



Márcia Cristina Breitz

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES DE
FÁRMACOS POUCO SOLÚVEIS EM ÁGUA EMPREGANDO
ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM E QUIMIOMETRIA**

CAMPINAS

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MÁRCIA CRISTINA BREITKREITZ

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMULAÇÕES DE
FÁRMACOS POUCO SOLÚVEIS EM ÁGUA EMPREGANDO
ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM E QUIMIOMETRIA**

ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI JESUS POPPI

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR MÁRCIA CRISTINA BREITKREITZ E ORIENTADA PELO PROF. DR. RONEI
JESUS POPPI

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR DANIELLE DANTAS DE SOUSA -
CRB8/6490 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

B748d Breitreitz, Márcia Cristina (1979-).
Desenvolvimento e caracterização de formulações de fármacos pouco solúveis em água empregando espectroscopia de imagem e quimiometria / Márcia Cristina Breitreitz. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Espectroscopia de imagem. 2. Espectroscopia Raman. 3. Espectroscopia no infravermelho próximo. 4. Atorvastatina. 5. Quimiometria. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development and characterization of pharmaceutical formulations of poorly water soluble drugs using image spectroscopy and chemometrics

Palavras-chave em inglês:

Image spectroscopy
Raman spectroscopy
Near-infrared spectroscopy
Atorvastatin
Chemometrics

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ronei Jesus Poppi [Orientador]
Jarbas José Rodrigues Rohwedder
Francisco Benedito Teixeira Pessine
Marco Flôres Ferrão
Marcelo Martins de Sena

Data de defesa: 06/09/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedico esta tese a duas pessoas maravilhosas que tive a felicidade de conviver nesta vida: à minha mãe (Olga Breitzkreitz) e ao André Marcelo de Souza (Dedé), por terem me ensinado muito mais do que eles imaginam.

“Alguém que nunca cometeu erros nunca tratou de fazer algo novo”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

É com grande prazer que agradeço a todos que me acompanharam nesta jornada e de maneiras diferentes a tornaram muito agradável.

Primeiramente ao Prof. Dr. Ronei J. Poppi por ter me recebido prontamente em seu laboratório e ter me dado a liberdade de pesquisa para a elaboração deste projeto; pelo conhecimento compartilhado e orientação, pela compreensão nos momentos difíceis e confiança no meu trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo nº 09/54297-9) que tornou possível esta conquista por meio do apoio financeiro no neste período;

Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, por disponibilizar toda a infraestrutura para a realização deste trabalho e pela oportunidade de contato com o ensino por meio do Programa de Estágio Docente (PED);

Aos colegas de laboratório que ao longo deste período tornaram-se grandes amigos e fizeram esta jornada muito mais divertida: Mariana Ramos, Luciana Terra, Guilherme Sabin, Guilherme Alexandrino, Paulo Filgueiras, Monica Lopez, Luciana Oliveira, Carlos Diego, Thiago Ávila e ao técnico de laboratório Humberto Machado, sempre pronto a ajudar nos mais diversos problemas.

À Prof^a. Dr^a Isabel Cristina S. F. Jardim, pela disponibilização da infraestrutura do laboratório de cromatografia líquida (LabCrom), no qual foram realizados as análises de solubilidade; pela prontidão em ajudar, incentivo e atenção sempre presentes;

À pesquisadora Griselda Polla, que prontamente me auxiliou com a obtenção do fármaco utilizado nesta tese; à doutoranda Mara Rúbia W. Vargas (UFRGN) e às empresas Gattefossé (França) e Abitec (EUA) que gentilmente me forneceram diversos excipientes.

Ao André e à minha mãe, pelo amor, paciência e apoio incondicional não só nestes anos de doutorado, mas durante toda a minha vida. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência e pelo encorajamento para terminar esta jornada.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nacionalidade: brasileira, natural de Osasco-SP

Data nascimento: 25/10/1979

Estado civil: solteira

e-mail: marciacristinab@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Mestrado em Química Analítica/Quimiometria (08/2004 – 07/2007). Instituição de Ensino: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

- Graduação: Bacharelado em Química (03/2000-07/2004). Instituição de Ensino: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Coordenadora de Pré-formulação do P&D Internacional (04/2007 - 10/2009). Empresa: Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas (IIPF)/E.M.S.

- Pesquisadora/Supervisora Projetos (12/2005 – 03/2007). Empresa: Instituto Internacional de Pesquisas Farmacêuticas (IIPF).

ARTIGOS CIENTÍFICOS

1) M. C. Breitreitz, A. M. Souza, R. J. Poppi, Experimento didático de Quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de Ferro com o-fenantrolina. um tutorial, parte III, aceito para publicação em 09/2013.

2) A. M. Souza, M. C. Breitreitz, J. J. R. Rowhedder, R. J. Poppi, Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. Quím. Nova, artigo no prelo.

3) R. P. S. de Campos, I. V. P. Yoshida, M. C. Breitreitz, R. J. Poppi, J. A. F. da Silva, Raman Imaging Spectroscopic characterization of modified poly(dimethylsiloxane) for micro total analysis systems applications, Spectrochim. Acta A 100 (2013) 67-71.

4) M. C. Breitreitz, G. P. Sabin, G. Polla, R. J. Poppi, Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics, J. Pharm. Biomed. Anal. 73 (2013) 3-12.

5) M. C. Breitreitz e R. J. Poppi, Trends in Raman Chemical Imaging, Biomed. Spectrosc. Imaging 2 (2012) 159-183.

6) C. C. Castro e Silva, M. C. Breitreitz, M. Santhiago, C. C. Correa, L. T. Kubota, Construction of a new functional platform by grafting poly (4-vinylpyridine) in multi-walled carbon nanotubes for complexing copper ions aiming the amperometric detection of L-cysteine, Electrochim. Acta 71 (2012) 150-158.

- 7) G. P. Sabin, M. C. Breitzkreitz, A. M. Souza, R. J. Poppi, Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de *spikes* em espectroscopia Raman de Imagem, Quím. Nova 3 (2012) 612-615.
- 8) G. P. Sabin, M. C. Breitzkreitz, A. M. Souza, P. Fonseca, L. Calefe, M. Moffa, R. J. Poppi, Analysis of pharmaceutical pellets: an approach using near-infrared chemical imaging, Anal. Chim. Acta 706 (2011) 113-119.
- 9) M. C. Breitzkreitz, I. C. S. F. Jardim, R. E. Bruns, Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high performance liquid chromatography analysis of multicomponent, J. Chromatogr. A. 1216 (2009) 1439-1449.
- 10) C. N. Borges, M. C. Breitzkreitz, R. E. Bruns, L. M. C. Silva, I. S. Scarminio, Unreplicated split-plot mixture designs and statistical models for optimizing mobile chromatographic phase and extraction solutions for fingerprint searches, Chem. Intell. Lab. Systems 89 (2007) 82-89.
- 11) S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, E. G. P. Silva, W. N. L. Santos, C. M. Quintella, J. M. David, M. C. Breitzkreitz, I. C. S. F. Jardim, B. B. Neto, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 2 - 14.
- 12) M. C. Breitzkreitz, I. M. Raimundo Jr., J. J. R. Rohwedder, C. Pasquini, H. A. Dantas Filho, G. E. José, M. C. U. Araújo, Determination of total sulphur in diesel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration, Analyst 128 (2003) 1204-1207.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS: 14 (período: 2003 – 2013)

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS NACIONAIS: 12 (período: 2002 – 2012)

MONITORIA DENTRO DO PROGRAMA DE ESTÁGIO DOCENTE (PED)

- 1) QA 213 - Química Analítica para Engenharia de Alimentos (PED C, 2005);
- 2) QA 416 - Química Analítica IV, (PED C, 2010);
- 3) QA 416 - Química Analítica IV (PED B, 2011);
- 4) QA 316 - Química Analítica III (PED B, 2012).

CURSOS MINISTRADOS E PALESTRAS CONVIDADAS

- 1) Palestra: Espectroscopia NIR na Indústria Farmacêutica: aplicações em P&D, I Encontro de usuários NIR – Pensalab/Buchi, 2008.
- 2) Palestra: Espectroscopia NIR na Indústria Farmacêutica: aplicações no controle de qualidade e monitoramento de processos, II Workshop em Espectroscopia no Infravermelho próximo, 2007.
- 3) Curso: Planejamento e Otimização Experimental - teoria e prática, ministrado para o P&D da empresa E.M.S, 2006, carga horária 8h/turma.
- 4) Curso: Planejamento Experimental: teoria e prática, ministrado no Conselho Regional de Química CRQ –IV, SP, 2008, carga horária de 16h

RESUMO

Título: Desenvolvimento e caracterização de formulações de fármacos pouco solúveis em água empregando espectroscopia de imagem e Quimiometria.

Autora: Márcia Cristina Breitreitz

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Este trabalho teve como objetivo demonstrar como a espectroscopia NIR e Raman de imagem, juntamente com diversos métodos quimiométricos podem auxiliar a tomada de decisões durante o desenvolvimento farmacêutico de formulações de fármacos pouco solúveis em água, tendo como modelo a atorvastatina cálcica. Foram avaliados dois excipientes inovadores, o Gelucire[®] 44/14 e o Soluplus[®] que serviram de base para o desenvolvimento das formulações. O Gelucire[®] 44/14 foi utilizado para o preparo de dispersões sólidas pelos métodos da fusão e da evaporação do solvente e formulações do tipo SEDDS (*Self-Emulsifying drug Delivery Systems*), enquanto o Soluplus[®] foi utilizado para o preparo de dispersões sólidas pelo método da evaporação do solvente. Nas dispersões preparadas pelo método da fusão foram observados aglomerados do fármaco, enquanto o método de evaporação do solvente apresentou melhor homogeneidade na distribuição dos componentes, porém a amostra se apresentou enrijecida após a secagem. Com as formulações SEDDS foi possível contornar estes problemas. Foram obtidas dispersões sólidas homogêneas de atorvastatina em Soluplus[®] utilizando etanol como solvente e lactose como diluente. As imagens foram geradas por calibração univariada, análise de componentes principais (PCA), regressão em mínimos quadrados clássicos (CLS) e regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) e os resultados foram comparados. O método CLS foi estudado com mais detalhes devido às suas vantagens para utilização na pesquisa farmacêutica. Os principais fatores que levaram à problemas de exatidão com este método foram identificados e procedimentos para contorná-los foram apresentados e discutidos.

ABSTRACT

Title: Development and characterization of pharmaceutical formulations of poorly water soluble drugs using image spectroscopy and chemometrics

Author: Márcia Cristina Breitzkreitz

Advisor: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

The aim of this work was to demonstrate how NIR and Raman image spectroscopy associated with different chemometric methods can support decision making during pharmaceutical development of formulations of low water soluble drugs, using atorvastatin calcium as a model drug. Two innovative excipients were used, Gelucire[®] 44/14 and Soluplus[®]. The former was used to prepare solid dispersions by both hot melt and solvent evaporation methods and to formulate Self Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS). The latter was used to prepare solid dispersions by the solvent evaporation method.

In solid dispersions prepared by the hot melt method it was observed lumps of the drug, whereas the solvent evaporation method presented more homogeneous distribution of the components, even though the sample became stiffened after drying. By preparing SEDDS formulations, it was possible to overcome these problems. A homogeneous solid dispersion of atorvastatin in Soluplus[®] was achieved by using ethanol as solvent and lactose as diluent. Chemical images were generated by univariate calibration, principal component analysis (PCA), classical least squares (CLS) and partial least squares (PLS). The capability of these methods to generate chemical images were compared. CLS method was studied more carefully due to its advantages for pharmaceutical research use. The main features that lead to accuracy issues were identified both in Raman and in NIR spectroscopy and procedures to overcome them were presented and discussed.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xxv
PREFÁCIO	1
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	5
1. A solubilidade de fármacos e o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB)	7
2. Excipientes inovadores: Gelucire [®] 44/14 e Soluplus [®]	10
2.1. Características físico-químicas	10
2.2. Formulações	13
3. A atorvastatina	15
4. Polimorfismo farmacêutico	17
5. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)	19
6. Espectroscopia Raman	21
7. Espectroscopia de imagem	24
7.1. Métodos para geração das imagens	28
7.1.1. Regressão em Mínimos Quadrados Clássicos	29
7.1.2. Resolução Multivariada de Curvas	31
7.1.3. Análise de Componentes Principais	34
7.1.4. Regressão em Mínimos Quadrados Parciais	36
7.2. Espectroscopia Raman de imagem: instrumentação e aplicações	39
7.3. Espectroscopia NIR de imagem: Instrumentação e aplicações	43
7.4. Breve comparação entre a espectroscopia vibracional de imagem Raman e NIR45	
8. Objetivo	46
CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS	47
1. Procedimento Experimental	49

1.1. Materiais	49
1.1. Técnicas analíticas utilizadas para caracterização	49
1.1.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	49
1.1.2. Termogravimetria (TGA)	50
1.1.3. Difração de Raios-X (DRX)	50
1.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	50
1.1.5. Espectroscopia NIR	51
1.1.6. Espectroscopia Raman	51
2. Resultados	52
2.1. Caracterização do fármaco	52
2.2. Caracterização dos excipientes	59
3. Conclusões	61
CAPÍTULO 3: DISPERSÕES SÓLIDAS DE ATORVASTATINA EM GELUCIRE® 44/14 PREPARADAS PELO MÉTODO DA FUSÃO	63
1. Procedimento Experimental	64
1.1. Preparo das amostras	64
1.2. Obtenção das imagens químicas	65
1.3. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados	65
1.4. Teste de solubilidade	66
2. Resultados e Discussão	67
2.1. Geração de imagens empregando o método univariado	67
2.2. Geração de imagens empregando CLS e PLS	73
2.3. Geração de imagens empregando PCA	81
2.4. Solubilidade em água	84
3. Conclusões	84

CAPÍTULO 4: DISPERSÕES SÓLIDAS DE ATORVASTATINA EM GELUCIRE® 44/14 PREPARADAS PELO MÉTODO DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE	87
1. Procedimento Experimental	89
1.1. Preparo das amostras	89
1.1. Obtenção das imagens	90
1.2. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados	90
1.3. Teste de solubilidade	91
2. Resultados e Discussão	91
2.1. Espectroscopia Raman de imagem	92
2.2. Solubilidade em água	96
3. Conclusões	97
CAPÍTULO 5: SELF-EMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEMS (SEDDS) CONTENDO ATORVASTATINA E GELUCIRE® 44/14	99
1. Procedimento Experimental	101
1.1. Preparo das amostras	101
1.1. Obtenção das imagens	103
1.2. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados	104
1.3. Teste de solubilidade	104
1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	104
2. Resultados e Discussão	104
2.1. Etapa 1: Triagem dos solventes	104
2.2. Etapa 2: Desenvolvimento da formulação SEDDS empregando Capmul® MCM	116
2.3. Solubilidade em água	120
3. Conclusões	120

CAPÍTULO 6: DISPERSÕES SÓLIDAS DE ATORVASTATINA EM SOLUPLUS®	123
1. Procedimento Experimental.....	125
1.1. Preparo das amostras.....	125
1.1.1. Etapa 1: Estudo Inicial de triagem em etanol, água e mistura física....	125
1.1.2. Etapa 2: Estudo das dispersões em etanol variando a concentração de atorvastatina.....	126
1.1.3. Etapa 3: Seleção do diluente	127
1.2. Obtenção das imagens	127
1.3. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados	128
1.4. Teste de solubilidade	128
2. Resultados e Discussão.....	129
2.1. Etapa 1: Triagem dos solventes.....	129
2.2. Etapa 2: Estudo de concentração da atorvastatina na dispersão preparada em etanol.....	133
2.2.1. Avaliação das amostras em meio aquoso	136
2.3. Etapa 3: Seleção de um diluente	136
2.3.1. Espectroscopia NIR de imagem	137
2.3.2. Espectroscopia Raman de imagem	150
2.4. Solubilidade em água	153
2.5. Considerações sobre o uso do MCR	154
3. Conclusões	155
CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES GERAIS	157
CAPÍTULO 8: TRABALHOS FUTUROS	163
REFERÊNCIAS	167

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Definição de solubilidade de acordo com a Farmacopéia Americana (<i>United States Pharmacopoeia, USP</i>).....	8
Tabela II: O Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB)	9
Tabela III: Valores de $2-\theta$ para os principais picos observados experimentalmente para a atorvastatina cálcica e correspondentes valores encontrados na literatura.	54
Tabela IV: Regiões de frequências observadas no espectro Raman das duas formas da atorvastatina e a correspondente atribuição.....	57
Tabela V: Concentração dos constituintes nas dispersões sólidas de atorvastatina em Gelucire [®] 44/14 preparadas pelo método da fusão.	65
Tabela VI: Concentração das formas amorfa e cristalina nas amostras utilizadas para calibração por PLS para previsão das concentrações na dispersão sólida preparada pelo método do solvente.	90
Tabela VII: Concentração atorvastatina + Capmul [®] MCM e Gelucire [®] 44/14 nas amostras preparadas para a construção do modelo PLS, visando avaliar a homogeneidade da formulação SEDDS 04.....	102
Tabela VIII: Concentração dos constituintes nas amostras preparadas para estudos em meio aquoso.	103
Tabela IX: Concentração dos constituintes nas amostras preparadas para a construção de novo modelo PLS para avaliar homogeneidade da formulação contendo as novas proporções de Capmul [®] MCM e Gelucire [®] 44/14, determinadas após estudo de solubilidade em água.	103
Tabela X: Estruturas químicas dos solventes utilizados no preparo das formulações SEDDS.	105
Tabela XI: Resumo dos resultados obtidos pelo método CLS para as formulações SEDDS 01-04.....	114
Tabela XII: Resultados da avaliação visual das amostras contendo diferentes proporções de Capmul [®] MCM e Gelucire [®] 441/14 após solubilização em água.	118

Tabela XIII: Concentração de atorvastatina e Soluplus [®] nas dispersões sólidas preparadas em etanol na Etapa 2	126
Tabela XIV: Concentração de atorvastatina + Soluplus [®] e dos polímeros nas amostras preparadas para correção dos valores previstos por CLS.....	127
Tabela XV: Resultados da quantificação do fármaco solubilizado em meio aquoso por CLAE nas dispersões sólidas preparadas com diferentes polímeros	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto físico do Gelucire 44/14 com aquecimento e resfriamento.....	10
Figura 2: (A) Aspecto físico do Soluplus® e estrutura do monômero da cadeia polimérica e (B) ilustração do processo de dobramento das cadeias hidrofílicas em meio aquoso formando as micelas contendo o fármaco, representado ao centro.	12
Figura 3: Estrutura química da atorvastatina cálcica.....	15
Figura 4: Diagrama de energia para os osciladores harmônico (A) e anarmônico (B) indicando as transições possíveis para cada um.	20
Figura 5: (A): Ilustração do processo de incidência de fótons do laser sobre uma amostra e o espalhamento resultante e (B): diagrama de energia mostrando os estados envolvidos nos processos de excitação e espalhamento. A seta vertical para cima indica o fóton incidente e a seta vertical para baixo indica o fóton espalhado.....	21
Figura 6: Ilustração do processo de fluorescência e espalhamento Raman indicando os estados eletrônicos e vibracionais envolvidos.....	24
Figura 7: Cubo de dados gerado em espectroscopia de imagem ou hipercubo espectral.....	25
Figura 8: Procedimentos para a aquisição do hipercubo espectral: A) <i>point-mapping</i> e a geração de um único espectro; B) <i>line-mapping</i> e a geração de uma linha de espectros e C) <i>imaging</i> e a geração de uma imagem baseada na intensidade em um único comprimento de onda.	27
Figura 9: Esquema geral para a geração de imagens químicas utilizando métodos quimiométricos.	28
Figura 10: Ilustração do processo de formação da matriz aumentada a partir de vários cubos de dados.	34
Figura 11: Esquema ilustrativo de um equipamento Raman dispersivo acoplado a um microscópio. Adaptado da referência 38.	41
Figura 12: Esquema de um espectrofotômetro de imagem para a região do infravermelho próximo e médio. Adaptado da referência 77.	44

Figura 13: Equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging System da Perkin-Elmer. 1) compartimento da ótica do microscópio; 2) posicionador de amostra; 3) espectrofotômetro NIR.	51
Figura 14: (A) Visão geral do equipamento Raman Station 400; (B) detalhe da câmara e cela de alumínio utilizada nas medidas.	52
Figura 15: Caracterização térmica da atorvastatina cálcica adquirida comercialmente: (A) curva de DSC, (B) curva de TGA na faixa de temperatura de 30-200 °C e (C) ampliação da curva de TGA na faixa de temperatura de 30-500°C.	53
Figura 16: Difratograma de Raios-X da atorvastatina adquirida comercialmente..	54
Figura 17: Caracterização térmica da atorvastatina cálcica amorfa preparada em laboratório: (A) curva de DSC, (B) curva de TGA na faixa de temperaturas de 30-200 °C e (C) ampliação da curva de TGA na faixa de temperatura de 30-500°C.	55
Figura 18: Difratograma de Raios-X da atorvastatina amorfa preparada em laboratório.	56
Figura 19: Comparação dos espectros Raman das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina. <i>Inset</i> : destaque para a região entre 1700 – 1600 cm ⁻¹	56
Figura 20: Comparação dos espectros NIR das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina. <i>Inset</i> : destaque para a região entre 5400 – 4600 cm ⁻¹	58
Figura 21: Cromatogramas da análise da atorvastatina matéria-prima: (A) pico do fármaco e (B) ampliação da linha de base para mostrar as impurezas.....	59
Figura 22: Resultados da caracterização do Gelucire [®] 44/14: (A) curva de DSC, (B) Difratograma de raios-X e (C) curva de TGA na faixa de temperatura de 30-500°C.	60
Figura 23: Resultados da caracterização do Soluplus [®] : (A) curva de DSC e (B) Difratograma de raios-X.	60
Figura 24: Agitador de frascos Dubnoff com movimento recíproco e banho-maria com ajuste de temperatura. (A) visão geral do equipamento, com tampa para manter a temperatura constante e (B) parte interna do equipamento, onde as amostras são colocadas para agitação.	67

Figura 25: Espectros Raman das duas formas polimórficas da atorvastatina, juntamente com o espectro do Gelucire [®] 44/14 após normalização.	68
Figura 26: Espectros Raman médio das dez dispersões sólidas. <i>Inset</i> : Destaque para a região de 1640 – 1740 cm ⁻¹	69
Figura 27: (A) Curva analítica univariada para a quantificação da atorvastatina cristalina e (B) região espectral contendo o número de onda utilizado (1600 cm ⁻¹); (B) Curva analítica univariada para a quantificação do Gelucire [®] 44/14 e (D) região espectral contendo o número de onda utilizado (1280 cm ⁻¹).....	70
Figura 28: Imagens dos componentes da amostra 4 baseadas na quantificação univariada.....	71
Figura 29: Imagens dos componentes da amostra 5 baseadas na quantificação univariada.....	72
Figura 30: Comparação do espectro médio de uma amostra com o espectro calculado matematicamente com base nas concentrações dos componentes e seus espectros puros.	74
Figura 31: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina (A) e para o Gelucire [®] 44/14 (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.	76
Figura 32: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas pelos métodos CLS após correção e PLS para a atorvastatina (A) e Gelucire [®] 44/14 (B).	77
Figura 33: Imagens dos componentes da amostra 4 baseadas na quantificação multivariada empregando CLS (A) e PLS (B).....	78
Figura 34: Imagens dos componentes da amostra 5 baseadas na quantificação multivariada empregando CLS (A) e PLS (B).....	80
Figura 35: Mapas de <i>scores</i> para a amostra 4 nas duas primeiras componentes principais.	81
Figura 36: <i>Loadings</i> na primeira (A) e segunda (B) componentes principais vs espectros da atorvastatina e Gelucire [®] 44/14.	82

Figura 37: Espectro médio da dispersão sólida preparada pelo método do solvente contendo 25 % de atorvastatina. <i>Inset</i> : Destaque para a região entre 1710-1580 cm^{-1} .	92
Figura 38: Misturas físicas das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina e Gelucire® 44/14. <i>Inset</i> : destaque para a região de 1630-1720 cm^{-1} .	93
Figura 39: Gráfico de <i>scores</i> do PLS nas duas primeiras variáveis latentes, com as amostras de calibração (misturas físicas 1 - 10) e previsão (espectros da dispersão sólida nos pixels).	94
Figura 40: Imagens da forma amorfa e cristalina da atorvastatina na dispersão sólida preparada pelo método do solvente baseadas na quantificação empregando PLS e imagem da soma das duas formas polimórficas.	95
Figura 41: Aspecto da amostra SEDDS 01 com aquecimento (A) e após o resfriamento (B e C).	106
Figura 42: Espectros Raman dos solventes Transcutol®, propilenoglicol, Capryol® 90 e Capmul® MCM. <i>Inset</i> : Destaque para a região de 1750 – 700 cm^{-1} .	107
Figura 43: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 01 baseadas na quantificação empregando CLS.	107
Figura 44: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 01 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em Transcutol® como um único componente da mistura.	108
Figura 45: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 02 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em propilenoglicol como um único componente da mistura.	109
Figura 46: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 03 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em Capryol® 90 como um único componente da mistura.	110
Figura 47: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 04 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em Capmul® MCM como um único componente da mistura.	111
Figura 48: Comparação dos espectros dos componentes puros na dispersão sólida preparada pelo método da fusão (A) e formulação SEDDS 03 (B).	112

Figura 49: Comparação do espectro médio da formulação SEDDS 03 com o espectro calculado matematicamente com base nas concentrações dos componentes e seus espectros puros.....	113
Figura 50: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações SEDDS01-SEDDS04.	115
Figura 51: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações previstas pelo método PLS para a atorvastatina solubilizada em Capmul [®] MCM (A) e Gelucire [®] 44/14 (B).	116
Figura 52: Imagens dos componentes da formulação SEDDS04 baseadas na quantificação empregando PLS.	117
Figura 53: Imagens dos componentes da formulação SEDDS04 com as novas proporções, determinadas após estudo em água.	119
Figura 54: Espectros NIR (A) e Raman (B) do Soluplus [®]	129
Figura 55: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na mistura física preparada na etapa inicial de triagem.	130
Figura 56: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na dispersão preparada em água na etapa inicial de triagem.....	131
Figura 57: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na dispersão preparada em etanol na etapa inicial de triagem.....	132
Figura 58: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na amostra 1.....	134
Figura 59: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na amostra 2.....	134
Figura 60: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na amostra 4.....	135
Figura 61: Imagens da atorvastatina e do Soluplus [®] na amostra 5.....	135
Figura 62: Imagens da atorvastatina, do Soluplus [®] e do amido considerando os três componentes de forma separada.....	137
Figura 63: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e do amido (adicionado na fase interna), geradas por CLS sem correção.	138
Figura 64: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e do amido (adicionado na fase externa), geradas por CLS sem correção.	139

Figura 65: Comparação dos espectros calculados matematicamente com os espectros médios das dispersões de amido em fase interna (A) e fase externa (B).	139
Figura 66: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina + Soluplus [®] (A) e para o amido (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.	144
Figura 67: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina + Soluplus [®] (A) e para a celulose (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.	144
Figura 68: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina + Soluplus [®] (A) e para a lactose (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.	144
Figura 69: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e do amido, adicionado na fase interna, geradas por CLS após correção.....	145
Figura 70: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e do amido, adicionado na fase externa, geradas por CLS após correção.....	146
Figura 71: Comparação de espectros dos componentes puros estimados com base na equação 2 e aqueles obtidos experimentalmente.	147
Figura 72: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e do amido, adicionado na fase interna, geradas empregando os espectros puros estimados com base na equação 2.	148
Figura 73: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e da celulose, adicionada na fase interna, geradas por CLS após correção.....	148
Figura 74: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e da celulose, adicionada na fase externa, geradas por CLS após correção.....	149
Figura 75: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e da lactose, adicionada na fase interna, geradas por CLS após correção.....	149
Figura 76: Imagens da atorvastatina + Soluplus [®] e da lactose, adicionada na fase externa, geradas por CLS após correção.....	150

Figura 77: Espectros Raman dos componentes puros das dispersões: atorvastatina + Soluplus® e amido (A), atorvastatina + Soluplus® e celulose (B) e atorvastatina + Soluplus® e lactose (C)..... 151

Figura 78: Valores de desvio padrão dos histogramas de distribuição das concentrações dos polímeros nas diferentes dispersões obtidos por espectroscopia NIR e Raman..... 152

PREFÁCIO

O setor de pesquisa e desenvolvimento de uma empresa farmacêutica necessita de uma grande diversidade de técnicas analíticas trabalhando em conjunto para reunir o máximo de informações possível sobre o fármaco, os excipientes e as formulações “piloto”, ou seja, as formulações que estão sendo desenvolvidas, até que se chegue a uma formulação final com segurança. A distribuição dos compostos em uma formulação sempre foi uma questão importante no desenvolvimento farmacêutico e controle de qualidade dos medicamentos, uma vez que a heterogeneidade pode estar relacionada a diversos problemas de qualidade no produto, incluindo dissolução baixa e variável. A homogeneidade é especialmente importante para formulações de fármacos pouco solúveis em água uma vez que a solubilização depende, na realidade, dos excipientes utilizados. Assim, formulações que apresentem aglomerados do fármaco podem apresentar precipitação quando colocadas em meio aquoso. O surgimento de formulações lipídicas empregando excipientes semi-sólidos, como por exemplo os compostos da família dos Gelucires[®], tornou ainda mais crítica a questão da homogeneidade, uma vez que, microheterogeneidades podem gerar, a longo prazo, a separação de fases dentro da matriz semi-sólida. Técnicas como microscopia ótica ou microscopia eletrônica de varredura (MEV) não fornecem informações sobre a distribuição dos constituintes na amostra. Para algumas amostras, a análise de MEV não pode ser realizada devido ao alto vácuo utilizado no equipamento, que pode danificar sua estrutura. Assim, a espectroscopia vibracional de imagem pode ser especialmente útil, ajudando na tomada de decisões sobre diversas questões durante o desenvolvimento farmacêutico, como por exemplo, qual (ais) solvente (s), qual processo, qual (ais) excipiente (s) devem ser utilizados de modo a obter uma formulação homogênea, sem aglomerados ou separação de fases.

A motivação desta tese foi demonstrar como a espectroscopia vibracional de imagem NIR e Raman podem fornecer informações importantes para o desenvolvimento de um produto, tomando como modelo o fármaco pouco solúvel em água atorvastatina cálcica e os excipientes inovadores Gelucire[®] 44/14 e Soluplus[®]. Até o momento, a espectroscopia de imagem com excipientes semi-

sólidos da família dos Gelucires[®] não foi descrita na literatura e, como o uso destes excipientes tende a crescer no desenvolvimento farmacêutico, esta técnica pode ser de grande valia para a avaliação das formulações desenvolvidas no futuro.

