



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE FORMAS POLIMÓRFICAS DO
MEBENDAZOL NO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIAS NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO E TERAHERTZ**

Vitor Hugo da Silva

Recife

Fevereiro/2015

Vitor Hugo da Silva*

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE FORMAS POLIMÓRFICAS DO
MEBENDAZOL NO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIAS NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO E TERAHERTZ**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Química pela Universidade Federal
Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof^a Dr^a Claudete Fernandes Pereira

* Bolsista CAPES

**Recife
Fevereiro/2015**

Ficha Catalográfica

S586s Silva, Vitor Hugo da
Análise quantitativa de formas polimórficas do mebendazol no insumo farmacêutico ativo utilizando espectroscopias na região do infravermelho e terahertz / Vitor Hugo da Silva. – Recife, 2015.
91 f.: il.

Orientador(a): Claudete Fernandes Pereira.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Recife, 2015.

Referências.

1. Mebendazol 2. Polimorfismo 3. Infravermelho Médio (MIR) 4. Infravermelho Próximo (NIR) 5. Terahertz (THz) 6. Calibração Multivariada I. Pereira, Claudete Fernandes, orientadora II. Título

CDD 540

Vitor Hugo da Silva

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE FORMAS POLIMÓRFICAS DO
MEBENDAZOL NO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO
UTILIZANDO ESPECTROSCOPIAS NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO E TERAHERTZ**

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM:

27/02/15



Prof^a Dr.^a Claudete Fernandes Pereira (DQF – UFPE)

Orientadora



Dr. Severino Grangeiro Júnior (LAFEPE)

1º Examinador



Prof.^a Dra. Maria José Filgueiras Gomes (DQ – UFRPE)

2º Examinador

A Maria Piedade (*in memoriam*), que
sem ver onde eu poderia chegar,
acreditou no meu potencial.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas suas misericórdias que se renovam diariamente em minha vida. Nada teria sido realizado sem a Sua provisão.

Aos meus amados pais, Maria Veronica e Paulo Francisco, pelo constante apoio a minha carreira.

A prof^a Claudete Fernandes, minha orientadora, pela parceria, confiança, apoio, ensinamentos e extrema contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

A aluna de Iniciação Científica, Jacqueline Lima, pela sua contribuição e parceria na execução deste trabalho.

Ao LAC e seus membros, por proporcionar a efetivação desse trabalho e pelo acolhimento diário. Agradeço em especial os membros do setor técnico e administrativo, Carol, Vanessa, João, Shirley, Ismália, Paula e Polyana, pelo constante apoio.

Ao Lab. de Instrumentação e Automação em Análises Química (LIAAQ) e prof^a Ana Paula Paim, pelo espaço fornecido para efetivação do trabalho.

Ao Grupo de Instrumentação e Automação (GIA), prof. Célio Pasquini e pesquisador Francisco Senna, pelo apoio, acolhimento e grande contribuição na execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Metodologia e Síntese (LMS), prof^a Ivani Malvestiti e os alunos Thiago Muniz e Rodolfo Nunes, pela contribuição neste trabalho e espaço cedido.

Aos amigos pesquisadores, Carol, Alianda, Neirivaldo, Eduardo, Leandro, Francielson, Rafaela, Jessica e Danilo, pelo companheirismo, apoio e incentivo.

Ao LAFEPE e pesquisadora Fernanda Vera Cruz, pela contribuição na problemática deste trabalho e fornecimento do material utilizado.

A Formil Química, pelo apoio ao trabalho no fornecimento da matéria prima utilizada.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela formação.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao NUQAPE, pelo apoio a pesquisa.

Aos meus pastores, Ivo e Ângela Pinheiro, e toda Igreja do Nazareno, por todas as orações e cuidados com minha vida espiritual.

Aos meus amigos, pela força e coragem depositadas.

A todos, muito OBRIGADO!

“Não há nada como um sonho para criar o futuro”

Victor Hugo

RESUMO

Análise Quantitativa de Forma Polimórfica do Mebendazol no Insumo Farmacêutico Ativo Utilizando Espectroscopias na Região do Infravermelho e Terahertz.

O mebendazol (MBZ) é um medicamento anti-helmíntico de amplo espectro, frequentemente utilizado na terapia das parasitoses do lúmen intestinal. Tal substância possui três diferentes formas polimórficas, A, B e C. Dentre essas, a forma A não possui efeito anti-helmíntico e torna a medicação totalmente inativa quando excede 30% do seu teor na formulação, enquanto a forma B apresenta maior toxicidade por via oral. Portanto, a forma C é a farmacologicamente preferida por não apresentar as desvantagens das formas A e B e ser estável à temperatura ambiente. No entanto, todas as formas polimórficas do MBZ são reportadas tanto na matéria prima quanto nos medicamentos comercializados. Diante disso, o objetivo deste trabalho é determinar quantitativamente as formas polimórficas do mebendazol na matéria prima utilizando as espectroscopias no Infravermelho Médio (MIR), Próximo (NIR) e Terahertz (THz). Para isso, foi construído um planejamento de misturas ternárias com 21 amostras das formas polimórficas do MBZ. Modelos baseados na regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foram desenvolvidos utilizando os espectros MIR, NIR e THz pré-processados. Todas as técnicas estudadas apresentaram eficiência na diferenciação das formas polimórficas do fármaco, os quais apresentam perfis espectrais diferentes com mudanças nas intensidades das bandas e picos, além de deslocamentos dos mesmos. Os modelos de calibração multivariada PLS apresentaram resultados satisfatórios na quantificação das formas polimórficas do MBZ na matéria prima. Os melhores resultados para cada região espectral apresentaram valores de coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,95, coeficiente de correlação (R) acima de 0,97 e RMSEP médio de 0,0312 m/m, 0,0132 m/m e 0,0282 m/m para as formas polimórficas A, B e C, respectivamente.

Palavras-chave: Mebendazol; Polimorfismo; Infravermelho Médio (MIR); Infravermelho Próximo (NIR); Terahertz (THz); Calibração Multivariada.

ABSTRACT

Quantitative Analysis of Polymorphic Forms of Mebendazole in Active Pharmaceutical Ingredients Using Infrared and Terahertz Spectroscopies.

Mebendazole (MBZ) is a broad spectrum anthelmintic drug, often used as therapy against parasites from intestinal lumen. This substance has three different polymorphic forms, A, B and C. Among these forms, form A has no anthelmintic effect and renders the medication totally inactive when it exceeds 30% of mebendazole content in the formulation. Form B shows higher toxicity when ingested orally. Therefore, form C is the pharmaceutically preferred one because it does not have the drawbacks of forms A and B, and is stable at room temperature. All polymorphic forms of MBZ have been reported in pharmaceutical raw materials and commercial formulae. Thus, the aim of this work is to quantify the polymorphic forms of mebendazole in raw material using mid infrared (MIR), near infrared (NIR) and terahertz (THz) spectroscopies. For this, we built a ternary mixture design with 21 samples of polymorphic forms of MBZ. Models based on regression by Partial Least Squares (PLS) were developed using preprocessed MIR, NIR and THz spectra. All these techniques were efficient in discriminating among polymorphic forms of the drug, which have different spectral profiles with changes in intensities of bands and peaks, and displacements thereof. The multivariate calibration PLS models showed satisfactory results in the quantification of polymorphic forms of MBZ in the raw material. The best results for each spectral region showed values of determination coefficient (R^2) above 0.95, correlation coefficient (R) above 0.97 and average RMSEP of 0.0294 w/w, 0.0132 w/w and 0.0282 w/w to polymorphic forms A, B and C, respectively.

Keywords: Mebendazole; Polymorphism; Mid infrared (MIR), near infrared (NIR); Terahertz (THz); Multivariate calibration.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1 Polimorfismo em Compostos Farmacêuticos.....	5
2.2 Mebendazol	9
2.2.1 Formas polimórficas do mebendazol	11
2.2.2 Caracterização e identificação das formas polimórficas do mebendazol ...	12
2.3 Espectroscopia no infravermelho.....	14
2.3.1 Espectroscopia no infravermelho próximo	18
2.3.2 Espectroscopia no infravermelho médio	20
2.4 Espectroscopia Terahertz	21
2.5 Quimiometria	23
2.5.1 Planejamento e otimização de experimentos	24
2.5.2 Pré-processamento de dados.....	25
2.5.3 Calibração multivariada	26
2.5.4 Seleção de amostras	30
2.5.5 Seleção de variáveis.....	31
2.6 Métodos baseados na espectroscopia vibracional para análise das formas polimórficas do Mebendazol	32
CAPÍTULO III - OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.1.1 Objetivos específicos	36
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Obtenção e caracterização das formas polimórficas A, B e C do MBZ	38
4.2 Planejamento de misturas ternárias das formas polimórficas do MBZ	39
4.3 Aquisição dos Espectros MIR, NIR e THz	40
4.3.1 Espectros MIR	40
4.3.2 Espectros NIR.....	40
4.3.3. Espectros THz	41

4.4 Tratamento Quimiometrico	42
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Recristalização da forma polimórfica B do MBZ	45
5.2 Caracterização das formas polimórficas do MBZ	49
5.3 Pré-processamento dos dados	54
5.4 Calibração Multivariada	61
5.4.1 MIR	61
5.4.2 NIR.....	64
5.4.3 THz	67
CAPÍTULO VI - CONCLUSÃO	71
6.1 Conclusão.....	72
CAPÍTULO VII - PERSPECTIVAS FUTURAS.....	73
7.1 Perspectivas futuras	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas cristalinos e parâmetros de rede	5
Tabela 2. Propriedades físicas que diferem as formas cristalinas de um sistema polimorfo	7
Tabela 3. Regiões espectrais do infravermelho	15
Tabela 4. Proporções das três formas polimórficas do MBZ atribuído a cada amostra	39
Tabela 5. Números de onda característicos (cm^{-1}) das formas polimórficas do MBZ.....	45
Tabela 6. Ângulos e intensidades relativas aos picos PXRD das formas polimórficas do MBZ.....	47
Tabela 7. Valores de correlação, RMSEP e R^2 obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para as formas polimórficas do MBZ nos espectros MIR pré-processados. Os valores entre parênteses correspondem à quantidade de variáveis latentes utilizadas no modelo na regressão	62
Tabela 8. Valores de correlação, RMSEP e R^2 obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para as formas polimórficas do MBZ nos espectros NIR pré-processados. Os valores entre parênteses correspondem à quantidade de variáveis latentes utilizadas no modelo na regressão	65
Tabela 9. Valores de correlação, RMSEP e R^2 obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para as formas polimórficas do MBZ nos espectros THz pré-processados. Os valores entre parênteses correspondem à quantidade de variáveis latentes utilizadas no modelo na regressão	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do mebendazol	10
Figura 2. Modos vibracionais em uma molécula triatômica	16
Figura 3. Diagrama de energia potencial para os (a) osciladores harmônicos e (b) anarmônicos	17
Figura 4. Modos de medida na região NIR. (a) Transmitância; (b) Transflectância; (c) Reflectância difusa.....	19
Figura 5. Dispositivos de medida para ATR.	20
Figura 6. Espectro eletromagnético entre as ondas de rádio e radiação ultravioleta-visível.....	22
Figura 7. Representação da matriz de dados X e Y	26
Figura 8. Novo sistema de componentes principais formados de um gráfico de amostras hipotéticas com duas variáveis	28
Figura 9. Espectrofotômetro FTIR Spectrum 400 (a) e acessório ATR (b)	40
Figura 10. Espectrofotômetro FTNIR Frontier (a) e acessório NIRA (b).....	41
Figura 11. Espetrômetro THZ (a), porta amostra (b) e pastilhas utilizadas (c) nas medidas	42
Figura 12. Banda espectral MIR do estiramento C=O do carbamato da forma polimórfica A e Testes 1-4 do MBZ	45
Figura 13. Difratoograma da Forma A e Teste 3 do MBZ.....	46
Figura 14. Bandas espectrais MIR do estiramento (a) N-H e (b) C=O do carbamato da forma polimórfica C e Teste 5 do MBZ	48
Figura 15. Difratoograma da Forma C e Teste 5 do MBZ.	49
Figura 16. Difratoograma das formas polimórficas do MBZ	50
Figura 17. (a) Espectros MIR das formas polimórficas do MBZ. (b) Bandas do estiramento N-H. (c) Bandas do estiramento C=O do carbamato.	51
Figura 18. Espectros NIR das formas polimórficas do MBZ	52
Figura 19. Espectro THz das formas polimórficas do MBZ	53
Figura 20. Espectros MIR das misturas das formas polimórficas do MBZ	54

Figura 21. Espectros MIR pré-processados por MSC	55
Figura 22. Espectros MIR pré-processados por SNV	55
Figura 23. Espectros MIR pré-processados por derivada	56
Figura 24. Espectros NIR das misturas das formas polimórficas do MBZ. Em destaque, faixa de trabalho utilizada nos modelos de calibração multivariada	57
Figura 25. Espectros NIR pré-processados por MSC.....	57
Figura 26. Espectros MIR pré-processados por SNV	58
Figura 27. Espectros MIR pré-processados por derivada	58
Figura 28. Espectro THz das misturas das formas polimórficas do MBZ. Em destaque, faixa de trabalho utilizada nos modelos de calibração multivariada	59
Figura 29. Espectros THz pré-processados por MSC	60
Figura 30. Espectros THz pré-processados por SNV	60
Figura 31. Espectros THz pré-processados por derivada	61
Figura 32. Gráfico das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidos com o melhor modelo MIR para a forma polimórfica (a) A (PLS/JK derivada), (b) B (PLS MSC) e (c) C (PLS derivada) do MBZ	64
Figura 33. Gráfico das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidos com o melhor modelo NIR para a forma polimórfica (a) A (PLS SNV), (b) B (PLS/JK derivada) e (c) C (PLS derivada) do MBZ	67
Figura 34. Gráfico das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidos com o melhor modelo THz para a forma polimórfica (a) A (PLS derivada), (b) B (PLS/JK derivada) e (c) C (PLS MSC) do MBZ	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ANN	Redes Neurais (<i>Artificial Neural Network</i>)
APS	Algoritmo de Projeções Sucessivas (<i>Successive Projections Algorithm</i>)
ATD	Análise Térmica Diferencial
ATR	Reflectância Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflectance</i>)
DRA-UV	Reflectância Difusa por Ultravioleta (<i>Difussed Reflectance Analysis – Untraviolet</i>)
DRIFTS	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Difusa (<i>Diffuse Reflectance IR Fourier Spectroscopy</i>)
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DXR	Difração de Raios-X (<i>Diffraction X-ray</i>)
FIR	Infravermelho Distante (<i>Far Infrared</i>)
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (<i>Infrared Fourier Transform</i>)
GA	Algoritmo Genético (<i>Genetic Algorithm</i>)
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
iPLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais por Intervalos (<i>internal Partial Least Squares Segression</i>)
IV	Infravermelho
JK	Jack-Knife
KS	Kennard-Stone
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes
LSS	Lauril Sufato de Sódio
MBZ	Mebendazol
MIR	Infravermelho Médio (<i>Medium Infrared</i>)
MLR	Regressão Linear Múltipla (<i>Multiple Linear Regression</i>)

MSC	Correção Multiplicativa de Sinal (<i>Multiplicative Scatter Correction</i>)
NIR	Infravermelho Próximo (<i>Near Infrared</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Componente Principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais (<i>Principal Components Analysis</i>)
PCR	Regressão por Componentes Principais (<i>Principal Component Regression</i>)
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least-Squares</i>)
PXRD	Difração de Raios-X de Pó (<i>Powder X-ray Diffraction</i>)
RMSECV	Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (<i>Root Means Square Error Cross Validation</i>)
RMSEP	Erro Médio Quadrático de Previsão (<i>Root Means Square Error Cross Validation</i>)
SNV	Variação Padrão Normal (<i>Standard Normal Variation</i>)
SPXY	Partição de Amostras Baseados na Distância X-y
SW	Stepwise
TGA	Análise Termogravimétrica (<i>Thermal Gravimetric Analysis</i>)
THZ	Terahertz
UART	Reflectância Total Atenuada Universal (<i>Universal Attenuated Reflectance Total</i>)
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos (<i>United State Pharmacopeia</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VL	Variável Latente (<i>Latent Variable</i>)

INTRODUÇÃO
CAPÍTULO I

1. Introdução

O Mebendazol (MBZ) é um anti-helmíntico de amplo espectro utilizado no tratamento contra parasitoses do lúmen intestinal. Esse fármaco está listado como droga essencial na classe farmacológica de anti-helmínticos intestinais pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e vem sendo amplamente utilizado em programas de desparasitação em todo mundo. O MBZ em seu estado sólido pode se cristalizar em três formas polimórficas distintas (Formas A, B e C) que apresentam diferenças em suas estruturas cristalinas e em suas propriedades físico-químicas e terapêuticas (COSTA *et al.*, 1991; HONORATO *et al.*, 2012; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que descrevem as diferenças apresentadas pelas três formas polimórficas do MBZ quanto às suas propriedades. No estudo realizado por Costa *et al.* (1991), foi evidenciado que a forma polimórfica A é menos solúvel em meio ácido, enquanto a forma B é a mais solúvel e mais tóxica entre as três formas. Além disso, Charoenlarp *et al.* (1993) demonstraram que a forma polimórfica A do MBZ, quando excede 30% na formulação, torna a medicação totalmente inativa. Já a forma polimórfica C é farmacologicamente preferível por não apresentar as desvantagens das outras formas, apresentar solubilidade satisfatória para absorção do fármaco no organismo e ser estável a temperatura ambiente e até 180° C (KACHRUMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010; DE VILLIERS *et al.*, 2005). Embora haja diferenças no comportamento químico e terapêutico das três formas polimórficas do MBZ, todas são descritas na literatura como presentes em matérias primas e medicamentos comercializados em todo mundo, necessitando, portanto, de métodos analíticos para sua identificação e quantificação (AYALA; SIESLER; CUFFRINI, 2008; KACHRUMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010).

As espectroscopias vibracionais, como as espectroscopias no infravermelho médio (MIR), próximo (NIR) e espectroscopia Terahertz (THz), mostram-se como ferramentas poderosas para a diferenciação de substâncias no estado sólido que apresentam polimorfismo (BRITAIN, 2009a). Essas técnicas apresentam diversas vantagens como, rapidez, requererem pouco preparo das amostras sem destruí-las e são facilmente aplicadas ao setor industrial (CHIENG; RADES; AALTOEN, 2011). Além disso, essas técnicas têm sido reportadas na literatura para análises

qualitativas e quantitativas de várias substâncias empregando métodos multivariados de análise (SHEN, 2011; STRACHAN, 2005).

No caso das formas polimórficas do MBZ, a literatura descreve o potencial das espectroscopias no infravermelho na caracterização e quantificação das formas polimórficas do MBZ utilizando ferramentas quimiométricas (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; FROEHLICH; GASPAROTTO, 2005, ABOUL-ENEIN; BUNACIU; FLESCHEIN, 2002; AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2008; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010). Entretanto, não foram encontrados, até o momento, trabalhos que contemplem a determinação das três formas polimórficas do MBZ pelas espectroscopias NIR e THz.

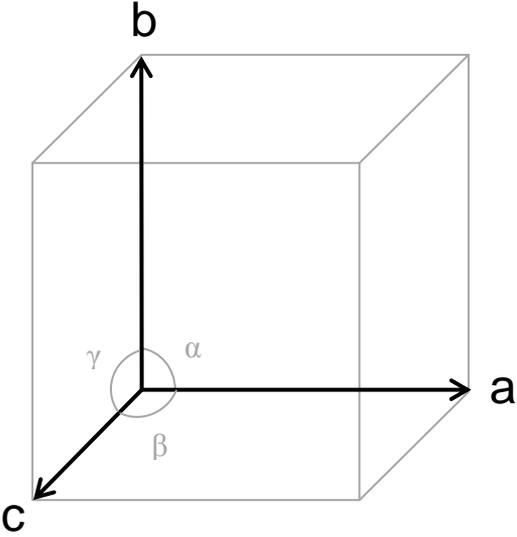
Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de métodos analíticos para quantificação das três formas polimórficas do MBZ no Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) utilizando as espectroscopias vibracionais MIR, NIR e THZ associadas às ferramentas quimiométricas.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA
CAPÍTULO II

2.1 Polimorfismo em Compostos Farmacêuticos

Diversos compostos orgânicos e inorgânicos de importância farmacêutica podem existir em uma ou mais formas cristalinas. Quando aplicado a sólidos, o termo 'cristalino' traz a ideia de um cristal com estrutura unitária (célula unitária) que se repete de forma regular nas três dimensões do espaço (vetores translacionais a, b e c), com volume definido e quantidade suficiente de átomos e moléculas para formação do cristal. Os cristais podem ser classificados como membro de uma das sete classes ou sistemas de cristais estabelecidos pelas relações entre as dimensões no espaço vetorial e ângulos formados pelos vetores (α , β e γ) (VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001), como observado pela Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas cristalinos e parâmetros de rede (STIEGER; LIEBENBERG, 2007).

	Sistema de Cristalização	Relação entre os parâmetros de rede
	Cúbico	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Tetragonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Ortorrômbico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
	Romboédrico (Trigonal)	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$
	Hexagonal	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
	Monoclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
	Triclínico	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

Através da Tabela 1, percebe-se que existe a possibilidade de formação de uma grande quantidade de fármacos no estado sólido que obedecem ao espaço translacional e angular apresentado. Quando a formação dos cristais é estabelecida por um único elemento químico, recebe o nome de Alotropia. Um dos casos mais conhecidos e clássicos desse fenômeno são as formas alotrópicas do carbono (C), o grafite, o diamante e o fulereno. Outro exemplo de alotropia inclui o fósforo (P), que pode existir na forma cúbica, monocíclica e ortorrômbica. Por outro lado, no caso de

compostos químicos e substâncias, como o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) de um fármaco, esse fenômeno natural recebe o nome de polimorfismo (PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009).

Polimorfismo, por definição, é a habilidade de um composto existir em duas ou mais formas cristalinas com diferentes arranjos e/ou conformações de suas moléculas na célula unitária. Ou seja, são as diferentes formas cristalinas apresentadas por um mesmo composto químico (BRITAIN, 2009b; LOHANI; GRANT, 2006; PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009). A diferença entre as estruturas cristalinas dos polimorfos são originadas através de dois mecanismos denominados de polimorfismo de empacotamento e polimorfismo conformacional. Esse último ocorre quando as moléculas existem em diferentes conformações em seu estado cristalino. Tal fenômeno é muito comum em compostos farmacêuticos por apresentarem flexibilidade em suas estruturas. Já no polimorfismo de empacotamento, as moléculas compartilham da mesma conformação molecular, mas possuem empacotamento diferente nas três dimensões do espaço (LEE, 2014; VIPAGUNTA; BRITAIN; GRANT, 2001).

A existência de diferentes estruturas cristalinas (diferentes arranjos na célula unitária) de vários polimorfos de uma substância faz com que os mesmos apresentem diferentes propriedades físicas e químicas (PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009; BRITAIN, 2009b; LOHANI; GRANT, 2006). Isto inclui propriedades termodinâmicas, espectroscópicas, cinéticas, mecânicas, de empacotamento e superfície, como listados na Tabela 2. As diferentes propriedades físicas e químicas encontradas nos diferentes polimorfos surgem devido às diferenças de empacotamento molecular nas dimensões, forma, simetria, capacidade (número de moléculas) e volume das células unitárias. Já as diferenças nas propriedades mecânicas dos cristais são originadas pelas diferenças existentes nas propriedades de empacotamento e nas energias de interação intermoleculares (propriedade termodinâmicas) entres os polimorfos (BRITAIN, 2009b).

As diferenças de propriedades encontradas nas formas cristalinas dos polimorfos são de extremo interesse para indústria farmacêutica, pois cerca de 80% dos medicamentos comerciais exibem polimorfismo sob condições experimentais e sua manifestação pode ocasionar diferenças significativas no processo, na formulação, na biodisponibilidade da droga, na solubilidade, na taxa de dissolução e,

possivelmente, no transporte de massa das moléculas (LOHANI; GRANT, 2006; BRITTAİN, 2009b; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001).

