

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE
MULTIVARIADA NA CARACTERIZAÇÃO E MONITORAMENTO *IN
SITU* DA SÍNTESE DE COCRISTAIS DE CARBAMAZEPINA-
NICOTINAMIDA E IBUPROFENO-NICOTINAMIDA**

Frederico Luis Felipe Soares*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

* bolsista CAPES

São Carlos - SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S676ae Soares, Frederico Luis Felipe.
Aplicação de espectroscopia raman e análise multivariada na caracterização e monitoramento *in situ* da síntese de cocristais de carbamazepina-nicotinamida e ibuprofeno-nicotinamida / Frederico Luis Felipe Soares. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
160 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Química analítica. 2. Cocristais. 3. Monitoramento. 4. Quimiometria. 5. Carbamazepina. 6. Ibuprofeno. I. Título.


CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do candidato Frederico Luis Felipe Soares, realizada em 20 de fevereiro de 2014:



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini



Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira

“Dedica-te ao trabalho em que te sustentas, sem desprezar a pausa de repouso ou o entretenimento em que te restaurem as energias.”

Emmanuel

“O gênio é um por cento de inspiração e noventa e nove por cento de transpiração.”

Thomas Edison

"Se a religião recusa caminhar com a ciência, a ciência avança sozinha."

Allan Kardec

"A ciência sem a religião é paralítica - A religião sem a ciência é cega..."

Albert Einstein

*Dedico a minha mãe Dulce, minha vó
Maria José, e ao meu Irmão Rafael
Pelo apoio e suporte, mesmo estando tão longe*

AGRADECIMENTOS

- A Deus e meus amigos espirituais, sem eles nada disso seria possível;
- A minha mãe Dulce, minha vó Maria José e meu irmão Rafael, pelo amor incondicional, carinho e lições de vida;
- Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, confiança, convivência e amizade;
- À Gabi, pelo auxílio na correção dos textos e nas análises de DSC, mas principalmente pelo apoio e companheirismo durante esses dois anos.
- Aos meus amigos de São Carlos: Geiser, Marcão, Lorisse, Jorgito, Priscylla e Deroco. A minha família longe de Brasília.
- Aos colegas do GQA e LABBES.
- Aos colegas Thiago Faheina, Cinthia Soares e Francisco Nunes pelas análises de DRX
- Aos meus colegas de Brasília, que mesmo com a distância nunca deixaram de me apoiar e incentivar.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Alternative Least Squares (Mínimos Quadrados Alternados)
API	Active Principle Ingredient (Princípio Ativo)
ATR	Attenuated Total Reflectance (Reflectância Total Atenuada)
BCS	Biopharmaceutical Classification System (Sistema de Classificação Biofarmacêutica)
BEFA	Backward Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionários para trás)
CBZ	Carbamazepina
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)
DTA	Differential Thermal Analysis (Análise Térmica Diferencial)
EFA	Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionários)
FAR	Far infrared (Infravermelho Distante)
FEFA	Forward Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionários para frente)
FT	Fourier Transform (Transformada de Fourier)
FT-IR	Fourier Transform Infrared (Infravermelho com Transformada de Fourier)
GAS	Gas Anti-solvente (Anti-solvente a Gás)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HSM	Hot-Stage Microscopy (Microscopia com estágio a quente)
IBP	Ibuprofeno
iPLS	Interval PLS (PLS por intervalos)
MCR	Multivariate Curve Resolution (Resolução Multivariada de Curvas)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIA	Multivariate Image Analysis (Análise Multivariada de Imagens)
MIR	Mid infrared (Infravermelho Médio)

NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NCT	Nicotinamida
NIPALS	Non-linear iterative Partial Least Squares (Mínimos Quadrados Parciais Iterativo Não-linear)
NIR	Near infrared (Infravermelho Próximo)
PAT	Process Analytical Technology (Tecnologia Analítica em Processo)
PC	Principal Component (Componente Principal)
PCA	Principal Component Analysis (Análise por Componentes Principais)
PLS	Partial Least Squares Regression (Regressão por Quadrados Mínimos Parciais)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration (Raiz Quadrada do Erro Médio de Calibração)
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation (Raiz Quadrada do Erro Médio de Validação Cruzada)
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction (Raiz Quadrada do Erro Médio de Predição)
SAS	Supercritical Anti-solvente (Anti-solvente Supercrítico)
SDG	Solvent-Drop Grinding (Moagem por Gota de Solvente)
SIMPLS	Statistically Inspired Modification of PLS (Modificação do PLS Inspirada Estatisticamente)
SVD	Singular Value Decomposition (Decomposição de Valores Singulares)
TGA	Thermogravimetric Analysis (Análise Termogravimétrica)
US. FDA	United States Food and Drug Administration (Agência Americana de Drogas e Alimentos)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3. 1 - Tabela de calibração utilizada no PLS para os cocristais de CBZ-NCT e IBP-NCT	50
TABELA 3.2 – Pontos de validação para o PLS utilizando Raman e IR para o cocrystal de CBZ-NCT	51
TABELA 3.3 - Pontos de validação para o PLS utilizando Raman e IR para o cocrystal de IBP-NCT	51
TABELA 3. 4 - Pontos de validação para o PLS utilizando o DSC para o cocrystal de CBZ-NCT	52
TABELA 3. 5 - Tabela de validação para o PLS utilizando o DSC para o cocrystal de IBP-NCT	52
TABELA 3. 6 - Pontos de validação para o PLS utilizando o DRX para o cocrystal de CBZ-NCT	53
TABELA 3. 7 - Pontos de validação para o PLS utilizando o DRX para o cocrystal de IBP-NCT	53
TABELA 3.8 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	62
TABELA 3.9 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	63
TABELA 3.10 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	63
TABELA 3.11 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	68
TABELA 3.12 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	68
TABELA 3.13 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	68
TABELA 3.14 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	73
TABELA 3.15 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	73
TABELA 3.16 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	73
TABELA 3.17 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	79
TABELA 3.18 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	79
TABELA 3.19 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	79
TABELA 3.20 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	88
TABELA 3.21 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	89
TABELA 3.22 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	89
TABELA 3.23 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	94
TABELA 3.24 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	94
TABELA 3.25 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	95
TABELA 3.26 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	99

TABELA 3.27 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração	99
TABELA 3.28 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro terceiro de calibração....	100
TABELA 3.29 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração	105
TABELA 3.30 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração ...	105
TABELA 3.31 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Diferentes estados cristalinos de um mesmo princípio ativo.....	2
FIGURA 1.2 – Cocrystal de quinidrona formado a partir de quinina e hidroquinona	2
FIGURA 1.3 – Interações do tipo a) homosínton e b) heterosínton	3
FIGURA 1.4 – Sistema de classificação de fármacos de acordo com a BCS	5
FIGURA 1.5 – Tipo de rosca extrusora utilizada para reação em estado sólido	6
FIGURA 1.6 – Diagrama de fases para a formação de cocrystal a partir de compostos com: (a) mesma solubilidade, (b) solubilidade diferente.....	8
FIGURA 1.7 – Estrutura química da molécula de carbamazepina	11
FIGURA 1.8 – Estrutura química da molécula de Ibuprofeno.....	12
FIGURA 1.9 – Estrutura química da molécula de nicotinamida.....	12
FIGURA 1.10 – Cocrystal de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT).....	13
FIGURA 1.11 – Cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT)	15
FIGURA 1.12 – Plano de difração, de um equipamento de raios-X	18
FIGURA 1.13 – Representação básica de um equipamento de DRX	19
FIGURA 1.14 – Representação esquemática da célula de aquecimento das duas configurações de DSC: a) Por compensação de potência e b) por fluxo de calor.....	20
FIGURA 1.15 – Representação esquemática de uma curva de DSC genérica demonstrando os principais eventos térmicos detectados pelo equipamento.....	21
FIGURA 1.16 – Movimentos vibracionais de estiramento e de deformação da molécula da água.....	22
FIGURA 1.17 – Representação esquemática de um equipamento de Infravermelho dispersivo	23
FIGURA 1.18 – Representação esquemática de um equipamento de Infravermelho com transformada de Fourier	24
FIGURA 1.19 – Principais sistemas de compartimento de amostra utilizado em equipamentos de infravermelho médio.....	24
FIGURA 1.20 – Representação do espalhamento Rayleigh e os espalhamentos inelásticos: Stokes e o Anti-Stokes.....	26
FIGURA 1.21 – Representação esquemática de um equipamento de espectroscopia Raman dispersivo com sonda.	28

FIGURA 1.22 – Representação esquemática dos diferentes tipos de analisadores de processos segundo a classificação da FDA	32
FIGURA 2. 1 – Representação gráfica das Componentes Principais.....	34
FIGURA 2. 2 – Esquema de decomposição da matriz de dados X	35
FIGURA 2. 3 – Representação esquemática do MCR-ALS em monitoramento de reações.....	37
FIGURA 2. 4 – Exemplo de um Forward EFA (adaptado da referência ¹⁴³)	38
FIGURA 2. 5 – Representação esquemática da decomposição das matrizes X e Y no PLS.....	41
FIGURA 2. 6 – Representação gráfica da regressão do PLS.....	41
FIGURA 3.1 – Representação esquemática da síntese do cocrystal CBZ-NCT	47
FIGURA 3.2 – Representação esquemática da síntese do cocrystal IBP-NCT	48
FIGURA 3.3 – Representação esquemática do planejamento de misturas para a curva de calibração dos cocrystal de CBZ-NCT e IBP-NCT.....	49
FIGURA 3.4 – Curvas de DSC do cocrystal, seus substratos e uma mistura física de seus coformadores	54
FIGURA 3.5 – Difrátograma de raios-X do cocrystal e de seus substratos e uma mistura física de seus coformadores.....	55
FIGURA 3.6 – Espectros Raman do cocrystal e de seus substratos e uma mistura física de seus coformadores	56
FIGURA 3.7 – Espectro infravermelho do cocrystal e de seus substratos e uma mistura física de seus coformadores.....	57
FIGURA 3.8 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	59
FIGURA 3.9 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	59
FIGURA 3.10 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	60
FIGURA 3.11 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração preditos em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação	61
FIGURA 3.12 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	64

FIGURA 3.13 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	65
FIGURA 3.14 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	65
FIGURA 3.15 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	67
FIGURA 3.16 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	70
FIGURA 3.17 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	70
FIGURA 3.18 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	71
FIGURA 3.19 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	72
FIGURA 3.20 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	75
FIGURA 3.21 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	75
FIGURA 3.22 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	76
FIGURA 3.23 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de predição em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	78
FIGURA 3.24 – Curvas de DSC do cocrystal, de seus substratos e de uma mistura física dos substratos.....	80
FIGURA 3.25 – Difrátograma do cocrystal e de seus substratos e de uma mistura física dos substratos	81
FIGURA 3.26 – Espectro Raman do cocrystal e de seus substratos	82
FIGURA 3.27 – Espectro infravermelho do cocrystal e de seus substratos	83
FIGURA 3.28 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	84
FIGURA 3.29 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	85
FIGURA 3.30 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	86

FIGURA 3.31 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	87
FIGURA 3.32 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	90
FIGURA 3.33 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	91
FIGURA 3.34 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	91
FIGURA 3.35 –Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	93
FIGURA 3.36 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	96
FIGURA 3.37 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	96
FIGURA 3.38 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	97
FIGURA 3.39 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	98
FIGURA 3.40 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1	101
FIGURA 3.41 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2.....	102
FIGURA 3.42 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3.....	102
FIGURA 3.43 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação.....	104
FIGURA 4.1 – a) Esquema d montagem usado para o monitoramento da síntese do cocrystal b) Fotografia do sistema de reação.	110
FIGURA 4.2 – Representação esquemática da reação em meio aquoso do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida.....	111
FIGURA 4.3 – Dados obtidos durante o monitoramento a) antes da filtragem por PCA b) depois da filtragem por PCA.....	112

FIGURA 4.4 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura ambiente..	114
FIGURA 4.5 – a) Perfil de concentração da reação a temperatura ambiente e b) Ampliação na faixa de tempo entre 0 à 14 minutos de reação	115
FIGURA 4.6 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura ambiente.....	116
FIGURA 4.7 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura de 40 °C ..	117
FIGURA 4.8 – a) Perfil de concentração da reação a temperatura de 40 °C e b) Amplificação na faixa de tempo entre 0 à 14 minutos de reação	118
FIGURA 4.9 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura de 40 °C	119
FIGURA 4.10 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura de 60 °C ..	120
FIGURA 4.11 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C	121
FIGURA 4.12 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C	121
FIGURA 4.13 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura de 80 °C ..	123
FIGURA 4.14 – Representação da porcentagem de variância explicada para os dados obtidos na reação a temperatura de 80 °C	124
FIGURA 4.15 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 80 °C	125
FIGURA 4.16 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação à temperatura de 80 °C	125
FIGURA 5.1 – Representação esquemática do procedimento experimental para a reação em água do cocristal de ibuprofeno-nicotinamida.....	130
FIGURA 5.2 – Espectros Raman da mistura ibuprofeno-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura ambiente	132
FIGURA 5.3 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura ambiente.....	133

FIGURA 5.4 – Perfis espectrais integrados utilizados pelo modelo da reação a temperatura ambiente.....	133
FIGURA 5.5 – Espectros Raman da mistura ibuprofeno-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura ambiente de 40 °C	134
FIGURA 5.6 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 40 °C	135
FIGURA 5.7 – Perfis espectrais integrados utilizados pelo modelo da reação a temperatura de 40 °C	136
FIGURA 5.8 – Espectros Raman da mistura ibuprofeno-nicotinamida obtidos in-line em cinco tempos diferentes de reação à temperatura ambiente de 60 °C	137
FIGURA 5.9 – Representação da porcentagem de variância explicada para os dados obtidos na reação a temperatura de 60 °C	138
FIGURA 5.10 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C	139
FIGURA 5.11 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C	139

RESUMO

APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN E ANÁLISE MULTIVARIADA NA CARACTERIZAÇÃO E MONITORAMENTO IN SITU DA SÍNTESE DE COCRISTAIS DE CARBAMAZEPINA-NICOTINAMIDA E IBUPROFENO-NICOTINAMIDA

Neste trabalho foram utilizadas ferramentas do PAT (por meio da espectroscopia Raman com analisador *in situ* e ferramentas multivariadas) para realizar o monitoramento da cristalização e a quantificação dos cocristais de carbamazepina–nicotinamida (CBZ–NCT) e ibuprofeno–nicotinamida (IBP–NCT). Inicialmente, realizou-se a síntese dos cocristais, que seriam utilizados como “padrão” durante o trabalho, empregando-se um método descrito na literatura. Estes foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), difração de raios-X (DRX), espectroscopias no infravermelho médio (IR) e Raman. Com a confirmação nova estrutura cristalina, pelos métodos analíticos de estado sólido, estes cristais foram utilizados em um planejamento de misturas com três componentes (cocrystal, coformador A e coformador B) para desenvolver uma curva analítica usada na quantificação dos cocristais. Foi identificada a técnica analítica de estado sólido, que em conjunto com métodos quimiométricos de quantificação, como o PLS, possibilitaram uma melhor quantificação do cocrystal em meio ao seus coformadores. A espectroscopia Raman foi a técnica que apresentou os menores valores de erro, tanto na etapa de calibração, quanto na etapa de predição, obtendo erros quadráticos médios de predição variando entre 1,5 – 4,5 % de cada analito. Para a síntese e monitoramento dos cocristais, utilizou-se um procedimento de reação de cristalização. Dessa forma, preparou-se uma solução aquosa de nicotinamida com concentração próxima a saturação. Essa solução foi adicionada ao outro coformador. As reações foram realizadas em diferentes temperaturas e monitoradas com espectroscopia Raman. Para ambos os cocristais, foi possível observar uma cocrystalização com alto rendimento a partir de 60 °C, sendo este fato inédito na literatura, uma vez que a maior parte dos procedimentos de cocrystalização utiliza solventes orgânicos. O emprego da resolução de curvas multivariadas (MCR-ALS) possibilitou observar distintamente os pontos de dissolução dos fármacos, nucleação e cristalização do cocrystal, podendo ser empregado facilmente em um procedimento de rotina na indústria farmacêutica.

ABSTRACT**RAMAN SPECTROSCOPY AND MULTIVARIATE ANALYSIS IN THE CHARACTERIZATION AND IN SITU MONITORING ON SYNTHESIS OF CARBAMAZEPINE-NICOTINAMIDE AND IBUPROFEN-NICOTINAMIDE COCRYSTALS**

In this work, the PAT tools were used (Raman spectroscopy with an *in situ* analyzer and multivariate tools) to proceed a crystallization monitoring and quantification of cocrystals of carbamazepine–nicotinamide (CBZ–NCT) and ibuprofen–nicotinamide (IBP–NCT). At first, it was performed the cocrystals syntheses that would be used as “standard cocrystal” during the course of this work, employing a method described in the literature. These crystals were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), powder X-ray diffraction (PXRD), mid-infrared (MIR) and Raman spectroscopy. After the confirmation of the crystalline structure by the solid state analytical techniques, these crystals were used on a mixture design with three components (cocrystal, coformer A and coformer B) to develop an analytical curve employed in the quantification of the cocrystals. It was evaluated with the solid state analytical technique and quantification chemometrics methods, such as the PLS, which enabled a better cocrystal quantification among its coformers. Raman spectroscopy was the technique that presented the lowest error values, both in calibration and validation stages, with square mean errors of prediction ranging from 1.5 – 4.5 % for each analyte. For cocrystal synthesis and monitoring, it was used as a crystallization reaction procedure. Thus, it was prepared using a nicotinamide solution in water with a concentration near saturation level. This solution was added to the coformer, in solid state. The reactions were performed at different temperatures and monitored by the Raman spectroscopy. For both cocrystals, it was possible to observe a crystallization with a high yield from 60 °C, being the fact unpublished by the literature, since most of the cocrystallization reactions use organic solvents. The employment of multivariate curve resolution (MCR-ALS) enabled to observe distinctly the main points of the reaction, such as drugs dissolution, crystal nucleation and cocrystal crystallization, which can be easily employed on a routine procedure in the pharmaceutical industry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Cocristais	2
1.2. Métodos de cocrystalização	5
1.2.1. Métodos de mecanoquímicos	5
1.2.2. Métodos assistidos por solução.....	7
1.2.3. Métodos assistidos por solução.....	9
1.3. Fármacos.....	10
1.3.1. Carbamazepina.....	10
1.3.2. Ibuprofeno	11
1.3.3. Nicotinamida.....	12
1.4. Cocrystal de Carbamazepina-Nicotinamida	13
1.5. Cocrystal de Ibuprofeno-Nicotinamida.....	14
1.6. Métodos de caracterização	16
1.6.1. Difração de Raios-X (DRX)	17
1.6.2. Calorimetria exploratório diferencial (DSC).....	19
1.6.3. Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)	21
1.6.4. Espectroscopia Raman.....	25
1.7. Tecnologia Analítica em Processo (PAT)	28
1.7.1. Ferramentas Multivariadas.....	30
1.7.2. Analisadores de processos.....	31
2. MÉTODOS QUIOMÉTRICOS	34
2.1. Análise por Componentes Principais (PCA)	34
2.2. Resolução Multivariada de Curvas (MCR)	37

2.3.	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	40
2.3.1.	iPLS	43
2.4.	Rotinas utilizadas	44
3.	SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COCRISTAIS DE CBZ-NCT E IBP-NCT	46
3.1.	Introdução e objetivos.....	46
3.2.	Parte Experimental	47
3.2.1.	Síntese do cocrystal “padrão” de CBZ-NCT.....	47
3.2.2.	Síntese do cocrystal “padrão” de IBP-NCT	48
3.2.3.	Quantificação dos cocristsais	49
3.2.4.	Espectroscopia Raman.....	50
3.2.5.	Infravermelho Médio (IR)	50
3.2.6.	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
3.2.7.	Difração de raios-X (DRX).....	53
3.2.8.	Métodos Quimiométricos	53
3.3.	Resultados e discussão	54
3.3.1.	Caracterização do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT)	54
3.3.2.	Quantificação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT)	58
3.3.2.1.	Infravermelho médio.....	58
3.3.2.2.	Calorimetria exploratória diferencial.....	64
3.3.2.3.	Difração de raios-X em pó (DRX).....	69
3.3.2.4.	Espectroscopia Raman	74
3.3.3.	Caracterização do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT)	

3.3.4.	Quantificação do cocrystal de IBP-NCT por PLS	83
3.3.4.1.	Infravermelho médio.....	83
3.3.4.2.	Calorimetria exploratória diferencial.....	89
3.3.4.3.	Difração de raios-X em pó (DRX).....	95
3.3.4.4.	Espectroscopia Raman	100
3.4.	Conclusão	106
4.	MONITORAMENTO IN SITU DO COCRISTAL DE CARBAMAZEPINA-NICOTINAMIDA	109
4.1.	Introdução e Objetivos	109
4.2.	Parte Experimental	109
4.2.1.	Síntese cocrystal de CBZ-NCT em água	110
4.2.2.	Métodos Quimiométricos	111
4.3.	Resultados e Discussão.....	112
4.3.1.	Reação a temperatura ambiente	112
4.3.2.	Reação a temperatura de 40 °C.....	116
4.3.3.	Reação a temperatura de 60 °C.....	119
4.3.4.	Reação a temperatura de 80 °C.....	122
4.4.	Conclusões	126
5.	MONITORAMENTO IN SITU DO COCRISTAL DE IBUPROFENO- NICOTINAMIDA	128
5.1.	Introdução e Objetivos	128
5.2.	Parte Experimental	128
5.2.1.	Síntese do cocrystal de IBP-NCT em água	129
5.2.2.	Métodos Quimiométricos	130
5.3.	Resultados e Discussão.....	131
5.3.1.	Reação à temperatura ambiente	131

5.3.2.	Reação com a temperatura à 40 °C	134
5.3.3.	Reação com a temperatura à 60 °C	136
5.4.	Conclusões	140
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	142
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cocristais

Cocristais são arranjos cristalinos de diferentes moléculas que ao serem combinados formam uma única estrutura cristalina¹, com padrões cristalográficos diferentes dos compostos precursores^{2,3}. (Figura 1.1)

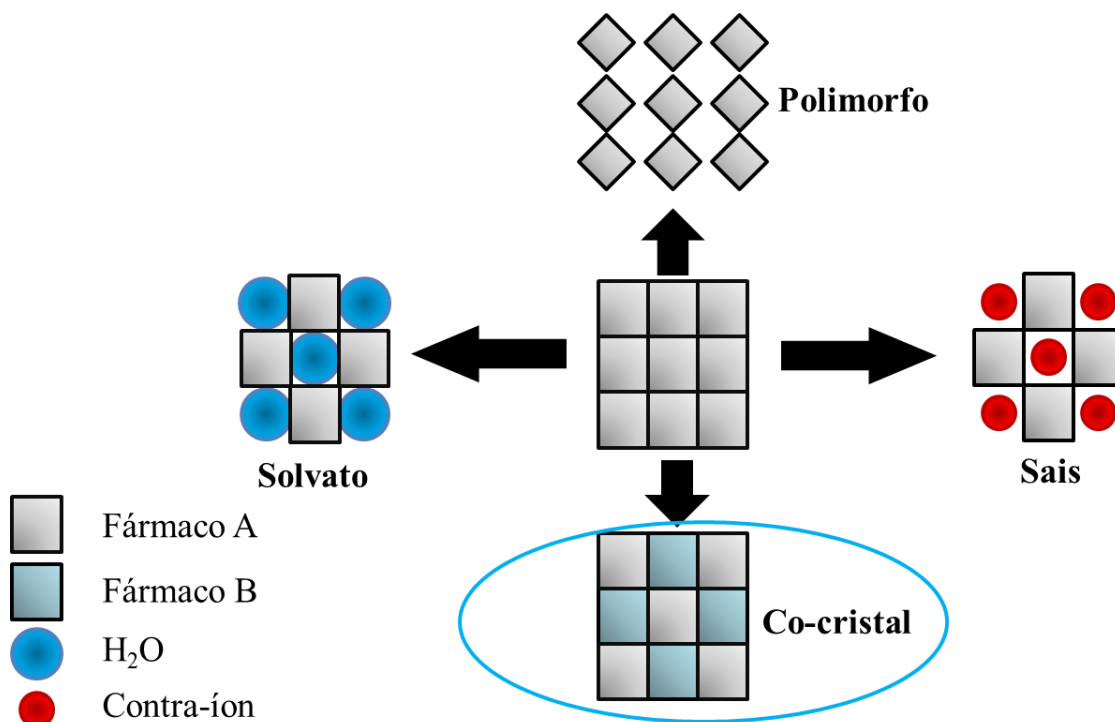


FIGURA 1.1 – Diferentes estados cristalinos de um mesmo princípio ativo

O primeiro relato de cocristais foi feito em 1844, quando o químico alemão Friedrich Wöhler realizou uma reação de cocrystalização entre a quinonona e a hidroquinona, formando a quinidrona (Figura 1.2)⁴. Porém apenas no século XXI, com o surgimento dos primeiros cocristais farmacêuticos, estes começaram a ter importância tanto no âmbito acadêmico quanto no industrial⁵.

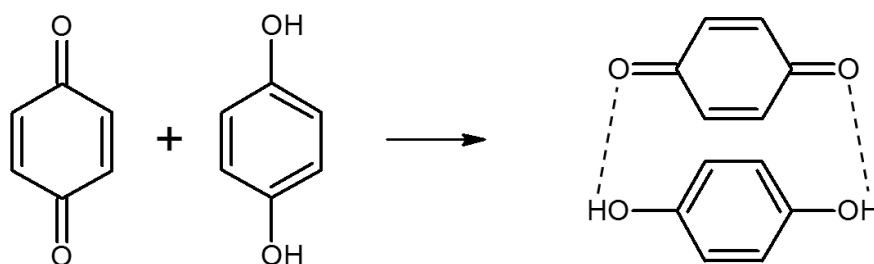


FIGURA 1.2 – Cocrystal de quinidrona formado a partir de quinonona e hidroquinona

Cocristais farmacêuticos são uma classe de cocristais no qual pelo menos um dos componentes é o ingrediente ativo (API, do inglês *active principle ingredient*) e o outro geralmente é designado coformador^{6,7}. O princípio ativo e o coformador são unidos por interações intermoleculares como ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e interações π - π .

Eles diferem dos solvatos, pois todos os seus coformadores estão no estado sólido a temperatura ambiente⁸. Também divergem dos sais, pois não ocorre a transferência de prótons durante a interação das moléculas formadoras do cocrystal⁹.

A formação de um cocrystal ocorre a partir das interações dos tipos homosínton e heterosínton (Figura 1.3)¹⁰. O termo sínton foi primeiramente utilizado em 1995 por Desiraju e é definido como centros estruturais presentes em supramoléculas (substâncias compostas de duas ou mais moléculas) que podem ser formadas por métodos sintéticos envolvendo interações intermoleculares¹¹. Portanto, uma interação do tipo homosínton ocorre entre dois síntons iguais, ou seja, uma interação baseada no mesmo grupo funcional como, por exemplo, amida-amida e ácido-ácido. Enquanto as interações do tipo heterosínton ocorrem em síntons diferentes, isto é, interações intermoleculares entre diferentes grupos funcionais como, por exemplo, amida-ácido e ácido-piridina¹².

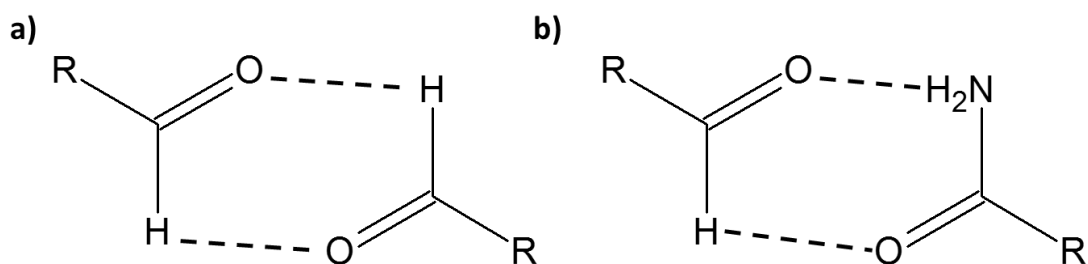


FIGURA 1.3 – Interações do tipo a) homosínton e b) heterosínton

Os cocristais farmacêuticos apresentam propriedades diferentes das apresentadas pelos seus precursores, justificando o interesse das indústrias e pesquisas na área farmacêutica desta nova classe de compostos, principalmente com o intuito de melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de alguns princípios ativos.

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes quando se avalia um princípio ativo¹³. Os princípios ativos geralmente são administrados em sua forma sólida, portanto a solubilidade do fármaco está correlacionada com sua biodisponibilidade. Diversos métodos foram desenvolvidas para melhorar a

solubilidade dos princípios ativos: formação de sais¹⁴, polimorfismo¹⁵, formação de amorfos¹⁶, micronização¹⁷, entre outros.

Dos métodos utilizados, os cocrystal farmacêuticos apresentam uma alta razão solubilidade do cocrystal/solubilidade do API e, como vantagem adicional, apresentam geralmente alta estabilidade química e/ou física. Good e Rodríguez-Hornedo mostraram que a razão solubilidade do cocrystal/solubilidade do API, para os cocrystal de carbamazepina-nicotinamida e carbamazepina-ácido glutárico foram de 157 e 112 respectivamente¹⁸.

Estes aumentos de solubilidade em conjunto com a estabilidade química do cocrystal, uma vez que a forma cocrystalizada é preferencial em relação as formas polimórficas da carbamazepina, resultam em propriedades extremamente vantajosas para um princípio ativo com baixa solubilidade e que apresenta várias formas polimórficas.

Outras propriedades igualmente importantes que também são alteradas pela adição de moléculas coformadoras no motivo cristalográfico do princípio ativo são: ponto de fusão; estabilidade mecânica e química; e biodisponibilidade.

Ponto de fusão é uma característica termodinâmica bastante utilizada no meio farmacêutico para se caracterizar e/ou determinar a pureza dos compostos analisados. Os cocrystal geralmente possuem pontos de fusão com valores intermediários ou abaixo de seus compostos precursores.

Stanton e Bak avaliaram as propriedades físico-químicas de 10 cocrystal de ácidos carboxílicos com o API AMG 517¹⁹. Os autores constataram que os pontos de fusão de todos os cocrystal sintetizados apresentavam-se entre os pontos de fusão do ácido carboxílico e do API, e obteve-se uma correlação entre os valores de ponto de fusão e a solubilidade dos cocrystal.

Outra importante característica dos cocrystal é a melhora na estabilidade do princípio ativo tanto em processo mecânico quanto em mudanças químicas, como polimorfismo ou solvatação.

Trask e colaboradores avaliaram a estabilidade do cocrystal de teofilina em diferentes umidades relativas com o decorrer do tempo²⁰. O cocrystal de teofilina-ácido oxálico apresentou uma boa estabilidade mesmo em ambientes onde a umidade relativa era de 98%, enquanto que o princípio ativo teofilina conseguiu manter sua estabilidade somente quando a umidade relativa máxima era de 75%. Este aumento na estabilidade demonstrou uma melhora no cocrystal, pois impediu a hidratação do

princípio ativo que tem uma biodisponibilidade menor do que o mesmo em sua forma anidra.

As propriedades anteriores estão coerentes com a biodisponibilidade de um fármaco. A biodisponibilidade é definida como a quantidade do fármaco que alcança a circulação sistêmica de forma inalterada. A BCS (Sistema de Classificação Biofarmacêutica, do inglês, *Biopharmaceutical Classification System*) classifica os medicamentos em 4 classes²¹: I – alta solubilidade e permeabilidade; II – baixa solubilidade e alta permeabilidade; III – baixa permeabilidade e alta solubilidade; e por fim IV – baixa permeabilidade e solubilidade (Figura 1.4).

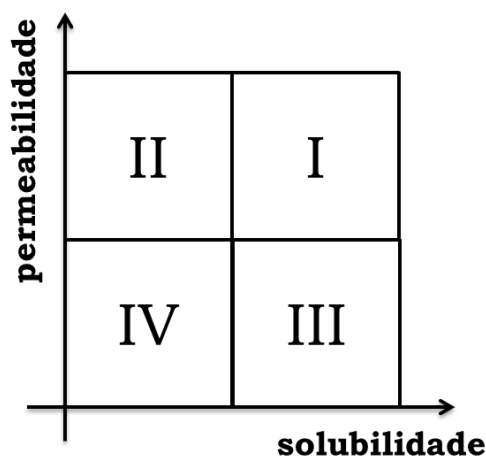


FIGURA 1.4 – Sistema de classificação de fármacos de acordo com a BCS

O aumento da solubilidade de compostos classificados como classe II e IV (e portanto sua biodisponibilidade) faz com que o estudo de cocrystal se torne extremamente vantajoso para as indústrias e pesquisa na área farmacêutica.

1.2. Métodos de cocrystalização

Diversos métodos para formação de cocrystal foram descritos na literatura²², dentre eles os mais utilizados estão: os métodos mecanoquímicos e os métodos assistidos por solução. Entretanto, outros métodos estão sendo estudados e desenvolvidos, destacando-se: método da fusão, cocrystalização assistido por ultrassom e cocrystalização utilizando fluídos supercríticos.

1.2.1. Métodos de mecanoquímicos

Os métodos mecanoquímicos baseiam-se na quebra das interações intermoleculares (inclusive as ligações de hidrogênio) através de esforços mecânicos,

seguido por uma etapa de reação química. Dentre os métodos mecanoquímicos, os mais utilizados para a produção de cocrystal são por moagem pura, por moagem com gota de solvente (SDG, do inglês *solvent drop grinding*) e com prensa extrusora.

A moagem pura ou moagem seca consiste na mistura dos componentes iniciais em um pistilo ou em um moinho de bolas. Estes compostos são submetidos a esforço físico até a formação do cocrystal. Friscic e Jones relataram três diferentes tipos de mecanismos para a formação do cocrystal: difusão molecular, formação eutética e formação por meio de fase amorfa²³. Tal método só pode ser utilizado se os intermediários presentes na moagem apresentarem estabilidades menores (valores de entalpia maiores) do que os formadores iniciais ou uma alta mobilidade molecular²⁴.

A cocrystalização em prensa de extrusão baseia-se na adição dos princípios ativos em uma extrusora. As roscas da extrusora (Figura 1.5) são aquecidas e rotacionadas, utilizando diferentes parâmetros de temperatura e rotação por minuto. Nestas roscas os fármacos são fundidos e misturados e, quando resfriados, cristalizam na forma do cocrystal. Diversos cocrystalis foram obtidos utilizando este método²⁵. Em 2010, Dhumal e colaboradores utilizaram uma prensa extrusora com rosca dupla para obter o cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida²⁶.

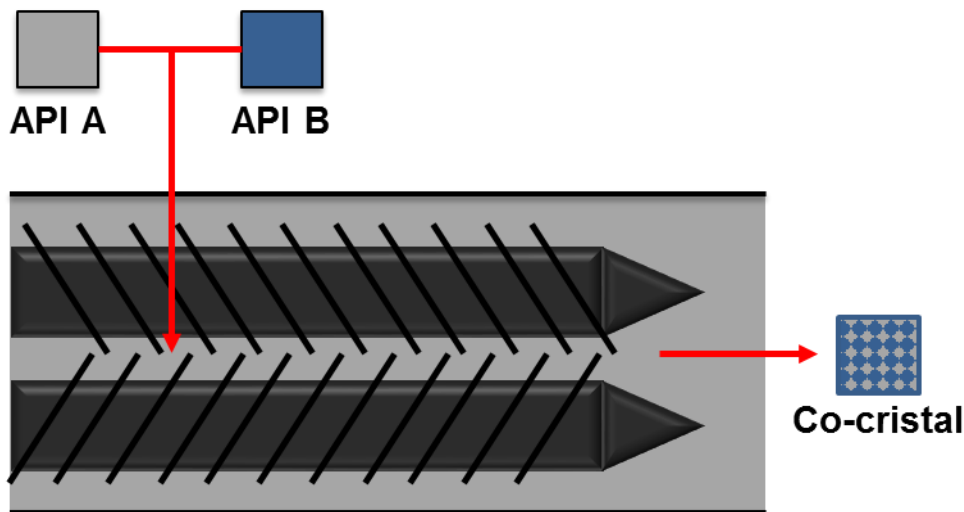


FIGURA 1.5 – Tipo de rosca extrusora utilizada para reação em estado sólido

Os métodos mecanoquímicos geralmente são técnicas rápidas, que não necessitam de solventes e podem ser facilmente controlados durante o processo. Entretanto por utilizar temperaturas elevadas e alto esforço mecânico, a chance de degradar o fármaco utilizado (ou o cocrystal resultante) é alta.

Atualmente, uma das técnicas mais vantajosas para a formação de cocrystalis por meios mecanoquímicos é a moagem por gota de solvente (SDG, do inglês

solvente-drop grinding). Ela permite uma melhora significativa na cinética de formação do cocrystal por moagem pura²⁷. O método consiste na adição de uma pequena quantidade de solvente no meio onde irá ser realizada a moagem dos compostos. Uma vez que não é necessária a dissolução completa dos cristais, a formação dos cocrystal ocorre de maneira mais rápida²⁸.

Shan e Jones foram os primeiros a reportarem a adição de pequenas quantidades de solvente para a obtenção de cocrystal de maneira mais rápida²⁹. Os autores constataram que para um dos cocrystal estudados foi possível observar o padrão de difração do cocrystal utilizando uma pequena quantidade de metanol em 20 minutos de moagem, enquanto que o produto desejado não foi obtido após uma hora de moagem sem utilizar solvente.

1.2.2. Métodos assistidos por solução

Estes métodos são os mais utilizados para a formação de cocrystal. São realizadas em quantidades equivalentes de cada componente, como no caso da cocrystalização por evaporação do solvente ou em razões não equivalentes, como a reação de cristalização.

Cocrystalização por evaporação consiste na adição de dois ou mais componentes em um solvente volátil que possa solubilizar todos os cristais presentes. Com a evaporação do solvente, alcança-se um ambiente de supersaturação onde qualquer alteração no sistema resulta na nucleação do cocrystal³⁰. É o método mais simples, e por isso o mais utilizado, principalmente para a triagem de novos tipos de cocrystal⁶.

Em 2013, Sanphui et. al. realizaram testes de triagem utilizando o método de evaporação lenta para o fármaco temozolomida³¹. Os autores utilizaram diferentes coformadores (isonicotinamida, nicotinamida, pirazinamida, 4-hidroxibenzamida, cafeína e sacarina) e dois tipos distintos de solventes, acetona e acetonitrila. A triagem obteve como resultado diferentes cocrystal com diferentes proporções entre o API e o coformador.

Entretanto, este método somente pode ser utilizado quando o cocrystal pretendido tem razão estequiométrica equivalentes dos reagentes iniciais, i.e. a solução inicial deve conter uma solução com concentração molar igual à presente no cocrystal. Quando a razão é não equivalente, obtém-se a cristalização de apenas um dos componentes, enquanto o outro fármaco se encontra em solução³².

A reação de cristalização foi utilizada para contornar este tipo de problema. O método consiste na obtenção de uma solução supersaturada de um dos componentes, seguido da adição do segundo reagente. O equilíbrio então é deslocado e o processo de cristalização do cocrystal se inicia.

A Figura 1.6 mostra um diagrama de fases que diferencia o método por evaporação de solvente e por reação de cristalização. O diagrama de fases é altamente influenciado pela solubilidade dos componentes no solvente reacional. A Figura 1.6a representa um diagrama de fases de um cocrystal sintetizado por evaporação lenta. Os componentes A e B possuem solubilidade semelhante no solvente, e ao final da reação (dependo da quantidade de cada componente) é possível obter o cocrystal puro (C), uma mistura entre o cocrystal e um dos componentes (S_A ou S_B) ou apenas um dos componentes puros (A ou B)²².

A Figura 1.6b representa um diagrama de fases para reações de cocrystalização. No diagrama, os componentes A e B apresentam solubilidades distintas no solvente reacional. Para este sistema, o método de evaporação lenta resultará em uma precipitação única de apenas um dos componentes (B, por exemplo) ou uma mistura entre o cocrystal e apenas um componente (S_B)³³.

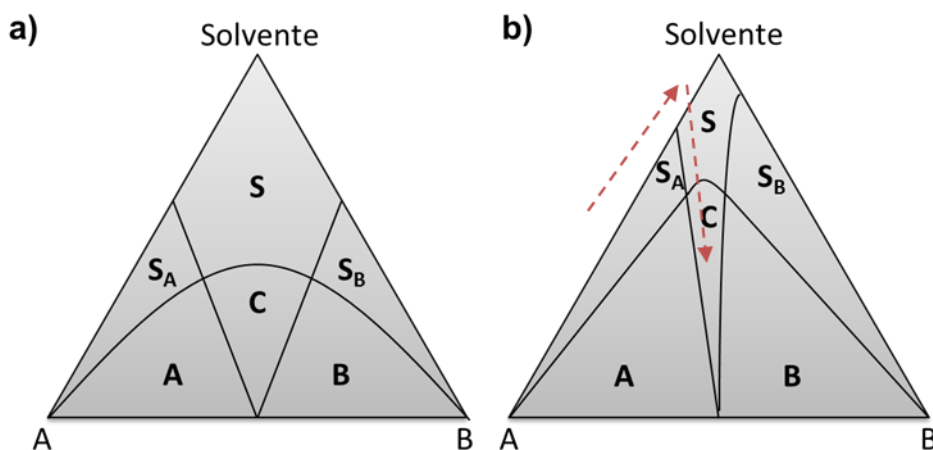


FIGURA 1.6 – Diagrama de fases para a formação de cocrystal a partir de compostos com: (a) mesma solubilidade, (b) solubilidade diferente.

O ideal é alterar o estado para uma região de supersaturação do componente A, e em seguida, adicionar o componente B à mistura reacional, assim alterar a rota sintética ($--->$) levando a formação do cocrystal (C). Rodríguez-Hornedo et. al. compararam os métodos de reação de cristalização e evaporação lenta para o cocrystal de carbamazepina-nicotinamida. Os autores utilizaram a espectroscopia

Raman para acompanhar a cristalização do produto, e observaram que utilizando o método de evaporação lenta, onde adições equimolares dos reagentes foram adicionadas em etanol, o cocrystal foi formado em 3 horas. Entretanto, utilizando uma solução praticamente saturada de nicotinamida, ocorreu a formação do cocrystal em 3 minutos³⁴.

Ambos os métodos descritos apresentam uma dificuldade de serem realizadas em larga escala, principalmente se o API utilizado apresenta um forma polimórfica mais estável do que o cocrystal desejado. Para a formação de cocrystal em grande quantidade, utiliza-se o método de resfriamento, ou também chamado de reação em suspensão³⁰. Em um reator, adiciona-se o solvente e os componentes formadores do cocrystal. O reator é aquecido até a dissolução de grande parte dos reagentes. Quando solubilizados, estes fármacos interagem entre si e precipitam na forma do cocrystal. Passado um tempo de reação, há a presença de um equilíbrio entre os reagentes solubilizados e o cocrystal precipitado. Nesta etapa, a reação passa por um processo de resfriamento em que todo o API solubilizado é cocrystalizado³⁵.

Este método utiliza o princípio da reação de cristalização, porém com o aumento de temperatura para forçar a formação do cocrystal, o que ocasiona a diminuição do tempo de reação. Outra vantagem deste método é a possibilidade de utilizar análises espectroscópicas *in situ* para obter informações sobre o processo de cristalização e as interações químicas presentes no processo³⁶.

Nesta dissertação, utilizou-se reações em suspensão para a formação do cocrystal e o seu monitoramento utilizando a espectroscopia Raman e técnicas quimiométricas.

1.2.3. Métodos assistidos por fluido supercrítico

Fluídos supercríticos são amplamente utilizados como solvente para extração de diversos analitos³⁷ e como fase móvel em cromatografia líquida³⁸. Na área farmacêutica, seu uso deve-se principalmente ao controle do tamanho e da morfologia dos cristais farmacêuticos, sendo utilizado até mesmo como indutor de transformação polimórfica³⁹.

Diferentes métodos foram desenvolvidas para a utilização de fluídos supercríticos como solvente em reação de cocrystalização. Entretanto, a maioria delas utiliza o fluido supercrítico como um anti-solvente, utilizando a baixa solubilidade dos compostos farmacêuticos em CO₂. Assim, os APIs são solubilizados em um solvente

comum, e em seguida adiciona-se o fluido supercrítico em alta quantidade. Essa rápida mudança de polaridade no meio faz com que ocorra a precipitação dos cocristais.

Os dois métodos mais comuns para a cocrystalização por anti-solvente utilizando fluidos supercríticos são: a SAS (anti-solvente supercrítico, do inglês, *supercritical anti-solvent*) e a GAS (anti-solvente a gás, do inglês, *gas anti-solvent*).

Na SAS, a solução contendo os APIs é pulverizada em um vaso de alta pressão contendo CO₂ supercrítico. O solvente orgânico se difunde pelo fluido supercrítico causando uma supersaturação do sistema e posteriormente a precipitação dos cristais⁴⁰. Em 2009, Padrela *et. al.* utilizaram um sistema de SAS para a formação de cocristais de indometacina-sacarina. Os cristais foram obtidos com um alto grau de pureza e um elevado tamanho de partícula⁴¹.

A GAS apresenta um procedimento parecido com a SAS. Entretanto, neste método o fluido supercrítico é adicionado à solução contendo o solvente orgânico e os APIs. O CO₂ é dissolvido no solvente líquido causando uma rápida expansão da parte orgânica, diminuindo a solubilidade do solvente e gerando a formação dos cocristais⁴². Ober e Gupta utilizaram este método para a cocrystalizar itraconazol e ácido succínico. Este cocrystal apresentou uma taxa de dissolução maior do que quando formado por cocrystalização mediante solução⁴³.

1.3. Fármacos

No estudo desta dissertação, foram utilizados dois princípios ativos, classificados como grupo II no sistema de classificação BCS, e um fármaco coformador do grupo I, com o objetivo de melhorar as características de solubilidade e biodisponibilidade dos fármacos da classe II. Portanto, os fármacos utilizados no trabalho foram a carbamazepina e o ibuprofeno como APIs pouco solúveis e com baixa biodisponibilidade; e a nicotinamida como coformador.

1.3.1. Carbamazepina

A carbamazepina (CBZ) [C₁₅H₁₂N₂O – 5H-Dibenzo(b,f)azepina-5-carboxamida] (Figura 1.7) é um importante princípio ativo utilizado para o tratamento de epilepsia e de neuralgia do trigêmeo. Apesar de ser utilizada como medicamento por mais de 30

anos, a carbamazepina é um fármaco com baixa solubilidade e o tratamento com este medicamento envolve altas doses⁴⁴.

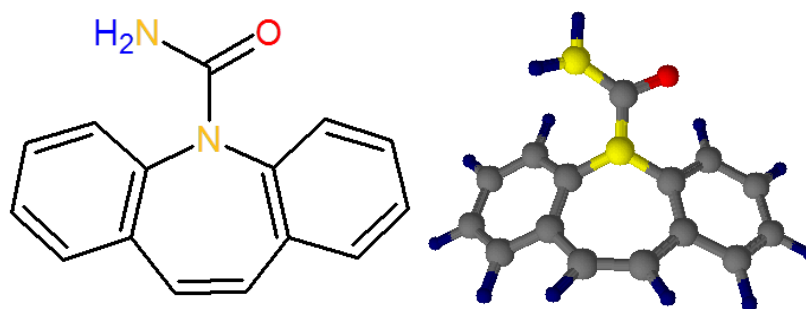


FIGURA 1.7 – Estrutura química da molécula de carbamazepina

A carbamazepina apresenta oito formas polimórficas conhecidas e outras formas pseudopolimórficas já foram reportadas na literatura. Dentre as oito formas polimórficas, quatro delas já foram bem caracterizadas: a forma I (triclínica), forma II (trigonal) e formas III e IV (ambas monoclinicas)⁴⁵. A forma III é a forma mais estável termodinamicamente, porém em condições normais pode ser hidratada pela umidade do ambiente. A carbamazepina quando hidratada apresenta características de dissolução e solubilidade menores do que sua forma anidra⁴⁶.

O grupo carboxiamida presente na estrutura da molécula pode apresentar interações químicas contendo uma ligação de hidrogênio e formar dímeros em todas as suas formas polimórficas⁴⁷. Este sinton presente no grupo carboxiamida também é utilizado para se combinar com diversos outros fármacos realizando sinton para a formação de cocrystal farmacêuticos.

1.3.2. Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBP) [C₁₃H₁₈O₂ – ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoico] (Figura 1.8) é um anti-inflamatório não esteroide largamente utilizado como antipirético, agente analgésico e no tratamento de artrites. Ele apresenta um carbono assimétrico, podendo assumir duas formas ópticas diferentes. Geralmente, o processo de separação de espécies quirais são métodos caros e difíceis de serem realizados. Por isso, o ibuprofeno comercializado é uma mistura racêmica (R/S), sendo que apenas o enantiômero (S) é biologicamente ativo.

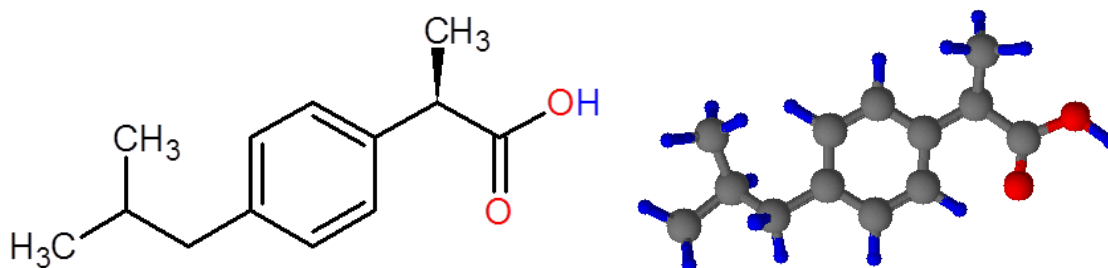


FIGURA 1.8 – Estrutura química da molécula de Ibuprofeno

Por ser um composto apolar e hidrofóbico, o ibuprofeno possui baixa solubilidade em sistemas aquosos, e por tanto, baixa biodisponibilidade⁴⁸. Entretanto, uma vez solubilizado o ibuprofeno, é rapidamente absorvido pelo corpo. Logo, o fármaco é classificado como tipo II pela BCS, categoria que enquadra fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade⁴⁹.

O grupo carboxílico do ibuprofeno possibilita ligações heterosínton com outros fármacos que apresentam agrupamentos amida ou nitrogênios aromáticos⁵⁰.

1.3.3. Nicotinamida

Nicotinamida (NCT) [C₆H₆N₂O – piridina-3-carboxamida] (Figura 1.9) ou niacinamida é a amida produzida *in vivo* a partir do ácido nicotínico (vitamina B3). É uma molécula do grupo das vitaminas B que apresenta alta solubilidade em água. Este fármaco é bastante utilizado em sistemas bioquímicos para a formação de NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) e NADP (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) que são utilizados como coenzimas de diversas reações bioquímicas⁵¹.

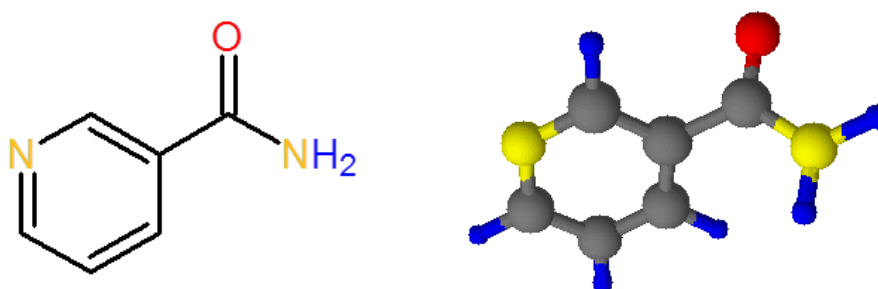


FIGURA 1.9 – Estrutura química da molécula de nicotinamida

O grupo amida, em sua estrutura, possibilita a formação de uma ligação homosínton na amida da carbamazepina e uma ligação heterosínton no grupo carboxílico do ibuprofeno⁵². A nicotinamida atuará como formadora do esqueleto molecular de cada cocristal, aumentando a solubilidade dos princípios ativos em estudo.

1.4. Cocrystal de Carbamazepina-Nicotinamida

A carbamazepina é um fármaco com baixa solubilidade em água, além de apresentar 8 formas polimórficas bem conhecidas⁵³. O grupo carboxamida presente na molécula da carbamazepina forma interações do tipo homosínton gerando dímeros nos cristais da molécula.

Portanto, torna-se possível o uso de interações do tipo homosínton e heterosínton no grupamento carboxamida com outras moléculas orgânicas que apresentam alta solubilidade em água com o intuito de melhorar as propriedades dissolutivas deste princípio ativo. Os coformadores mais estudados são a sacarina e a nicotinamida, sendo que para cada coformador foi possível observar uma taxa de solubilidade de 2,6 e 152 vezes maior do que para o API puro, respectivamente¹⁸.

No motivo cristalográfico do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida, é possível observar a presença de um dímero da carbamazepina envolto por dímeros da nicotinamida (Figura 1.10). A carbamazepina se organiza na forma de barco e o cristal apresenta um motivo cristalográfico com estrutura monoclinica⁵⁴.

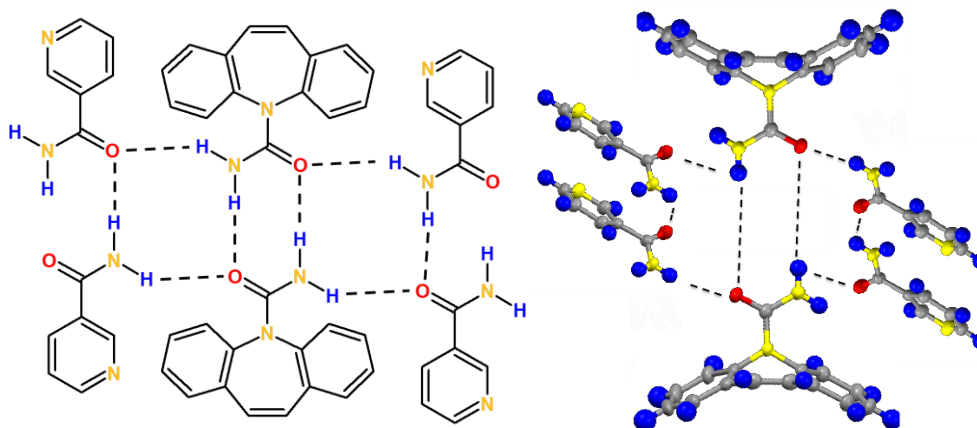


FIGURA 1.10 – Cocrystal de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT)

Os métodos mais utilizados para a formação deste cocrystal são:

- evaporação lenta, utilizando como solventes: DMSO: metanol⁵³, acetonitrila, etanol⁵⁵;
- reação de cristalização, utilizando os solventes: etanol⁵⁶⁻⁵⁸, 2-propanol, acetato de etila⁵⁴, água^{59,60} e metanol⁶¹;
- método da cristalização por fusão acompanhada por microscopia ótica⁶² (*hot stage*);

- SDG acompanhado por um microscópio óptico, utilizando diversos solventes orgânicos tais como: água, clorofórmio, etanol, acetato de etila e 2-propanol⁵⁶;
- e por métodos mecanoquímicos: utilizando um pistilo^{28,63}, moinho de bolas⁶⁴, criomoagem⁵⁵ e utilizando uma extrusora mecânica^{26,65}.