Esta tese está dividida da seguinte maneira: o Capítulo 1 apresenta uma introdução teórica sobre os principais assuntos que serão abordados na tese; o Capítulo 2 apresenta a caracterização das matérias primas utilizadas, tanto do fármaco quanto dos excipientes. Nos Capítulos 3 - 6 são mostrados os resultados da pesquisa, sendo cada capítulo descrito de forma independente, com procedimento experimental e conclusões próprias. No capítulo 3 são apresentados resultados do estudo do método da fusão para o preparo de dispersões sólidas de atorvastatina em Gelucire[®] 44/14. Neste capítulo foram comparados vários métodos para a geração das imagens: calibração univariada, análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA), regressão em mínimos quadrados clássicos (*Classical Least Squares*, CLS) e regressão em mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares*, PLS). No Capítulo 4 são mostrados os resultados empregando o método de evaporação do solvente para o preparo de dispersões sólidas com Gelucire[®] 44/14, sendo as imagens geradas por PLS. No Capítulo 5 são descritos os resultados do desenvolvimento de formulações do tipo SEDDS (*Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*) de atorvastatina em Gelucire[®] 44/14 utilizando diferentes solventes e tratamento de dados por CLS e PLS. Os resultados mostrados nos capítulos 3 a 5 foram obtidos empregando espectroscopia Raman de imagem. O Capítulo 6 apresenta os resultados dos estudos para o desenvolvimento de dispersões sólidas empregando Soluplus[®] e espectroscopia NIR de imagem, sendo os estudos planejados de forma sequencial: seleção do solvente, concentração do fármaco na dispersão e, por fim, seleção de um diluente para a formulação.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. A solubilidade de fármacos e o Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB)

O efeito terapêutico de um fármaco depende da concentração do mesmo no local de ação. Para fármacos administrados por via oral (rota gastro-intestinal), em qualquer forma farmacêutica (comprimidos, cápsulas, soluções etc), a absorção pela circulação sistêmica é um pré-requisito para ele atingir o local de ação. Após a administração oral, muitos fatores determinam a biodisponibilidade (fração do fármaco que atinge a circulação sistêmica). Considerando que somente fármacos solubilizados podem penetrar na membrana intestinal, a solubilidade em água é um destes fatores.

De acordo com a agência regulatória americana de medicamentos e alimentos, o FDA (*Food and Drug Administration*), um fármaco é considerado altamente solúvel se sua maior dosagem for solúvel em 250 mL do meio aquoso com pH na faixa de 1 – 7,5. O volume de 250 mL foi determinado com base em protocolos típicos de estudos de bioequivalência que prescrevem a administração do produto a voluntários com um copo de água¹.

A Farmacopéia Americana (*USP, United States Pharmacopoeia*)² define sete faixas de solubilidade para fármacos que variam desde muito solúveis até praticamente insolúveis. A solubilidade atribuída aos fármacos dentro de cada faixa normalmente é o limite inferior da faixa, por se tratar de uma estimativa mais conservadora. Esta classificação é mostrada na Tabela I. Kasin e co-autores utilizaram esta classificação para atribuir a solubilidade de fármacos indicados como essenciais pela Organização Mundial da Saúde e fármacos contidos nos 200 medicamentos mais vendidos nos Estados Unidos³, dentre eles a atorvastatina cálcica.

Tabela I: Definição de solubilidade de acordo com a Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopoeia, USP*).

Definição	Partes de solvente necessárias para 1 parte do soluto	Faixa de solubilidade (mg/mL)	Solubilidade atribuída (mg/mL)
Muito solúvel (<i>very soluble, vs</i>)	< 1	≥ 1000	1000
Livremente solúvel (<i>freely soluble, fs</i>)	1-10	100-1000	100
Solúveis (<i>soluble, s</i>)	10-30	33-100	33
Moderadamente solúvel (<i>sparingly soluble, sps</i>)	30-100	10-33	10
Levemente solúvel (<i>slightly soluble, ss</i>)	100-1000	1-10	1
Muito pouco solúvel (<i>very slightly soluble, vss</i>)	1000-10000	0,1 - 1	0,1
Praticamente insolúvel (<i>practically insoluble, pi</i>)	≥ 10000	< 0.1	0,01

A solubilidade do fármaco em meio aquoso e a permeabilidade nas células formam a base do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB), proposto por Amidon e colaboradores⁴ e atualmente é aceito e utilizado pelo FDA¹. De acordo com o SCB, os fármacos são agrupados em quatro classes, mostradas na Tabela II.

Fármacos da Classe I são altamente solúveis em água e são rapidamente transportadas através da membrana intestinal e, desta maneira, não são necessárias estratégias no desenvolvimento farmacêutico para aumentar sua solubilidade. A absorção de fármacos da Classe II é limitada pela sua baixa solubilidade em água e não apresentam problemas de permeabilidade. Desta maneira, para fármacos desta classe, um aumento de solubilidade *in-vitro* corresponde a um aumento de solubilidade e biodisponibilidade *in-vivo*⁵. Para

fármacos da Classe III, a permeabilidade é o fator limitante e para fármacos da classe IV tanto a solubilidade quanto a permeabilidade devem ser aumentados para se obter adequada biodisponibilidade. Dentre os fármacos da classe IV, poucos chegam a se tornar produtos comerciais devido às limitações tanto de solubilidade quanto de permeabilidade.

Tabela II: O Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB)

Classe	Solubilidade em água	Permeação na membrana intestinal
I	Alta	Alta
II	Baixa	Alta
III	Alta	Baixa
IV	Baixa	Baixa

Com os recentes avanços em métodos de triagem molecular (*High Throughput Screening*), a descoberta de novas moléculas com atividade farmacológica vem aumentando dramaticamente. Entretanto, tem-se verificado que tais moléculas apresentam cada vez mais caráter lipofílico (e conseqüentemente, baixa solubilidade em água) sendo, portanto, classificados como pertencentes às Classes II e IV do SCB. De fato, estima-se que de 40 a 70 % de novas moléculas com atividade farmacológica não possuem adequada solubilidade em água para garantir absorção gastrointestinal em uma magnitude suficiente para garantir a eficácia terapêutica⁶. Diversas estratégias podem ser empregadas para aumentar a solubilidade de fármacos pertencentes à Classe II, enquanto aqueles pertencentes à Classe IV normalmente retornam aos programas para a otimização em nível molecular.

As estratégias existentes para aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água envolvem modificações físicas ou químicas com o intuito de alcançar a supersaturação no trato gastrointestinal. Se um fármaco da Classe II puder ser mantido no estado solubilizado no trato gastrointestinal, a absorção tende a ser similar à de um fármaco da Classe I. Dentre as modificações químicas, pode-se citar a utilização de um sal do composto ou a incorporação de grupos

polares ou ionizáveis na estrutura do fármaco (formação de um pró-fármaco). Dentre as modificações físicas, pode-se citar a diminuição do tamanho de partícula (aumentando a área superficial disponível para a solubilização); utilização de uma forma polimórfica mais solúvel, como por exemplo, a forma amorfa de muitos fármacos e as estratégias de formulação: dispersões sólidas, complexação, sistemas auto-emulsificantes, nanotecnologia, dentre outras⁷. Além disto, atualmente excipientes especialmente voltados para o problema da baixa solubilidade de fármacos estão sendo lançados, sendo dois deles estudados neste trabalho: o Gelucire[®] 44/14 e o Soluplus[®], os quais serão discutidos a seguir.

2. Excipientes inovadores: Gelucire[®] 44/14 e Soluplus[®]

2.1. Características físico-químicas

O Gelucire[®] 44/14 (Gattefossé, França) é um membro da família dos Gelucires[®], formado quimicamente por misturas de mono-, di- e triglicerídeos e mono- e di-ésteres de polietilenoglicol (PEG), além de PEG livre. Em meio aquoso eles formam emulsões contendo o fármaco solubilizado, levando a um aumento da solubilidade *in-vitro* e biodisponibilidade *in-vivo*⁸. Os Gelucires[®] são identificados em relação a seu ponto de fusão e Balanço Hidrofílico Lipofílico (HLB), uma escala que vai desde 1 (totalmente lipofílico) até 20 (totalmente hidrofílico). O Gelucire[®] 44/14 apresenta um ponto de fusão de 44 °C e HLB 14. Seu aspecto físico é semi-sólido e deve ser aquecido para a utilização em formulações, conforme mostrado na Figura 1.

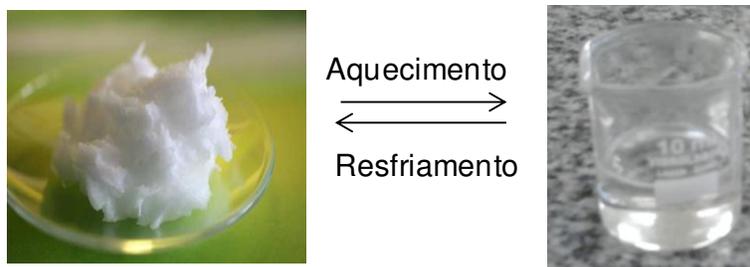


Figura 1: Aspecto físico do Gelucire 44/14 com aquecimento e resfriamento.

De acordo com o fabricante⁸, o Gelucire[®] 44/14 apresenta a seguinte composição química:

- 72 % de mono e di- ésteres de PEG 1500: atuam principalmente como surfactantes, formando micelas em meio aquoso;
- 20 % de mono, di e triglicerídeos: podem atuar como solventes do fármaco na formulação e ajudam a agregação das micelas;
- 8% de PEG 1500 livre: pode atuar como solvente do fármaco.

Por se tratar de uma mistura de compostos com diversas funções, este excipiente pode ser utilizado sozinho ou em conjunto com outros na formulação, sendo as formulações resultantes chamadas, de uma maneira geral, de formulações lipídicas, as quais podem englobar dispersões sólidas auto-emulsificantes e sistemas SEDDS (*Self Emulsifying Drug Delivery Systems*).

Em 2010 foi lançado pela empresa BASF um polímero denominado Soluplus[®], que é um surfactante co-polimérico adequado para o preparo de dispersões sólidas e que aumenta a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, também através da formação de micelas em meio aquoso. O Soluplus[®] apresenta cadeia principal hidrofílica (polietilenoglicol) e cadeias laterais lipofílicas (polivinil caprolactama e polivinil acetato) e é considerado como pertencente à quarta geração de materiais para o preparo de dispersões sólidas⁹. Soluplus[®] tem o aspecto de pequenos grânulos sólidos que podem ser facilmente triturados em almofariz. O aspecto físico e a estrutura química do Soluplus[®] são mostrados na Figura 2A e a micela formada após a dispersão em água é mostrada na Figura 2B. Nesta Figura, é possível verificar que a região interna da micela pode carregar o fármaco lipofílico devido à sua afinidade com as cadeias laterais do polímero, isolando-o do meio aquoso e evitando, assim, sua precipitação neste meio.

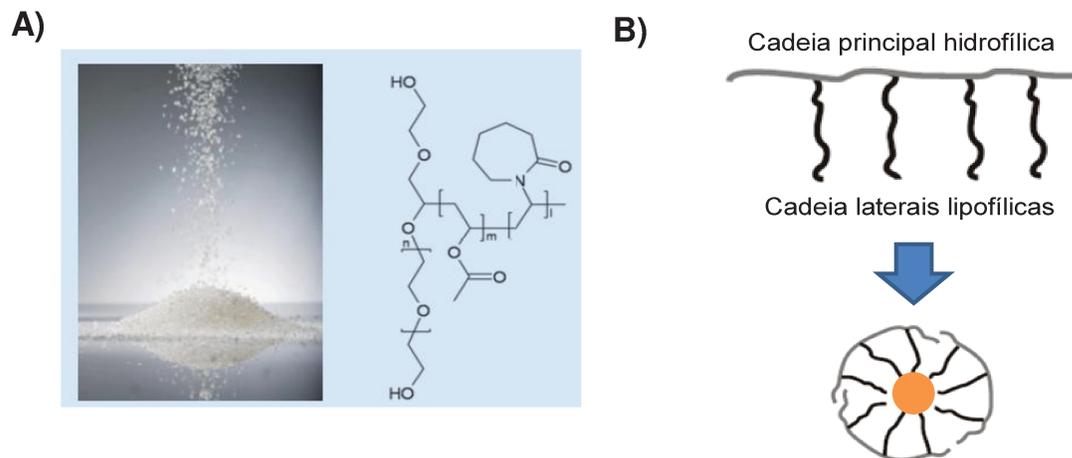


Figura 2: (A) Aspecto físico do Soluplus® e estrutura do monômero da cadeia polimérica e (B) ilustração do processo de dobramento das cadeias hidrofílicas em meio aquoso formando as micelas contendo o fármaco, representado ao centro.

Para fármacos pouco solúveis, sabe-se que a absorção pode ser aumentada pela presença de alimentos devido à presença de lipídios que podem atuar como solventes e também devido à maior concentração de sais biliares que são emulsificantes e permitem a formação micelas contendo o fármaco solubilizado⁶. Entretanto, para que se tenha um efeito farmacológico constante, é necessário que a absorção seja independente da alimentação do paciente. Formulações contendo Gelucire® 44/14 e Soluplus® têm a capacidade de normalizar a absorção, tornando-a independente da alimentação pelo fato de garantirem que o fármaco permaneça solubilizado no trato gastrointestinal devido aos componentes da formulação e não da alimentação. Além disto, foi demonstrado que estes excipientes podem aumentar a absorção por meio da inibição do efluxo mediado pelas glicoproteínas-P (PGP) e a promoção do transporte linfático, o qual entrega o fármaco diretamente à circulação sistêmica, evitando o metabolismo de primeira passagem no fígado^{6,10}. As glicoproteínas-P são transportadores de efluxo ou secreção que transportam os fármacos da membrana intestinal de volta para o lúmen e funcionam como barreiras adicionais à absorção.

2.2. Formulações

Dois tipos de formulações foram estudados neste trabalho, as dispersões sólidas auto emulsificantes e as formulações conhecidos como SEDDS (*Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*). A definição tradicional de dispersão sólida é: “uma formulação formada por dois ou mais constituintes, geralmente um ou mais polímeros hidrofílicos e o fármaco, que é hidrofóbico. A matriz pode ser amorfa ou cristalina. O fármaco pode ser disperso molecularmente, em partículas amorfas ou cristalinas”¹¹. Dispersões sólidas tradicionais empregam polímeros como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), hidroxipropilmetil celulose (HPMC) etc, com ou sem surfactantes sólidos, como o dodecil sulfato de sódio.

Apesar da vantagem de aumento da solubilidade de muitos fármacos, a utilização comercial das dispersões sólidas tem sido limitada. Serajuddin¹² revisou os diversos aspectos que têm impedido o desenvolvimento comercial de dispersões sólidas e então discutiu como a introdução de excipientes com atividade superficial (como Gelucire[®] 44/14 e o Soluplus[®]) renovou o interesse no desenvolvimento comercial deste tipo de formulação. Mais especificamente, o autor discute que excipientes semi-sólidos apresentam vantagens em relação aos sólidos, pois permitem que a formulação seja incorporada, no estado fundido, diretamente em cápsulas de gelatina duras, eliminando assim a necessidade de moagem, mistura e compressão.

Dispersões sólidas auto emulsificantes empregando Gelucire[®] 44/14 têm sido descritas com sucesso para o aumento da solubilidade de diversos fármacos empregando basicamente dois métodos: o método da fusão (*Hot-melt*)^{13,14} e o método do solvente¹⁵. O primeiro envolve a fusão do excipiente semi-sólido com aquecimento brando (usualmente até 65 °C) com posterior mistura do fármaco, gerando uma solução ou uma dispersão. A mistura é então resfriada à temperatura ambiente ou encapsulada enquanto ainda quente em cápsulas de gelatina duras, para que esfrie e tome forma dentro das cápsulas. No segundo método, é utilizado um solvente para solubilizar o Gelucire[®] 44/14 e o fármaco, o qual deve ser evaporado ao final do processo. Entretanto, para evitar danos à

estrutura da dispersão, o solvente comumente utilizado é o diclorometano por apresentar ponto de ebulição abaixo da temperatura de fusão do Gelucire® 44/14.

O Soluplus® foi desenvolvido para o preparo de dispersões (ou soluções) sólidas pelo processo de extrusão a quente (*hot melt extrusion*) e recentes publicações têm descrito o aumento de solubilidade *in-vitro* e *in-vivo* empregando este método^{9,16}. Embora desenvolvido para o processo de extrusão a quente, o Soluplus® também pode ser utilizado para o preparo de dispersões sólidas empregando o método de evaporação do solvente¹⁷, sendo possível a utilização de diversos solventes orgânicos nos quais o excipiente é solúvel (água, acetona, metanol, etanol e dimetilformamida)¹⁸.

Quando o método da fusão é utilizado, o estado cristalino do fármaco irá depender se o fármaco é solúvel ou insolúvel no carreador no estado fundido. Se o fármaco é pouco solúvel no carreador fundido, não se deve esperar mudança significativa no estado cristalino do fármaco após resfriamento. Por outro lado, se o fármaco é solubilizado no carreador fundido, depois do resfriamento ele pode precipitar em uma forma cristalina ou semi-cristalina, ou permanecer aprisionado dentro da matriz do carreador na sua forma amorfa. Os fatores que determinarão o estado sólido final do fármaco na dispersão incluem a tendência intrínseca de cristalização do fármaco, sua porcentagem na dispersão, interação fármaco-excipiente, cristalinidade do carreador e taxa de resfriamento da dispersão¹². No método do solvente, a solubilidade do fármaco no solvente orgânico utilizado para o preparo da dispersão determina o seu estado sólido após a evaporação do mesmo e as considerações descritas acima podem ser estendidas a este método também.

Além das dispersões sólidas, formulações do tipo SEDDS também podem ser exploradas utilizando o excipiente Gelucire® 44/14. SEDDS são definidos como misturas homogêneas de óleos naturais ou sintéticos, surfactantes e um ou mais solventes ou co-solventes hidrofílicos¹⁹. O fármaco neste tipo de formulação deve estar, obrigatoriamente, solubilizado em um ou mais solventes ou co-solventes²⁰. Da mesma maneira que dispersões sólidas auto-emulsificantes, formulações SEDDS quando em contato com meio aquoso com agitação suave

formam micelas ou outras estruturas capazes de carregar o fármaco, mantendo-o solubilizado. Formulações SEDDS tradicionais fornecem dispersões opacas com tamanho de micelas > 200 nm. Formulações que apresentem micelas com tamanho < 200 nm são ópticamente límpidas ou levemente opalescentes e normalmente chamadas de SMEDDS (*Self-Micro Emulsifying Drug Delivery System*)²¹.

Formulações SEDDS semi-sólidas vêm despertando muito interesse na área farmacêutica devido à disponibilidade atual de maquinário para enchimento de cápsulas de gelatina duras com a formulação ainda aquecida e à compatibilidade de muitos excipientes com a cápsula de gelatina²².

3. A atorvastatina

A atorvastatina cálcica tem como forma molecular $C_{66}H_{68}CaF_2N_4O_{10}$ e nome IUPAC (3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilcarbamoil)-5-propano-2-ilpirrol-1-il]-3,5-dihidroxiheptanoato de cálcio. Sua estrutura é mostrada na Figura 3.

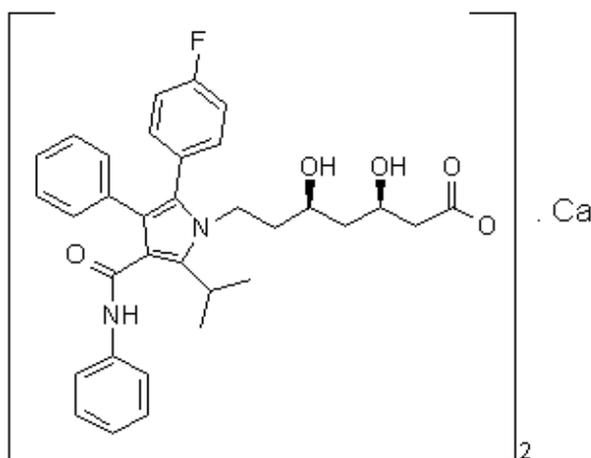


Figura 3: Estrutura química da atorvastatina cálcica.

A atorvastatina é membro de uma classe de fármacos denominada estatinas, as quais são, atualmente, a melhor opção para a redução de colesterol do tipo LDL (*Low Density Lipoproteins*) em pacientes com risco de doença cardiovascular. Este efeito é resultante da atividade inibidora das estatinas sobre a

enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-CoA redutase), com propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese do colesterol. Além disto, estudos recentes têm mostrado outros efeitos terapêuticos importantes das estatinas, tais como ação antineoplásica, inibição da reabsorção óssea, aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico endotelial, relaxamento do músculo sanguíneo, atenuação da hipertrofia do miócito cardíaco induzida pelo endotélio, inibição da proliferação de células endoteliais induzida por fatores angiogênicos, diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6, liberada pelo tecido adiposo²³.

A atorvastatina cálcica é classificada como muito pouco solúvel em soluções aquosas (solubilidade atribuída de 0,1 mg/mL) de acordo com a classificação da Farmacopéia Americana, mostrada na Tabela I. A biodisponibilidade absoluta da atorvastatina é de apenas 12 % após a administração de uma dose de 40 mg devido à sua baixa solubilidade e extenso metabolismo de primeira passagem pelo fígado²⁴. Desta maneira, a atorvastatina seria um fármaco excelente para se beneficiar das vantagens fornecidas pelos excipientes Gelucire[®] 44/14 e Soluplus[®], conforme descrito anteriormente.

Atualmente não existe nenhuma formulação comercial com estratégia de solubilidade aumentada para a atorvastatina, pois até pouco tempo (2010), a empresa Pfizer detinha a patente de comercialização do medicamento comercial (Lipitor[®]), o qual foi desenvolvido há 20 anos, época em que os excipientes para aumento de solubilidade não estavam disponíveis. Observa-se que, recentemente, muitos esforços de formulação têm sido descritos para aumentar a solubilidade e melhorar a absorção da atorvastatina. Kadu e co-autores descreveram o uso de uma formulação líquida do tipo SEDDS contendo Captex[®] 355 como fase oleosa, Capmul[®] MCM e Tween[®] 80 como mistura de surfactantes e PEG-400 como co-solvente²⁵, Kim e co-autores demonstraram aumento de solubilidade por meio do uso de nanopartículas de atorvastatina na sua forma amorfa²⁴, Yin e co-autores descreveram o preparo, caracterização e o aumento de absorção *in-vivo* de uma emulsão seca para a atorvastatina²⁶.

4. Polimorfismo farmacêutico

A atorvastatina existe na forma amorfa e em várias formas polimórficas. Polimorfismo é o termo utilizado para descrever a habilidade de uma substância em existir em estruturas caracterizadas por diferentes celas unitárias, porém com exatamente a mesma fórmula química²⁷. Diferentes formas polimórficas de um fármaco podem apresentar propriedades físicas e químicas diferentes, incluindo ponto de fusão, reatividade química, solubilidade e taxa de dissolução, propriedades óticas e mecânicas, pressão de vapor e densidade. Estas propriedades podem ter um efeito direto na habilidade de processamento e fabricação do produto farmacêutico, assim como na sua estabilidade, dissolução e biodisponibilidade. Assim, o polimorfismo pode afetar a qualidade, segurança e eficácia do produto²⁸. Para fármacos cuja absorção é limitada apenas pela solubilidade (Classe II do SCB), grandes diferenças de solubilidade para as diferentes formas polimórficas são muito prováveis de afetar a biodisponibilidade, ao contrário de fármacos muito solúveis.

O polimorfismo pode também acontecer em sólidos que apresentam diferenças em suas celas unitárias pela inclusão de uma ou mais moléculas de solventes, sendo chamados neste caso de solvatos. Um caso particular é quando a água é o solvente de inclusão e, neste caso, o polimorfo é chamado de hidrato. A forma amorfa por outro lado, é caracterizada pela ausência de ordenamento molecular a longa distância e normalmente apresenta a vantagem de maior solubilidade e taxa de dissolução sobre as formas cristalinas, justamente devido à menor energia de empacotamento ocasionada pela falta do ordenamento molecular.

Conversões polimórficas podem acontecer como consequência natural do processo de fabricação, como, por exemplo, em processos que envolvam fusão ou solubilização em um solvente orgânico com posterior secagem ou podem acontecer inadvertidamente, como por exemplo, durante a compressão do medicamento ou perante a exposição à alta temperatura e umidade. Durante o desenvolvimento farmacêutico, na etapa de pré-formulação, são realizados estudos de estabilidade da forma polimórfica do fármaco a ser utilizada, através de

testes de *stress* do mesmo em diferentes condições de temperatura, umidade etc. Entretanto, um aspecto que está ganhando cada vez mais atenção é a caracterização e monitoramento do estado sólido do fármaco *no medicamento* durante a produção. Além da questão farmacológica, esta necessidade é realçada por exigências regulatórias e questões relacionadas à propriedade intelectual²⁹.

As técnicas mais comumente utilizadas para caracterização do estado sólido são Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*), Difração de Raios-X, e espectroscopia vibracional como espectroscopia no infravermelho médio (MIR, *Mid-Infrared*), próximo (NIR, *Near-Infrared*) e Raman³⁰. No entanto, muitas vezes são encontradas dificuldades no desenvolvimento de métodos para a avaliação do estado sólido do fármaco no produto final devido à baixa concentração do mesmo e/ou presença de excipientes que encobrem o sinal do fármaco. As técnicas de DSC e Difração de Raios-X apresentam uma dificuldade adicional, pois nestas técnicas, o estado amorfo é caracterizado pela ausência de sinal analítico. Somente quando o fármaco cristaliza e sua concentração supera o limite de detecção destas técnicas, um sinal é observado. Com a técnica de DSC deve-se atentar para o fato de que, com o aquecimento, o fármaco cristalino pode ser solubilizado no carreador, levando à conclusão errônea de que não existe material cristalino na dispersão.

Por outro lado, técnicas de espectroscopia vibracional apresentam limites de detecção equivalentes ou inferiores ao DSC e Difração de Raios-X³¹. Além disto, estas técnicas têm a vantagem de apresentarem um sinal analítico para o fármaco amorfo também. Desta maneira, se as formas amorfa e cristalina apresentarem diferentes espectros vibracionais, em concentrações acima do limite de detecção, estas técnicas podem ser adequadas para o monitoramento do estado sólido do fármaco no produto final. McArdle e co-autores³² estudaram diferentes técnicas para quantificação de polimorfos de bicifadino, sendo que a espectroscopia NIR se mostrou a mais adequada.

5. Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

Em 1800, o astrônomo alemão Frederick William Herschel descobriu os primeiros sinais de luz na região do infravermelho próximo. Utilizando um prisma para decompor a luz, ele moveu um termômetro através das cores para saber a relação entre as cores do espectro e o calor produzido, verificando uma pequena variação com o comprimento de onda. Ao colocar o termômetro além da região do vermelho verificou uma grande variação na temperatura. Herschel postulou uma banda invisível de luz pertencente ao vermelho, ao qual denominou de infravermelho e posteriormente foi classificada como a região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*)³³.

Atualmente sabe-se que a região do infravermelho próximo está compreendida na faixa de energia de $2,65 \times 10^{-19}$ a $7,96 \times 10^{-20}$ J da radiação eletromagnética, correspondendo à faixa de comprimentos de onda de 780 a 2.500 nm (ou números de onda de 12.820 a 4.000 cm^{-1})³⁴. Nesta região são detectadas as vibrações de primeiro, segundo e terceiro sobretons (*overtones*) de bandas fundamentais observadas no infravermelho médio, bem como as bandas de combinação. Sobretons são transições múltiplas das transições fundamentais, ou seja, acontecem do nível vibracional fundamental $v = 0$ para os diversos níveis vibracionais $v = 2, 3, 4 \dots$ ³⁴.

Para que ocorra absorção da radiação no infravermelho, a energia do fóton incidente deve ser idêntica à diferença de energia entre dois níveis vibracionais. Entretanto, este critério não é suficiente e, para uma vibração ser ativa, é também necessário que o campo elétrico oscilante da radiação incidente possa interagir com a molécula. Isto só pode acontecer se o deslocamento dos átomos na vibração produzir uma mudança no momento de dipolo da molécula. Este critério é válido tanto para o infravermelho médio quanto para o próximo.

Entretanto, para o infravermelho próximo existem fatores adicionais que governam a absorção da radiação por parte dos analitos: a anarmonicidade elétrica e mecânica. Considerando inicialmente a molécula como um oscilador harmônico e a regra de seleção para o infravermelho médio ($\Delta v = \pm 1$), as

transições de sobretons seriam consideradas proibidas. No entanto, sobretons acontecem principalmente devido ao fenômeno de anarmonicidade elétrica. Para moléculas que apresentam diferenças entre as massas dos átomos conectados pela ligação química, a vibração não pode ser descrita por um oscilador com movimento harmônico³³. A anarmonicidade mecânica de osciladores pode ser demonstrada pelo diagrama de energia potencial. Em relação a osciladores harmônicos, cujo diagrama de energia é uma parábola perfeita (Figura 4 A), o diagrama referente a um oscilador anarmônico apresenta uma parábola distorcida, com espaçamento entre os níveis vibracionais desiguais e contendo energia referente à dissociação da molécula³⁵ (Figura 4 B). Neste modelo transições de $\nu = 0$ para os diversos níveis vibracionais $\nu = 2, 3, 4$ são permitidas e são aquelas de fato observadas no espectro NIR. Além disto, podem existir transições originárias em níveis vibracionais excitados ($\nu = 1, 2$), as quais são denominadas *hot bands* e também são indicadas na Figura 4B.

Por apresentarem alta anarmonicidade e grande momento de dipolo, as principais bandas de absorção na região do infravermelho próximo são relacionadas à sobretons e bandas de combinação das transições vibracionais fundamentais dos grupos: C-H, N-H, O-H e S-H³⁴.

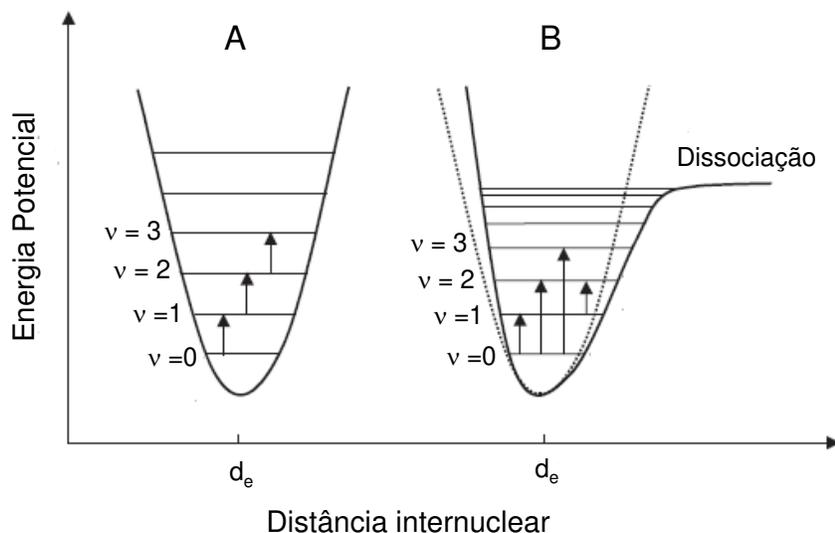


Figura 4: Diagrama de energia para os osciladores harmônico (A) e anarmônico (B) indicando as transições possíveis para cada um.