Tabela 2. Propriedades físicas que diferem as formas cristalinas de um sistema polimorfo (BRITTAİN, HARRY G., 2009).

Propriedades de Empacotamento	Volume molar e densidade Índice de Refração Condutividade: Elétrica e Térmica Higroscopicidade
Propriedades Termodinâmicas	Temperatura de fusão e sublimação Energia interna ou estrutural Entalpia Capacidade calorífica Entropia Energia livre e potencial químico Atividade Termodinâmica Pressão de vapor Solubilidade
Propriedades Espectroscópicas	Estado de transição eletrônico Estado de transição vibracional Estado de transição de spin nuclear
Propriedades cinéticas	Taxa de dissolução Taxa de reação do estado sólido Estabilidade
Propriedades da superfície	Energia livre de superfície Tensão interfacial Hábito do cristal
Propriedades mecânicas	Dureza Resistência à tração Compatibilidade Manipulação, fluxo e mistura

A estabilidade relativa das formas polimórficas de uma substância depende de suas propriedades, especialmente das termodinâmicas, pois, um sistema tende a se mover ao estado de equilíbrio termodinamicamente estável, ou seja, com mais baixa energia livre (LEE, 2014; LOHANI; GRANT, 2006). Diante de um conjunto

definido de condições experimentais (com exceção dos pontos de transição), apenas um polimorfo tem a menor energia livre. Este polimorfo é a forma termodinamicamente estável e os demais polimorfos são designados a uma forma metaestável, que é termodinamicamente instável, mas possui uma existência finita como resultado da taxa de transformação relativamente lenta para a forma mais estável (LOHANI; GRANT, 2006).

As interações intermoleculares são também parâmetros analisados para determinação e especificação das diferentes estruturas cristalinas polimórficas. As interações não covalentes, como ligação de hidrogênio, força de van der Waals, empilhamento π e interações eletrostáticas possuem um papel importante na determinação do arranjo molecular do cristal no espaço. A natureza dessas interações é energeticamente fraca, porém, com energia suficiente para provocar torções nas moléculas e modificarem seu arranjo espacial podendo deixar as mesmas com energias bastante próximas. Além disso, as interações não covalentes também são responsáveis pela forma que o calor é dissipado na estrutura cristalina do polimorfo. Como característica, cada polimorfo possui sua própria capacidade calorífica molar, C_m . Através do cálculo dessa propriedade termodinâmica torna-se possível determinar a entalpia (H) e entropia (S) de diferentes polimorfos (A e B) numa temperatura específica (T_1) e pressão constante, e conseqüentemente, a diferença da energia livre (ΔG) entre as formas hipotéticas como descrita na Equação 1 (LOHANI; GRANT, 2006).

$$\Delta G_{B \rightarrow A}^{T_1} = \Delta H_{B \rightarrow A}^{T_1} - T_1 \Delta S_{B \rightarrow A}^{T_1} \quad (1a)$$

$$\Delta G_{B \rightarrow A}^{T_1} = \left(\Delta H_{B \rightarrow A}^0 + \int_0^{T_1} \Delta C_{P,m(B \rightarrow A)} dT \right) - T_1 \left(\int_0^{T_1} \frac{\Delta C_{P,m(B \rightarrow A)}}{T} dT \right) \quad (1b)$$

onde, $C_{p,m}$ é a capacidade calorífica a pressão constante, T_1 é a temperatura do sistema, ΔH é a variação de entalpia e ΔS é a variação de entropia entre as formas hipotéticas A e B. Ambas as Equações, 1a e 1b, assumem que não há ocorrência de fase de transição no sistema na faixa de temperatura. No entanto, a Equação 1b possui termos adicionais correspondentes às variações de entalpia e entropia associadas a cada fase de transição.

Os fármacos na sua grande maioria são formulados e comercializados no estado sólido, tornando, então, extremamente importante o estudo dos compostos que são apresentados nessa forma e, principalmente, quando apresentam polimorfismo. O conhecimento dessas características num fármaco ajuda a evitar problemas na fabricação do IFA, melhora o desempenho do mesmo e gera espaço para inovação, pois, geralmente, a forma mais estável do fármaco é preferida comercialmente devida suas características físicas e químicas e/ou, principalmente, pela forma metaestável poder se transformar na forma estável(PUROHIT; VENUGOPALAN, 2009).

Na literatura são descritos vários fármacos que apresentam polimorfismo. Borka e Halebian (1990) apresentaram uma lista com mais de 450 fármacos polimórficos. Os autores ainda ressaltam a possibilidade de existência de muitos fármacos que exibem polimorfismo, mas que ainda não foram reportados na literatura ou ainda não foram estudados para se saber se realmente apresentam essa característica (BORKA; HALEBLIAN, 1990). Dentre os fármacos apresentados no artigo está o Mebendazol, listado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como droga essencial na classe farmacológica de anti-helmínticos intestinais(WHO, 2003).

2.2 Mebendazol

O mebendazol (Éster metílico do ácido N-(6-benzoil-1H-benzimidazol-2-il)carbâmico (MBZ), Figura 1) é um anti-helmíntico de amplo espectro, ativo no combate as parasitoses (nematódeos e cestódeos)do lúmen intestinal e indicado no tratamento de infecção simples ou mistas causadas por *Enterobius vermiculares*, *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Acylostoma duodenale* e *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* e *Teania spp* (COSTA *et al.*, 1991; AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977). Apresenta-se na forma de pó branco a ligeiramente amarelo e inodoro, empregado na terapia humana e animal, é praticamente insolúvel em água, clorofórmio, cloreto de metileno, etanol, éter etílico e ácido mineral. No entanto, apresenta solubilidade em ácido fórmico (FARMACOPÉIA, 2010). Esse fármaco é amplamente utilizado em tratamentos de casos não cirúrgicos, suplementar prévio e pós-cirúrgico e como

fármaco de segunda escolha em alguns estágios sanguíneos de infestação parasita (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2008; FROEHLICH; GASPAROTTO, 2005).

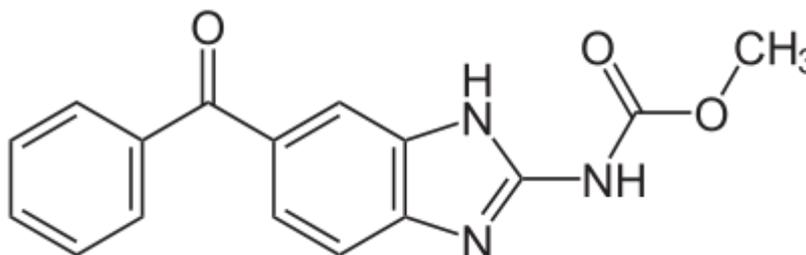


Figura 1. Estrutura química do mebendazol.

Esses parasitas, nematódeos e cestódeos, são comuns e tem implicações importantes para saúde em todo mundo. Eles podem ser responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento de crianças com retardo, provavelmente, por meio de um mecanismo de anemia por deficiência de ferro (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2008). Por isso, o MBZ tem sido utilizado em grande escala em países em desenvolvimento nos seus programas nacionais de desparasitação em decorrência da sua eficiência, poucos efeitos colaterais, segurança e baixo custo (HONORATO *et al.*, 2012). Além disso, o MBZ, junto com outros quatro anti-helmínticos, está incluído na lista de medicamentos essenciais da OMS (TORLESSE; CROMPTON; SAVIOLI, 2003).

Considerando o uso generalizado do MBZ no tratamento das infestações parasitárias na população humana, tem surgido à preocupação de se acompanhar, de forma cautelosa, a qualidade do IFA a fim de identificar o surgimento de qualquer resistência ao medicamento. Tal resistência pode reduzir a eficiência clínica do fármaco e, além disso, comprometer os resultados dos programas de desparasitação. Sem esse controle de qualidade, os comprimidos podem ser comercializados variando propriedades importantes que afetam os resultados terapêuticos como a pureza, a desintegração, a dissolução e biodisponibilidade. Além dessas, outra propriedade que pode influenciar na variabilidade da eficiência de uma formulação farmacêutica é a existência de polimorfismo no IFA, a qual pode alterar o desempenho da droga. Por exemplo, o MBZ possui três formas polimórficas e apresenta características físicas, químicas e terapêuticas distintas para cada uma delas (HONORATO *et al.*, 2012).

2.2.1 Formas polimórficas do mebendazol

O MBZ em seu estado sólido pode se cristalizar em três formas polimórficas distintas denominadas de polimorfos A, B e C. Esses polimorfos, além de exibir diferenças em sua estrutura cristalina, apresentam diferenças significativas em sua solubilidade e em suas propriedades terapêuticas (COSTA *et al.*, 1991; HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; SWANEPOEL; LIEBENBERG; DE VILLIERS, 2003).

Na literatura, diversos estudos comprovam as diferenças existentes entre as três formas polimórficas do MBZ quanto as suas propriedades físicas, químicas e terapêuticas (CHAROENLARP *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 1991). Costa *et al.* (1991) realizaram um estudo com as formas polimórficas do MBZ e comprovaram diferenças significativas nas propriedades físicas, físico-químicas e de toxicidade entre elas. Com a relação ao estudo de solubilidade em ácido clorídrico 0,03 N, o resultado apresentou a seguinte ordem $B (0,0733 \pm 0,0020 \text{ mg/mL}) > C (0,0360 \pm 0,0008 \text{ mg/mL}) > A (0,0123 \pm 0,0007 \text{ mg/mL})$. Em relação à toxicidade, as evidências experimentais mostraram resultados com ordem inversa à solubilidade, sendo $A < C < B$. A avaliação geral dos espectros de infravermelho (IV) e difratogramas de raios-X das amostras indicou bandas e raias características das três formas polimórficas, sendo os tipos A e C com maior cristalinidade. Uma Análise Térmica Diferencial (ATD) também foi realizada no MBZ e observou-se que as formas polimórficas C e B se convertem na forma A em altas temperaturas e, por isso, essa é a forma de maior estabilidade termodinâmica. Tal resultado também foi observado nos trabalhos realizados por Himmelreich, Rawson e Watson (1977) e De Villiers *et al* (2010). Ambos observaram que o aumento da temperatura e humidade fazem com que haja uma conversão das formas polimórficas C e B na forma A em temperaturas acima de 170°C e 200°C, respectivamente (HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; DE VILLIERS *et al.*, 2005).

Um estudo utilizando as formas A e C do MBZ e placebo em 958 crianças em idade escolar na Tailândia foi realizado por Charoenlarp *et al.* (1993) afim de observar o desempenho terapêutico do fármaco num programa de desparasitação. O estudo relevou que quando o MBZ é administrado na forma A e seu teor supera 30% na formulação, o mesmo não apresenta eficácia anti-helmíntica e seu

desempenho é semelhante ao placebo. Portanto, há dependência na eficácia do efeito anti-helmíntico do MBZ em função do seu polimorfo (CHAROENLARP *et al.*, 1993).

A forma C do MBZ, por não apresentar os problemas provenientes da forma A, possuir solubilidade suficiente que assume excelente biodisponibilidade da droga sem associação à toxicidade, como a forma B, e ser bastante estável a temperatura ambiente e a aproximadamente 179 °C, é a forma farmacêuticamente preferível (DE VILLIERS *et al.*, 2005; HONORATO *et al.*, 2012; KACHRIMANIS; RONGOIANNI; MALAMATARIS, 2010). No entanto, a presença de todas as formas polimórficas do MBZ tem sido reportada em matérias primas e formulações comercializadas em todo mundo (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; KACHRIMANIS; RONGOIANNI; MALAMATARIS, 2010). Diante do exposto, ensaios e teste analíticos têm sido propostos para identificação e caracterização das formas polimórficas do MBZ.

2.2.2 Caracterização e identificação das formas polimórficas do mebendazol

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

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

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

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

Dentre as técnicas citadas, a PXRD é considerada a mais confiável para diferenciação de polimorfismo. Esta técnica produz uma impressão digital com numerosos picos cujas posições correspondem aos espaçamentos periódicos dos átomos no sólido. A técnica é utilizada para caracterização de polimorfismo porque diferentes estruturas cristalinas na célula unitária, em geral, dão origem a diferentes posições de pico no difratograma. Além disso, a boa separação entre os picos no PXRD permite a análise de misturas entre os polimorfos (RODRÍGUEZ-SPONG *et al.*, 2004). No entanto, quando os padrões de referência das formas puras do pó não estão disponíveis, torna-se difícil esse tipo de análise por não se saber, se o padrão a ser utilizado é proveniente de uma mistura ou material puro (LEE, 2014).

Para acessar as informações químicas relevantes das formas polimórficas de fármacos as técnicas espectroscópicas vibracionais são as mais recomendadas.

Dentre essas, técnicas como o MIR, NIR, Raman e Terahertz (THz) são extremamente poderosas para diferenciação substâncias polimórficas no estado sólido e, além disso, incluem conjuntamente informações físicas e químicas das mesmas. Esses métodos não fornecem diretamente informações da rede cristalina, como o PXR, mas fornecem informações estruturais das moléculas através das interações intermoleculares e intramoleculares observada nessas formas de análise (BRITAIN, H., 2009a; CHIENG; RADES; AALTONEN, 2011).

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

2.3 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) é uma técnica de análise por absorção molecular muito poderosa e útil para análises quantitativas e qualitativas em diversos tipos de amostras com naturezas diversas. Esse tipo de espectroscopia tem sido reportada em diversos setores industriais e de pesquisa por apresentar uma série de vantagens como, simplicidade, não destrutividade, rapidez, pouco preparo de amostra, além de agregar informação física e química da natureza da amostra.

A espectroscopia IV emprega fenômenos de absorção e emissão de energia radiante associado aos movimentos vibracionais e rotacionais das moléculas. Esse tipo de espectroscopia é caracterizada pela região da radiação eletromagnética com número de onda entre 12800 a 10 cm^{-1} . A espectroscopia IV é dividida em três regiões, infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e infravermelho distante (FIR), como descrito na Tabela 3 (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

Tabela 3. Regiões espectrais do infravermelho (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

Região	Comprimento de onda (nm)	Número de Onda (cm^{-1})	Frequência (Hz)
Próximo	780 a 2.500	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio	2.500 a 50.000	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante	50.000 a 100.000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

A radiação IV, contrária a radiação ultravioleta e visível (UV-Vis), não possui energia suficiente para que ocorram transições eletrônicas nas moléculas. No entanto, é suficientemente energética para ocorrência de transições de um estado vibracional ou rotacional para outro (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

Para que uma molécula absorva radiação IV é necessário que haja uma variação no momento de dipolo decorrente dos seus movimentos vibracionais ou rotacionais (Figura 2). Nessa condição, o campo elétrico alternado associado à radiação eletromagnética é capaz de interagir com a molécula e ocasionar uma variação na amplitude de seus movimentos. Para isso ocorrer, a frequência da radiação incidente nas moléculas deve ser exatamente igual à frequência de vibração natural das mesmas. Esse fenômeno, por exemplo, ocorre em moléculas heteronucleares, como HCl, pela existência de momento dipolar em seus movimentos vibracionais. Já as moléculas homonucleares, como o H_2 , N_2 ou O_2 , não possuem variação no momento dipolar durante suas vibrações e não absorvem radiação IV (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

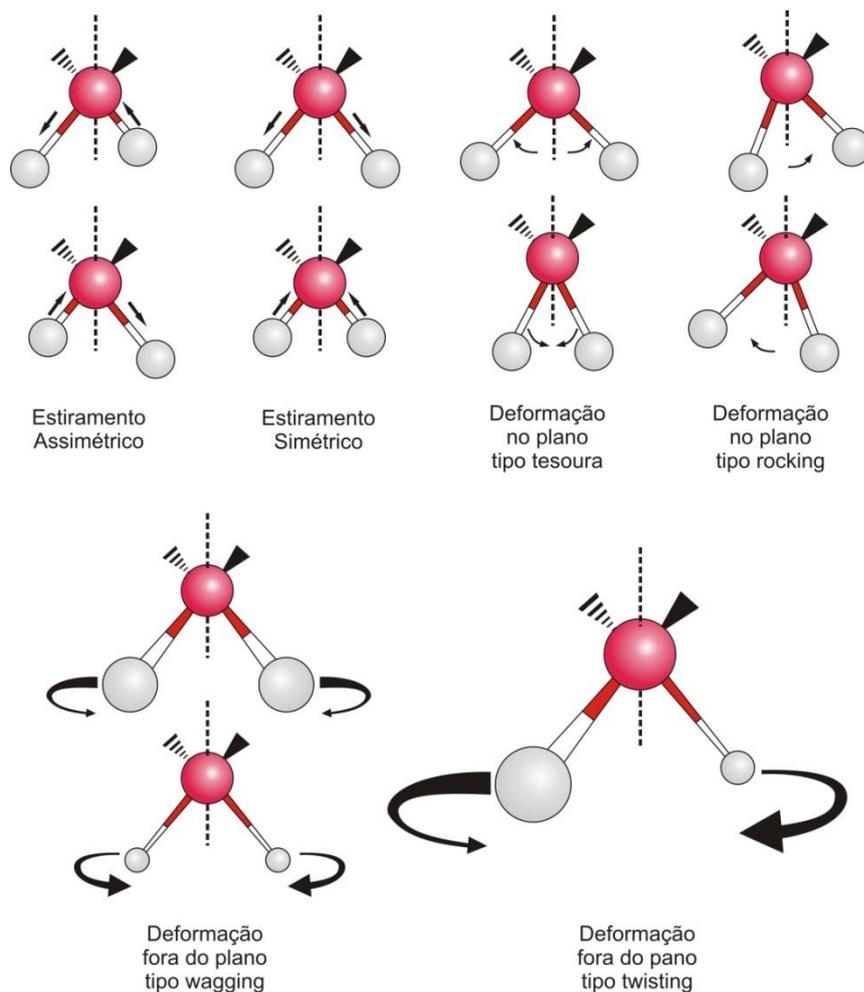


Figura 2. Modos vibracionais em uma molécula triatômica(OLIVEIRA, 2013).

As características das vibrações moleculares podem ser aproximadas ao comportamento de um modelo mecânico (oscilador harmônico, Figura 3a) com duas massas conectadas por uma mola oscilando em torno da posição de equilíbrio. No instante em que as massas estão em repouso, posição de equilíbrio, a energia potencial do sistema é zero. Porém, no momento em que a mola do sistema for comprimida ou esticada, a energia potencial é alterada em quantidade equivalente ao deslocamento das massas obedecendo ao movimento harmônico simples, descrito na Equação 2:

$$E = \frac{1}{2}ky^2 \quad (2)$$

onde k é a constante de força da mola e y o deslocamento das massas (PASQUINI, 2003).

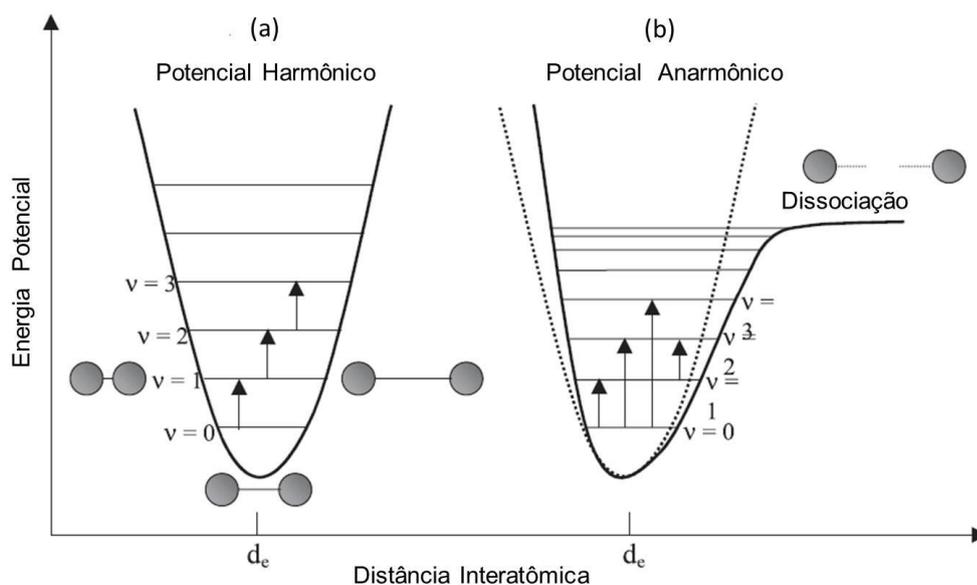


Figura 3. Diagrama de energia potencial para os (a) osciladores harmônicos e (b) anarmônicos (PASQUINI, 2003).

O oscilador harmônico é um excelente modelo para a explicação do conceito de energia vibracional. Porém, esse modelo clássico falha quando são considerados sistemas moleculares que não podem assumir níveis de energia contínuos. Esses sistemas, que possuem níveis discretos de energia (E_{vib}), são definidos pela mecânica quântica através da Equação 3.

$$E_{vib} = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu \quad (3)$$

onde E_{vib} é a energia vibracional, h é a constante de Planck, ν é o número quântico vibracional e ν é a frequência vibracional fundamental de uma molécula de massa m_1 e m_2 , que é definida pela Equação 4 (PASQUINI, 2003).

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1+m_2)}{m_1m_2}} \quad (4)$$

No oscilador harmônico as transições entre os níveis de energia vibracionais somente podem ocorrer entre níveis adjacentes de energia, $\Delta v = \pm 1$. Além disso, a diferença energética entre os níveis vibracionais são igualmente espaçados. No entanto, em sistemas moleculares reais é necessário levar em consideração as

forças de repulsão coulômbica entre os átomos quando estão muito próximos e a ruptura de sua ligação quando estão muito afastados. Desta forma, o comportamento das moléculas reais assemelha-se com o oscilador anarmônico (Figura 3b) (PASQUINI, 2003; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

No modelo do oscilador anarmônico, as diferenças entre os níveis vibracionais adjacentes vão diminuindo à medida que o número quântico vibracional aumenta. Além disso, são previstas transições com $\Delta\nu = \pm 2$ ou ± 3 (sobretons) e a existência de bandas de combinação, que possuem frequências maiores e intensidades menores que a transição fundamental (PASQUINI, 2003; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006). Tais informações são observadas na região espectral do infravermelho próximo (NIR).

Considerando que a cristalografia de uma molécula perturba energeticamente seus modos vibracionais e, conseqüentemente, seus graus de liberdade vibracionais, mudanças nos perfis espectrais dos sistemas em estudo serão observadas na região do infravermelho, o que permitirá a avaliação de características físicas, como o polimorfismo, e químicas dos sistemas em estudo (BRITTAIN, H., 2009a). Devido a isso, o IV tem sido utilizado em grande escala na ciência farmacêutica para identificação e quantificação de matéria prima, determinação de homogeneidade do IFA, excipientes, polimorfismo, isômeros ópticos, parâmetros físicos e misturas (BLANCO *et al.*, 1998).

2.3.1 Espectroscopia no infravermelho próximo

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é um tipo de espectroscopia vibracional ou rotacional com números de onda na faixa de 12.800 a 4.000 cm^{-1} (780 – 2500 nm). Essa região do espectro eletromagnético é bastante utilizada por possuir algumas características significativas de análise como, não destrutiva, não invasiva, não requer nenhum ou quase nenhum preparo da amostra, permite análises rápidas (um minuto ou menos por amostras) e pode ser aplicada em linha de processos utilizando sonda com fibras ópticas (PASQUINI, 2003).

Os espectros de absorção na região NIR são caracterizados pelos sobretons e bandas de combinação entre vibrações. Essas bandas de absorção possuem intensidades bastante fracas e com muita sobreposição com relação ao MIR e FIR. Devido a isso, os espectros NIR são difíceis para interpretação e extração de

informação relevante à amostra. Para tanto, ferramentas quimiométricas são utilizadas para determinações qualitativas e quantitativas de compostos (BLANCO *et al.*, 1998; BRITAIN, H., 2009a).