Dentre os polimorfos da carbamazepina, a forma dihidratada é uma das mais problemáticas para a indústria farmacêutica, pois apresenta uma menor taxa de dissolução. Esta forma polimórfica pode ser facilmente obtida com pequenas quantidades de água⁶⁶. Assim, vários estudos, tentaram monitorar a reação de formação de cocristais de carbamazepina em água. Em 2006, Rodríguez-Hornedo e colaboradores estudaram a reação de cristalização da carbamazepina-nicotinamida por conversão em suspensão, utilizando etanol e água como solvente a temperatura ambiente. Com uma sonda de Raman, os autores obtiveram perfis de formação do cocrystal acompanhando o deslocamento de pico referente ao espectro de carbamazepina pura⁵⁶.

Mais tarde, Rodríguez-Hornedo *et.al.* estudou a degradação do cocrystal de CBZ-NCT mediante estocagem em altas temperaturas. Os autores observaram que, na presença de um agente deliquescente (DCPD – $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em comprimidos que continham nicotinamida e carbamazepina puros, formou-se espontaneamente cocristais após um período de 22 dias (temperatura = 40 °C)⁶⁰. A água formada pela desidratação do DCPD atua como solvente na formação dos cocristais. O mesmo teste a 60 °C mostrou a formação de cocrystal em apenas 12 horas. Afirmando, a alta estabilidade dos fármacos na forma de cocristais. Entretanto, mesmo sendo possível acompanhar a reação e obter diferentes mecanismos de formação, os autores não obtiveram um alto rendimento da reação quando realizada em água.

1.5. Cocrystal de Ibuprofeno-Nicotinamida

O ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal de classe II (de acordo com a BCS) que apresenta baixa solubilidade em água⁶⁷. A adição de moléculas solúveis em água no arranjo cristalino do ibuprofeno é uma alternativa para melhorar sua solubilidade, e portanto, a biodisponibilidade deste fármaco⁶⁸.

Um cocrystal que apresenta diversos estudos na literatura é o cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida. A parte central de cada motivo cristalográfico é um dímero da nicotinamida, na qual há uma ligação homosínton entre as amidas de cada molécula de nicotinamida. O ibuprofeno realiza uma ligação heterosínton entre o ácido carboxílico e o anel piridinico da nicotinamida⁶⁹ (Figura 1.11).

O ibuprofeno é um princípio ativo que se apresenta em duas formas enantioméricas, sendo que apenas a sua forma levógira (ibuprofeno-S) é bioativo. Cada enântiômero do ibuprofeno apresenta uma estrutura cristalina diferente. Este padrão se repete quando cocrystalizada com a nicotinamida, ou seja, o cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida apresenta um polimorfismo estrutural⁶⁸⁻⁷⁰. A forma racêmica do ibuprofeno (R/S) apresenta-se na forma ortorômbica, enquanto que a forma S demonstra uma estrutura cristalina tipicamente monoclínica⁵².

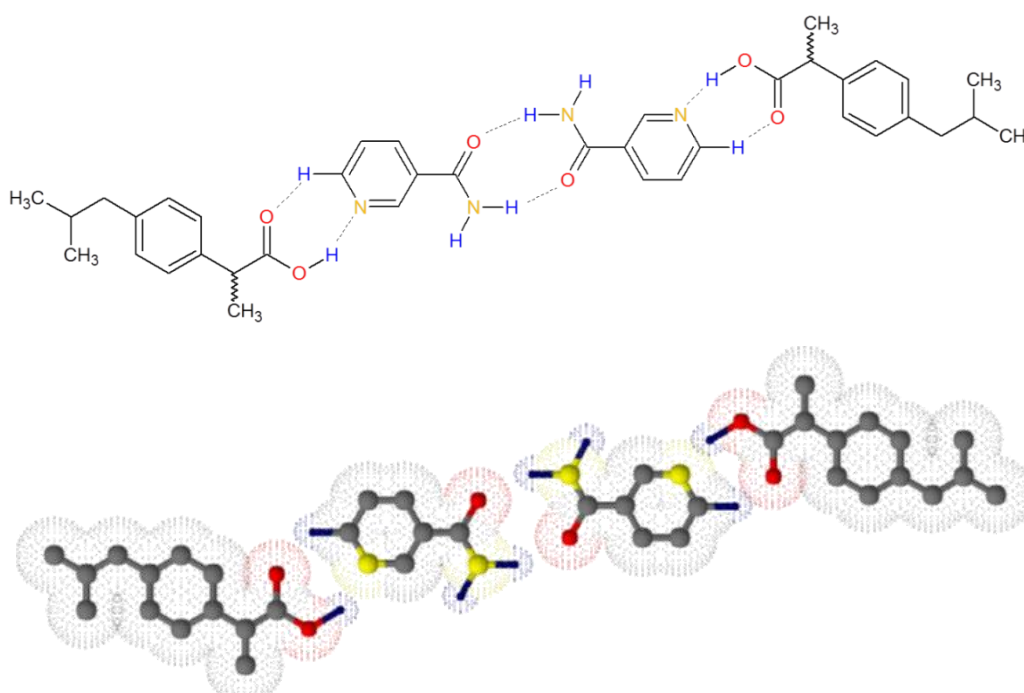


FIGURA 1.11 – Cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT)

Alguns estudos demonstraram que a interação de moléculas de nicotinamida no motivo cristalográfico do ibuprofeno altera a biodisponibilidade e estabilidade mecânica deste princípio ativo⁷¹. Testes de solubilidade demonstraram que a solubilidade do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT) é 7,5 vezes maior do que a solubilidade do cristal de ibuprofeno puro⁷², aumentando de maneira efetiva a solubilidade de um princípio ativo de classe II.

Os métodos mais utilizados para a formação deste cocrystal são através de:

- evaporação lenta, utilizando como solventes: acetonitrila^{68,69}, nitrometano⁶⁹, acetato de metila⁶⁹, acetona⁵², etanol⁵² e metanol⁵²;
- evaporação forçada com um rotoevaporador⁷¹
- método de cristalização por fusão acompanhada por microscopia ótica⁵²;
- e por métodos mecanoquímicos: utilizando um pistilo⁶⁸, moinho de bolas⁶⁹ e utilizando uma extrusora mecânica^{26,65}.

A partir do cocrystal formado, as técnicas de estado sólido utilizadas para a caracterização do material são: análise termogravimétrica (TGA)⁷¹, calorimetria exploratória diferencial (DSC)^{26,69-72}, difração de raios X (DRX) em pó^{26,52,68-72} e de monocristal^{52,68}, infravermelho médio (IR)^{68,71,72} e próximo (NIR)⁶⁵, ressonância magnética nuclear (NMR) de estado sólido^{70,72}, microscopia ótica⁵² e microscopia eletrônica de varredura²⁶.

O primeiro trabalho reportado usando cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida voltado para o monitoramento de reações foi desenvolvido por Kelly et. al.⁶⁵. Os autores realizaram um monitoramento off-line, usando espectroscopia NIR, da formação de cocrystal de nicotinamida e ibuprofeno utilizando o método de prensa extrusora com aquecimento. Os autores obtiveram altos níveis de pureza do produto (chegando a 99%) alterando variáveis como velocidade de rotação e aumento de temperatura da extrusora⁶⁵. Anteriormente, os autores já haviam demonstrado as propriedades do cocrystal obtido a partir da técnica de prensa extrusora²⁶.

1.6. Métodos de caracterização

Devido à grande quantidade de formas cristalinas que são obtidas a partir de um único produto cristalino, torna-se necessário o estudo destes cristais no estado sólido. Por isso, não é possível a utilização da técnica analítica mais utilizada no âmbito farmacêutico, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*), uma vez que ao solubilizar estes compostos, perde-se toda a informação estrutural atrelada ao composto.

Desta maneira, a caracterização destes produtos farmacêuticos fica restrita a técnicas analíticas do estado sólido, onde a amostra ou a matriz analisado apresenta-se no estado sólido. Diversos métodos podem ser utilizados para tal fim, onde

geralmente, emprega-se uma combinação de técnicas para a confirmação e maior compreensão das propriedades dos compostos obtidos.

Diversos métodos de caracterização são utilizados para a caracterização de cocristsais farmacêuticos, tais como: TGA⁷³, DSC⁷⁴, DRX em pó⁷⁵ e de monocristal⁷⁶, MIR⁷⁷, NIR⁷⁸, espectroscopia Terahertz⁷⁹, espectroscopia Raman⁸⁰, RMN de estado sólido⁸¹, microscopia óptica⁸², microscopia eletrônica de varredura (MEV)⁸³ e microscopia eletrônica de transmissão (MET)⁸⁴.

Na presente dissertação serão utilizadas as técnicas de difração de raios-X, calorimetria exploratória diferencial, infravermelho médio e a espectroscopia Raman.

1.6.1. Difração de Raios-X (DRX)

A difração de raios-X é uma das técnicas mais utilizadas para a determinação de diferentes estruturas cristalinas. Esta técnica consegue distinguir de maneira fácil a presença de um novo motivo cristalográfico, seja este, um polimorfo, solvato, sal ou cocrystal. É um método de análise não-destrutivo e que apresenta padrões de difração únicos para cada estrutura. Porém, é uma metodologia que demanda certo tempo de análise sendo mais difícil sua implementação em sistemas de PAT. Além disso, a análise quantitativa só pode ser realizada com adição de padrão interno ou análise de misturas, e seus dados apresentam problemas de orientação preferencial dos cristais que dificulta a análise quantitativa.

O fenômeno de difração ocorre quando a radiação emitida colide com obstáculos organizados de tamanho próximo ao comprimento de onda emitido. Os raios-X gerados na análise de difratometria apresentam comprimentos de onda na faixa de 0,5 – 2,5 Å. Como os cristais analisados apresentam uma distância interatômica de mesma ordem do comprimento de onda, é possível observar o fenômeno da difração⁸⁵.

Quando o feixe de raios-X incide na superfície de um cristal, parte do feixe é espalhado e parte penetra na segunda camada de átomos. Na segunda camada, novamente, uma parte do feixe é espalhada e uma parte penetra a terceira camada de átomos, e assim por diante⁸⁶. Considerando, apenas a quantidade de radiação espalhada pelos cristais, como na Figura 1.12 é possível compreender de maneira eficaz o fenômeno da difração e como ela implica na formação de um difratograma.

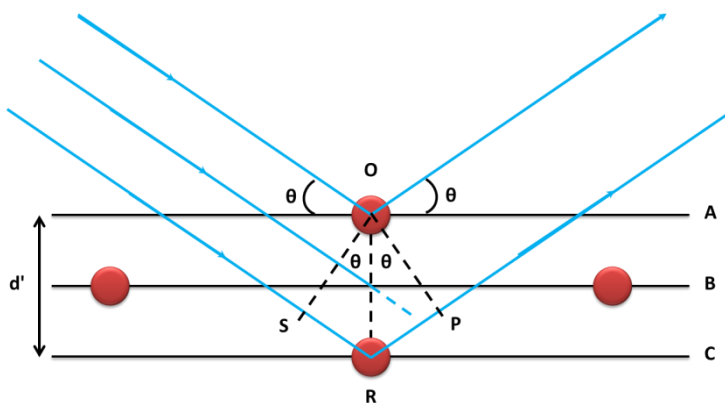


FIGURA 1.12 – Plano de difração, de um equipamento de raios-X

O feixe de raio-X espalhado pelos átomos forma um ângulo θ , com o átomo e com o feixe incidente. A distância entre dois átomos, onde o feixe irá espalhar é d' . Para que o fenômeno da difração ocorra, os feixes terão que ser espalhados por dois planos subsequentes (A e C). Ou seja, se a diferença entre seus caminhos ópticos (δ) for um número inteiro (n) do comprimento de onda irradiado (λ):

$$\delta = n\lambda \quad (1.1)$$

Então, haverá superposição construtiva e um feixe do raio-X será observado. Entretanto, se n for diferente de um número inteiro (A e B), haverá uma superposição destrutiva, e não será possível observar um feixe do raio-X⁸⁷.

A distância entre os caminhos ópticos será:

$$\delta = \overline{SR} + \overline{RP} = 2\overline{RP} \quad (1.2)$$

Assim, por trigonometria e as equações 1.1 e 1.2, é possível observar que:

$$\begin{aligned} \frac{\delta}{2} &= \overline{OR} \sin \theta \\ \delta &= 2d' \sin \theta \\ n\lambda &= 2d' \sin \theta \end{aligned} \quad (1.3)$$

A equação 1.3, conhecida como lei de Bragg, é a equação que rege a difração de raios-X, e a partir dela, é possível determinar a estrutura cristalográfica da amostra, onde o parâmetro d' é dependente de valores inteiros h , k e l que descrevem espacialmente a célula unitária. Estes valores são conhecidos como índices de Miller e a combinação deles descrevem o tipo de face cristalográfica do cristal⁸⁸.

Assim, o equipamento de difração de raios-X não mede as linhas de difração, mas a quantidade de fótons difratados pela amostra em determinado ângulo, onde

este ângulo ocorre entre a fonte de raios-X e o detector. A Figura 1.13 apresenta uma representação esquemática do tipo mais comum de difratômetro de raios-X.

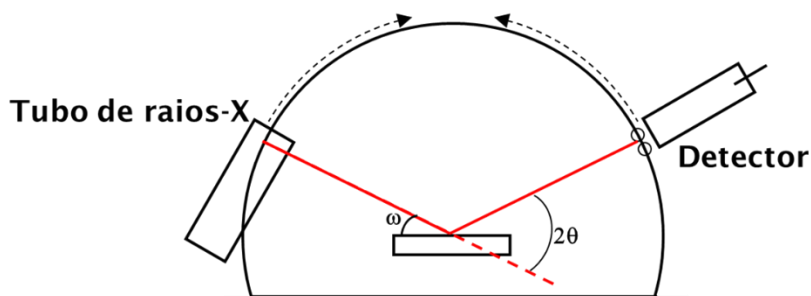


FIGURA 1.13 – Representação básica de um equipamento de DRX

Os raios-X gerados na fonte são incididos na amostra presente no centro do equipamento, dependendo do arranjo cristalino e da organização dos cristais presentes no amostrador, a radiação incidente é difratada para diversos ângulos. Os fótons difratados no ângulo 2θ , que chegam ao detector, são convertidos em sinal coletado representado pela intensidade no difratograma.

Para realizar a varredura dos ângulos difratados, é necessário uma mudança na posição do detector, ou da fonte de raios-X. O goniômetro é um componente central do difratômetro de raios-X que é responsável por alterar o ângulo de difração. Hoje em dia, existem equipamentos com multicanal, onde vários detectores são posicionados em diferentes ângulos de difração.

1.6.2. Calorimetria exploratório diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial é um método de caracterização baseado no calor de reação envolvido em diferentes eventos térmicos. Para a indústria farmacêutica, o DSC é utilizado principalmente para obter as temperaturas de fusões dos princípios ativos e assim determinar o seu grau de pureza. É uma técnica que pode ser usada para obter dados tanto qualitativos quanto quantitativos, uma vez que o calor de reação é diretamente proporcional à massa do composto analisado. Entretanto, por ser uma técnica destrutiva, os eventos de fusão atrapalham de forma significativa a análise de misturas, principalmente quando a mistura é constituída pelo mesmo composto em estruturas cristalinas diferentes.

Além do DSC, outras análises térmicas são bastante utilizadas para análises farmacêuticas, entre elas: o DTA (do inglês, *Differential Thermal Analysis*), que mede a variação de temperatura da amostra em relação ao material de referência e a HSM

(do inglês, *Hot-stage microscopy*) que acompanha as mudanças morfológicas da amostra⁸⁹.

O equipamento utilizado para análises de calorimetria diferencial apresenta dois arranjos mais comuns: o DSC por fluxo de calor e por compensação de potência. Porém, ambos têm como finalidade medir variações de entalpia ocorridas no processo de aquecimento ou resfriamento da amostra.

Os dois equipamentos são bem similares, com a única diferença no arranjo do aquecedor. Nos equipamentos de compensação de potência, utiliza-se aquecedores elétricos (fornos) individuais para a amostra e a referência (Figura 1.14a). Enquanto, nos equipamentos de fluxo de calor é um arranjo mais simples, onde a referência e a amostra encontram-se no mesmo forno (Figura 1.14b)^{90,91}.

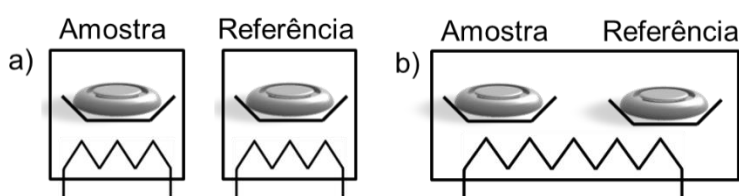


FIGURA 1.14 – Representação esquemática da célula de aquecimento das duas configurações de DSC: a) Por compensação de potência e b) por fluxo de calor

No DSC por compensação de calor, a diferença de temperatura entre a amostra e a referência é mantida a zero variando a quantidade de potência necessária para manter a diferença de temperatura. A potência medida é referente às mudanças da entalpia ou capacidade calorífica que a amostra sofre em diferentes temperaturas⁹².

No DSC por fluxo de calor, a referência e a amostra encontram-se em uma placa metálica com alta condutividade térmica, que possibilita um bom fluxo de calor entre a amostra e a referência. As mudanças ocorridas na amostra geram uma diferença de temperatura entre os amostradores, que resulta em uma diferença no fluxo de calor, captados por termopares localizados abaixo dos amostradores. Um aumento no fluxo de calor é referente a um evento exotérmico, e uma diminuição é referente a um evento endotérmico⁹¹.

Os equipamentos por fluxo de calor apresentam maior sensibilidade, sendo mais utilizados para análises quantitativas e para caracterização de novos materiais. Enquanto o DSC por compensação de potência gera respostas em menos tempo e com maior resolução, tornando-se um equipamento apropriado para estudos cinéticos⁸⁶.

A Figura 1.15 apresenta algumas das mudanças na linha de base e picos característicos das curvas de DSC. Eventos térmicos que geram mudanças na curva podem ser transições de primeira ou segunda ordem. Eventos de primeira ordem geram picos na curva e podem ser endotérmicos (fusão, perda de massa, dessorção ou redução) ou exotérmicos (cristalização, polimerização, cura, oxidação, degradação oxidativa e adsorção). As transições de segunda ordem caracterizam-se pela variação de capacidade calorífica do material e geram um deslocamento da linha de base como a transição vítrea.

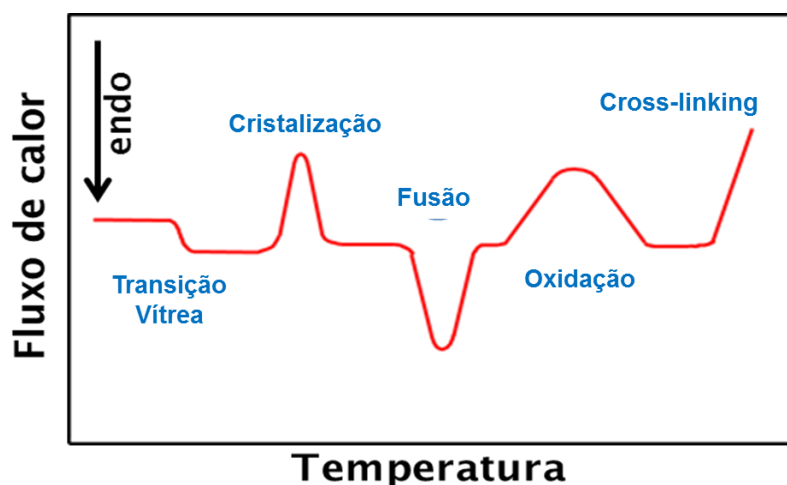


FIGURA 1.15 – Representação esquemática de uma curva de DSC genérica demonstrando os principais eventos térmicos detectados pelo equipamento

1.6.3. Espectroscopia de infravermelho médio (MIR)

A espectroscopia do infravermelho, assim como a Raman, apresenta uma grande quantidade de informação devido às ligações e interações químicas. É um método de análise rápido, não destrutivo e quando acoplada ao acessório reflectância total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*) não necessita de preparo da amostra. Em contrapartida, análises por pastilhas de KBr podem induzir a transformações polimórficas ou outras transformações no estado sólido.

No espectro eletromagnético, a região do infravermelho apresenta comprimentos de onda maiores do que a região ultravioleta (800 nm) e menores do que a região de micro-ondas (1 mm). A região do infravermelho pode ser subdividida em três diferentes regiões do espectro, de acordo com o tipo de transição mais usual de cada região.

O infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*) apresenta vibrações harmônicas e sobretons, e está contido na região de 800 nm até 2500 nm, ou em

número de onda de 14000 cm^{-1} até 4000 cm^{-1} . O infravermelho médio (MID, do inglês *mid infrared*), compreendido entre $2,5 - 25\text{ }\mu\text{m}$, ou 4000 até 400 cm^{-1} , nesta região é possível observar movimentos do tipo vibracional e vibracional-rotacional. Na região de $25 - 1000\text{ }\mu\text{m}$, é possível observar majoritariamente movimentos do tipo rotacional e vibracional de compostos inorgânicos, essa região é conhecida como infravermelho distante (FAR, do inglês *far infrared*)⁹³.

O infravermelho próximo, por ser obtido a partir de vibrações harmônicas e sobretons, apresenta informações químicas de uma forma não diretamente interpretável, sendo necessária a utilização de métodos quimiométricos no tratamento dos dados. Assim, o NIR têm sua maior aplicação em análises quantitativas. O infravermelho distante apresenta uma gama de aplicações em sistemas inorgânicos, uma vez que movimentos de estiramento e deformação de complexos metálicos ocorrem abaixo de 650 cm^{-1} .⁹⁴

O infravermelho médio é a região com muitas aplicações químicas, tanto para análises qualitativas na identificação e elucidação de estruturas, quanto para análises quantitativas de diversos compostos orgânicos. Os movimentos vibracionais mais comuns na região do infravermelho médio são os movimentos de deformação e de estiramento. As vibrações de estiramento ocorrem na região de menor energia do espectro infravermelho, e as vibrações de deformação na região mais energética. A Figura 1.16 apresenta os movimentos vibracionais da água e a diferença entre movimentos de deformação e de estiramento⁹⁵.

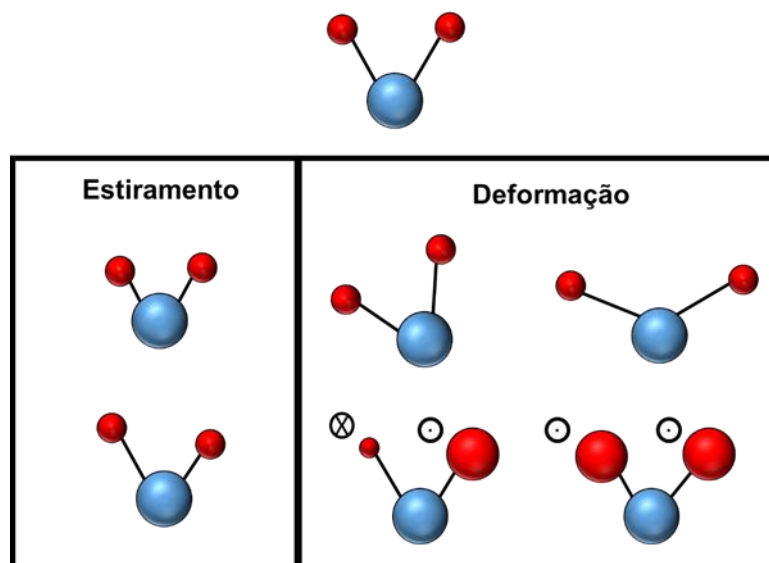


FIGURA 1.16 – Movimentos vibracionais de estiramento e de deformação da molécula da água

Atualmente, duas configurações de equipamentos de infravermelho são comumente encontradas: equipamentos dispersivos e equipamentos com transformada de Fourier (FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared*). Os equipamentos dispersivos apresentam uma instrumentação óptica mais simples, porém os espectrômetros com transformada de Fourier possibilitam a aquisição de vários espectros em um curto intervalo de tempo, melhorando a razão sinal/ruído do equipamento e também a resolução espectral⁹⁶.

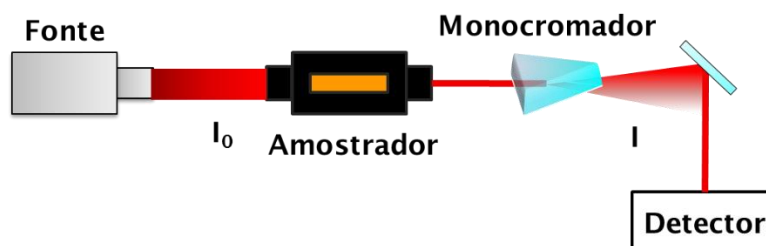


FIGURA 1.17 – Representação esquemática de um equipamento de Infravermelho dispersivo

A Figura 1.17 apresenta um espectrômetro de infravermelho dispersivo. O equipamento consiste em quatro componentes básicos: a fonte de radiação, a célula de amostragem, o monocromador e o detector. Alguns equipamentos são munidos de um feixe duplo com o intuito de diminuir possíveis interferências, como CO₂ e H₂O.

A fonte consiste em um sólido inerte que é aquecido eletricamente a temperaturas de 1000 a 1800 °C, gerando radiação no infravermelho. Esta radiação entra em contato com a amostra, parte da radiação é absorvida pelos movimentos vibracionais das moléculas do analito, e a parte não absorvida passa por um monocromador. O monocromador é o componente que difere os equipamentos dispersivos, dos equipamentos com transformada de Fourier. Nos equipamentos dispersivos, o monocromador é composto por uma rede de difração e filtros com seletores de comprimentos de onda. A rede de difração varia lentamente o comprimento de onda da radiação que chega ao detector, possibilitando obter valores de absorbância relativos ao espectro de infravermelho para cada comprimento de onda separadamente, porém com um alto tempo de análise⁸⁶.

A Figura 1.18 apresenta um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier. Os equipamentos de FT-IR apresentam, como grande desvantagem, o fato de possuírem uma mecânica óptica mais complexa e menos robusta do que os equipamentos dispersivos (somente um espelho se movimenta durante a análise),

além de fornecer espectros em menos de um segundo. Esse aumento na velocidade de varredura do espectro é possível graças ao interferômetro de Michelson. O interferômetro é construído por dois espelhos, um móvel e outro fixo, e um divisor de feixes. A radiação proveniente da fonte atinge o divisor de feixe e é parcialmente dirigida para os dois espelhos. O espelho móvel se move com velocidade constante fazendo com que haja flutuações na potência da radiação emitida. Os feixes dos dois espelhos são recombinados com diferentes padrões de máximos e mínimos como resultado obtêm-se um interferograma. O interferograma é decodificado em um espectro de transmitância realizando-se a transformada de Fourier⁹⁷.

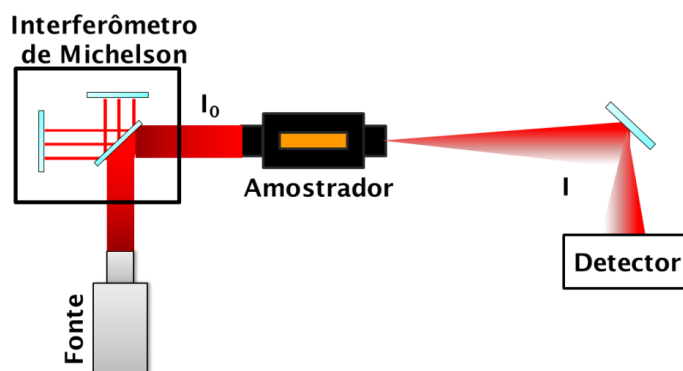


FIGURA 1.18 – Representação esquemática de um equipamento de Infravermelho com transformada de Fourier

Em ambas configurações de equipamentos, é possível coletar informação espectral para amostras sólidas, líquidas e gasosas. Para análises em estado sólido, os dois métodos principais de análise são por pastilhas de KBr e acessório de refletância total atenuada (Figura 1.19).



FIGURA 1.19 – Principais sistemas de compartimento de amostra utilizado em equipamentos de infravermelho médio

Vidros e plásticos absorvem em quase toda a região do espectro infravermelho, assim, os amostradores utilizados como suporte para a amostra devem ser feitos de substâncias iônicas, como por exemplo o brometo de potássio. Embora seja um método barato, demanda tempo de preparo, e mais especificamente em produtos

farmacêuticos é possível ocorrer reações de estado sólido ao prensar a amostra, levando a uma informação espectral equivocada.

Uma alternativa para evitar o preparo da amostra é o uso do acessório de reflectância total atenuada (ATR, do inglês *attenuated total reflectance*). Um acessório de ATR opera medindo as mudanças que ocorrem em um feixe infravermelho refletido internamente num cristal, quando o mesmo entra em contato com uma amostra. A radiação no infravermelho é refletida internamente no cristal do acessório, formando uma onda evanescente entre o cristal e a amostra. Parte da energia evanescente é absorvida pelas moléculas da amostra, resultando no espectro de absorção no infravermelho, similar ao obtido por pastilha de brometo de potássio⁹⁸.

1.6.4. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica comumente usada para identificar arranjos cristalográficos de diversos princípios ativos. É uma técnica rápida, não destrutiva, além de apresentar uma grande quantidade de informação química e limites de detecção mais baixos do que o DRX e o DSC, sendo utilizada em amostras reais de comprimidos devido principalmente ao seu poder de penetração do laser na amostra. Entretanto, uma limitação ocorre para amostras que apresentam fluorescência e amostras com cores intensas.

Quando a radiação interage com a matéria, os fótons são absorvidos ou espalhados pelo material. Quando há absorção, a energia contida no fóton leva a molécula a um estado eletrônico-vibracional-rotacional maior que o seu estado basal e esta retorna ao estado fundamental através de fenômenos como: relaxamento não-radiativo, fluorescência e/ou fosforescência⁹⁹. Quando a radiação é espalhada, a luz incidente colide com a matéria e dispersa (espalha) em dois tipos de espalhamentos podem ocorrer, o espalhamento elástico e o espalhamento inelástico.

O espalhamento elástico ocorre quando os fótons espalhados apresentam a mesma energia e, portanto, o mesmo comprimento de onda que os fótons incididos. Este tipo de espalhamento é conhecido como espalhamento Rayleigh. Entretanto, uma pequena parte dos fótons pode apresentar uma energia maior ou menor em relação ao fóton incidente. Este fenômeno é denominado espalhamento Raman¹⁰⁰.

O fenômeno de espalhamento Raman foi primeiramente previsto por Smekal em 1923¹⁰¹ e comprovado teoricamente por Kramers e Heisenberg em 1925^{102,103}. Mas somente em 1928, Chandrasekara Venkata Raman observou experimentalmente

o efeito que receberia seu nome¹⁰⁴. A Figura 1.20 representa os dois tipos de espalhamento mais comuns, o espalhamento Rayleigh e o espalhamento Raman.

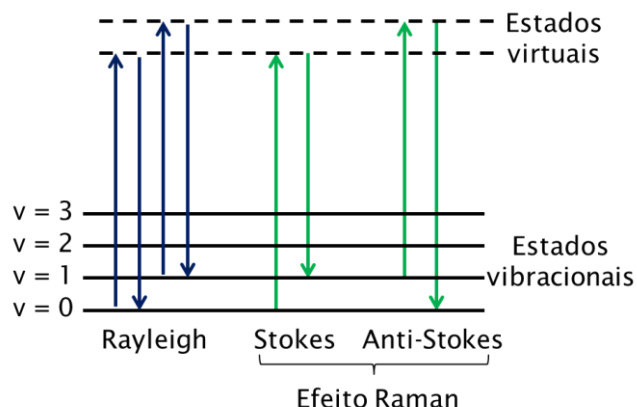


FIGURA 1.20 – Representação do espalhamento Rayleigh e os espalhamentos inelásticos: Stokes e o Anti-Stokes

O espalhamento Rayleigh é o mais comum e ocorre com maior frequência enquanto o espalhamento Raman ocorre em menos de 0,0001% dos fótons irradiados¹⁰⁵. Dentro do espalhamento Raman, é possível observar um decréscimo na energia do fóton espalhado, conhecido com espalhamento Stokes, ou um aumento da energia do fóton, o espalhamento Anti-Stokes.

O espalhamento Stokes ocorre a partir da interação entre a radiação emitida e a molécula que se encontra no estado basal, enquanto o espalhamento Anti-Stokes ocorre pela interação entre a radiação e uma molécula no estado excitado. Como a maioria das moléculas estão presentes no seu estado basal nas condições ambientes de temperatura, a ocorrência do espalhamento Stokes é muito maior do que a Anti-Stokes, e por isso é o mais utilizado na espectroscopia Raman.

A espectroscopia Raman é baseada no espalhamento inelástico entre os fótons emitidos pela fonte de radiação e a molécula analisada. Mesmo em moléculas onde é possível observar uma excitação vibracional, o efeito Raman ocorre a partir da variação do momento de dipolo da molécula a partir do campo elétrico induzido pela radiação monocromática¹⁰⁶.

A radiação espalhada produz uma oscilação no dipolo induzido da molécula. Este dipolo induzido resulta em uma alteração na polarizabilidade da molécula, ou seja, na capacidade de deformação da nuvem eletrônica da molécula a partir de um campo eletromagnético. As ligações (ou interações) químicas que sofrem mudanças na sua polarizabilidade são tidas como regiões ativas no espectro Raman⁹³.

Logo, para que uma ligação química seja ativa na espectroscopia Raman, é necessário que a radiação incidente realize uma mudança na polarizabilidade da molécula. Diferente da espectroscopia no infravermelho, este efeito pode ocorrer tanto em moléculas heteronucleares quanto em moléculas homonucleares, uma vez que o efeito de polarizabilidade ocorre em ambos os casos.

No espalhamento Stokes, o fóton irradiado de energia $h\nu_0$ doa parte de sua energia para a molécula na qual colide. Assim, a energia do fóton é reduzida para $h(\nu_0-\nu)$. O espalhamento Anti-Stokes ocorre de maneira análoga, porém com um aumento energético. O fóton espalhado recebe parte da energia da molécula e apresenta um aumento na sua energia $h(\nu_0+\nu)$. A diferença de energia entre o fóton incidente e o espalhado resulta da origem ao deslocamento Raman, sendo essa diferença de energia relativa a transições de níveis vibracionais moleculares, normalmente entre 100 e 4000 cm^{-1} .

Portanto, as bandas e picos espectrais obtidos pelo espalhamento Raman são sempre deslocados por uma frequência constante. Deste modo, cada molécula apresenta um espectro Raman único, que permite a identificação de modos vibracionais da molécula, que podem ser consideradas sua “impressão digital”¹⁰⁷.

Assim como o infravermelho, o Raman apresenta duas configurações básicas de equipamento, o Raman dispersivo e com transformada de Fourier (FT-Raman). As vantagens e desvantagens de cada equipamento são as mesmas descritas previamente para o MIR. Entretanto, devido à espectroscopia Raman utilizar radiação de 200 a 1064 nm na amostra, instrumentos que utilizam dispersão são mais comuns, pois possibilitam um maior espalhamento Raman, sendo que o FT-Raman é utilizado somente com lasers acima de 1000 nm.

Um equipamento Raman consiste em lasers como fonte de excitação do espalhamento Raman, um monocromador ou interferômetro (dependendo do tipo de equipamento), a célula de amostra e um detector. O tipo de detector e a ótica utilizada no equipamento depende do tipo de laser empregado na fonte⁹³.

Os lasers utilizados como fonte de excitação na espectroscopia Raman variam do ultravioleta (UV) até o infravermelho próximo. A quantidade de fótons espalhados de maneira inelástica variam à quarta potência em relação à energia da fonte. Lasers na região do UV-visível, geralmente constituídos de íons argônio ou de criptônio, geram um grande espalhamento Raman. Porém, como são muito energéticos, podem

promover a excitação eletrônica da molécula analisada e produzir fluorescência de fundo, um dos principais problemas da espectroscopia Raman⁸⁶.

Em contra partida, lasers na região do infravermelho próximo, como laser de diodo ou de ítrio-alumínio-garneto ($Y_3Al_5O_{12}$) dopado com neodímio (Nd:YAG), apresentam menor quantidade de espalhamento Raman, mas não apresentam emissões significativas de fluorescência de fundo. Outra vantagem deste tipo de laser é a possibilidade de aplicar uma alta potência na amostra (acima de 300 mW) sem que haja a degradação da mesma, desde que essa não absorva a radiação incidida¹⁰⁸.

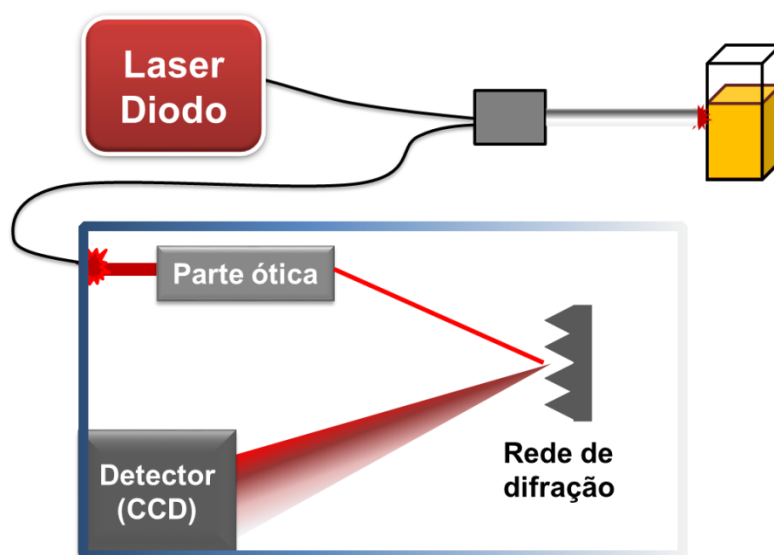


FIGURA 1.21 – Representação esquemática de um equipamento de espectroscopia Raman dispersivo com sonda.

Um acessório bastante utilizado na espectroscopia Raman, é a microssonda. Com a microssonda, é possível obter espectros Raman em sistemas de reação, análises de campo e produtos comerciais, sem a necessidade de se retirar o produto da embalagem. Geralmente, os equipamentos com sonda são instrumentos dispersivos, pois a rede de difração ocupa menos espaço do que o interferômetro de Michelson, tornando-se um equipamento menor e portátil¹⁰⁹. A Figura 1.21 apresenta a configuração de um equipamento dispersivo com sonda.

1.7. Tecnologia Analítica em Processo (PAT)

Nas indústrias farmacêuticas, as técnicas de análise de fármacos, inclusive as técnicas de estado sólido, são empregadas no sistema de batelada, onde ao final de cada etapa do processo o produto farmacêutico é avaliado. Entretanto, fatores

externos e variáveis do sistema podem resultar em falhas no processo, necessitando de um reprocessamento do produto e um maior tempo de batelada.

Como alternativa a esses processos, foi desenvolvida a tecnologia analítica em processos (do inglês, *Process Analytical Technology, PAT*), que consiste em análises químicas ou físicas dos materiais realizadas durante a corrente do processo, utilizando analisadores pontuais¹⁰⁹. A agência americana de administração de drogas e alimentos (do inglês, *United States Food and Drug Administration, US. FDA*) lançou, em 2004, um guia para indústrias farmacêuticas aconselhando o uso e desenvolvimento de ferramentas do PAT em seus processos industriais¹¹⁰.

O uso destas ferramentas analíticas de processo é cada vez mais utilizado e estudado em diversas etapas dos processos farmacêuticos, entre elas estão: etapas de cristalização^{111,112}, perfil de dissolução¹¹³, liberação controlada¹¹⁴ e formação de princípios ativos¹¹⁵, compressão e formação de comprimidos¹¹⁶.

De acordo com o guia da FDA, a principal manufatura nas indústrias farmacêuticas é baseada no processo em batelada, com coletas regulares dos materiais para certificação da qualidade dos produtos¹¹⁷. Entretanto, novas tecnologias para controle de qualidade e de processos são desenvolvidas a cada dia¹¹⁸. O guia de aconselhamento da FDA tem como intuito incentivar a utilização e o desenvolvimento destas tecnologias no âmbito das indústrias farmacêuticas¹¹⁷.

O guia de aconselhamento apresenta algumas vantagens na implementação do PAT nas indústrias farmacêuticas, tais como¹¹⁹: entender os mecanismos envolvidos no processo e diminuir suas chances de falha; encontrar o ponto final da reação e diminuir os tempos de batelada aumentando a eficiência do processo; possibilitar uma análise mais apurada no planejamento do experimento, com informações precisas e seguras.

Assim, o PAT visa facilitar o desenvolvimento da tecnologia presente nos processos de controle de qualidade e de manufatura, através do entendimento dos processos envolvidos no sistema¹²⁰.

Para que estes objetivos sejam cumpridos, algumas ferramentas típicas do PAT devem ser utilizadas, tais como¹²¹:

- Uso de ferramentas multivariadas para o desenvolvimento de experimentos e análise dos dados adquiridos;
- Analisadores modernos que possibilitem análises rápidas e em tempo real;

- Ferramentas para controle de processos, como determinação do ponto final da reação ou adição de mais reagentes no meio do processo;
- Contínua melhoria no desenvolvimento e conhecimento das ferramentas supracitadas.

O uso de uma ou mais ferramentas utilizadas no PAT levam ao aumento significativo dos resultados obtidos no processo como: custo, eficiência, rendimento ou controle de qualidade dos materiais. No presente trabalho, foram utilizadas duas das principais ferramentas do PAT: a utilização de ferramentas multivariadas (a serem explicadas de forma detalhada no capítulo 2) e analisadores de processo.

1.7.1. Ferramentas Multivariadas

Nas indústrias, é necessário uma maior robustez e reprodutibilidade dos dados e dos processos empregados, devido à alta variabilidade de condições, tornando-se necessária a utilização de sistemas automatizados¹⁰⁹. A utilização da quimiometria nos sistemas analíticos de processos se deu primeiramente para extrair informações e diminuir os possíveis erros presentes nas análises.

Em 2012, Rodionova e Pomerantsev¹²² levantaram dados bibliográficos relacionados à pesquisa de artigos que utilizassem ferramentas multivariadas no âmbito do PAT entre os anos de 1993 e 2011. De acordo com os autores, os métodos quimiométricos mais utilizados como ferramenta do PAT são: a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS), análise por componentes principais (PCA), análise multivariada de imagens (MIA), e a análise de curvas multivariadas (MCR).

O PLS possibilita correlacionar dados experimentais com diferentes propriedades dos materiais, e por isso pode ser empregada em diversos processos e assim, obter diferentes características dos produtos. Isto faz com que o PLS seja a ferramenta quimiométrica mais empregada no âmbito industrial. Alguns exemplos de sua aplicação são: quantificação de princípios ativos¹²³, controle de reações de polimerização¹²⁴, granulação de excipientes e fármacos¹²⁵, interação entre excipiente e princípio ativo¹²⁶.

O PCA, assim como o PLS, tem a capacidade de ser empregado em diversos sistemas, sendo utilizado principalmente na análise exploratória dos dados. Esta ferramenta é bastante empregada para determinar dissimilaridades presentes em um processo¹²⁷. Estas dissimilaridades podem representar a presença de interferentes presentes no processo¹²⁸, ou o ponto final da reação¹²⁹.

A análise de imagens é basicamente utilizada na observação da homogeneidade dos materiais. Sua aplicação mais comum na indústria farmacêutica é a avaliação de géis e comprimidos¹³⁰. Entretanto, análises de imagens geralmente são associadas a outras ferramentas quimiométricas como o PCA e o MCR¹³¹.

A análise de curvas multivariadas é uma importante ferramenta quimiométrica que possibilita obter perfis de concentração da reação, e assim acompanhar a transformação dos substratos iniciais no produto final¹³². É uma ferramenta muito utilizada em sistemas em linha, onde é possível obter dados dos componentes presentes na reação em cada tempo de análise e assim acompanhar a formação do produto final, seja em uma reação química¹³³ ou em um processo físico¹³⁴.

1.7.2. Analisadores de processos

De acordo com o guia da FDA, os analisadores de processo são divididos em três categorias, a Figura 1.22 resume os tipos de analisadores possíveis para um processo em batelada¹³⁵:

- *At-line*: São os analisadores que necessitam de uma amostragem, ou seja, as alíquotas são retiradas do processo e levadas até o equipamento de análise. Para ser considerado um sistema “*at-line*”, o instrumento tem que estar próximo do local onde ocorre a medição, tendo como principal vantagem a simplicidade e robustez do equipamento a ser utilizado. Entretanto, estes analisadores demandam um maior tempo de análise.
- *On-line*: São analisadores que se encontram fora da corrente do processo, mas que apresentam um sistema automatizado capaz de retirar as alíquotas do sistema, realizar a medição e retornar a amostra ao processo. Diferente dos sistemas “*at-line*”, os sistemas “*on-line*” não necessitam da ação humana para a amostragem do processo. No entanto, a vantagem também pode se tornar uma limitação dependendo do tipo de sistema. A linha de amostragem tem que ser apropriada para que a alíquota retirada mantenha-se intacta e apresente uma boa representatividade do processo.
- *In-line*: de acordo com a FDA¹¹⁷, este é o tipo de amostrador ideal para ser empregado em processos químicos. Amostradores “*in-line*” realizam medidas a partir do contato direto com a corrente do processo. São subdivididos em invasivo (ocorre contato direto com a amostra) ou não-invasivo (não ocorre contato direto com a amostra) e apresentam a vantagem de obter resultados

em tempo real sem a necessidade de se retirar uma alíquota da solução. Os amostradores invasivos precisam ser resistentes, uma vez que entram em contato direto com soluções em altas temperaturas e pressões elevadas. Os amostradores não invasivos apresentam todas as vantagens dos amostradores invasivos com o benefício de não entrar em contato com a solução. Facilitando a sua manutenção e preservando a integridade da amostra presente no processo.

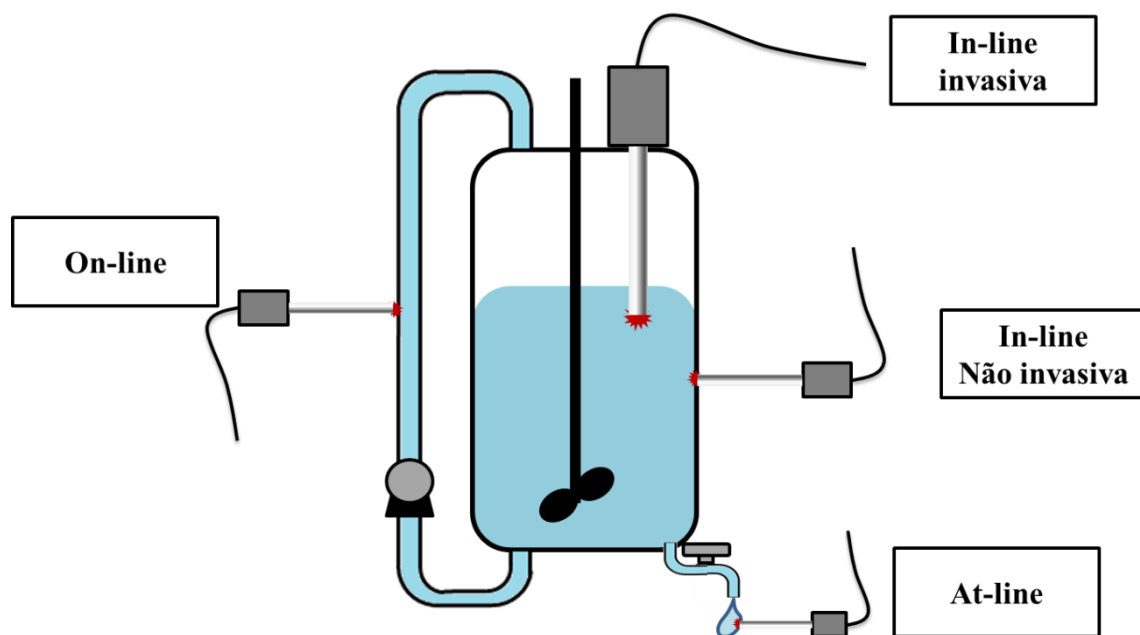


FIGURA 1.22 – Representação esquemática dos diferentes tipos de analisadores de processos segundo a classificação da FDA

No presente trabalho, utilizou-se como enfoque o uso de analisadores modernos para análises *in-line*, aliados a ferramentas multivariadas para interpretação dos dados. Para isso, utilizou-se um espectrômetro Raman com uma sonda portátil e ferramentas quimiométricas como Resolução Multivariada de Curvas (MCR) e Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS) para acompanhar processos de cocristalização de princípios ativos farmacêuticos.

CAPÍTULO 2 –MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2. MÉTODOS QUIOMÉTRICOS

2.1. Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais é utilizada quando existe colinearidade entre as variáveis estudadas na matriz de dados, ou seja, algumas variáveis apresentam as mesmas informações que outras, elas são correlacionadas¹³⁶. A partir de um determinado conjunto de dados, o PCA é capaz de conter as informações mais relevantes em um número reduzido de novas variáveis, descartando dados irrelevantes para o sistema¹³⁷.

O objetivo deste método é avaliar e reduzir a dimensão dos dados originais para: reconhecer padrões, selecionar amostras, construir modelos de calibração multivariada e obter uma visualização rápida e fácil de grupos e/ou anomalias. Desse modo, torna-se desnecessária a avaliação de todo o conjunto de dados, o que pode ser um trabalho mais demorado e propenso a erros sistemáticos.

O método baseia-se na transformação das coordenadas das variáveis originais de uma matriz dados (amostras x variáveis) em um novo eixo de variáveis ortogonais, ou seja, não correlacionadas.

A componente principal (PC) é o novo eixo que explica a maior quantidade de informação dos dados obtidos. A Figura 2.1 ilustra a transformação de um conjunto de dados que apresenta valores para três variáveis originais: x, y e z. Esta distribuição é facilmente explicada em um novo espaço de duas dimensões formado pelas novas variáveis (PC1 e PC2, sendo PC2 ortogonal a PC1), reduzindo o número de fatores analisados de 3 para 2 sem perder informação relevante.

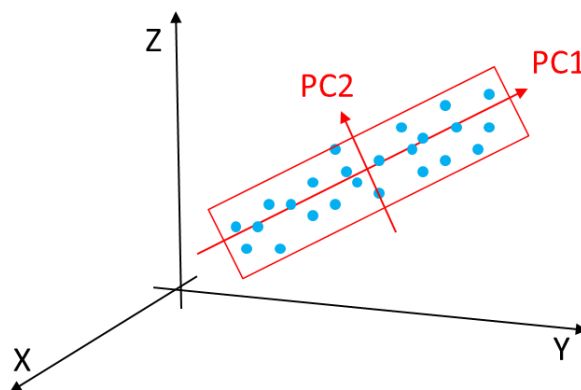


FIGURA 2. 1 – Representação gráfica das Componentes Principais

O PCA obtêm uma relação entre os dados originais (\mathbf{X}) e os dados obtidos nesta nova dimensão de variáveis, a partir dos pesos dados por cada amostra (\mathbf{P}) e a sua projeção na nova dimensão de variáveis (\mathbf{T}), de acordo com a equação 2.1.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (2.1)$$

Esta equação expressa o PCA em termos matemáticos. Logo, o PCA é a decomposição da matriz de dados originais, matriz \mathbf{X} em duas novas matrizes (matriz \mathbf{T} e matriz \mathbf{P}^T), além de uma matriz de resíduos (\mathbf{E}), como descrito na Figura 2.2.

$$\begin{array}{c} \boxed{\mathbf{X}} \\ n \times m \end{array} = \begin{array}{c} \boxed{\mathbf{T}} \\ n \times d \end{array} \times \begin{array}{c} \boxed{\mathbf{P}^T} \\ d \times m \end{array} + \begin{array}{c} \boxed{\mathbf{E}} \\ n \times m \end{array}$$

FIGURA 2. 2 – Esquema de decomposição da matriz de dados \mathbf{X}

Sendo que \mathbf{X} é a matriz com os dados originais, com n linhas e m colunas; \mathbf{T} é a matriz de escores com n linhas e d colunas (número de PC escolhido), \mathbf{P}^T é a matriz transposta de pesos com m colunas e d linhas (sendo as colunas de \mathbf{T} e as linhas de \mathbf{P}^T ortogonais entre si, ou seja, $\mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_j = 0$ e $\mathbf{t}_i^T \mathbf{t}_j = 0$, para $i \neq j$) e \mathbf{E} é a matriz de resíduos que contém a fração da informação não modelado/explicado pelas PC¹³⁸.

A matriz de pesos (matriz \mathbf{P}) é definida pela relevância de cada variável em uma dada combinação linear (PC). Cada elemento da matriz \mathbf{P} é matematicamente igual ao cosseno do ângulo entre o eixo da cada variável original e a PC. Quanto mais próximo de ± 1 , maior a influência que a variável tem na descrição da componente principal. A matriz de escores (matriz \mathbf{T}) representa a projeção das amostras neste novo sistema de eixos e cada amostra terá um valor de escore para cada PC^{139,140}. Cada coluna da matriz \mathbf{T} representa uma componente principal. A matriz de resíduos (matriz \mathbf{E}) é a quantidade de informação não relevante ou não explicada pelas componentes principais. Geralmente em dados espectroscópicos, a matriz de resíduos é atribuída ao ruído da análise.

A princípio, espera-se que grande parte da variância (informação) dos dados seja explicada por um número pequeno de PC. Para escolher a quantidade de componentes principais, utiliza-se vários critérios estatísticos. Uma das técnicas mais utilizadas é o cálculo da porcentagem da variância explicada¹⁴¹. A variância explicada

pela PC d é calculada a partir da equação 2.2, onde d é o número de componentes escolhidas pelo modelo:

$$\text{Variância Explicada (\%)} = \frac{1 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (x_{i,j} - t_d p_d^T)^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m x_{i,j}^2} \times 100 \quad (2.2)$$

Onde o numerador representa a variância explicada pela PC d e o denominador, a variância total dos dados. A porcentagem de variância explicada é então, a razão entre a soma de d autovalores considerados relevantes pela soma de todos os p autovalores.

Há duas maneiras de se calcular o PCA. Uma é através do algoritmo iterativo NIPALS, que determina os escores e os loadings de maneira iterativa utilizando a regressão por mínimos quadrados.