As bandas de combinação são obtidas a partir da combinação (através da soma ou diferença dos números de onda) para fornecer uma única banda e sua presença no espectro NIR indica que as vibrações não são independentes³³. A sobreposição de muitos sobretons e bandas de combinação leva à falta de especificidade espectral na região NIR, ao contrário da região do infravermelho médio, onde picos específicos podem ser atribuídos a diferentes grupos químicos.

6. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman baseia-se no fenômeno de espalhamento inelástico da radiação, primeiramente demonstrado por Raman e Krishnan em 1928³⁶. Utilizando um telescópio para focar a radiação do sol em uma amostra, eles demonstraram a existência de radiação espalhada com uma frequência diferente daquela da radiação incidente. Atualmente os espectros Raman são obtidos irradiando-se a amostra com um laser na região do visível ou NIR. Para entender o princípio de funcionamento da técnica Raman, deve-se considerar os fótons do laser como partículas ao invés de ondas. A Figura 5 ilustra os fenômenos que dão origem aos espectros Raman.

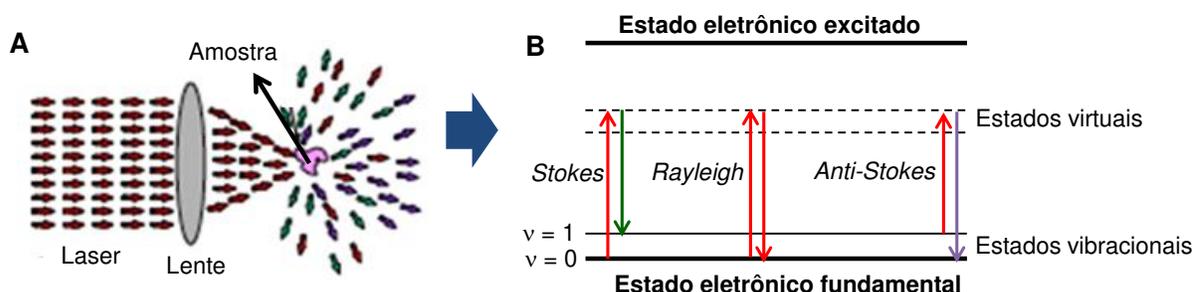


Figura 5: (A): Ilustração do processo de incidência de fótons do laser sobre uma amostra e o espalhamento resultante e (B): diagrama de energia mostrando os estados envolvidos nos processos de excitação e espalhamento. A seta vertical para cima indica o fóton incidente e a seta vertical para baixo indica o fóton espalhado.

A Figura 5 A ilustra de forma geral o processo de incidência de fótons do laser sobre a amostra e conseqüente espalhamento dos mesmos. A Figura 5 B descreve os fenômenos envolvidos na geração dos fótons espalhados: a

temperatura ambiente, a maior parte das moléculas encontra-se no estado vibracional fundamental ($v = 0$) do estado eletrônico fundamental, e ao irradiar a amostra com um feixe monocromático de energia $h\nu$, há transferência de energia dos fótons incidentes para as moléculas, gerando uma transição para um estado denominado virtual. Este estado é assim denominado uma vez que ele não é um orbital molecular presente na molécula e existe somente enquanto há incidência do laser sobre a mesma. A energia do estado virtual depende do número de onda da radiação do laser e, por este motivo, para evitar fluorescência, o mesmo deve ser afastado de uma banda de absorção do analito³⁷. Ao retornar para o estado eletrônico fundamental, a molécula pode retornar ao mesmo estado vibracional fundamental (espalhamento *Rayleigh*) ou adquirir uma energia vibracional correspondente ao primeiro estado vibracional excitado (espalhamento *Stokes*). No primeiro caso, o espalhamento é do tipo elástico, pois o fóton espalhado tem a mesma energia do fóton incidente, e, por este motivo, ele não traz informações analíticas sobre a amostra. No segundo caso, o espalhamento é do tipo inelástico e o fóton espalhado tem energia menor do que a do fóton incidente, uma vez que houve transferência de energia do fóton incidente para a molécula, que a fez vibrar em um nível vibracional excitado.

Existe ainda um terceiro fenômeno descrito na Figura 5 B, denominado espalhamento *anti-Stokes*, que é devido ao espalhamento inelástico por moléculas que já se encontram no primeiro estado vibracional excitado. Neste caso, a molécula transfere energia para o fóton incidente e o fóton espalhado apresenta energia maior que o fóton incidente. Como a população de moléculas no primeiro estado vibracional excitado tende a ser pequena a temperatura ambiente, as linhas *anti-Stokes* tendem a apresentar intensidades muito menores do que as linhas *Stokes*.

O deslocamento Raman, medido em cm^{-1} , é a diferença entre o número de onda dos fótons incidentes e dos fótons espalhados. Observando a Figura 5 B, é possível verificar que esta diferença é correspondente à diferença de energia entre os níveis vibracionais $v = 1$ e $v = 0$, ou seja, é exatamente a diferença de energia observada na região do infravermelho médio. Por este motivo os espectros Raman

tendem a ser muito semelhantes aos espectros de absorção nesta região. No entanto, enquanto a regra de seleção para a absorção no infravermelho é que a molécula deve apresentar variação no momento de dipolo com a vibração, na espectroscopia Raman a regra de seleção é que a molécula deve apresentar polarizabilidade da nuvem eletrônica durante a incidência do laser. Por este motivo, moléculas polares tendem a apresentar sinais mais intensos no infravermelho e moléculas apolares, com nuvem eletrônica polarizável, tendem a apresentar sinais mais intensos no Raman³⁸. É possível concluir também ao observar a Figura 5, que, ao contrário da espectroscopia no infravermelho médio, a espectroscopia Raman não requer que a radiação incidente tenha exatamente a energia correspondente entre o nível vibracional fundamental e excitado.

As intensidades das linhas Raman são, no máximo, 0,001 % da intensidade do laser. Por causa disto, poderia parecer mais difícil detectar e medir bandas Raman do que bandas vibracionais de absorção no infravermelho. Entretanto, como o que se mede é a radiação *espalhada* e esta se situa nas regiões do visível ou do infravermelho próximo, isto é feito com facilidade uma vez que para estas regiões estão disponíveis detectores mais sensíveis³⁷. Após medir a energia da radiação espalhada, é feito o cálculo da diferença entre esta e a do fóton incidente, dando origem ao deslocamento Raman. Em equipamentos comerciais, as linhas *Rayleigh* e *anti-Stokes* tendem a ser suprimidas por filtros e somente as linhas *Stokes* são mostradas.

De forma resumida, se por um lado a espectroscopia de absorção no infravermelho envolve a excitação direta da molécula do estado vibracional fundamental para primeiro estado excitado por fótons que possuem exatamente a diferença de energia entre estes dois níveis, a espectroscopia Raman utiliza radiação muito mais energética e a diferença de energia entre estes dois estados é medida subtraindo a energia do fóton espalhado daquela do fóton incidente.

A intensidade de espalhamento aumenta à quarta potência da frequência da radiação incidente³⁹. Assim, qualquer aumento no comprimento de onda (e, portanto, diminuição da frequência e energia) diminui drasticamente a intensidade de espalhamento. Desta maneira, inicialmente poderia se pensar que a melhor

escolha seria utilizar lasers com baixos comprimentos de onda (região do visível) ao invés de lasers na região do infravermelho próximo. Isto aumentaria de fato a intensidade dos sinais (e aumentaria, portanto a detectabilidade de compostos na amostra), no entanto, o fenômeno de fluorescência é muito mais provável de acontecer, pois o comprimento de onda pode coincidir com uma banda de absorção de um analito, causando distorções ou bloqueando completamente o fenômeno de espalhamento. Por outro lado, o uso de lasers na região do infravermelho próximo diminui de fato a probabilidade de fluorescência, no entanto, isto acontece com consequente diminuição da intensidade do espalhamento Raman. A escolha do comprimento de onda do laser não é trivial e, em casos em que a amostra não fluoresce, a seleção do laser com comprimento de onda na região do visível é a melhor opção. A Figura 6 ilustra os processos de fluorescência e espalhamento Raman.

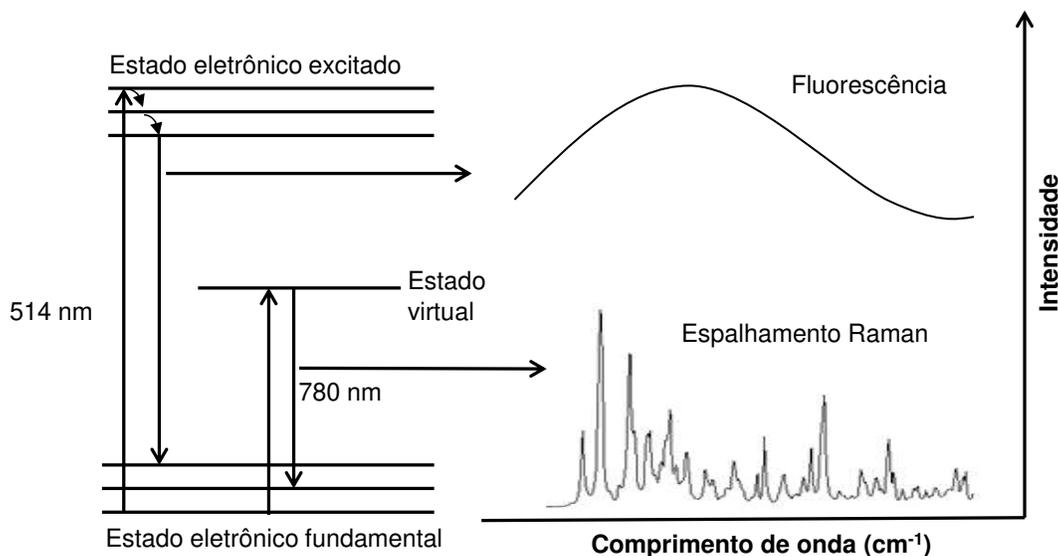


Figura 6: Ilustração do processo de fluorescência e espalhamento Raman indicando os estados eletrônicos e vibracionais envolvidos.

7. Espectroscopia de imagem

A espectroscopia de imagem é uma técnica emergente dentro da área química e farmacêutica, comparada com espectroscopia vibracional tradicional, a qual já está bem estabelecida. Enquanto a espectroscopia vibracional tradicional permite a análise do *bulk* da amostra e a determinação da composição média de

toda a amostra, a espectroscopia de imagem permite obter informações sobre a distribuição espacial de seus constituintes, permitindo a avaliação da homogeneidade da amostra em microescala. Nesta técnica, os contrastes das imagens são gerados por diferenças espectrais presentes nas amostras e, portanto, diferenças de composição química.

Muita atenção tem sido despendida a este tópico no meio científico. O Conselho para Pesquisa Química (*Council for Chemical Research*), no seu relatório “*Technology Vision 2020: The US Chemical Industry*” reconhece que a espectroscopia de imagem é uma tecnologia importante e essencial para cada fase da ciência química, no desenvolvimento de produtos, processos e controle de produção. O relatório então identifica a espectroscopia de imagem como uma das tecnologias em desenvolvimento com potencial para impacto significativo nas análises conduzidas no futuro⁴⁰.

A espectroscopia de imagem compreende a medida de um espectro completo por unidade da superfície da amostra (pixel). O resultado pode ser visualizado como um cubo, denominado hipercubo espectral (Figura 7), onde as três dimensões são as coordenadas x e y do pixel e a terceira é a dimensão dos comprimentos de onda.

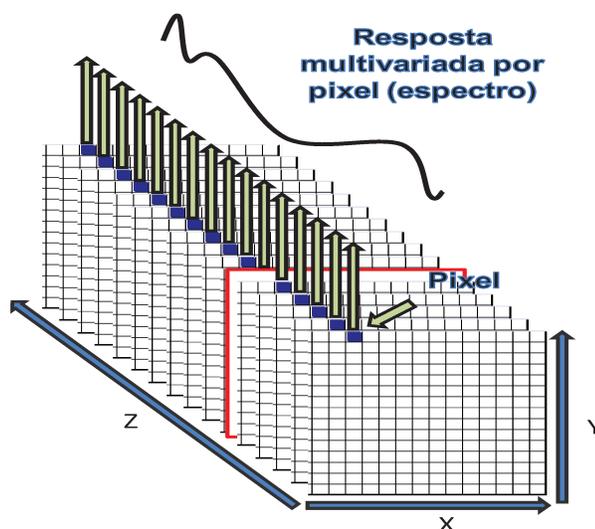


Figura 7: Cubo de dados gerado em espectroscopia de imagem ou hipercubo espectral.

Os termos *Hyperspectral imaging* ou *Hyperspectral image* aparecem atualmente na literatura como sinônimos para *Chemical Imaging* ou *Chemical Image* (CI) e têm origem nas primeiras aplicações de imagens hiperespectrais em sensoriamento remoto, nos anos 70. Nesta época, as imagens eram geradas por um conjunto de bandas ao invés de um espectro contínuo e a técnica era denominada *Multispectral Imaging*. A partir de 1980, a utilização de espectros contínuos para o monitoramento deu origem ao termo *Hyperspectral Imaging*⁴¹.

De acordo com a maneira como o cubo de dados é gerado, o procedimento de geração do hipercubo espectral pode ser classificado como *mapping* ou *imaging*. Quando uma plataforma móvel (*motorized stage*), é utilizada para movimentar a amostra, o procedimento é denominado *mapping*, e ainda pode ser subdividido em *point mapping* (varredura feita pixel a pixel) ou *line-mapping* (varredura simultânea de uma linha de pixels). O procedimento *mapping* representa a adaptação da microespectroscopia - técnica na qual o microscópio é utilizado apenas como dispositivo de visualização da amostra - pela adição de uma plataforma móvel. Por outro lado, quando toda a área da amostra é refletida sobre um detector multi-elementar (formado por centenas ou milhares de elementos em uma matriz) do tipo *focal plane array* (FPA), o procedimento passa a ser denominado *imaging*⁴². Estes detectores permitem que os espectros sejam adquiridos de forma simultânea para uma determinada área da amostra, em um dado comprimento de onda.

A seleção de um ou outro procedimento de aquisição de dados depende da aplicação. O procedimento *mapping* fornece resolução espacial superior ao procedimento *imaging* devido à existência de aberturas nos microscópios que permitem determinar o tamanho do pixel com precisão e a vantagem de permitir o estudo de superfícies rugosas, pois o foco pode ser ajustado a cada ponto. Deve-se ressaltar que conforme o tamanho do pixel diminui, diminui também a intensidade luminosa que chega à amostra e assim, a relação sinal ruído diminui. O procedimento *mapping* é então ideal para analisar amostras pequenas (devido ao tempo longo que é necessário para a varredura) e constituintes minoritários, por ser possível um maior detalhamento. Por outro lado, o procedimento *imaging*

é ideal para aplicações que necessitem de respostas rápidas, nas quais constituintes majoritários são analisados⁴².

Considerando que no procedimento *mapping*, os espectros são obtidos variando-se a posição da amostra em relação à fonte incidente, pode-se pensar no cubo de dados como contendo informações espectrais espacialmente resolvidas, uma vez que um espectro completo é disponível por pixel da superfície da amostra. Considerando que o procedimento *imaging* não envolve movimento da amostra uma vez que a fonte ilumina toda a superfície da amostra de uma única vez e os comprimentos de onda são posteriormente separados, pode-se pensar no cubo de dados como contendo informações espaciais espectralmente resolvidas, pois se tem uma imagem por comprimento de onda. A Figura 8 ilustra os modos de obtenção dos espectros descrito.

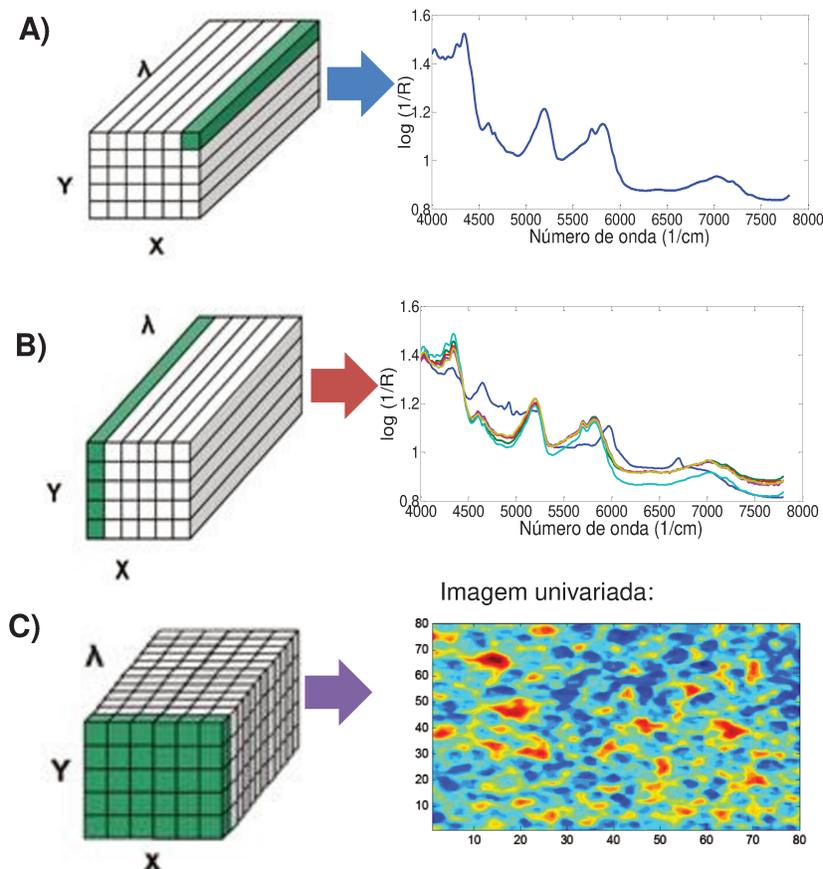


Figura 8: Procedimentos para a aquisição do hiper-cubo espectral: A) *point-mapping* e a geração de um único espectro; B) *line-mapping* e a geração de uma linha de espectros e

C) *imaging* e a geração de uma imagem baseada na intensidade em um único comprimento de onda.

Tanto o procedimento *mapping* quanto o procedimento *imaging* geram imagens químicas, ou seja, imagens cujos contrastes são gerados por diferenças espectrais. Desta maneira, ao utilizar o termo “imagem química” neste texto, o mesmo não implica que o modo *imaging* tenha sido utilizado para a sua geração.

7.1. Métodos para geração das imagens

De uma maneira geral, métodos univariados e multivariados podem ser utilizados para a geração de imagens químicas. O método univariado consiste basicamente em selecionar uma “fatia”, correspondente a um comprimento de onda, do hipercubo espectral e a imagem é gerada pelos valores de intensidade de absorbância em todos os pixels da “fatia”. Este método pode ser utilizado caso exista um comprimento de onda característico para cada um dos constituintes da amostra e com o objetivo de se obter uma avaliação qualitativa da distribuição dos constituintes na mesma, uma vez que a imagem é gerada com base na intensidade neste comprimento e não na concentração das espécies. O método univariado pode não permitir extração completa das informações contidas nos dados, sendo os métodos multivariados mais promissores, uma vez que fazem uso de várias medidas espectrais de forma simultânea. A Figura 9 mostra o esquema geral do tratamento de dados para a geração de uma imagem empregando métodos quimiométricos.

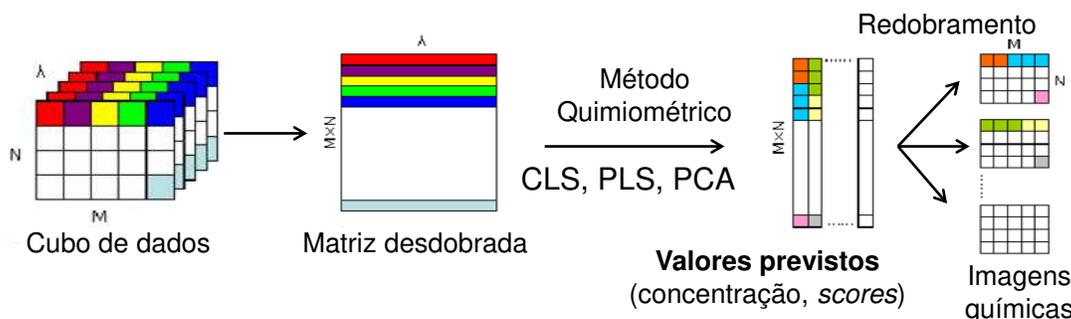


Figura 9: Esquema geral para a geração de imagens químicas utilizando métodos quimiométricos.

Como é possível verificar na Figura 9, a primeira etapa é o desdobramento do cubo de dados em uma matriz de duas dimensões, com as amostras nas linhas e as variáveis nas colunas. Após o desdobramento, podem ser realizados pré-processamentos nesta matriz com o objetivo remover ruído e artefatos não relacionados à composição física e química da amostra. O tipo de pré-processamento depende da técnica que foi empregada para obter os espectros. Desta maneira, espectros NIR de amostras sólidas normalmente requerem a eliminação de flutuações de linha base, o que pode ser feito pelo método de correção de espalhamento multiplicativo (*Multiplicative Scattering Correction, MSC*), pelo método de variação normal padrão (*Standard Normal Variate, SNV*) ou pelo uso de derivadas. Por outro lado, espectros Raman tendem a apresentar diferenças de polarizabilidade das espécies químicas, e, desta maneira, um pré-processamento comumente empregado é a normalização para comprimento unitário ou pelo comprimento do vetor (espectro).

Após o pré-processamento, segue-se a etapa de extração de informações dos mapas, que é o centro da análise de imagens, pois os compostos químicos são localizados nesta etapa. Muitas são as ferramentas quimiométricas que podem ser utilizadas nesta etapa, sendo as principais: Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis, PCA*), Regressão em Mínimos Quadrados Clássicos (*Classical Least Squares, CLS*), Resolução Multivariada de Curvas (*Multivariate Curve Resolution, MCR*), Regressão em Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares, PLS*). A aplicação destas ferramentas fornece como resultado vetores (ou matrizes) contendo as propriedades de interesse (concentrações, *scores*), as quais são redobradas, de acordo com a distribuição espacial original, dando origem aos mapas de distribuição (de *scores* ou concentrações), também chamados de imagens químicas.

7.1.1. *Regressão em Mínimos Quadrados Clássicos*

O método dos Mínimos Quadrados Clássicos (CLS) é um método quantitativo baseado na Lei de Beer que assume que cada medida é a soma de sinais linearmente independentes, ou seja, que o espectro em cada pixel é a soma

de todos os espectros dos componentes puros ponderadas pelas suas concentrações⁴³. O CLS é um método quimicamente intuitivo, sendo suas principais vantagens a facilidade de execução e principalmente de compreensão.

A matriz de espectros **X** desdobrada é considerada como sendo o produto da matriz de concentrações (**C**) e da matriz contendo os espectros (**S**) dos constituintes puros, conforme mostrado na equação 1.

$$\mathbf{X} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Se um conjunto de amostras de concentrações conhecidas estiver disponível, o CLS também pode ser utilizado para estimar os espectros puros. Isolando-se **S** na equação 1, obtém-se:

$$\mathbf{S} = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{X} \quad (2)$$

Caso os espectros puros estejam disponíveis - o que é uma situação bastante comum no desenvolvimento farmacêutico - é possível estimar as concentrações dos compostos em uma amostra desconhecida, isolando-se **C** na equação 1, conforme mostrado na equação 3:

$$\mathbf{C} = (\mathbf{SS}^T)^{-1}\mathbf{SX}^T \quad (3)$$

A equação 3 indica que os espectros puros devem ser linearmente independentes (não colineares), pois caso exista colinearidade, a matriz (\mathbf{SS}^T) não poderá ser invertida. Na prática, quando as respostas apresentam apenas pequena colinearidade, esta matriz ainda poderá ser calculada, mas será instável e os valores previstos de concentração podem não ser exatos⁴³.

É importante garantir que os materiais utilizados como componentes puros estejam em uma forma representativa em relação ao que se espera encontrar na amostra a ser analisada. Por exemplo, se o processo envolver a utilização de um solvente, transições polimórficas podem ocorrer e o espectro da forma cristalina original já não representará o fármaco no produto final. Mesmo para a simples

mistura de pós, é importante compactar os componentes puros com o mesmo procedimento utilizado para a compactação do produto.

Considerando que no método CLS um dado espectro é considerado como sendo a soma ponderada dos espectros puros pelas suas correspondentes concentrações, interações físico-químicas entre os constituintes da amostra – as quais geram deslocamentos no sentido dos números de onda - e não-linearidades do sinal analítico com a concentração podem levar à falta de exatidão do método. Além disto, o CLS, assim como outros métodos de resolução de curvas, pode apresentar a propriedade denominada ambiguidade de intensidade⁴⁴, e que ocorre porque os valores na matriz **C** podem ser multiplicados (ou divididos) por um número diferente de zero e, ao dividir (ou multiplicar) o espectro associado contido na matriz **S** pelo mesmo número, obtém-se a matriz **X**, idêntica àquela obtida sem nenhuma operação matemática, uma vez que $\mathbf{X} = \mathbf{CS}^T$. Devido à ambiguidade de intensidade, as concentrações estimadas dos componentes podem não corresponder aos valores *absolutos* de concentração, mas estão *correlacionados* com estes. Por este motivo, a matriz **C** é normalmente descrita como contendo as concentrações *relativas* de cada componente, as quais são proporcionais às concentrações absolutas⁴⁵.

7.1.2. Resolução Multivariada de Curvas

O MCR é um método de resolução de curvas⁴⁶ que apresenta semelhanças com o CLS, pois o mesmo modelo bilinear mostrado na equação 1 ($\mathbf{X} = \mathbf{CS}^T$) é adotado. A principal diferença entre os dois é que, enquanto no CLS, a matriz **S** é fixa (representada pelos espectros puros), no MCR, as matrizes **C** e **S** são encontradas de forma iterativa (empregando normalmente o algoritmo de mínimos quadrados alternados, *Alternating Least Squares*, ALS), de tal maneira que o produto delas retorne a matriz **X**, com um erro aceitável. Esta flexibilidade em alterar a matriz **S** tem a vantagem de permitir explicar uma variabilidade na amostra que não pode ser descrita pelos espectros dos componentes puros iniciais, como por exemplo, alterações de formas polimórficas que acontecem

durante um determinado processo, adsorção de água e interações entre os constituintes da amostra.

Se por um lado, esta é uma vantagem do método MCR, o que o torna menos rígido que o CLS, por outro lado, a liberdade em alterar a matriz **S** pode gerar um problema denominado ambiguidade rotacional, no qual diferentes combinações entre **C** e **S** fornecem a mesma solução matemática para a equação 1, ou seja, retornam igualmente a matriz **X** sem representar, no entanto, uma solução com sentido químico. A maneira mais simples de avaliar se a solução fornecida pelo MCR apresenta sentido químico é comparar os espectros puros iniciais e aqueles recuperados pelo MCR. Se existirem diferenças espectrais em regiões onde estas não deveriam estar presentes (regiões nas quais se sabe que um determinado composto não deveria apresentar sinal), caracteriza-se a ambiguidade rotacional. Nestes casos, os valores de concentração previstos (contidos na matriz **C**) não estarão corretos.

Para eliminar ou minimizar a ambiguidade rotacional são colocadas restrições às possíveis soluções do MCR, sendo as principais para espectroscopia vibracional: 1) não negatividade de concentrações e espectros – impõe que as soluções da equação 1 devem conter apenas valores de concentração positivos e 2) *Closure* ou balanço de massa – impõe que a soma de todas as concentrações previstas deve ser igual a 100 %⁴⁷. Recentemente, foi descrito por de Juan *et al.*⁴⁸ a possibilidade de inclusão de restrições relacionadas ao conhecimento prévio do usuário sobre a falta de um ou mais constituinte em determinados pixels da imagem. Nestes casos, são introduzidas no cálculo do MCR matrizes denominadas **C_{sel}** (para concentrações) e **S_{sel}** (para espectros) com valores iguais a zero para as concentrações ou regiões dos espectros nas quais sabe-se que determinado composto esteja ausente.

A ambiguidade rotacional é um problema sério que limita bastante o uso do MCR. Vale ressaltar que o CLS não pode apresentar ambiguidade rotacional, uma vez que a matriz **S** é fixa. Outro aspecto que limita o uso do MCR está relacionado ao fato de que, para obter resultados adequados, cada constituinte deve estar presente em uma área seletiva da amostra (problema da seletividade).

Caso a amostra seja muito homogênea e uma mistura de todos os constituintes esteja presente em todos os pixels, o algoritmo MCR-ALS tende a convergir para uma solução que contém na matriz **S** espectros da mistura destes constituintes ao invés dos espectros individuais. Em outras palavras, é impossível para o algoritmo detectar que existem vários componentes na amostra e ele entende que a mesma é formada por apenas um único componente, uniformemente distribuído ao longo da superfície. Este problema está associado ao fato do posto químico (número de componentes químicos presentes de fato na amostra) ser diferente do posto matemático (número de componentes distinguíveis dentro da amostra), o que acontece em casos de amostras muito homogêneas. Desta maneira, o MCR só funciona adequadamente em casos nos quais o posto químico é igual ao posto matemático.

Para resolver o problema descrito acima, normalmente utiliza-se o procedimento de matriz aumentada no cálculo do MCR⁴⁹. Neste procedimento, as matrizes desdobradas de diversas imagens são “empilhadas”, formando uma matriz **X** aumentada (Figura 10), a qual é tratada como em um procedimento normal de cálculo empregando MCR, ou seja, decomposta nas matrizes **C** e **S**, mais a matriz de erros. Este procedimento tem o objetivo de aumentar a variabilidade na matriz **X** para eliminar ou minimizar o problema de deficiência de posto e fornecer soluções realistas para as concentrações. Após o cálculo de **C** e **S** pelo algoritmo, as matrizes contendo os valores das concentrações dos analitos para cada amostra são separadas e redobradas para gerar os mapas de distribuição de cada constituinte em cada amostra.

Da mesma maneira que para o CLS, as concentrações previstas pelo MCR não são absolutas, mas relativas. Para encontrar as concentrações absolutas, foi utilizado por Piqueras e co-autores⁵⁰, uma correção empregando a regressão entre os valores médios experimentais (*bulk*) contra os valores previstos pelo MCR, de acordo a equação 4. Para a realização desta correção é preciso que se conheça a composição experimental média de cada constituinte na amostra.

$$C_{i\ corr} = \frac{C_{i\ prev} - b}{a} \quad (4)$$

onde $C_{i\ prev}$ é um vetor contendo as concentrações previstas pelo MCR para o constituinte i em todos os pixels; a e b representam, respectivamente, a inclinação e o intercepto do gráfico de valores experimentais vs valores previstos e $C_{i\ corr}$ contém os valores corrigidos de concentração para o constituinte i em todos os pixels.