Um espectrofotômetro NIR é constituído de componentes ópticos semelhantes aos utilizados na instrumentação da região espectral do UV-Vis. Sendo assim, os componentes empregados são mais simples, robustos, mais baratos e menos sensível a umidade do ar que outros instrumentos da faixa do infravermelho. As formas de análise mais comuns realizadas no NIR são transmitância, transflectância e reflectância difusa, como ilustradas na Figura 4 (PASQUINI, 2003).

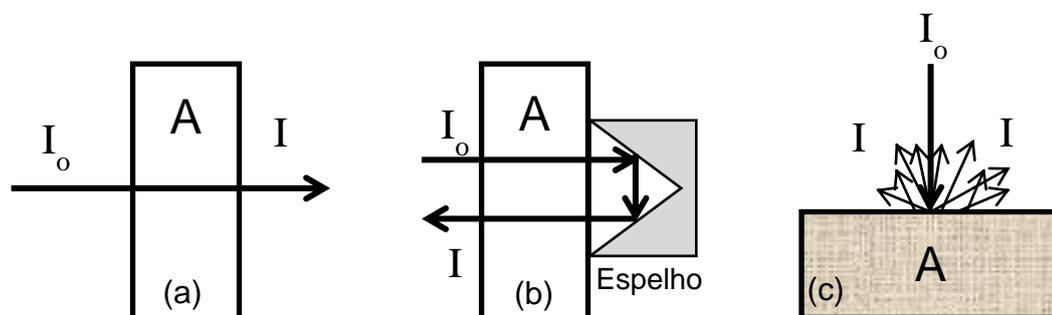


Figura 4. Modos de medida na região NIR. (a) Transmitância; (b) Transflectância; (c) Reflectância difusa (PASQUINI, 2003).

Na transmitância (Figura 4a) as análises são realizadas em cubetas de vidro ou quartzo com caminho óptico variando entre 1 a 50 mm. O caminho óptico a ser utilizado na medida de transmitância dependerá da faixa espectral desejada. Grandes caminhos ópticos geralmente são utilizados para visualização dos sobretons e pequenos caminhos ópticos para visualização das bandas de combinação. Já na transflectância (Figura 4b), o caminho óptico é duplo e o feixe da radiação passa na amostra duas vezes, ou seja, a radiação interage com a amostra e em seguida é refletida por um espelho voltando ao detector por meio de fibra óptica.

A reflectância difusa (Figura 4c) é o modo de análise utilizada em amostras no estado sólido. Nessa forma de análise a radiação penetra na camada superficial do sólido espalhando radiação em todas as direções. A medida de reflectância é calculada pela razão entre a intensidade da radiação refletida pela amostra e a intensidade da radiação refletida e atenuada pela amostra, ou seja, o sinal analítico

tem influência da radiação espalhada e absorvida pelos grânulos do sólido(OLIVEIRA, 2013; PASQUINI, 2003).

2.3.2 Espectroscopia no infravermelho médio

A espectroscopia no infravermelho médio (MIR) compreende a faixa da radiação eletromagnética de 4000 a 400 cm^{-1} (2.500 a 50.000 nm). O MIR tem sido bastante empregado em metodologias analíticas, assim com o NIR, por apresentar vantagens como sua rapidez de análise, ser uma técnica não destrutiva e ter nenhum ou quase nenhum preparo de amostra(BRITTAI, H., 2009a; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

O espectro de absorção na região MIR apresenta picos bem nítidos e estreitos, relacionados essencialmente as vibrações moleculares fundamentais ($\Delta v = \pm 1$). Por essa razão, os espectros nessa região apresentam picos e perfis espectrais bem definidos, o que permite seu uso na elucidação de estruturas de compostos orgânicos, principalmente, com a região de impressão digital (1.200 - 600 cm^{-1}) (VASCONCELOS, 2011).

Os espectrofotômetros MIR apresentam óptica mais complexa e sensível à umidade quando comparados aos equipamentos NIR. As formas de análise mais comuns realizadas na região do infravermelho médio são transmitância (Figura 4a), reflectância difusa (Figura 4b) e reflectância total atenuada (ATR) (Figura 5).

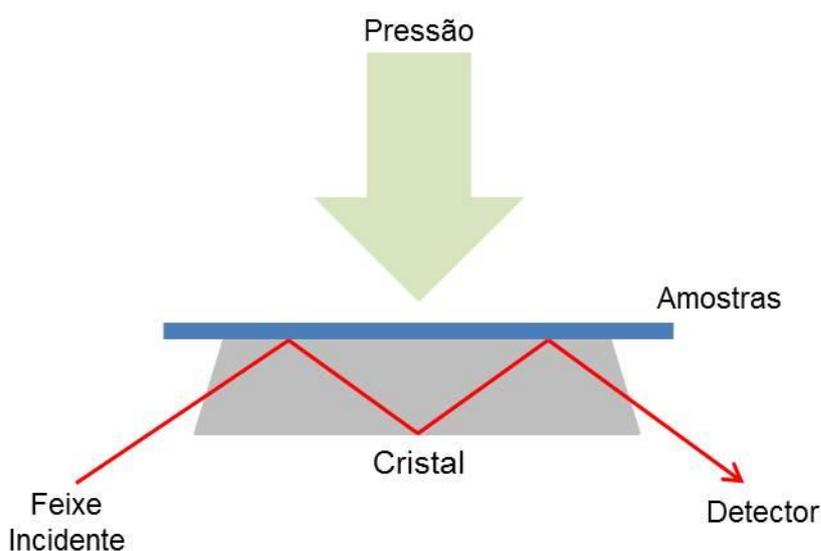


Figura 5. Dispositivos de medida para ATR.

No caso das medidas de transmitância (Figura 4a) nessa região espectral, são utilizados caminhos ópticos mais estreitos (0,01 a 1 mm) quando comparadas as utilizadas nas regiões espectrais NIR e UV-Vis, visto que as informações espectrais nessa região são decorrentes de transições fundamentais que são mais intensas (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

As medidas de ATR são bastante comuns na medida de amostras sólidas na região MIR, não requerendo tratamento da amostra. Esse tipo de análise baseia-se na incidência de radiação IV sobre um cristal de alta densidade que sofre reflexão quando em contato com a amostra pela diferença de densidade. Durante o processo de reflexão, o feixe penetra uma pequena distância no meio menos denso (amostra) antes de ser refletido. Uma pressão é exercida na amostra na garantia que ela esteja em total contato com o cristal. Os espectros ATR são semelhantes ao de absorção, apenas com diferença na intensidade relativa das bandas (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2006).

2.4 Espectroscopia Terahertz

A espectroscopia Terahertz (THz) é um tipo de espectroscopia vibracional e rotacional correspondente a região do espectro eletromagnético na faixa de frequências entre 0,1 e 10 THz ($3,3$ a 333 cm^{-1}). Esse tipo de radiação está localizada entre a região espectral do infravermelho e das microondas, como observado na Figura 6. Através do advento de lasers com pulsos ultrarápidos e de materiais semicondutores, tornou-se possível o desenvolvimento de espectrômetros THz no domínio do tempo (THz-TD) e, desde então, esta região tem sido amplamente explorada (WU; KHAN, 2012).

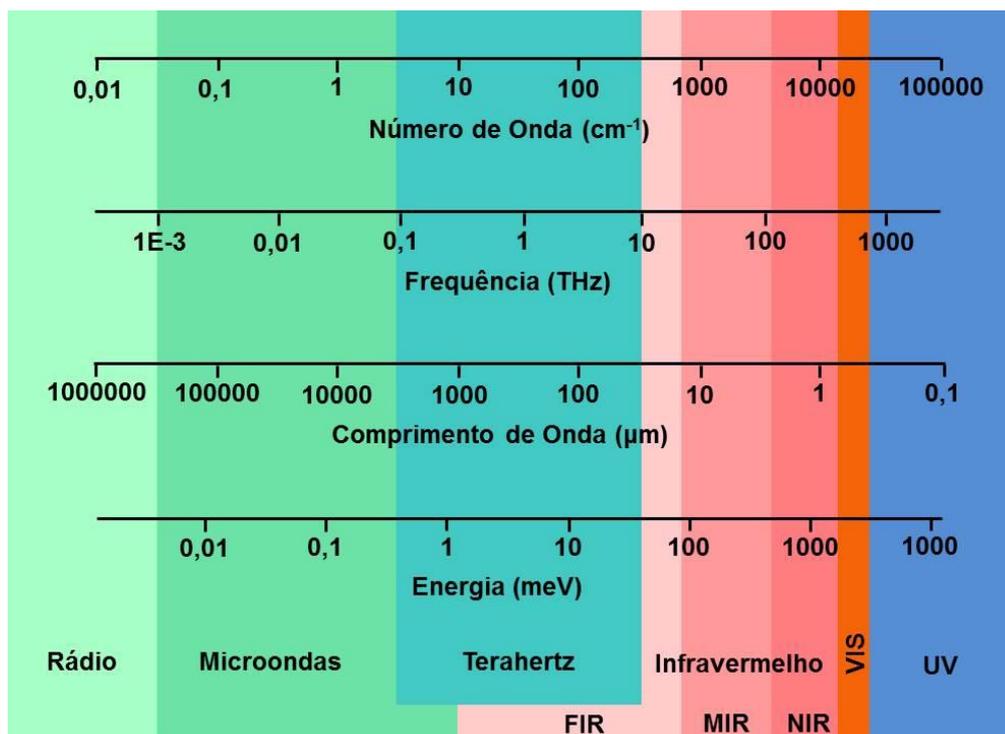


Figura 6. Espectro eletromagnético entre as ondas de rádio e radiação ultravioleta-visível.

A radiação na região THz é obtida pela excitação de um material semiconductor por meio de uma laser pulsado ultra rápido. Esses pulsos podem ser detectados por um receptor de antena ultra rápido, proporcionando simultaneamente a amplitude e fase de informação sobre uma vasta gama de frequências em uma única medida. O coeficiente de absorção em função da frequência e do índice de refração da substância a analisar é obtido a partir da atenuação, atraso e distorção do pulso THz transmitido através da amostra. Para se obter um espectro THz confiável e de alta qualidade, a amostra sólida deve ser misturada a um fino pó de polietileno (PE) ou politetrafluoretileno (Teflon) de alta densidade e comprimidos em pastilhas para aquisição dos espectros. Esses polímeros geralmente são utilizados nessas misturas por ser um bom aglutinante e transparente na região do THz. Uma técnica de amostragem alternativa para medidas THz é a utilização do acessório ATR (Figura 5), que requer pequenas quantidades de amostras e nenhum pré tratamento amostral (BRITAIN, H., 2009a; SHEN, 2011).

A espectroscopia THz é uma ferramenta poderosa para caracterização de modos vibracionais de baixa frequência, torções, fônons e interações fracas entre moléculas como, força de van der Waals, ligações de hidrogênio e/ou interação OH- π . A detecção desses modos vibracionais, rotacionais e interações são

extremamente úteis para caracterização de matérias no estado sólido. Além disso, a radiação THz possui a capacidade de penetrar numa grande variedade de materiais de modo que ela pode ser utilizada na análise de embalagens (papel, plástico, couro, madeira, etc.) e tem sido amplamente utilizada no estudo da cristalinidade de materiais de interesse farmacêutico (BRITAIN, H., 2009a; EL HADDAD *et al.*, 2013; SHEN, 2011; STRACHAN *et al.*, 2005).

A espectroscopia THz, mesmo possuindo frequência da radiação na faixa do IV, tem informações características distintas dele. Os modos vibracionais observados no IV são fundamentalmente de caráter intramolecular, enquanto na espectroscopia THz se investiga diretamente vibrações da rede e ligações de baixa energia. Portanto, os modos observados na espectroscopia THz são diretamente afetados pelas mudanças nas ligações de caráter intermolecular. Devido a isso, a região espectral THz tem sido bastante utilizado na investigação de matérias no estado sólido, principalmente no estudo de formas polimórficas e amorfas de fármacos (STRACHAN *et al.*, 2005).

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

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

2.5 Quimiometria

O crescente desenvolvimento de tecnologias analíticas computadorizadas, como os métodos espectroscópicos, permitiu que dados de natureza química fossem gerados com mais rapidez, com grande quantidade de variáveis e, conseqüente, maior quantidade de informação atrelada à amostra. Para a extração de maior quantidade de informação desses dados analíticos multivariados surgiu a

quimiometria, a qual utiliza métodos estatísticos e matemáticos para esse fim (FERREIRA, 1999).

A quimiometria está dividida em três grandes áreas, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação e calibração multivariada.

2.5.1 Planejamento e otimização de experimentos

O planejamento e otimização de experimentos consiste na utilização de ferramentas estatísticas para planejar experimentos de forma que seja extraído o máximo de informação do sistema com um número mínimo de ensaios.

Diversas técnicas são utilizadas na etapa de planejamento experimental. A escolha da técnica adequada dependerá dos objetivos que se deseja alcançar e da quantidade de experimentos que poderá ser realizado. No presente trabalho será utilizado o planejamento de misturas.

No planejamento de misturas a quantidade de cada componente no sistema não deve ser tratado individualmente e sim como uma variável da mistura, pois o somatório das proporções dos seus componentes deve ser igual a 100%. Matematicamente isso pode ser descrito pela Equação 5:

$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1 \quad (5)$$

onde q é o número de componentes da mistura e x_i são as proporções dos componentes na mistura (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; SIMÕES, 2008).

A Equação 5 retira uma grau de liberdade das proporções por não poder assumir qualquer valor (tem que ser igual a 1). Para especificar a composição da mistura, é necessário apenas fixar as proporções de $q-1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 1. Portanto, para modificar as propriedade de uma mistura mudando a sua formulação, as novas proporções têm que continuar obedecendo a Equação 5.

A seguir são descritos procedimentos e áreas da quimiometria que também serão utilizadas neste trabalho.

2.5.2 Pré-processamento de dados

Por definição, pré-processamento é uma manipulação matemática realizada nos dados antes do desenvolvimento de qualquer modelagem. No geral, eles são empregados para remover ou reduzir fontes de informações irrelevantes à modelagem. Entre as técnicas utilizadas para essa finalidade está a normalização, Variação Normal Padrão (SNV: *Standard Normal Variation*), suavização, derivada, correção de linha de base, Correção Multiplicativa de Sinal (MSC: *Multiplicative Scatter Correction*), entre outros (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas MSC, SNV, suavização e derivada.

As técnicas de pré-processamento MSC e SNV geralmente são utilizadas quando o conjunto de dados espectrais apresenta variabilidade provocada pelo espalhamento da radiação na amostra. Esse tipo de efeito físico ocorre com frequência em análises com material sólido. O MSC realiza uma correção nos espectros a partir de uma regressão realizada de cada espectro em relação ao espectro médio. Já no SNV, os espectros individualmente são centrados na média e divididos pelos seus respectivos desvios padrão. Em ambas as técnicas, a fonte de variação é eliminada e os espectros permanecem com um formato semelhante ao original (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009).

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

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

2.5.3 Calibração multivariada

A calibração multivariada é um dos métodos quimiométricos mais utilizados e bem sucedidos na química analítica. Esse método consiste na construção de modelos matemáticos que relacionam dados instrumentais com a concentração do analito ou outras propriedades da amostra (FERREIRA, 1999).

O processo de calibração multivariada ocorre em três etapas: a calibração, a validação e a previsão. A etapa de calibração é estabelecida pela construção do modelo matemático que relaciona a matriz de dados instrumentais com a matriz de dados das propriedades de interesse determinadas pelos métodos de referência. Na etapa de validação, os modelos desenvolvidos serão avaliados através de ferramentas de diagnósticos. Por último, os modelos construídos e validados são utilizados para prever valores de concentração ou outras propriedades desconhecidas nas amostras (OLIVEIRA, 2013; SIMÕES, 2008).

Na construção dos modelos de calibração multivariada, os dados espectrais são representados por uma matriz \mathbf{X} , com dimensões $(n \times m)$, onde n representa o número de amostras cujos espectros foram registrados e m representa o número de variáveis em que as absorvâncias foram medidas (comprimentos de onda). Os parâmetros de interesse são representados pela matriz \mathbf{Y} , com dimensões $(n \times p)$, onde p são os parâmetros a serem estimados pelos modelos construídos (Figura 7)(BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{nm} \end{bmatrix} \quad \mathbf{Y} = \begin{bmatrix} y_{11} & \cdots & y_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ y_{n1} & \cdots & y_{np} \end{bmatrix}$$

Figura 7. Representação da matriz de dados X e Y.

Diversos métodos matemáticos podem ser utilizados na calibração multivariada, tais como: Regressão Linear Múltipla (MLR: *Multiple Linear Regression*), Regressão por Componentes Principais (PCR: *Principal Component Regression*) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS: *Partial least-Squares*) (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998).

A MLR é considerada a técnica de calibração mais simples por utilizar as variáveis originais dos dados instrumentais na obtenção dos modelos. Essa ferramenta é uma extensão da regressão linear simples sendo utilizada quando mais de uma variável é incorporada ao modelo. Apesar da simplicidade do método, o mesmo apresenta algumas restrições que limitam sua aplicação, tais como, o número de variáveis deve ser menor que o número de amostras e os dados não podem ser colineares. Essas restrições apresentam dificuldades quando aplicados a dados espectroscópicos, onde, em sua grande maioria, a quantidade de variáveis é superior à quantidade de amostras. Essas dificuldades podem ser resolvidas utilizando técnicas de seleção de variáveis ou faixas espectrais mais informativas e que não seja colinear (NAES *et al.*, 2004).

A PCR e PLS surgem como técnicas de calibração alternativa ao MLR e utiliza variáveis modificadas na construção dos modelos matemáticos. Em ambas as regressões os dados são redimensionados e sua manipulação é baseada na Análise de Componentes Principais (PCA: *Principal Components Analysis*). No processo de modelagem, um novo sistema de eixos é construído de forma ortogonal entre si, comumente chamado de componentes principais (PC's), obtidos por meio da combinação linear das variáveis originais. Esse novo sistema de eixos possibilita a visualização e trabalho dos dados de natureza multivariada em um menor número de dimensões. As coordenadas das amostras no novo sistema de eixos das componentes principais são chamadas de *scores* e elas apontam as diferenças e similaridades entre as amostras. Já a contribuição de cada variável nas PC's é denominada de pesos (*Loadings*), que é calculada pelo cosseno do ângulo entre o eixo da variável e o eixo da PC e indica o quanto cada variável original contribui para uma dada componente principal (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998; NAES *et al.*, 2004). Na Figura 8 pode ser observado o novo sistema de eixos formados pela PCs em um gráfico de amostras hipotéticas, e a Equação 4 descreve matematicamente a decomposição da matriz original.

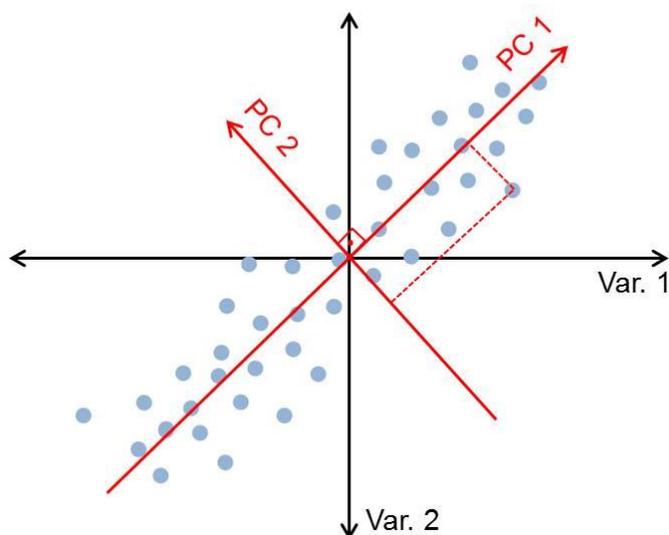


Figura 8. Novo sistema de componentes principais formados de um gráfico de amostras hipotéticas com duas variáveis.

$$\mathbf{X} = \mathbf{S}\mathbf{P}^T + \mathbf{E} \quad (6)$$

onde, \mathbf{S} é a matriz dos escores, \mathbf{P} é a matriz do pesos e \mathbf{E} é a matriz residual.

Na Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) os dados são redimensionados observando a matriz \mathbf{X} e a matriz \mathbf{Y} . Nesse caso, cada componente, agora chamada de Variáveis Latentes (VL) ou fatores, é obtido pela máxima covariância entre a matriz \mathbf{Y} e todas as funções lineares da matriz \mathbf{X} . Portanto, as componentes mais relacionadas com a variabilidade em \mathbf{Y} serão utilizadas na modelagem (NAES *et al.*, 2004)

Na etapa de construção dos modelos PLS, as matrizes de trabalho \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas em suas matrizes de pesos e escores, como mostra as Equações 6 e 7:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{Q}\mathbf{R}^T + \mathbf{F} \quad (7)$$

onde, \mathbf{Q} é a matriz dos escores, \mathbf{S} é a matriz dos pesos e \mathbf{F} é a matriz residual da matriz \mathbf{Y} (SIMÕES, 2008; PEREIRA, 2007).

O modelo final PLS relaciona linearmente os escores da matriz \mathbf{X} (matriz \mathbf{S}) com os escores da matriz \mathbf{Y} (matriz \mathbf{Q}), de acordo com as Equações 8 e 9:

$$\mathbf{Q} = \mathbf{BS} + \mathbf{G} \quad (8)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{BSR}^T + \mathbf{H} \quad (9)$$

Onde, \mathbf{B} é a matriz do coeficiente de regressão, \mathbf{G} é a matriz de resíduo dos escores e \mathbf{H} a de resíduos de concentração (SIMÕES, 2008; PEREIRA, 2007).

Para determinar o melhor número de VL a serem utilizadas nos modelos de calibração multivariada, duas técnicas de validação podem ser utilizadas: série de teste e validação cruzada (Cross Validation). Em geral, a validação cruzada total (Full Cross Validation) é o procedimento escolhido, o qual consiste na retirada de uma amostra do conjunto de calibração e o modelo é construído com as amostras remanescentes. O procedimento é repetido até que todas as amostras sejam utilizadas para predição. O número ótimo de VL será aquele que obtiver o menor erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV: *Root Means Square Error Cross Validation*), que pode ser determinado pela Equação 10:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_{cal,n} - \hat{y}_{cal,m})^2}{n_{cal}}} \quad (10)$$

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

A capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos é avaliada em função da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP: *Root Mean Square Erro Prevision*) utilizando as amostras que não participaram da modelagem (conjunto de validação externa), conforme a Equação 11:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{pred}} (y_{pred,n} - \hat{y}_{pred,m})^2}{n_{pred}}} \quad (11)$$

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

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

O conjunto de validação externa também deve apresentar as características descritas acima. No entanto, a faixa de variação do conjunto de validação externa não deve extrapolar a faixa de variação das amostras de calibração. Técnicas quimiométricas de seleção de amostras podem ser aplicadas para escolha adequada do grupo de amostras a serem utilizadas na calibração e validação externa.