O outro método utilizado para se decompor a matriz de dados é a partir do método numérico denominado SVD (decomposição por valores singulares). O SVD é uma decomposição de uma matriz em matriz ortogonais, de acordo com a equação 2.3¹⁴²:

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^T + \mathbf{E} \quad (2.3)$$

onde:

- **X**: matriz original;
- **U**: matriz normalizada dos escores de **X** sujeita a $\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{I}$;
- **V**: matriz normalizada dos loadings de **X** sujeita a $\mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I}$;
- **S**: matriz diagonal com os valores singulares;
- **E**: matriz de resíduos.

A relação entre a equação 2.1 e a equação 2.3 é dado por:

$$\mathbf{P} = \mathbf{V} \quad (2.4)$$

$$\mathbf{T} = \mathbf{US} \quad (2.5)$$

Os elementos na matriz **S** são ordenados de acordo com a variância explicada de cada componente. Os termos da diagonal de **S** ao quadrado são os autovalores da matriz original. Esta relação é importante para se determinar o número de componentes principais significativas para o modelo.

Mesmo sendo um algoritmo com cálculos complexos e demorados, a maioria dos softwares computacionais já apresentam a função SVD contidas em seus sistemas.

Nos dias atuais, a maioria dos cálculos de PCA utilizam o SVD, e poucos usuários ainda utilizam o algoritmo NIPALS.

2.2. Resolução Multivariada de Curvas (MCR)

O MCR é baseado na decomposição bilinear dos dados originais, \mathbf{D} ($r \times c$) em duas matrizes¹⁴³ (Equação 2.6) realizando uma deconvolução de espectros sobrepostos. A resolução multivariada de curvas (MCR) possibilita obter perfis de concentração de cada um dos componentes presentes durante o monitoramento da reação a partir de uma extensão da lei de Lambert-Beer (Figura 2.3):

$$\mathbf{A} = \epsilon \mathbf{c} \mathbf{l} \quad \rightarrow \quad \mathbf{D}_{r,c} = \mathbf{C}_{r,c} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{r,c} \quad (2.6)$$

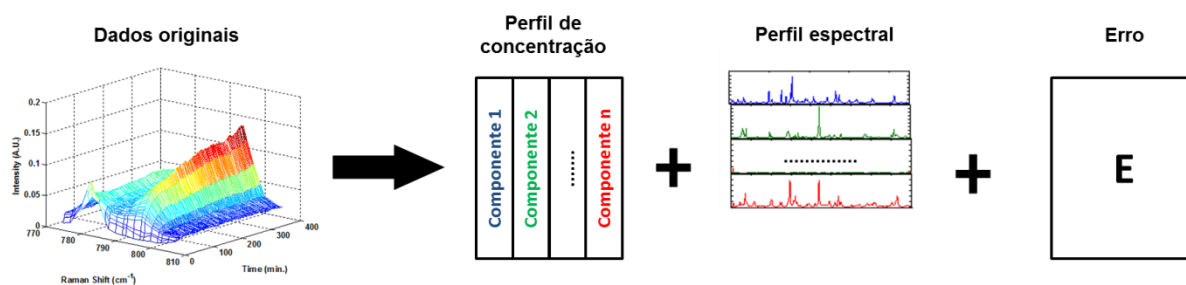


FIGURA 2. 3 – Representação esquemática do MCR-ALS em monitoramento de reações

Através de métodos iterativos de regressão por quadrados mínimos, é possível obter uma matriz correspondente a um perfil de concentrações, \mathbf{C} ($r \times k$) e uma outra matriz relativa aos espectros puros, \mathbf{S} ($k \times c$) de cada um dos k -componentes presentes na mistura. Os parâmetros r e c são as linhas e as colunas presentes nos dados originais.

Para obter os perfis de concentração e os perfis espectrais, utiliza-se o algoritmo de quadrados mínimos alternados (ALS). Este funciona da seguinte maneira¹⁴⁴:

1. Determina-se o número de componentes presentes na mistura (o parâmetro k). Esta etapa pode ser realizada utilizando-se o SVD (decomposição dos valores singulares) ou pelo EFA (análise de fatores evolucionários).

O EFA é bastante utilizado em conjuntos de dados onde existem variação sequencial das informações químicas presentes, como por exemplo, monitoramento

de reações. O EFA realiza diversas PCA's em sequência em intervalos de dados gradualmente maiores, geralmente pela adição de uma linha. A análise é realizada criando intervalos do começo ao final do experimento (Forward EFA, EFA pra frente), ou do final do experimento até o início (Backward EFA, EFA para trás).

Os autovalores obtidos a partir da execução dos PCA permitem a detecção e localização dos compostos presentes no processo. Logo, fica fácil observar as regiões de concentrações e os locais onde não há a presença do composto (Figura 2.4)¹⁴³. Estes autovalores possibilitam estimar quantos componentes estão presentes na mistura e os seus perfis de concentração.

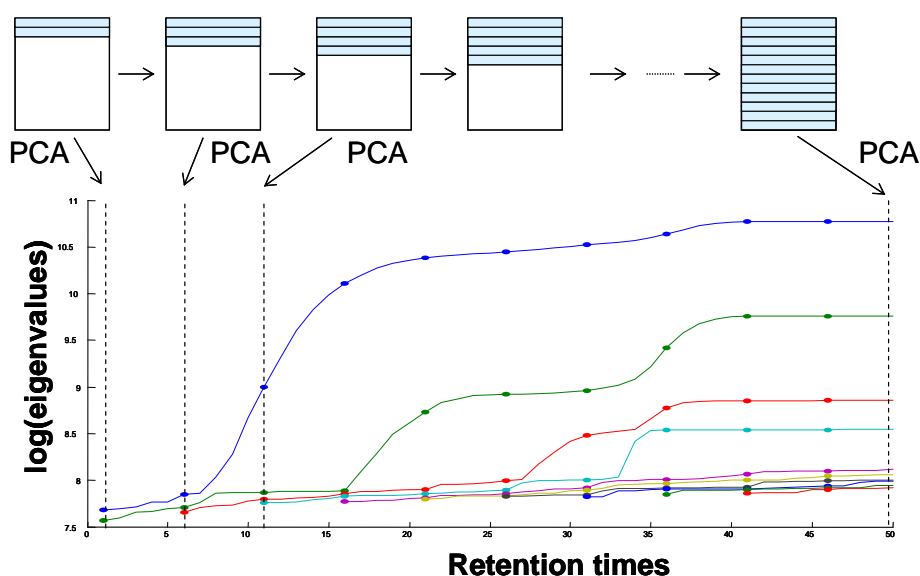


FIGURA 2. 4 – Exemplo de um Forward EFA (adaptado da referência¹⁴³)

2. Estima-se um valor para \mathbf{C} ou para \mathbf{S}^T

Nesta etapa é possível estimar os valores utilizando o EFA, ou o método das variáveis puras, sendo que o EFA só estima os valores para o perfil de concentração \mathbf{C} .

Assim como o EFA, o método das variáveis puras (*pure*) também utiliza o PCA¹⁴⁵. Entretanto, a partir dos loadings resultantes do PCA este método procura k linhas (espectros) ou colunas (perfis de concentração) mais dissimilares entre si presentes nos dados originais¹⁴⁶.

Uma última alternativa para se estimar os valores de \mathbf{C} é a utilização dos perfis espectrais dos compostos presentes na amostra.

3. Tendo os valores de \mathbf{D} e \mathbf{S}^T é possível calcular o valor de \mathbf{C}^* ¹⁴⁷

$$\mathbf{C}^* = \mathbf{D} \mathbf{S}(\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1} \quad (2.7)$$

Sendo $\mathbf{S}(\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1}$ a pseudo-inversa da matriz \mathbf{S}^T , também denominada \mathbf{S}^{T+}

4. Dado \mathbf{D} e \mathbf{C}^* é possível calcular \mathbf{S}^{T*} ¹⁴⁷

$$\mathbf{S}^{T*} = (\mathbf{C}^{T*} \mathbf{C}^*)^{-1} \mathbf{C}^{T*} \mathbf{D} \quad (2.8)$$

Sendo $(\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T$ a pseudo-inversa da matriz \mathbf{C} , também denominada \mathbf{C}^+

5. Calcula-se os valores originais \mathbf{D}^* , a partir das matrizes \mathbf{C}^* e \mathbf{S}^{T*} calculadas nas etapas 3 e 4

$$\mathbf{D}^* = \mathbf{C}^* \mathbf{S}^{T*} + \mathbf{E}^* \quad (2.9)$$

6. Realiza-se um teste de convergência nos dados. E repete-se os passos 3 e 4 até que a falta de ajuste dos dados entre duas iterações consecutivas seja menor do que um valor crítico (geralmente utiliza-se 10^{-6}).

A falta de ajuste é calculada pela equação 2.10:

$$FA_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (X_{i,j} - \hat{X}_{i,j})^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m X_{i,j}^2}} \quad (2.10)$$

É importante notar que o perfil de concentração gerado pelo MCR-ALS é referente a um perfil relativo de concentração. Os valores de concentração dados pelo modelo são dados em unidade relativa de cada espectro puro normalizado, diferente dos valores de concentração encontrados por métodos de calibração e quantificação.

Uma importante vantagem do MCR-ALS é a possibilidade de aplicar diversos tipos de restrições em cada otimização do ALS. Estas restrições são condições matemáticas que provém de propriedades químicas e são utilizadas nos perfis de concentração, nos perfis espectrais e em alguns casos, em ambos. Para trabalhos de monitoramento de reação as restrições mais utilizadas são:

- não-negatividade – os valores obtidos pelos perfis resolvidos devem ser positivos. Ex.: não existe concentração negativa e intensidade instrumental

negativa (a não ser que o dado em questão passe por um processamento, como primeira derivada).

- restrição de igualdade – alguns dos elementos em um perfil (ou em partes dele) são conhecidos. Ex.: espectros das substâncias puras presentes nas amostras.

2.3. Regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS)

Em química analítica, modelos clássicos univariados conseguem correlacionar diferentes concentrações de um analito com os sinais instrumentais de determinado equipamento. Entretanto, quando se trata de matrizes complexas que apresentam interferentes esta correlação torna-se mais difícil e sujeita a erros.

Métodos analíticos que contornam estes problemas são objetos de estudo de muitos trabalhos acadêmicos, e muitos deles já são incorporados em indústrias e centros de análises químicas. As técnicas analíticas mais populares para a resolução de matrizes complexas ainda são baseadas em métodos de separação, como cromatografia, ou procedimentos que necessitam de um preparo de amostra. Entretanto, muitas dessas técnicas necessitam de longo tempo de preparo e alto custo com insumos.

A calibração multivariada é uma excelente alternativa para utilização com técnicas instrumentais de baixa seletividade, com a vantagem de não necessitar de um preparo de amostra, ser mais rápida e utilizar técnicas relativamente mais baratas, como as técnicas espectroscópicas.

Os algoritmos utilizados para calibração multivariada exigem que haja independência linear entre o número de colunas e o número de linhas (sendo que o número de colunas é igual ao número de variáveis e o número de linhas é o número de amostras a serem modeladas). Para que isto ocorra, é necessário que o número de linhas (amostras) seja maior que o número de colunas (variáveis). Portanto para realizar calibrações multivariadas, algumas técnicas de compressão e/ou seleção de variáveis são geralmente utilizadas.

O PLS baseia-se na decomposição de cada matriz (a matriz de dados \mathbf{X} a matriz de respostas \mathbf{Y}) em duas matrizes menores, uma matriz de pesos \mathbf{P}^T e \mathbf{Q}^T , (para \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente) e uma matriz que representa os coeficientes de regressão dos escores \mathbf{T} e \mathbf{U} . As matrizes \mathbf{E} e \mathbf{F} são os resíduos que não são

explicados pelo modelo¹³⁶. Durante a decomposição, utiliza-se uma matriz de pesos **W**, que contém informações que relacionam as matrizes **X** e **Y**.

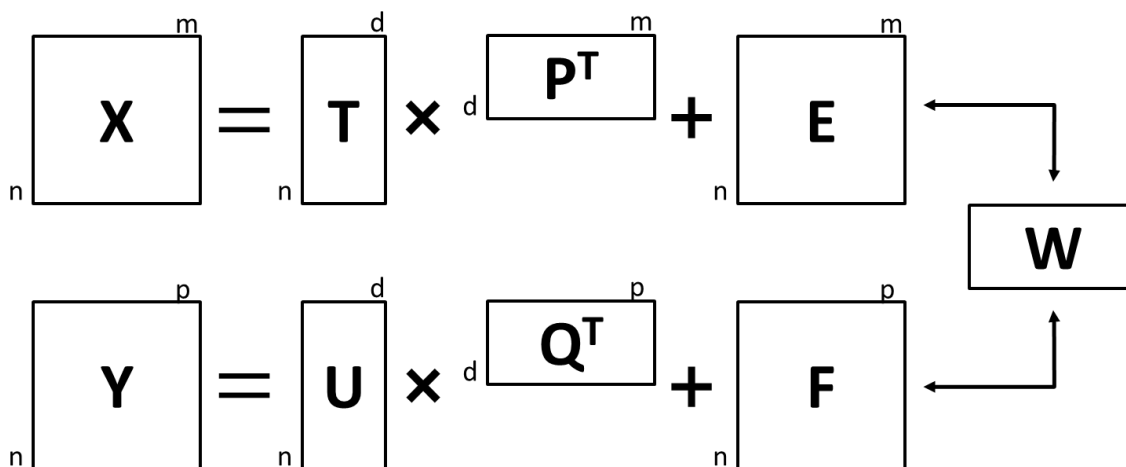


FIGURA 2. 5 – Representação esquemática da decomposição das matrizes **X** e **Y** no PLS

As variáveis latentes obtidas da decomposição de **X** (matriz de amostras) são distorcidas de modo à obter uma maior correlação possível com **Y** (matriz de respostas). E assim, obter curvas de calibração e quantificação dos dados.

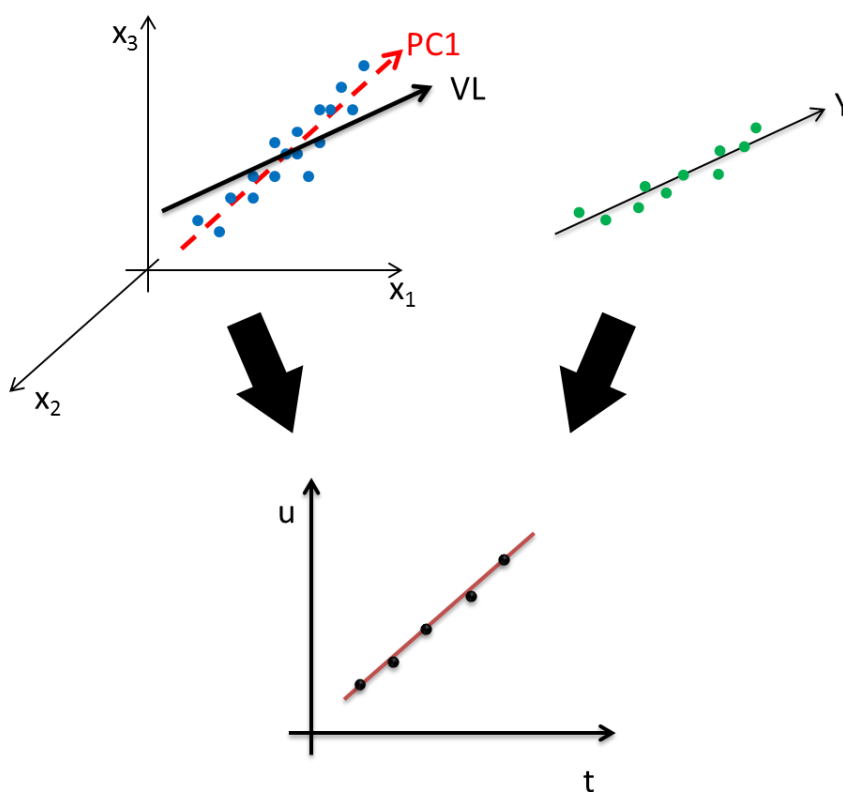


FIGURA 2. 6 – Representação gráfica da regressão do PLS

O SIMPLS (modificação do PLS inspirada estatisticamente)¹⁴⁸ e o NIPALS (mínimos quadrados parciais alternados não-iterativo)¹⁴⁹ são os algoritmos mais comumente utilizado para se obter os coeficientes de regressão do PLS. Ambos apresentam certa similaridade no algoritmo, entretanto o SIMPLS é um método mais rápido do que o NIPALS. Os passos para se realizar o algoritmo NIPALS estão descritos abaixo:

1. Determina-se uma estimativa inicial para o primeiro vetor (\mathbf{u}_1) da matriz \mathbf{U} , geralmente um vetor randômico da matriz \mathbf{Y} . Caso se deseje modelar apenas uma componente, $\mathbf{u} = \mathbf{y}$;

2. Calcula-se o vetor de pesos para a primeira componente, e em seguida o normaliza;

$$\mathbf{w}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{u}_1 (\mathbf{u}_1^T \mathbf{u}_1)^{-1} \quad (2.11)$$

$$\mathbf{w}_1 = \mathbf{w}_1 / \|\mathbf{w}_1\| \quad (2.12)$$

3. Com o vetor de pesos, é possível calcular os escores da primeira componente de \mathbf{X} ;

$$\mathbf{t}_1 = \mathbf{X} \mathbf{w}_1 \quad (2.13)$$

4. Calculam-se os loadings da matriz \mathbf{Y} , e em seguida o normaliza;

$$\mathbf{q}_1 = \mathbf{Y}^T \mathbf{t}_1 (\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1)^{-1} \quad (2.14)$$

$$\mathbf{q}_1 = \mathbf{q}_1 / \|\mathbf{q}_1\| \quad (2.15)$$

5. E por fim recalcula-se o novo vetor de escores de \mathbf{Y} , \mathbf{u}_1^* ;

$$\mathbf{u}_1^* = \mathbf{Y}^T \mathbf{q}_1 (\mathbf{q}_1^T \mathbf{q}_1)^{-1} \quad (2.16)$$

6. Nesta etapa, repete-se os cálculos dos passos 2 e 3 para se determinar o novo vetor de pesos e \mathbf{w}_1^* , o novo vetor de escores \mathbf{t}_1^* . Realiza-se o teste de convergência.

Se: $|\mathbf{t}_1^* - \mathbf{t}_1| > \text{valor crítico}$ (geralmente 10^{-6}); repete-se o passo 4, 5 e 6

Se: $|\mathbf{t}_1^* - \mathbf{t}_1| < \text{valor crítico}$; o algoritmo seguir para a etapa 7;

7. Calculam-se os loadings da matriz \mathbf{X} ;

$$\mathbf{p}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{t}_1 (\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1)^{-1} \quad (2.17)$$

8. Somente nesta etapa, é possível calcular o primeiro coeficiente de regressão do modelo;

$$\mathbf{b}_{1\text{PLS}} = \mathbf{u}_1^T \mathbf{t}_1 (\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1)^{-1} \quad (2.18)$$

9. Após esta etapa, recuperam-se as matriz \mathbf{X} e \mathbf{Y} sem a primeira componente;

$$\mathbf{X}^* = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T \quad (2.19)$$

$$\mathbf{Y}^* = \mathbf{Y} - \mathbf{b}_{1\text{PLS}} \mathbf{t}_1 \mathbf{q}_1^T \quad (2.20)$$

10. A partir deste ponto, o algoritmo retorna para o passo 1, substituindo \mathbf{X} por \mathbf{X}^* e \mathbf{Y} por \mathbf{Y}^*

O algoritmo continua até que não haja mais informação relevante em \mathbf{X} acerca da matriz \mathbf{Y} . Uma excelente maneira para se determinar a quantidade de informação relevante em \mathbf{X} para a matriz \mathbf{Y} é utilizando a validação cruzada.

A validação cruzada é uma técnica importante para determinar o número de variáveis latentes necessárias para o modelo de regressão. Separa-se uma ou mais amostras da matriz \mathbf{X} e se constrói o modelo de calibração com as amostras restantes. Estima-se o erro do modelo prevendo as amostras que não foram utilizadas para calibrar, utilizando diferentes números de variáveis latentes.

Esse processo é repetido para todas as outras amostras até que todas tenham o seu erro estimado. Calcula-se uma estimativa do erro médio para cada variável latente utilizada, seguindo a equação 2.21:

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (2.21)$$

O número de variáveis latentes é estimado pelo valor que oferece a menor raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSECV)¹³⁸.

2.3.1. iPLS

O iPLS, ou também chamado de PLS por intervalos, é uma extensão do PLS onde utiliza-se diferentes intervalos do conjunto de variáveis para se determinar e selecionar aquelas que contém uma maior importância para o modelo¹⁵⁰. Assim espera-se otimizar o modelo de regressão e facilitar a sua interpretação.

O PLS por intervalos realiza modelos locais de regressão em intervalos equidistantes ou variáveis. O tamanho do intervalo é definido pelo usuário. Os intervalos são avaliados pelo valor obtido no RMSECV. As regiões que obtiverem os melhores valores para a estimativa do erro são escolhidas pelo algoritmo.

2.4. Rotinas utilizadas

Para realização das análises do PCA, foi utilizada a rotina SVD do software MATLAB 2010b. As análises por MCR-ALS foram realizadas utilizando a rotina ALS do toolbox MCR_ALS¹⁵¹ disponibilizado pela universidade de Barcelona pelo Prof. Romà Tauler. As análises por iPLS foram realizadas utilizando o toolbox PLS_toolbox 6.2da Eigenvector, disponível para MATLAB.

**CAPÍTULO 3 – SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
DOS COCRISTAIS DE CBZ-NCT E IBP-NCT**

3. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COCRISTAIS DE CBZ-NCT E IBP-NCT

3.1. Introdução e objetivos

O interesse da indústria farmacêutica por técnicas analíticas de caracterização de estado sólido se deu a partir da descoberta de diferentes formas cristalinas para um mesmo princípio ativo, de maneira que tais técnicas tornaram-se necessárias para correta caracterização do fármaco e desenvolvimento do medicamento. Estas técnicas são geralmente utilizadas quando é preciso obter informações quanto à forma cristalográfica do princípio ativo¹⁵².

Diversas técnicas analíticas do estado sólido são utilizadas para caracterizar cocristais: TGA^{53,60,71}, DSC^{26,53,59,62,69-72}, DRX em pó^{26,52,53,56,59,60,62,68-72} e de monocristal^{28,52,53,68}, infravermelho médio^{53,56,59,60,68,71,72} e próximo⁶⁵, RMN de estado sólido^{70,72}, espectroscopia Raman^{56,60,62}, microscopia óptica^{52,56,60,62} e microscopia eletrônica de varredura^{26,57,58}.

Entretanto, apenas dois trabalhos na literatura apresentam a quantificação de um cocrystal na presença de seus coformadores. Em 2013, Caliandro e colaboradores quantificaram o cocrystal de carbamazepina-sacarina por infravermelho médio e difração de raios-X em pó¹⁵³. E em 2014, nosso grupo de pesquisa avaliou as principais técnicas analíticas para a quantificação do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida¹⁵⁴, os resultados obtidos foram provenientes dessa dissertação. Tal estudo é de grande importância visto que é possível a determinação da fração de precursores que não foi convertida em cocrystal.

A maioria das técnicas instrumentais utilizadas para analitos no estado sólido não apresentam seletividade, tais como DRX, DSC, IR e Raman; e necessitam, na maioria das vezes, de modelos de calibração multivariados. Uma das ferramentas multivariadas mais utilizadas é a regressão por quadrados mínimos parciais (PLS).

Assim, o objetivo deste capítulo é o desenvolvimento de modelos de calibração utilizando ferramentas quimiométricas multivariadas e diferentes técnicas de caracterização: DSC, PXRD, IR Raman para quantificar os cocristais de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT) e ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT) em meio aos seus componentes formadores.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Síntese do cocrystal “padrão” de CBZ-NCT

Para a síntese do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida seguiu-se o método descrito por Nehm ET. AL.⁵⁹. A síntese é baseada no método de reação de cristalização, também chamada de método solvotérmico. Adiciona-se quantidades equimolares dos coformadores em um solvente orgânico, a reação é aquecida até a dissolução total dos cristais. Com a evaporação do solvente obtêm-se o cocrystal desejado. Utilizou-se carbamazepina da marca Jubilant Life Sciences Limited, nicotinamida da marca Aarti Drugs Limited, grau de pureza 99,82%; acetato de etila da marca Quemis, grau P.A.

Pesou-se aproximadamente 472,6 mg de carbamazepina (2 mmol) e 244,2 mg de nicotinamida (2 mmol) em um béquer, em seguida, adicionou-se 40 mL de acetato de etila. A solução foi aquecida à 40°C e deixada sobre agitação magnética por 30 minutos. Após este período, os fármacos foram completamente dissolvidos. O cocrystal foi obtido quando todo o acetato de etila foi evaporado (aproximadamente 4 dias). Com o intuito de se remover todo o acetato de etila residual, o cocrystal foi deixado em estufa a 40 °C por 12 horas.

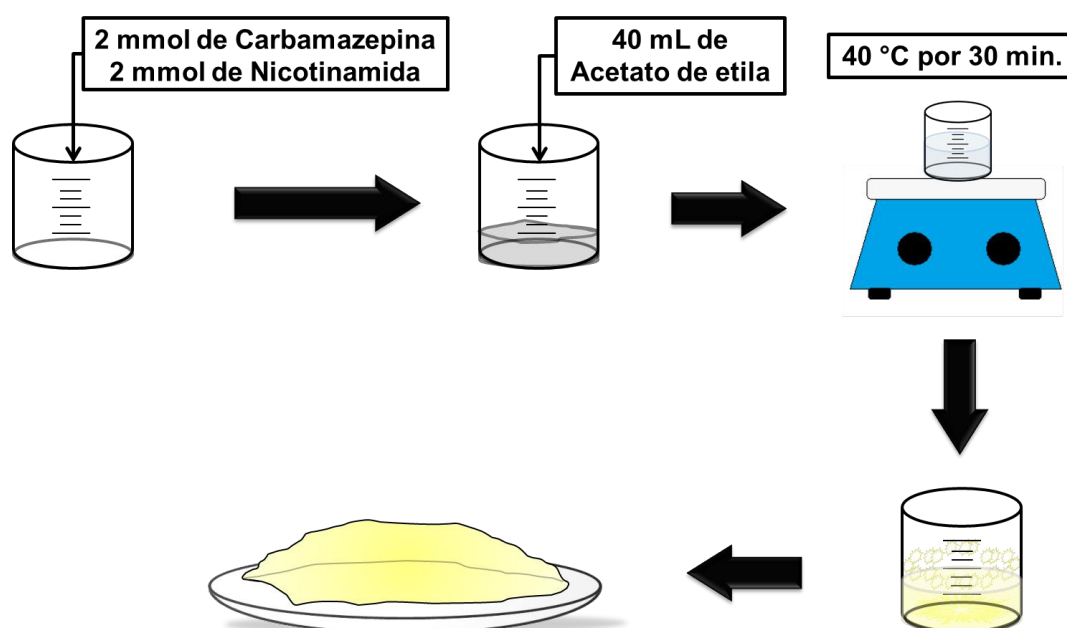


FIGURA 3.1 – Representação esquemática da síntese do cocrystal CBZ-NCT

3.2.2. Síntese do cocrystal “padrão” de IBP-NCT

Para a síntese do cocrystal IBP-NCT, seguiu-se o método desenvolvido por Frišič e Jones, e mais tarde utilizada por Berry ET. AL.^{52,69}. O procedimento baseia-se em solubilizar completamente os coformadores em um solvente volátil, à medida que este evapora o cocrystal é precipitado. Utilizou-se ibuprofeno da marca IOL Chemicals and Pharmaceuticals Ltd., grau de pureza 100,29%; nicotinamida da marca Aarti Drugs Limited, grau de pureza 99,82%; metanol da marca Quemis, grau P.A.

Pesou-se aproximadamente 618,8 mg de ibuprofeno (3 mmol) e 366,4 mg de nicotinamida (3 mmol) em um béquer, em seguida, adicionou-se 3 mL de metanol, até a dissolução total dos fármacos. O cocrystal de IBP-NCT foi obtido quando todo o metanol foi evaporado (aproximadamente 10 horas). Com o intuito de se remover todo o metanol residual, o cocrystal foi deixado em estufa a 40 °C por 12 horas.

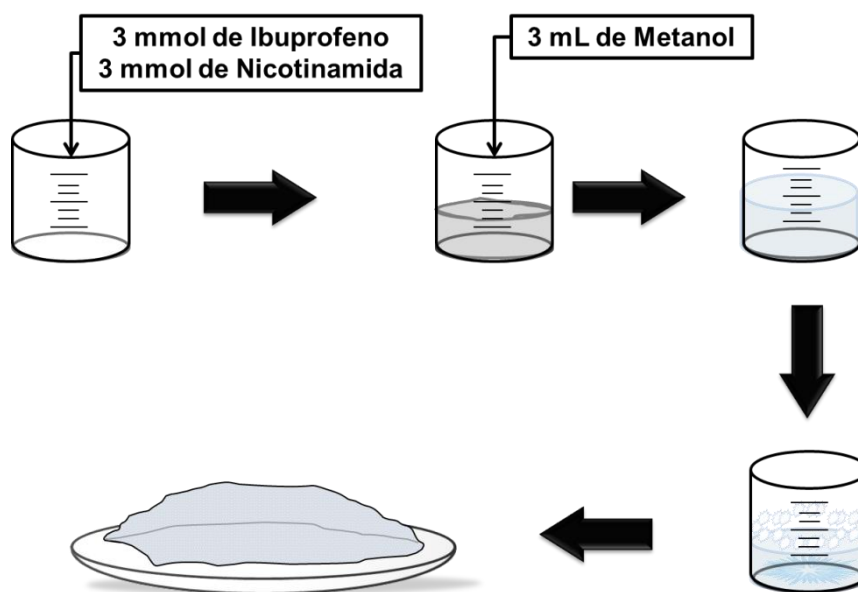


FIGURA 3.2 – Representação esquemática da síntese do cocrystal IBP-NCT

Os cocrystal de CBZ-NCT e IBP-NCT foram caracterizados por espectroscopia Raman, Infravermelho, Difração por Raios-X (DRX) e por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Ao caracterizar os produtos obtidos, observou-se apenas as formas cristalinas dos cocrystal. Assim, estes foram utilizados como “padrão analítico” durante as análises de quantificação, ou seja, estes produtos seriam os compostos de referência na análise quantitativa do cocrystal em meio aos seus coformadores.

3.2.3. Quantificação dos cocristais em meio aos precursores

Para determinar os pontos da curva de calibração em cada uma das técnicas, realizou-se um planejamento de misturas com três componentes (fármaco, coformador e cocrystal) para a carbamazepina e para o ibuprofeno. O planejamento de misturas fornece 6 níveis de variação (contando com a mistura padrão) para cada componente, utilizando somente 10 experimentos. A Figura 3.3 ilustra o planejamento de misturas utilizado para os cocristais de carbamazepina e de ibuprofeno, onde variam as quantidade de cada um dos componentes de 0 a 100%, de modo que:

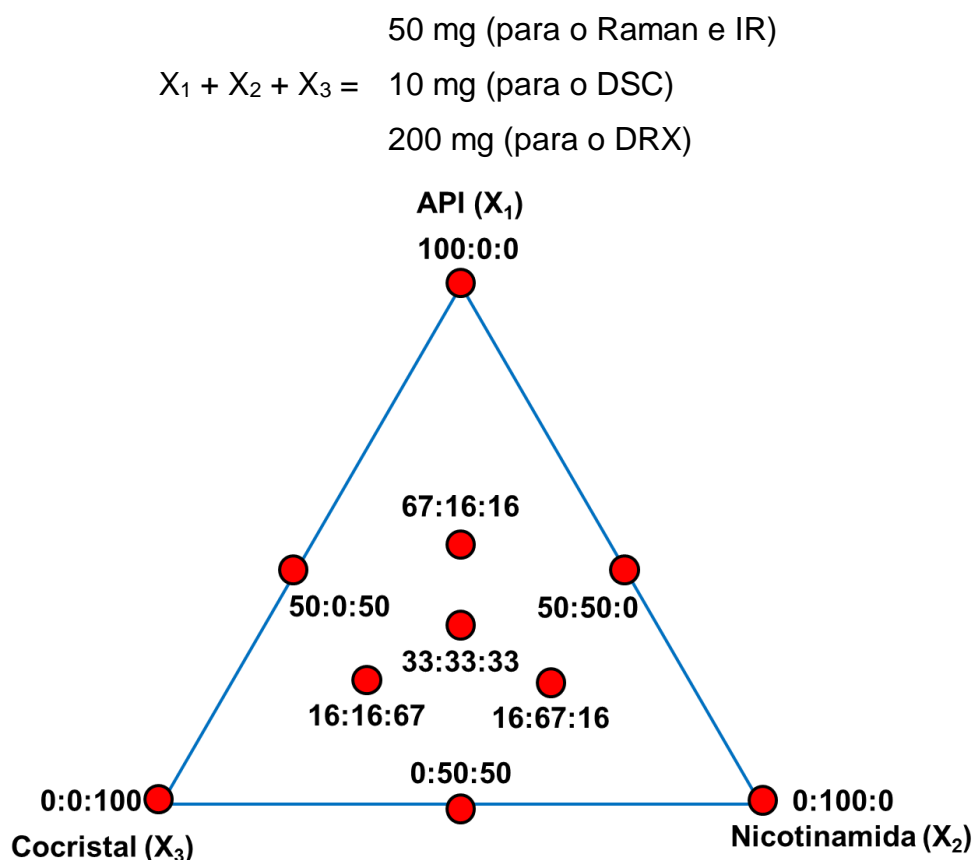


FIGURA 3.3 – Representação esquemática do planejamento de misturas para a curva de calibração dos cocristais de CBZ-NCT e IBP-NCT

A Tabela 3.1 apresenta a composição de cada amostra de acordo com o planejamento ternário para cada cocrystal.

TABELA 3. 1 - Tabela de calibração utilizada no PLS para os cocristais de CBZ-NCT e IBP-NCT

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9	Exp 10
CBZ ou IBP (%)	100,0	0,0	0,0	50,0	50,0	0,0	66,7	16,6	16,6	33,3
Nicotinamida (%)	0,0	100,0	0,0	50,0	0,0	50,0	16,6	66,7	16,6	33,3
Cocristal (%)	0,0	0,0	100,0	0,0	50,0	50,0	16,6	16,6	66,7	33,3

Para a etapa de validação preparou-se cinco amostras com massas distintas das amostras de calibração, respeitando a massa final para cada equipamento, como apresentado na figura 3.3. Tanto na etapa de calibração quanto nas etapas de validação, utilizou-se as massas reais pesadas para cada amostra como valor de resposta

3.2.4. Espectroscopia Raman

Utilizou-se um espectrômetro *i*-Raman da B&W Tek modelo BWS 415-785H, laser vermelho de 785 nm, com resolução espectral de 3,5 cm⁻¹. Os espectros foram realizados com tempo de aquisição de 60 s, de 100 a 70 % de potência para o laser, lente objetiva de 20x e intervalo de 285 à 1708 cm⁻¹ (Raman Shift).

Para a análise por espectroscopia Raman, utilizou-se um molde evacuável de pastilhamento para prensar cada amostra, as amostras foram prensadas manualmente de modo a se evitar transformações de fase no cocrystal e seus precursores. Com as amostras prensadas, é possível obter espectros mais bem resolvidos e de maior intensidade. Isto ocorre porque nas amostras prensadas existe uma maior quantidade de cristais em uma área menor, assim aumenta-se a ocorrência de espalhamentos Raman na região onde o laser é incidido. Realizaram-se dez medidas de pontos aleatórios de cada amostra com o intuito de se obter uma maior representatividade da mesma.

3.2.5. Infravermelho Médio (IR)

O infravermelho utilizado foi um Varian modelo 660 FT-IR. As medidas foram feitas em refletância, utilizando um acessório de refletância total atenuada (ATR). Realizou-se 64 scans com um intervalo de número de onda de 600 – 3500 cm⁻¹, e resolução espectral de 2,0 cm⁻¹.

As amostras utilizadas tanto na etapa de calibração quanto na de validação foram feitas em triplicatas reais. Para a etapa de calibração, seguiu-se a mesma relação de concentração utilizada para a calibração com o Raman. Na validação, preparou-se 5 amostras com quantidade aleatórias de cada um dos componentes.

As Tabelas 3.2 e 3.3 ilustram os pontos de validação utilizados tanto para a espectroscopia Raman quanto para o infravermelho médio em cada cocrystal.

TABELA 3.2 – Pontos de validação para o PLS utilizando Raman e IR para o cocrystal de CBZ-NCT

IR e Raman						
	Massa Teórica ($m_f = 50,0$ mg)			Porcentagem (%)		
	CBZ	NCT	CBZ-NCT	CBZ	NCT	CBZ-NCT
1	38,1	4,5	7,3	76,4	9,2	14,4
2	20,9	6,5	22,6	41,8	12,9	45,2
3	4,0	16,8	29,1	8,0	33,7	58,3
4	19,2	20,1	10,6	38,4	40,6	20,9
5	13,2	20,3	16,5	26,5	40,6	32,9

TABELA 3.3 - Pontos de validação para o PLS utilizando Raman e IR para o cocrystal de IBP-NCT

IR e Raman						
	Massa Teórica ($m_f = 50,0$ mg)			Porcentagem (%)		
	IBP	NCT	IBP-NCT	IBP	NCT	IBP-NCT
1	15,0	32,9	2,1	30,0	65,8	4,2
2	24,5	12,8	12,8	49,0	25,5	25,5
3	10,4	28,0	11,6	20,7	56,1	23,2
4	4,5	30,3	15,2	9,1	60,6	30,3
5	16,7	26,9	6,4	33,3	53,8	12,8

3.2.6. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O DSC utilizado foi um Shimadzu DSC-60 com velocidade de varredura de 10°C/min, atmosfera de hélio (vazão 30 mL/minuto) e uma faixa de varredura de 110 °C até 200 °C para o cocrystal com carbamazepina, e de 50 °C até 160 °C para o

cocristal com ibuprofeno. Cada uma das amostras da curva de calibração e validação analisadas consistia de uma massa de 2 a 4 mg para o planejamento do CBZ-NCT e de 4 a 6 mg para componentes da mistura do planejamento IBP-NCT.

Realizaram-se triplicatas reais para cada uma das amostras utilizadas nas etapas de calibração e validação. Utilizando a relação entre a massa analisada e o calor liberado na análise, todos os termogramas foram normalizados para massa igual a 1,0 mg.

As Tabelas 3.4 e 3.5 ilustram os pontos de validação utilizados para o DSC em cada cocristal.

TABELA 3. 4 - Pontos de validação para o PLS utilizando o DSC para o cocristal de CBZ-NCT

DSC						
	Massa Teórica ($m_f = 10,0$ mg)			Porcentagem (%)		
	CBZ	NCT	CBZ-NCT	CBZ	NCT	CBZ-NCT
1	5,3	2,0	2,7	55,1	19,5	25,4
2	1,1	3,9	5,0	11,9	39,1	48,9
3	3,3	1,1	5,6	29,5	11,9	58,6
4	1,5	6,2	2,3	15,0	60,2	24,7
5	4,1	4,1	1,8	39,7	41,9	18,5

TABELA 3. 5 - Tabela de validação para o PLS utilizando o DSC para o cocristal de IBP-NCT

DSC						
	Massa Teórica ($m_f = 10,0$ mg)			Porcentagem (%)		
	IBP	NCT	IBP-NCT	IBP	NCT	IBP-NCT
1	6,8	0,4	2,7	68,7	4,4	26,9
2	1,5	1,2	7,5	14,5	11,5	74,0
3	3,4	1,4	4,9	34,7	14,7	50,6
4	0,4	5,1	4,5	4,0	50,8	45,2
5	4,4	4,5	1,1	43,9	44,9	11,2

3.2.7. Difração de raios-X (DRX)

Para a análise de DRX, utilizou-se um difratômetro de raios-X Multiflex da Rigaku com comprimento de onda de 0,154 nm fonte de Cu, 40 kV de voltagem e corrente de 30 mA. As amostras foram analisadas de 5° até 45° (2°θ) com velocidade de 0,2°/minuto, e passo de 0,02°.

As Tabelas 3.6 e 3.7 ilustra os pontos de validação utilizados para o DRX em cada cocrystal.

TABELA 3. 6 - Pontos de validação para o PLS utilizando o DRX para o cocrystal de CBZ-NCT

DRX						
	Massa Teórica (m _f = 200,0 mg)			Porcentagem (%)		
	CBZ	NCT	CBZ-NCT	CBZ	NCT	CBZ-NCT
1	29,6	39,6	130,8	14,8	19,8	52,7
2	124,7	20,7	54,6	62,3	10,4	19,8
3	10,1	180,6	9,3	5,1	73,8	4,6
4	3,7	81,1	115,2	1,8	40,6	57,6
5	88,4	44,1	67,5	44,2	22,0	33,8

TABELA 3. 7 - Pontos de validação para o PLS utilizando o DRX para o cocrystal de IBP-NCT

DRX						
	Massa Teórica (m _f = 200,0 mg)			Porcentagem (%)		
	IBP	NCT	IBP-NCT	IBP	NCT	IBP-NCT
1	61.7	56.7	81.7	30.8	28.4	40.8
2	80.8	46.9	72.1	40.4	23.5	36.1
3	90.1	87.3	22.6	45.1	43.7	11.3
4	15.2	63.2	119.8	7.7	31.9	60.4
5	135.0	30.4	34.7	67.5	15.2	17.4

3.2.8. Métodos Quimiométricos

Para a quantificação, utilizou-se a rotina do iPLS disponível no PLS toolbox 6.2 da Eigenvector disponível para o Matlab R2010a. As amostras foram normalizadas

pela área, e utilizou-se a média das triplicatas para realizar as análises. Foram utilizados diferentes tipos de pré-tratamento para os dados, de acordo com a técnica empregada.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Caracterização do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT)

O co-cristal de carbamazepina-nicotinamida formado pela reação de cristalização em acetato de etila foi caracterizado por DSC (Figura 3.4), DRX (Figura 3.5), espectroscopias Raman (Figura 3.6) e infravermelho médio (Figura 3.7).

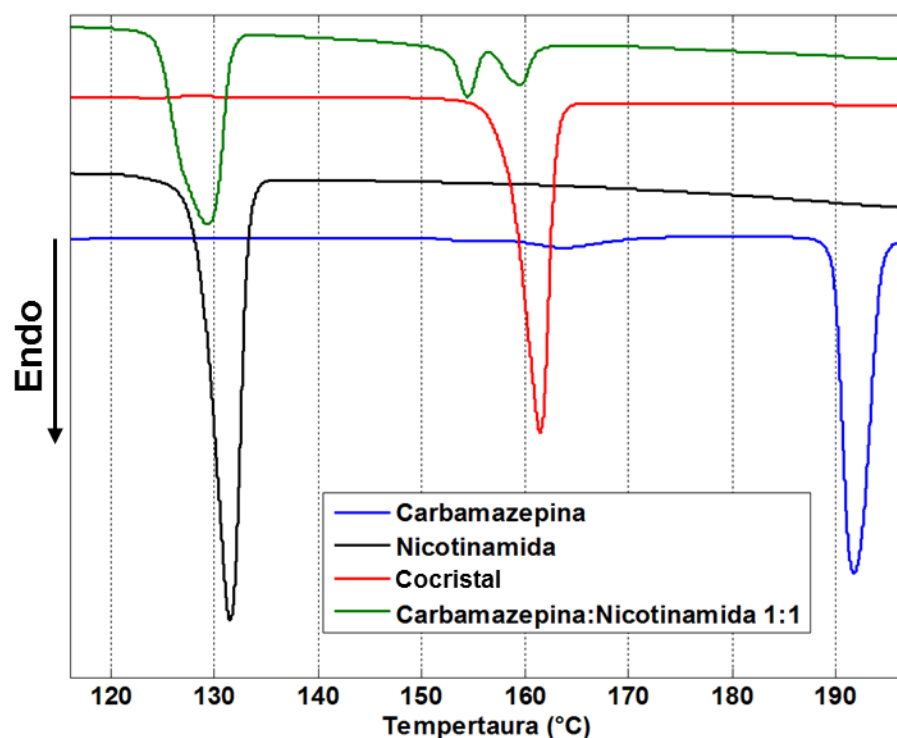


FIGURA 3.4 – Curvas de DSC do cocrystal, seus substratos e uma mistura física de seus coformadores

A Figura 3.4 apresenta as curvas de DSC para a carbamazepina, nicotinamida, o cocrystal e uma mistura física de carbamazepina:nicotinamida 1:1 (m/m). A curva da carbamazepina demonstra uma leve um pico por volta de 164 °C proveniente de uma transição cristalina, provavelmente uma transição polimórfica para a forma I que

apresenta uma temperatura de fusão de 192 °C. A nicotinamida apresenta um sinal endotérmico em 131 °C referente ao seu ponto de fusão.

O cocrystal apresenta uma temperatura de fusão intermediária entre os seus coformadores, em 162 °C. Corroborando para a formação de uma nova estrutura cristalina. A diferença no perfil da curva de DSC entre o cocrystal e a mistura física demonstra as diferentes propriedades deste cocrystal. Na curva da mistura física, é possível observar primeiramente a fusão da nicotinamida por volta de 129 °C, seguida por uma fusão em 155 °C, e por fim, é possível notar o pico de fusão referente a uma formação *in situ* do cocrystal em 162 °C. Os dados obtidos pelo DSC apresentam-se em concordância com os valores apresentados na literatura^{62,64}.

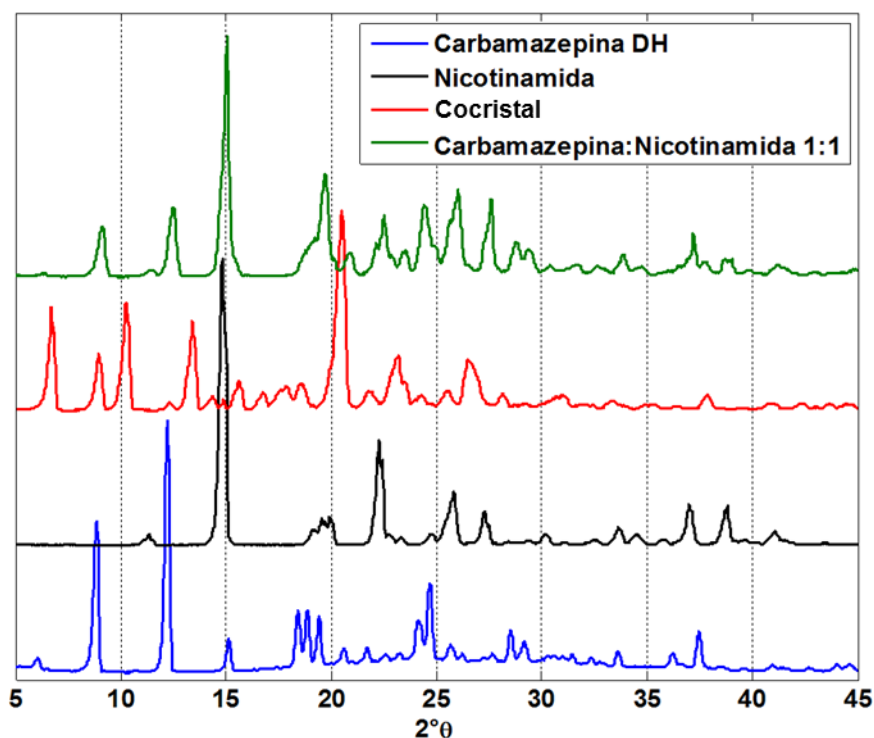


FIGURA 3.5 – Difratoograma de raios-X do cocrystal e de seus substratos e uma mistura física de seus coformadores

A Figura 3.5 mostra os difratogramas do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida assim como os de seus coformadores. Observando o padrão de difração do cocrystal, foi possível verificar a formação de um novo motivo cristalográfico, uma vez que seu difratograma se mostra diferente do difratograma obtido pela mistura física de carbamazepina:nicotinamida 1:1 (m/m). Os principais picos de difração do cocrystal apresentam-se em: 6,70; 8,92; 10,26; 13,40 e 20,50 $2^\circ \theta$. Enquanto que para

os seus coformadores os picos de difração mais intensos apresentam-se em ângulos diferentes.

A nicotinamida apresenta picos de difração em: 11,34; 14,80; 19,06; 19,54; 19,92 e 22,24 $2^\circ\theta$. Para a carbamazepina dihidratada apresenta seus picos em: 6,08; 8,84; 12,22; 15,12; 18,42; 18,88; 19,44; 24,12 e 24,68 $2^\circ\theta$. Os difratogramas observados são concordantes com os dados encontrados na literatura.

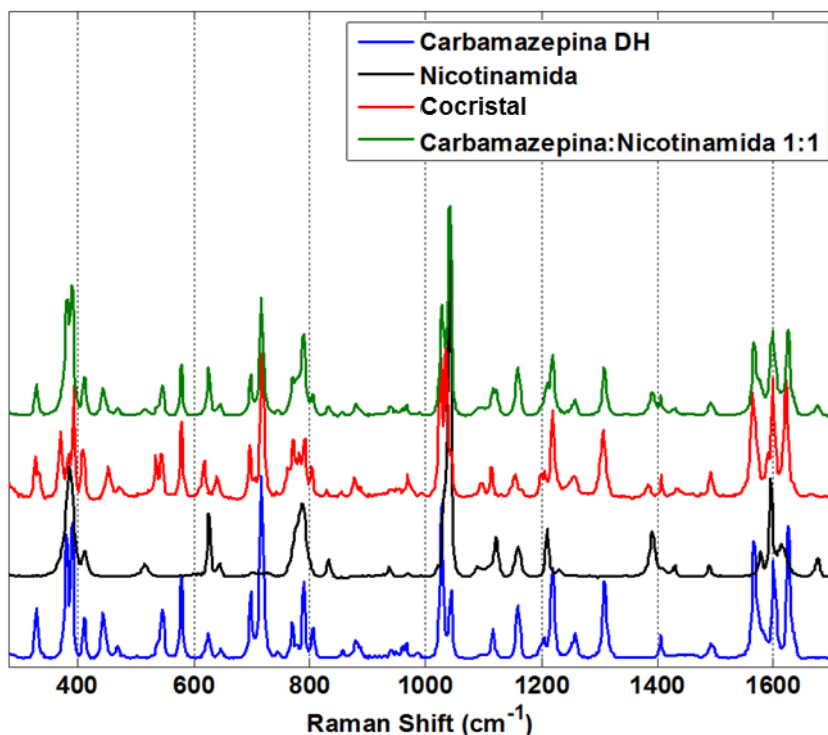


FIGURA 3.6 – Espectros Raman do cocrystal e de seus substratos e uma mistura física de seus coformadores

A Figura 3.6 apresenta o espectro Raman da carbamazepina, da nicotinamida, do cocrystal e de uma mistura física 1:1 dos coformadores do cocrystal. O espectro Raman do cocrystal apresenta picos característicos comuns ao espectro da carbamazepina, porém algumas regiões possibilitam caracterizar e diferenciar o seu espectro das formas polimórficas da carbamazepina. Na região espectral de 1550 – 1630 cm^{-1} , referentes as vibrações de estiramento C=C e deformação N-H de amidas secundárias¹⁵⁵, é possível observar uma maior intensidade do pico em 1599 cm^{-1} referente à deformação N-H presente na molécula de carbamazepina e na molécula de nicotinamida, e responsável pela interação do tipo homosínton existente entre os dímeros das moléculas de carbamazepina e nicotinamida do cocrystal. Referente ao

espectro da nicotinamida, a alteração mais evidente é o desaparecimento do pico em 1676 cm^{-1} , característico de estiramento C=O de amidas¹⁵⁶. Este desaparecimento ocorre devido a ligação homosínton que ocorre entre as moléculas de nicotinamida e de carbamazepina presentes no arranjo do cocrystal.

Outra região característica do cocrystal encontra-se em 1036 cm^{-1} , indicativo de uma respiração assimétrica de anel aromático com heteroátomo¹⁵⁷. No espectro da carbamazepina é possível observar dois picos referentes a vibrações do anel central de 7 membros, que possui o carbamato, na região de 1044 cm^{-1} e 1028 cm^{-1} ¹⁵⁵. Na nicotinamida, é possível observar apenas um pico na região de 1041 cm^{-1} originado da respiração do anel piridínico, sendo este o pico mais intenso da molécula. Porém no cocrystal, além dos picos presentes na molécula da carbamazepina, um terceiro pico é observado em um comprimento de onda intermediário, em 1036 cm^{-1} , sendo este, um dos picos mais intensos e também seletivo para o cocrystal. Os espectros obtidos mostraram-se de acordo com os reportados na literatura^{56,60}.

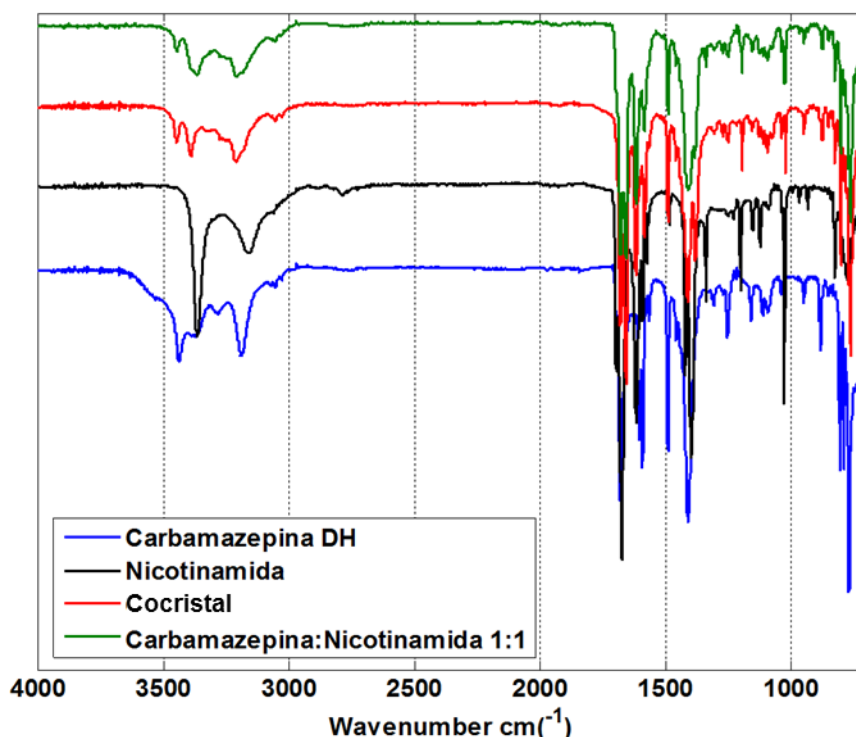


FIGURA 3.7 – Espectro infravermelho do cocrystal e de seus substratos e uma mistura física de seus coformadores

A Figura 3.7 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho médio para o cocrystal e seus coformadores. O espectro infravermelho da mistura

física de carbamazepina:nicotinamida 1:1 é o que mais se assemelha ao espectro do cocrystal. Ou seja, das técnicas analíticas utilizadas para caracterizar e quantificar o cocrystal, o infravermelho é o que apresenta menor diferença entre os perfis espectrais. Apenas alguns deslocamentos de picos na região do *fingerprint* e o deslocamento dos picos em 1657 cm^{-1} e 1680 cm^{-1} , relativos a estiramento C=O de amidas⁹⁶, diferenciam o espectro do cocrystal do espectro de seus coformadores. Porém, quando se compara o espectro do cocrystal com o espectro da mistura física de seus coformadores, não é possível observar discrepâncias mesmo nas regiões citadas. Mostrando que o infravermelho médio não fornece informação suficiente para distinguir a mistura física do arranjo cristalino misto. Os espectros obtidos foram concordantes com os reportados na literatura^{53,59}.

