experimentos no TG e DTA, quatro amostras foram analisadas sendo duas em pó hidratado (P1) e desidratado (P2) e duas compostas por monocristais hidratados (M1) e desidratados (M2). A finalidade de analisar o pó e o monocristal foi observar se no monocristal a saída da água é mais lenta devido ao tamanho do cristal.

Para as medidas no espectrofotômetro THz, uma pastilha de 200 mg contendo 30% da Forma M da THEO e 70% de polietileno foi produzida. O polietileno não possui bandas intensas no espectro de absorção THz e, por isso, é utilizado como o branco para obtenção dos espectros de absorção. Foi utilizado um espectrofotômetro THz com tecnologia ASOPS e detecção eletro-óptica (HASSP-THZ, Laser Quantum) realizando médias de 500 medidas por espectro. A faixa espectral foi de 10 a 200 cm^{-1} (0,3 a 6 THz) e os espectros no domínio das frequências foram obtidos através da Transformada de Fourier. A câmara da amostra do espectrômetro THz foi purgada com nitrogênio gasoso, pois os modos rotacionais do vapor de água do ambiente absorvem nesta região espectral. Desta forma, o próprio ambiente da amostra é quem provoca a desidratação da teofilina monoidratada. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente e em intervalos de tempo suficientes para visualizar as mudanças espectrais durante o processo de desidratação. A amostra foi posicionada fora do foco para aumentar o *spot* da radiação na amostra e, assim poder monitorar uma região maior da pastilha.

Para as medidas no espectrofotômetro Raman construído, o pó do polimorfo M da THEO foi colocado em um acessório confeccionado que consiste de uma câmara fechada que permite medidas Raman enquanto a amostra é submetida à um fluxo contínuo de nitrogênio. Isto foi feito para promover a desidratação e, dessa maneira, poder visualizar mudanças espectrais, principalmente na região das baixas frequências vibracionais. Foi utilizado um tempo de integração de 4 s por espectro.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA PARTE 3 DOS OBJETIVOS

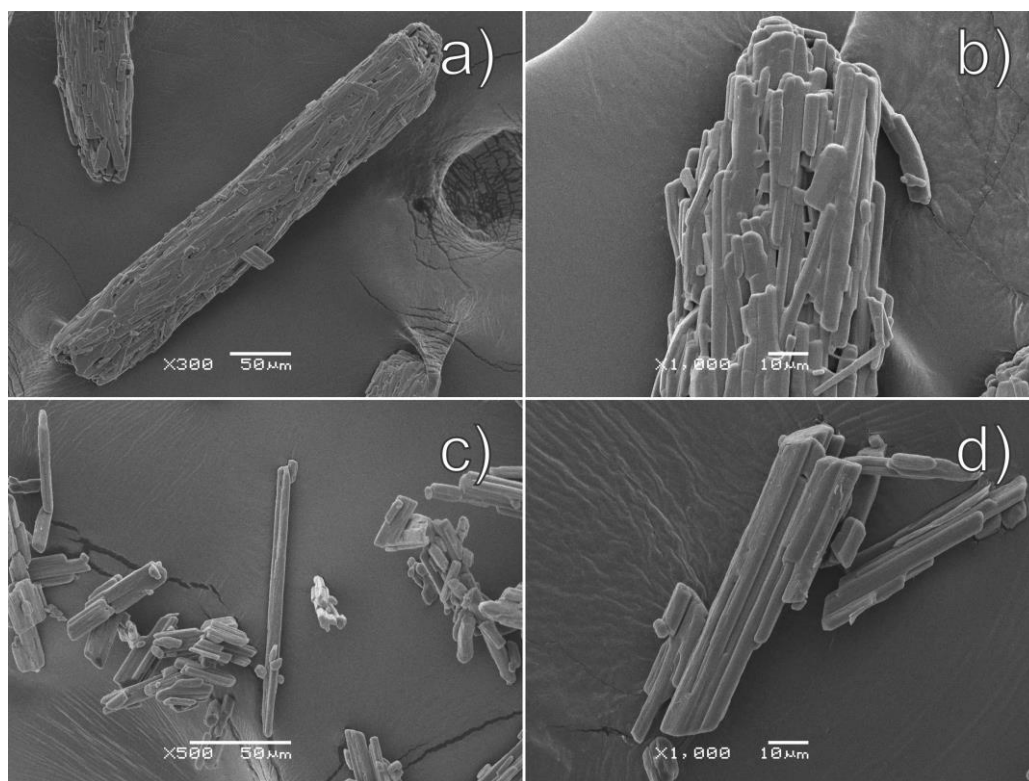
5.3.1 Caracterização das amostra da Teofilina

Na Figura 45 são mostradas as micrografias de partículas dos polimorfos II e M da teofilina em pó, onde pode ser observado que essas duas formas polimórficas possuem formato

acicular. As partículas apresentam tamanhos que variam entre 400 a 100 μm de comprimento e entre 10 a 60 μm de largura, aproximadamente. Possuem certo grau de policristalinidade que pode ser observado pelas fraturas e irregularidades na superfície das partículas. Essa informação é importante para a interpretação dos espectros vibracionais e dos difratogramas. No entanto, seu caráter cristalino é mostrado pelos difratogramas da Figura 46, os quais estão de acordo com os reportados na literatura (Amira *et al.*, 2016; Khamar *et al.*, 2012; Szterner *et al.*, 2010).

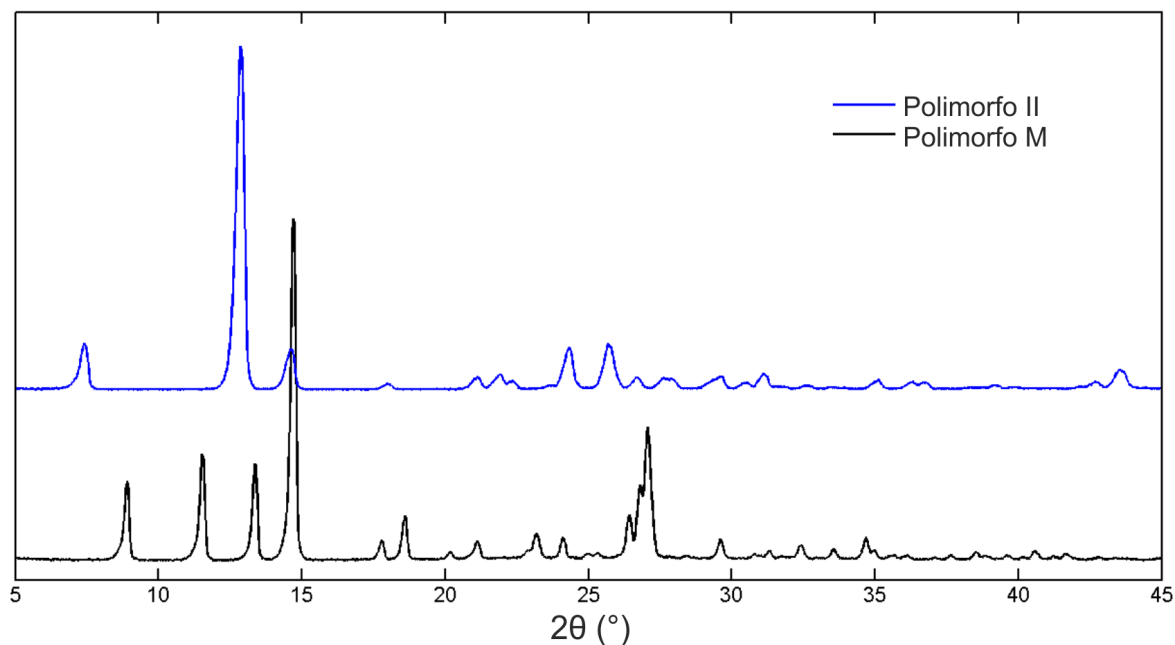
Na Figura 47 são mostradas fotografias dos monocristais hidratados e desidratados com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada. Pode ser observado que o monocristal hidratado (Figura 47a) possui transparência na luz visível enquanto o desidratado torna-se opaco. O monocristal hidratado possui organização cristalina a longas distâncias e, por isso espalha menos a radiação transmitida, sendo então, translúcido. Já o produto desidratado (Figura 47b) fica opaco devido à um colapso da rede cristalina formando regimes de curtas distâncias. Dessa forma, a luz é refratada várias vezes ao longo da partícula o que o torna opaco.

Figura 45 - Micrografias das partículas dos polimorfos II (a-b) e M (c-d) da teofilina com diferentes magnificações.