2.5.4 Seleção de amostras

Um algoritmo clássico na quimiometria para seleção de amostras é o Kennard-Stone. Nesse algoritmo, as distâncias euclidianas entre pares de amostras entre os vetores das repostas instrumentais (x) é calculado e o par de amostras com maior distância é selecionado. Para as amostras remanescentes, a distância mínima com respeito às amostras já selecionadas é calculada. Em seguida, a amostra com a maior distância mínima é retida, e o procedimento é repetido até que um determinado número de amostras seja selecionado. Tal distância é descrita como $d_x(p,q)$ entre \mathbf{X} -vetores de cada par (p,q) de amostras, como descrita na Equação 12:

$$d_x(p, q) = \sqrt{\sum_{j=1}^J [x_p(j) - x_q(j)]^2}; \quad p, q \in [1, N] \quad (12)$$

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

Como extensão do KS, o algoritmo de Partição de Amostras Baseados na Distância \mathbf{X} - y (SPXY: Sample set Partitioning Based on Joint \mathbf{X} - y Distances) leva em consideração a variabilidade das dimensões \mathbf{X} e y . Nesse caso, cada distância $d_y(p,q)$ pode ser calculada para cada par (p,q) de amostras, conforme descrito na Equação 13 (GALVÃO *et al.*, 2005).

$$d_y(p, q) = \sqrt{(y_p - y_q)^2} = |y_p - y_q|; \quad p, q \in [1, N] \quad (13)$$

Para assegurar a igualdade de importância para a distribuição das amostras no espaço de \mathbf{X} e y , as distâncias $d_x(p,q)$ e $d_y(p,q)$ são divididas pelos seus valores máximos no conjunto de dados, obtendo-se assim uma distância $\mathbf{X}y$ normalizada, conforme descrito equação 14 (GALVÃO *et al.*, 2005).

$$d_{x,y}(p, q) = \frac{d_x(p,q)}{\max_{p,q \in [1,N]} d_x(p,q)} + \frac{d_y(p,q)}{\max_{p,q \in [1,N]} d_y(p,q)}; \quad p, q \in [1, N] \quad (14)$$

2.5.5 Seleção de variáveis

Métodos de seleção de variáveis são geralmente utilizados para escolher variáveis mais informativas com relação ao parâmetro a ser estimado e excluir variáveis não relevantes dos modelos de calibração multivariada. Através das técnicas utilizadas, modelos mais simples e mais robustos para análise de rotina podem ser construídos e os problemas de dimensionalidades apresentadas por alguns métodos de calibração podem ser solucionados. Além disso, a utilização de uma quantidade menor de variáveis possibilita a construção de modelos com quantidade ainda menor de VL (MEHMOOD *et al.*, 2012; XIAOBO *et al.*, 2010).

Uma série de algoritmos vem sendo utilizados para esta finalidade, dentre os quais se destacam o algoritmo genético (GA: *Genetic Algorithm*), o *stepwise* (SW), o algoritmo de projeções sucessivas (APS: *Successive Projections Algorithm*), a regressão por mínimos quadrados parciais por intervalos (iPLS: *Internal Partial Least Squares Regression*) e o algoritmo Jack-Knife (JK). Sendo esse último o algoritmo utilizado para selecionar variáveis em modelos de regressão deste trabalho.

No JK, a variância dos coeficientes da regressão é calculada (Equação 15) e a seleção de variáveis é realizada por meio de teste de significância. Um teste-t avalia a significância dos valores estimados para cada coeficiente de regressão do modelo desenvolvido, obtendo um nível de significância correspondente a cada variável. Por fim, as variáveis relacionadas aos coeficientes de regressão significativos serão aqueles selecionados (WESTAD; MARTENS, 2000).

$$s^2b = (\sum_{m=1}^M (b - b_m)^2) \left(\frac{N-1}{N} \right) \quad (15)$$

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

2.6 Métodos baseados na espectroscopia vibracional para análise das formas polimórficas do Mebendazol

A espectroscopia vibracional, principalmente a espectroscopia no infravermelho, tem sido reportada na literatura em diversos trabalhos para identificação e quantificação das formas polimórficas do MBZ.

Ayala, Siesler e Cuffini (2008) realizaram um trabalho para avaliar a capacidade da espectroscopia vibracional (MIR, NIR e Raman) na identificação das formas polimórficas A e C do MBZ na matéria prima e em comprimidos comercializados no Brasil e Alemanha. Nos comprimidos comercializados no Brasil foram encontradas formulações com as formas A e C puras, bem como misturadas das mesmas. Já nos comprimidos comercializados na Alemanha, apenas a forma polimórfica C foi encontrada. Os resultados obtidos demonstraram a sensibilidade das técnicas vibracionais na identificação de formas cristalinas do MBZ (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008).

Em 2005, Froehlich e Gasparotto realizaram um estudo para caracterizar as formas polimórficas do MBZ em comprimidos existentes no mercado brasileiro e na matéria prima. Para isso, utilizaram-se da espectroscopia MIR e o perfil de

dissolução descrito na farmacopeia americana modificada. Um total de 15 amostras foram utilizadas neste trabalho, sendo 5 amostras de matéria prima, 5 amostras de medicamentos genéricos e 5 amostras de medicamentos de referência. Os resultados obtidos demonstraram que as três formas polimórficas do MBZ estão presentes nos medicamentos e duas delas em matérias primas (FROEHLICH; GASPAROTTO, 2005).

Agatonovic-Kustrin *et al.* (2008) desenvolveram uma metodologia direta e não destrutiva de análise utilizando reflectância difusa por ultravioleta (DRA-UV: *Diffuse Reflectance Analysis – Ultraviolet*) e ATR-MIR para identificar e quantificar a pureza das formas polimórficas do MBZ em misturas binárias (Forma A e Forma C) e estabelecer a estabilidade da forma C em uma suspensão. Ambas as regiões se mostraram eficientes para distinguir as formas polimórficas do MBZ. Modelos de calibração multivariada utilizando redes neurais (ANN: *Artificial Neural Network*) foram desenvolvidos utilizando os espectros no infravermelho para quantificar a misturas binárias do MBZ. Os modelos desenvolvidos confirmaram que as absorções características na região IR são diretamente proporcionais aos valores medidos das formas cristalinas do MBZ presentes nas amostras ($R^2 > 0,94$). A difração de raios-X (DRX: *Diffraction X-ray*) foi utilizada para confirmar os resultados obtidos na calibração. A metodologia também apresentou resultados satisfatórios para confirmar a estabilidade polimórfica do MBZ (Forma C) em suspensões evidenciando a eficiência da espectroscopia IR para este fim (AGATONOVIC-KUSTRIN *et al.*, 2008).

Em 2002, Aboul-Enein, Bunaciu e Fleschin, desenvolveram uma medida rápida e direta para quantificação das formas polimórficas do MBZ utilizando a espectroscopia no infravermelho médio e métodos quimiométricos. Dois tipos de medidas foram realizados nas amostras contendo todas as formas polimórficas do MBZ: reflectância difusa (DRIFTS: *Diffuse Reflectance IR Fourier Spectroscopy*) em misturas amostras-KBr e transmitância com o pastilhamento da amostra com KBr. Ambos os espectros foram adquiridos na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , como média de 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} e 8 cm^{-1} . As diferenças espectrais para todas as formas polimórficas, embora evidenciada em todas as formas de medidas, foram mais pronunciadas nas medidas por DRIFTS. Modelos de regressão PCR e PLS com multicomponente (PLS2) foram desenvolvidos utilizando os espectros DRIFTS medidos com ambas as resoluções espectrais, os quais apresentaram correlação

(R) de 0,955 e 0,941 para 4 cm^{-1} e 8 cm^{-1} , respectivamente (ABOUL-ENEIN; BUNACIU; FLESCIN, 2002).

Kachrimanis, Rontogianni e Malamataris (2010), desenvolveram uma metodologia utilizando DRIFTS e ANN para análise quantitativa simultânea em misturas das formas polimórficas A, B e C do MBZ. Inicialmente foram avaliadas as diferenças espectrais entre as formas polimórficas do MBZ e comparadas com o calculado computacionalmente. Modelos ANN foram desenvolvidos e comparados com modelos PLS. A modelagem por ANN se mostrou satisfatória para análise simultânea das formas polimórficas do fármaco utilizando espectros de segunda derivada (RMSEP de 1,75% para forma A, 1,85% para B e 1,65% para C), enquanto o modelo PLS apresentou previsões aceitáveis na faixa de $700\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ após correção de sinal ortogonal (DOSC: Direct Orthogonal Signal Correction) com RMSEP de 2,69%, 2,68% e 3,40% para forma A, B e C, respectivamente. O modelo ANN foi aplicado em amostras comerciais, de suspensões e matéria prima e apresentou resultados satisfatórios e confiáveis para metodologia desenvolvida (KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010).

Pelo exposto, verifica-se que a maioria dos trabalhos emprega a espectroscopia vibracional para caracterização das formas polimórficas do MBZ. Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos para análise quantitativa, e os existentes utilizam a espectroscopia MIR. Além disso, a maioria dos trabalhos não abrangem as três formas polimórficas do MBZ em suas análises quantitativas, as quais podem estar presentes tanto na matéria prima quanto nos fármacos comercializados.

Até o momento, nenhum trabalho foi encontrado na literatura utilizando as espectroscopia NIR e THz para análise quantitativas das formas polimórficas do MBZ, mesmo considerando o grande potencial dessa tecnologia para essa finalidade. Portanto, surge a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias analíticas para identificação e quantificação das três formas polimórficas do MBZ utilizando espectroscopia vibracional e técnicas de calibração multivariada.

OBJETIVOS
CAPÍTULO III

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver métodos analíticos baseados nas espectroscopias vibracionais (NIR, MIR e THz) e calibração multivariada para quantificação das três formas polimórficas do MBZ no Insumo Farmacêutico Ativo (IFA).

3.1.1 Objetivos específicos

- Obter por recristalização a forma polimórfica B do MBZ;
- Preparar misturas ternárias das formas polimórficas do MBZ utilizando um planejamento de misturas;
- Caracterizar os polimorfos por PXRD, MIR, NIR e THz;
- Desenvolver modelos de calibração multivariada baseados na Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para prever a concentração das três formas polimórficas do MBZ através dos espectros MIR, NIR e THz.

MATERIAIS E MÉTODOS
CAPÍTULO IV

4.1 Obtenção e caracterização das formas polimórficas A, B e C do MBZ

As formas polimórficas A e C do MBZ foram gentilmente cedidas pela Formil Química e pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE). Já a forma B, foi obtida por recristalização conforme descrito por Kachrimanis, Rontogiani e Malamataris (2010). Os autores sugerem a obtenção da forma polimórfica B do MBZ pela dissolução de uma das outras formas polimórficas em clorofórmio a 70°C e obtenção dos cristais pela evaporação do solvente a baixa pressão.

Testes foram realizados com o fármaco que estivesse em maior quantidade (forma A) para determinação das melhores condições de evaporação do solvente na recristalização para forma B. Para os testes, foram solubilizados 100 mg do fármaco em 200 mL de clorofórmio a 70°C. As soluções foram rotaevaporadas (Rotaevaporador R-114, Büchi) até completa secagem nas seguintes condições de temperatura do banho de aquecimento e pressão: 70°C/690 mbar (Teste 1), 70°C/400 mbar (Teste 2), 50°C/320 mbar (Teste 3), 25°C/200 mbar (Teste 4). Após caracterização dos testes e estabelecimento da melhor condição, um novo teste foi realizado utilizando a forma C como material de partida (Teste 5).

Para caracterização da forma polimórfica B obtida e para certificação das formas A e C fornecidas, espectros MIR e DRX de pó foram adquiridos.

Os espectros MIR foram registrados em um espectrofotômetro FTIR Spectrum 400 (Perkin-Elmer), utilizando o acessório de reflectância total atenuada universal (UATR: *Universal Attenuated Total Reflectance*), na faixa espectral de 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e média de 32 varreduras.

As análises de DRX de pó foram realizadas em um difratômetro modelo D8 Advance (Bruker) com radiação $K\alpha$ do cobre (1,54 Å). Foram utilizados 2θ entre 5° e 35°, incrementos de 0,02° e aquisição de 1s por passo. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente e as amostras foram finamente pulverizadas e colocadas em porta amostra, adequado às medidas.

Os testes foram realizados com o fármaco fornecido pelo LAFEPE e as demais etapas do trabalho foram realizadas com o material fornecido pela Formil Química. Para obtenção de material suficiente da forma polimórfica B do MBZ para o presente trabalho, foram realizadas 51 bateladas de recristalização, com recuperação média, por batelada, de 60%. Após caracterização das bateladas

realizadas por espectroscopia MIR, todo o material foi agrupado em único frasco e caracterizado por DRX.

4.2 Planejamento de misturas ternárias das formas polimórficas do MBZ

Um planejamento ternário de misturas foi realizado variando as concentrações das formas polimórficas A e C do MBZ de 0 a 100% (0 a 1 m/m) e a forma B de 0 a 30% (0 a 0,3 m/m). Este último teve menor variação em sua concentração pela pouca disponibilidade de material e por ser a forma polimórfica do MBZ menos encontrada comercialmente. O planejamento de misturas foi construído com um total de 21 misturas que pode ser observado pela Tabela 4.

Tabela 4. Proporção das três formas polimórficas do MBZ atribuído a cada mistura.

	Forma A (m/m)	Forma B (m/m)	Forma C (m/m)
Mistura 1	0,850	0,150	0,000
Mistura 2	0,000	0,300	0,700
Mistura 3	0,700	0,300	0,000
Mistura 4	0,425	0,150	0,425
Mistura 5	1,000	0,000	0,000
Mistura 6	0,500	0,000	0,500
Mistura 7	0,000	0,000	1,000
Mistura 8	0,000	0,150	0,850
Mistura 9	0,350	0,300	0,350
Mistura 10	0,750	0,075	0,175
Mistura 11	0,600	0,030	0,370
Mistura 12	0,190	0,010	0,800
Mistura 13	0,300	0,050	0,650
Mistura 14	0,010	0,090	0,900
Mistura 15	0,800	0,120	0,080
Mistura 16	0,250	0,180	0,570
Mistura 17	0,100	0,200	0,700
Mistura 18	0,400	0,250	0,350
Mistura 19	0,600	0,150	0,250

Mistura20	0,175	0,125	0,700
Mistura 21	0,200	0,250	0,550

Na etapa de preparação das misturas, todo material foi previamente peneirado numa abertura de 355 μm (Mesh 45) e devidamente pesado numa balança analítica BL 210S (Sartorius) com incerteza de $\pm 0,0001$ g.

4.3 Aquisição dos Espectros MIR, NIR e THz

4.3.1 Espectros MIR

Os espectros MIR foram registrados utilizando o espectrofotômetro FTIR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) empregando o acessório UATR na faixa de 4000 a 650 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , média de 32 varreduras e pressão de 100 ± 1 (unidades arbitrárias). Como o amostrador nesse tipo de análise é bastante pequeno, foram registrados espectros em 5 replicatas para cada mistura. A média dessas cinco medidas foi utilizada para garantir a homogeneidade da amostra.

A Figura 9 apresenta o equipamento e acessório utilizado.

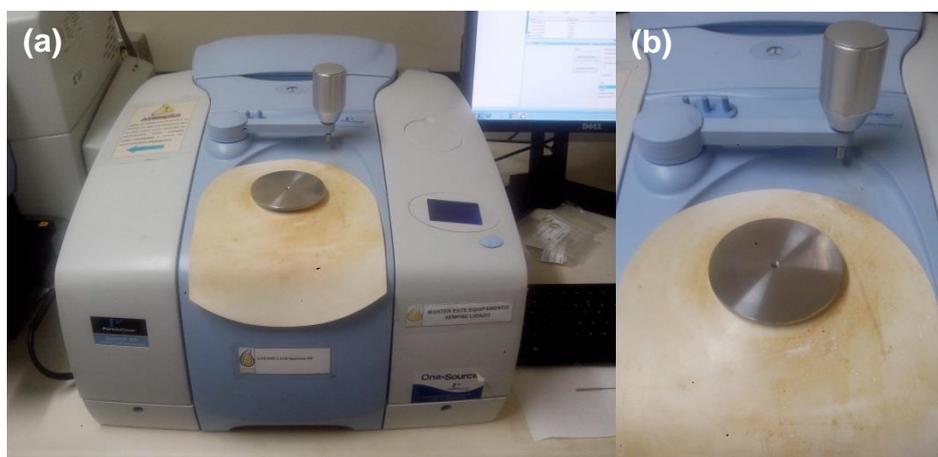


Figura 9. Espectrofotômetro FTIR Spectrum 400 (a) e acessório UATR (b).

4.3.2 Espectros NIR

Os espectros NIR foram adquiridos utilizando um espectrofotômetro FTNIR Frontier (Perkin-Elmer) empregando o acessório de reflectância difusa (NIRA: *Near Infrared Reflectance Accessory*) na faixa de 12000 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1}

e média de 32 varreduras. As amostras foram colocadas em um tubo de vidro, o qual foi posicionado em cima do cristal de safira do acessório de reflectância utilizado.

A Figura 10 apresenta o equipamento utilizado e acessório de reflectância difusa com amostra.

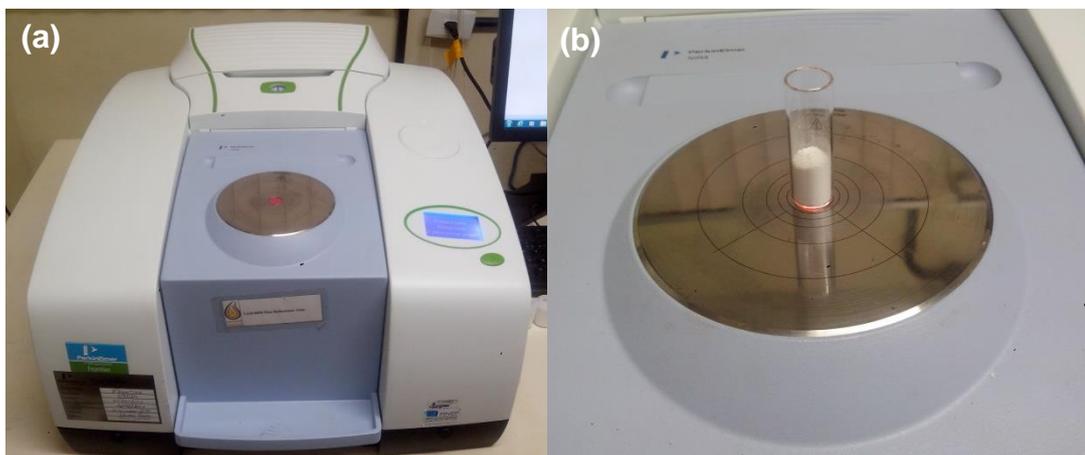


Figura 10. Espectrofotômetro FTNIR Frontier (a) e acessório NIRA (b).

4.3.3. Espectros THz

Os espectros THz foram adquiridos utilizando uma espectrômetro THz (HASSP-THZ, Lazer Quantum) com a tecnologia de amostragem óptica assíncrona de alta velocidade (ASOPS – *High Speed Asynchronous Optical Sampling*), gerando pulsos com frequências de 0,3 a 6,0 THz. Purga com nitrogênio foi realizada antes das medidas até que a linha de absorção do vapor d'água fosse indistinguível do ruído. Uma transformada de Fourier foi realizada nos dados para convertê-los do domínio do tempo para o domínio das frequências.

Os espectros das misturas foram obtidos a partir de pastilhas de teflon (diâmetro = 12 mm e espessura média = 1 mm) contendo 15% m/m da mistura das formas polimórficas do MBZ. Foram produzidas duas pastilhas para cada mistura a fim de garantir a homogeneidade nas mesmas. Para cada pastilha, foram realizadas médias de 500 varreduras. Todas as medidas foram realizadas no foco (área = 0,5 mm) e em duplicata para garantia da homogeneidade do material na pastilha.

A Figura 11 apresenta o espectrômetro THz utilizado, o porta amostra e a pastilha utilizada.

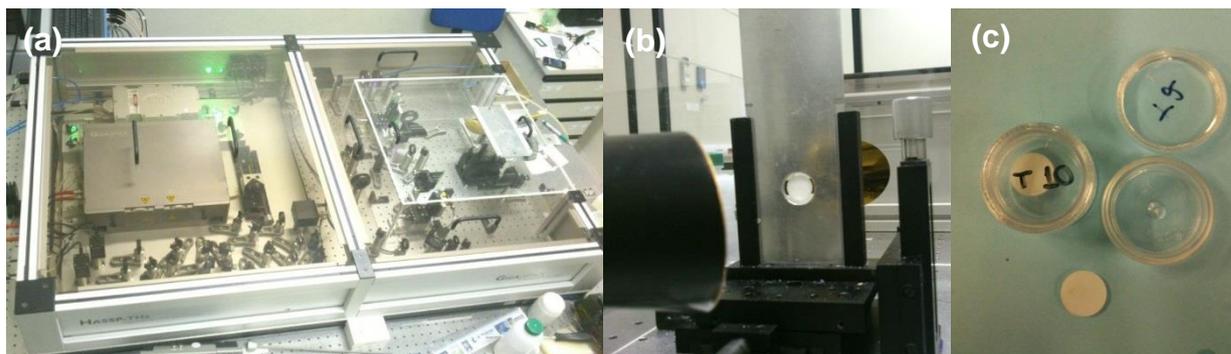


Figura 11. Espectrômetro THZ (a), porta amostra (b) e pastilhas utilizadas (c) nas medidas.

4.4 Tratamento Quimiométrico

Para a construção dos modelos de calibração multivariada o conjunto total de amostras (21) foi subdividido nos conjuntos de calibração e previsão externa, contendo 17 e 4 amostras, respectivamente. A seleção das amostras de calibração e previsão foi realizada utilizando-se o algoritmo de Partição de Amostras Baseados na Distância X - y (SPXY).

Modelos de calibração multivariada foram construídos utilizando-se a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) empregando os espectros NIR, MIR e THz pré-processados. Os pré-processamentos aplicados nos espectros foram: SNV, MSC e derivada (1ª derivada com filtro Savitzky-Golay e polinômio de segunda ordem). Para espectros NIR e MIR, foi utilizada primeira derivada com janela de 11 pontos no polinômio. Já no caso dos espectros THz, os quais são bastante ruidosos, foi necessária a utilização de uma suavização com janela de 51 pontos. Modelos PLS, utilizando-se os coeficientes de regressão mais significativos selecionados pelo algoritmo de Jack-Knife (PLS/JK), foram também construídos. Além disso, todos os dados foram centrados na média.

Para a validação dos modelos, utilizou-se o método de validação cruzada total (Full Cross Validation). A capacidade preditiva dos modelos foi avaliada por meio dos valores de RMSEP obtidos com o conjunto de previsão externo, ou seja, com amostras que não foram utilizadas na etapa de calibração. Um teste F, em um nível de 95% de confiança, foi utilizado para avaliar se há diferenças estatisticamente significativas entre os valores de RMSEP dos modelos construídos para cada forma

polimórfica nas regiões espectrais estudadas. Os valores de F_{cal} foram comparados com os valores de $F_{crit}(0,95, \nu_1, \nu_2)$.

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

Todos os cálculos quimiométricos foram realizados utilizando-se os softwares *The Unscrambler X*, versão 10.0.3 (Camo S/A) e Matlab R2010a versão 7.10.0.499.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
CAPÍTULO V

5.1 Recristalização da forma polimórfica B do MBZ

A caracterização da forma polimórfica B, obtida por recristalização, foi inicialmente realizada pela espectroscopia MIR, cujos picos, de identificação e distinção das outras formas polimórficas, foram comparados com os descritos na literatura (Tabela 5). Os perfis espectrais dos testes não apresentaram grandes diferenças do espectro do material de partida, apenas no pico referente à carbonila do grupo carbamato (Figura 12). Pode-se verificar nos espectros obtidos, que há uma diminuição na intensidade do pico referente ao estiramento C=O do grupo carbamato, nos espectros dos testes na posição da forma A, e uma tendência de formação do pico na posição referente à forma B.

Tabela 5. Números de onda característicos (cm^{-1}) das formas polimórficas do MBZ(COSTA *et al.*, 1991).