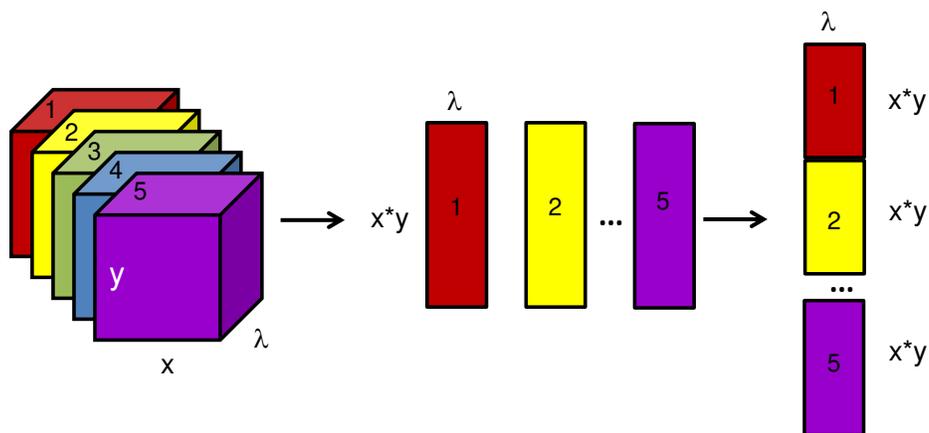


Figura 10: Ilustração do processo de formação da matriz aumentada a partir de vários cubos de dados.

7.1.3. Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais⁵¹ é, sem dúvida, um dos métodos mais importantes dentro da Quimiometria. Em síntese, é um método que permite resumir informações contidas em conjuntos de dados de alta dimensionalidade algumas poucas dimensões, permitindo encontrar visualmente tendências e similaridades entre amostras e entender quais variáveis (no caso de espectroscopia, números de onda) são responsáveis pelas similaridades. Na PCA, a variação sistemática de uma matriz de dados \mathbf{X} é capturada e resumida em algumas novas variáveis, chamadas componentes principais, as quais são combinações lineares não correlacionadas das variáveis originais⁴³. A matriz \mathbf{X} (com m linhas e n colunas) é decomposta em uma soma de r t_i e p_i , na qual r representa o posto da matriz \mathbf{X} , t são os *scores* e p são os *loadings*:

$$\mathbf{X} = t_1\mathbf{p}_1^T + t_2\mathbf{p}_2^T + t_3\mathbf{p}_3^T + \dots + t_r\mathbf{p}_r^T \quad (5)$$

Normalmente, o modelo de PCA é truncado após certo número de componentes principais e variância residual é alocada na matriz de erros (\mathbf{E}). Assim, de forma matricial, tem-se que:

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

onde \mathbf{T} ($m \times r$) é a matriz contendo os *scores* e \mathbf{P} ($n \times r$) a matriz contendo os *loadings*.

Os *scores* representam as coordenadas de cada uma das amostras em cada componente principal enquanto os *loadings* fornecem informações sobre a contribuição das variáveis originais para a formação das componentes principais. Isto significa que, se os *loadings* em uma determinada componente principal apresentarem sinais característicos do espectro de um composto puro, aquela componente principal descreve principalmente a variação deste composto.

A princípio, a equação 6 apresenta similaridade com a equação descrita para o CLS (equação 1), ou seja, em um sistema que segue a lei de Beer e que pode ser modelado pela equação bilinear $\mathbf{X} = \mathbf{CS}^T$, é clara a correlação entre os *scores* da PCA (\mathbf{T}) e as concentrações do CLS (\mathbf{C}) da mesma maneira que entre os *loadings* da PCA (\mathbf{P}) e os espectros puros do CLS (\mathbf{S}). No entanto, o principal problema reportado com o uso da PCA para a geração de imagens químicas é a dificuldade em atribuir uma imagem baseada nos *scores* a um determinado componente químico da amostra por causa da dificuldade de associar os *loadings* com os espectros dos compostos puros^{52,53}. Assim, deve-se tomar cuidado ao tomar decisões baseadas na distribuição de um composto com base nas imagens dos *scores*. Outro problema bastante comum é que o número de componentes principais nem sempre tem relação direta com o número de compostos presentes na amostra⁵⁴.

Apesar das limitações descritas para a utilização da PCA para a geração de imagens químicas, este método tem, sem dúvida, grande importância nesta área, especialmente para a geração de imagens de amostras sobre as quais não se tem informações *a priori*. Isto se deve principalmente à sua natureza não supervisionada, a qual permite que ele seja utilizado sem nenhum conhecimento prévio da amostra e não requer nenhuma amostra de referência (espectros puros ou conjunto de calibração). É necessário apenas que exista *variação* na concentração dos componentes nos pixels dentro da área amostrada. De forma resumida, pode-se dizer que a PCA é adequada para uma análise exploratória inicial, especialmente de amostras de composição desconhecida, para as quais outros métodos não podem ser aplicados.

7.1.4. *Regressão em Mínimos Quadrados Parciais*

A regressão em mínimos quadrados parciais é um método de calibração multivariada bem estabelecido^{55,56} utilizado para relacionar duas matrizes de dados, como por exemplo, espectros (**X**) e valores de alguma propriedade de interesse, normalmente a concentração de um ou mais analitos. No caso de um único analito, os valores de concentração são alocados em um vetor (**y**) e o método é denominado PLS 1. No caso de mais de um analito, os valores são alocados em uma matriz (**Y**), e, neste caso o método é denominado PLS 2. Para estabelecer a relação entre as matrizes X e Y, deve-se proceder com uma etapa de calibração, na qual os valores de concentração dos analitos são conhecidos, seja pelo preparo experimental das amostras, seja empregando um método de referência.

O modelo PLS também utiliza a decomposição em componentes principais para a redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre os espectros e as concentrações dos analitos. As matrizes **X** e **Y** são decompostas por PCA através das seguintes equações⁵⁷:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (7)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{F} \quad (8)$$

onde:

- \mathbf{P} e \mathbf{Q} são os *loadings* de \mathbf{X} e \mathbf{Y} respectivamente,
- \mathbf{T} e \mathbf{U} são os *scores* de \mathbf{X} e \mathbf{Y} respectivamente e
- \mathbf{E} e \mathbf{F} representam as matrizes de resíduos de \mathbf{X} e \mathbf{Y} respectivamente.

O direcionamento dos *scores* nas matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} é alterado até que o melhor modelo linear seja estabelecido entre os *scores* dos dois grupos e assim, a maior covariância entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} seja alcançada. Isso é feito em uma série de etapas, que são repetidas para cada Componente Principal estimada por meio de um processo iterativo. Desta maneira, no PLS existe um compromisso entre a explicação da variância em \mathbf{X} e a obtenção da maior correlação com \mathbf{Y} , ao contrário da PCA na qual o direcionamento dos componentes se dá para explicar a maior variância possível na matriz \mathbf{X} . No PLS, uma vez que no cálculo de cada componente principal os valores de concentração dos analitos também são levados em consideração, as componentes principais perdem a total ortogonalidade e passam se chamar de variáveis latentes.

Para a geração de imagens químicas com PLS, um modelo de calibração deve ser construído com amostras que possuam concentrações conhecidas dos analitos (*bulk concentration*). Devem ser obtidos hipercubos espectrais destas amostras em uma área representativa, os cubos devem ser desdobrados e os espectros *médios* devem ser utilizados para a regressão, juntamente com os valores das concentrações conhecidas. Os vetores contendo os valores previstos pelo PLS para os analitos nos pixels são então redobrados para gerar os mapas de distribuição. Para o modelo PLS, somente os analitos que tiveram sua concentração variada nas amostras de calibração poderão ser quantificados, ao contrário do CLS.

Antes da previsão das concentrações nos pixels, o modelo deve ser avaliado empregando algumas ferramentas de diagnóstico, tais como o gráfico de

valores previstos vs valores experimentais e o erro quadrático médio de validação cruzada (*root mean square error of cross validation*, RMSECV). O RMSECV é um parâmetro para avaliar a concordância entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo quando uma (*leave-one-out*) ou mais amostras do próprio conjunto de calibração são deixadas fora do cálculo. No método *leave-one-out*, uma amostra é deixada de fora da calibração, o modelo é construído com as demais e é realizada a previsão da propriedade de interesse para esta amostra. Este procedimento é então repetido para todas as amostras e um erro médio é calculado, de acordo com a equação 9.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (y_p - y_r)^2}{n}} \quad (9)$$

onde y_p representa o valor previsto de concentração e y_r o valor real (experimental).

Considerando que este procedimento é repetido para cada número de variáveis latentes, o mínimo do gráfico de RMSECV contra o número de variáveis latentes pode ser utilizado para determinar o número de variáveis latentes a serem utilizadas no modelo.

No tratamento de dados de imagens, é possível calcular o RMSEP (*root mean square error of prediction*) empregando a média dos valores previstos nos pixels (y_p) e os valores médios experimentais (y_r), representando uma medida da grandeza do erro obtido para a previsão da concentração do analito utilizando determinado método de quantificação. Isto pode ser utilizado para qualquer método de calibração multivariada, não apenas o PLS. No caso do PLS, este valor deve ser estatisticamente equivalente ao RMSECV.

O PLS tem se mostrado o método mais exato para análise de dados hiperespectrais de amostras farmacêuticas⁵⁴. A maior limitação para o uso do método é o tempo e materiais necessários para o preparo e leitura das amostras necessárias para a calibração. Além disto, nem sempre é possível realizar uma

calibração, como por exemplo, no início do desenvolvimento farmacêutico, no qual a quantidade do fármaco é geralmente limitada. Existe também o desafio de obter valores de referências exatos. Utilizando os valores experimentais teóricos, a variação experimental do preparo da amostra (*batch variation*) não é levada em consideração. Isto pode ser corrigido realizando-se a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por exemplo. No entanto, este enfoque é válido apenas para o fármaco uma vez que os excipientes normalmente não são avaliados.

7.2. Espectroscopia Raman de imagem: instrumentação e aplicações

A combinação de um espectrômetro Raman com um microscópio é relativamente simples pelo fato de que um microscópio ótico convencional pode ser utilizado. Como a espectroscopia Raman envolve radiação visível e a microscopia ótica é muito bem desenvolvida, existe uma combinação natural entre as duas técnicas. A primeira combinação de um espectrômetro Raman com um microscópio deu origem à microespectroscopia, técnica na qual o microscópio é utilizado apenas como instrumento de amostragem para obter informações espectrais de uma região específica da amostra. Desta maneira, uma pequena impureza visível em um comprimido pode ser focalizada com o microscópio e o espectro neste ponto pode ser coletado. Este aparato experimental não gera imagens baseadas em contraste espectral, mas utiliza o microscópio como facilitador para amostragem em espectroscopia pontual⁵⁸.

O espectrômetro Raman acoplado a um microscópio pode ser dispersivo ou baseado em transformada de Fourier (*Fourier Transform*, FT), sendo que enquanto o primeiro emprega um laser na região do visível para excitação, o segundo emprega um laser de na região do infravermelho próximo³⁹. Espectrômetros Raman com transformada de Fourier para geração de imagens foram desenvolvidos como acessórios aditivos (*add-on devices*) aos equipamentos Raman pontuais utilizando lasers em 1064 nm para excitação, com altas potências para compensar o decréscimo na eficiência de espalhamento com o aumento do

comprimento de onda. No entanto, o espectrômetro que se tornou padrão foi o dispersivo, com excitação em 780 nm e detecção com dispositivos CCD⁵⁸. Este comprimento de onda demonstrou ser o melhor compromisso entre a supressão de fluorescência, eficiência de espalhamento e compatibilidade com os detectores CCD.

Basicamente, em um experimento Raman utilizando um equipamento dispersivo, o laser é focalizado sobre a amostra pelo microscópio e a radiação espalhada é coletada e focalizada em direção à fenda de entrada de um espectrômetro, após a remoção da radiação Rayleigh por um filtro, as frequências remanescentes são direcionadas ao detector³⁸. No modo *line-mapping*, o laser é projetado para iluminar uma linha da amostra, e a radiação espalhada é então direcionada para a entrada do monocromador, sendo os espectros espacialmente resolvidos ao longo desta linha, em diferentes alturas do detector. O modo *line-mapping* certamente diminui o tempo de análise porém problemas de quantificação podem surgir devido à iluminação desigual⁵⁸.

No modo *imaging*, o laser é desfocado para iluminar simultaneamente toda a superfície da amostra e a radiação espalhada é passada por um elemento de separação de comprimentos de onda, que pode ser um filtro ótico-acústico sintonizável (*acousto-optic tunable filters* AOTF), ou um filtro de cristal líquido sintonizável (*liquid crystal tunable filters*, LCTF). Estes filtros separam os espectros da área amostrada em seus comprimentos de onda, fornecendo uma imagem de toda a área por comprimento de onda. A vantagem óbvia é a velocidade da aquisição das imagens, comparando-se com o modo *mapping*. Entretanto, este modo apresenta vantagens apenas quando poucos comprimentos de onda são varridos. Se muitos comprimentos de onda são varridos, a vantagem da velocidade de aquisição dos dados é perdida. Outro obstáculo relacionado à este modo é a iluminação desigual, o que pode gerar problemas de quantificação, de forma similar ao modo *line-mapping*, e o fato de que a resolução espectral é limitada pelos elementos de seleção de comprimentos de onda (LCTF ou AOTFs) e tende a ser pior que no modo *mapping*³⁸. Um esquema ilustrativo do

acoplamento de um espectrômetro Raman dispersivo a um microscópio é mostrado na Figura 11.

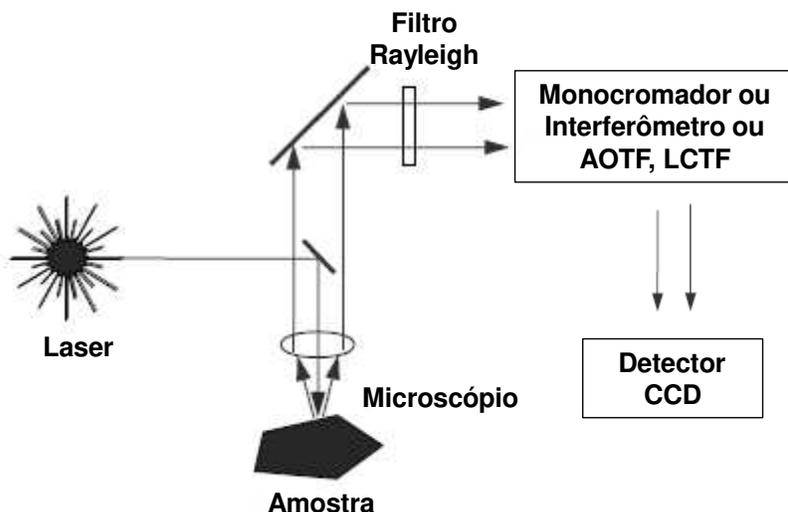


Figura 11: Esquema ilustrativo de um equipamento Raman dispersivo acoplado a um microscópio. Adaptado da referência 38.

Atualmente a detecção em equipamentos Raman é feita quase exclusivamente por detectores CCD de alta eficiência, os quais são empregados tanto no modo *Mapping* quanto no modo *Imaging*. O uso inicial de detectores CCD em equipamentos Raman foi impedido pelo fato do formato do monocromador não ser direcionado para a utilização com detectores em duas dimensões, mas para detectores pontuais, como tubos fotomultiplicadores. A nova geração de monocromadores tem sido planejada de tal maneira que a passagem da radiação é otimizada em relação ao plano do detector CCD⁵⁸.

A espectroscopia Raman de imagem tem se beneficiado da adição da dimensão espacial para resolução de muitos problemas em diversas áreas, porém nesta tese será enfatizada a área farmacêutica. De fato, com a adição de informações espaciais, a espectroscopia de imagem atende as necessidades analíticas atuais do desenvolvimento farmacêutico de produtos e controle de processos, tendo a capacidade de fornecer um grau de entendimento acerca dos mesmos jamais observado anteriormente. Na realidade, a espectroscopia de imagem vem diretamente ao encontro das diretrizes descritas no guia lançado pelo FDA “PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development,

*Manufacturing and Quality Assurance*⁵⁹. Este guia foi emitido dentro da iniciativa denominada “*Pharmaceutical CGMPs for the 21st century: a risk-based approach*” lançada com o objetivo de atualizar o desenvolvimento farmacêutico, a fabricação e garantia da qualidade através da inovação baseada em métodos científicos. Este guia foi também lançado pelo ICH (*International Conference on Harmonization*) para uso mundial como guia ICH-Q8 em 2005⁶⁰.

Devido à versatilidade da espectroscopia Raman de imagem, a mesma pode ser aplicada à diferentes formas farmacêuticas. Para sólidos, encontram-se aplicações na determinação espacial de múltiplos componentes em comprimidos⁵³, no mapeamento de fármacos em baixas concentrações^{61,62}, avaliação da distribuição de diferentes formas polimórficas de fármacos^{63,64,65}, comparação de processos^{66,67}, dentre outras muitas aplicações. A detecção de fármacos em concentrações consideradas baixas para a espectroscopia vibracional (< 1 %) é possível uma vez que o mesmo pode estar altamente concentrado em um ou mais pixels, o que não seria identificado pela análise do *bulk*. Outras formas farmacêuticas também foram avaliadas por espectroscopia Raman de imagem, tais como, por exemplo, adesivos transdérmicos⁶⁸, revestimento de *stents*⁶⁹, spray nasais⁷⁰, formulações líquidas incorporadas em sólidos⁷¹ e formulações semi-sólidas⁷². Além disto, devido à vantagem de não sofrer interferência significativa da água, estudos de dissolução foram descritos⁷³.

Um artigo recente traz uma revisão muito completa das aplicações da espectroscopia Raman de imagem na área farmacêutica⁷⁴. É possível verificar que muitos trabalhos utilizam métodos univariados para a geração das imagens, indicando que existe um grande campo de aplicação para a quimiometria nesta área. A comparação de diferentes métodos quimiométricos para a geração das imagens químicas por espectroscopia Raman foi realizada por Zhang e co-autores⁴⁵ e Vajna e co-autores⁷⁵.

Deve-se ressaltar que outras modalidades da espectroscopia Raman, tais como *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS), *Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy* (CARS), *Stimulated Raman Spectroscopy* (SRS) e *Tip Enhanced Raman Spectroscopy* (TERS) também se beneficiam da adição da

dimensão espacial ao conjunto de espectros e assim, são encontradas muitas aplicações de imagem utilizando estas técnicas, as quais foram recentemente revisadas por Breitzkreitz e Poppi⁷⁶.

7.3. Espectroscopia NIR de imagem: Instrumentação e aplicações

Atualmente, os espectrômetros que operam nas regiões do infravermelho próximo e médio são, em sua grande maioria, interferométricos. Configurações comuns de espectrofotômetros de imagens consistem basicamente em três elementos básicos: o interferômetro em si, um microscópio e um detector sensível à radiação na região do infravermelho. Uma representação esquemática de um interferômetro acoplado a um microscópio é mostrado na Figura 12, tanto para o modo *Imaging* quanto para o modo *Mapping*.

A radiação infravermelha provém da fonte do equipamento e, após passar pelo sistema interferométrico, é dirigida à amostra. Lentes do tipo Cassegrainian são utilizadas para focalizar a radiação sobre a amostra, a qual se encontra em uma plataforma móvel, no caso de amostragem no modo *mapping*. Após a interação com a amostra, a radiação refletida ou transmitida passa através de uma série de aberturas em direção ao detector (no caso de detector de um único elemento). Uma câmera CCD é normalmente colocada ao final do sistema ótico para obter as imagens no visível. Uma série de divisores de feixes ou espelhos pode ser utilizada para a visualização alternada da imagem no visível e para realizar a focalização da radiação na amostra⁷⁷.

Outra possibilidade, também mostrada na Figura 12, é a utilização de um detector do tipo FPA, e, neste modo, não é necessário um posicionador móvel para a amostra e o microscópio não tem aberturas. Desta maneira, a resolução espacial é determinada tanto pela ótica que controla a magnificação quanto pelo tamanho individual do elemento de detecção (pixel) no arranjo do detector FPA⁷⁷. A principal vantagem do uso deste tipo de detector é o tempo na aquisição dos espectros: um interferômetro acoplado com um detector FPA fornece imagens espacialmente resolvidas em tempos comparáveis ao tempo necessário para obter

um único espectro utilizando um detector de elemento único⁷⁷. Como não há aberturas no microscópio, a relação sinal/ruído de detectores FPA é maior que em equipamentos de detectores pontuais⁷⁷. No entanto, a resolução *espectral*, tende a ser de 8-10 cm^{-1} , comparada com 1-4 cm^{-1} nos equipamentos que operam no modo *mapping*⁵⁴.

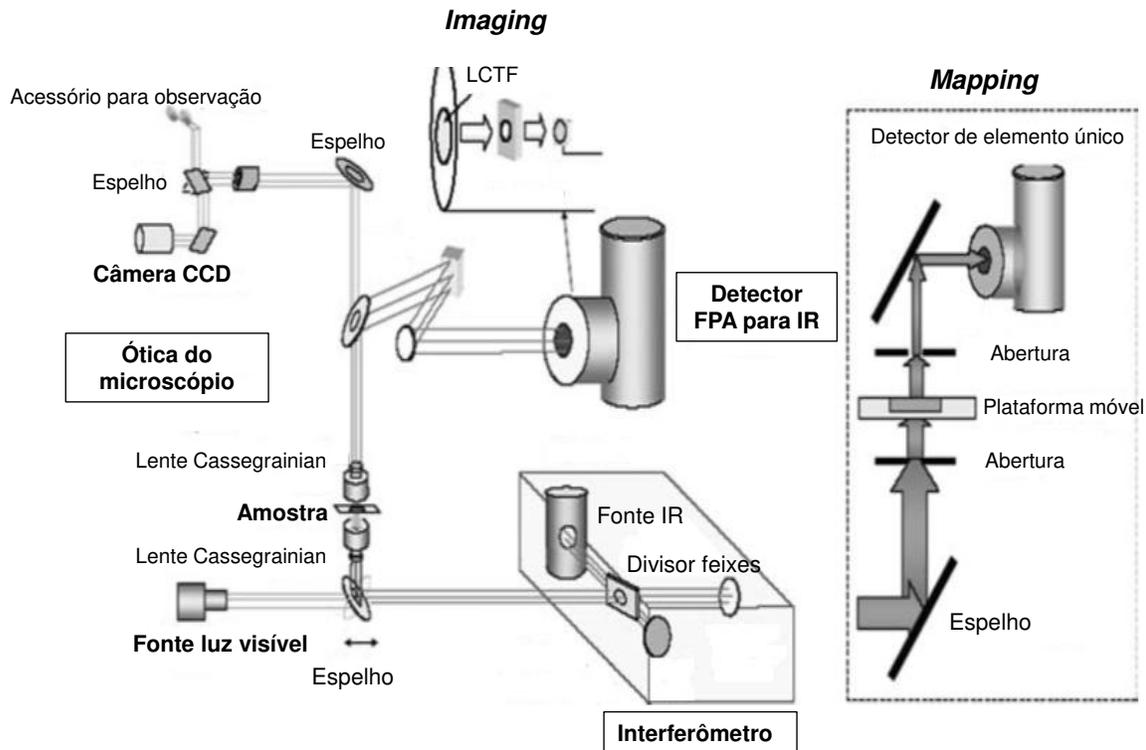


Figura 12: Esquema de um espectrofotômetro de imagem para a região do infravermelho próximo e médio. Adaptado da referência 77.

A espectroscopia NIR de imagem tem encontrado inúmeras aplicações na área farmacêutica, como uma extensão da espectroscopia NIR tradicional, a qual já é bastante estabelecida nesta área⁷⁸. Verifica-se, que as aplicações da espectroscopia NIR de imagem estão mais concentradas em produtos sólidos, cujos espectros são obtidos por reflectância difusa e que esta ferramenta tem tornado possível solucionar problemas mais diversos, tais como: avaliação de homogeneidade em misturas de pós⁷⁹, detecção de impurezas⁸⁰, visualização da distribuição de fármacos e excipientes em medicamentos⁸¹, estudos de uniformidade de conteúdo^{82,83}, avaliação de intermediários de processo⁸⁴,

avaliação da estrutura interna de grânulos de entrega controlada⁸⁵, distribuição das camadas em pellets revestidos⁸⁶, avaliação de cristalinidade⁸⁷, identificação de medicamentos falsificados⁸⁸, dentre outros. São encontradas também aplicações utilizando o modo transmitância para semi-sólidos⁸⁹. As aplicações farmacêuticas da espectroscopia NIR de imagem têm crescido tanto nos últimos anos que já foram revisadas em vários artigos^{90,91}. Assim como para a espectroscopia Raman de imagem, os métodos de extração das informações são variados, sendo mais difícil a utilização do método univariado devido à sobreposição espectral observada na região NIR, não sendo, no entanto, impossível de ser utilizado. Ravn e co-autores revisam e comparam os principais métodos de geração de imagens por espectroscopia NIR⁹². Atualmente livros específicos estão disponíveis para o aprofundamento da teoria, instrumentação e aplicações da espectroscopia vibracional de imagem^{93,94,95}.

7.4. Breve comparação entre a espectroscopia vibracional de imagem Raman e NIR

Comparando-se as técnicas de espectroscopia Raman e NIR, pode-se dizer que ambas apresentam as vantagens de permitirem a aquisição de espectros de forma não invasiva com pouco ou nenhum pré-tratamento da amostra. Adicionalmente, a espectroscopia Raman apresenta ainda as vantagens de fornecer sinais de transições vibracionais fundamentais, os quais são mais intensos e definidos (sem sobreposição espectral) do que os sobretons observados na região NIR e assim, podem ser facilmente atribuídos aos grupos químicos e podem permitir a geração de imagens univariadas. Além disto, amostras biológicas e aquosas são prontamente analisadas com a técnica uma vez que a água não apresenta sinal significativo de espalhamento e assim não interfere significativamente com o espectro dos analitos.

Outro aspecto a ser comparado é a resolução espacial que pode ser alcançada, a qual é definida pela ótica do microscópio e, em última instância, pelo limite de difração da radiação incidente, o qual depende do seu comprimento de

onda. A separação de dois objetos é definida pelo critério de Rayleigh (equação 10):

$$d = 0.61\lambda / NA \quad (10)$$

onde NA representa a abertura numérica (*numerical aperture*) das lentes, definido como $NA = n \sin \theta$, onde n é o índice de refração do meio onde as lentes estão imersas ($NA = 1$ para o ar) e θ é o ângulo de convergência para o elemento de foco⁹³.

Dois objetos estão minimamente separados a uma distância d e completamente separados a uma distância $2d$. Assim, utilizando um laser com comprimento de onda de 780 nm e $NA = 0.9$, temos que $d = 529$ e $2d = 1057$ nm ($\sim 1.1 \mu\text{m}$). Estes valores podem ser melhorados diminuindo o comprimento de onda ou aumentando o valor de NA. Baseado na equação 10, é possível inferir que a resolução espacial para a microscopia Raman é inerentemente superior à microscopia no infravermelho devido aos menores comprimentos de onda utilizados pelos lasers.

Vale ressaltar que, caso não exista um microscópio acoplado ao equipamento, ainda assim é possível fazer a varredura para obtenção de espectros no modo *mapping*. A resolução espacial neste caso será ditada pelo diâmetro do feixe do laser.

8. Objetivo

O objetivo desta tese é avaliar as técnicas de espectroscopia vibracional de imagem Raman e NIR e diferentes métodos quimiométricos - com ênfase ao método CLS - como ferramentas analíticas a serem utilizadas durante o desenvolvimento farmacêutico de formulações de fármacos pouco solúveis em água (classe II do SCB), tendo como exemplo a atorvastatina cálcica, utilizando os excipientes inovadores Gelucire[®] 44/14 e Soluplus[®].

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS

Uma caracterização apropriada das matérias primas é importante para o desenvolvimento de procedimentos experimentais adequados para o preparo das formulações bem como para o entendimento das características das mesmas. Desta maneira, a atorvastatina cálcica Forma I adquirida comercialmente, a atorvastatina amorfa preparada em nosso laboratório, o Gelucire[®] 44/14 e o Soluplus[®] foram caracterizados empregando diferentes técnicas analíticas.

1. Procedimento Experimental

1.1. Materiais

A atorvastatina cálcica (ATC) na sua forma polimórfica I (trihidratada) foi adquirida do Laboratório Raffo S.A (Argentina). A atorvastatina amorfa foi preparada no nosso laboratório pela solubilização completa da Forma I em metanol, seguida da secagem em rotoevaporador. O Gelucire[®] 44/14 e Soluplus[®] foram recebidos como amostra grátis dos fabricantes Gattefosse (França) e BASF (Alemanha), respectivamente.

1.1. Técnicas analíticas utilizadas para caracterização

A atorvastatina Forma I e amorfa foram avaliadas por análise térmica, incluindo Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TGA), Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia NIR e Raman. A pureza química da atorvastatina adquirida comercialmente foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os excipientes Gelucire[®] 44/14 e Soluplus[®] foram caracterizados por DSC, TGA e Difração de Raios-X.

1.1.1. *Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)*

A análise de calorimetria diferencial de varredura foi realizada em um equipamento da TA Instruments, modelo 2910, na faixa de temperatura de 25 a 220 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera inerte (argônio 50 mL/min). Foi pesada uma massa entre 3-12 mg da amostra e colocada em um cadinho de alumínio com a tampa furada.

1.1.2. *Termogravimetria (TGA)*

A análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento da TA Instruments modelo TGA 2050 na faixa de temperatura de 25 a 220 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min., atmosfera inerte (argônio 100 mL/min), com massa de amostra de 3-12 mg em cadinho de alumina.

1.1.3. *Difração de Raios-X (DRX)*

Os difratogramas de Raios-X do fármaco e dos excipientes foram obtidos utilizando um equipamento Shimadzu XRD7000 com as seguintes condições: radiação Cu (1.54060 Å), voltagem 40 kv, corrente: 30 mA, faixa: 1,4 – 50 graus 2 θ .

1.1.4. *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

Foi utilizado um cromatógrafo Líquido marca Shimadzu, constituindo de auto-injetor com amostragem de 10 μ L; detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (faixa de 190 a 370 nm), cela de 8 μ L de volume, 10 mm de caminho óptico.

O método utilizado foi adaptado do trabalho descrito por Shah e colaboradores⁹⁶. A coluna cromatográfica utilizada foi da marca Waters, de diâmetro interno de 0,39 cm e comprimento de 15 cm, recheada com fase ligada C18, de tamanho de partícula 4 μ m. A fase móvel foi uma mistura de água purificada pelo sistema Milli Q com pH ajustado para 3.0 pela adição de ácido fosfórico e acetonitrila (ACN) na proporção 55:45 (v/v). O fluxo empregado foi de 1,2 mL/min. A detecção foi realizada espectrofotometricamente a 245 nm (máximo de absorção do fármaco).

A atorvastatina adquirida como matéria-prima foi solubilizada em metanol na concentração de 0,6 mg/mL, concentração determinada experimentalmente de modo a obter sinal adequado para a visualização das impurezas. A pureza foi estimada pela porcentagem relativa da área do fármaco em relação à soma das áreas, incluindo as impurezas.