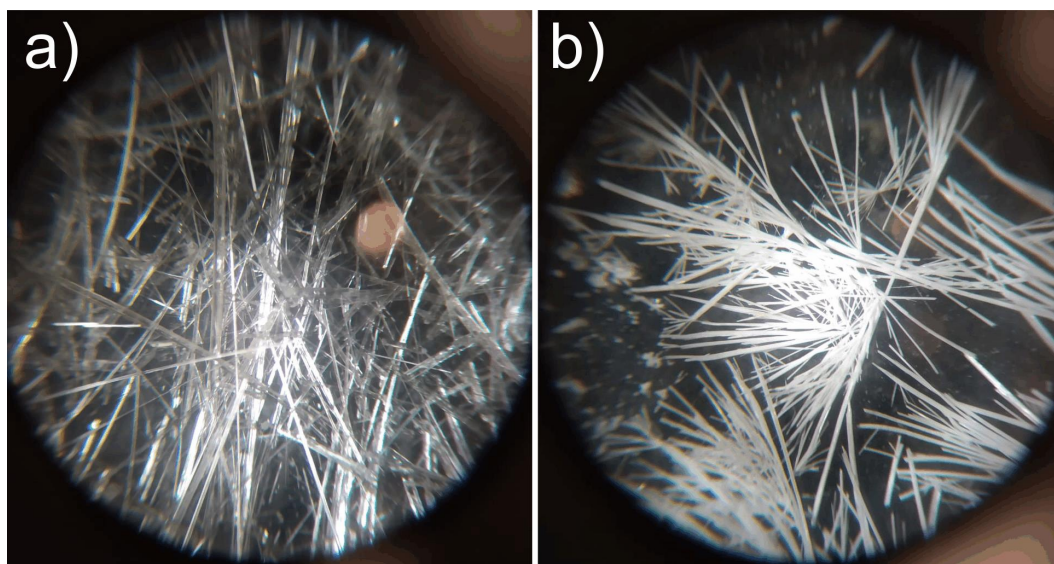
Fonte: Paiva, 2019.

Figura 46 - Difratogramas dos polimorfos II e M da THEO.



Fonte: Paiva, 2019.

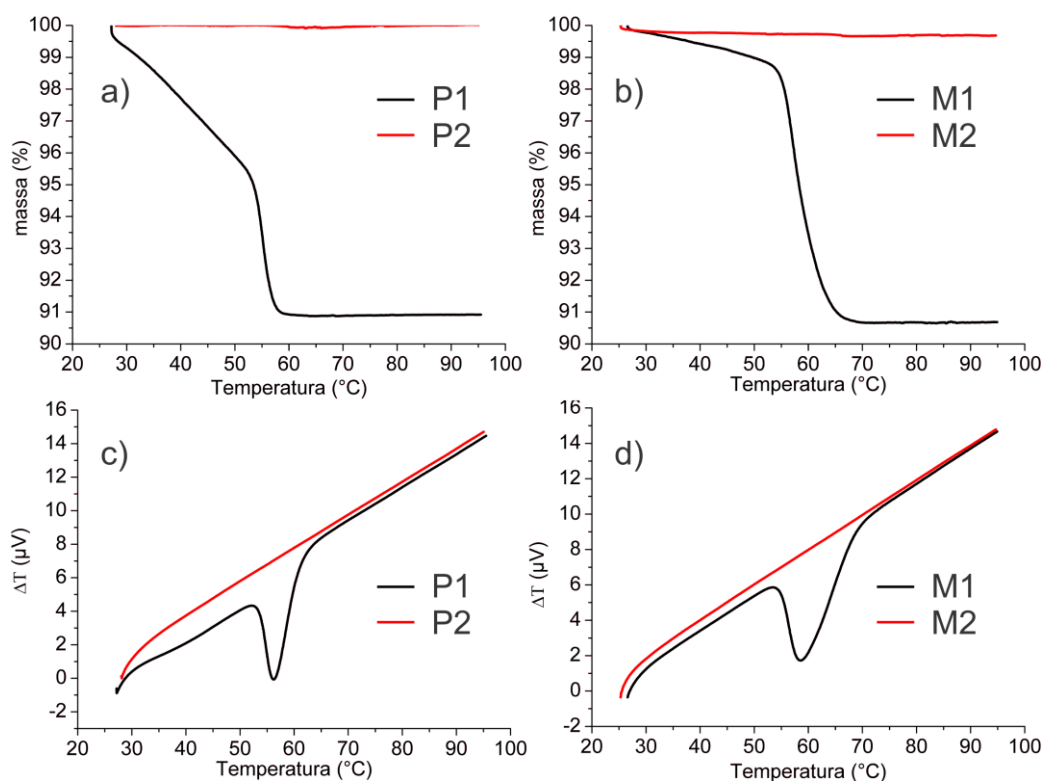
Figura 47 - Fotografias dos monocristais a) hidratados e b) desidratados com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada, da Forma M da THEO.



Fonte: Paiva, 2019.

Para confirmação da eficiência de desidratação do processo empregado, análises termogravimétricas foram realizadas no pó (P1 e P2) e no monocristal (M1 e M2). A Figura 48 mostra as curvas TG e DTA das amostras antes (M1 e P1) e depois da desidratação (M2 e P2) com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada.

Figura 48 - Curvas TG (a – b) e DTA (c – d) das amostras em forma de pó e monocristais, antes e depois da desidratação com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada.



Fonte: Paiva, 2019.

As curvas em preto, nas Figuras 48a e b mostram a desidratação com a temperatura durante a análise TG das amostras P1 e M1 que são o pó e o monocristal hidratados, respectivamente. Até aproximadamente 54 °C a desidratação é gradual e pode estar relacionada com a primeira etapa do mecanismo de transformação, que é a saída de colunas de águas superficiais deixando os espaços vazios entre as estruturas de dímeros da teofilina. Porém, nem todas as moléculas de água saem, pois em 55 °C um evento brusco ocorre devido à saída rápida de mais moléculas de água. Esse comportamento deve ocorrer devido ao colapso da estrutura de dímeros, que se refere à segunda etapa do mecanismo de desidratação com temperatura, e assim liberando, de uma só vez, as moléculas remanescentes de água que se encontram mais internas ao cristal. Ainda nas curvas em preto das Figuras 48a e 48b, pode ser observado que a perda de massa gradual, decorrente da saída das moléculas de água, que ocorre até 54 °C, é mais pronunciada na amostra em pó do que no monocristal. Isso ocorre devido ao tamanho da partícula que retém menos moléculas de água internas quanto menor for a partícula.

As análises TG também foram realizadas nas amostras desidratadas com a purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada e, são mostradas pelas curvas vermelhas nas Figuras 48a e 48b. As curvas demonstram que a desidratação foi eficiente

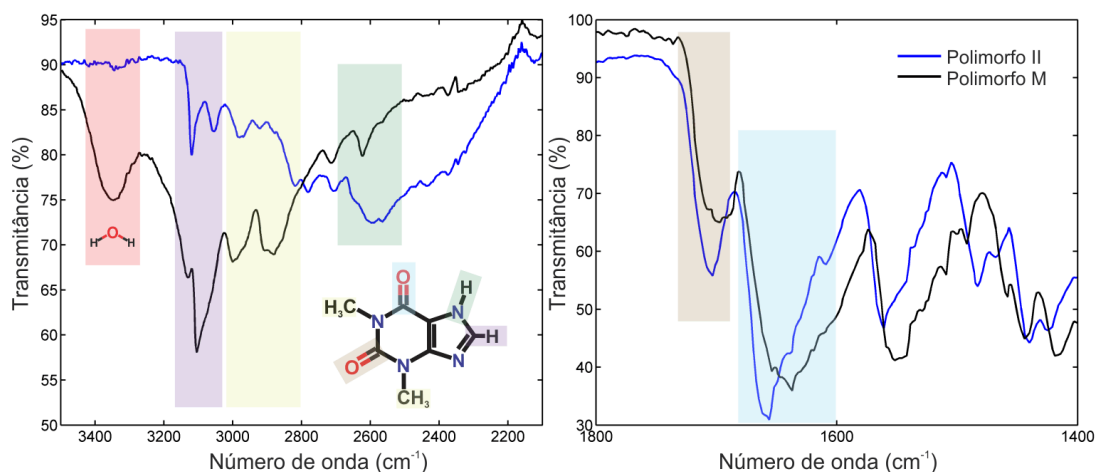
eliminando praticamente 100% da água do cristal hidratado antes de ser submetido à análise no TG. Em toda a faixa de temperatura da análise não são observadas perdas de massa significativas tanto para o pó como para o monocrystal.