3.3.2. Quantificação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida (CBZ-NCT)

3.3.2.1. Infravermelho médio

Os espectros obtidos em triplicata durante as etapas de calibração e validação foram normalizados pela área com o intuito de se atribuir a mesma importância para cada amostra, em seguida realizou-se a média das replicatas e por fim, utilizou-se o algoritmo iPLS com diferentes pré-tratamentos e diferentes intervalos de variáveis com o objetivo de obter os menores erros de calibração e previsão em cada modelo.

A escolha das variáveis latentes foi baseada utilizando o menor valor da raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV, do inglês *root mean square error of cross validation*). As Figuras de 3.8 a 3.10 apresentam a raiz quadrada do erro quadrático médio de validação (RMSEC, do inglês *root mean square error of calibration*) e RMSECV para os três componentes em cada um dos modelos. Os menores valores de RMSECV foram obtidos quando utilizou-se três variáveis latentes no modelo. Este fato já era esperado, uma vez que o modelo de calibração é composto por 3 componentes: carbamazepina, nicotinamida e cocrystal. Portanto, para todos os modelos utilizou-se apenas 3 variáveis latentes. O modelo 1 foi atribuído ao conjunto de dados que apresentou as melhores condições para a quantificação da carbamazepina, o modelo 2 foi ajustado com os menores erros de previsão para a nicotinamida e o modelo 3 foi escolhido com base nos menores erros de quantificação do cocrystal. Os modelos utilizados apresentam-se nas tabelas de 3.8 a 3.10.

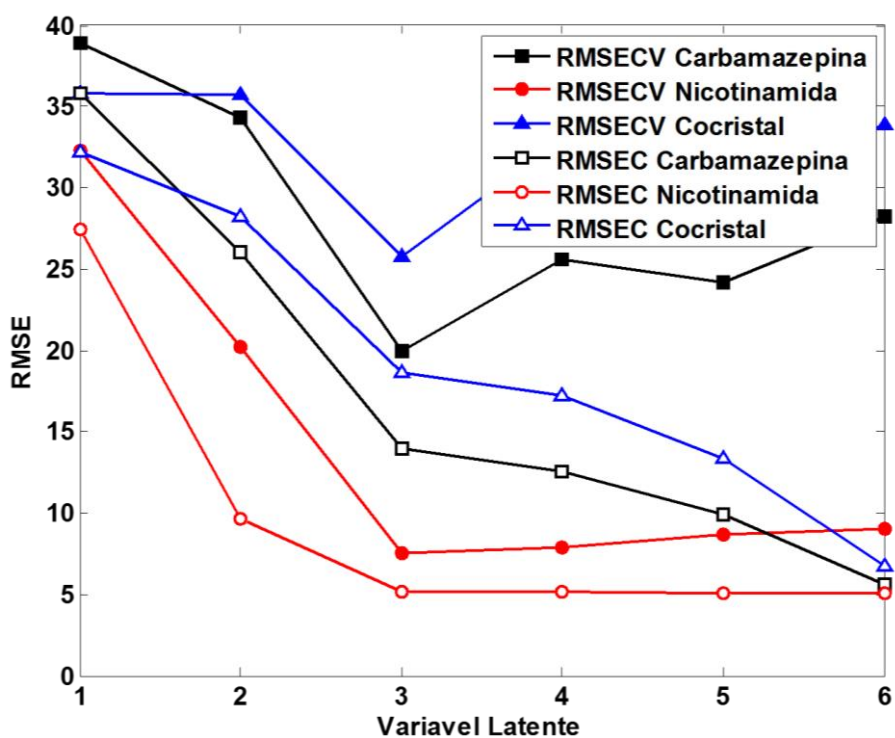


FIGURA 3.8 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

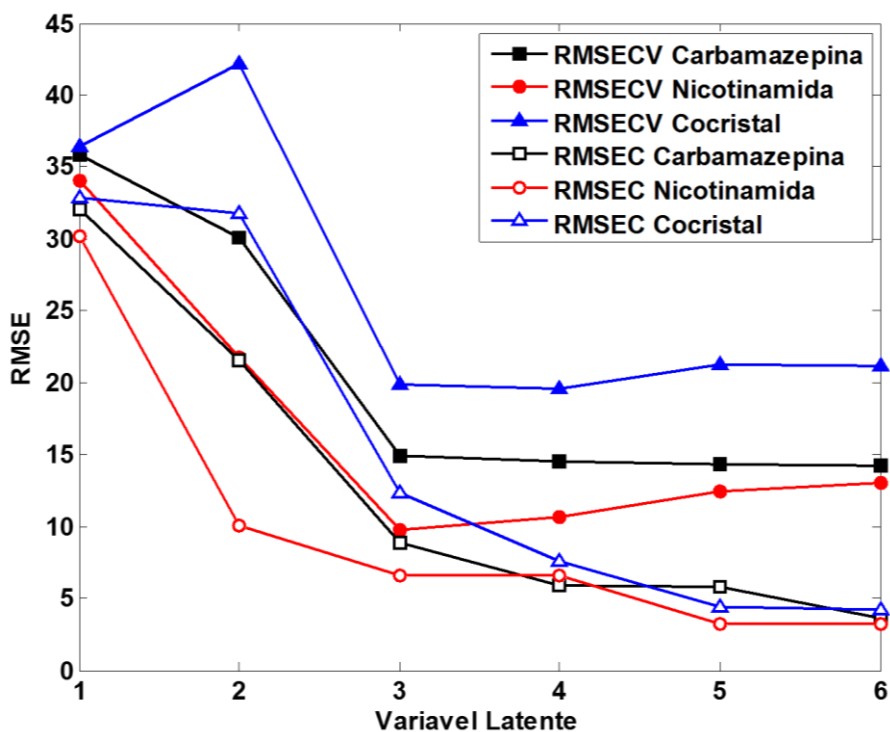


FIGURA 3.9 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

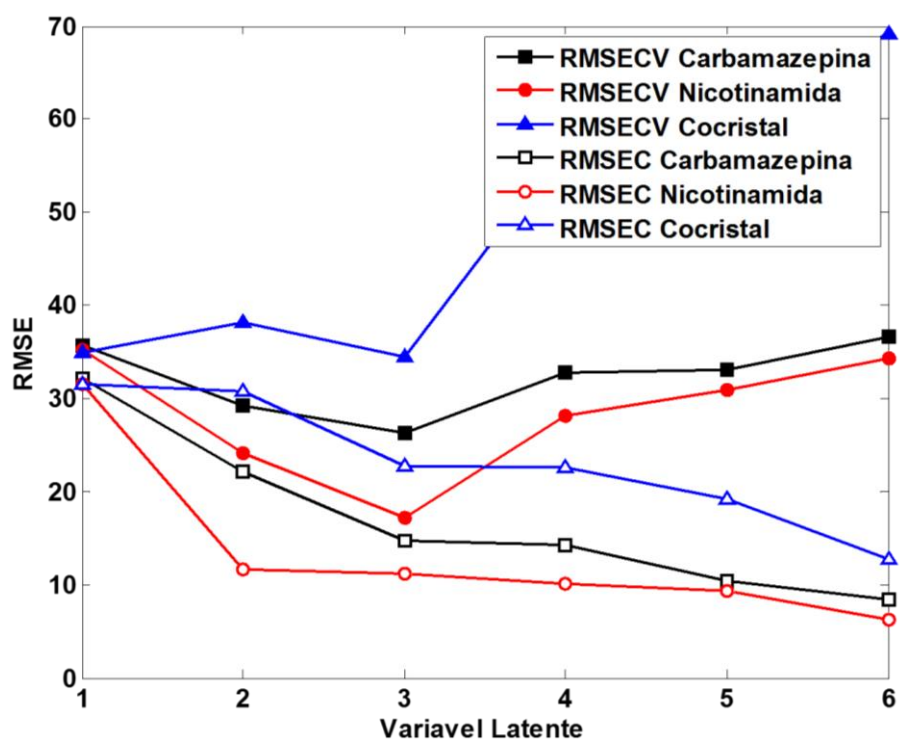


FIGURA 3.10 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

É possível avaliar o poder de predição do modelo analisando o gráfico de valores de concentração real contra os valores de concentração estimados pelo modelo, Figura 3.11. Apenas o modelo 2 apresentou uma boa linearidade e baixa dispersão dos dados em relação à reta ajustada para a quantificação de nicotinamida, todos os outros modelos mostraram-se ineficazes para a predição correta dos valores de calibração e de validação deste analito. Para os demais analitos, cocrystal e carbamazepina, nenhum modelou conseguiu prever os valores reais de concentração de maneira eficaz, apresentando uma grande dispersão dos dados em relação à reta ajustada.

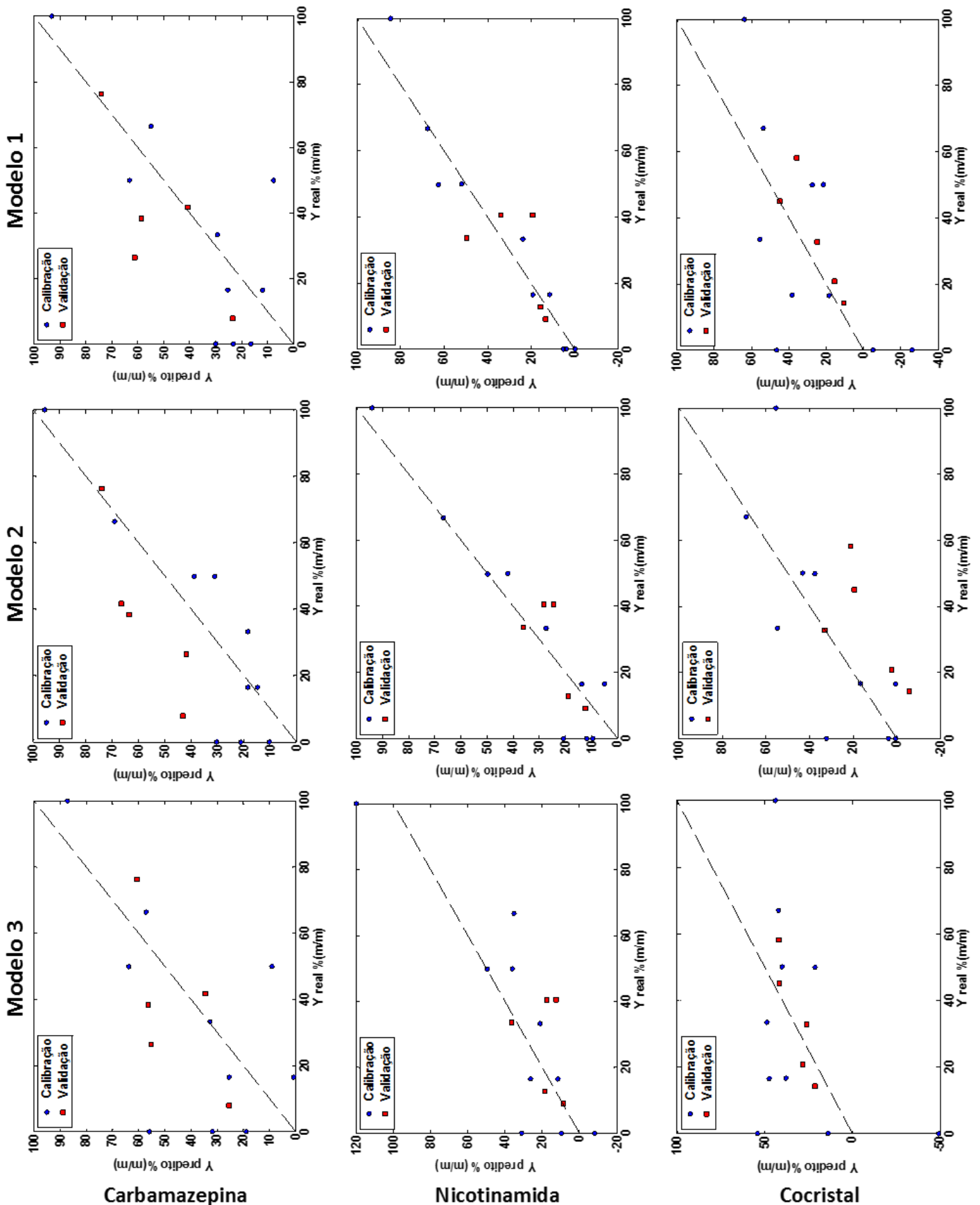


FIGURA 3.11 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração preditos em % (m/m). (•) Calibração, (□) Validação

As tabelas de 3.8 a 3.10 apresentam os dados resumidos para os 3 modelos de PLS utilizando o infravermelho. Os valores de raiz quadrada do erro quadrático médio dos erros de predição (RMSEP, do inglês *root mean square error of prediction*) e RMSECV permitem estimar a eficiência do modelo quanto a predição e a validação, respectivamente. Quanto menor os valores de RMSECV e RMSEP, menor é o erro do modelo para quantificar aquela substância.

O menor erro de validação cruzada e de predição para a carbamazepina foi obtido nas condições do modelo 1, com valor de RMSECV de 20% e valor de RMSEP de 19%, isto quer dizer que em 50 mg de uma mistura com carbamazepina, nicotinamida e cocrystal, o erro médio de previsão é de 9,5 mg, um erro bastante elevado até mesmo na quantificação de cristais. O modelo 3 foi aquele que melhor se ajustou para o cocrystal. Os valores obtidos foram 34,5% para o RMSECV e 9,2% para RMSEP. Como observado pelos gráficos de concentração real x concentração estimada, o PLS não pode diferenciar eficientemente a o cocrystal dos fármacos utilizados como coformadores.

O modelo 2 foi o que apresentou os menores erros para a nicotinamida. Os valores de RMSECV e RMSEP foram 9,7% para ambos os parâmetros. Mesmo com os elevados valores de erros, os valores obtidos no modelo 2 para a nicotinamida foram os melhores resultados obtidos empregando-se a técnica de infravermelho médio na quantificação do cocrystal e de seus coformadores.

TABELA 3.8 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 IR	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	14,0	5,2	18,7
RMSECV (%)	19,9	7,6	25,8
RMSEP (%)	19,1	12,4	11,1
R ² calibração	0,81	0,97	0,65
R ² CV	0,61	0,95	0,40
R ² predição	0,62	0,34	0,78
Pré-processamento	Normalizar + 1ªDerivada		
Tamanho do intervalo	35		
Variáveis incluídas	420 variáveis		
Região do espectro	(902–934 969–1036 1138–1171 1307–1339 2083–2116 2150–2183 2285–2318 2353–2385 2454–2487 2825–2858 3095–3128) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.9 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 IR	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	8,9	6,6	12,4
RMSECV (%)	14,9	9,7	19,9
RMSEP (%)	23,3	9,7	23,6
R ² calibração	0,92	0,96	0,85
R ² CV	0,79	0,91	0,61
R ² predição	0,77	0,60	0,46
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Tamanho do intervalo	10		
Variáveis incluídas	130 variáveis		
Região do espectro	(1143–1151 1837–1846 1953–1961 2049–2077 2107–2116 2271–2279 2290–2308 2367–2376 2387– 2395 2936–2954) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.10 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 IR	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	14,6	11,1	22,7
RMSECV (%)	26,3	17,2	34,5
RMSEP (%)	18,8	16,4	9,2
R ² calibração	0,79	0,88	0,49
R ² CV	0,37	0,73	0,13
R ² predição	0,43	0,10	0,84
Pré-processamento	Normalizar		
Variáveis Latentes	3		
Sem iPLS			

Os altos valores de erros de validação cruzada e de predição para o infravermelho eram esperados, uma vez que existe pouca dissimilaridade entre os espectros do cocrystal do espectro da mistura física e de seus componentes. Avaliando a Figura 3.7 é possível observar que o espectro da mistura física 1:1 de carbamazepina e nicotinamida, e o espectro do cocrystal apresentam os mesmos picos e com intensidades relativas bastante semelhantes. É possível observar, inclusive, picos e bandas característicos do cocrystal no espectro infravermelho da mistura física, demonstrando que a espectroscopia no infravermelho médio não possibilita identificar e quantificar de maneira eficiente o cocrystal de carbamazepina-nicotinamida na presença de seus coformadores.

3.3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial

Para a construção dos modelos de calibração e de validação, os calores de fusão envolvidos durante a análise foram normalizados para 1 miligrama de massa, i.e., cada ponto coletado pelo equipamento de DSC foi dividido pela massa total pesada para a análise, sendo posteriormente, realizada a média das triplicatas da análise. Como o modelo era baseado em uma mistura ternária, escolheu-se o melhor modelo para cada componente resultando em três melhores modelos: o modelo 1 referente aos melhores resultados obtidos na quantificação de carbamazepina, o modelo 2 referente à nicotinamida e o modelo 3 ao cocrystal.

A escolha das variáveis latentes foi baseada nos menores valores de RMSEC e RMSECV para cada componentes presentes na mistura. As Figuras de 3.12 a 3.14 apresentam o RMSEC e RMSECV para os três componentes em cada modelo. Observando as Figuras 3.12 a 3.14 é possível observar que a capacidade de previsão dos modelos não sofre qualquer aprimoramento quando se utiliza mais do que 3 variáveis latentes, portanto foram escolhidas 3 variáveis latentes para os modelos 1, 2 e 3 utilizando o DSC.

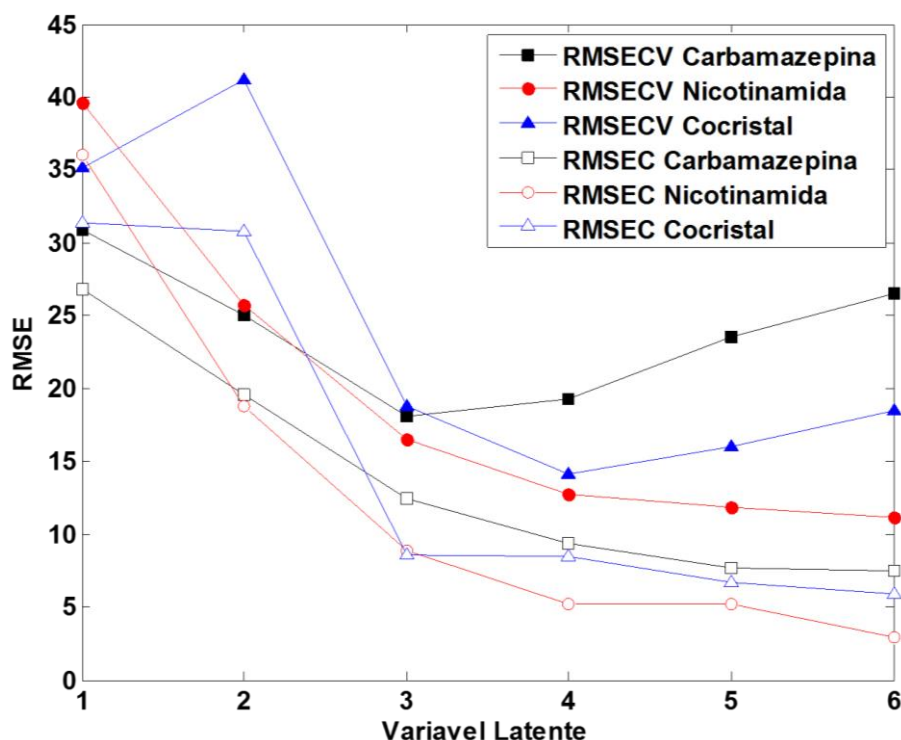


FIGURA 3.12 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

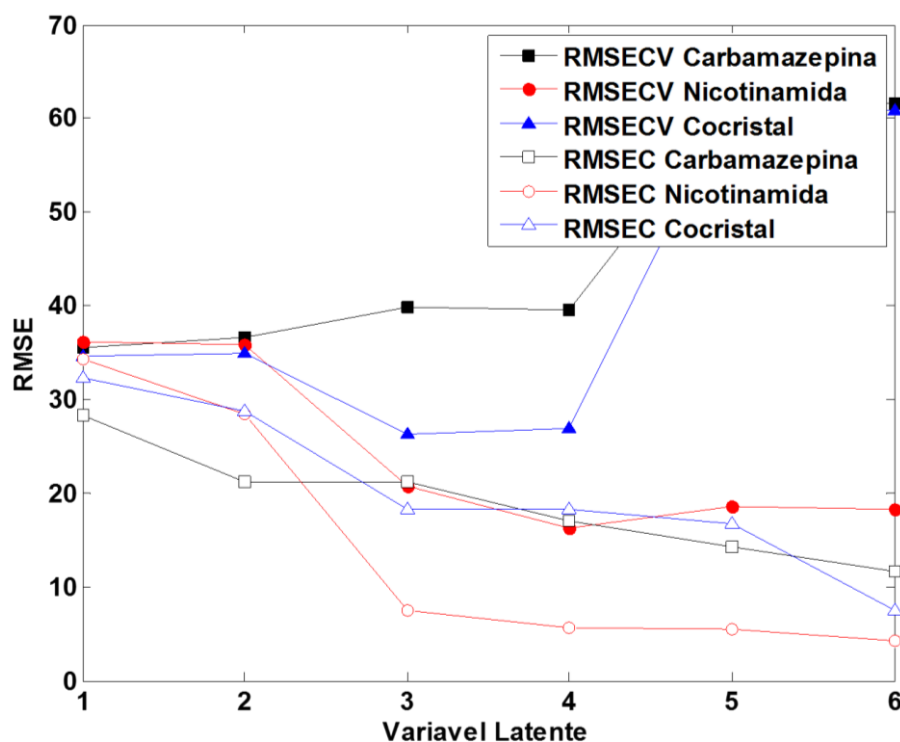


FIGURA 3.13 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

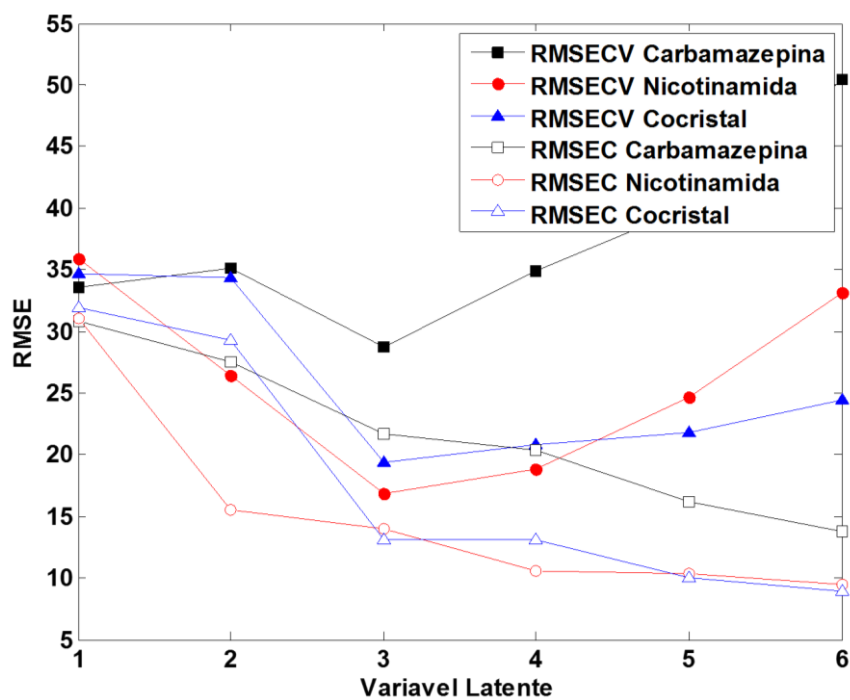


FIGURA 3.14 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

Os modelos mostraram uma baixa linearidade e alta dispersão dos dados em relação à reta ajustada (Figura 3.15). É possível observar que as curvas com melhor linearidade e baixa dispersão dos dados são as curvas de quantificação da nicotinamida. A nicotinamida é o primeiro componente da mistura a apresentar um ponto de fusão, isso faz com que os seus eventos térmicos não sejam influenciados de maneira direta pelos eventos térmicos dos outros compostos presentes na mistura, fazendo com que os dados apresentem melhor linearidade com a quantidade de nicotinamida presente na mistura. Isto significa que para a nicotinamida existe uma pequena variação entre os valores reais e os valores estimados pelo modelo, porém, os modelos apresentados não demonstram um desempenho superior em relação aos modelos obtidos por infravermelho médio, tornando o DSC uma técnica pior do que o infravermelho para a quantificação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida.

As tabelas de 3.11 a 3.13 apresentam os dados resumidos para os 3 modelos de PLS utilizando o DSC. O modelo 1 foi o que melhor apresentou valores para o carbamazepina com valores de RMSEP de 9,8%. O modelo 2 apresentou os melhores valores para a nicotinamida, RMSEP de 6,7%. E por fim o modelo 3 apresentou valor de RMSEP para o cocrystal de 9,3%. Todos os modelos apresentaram valores de RMSEP menores do que 10% para no mínimo um componente da calibração, entretanto os valores de RMSECV foram bem altos, próximos de 20%, indicando que, embora as amostras de predição terem se ajustado no modelo com pouca diferença entre os valores reais e os valores preditos, alguns pontos da calibração não foram bem preditos na etapa de validação cruzada, principalmente as amostras com apenas um componente.

Este fato se deve principalmente à alteração no perfil de fusão observada nas amostras que apresentam uma mistura, como por exemplo, a mistura física de carbamazepina:nicotinamida (Figura 3.4). Os eventos térmicos de menor temperatura alteraram de maneira significativa os eventos térmicos posteriores, impossibilitando a calibração simultânea de todos os componentes.

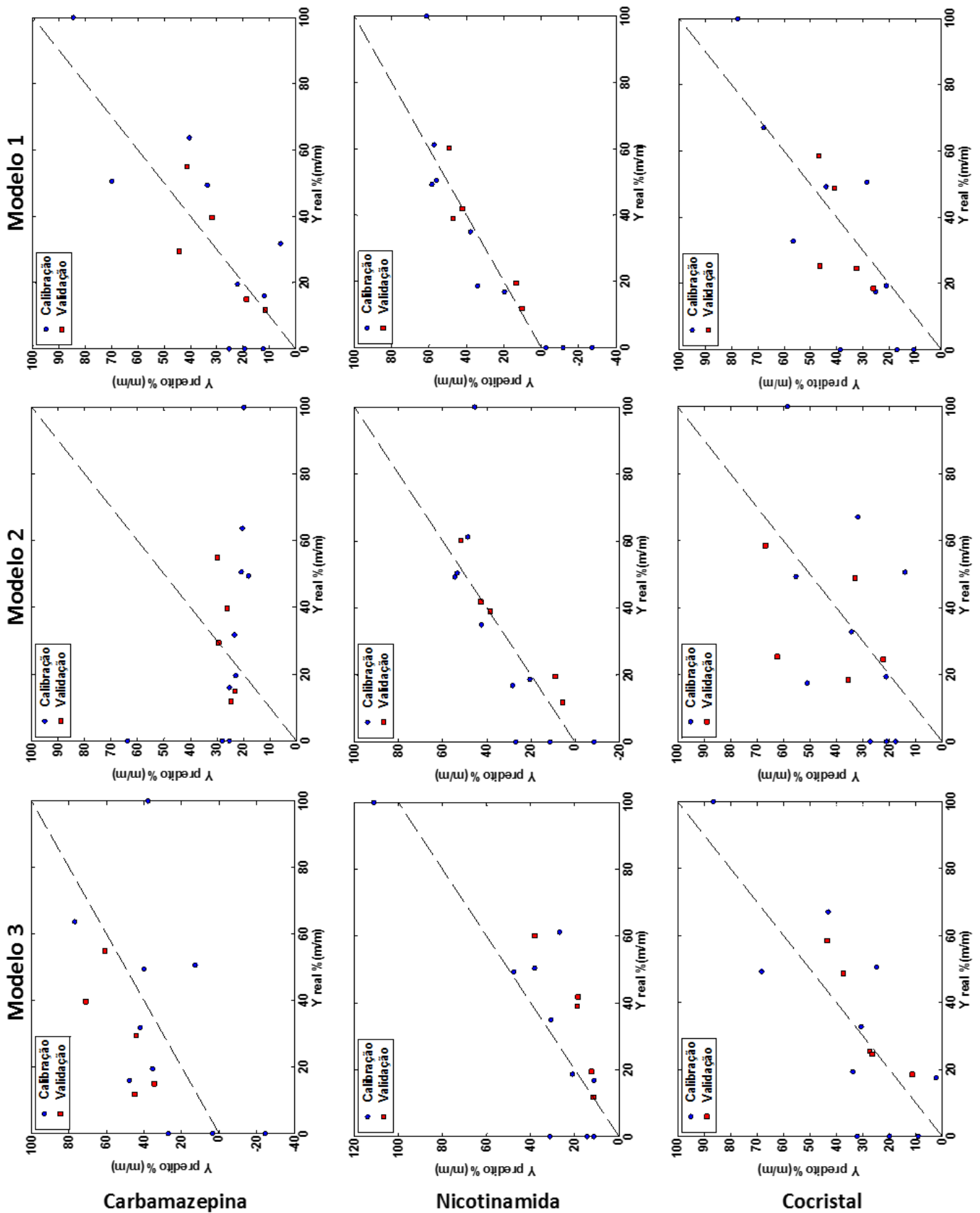


FIGURA 3.15 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação

TABELA 3.11 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 DSC	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	12,5	8,8	8,5
RMSECV (%)	18,1	16,5	18,8
RMSEP (%)	9,8	6,8	12,3
R ² de calibração	0,84	0,92	0,92
R ² de CV	0,66	0,75	0,69
R ² de predição	0,62	0,86	0,44
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a Derivada		
Tamanho do intervalo	275		
Variáveis incluídas	550 variáveis		
Região da curva de DSC	(138,37-142,79 147,24-151,65) °C		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.12 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 DSC	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	21,3	7,5	18,3
RMSECV (%)	39,9	20,7	26,3
RMSEP (%)	14,5	6,7	19,8
R ² de calibração	0,54	0,94	0,66
R ² de CV	0,27	0,57	0,30
R ² de predição	0,60	0,95	0,18
Pré-processamento	Normalizar		
Variáveis Latentes	3		
Sem iPLS			

TABELA 3.13 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 DSC	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	21,6	13,9	13,1
RMSECV (%)	28,8	16,8	19,3
RMSEP (%)	23,2	17,3	9,3
R ² de calibração	0,52	0,78	0,82
R ² de CV	0,27	0,71	0,63
R ² de predição	0,59	0,83	0,85
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	150		
Variáveis incluídas	750 variáveis		
Região da curva de DSC	(130,66-133,07 184,37-186,81) °C	152,46-157,31	176,96-179,44
Variáveis Latentes	3		

Apesar dos modelos de calibração apresentarem erros de predição menores que 10%, apenas para a nicotinamida, é possível observar um aumento na variância

explicada ($R^2 > 0,90$), e os erros referentes às amostras de calibração foram altos, demonstrando que a calorimetria exploratória diferencial é uma técnica analítica que não apresenta bons resultados para a quantificação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida em meio aos seus coformadores.

3.3.2.3. Difração de raios-X em pó (DRX)

As intensidades dos difratogramas de raios-X são influenciadas pelo tamanho do cristal, assim os difratogramas foram normalizados pela área de modo que todos os picos difratados obtivessem a mesma intensidade relativa. Usou-se a média das triplicatas das análises para construir os modelos de calibração e de validação. Foram testados diferentes tipos de pré-processamento com diferentes intervalos do difratograma, com o intuito de se obter modelos com menor diferença entre os valores reais e previstos pelo modelo.

A partir dos dados obtidos, foram selecionados três modelos que poderiam ser utilizados para quantificar pelo menos um dos componentes presentes na mistura, sendo o modelo 1 responsável por quantificar a carbamazepina, o modelo 2 a nicotinamida e o modelo 3 o cocrystal.

As Figuras de 3.16 a 3.17 apresentam os valores de RMSEC e RMSECV para os três componentes em cada um dos modelos, é possível observar que a partir de três variáveis latentes nenhuma variância significativa é adicionada ao modelo alcançando-se um patamar, portanto, para todos os modelos utilizou-se apenas 3 variáveis latentes como era de se esperar para um sistema ternário.

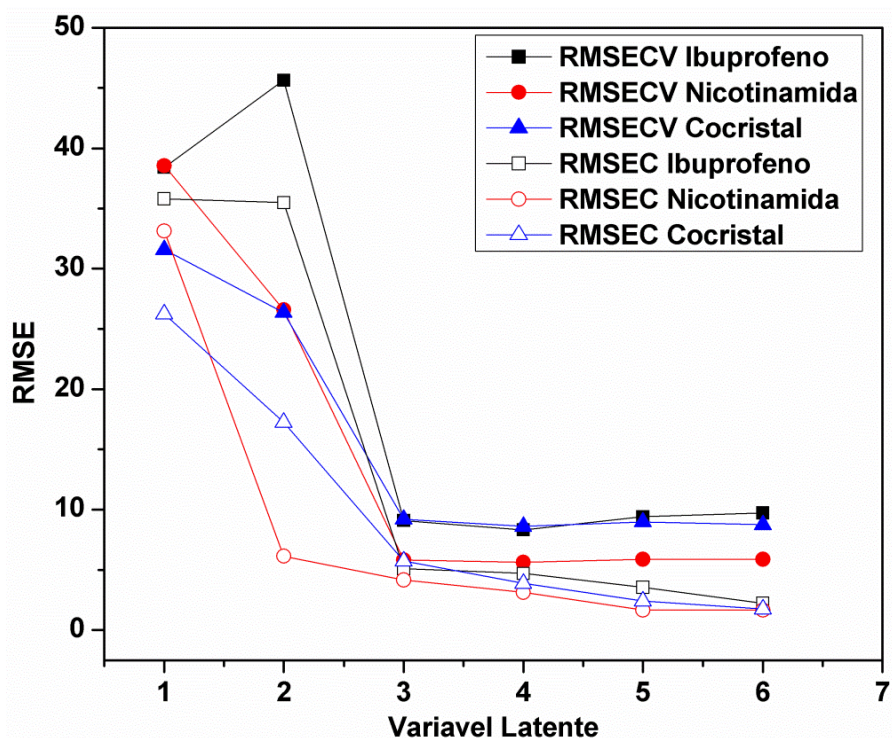


FIGURA 3.16 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

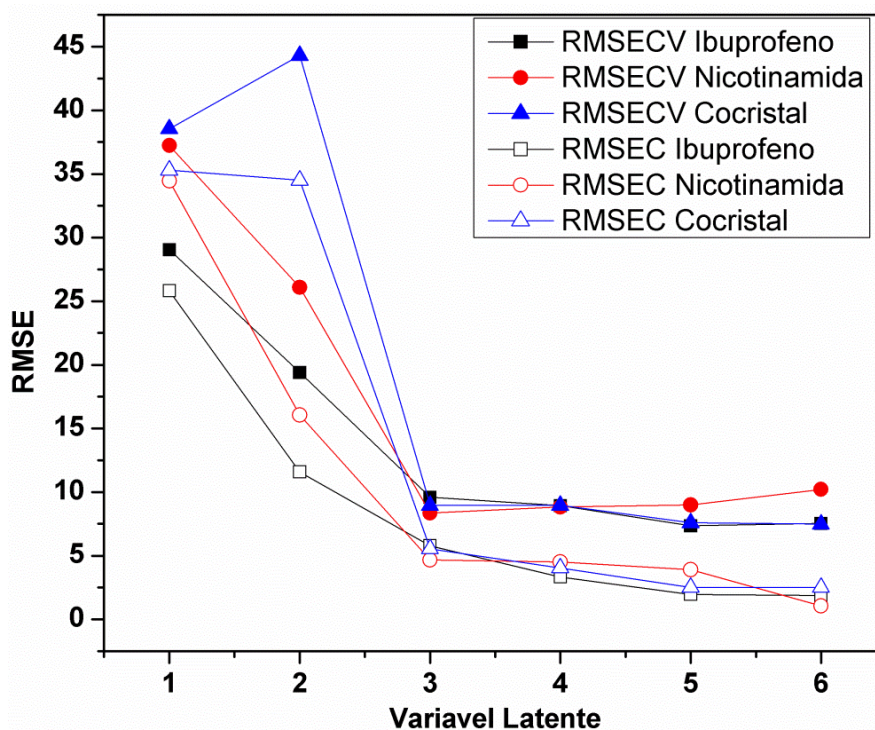


FIGURA 3.17 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

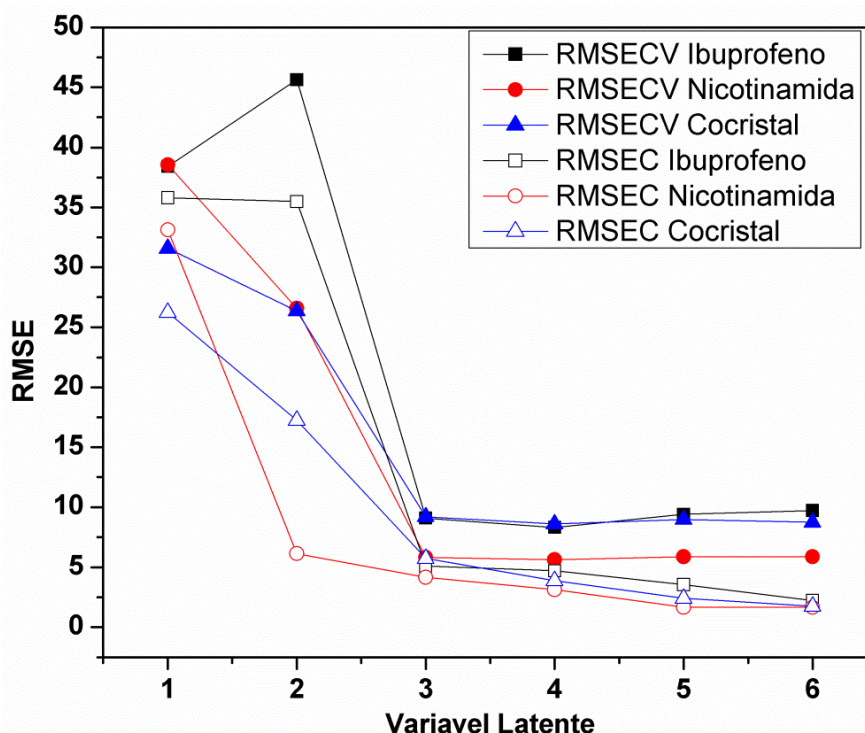


FIGURA 3.18 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

A Figura 3.19 apresenta os gráficos de valores de concentração real contra os valores de concentração preditos pelos respectivos modelos para cada analito. Para a carbamazepina, os modelos apresentaram uma boa concordância entre os valores reais de concentração e os valores estimados. Para o cocrystal, apenas o modelo 1 apresentou uma baixa dispersão dos dados de calibração e de validação, com valores de variância explicada próximos de 0,95. Entretanto, o modelo não possibilitou um bom ajuste das amostras de predição, com RMSEP de 14,0%, indicativo de um possível sobreajuste dos dados para o cocrystal.

As tabelas 3.14 a 3.16 apresentam os dados resumidos obtidos pelos modelos PLS. O modelo 1 apresentou valores de RMSECV igual à 10,7% e RMSEP 3,3% para a carbamazepina. Para a nicotinamida, o modelo com melhor ajuste foi o modelo 2, com RMSECV de 17,2% e RMSEP de 6,7% e o modelo 3 apresentou o melhor ajuste para o cocrystal, com valor de RMSECV de 18,4% e RMSEP de 5,4%.

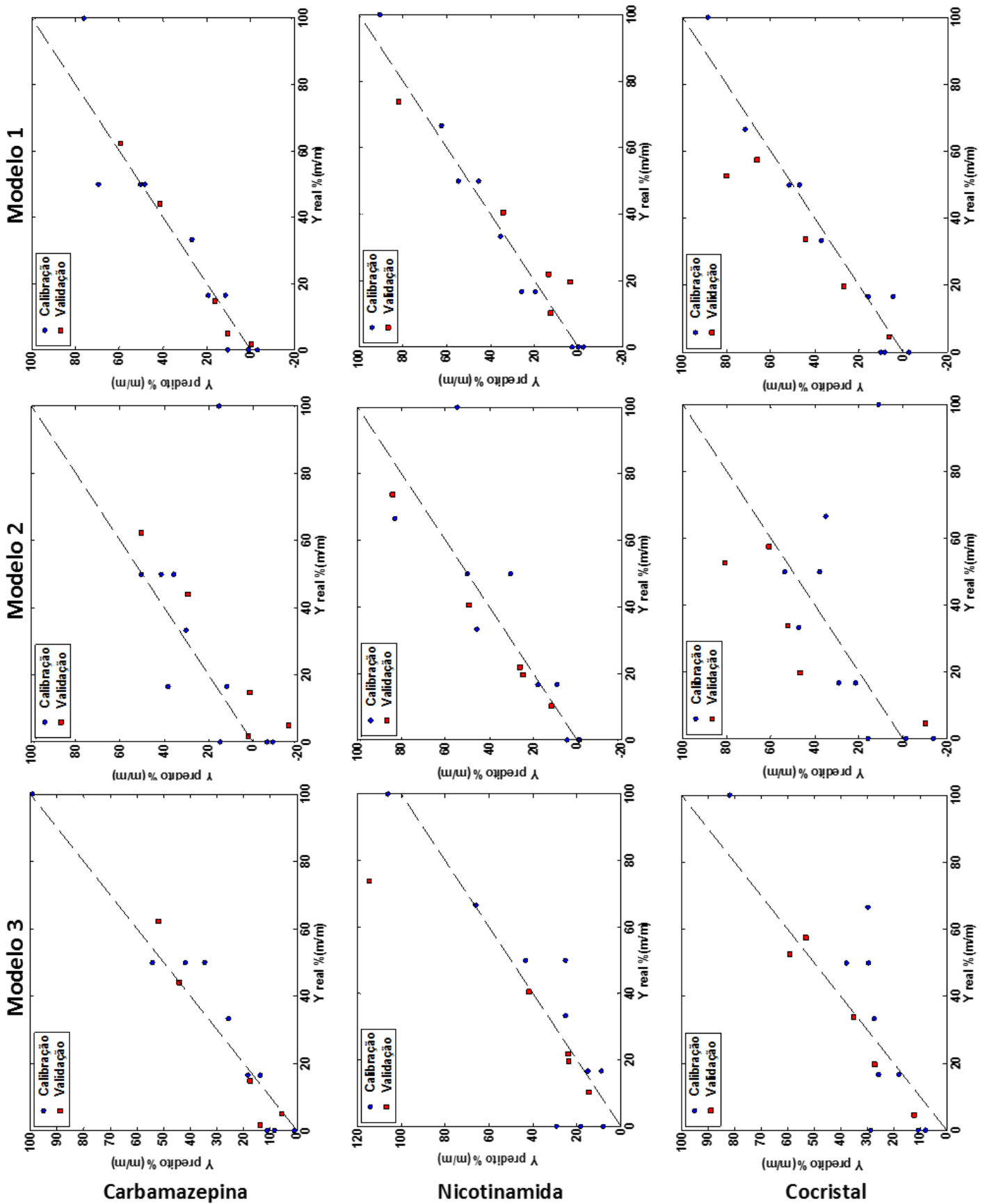


FIGURA 3.19 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação

A difratometria de raios-X sofre alta interferência devido ao tamanho do cristal e sua orientação preferencial, fatores que influenciam de maneira significativa nos resultados esperados para a quantificação de cristais. Diferentes sínteses e diferentes analistas podem favorecer os problemas de tamanho do cristal e orientação preferencial, respectivamente, diminuindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos dados obtidos nesta técnica.

TABELA 3.14 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 DRX	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	6,4	3,2	4,3
RMSECV (%)	10,7	5,1	7,1
RMSEP (%)	3,3	9,4	14,0
R ² de calibração	0,96	0,99	0,98
R ² de CV	0,88	0,98	0,95
R ² de predição	0,99	0,94	0,94
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	15		
Variáveis incluídas	60 variáveis		
Região do difratograma	(19,10-19,38 26,90-27,18 38,90-39,18 41,00-41,28)		
Variáveis Latentes	2 ^o 3		

TABELA 3.15 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 DRX	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	11,0	8,9	11,0
RMSECV (%)	28,8	17,2	31,4
RMSEP (%)	14,1	6,7	20,3
R ² de calibração	0,88	0,93	0,89
R ² de CV	0,22	0,72	0,16
R ² de predição	0,92	0,99	0,77
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Variáveis Latentes	3		
Sem iPLS			

TABELA 3.16 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 DRX	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	6,3	8,9	12,8
RMSECV (%)	7,7	14,5	18,4
RMSEP (%)	7,2	18,4	5,9
R ² de calibração	0,96	0,92	0,85
R ² de CV	0,94	0,79	0,73
R ² de predição	0,95	0,96	0,96

Pré-processamento	Normalizar + 1ª derivada
Tamanho do intervalo	40
Variáveis incluídas	240 variáveis
Região do difratograma	(4,80-6,58 11,40-12,18 16,20-17,84 36,20-36,98 40,20-40,98) 2°θ
Variáveis Latentes	3

Apesar dos baixos valores de predição do modelo, os valores de validação cruzada não foram baixos o suficiente para utilizar a difratometria de raios-X como técnica analítica de estado sólido na quantificação do cocristal de carbamazepina:nicotinamida. Os dados apresentaram uma melhora em relação as técnicas de infravermelho médio e calorimetria diferencial de varredura, entretanto não foram satisfatórios para utilizar esta técnica como análise de rotina em indústrias farmacêuticas devido aos altos erros estimados nas etapas de calibração e validação.

3.3.2.4. Espectroscopia Raman

Devido a diferenças de espalhamento Raman existentes entre os tipos de moléculas analisadas, normalizaram-se os espectros pela área de modo que todos obtivessem a mesma intensidade relativa, ou seja, a mesma importância para o modelo de calibração. Utilizou-se o algoritmo iPLS de seleção de variáveis para determinar diferentes intervalos espectrais que fornecessem maior informação espectral linear relativa a cada analito.

Para a construção dos modelos de calibração e de validação, usou-se a média de 10 espectros coletados em pontos aleatórios para uma mesma amostra, em seguida realizou-se a média das triplicatas reais destas amostras. Testou-se diferentes tipos de pré-processamentos e escolheu-se três modelos de previsão, um para cada componente presente no planejamento ternário.

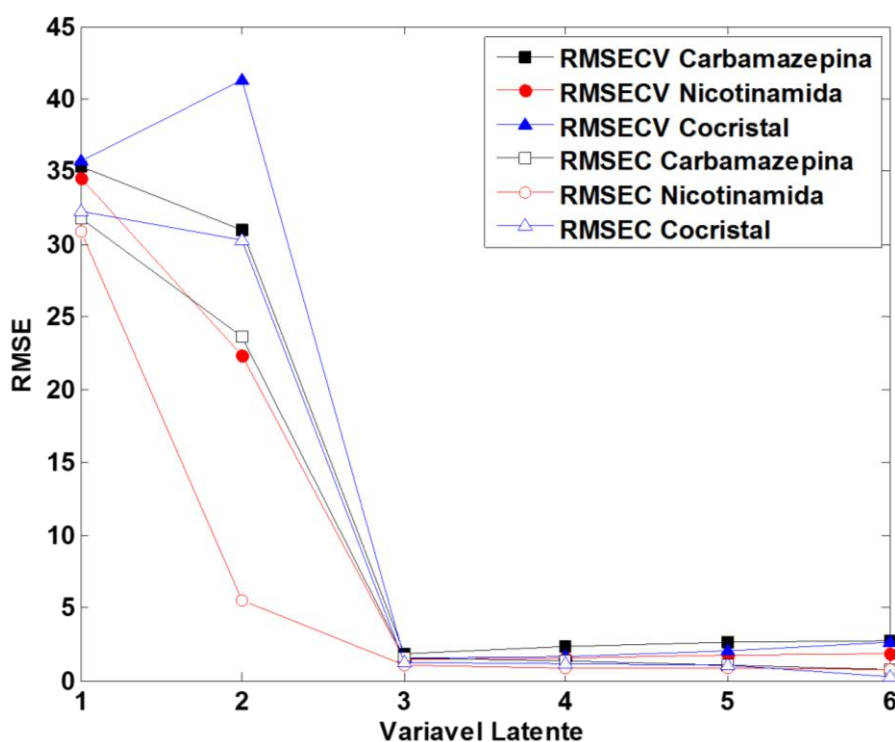


FIGURA 3.20 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

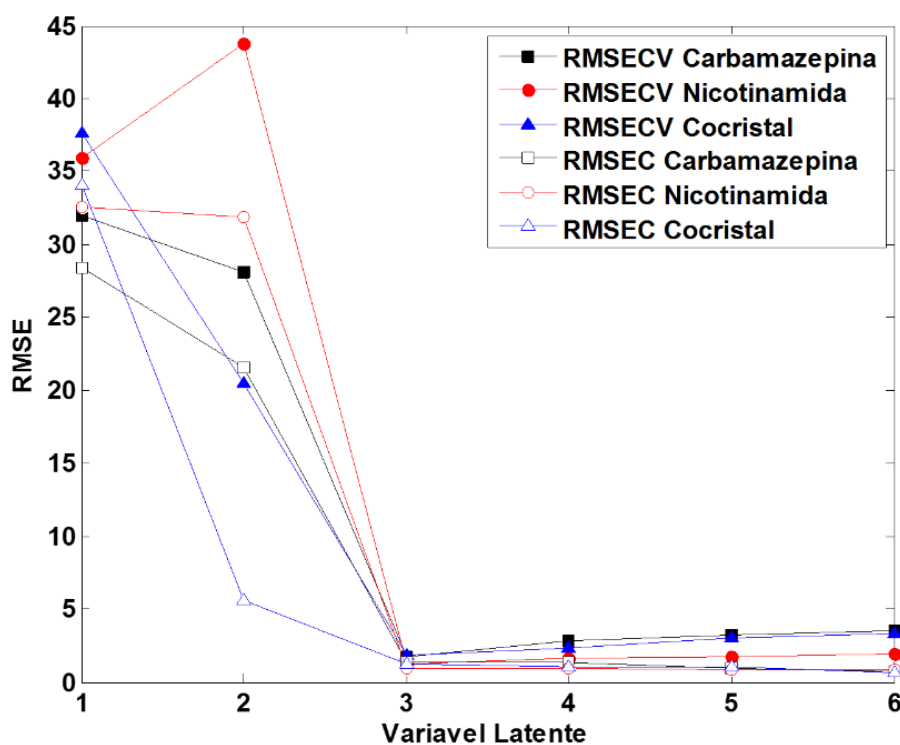


FIGURA 3.21 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

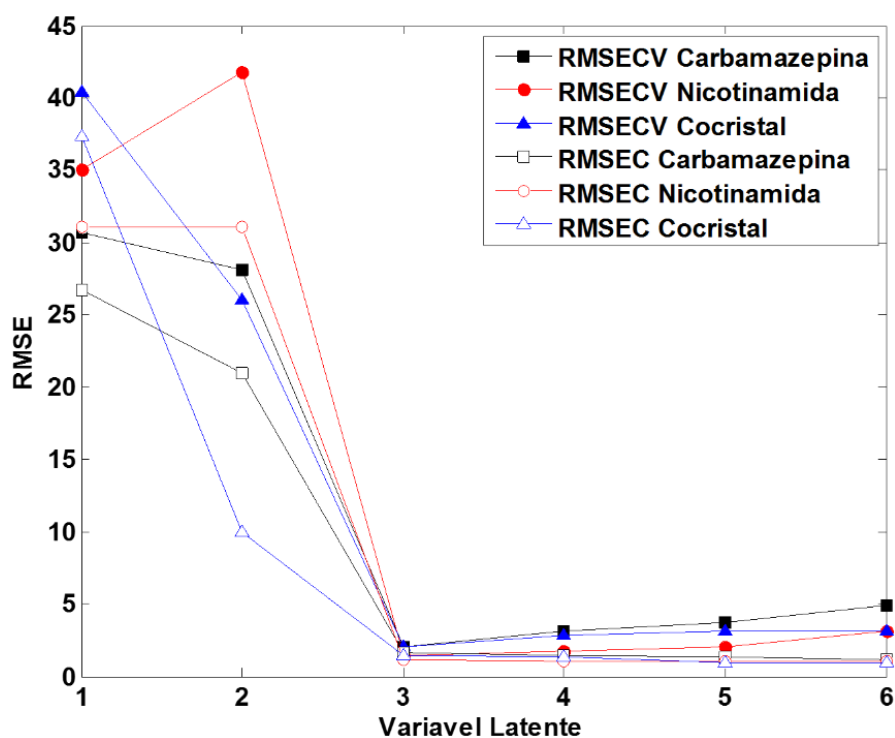


FIGURA 3.22 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

A escolha das variáveis latentes foi realizada, levando em consideração os gráficos de valores de RMSEC e RMSECV de cada um dos componentes para diferentes variáveis latentes (Figuras 3.20 a 3.22). Pela Figura 3.20, é possível observar que a partir de 3 variáveis latentes os valores de RMSEC e RMSECV não variam de maneira significativa. Logo, a capacidade de previsão não é melhorada quando se utiliza mais do que 3 variáveis latentes. Este critério foi utilizado para os modelos 2 e 3 (Figura 3.21 e 3.22, respectivamente).

A Figura 3.23 apresenta os gráficos de valor real contra valor predito para cada modelo e cada analito. Apenas observando a Figura 3.23, é aceitável observar que os modelos construídos a partir dos dados obtidos por espectroscopia Raman apresentaram o melhor ajuste de dados. Os modelos selecionados apresentam uma alta linearidade e baixa dispersão dos dados, indicando que há uma pequena diferença entre os valores de concentração preditos pelos modelos e os valores reais contidos em cada amostra.

As tabelas de 3.17 a 3.19 apresentam os dados resumidos para os 3 modelos de PLS utilizando a espectroscopia Raman. O modelo 1 foi o que apresentou os

melhores valores para a quantificação de carbamazepina, com valores de RMSECV e RMSEP de 1,8% e 2,5% respectivamente. O modelo 2 foi o que melhor apresentou valores para a nicotinamida. Os valores de RMSECV e RMSEP foram de 1,3% e 4,1% respectivamente. E o modelo 3 foi aquele que melhor se ajustou para o cocrystal. Os valores obtidos foram 2,0% para o RMSECV e 3,5% para RMSEP.