1.1.5. Espectroscopia NIR

Os espectros NIR do fármaco amorfo e cristalino Forma I foram obtidos empregando-se um espectrofotômetro modelo Spotlight 400N da PerkinElmer (Figura 13). Os espectros foram obtidos colocando-se os pós dos fármacos em uma cela (sem compactação) e foi feita uma varredura de uma área de 1 mm^2 , com pixel de $50 \text{ }\mu\text{m}$, 32 scans/pixel, na faixa espectral de $7800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 16 cm^{-1} no modo refletância, utilizando uma superfície de ouro polida como referência. O espectro apresentado representa o espectro médio da área amostrada.

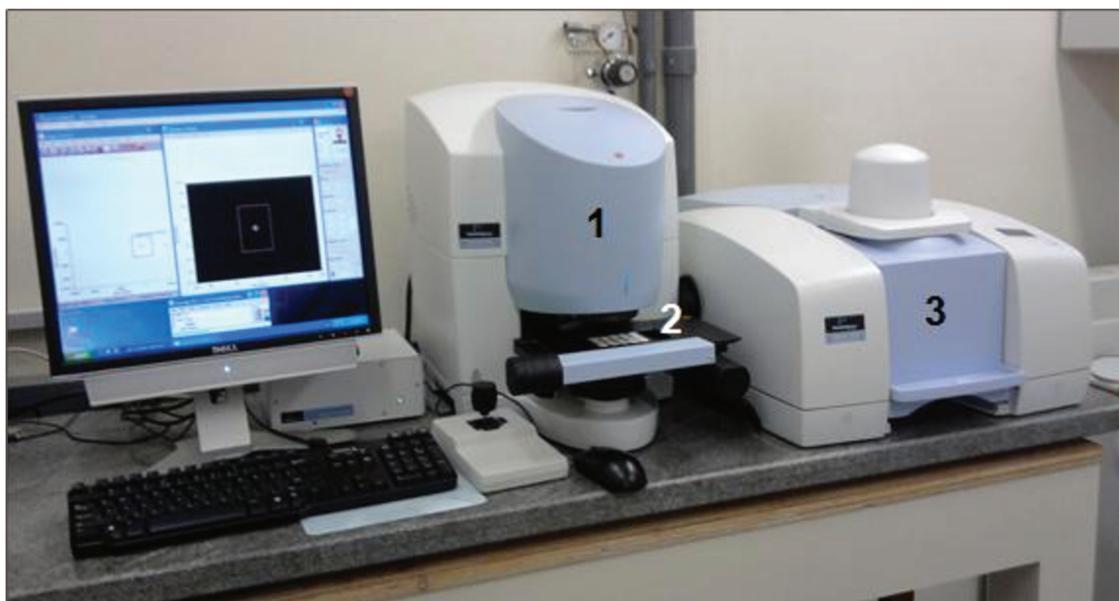


Figura 13: Equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging System da Perkin-Elmer. 1) compartimento da ótica do microscópio; 2) posicionador de amostra; 3) espectrofotômetro NIR.

1.1.6. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman do fármaco amorfo e cristalino Forma I foram obtidos empregando-se o equipamento Raman Station 400 (Perkin Elmer), equipado com laser de excitação de 785 nm (Figura 14). Similarmente ao descrito anteriormente para a espectroscopia NIR, os pós dos fármacos foram colocados em uma cela e

foi varrida uma área de 1 mm^2 , com pixel de $50 \text{ }\mu\text{m}$, na faixa de $3200 - 600 \text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

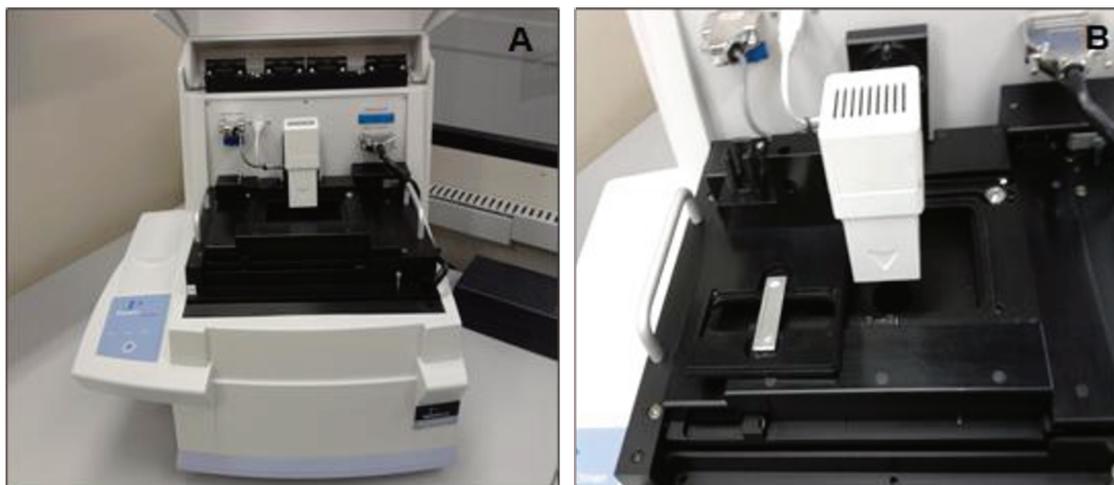


Figura 14: (A) Visão geral do equipamento Raman Station 400; (B) detalhe da câmera e cela de alumínio utilizada nas medidas.

2. Resultados

2.1. Caracterização do fármaco

Os resultados das análises de DSC e TGA para a atorvastatina adquirida como matéria-prima são mostrados na Figura 15. A curva de DSC, mostrada na Figura 15 A, apresenta dois picos endotérmicos: o primeiro na faixa de $70 - 120 \text{ }^\circ\text{C}$ e o segundo em torno de $160 \text{ }^\circ\text{C}$. A curva de TGA, mostrada na Figura 15 B, indica que existe uma perda de massa de aproximadamente 4% entre 70 e $125 \text{ }^\circ\text{C}$, indicando que o fenômeno observado no DSC é de natureza física, provavelmente perda de água. Pode-se observar também que esta perda se dá em duas etapas: uma até $70 \text{ }^\circ\text{C}$ e outra de $100 - 120 \text{ }^\circ\text{C}$, as quais podem ser atribuídas à perda de água de superfície e perda de água de hidratação, respectivamente. Por outro lado, o pico observado em $160 \text{ }^\circ\text{C}$ na curva de DSC não é acompanhado de perda de massa na curva de TGA, indicando se tratar de um fenômeno físico, atribuído à fusão do fármaco. Os resultados estão de acordo com o encontrado na literatura^{24,97}. A Figura 15 C mostra a ampliação da curva de

TGA até 500° C, e indica que a maior perda de massa se dá após 200° C, devido à degradação do fármaco, sendo portanto, possível trabalhar até esta temperatura sem que aconteça degradação térmica.

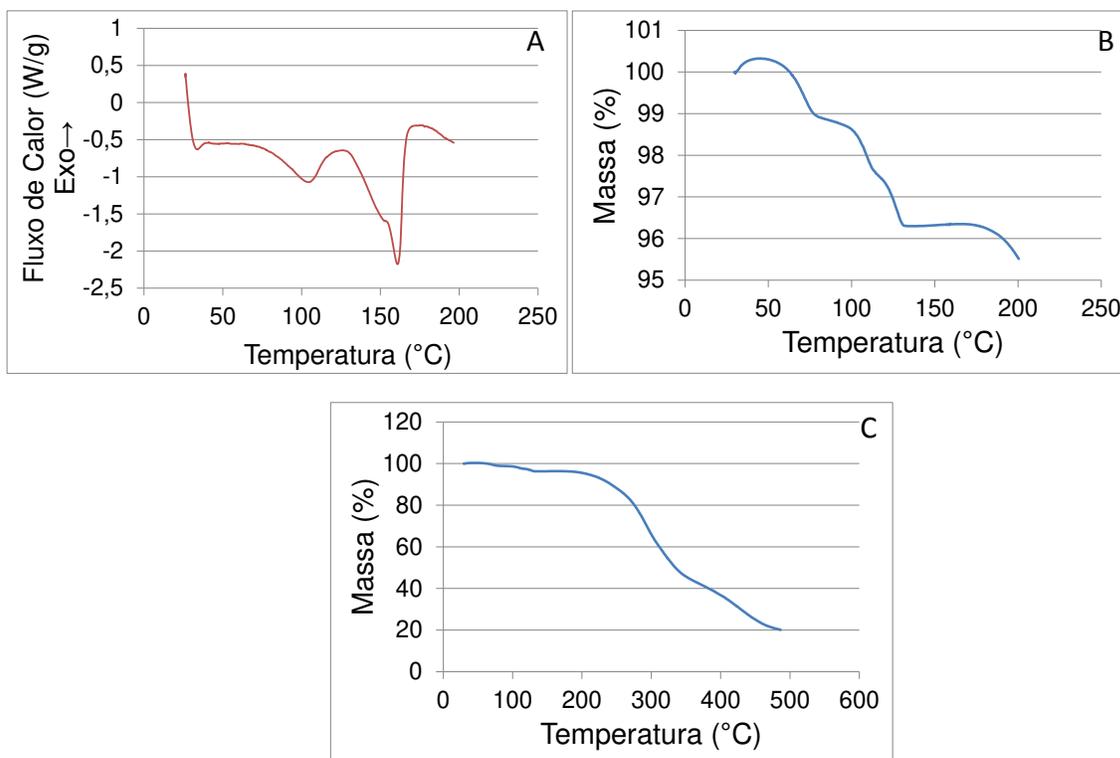


Figura 15: Caracterização térmica da atorvastatina cálcica adquirida comercialmente: (A) curva de DSC, (B) curva de TGA na faixa de temperatura de 30-200 °C e (C) ampliação da curva de TGA na faixa de temperatura de 30-500°C.

O difratograma de Raios-X é mostrado na Figura 16 e os valores de graus 2- θ observados neste difratograma são descritos na Tabela III, juntamente com os valores encontrados na literatura para a Forma I da atorvastatina^{97,98}. Através da comparação dos valores graus 2- θ observados experimentalmente com aqueles descritos na literatura, pode-se confirmar que o fármaco recebido corresponde de fato à Forma I da atorvastatina cálcica.

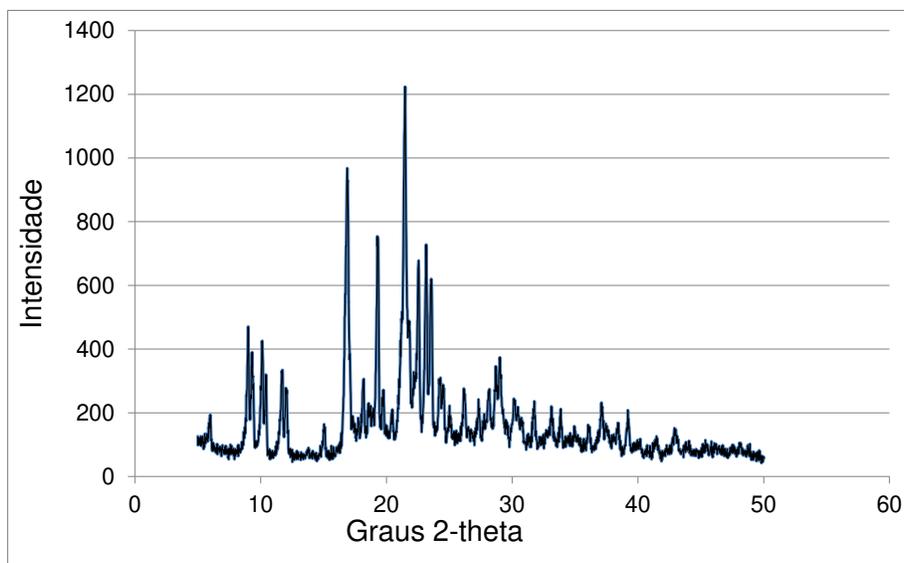


Figura 16: Difratoograma de Raios-X da atorvastatina adquirida comercialmente.

Tabela III: Valores de 2- θ para os principais picos observados experimentalmente para a atorvastatina cálcica e correspondentes valores encontrados na literatura.

Observado (graus 2-theta)	Literatura (Tessler <i>et al.</i> ⁹⁸ , graus 2-theta \pm 0.2)	Literatura (Kim <i>et al.</i> ⁹⁷ , graus 2-theta)
9,5	9,5	9,4
10,1	10,3	10,2
10,4	10,6	10,5
11,7	11,9	11,8
16,9	17,1	16,9
19,3	19,5	19,5
21,5	21,6	21,6
22,6	22,7	22,6
23,2	23,3	23,2
24,2	24,4	23,7
29,0	28,9	

As curvas de DSC, TGA e difratograma da forma amorfa são mostradas na Figura 17. Para esta forma, a curva de DSC (Figura 17 A) apresenta um pico endotérmico na faixa de temperaturas de 50-120° C, o qual pode ser atribuído a um evento químico, pois há perda de massa associada (em torno de 2,5 % de

acordo com a curva de TGA mostrada na Figura 17 B). Este evento pode ser a evaporação de um solvente, possivelmente o próprio metanol utilizado, pois seu ponto de ebulição é de 68° C. O pico de fusão da atorvastatina em 160 °C não foi mais observado. Estes resultados também estão de acordo com o descrito na literatura para a forma amorfa da atorvastatina²⁹. A Figura 17 C mostra a ampliação da curva de TGA até 500° C, a qual indica que a decomposição da forma amorfa acontece também somente acima de 200° C. Conforme esperado, o difratograma de Raios-X (Figura 18) não apresentou picos definidos, confirmando que a forma amorfa foi obtida pelo processo de solubilização em metanol seguido de secagem.

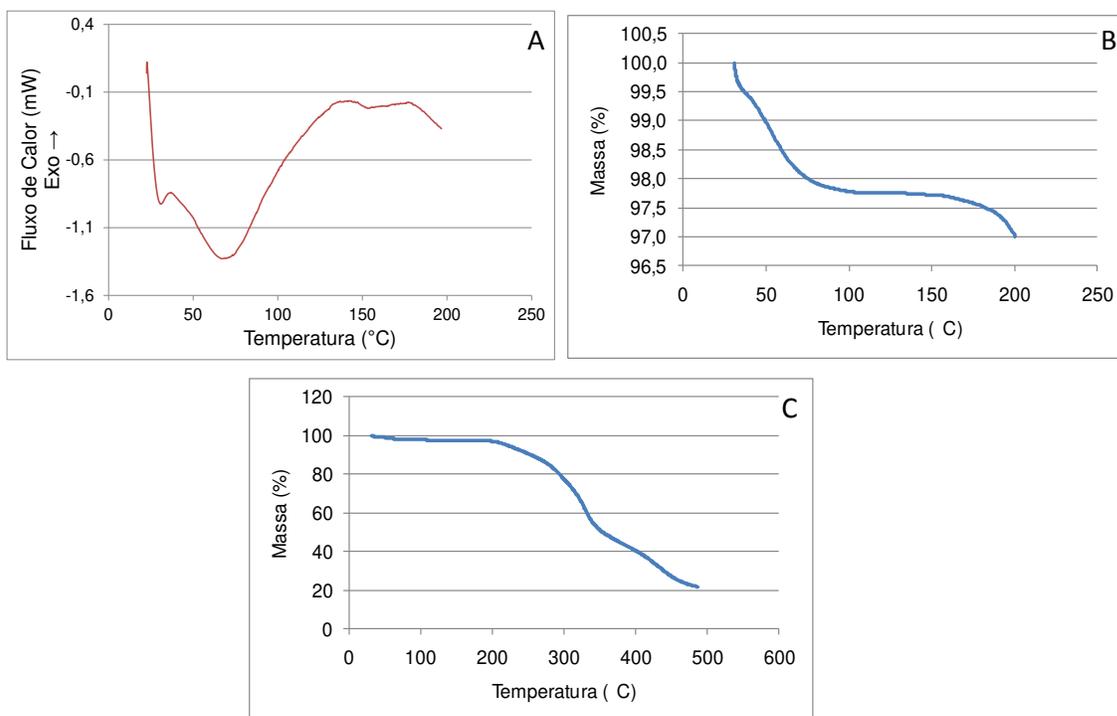


Figura 17: Caracterização térmica da atorvastatina cálcica amorfa preparada em laboratório: (A) curva de DSC, (B) curva de TGA na faixa de temperaturas de 30-200 °C e (C) ampliação da curva de TGA na faixa de temperatura de 30-500°C.

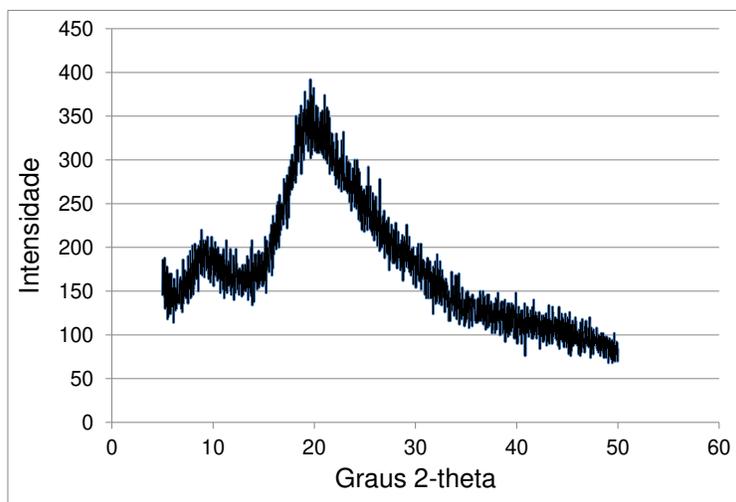


Figura 18: Difratoograma de Raios-X da atorvastatina amorfa preparada em laboratório.

O espectro Raman da forma cristalina I é mostrado na Figura 19, em comparação com o espectro da forma amorfa com destaque para a região entre 1600 e 1700 cm^{-1} . As regiões de absorção dos principais grupos funcionais encontrados na molécula são mostradas na Tabela IV e foram atribuídos de acordo com o *Handbook of Infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*⁹⁹.

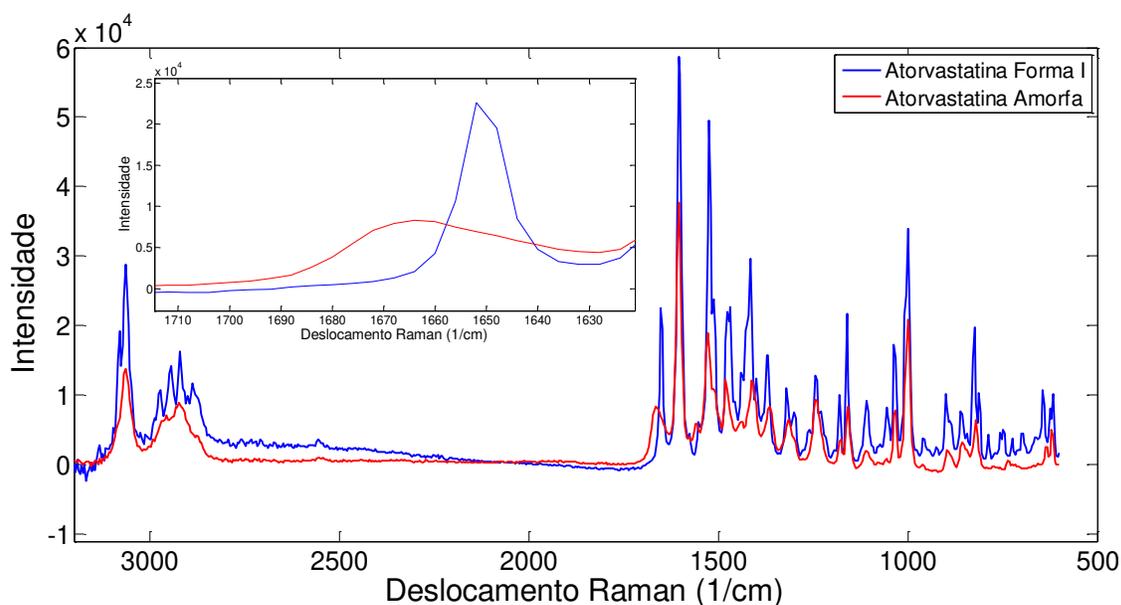


Figura 19: Comparação dos espectros Raman das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina. *Inset*: destaque para a região entre 1700 – 1600 cm^{-1} .

Tabela IV: Regiões de frequências observadas no espectro Raman das duas formas da atorvastatina e a correspondente atribuição.

Frequências características (cm ⁻¹)	Atribuição
1680-1630	Est. C=O em amidas monosubstituídas
1570-1510	CHN estiramento-deformação* em amidas monosubstituídas
1310-1250	CHN estiramento aberto (<i>stretch-open</i>) em amidas monosubstituídas
1510	Deformação CNH em Ar-NHR
1570-1515	Deformação CNH em C=ONHR
1350-1280	Estiramento C-N em Ar-NHR
1350-1310	Estiramento C-N em C=ONHR
1650-1540	Estiramento COO- antisimétrico
1450-1360	Estiramento COO- simétrico
1620-1400	Vibrações do anel aromático

*Esta vibração envolve tanto o estiramento C-N quanto a deformação C-N-H no plano.

Os espectros Raman das duas formas indicam que a composição química é a mesma, porém as diferenças devido ao empacotamento das moléculas são evidentes. A maior modificação do espectro da forma cristalina I para a forma amorfa ocorre em 1650 cm⁻¹, devido ao estiramento C=O do grupo amida, o qual é deslocado para 1670 cm⁻¹ na forma amorfa. Outras diferenças, como deslocamento e ausência de picos também podem ser observadas.

Os espectros NIR das duas formas são mostrados de forma comparativa na Figura 20, com destaque para a região de 5100-4700 cm⁻¹, onde são observadas as maiores diferenças. As bandas na região NIR são largas e sobrepostas, o que torna a atribuição mais difícil. Entretanto, é possível avaliar, de forma qualitativa, as regiões onde os principais grupos químicos absorvem³³. Os picos em 6589 cm⁻¹ (forma cristalina I) e 6703 cm⁻¹ (forma amorfa) estão relacionados ao 2^o sobretom da vibração do grupo amida. A região de 5000 – 4800 cm⁻¹ apresenta combinações de vibrações as quais podem ser atribuídas aos grupos amida ou OH. Assim, de maneira equivalente ao observado com a espectroscopia Raman, o grupo amida apresenta grande influência para a diferenciação das duas formas polimórficas.

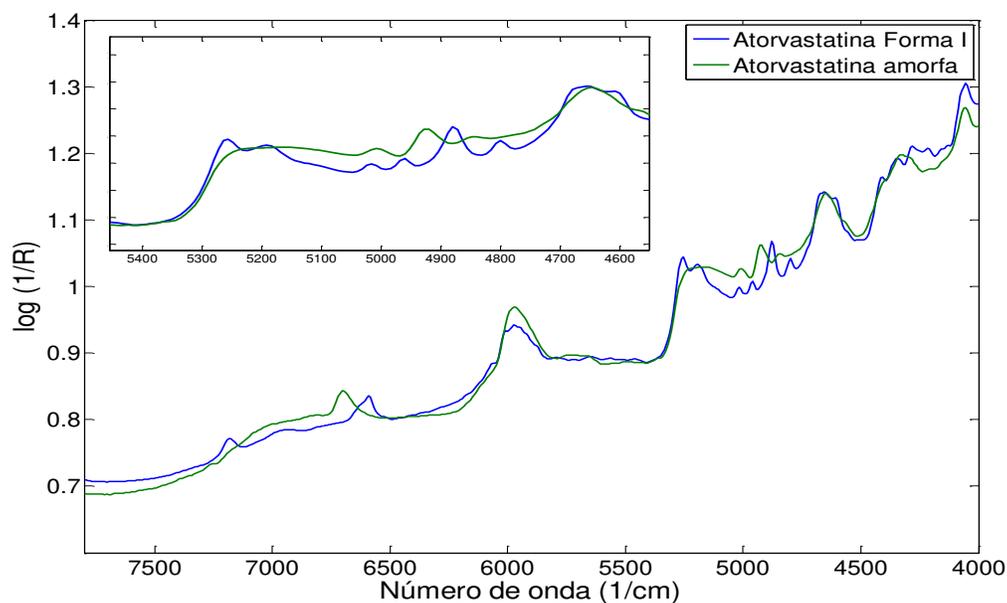


Figura 20: Comparação dos espectros NIR das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina. *Inset*: destaque para a região entre 5400 – 4600 cm^{-1} .

A pureza cromatográfica da matéria-prima adquirida foi avaliada por HPLC. A concentração de 0,6 mg/mL forneceu sinal adequado para a integração das impurezas, sem saturar o detector e por este motivo foi selecionada para o cálculo da pureza cromatográfica. A pureza cromatográfica foi estimada pela porcentagem relativa da área do fármaco em relação à soma das áreas, sendo a integração realizada no máximo de absorção do fármaco (245 nm). O cromatograma obtido nesta concentração é mostrado na Figura 21. A pureza cromatográfica estimada desta maneira foi de 99,08 %, um valor adequado para se trabalhar com esta matéria-prima.

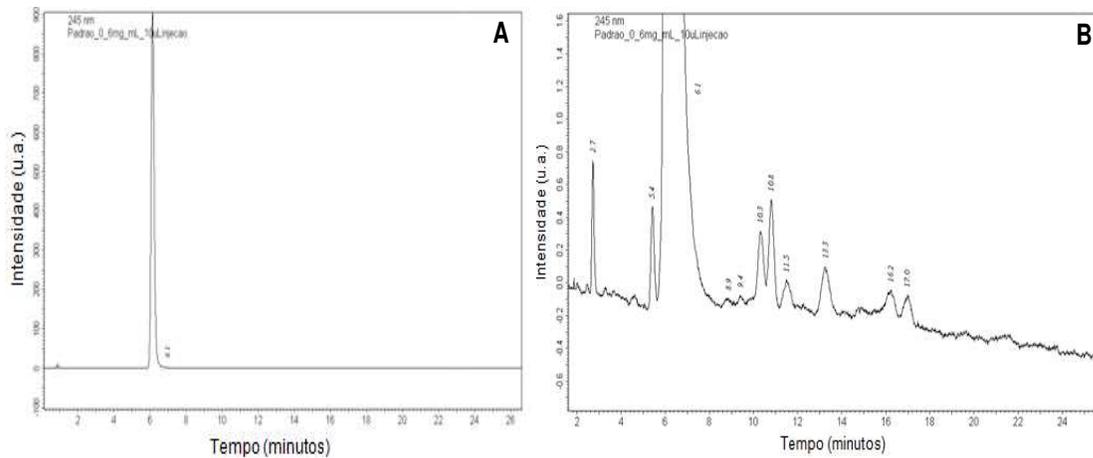


Figura 21: Cromatogramas da análise da atorvastatina matéria-prima: (A) pico do fármaco e (B) ampliação da linha de base para mostrar as impurezas.

2.2. Caracterização dos excipientes

De acordo com o fabricante⁸, o Gelucire[®] 44/14 é um excipiente cristalino que deve apresentar temperatura de fusão próxima a 44 °C. A curva de DSC, o difratograma de raios-X e a curva de TGA obtidos experimentalmente são mostrados na Figura 22. A curva de DSC apresenta um evento endotérmico que se inicia em 30 °C e termina em 55 °C, com máximo em 48 °C. O difratograma indica que o material é de fato cristalino. A curva de TGA mostra que a perda de massa se inicia em 200 °C, indicando que é possível aquecer este material até esta temperatura sem que ocorra degradação. Esta curva também demonstra que o evento endotérmico apresentado na análise de DSC é de fato um evento físico (fusão), pois não há perda de massa associada à esta faixa de temperaturas.

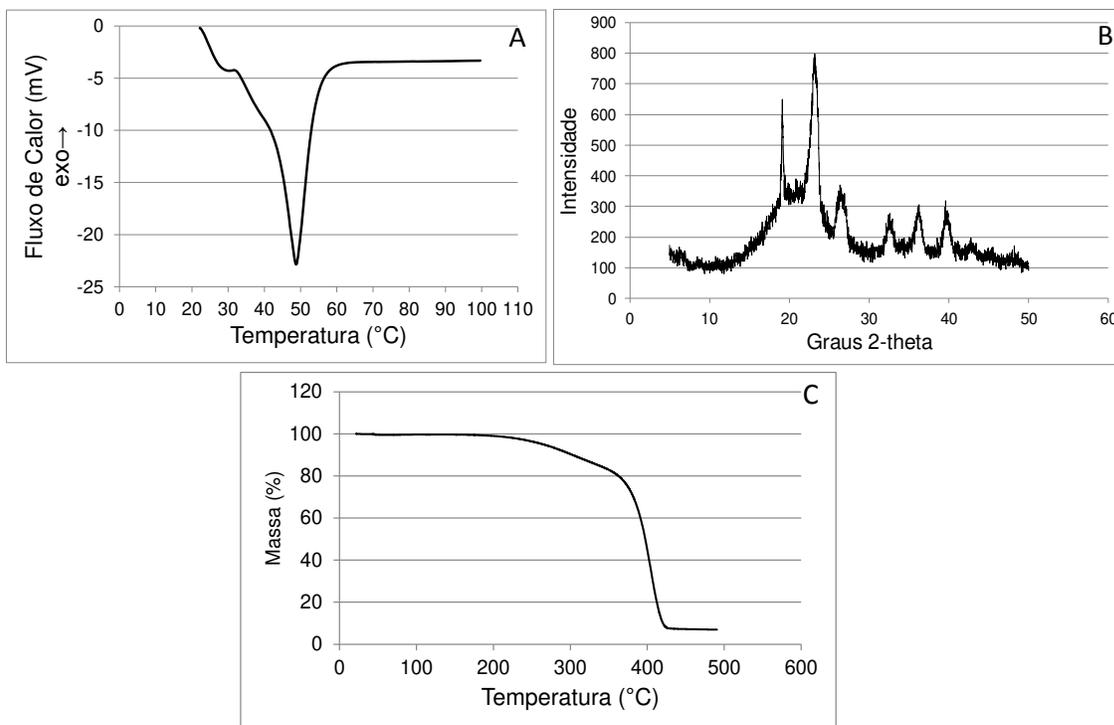


Figura 22: Resultados da caracterização do Gelucire® 44/14: (A) curva de DSC, (B) Difratoograma de raios-X e (C) curva de TGA na faixa de temperatura de 30-500°C.

De acordo com o fabricante⁹, o Soluplus® é um polímero amorfo que tem temperatura de transição vítrea próxima a 70 °C. A curva de DSC e o difratograma de raios-X são mostrados na Figura 23. Conforme é possível verificar nesta Figura, a curva de DSC apresenta uma banda larga representando um evento endotérmico com um máximo em 75° C, o que está de acordo com o esperado para o Soluplus® e não existe um padrão de difração característico de sólidos cristalinos, indicando, portanto que o polímero é amorfo.