As curvas do DTA (Figuras 48c e 48d) das amostras hidratadas (curvas pretas) mostram que o processo de desidratação, com aumento de temperatura, é endotérmico. Já as curvas DTA dos produtos previamente desidratados à temperatura ambiente antes da análise, não mostram nenhum evento indicando que não há perdas de massa durante a análise.

Os espectros no infravermelho médio são mostrados na Figura 49. Neles são mostradas as principais diferenças espectrais causadas pelos estiramentos das ligações intramoleculares que formam ligação de hidrogênio na rede cristalina. A banda de estiramento O-H da água em 3335 cm^{-1} está presente somente na Forma M da THEO (Suzuki *et al.*, 1989). O H(2) (ver Figura 49) tem um papel importante na forma polimórfica M, que é a interação entre lâminas vizinhas da molécula da THEO através de ligação de hidrogênio mais fraca. No caso do polimorfo II, a interação entre lâminas se dá pela interação entre o O(2) e o hidrogênio metílico.

Essas interações intermoleculares também interferem nas bandas dos estiramentos das carbonilas de forma que aquelas ligações em que participam o O(1) observa-se maior deslocamento da banda, entre 1656 e 1630 cm^{-1} , para os polimorfos da THEO, devido aos diferentes ambientes químicos dessa ligação intramolecular. Já a carbonila que contém o O(2) possui ambientes químicos mais semelhantes entre os polimorfos II e M, e por isso, menor é a diferença entre suas bandas de estiramento que estão em torno de 1700 cm^{-1} (Bobrovs *et al.*, 2015).

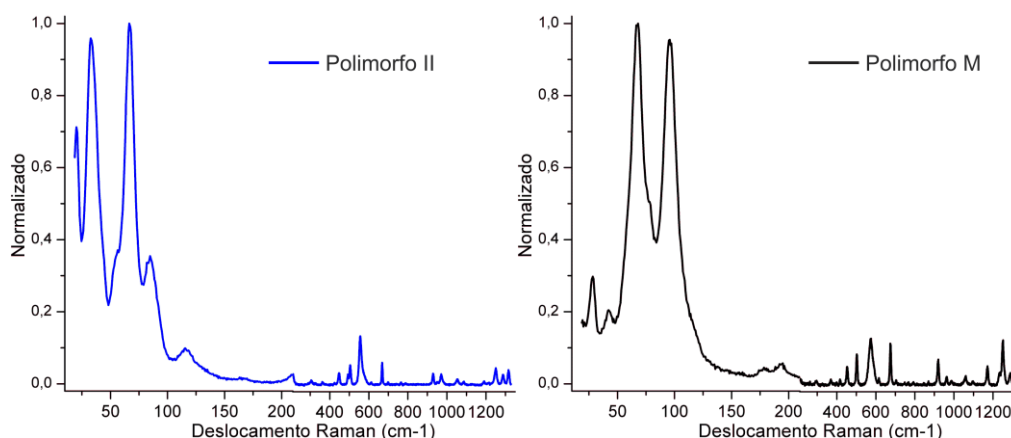
Figura 49 - Espectros no infravermelho médio dos polimorfos II e M da THEO destacando as principais ligações químicas intramoleculares e suas bandas no espectro vibracional.



Fonte: Paiva, 2019.

Na região das baixas frequências vibracionais dos espectros Raman, as interações de Van-der-Waals dos empilhamentos $\pi - \pi$ são importantes, pois são sistemas com alta polarizabilidade e, portanto, bandas intensas são observadas devido aos modos fônons, como pode ser observado na Figura 50. Segundo a equação $6Z - 3$ (onde Z é o número de moléculas na célula unitária primitiva) temos teoricamente 21 modos fônons vibracionais ópticos para cada polimorfo II e M (Larkin *et al.*, 2014). Nem todos os modos fônons vibracionais são observados, pois na temperatura ambiente a VDOS alarga as bandas provocando sobreposição das mesmas. Ainda assim, na região entre 10 e 200 cm^{-1} , são observadas 7 bandas para o polimorfo II e 6 bandas para o polimorfo M à temperatura de aproximadamente 25 °C.

Figura 50 - Espectros Raman dos polimorfos II e M da THEO na região espectral de 10 a 1350 cm^{-1} registrados com o espectrômetro Raman construído no laboratório. Os dados foram normalizados para uma melhor visualização das diferenças espectrais.



Fonte: Paiva, 2019.

5.3.2 Análise do monocrystal hidratado e desidratado da Teofilina

Com base nas informações do processo de desidratação da Forma M da teofilina reportados na literatura e nas informações obtidas na caracterização das amostras reportadas no item 5.3.1 deste capítulo, uma análise em um difratômetro de raios x de monocristais foi realizada com um monocrystal desse polimorfo. A finalidade desta análise foi tentar elucidar a estrutura do cristal do polimorfo M sintetizado e do seu produto desidratado (FIII), a fim de poder associar tal estrutura com o metaestado reportado na literatura.

Os parâmetros de rede obtidos estão descritos na Tabela 7. Os dados para o monocrystal da Forma M estão de acordo com os encontrados na literatura (Fucke *et al.*, 2012). Esse mesmo monocrystal foi submetido à desidratação com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada e seus dados cristalográficos também são mostrados na Tabela 7. Como pode ser observado os parâmetros de rede do desidratado não foram alterados

significativamente em comparação aos do cristal hidratado. Novamente, a aparência do cristal foi alterada de translúcido para opaco.

Esses resultados são mais evidências de que o metaestado reportado na literatura, fruto da desidratação com temperatura, tem uma estrutura similar ao hidratado, ou seja, a estrutura tridimensional de dímeros da teofilina é mantida, mas com espaços vazios deixados pela saída das moléculas de água. Por isso, não há alteração significativa no hábito cristalino. No entanto, esses dados ainda não comprovam tal estrutura.

Tabela 7 - Parâmetro de rede do monocristal da Forma M reportado na literatura (Fucke *et al.*, 2012), da Forma M sintetizada e do produto desidratado.

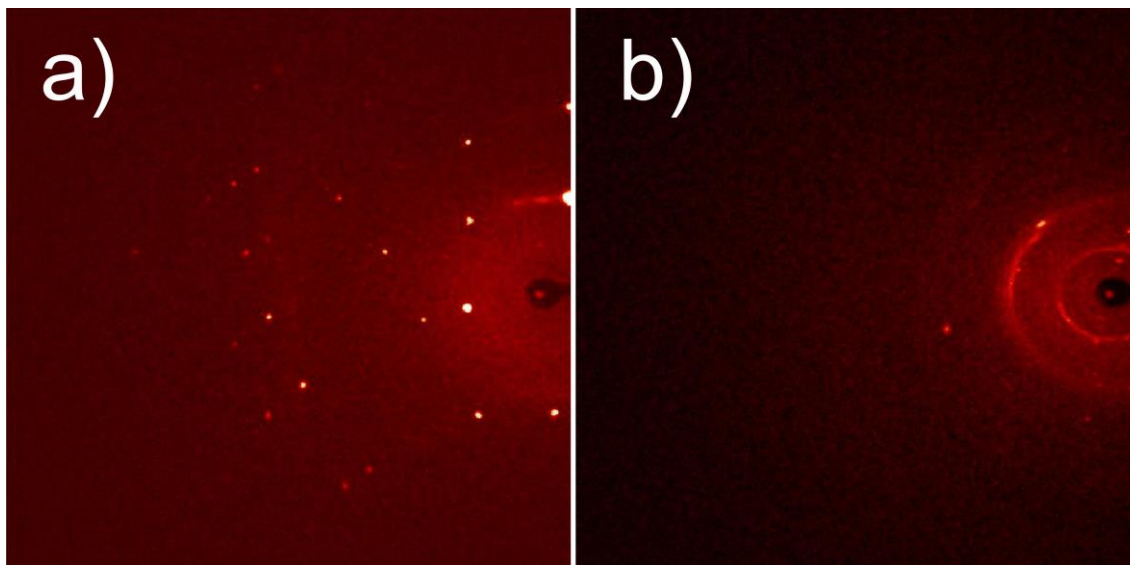
	Forma M (Fucke <i>et al.</i> , 2012)	Forma M	Forma M Desidratada
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
T (K)	120	296	296
a (Å)	4,4605(3)	4,49(3)	4,4911(16)
b (Å)	15,3207(9)	15,44(11)	15,417(6)
c (Å)	13,0529(7)	13,31(9)	13,291(5)
α (°)	90	90	90
β (°)	97,511(2)	98,51(7)	98,556(9)
γ (°)	90	90	90
V (Å ³)	884,36(9)	912,(19)	910,0(10)
Z	4	4	4

Fonte: Paiva, 2019.