Estiramentos	MBZ Forma A	MBZ Forma B	MBZ Forma C
N-H	3365 cm^{-1}	3350 cm^{-1}	3405 cm^{-1}
C=O do grupo carbamato	1730 cm^{-1}	1700 cm^{-1}	1720 cm^{-1}
C=O do grupo aromático	1640 cm^{-1}	1650 cm^{-1}	1645 cm^{-1}

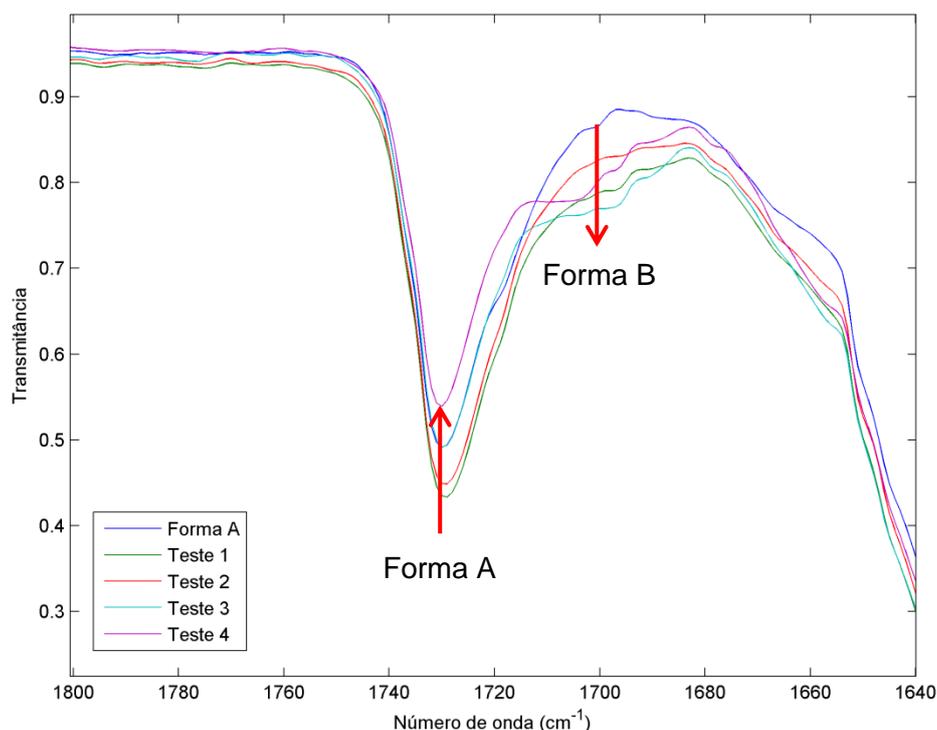


Figura 12. Banda espectral MIR do estiramento C=O do carbamato da forma polimórfica A e Testes 1-4 do MBZ.

Observando a Figura 12, percebe-se que com a diminuição da pressão e temperatura (Testes 3 e 4) no sistema de evaporação do solvente, há uma diminuição do pico da carbonila do grupo carbamato da forma A e aparecimento, muito sutil, do pico referente à esse grupo na forma B. Com base nesses resultados, foram escolhidas as condições utilizadas no Teste 3, visto que esse é mais rápido no processo de recristalização.

A Figura 13 apresenta os difratogramas da forma A e do Teste 3. Os ângulos e intensidades relativas dos picos do PXRD das formas polimórficas do MBZ descritos na literatura são apresentados na Tabela 6.

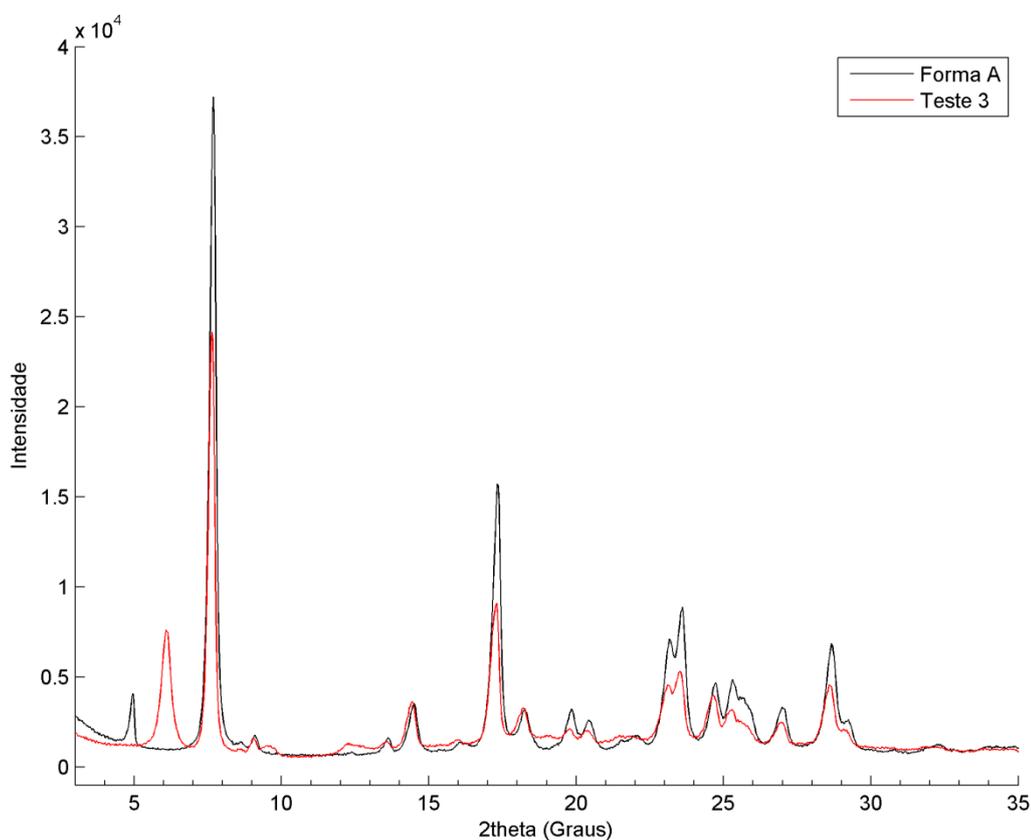


Figura 13. Difratograma da Forma A e Teste 3 do MBZ.

Na Figura 13, pode-se perceber que não houve uma cristalização completa da forma A na B, como já observado na Figura 12. Observando o difratograma do Teste 3, percebe-se claramente uma mistura do polimorfo B com seu material de partida. Além disso, é evidenciado no difratograma que a forma A fornecida pelo LAFEPE apresenta contaminação com a forma polimórfica C, por apresentar um pico

referente ao mesmo em 4,9°. O mesmo pico não aparece na mistura do Teste 3, provavelmente, pela completa solubilização do contaminante no sistema e total recristalização em outra forma polimórfica.

Tabela 6. Ângulos e intensidades relativas aos picos PXRD das formas polimórficas do MBZ(KACHRIMANIS; RONGOIANNI; MALAMATARIS, 2010).

MBZ Forma A		MBZ Forma B		MBZ Forma C	
2 θ	Intensidade (%)	2 θ	Intensidade (%)	2 θ	Intensidade (%)
7,68	100,00	4,23	5,10	4,91	100,00
9,08	5,20	6,18	100,00	12,35	2,20
13,61	5,40	7,65	4,40	14,85	2,80
14,48	16,70	9,47	14,10	16,30	8,90
17,36	77,50	9,83	6,50	18,04	1,70
18,27	12,70	12,53	18,60	18,23	1,70
19,87	10,80	13,44	3,60	19,31	2,10
20,43	9,60	17,57	4,60	19,83	28,40
22,07	6,10	19,06	18,00	21,58	2,90
23,18	31,40	19,74	4,80	24,89	7,70
23,61	43,50	21,06	6,70	25,32	1,70
24,75	22,30	21,64	12,80	26,54	1,70
25,32	19,90	22,93	8,10	26,87	7,00
25,69	14,90	24,47	22,30	29,30	3,80
27,04	14,80	25,39	12,40	30,00	1,70
28,72	36,20	26,15	3,90	33,58	1,60
29,30	11,10	28,91	11,20	35,07	2,60
		29,20	10,90		
		30,42	3,00		

A recristalização não ocorre de forma completa devido à baixa solubilidade do fármaco em clorofórmio (<1 mg/mL). Dentre as formas polimórficas do MBZ, a forma A apresenta menor solubilidade entre as três formas polimórficas em diversos solventes, por isso, na etapa de solubilização do fármaco, a solução apresentava aspecto bastante turva e conseqüentemente, baixa cristalização de uma forma na outra (HIMMELREICH; RAWSON; WATSON, 1977; KUMAR *et al.*, 2008). Devido a isso, o teste que apresentou melhores condições de recristalização na forma desejada, Teste 3, foi repetido utilizando a forma C como material de partida (Teste 5).

As Figuras 14 e 15 apresentam as bandas mais distintivas nos espectros MIR e nos difratogramas da forma polimórfica C e Teste 5. Como pode ser verificado, há

um claro deslocamento dos picos, tanto nos espectros quanto nos difratogramas da forma polimórfica C e do Teste 5. Comparando-se os picos dos espectros MIR e difratogramas com aqueles descritos na literatura, evidencia-se que os mesmos correspondem às suas formas polimórficas puras e que houve uma completa cristalização de uma forma na outra. Tal resultado demonstra a maior solubilidade da forma C em clorofórmio, cuja solução não apresentou aspecto turvo na etapa de solubilização.

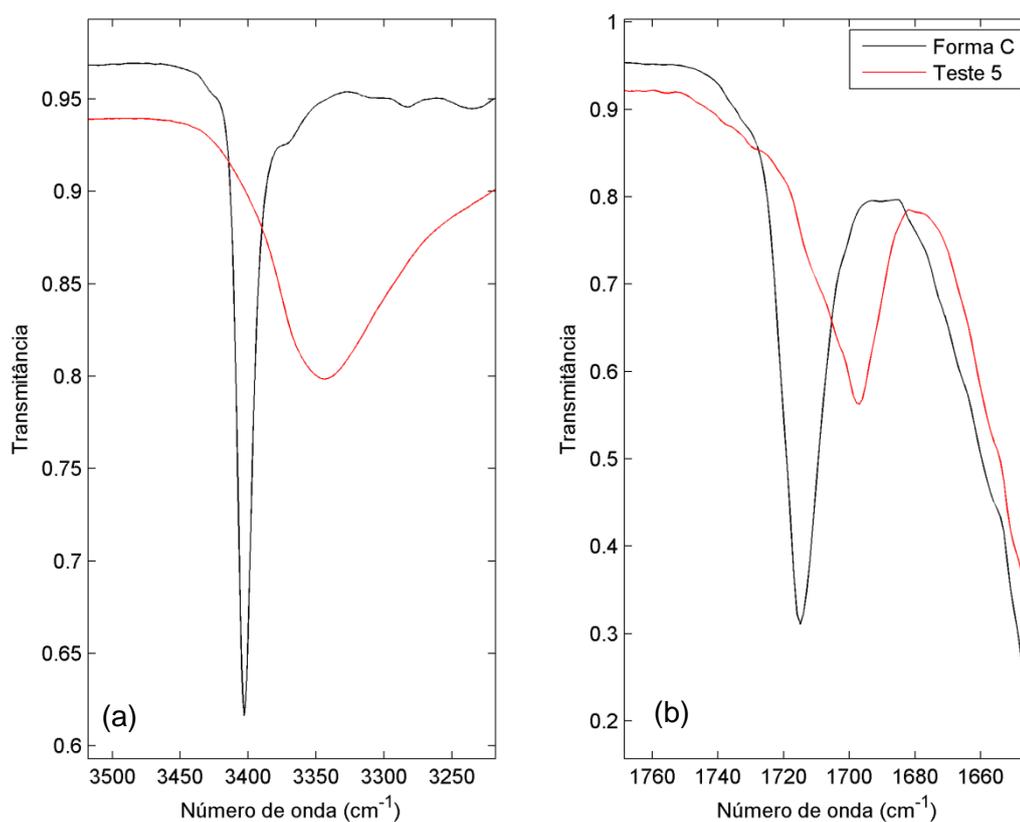


Figura 14. Bandas espectrais MIR do estiramento (a) N-H e (b) C=O do carbamato da forma polimórfica C e Teste 5 do MBZ.

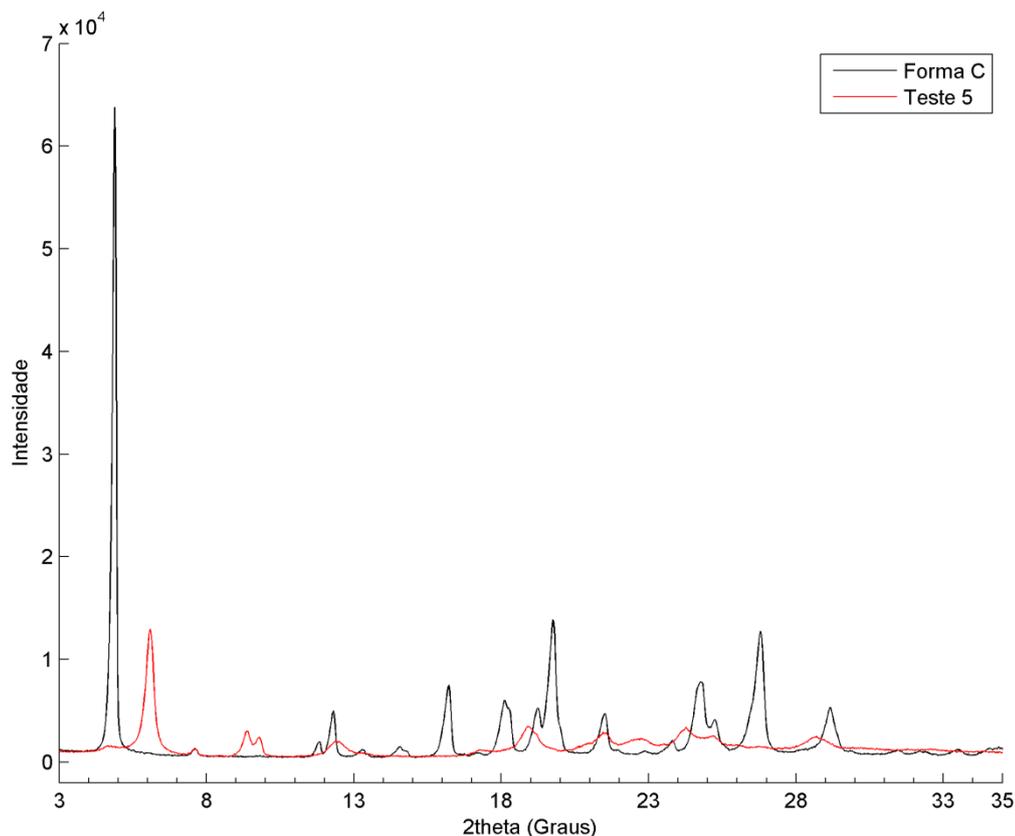


Figura 15. Difratogramas da Forma C e Teste 5 do MBZ.

De acordo com esses resultados, a recristalização da forma polimórfica B foi realizada a partir da forma C (Formil Química) utilizando-se as condições experimentais do Teste 5: pressão de 320 mbar e temperatura de banho de aquecimento de 50 °C.

5.2 Caracterização das formas polimórficas do MBZ

A Figura 16 apresenta os difratogramas das formas polimórficas A, B e C do MBZ. Pode-se perceber que as matérias primas das formas polimórficas apresentam intensidades relativas e posições de picos correspondentes aos polimorfos em suas formas puras. Os difratogramas foram individualmente comparados aos descritos na literatura (Tabela 6) e todos eles apresentam concordância na maioria dos picos. Além disso, pode-se perceber que as intensidades no difratograma da forma B são menores que os demais, provavelmente devido ao pequeno tamanho do seu cristalito e/ou micro deformação na estrutura do cristal (KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010).

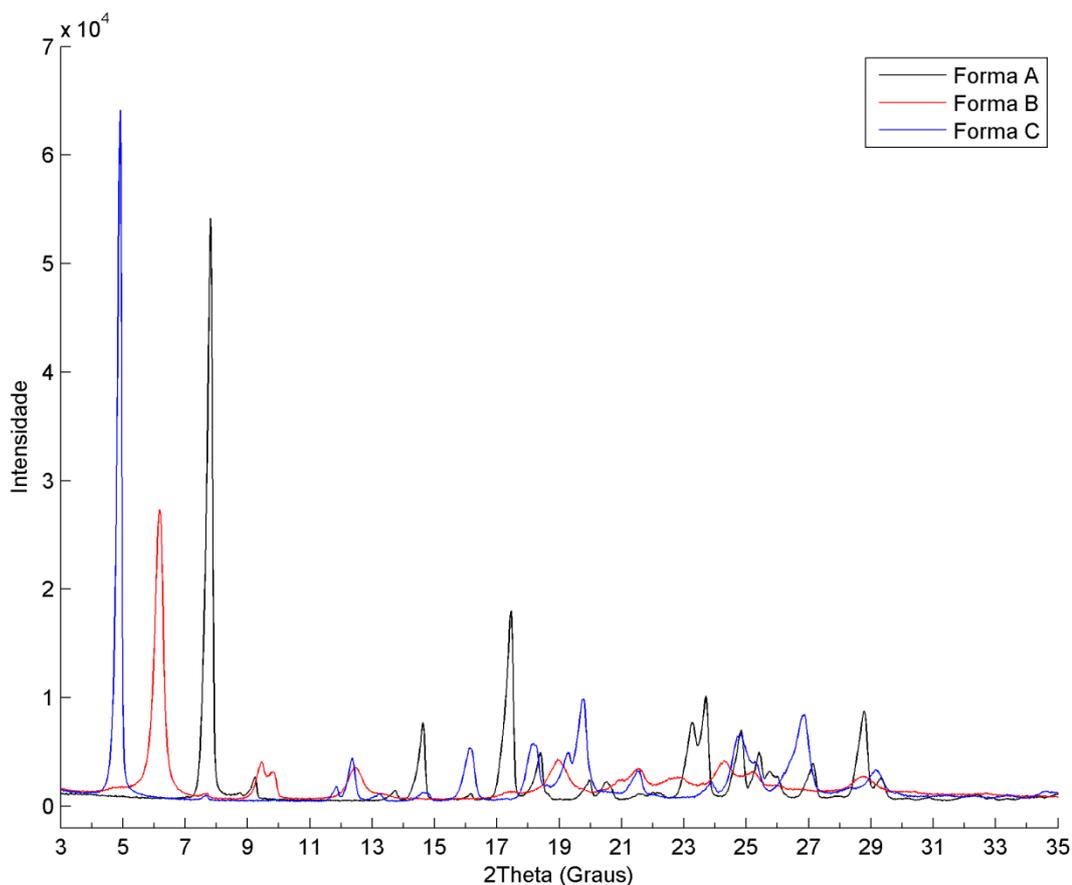


Figura 16. Difratograma das formas polimórficas do MBZ.

Na Figura 17 estão ilustrados os espectros MIR das formas polimórficas A-C do MBZ. Pode-se observar que os espectros MIR dos polimorfos apresentam bandas e picos nos comprimentos de onda correspondentes às formas puras, como descritas na Tabela 5. Analisando o espectro referente à forma C, percebe-se que o mesmo tem uma estrutura mais pronunciada e bandas mais finas quando comparado aos espectros das formas A e B. Isso pode ser um indicativo de maior liberdade vibracional e possível existência de mais de uma simples molécula de MBZ em uma unidade assimétrica. Os espectros apresentam significativas diferenças entre as formas polimórficas do MBZ na região da impressão digital ($1500-400\text{ cm}^{-1}$). Porém, as maiores diferenças espectrais são encontradas na faixa dos estriamentos N-H ($3340-3400\text{ cm}^{-1}$) e C=O ($1700-1730\text{ cm}^{-1}$), observadas na Figura 17b e c. Essas diferenças espectrais sugerem que os grupos funcionais da molécula formam ligações de hidrogênio e são responsáveis pelas diferenças de

empacotamento na estrutura cristalina das formas polimórficas do fármaco (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008; KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010).

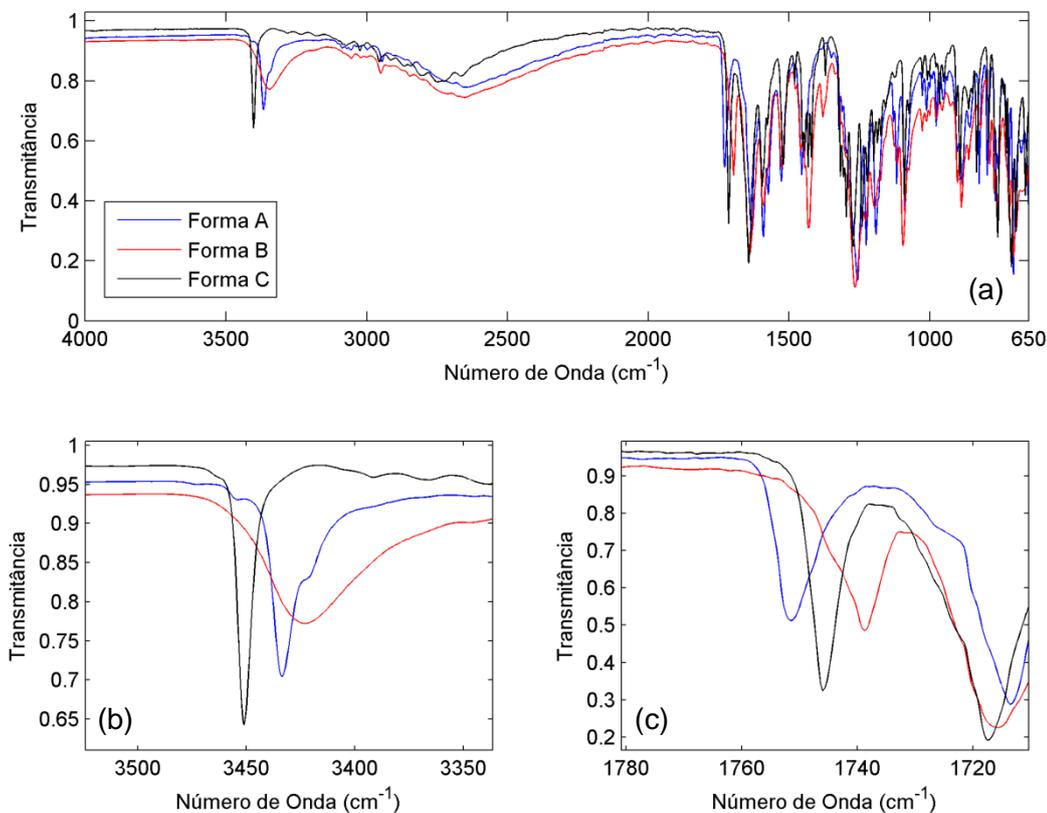


Figura 17.(a)Espectros MIR das formas polimórficas do MBZ.(b) Bandas do estiramento N-H. (c) Bandas do estiramento C=O do carbamato.

Observando o espectro na região do estiramento N-H (Figura 17b) referente à forma A, percebe-se a presença de pequenas bandas na posição referentes às formas B e C. Isso pode ser um indicativo de contaminação na amostra. No entanto, essa informação não é observada na região do estiramento C=O (Figura 17c) e nem no difratograma (Figura 16) das formas polimórficas do MBZ. Essa observação não compromete a qualidade dos modelos a serem construídos. Como os picos são pequenos e observados apenas em uma região restrita do espectro, a concentração do contaminante na amostra deve ser bem pequena, podendo-se considerá-la como sendo igual a zero e a forma polimórfica 100% pura.

A Figura 18 exhibe os espectros NIR das três formas polimórficas do MBZ.As bandas de absorção presentes nos espectros NIR podem ser principalmente associadas às combinações e sobretons das vibrações dos estiramentos C-H e N-H.

As bandas observadas em números de onda abaixo de 5000 cm^{-1} são atribuídas às combinações das vibrações do estiramento CH e NH com suas respectivas deformações. Embora não seja possível fazer atribuições precisas nessa faixa (impressão digital), o caráter cristalino do composto dá origem a bandas estreitas, que são potencialmente úteis para discriminar as diferentes formas cristalinas. Os sobretoms do estiramento CH podem ser observados na região de 6000 cm^{-1} (primeiro sobretom) e 8700 cm^{-1} (segundo sobretom). Já o primeiro sobretom do estiramento NH é observado por intensas bandas em 6580 cm^{-1} (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008).