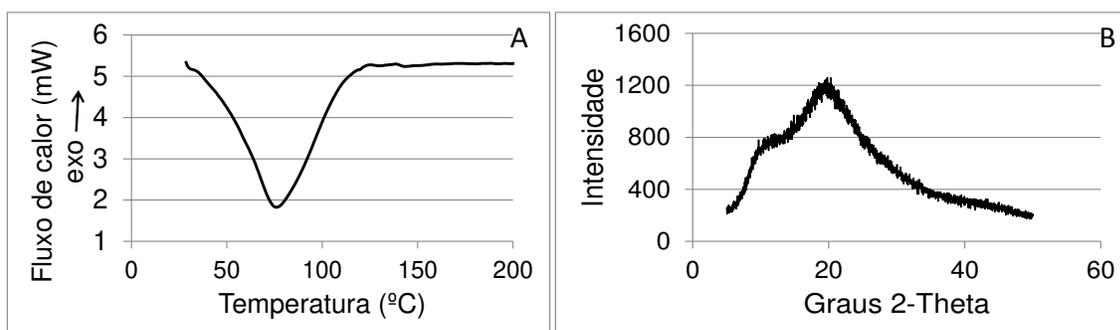


Figura 23: Resultados da caracterização do Soluplus®: (A) curva de DSC e (B) Difratoograma de raios-X.

3. Conclusões

Nesta etapa do trabalho foi verificado que o fármaco corresponde à forma polimórfica esperada (forma I) e que apresenta pureza analítica adequada para seu uso (> 99,0 %). Foi verificado que o mesmo apresenta estabilidade térmica até 200 °C, podendo, portanto ser utilizado em procedimentos que envolvam seu aquecimento. As principais bandas nos espectros NIR e Raman foram caracterizadas. A forma amorfa foi preparada com sucesso pela solubilização em metanol seguida da evaporação do solvente, conforme demonstrado por DSC e Difração de Raios-X. Esta amostra foi preparada com o intuito de caracterizar os espectros NIR e Raman da forma amorfa caso os processos utilizados empregando a forma cristalina I levem à sua formação. Os excipientes também foram caracterizados e se encontravam de acordo com as especificações dos fabricantes.

**CAPÍTULO 3: DISPERSÕES SÓLIDAS
DE ATORVASTATINA EM GELUCIRE®
44/14 PREPARADAS PELO MÉTODO
DA FUSÃO**

O método mais simples de preparo de dispersões sólidas empregando o Gelucire® 44/14 é o método da fusão ou *Hot-melt*^{13,14} e por este motivo ele foi avaliado primeiro. Este método envolve a fusão do excipiente semi-sólido com aquecimento brando e posterior adição do fármaco, gerando uma solução ou uma dispersão, dependendo da solubilidade do fármaco no excipiente fundido. A mistura é então resfriada a temperatura ambiente ou industrialmente ela é encapsulada enquanto ainda quente em cápsulas de gelatina duras, para que esfrie e tome forma dentro das cápsulas. Se a solubilização for completa, o fármaco deve estar em sua forma amorfa após o resfriamento. Caso contrário, o produto será uma dispersão contendo o fármaco na sua estrutura cristalina original. Caso o fármaco seja apenas parcialmente solúvel, uma mistura de polimorfos será formada, o que não é desejável do ponto de vista farmacêutico.

1. Procedimento Experimental

1.1. Preparo das amostras

As amostras foram preparadas empregando o método da fusão na faixa de concentração de 5 – 27,5 % de atorvastatina (% m/m, Tabela V). O Gelucire® 44/14 foi fundido em um béquer a temperatura de aproximadamente 70 °C, em seguida o fármaco cristalino foi adicionado, com agitação até a obtenção de uma dispersão visualmente homogênea. As amostras foram então resfriadas à temperatura ambiente. Amostras com concentrações do fármaco superiores a 27,5 % se mostraram inviáveis devido ao fato das mesmas se apresentarem muito viscosas durante o preparo e muito endurecidas após o resfriamento.

Tabela V: Concentração dos constituintes nas dispersões sólidas de atorvastatina em Gelucire® 44/14 preparadas pelo método da fusão.

Amostra	Atorvastatina (% m/m)	Gelucire (% m/m)
1	5,0	95,0
2	7,3	92,7
3	10,0	90,0
4	12,4	87,6
5	14,9	85,1
6	17,5	82,5
7	19,9	80,1
8	22,5	77,5
9	25,0	75,0
10	27,5	72,5

1.2. Obtenção das imagens químicas

As imagens foram obtidas empregando-se o equipamento Raman Station 400 (Perkin Elmer), mostrado na Figura 14. As amostras foram colocadas em uma cela de alumínio, confeccionada especialmente para esta finalidade e foi mapeada uma área 9 mm², com pixel de 100 um, na faixa espectral de 1800 – 600 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹. Espectros dos constituintes puros (Gelucire® 44/14 e das duas formas polimórficas da atorvastatina) também foram obtidos na forma de imagem, com uma área menor (1 mm²) para que fosse feita uma média dos espectros, a qual seria utilizada para representar o constituinte puro nos cálculos quimiométricos.

1.3. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados

A primeira etapa de pré-tratamento dos dados foi a remoção de *spikes*. Para isto, foi desenvolvido em nosso grupo de pesquisa um novo algoritmo que identifica e corrige *spikes* com base na comparação com os sinais dos pixels vizinhos¹⁰⁰. Os *spikes* são sinais estreitos gerados por raios cósmicos que atingem a Terra, os quais são detectados pelos detectores do tipo CCD, utilizados em espectroscopia Raman. Na referência 100, foi descrito o princípio de funcionamento do algoritmo utilizado e demonstrou-se que o mesmo não altera os espectros originais. Os resultados desta etapa foram tratados utilizando o

procedimento de calibração univariada, regressão em mínimos quadrados clássicos (CLS), regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) e análise de componentes principais (PCA). Para os cálculos empregando CLS, os espectros puros foram normalizados para comprimento unitário devido às grandes diferenças de intensidade entre espectros do fármaco e dos excipientes. Para cálculos empregando PCA os dados foram centrados na média. Para os cálculos empregando o método PLS, cada amostra de calibração foi adquirida como um hiper-cubo espectral, sendo que o espectro médio de cada amostra foi utilizado para a calibração. Foi necessária uma correção de linha base do tipo polinomial na matriz dos espectros médios para remover pequenas flutuações entre os mesmos. Os dados foram então centrados na média.

Os cálculos foram realizados em ambiente Matlab 7.8, com rotinas escritas para cada finalidade e, quando necessário, também empregando o PLS Toolbox versão 6.7.

1.4. Teste de solubilidade

As dispersões sólidas foram avaliadas em relação à sua solubilidade em água de maneira visual (para detectar possível precipitação do fármaco) e por CLAE (para quantificar de maneira efetiva a porcentagem de fármaco solubilizado). Para isto, foram pesadas massas de cada uma das amostras de tal maneira a se obter 80 mg de fármaco (maior dosagem da atorvastatina) e adicionadas a um erlenmeyer contendo 250 mL de água destilada (simulando a tomada do medicamento com um copo de água), fornecendo uma concentração de 0,32 mg/mL do fármaco. Esta concentração representa uma condição de supersaturação que não seria alcançada com formulações tradicionais. As amostras foram agitadas em um agitador de frascos da marca Dubnoff (Figura 24), com rotação e 100 rpm, temperatura de 37 °C (simulando a temperatura corporal) por 60 minutos.



Figura 24: Agitador de frascos Dubnoff com movimento recíproco e banho-maria com ajuste de temperatura. (A) visão geral do equipamento, com tampa para manter a temperatura constante e (B) parte interna do equipamento, onde as amostras são colocadas para agitação.

Após os 60 minutos com agitação, as amostras foram avaliadas visualmente e aquelas que não apresentaram precipitação do fármaco no fundo do erlenmeyer foram filtradas e quantificadas por CLAE empregando uma curva analítica construída na faixa de concentrações de 0,10 a 0,40 mg/mL. Também foi determinada a solubilidade do fármaco puro (forma cristalina I e forma amorfa) e do medicamento Lipitor®. As corridas cromatográficas foram realizadas empregando-se o sistema cromatográfico e o método descritos no item 1.1.4 Os resultados reportados são médias de três amostragens, com seus respectivos intervalos de confiança.

2. Resultados e Discussão

2.1. Geração de imagens empregando o método univariado

Conforme mostrado na Figura 19, os espectros Raman da forma amorfa e da forma cristalina da atorvastatina apresentaram diferenças significativas, e, portanto, espera-se que seja possível identificar e quantificar a forma polimórfica presente nas dispersões sólidas preparadas. A Figura 25 mostra de forma comparativa, o espectro do Gelucire® 44/14, juntamente com as duas formas polimórficas da atorvastatina. O asterisco indica os picos que serão utilizados para calibração univariada.

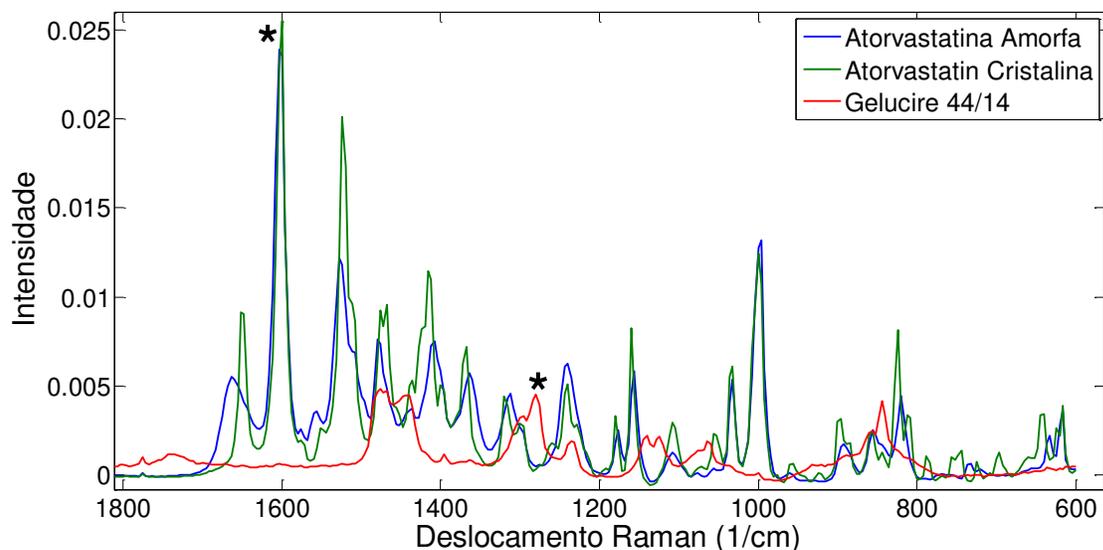


Figura 25: Espectros Raman das duas formas polimórficas da atorvastatina, juntamente com o espectro do Gelucire® 44/14 após normalização.

Conforme é possível observar na Figura 25, o Gelucire® 44/14 não tem sinal na região de $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, região na qual as duas formas polimórficas da atorvastatina são facilmente identificáveis. Conforme mencionado anteriormente, o pico em 1650 cm^{-1} observado na forma cristalina devido ao estiramento C=O do grupo amida, é deslocado para 1670 cm^{-1} na forma amorfa. Isto permite identificar, de maneira simples e visual, a forma polimórfica da atorvastatina presente nas dispersões. Os espectros médios de todas as dispersões são mostrados na Figura 26.

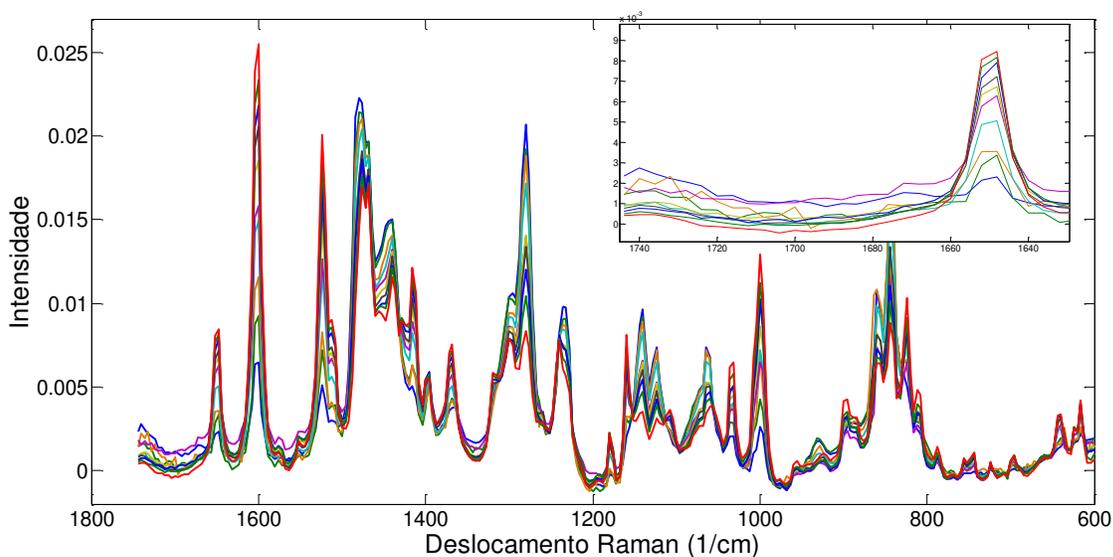


Figura 26: Espectros Raman médio das dez dispersões sólidas. *Inset*: Destaque para a região de 1640 – 1740 cm^{-1}

Observando a Figura 26 é possível inferir que o sinal em 1650 cm^{-1} se manteve, não sendo observado nenhum deslocamento para 1670 cm^{-1} , indicando que a atorvastatina permaneceu na sua forma polimórfica original. Isto está de acordo com a observação realizada durante o preparo das dispersões de que a atorvastatina é praticamente insolúvel no Gelucire® 44/14.

Considerando que a forma amorfa não está presente nas dispersões e que o Gelucire® 44/14 não apresenta sinal na região de $1700\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$, foi possível selecionar um sinal específico para a atorvastatina cristalina (o pico em 1600 cm^{-1} foi selecionado, embora existam outros) para a geração de uma imagem empregando calibração univariada, que seria o método mais simples para o tratamento destes dados. De maneira similar, buscou-se um sinal seletivo para o Gelucire® 44/14, tendo sido selecionado o número de onda de 1280 cm^{-1} . Estes dois sinais são indicados por um asterisco na Figura 25. As curvas analíticas univariadas construídas são mostradas na Figura 27 para a atorvastatina e Gelucire® 44/14, juntamente com os sinais espectrais nestes dois comprimentos de onda.

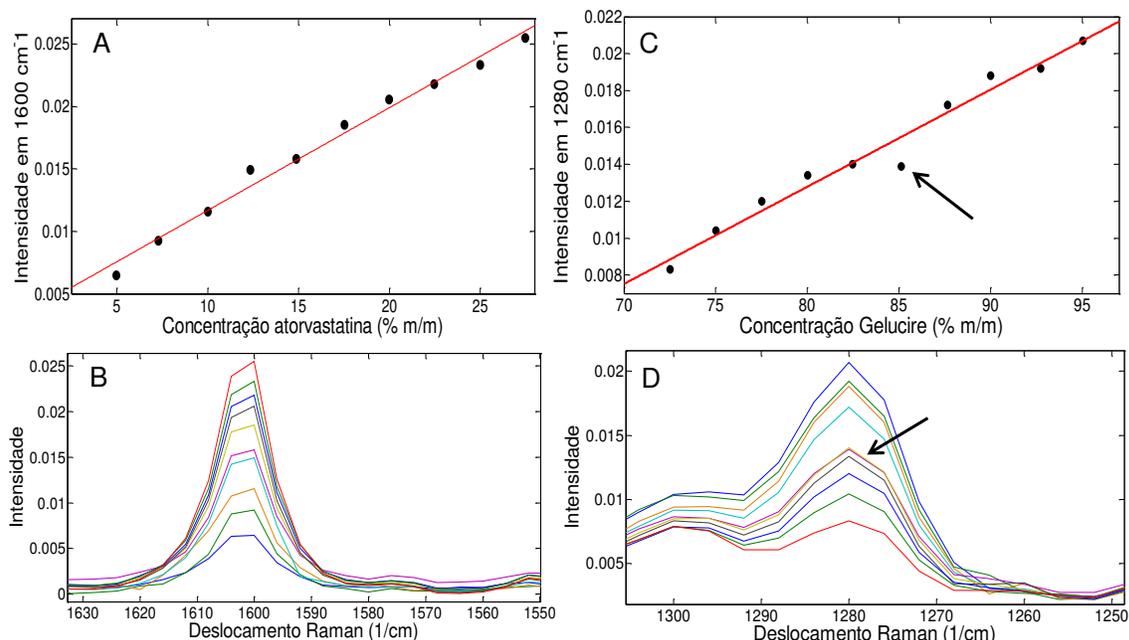


Figura 27: (A) Curva analítica univariada para a quantificação da atorvastatina cristalina e (B) região espectral contendo o número de onda utilizado (1600 cm^{-1}); (C) Curva analítica univariada para a quantificação do Gelucire® 44/14 e (D) região espectral contendo o número de onda utilizado (1280 cm^{-1}).

Como é possível verificar na Figura 27, de maneira geral, o incremento de sinal pode ser considerado linear com a concentração. No entanto, foi observado que o ponto referente à amostra número 5 (Tabela V), cuja concentração média de Gelucire® 44/14 é de 85,12 % apresentou um sinal anômalo em 1280 cm^{-1} , o qual não é anômalo para a atorvastatina em 1600 cm^{-1} . Este sinal anômalo pode ser devido a um erro instrumental durante a medida e, ao invés de retirar este ponto ou refazê-lo, ele será utilizado para ilustrar como os métodos uni e multivariados são capazes de lidar com um sinal anômalo.

Quando a concentração média (*bulk concentration*) dos constituintes na amostra é conhecida, esta pode ser empregada para avaliar se o método utilizado para a geração dos mapas de distribuição é adequado. Isto é feito por meio da comparação do valor médio previsto com o valor experimental. Se o mapeamento foi realizado em uma área representativa da amostra, *na média*, o valor previsto deve coincidir com o valor experimental, independentemente da distribuição dos valores de concentração nos pixels. Outra maneira de avaliar a adequação é a

complementariedade das imagens. Imagens geradas por um método exato devem ser complementares e isto é muito facilmente verificado para imagens de dois componentes apenas. Esta complementariedade também pode ser observada nos histogramas de valores de concentração previstos para cada um dos componentes da amostra: no caso de dois componentes apenas, os histogramas devem ser a imagem especular um do outro.

Observando-se a Figura 27 A e C, espera-se que a previsão univariada das concentrações dos dois componentes seja exata para todas as amostras, exceto para o Gelucire® 44/14 na amostra 5, pois o resíduo desta amostra é alto em relação à curva analítica utilizada para a previsão das concentrações nos pixels. Isto de fato se comprovou e, para ilustrar este fato, são mostradas na Figura 28 e 29 as imagens univariadas das amostras 4 (amostra normal) e 5 (amostra com sinal anômalo em 1280 cm^{-1}), respectivamente. As imagens foram geradas por meio da previsão dos valores de concentração nos pixels utilizando o coeficiente angular e linear da regressão mostrada na Figura 27.

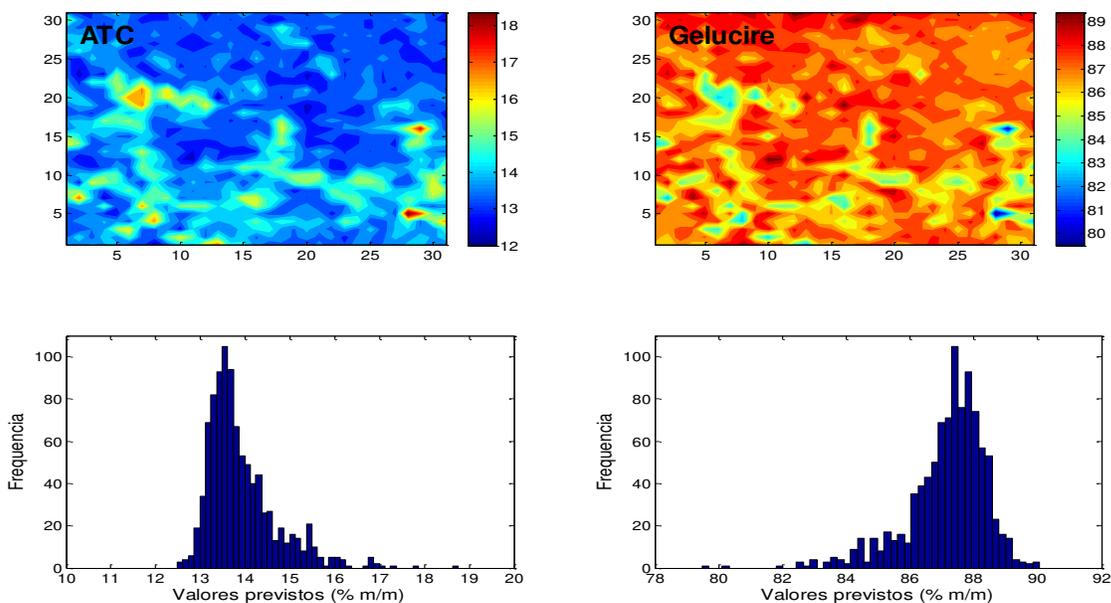


Figura 28: Imagens dos componentes da amostra 4 baseadas na quantificação univariada.

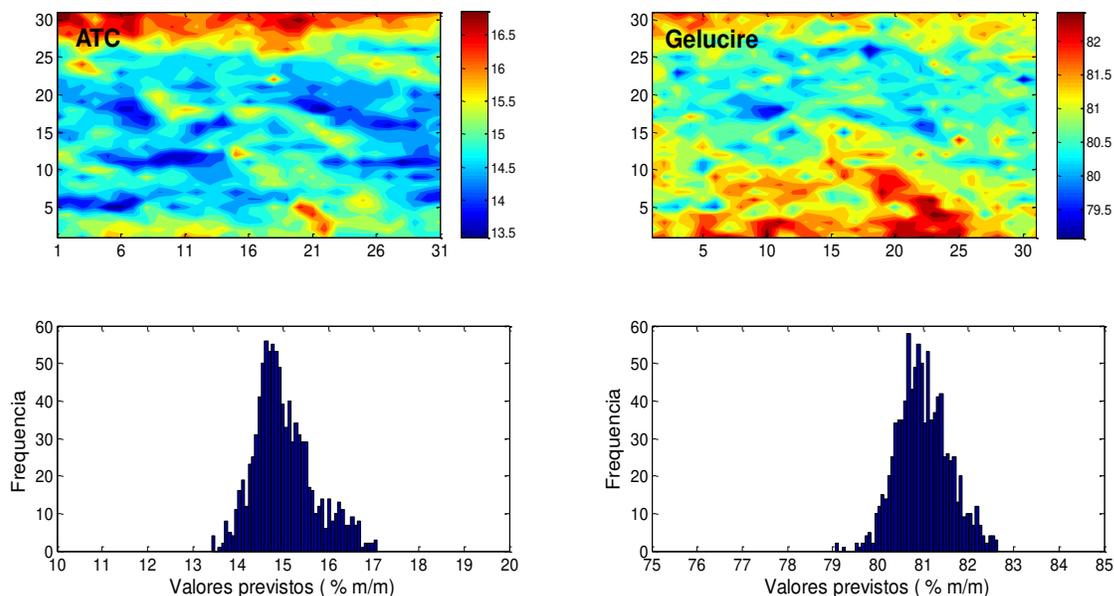


Figura 29: Imagens dos componentes da amostra 5 baseadas na quantificação univariada.

A previsão empregando o método univariado para a amostra 4 forneceu uma concentração média de atorvastatina de 13,9 % (erro de 1,5 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 12,5 a 18,7 %. A concentração média prevista do Gelucire® 44/14 foi de 87,2 % (erro de - 0,4%) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 79,5 a 90,05 %. Com base nestes resultados, é possível concluir que o método univariado apresentou valores previstos próximos aos esperados. De fato, os histogramas mostrados na Figura 28 estão centrados nos valores esperados. No entanto, os histogramas da atorvastatina e do Gelucire® 44/14 não são as imagens especulares perfeitas um do outro. Este resultado será comparado posteriormente com aqueles obtidos empregando métodos multivariados de quantificação, como o CLS e PLS. Para a amostra 5 (Figura 29) as imagens não são complementares, os histogramas não são imagens especulares um do outro e o valor médio previsto para o Gelucire® 44/14 está deslocado em relação à concentração experimental esperada. Ou seja, não é possível obter uma imagem confiável caso o resíduo da amostra em relação à curva analítica seja grande.

A descrição destes resultados teve por objetivo demonstrar dois aspectos. Primeiro, a espectroscopia Raman pode permitir a calibração univariada para a geração de imagens químicas, caso sinais específicos para cada um dos compostos sejam encontrados nos espectros. Este é um ponto positivo da espectroscopia Raman em relação à espectroscopia NIR, na qual é mais difícil de verificar tal situação. Segundo, a calibração univariada não é capaz de lidar com sinais anômalos, sendo que a previsão das concentrações de amostras que apresentem alto resíduo em relação à curva analítica não será próxima ao valor esperado e as imagens não serão complementares.

2.2. Geração de imagens empregando CLS e PLS

O segundo método de quantificação que foi avaliado foi a regressão em mínimos quadrados clássicos, o CLS. Este é um método de calibração direta, o qual permite a inclusão de sinais espectrais em vários números de onda. O CLS baseia-se no princípio da aditividade da lei de Beer, sendo o sinal observado a cada pixel a soma dos sinais dos compostos puros, ponderada pela concentração de cada composto. Em espectroscopia Raman, o fenômeno observado é de espalhamento e não de absorção e, portanto, não é correto descrevê-lo com base na Lei de Beer. No entanto, se considerarmos a expressão matemática da Lei de Beer ($A = \epsilon bc$), é possível verificar que a intensidade do sinal (de absorbância neste caso) é diretamente proporcional à concentração. Esta relação também é válida para o sinal de espalhamento Raman e, por este motivo, o CLS pode ser utilizado. Durante o desenvolvimento farmacêutico, os constituintes puros das amostras estão prontamente disponíveis e as concentrações médias das amostras preparadas são conhecidas, o que torna o método CLS muito interessante para a utilização durante esta etapa.

No entanto, após os cálculos e a geração das imagens por CLS para as dez dispersões preparadas, foi verificado que os valores médios previstos diferiram significativamente dos valores médios experimentais. O erro quadrático médio de previsão (RMSEP) do CLS para o fármaco foi de 27,0 %. Considerando que a faixa de concentrações é de 5,0 - 27,5 % e que o valor médio desta faixa é de 16,3

%, este valor fornece um erro relativo médio de 166 %, o que inviabilizaria o uso do CLS para avaliações quantitativas da distribuição dos constituintes na amostra. Considerando os princípios nos quais o método se baseia, é possível inferir que ele pode falhar na presença de interações físico-químicas entre os componentes da amostra - as quais geram deslocamentos no sentido dos números de onda - e quando o sinal não é linearmente proporcional à concentração.

Para avaliar se existiam interações físico-químicas entre os componentes da amostra, o espectro esperado de cada uma das amostras foi calculado em Matlab®, considerando o princípio de aditividade do sinal no qual se baseia o CLS. Por exemplo, o espectro esperado para uma amostra contendo 10 % de fármaco e 90 % de Gelucire 44/14® foi calculado da seguinte maneira: Espectro esperado = $0.1 * \text{Espectro fármaco} + 0.9 * \text{Espectro Gelucire 44/14}^{\text{®}}$. O espectro esperado (ou calculado) foi então comparado com o espectro médio obtido experimentalmente para cada uma das amostras (média de todos os pixels da amostra). Esta comparação é mostrada na Figura 30. Como é possível verificar nesta Figura, o espectro médio experimental é muito próximo daquele esperado com base no princípio do CLS, não existindo deslocamentos no sentido dos comprimentos de onda. Este fato excluiu a possibilidade de interações entre os constituintes como fonte da inexatidão do método CLS.

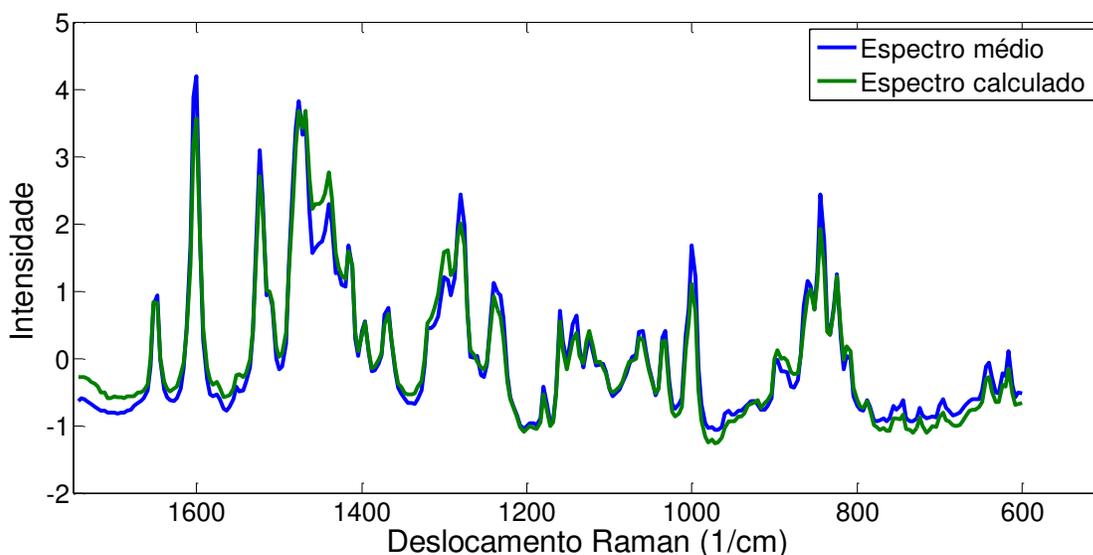


Figura 30: Comparação do espectro médio de uma amostra com o espectro calculado matematicamente com base nas concentrações dos componentes e seus espectros puros.

A linearidade do sinal com a concentração já foi demonstrada em dois números de onda na etapa de calibração univariada (Figura 27). Para avaliar a linearidade de maneira multivariada, foi realizada a análise de componentes principais e avaliada a relação entre os *scores* na primeira componente principal (contendo a maior porcentagem da variância experimental) e as concentrações, por meio de um gráfico contendo estas duas grandezas. Este gráfico apresentou uma relação claramente linear. Desta maneira, pode-se excluir também a falta de linearidade como razão para a falta de exatidão do CLS.

Após a exclusão destes dois fatores, por meio de pesquisa na literatura sobre métodos de resolução de curvas^{44,45} concluiu-se que uma possível explicação para a falta de exatidão do CLS seria a ambiguidade de intensidade, gerada durante a etapa de normalização dos espectros para comprimento unitário. Isto aconteceu pois na normalização, foi introduzida uma constante na matriz **S**, a qual foi compensada na matriz **C** na solução do CLS. A etapa de normalização dos espectros Raman é necessária devido à grande diferença de intensidade entre os espectros do fármaco e dos excipientes, gerada pela natureza química de cada um. Enquanto o fármaco normalmente apresenta muitos grupos químicos polarizáveis, os excipientes apresentam grupos polarizáveis em menor número e, desta maneira, a intensidade dos espectros Raman dos fármacos tende a ser sempre muito superior à dos excipientes.