A Figura 51 mostra as imagens de difração de raios-X de monocristais resultados das análises com o monocristal hidratado e depois da desidratação. Como pode ser observado o processo de desidratação com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada, danificou a qualidade do monocristal. Isso pode ser visto devido à falta de reflexões a longas distâncias (Figura 51b). Isso pode indicar que a saída da água deixou a estrutura de dímeros instável ao ponto de promover fraturas dessa estrutura que, por fim, formou regimes cristalinos de curtas distâncias com a estrutura de dímeros.

Esses resultados com o monocristal, demonstram que existe uma dificuldade em se obter um monocristal do metaestado com qualidade suficiente para elucidação de sua estrutura utilizando dados de difração de raios-X de monocristal, uma vez que esse metaestado só é obtido durante a desidratação da Forma M da THEO. Dessa forma, as espectroscopias Raman e Terahertz, na região das baixas frequências vibracionais, associadas a cálculos teóricos quânticos, podem ser ferramentas úteis para propor uma estrutura desse metaestado.

Figura 51 - Imagens de difração de raios-X de monocristais da a) Forma M e do b) cristal desidratado.



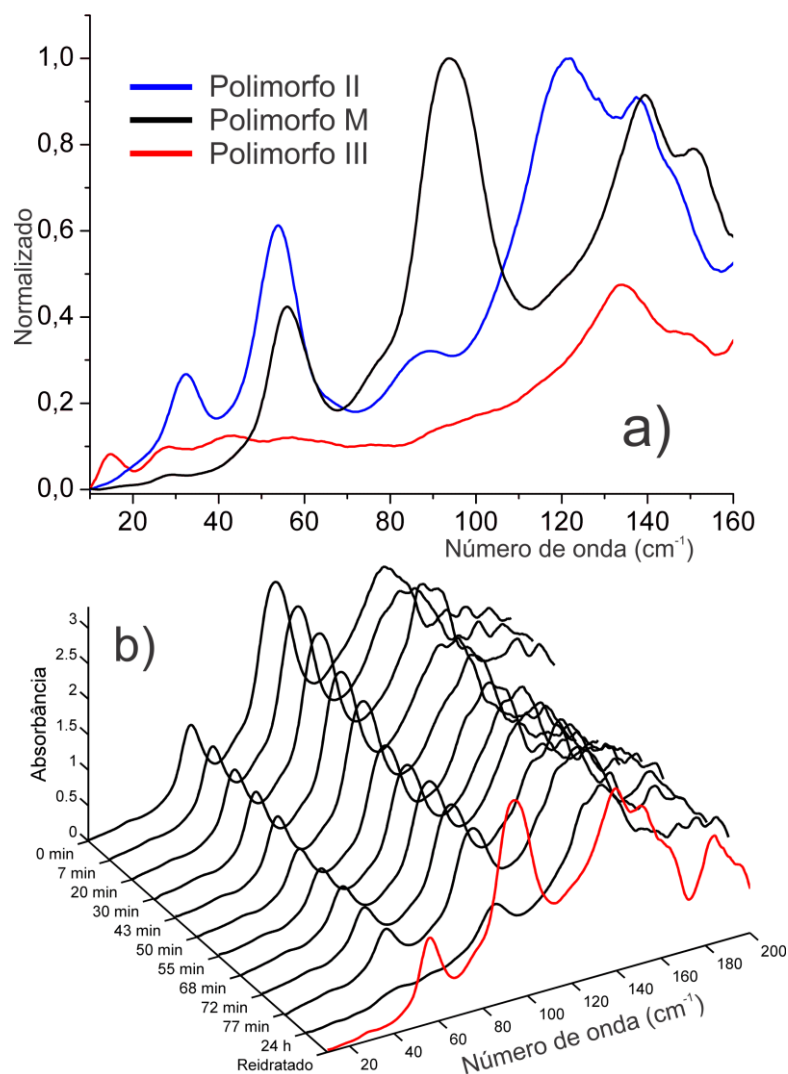
Fonte: Paiva, 2019.

5.3.3 Estudo da desidratação da teofilina monoidratada empregando espectroscopia Raman e Terahertz

A Figura 52a mostra os espectros THz das Formas M, M desidratada e da Forma II que estão em concordância aos reportados na literatura (Jørgensen *et al.*, 2009). A Figura 52b mostra os espectros THz durante a desidratação da Forma M na câmara da amostra purgada com nitrogênio. Como pode ser observado durante a desidratação não há conversão da Forma M na Forma II visto que não há formação de uma banda na região em torno de 30 cm^{-1} . A mudança espectral observada se resume ao decaimento das bandas com máximo em 56 e 93 cm^{-1} . A amostra foi retirada do nitrogênio e exposta a um ambiente com 100% de RH o espectro da Forma M foi reconstituído (curva vermelha na Figura 52b). Em todo o experimento as bandas em torno de 140 cm^{-1} permaneceram aparentemente inalteradas quanto às suas intensidades, porém essa região do espectro apresentou bastante ruído.

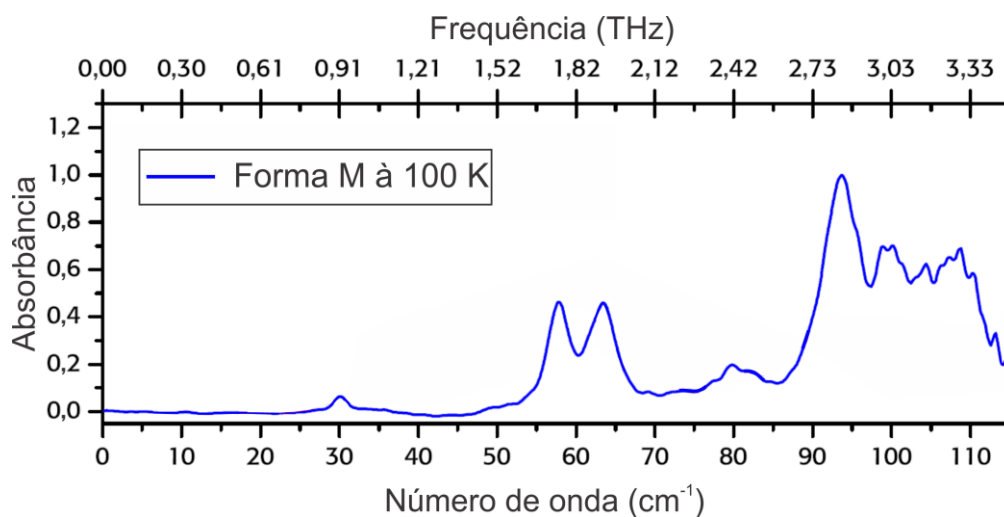
Deve ser ressaltado que, à 20 °C os estados excitados dos modos vibracionais fônons estão ocupados e, por isso há grande sobreposição de bandas nos espectros. Medidas à 100 K da Forma M da THEO foram realizadas no trabalho de tese de Tomerini, 2012, e revelam que, na verdade, as bandas em 56 e 93 cm^{-1} são compostas por mais de uma banda (Figura 53). Em baixas temperaturas as bandas ficam mais intensas e mais estreitas devido à redução do VDOS (*Vibrational Density of States*) e, além disso, algumas bandas são deslocadas para maiores frequências de vibração devido à contração da célula unitária.

Figura 52 - a) Espectros THz das Forma M, M desidratada e II da THEO. b) Espectros THz adquiridos durante a desidratação. Destaque para o espectro do reidratado marcado em vermelho que é igual ao da Forma M.



Fonte: Paiva, 2019.

Figura 53 - Espectro THz da Forma M à 100 K.