Os resultados mostraram que é possível quantificar o cocrystal de carbamazepina-nicotinamida e seus coformadores a partir de uma mistura ternária destes componentes utilizando a espectroscopia Raman. Enquanto as outras técnicas analíticas de estado sólido demonstraram erros de previsão próximos de 10% e erros de validação cruzada de 15% na maioria dos casos, os modelos utilizando a espectroscopia Raman apresentaram valores de RMSEP e o RMSECV menores que 5% sendo valores suficientemente baixos para a quantificação de cristais. O Raman mostrou-se a técnica mais precisa, seguida pelo DRX, espectroscopia no infravermelho médio, e por fim o DSC.

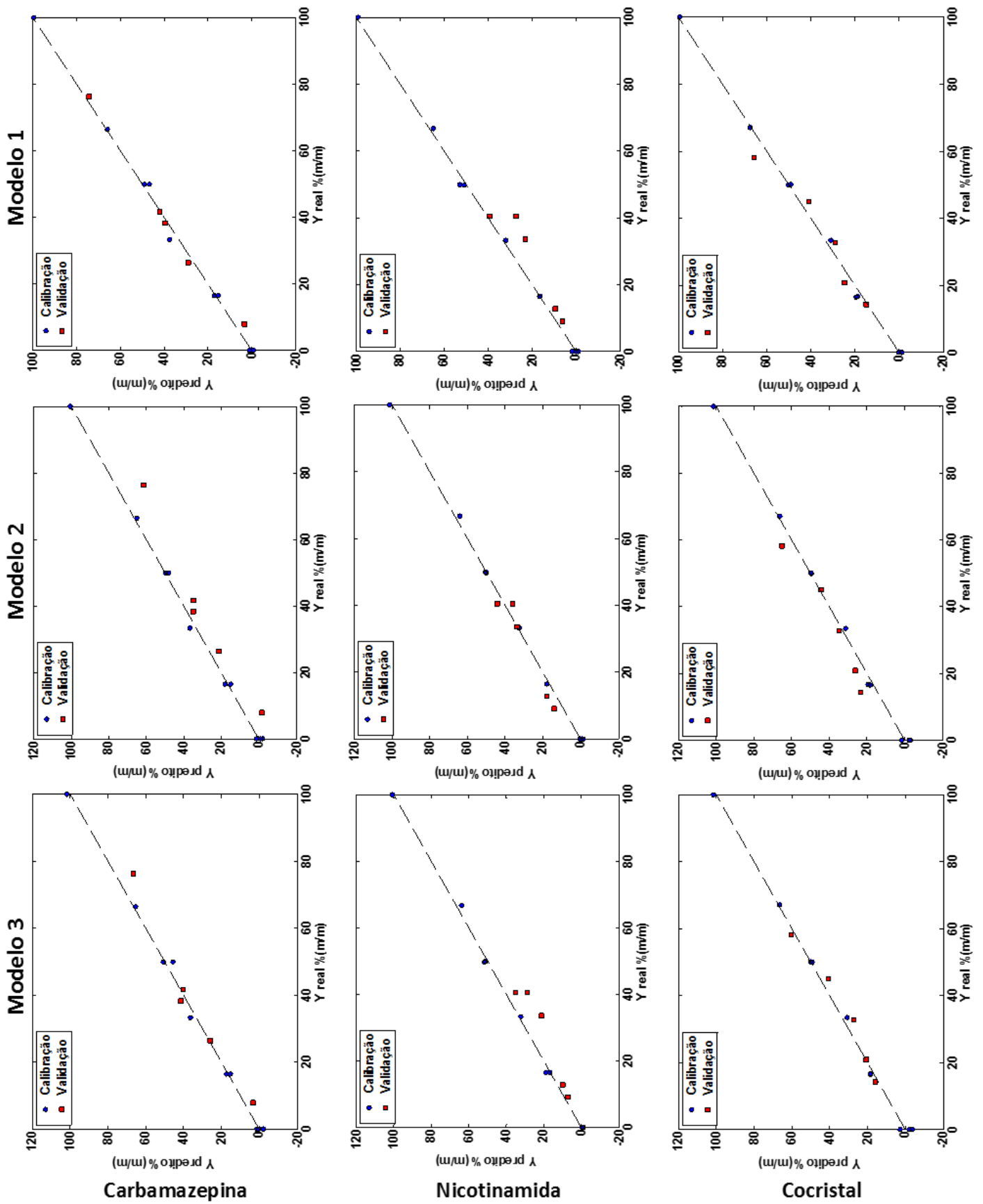


FIGURA 3.23 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de predição em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação

TABELA 3.17 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 Raman	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	1,5	1,1	1,2
RMSECV (%)	1,8	1,4	1,6
RMSEP (%)	2,5	7,9	4,6
R ² de calibração	0,99	0,99	0,99
R ² de CV	0,99	0,99	0,99
R ² de predição	0,99	0,88	0,94
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	15		
Variáveis Incluídas	135 variáveis (785-808 835-858 884-891 982-1004 1100-1122 1170-1191 1328-1349 1647- 1666 1688-1706) cm ⁻¹		
Região do espectro			
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.18 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 Raman	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	1,4	0,9	1,3
RMSECV (%)	1,8	1,3	1,8
RMSEP (%)	9,0	4,1	5,6
R ² de calibração	0,99	0,99	0,99
R ² de CV	0,99	0,99	0,99
R ² de predição	0,97	0,95	0,96
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	20		
Variáveis incluídas	220 variáveis (355-426 500-534 606-639 810-875 909-940 1131- 1191 1343-1370 1681-1706) cm ⁻¹		
Região do espectro			
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.19 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 Raman	Carbamazepina	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	1,6	1,1	1,4
RMSECV (%)	2,1	1,4	2,0
RMSEP (%)	5,1	8,2	3,5
R ² de calibração	0,99	0,99	0,99
R ² de CV	0,99	0,99	0,99
R ² de predição	0,97	0,93	0,96
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Tamanho do intervalo	40		
Variáveis incluídas	160 variáveis (355-426 777-907 1100-1161) cm ⁻¹		
Região do espectro			
Variáveis Latentes	3		

3.3.3. Caracterização do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT)

O cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida sintetizado foi caracterizado por DSC (Figura 3.24), DRX (Figura 3.25), Raman (Figura 3.26) e infravermelho médio (Figura 3.27).

A Figura 3.24 apresenta a curva de DSC do cocrystal e de seus precursores. O cocrystal apresentou um sinal endotérmico em 92 °C referente ao seu ponto de fusão, um valor diferente da temperatura de fusão de seus coformadores. O ibuprofeno apresentou um sinal endotérmico em 75 °C e a nicotinamida em 131 °C, ambos são os sinais respectivos aos pontos de fusão dos compostos puros. Os resultados estão de acordo com os dados da literatura^{26,69-72}.

A análise da mistura física 1:1 (m/m) de ibuprofeno e nicotinamida mostrou a fusão do ibuprofeno em 72° C, e, em seguida ocorreu a formação *in situ* do cocrystal, comprovado pelo ponto de fusão em 89,6 °C. Pela curva de DSC, é possível observar o nível da pureza, uma vez que apenas um ponto de fusão é observado.

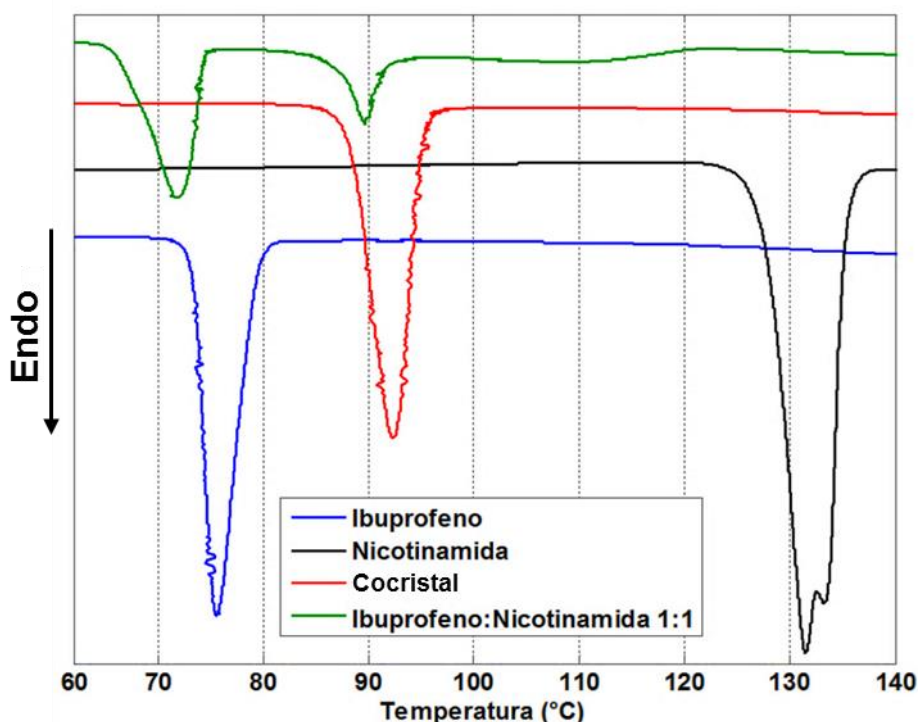


FIGURA 3.24 – Curvas de DSC do cocrystal, de seus substratos e de uma mistura física dos substratos

A Figura 3.25 apresenta o difratogramas do cocrystal e seus coformadores. Analisando o difratograma, percebe-se que pelos padrões de difração do cocrystal não

existem outras formas cristalinas além daquela referente ao cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida. O ibuprofeno apresenta picos de difração característicos em: 6,06; 12,22; 13,86; 14,60; 16,54; 17,60; 18,80; 19,32; 20,06 e 22,24 $2^\circ\theta$. Para a nicotinamida os picos de difração mais significativos são: 11,34; 14,80; 19,06; 19,54; 19,92 e 22,24 $2^\circ\theta$. Enquanto o cocrystal apresenta picos diferentes dos seus coformadores iniciais: 9,50; 12,66; 15,82; 16,24; 16,94; 17,72; 18,98; 21,76; 25,36 e 35,08 $2^\circ\theta$. Sendo os mais característicos os picos em 9,50 $2^\circ\theta$ e 12,66 $2^\circ\theta$, confirmando uma nova estrutura cristalográfica. Os difratogramas obtidos apresentaram-se de acordo com os reportados na literatura^{26,52,68-72}.

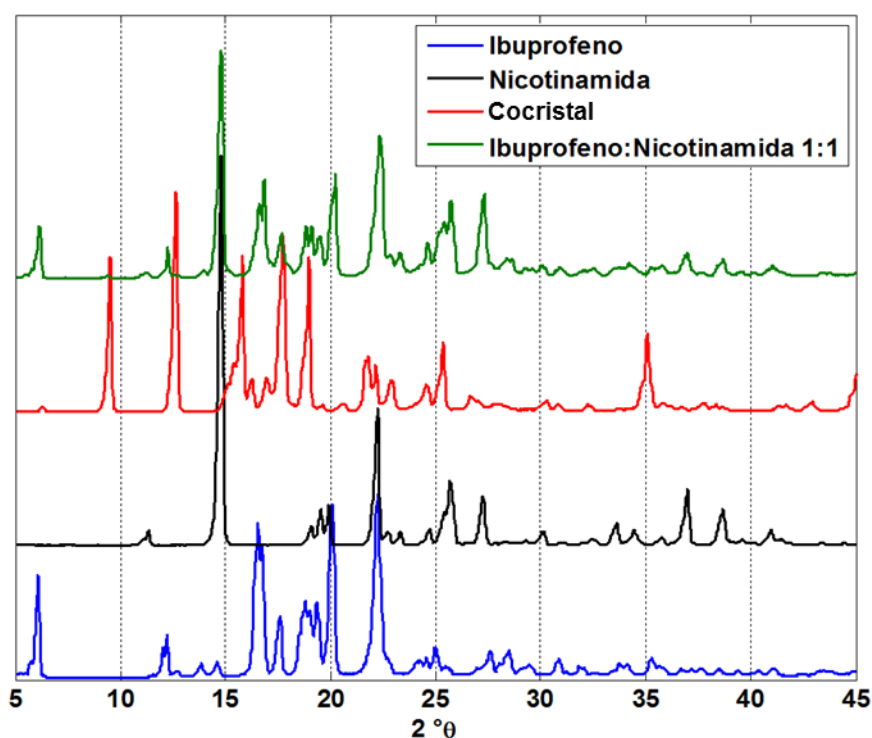


FIGURA 3.25 – Difratograma do cocrystal e de seus substratos e de uma mistura física dos substratos

A Figura 3.26 apresenta o espectro Raman do cocrystal e de seus coformadores. No espectro da nicotinamida, a alteração mais evidente é o deslocamento do pico em 788 cm^{-1} , referente a deformação angular do grupo NH_2 e o deslocamento do pico em 1391 cm^{-1} do estiramento C-N-H ¹⁵⁶. Estas mudanças são devido à ligação homosínton que ocorre entre duas moléculas de nicotinamida presentes no arranjo do cocrystal. Na região de $1570 - 1630\text{ cm}^{-1}$ observa-se

deslocamentos nos picos da nicotinamida. Esta é a região de estiramentos do anel piridínico, onde a molécula de ibuprofeno realiza a ligação heterosínton do cocrystal.

O espectro do ibuprofeno apresenta diversos picos que são mantidos no espectro do cocrystal, principalmente na região de $900 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, característica de vibrações CH_2 e CH_3 ¹⁵⁶. Entretanto, é possível diferenciar o espectro do ibuprofeno do espectro do cocrystal em duas regiões específicas na região de $820 - 850 \text{ cm}^{-1}$ e na região de 746 cm^{-1} . Em $820 - 850 \text{ cm}^{-1}$, ocorre um deslocamento dos picos referentes ao estiramento C-H do anel aromático, sendo o pico 833 cm^{-1} , o mais evidente para o ibuprofeno¹⁵⁷. O pico em 746 cm^{-1} é referente ao estiramento C=O e estiramento C-H de aromáticos do ibuprofeno¹⁵⁷ não são observados no espectro do cocrystal, sendo este um pico seletivo para o ibuprofeno e que garante a pureza do cocrystal.

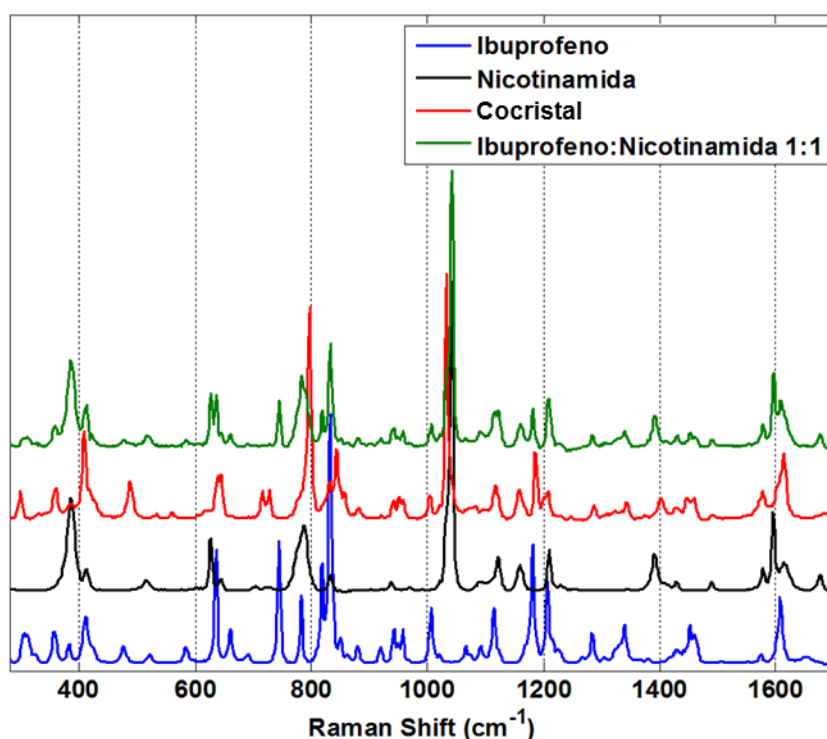


FIGURA 3.26 – Espectro Raman do cocrystal e de seus substratos

A Figura 3.27 apresenta os espectros na região do infravermelho médio para o cocrystal e seus coformadores. No infravermelho médio, assim como ocorre com o cocrystal de carbamazepina-nicotinamida, o espectro da mistura física de ibuprofeno:nicotinamida 1:1 é bastante semelhante ao espectro do cocrystal. Assim, o infravermelho é a técnica que menos fornece informação para caracterizar o produto,

e ainda, fornece pouca informação útil ao modelo na calibração para quantificar o cocrystal. Apenas alguns deslocamentos de picos na região do fingerprint e o aparecimento de duas bandas de baixa intensidade em 1950 cm^{-1} e 2500 cm^{-1} diferenciam o espectro do cocrystal do espectro misto de seus coformadores.

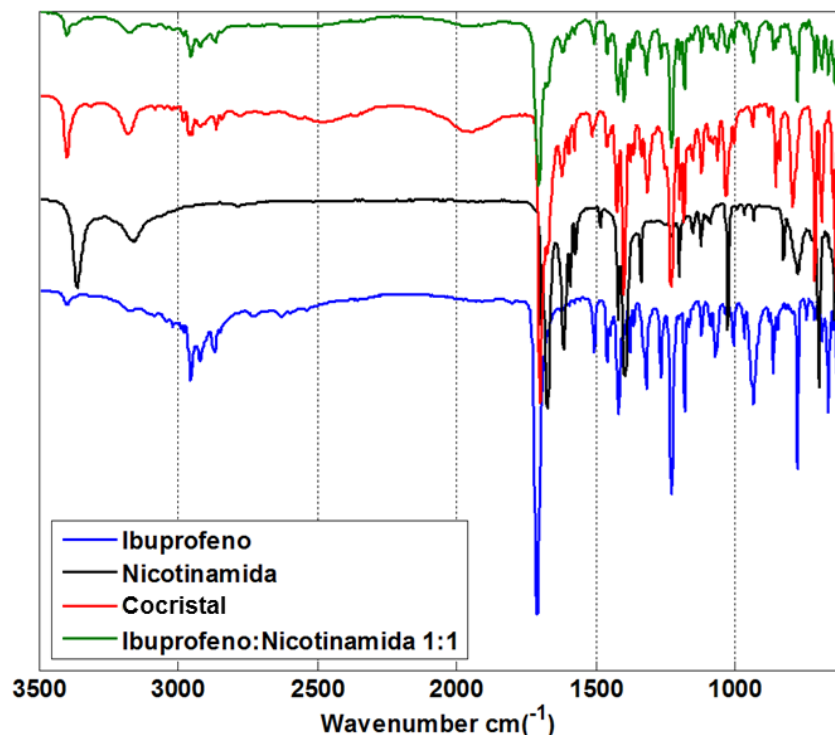


FIGURA 3.27 – Espectro infravermelho do cocrystal e de seus substratos

3.3.4. Quantificação do cocrystal de IBP-NCT por PLS

3.3.4.1. Infravermelho médio

Devido a diferenças de intensidade e deslocamento de linha de base ocorrida durante as análises, normalizaram-se os espectros pela área de modo que todos obtivessem a mesma intensidade relativa, ou seja, a mesma importância para o modelo de calibração. Com o intuito de se ajustar um modelo com melhor concordância entre os dados de validação e de calibração, utilizou-se o algoritmo iPLS de seleção de variáveis para selecionar as partes mais importantes do espectro de modo a obter modelos com menor quantidade de variáveis e com menores erros.

Entretanto, para o infravermelho, a diferença espectral entre os espectros dos substratos iniciais e do cocrystal é muito pequena. Por isso, um dos pré-tratamentos utilizados foi a primeira derivada dos espectros. A primeira derivada tornou mais nítido

os sinais característicos de cada componente, porém também causou um aumento na intensidade dos ruídos.

Foram construídos e testados modelos de calibração utilizando todo o espectro, todo o espectro derivado e diferentes faixas de espectrais do espectro e do espectro derivado. Para a construção do modelo de calibração, foi utilizada a média das triplicatas da análise com o intuito de minimizar os erros instrumentais, erros de pesagem e erros de amostragem. Como o modelo era baseado em uma mistura ternária de três componentes (ibuprofeno, nicotinamida e cocrystal), escolheram-se os três melhores modelos, um para cada componente presente na mistura.

A escolha das variáveis latentes foi baseada na menor raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV). As Figuras de 3.28 a 3.30 apresentam os valores de RMSEC e RMSECV para os três componentes em cada um dos modelos. A partir dos dados de RMSECV, é possível observar que para todos os modelos a partir da terceira variável latente, ou o valor de RMSECV aumenta ou alcança um patamar, onde não há variação significativa no erro. Portanto, para todos os modelos utilizou-se apenas 3 variáveis latentes. Os modelos utilizados são apresentados nas tabelas de 3.20 a 3.22.

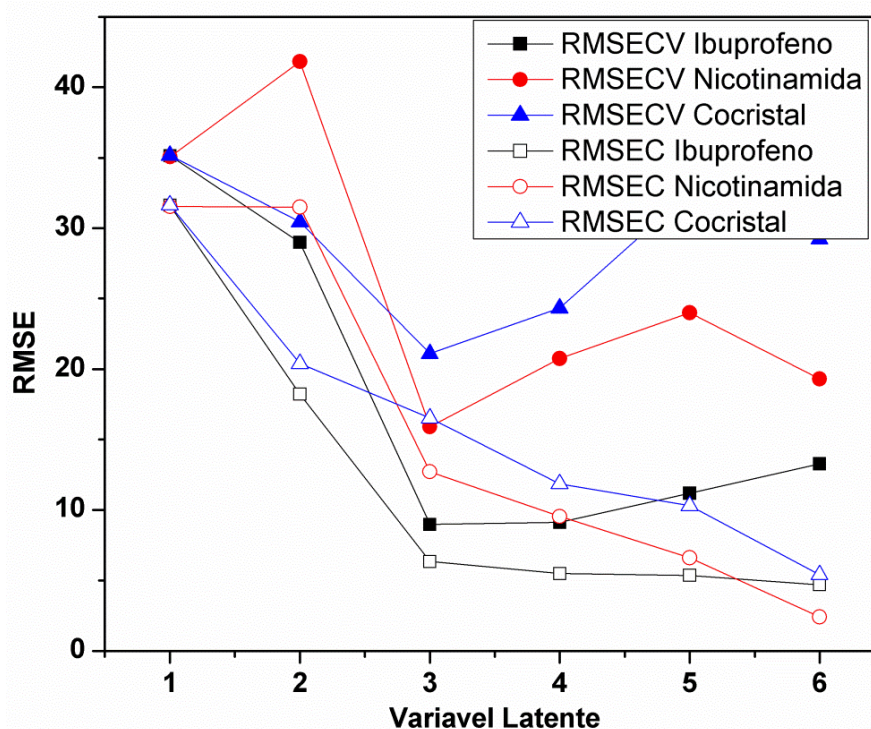


FIGURA 3.28 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

Uma maneira de se avaliar o modelo é partir dos gráficos de valores de concentração real contra os valores de concentração estimados pelo modelo do PLS, Figura 3.31. Para o ibuprofeno, os modelos apresentaram boa linearidade e baixa dispersão dos dados em relação à reta ajustada. Isto significa que para o ibuprofeno não houveram variações significativas entre os valores reais e os valores estimados pelo modelo, ou seja, o erros do modelo foram pequenos. Entretanto, para a nicotinamida e o para o cocristal há grande dispersão dos dados em relação à reta ajustada.

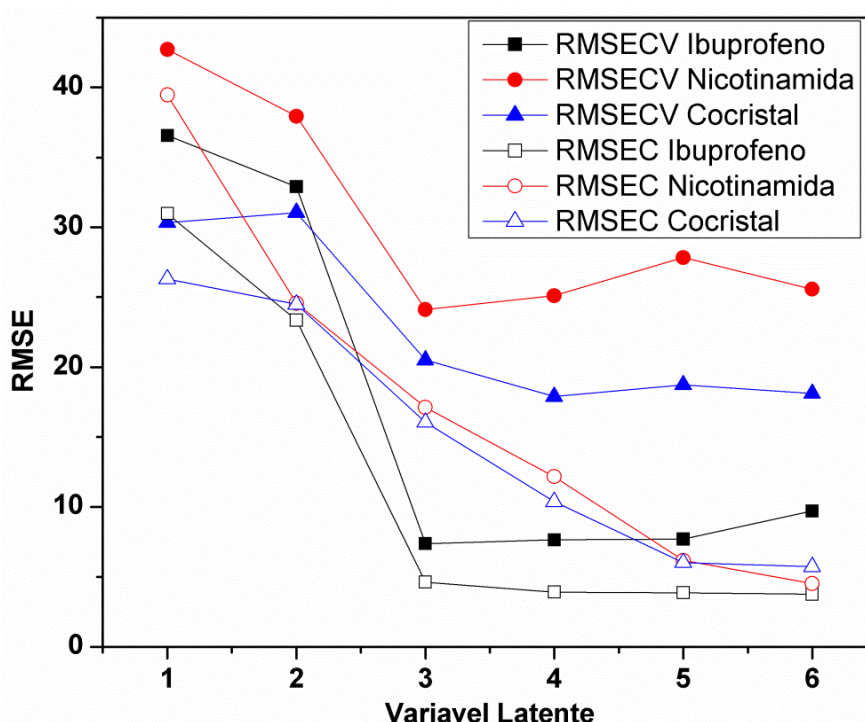


FIGURA 3.29 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

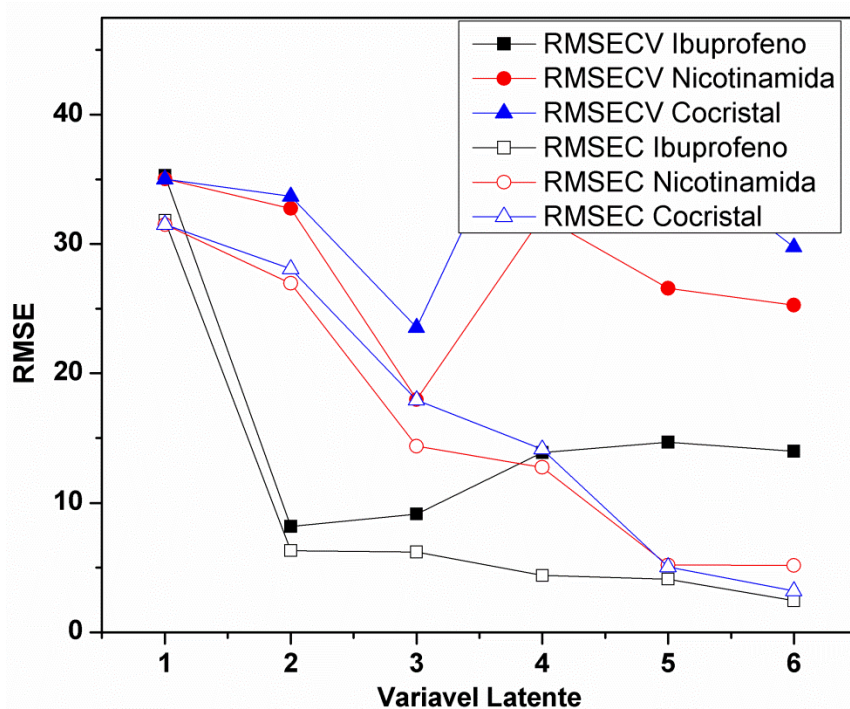


FIGURA 3.30 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

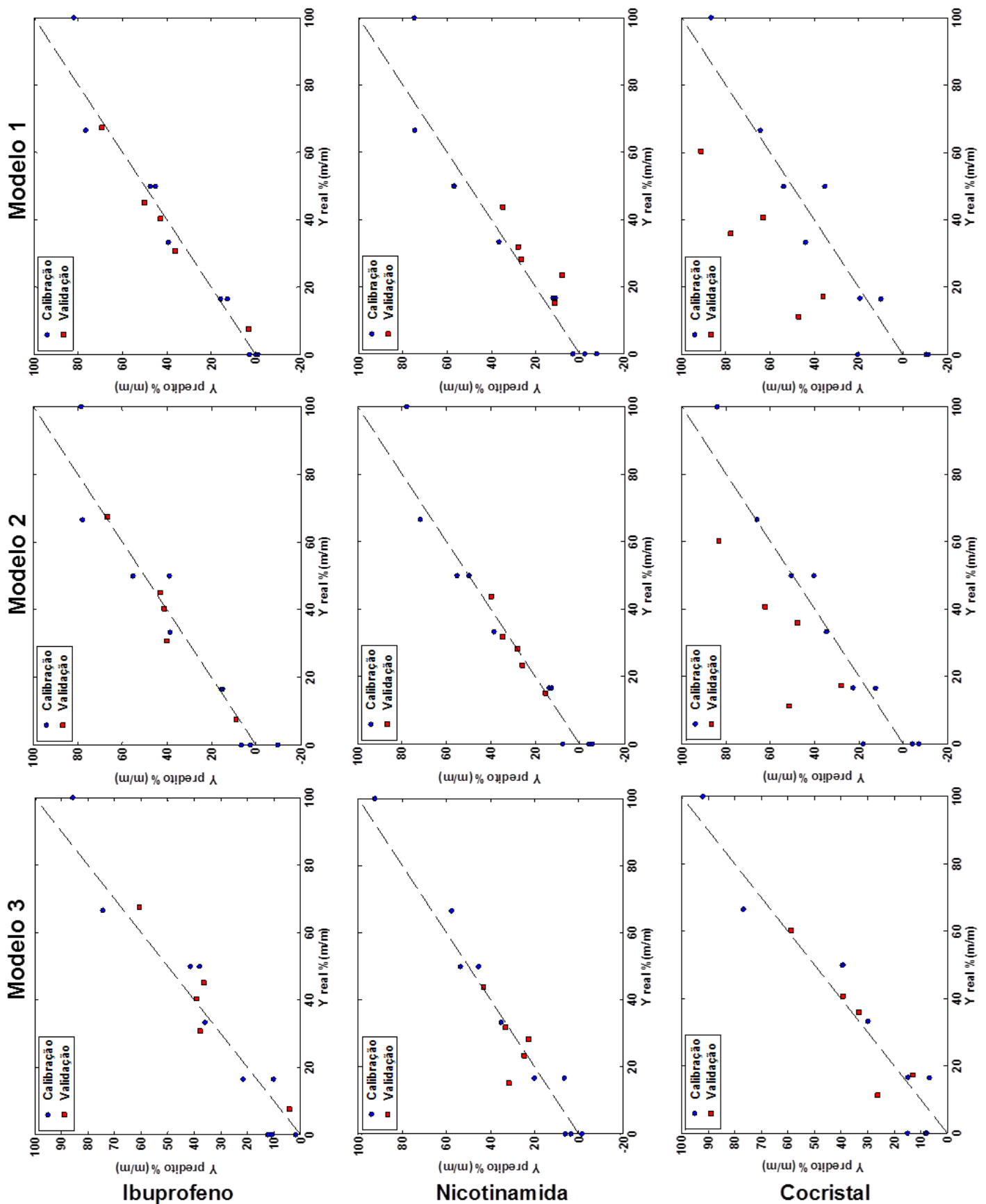


FIGURA 3.31 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em %(m/m). (•) Calibração, (□) Validação

Através da Figura 3.31, é possível observar que o modelo PLS utilizando os espectros na região do infravermelho confunde a concentração de nicotinamida e de cocrystal. As amostras de validação de todos os modelos para a nicotinamida demonstram uma concentração estimada menor do que a concentração real, e para o cocrystal, os modelos apresentam uma concentração estimada maior do que a concentração real. Isto se deve principalmente à semelhança espectral entre o cocrystal e a nicotinamida.

As tabelas de 3.20 a 3.22 apresentam os dados resumidos para os 3 modelos de PLS utilizando o infravermelho. O modelo 1 foi o que melhor apresentou valores para o ibuprofeno. Os valores de RMSECV e RMSEP foram 9,0% e 5,4% respectivamente. Isto significa que os valores de concentração para a etapa de calibração tiveram um erro médio de 9% e 5,4% para as amostras de validação. Estes valores apresentaram-se muito bons principalmente se considerar a massa das amostras analisadas. Em 50 mg de uma mistura com ibuprofeno, nicotinamida e cocrystal, o erro médio de previsão não passa de 2,7 mg.

O modelo 2 foi o que apresentou os melhores valores para a determinação de nicotinamida. Os valores de RMSECV e RMSEP foram 24,1% e 11,8% respectivamente. E o modelo 3 foi aquele que melhor se ajustou para o cocrystal. Os valores obtidos foram 23,5% para o RMSECV e 28,5% para RMSEP. Como observado pelos gráficos de concentração real por concentração estimada, o PLS não pode diferenciar eficientemente a nicotinamida do cocrystal, portanto seria de se esperar que os erros médios para esses componentes fossem maiores.

TABELA 3.20 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 IR	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	6,3	12,7	16,5
RMSECV (%)	9,0	15,9	21,1
RMSEP (%)	5,4	43,2	42,3
R ² calibração	0,96	0,84	0,73
R ² CV	0,92	0,75	0,56
R ² predição	0,95	0,38	0,45
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	25		
Variáveis incluídas	50 variáveis		
Região do espectro	(1033,67–1079,96 1756,85–1803,14) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.21 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 IR	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	4,6	17,1	16,1
RMSECV (%)	7,4	24,1	20,5
RMSEP (%)	5,8	11,8	33,7
R ² calibração	0,98	0,71	0,74
R ² CV	0,95	0,51	0,58
R ² predição	0,89	0,62	0,40
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Tamanho do intervalo	50		
Variáveis incluídas	250 variáveis		
Região do espectro	(599,77–694,26 1178,31–1272,81 2238,98–2429,90) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.22 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 IR	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	6,2	14,4	17,9
RMSECV (%)	9,1	18,0	23,5
RMSEP (%)	6,8	32,6	28,5
R ² calibração	0,96	0,79	0,68
R ² CV	0,92	0,68	0,46
R ² predição	0,88	0,72	0,47
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	40		
Variáveis incluídas	40 variáveis		
Região do espectro	(908,32 – 983,53) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

3.3.4.2. Calorimetria exploratória diferencial

Os calores de fusão envolvidos durante a análise são diretamente proporcionais a quantidade de massa utilizada. Por isso, normalizaram-se as curvas de DSC para 1 miligrama de massa.

Grande quantidade de dados foram gerados para cada curva de DSC (4900 pontos por curva), por isso utilizou-se o algoritmo iPLS para diminuir a quantidade de variáveis presentes no modelo e assim melhorar sua robustez e precisão. Foram construídos e testados modelos de calibração utilizando toda a curva e com diferentes faixas para a curva de DSC. Para a construção do modelo de calibração e de validação, foi utilizada a média das triplicatas da análise. Assim, os erros relativos à pesagem, erros instrumentais e erros de amostragem seriam minimizados. Como o modelo foi baseado em uma mistura ternária, escolheu-se um conjunto de dados

recuperados pelo PLS para cada analito presente na mistura resultando em três melhores modelos, um para cada analito.

A escolha das variáveis latentes foi baseada nos menores valores de RMSEC e RMSECV para cada um dos componentes presentes na mistura. As Figuras de 3.32 a 3.34 apresentam o RMSEC e RMSECV para os três componentes em cada modelo. Pela Figura 3.32 é possível observar que a partir de 5 variáveis latentes os valores de RMSEC e RMSECV não variam de maneira significativa ou então aumentam de forma brusca. Logo, a capacidade de previsão não é melhorada quando se utiliza mais do que 5 variáveis latentes. Este critério foi utilizado para os modelos 2 e 3 (Figura 3.33 e 3.34, respectivamente).

Os modelos selecionados apresentam-se nas tabelas 5 à 7. Para o modelo 1 utilizou-se 5 variáveis latentes, 4 variáveis latentes para o modelo 2 e 3 variáveis latentes para o modelo 3.

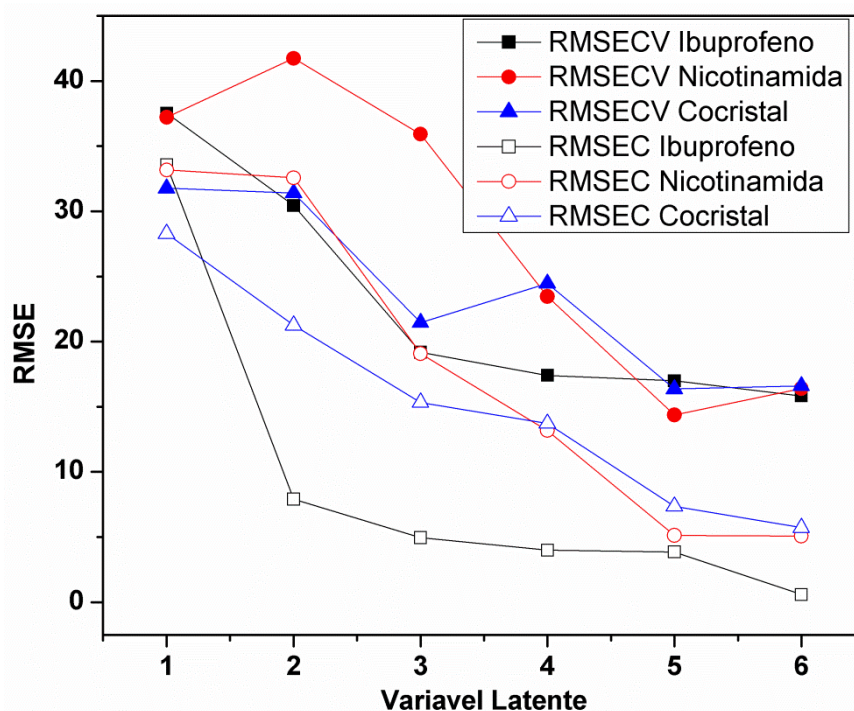


FIGURA 3.32 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

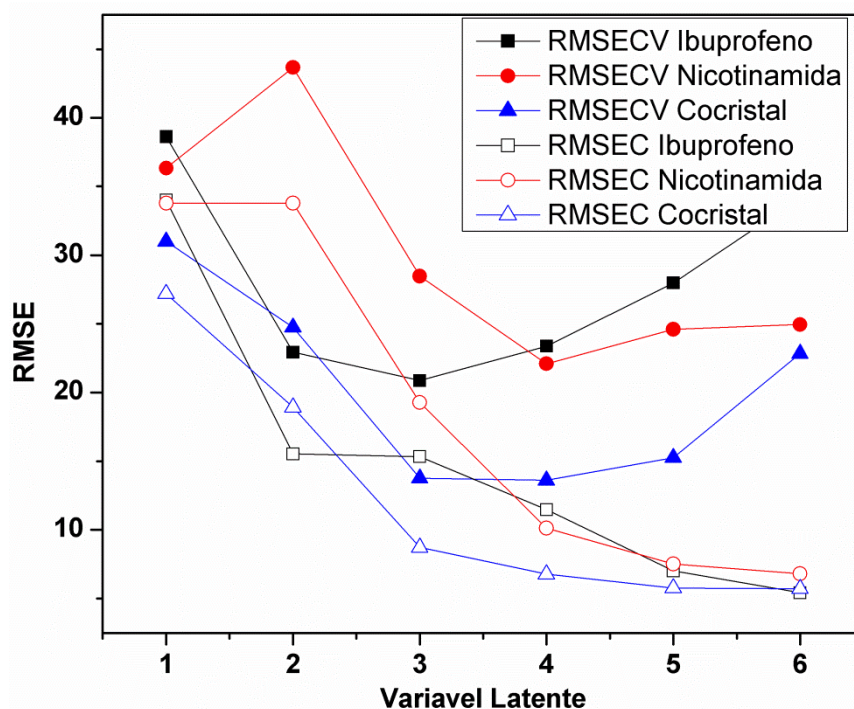


FIGURA 3.33 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

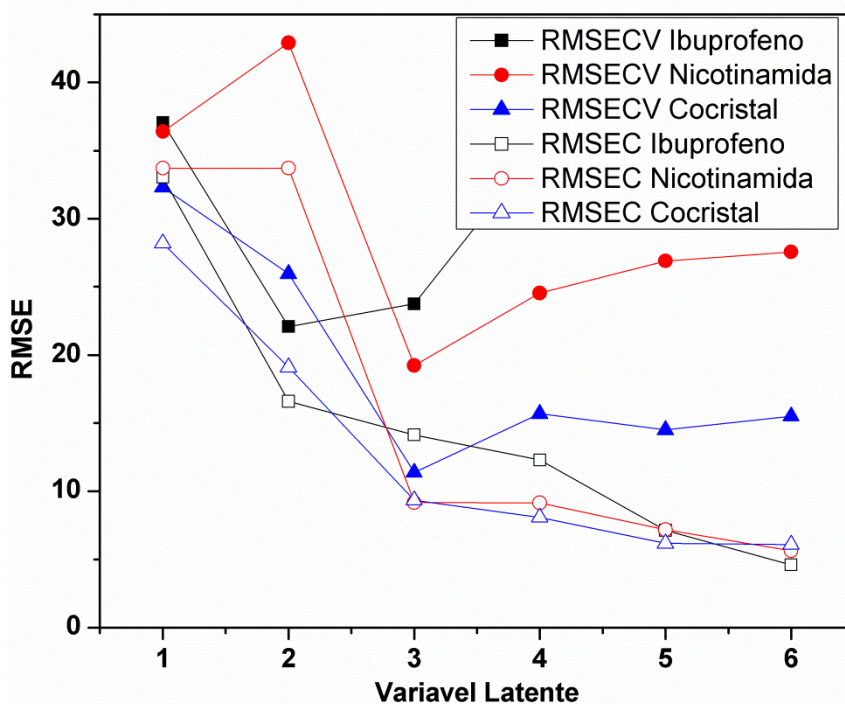


FIGURA 3.34 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

Como se trata de um modelo de misturas ternário, esperava-se que com apenas três variáveis latentes o modelo poderia prever os componentes de maneira precisa. Entretanto, para os modelos de calibração 1 e 2 foram necessárias uma maior quantidade de variáveis latentes. Isso se deve à formação *in situ* do cocrystal e à fusão antecipada da nicotinamida ocorrida durante alguns dos experimentos. No experimento 4, por exemplo, embora contenha apenas nicotinamida e ibuprofeno na análise, a curva de DSC mostra uma formação *in situ* do cocrystal ocorrendo após a fusão do ibuprofeno (Figura 3.24).

Pelo gráfico de valores de concentração real contra os valores de concentração preditos pelo PLS foi possível estimar a qualidade do modelo (Figura 3.35). Os modelos apresentados mostraram boa linearidade, com pequenas variações entre os valores reais e os valores estimados pelo modelo, apresentando melhores que aqueles obtidos utilizando infravermelho médio.

As tabelas de 3.23 a 3.25 apresentam os dados resumidos para os 3 modelos de PLS utilizando o DSC. O modelo 1 foi o que apresentou os melhores valores para a determinação do ibuprofeno. Os valores de RMSECV e RMSEP foram 17,0% e 4,4% respectivamente. O modelo 2 apresentou os melhores valores para a determinação de nicotinamida, com RMSECV de 22,1% e RMSEP de 5,8%. E por fim o modelo 3 foi aquele que melhor se ajustou para quantificar o cocrystal, utilizando os dados obtidos pelo DSC. Os valores obtidos foram 11,4% para o RMSECV e 7,3% para RMSEP.

Os valores de erros de predição para os modelos não passaram de 10%, demonstrando uma melhora em relação aos dados obtidos pelo infravermelho. Enquanto no infravermelho apenas o ibuprofeno foi bem predito, para o DSC todos os três componentes apresentaram baixos erros de predição para a etapa de validação.

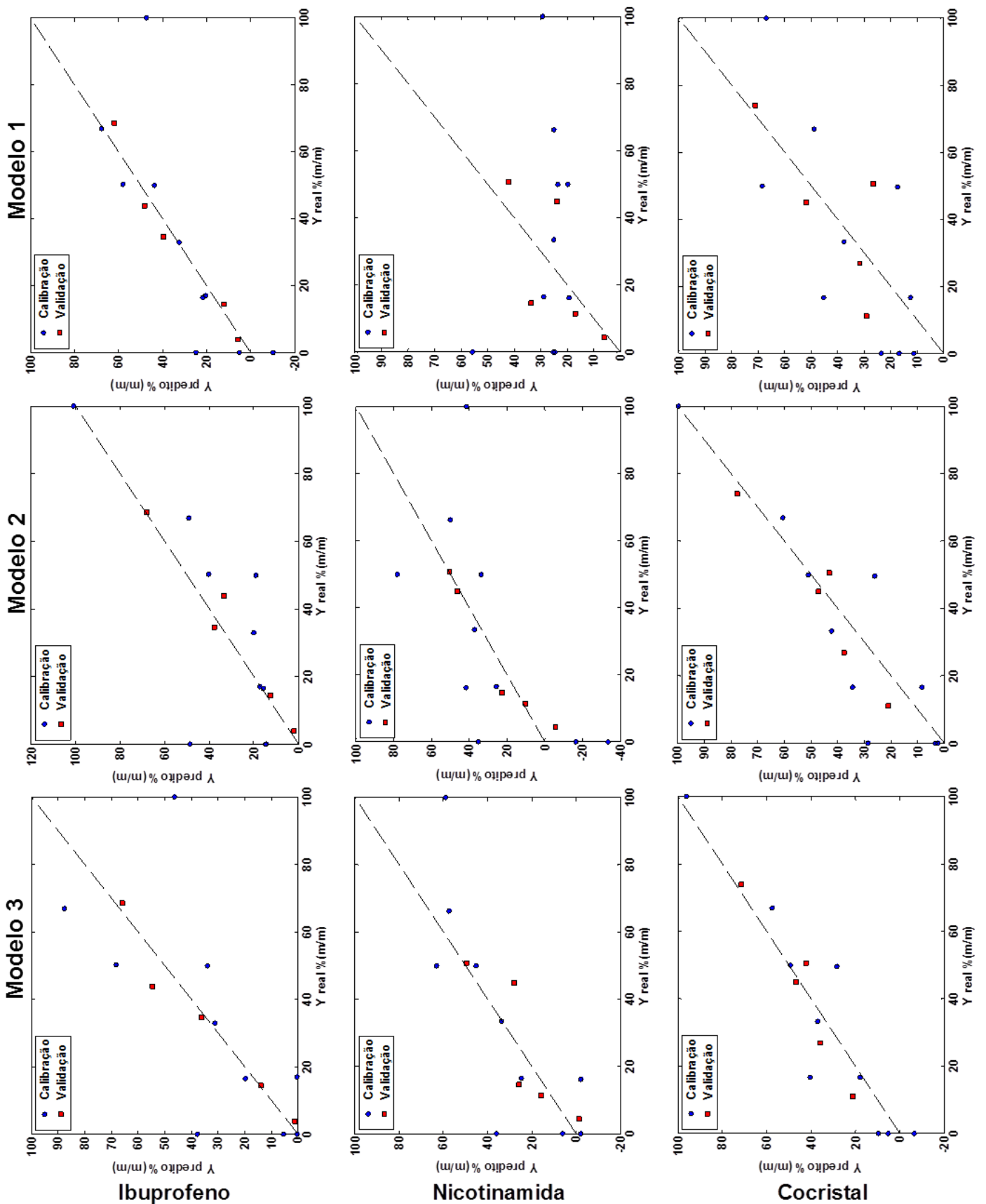


FIGURA 3.35 –Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em % (m/m). (•) Calibração, (□) Validação

Apesar dos modelos de calibração conseguirem explicar mais de 90% dos dados para cada um dos componentes (R^2 de predição do modelo 1 para o ibuprofeno = 0,96, R^2 de predição do modelo 2 para a nicotinamida = 0,93, R^2 de predição do modelo 3 para o cocristal = 0,93), os erros de validação cruzada referentes a amostras de calibração ainda foram altos. Valores de RMSECV acima de 15% mostram que a curva de calibração utilizada não foi precisa, e ainda não poderia ser utilizada como metodologia para quantificar os cocristais e seus coformadores.

TABELA 3.23 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 DSC	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocristal
RMSEC (%)	3,9	5,1	7,4
RMSECV (%)	17,0	14,4	16,4
RMSEP (%)	4,4	13,4	13,9
R^2 de calibração	0,99	0,97	0,95
R^2 de CV	0,73	0,85	0,75
R^2 de predição	0,96	0,49	0,58
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	300		
Variáveis incluídas	1800 variáveis		
Região da curva de DSC	(66,92-75,26 81,72-86,65 91,69-96,19 111,26-116,14 130,71-135,55) °C		
Variáveis Latentes	5		

TABELA 3.24 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 DSC	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocristal
RMSEC (%)	11,5	10,1	6,8
RMSECV (%)	23,4	22,1	13,6
RMSEP (%)	5,1	5,8	7,5
R^2 de calibração	0,87	0,90	0,95
R^2 de CV	0,46	0,53	0,82
R^2 de predição	0,96	0,93	0,91
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	400		
Variáveis incluídas	2000 variáveis		
Região da curva de DSC	(74,27-81,70 88,30-94,82 101,43-121,03) °C		
Variáveis Latentes	4		

TABELA 3.25 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 DSC	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	14,1	9,2	9,3
RMSECV (%)	23,7	19,2	11,4
RMSEP (%)	5,2	9,5	7,3
R ² de calibração	0,80	0,92	0,91
R ² de CV	0,47	0,63	0,87
R ² de predição	0,96	0,75	0,93
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	200		
Variáveis incluídas	1200 variáveis		
Região da curva de DSC	(65,28-68,56	71,84-74,31	88,30-91,67 107,96-117,77) °C
Variáveis Latentes	3		

3.3.4.3. Difração de raios-X em pó (DRX)

Devido a diferenças de intensidade do difratograma, estes foram normalizados pela área de modo que todos os picos difratados obtivessem a mesma intensidade relativa. Assim como nos modelos anteriores, utilizou-se o algoritmo iPLS de seleção de variáveis para determinar as regiões mais importantes do difratograma, e assim ter um modelo de previsão com melhor concordância entre os dados reais e previstos.

Foram realizados modelos de calibração e de validação utilizando os difratogramas derivados e em seguida normalizados e os difratogramas apenas normalizados. Para alguns modelos, utilizou-se todo o difratograma e para outros, diferentes faixas da região analisada, tanto para o difratograma normalizado quanto para o difratograma derivado. Usou-se a média das triplicatas das análises para construir os modelos de calibração e de validação, sendo escolhidos os três melhores modelos que poderiam ser utilizados para quantificar pelo menos um dos componentes presentes na mistura.

Para determinar a quantidade de variáveis latentes necessárias para o modelo, utilizou-se os valores de RMSECV e RMSEC. As Figuras de 3.36 a 3.38 apresentam o RMSEC e RMSECV para os três componentes em cada um dos modelos, apresentados nas tabelas 3.26, 3.27 e 3.28. Assim como no modelo do infravermelho, foram necessárias apenas três variáveis latentes para criar os três modelos propostos.

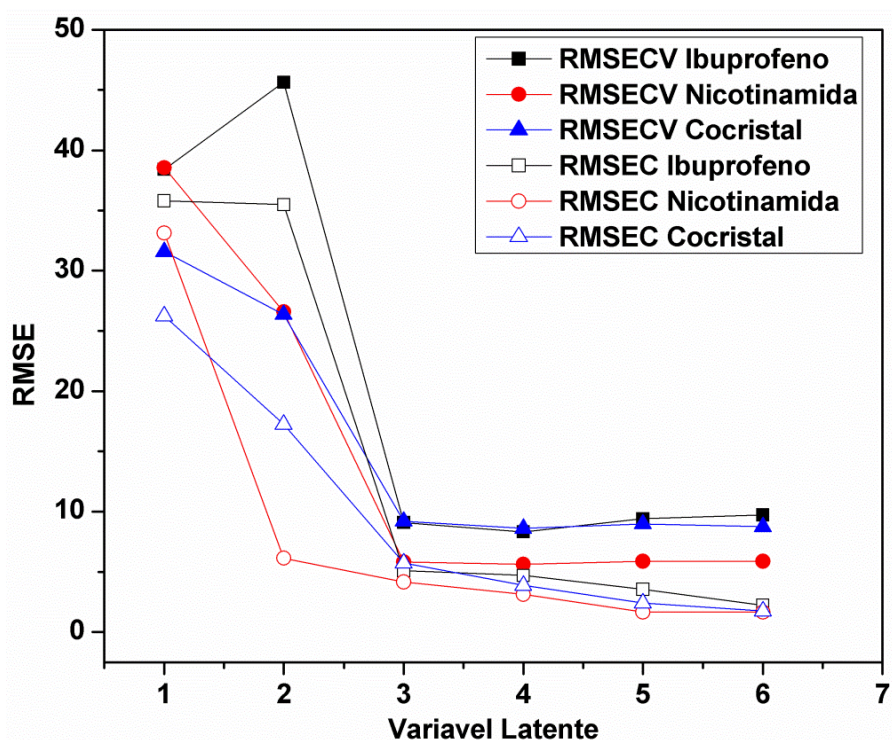


FIGURA 3.36 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

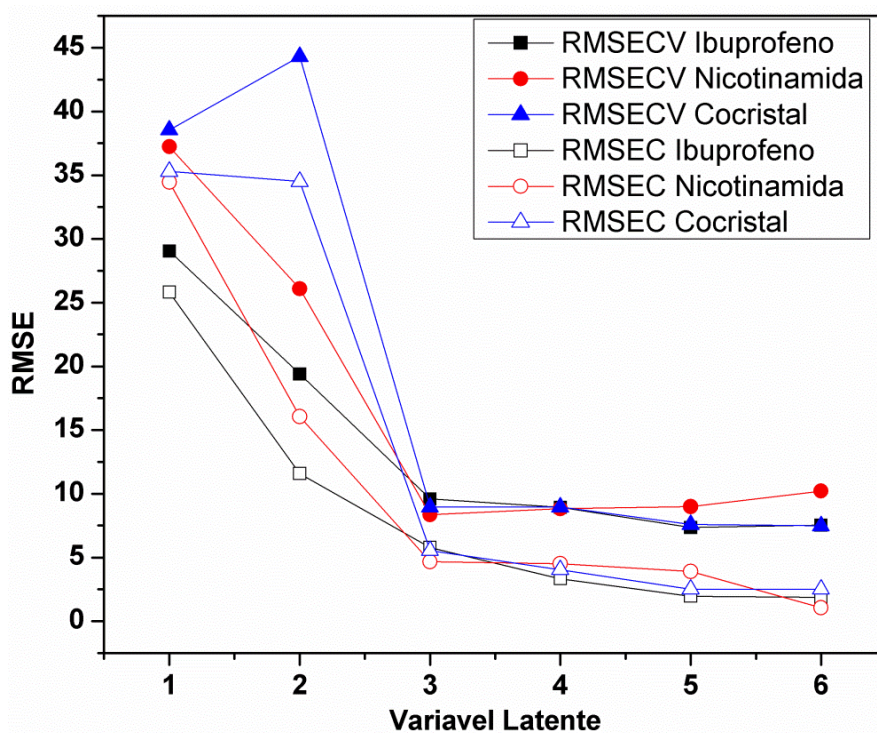


FIGURA 3.37 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

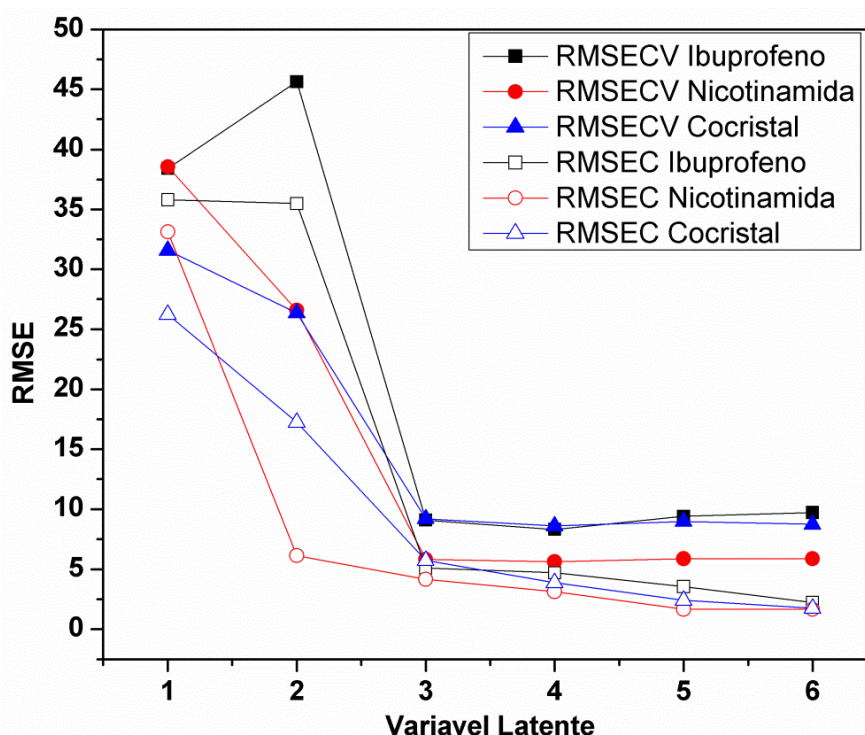


FIGURA 3.38 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

A Figura 3.39 apresenta os gráficos dos valores de concentração real contra os valores de concentração estimados pelo modelo. Para as componentes ibuprofeno e nicotinamida, os modelos apresentaram uma boa concordância entre os valores reais de concentração e os valores estimados. Para o cocrystal, apenas o modelo 3 apresentou baixa dispersão dos dados de calibração e de validação. Ainda que valores aceitáveis de RMSECV e RMSEP (11,4% e 7,3%) fossem apresentados, a porcentagem de variância explicada de 84% deixou a desejar ($R^2 = 0.84$).