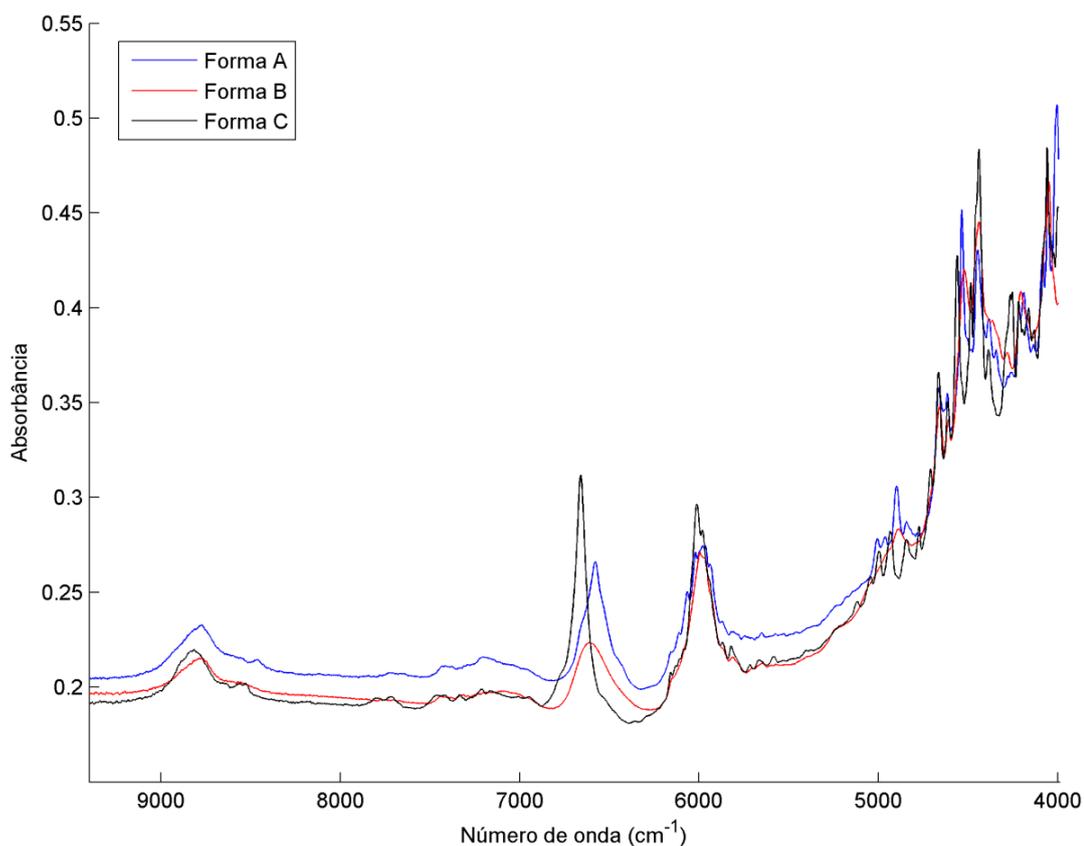


Figura 18. Espectros NIR das formas polimórficas do MBZ.

Comparando os espectros NIR das três formas polimórficas do MBZ (Figura 18), percebe-se que as diferenças entre eles estão mais associadas com a intensidade das bandas do que com seus deslocamentos. Entretanto, observa-se que o primeiro sobretom do estiramento NH apresenta um deslocamento em sua banda, evidenciando a sensibilidade desse modo vibracional na diferenciação da

crystalinidade desse fármaco por NIR. Isso acontece devido as fortes ligações de hidrogênio formadas pelo NH nos cristais de carbamatos, que dentre os três, a forma A apresenta maior força e, conseqüentemente, maior estabilidade. Nos espectros NIR, as diferenças entre as forças das ligações de hidrogênio nos cristais não são observadas somente pelo deslocamento das bandas, mas também pela largura das mesmas. Os modos vibracionais tornam-se mais harmônicos e exibem bandas de absorção mais largas e menos intensas como conseqüência das ligações de hidrogênio (AYALA; SIESLER; CUFFINI, 2008).

Na Figura 19 estão apresentados os espectros THz das formas polimórficas do MBZ. Observa-se que os três polimorfos apresentam perfis espectrais diferentes, demonstrando o potencial da técnica para diferenciação dos mesmos. O THz é uma tecnologia emergente e ainda não é possível fazer atribuições espectrais por desconhecer de forma precisa os mecanismo de formação de suas bandas. Sabe-se que esse tipo de radiação enxerga interações intermoleculares, como a ligação de hidrogênio, sendo possível extrair informações dos cristais através dos seus espectros. Analisando o espectro da forma B, percebe-se que o mesmo não apresenta picos bem definidos como observado nos espectros das formas A e C. Isso ocorre, provavelmente, pela diminuição na cristalinidade dessa forma ou por apresentar um caráter amorfo no material.

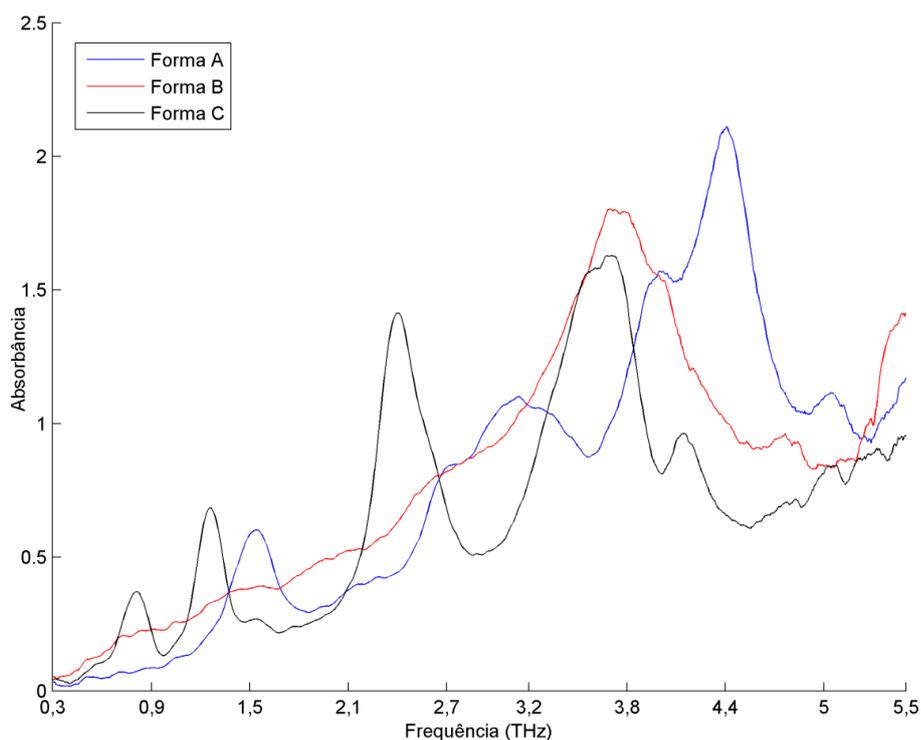


Figura 19. Espectro THz das formas polimórficas do MBZ.

5.3 Pré-processamento dos dados

A Figura 20 apresenta os espectros MIR das misturas das três formas polimórficas do MBZ preparadas de acordo com o planejamento descrito na Tabela 4.

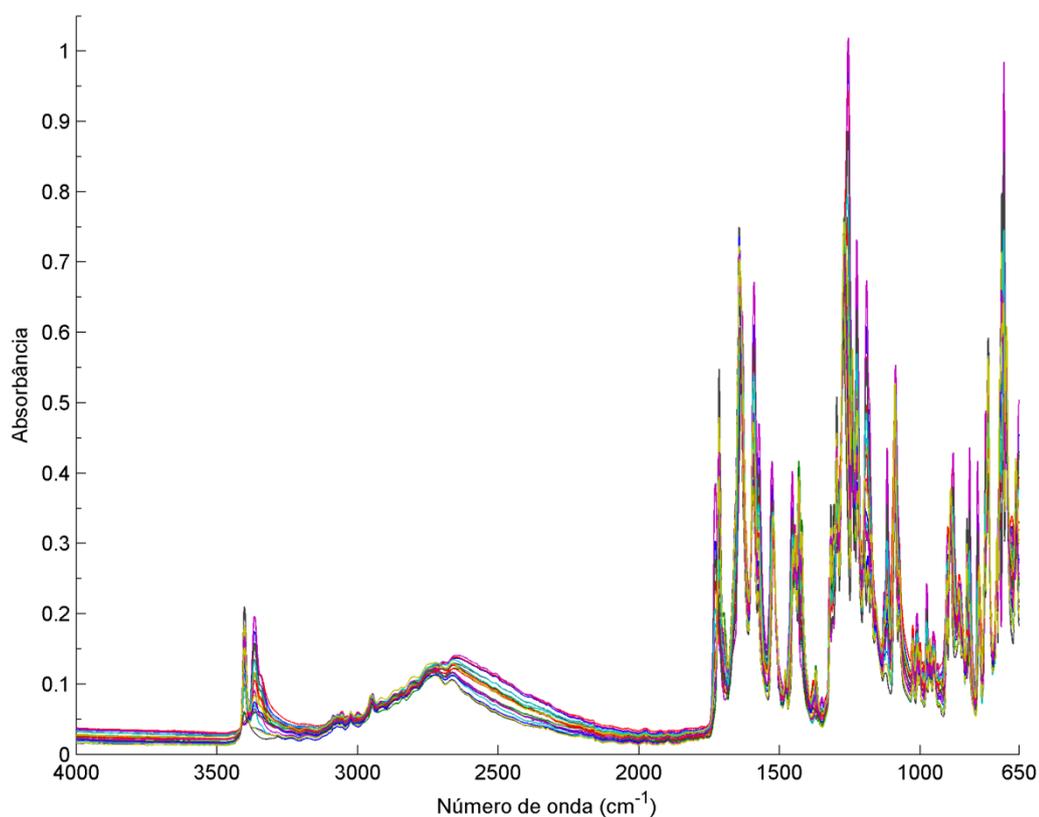


Figura 20. Espectros MIR das misturas das formas polimórficas do MBZ.

Os espectros MIR foram pré-processados com o objetivo remover variações sistemáticas nas linhas de base e enfatizar as informações mais importantes para os modelos de calibração multivariada. Para essa finalidade, as técnicas MSC, SNV e 1ª derivada com filtros Savitzky-Golay (janela de 11 pontos e polinômio de 2º grau) foram aplicadas nos espectros, como observados nas Figuras 21, 22 e 23.

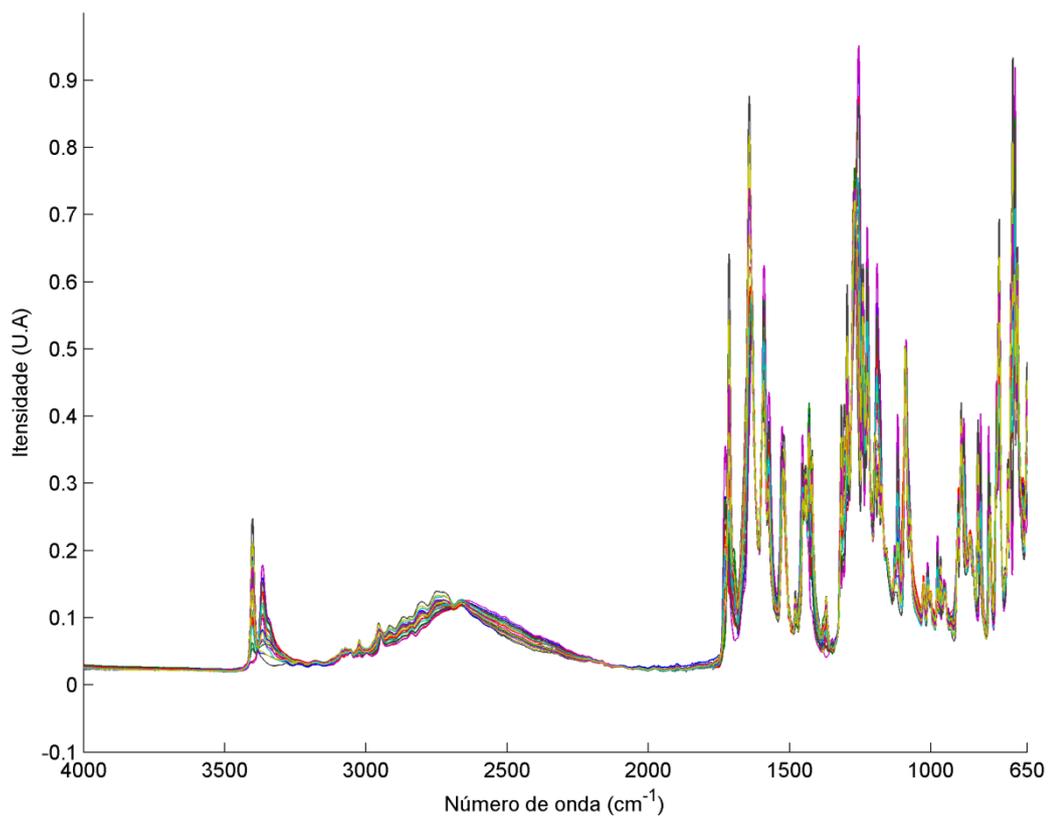


Figura 21. Espectros MIR pré-processados por MSC.

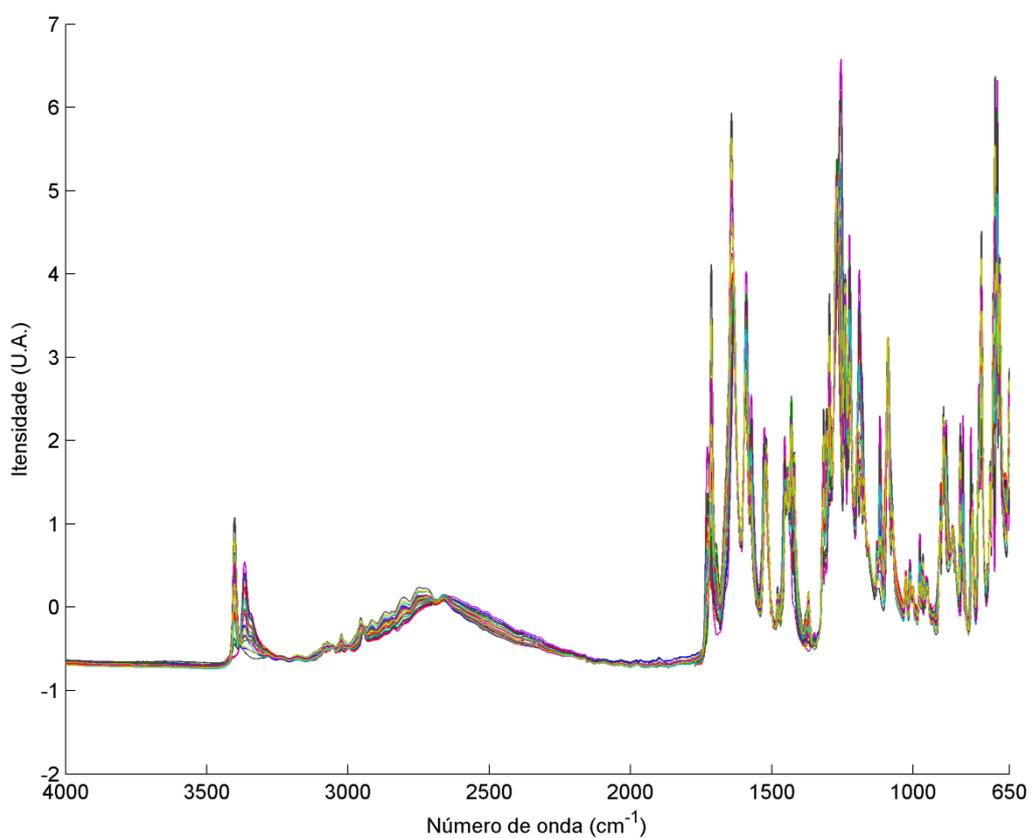


Figura 22. Espectros MIR pré-processados por SNV.

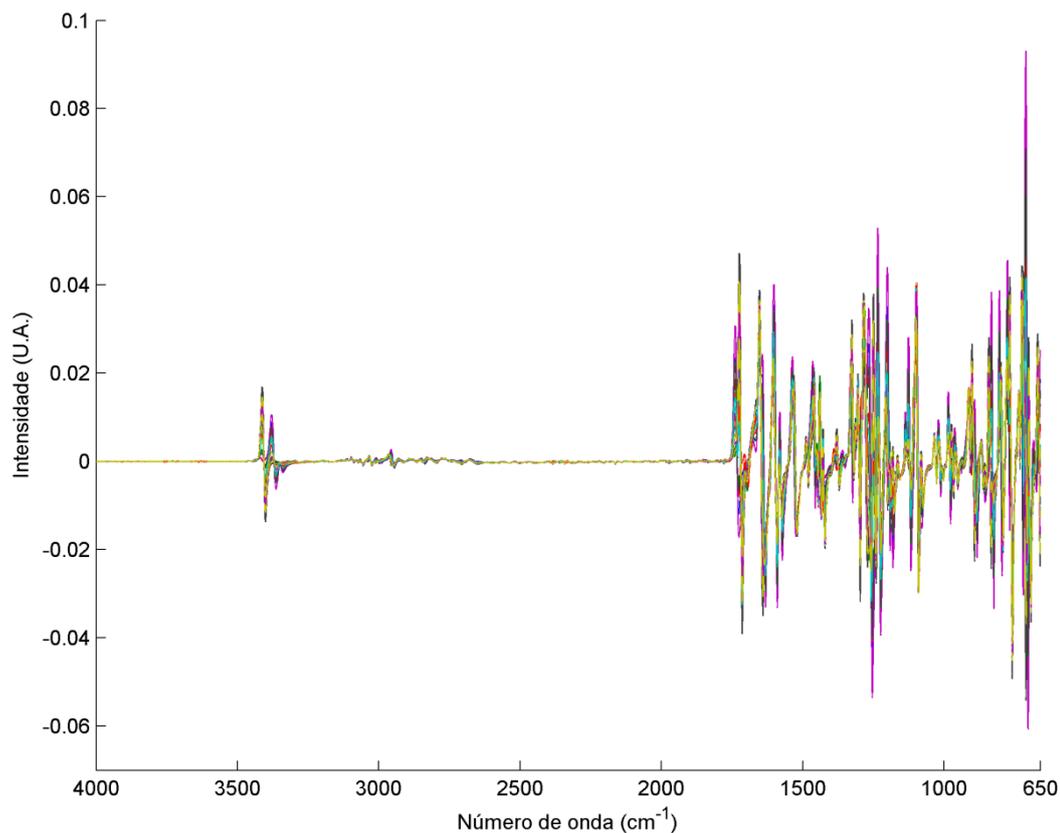


Figura 23. Espectros MIR pré-processados por derivada.

Na Figura 24 estão apresentados os espectros NIR das misturas das formas polimórficas do MBZ.

Observando os espectros NIR, percebe-se que os mesmos apresentam uma região espectral ruidosa e sem informação (12000 e 9200 cm^{-1}). Portanto, tal faixa espectral foi excluída e a faixa de trabalho escolhida para o desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada está compreendida entre 9200 e 4000 cm^{-1} . Além disso, nota-se nos espectros NIR das misturas uma variação sistemática de linha de base. Para correção desse efeito físico, os espectros foram pré-processados utilizando-se MSC, SNV e 1^{a} derivada com suavização com filtros Savitzky-Golay (polinômio de segunda ordem e janela de 11 pontos), conforme apresentados nas Figuras 25, 26 e 27.

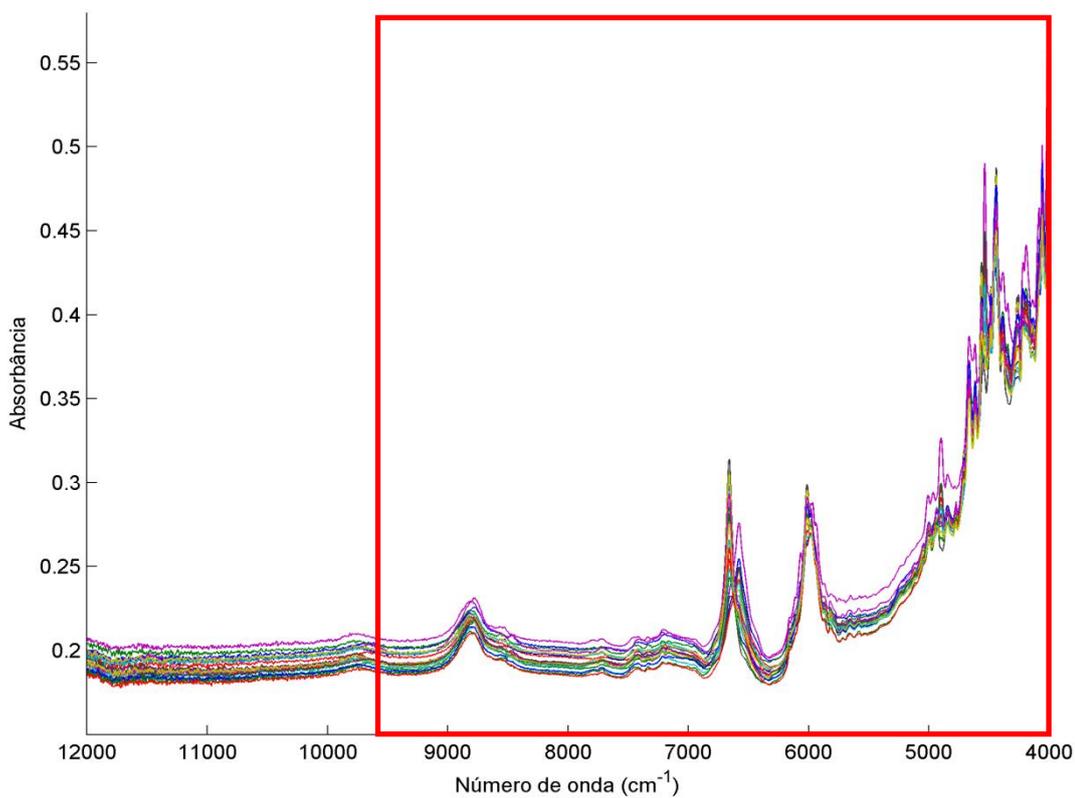


Figura 24. Espectros NIR das misturas das formas polimórficas do MBZ. Em destaque, faixa de trabalho utilizada nos modelos de calibração multivariada.

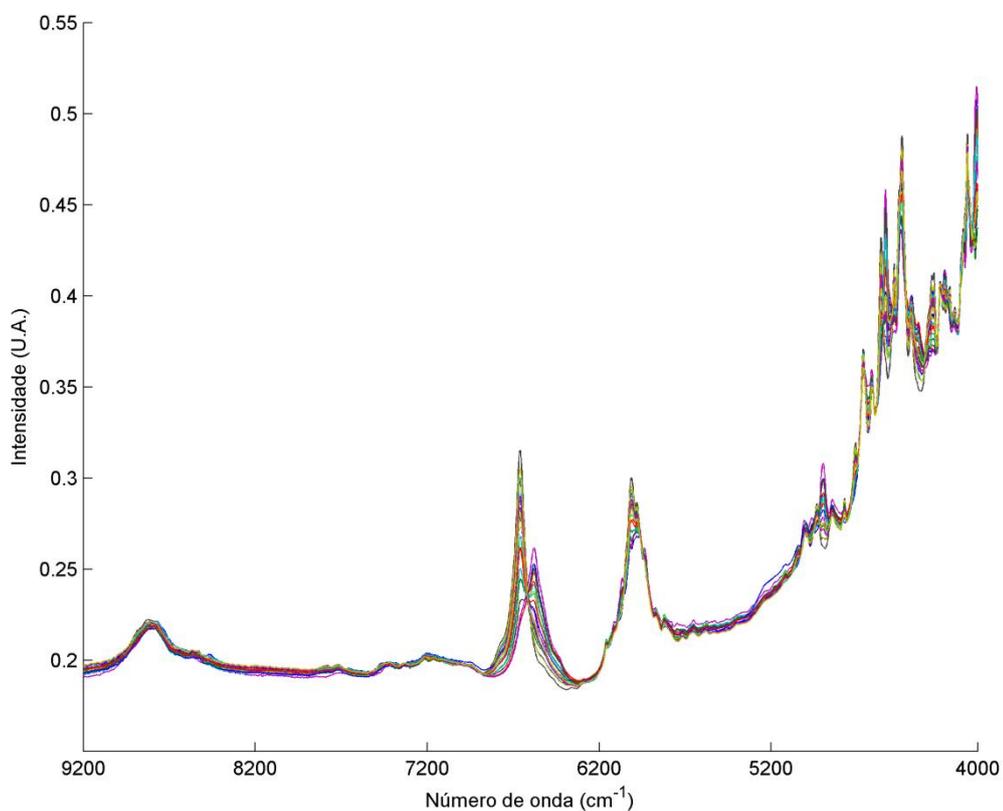


Figura 25. Espectros NIR pré-processados por MSC.