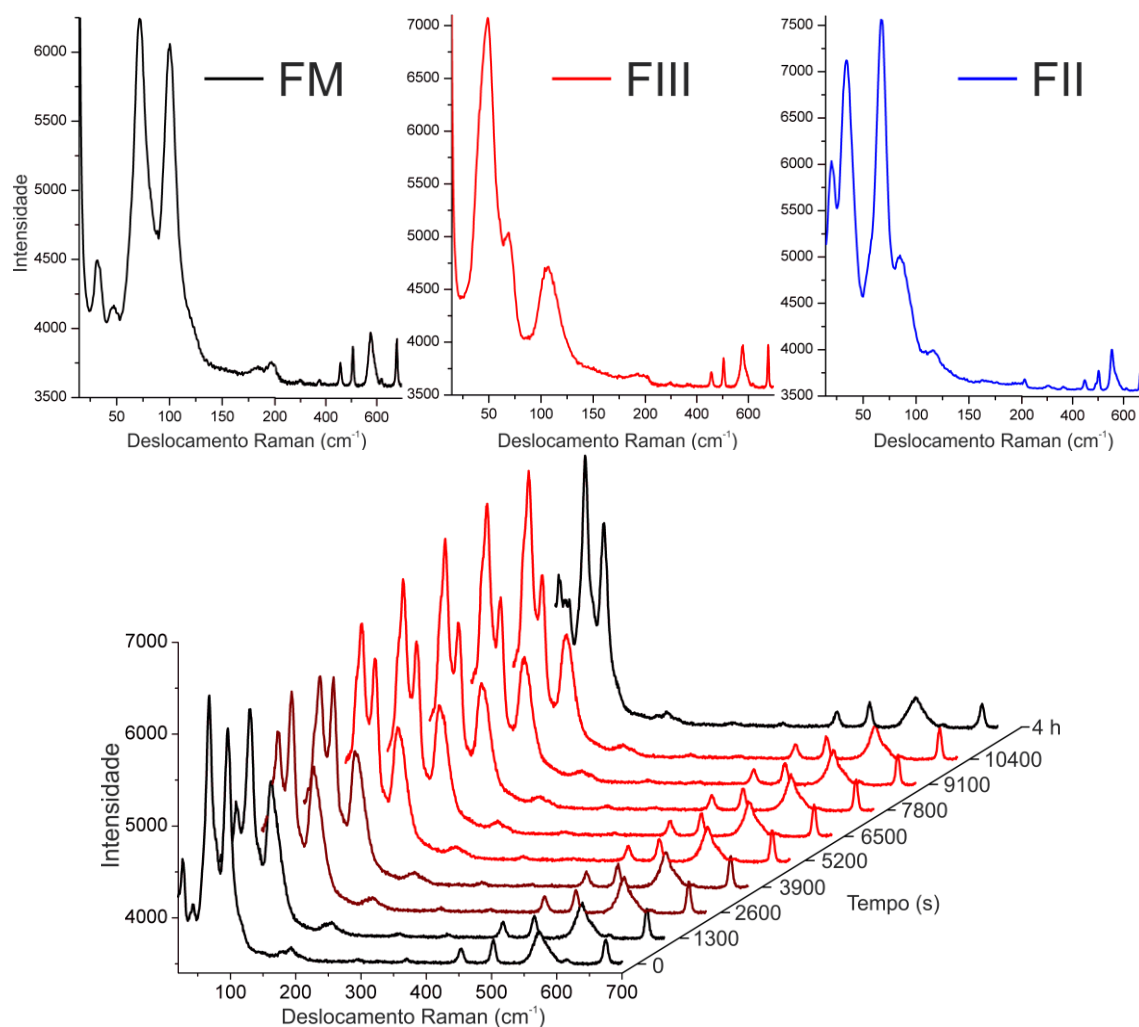
Fonte: Tomerini, 2012.

O mesmo experimento foi realizado no espectrômetro Raman construído no laboratório. A amostra em pó da Forma M da THEO foi colocada em um recipiente fechado com uma entrada para purga contínua com nitrogênio gasoso. A Figura 54 mostra os espectros Raman da Forma M, da M desidratada (FIII) e da Forma II nas baixas frequências vibracionais.

Uma mudança clara é vista na região das baixas frequências vibracionais (10 a 200 cm^{-1}), região que está diretamente relacionada com a estrutura cristalina. A Forma M apresenta duas bandas em torno de 188 cm^{-1} , enquanto a Forma III apresenta somente uma banda larga nesta região. As duas bandas mais intensas da Forma M, 66 e 95 cm^{-1} , parecem sofrer uma mudança em suas frequências de vibração no espectro do produto desidratado para 64 e 103 cm^{-1} , respectivamente. Isso indica que se tratam de modos fônons semelhantes (relacionados com vibrações dos dímeros). No entanto, com a perturbação devido à desidratação, um deslocamento de suas frequências de vibração é observado. A mudança principal se dá pelo surgimento de uma banda intensa em 46 cm^{-1} que está ausente tanto na Forma M quanto na Forma II da THEO, comprovando ser uma nova forma cristalina desse material. Mais mudanças no espectro são observadas na região entre 10 e 53 cm^{-1} que podem ter relação com algum modo vibracional em que a molécula de água seja importante. Mas, somente com cálculos computacionais poderá ser feita essa associação.

O mesmo comportamento de desidratação e reidratação da teofilina monoidratada, mostrados pelos dados no THz, também foi observado nos espectros Raman adquiridos em intervalos de tempo (Figura 54). Já com 21 min de purga com nitrogênio, são observadas as mudanças espectrais. O material foi reidratado em ambiente úmido e o espectro da Forma M foi reconstituído (Figura 54). Para essas medidas no Raman, a reidratação foi realizada purgando o ar atmosférico úmido para dentro da câmara da amostra. Em todo o processo, não há evidências de formação do polimorfo II indicando que, à temperatura ambiente, o sistema não tem energia suficiente para quebrar os dímeros da THEO que estão presentes na Forma M e no metaestado (que é a Forma M desidratada ou FIII) e ausente na Forma II. Essa transformação de fase sólido-sólido só ocorre com aumento da temperatura.

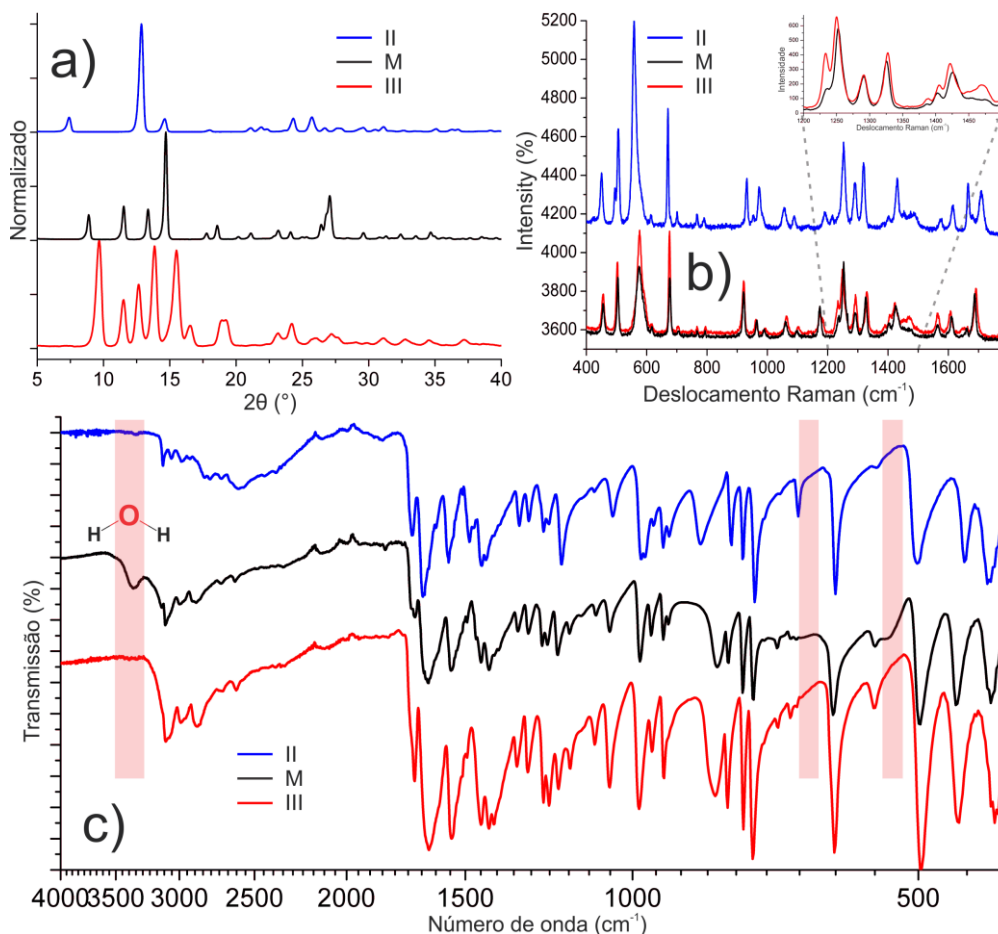
Figura 54 - a) espectro Raman da Forma II, M e III (acima). b) espectros Raman durante a desidratação e reidratação da THEO monoidratada (abaixo).