Devido à ambiguidade de intensidade, as concentrações estimadas dos componentes não correspondem aos valores absolutos de concentração, mas estão *correlacionados* com estes⁴⁵. De fato, comparando-se os valores previstos pelo CLS com os valores experimentais, foi verificado que a correlação entre ambos é muito grande (Figura 31). Este fato permitiu utilizar os coeficientes linear e angular do gráfico de valores experimentais vs valores previstos pelo CLS para a correção dos valores previstos nos pixels, utilizando a equação 4. A Figura 31 mostra também a regressão entre os valores experimentais e valores médios previstos após a correção mencionada.

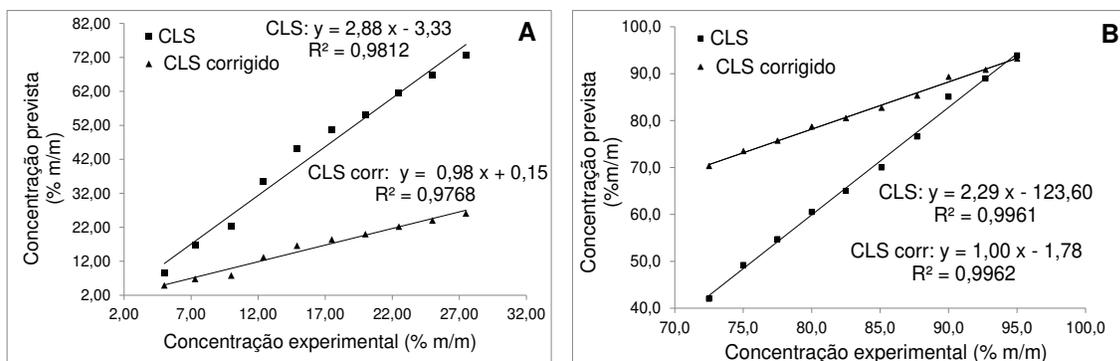


Figura 31: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina (A) e para o Gelucire® 44/14 (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.

É possível observar na Figura 31 que a inclinação da reta do método CLS sem correção apresenta coeficiente angular muito diferente de 1 e coeficiente linear (intercepto) muito diferente de zero. Após a correção, o coeficiente angular passa a ser próximo de 1 e o linear próximo de zero, indicando excelente concordância entre os valores médios previstos e os experimentais. Após a correção, o RMSEP do CLS foi de 1,1 % (erro relativo médio de 7,0 %, considerando a média da faixa de concentrações) para a atorvastatina e 1,8 % (erro relativo médio de 2,0 % considerando a média da faixa de concentrações) para o Gelucire® 44/14. É interessante notar que os dois gráficos são perfeitamente complementares, ou seja, os enquanto valores previstos para a atorvastatina são corrigidos para valores menores, aqueles previstos para o Gelucire® 44/14 são corrigidos para valores maiores.

É importante ressaltar que a distribuição dos constituintes nas imagens não se alterou após a correção do método CLS. Isto se deve ao fato de que os valores previstos pelo CLS sem correção serem *proporcionais* aos valores absolutos e, desta maneira, proporcionalmente, as imagens dos constituintes se mantiveram depois da correção, a qual apenas deslocou o centro do histograma para os valores experimentais médios esperados. Assim, o desvio padrão dos histogramas também não se alterou após a correção, pois o mesmo não depende da correção realizada na média.

Para comparação e validação da metodologia de correção do CLS, também foi utilizado o método PLS 2 para a geração das imagens químicas com estes dados. O gráfico de valores experimentais vs valores previstos pelo PLS para a atorvastatina e Gelucire® 44/14 são mostrados na Figura 32 A e B, respectivamente. Os resultados descritos anteriormente para o CLS também são mostrados nesta Figura para comparação.

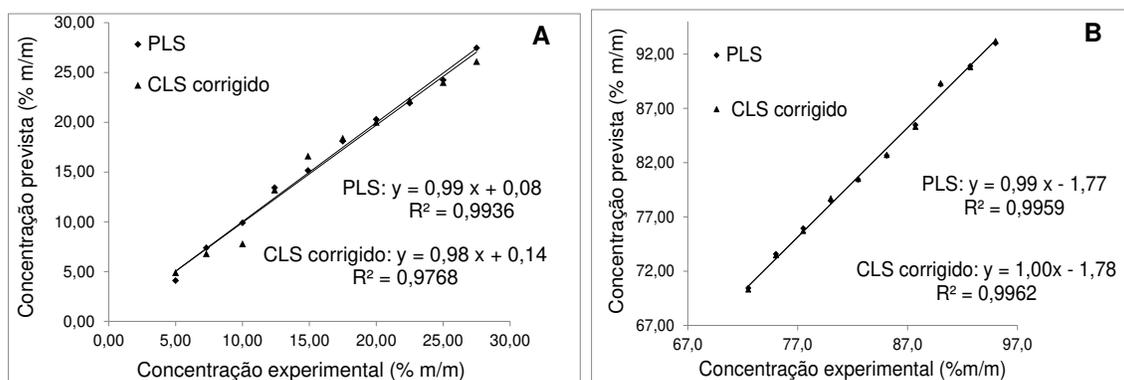


Figura 32: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas pelos métodos CLS após correção e PLS para a atorvastatina (A) e Gelucire® 44/14 (B).

Como é possível observar na Figura 32, a concordância entre os dois métodos é muito boa, sendo que os pontos referentes ao PLS tendem, de uma maneira geral, a estarem um pouco mais próximos à reta do que os pontos referentes ao CLS corrigido (resíduos menores). O modelo PLS foi construído com duas variáveis latentes. Conforme esperado, a primeira variável latente descreve a maior parte da variação tanto na matriz de espectros (94%) quanto na matriz de concentrações (98 %). A segunda variável latente, embora descreva uma pequena fração apenas da variação (3,2% da matriz de espectros e 0,7% da matriz de concentrações), foi selecionada considerando o mínimo no gráfico de valores de RMSECV vs número de variáveis latentes. Como é possível verificar na Figura 32 B, a amostra 5 não apresenta nenhum comportamento anômalo e isto se deve ao fato da utilização do espectro inteiro para a modelagem e previsão e a possibilidade de utilização de uma segunda variável latente no caso do PLS.

O RMSEP do PLS para atorvastatina foi de 0,6 % (erro relativo médio de 4,0 %, considerando a média da faixa de valores de concentração) e para o Gelucire de 1,8 % (erro relativo médio de 2,0 %, considerando a faixa de valores de concentração, valor idêntico ao obtido pelo CLS corrigido). As imagens da amostra 4 geradas por CLS e PLS são mostradas na Figura 33. As imagens da amostra 5 geradas por CLS e PLS são mostradas nas Figuras 34.

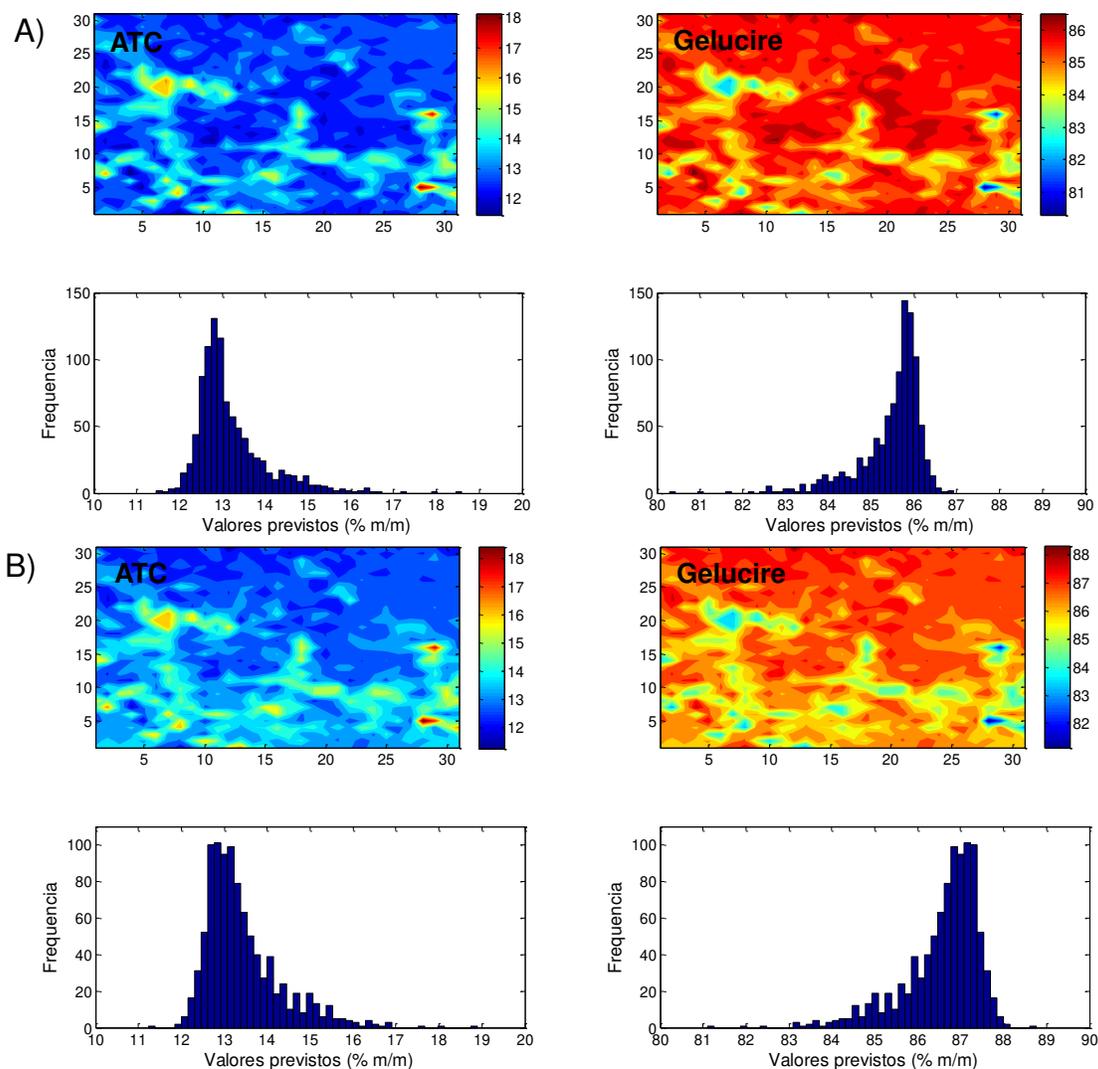


Figura 33: Imagens dos componentes da amostra 4 baseadas na quantificação multivariada empregando CLS (A) e PLS (B).

A previsão do CLS para a concentração média de atorvastatina na amostra 4 foi de 13,2 % (erro de 0,8 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 11,5 a 18,6 %. A concentração prevista média do Gelucire® 44/14 foi de 85,5 %

(erro de - 2,1 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 80,3 a 86,9 %. Para o PLS a concentração média prevista da atorvastatina foi de 13,4 (erro de 1,0 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 11,2 a 18,9 %. A concentração média do Gelucire® 44/14 foi de 86,6 % (erro de - 1,0 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 81,1 a 88,8 %. Com isto, é possível verificar que o CLS após a correção forneceu resultados praticamente idênticos ao PLS para esta amostra (a qual não apresentou nenhuma anormalidade no sinal espectral). Além disto, ao comparar ambos os métodos multivariados com o método univariado (Figura 28) é possível verificar que, embora de uma maneira geral as imagens tenham sido bastante semelhantes, os histogramas de valores previstos pelos métodos multivariados são, de fato, a imagem especular perfeita um do outro, o que não ficou tão evidente no método univariado.

A previsão do CLS para a concentração média de atorvastatina na amostra 5 foi de 16,6 % (erro de 1,7 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 15,9 a 18,1 %. A concentração média do Gelucire® 44/14 foi de 82,6 % (erro de - 2,5 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 80,9 a 83,4 %. Para o PLS a concentração média prevista da atorvastatina foi de 15,2 % (erro de 0,3 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 14,2 a 17,1 %. A concentração média do Gelucire® 44/14 foi de 84,9 % (erro de - 0,2 %) e as concentrações previstas nos pixels variaram de 82,9 a 85,8 %. Comparando-se estes resultados, é possível verificar que, para esta amostra a qual apresentou uma anomalia espectral, o método PLS apresentou valores previstos mais próximos aos valores esperados, em relação ao CLS corrigido, embora os erros apresentados por este último tenham sido aceitáveis (< 5 %). Comparando-se estes resultados com aqueles da quantificação univariada (Figura 29) verifica-se a superioridade dos dois métodos multivariados na presença de flutuações espectrais não esperadas em determinados números de onda. Com a utilização do espectro inteiro, o sinal anômalo em 1280 cm^{-1} não prejudicou a quantificação do Gelucire® 44/14 e permitiu a geração de imagens confiáveis. Comparando-se as imagens A e B mostradas na Figura 34, é possível verificar os aglomerados são

ligeiramente mais visíveis empregando PLS (cauda nos histogramas), porém, de uma maneira geral, as imagens são muito semelhantes.

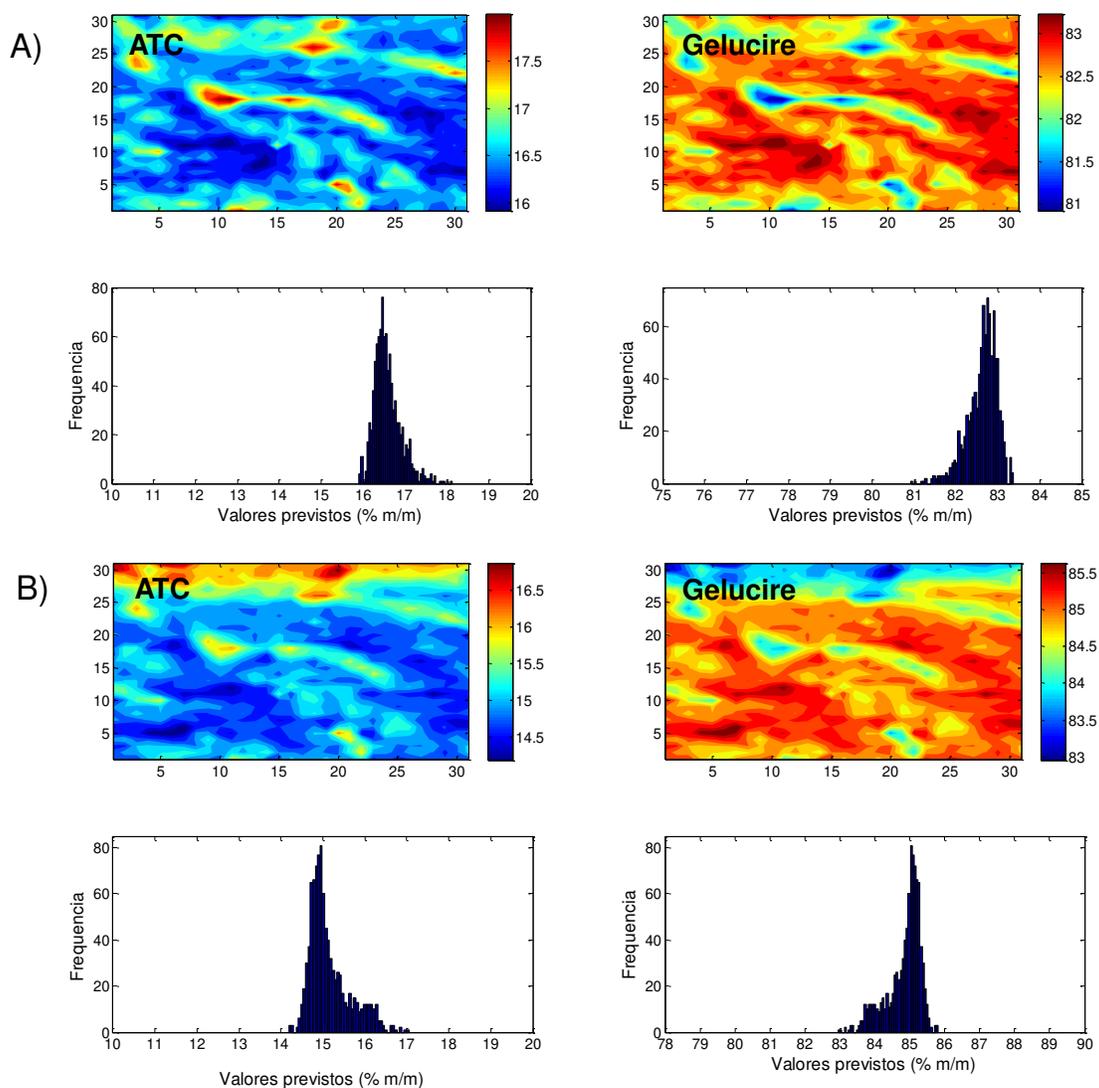


Figura 34: Imagens dos componentes da amostra 5 baseadas na quantificação multivariada empregando CLS (A) e PLS (B).

Vajna e co-autores¹⁰¹ descreveram a normalização dos valores previstos de concentração pelo CLS para cada componente em relação à soma dos valores previstos das concentrações de todos os componentes em um dado pixel. Este enfoque foi aplicado neste conjunto de dados, entretanto a exatidão não foi satisfatória, com erros > 6% nos valores médios, sendo preferível, desta maneira, o procedimento de correção com base na regressão.

2.3. Geração de imagens empregando PCA

A análise de componentes principais, PCA também foi avaliada como método para geração de imagens destas amostras. Neste método, as imagens são geradas redobrando-se os *scores* de cada amostra em cada componente principal para manter a disposição espacial original. No sistema em estudo, como são dois componentes químicos cuja concentração está correlacionada, pois a soma deve ser 100 %, espera-se que apenas uma componente principal seja necessária para descrever as variações. No entanto, com base no gráfico de porcentagem de variância descrita contra o número de componentes principais, são escolhidos duas componentes, que descrevem 72 % da variação experimental. As imagens baseadas nos mapas de *scores* nestas duas componentes são mostradas na Figura 35

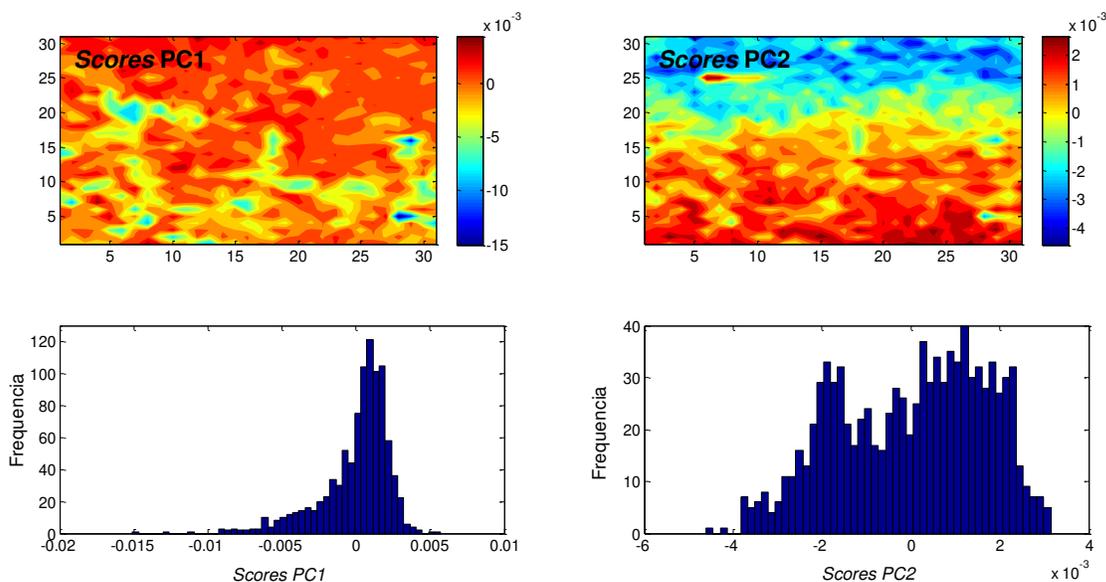


Figura 35: Mapas de *scores* para a amostra 4 nas duas primeiras componentes principais.

Como é possível verificar na Figura 35, o mapa de *scores* extraído da PC1 é semelhante à imagem do Gelucire® 44/14, mostrado nas Figuras 28 e 33. Entretanto, o mapa na segunda componente não é a imagem da atorvastatina, porque na realidade, a PCA descreve a *covariação* destes dois componentes na PC1. Isto pode ser observado comparando-se os *loadings* na primeira componente, com os espectros puros, conforme mostrado na Figura 36 A.

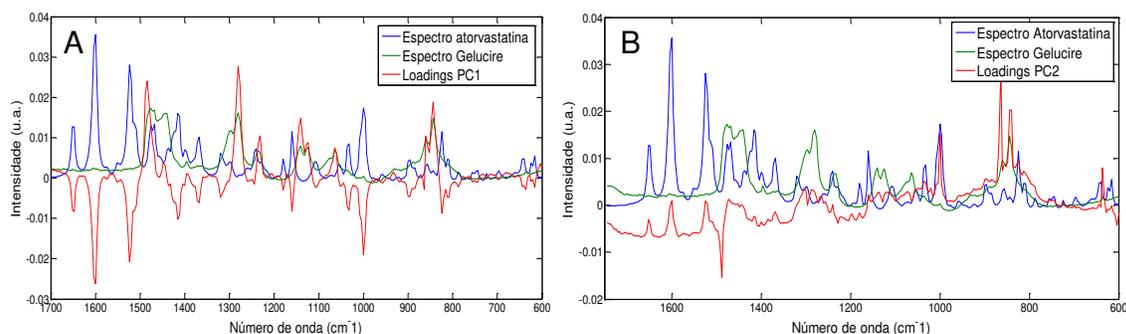


Figura 36: *Loadings* na primeira (A) e segunda (B) componentes principais vs espectros da atorvastatina e Gelucire® 44/14.

A Figura 36 A mostra que os *loadings* na PC1 são combinações dos espectros da atorvastatina e do Gelucire® 44/14, sendo possível observar claramente a contribuição dos dois compostos para a geração desta componente principal. Por este motivo, não é possível atribuir a imagem de *scores* na PC1 a um componente químico específico e pode-se dizer que a imagem na PC1 representa, na realidade, o contraste entre as concentrações dos dois componentes. Este fato já era esperado para esta mistura de dois compostos por causa da correlação entre eles, no entanto, este problema tem sido reportado na literatura da área mesmo para misturas de mais compostos, para os quais a correlação não é tão grande^{52, 53}. Na verdade, imagens obtidas em uma determinada componente principal só podem ser atribuídas a determinado composto químico quando os *loadings* naquela componente principal forem muito próximos ao espectro puro do composto, ou seja, quando aquele espectro contribuir muito para a formação daquela componente principal⁵³. Espera-se que isto aconteça apenas em amostras em que não exista alta correlação entre as concentrações dos compostos.

O segundo aspecto a ser ilustrado nos resultados da PCA é que nem sempre o número de componentes principais selecionado tem relação direta com o número de compostos presentes na amostra, o que também já foi discutido na literatura⁵⁴. Para amostra em estudo, por exemplo, a segunda componente principal representa 23 % da variação experimental, e ao observarmos os *loadings*

nesta componente (Figura 36 B), verificamos que ela também é uma combinação dos espectros da atorvastatina e do Gelucire® 44/14. No entanto, a variação que ela representa não está relacionada à variação sistemática de concentrações responsável por gerar as imagens observadas empregando os métodos CLS e PLS, que é a variação de interesse analítico. Uma vez que as imagens geradas empregando CLS e PLS, são conhecidas, sabe-se que a segunda componente principal poderia ser descartada, no entanto, caso esta informação não estivesse disponível, seria controverso descartá-la, pois os *loadings* indicam que ela tem informações sobre os dois compostos da amostra.

Finalmente, observa-se claramente uma desvantagem do método que é a escala das imagens geradas, conforme é possível verificar na Figura 36. A escala refere-se aos *scores* e não é possível, a princípio, ter uma idéia sobre a variação de concentração que ela representa. Os métodos de quantificação para a geração das imagens, tais como o CLS e PLS e mesmo o método univariado são preferíveis neste sentido porque fornecem mapas de concentração dos compostos, que são mais prontamente interpretáveis do que mapas de *scores*.

Por meio dos métodos utilizados para gerar as imagens, foi possível verificar que existem pequenos aglomerados de atorvastatina dentro da matriz do Gelucire® 44/14. A presença de aglomerados foi observada para as demais amostras, ao longo da faixa de concentração estudada, indicando que é uma característica deste tipo de dispersão e não depende da concentração do fármaco. No entanto, estes aglomerados estiveram presentes em uma faixa de concentração bastante estreita para todas as amostras (por exemplo, 12 – 17 % m/m para amostra de composição média 12,5 % e 14 - 17 % para a amostra de composição média 15 %, considerando o método PLS), o que indica que não é uma heterogeneidade severa. Além disto, espera-se que este resultado seja dependente do processo de mistura dos componentes e outros processos podem levar a resultados diferentes. Espera-se também que, por conta da faixa estreita de concentrações, estes aglomerados não impactem de forma significativa na solubilização do fármaco em meio aquoso.

2.4. Solubilidade em água

Após a agitação por 60 minutos a 37 °C no agitador de frascos, as dispersões foram avaliadas de forma visual em relação à precipitação do fármaco no fundo do erlenmeyer. Foi observada a precipitação em concentrações acima de 15 % do fármaco e, para concentrações até 12,5 %, as soluções apresentaram-se límpidas. A precipitação é explicada devido à concentração alta do fármaco em relação ao Gelucire® 44/14, cuja concentração não foi suficiente para mantê-lo solubilizado em meio aquoso. Assim, a concentração de 12,5 % foi selecionada para quantificação por CLAE, juntamente com o fármaco na sua forma cristalina I. A concentração esperada caso a dosagem de 80 mg estivesse completamente solubilizada em meio aquoso seria de 0,32 mg/mL. A atorvastatina cristalina apresentou solubilidade de $0,15 \pm 0,01$ mg/mL, um valor coerente com a literatura para esta forma polimórfica³, enquanto a dispersão sólida apresentou solubilidade de $0,31 \pm 0,01$ mg/mL, ou seja, foi confirmado que o Gelucire® 44/14 permitiu alcançar uma condição de supersaturação em meio aquoso. Concluiu-se também que a presença de aglomerados na estreita faixa de concentrações observada não impactou na solubilidade, conforme esperado. A concentração de atorvastatina solubilizada em água a partir do medicamento Lipitor® foi de $0,17 \pm 0,01$ mg/mL, um valor coerente com a solubilidade do fármaco puro, uma vez que nenhuma estratégia de aumento de solubilidade foi utilizada neste medicamento.

3. Conclusões

Neste capítulo foram comparados diferentes métodos quimiométricos para a geração de imagens químicas por espectroscopia Raman: o método univariado, a regressão em mínimos quadrados clássicos (CLS), a regressão em mínimos quadrados parciais (PLS) e a análise de componentes principais (PCA). Foram encontrados números de onda específicos para cada um dos componentes da amostra, o que permitiu a quantificação por meio de calibração univariada. No entanto, em um dos números de onda utilizados, foi verificada uma anomalia espectral para uma das amostras e a quantificação univariada não foi eficiente

para esta. Por outro lado, quando os espectros inteiros foram utilizados para quantificação empregando os métodos CLS e PLS, foi verificado que esta anomalia não interferiu de forma significativa nos resultados, demonstrando uma das vantagens dos métodos multivariados.

Inicialmente, os valores de concentração previstos pelo método CLS apresentaram um erro muito alto em relação aos valores médios esperados, com base no procedimento experimental. No entanto, foi verificado que, embora o erro fosse alto, os valores previstos estavam correlacionados com os valores experimentais, permitindo a sua correção com base na regressão contra os valores médios experimentais. As imagens antes e depois da correção e o desvio padrão dos histogramas se mantiveram inalterados, indicando que a correção apenas deslocou o histograma como um todo, centrando-o no valor médio correto, sem alterar a relação entre os valores previstos nos pixels. Após a correção, o CLS forneceu valores previstos concordantes com o PLS.

Acredita-se que os altos erros do método CLS tenham acontecido devido à ambiguidade de intensidade, uma característica de métodos de resolução de curvas, causada pela normalização dos espectros puros. Considerando que os espectros médios das amostras coincidiram exatamente com os espectros calculados matematicamente com base no princípio do CLS, não é possível atribuir os altos erros de previsão do método a deslocamentos espectrais (gerados por interações entre os constituintes). Além disto, a linearidade do sinal com a concentração foi demonstrada, indicando não ser esta também a fonte dos erros. Assim, a ambiguidade de intensidade parece ser a explicação mais plausível para os altos erros observados.

A análise de componentes principais gerou na primeira componente uma imagem da covariação entre os dois componentes da amostra, uma vez os mesmos estavam altamente correlacionados. Por este motivo, só foi gerada uma imagem para esta amostra. Além disto, o método apresentou algumas dificuldades para relacionar as imagens nas demais componentes principais com variações de concentração na amostra. Finalmente, a escala das imagens baseada nos *scores* não permite uma relação direta com a concentração dos componentes, o que

torna difícil sua interpretação. Por estes motivos, este método não foi mais utilizado neste trabalho.

As dispersões sólidas de atorvastatina em Gelucire® 44/14 preparadas pelo método da fusão apresentaram pequenos aglomerados, em faixas estreitas de concentração dos compostos, o que não interferiu na solubilização da atorvastatina em meio aquoso. Foi verificado que, para amostras contendo uma concentração do fármaco inferior a 15 %, a supersaturação em meio aquoso foi alcançada, permitindo que a maior dosagem deste fármaco (80 mg) pudesse ser solubilizada em um copo de água (250 mL). Estes aglomerados podem ter sido causados pelo fato da atorvastatina ter sido incorporada na forma de pó no Gelucire® 44/14.

**CAPÍTULO 4: DISPERSÕES SÓLIDAS
DE ATORVASTATINA EM GELUCIRE[®]
44/14 PREPARADAS PELO MÉTODO
DE EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE**

No capítulo anterior foram identificados aglomerados da atorvastatina cristalina dentro da matriz semi-sólida do Gelucire® 44/14. Para verificar se seria possível melhorar a dispersão do fármaco, evitando a formação de aglomerados, dois tipos de estratégias foram adotadas: a solubilização tanto do fármaco quanto do Gelucire® 44/14 em um solvente orgânico, o qual é posteriormente evaporado (método da evaporação do solvente) e a possibilidade de incorporar o fármaco já solubilizado em um solvente farmacologicamente aceito à matriz semi-sólida do Gelucire® 44/14, o qual permaneceria na formulação, originando formulações do tipo SEDDS. Os resultados do método de evaporação do solvente serão descritos neste capítulo.

1. Procedimento Experimental

1.1. Preparo das amostras

As amostras foram preparadas através da solubilização do Gelucire® 44/14 em diclorometano em um béquer com adição do fármaco e agitação em um agitador de hastes por 60 minutos. As amostras foram então secas em rotoevaporador, com temperatura controlada (máximo 40 °C). Inicialmente a concentração de atorvastatina foi de 50 % (m/m), sendo reduzida posteriormente para 33,0; 25,0 e 15,0 % (m/m).