As tabelas 3.26 a 3.28 apresentam os dados obtidos pelos modelos PLS de forma resumida. O modelo 1 apresentou valores de RMSECV igual à 7,2% e RMSEP 4,2% para o ibuprofeno, com R^2 de 0.98. Para a nicotinamida, o modelo com melhor ajuste foi o modelo 2, com RMSECV de 8,4% e RMSEP de 4,6%, com R^2 de 0.94.

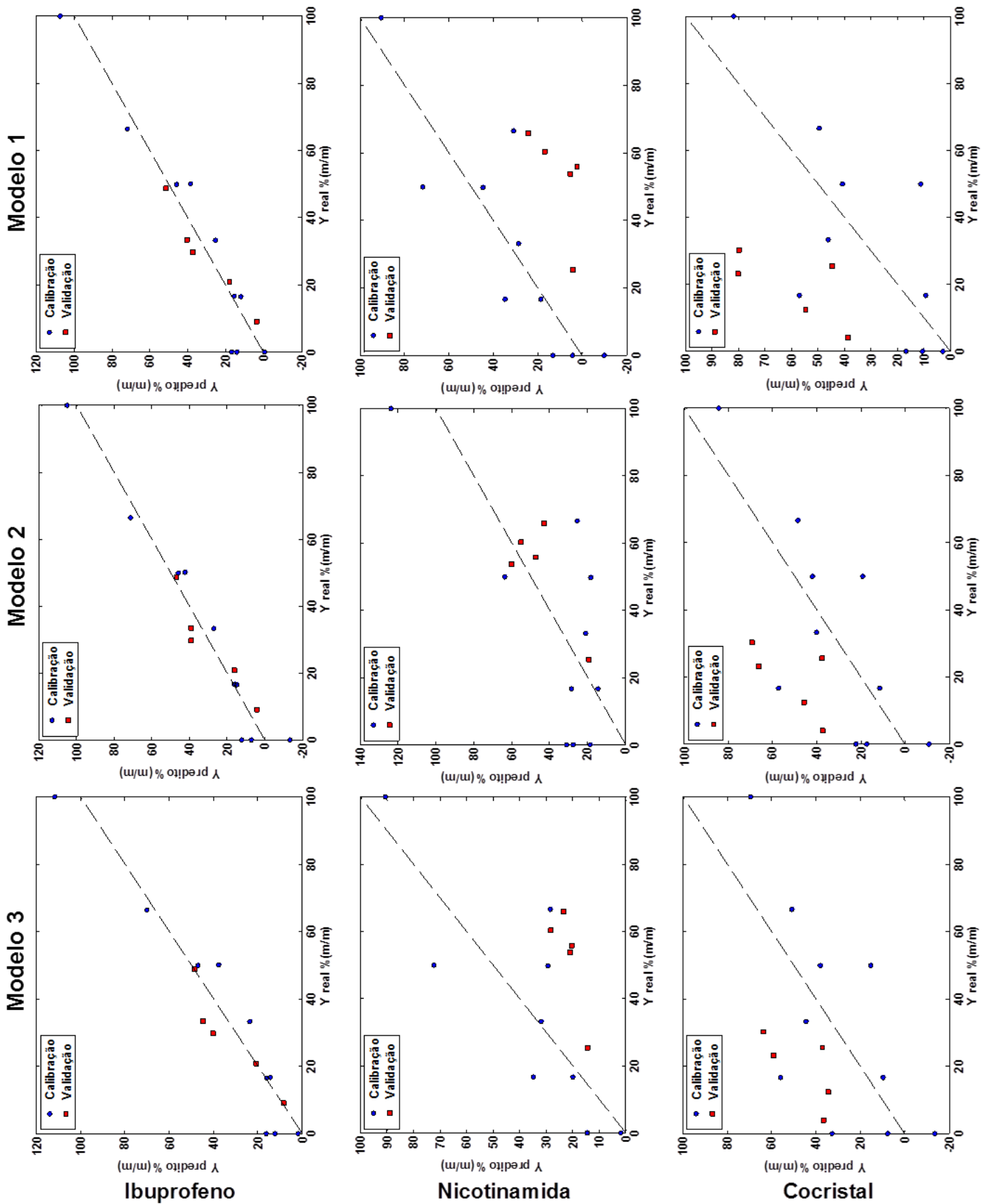


FIGURA 3.39 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em % (m/m). (•) Calibração, (□) Validação

Ambos os modelos 1 e 2, podem ser utilizados como uma metodologia para quantificar ibuprofeno ou nicotinamida na presença do seu cocrystal. Entretanto, o modelo do cocrystal ainda possui valores baixos para a variância explicada, sendo necessário melhorar o modelo de quantificação para este componente. A técnica de difração de raios-X mostrou-se uma técnica passível de ser utilizada para quantificar os coformadores do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida na presença de seu cocrystal, desde que as análises sejam realizadas por apenas um analista, e com os cristais resultantes da mesma síntese. Do contrário, fatores como orientação preferencial e tamanho de cristal poderiam alterar a qualidade dos dados.

TABELA 3.26 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 DRX	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	4,0	6,0	7,7
RMSECV (%)	7,2	9,6	11,2
RMSEP (%)	4,2	8,5	30,9
R ² de calibração	0,98	0,97	0,94
R ² de CV	0,95	0,91	0,88
R ² de predição	0,98	0,78	0,82
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	35		
Variáveis incluídas	175 variáveis		
Região do difratograma	(5-5,68 6,40-7,08 10,60-11,28 20,40-21,08 39,30-39,98) 2°θ		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.27 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 DRX	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	5,8	4,6	5,5
RMSECV (%)	9,6	8,4	8,9
RMSEP (%)	4,2	2,4	23,9
R ² de calibração	0,97	0,98	0,97
R ² de CV	0,91	0,93	0,93
R ² de predição	0,96	0,94	0,67
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	25		
Variáveis incluídas	400 variáveis		
Região do difratograma	(5-5,48 11,00-11,48 13,50-13,98 20,50-21,48 28,00-28,48 29,00-29,48 30,00-30,48 32,00-32,48 33,00-33,48 34,00-34,48 35,50-35,98 37,50-37,98 39,00-39,48 40,00-40,48 43,00-43,48) 2°θ		

Variáveis Latentes	3
--------------------	---

TABELA 3.28 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro terceiro de calibração

MODELO 3 DRX	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	14,1	9,2	9,3
RMSECV (%)	23,7	19,2	11,4
RMSEP (%)	5,2	9,5	7,3
R ² de calibração	0,97	0,98	0,97
R ² de CV	0,83	0,75	0,92
R ² de predição	0,96	0,97	0,84
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Tamanho do intervalo	15		
Variáveis incluídas	555 variáveis		
Região do difratograma	(6,50-6,78 7,40-7,98 8,60-8,88 9,80-10,98 11,30-11,88 13,10-13,68 20,60-21,48 23,60-24,18 26,30-26,58 29,60-29,88 30,50-30,78 31,40-31,68 32,60-33,18 34,10-34,38 35,30-35,88 36,20-36,78 38,90-39,18 39,50-40,08 40,40-41,28 41,90-42,48 43,10-43,38) 2°θ		
Variáveis Latentes	3		

3.3.4.4. Espectroscopia Raman

Moléculas polarizáveis, como a nicotinamida, apresentam maior espalhamento Raman que as moléculas pouco polarizáveis, como o ibuprofeno. Devido a diferenças de intensidade presentes nos espalhamentos e deslocamentos de linha de base ocorrida durante as análises, normalizaram-se os espectros pela área de modo que todos obtivessem a mesma importância para o modelo de calibração. Utilizou-se o algoritmo iPLS de seleção de variáveis para determinar diferentes intervalos espectrais com o intuito de se obter um modelo de previsão mais preciso

Desenvolveu-se os modelos a partir do espectro inteiro, do espectro derivado e de diferentes faixas do espectro e do espectro derivado. Para a construção dos modelos de calibração e de validação, usou-se a média de 10 espectros coletados em pontos aleatórios de uma mesma amostra, em seguida realizou-se a média das triplicatas reais destas amostras e foram gerados três modelos de previsão, um para cada componente presente no planejamento ternário.

A escolha das variáveis latentes baseou-se nos menores valores de RMSEC e RMSECV para cada um dos componentes. As Figuras de 3.40 a 3.42 apresentam o RMSEC e RMSECV para os três modelos de previsão. Apenas três variáveis latentes

foram suficientes para explicar todos os modelos. Os melhores modelos obtidos apresentam-se nas tabelas 3.29 a 3.31. A capacidade de previsão dos modelos não sofre qualquer aprimoramento quando se utiliza mais do que 3 variáveis latentes.

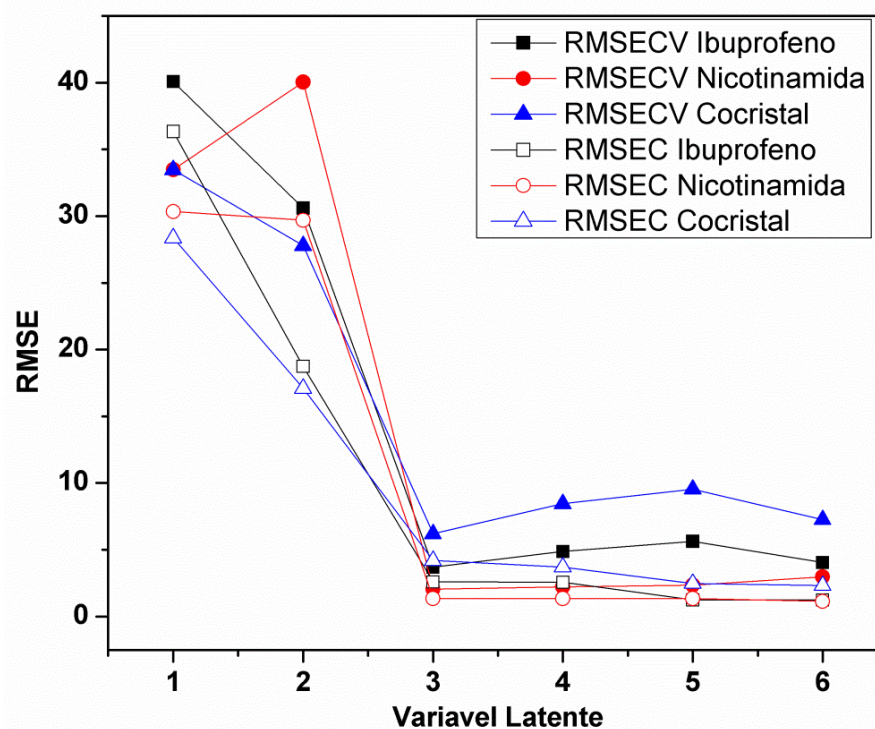


FIGURA 3.40 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 1

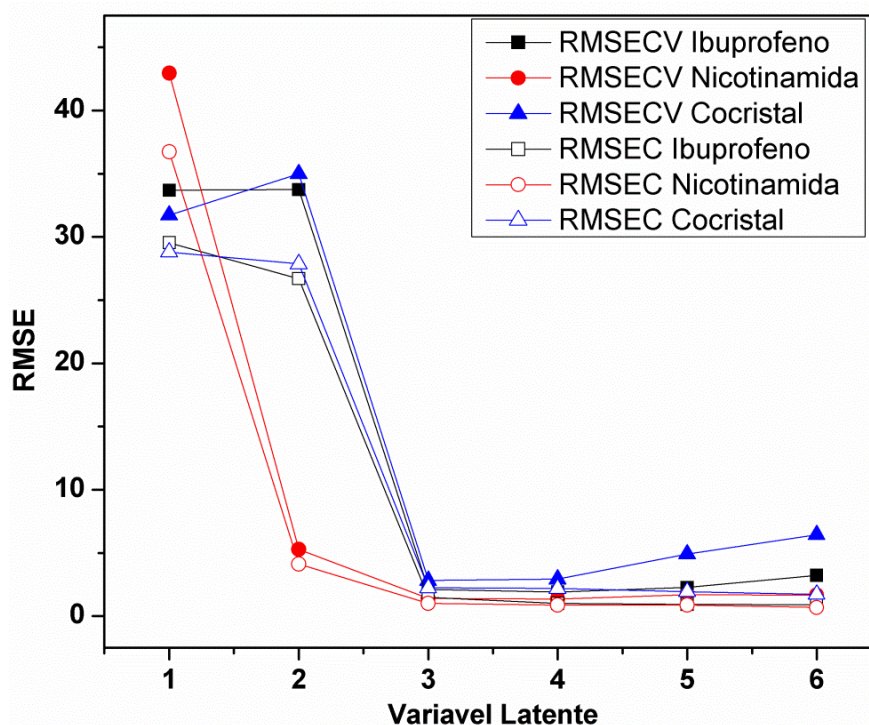


FIGURA 3.41 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 2

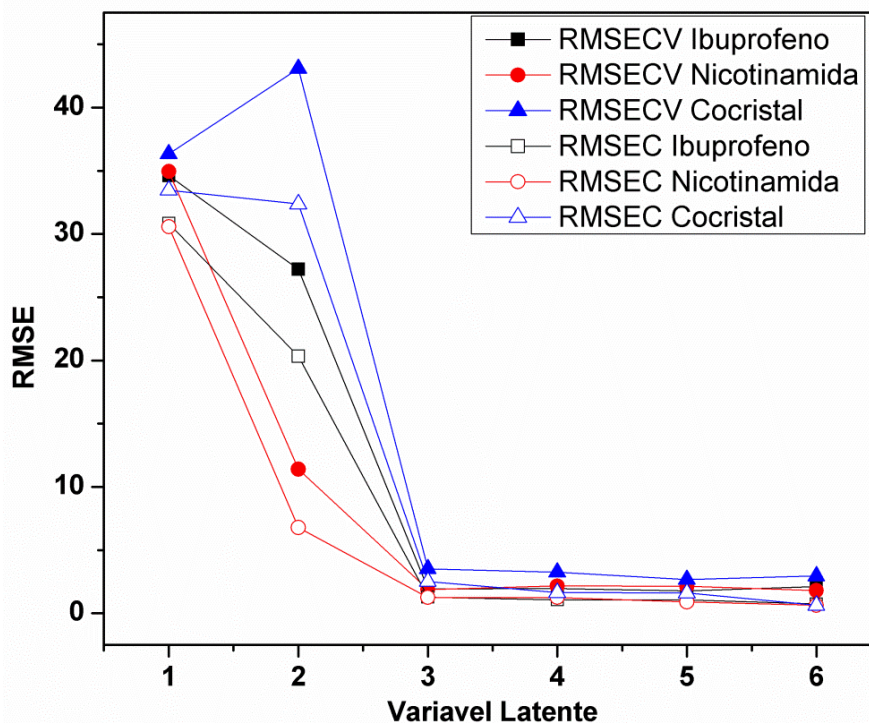


FIGURA 3.42 – Representação gráfica dos valores de RMSEC e RMSECV para cada variável latente do modelo 3

As tabelas de 3.29 a 3.31 apresentam os dados resumidos para os 3 modelos de PLS utilizando a espectroscopia Raman. O modelo 1 foi o que melhor apresentou valores para a quantificação do ibuprofeno. Os valores de RMSECV e RMSEP foram 3,71% e 4,41% respectivamente. O modelo 2 foi o que apresentou os melhores valores para a determinação de nicotinamida. Os valores de RMSECV e RMSEP foram 1,39% e 3,64% respectivamente. E o modelo 3 foi aquele que melhor se ajustou para a quantificação do cocristal. Os valores obtidos foram 3,50% para o RMSECV e 1,68% para RMSEP.

Os modelos analisados apresentaram erros médios de validação cruzada e de previsão menores que 5%. Todos os modelos mostraram-se eficazes como uma metodologia padrão para quantificar misturas de ibuprofeno, nicotinamida e o cocristal.

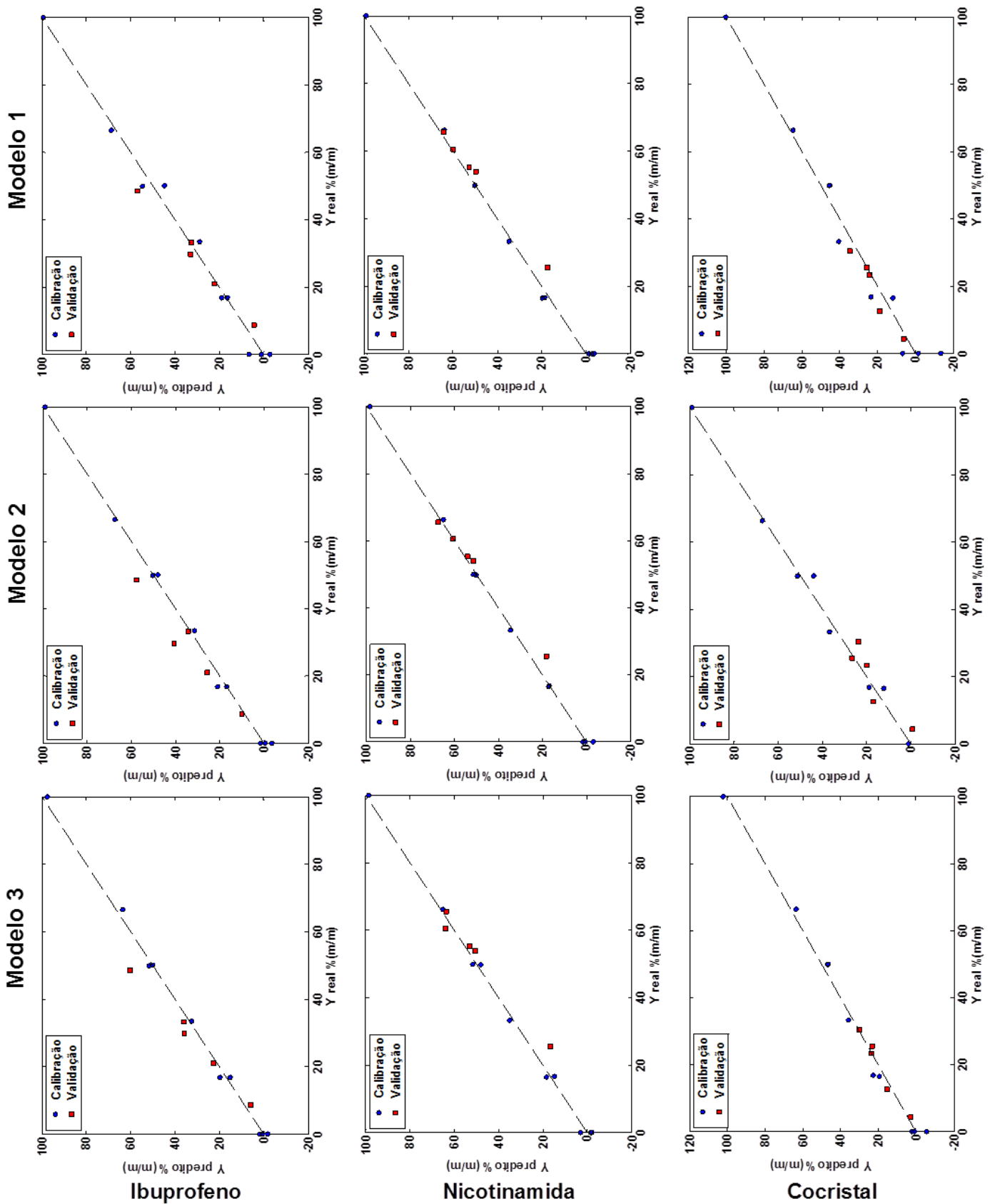


FIGURA 3.43 – Gráfico dos valores de referência contra os valores de em concentração em % (m/m). (•) Calibração, (□) Validação

TABELA 3.29 - Resumo dos dados obtidos pelo primeiro modelo de calibração

MODELO 1 Raman	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	2,6	1,3	4,2
RMSECV (%)	3,7	2,0	6,2
RMSEP (%)	4,4	4,4	3,5
R ² de calibração	0,99	0,99	0,98
R ² de CV	0,99	0,99	0,96
R ² de predição	0,99	0,99	0,94
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Tamanho do intervalo	35		
Variáveis Incluídas	105 variáveis		
Região do espectro	(410-471 777-833 1061-1114) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.30 - Resumo dos dados obtidos pelo segundo modelo de calibração

MODELO 2 Raman	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	1,5	1,0	2,2
RMSECV (%)	2,1	1,4	2,8
RMSEP (%)	6,6	3,6	4,6
R ² de calibração	0,99	0,99	0,99
R ² de CV	0,99	0,99	0,99
R ² de predição	0,96	0,99	0,82
Pré-processamento	Normalizar + 1 ^a derivada		
Tamanho do intervalo	10		
Variáveis incluídas	80 variáveis		
Região do espectro	(410-426 958-972 1069-1083 1501-1528 1544-1556 1599-1611 1694-1706) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

TABELA 3.31 - Resumo dos dados obtidos pelo terceiro modelo de calibração

MODELO 3 Raman	Ibuprofeno	Nicotinamida	Cocrystal
RMSEC (%)	1,3	1,2	2,5
RMSECV (%)	1,9	1,9	3,5
RMSEP (%)	6,1	4,8	1,7
R ² de calibração	0,99	0,99	0,99
R ² de CV	0,99	0,99	0,99
R ² de predição	0,99	0,98	0,97
Pré-processamento	Normalizar		
Tamanho do intervalo	30		
Variáveis incluídas	120 variáveis		
Região do espectro	(606-656 958-1004 1053-1099 1416-1457) cm ⁻¹		
Variáveis Latentes	3		

Os resultados mostraram que é possível quantificar o cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida e seus coformadores a partir de uma mistura ternária destes componentes, utilizando a espectroscopia Raman. Apesar dos modelos utilizando difração de raios-X mostrarem bons resultados para o RMSEP e o RMSECV a espectroscopia Raman foi a única a gerar modelos capazes de prever de maneira eficiente a concentração de cocrystal presente em cada amostra de validação. A difração de raios-X apresentou bons resultados, pois todas as análises foram feitas com os produtos originários de uma mesma síntese, e as análises foram realizadas por um único analista. Caso contrário, a orientação preferencial dos cristais e o tamanho dos mesmos poderiam aumentar o erro presente na quantificação. Estes fatores, apesar de influenciarem os dados da espectroscopia Raman, não alteram de maneira significativa o espectro, fazendo com que esta técnica seja a mais robusta entre os métodos testados.

3.4. Conclusão

Foram realizadas análises quantitativas dos cocrystal de carbamazepina-nicotinamida e ibuprofeno-nicotinamida por diferentes técnicas analíticas do estado sólido.

Para o cocrystal de carbamazepina-nicotinamida, as técnicas DSC, infravermelho médio e DRX não apresentaram modelos quimiométricos bons o suficiente para utilizar estas técnicas como métodos de análise quantitativa, com erros de validação cruzada altos, acima de 10% na maioria dos casos.

Com o uso da espectroscopia Raman foi possível obter modelos de previsão de maneira rápida e precisa para a quantificação do cocrystal em meio aos seus coformadores. Os modelos obtidos mostraram erros de predição próximos à 8%. A espectroscopia Raman se mostrou a técnica preferencial para a quantificação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida, podendo ser utilizada em análises de rotinas em indústrias farmacêuticas.

Para o cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida, o DSC e o infravermelho médio não se mostraram eficientes. Os valores de erros médios para a previsão destes modelos foi por volta de 15%. As técnicas que apresentaram melhores resultados foram a difração de raios-X e a espectroscopia Raman. Ambas as técnicas podem ser

utilizadas para se determinar rendimentos de reações do cocristalização do cocristal de ibuprofeno-nicotinamida.

O DRX aliado ao iPLS possibilitou prever de forma eficaz as concentrações de ibuprofeno e nicotinamida presentes na mistura. A espectroscopia Raman em conjunto com o modelo multivariado do iPLS conseguiu prever de maneira rápida e precisa as concentrações do cocristal e de seus coformadores iniciais. Os modelos ajustados apresentaram erros relativos menores do que 5% para a previsão das concentrações.

**CAPÍTULO 4 – MONITORAMENTO IN SITU
DO COCRISTAL DE CARBAMAZEPINA-
NICOTINAMIDA**

4. MONITORAMENTO IN SITU DO COCRISTAL DE CARBAMAZEPINA-NICOTINAMIDA

4.1. Introdução e Objetivos

O cocrystal de carbamazepina-nicotinamida é um cocrystal amplamente estudado na literatura utilizando diversos métodos de síntese. Este cocrystal foi um dos primeiros a serem produzidos por reação de cristalização, sendo reportadas sínteses utilizando água como solvente da reação^{56,60}. Entretanto nenhum relato na literatura demonstrou uma rota sintética em meio aquoso com conversão total dos reagentes iniciais em sua forma de cocrystal.

Um dos primeiros trabalhos utilizando quimiometria aplicada a cocrystal foi feito com o cocrystal de carbamazepina-nicotinamida. Chieng et al. utilizou três formas polimórficas da carbamazepina (forma I, forma III e hidratada) e para cada uma das formas adicionou com o princípio ativo nicotinamida em um moinho de bolas, que foi agitado por 60 minutos⁶⁴. Utilizando a análise de componentes principais, foi possível observar a cinética de formação do cocrystal, tendo como material de partida diferentes polimorfos. A carbamazepina dihidratada foi o polimorfo que apresentou maior velocidade de formação, seguido pela carbamazepina I e por fim, a carbamazepina III.

Desta forma, buscou-se utilizar a quimiometria como ferramenta do PAT para monitorar a reação de formação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida em meio aquoso, possibilitando assim uma rota sintética com análise em tempo real, e a utilização de um solvente ambientalmente correto, além da identificação do ponto final da reação, possibilitando um maior controle da reação, diminuindo o tempo de ciclo e aumentando a eficiência do processo.

4.2. Parte Experimental

Em todas as sínteses utilizou-se: carbamazepina da marca Jubilant Life Science Limited, a nicotinamida da marca Aarti Drugs Limited, grau de pureza 99,82%, acetato de etila marca Quemis, grau PA, e água ultrapura com resistividade superior a 18 mΩ·cm produzido por um sistema Milli-Q (Millipore®).

Para o monitoramento *in-line*, utilizou-se um espectrômetro Raman da B&W Tek modelo *i*-Raman BWS 415-785H, laser vermelho de 785 nm, com resolução espectral de $3,5\text{ cm}^{-1}$. Os espectros foram realizados utilizando uma sonda de fibra óptica posicionada acima do local onde iria ocorrer a reação, como apresentado na Figura 4.1. O tempo de aquisição de cada espectro foi de 120 segundos, sendo este também, o intervalo de tempo entre cada espectro. A potência do laser foi de 224 mW e o intervalo espectral foi de 216 a 1652 cm^{-1} (Raman Shift).

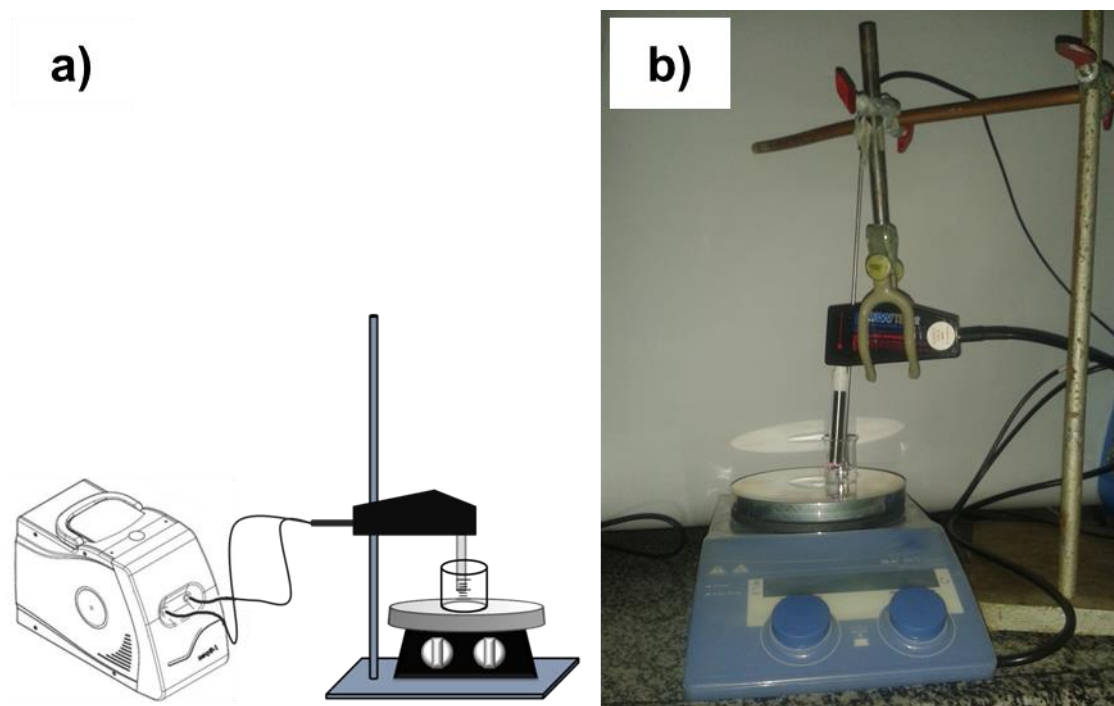


FIGURA 4.1 – a) Esquema d montagem usado para o monitoramento da síntese do cocrystal b) Fotografia do sistema de reação.

4.2.1. Síntese cocrystal de CBZ-NCT em água

Pesou-se aproximadamente 472,5 mg de carbamazepina (2 mmol) em um béquer. Em outro recipiente, pesou-se 244,3 mg de nicotinamida (2 mmol), e foram adicionados 1,5 mL de H_2O ultrapura, obtendo-se uma solução de nicotinamida de 1,33 mol/L que foi adicionada ao béquer contendo a carbamazepina previamente pesada. A reação foi aquecida em diferentes tempos utilizando uma placa aquecedora da IKA modelo C-MAG HS 7, com agitação magnética e um termopar (Figura 4.2).

O primeiro espectro do monitoramento é referente ao espectro do cristal de carbamazepina (tempo = 0 h). Após a aquisição do primeiro espectro, adiciona-se a solução de nicotinamida e inicia-se o aquecimento da reação. Este procedimento foi

realizado em quatro temperaturas: temperatura ambiente ($23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$); temperatura de $40\text{ °C} (\pm 2\text{ °C})$, temperatura de $60\text{ °C} (\pm 3\text{ °C})$ e temperatura de $80\text{ °C} (\pm 3\text{ °C})$, sendo o último, a temperatura descrita na literatura onde ocorre a transição polimórfica da CBZ forma dihidratada para a forma III. As reações foram monitoradas durante 5 horas, sendo três horas de reação com temperatura elevada, e duas horas referentes a etapa de resfriamento.

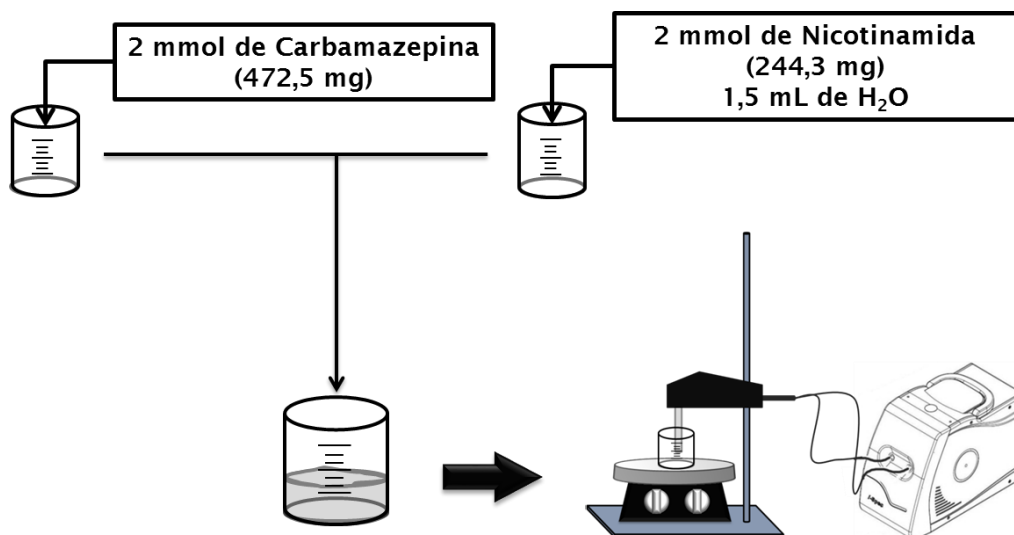


FIGURA 4.2 – Representação esquemática da reação em meio aquoso do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida

4.2.2. Métodos Quimiométricos

Ao final das reações, os dados gerados por espectroscopia Raman foram organizados em uma única matriz. Os espectros foram derivados, normalizados pela área, utilizou-se a filtragem por PCA e por fim utilizou-se o MCR-ALS. A filtragem por PCA foi realizada após a derivação dos espectros, com o intuito de realçar a diminuição do ruído.

A filtragem por PCA tem como intuito diminuir o ruído sem perder informação espectral. Uma matriz \mathbf{X} é recuperada pela multiplicação de n escores (\mathbf{t}_n) por n loadings (\mathbf{p}_n^T), onde n é o número componentes principais necessários para explicar quase toda a matriz original. No caso do monitoramento in-line, sabe-se que três substâncias estão envolvidas, portanto são três componentes principais. Para a filtragem por PCA, utilizou-se 6 componentes principais para assegurar que toda a informação essencial havia sido mantida. A Figura 4.3 demonstra uma aplicação da filtragem por PCA, onde grande parte dos ruídos foi minimizada após a aplicação deste algoritmo sem distorcer ou perder qualquer tipo de informação espectral.

Este tipo de ferramenta é utilizada em conjuntos de dados onde existem várias amostras com pouca diferença espectral, como por exemplo no monitoramento de reação onde se observa espectros de 3 ou 4 componentes em um conjunto de mais de 100 espectros em diferentes tempos de reação.

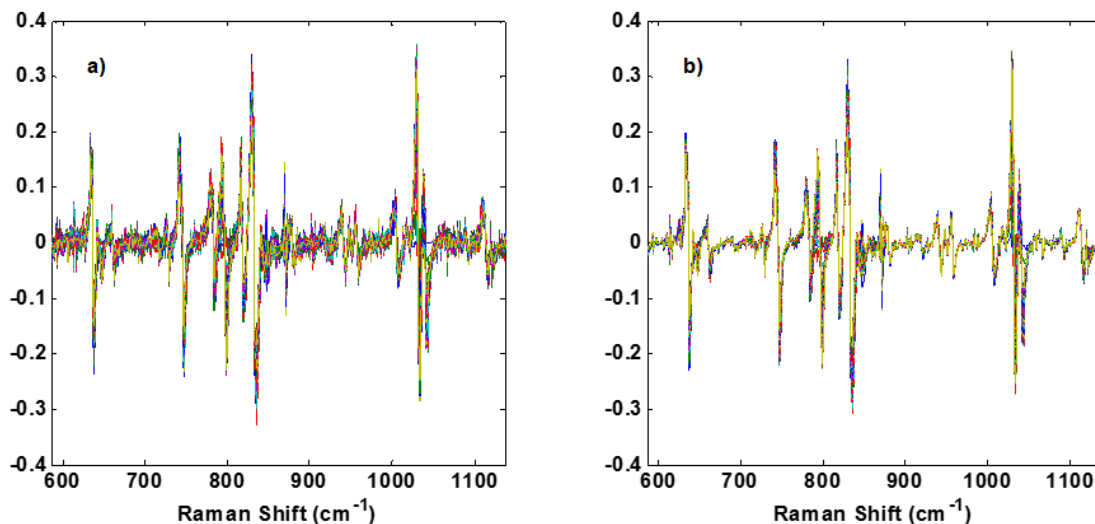


FIGURA 4.3 – Dados obtidos durante o monitoramento a) antes da filtragem por PCA b) depois da filtragem por PCA.

Em seguida, o MCR-ALS foi utilizado nas seguintes condições:

- Intervalo espectral: 500 – 1666 cm^{-1}
- Duas componentes;
- Estimativa inicial: função PURE do toolbox MCR-ALS, onde o algoritmo encontra os n espectros mais distintos entre si presentes no conjunto de dados, onde n é o número de componentes utilizados na rotina;
- Não negatividade na concentração;

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Reação a temperatura ambiente

Durante a primeira reação, realizada à temperatura ambiente, obteve-se 151 espectros durante um período de 5 horas de reação. Ao final da reação, estes espectros foram organizados na forma de uma matriz com 151 linhas e 751 colunas, referentes aos comprimentos de onda utilizados na deconvolução espectral. Os

espectros foram pré-tratados utilizando-se a primeira derivada, normalização pela área e filtragem por PCA utilizando as 6 primeiras componentes principais.

A Figura 4.4 apresenta alguns espectros obtidos durante o monitoramento da reação à temperatura ambiente. As regiões que apresentam uma mudança mais significativa estão em 550 cm^{-1} , 700 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} . Todos os espectros obtidos apresentam um perfil espectral similar ao da carbamazepina devido ao fato desta molécula possuir um espalhamento Raman mais intenso do que a molécula de nicotinamida, além disso, a carbamazepina esteve presente no estado sólido durante todo a reação, enquanto a nicotinamida apresentava-se em uma solução diluída.

No início da reação, observa-se apenas o espectro da carbamazepina forma polimórfica III, que é a forma comercializada do fármaco, sendo caracterizada pelo dois picos referentes a vibrações do anel de 7 membros da molécula (picos característicos em 1020 e 1040 cm^{-1}). Após 4 minutos de reação, o espectro obtido é idêntico ao espectro inicial da reação, entretanto, com 6 minutos de reação o espectro Raman obtido é referente a forma dihidratada da carbamazepina, caracterizado pela inversão na intensidade dos picos em 1020 e 1040 cm^{-1} , além do desaparecimento do pico em 535 cm^{-1} . Ao final da reação, não há nenhuma mudança significativa, e o espectro final mantém o perfil espectral da forma dihidratada da carbamazepina.

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram os perfis de concentração e espectrais recuperados pelo modelo construído por MCR-ALS. O perfil de concentração demonstra que na reação à temperatura ambiente apenas uma rápida transição polimórfica é possível ser observada. Os três primeiros espectros adquiridos para a reação (tempos iguais a 0, 2 e 4 minutos) são referentes ao espectro da carbamazepina presente na forma III. Após 6 minutos de reação, toda a carbamazepina presente na reação sofre uma transição polimórfica para a forma dihidratada. A forma dihidratada possui menor solubilidade em água que a forma III, impedindo que haja solubilização, mesmo que parcial, do fármaco para interagir com as moléculas de nicotinamida presentes no meio. Assim, à temperatura ambiente, nenhum indício de cocrystal foi observado.

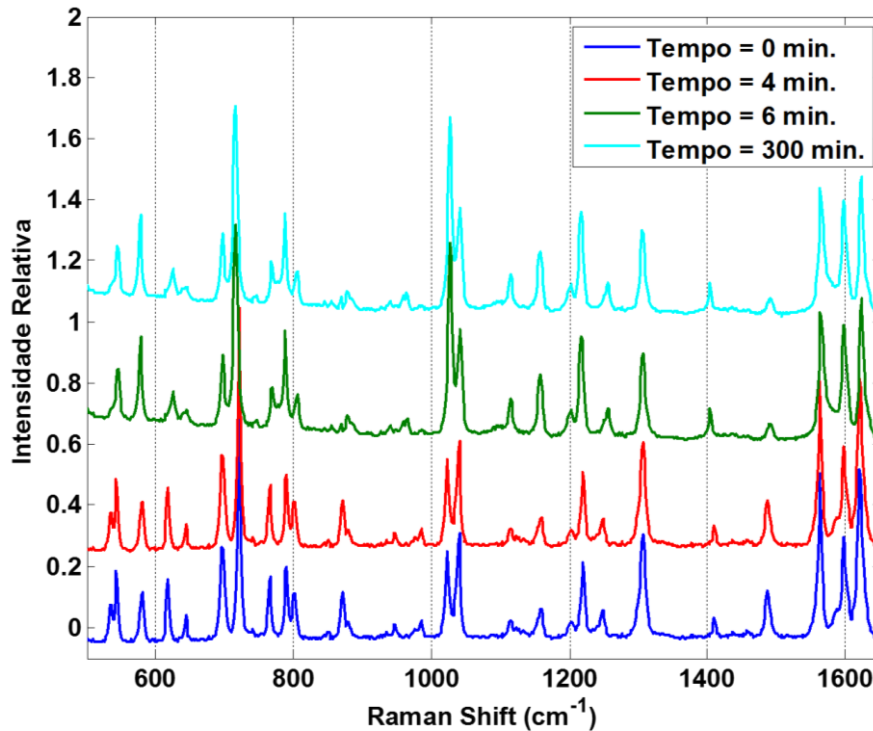


FIGURA 4.4 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura ambiente

A Figura 4.6 apresenta os perfis espectrais recuperados pelo modelo. Os espectros obtidos apresentaram perfis idênticos aos espectros puros da carbamazepina forma III e da carbamazepina forma dihidratada, fato esperado, uma vez que é bem conhecido que a carbamazepina apresenta uma rápida transição polimórfica para suas formas hidratadas em meio aquoso, sendo este, um dos maiores problemas da manipulação da carbamazepina nas indústrias farmacêuticas⁴⁶.

O modelo gerado pelo MCR-ALS apresentou uma boa concordância entre os dados obtidos e os dados modelados, apresentando uma porcentagem de variância explicada de 99,65% ($R^2 = 0,99$) e uma falta de ajuste de apenas 5,89 %.

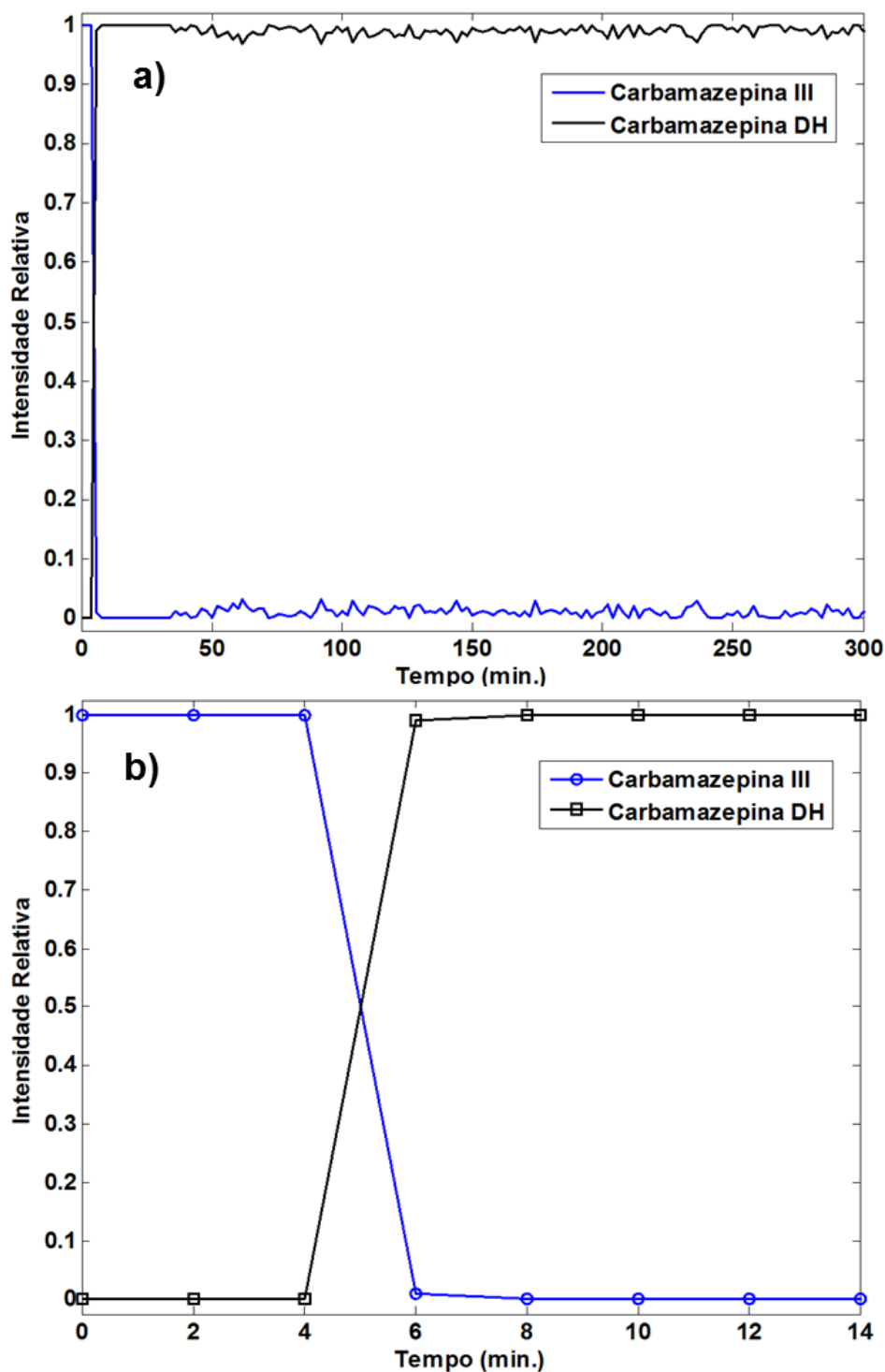


FIGURA 4.5 – a) Perfil de concentração da reação a temperatura ambiente e b) Ampliação na faixa de tempo entre 0 à 14 minutos de reação

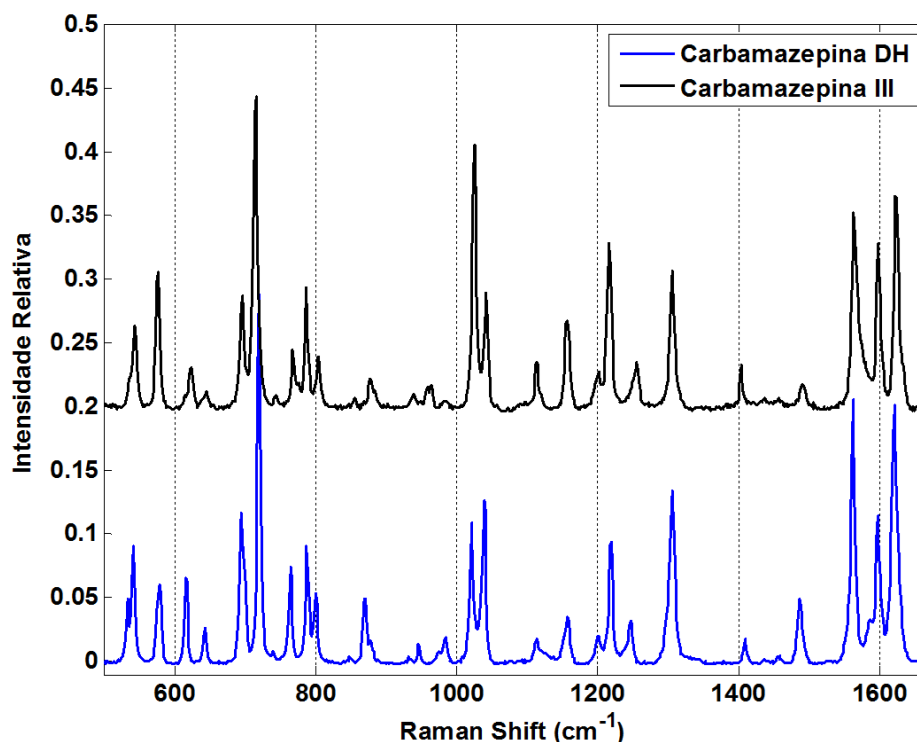


FIGURA 4.6 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura ambiente

4.3.2. Reação à temperatura de 40 °C

A reação à 40 °C foi realizada por um período de 5 horas com aquisição dos espectros Raman em intervalos de 2 minutos, resultando em uma matriz com 151 espectros por 751 colunas. Os espectros foram derivados, normalizados pela área e em seguida utilizou-se a filtragem por PCA.

A Figura 4.7 apresenta espectros adquiridos durante o monitoramento em diferentes tempos de reação. Assim como os espectros obtidos na reação à temperatura ambiente, os espectros observados apresentam apenas picos referentes a carbamazepina. O espectro de 0 minutos apresenta os picos relativos a forma III da carbamazepina. Com 4 minutos de reação, é possível observar um espectro misto entre a forma III e a forma dihidratada da carbamazepina, a relação de picos na região entre 1020 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} muda, de forma que a intensidade dos picos é quase 1:1, e o pico duplo na região de 530 cm^{-1} começa a desaparecer. Com 6 minutos de reação, o espectro adquirido é praticamente idêntico ao espectro da forma hidratada, e ao final da reação, é possível observar apenas o espectro puro da forma dihidratada.

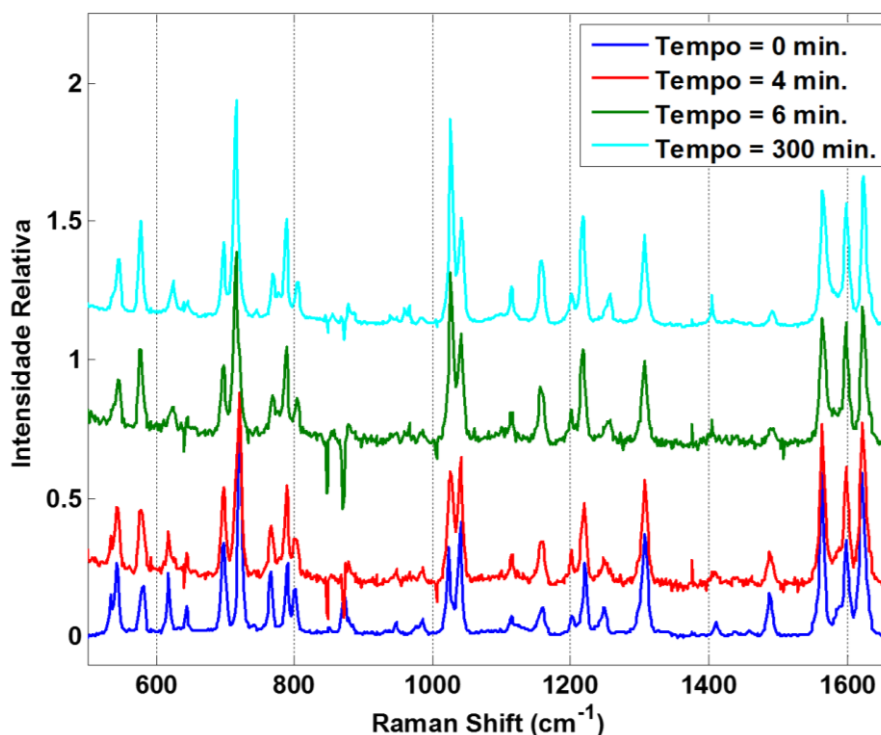


FIGURA 4.7 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura de 40 °C

Os perfis de concentração e espectral recuperados pelo modelo são apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9. O perfil espectral confirma a presença de apenas dois componentes no conjunto de dados adquiridos no monitoramento da reação. Um dos componentes apresenta o espectro Raman idêntico ao espectro da carbamazepina forma III, enquanto o outro espectro recuperado apresenta um perfil do espectro do espectro da carbamazepina forma dihidratada.

O perfil de concentração mostra a rápida conversão polimórfica da forma III da carbamazepina, na forma dihidratada do fármaco. Após 8 minutos de reação, toda a carbamazepina III presente no início da reação é convertida em carbamazepina dihidratada, impossibilitando a formação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida. Os dados recuperados mostraram um bom ajuste em relação aos dados originais, apresentando uma porcentagem de variância explicada de 99,46 % com baixa falta de ajuste, 7,38%.

Assim como na reação a temperatura ambiente, não foi possível observar a conversão dos substratos iniciais no produto pretendido. Entretanto, os resultados mostraram que a espectroscopia Raman acoplada ao MCR-ALS podem ser utilizadas

para monitorar transições polimórficas com possibilidade de informação em tempo real, algo pretendido pelas indústrias farmacêuticas e aconselhado pelo FDA.