Fonte: Paiva, 2019.

Na Figura 55 são mostrados resultados da PXRD, Raman e FT-IR nas médias frequências vibracionais. Podem ser observadas algumas pequenas mudanças nos espectro na região espectral entre 200 e 1800 cm^{-1} , onde não há surgimento nem desaparecimento de nenhuma banda, mas sim uma mudança de intensidade nas bandas em 1233 e 1471 cm^{-1} do espectro Raman (em destaque na Figura 55b). No geral, as respostas espectrais ao longo da região espectral de 200 e 1800 cm^{-1} se mantêm bastante semelhantes. Mais uma evidência de que o produto desidratado possui semelhança estrutural com a Forma M.

Figura 55 - a) PXRD, b) Raman, c) FT-IR dos polimorfos II, M e III da teofilina. Destaca-se nos espectros de FT-IR a presença e ausência de bandas de vibração de água nas Formas M e III, respectivamente.



Fonte: Paiva, 2019.

Já os dados do PXRD comprovam que se tratam de cristais distintos uma vez que o perfil do difratograma da Forma III apresenta picos que não estão presentes nem na Forma M nem na Forma II. Também, os principais picos da FIII (9,66, 11,50, 12,64, 13,84, 15,50, 16,50 °) são os mesmos reportados na literatura para a Forma III.

Os dados espectroscópicos demonstram que o produto da desidratação (metaestado ou FIII) possui semelhança estrutural à Forma M da THEO. Isso também é comprovado uma vez que a reidratação reconstitui a Forma M, ou seja, a estrutura cristalina preserva os sítios de ligação de hidrogênio da água permitindo sua reentrada. Essa semelhança estrutural se deve à estrutura de dímeros que é mantida. No entanto são cristais distintos como demonstrado pelo PXRD e pelo Raman nas baixas frequências vibracionais.

Para elucidação da estrutura desse metaestado, cálculos teóricos computacionais são necessários a fim de obter as frequências de vibração dessa estrutura e suas intensidades. Além disso, a estrutura obtida pelo cálculo teórico pode fornecer um difratograma raios-X teórico que pode ser comparado com as medidas experimentais.

5.4 CONCLUSÃO DA PARTE 3 DOS OBJETIVOS

Neste Capítulo da tese foi mostrado que há evidências da existência de um polimorfo, metaestado, da teofilina que é denominado por alguns trabalhos de Forma III. Esse metaestado é observado somente no processo de desidratação da Forma M através de dados de difração de raios-X de pó. Tais experimentos foram realizados com aquecimento da amostra e, portanto, esse metaestado é dito um produto intermediário da transformação de fase sólido-sólido entre a Forma M e a II da THEO.

Os experimentos de desidratação realizados foram feitos com purga de nitrogênio, à temperatura ambiente, por 24 h em câmara fechada. Os resultados termogravimétricos mostraram que esse processo de desidratação na temperatura ambiente foi eficiente eliminando totalmente a água do cristal.

Os experimentos realizados utilizando o difratograma de raios-X de monocristais demonstraram que durante a desidratação, à temperatura ambiente, há uma perda de qualidade do cristal dificultando o refinamento dos dados, a fim de elucidação da estrutura desse metaestado.

Já os dados espectroscópicos Raman demonstraram que a região das baixas frequências vibracionais pode ser utilizada, junto com cálculos computacionais, para propor uma estrutura desse metaestado, uma vez que essa região espectral possui diferenças claras entre os polimorfos da teofilina.

Todos esses resultados espectroscópicos e PXRD mostraram que as Formas M e III são polimorfos distintos, dados os resultados de PXRD e do Raman nas baixas frequências vibracionais, embora apresentem algumas estruturas similares, já que seu infravermelho e Raman em frequências médias (400 a 1800 cm^{-1}) possuem perfís bastante semelhantes. A estrutura semelhante pode ser constituída por dímeros empilhados das moléculas da teofilina, mantendo o local de ligação à água, N (1), exposto permitindo a reentrada da água e, desse modo, reconstituindo a forma monohidratada. No entanto, a desidratação provoca uma perda da qualidade estrutural do cristal devido a falhas resultantes do colapso da estrutura dos dímeros e formando assim regiões microcristalinas. Isto pode ser comprovado por medições no difratômetro de raios-X de monocristais, onde os reflexos em longas distâncias são perdidos.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos nos trabalhos desta tese, têm-se como perspectivas futuras:

- Realizar mais experimentos espectrofotômetro Raman construído no laboratório variando o spot do laser, e a distância focal da amostra a fim de otimizar as condições instrumentais e experimentais para análise quantitativa de polimorfos de fármacos.
- Dar andamento, através da parceria já realizada, nos cálculos computacionais para obtenção dos espectros Raman e THz para o estudo da desidratação da Forma M da teofilina, com a finalidade de propor uma estrutura do metaestado da desidratação, denominado de Forma III.

REFERÊNCIAS

- Airaksinen, S., Karjalainen, M., Räsänen, E., Rantanen, J., Yliruusi, J., 2004. Comparison of the effects of two drying methods on polymorphism of theophylline. *Int. J. Pharm.* 276, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.02.017>
- Allegrini, F., Olivieri, A.C., 2014. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Anal. Chem.* 86, 7858–7866. <https://doi.org/10.1021/ac501786u>
- Amado, A.M., Nolasco, M.M., Ribeiro-Claro, P.J.A., 2007. Probing Pseudopolymorphic Transitions in Pharmaceutical Solids using Raman Spectroscopy: Hydration and Dehydration of Theophylline. *J. Pharm. Sci.* 96, 1366–1379. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Amira, T., Roman, P., Fethi, Z., 2016. On-line monitoring of vacuum drying of theophylline using NIR spectroscopy: solid-state transitions, water content and semi-empirical modeling. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42, 1825–1832. <https://doi.org/10.1080/03639045.2016.1178768>
- Araujo, M.C.U., Saldanha, T.C.B., Galvao, R.K.H., Yoneyama, T., Chame, H.C., Visani, V., 2001. The successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 57, 65–73. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00119-8)
- Ayala, A.P., 2007. Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering. *Vib. Spectrosc.* 45, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2007.06.004>
- Ayala, A.P., Siesler, H.W., Cuffin, S.L., 2008. Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole: a vibrational spectroscopy investigation. *J. Raman Spectrosc.* 39, 1150–1157. <https://doi.org/10.1002/jrs>
- Barros Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., Como Fazer Experimentos - Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, 2010. Porto Alegre-RS. Editora Bookman.
- Baxter, J.B., Guglietta, G.W., 2011. Terahertz spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 83, 4342–4368. <https://doi.org/10.1021/jp020579i>
- Bobrovs, R., Seton, L., Dempster, N., 2015. The reluctant polymorph: Investigation into the effect of self-association on the solvent mediated phase transformation and nucleation of theophylline. *CrystEngComm* 17, 5237–5251. <https://doi.org/10.1039/c4ce02484b>
- Brits, M., Liebenberg, W., Villiers, M.M. DE, 2010. Characterization of Polymorph Transformations That Decrease the Stability of Tablets Containing the WHO Essential Drug Mebendazole. *J. Pharm. Sci.* 99, 26–33. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Brittain, H.G., 2009. Polymorphism in pharmaceutical solids, Polymorphism in Pharmaceutical Solids. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00252-8)
- Calvo, N.L., Kaufman, T.S., Maggio, R.M., 2016. Mebendazole crystal forms in tablet formulations. An ATR-FTIR/chemometrics approach to polymorph assignment. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 122, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.035>