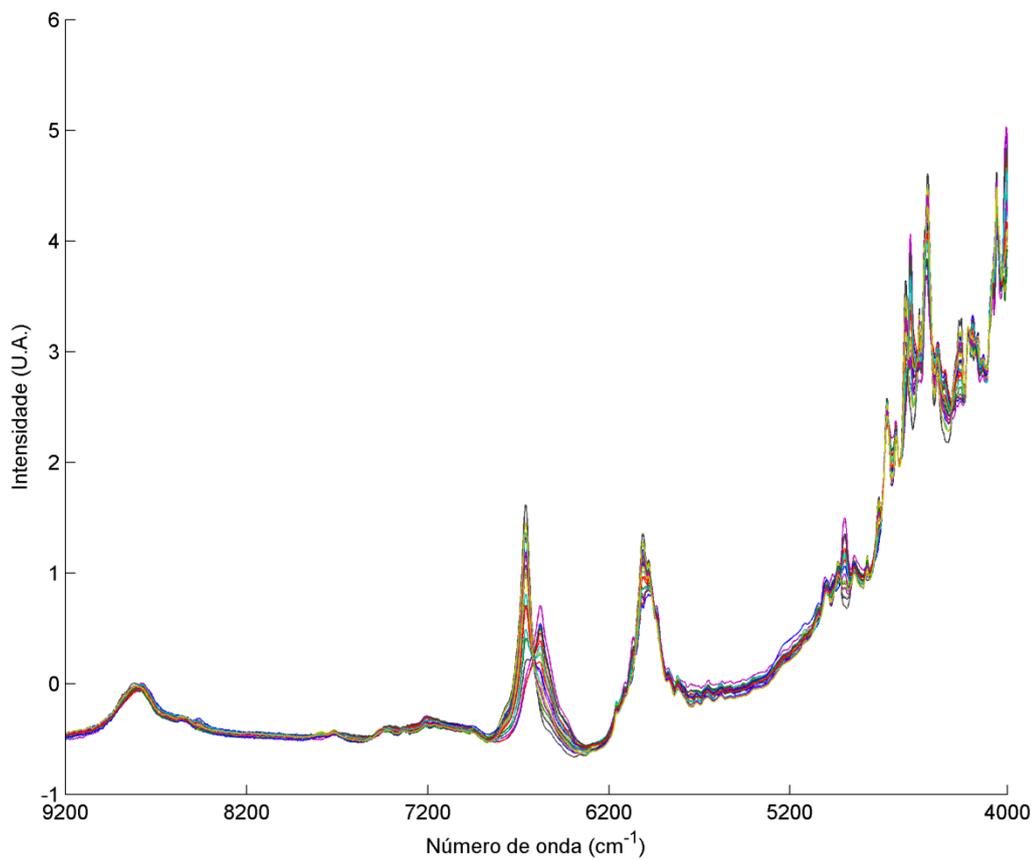


Figura 26. Espectros NIR pré-processados por SNV.

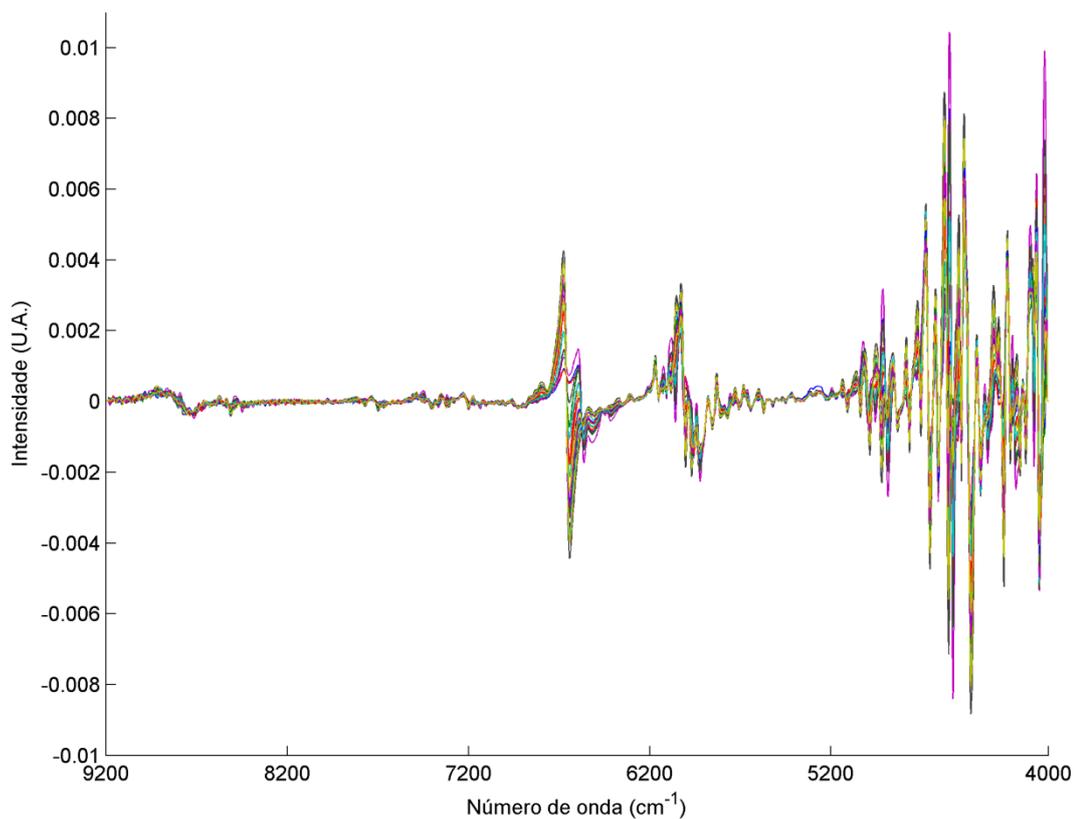


Figura 27. Espectros NIR pré-processados por derivada.

Analisando os espectros derivativos (Figura 27), observa-se que a região entre 9200 e 7000 cm^{-1} não apresenta informação espectral relevante. Portanto, essa região foi retirada do espectro e a faixa resmanescente foi utilizada nos modelos de calibração multivariada.

Os espectros THz das misturas das formas polimórficas do MBZ estão apresentados na Figura 28. Pode-se verificar um efeito acentuado do espalhamento da radiação nas amostras. Para minimizar esse efeito físico, os modelos de calibração foram construídos utilizando os espectros pré-processados por SNV, MSC e 1^{a} derivada com filtros Savitzky-Golay (janela de 51 pontos e polinômio de 2^{o} grau), na faixa entre $0,3$ e $4,8$ THz (destacada em vermelho). Tal região espectral foi escolhida por ser mais informativa e menos ruidosa.

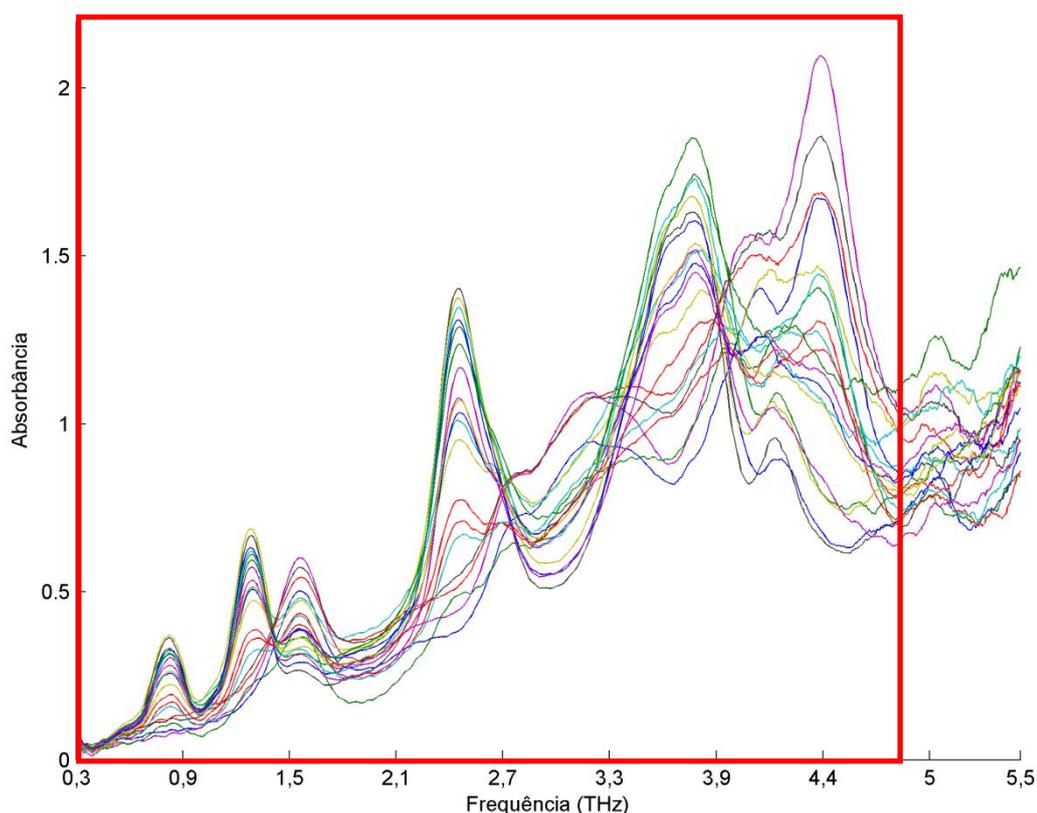


Figura 28. Espectros THz das misturas das formas polimórficas do MBZ. Em destaque, faixa de trabalho utilizada nos modelos de calibração multivariada.

Os espectros THz pré-processados são apresentados nas Figuras 29, 30 e 31.

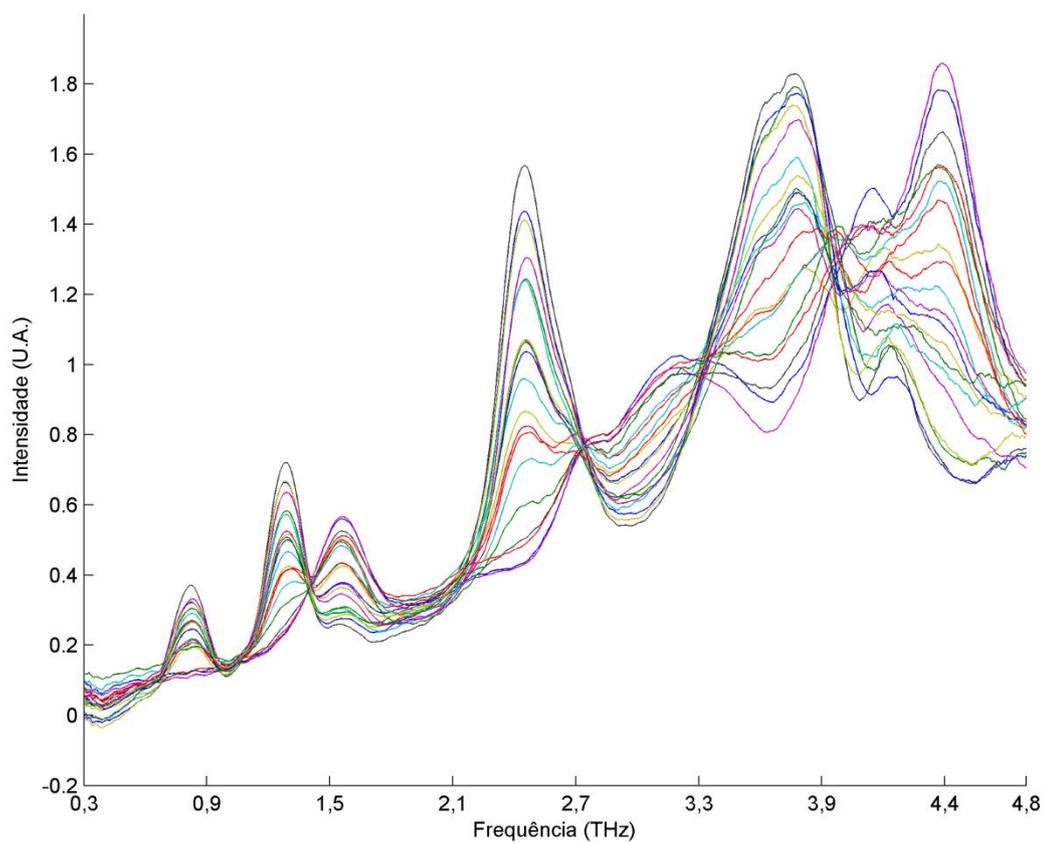


Figura 29. Espectros THz pré-processados por MSC.

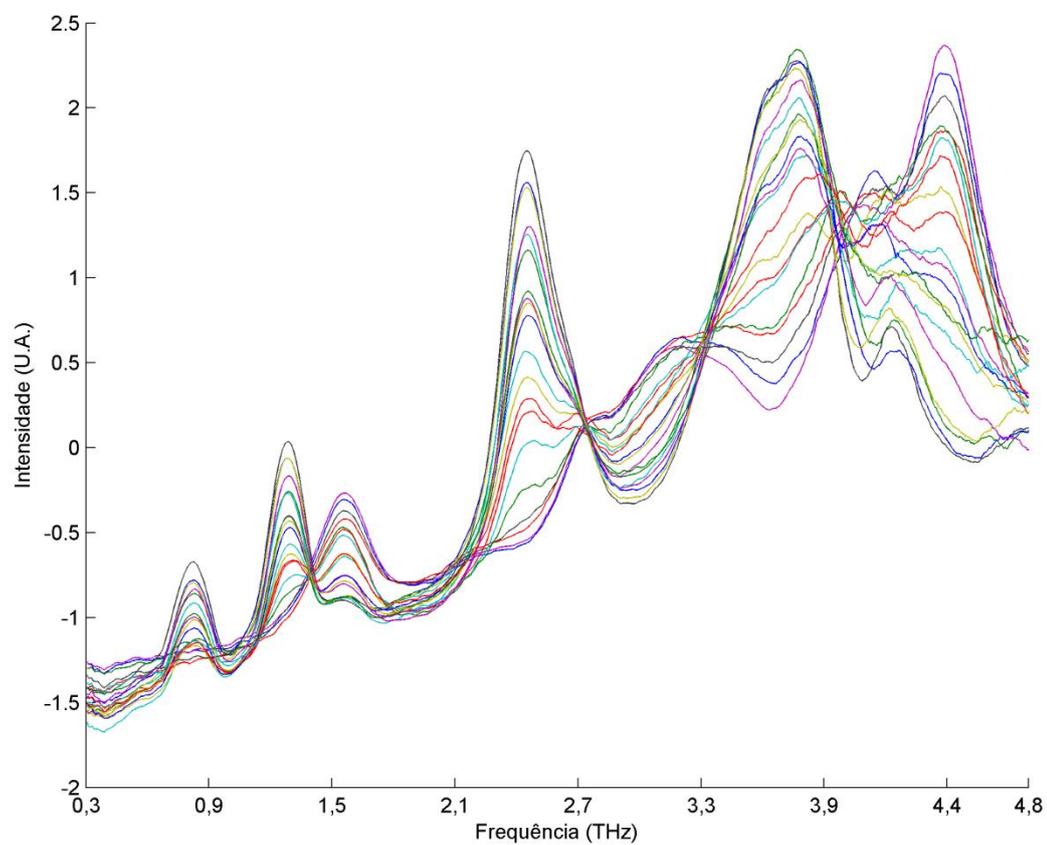


Figura 30. Espectros THz pré-processados por SNV.

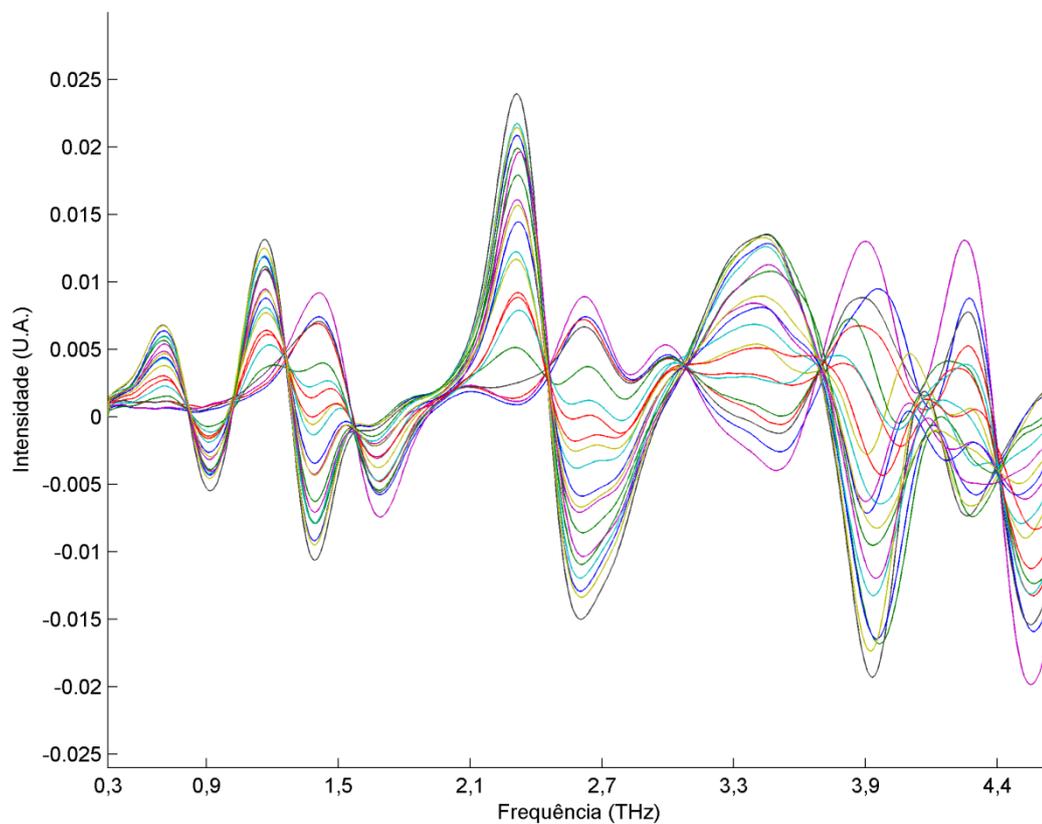


Figura 31. Espectros THz pré-processados por derivada.

5.4 Calibração Multivariada

5.4.1 MIR

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para os modelos de calibração multivariada PLS e PLS/JK construídos utilizando-se a região espectral MIR.

Tabela 7. Valores de correlação, RMSEP e R² obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para as formas polimórficas do MBZ nos espectros MIR pré-processados. Os valores entre parênteses correspondem à quantidade de variáveis latentes utilizadas no modelo na regressão.

			Forma A			Forma B			Forma C		
			R	R ²	RMSE (m/m)	R	R ²	RMSE (m/m)	R	R ²	RMSE (m/m)
MSC	PLS	Cal.	0,986 (2)	0,975	0,0524	0,977 (2)	0,959	0,0187	0,994 (4)	0,990	0,0322
		Prev.	0,996	0,982	0,0400	0,991	0,979	0,0152	0,998	0,922	0,0302
	PLS/JK	Cal.	0,986 (2)	0,975	0,0519	0,990 (4)	0,982	0,0123	0,993 (3)	0,987	0,0359
		Prev.	0,995	0,982	0,0401	0,986	0,957	0,0215	0,999	0,996	0,0217
SNV	PLS	Cal.	0,988 (2)	0,980	0,0476	0,972 (2)	0,951	0,0205	0,987 (2)	0,977	0,0487
		Prev.	0,995	0,981	0,0412	0,989	0,975	0,0164	0,999	0,997	0,0185
	PLS/JK	Cal.	0,989 (2)	0,980	0,0472	0,973 (2)	0,954	0,0200	0,983 (1)	0,970	0,0551
		Prev.	0,995	0,981	0,0414	0,990	0,977	0,0160	0,999	0,995	0,0229
Derivada	PLS	Cal.	0,991 (2)	0,984	0,0424	0,987 (2)	0,976	0,0144	0,990 (2)	0,982	0,0429
		Prev.	0,994	0,982	0,0396	0,988	0,954	0,0224	0,999	0,997	0,0191
	PLS/JK	Cal.	0,986 (1)	0,975	0,0522	0,987 (2)	0,977	0,0140	0,990 (2)	0,982	0,0423
		Prev.	0,995	0,983	0,0392	0,988	0,953	0,0226	0,999	0,997	0,0191

No caso da forma polimórfica A, percebe-se que os modelos construídos com os espectros derivativos apresentaram os menores valores de RMSEP e maiores valores de R^2 e R. Dentre eles, destaca-se o modelo construído com as variáveis mais informativas (PLS/JK), que além de utilizar a menor quantidade de variáveis latentes apresentou RMSEP = 0,0392 m/m, $R^2 = 0,983$ e $R = 0,995$. Para a forma polimórfica B, o modelo construído com os espectros pré-processados por MSC utilizando toda faixa espectral apresentou o melhor resultado, com RMSEP = 0,0152, $R^2 = 0,979$ e $R = 0,992$. Já para a forma C, o melhor resultado foi alcançado com os espectros pré-processados por SNV utilizando toda faixa espectral. Esse modelo apresentou valores de RMSEP = 0,0185 m/m, $R^2 = 0,997$ e $R = 0,999$.

De acordo com o teste F realizado, em um nível de 95% de confiança, não há diferença estatisticamente significativa entre os menores valores de RMSEP descritos acima e as demais estratégias de modelagem utilizadas. Portanto, todos os pré-processamentos utilizados podem ser aplicados aos espectros MIR para previsão dos teores das formas polimórficas do MBZ nas matérias primas. Além disso, os valores de RMSEP obtidos são comparáveis aos descritos na literatura (KACHRIMANIS; RONTOGIANNI; MALAMATARIS, 2010).

A Figura 32 apresenta os gráficos das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidas com os melhores modelos para cada forma polimórficas do MBZ.