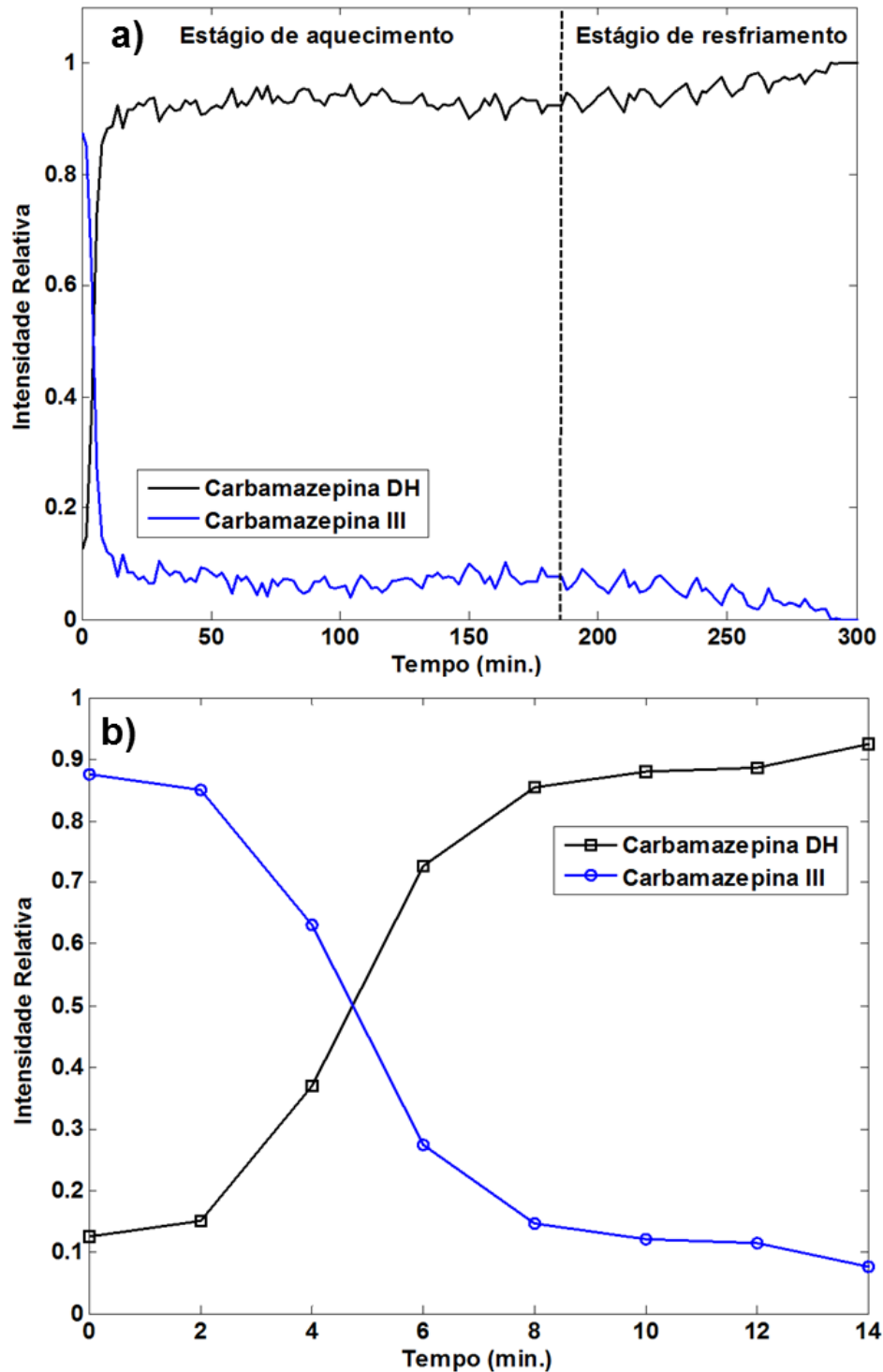


FIGURA 4.8 – a) Perfil de concentração da reação a temperatura de 40 °C e b) Amplificação na faixa de tempo entre 0 à 14 minutos de reação

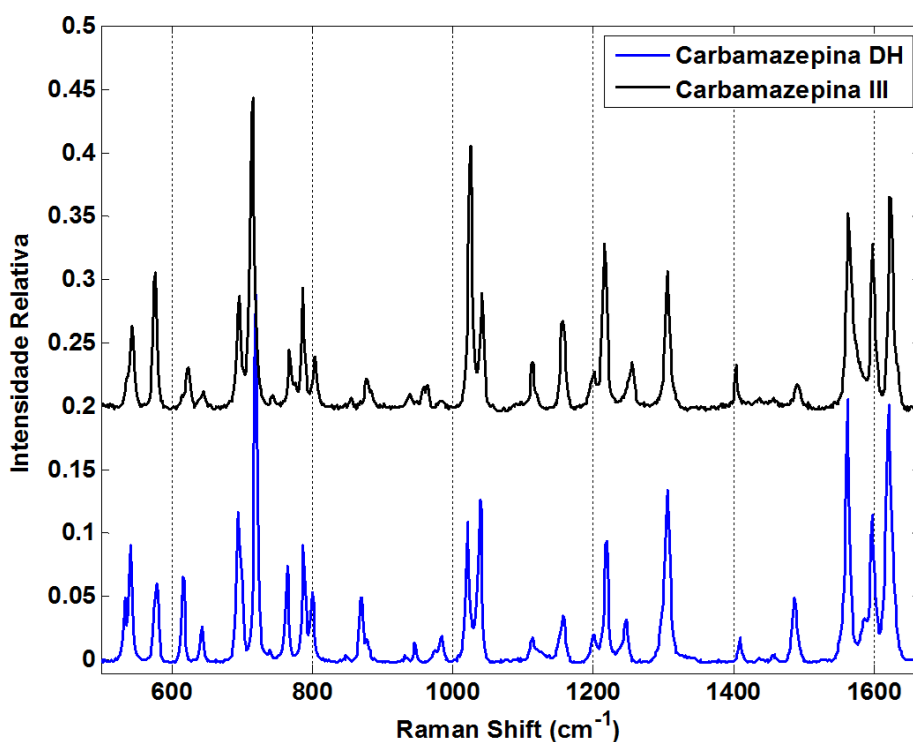


FIGURA 4.9 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura de 40 °C

4.3.3. Reação a temperatura de 60 °C

A reação a 60 °C foi realizada por um período de 5 horas e durante este período de tempo foram adquiridos espectros Raman em intervalos de 2 minutos. Ao final da reação todos os 151 espectros foram organizados na forma de matriz. Realizou-se a primeira derivada, normalização pela área e filtragem por PCA.

A solução foi aquecida a 60 °C durante 3 horas. Sendo que as duas horas restantes, a reação foi mantida sem nenhum tipo de aquecimento. A Figura 4.10 apresenta 4 espectros adquiridos durante o monitoramento. No início da reação, o espectro obtido é relativo apenas à carbamazepina na forma III. Com 1,3 horas de reação, é possível observar uma pequena diferença na intensidade dos picos presentes na região de 1000 – 1040 cm^{-1} , entretanto essa alteração pode indicar tanto a formação do cocrystal, quanto a transição polimórfica para a forma dihidratada.

Com 2,5 horas de reação, o espectro adquirido apresenta um perfil similar ao espectro do cocrystal com a presença de alguns picos seletivos para este crystal, tais como o pico em 1036 cm^{-1} e a alteração nas intensidades relativas dos picos presentes na região de 750 – 800 cm^{-1} . Ao final do monitoramento, o espectro obtido é idêntico ao espectro do cocrystal.

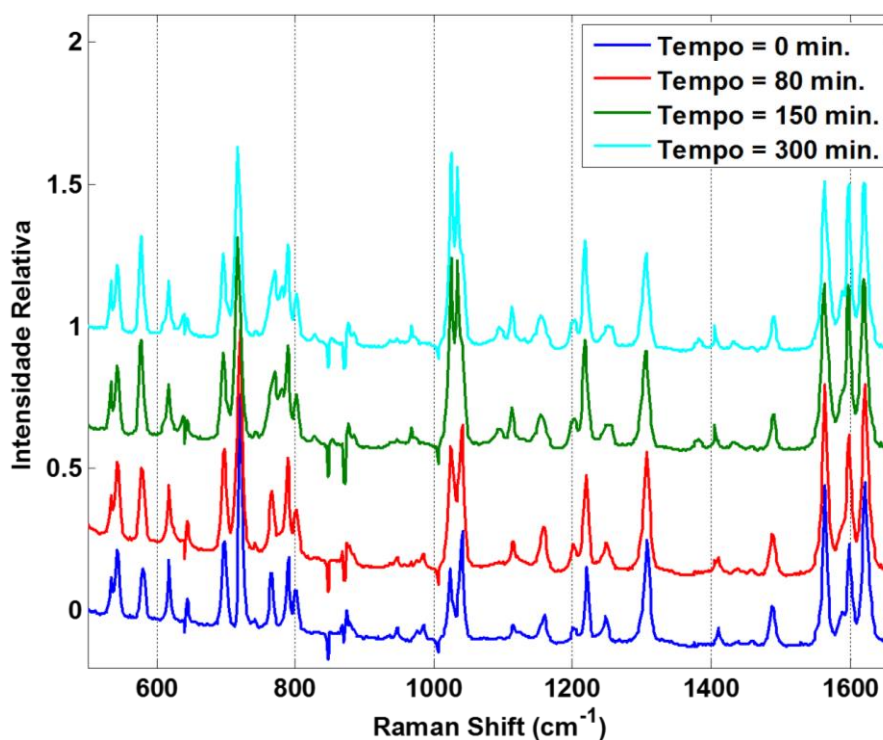


FIGURA 4.10 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura de 60 °C

Os perfis de concentração e espectral estão apresentados nas Figuras 4.11 e 4.12. O perfil espectral apresenta dois espectro distintos. Um espectro recuperado é referente a carbamazepina na forma III e o outro espectro obtido mostra um perfil idêntico ao espectro do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida. Observando-se o perfil de concentração, é possível observar que, a 60 °C, toda a carbamazepina presente na reação interage com a solução de nicotinamida resultando na forma de cristal misto. No começo da reação, pode-se notar observar apenas a forma pura da carbamazepina. Com 1 hora de reação, nenhuma mudança significativa do espectro é observada. Uma vez que nas reações anteriores a carbamazepina sofre uma transição polimórfica com apenas 6 minutos de reação, a conservação do perfil espectral por mais de uma hora de reação leva a crer que a 60 °C o dihidrato não é estável mesmo em solução aquosa.

Próximo a 1,5 hora de reação, a concentração relativa da componente referente a carbamazepina forma III começa a decair, e um aumento na intensidade relativa da segunda componente começa a aumentar. Após duas horas de reação, toda a carbamazepina inicial é recristalizada na forma de cocrystal, ressaltando-se apenas o espectro puro do cocrystal, sendo este o ponto final da reação.

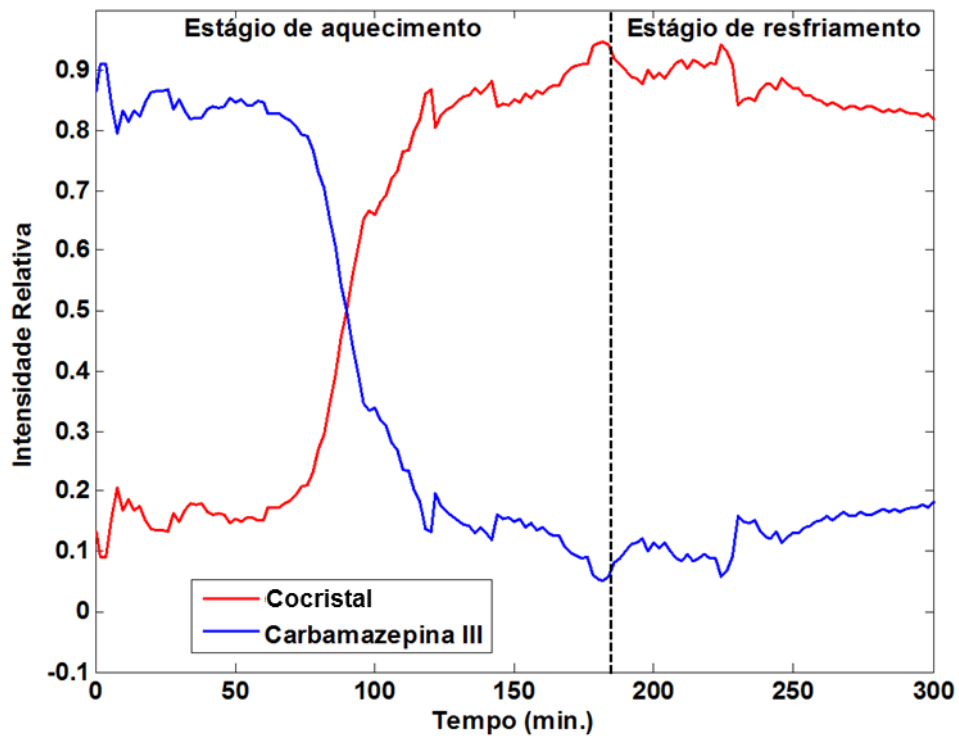


FIGURA 4.11 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C

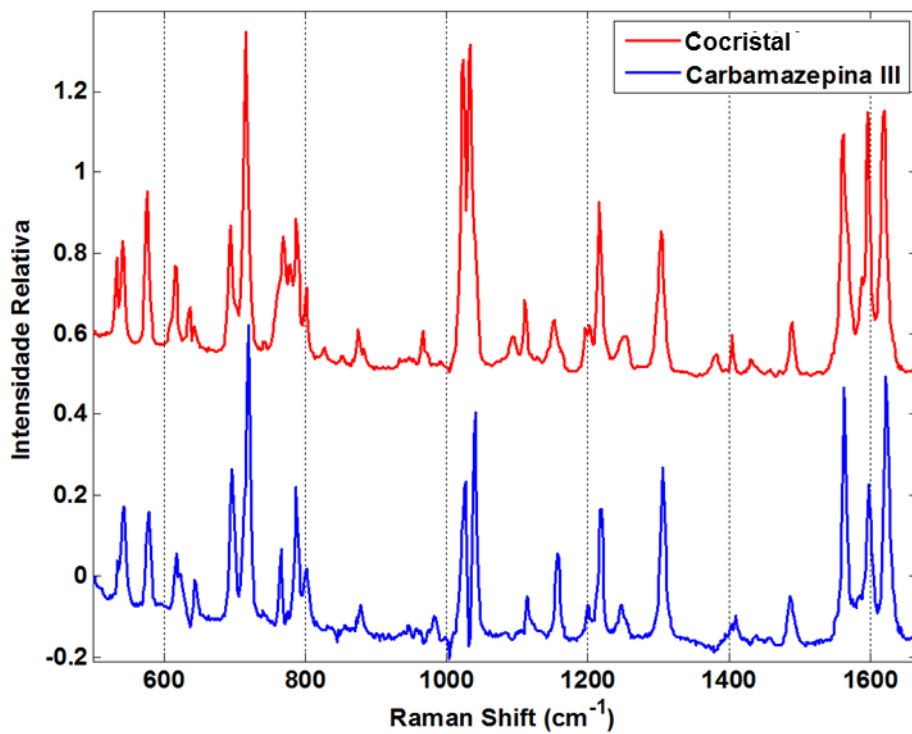


FIGURA 4.12 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C

Os dados apresentados pelo modelo apresentam bom ajuste, com porcentagem de variância explicada de 96,62 % e falta de ajuste de 14,88 %. A reação à temperatura de 60 °C possibilitou observar a conversão praticamente completa dos reagentes iniciais à forma mista de cocrystal, utilizando um solvente ambientalmente correto.

4.3.4. Reação a temperatura de 80 °C

Mesmo com uma reação com conversão praticamente completa a 60 °C foi realizada uma reação a 80 °C, pois esta temperatura é descrita na literatura como condição para a transformação polimórfica da carbamazepina dihidratada para a forma III. Como foi observado nas reações a temperatura ambiente e a 40 °C, a carbamazepina dihidratada impede a reação de cocrystalização com a nicotinamida. Assim, utilizou-se uma temperatura de reação a 80 °C para avaliar o mecanismo de cocrystalização dos fármacos com o intuito de observar mais de dois componentes no sistema.

A reação a 80 °C ocorreu durante 5 horas, na qual a reação submetida a aquecimento por 3 horas e mais 2 horas sem aquecimento. Foram obtidos espectros em intervalos de 2 minutos. Os dados foram organizados numa matriz e posteriormente pré-tratados realizando-se a primeira derivada, normalização pela área e filtragem por PCA.

A Figura 4.13 apresenta 4 espectros adquiridos em diferentes tempos de reação durante o monitoramento. No início da reação, o espectro obtido é referente à carbamazepina na sua forma sólida comercial. Com quase 180 minutos de reação, notam-se diferenças entre o espectro inicial e o espectro obtido por meio mudanças nas intensidades relativas de quatro regiões do espectro, na região de 520 – 550 cm^{-1} , entre 740 – 800 cm^{-1} , na região de 1000 – 1050 cm^{-1} e entre 1550 – 1650 cm^{-1} .

Na região de deformação fora do plano do anel aromático, 500 – 550 cm^{-1} , há um aumento na intensidade do pico em 536 cm^{-1} quando comparado com o espectro do início da reação. Na região de 740 – 800 cm^{-1} , existe o surgimento de um pico, em 782 cm^{-1} e uma clara alteração nas intensidades relativas dos picos presentes nesta região. Na região de deformação de C-H do anel aromático, 1000 – 1050 cm^{-1} , há uma mudança no comprimento de onda de um dos picos presentes e o surgimento de um ombro, indicativo de dois ou mais picos sobrepostos na mesma região. Entre 1550 e

1650 cm^{-1} , a relação entre picos é diferente da relação esperada para os espectros Raman da carbamazepina forma III, forma dihidrata e do cocrystal.

Logo após o estágio de aquecimento, em 210 minutos de reação, o espectro obtido é bem semelhante ao espectro de 170 minutos. Entretanto, observa-se uma diminuição na intensidade do ombro em 1044 cm^{-1} e um aumento do pico em 1036 cm^{-1} característico do espectro do cocrystal. Ao final do monitoramento, vê-se um perfil espectral idêntico ao espectro do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida.

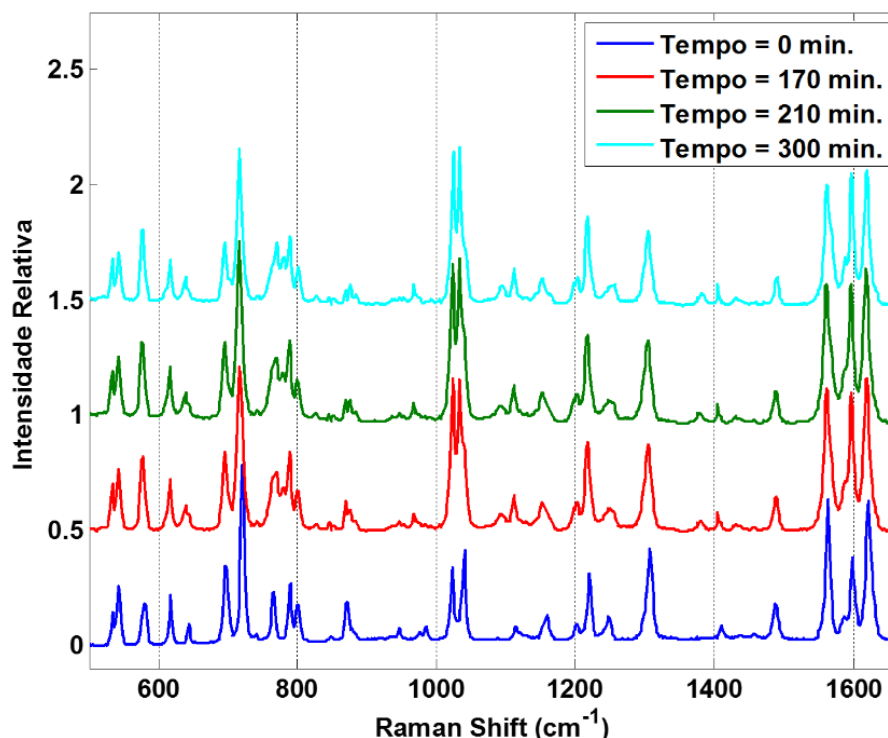


FIGURA 4.13 – Espectros Raman da mistura carbamazepina-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura de 80 °C

Quando realizou-se a filtragem por PCA das outras reações, apenas duas componentes principais eram significativas: uma referente ao cocrystal e outra referente à carbamazepina (dihidratada para ambiente e 40 °C e forma III na reação a 60°C). Entretanto, na reação à temperatura de 80 °C, avaliou-se uma componente a mais para o modelo (Figura 4.14). Por isso, no caso da reação a 80 °C, executou-se o MCR com três componentes.

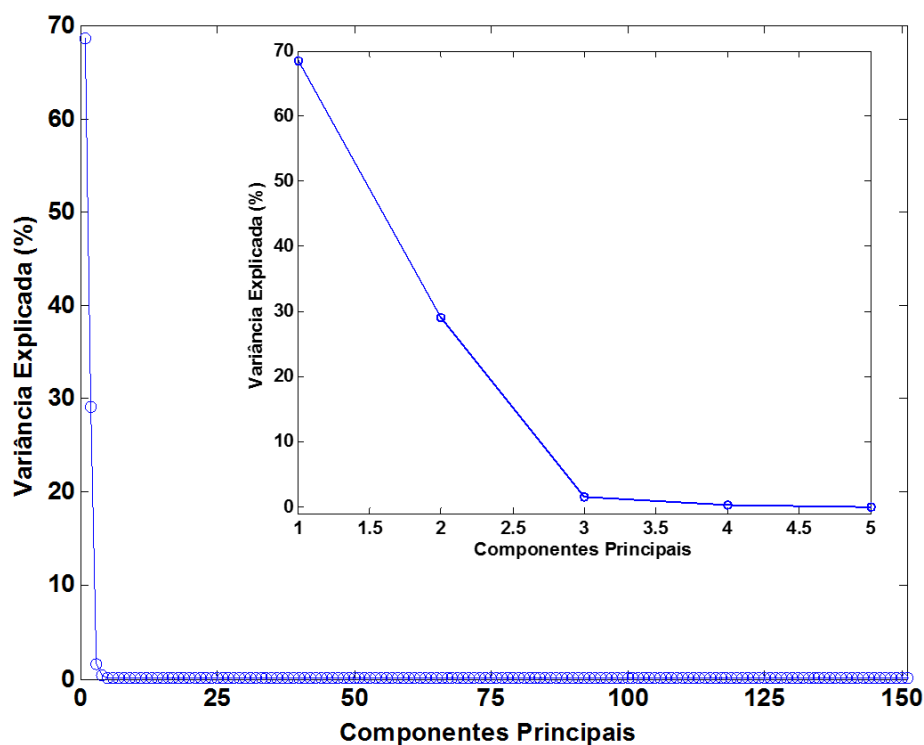


FIGURA 4.14 – Representação da porcentagem de variância explicada para os dados obtidos na reação a temperatura de 80 °C

Os perfis de concentração e espectral estão apresentados nas Figuras 4.15 e 4.16. O perfil espectral apresenta três espectro distintos. O primeiro espectro recuperado é referente ao espectro puro da carbamazepina na forma III; o segundo, uma mistura do espectro puro do cocrystal com o espectro da carbamazepina amorfa⁶²; e o terceiro, ao espectro puro do cocrystal.

No começo da etapa de aquecimento, apenas a carbamazepina forma III se mantém evidente na reação. Após duas horas e meia, toda a carbamazepina forma III foi consumida e contata-se que é uma mistura da carbamazepina amorfa e do cocrystal. Esta mistura é mantida até a etapa de resfriamento, quando a solução esfria os cristais precipitam-se na forma do cocrystal, havendo conversão total.

Alguns estudos relatam que o mecanismo de cocrystalização da carbamazepina em conjunto com a nicotinamida em água ocorre primeiramente com a transformação de carbamazepina cristalizada (geralmente na forma III) para a carbamazepina amorfa. A última apresenta uma taxa de dissolução e uma solubilidade maior do que os seus polimorfos. A carbamazepina amorfa solubiliza-se na solução aquosa de nicotinamida, e devido às interações do tipo homosínton ocorre a coprecipitação dos dois fármacos na forma de um cristal misto⁶².

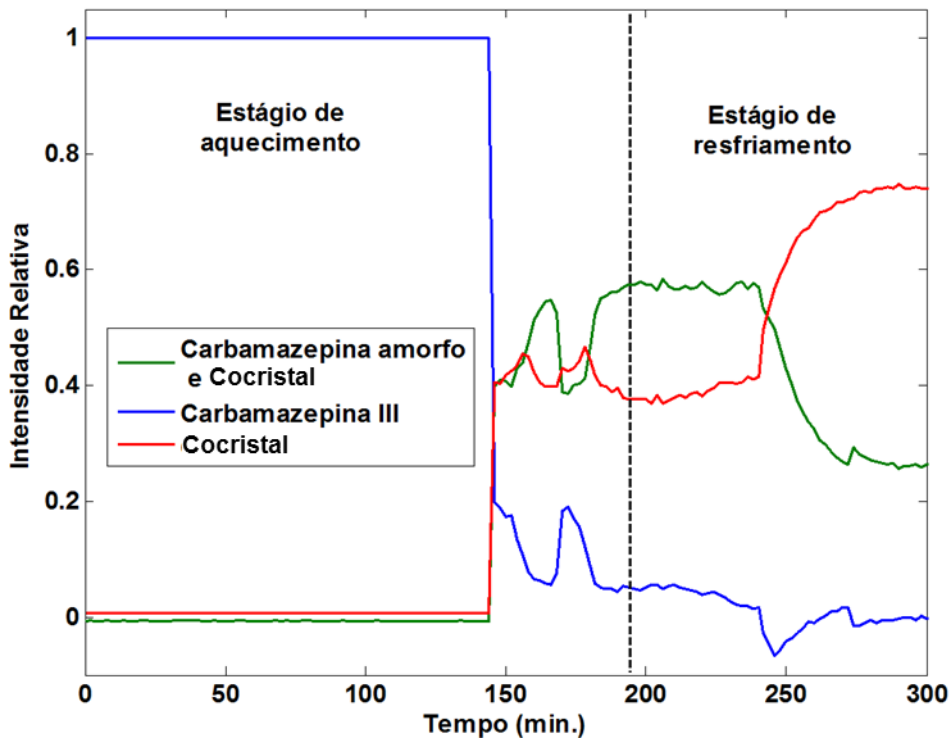


FIGURA 4.15 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 80 °C

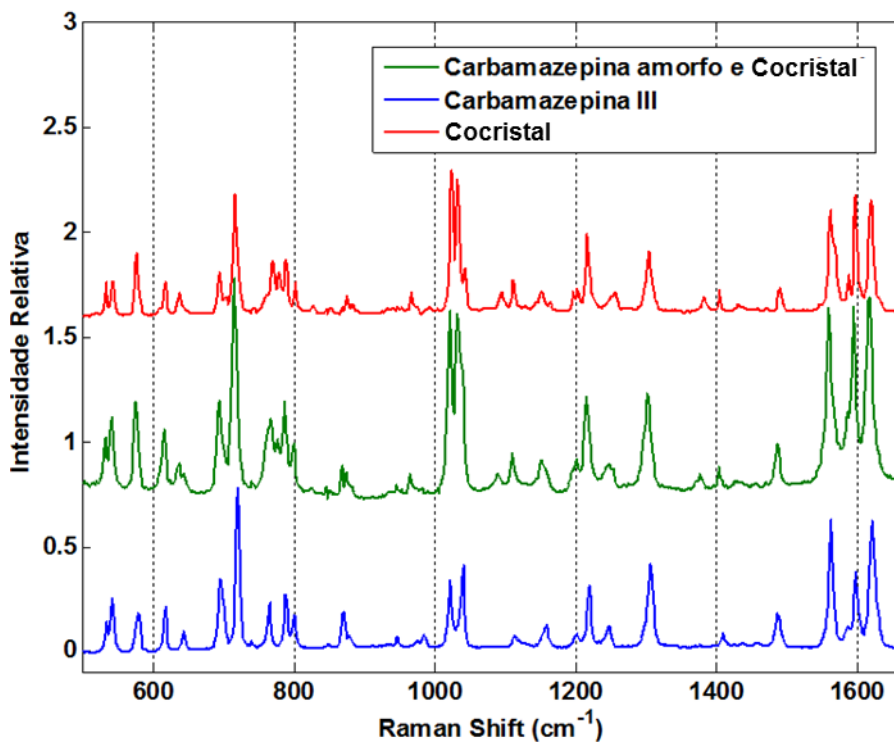


FIGURA 4.16 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação à temperatura de 80 °C

Os dados apresentados pelo modelo apresentam bom ajuste, obtendo-se o menor erro dos modelos ajustados, com porcentagem de variância explicada de 99,51 % e falta de ajuste de 6,97 %. A reação à temperatura de 80 °C, assim como a reação de 60 °C, possibilitou uma conversão praticamente completa dos substratos iniciais no cocrystal, sendo este um fato inédito na literatura.

4.4. Conclusões

A reação de cocrystalização para a carbamazepina-nicotinamida foi realizada em meio aquoso, utilizando a espectroscopia Raman como técnica de monitoramento durante a reação e aplicando duas das principais ferramentas do PAT: o uso de analisadores em linha e a utilização de ferramentas multivariadas para o tratamento dos dados obtidos.

A realização da reação em diferentes temperaturas possibilitou encontrar um ponto ótimo de síntese onde toda a carbamazepina e nicotinamida adicionadas ao início da reação foram convertidos em cocrystal de carbamazepina-nicotinamida

O monitoramento Raman acoplado a ferramentas quimiométricas, como o PCA e o MCR-ALS, possibilitaram identificar o ponto final das reações e identificar o mecanismo de cristalização dos fármacos em diferentes temperaturas.

Nas reações à temperatura ambiente e a 40 °C, não houve formação do cocrystal de carbamazepina-nicotinamida. Como a reação foi feita em meio aquoso, ocorreu uma transição polimórfica da carbamazepina adicionada à reação na sua forma dihidratada, impossibilitando a formação do cocrystal.

Na temperatura de 60 °C não houve a formação de hidratos nos cristais de carbamazepina, favorecendo a adição de moléculas de nicotinamida, necessária para a formação do cocrystal. A 80 °C, foi possível identificar a presença da carbamazepina na forma amorfa. Como a forma amorfa de compostos orgânicos apresentam uma solubilidade maior do que a forma cristalina. Estima-se que a cocrystalização do cocrystal de CBZ-NCT à 80 °C, ocorre primeiramente com a transformação de carbamazepina da forma III para amorfo, que por ser mais solúvel interage mais facilmente com as moléculas de nicotinamida presentes na solução, e em seguida, gera o cocrystal CBZ-NCT.

**CAPÍTULO 5 – MONITORAMENTO IN SITU
DO COCRISTAL DE IBUPROFENO-
NICOTINAMIDA**

5. MONITORAMENTO IN SITU DO COCRISTAL DE IBUPROFENO-NICOTINAMIDA

5.1. Introdução e Objetivos

Como objeto de estudo, utilizou-se o cocristal ibuprofeno-nicotinamida (IBP-NCT). O cocristal de ibuprofeno-nicotinamida já foi estudado utilizando diversas formas de síntese, porém uma boa parte deles utiliza solventes orgânicos. Não há relatos na literatura de formação deste cocristal utilizando o método de conversão em suspensão.

Com enfoque neste tipo de cristal, buscou-se um novo método de cocristalização com o objetivo de gerar resíduos, seguindo-se os princípios da química verde. Dentre os 12 princípios da química verde citados por Anastas e Warner¹⁵⁸, estão presentes a utilização de solventes não-orgânicos e o monitoramento e controle em tempo real de processos químicos.

No âmbito da química verde, o monitoramento in-line das reações químicas é essencial para se controlar e observar a presença de subprodutos que possam ser nocivos à saúde humana. Outro fator que corrobora a utilização da tecnologia analítica de processo (PAT) na química verde é a diminuição no tempo de processo. Com menor tempo de ciclagem, pode-se obter o mesmo produto com menor consumo de energia, o que a longo prazo beneficia tanto a indústria quanto o meio ambiente.

5.2. Parte Experimental

Em todas as sínteses utilizou-se: ibuprofeno da marca IOL Chemicals and Pharmaceuticals Ltd, grau de pureza 100,29%, a nicotinamida da marca Aarti Drugs Limited, grau de pureza 99,82%, e água ultrapura com resistividade superior a 18 m Ω ·cm proveniente de um sistema Milli-Q (Millipore®).

Para o monitoramento *in-line* da reação, utilizou-se o espectrômetro Raman da B&W Tek modelo *i*-Raman BWS 415-785H com laser vermelho de 785 nm, com resolução espectral de 3,5 cm⁻¹. O tempo de aquisição de cada espectro foi de 120 segundos, sendo este, o intervalo de tempo entre cada espectro. A potência do laser foi variada de 224mW até 320 mW e o intervalo espectral foi de 281 a 1708 cm⁻¹

(Raman Shift). A reação foi montada seguindo o esquema apresentado na Figura 5.1 onde a sonda portátil do Raman é posicionado acima do sistema de reação onde se encontra o béquer e uma chapa de aquecimento termostatzada.

5.2.1. Síntese do cocrystal de IBP-NCT em água

Pesou-se aproximadamente 412,5 mg de ibuprofeno (2 mmol) em um béquer. Em outro recipiente, preparou-se uma solução aquosa de concentração próxima da saturação de nicotinamida (5,00 mol/L). Para isso, 244,3 mg de nicotinamida (2 mmol) foram solubilizados em 400 μ L de H₂O ultrapura. A reação foi aquecida utilizando uma placa aquecedora da IKA modelo C-MAG HS 7 com agitação magnética e um termopar conforme Figura 5.1.

O monitoramento foi realizado acompanhando as mudanças envolvidas nos cristais de ibuprofeno. Portanto, a solução de nicotinamida é adicionada após o primeiro espectro de ibuprofeno ser adquirido.

Este procedimento foi realizado em três temperaturas diferentes: ambiente (23 °C \pm 1 °C); 40 °C (\pm 2 °C) e 60 °C (\pm 3 °C). Para as reações à temperatura ambiente e a 40 °C o monitoramento, foi realizado durante períodos de 5 e 6 horas, respectivamente. Sendo que, para a reação de 40 °C, as duas últimas horas da reação foram realizadas sem aquecimento.

Com a reação ocorrendo à temperatura de 60 °C, é possível observar a total dissolução do ibuprofeno em água, e posteriormente a dissolução da nicotinamida. Portanto, o monitoramento para esta reação procedeu por apenas 2 horas, tempo suficiente para a dissolução de seus componentes e posterior resfriamento da reação e precipitação dos cocrystal.

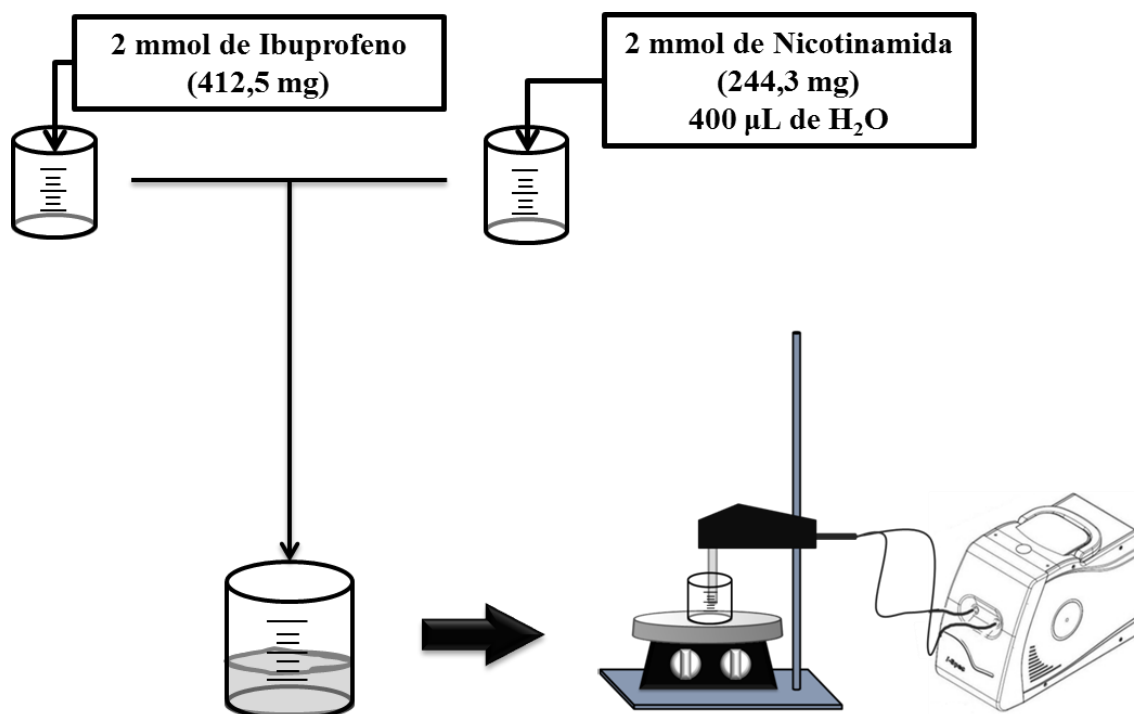


FIGURA 5.1 – Representação esquemática do procedimento experimental para a reação em água do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida

5.2.2. Métodos Quimiométricos

Ao final das reações, os dados gerados por espectroscopia Raman foram armazenados em uma única matriz. Os espectros foram derivados (na maioria dos casos), normalizados pela área e em seguida utilizou-se a filtragem por PCA e por fim utilizou-se o MCR-ALS.

O MCR foi utilizado nas seguintes condições:

- Intervalo espectral: $586 - 1137 \text{ cm}^{-1}$
- Três componentes;
- Estimativa inicial: espectros puros do ibuprofeno, nicotinamida e do cocrystal;
- Não negatividade na concentração;
- Não negatividade no espectro (apenas para os casos que não se utilizou espectros derivados);
- Restrição dos espectros finais iguais aos espectros puros do ibuprofeno, nicotinamida e do cocrystal.

É possível observar que um maior número de restrições foram necessárias para a construção do modelo para o monitoramento do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida quando comparado com as restrições utilizadas no monitoramento do cocrystal de

carbamazepina-nicotinamida. Isto se deve, pois o cocrystal de IBP-NCT apresentou um conjunto de dados, mais complexa que a do cocrystal de CBZ-NCT. Isto ocorre pois, durante a síntese do cocrystal de IBP-NCT o espectro do cocrystal aparece concomitante com o espectro da nicotinamida, fazendo-se necessária a utilização de restrições adicionais para uma melhor visualização do sistema.

5.3. Resultados e Discussão

O espectro Raman do cocrystal formado por evaporação lenta (Capítulo 3) foi utilizado como restrição de espectro final para um dos componentes resultantes do MCR. Esta restrição é necessária uma vez que no monitoramento da reação é observado uma deficiência de posto (rank). Isto ocorreu, pois o espectro no início da reação é referente a uma mistura dos espectros iniciais do ibuprofeno e da nicotinamida, e ao final da reação observa-se os espectros do cocrystal com a mistura inicial de ibuprofeno e nicotinamida. Portanto, a matriz que era para possuir posto igual a 3 (ibuprofeno, nicotinamida e cocrystal) é reduzida para posto igual a 2 (ibuprofeno + nicotinamida e cocrystal).

5.3.1. Reação à temperatura ambiente

A primeira reação foi realizada à temperatura ambiente. Coletou-se 301 espectros durante 5 horas. Ao final do monitoramento, obteve-se uma matriz de dados de 301 linhas por 901 colunas. Realizou-se a primeira derivada dos espectros, em seguida foram normalizados pela área e por fim utilizou-se a filtragem por PCA.

A Figura 5.2 apresenta espectros adquiridos durante o monitoramento em diferentes tempos de reação, nos quais é possível realizar uma análise prévia dos dados obtidos. As regiões que apresentaram mudanças mais significativas estão em 800 cm^{-1} e entre $1025 - 1050\text{ cm}^{-1}$. No início da reação, observa-se apenas o ibuprofeno (pico característico em 833 cm^{-1}) e a nicotinamida tanto no estado sólido (pico em 1041 cm^{-1}) quanto em solução (1033 cm^{-1}). Após 0,5 hora de reação, já é possível observar um pico em 797 cm^{-1} , característico do cocrystal assim como aumento de intensidade do pico em 1033 cm^{-1} , entretanto este pico pode representar tanto o cocrystal quanto a nicotinamida em solução. Com 2,5 horas de reação, todo o

cocrystal já foi formado. Ao final da reação não há nenhuma mudança significativa na intensidade do pico do cocrystal.

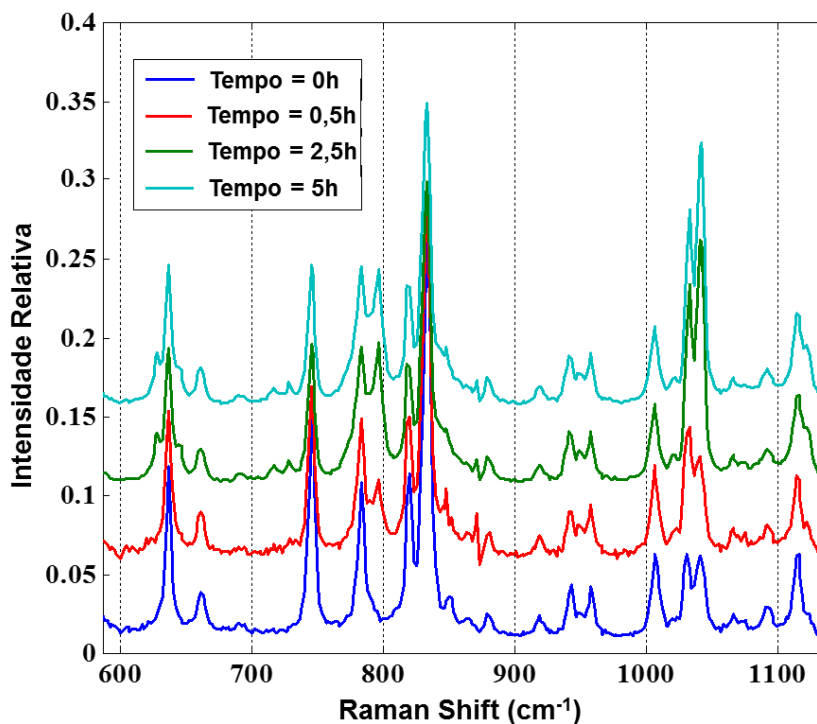


FIGURA 5.2 – Espectros Raman da mistura ibuprofeno-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura ambiente

Utilizando o pico do cocrystal em 797 cm⁻¹ seria possível monitorar a sua formação, utilizando um modelo univariado, relacionando a sua intensidade com um pico característico do ibuprofeno ou da nicotinamida. No entanto, muitos dos picos apresentados no cocrystal estão presentes em seus substratos iniciais, o que dificultaria a escolha das regiões utilizadas. Por isso, preferiu-se utilizar a ferramenta MCR-ALS de deconvolução quimiométrica.

As Figuras 5.3 e 5.4 mostram os perfis de concentração (C_k) e espectrais (S^T) recuperados pelo modelo. O perfil de concentração demonstra que a formação do cocrystal ocorre de forma rápida. Com apenas 1,2 horas, a reação já havia alcançado o seu equilíbrio. Estes dados também corroboram com a estabilidade termodinâmica do cocrystal, pois mesmo, à temperatura ambiente, o ibuprofeno e a nicotinamida, quando em solução, preferem precipitar na forma de cocrystal ao invés de precipitarem isoladamente. Como utilizou-se a constrição de espectros finais igual ao espectro puro de cada componente, o perfil espectral é importante apenas para identificar cada composto no perfil de concentração. O modelo gerado pelo MCR-ALS apresentou

uma boa porcentagem de variância explicada com 91,80% dos dados sendo explicados pelo modelo ($R^2 = 0,92$).

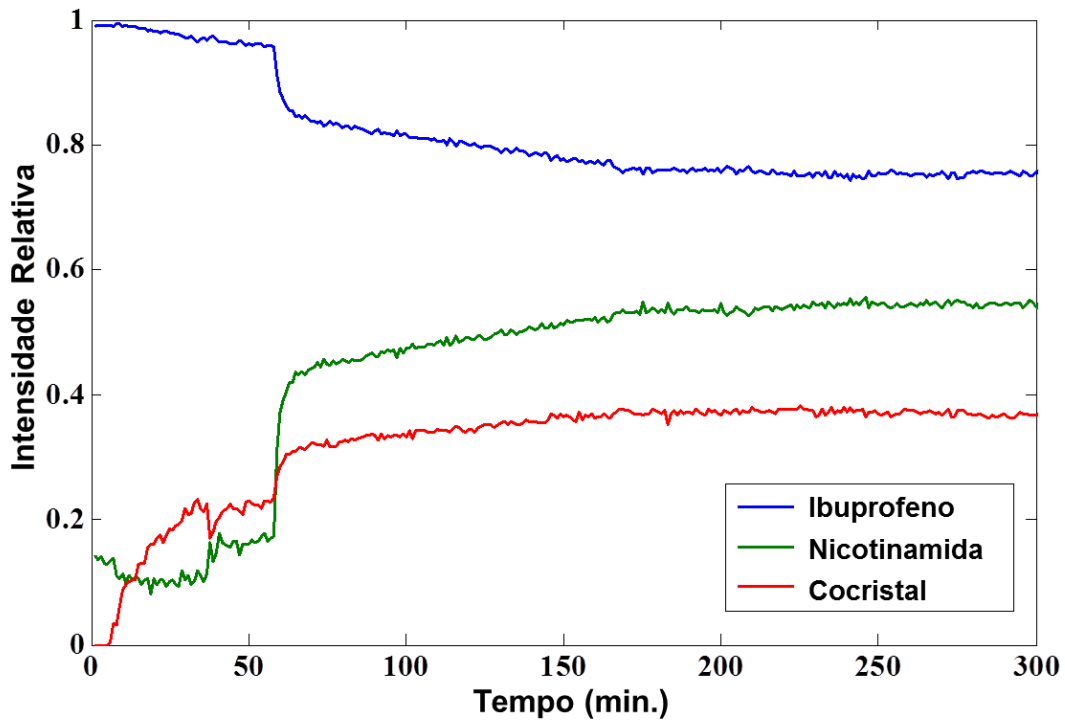


FIGURA 5.3 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura ambiente

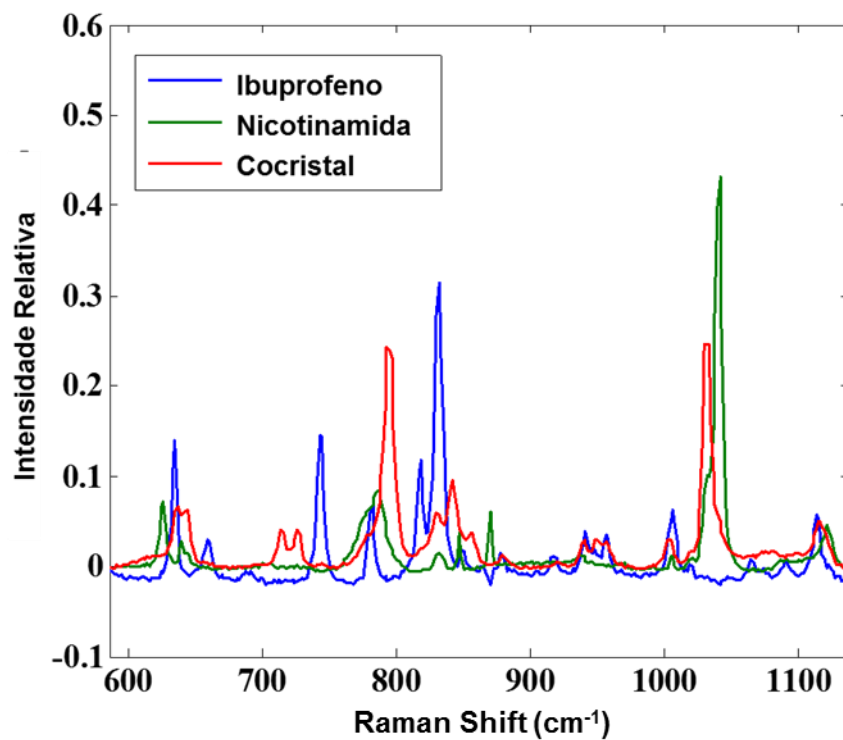


FIGURA 5.4 – Perfis espectrais integrados utilizados pelo modelo da reação a temperatura ambiente

5.3.2. Reação com a temperatura à 40 °C

Como foi possível observar um equilíbrio de precipitação entre o cocrystal e seus coformadores, aumentou-se a temperatura da reação com o intuito de deslocar tanto o equilíbrio de precipitação, quanto aumentar a solubilidade dos fármacos em água.

A reação à 40 °C, foi realizada por um período de 6 horas com espectros adquiridos em intervalos de 2 minutos, resultando em uma matriz com 181 espectros por 901 colunas. Os espectros foram normalizados pela área e em seguida utilizou-se a filtragem por PCA.

A Figura 5.5 apresenta espectros adquiridos durante o monitoramento em diferentes tempos. No início da reação, observa-se apenas o espectro do ibuprofeno puro. Depois de 1 hora de reação, os picos específicos do cocrystal começam a aparecer. Em 2,5 horas de reação, a relação entre o pico do ibuprofeno e o pico do cocrystal é quase 1:1. Ao final da reação (tempo = 5 horas), o pico do cocrystal apresenta uma intensidade relativa maior do que o pico do ibuprofeno e da nicotinamida.

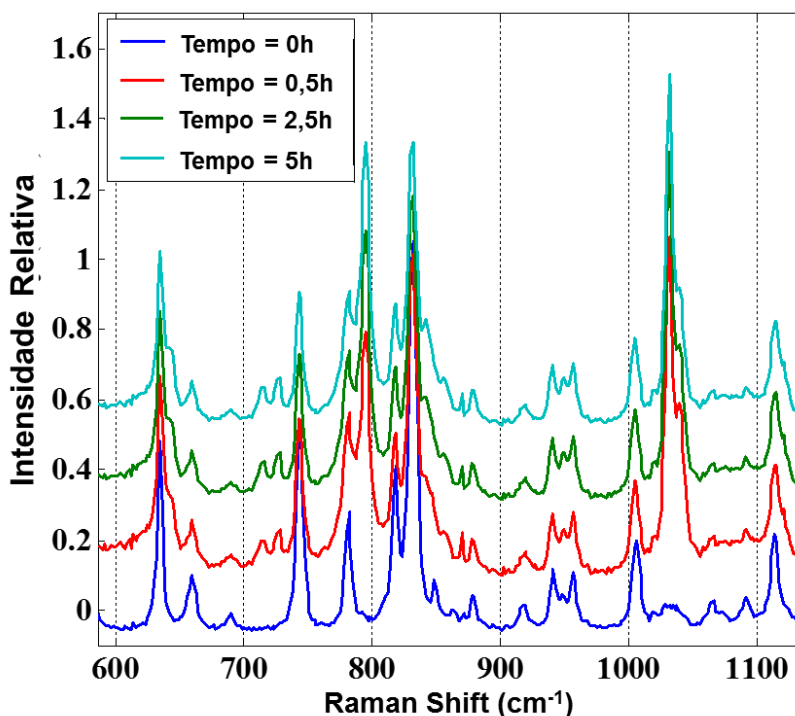


FIGURA 5.5 – Espectros Raman da mistura ibuprofeno-nicotinamida obtidos in-line em quatro tempos diferentes de reação à temperatura ambiente de 40 °C

Os perfis de concentração e espectral recuperados pelo modelo são apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7. O perfil de concentração mostra a rápida conversão dos substratos iniciais para o cocrystal, pois com apenas 1 hora, a reação já havia quase alcançado o estado de equilíbrio da reação. A formação do cocrystal ocorreu de maneira mais lenta durante o restante do período. No período de resfriamento, há uma grande precipitação de nicotinamida, enquanto parte do ibuprofeno é solubilizado para formar o restante de cocrystal. A reação à 40 °C mostrou que com o acréscimo na temperatura, é possível favorecer a formação do cocrystal de maneira significativa.

Assim como na reação à temperatura ambiente, o perfil espectral apenas informa qual é cada espécie no perfil de concentração. E o ajuste dos dados apresentou-se melhor do que na reação a temperatura ambiente. Na reação a 40 °C, 94,2% dos dados foram explicados pelo modelo, $R^2 = 0,94$.