- Censi, R., Di Martino, P., 2015. Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs. *Molecules* 20, 18759–18776. <https://doi.org/10.3390/molecules201018759>
- Ceolin, R., Toscani, S., Gardette, M.-F., Agafonov, V.N., Dzyabchenko, A. V., Bachet, B., 1997. X-ray characterization of the triclinic polymorph of carbamazepine. *J. Pharm. Sci.* 86, 1062–1069. <https://doi.org/10.1021/js960338k>
- Chase, B., Fourier Transform Near-infrared Raman Spectroscopy. Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., 2002. *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Handbook of Vibrational Spectroscopy.*
- Day, G.M., Zeitler, J.A., Jones, W., Rades, T., Taday, P.F., 2006. Understanding the influence of polymorphism on phonon spectra: Lattice dynamics calculations and terahertz spectroscopy of carbamazepine. *J. Phys. Chem. B* 110, 447–456. <https://doi.org/10.1021/jp055439y>
- De Villiers, M.M., Terblanche, R.J., Liebenberg, W., Swanepoel, E., Dekker, T.G., Song, M., 2005. Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.025>
- Dhillon, S.S., Vitiello, M.S., Linfield, E.H., Davies, A.G., Hoffmann, M.C., Booske, J., Paoloni, C., Gensch, M., Weightman, P., Williams, G.P., Castro-Camus, E., Cumming, D.R.S., Simoens, F., Escorcía-Carranza, I., Grant, J., Lucyszyn, S., Kuwata-Gonokami, M., Konishi, K., Koch, M., Schmuttenmaer, C.A., Cocker, T.L., Huber, R., Markelz, A.G., Taylor, Z.D., Wallace, V.P., Axel Zeitler, J., Sibik, J., Korter, T.M., Ellison, B., Rea, S., Goldsmith, P., Cooper, K.B., Appleby, R., Pardo, D., Huggard, P.G., Krozer, V., Shams, H., Fice, M., Renaud, C., Seeds, A., Stöhr, A., Naftaly, M., Ridler, N., Clarke, R., Cunningham, J.E., Johnston, M.B., 2017. The 2017 terahertz science and technology roadmap. *J. Phys. D. Appl. Phys.* <https://doi.org/10.1088/1361-6463/50/4/043001>
- Douroumis, D., Fahr, A., 2013. Drug Delivery Strategies for Poorly Water-Soluble Drugs. *Drug Deliv. Strateg. Poorly Water-Soluble Drugs* 5247. <https://doi.org/10.1002/9781118444726>
- Ferreira, M.M.C., *Quimiometria Conceitos, Métodos e Aplicações.* 2009. Campinas-SP. Editora Unicamp.
- Ferreira, F.F., Antonio, S.G., Rosa, P.C.P., Paiva-Santos, C. de O., 2010. Crystal structure determination of mebendazole form A using high-resolution synchrotron x-ray powder diffraction data. *J. Pharm. Sci.* 99, 1734–44. <https://doi.org/10.1002/jps.21902>
- Filgueiras, P.R., Alves, J.C.L., Poppi, R.J., 2014. Quantification of animal fat biodiesel in soybean biodiesel and B20 diesel blends using near infrared spectroscopy and synergy interval support vector regression. *Talanta* 119, 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.056>
- Fucke, K., McIntyre, G.J., Wilkinson, C., Henry, M., Howard, J.A.K., Steed, J.W., 2012. New insights into an old molecule: Interaction energies of theophylline crystal forms. *Cryst. Growth Des.* 12, 1395–1401. <https://doi.org/10.1021/cg201499s>
- Galvão, R.K.H., Araujo, M.C.U., José, G.E., Pontes, M.J.C., Silva, E.C., Saldanha, T.C.B.,

2005. A method for calibration and validation subset partitioning. *Talanta* 67, 736–740. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.03.025>
- Garbuio, A.Q.P., Hanashiro, T., Markman, B.E.O., Fonseca, F.L.A., Perazzo, F.F., Rosa, P.C.P., 2014. Evaluation and study of mebendazole polymorphs present in raw materials and tablets available in the Brazilian pharmaceutical market. *J. Appl. Pharm. Sci.* 4, 1–7. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.4111>
- Glebov, A.L., Mokhun, O., Rapaport, A., Vergnole, S., Smirnov, V., Glebov, L.B., 2012. Volume Bragg gratings as ultra-narrow and multiband optical filters 8428, 84280C. <https://doi.org/10.1117/12.923575>
- Gordon, K.C., McGoverin, C.M., 2011. Raman mapping of pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 417, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.030>
- Han, J., Suryanarayanan, R., 1998. Influence of Environmental Conditions on the Kinetics and Mechanism of Dehydration of Carbamazepine Dihydrate. *Pharm. Dev. Technol.* 3, 587–596. <https://doi.org/10.3109/10837459809028643>
- Hennigan, M.C., Ryder, A.G., 2013. Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.10.002>
- Himes, V.L., Mighell, A.D., De Camp, W.H., 1981. Structure of carbamazepine: 5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* 37, 2242–2245. <https://doi.org/10.1107/S0567740881008522>
- Honorato, S.B., Farfan, S., Viana, A., Filho, J.M., Camarão, G.C., Fachine, F. V., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O., Ferro, M., Dabbene, V., Cuffini, S.L., Ayala, A.P., 2012. Polymorphism evaluation in generic tablets containing mebendazole by dissolution tests. *J. Braz. Chem. Soc.* 23, 220–227. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000200005>
- JØRGENSEN, A.C., STRACHAN, C.J., POLLANEN, K.H., KORADIA, V., TIAN, F., RANTANEN, J., 2009. An Insight into Water of Crystallization during Processing Using Vibrational Spectroscopy. *J. Pharm. Sci.* 98, 3903–3932. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Kachrimanis, K., Braun, D.E., Griesser, U.J., 2007. Quantitative analysis of paracetamol polymorphs in powder mixtures by FT-Raman spectroscopy and PLS regression. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43, 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.032>
- Kachrimanis, K., Rontogianni, M., Malamataris, S., 2010. Simultaneous quantitative analysis of mebendazole polymorphs A-C in powder mixtures by DRIFTS spectroscopy and ANN modeling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.001>
- Keresztury, G., Raman Spectroscopy: Theory. Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., 2002. *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Handbook of Vibrational Spectroscopy.*
- Khamar, D., Bradshaw, I.J., Hutcheon, G.A., Seton, L., 2012. Solid State Transformations Mediated by a Kinetically Stable Form. *Cryst. Growth {&} Des.* 12, 109–118.
- Kiang, Y.H., Xu, W., Stephens, P.W., Ball, R.G., Yasuda, N., 2009. Layered structure and

- swelling behavior of a multiple hydrate-forming pharmaceutical compound. *Cryst. Growth Des.* 9, 1833–1843. <https://doi.org/10.1021/cg801004a>
- Kim, M., Chung, H., Woo, Y., Kemper, M., 2006. New reliable Raman collection system using the wide area illumination (WAI) scheme combined with the synchronous intensity correction standard for the analysis of pharmaceutical tablets. *Anal. Chim. Acta* 579, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.07.036>
- KOGERMANN, K., AALTONEN, J., STRACHAN, C.J., POLLANEN, K., HEINAMAKI, J., YLIRUUSI, J., RANTANEN, J., 2008. Establishing Quantitative In-Line Analysis of Multiple Solid-State Transformations During Dehydration. *J. Pharm. Sci.* 9, 4983–4999. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Larkin, P.J., Dabros, M., Sarsfield, B., Chan, E., Carriere, J.T., Smith, B.C., 2014. Polymorph characterization of active pharmaceutical ingredients (APIs) using low-frequency Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 68, 758–776. <https://doi.org/10.1366/13-07329>
- Larkin, P.J., Wasylyk, J., Raglione, M., 2015. Application of Low- and Mid-Frequency Raman Spectroscopy to Characterize the Amorphous-Crystalline Transformation of Indomethacin. *Appl. Spectrosc.* 69, 1217–1228. <https://doi.org/10.1366/15-07926>
- Legesse, M., Erko, B., Medhin, G., 2004. Comparative efficacy of albendazole and three brands of mebendazole in the treatment of ascariasis and trichuriasis. *East Afr. Med. J.* 81, 134–138. <https://doi.org/10.4314/eamj.v81i3.9142>
- Liebenberg, W., Dekker, T.G., Lötter, a P., de Villiers, M.M., 1998. Identification of the mebendazole polymorphic form present in raw materials and tablets available in South Africa. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 485–488. <https://doi.org/10.3109/03639049809085647>
- Mah, P.T., Fraser, S.J., Reish, M.E., Rades, T., Gordon, K.C., Strachan, C.J., 2015. Use of low-frequency Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of crystallinity in amorphous griseofulvin tablets. *Vib. Spectrosc.* 77, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2015.02.002>
- MARTINS, F.T., NEVES, P.P., ELLENA, J., CAMI, G.E., BRUSAU, E. V., NARDA, G.E., 2009. Intermolecular Contacts Influencing the Conformational and Geometric Features of the Pharmaceutically Preferred Mebendazole Polymorph C. *J. Pharm. Sci.* 98, 26–33. <https://doi.org/10.1002/jps>
- Meyer, M.C., Straughn, A.B., Jarvi, E.J., Wood, G.C., Pelsor, F.R., Shah, V.P., 1992. The Bioinequivalence of Carbamazepine Tablets with a History of Clinical Failures. *Pharm. Res.* 9, 1612–1616.
- Morris KR, Rodriguez-Hornado N. Hydrates, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, volume 7. In: Swarbrick J, Boylan J, eds. New York: Marcel Dekker, 1993: 393–440.
- Moser, C., Havermeier, F., 2009. Ultra-narrow-band tunable laserline notch filter. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 95, 597–601. <https://doi.org/10.1007/s00340-009-3447-6>
- Navin, C. V., Tondepu, C., Toth, R., Lawson, L.S., 2017. Quantitative determinations using portable Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 136, 156–161.