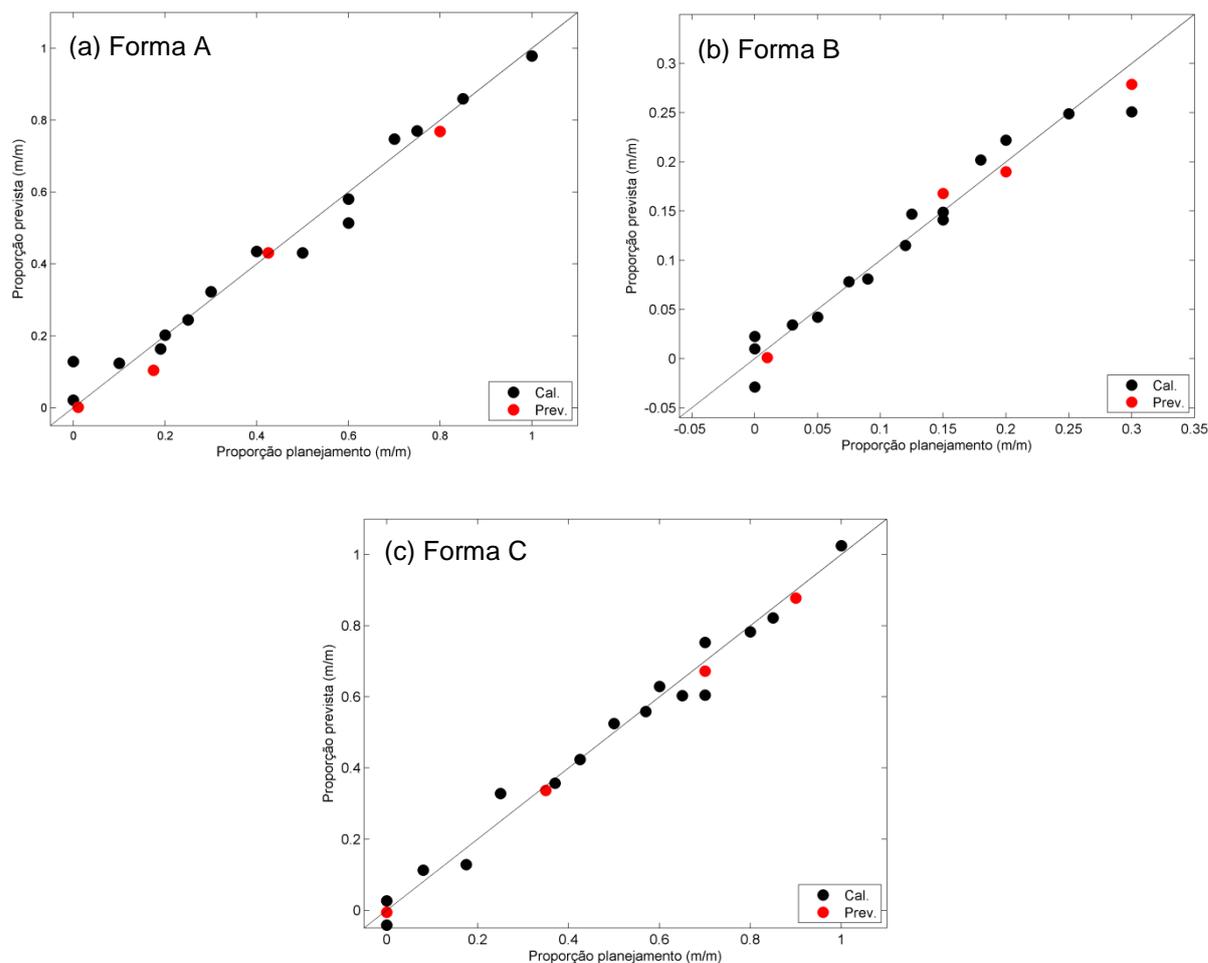


Figura 32. Gráfico das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidos com o melhor modelo NIR para a forma polimórfica (a) A (PLS/JK | derivada), (b) B (PLS | MSC) e (c) C (PLS | SNV) do MBZ.

A partir da Figura 32, observa-se que as amostras estão aleatoriamente distribuídas em torno da bissetriz, mostrando que não há evidência de erro sistemático nos modelos construídos.

5.4.2 NIR

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os modelos de calibração multivariada PLS e PLS/JK construídos utilizando-se a região espectral NIR.

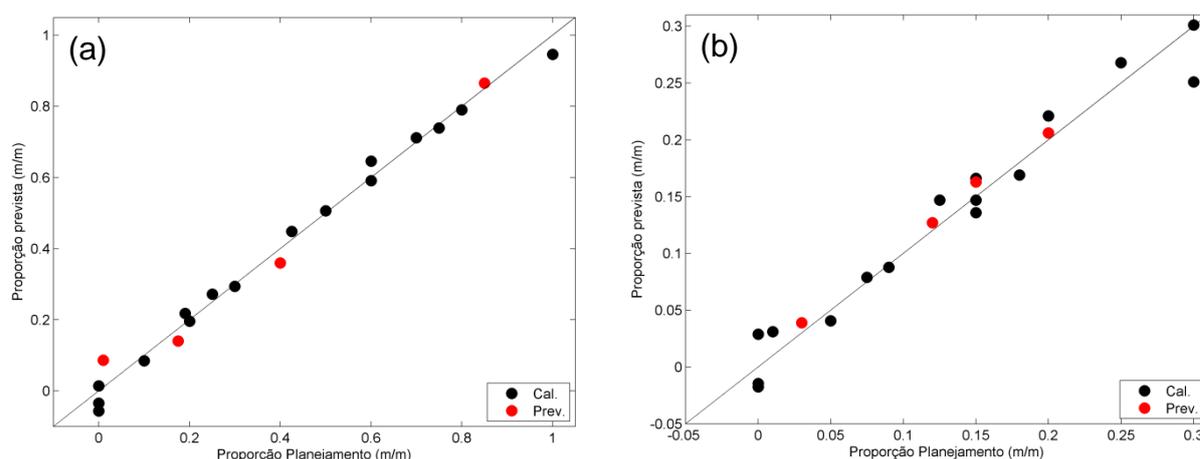
Tabela 8. Valores de correlação, RMSEP e R² obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para as formas polimórficas do MBZ nos espectros NIR pré-processados. Os valores entre parênteses correspondem à quantidade de variáveis latentes utilizadas no modelo na regressão.

			Forma A			Forma B			Forma C		
			R	R ²	RMSE (m/m)	R	R ²	RMSE (m/m)	R	R ²	RMSE (m/m)
MSC	PLS	Cal.	0,991 (2)	0,985	0,0394	0,961 (3)	0,932	0,0275	0,994 (1)	0,989	0,0332
		Prev.	0,997	0,986	0,0373	0,993	0,968	0,0110	0,997	0,988	0,0377
	PLS/JK	Cal.	0,992 (2)	0,987	0,0377	0,959 (2)	0,929	0,0280	0,994 (1)	0,990	0,0318
		Prev.	0,977	0,986	0,0366	0,996	0,919	0,0176	0,996	0,988	0,0370
SNV	PLS	Cal.	0,996 (3)	0,993	0,0263	0,961 (3)	0,932	0,0274	0,993 (1)	0,987	0,0358
		Prev.	0,998	0,991	0,0279	0,994	0,971	0,0105	0,996	0,987	0,0393
	PLS/JK	Cal.	0,998 (2)	0,991	0,0316	0,963 (3)	0,936	0,0267	0,994 (1)	0,989	0,0339
		Prev.	0,998	0,990	0,0315	0,995	0,977	0,0095	0,996	0,988	0,0382
Derivada	PLS	Cal.	0,994 (2)	0,989	0,0347	0,984 (5)	0,972	0,0176	0,993 (2)	0,988	0,0348
		Prev.	0,999	0,983	0,0411	0,992	0,969	0,0109	0,998	0,992	0,0307
	PLS/JK	Cal.	0,994 (2)	0,989	0,0345	0,982 (3)	0,969	0,0185	0,991 (1)	0,984	0,0401
		Prev.	0,999	0,983	0,0408	0,999	0,977	0,0094	0,997	0,984	0,0439

Para a forma polimórfica A, observa-se que o modelo construído utilizando toda faixa espectral e espectros pré-processados com SNV apresentou o melhor resultado, com valores de RMSEP = 0,0279 m/m, $R^2 = 0,991$ e $R = 0,998$. Já para as formas polimórficas B e C do MBZ, os modelos construídos com os espectros derivativos apresentaram menores valores de RMSEP e maiores valores de R^2 e R . Para a forma B, o resultado mais satisfatório foi para o modelo utilizando as variáveis espectrais mais informativas selecionadas por JK ($R^2 = 0,999$, $R = 0,977$ e RMSEP = 0,0094 m/m). Ao contrário, o modelo para forma C que apresentou melhor resultado foi construído com toda a faixa espectral ($R^2 = 0,992$, $R = 0,998$ e RMSEP = 0,0307 m/m).

Novamente, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre os menores valores de RMSEP descritos acima e as demais estratégias de modelagem utilizadas. Portanto, quaisquer das técnicas de pré-processamentos utilizadas são recomendadas.

Na Figura 33 estão apresentados os gráficos das proporções previstas em função dos valores determinados pelo planejamento de mistura para os melhores modelos de cada uma das formas polimórficas do MBZ (Tabela 8).



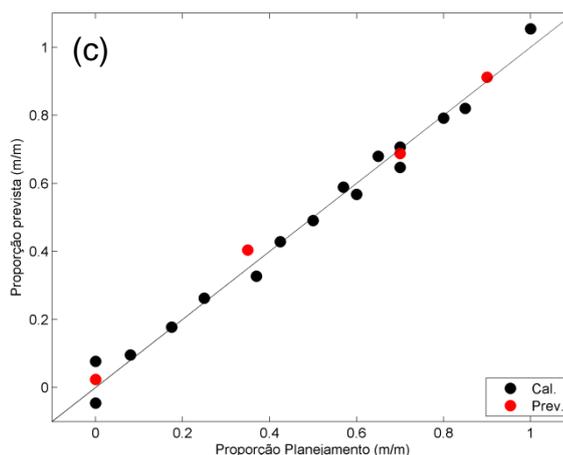


Figura 33. Gráfico das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidos com o melhor modelo NIR para a forma polimórfica (a) A (PLS | SNV), (b) B (PLS/JK | derivada) e (c) C (PLS | derivada) do MBZ.

A partir da Figura 33, observa-se que as amostras estão aleatoriamente distribuídas em torno da bissetriz, mostrando que não há evidência de erro sistemático nos modelos construídos.

5.4.3 THz

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para os modelos de calibração multivariada PLS construídos utilizando-se a região espectral THz. De acordo com esses resultados, observa-se que para as formas polimórficas A e B, os modelos construídos com os espectros derivativos apresentaram os resultados mais satisfatórios. Para forma A, o modelo PLS desenvolvido utilizando toda a faixa espectral apresentou o menor valor de RMSEP (0,0265 m/m) e os maiores valores de R^2 (0,993) e R (0,996). Já para forma B, o modelo utilizando as variáveis mais informativas (PLS/JK) apresentou RMSEP = 0,0145 m/m, $R^2 = 0,959$ e R = 0,994. Para a forma C, os modelos construídos utilizando toda a faixa espectral apresentaram melhores resultados que aqueles construídos com as variáveis espectrais mais informativas. Dentre eles, destaca-se o modelo utilizando espectros pré-processados por MSC que apresentou valores de RMSEP = 0,0350 m/m, $R^2 = 0,989$ e R = 0,999.

Tabela 9. Valores de correlação, RMSEP e R² obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para as formas polimórficas do MBZ nos espectros THz pré-processados. Os valores entre parênteses correspondem à quantidade de variáveis latentes utilizadas no modelo na regressão.

			Forma A			Forma B			Forma C		
			R	R ²	RMSE (m/m)	R	R ²	RMSE (m/m)	R	R ²	RMSE (m/m)
MSC	PLS	Cal.	0,986	0,975	0,0513	0,911 (7)	0,848	0,0412	0,988 (2)	0,979	0,0458
		Prev.	0,994	0,979	0,0461	0,822	0,557	0,0411	0,999	0,989	0,0350
	PLS/JK	Cal.	0,979	0,964	0,0624	0,899 (2)	0,831	0,0434	0,991 (2)	0,984	0,0407
		Prev.	0,995	0,980	0,0444	0,858	0,674	0,0353	0,999	0,984	0,0430
SNV	PLS	Cal.	0,982 (2)	0,969	0,0579	0,825 (3)	0,693	0,0579	0,991 (2)	0,984	0,0395
		Prev.	0,992	0,967	0,0569	0,822	0,231	0,0578	0,995	0,980	0,0485
	PLS/JK	Cal.	0,983 (1)	0,971	0,0560	0,880 (2)	0,801	0,0466	0,995 (2)	0,991	0,0304
		Prev.	0,991	0,968	0,0560	0,927	0,770	0,0316	0,988	0,966	0,0634
Derivada	PLS	Cal.	0,992 (2)	0,986	0,0382	0,950 (6)	0,915	0,0300	0,992 (2)	0,986	0,0376
		Prev.	0,996	0,993	0,0265	0,955	0,902	0,0226	0,999	0,988	0,0370
	PLS/JK	Cal.	0,989 (1)	0,980	0,0457	0,931 (4)	0,879	0,0359	0,969 (3)	0,946	0,0742
		Prev.	0,995	0,989	0,0332	0,994	0,959	0,0145	0,996	0,976	0,0535

Semelhante aos resultados obtidos nos modelos de calibração multivariada utilizando os espectros MIR e NIR, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa, entre os menores valores de RMSEP descritos anteriormente e dos demais modelos. Portanto, todas as estratégias utilizadas podem ser empregadas na quantificação das formas polimórficas do MBZ nas matérias primas por THz.

A Figura 34 apresenta os gráficos das proporções previstas em função dos valores determinados pelo planejamento obtidos utilizando-se os melhores modelos para cada uma das formas polimórficas (Tabela 9). De acordo com os resultados, verifica-se que as amostras estão aleatoriamente distribuídas em torno da bissetriz, mostrando que não há evidência de erro sistemático nos modelos construídos.

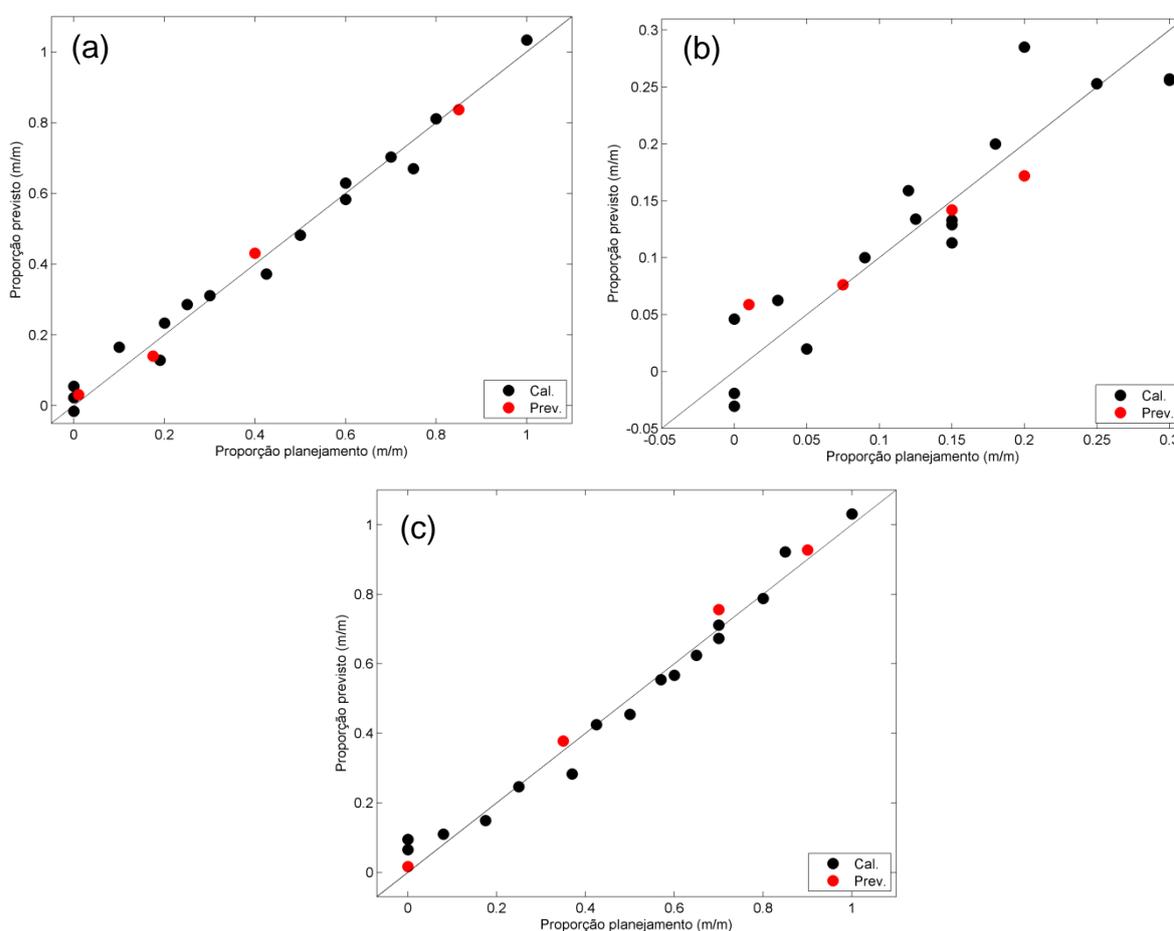


Figura 34. Gráfico das proporções previstas em função das proporções determinadas no planejamento de misturas obtidos com o melhor modelo THz para a forma polimórfica (a) A (PLS | derivada), (b) B (PLS/JK | derivada) e (c) C (PLS | MSC) do MBZ.

Avaliando-se de forma geral os modelos de calibração multivariada desenvolvidos, verifica-se que para cada uma das formas polimórficas do MBZ houve uma região espectral e um pré-processamento mais adequado. Para as formas polimórficas A e B, os melhores resultados foram obtidos com os modelos construídos utilizando-se espectros derivativos. Entretanto, para a forma polimórfica A, esses resultados foram alcançados com os espectros THz, enquanto para a forma B, utilizando os espectros NIR. Já para a forma polimórfica C, o melhor resultado foi alcançado com os espectros MIR pré-processados por SNV. No entanto, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os modelos construídos nas três regiões espectrais. Portanto, quaisquer das regiões espectrais estudadas podem ser empregadas na análise quantitativa das formas polimórficas do MBZ.

No que se refere às técnicas de pré-processamentos utilizadas, SNV e MSC são mais indicadas por não alteram os perfis espectrais. Do ponto vista de análises de processos, as regiões NIR e THZ são mais recomendadas devido às suas características inerentes, como permitir o monitoramento em linha com o uso de sondas.

CONCLUSÃO
CAPÍTULO VI

6.1 Conclusão

O presente trabalho descreveu um procedimento para obtenção da forma polimórfica B do mebendazol, por recristalização, o qual foi caracterizado pela espectroscopia MIR e difração de Raio X de pó. Além disso, foi evidenciado o potencial das espectroscopias NIR, MIR e THz na caracterização das matérias primas das três formas polimórficas do mebendazol.

Os modelos de calibração multivariada PLS e PLS/JK utilizando os espectros NIR, MIR e THz apresentaram resultados satisfatórios na quantificação das formas polimórficas do MBZ. No geral, os modelos desenvolvidos apresentaram coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2) acima de 0,97 e 0,95, respectivamente. Os valores de RMSEP obtidos para as formas polimórficas A, B e C foram, em média, 0,0312 m/m, 0,0132 m/m e 0,0282 m/m, respectivamente.

Os resultados apresentados para a espectroscopia MIR são comparáveis aos descritos na literatura. Além disso, novos e eficientes métodos analíticos baseados nas espectroscopias NIR e THz para quantificação das formas polimórficas do MBZ foram descritos. Vale ressaltar, que a espectroscopia NIR e THz seriam as técnicas mais indicadas para fins analíticos de processos pela facilidade de implementação nos processos industriais.

PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO VII

7.1 Perspectivas futuras

- Preparar novas misturas das formas polimórficas do mebenzadol a fim de ampliar o conjunto amostral;
- Desenvolver e aplicar um acessório que permita amostrar mais pontos das pastilhas utilizadas no instrumento THz, a fim de melhorar a sensibilidade dos sinais obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H.Y.; BUNACIU, A.; FLESCHEIN, S. Analysis of mebendazole polymorphs by Fourier transform IR spectrometry using chemometric methods. *Biopolymers*, v. 67, n. 1, p. 56–60, 2002.

AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; GLASS, B.D.; MANGAN, M.; SMITHSON, J. Analysing the crystal purity of mebendazole raw material and its stability in a suspension formulation. *International journal of pharmaceutics*, v. 361, n. 1-2, p. 245–50, 2008.

AYALA, A P; SIESLER, H W; CUFFINI, S L. Polymorphism incidence in commercial tablets of mebendazole : a vibrational spectroscopy investigation. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 39, p. 1150–1157, 2008.

BEEBE, Kenneth R.; PELL, Randy J.; SEASHOLTZ, Mary Beth. *Chemometrics: A Practical Guide*. New York: Wiley-Interscience, 1998.

BLANCO, M.; COELHO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; la PEZUELA, C. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *The Analyst*, v. 123, n. August, p. 135–150, 1998.

BORKA, L.; HALEBLIAN, J.K. Crystal Polymorphism of Pharmaceuticals. *Acta Phramaceutica Jugoslavica*, v. 40, p. 71–94, 1990.

BRITTAIN, H. Vibrational Spectroscopy. In: BRITTAIN, H. (Ed.) . *Polymorphism in Pharmaceutical Solids. Volume 192. Drugs and Pharmaceutical Sciences*. 2.ed. New York: Informa Helthcare, 2009a.

BRITTAIN, H. Theory and Principles of Polymorphic Systems. In: BRITTAIN, H. (Ed.). *Polymorphism in Pharmaceutical Solids. Volume 192: Drugs and Pharmaceutical Sciences*. 2. ed. New York: Informa Helthcare, 2009b. p. 1–23.

CHAROENLARP, P.; WAIKAGUL, J.; MUENNOO, C.; SRINOPHAKUN, S.; KITAYAPORN, D. Efficacy of single-dose mebendazole, polymorphic forms A and C, in the treatment of hookworm and Trichuris infections. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 24, n. 4, p. 712–6, 1993.

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

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

DE VILLIERS, M.M.; TERBLANCHE, R.J.; LIEBENBERG, W.; SWANEPOEL, E.; DEKKER, T.G.; SONG, M. Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of

the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 38, n. 3, p. 435–441, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KUMAR, S.; CHAWLA, G.; SOBHIA, M.; BANSAL, A. Characterization of solid-state forms of mebendazole. *Pharmazie*, v. 63, p. 136–143, 2008.

LEE, E.H. A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 9, p. 163–1375, 2014.

LOHANI, S.; GRANT, D.J.W. Thermodynamics of Polymorphs. In: HILFIKER, R. (Ed.). *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. 1.ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.

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

NAES, T.; ISAKSSON, T.; FEARN, T.; DAVIES, T.A *User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester-UK: NIR Publications, 2004.

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

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

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

PEREIRA, A.F.C. *Determinação simultânea de acidez , índice de refração e densidade usando espectrometria NIR, calibração multivariada e seleção de variáveis*.Dissertação de Mestrado. Departameno de Química. Universidade Federal da Paraíba, 2007.

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

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

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

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

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

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

STIEGER, N.; LIEBENBERG, W. Recrystallization of Active Pharmaceutical Ingredients. In: ANDREETA, M.R.B. (Ed.). *Crystallization - Science and Technology*. 1. ed. Rijeka: INTECH, 2007.

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

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

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

TORLESSE, H.; CROMPTON, D.W.T; SAVIOLI, L. Anthelmintic treatment during pregnancy. In: CROMPTON, D.W.T. *et al.* (Ed.). *Controlling disease due to helminth infections*. Geneva: World Health Organization, 2003.

VASCONCELOS, F.V.C. *Uso da região espectral de sobretons para determinação do teor de biodiesel e classificação de misturas diesel/biodiesel adulteradas com óleo vegetal*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

VIPPAGUNTA, S.R.; BRITAIN, H.G.; GRANT, D.J. Crystalline solids. *Advanced drug delivery reviews*, v. 48, n. 1, p. 3–26, 2001.

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

World Health Organization - WHO. *The selection and use of essential medicines. Report of the WHO Expert Committee (including the 12th Model List of Essential Medicines)*. . Geneva, 2003.

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

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