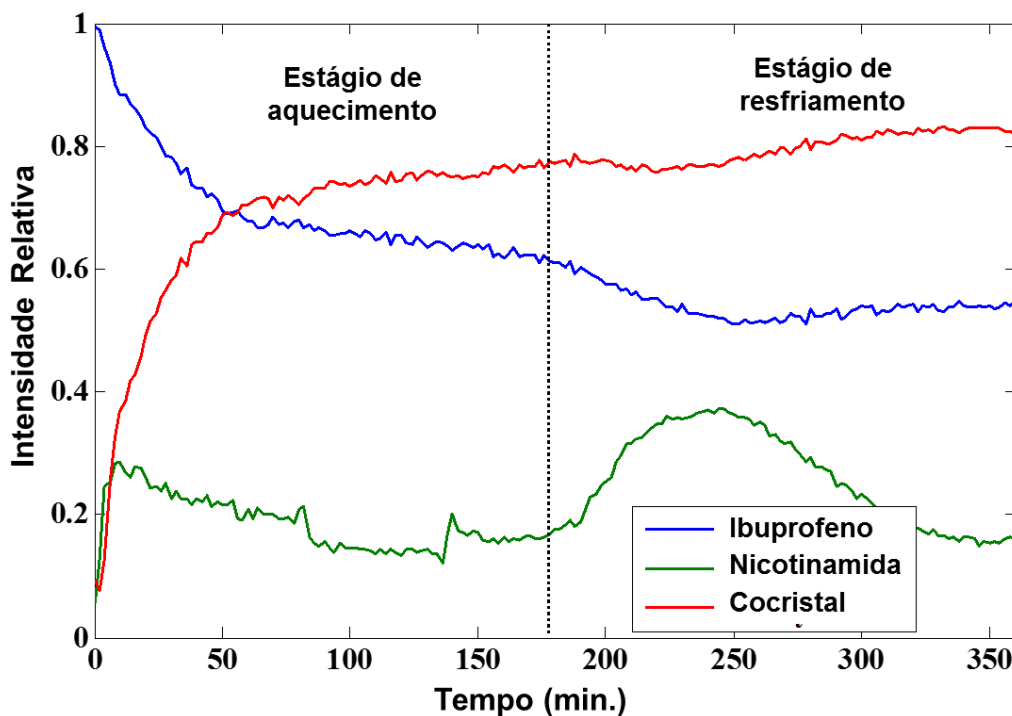


FIGURA 5.6 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 40 °C

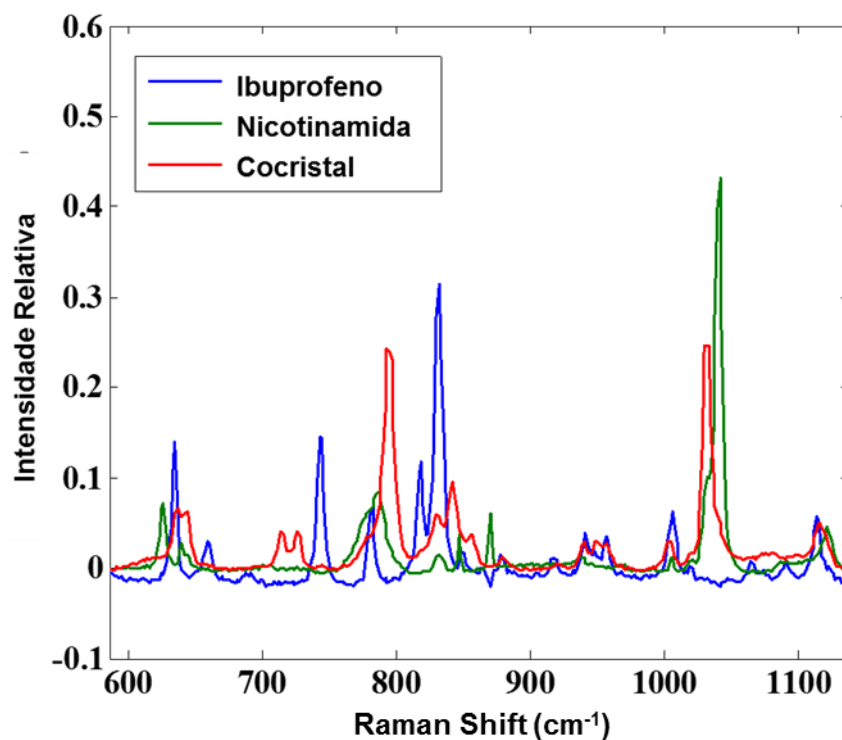


FIGURA 5.7 – Perfis espectrais integrados utilizados pelo modelo da reação a temperatura de 40 °C

5.3.3. Reação com a temperatura à 60 °C

A reação a 60 °C ocorreu durante um período de 6 horas com intervalos de medida de 2 minutos entre cada espectro. Ao final da reação todos os 181 espectros foram organizados na forma de matriz. Realizou-se a primeira derivada, normalização dos espectros pela área e filtragem por PCA. Após 35 minutos de reação, a solução foi aquecida a 60 °C. Esta etapa de aquecimento ocorreu durante 180 minutos. Os 145 minutos finais ocorreram sem nenhum tipo de aquecimento (etapa de resfriamento).

A Figura 5.8 apresenta 5 espectros adquiridos durante o monitoramento. No início da reação, o espectro obtido é da mistura de ibuprofeno e nicotinamida em solução e na forma sólida. Com 1 hora de reação, alguns picos assemelham-se com picos do cocrystal (797 cm^{-1} e 1033 cm^{-1}) e outros com o espectro do ibuprofeno (região de CH_2 e CH_3 de $900 - 1000\text{ cm}^{-1}$; pico em 830 cm^{-1} e em 743 cm^{-1}). Entretanto, estes picos apresentam-se mais largos do que o usual para os reagentes.

Com 2 horas de reação, os picos ficam mais resolvidos, e observa-se de forma mais nítida os picos do cocrystal. Apenas o pico mais intenso do ibuprofeno continua

presente no espectro, porém com uma intensidade relativa muito baixa. Com 2,5 horas, os reagentes são solubilizados por completo, e a reação fica translúcida. Os espectros adquiridos nesta etapa tem uma intensidade muito baixa bem próxima da linha de base. Apenas os picos mais intensos de cada um dos componentes da reação estão evidentes nestes espectros. Ao final do monitoramento, obtêm-se um espectro idêntico ao espectro do cocrystal.

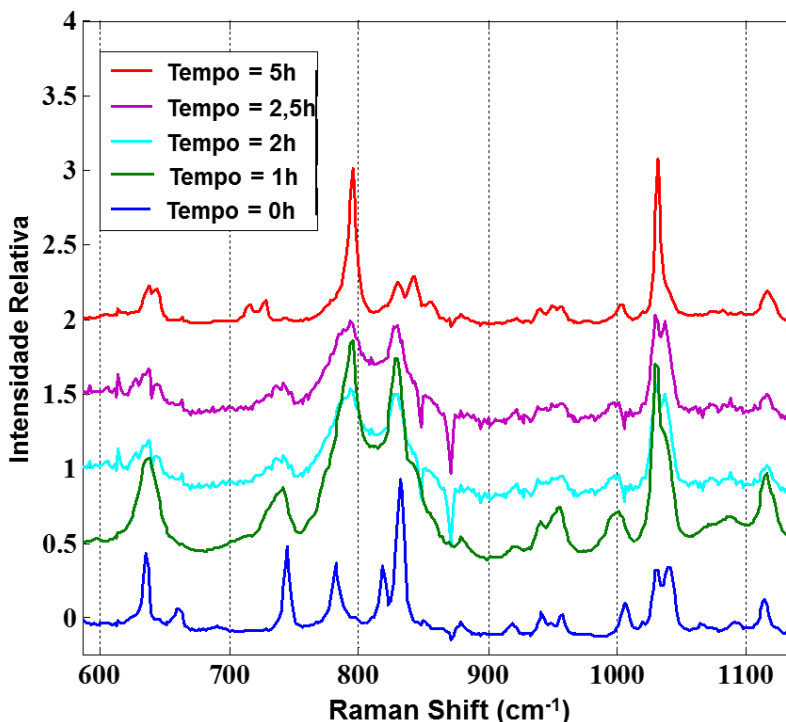


FIGURA 5.8 – Espectros Raman da mistura ibuprofeno-nicotinamida obtidos in-line em cinco tempos diferentes de reação à temperatura ambiente de 60 °C

Quando realizou-se o filtragem por PCA das outras reações apenas duas componentes principais eram significativas. Entretanto na reação a temperatura de 60 °C, a porcentagem de variância explicada mostrava que quatro componentes eram significativas para este caso (Figura 5.9). Por isso, no caso da reação a 60 °C, realizou-se o MCR com quatro componentes, e não foi possível utilizar a restrição de espectros finais igual ao espectro puro dos componentes. Como estimativa inicial dos espectros, utilizou-se a função *pure* do MCR, que recupera os 4 espectros mais diferentes nos dados originais.

Os perfis de concentração e espectral do ibuprofeno, nicotinamida e cocrystal IBP-NCT estão apresentados nas Figuras 5.10 e 5.11. O perfil espectral apresenta quatro espectros distintos. Um espectro recuperado é uma mistura do espectro puro

do ibuprofeno com o espectro da nicotinamida; outro é o espectro puro do cocrystal; o terceiro espectro recuperado é o ruído instrumental do equipamento; e por fim um espectro misto entre o ibuprofeno e cocrystal.

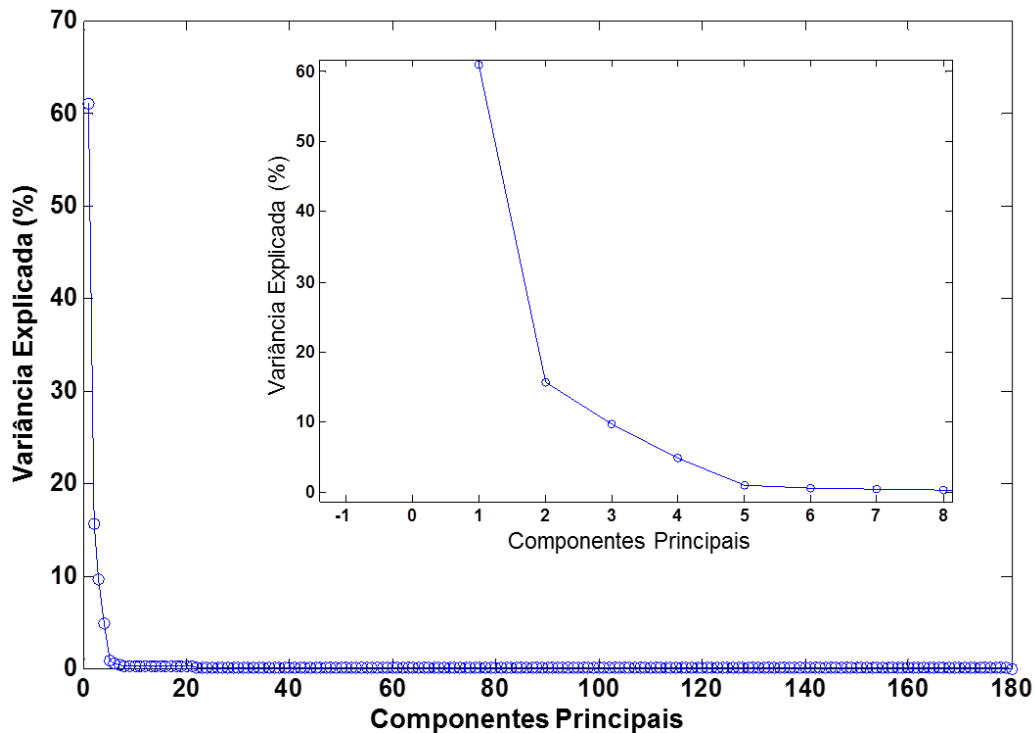


FIGURA 5.9 – Representação da porcentagem de variância explicada para os dados obtidos na reação a temperatura de 60 °C

O espectro recuperado da mistura do cocrystal com o ibuprofeno apresenta bandas largas diferentemente dos picos finos e bem resolvidos que usualmente aparecem no espectro Raman. Na espectroscopia vibracional, bandas largas são características de estruturas amorfas, que estão começando a cristalizar. Pois estas apresentam um mesmo tipo de vibração, mas com pequenas mudanças na energia relacionada a essas vibrações. Uma possibilidade é que este espectro recuperado, que também está presente nos dados puros do monitoramento (Figura 5.8, Tempo = 1h), possa ser referente ao espectro dos centros de nucleação do cocrystal que começam a ser formados próximos aos cristais do ibuprofeno. Este fato é reforçado pelo perfil de concentração recuperado pelo modelo.

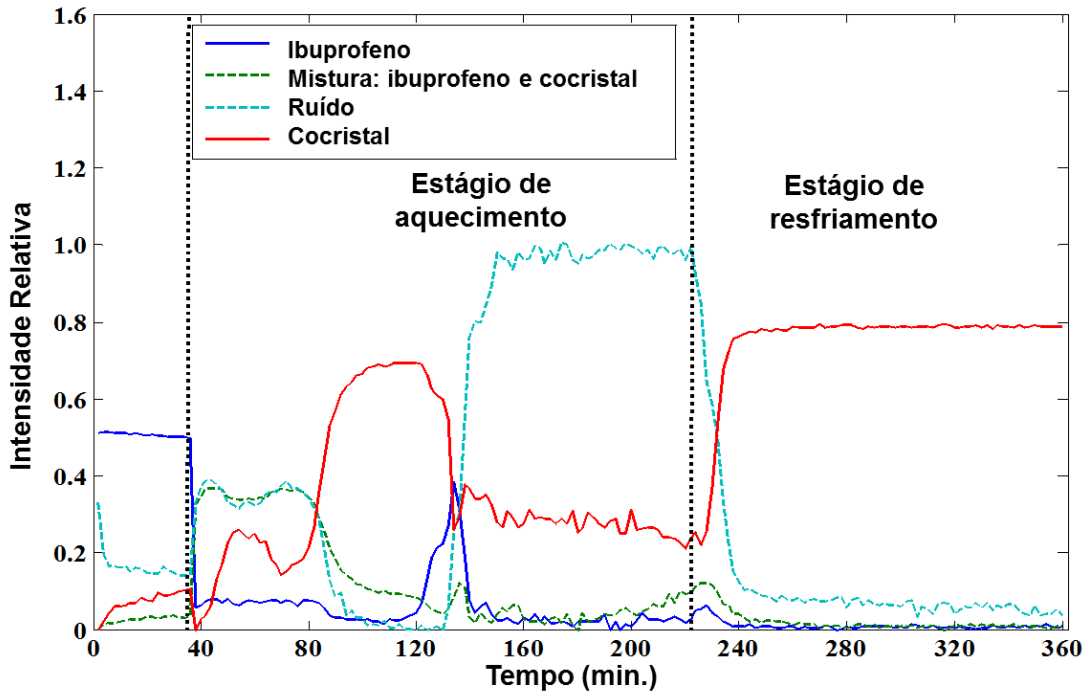


FIGURA 5.10 – Perfil de concentração recuperado pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C

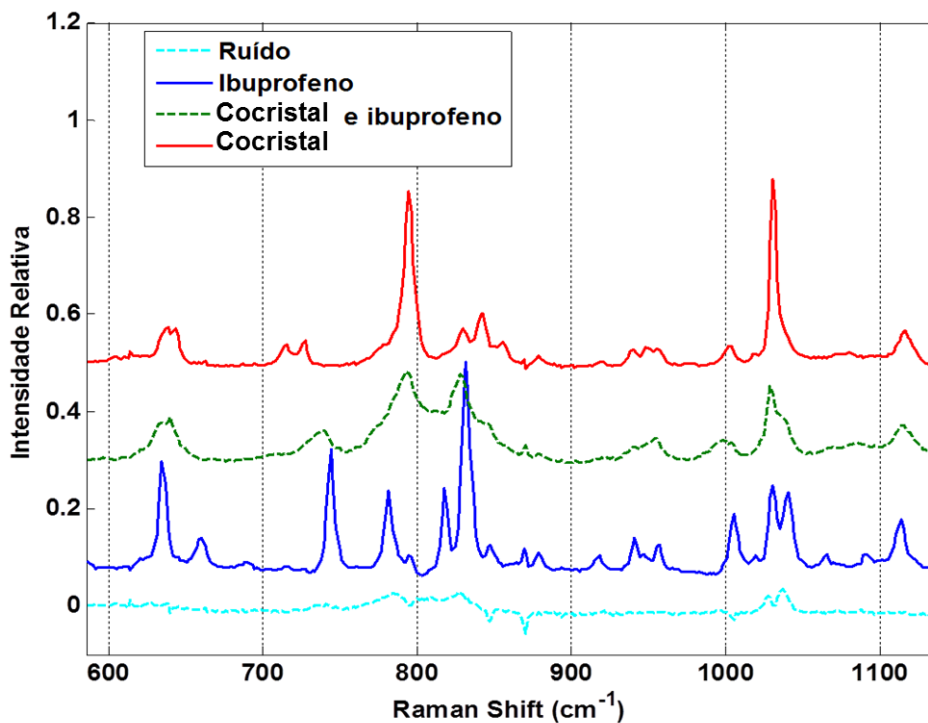


FIGURA 5.11 – Perfis espectrais integrados e recuperados pelo modelo da reação a temperatura de 60 °C

No começo da etapa de aquecimento, apenas o ruído e o espectro da mistura de cocrystal e ibuprofeno ficam evidentes na reação. Com o passar do tempo, a concentração relativa do cocrystal começa a aumentar e a da mistura diminui. Provavelmente os núcleos de formação do cocrystal começam a se agregar para formar os cristais. Com 2,2 horas de reação, toda a solução apresentou-se translúcida. Nesta etapa, os espectros adquiridos são representados basicamente pelo ruído instrumental. Quando a solução é resfriada, os cristais precipitam-se na forma do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida, com uma conversão total.

Como não se utilizou nenhuma restrição dos espectros finais, o ajuste dos dados para a reação a 60 °C apresentou-se melhor do que todas as outras com $R^2 = 0,999997$ e falta de ajuste de 0.18042 %.

5.4. Conclusões

A reação de cocrystalização do cocrystal de ibuprofeno-nicotinamida foi realizada utilizando uma síntese verde e ambientalmente correta. Esta reação foi realizada sem a adição de solventes orgânicos e com monitoramento in-line por espectroscopia Raman.

O monitoramento in-line e a utilização de ferramentas quimiométricas como o PCA e o MCR possibilitaram a obtenção de informações adicionais para a reação, como por exemplo, foi possível identificar o ponto final da reação, compreender os mecanismos de cristalização dos fármacos e assim, realizar um planejamento experimental mais eficaz.

Na reação à temperatura ambiente, foi possível identificar o equilíbrio de precipitação existente entre os coformadores e o produto final, observado a formação do produto pretendido com baixa conversão. Assim, pode-se realizar um delineamento experimental com o intuito de deslocar o equilíbrio químico envolvido.

Realizando a reação a 40 °C, houve uma maior conversão do produto final, entretanto, perfis de concentração relativos aos coformadores iniciais foram identificados. A reação à temperatura de 60 °C possibilitou a conversão total dos reagentes iniciais para a forma de cocrystal, e o uso de ferramentas quimiométricas auxiliou na compreensão do mecanismo de cristalização do cocrystal de ibuprofeno nicotinamida.

CAPÍTULO 6 – PERPESCTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Monitorar a síntese de diferentes classes de cocristais que podem apresentar: formas polimórficas diferentes, formação de cocristais a partir de moléculas iônicas (sais de cocristais) e de hidratos (solvatos de cocristais) e assim compreender o seus diferentes mecanismo de cocrystalização

Desenvolver métodos para a quantificação dos cocristais utilizando outras técnicas analíticas do estado sólido como por exemplo ressonância magnética nuclear de estado sólido, espectroscopia do infravermelho próximo e espectroscopia terahertz.

Estudar outros métodos de cocrystalização e realizar o seu monitoramento, como por exemplo reações mecanoquímicas.

Com o auxílio de técnicas como espalhamentos de raios-X de baixo ângulo e espalhamento de luz polarizada, realizar um monitoramento para avaliar o crescimento dos cocristais em diferentes métodos de síntese.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BHATT, P.M.; AZIM, Y.; THAKUR, T.S. & DESIRAJU, G.R., "Co-Crystals of the Anti-HIV Drugs Lamivudine and Zidovudine". *Cryst Growth Des.* **9**(2): 951, 2009.
2. BOND, A.D., "What is a co-crystal?". *Crystengcomm.* **9**: 833, 2007.
3. HERRMANN, M.; FORTER-BARTH, U.; KROBER, H.; KEMPA, P.B.; JUEZ-LORENZO, M.D. & DOYLE, S., "Co-Crystallization and Characterization of Pharmaceutical Ingredients". *Part Part Syst Char.* **26**(3): 151, 2009.
4. WÖHLER, F., "Untersuchungen über das Chinon". *Justus Liebigs Annalen der Chemie.* **51**(2): 145, 1844.
5. CHILDS, S.L. & ZAWOROTKO, M.J., "The Reemergence of Cocrystals: The Crystal Clear Writing Is on the Wall Introduction to Virtual Special Issue on Pharmaceutical Cocrystals". *Cryst Growth Des.* **9**(10): 4208, 2009.
6. SPRINGUEL, G.; NORBERG, B.; ROBEYNS, K.; WOUTERS, J. & LEYSSENS, T., "Advances in Pharmaceutical Co-crystal Screening: Effective Co-crystal Screening through Structural Resemblance". *Cryst Growth Des.* **12**(1): 475, 2012.
7. HABGOOD, M.; DEIJ, M.A.; MAZUREK, J.; PRICE, S.L. & TER HORST, J.H., "Carbamazepine Co-crystallization with Pyridine Carboxamides: Rationalization by Complementary Phase Diagrams and Crystal Energy Landscapes". *Cryst Growth Des.* **10**(2): 903, 2010.
8. AITIPAMULA, S.; BANERJEE, R.; BANSAL, A.K.; BIRADHA, K.; CHENEY, M.L.; CHOUDHURY, A.R.; DESIRAJU, G.R.; DIKUNDWAR, A.G.; DUBEY, R.; DUGGIRALA, N.; GHOGALE, P.P.; GHOSH, S.; GOSWAMI, P.K.; GOUD, N.R.; JETTI, R.R.K.R.; KARPINSKI, P.; KAUSHIK, P.; KUMAR, D.; KUMAR, V.; MOULTON, B.; MUKHERJEE, A.; MUKHERJEE, G.; MYERSON, A.S.; PURI, V.; RAMANAN, A.; RAJAMANNAR, T.; REDDY, C.M.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N.; ROGERS, R.D.; ROW, T.N.G.; SANPHUI, P.; SHAN, N.; SHETE, G.; SINGH, A.; SUN, C.Q.C.; SWIFT, J.A.; THAIMATTAM, R.; THAKUR, T.S.; THAPER, R.K.; THOMAS, S.P.; TOTHADI, S.; VANGALA, V.R.; VARIANKAVAL, N.; VISHWESHWAR, P.; WEYNA, D.R. &

ZAWOROTKO, M.J., "Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What's in a Name?". *Cryst Growth Des.* **12**(5): 2147, 2012.

9. KUMAR, T.L.; VISHWESHWAR, P.; BABU, J.M. & VYAS, K., "Salts of Hydrates of Imiquimod, an Immune Response Modifier". *Cryst Growth Des.* **9**(11): 4822, 2009.

10. BIS, J.A. & ZAWOROTKO, M.J., "The 2-aminopyridinium-carboxylate supramolecular heterosynthon: A robust motif for generation of multiple-component crystals". *Cryst Growth Des.* **5**(3): 1169, 2005.

11. DESIRAJU, G.R., "Supramolecular Synthons in Crystal Engineering—A New Organic Synthesis". *Angewandte Chemie International Edition in English.* **34**(21): 2311, 1995.

12. ADALDER, T.K.; SANKOLLI, R. & DASTIDAR, P., "Homo- or Heterosynthon? A Crystallographic Study on a Series of New Cocrystals Derived from Pyrazinecarboxamide and Various Carboxylic Acids Equipped with Additional Hydrogen Bonding Sites". *Cryst Growth Des.* **12**(5): 2533, 2012.

13. AAKERROY, C.B.; FORBES, S. & DESPER, J., "Using Cocrystals To Systematically Modulate Aqueous Solubility and Melting Behavior of an Anticancer Drug". *J Am Chem Soc.* **131**(47): 17048, 2009.

14. GOSWAMI, P.K.; THAIMATTAM, R. & RAMANAN, A., "Multiple Crystal Forms of p-Aminosalicylic Acid: Salts, Salt Co-Crystal Hydrate, Co-Crystals, and Co-Crystal Polymorphs". *Cryst Growth Des.* **13**(1): 360, 2013.

15. HENNIGAN, M.C. & RYDER, A.G., "Quantitative polymorph contaminant analysis in tablets using Raman and near infra-red spectroscopies". *J Pharmaceut Biomed.* **72**: 163, 2013.

16. KARMWAR, P.; GRAESER, K.; GORDON, K.C.; STRACHAN, C.J. & RADES, T., "Effect of different preparation methods on the dissolution behaviour of amorphous indomethacin". *Eur J Pharm Biopharm.* **80**(2): 459, 2012.

17. BAGRATASHVILI, V.N.; EGOROV, A.M.; KROTOVA, L.I.; MIRONOV, A.V.; PANCHENKO, V.Y.; PARENAGO, O.O.; POPOV, V.K.; REVELSKY, I.A.; TIMASHEV,

P.S. & TSYPIA, S.I., "Supercritical fluid micronization of risperidone pharmaceutical substance". *Russ J Phys Chem B+*. **6**(7): 804, 2012.

18. GOOD, D.J. & RODRIGUEZ-HORNEDO, N., "Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals". *Cryst Growth Des.* **9**(5): 2252, 2009.

19. STANTON, M.K. & BAK, A., "Physicochemical properties of pharmaceutical co-crystals: A case study of ten AMG 517 co-crystals". *Cryst Growth Des.* **8**(10): 3856, 2008.

20. TRASK, A.V.; MOTHERWELL, W.D.S. & JONES, W., "Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization". *Int J Pharmaceut.* **320**(1-2): 114, 2006.

21. FDA, *PAT — Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*, FDA, Editor. 2000: Washington, DC.

22. QIAO, N.; LI, M.Z.; SCHLINDWEIN, W.; MALEK, N.; DAVIES, A. & TRAPPITT, G., "Pharmaceutical cocrystals: An overview". *Int J Pharmaceut.* **419**(1-2): 1, 2011.

23. FRISCIC, T. & JONES, W., "Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding". *Cryst Growth Des.* **9**(3): 1621, 2009.

24. DELORI, A.; FRISCIC, T. & JONES, W., "The role of mechanochemistry and supramolecular design in the development of pharmaceutical materials". *Crystengcomm.* **14**(7): 2350, 2012.

25. DAURIO, D.; MEDINA, C.; SAW, R.; NAGAPUDI, K. & ALVAREZ-NÚÑEZ, F., "Application of Twin Screw Extrusion in the Manufacture of Cocrystals, Part I: Four Case Studies". *Pharmaceutics.* **3**(3): 582, 2011.

26. DHUMAL, R.S.; KELLY, A.L.; YORK, P.; COATES, P.D. & PARADKAR, A., "Cocrystallization and Simultaneous Agglomeration Using Hot Melt Extrusion". *Pharm Res.* **27**(12): 2725, 2010.

27. TRASK, A.V.; MOTHERWELL, W.D.S. & JONES, W., "Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation". *Chemical Communications.* **0**(7): 890, 2004.

-
28. WEYNA, D.R.; SHATTOCK, T.; VISHWESHWAR, P. & ZAWOROTKO, M.J., "Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution". *Cryst Growth Des.* **9**(2): 1106, 2009.
29. SHAN, N.; TODA, F. & JONES, W., "Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics". *Chemical Communications.* **0**(20): 2372, 2002.
30. CHILDS, S.L. & HARDCASTLE, K.I., "Cocrystals of chlorzoxazone with carboxylic acids". *Crystengcomm.* **9**(5): 364, 2007.
31. SANPHUI, P.; BABU, N.J. & NANGIA, A., "Temozolomide Cocrystals with Carboxamide Coformers". *Cryst Growth Des.* **13**(5): 2208, 2013.
32. VISHWESHWAR, P.; MCMAHON, J.A.; PETERSON, M.L.; HICKEY, M.B.; SHATTOCK, T.R. & ZAWOROTKO, M.J., "Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients". *Chemical Communications*, (36): 4601, 2005.
33. STEED, J.W., "The role of co-crystals in pharmaceutical design". *Trends Pharmacol Sci.* **34**(3): 185, 2013.
34. RODRIGUEZ-HORNEDO, N.; NEHRU, S.J.; SEEFELDT, K.F.; PAGAN-TORRES, Y. & FALKIEWICZ, C.J., "Reaction crystallization of pharmaceutical molecular complexes". *Mol Pharm.* **3**(3): 362, 2006.
35. GAGNIERE, E.; MANGIN, D.; PUEL, F.; BEBON, C.; KLEIN, J.P.; MONNIER, O. & GARCIA, E., "Cocrystal Formation in Solution: In Situ Solute Concentration Monitoring of the Two Components and Kinetic Pathways". *Cryst Growth Des.* **9**(8): 3376, 2009.
36. GAGNIERE, E.; MANGIN, D.; PUEL, F.; RIVOIRE, A.; MONNIER, O.; GARCIA, E. & KLEIN, J.R., "Formation of co-crystals: Kinetic and thermodynamic aspects". *J Cryst Growth.* **311**(9): 2689, 2009.
37. SPARR ESKILSSON, C. & BJÖRKLUND, E., "Analytical-scale microwave-assisted extraction". *J Chromatogr A.* **902**(1): 227, 2000.

-
38. GERE, D.R.; BOARD, R. & MCMANIGILL, D., "Supercritical fluid chromatography with small particle diameter packed columns". *Anal Chem.* **54**(4): 736, 1982.
39. TOM, J.W. & DEBENEDETTI, P.G., "Particle formation with supercritical fluids—a review". *Journal of Aerosol Science.* **22**(5): 555, 1991.
40. PADRELA, L.; RODRIGUES, M.A.; VELAGA, S.P.; FERNANDES, A.C.; MATOS, H.A. & DE AZEVEDO, E.G., "Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process". *J Supercrit Fluid.* **53**(1-3): 156, 2010.
41. PADRELA, L.; RODRIGUES, M.A.; VELAGA, S.R.; MATOS, H.A. & DE AZEVEDO, E.G., "Formation of indomethacin-saccharin cocrystals using supercritical fluid technology". *Eur J Pharm Sci.* **38**(1): 9, 2009.
42. OBER, C.A. & GUPTA, R.B., "Formation of Itraconazole-Succinic Acid Cocrystals by Gas Antisolvent Cocrystallization". *Aaps Pharmscitech.* **13**(4): 1396, 2012.
43. OBER, C.A.; MONTGOMERY, S.E. & GUPTA, R.B., "Formation of itraconazole/L-malic acid cocrystals by gas antisolvent cocrystallization". *Powder Technol.* **236**: 122, 2013.
44. HICKEY, M.B.; PETERSON, M.L.; SCOPPETTUOLO, L.A.; MORRISSETTE, S.L.; VETTER, A.; GUZMÁN, H.; REMENAR, J.F.; ZHANG, Z.; TAWA, M.D.; HALEY, S.; ZAWOROTKO, M.J. & ALMARSSON, Ö., "Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product". *Eur J Pharm Biopharm.* **67**: 112, 2007.
45. FLEISCHMAN, S.G.; KUDUVA, S.S.; MCMAHON, J.A.; MOULTON, B.; WALSH, R.D.B.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. & ZAWOROTKO, M.J., "Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases: Multiple-Component Crystalline Solids Involving Carbamazepine". *Cryst Growth Des.* **3**(6): 909, 2003.
46. MCMAHON, L.E.; TIMMINS, P.; WILLIAMS, A.C. & YORK, P., "Characterization of dihydrates prepared from carbamazepine polymorphs". *J Pharm Sci-US.* **85**(10): 1064, 1996.
47. MACDONALD, J.C. & PALMORE, G.T.R., *The Role of Amides in the Noncovalent Synthesis of Supramolecular Structures in Solution, at Interfaces and in Solids*, in *The Amide Linkage: Selected Structural Aspects in Chemistry, Biochemistry, and Materials*

Science, SONS, J.W., Editor. 2000, A. Greenberg; C. M. Breneman; J. F. Liebman: New York.

48. RASENACK, N. & MÜLLER, B.W., "Ibuprofen crystals with optimized properties". *Int J Pharmaceut.* **245**(1): 9, 2002.

49. POTTHAST, H.; DRESSMAN, J.B.; JUNGINGER, H.E.; MIDHA, K.K.; OESER, H.; SHAH, V.P.; VOGELPOEL, H. & BARENDIS, D.M., "Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: Ibuprofen". *J Pharm Sci-U.S.* **94**(10): 2121, 2005.

50. ALSHAHATEET, S.F., "Synthesis and Supramolecularity of Hydrogen-Bonded Cocrystals of Pharmaceutical Model Rac-Ibuprofen with Pyridine Derivatives". *Mol Cryst Liq Cryst.* **533**(1): 152, 2010.

51. NELSON, D.L. & COX, M.M., *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. 2011, Porto Alegre: Artmed.

52. BERRY, D.J.; SEATON, C.C.; CLEGG, W.; HARRINGTON, R.W.; COLES, S.J.; HORTON, P.N.; HURSTHOUSE, M.B.; STOREY, R.; JONES, W.; FRISCIC, T. & BLAGDEN, N., "Applying hot-stage microscopy to co-crystal screening: A study of nicotinamide with seven active pharmaceutical ingredients". *Cryst Growth Des.* **8**(5): 1697, 2008.

53. FLEISCHMAN, S.G.; KUDUVA, S.S.; MCMAHON, J.A.; MOULTON, B.; BAILEY WALSH, R.D.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. & ZAWOROTKO, M.J., "Crystal Engineering of the Composition of Pharmaceutical Phases: Multiple-Component Crystalline Solids Involving Carbamazepine". *Cryst Growth Des.* **3**(6): 909, 2003.

54. SHEIKH, A.Y.; RAHIM, S.A.; HAMMOND, R.B. & ROBERTS, K.J., "Scalable solution cocrystallization: case of carbamazepine-nicotinamide I". *Crystengcomm.* **11**(3): 501, 2009.

55. RAHMAN, Z.; AGARABI, C.; ZIDAN, A.S.; KHAN, S.R. & KHAN, M.A., "Physico-mechanical and Stability Evaluation of Carbamazepine Cocrystal with Nicotinamide". *Aaps Pharmscitech.* **12**(2): 693, 2011.

-
56. RODRÍGUEZ-HORNEDO, N.; NEHM, S.J.; SEEFELDT, K.F.; PAGÁN-TORRES, Y. & FALKIEWICZ, C.J., "Reaction Crystallization of Pharmaceutical Molecular Complexes". *Mol Pharm.* **3**(3): 362, 2006.
57. GAGNIÈRE, E.; MANGIN, D.; PUEL, F.; RIVOIRE, A.; MONNIER, O.; GARCIA, E. & KLEIN, J.P., "Formation of co-crystals: Kinetic and thermodynamic aspects". *J Cryst Growth.* **311**(9): 2689, 2009.
58. GAGNIERE, E.; MANGIN, D.; PUEL, F.O.; BEBON, C.; KLEIN, J.-P.; MONNIER, O. & GARCIA, E., "Cocrystal Formation in Solution: In Situ Solute Concentration Monitoring of the Two Components and Kinetic Pathways". *Cryst Growth Des.* **9**(8): 3376, 2009.
59. NEHM, S.J.; RODRÍGUEZ-SPONG, B. & RODRÍGUEZ-HORNEDO, N., "Phase Solubility Diagrams of Cocrystals Are Explained by Solubility Product and Solution Complexation". *Cryst Growth Des.* **6**(2): 592, 2005.
60. JAYASANKAR, A.; GOOD, D.J. & RODRÍGUEZ-HORNEDO, N., "Mechanisms by Which Moisture Generates Cocrystals". *Mol Pharm.* **4**(3): 360, 2007.
61. LEE, K.C. & KIM, K.J., "Effect of Supersaturation and Thermodynamics on Co-Crystal Formation". *Chem Eng Technol.* **34**(4): 619, 2011.
62. SEEFELDT, K.; MILLER, J.; ALVAREZ-NÚÑEZ, F. & RODRÍGUEZ-HORNEDO, N., "Crystallization pathways and kinetics of carbamazepine–nicotinamide cocrystals from the amorphous state by in situ thermomicroscopy, spectroscopy, and calorimetry studies". *J Pharm Sci-U.S.* **96**(5): 1147, 2007.
63. MAHESHWARI, C.; JAYASANKAR, A.; KHAN, N.A.; AMIDON, G.E. & RODRIGUEZ-HORNEDO, N., "Factors that influence the spontaneous formation of pharmaceutical cocrystals by simply mixing solid reactants". *Crystengcomm.* **11**(3): 493, 2009.
64. CHIENG, N.; HUBERT, M.; SAVILLE, D.; RADES, T. & AALTONEN, J., "Formation Kinetics and Stability of Carbamazepine–Nicotinamide Cocrystals Prepared by Mechanical Activation". *Cryst Growth Des.* **9**(5): 2377, 2009.

-
65. KELLY, A.L.; GOUGH, T.; DHUMAL, R.S.; HALSEY, S.A. & PARADKAR, A., "Monitoring ibuprofen-nicotinamide cocrystal formation during solvent free continuous cocrystallization (SFCC) using near infrared spectroscopy as a PAT tool". *Int J Pharmaceut.* **426**(1-2): 15, 2012.
66. KOBAYASHI, Y.; ITO, S.; ITAI, S. & YAMAMOTO, K., "Physicochemical properties and bioavailability of carbamazepine polymorphs and dihydrate". *Int J Pharmaceut.* **193**(2): 137, 2000.
67. YAZDANIAN, M.; BRIGGS, K.; JANKOVSKY, C. & HAWI, A., "The "high solubility" definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs". *Pharm Res.* **21**(2): 293, 2004.
68. ALSHAHATEET, S.F., "Synthesis and Supramolecularity of Hydrogen-Bonded Cocrystals of Pharmaceutical Model Rac-Ibuprofen with Pyridine Derivatives". *Mol Cryst Liq Cryst.* **533**: 152, 2010.
69. FRISCIC, T. & JONES, W., "Cocrystal architecture and properties: design and building of chiral and racemic structures by solid-solid reactions". *Faraday Discuss.* **136**: 167, 2007.
70. CHEN, S.; XI, H.M.; HENRY, R.F.; MARSDEN, I. & ZHANG, G.G.Z., "Chiral co-crystal solid solution: structures, melting point phase diagram, and chiral enrichment of (ibuprofen)(2)(4,4-dipyridyl)". *Crystengcomm.* **12**(5): 1485, 2010.
71. CHOW, S.F.; CHEN, M.; SHI, L.M.; CHOW, A.H.L. & SUN, C.C., "Simultaneously Improving the Mechanical Properties, Dissolution Performance, and Hygroscopicity of Ibuprofen and Flurbiprofen by Cocrystallization with Nicotinamide". *Pharm Res.* **29**(7): 1854, 2012.
72. OBEROI, L.M.; ALEXANDER, K.S. & RIGA, A.T., "Study of interaction between ibuprofen and nicotinamide using differential scanning calorimetry, spectroscopy, and microscopy and formulation of a fast-acting and possibly better ibuprofen suspension for osteoarthritis patients". *J Pharm Sci-U.S.* **94**(1): 93, 2005.
73. LUO, Y.H. & SUN, B.W., "Pharmaceutical Co-Crystals of Pyrazinecarboxamide (PZA) with Various Carboxylic Acids: Crystallography, Hirshfeld Surfaces, and Dissolution Study". *Cryst Growth Des.* **13**(5): 2098, 2013.

-
74. TOMASZEWSKA, I.; KARKI, S.; SHUR, J.; PRICE, R. & FOTAKI, N., "Pharmaceutical characterisation and evaluation of cocrystals: Importance of in vitro dissolution conditions and type of coformer". *Int J Pharmaceut.* **453**(2): 380, 2013.
75. GROBELNY, P.; MUKHERJEE, A. & DESIRAJU, G.R., "Drug-drug co-crystals: Temperature-dependent proton mobility in the molecular complex of isoniazid with 4-aminosalicylic acid". *Crystengcomm.* **13**(13): 4358, 2011.
76. FLEISCHMAN, S.G.; KUDUVA, S.S.; MCMAHON, J.A.; MOULTON, B.; WALSH, R.D.B.; RODRIGUEZ-HORNEDO, N. & ZAWOROTKO, M.J., "Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases: Multiple-component crystalline solids involving carbamazepine". *Cryst Growth Des.* **3**(6): 909, 2003.
77. BASAVOJU, S.; BOSTROM, D. & VELAGA, S.P., "Pharmaceutical cocrystal and salts of norfloxacin". *Cryst Growth Des.* **6**(12): 2699, 2006.
78. ALLESO, M.; VELAGA, S.; ALHALAWEH, A.; CORNETT, C.; RASMUSSEN, M.A.; VAN DEN BERG, F.; DE DIEGO, H.L. & RANTANEN, J., "Near-infrared spectroscopy for cocrystal screening. A comparative study with Raman spectroscopy". *Anal Chem.* **80**(20): 7755, 2008.
79. CHARRON, D.M.; AJITO, K.; KIM, J.Y. & UENO, Y., "Chemical Mapping of Pharmaceutical Cocrystals Using Terahertz Spectroscopic Imaging". *Anal Chem.* **85**(4): 1980, 2013.
80. MCNAMARA, D.P.; CHILDS, S.L.; GIORDANO, J.; IARRICCIO, A.; CASSIDY, J.; SHET, M.S.; MANNION, R.; O'DONNELL, E. & PARK, A., "Use of a glutaric acid cocrystal to improve oral bioavailability of a low solubility API". *Pharm Res.* **23**(8): 1888, 2006.
81. BALDRIGHI, M.; CAVALLO, G.; CHIEROTTI, M.R.; GOBETTO, R.; METRANGOLO, P.; PILATI, T.; RESNATI, G. & TERRANEO, G., "Halogen Bonding and Pharmaceutical Cocrystals: The Case of a Widely Used Preservative". *Mol Pharm.* **10**(5): 1760, 2013.
82. LIU, X.; LU, M.; GUO, Z.F.; HUANG, L.; FENG, X. & WU, C.B., "Improving the Chemical Stability of Amorphous Solid Dispersion with Cocrystal Technique by Hot Melt Extrusion". *Pharm Res.* **29**(3): 806, 2012.

-
83. RAHMAN, Z.; SAMY, R.; SAYEED, V.A. & KHAN, M.A., "Physicochemical and mechanical properties of carbamazepine cocrystals with saccharin". *Pharm Dev Technol.* **17**(4): 457, 2012.
84. EDDLESTON, M.D.; BITHELL, E.G. & JONES, W., "Transmission Electron Microscopy of Pharmaceutical Materials". *J Pharm Sci-US.* **99**(9): 4072, 2010.
85. CULITY, B.D. & STOCK, S.R., *Elements of X-Ray Diffraction*. 3ª ed. 2001: Prentice Hall.
86. HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A. & CROUCH, S.R., *Princípios de Análise Instrumental*. 6 ed. 2009, Porto Alegre: Bookman.
87. LANGFORD, J.I. & LOUER, D., "Powder diffraction". *Rep Prog Phys.* **59**(2): 131, 1996.
88. SURYANARAYANA, C. & NORTON, M.G., *X-Ray Diffraction: A Practical Approach*. 1998, New York: Plenum Press.
89. FORD, J.L. & MANN, T.E., "Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection". *Adv Drug Deliver Rev.* **64**(5): 422, 2012.
90. BERNAL, C.; COUTO, A.B.; BREVIGLIERI, S.T. & CAVALHEIRO, É.T.G., "Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC". *Química Nova.* **25**: 849, 2002.
91. BHATTACHARYA, S.; BRITAIN, H.G. & SURYANARAYANAN, R., *Thermoanalytical and Crystallographic Methods*, in *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, INFORMA HEALTHCARE USA, I., Editor. 2009: Nova Iorque.
92. BRITAIN, H.G., *Physical characterization of pharmaceutical solids*. 1 ed. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. 1995: CRC Press.
93. LARKIN, P.J., *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. 2011: Elsevier.
94. REICH, G., "Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications". *Adv Drug Deliver Rev.* **57**(8): 1109, 2005.

-
95. BUGAY, D.E., "Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques". *Adv Drug Deliver Rev.* **48**(1): 43, 2001.
96. PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. & VYVYAN, J.R., *Introduction to Spectroscopy*. 4th ed. 2009, Washington: Cengage Learning.
97. WARTEWIG, S. & NEUBERT, R.H.H., "Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy". *Adv Drug Deliver Rev.* **57**(8): 1144, 2005.
98. BAULSIR, C.F. & SIMLER, R.J., "Design and evaluation of IR sensors for pharmaceutical testing". *Adv Drug Deliver Rev.* **21**(3): 191, 1996.
99. SMITH, E. & DENT, G., *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. 2005: John Wiley & Sons Ltd. 224.
100. DAS, R.S. & AGRAWAL, Y.K., "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications". *Vib Spectrosc.* **57**(2): 163, 2011.
101. SMEKAL, A., "Zur Quantentheorie der Dispersion". *Naturwissenschaften.* **11**(43): 873, 1923.
102. KRAMERS, H.A. & HEISENBERG, W., "Über die Streuung von Strahlung durch Atome". *Z. Physik.* **31**(1): 681, 1925.
103. CLARK, R.J.H., "Rayleigh, Ramsay, Rutherford and Raman - their connections with, and contributions to, the discovery of the Raman effect". *Analyst.* **138**(3): 729, 2013.
104. RAMAN, C.V. & KRISHNAN, K.S., "A new type of secondary radiation (Reprinted from Nature, vol 121, pg 501-502, 1928)". *Curr Sci India.* **74**(4): 381, 1998.
105. VANKEIRSBILCK, T.; VERCAUTEREN, A.; BAEYENS, W.; VAN DER WEKEN, G.; VERPOORT, F.; VERGOTE, G. & REMON, J.P., "Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis". *Trac-Trend Anal Chem.* **21**(12): 869, 2002.
106. SALA, O., *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. Vol. 2. 2008, São Paulo: UNESP.

-
107. ANGEL, S.M.; CARRABBA, M. & COONEY, T.F., "The utilization of diode lasers for Raman spectroscopy". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **51**(11): 1779, 1995.
108. FERRARO, J.R.; NAKAMOTO, K. & BROWN, C.W., *Introductory Raman Spectroscopy*. 2nd ed. 2003, Boston: Academic Press.
109. GUENARD, R. & THURAU, G., *Implementation of Process Analytical Technologies*, in *Process Analytical Technology*, BAKEEV, K.A., Editor. 2005, Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK.
110. YU, L.X.; LIONBERGER, R.A.; RAW, A.S.; D'COSTA, R.; WU, H.Q. & HUSSAIN, A.S., "Applications of process analytical technology to crystallization processes". *Adv Drug Deliver Rev*. **56**(3): 349, 2004.
111. YANG, H. & RASMUSON, Å.C., "Investigation of Batch Cooling Crystallization in a Liquid-Liquid Separating System by PAT". *Organic Process Research & Development*. **16**(6): 1212, 2012.
112. FRAWLEY, P.J.; MITCHELL, N.A.; O'CIARDHA, C.T. & HUTTON, K.W., "The effects of supersaturation, temperature, agitation and seed surface area on the secondary nucleation of paracetamol in ethanol solutions". *Chem Eng Sci*. **75**: 183, 2012.
113. SAVOLAINEN, M.; KOGERMANN, K.; HEINZ, A.; AALTONEN, J.; PELTONEN, L.; STRACHAN, C. & YLIRUUSI, J., "Better understanding of dissolution behaviour of amorphous drugs by in situ solid-state analysis using Raman spectroscopy". *Eur J Pharm Biopharm*. **71**(1): 71, 2009.
114. STOEBNER, S.E. & MANI, G., "Effect of processing methods on drug release profiles of anti-restenotic self-assembled monolayers". *Appl Surf Sci*. **258**(12): 5061, 2012.
115. BLANCO, M.; BAUTISTA, M. & ALCALA, M., "API Determination by NIR Spectroscopy Across Pharmaceutical Production Process". *Aaps Pharmscitech*. **9**(4): 1130, 2008.

-
116. STEPHENS, J.D.; KOWALCZYK, B.R.; HANCOCK, B.C.; KAUL, G. & CETINKAYA, C., "Ultrasonic real-time in-die monitoring of the tablet compaction process—A proof of concept study". *Int J Pharmaceut.* **442**(1–2): 20, 2013.
117. FDA, *PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*, FDA, Editor. 2004: Washington, DC.
118. RATHORE, A.S.; BHAMBURE, R. & GHARE, V., "Process analytical technology (PAT) for biopharmaceutical products". *Anal Bioanal Chem.* **398**(1): 137, 2010.
119. CHEW, W. & SHARRATT, P., "Trends in process analytical technology". *Anal Methods-Uk.* **2**(10): 1412, 2010.
120. FLATEN, G.R.; FERREIRA, A.P.; BELLAMY, L. & FRAKE, P., "PAT within the QbD Framework: Real-Time End Point Detection for Powder Blends in a Compliant Environment". *J Pharm Innov.* **7**(1): 38, 2012.
121. YU, L.X.; LIONBERGER, R.A.; RAW, A.S.; D'COSTA, R.; WU, H.Q. & HUSSAIN, A.S., "Applications of process analytical technology to crystallization processes". *Adv Drug Deliver Rev.* **56**(3): 349, 2004.
122. POMERANTSEV, A.L. & RODIONOVA, O.Y., "Process analytical technology: a critical view of the chemometricians". *J Chemometr.* **26**(6): 299, 2012.
123. KIM, S.; KANO, M.; NAKAGAWA, H. & HASEBE, S., "Estimation of active pharmaceutical ingredients content using locally weighted partial least squares and statistical wavelength selection". *Int J Pharmaceut.* **421**(2): 269, 2011.
124. SANTOS, A.F.; SILVA, F.M.; LENZI, M.K. & PINTO, J.C., "Monitoring and control of polymerization reactors using NIR spectroscopy". *Polym-Plast Technol.* **44**(1): 1, 2005.
125. POUTIAINEN, S.; MATERO, S.; HAMALAINEN, T.; LESKINEN, J.; KETOLAINEN, J. & JARVINEN, K., "Predicting granule size distribution of a fluidized bed spray granulation process by regime based PLS modeling of acoustic emission data". *Powder Technol.* **228**: 149, 2012.
126. SAERENS, L.; DIERICKX, L.; QUINTEN, T.; ADRIAENSENS, P.; CARLEER, R.; VERVAET, C.; REMON, J.P. & DE BEER, T., "In-line NIR spectroscopy for the

understanding of polymer-drug interaction during pharmaceutical hot-melt extrusion". *Eur J Pharm Biopharm.* **81**(1): 230, 2012.

127. DE BEER, T.R.M.; BAEYENS, W.R.G.; OUYANG, J.; VERVAET, C. & REMON, J.P., "Raman spectroscopy as a process analytical technology tool for the understanding and the quantitative in-line monitoring of the homogenization process of a pharmaceutical suspension". *Analyst.* **131**(10): 1137, 2006.

128. LOPES, J.A.; COSTA, P.F.; ALVES, T.P. & MENEZES, J.C., "Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications". *Chemometr Intell Lab.* **74**(2): 269, 2004.

129. LEE, H.E.; LEE, M.J.; KIM, W.S.; JEONG, M.Y.; CHO, Y.S. & CHOI, G.J., "In-line monitoring and interpretation of an indomethacin anti-solvent crystallization process by near-infrared spectroscopy (NIRS)". *Int J Pharmaceut.* **420**(2): 274, 2011.

130. CARNEIRO, R.L. & POPPI, R.J., "Homogeneity study of ointment dosage forms by infrared imaging spectroscopy". *J Pharmaceut Biomed.* **58**: 42, 2012.

131. PRATS-MONTALBAN, J.M.; JEREZ-ROZO, J.I.; ROMANACH, R.J. & FERRER, A., "MIA and NIR Chemical Imaging for pharmaceutical product characterization". *Chemometr Intell Lab.* **117**: 240, 2012.

132. RICHARDS, S.E.; BECKER, E.; TAULER, R. & WALMSLEY, A.D., "A novel approach to the quantification of industrial mixtures from the Vinyl Acetate Monomer (VAM) process using Near Infrared spectroscopic data and a Quantitative Self Modeling Curve Resolution (SMCR) methodology". *Chemometr Intell Lab.* **94**(1): 9, 2008.

133. TAULER, R.; KOWALSKI, B. & FLEMING, S., "Multivariate Curve Resolution Applied to Spectral Data from Multiple Runs of an Industrial-Process". *Anal Chem.* **65**(15): 2040, 1993.

134. DE BEER, T.R.M.; VERCRUYSSSE, P.; BURGGRAEVE, A.; QUINTEN, T.; OUYANG, J.; ZHANG, X.; VERVAET, C.; REMON, J.P. & BAEYENS, W.R.G., "In-Line and Real-Time Process Monitoring of a Freeze Drying Process Using Raman and NIR Spectroscopy as Complementary Process Analytical Technology (PAT) Tools". *J Pharm Sci-Us.* **98**(9): 3430, 2009.

-
135. TREVISAN, M.G. & POPPI, R.J., "Química Analítica de Processos". *Química Nova*. **29**: 1065, 2006.
136. MARTENS, H. & NAES, T., *Multivariate Calibration*. 1 ed. 2002, New York: John Wiley & Sons. 419.
137. NETO, B.D.B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E., "25 Anos de Quimiometria no Brasil". *Química Nova*. **29**(6): 1401, 2006.
138. OTTO, M., *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. 2 ed. 2007, New York: Wiley-VCH.
139. BEEBE, K.R.; PELL, R.J. & SEASHOLTZ, M.B., *Chemometrics: A Practical Guide*. 1ª ed. 1998, New York: Wiley Interscience Publication.
140. THOMAS, E.V., "A primer on multivariate calibration". *Anal Chem*. **66**(15): 795A, 1994.
141. BRERETON, R.G., *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. 2ª ed. 2003: John Wiley & Sons, Ltd.
142. GOLUB, G.H. & LOAN, C.F.V., *Matrix Computation*. 3rd ed. 1996, New York: Johns Hopkins.
143. JUAN, A.D. & TAULER, R., "Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures. Revisiting latest trends in multivariate resolution". *Anal Chim Acta*. **500**: 195, 2003.
144. MAS, S.; DE JUAN, A.; LACORTE, S. & TAULER, R., "Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach". *Anal Chim Acta*. **618**(1): 18, 2008.
145. WINDIG, W., "Self-Modeling Mixture Analysis of Spectral Data with Continuous Concentration Profiles". *Chemometr Intell Lab*. **16**(1): 1, 1992.
146. WINDIG, W., "Mixture Analysis of Spectral Data by Multivariate Methods". *Chemometr Intell Lab*. **4**(3): 201, 1988.

-
147. TAULER, R., "Multivariate curve resolution applied to second order data". *Chemometr Intell Lab.* **30**(1): 133, 1995.
148. DE JONG, S., "SIMPLS: An alternative approach to partial least squares regression". *Chemometr Intell Lab.* **18**(3): 251, 1993.
149. WOLD, S.; RUHE, A.; WOLD, H. & DUNN, W.J., "The Collinearity Problem in Linear-Regression - the Partial Least-Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses". *Siam J Sci Stat Comp.* **5**(3): 735, 1984.
150. NORGAARD, L.; SAUDLAND, A.; WAGNER, J.; NIELSEN, J.P.; MUNCK, L. & ENGELSEN, S.B., "Interval partial least-squares regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy". *Appl Spectrosc.* **54**(3): 413, 2000.
151. TAULER, R. 2010.
152. CHIENG, N.; RADES, T. & AALTONEN, J., "An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs". *J Pharmaceut Biomed.* **55**(4): 618, 2011.
153. CALIANDRO, R.; DI PROFIO, G. & NICOLOTTI, O., "Multivariate analysis of quaternary carbamazepine–saccharin mixtures by X-ray diffraction and infrared spectroscopy". *J Pharmaceut Biomed.* **78–79**(0): 269, 2013.
154. SOARES, F.L.F. & CARNEIRO, R.L., "Evaluation of analytical tools and multivariate methods for quantification of co-former crystals in ibuprofen-nicotinamide co-crystals". *J Pharmaceut Biomed.* **89**(0): 166, 2014.
155. O'BRIEN, L.E.; TIMMINS, P.; WILLIAMS, A.C. & YORK, P., "Use of in situ FT-Raman spectroscopy to study the kinetics of the transformation of carbamazepine polymorphs". *J Pharmaceut Biomed.* **36**(2): 335, 2004.
156. SOCRATES, G., *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies - Tables and Charts.* 2001, New York: JOHN WILEY & SONS.
157. LARKIN, P., *Infrared and raman spectroscopy: principles and spectral interpretation.* 2011, Oxford: Elsevier.

-
158. ANASTAS, P.T. & WARNER, J., *Green Chemistry: Theory and Practice*. 1998, Oxford: Oxford University Press.