- Newport, Tutorial: Laser Diode Technology. 2019. Disponível: <https://www.newport.com/t/laser-diode-technology>. Acessado em: 24/01/2019.
- Olivieri, A.C., 2015. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* 868, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.017>
- Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C., Iñón, F.A., 2004. MVC1: An integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.03.004>
- Pan, MW., Benner, R.E., Smith, L.M., Continuous Lasers for Raman Spectrometry. Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., 2002. *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Handbook of Vibrational Spectroscopy*.
- Parrott, E.P.J., Zeitler, J.A., 2015. Terahertz time-domain and low-frequency Raman spectroscopy of organic materials. *Appl. Spectrosc.* 69, 1–25. <https://doi.org/10.1366/14-07707>
- Pelletier, M.J., Raman Monochromators and Polychromators. Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., 2002. *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Handbook of Vibrational Spectroscopy*.
- Phadnis, N. V., Suryanarayanan, R., 1997. Polymorphism in anhydrous theophylline - Implications on the dissolution rate of theophylline tablets. *J. Pharm. Sci.* 86, 1256–1263. <https://doi.org/10.1021/js9701418>
- Pommier, C.L.S., Walton, L.K., Ridder, T.D., Denton, M.B., Array Detectors for Raman Spectroscopy. Chalmers, J.M., Griffiths, P.R., 2002. *Handbook of Vibrational Spectroscopy, Handbook of Vibrational Spectroscopy*.
- Rodriguez-Caabeiro, F., Criado-Fornelio, A., Jimenez-Gonzalez, A., Guzman, L., Igual, A., Perez, A., Pujol, M., 1987. Experimental Chemotherapy and Toxicity in Mice of Three Mebendazole Polymorphic Forms. *Chemotherapy* 33, 266–271.
- Shin, K., Chung, H., 2013. Wide area coverage Raman spectroscopy for reliable quantitative analysis and its applications. *Analyst* 138, 3335–46. <https://doi.org/10.1039/c3an36843b>
- Sibik, J., Zeitler, J.A., 2016. Terahertz response of organic amorphous systems: Experimental concerns and perspectives. *Philos. Mag.* 96, 842–853. <https://doi.org/10.1080/14786435.2015.1111528>
- Silva, V.H., Gonçalves, J.L., Vasconcelos, F.V.C., Pimentel, M.F., Pereira, C.F., 2015. Analysis Quantitative analysis of mebendazole polymorphs in pharmaceutical raw materials using near-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115, 587–593. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.018>
- Silva, V.H., Silva, J.J., Pereira, C.F., 2017. Portable near-infrared instruments: application for quality control of polymorphs in pharmaceutical raw materials and calibration transfer. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134, 287–294. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.036>
- Silva, V.H., Vieira, F.S., Rohwedder, J.J.R., Pasquini, C., Pereira, C.F., 2017. Multivariate quantification of mebendazole polymorphs by terahertz time domain spectroscopy (THZ-

- TDS). Analyst 21–23. <https://doi.org/10.1039/C6AN02540D>
- Skoog, D. A. ; Holler, F. J. ; Nieman, T. A. ; Princípios de Análise Instrumental, 6ª edição, Editora Bookman, p. 180-181, 2009.
- Smith, G.P.S., Huff, G.S., Gordon, K.C., 2016. Investigating Crystallinity Using Low Frequency Raman Spectroscopy: Applications in Pharmaceutical Analysis. Spectroscopy 31, 42–50.
- Souza, A.M. De, Breitreitz, M.C., Filgueiras, P.R., José, J., Rohwedder, R., Poppi, R.J., 2013. EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE PARACETAMOL EM COMPRIMIDOS COMERCIAIS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO: UM TUTORIAL, PARTE II. Quim. Nova 36, 1057–1065.
- Suresh, P., Sreedhar, I., Vaidhiswaran, R., Venugopal, A., 2017. A comprehensive review on process and engineering aspects of pharmaceutical wet granulation. Chem. Eng. J. 328, 785–815. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.091>
- Suzuki, E., Shimomura, K., Sekiguchi, K., 1989. Thermochemical Study of Theophylline and Its hydrate. Chem. Pharm. Bull. 37, 493–497.
- Swanepoel, E., Liebenberg, W., De Villiers, M.M., 2003. Quality evaluation of generic drugs by dissolution test: Changing the USP dissolution medium to distinguish between active and non-active mebendazole polymorphs. Eur. J. Pharm. Biopharm. 55, 345–349. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00004-3)
- Swanepoel, E., Liebenberg, W., Devarakonda, B., De Villiers, M.M., 2003. Developing a discriminating dissolution test for three mebendazole polymorphs based on solubility differences. Pharmazie 58, 117–121.
- Szterner, P., Legendre, B., Sghaier, M., 2010. Thermodynamic properties of polymorphic forms of theophylline. Part I: DSC, TG, X-ray study. J. Therm. Anal. Calorim. 99, 325–335. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0186-1>
- Takagi, T., Ramachandran, C., Bermejo, M., Yamashita, S., Yu, L.X., Amidon, G.L., 2006. A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan. Mol. Pharm. 3, 631–643. <https://doi.org/10.1021/mp0600182>
- Takahashi, M., Ishikawa, Y., 2013. Translational vibrations between chains of hydrogen-bonded molecules in solid-state aspirin form i. Chem. Phys. Lett. 576, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.05.026>
- Tomerini, D., 2012. A computational analysis of the vibrational absorption of molecular solids in the terahertz range.
- Tondepu, C., Toth, R., Navin, C. V., Lawson, L.S., Rodriguez, J.D., 2017. Screening of unapproved drugs using portable Raman spectroscopy. Anal. Chim. Acta 973, 75–81.
- Valderrama, P., Braga, J.W.B., Poppi, R.J., 2009. ESTADO DA ARTE DE FIGURAS DE MÉRITO EM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA. Quim. Nova 32, 1278–1287.

- Vieira, F.S., 2016. Espectroscopia Terahertz: Instrumentação E Aplicações - Tese.
- Vieira, F.S., Pasquini, C., 2014. Determination of cellulose crystallinity by terahertz-time domain spectroscopy. *Anal. Chem.* 86, 3780–3786. <https://doi.org/10.1021/ac4035746>
- Wang, H., Barona, D., Oladepo, S., Williams, L., Hoe, S., Lechuga-Ballesteros, D., Vehring, R., 2017. Macro-Raman spectroscopy for bulk composition and homogeneity analysis of multi-component pharmaceutical powders. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 141, 180–191.
- Wang, H., Boraey, M.A., Williams, L., Lechuga-Ballesteros, D., Vehring, R., 2014. Low-frequency shift dispersive Raman spectroscopy for the analysis of respirable dosage forms. *Int. J. Pharm.* 469, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.04.058>
- Wang, H., Williams, L., Hoe, S., Lechuga-Ballesteros, D., Vehring, R., 2015. Quantitative macro-Raman spectroscopy on microparticle-based pharmaceutical dosage forms. *Appl. Spectrosc.* 69, 823–833. <https://doi.org/10.1366/14-07812>
- Zeitler, J.A., 2016. Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5>
- Zeitler, J.A., Taday, P.F., Gordon, K.C., Pepper, M., Rades, T., 2007. Solid-state transition mechanism in carbamazepine polymorphs by time-resolved terahertz spectroscopy. *ChemPhysChem* 8, 1924–1927. <https://doi.org/10.1002/cphc.200700261>
- Zeitler, J.A., Taday, P.F., Newnham, D.A., Pepper, M., Gordon, K.C., Rades, T., 2006. Terahertz pulsed spectroscopy and imaging in the pharmaceutical setting – a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 209–223. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.2.0008>