A dispersão contendo 25,0 % foi caracterizada por espectroscopia Raman de imagem empregando PLS. Para a utilização do método PLS foi necessária uma calibração, a qual foi realizada utilizando espectros médios das misturas das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina em Gelucire 44/14®. As concentrações das amostras preparadas para calibração são mostradas na Tabela VI. As amostras foram preparadas de modo que a soma das concentrações das duas formas fosse igual a 25,0 %, que é a concentração encontrada na dispersão sólida. A quantidade de Gelucire® 44/14 foi mantida constante em 75,0 %.

Tabela VI: Concentração das formas amorfa e cristalina nas amostras utilizadas para calibração por PLS para previsão das concentrações na dispersão sólida preparada pelo método do solvente.

Amostra	Atorvastatina amorfa (% m/m)	Atorvastatina cristalina I (% m/m)
1	2,5	22,5
2	5,1	19,9
3	7,6	17,4
4	10,2	14,8
5	12,5	12,5
6	15,0	10,
7	17,4	7,6
8	20,0	5,0
9	22,3	2,7
10	25,0	0,0

O fármaco amorfo foi preparado pela solubilização completa da forma cristalina I em metanol, seguida da evaporação do solvente.

1.1. Obtenção das imagens

As imagens foram obtidas empregando-se o equipamento Raman Station 400 (Perkin Elmer), mostrado na Figura 14. Similarmente ao descrito no Capítulo 3, as amostras foram colocadas em uma cela de alumínio e foi mapeada uma área 9 mm^2 , com pixel de $50 \text{ }\mu\text{m}$, na faixa espectral de $1800 - 600 \text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral de 4 cm^{-1} .

1.2. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados

Inicialmente foram removidos os *spikes*, empregando o algoritmo mencionado no capítulo anterior¹⁰⁰. Para os cálculos empregando o método PLS, cada amostra de calibração foi adquirida como um hiper-cubo espectral, sendo o espectro médio de cada ponto utilizado para a calibração. Foi realizado um pré-processamento na matriz dos espectros médios utilizando a primeira derivada (algoritmo Savitsky-Golay), com o intuito de eliminar pequenas flutuações de linha base e intensificar pequenas diferenças entre as duas formas polimórficas. Os dados foram então centrados na média.

1.3. Teste de solubilidade

A avaliação da solubilidade foi realizada de maneira análoga às dispersões preparadas pelo método da fusão, conforme descrito no item 1.4 do Capítulo 3.

2. Resultados e Discussão

O guia ICH Q3C (R4) residual solvents¹⁰² classifica os principais solventes orgânicos em três classes, de acordo com dados toxicológicos e regulamenta seu uso na área farmacêutica para fármacos, excipientes e medicamentos. Solventes pertencentes à classe 1 são aqueles que não podem ser utilizados por serem reconhecidamente tóxicos (p.e. benzeno e tetracloreto de carbono); solventes pertencentes à classe 2 podem ser utilizados, porém sua concentração no produto final (após a secagem) deve ser limitada a valores estabelecidos no guia; solventes pertencentes à classe 3 são aqueles que podem ser livremente utilizados e não requerem quantificação no produto final. O diclorometano é um solvente pertencente à classe 2, de acordo com este guia e foi selecionado para ser utilizado com o Gelucire® 44/14 devido ao fato do seu ponto de ebulição (39 °C) ser inferior ao ponto de fusão do Gelucire® 44/14, permitindo a sua secagem a 40 °C.

A amostra inicial foi preparada contendo 50,0 % do fármaco (razão 1:1 m/m) com Gelucire® 44/14. Foi verificado que nesta proporção a amostra apresentou um aspecto endurecido após a retirada do solvente, sendo de difícil manuseio. Este fato provavelmente foi devido à alta concentração do fármaco e, por este motivo, a concentração do mesmo foi diminuída para 33,33 % (razão 1:2 m/m), ainda apresentando estas características e então para 25,0 % (razão 1:3 m/m), proporção na qual ela se tornou manuseável.

2.1. Espectroscopia Raman de imagem

O espectro médio da dispersão contendo 25,0 % do fármaco inicialmente na sua forma cristalina é mostrado na Figura 37.

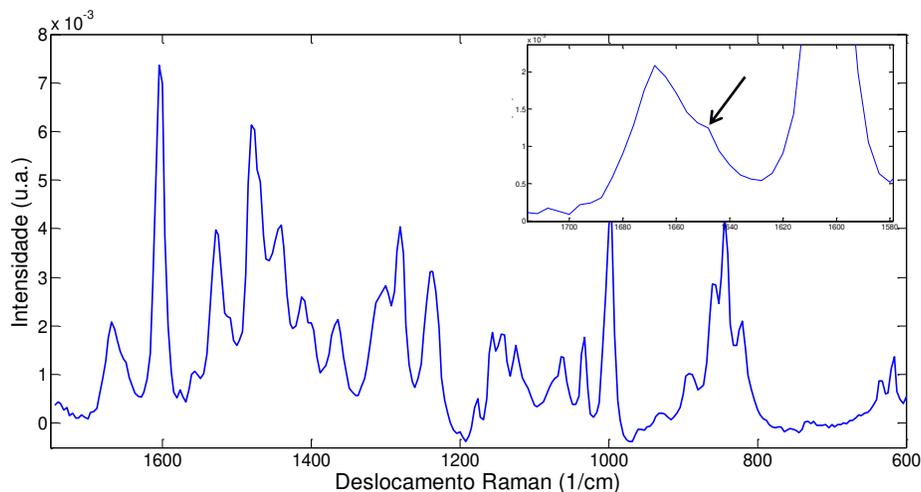


Figura 37: Espectro médio da dispersão sólida preparada pelo método do solvente contendo 25 % de atorvastatina. *Inset*: Destaque para a região entre 1710-1580 cm⁻¹.

Como se pode observar na Figura 37, a intensidade do pico em 1670 cm⁻¹ indica que grande parte do fármaco foi transformada para a forma amorfa durante o processo, entretanto existe um pequeno sinal em 1650 cm⁻¹ (indicado com a seta), devido à presença de pequena quantidade remanescente do fármaco cristalino. Desta maneira, espera-se que, nesta proporção, uma mistura de polimorfos tenha sido formada. Considerando que para este conjunto de dados não existe um pico específico de cada uma das formas polimórficas, não é possível fazer uma calibração univariada. Assim, um método multivariado é necessário e, inicialmente o conjunto de dados foi tratado por CLS. No entanto, este método não forneceu resultados satisfatórios, não permitindo a identificação da forma cristalina do fármaco, provavelmente por causa da baixa concentração do mesmo. Ravn e co-autores reportaram que métodos de resolução de curvas não forneceram resultados satisfatórios para componentes minoritários⁸¹. Assim, o método PLS foi avaliado para a quantificação das duas formas polimórficas.

As amostras de calibração foram preparadas através de misturas físicas em diferentes proporções das duas formas polimórficas com o Gelucire® 44/14, uma

vez que não é possível simular o processo com o solvente, pois a transformação polimórfica acontece durante o mesmo. As proporções foram selecionadas de tal maneira que a soma das duas formas polimórficas correspondesse a 25,0 % da formulação (proporções mostradas na Tabela VI), pois esta é a concentração total de atorvastatina na dispersão. Os espectros das misturas são mostrados na Figura 38.

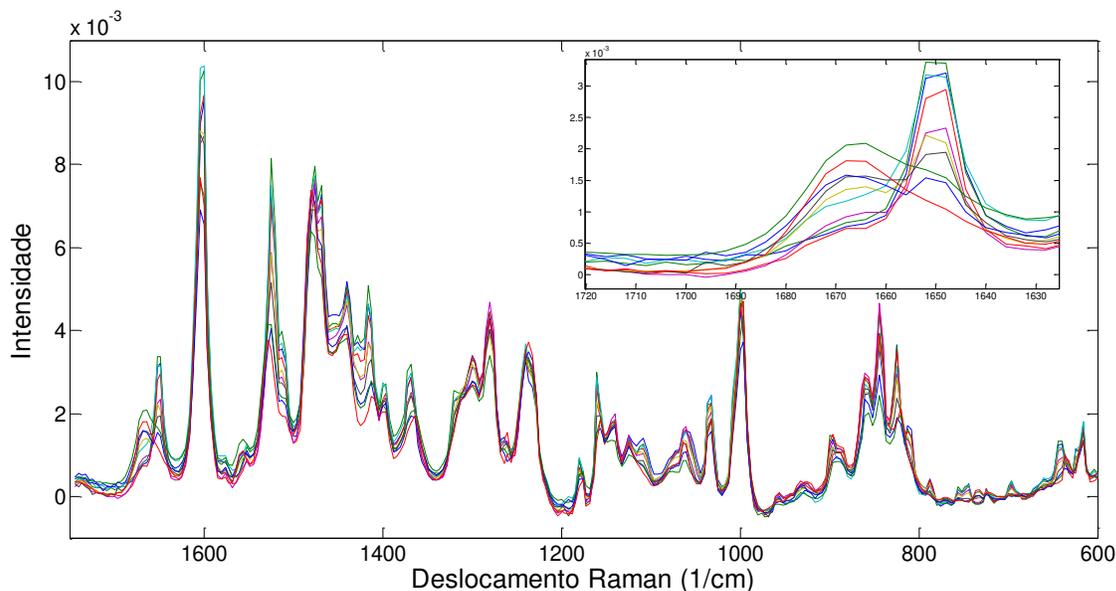


Figura 38: Misturas físicas das formas amorfa e cristalina I da atorvastatina e Gelucire® 44/14. *Inset*: destaque para a região de 1630-1720 cm^{-1} .

Como se pode observar na Figura 38, existe variação do sinal Raman com a variação da concentração das duas formas, o que é particularmente claro ao observar as bandas em 1650 e 1670 cm^{-1} , em destaque nesta figura. Em espectroscopia Raman, espectros obtidos de uma área de uma *mesma* amostra não tendem a ter deslocamentos de linha base. No entanto, quando espectros médios de diferentes amostras são colocados em uma mesma matriz, podem existir pequenas flutuações de linha base, como aquelas observadas na Figura 38, as quais podem ser corrigidas empregando uma correção polinomial ou por meio de derivadas. As derivadas apresentam ainda a vantagem de intensificar sinais pouco intensos o que pode ser interessante na diferenciação das duas formas

polimórficas e, por este motivo, a primeira derivada foi aplicada à este conjunto de dados.

O valor de RMSECV para esta calibração foi 0,7 % com duas variáveis latentes (93,14 % da variância explicada na Matriz **X** e 98,73 na matriz **Y**). A princípio poderia ser questionado se não existiriam diferenças entre os espectros das amostras de calibração e de previsão, uma vez que no primeiro caso são misturas físicas dos compostos e, no segundo, um solvente foi utilizado. Para avaliar melhor esta questão, foi analisado o gráfico de *scores* do PLS com as amostras de calibração (misturas físicas) e de previsão (espectros da dispersão sólida em todos os pixels) juntas, o qual é mostrado na Figura 39.

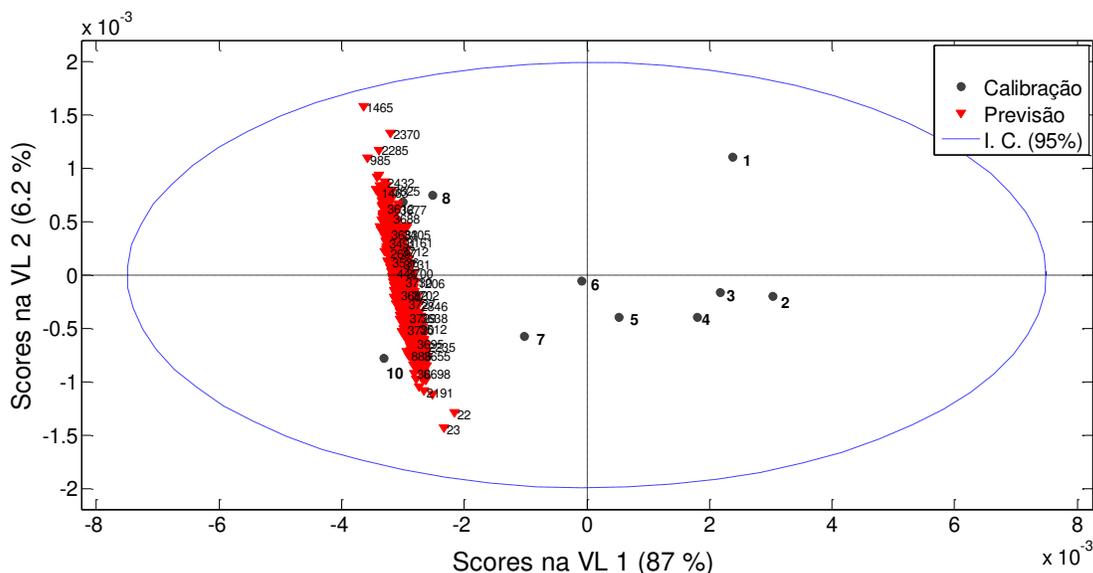


Figura 39: Gráfico de *scores* do PLS nas duas primeiras variáveis latentes, com as amostras de calibração (misturas físicas 1 - 10) e previsão (espectros da dispersão sólida nos pixels).

Conforme é possível observar na Figura 39, as amostras de previsão estão dentro do intervalo de confiança que contém as amostras de calibração. Isto permite concluir que é possível fazer a previsão da concentração das duas formas da atorvastatina na dispersão sólida utilizando a calibração com as misturas físicas. Além disto, é possível verificar que os espectros da dispersão em todos os pixels encontram-se entre as amostras 8 e 10 de calibração, indicando que as suas concentrações devem ser próximas aos valores de concentração destas

amostras. As imagens geradas pela previsão do modelo PLS são mostradas na Figura 40 para as duas formas polimórficas da atorvastatina na dispersão, juntamente com o mapa de distribuição da soma das duas formas, calculado matematicamente. A concentração de Gelucire® 44/14 foi mantida fixa em 75 % e, por este motivo, não é possível gerar uma imagem por PLS.

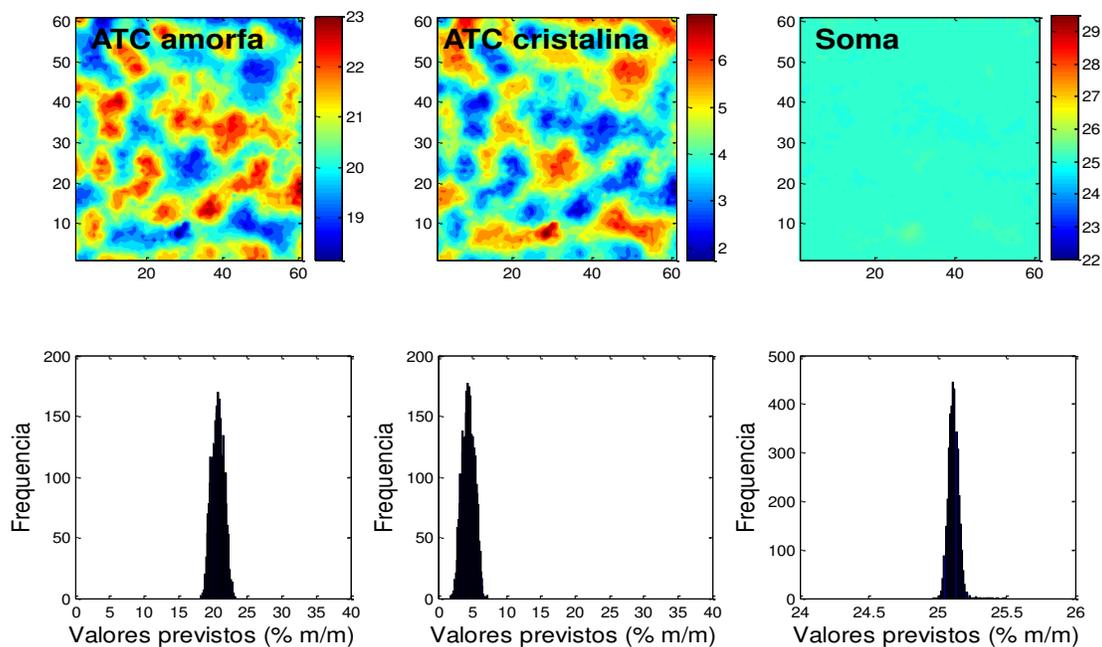


Figura 40: Imagens da forma amorfa e cristalina da atorvastatina na dispersão sólida preparada pelo método do solvente baseadas na quantificação empregando PLS e imagem da soma das duas formas polimórficas.

A Figura 40 comprova o que já havia sido inferido de forma qualitativa anteriormente, que o processo levou a transformação da maior parte da atorvastatina da forma cristalina para a forma amorfa. As concentrações médias previstas para as formas amorfa e cristalina do fármaco foram de 20,7 e 4,4 %, respectivamente. Não é possível calcular o erro de forma separada para cada uma das formas polimórficas, pois não se conhece o valor verdadeiro de cada uma delas, apenas que a sua soma deve ser 25,0 %. A faixa de concentrações previstas para o fármaco amorfo foi de 18,2 - 23,3 % e para o fármaco cristalino foi de 1,7 - 7,3 %. É possível verificar na Figura 40 que as imagens das duas formas

são perfeitamente complementares - a escala foi ampliada para ilustrar esta complementariedade. A média da soma concentração das concentrações das duas formas em todos os pixels foi de 25,1 %, indicando uma excelente concordância com o valor esperado (erro de 0,1 %).

Esta amostra foi submetida às análises de DSC e DRX e não foi possível identificar o fármaco cristalino nesta concentração, indicando a importância da utilização da espectroscopia vibracional para uma caracterização segura da forma polimórfica presente em uma amostra farmacêutica. Conforme descrito no Capítulo 1, o polimorfismo em fármacos está relacionado não somente à qualidade, segurança e eficácia do mesmo, mas também à exigências regulatórias e questões relacionadas à propriedade intelectual. Desta maneira, a espectroscopia Raman de imagem se apresenta como uma opção interessante para a identificação e quantificação de diferentes formas polimórficas em formulações farmacêuticas, especialmente em baixas concentrações uma vez que, neste caso, os compostos estarão concentrados nos pixels.

Este processo gerou uma dispersão mais homogênea da atorvastatina do que o método da fusão e não foi observada a presença de aglomerados, uma vez que os histogramas apresentaram formato gaussiano. Acredita-se que esta melhora deve-se à solubilização da atorvastatina no diclorometano, conforme esperado. No entanto, como a solubilização não foi completa, houve a formação de uma mistura de polimorfos, o que não é desejável do ponto de vista farmacêutico. Para evitar a mistura de polimorfos, a concentração da atorvastatina foi diminuída para 15,0 % (% m/m), sendo que nesta concentração, toda a forma cristalina foi transformada para a forma amorfa. No entanto, a pesquisa com este processo foi descontinuada devido à baixa solubilização em água da dispersão preparada, conforme discutido a seguir.

2.2. Solubilidade em água

A avaliação das amostras contendo 25,0 e 15,0 % de atorvastatina em água indicou que as mesmas não se dispersaram (não “abriram”) completamente, restando aglomerados no fundo do erlenmeyer. Por este motivo, o fármaco não foi

liberado da matriz para o meio aquoso, não sendo possível assim, quantificá-lo por CLAE. Este resultado se repetiu em uma replicata do teste e acredita-se que o solvente orgânico tenha sido responsável por este fato, uma vez que ele pode ter tornado a dispersão enrijecida após a secagem a ponto de que ela não dispersasse em meio aquoso.

3. Conclusões

Nesta etapa do trabalho, foi verificado que a solubilização da atorvastatina e do Gelucire® 44/14 em um solvente orgânico (diclorometano) gerou dispersões mais homogêneas - com histogramas mais estreitos e formato gaussiano - do que o método da fusão. Este fato encorajou o uso de um solvente no preparo das dispersões. No entanto, foi verificado um enrijecimento das dispersões após a retirada do solvente, o que fez com que as mesmas não liberassem o fármaco em meio aquoso. A concentração de 25,0 % (% m/m) gerou uma mistura de polimorfos, devido à solubilização apenas parcial da atorvastatina no diclorometano. A diminuição da concentração para 15,0 % resolveu este problema, no entanto, a pesquisa com este processo foi descontinuada devido ao fato de que a amostra se apresentou enrijecida após a secagem, não se dispersando em meio aquoso.

Para a geração das imagens da amostra contendo 25,0 % do fármaco, não foi possível a utilização de um método univariado, por falta de sinais espectrais específicos para cada um dos componentes. Os métodos multivariados CLS e PLS foram avaliados, sendo que o primeiro não apresentou resultados satisfatórios, provavelmente devido à baixa concentração do fármaco cristalino. O PLS, por outro lado, apresentou excelentes resultados, permitindo a quantificação das duas formas de maneira exata e gerando imagens complementares.

CAPÍTULO 5: *SELF-EMULSIFYING*
***DRUG DELIVERY SYSTEMS* (SEDDS)**
CONTENDO ATORVASTATINA E
GELUCIRE[®] 44/14

No capítulo anterior foi verificado que a solubilização da atorvastatina em um solvente gerou dispersões mais homogêneas. No entanto, foi utilizado um solvente orgânico o qual foi evaporado ao final do processo e este tornou a dispersão enrijecida impedindo a liberação do fármaco em meio aquoso. Assim, como próximo passo, foram estudadas formulações do tipo SEDDS, nas quais o fármaco também é solubilizado em um solvente, no entanto, este solvente permanece na amostra. Este método apresenta a vantagem de utilizar solventes toxicologicamente seguros e farmacologicamente aceitos ao invés de um solvente orgânico pertencente à classe 2 do ICH¹⁰², como o diclorometano. Os estudos foram divididos em duas etapas: Na etapa 1 foi realizada uma triagem entre diversos solventes para avaliar a sua miscibilidade com o Gelucire[®] 44/14 e na etapa 2, foi realizado um aprofundamento nos estudos com o solvente que apresentou resultados mais promissores.

1. Procedimento Experimental

1.1. Preparo das amostras

Na etapa 1, foram preparadas quatro amostras, as quais serão denominadas SEDDS 01 – SEDDS 04 solubilizando-se o fármaco nos seguintes solventes: 1) Transcutol[®] (dietilenoglicol monoetil éter, Gatefossé; SEDDS 01); 2) Propilenoglicol (Synth; SEDDS 02); 3) Capryol 90[®] (propilenoglicol monocaprilato, Gatefossé; SEDDS 03) e 4) Capmul MCM[®] (mono e diglicerídeos dos ácidos caprílico e cáprico, Abitec; SEDDS 04). O fármaco foi solubilizado em cada um dos solventes na razão de 1:3 (m/m) e adicionado ao Gelucire[®] 44/14 fundido, com agitação e aquecimento brando (65° - 70° C), até que uma solução límpida fosse obtida. As porcentagens de fármaco, solvente e Gelucire[®] 44/14 nesta etapa foram mantidas fixas em 5,0 15,0 e 80,0 % (% m/m), respectivamente. A alta concentração de Gelucire[®] 44/14 foi intencional nesta etapa, de modo a obter uma amostra altamente viscosa.

Na etapa 2, inicialmente os resultados obtidos com o método CLS para a amostra SEDDS 04 foram confirmados com PLS. Para isto foi preparado um

conjunto de calibração variando-se a quantidade de (atorvastatina + Capmul[®] MCM) e Gelucire[®] 44/14 (Tabela VII).

Tabela VII: Concentração atorvastatina + Capmul[®] MCM e Gelucire[®] 44/14 nas amostras preparadas para a construção do modelo PLS, visando avaliar a homogeneidade da formulação SEDDS 04.

Amostra	Atorvastatina + Capmul[®] MCM (% m/m)	Gelucire 44/14 (% m/m)
1	10,2	89,8
2	15,4	84,6
3	20,1	79,9
4	29,7	70,3
5	39,8	60,2
6	49,7	50,3
7	60,0	40,0
8	70,1	29,9
9	79,7	20,3
10	89,5	10,5

Seguiu-se então com um estudo para determinar a proporção de Capmul[®] MCM e Gelucire[®] 44/14 a ser utilizada na formulação, de modo a alcançar a supersaturação em água. Para isto, foram preparadas amostras contendo Capmul[®] MCM na faixa de 15,0 a 55,0 % (m/m) e Gelucire[®] 44/14 de 80,0 a 40,0 % (m/m), mantendo-se a quantidade de atorvastatina constante em 5,0 % (m/m). Este estudo foi elaborado mantendo-se a quantidade do fármaco constante, uma vez que o objetivo foi determinar a proporção entre Capmul[®] MCM e o Gelucire[®] 44/14 que fornecesse maior capacidade de solubilização do fármaco em meio aquoso. As concentrações das amostras preparadas para esta finalidade são mostradas na Tabela VIII.

Tabela VIII: Concentração dos constituintes nas amostras preparadas para estudos em meio aquoso.

Amostra	Atorvastatina (% m/m)	Capmul [®] MCM (% m/m)	Gelucire [®] 44/14 (%)
1	5,0	15,2	79,8
2	4,9	20,3	74,7
3	5,0	25,0	70,0
4	4,9	30,1	65,0
5	5,0	35,0	60,0
7	4,9	45,4	49,7
9	4,9	54,9	40,2

Após determinar as porcentagens de Capmul[®] MCM e Gelucire[®] 44/14 que fornecessem supersaturação em meio aquoso, foi construído um novo modelo PLS para avaliação da homogeneidade da formulação contendo estas novas proporções. A concentração dos constituintes nestas amostras é mostrada na Tabela IX.

Tabela IX: Concentração dos constituintes nas amostras preparadas para a construção de novo modelo PLS para avaliar homogeneidade da formulação contendo as novas proporções de Capmul[®] MCM e Gelucire[®] 44/14, determinadas após estudo de solubilidade em água.

Amostra	Atorvastatina + Capmul (% m/m)	Gelucire (% m/m)
1	20,4	79,6
2	25,0	75,0
3	30,4	69,6
4	35,0	65,0
5	39,7	60,3
6	43,9	56,1
7	49,7	50,3

1.1. Obtenção das imagens

As imagens foram obtidas empregando-se o equipamento Raman Station 400 (Perkin Elmer), mostrado na Figura 14. As amostras foram colocadas em uma cela de alumínio e foi mapeada uma área 4 mm², com pixel de 50 µm, na faixa espectral de 3200 – 600 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹.

1.2. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados

A primeira etapa do pré-tratamento foi a retirada de *spikes*, realizada empregando o algoritmo mencionado anteriormente¹⁰⁰. Os cálculos da etapa 1 (formulações SEDDS 01- 04) foram realizados empregando CLS sendo os espectros puros normalizados para comprimento unitário. A formulação SEDDS 04 e as amostras da etapa 2 foram avaliadas por PLS. Para a construção do modelo PLS, cada amostra de calibração foi adquirida como um hipercubo de dados e foram utilizados os espectros médios das amostras para a calibração. Os dados foram centrados na média.

1.3. Teste de solubilidade

Os ensaios de solubilidade em água foram realizados conforme descrito no item 1.4 do Capítulo 3.

1.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um equipamento Jeol 6360 – LZ, em ambiente de alto vácuo, com potencial de 20 kV. As amostras foram preparadas sobre um suporte de alumínio utilizando fita adesiva dupla-face e recobertas com camada de ouro para que as mesmas apresentassem condutividade adequada.

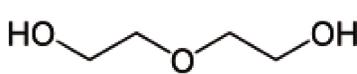
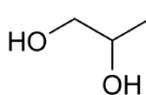
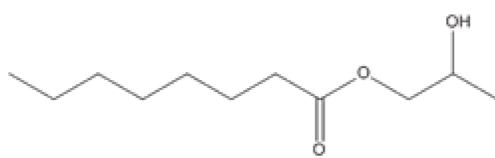
2. Resultados e Discussão

2.1. Etapa 1: Triagem dos solventes

Considerando que o Gelucire[®] 44/14 é um excipiente anfifílico, a princípio não se sabia se ele teria maior afinidade por um solvente hidrofílico ou lipofílico. Desta maneira, foram estudados quatro solventes, dois hidrofílicos (Transcutol[®] e propilenoglicol) e dois lipofílicos (Capryol[®] 90 e Capmul[®] MCM). Quimicamente o Transcutol[®] é o dietilenoglicol monoetil éter, um líquido miscível em água, utilizado como poderoso solubilizante para muitos fármacos pouco solúveis. É descrito na Farmacopéia europeia e Formulário Nacional da Farmacopéia americana (USP-

NF)¹⁰³. O propilenoglicol é um solubilizante hidrofílico muito utilizado na indústria farmacêutica. O Capryol[®] 90 é o propilenoglicol monocaprilato, um líquido oleoso com HLB 6 utilizado como solvente e co-surfactante, obtido pela reação de esterificação entre o propilenoglicol e o ácido caprílico. O Capryol[®] 90 apresenta monografia nas farmacopéias americana e japonesa¹⁰³. O Capmul[®] MCM é uma mistura de mono e diglicerídeos de ácidos graxos (especialmente ácido caprílico e cáprico), obtidos pela reação de esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico (C8) e cáprico (C10). É um ótimo solvente e co-surfactante (HLB = 5-6), apresenta *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*)¹⁰⁴. Os quatro solventes apresentaram solubilização adequada para a atorvastatina na proporção utilizada (1:3, m/m) e suas estruturas são mostradas na Tabela X.

Tabela X: Estruturas químicas dos solventes utilizados no preparo das formulações SEDDS.

Solvente	Estrutura	Caráter
Trascutol (dietilenoglicol monoetil éter)		Hidrofílico
Propilenoglicol		Hidrofílico
Capryol 90 (propilenoglicol monocaprilato)		Lipofílico
Capmul MCM (mono e diglicerídeos do ácido cáprico e caprílico)	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R1} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$ <p>Monoglicerídeo</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R} \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R} \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \end{array}$ <p>Diglicerídeo</p> </div> </div> <p>onde R corresponde à cadeia carbônica do ácido cáprico ou caprílico.</p>	Lipofílico

As formulações contendo predominantemente surfactantes hidrofílicos e solventes ou co-solventes representam a tendência atual no desenvolvimento de formulações lipídicas¹⁰⁵. A presença do solvente é útil para facilitar a dispersão do surfactante em meio aquoso e pode ajudar na agregação das micelas formadas pelo surfactante principal, caso ele apresente atividade co-surfactante¹⁰⁵. Conforme descrito anteriormente, o Capryol[®] 90 e Capmul[®] MCM além de solventes atuam também como co-surfactantes, devido aos seus valores de HLB baixos.

As amostras foram preparadas pela solubilização do fármaco em cada um dos solventes seguida da adição do Gelucire[®] 44/14 fundido e mistura a quente (65 °C). Foi observada a completa miscibilidade do solvente com o Gelucire[®] 44/14 em todas as amostras. A Figura 41 ilustra o aspecto da formulação SEDDS 01, o qual foi muito semelhante às demais. A Figura 41 A ilustra o aspecto da amostra a quente, na qual pode-se observar uma solução límpida. Após resfriamento, as amostras tornaram-se semi-sólidas (Figura 41 B e C), todas com o mesmo aspecto devido à alta concentração de Gelucire[®] 44/14. Desta maneira, visualmente não foi possível avaliar a homogeneidade do solvente na matriz de Gelucire[®] 44/14.

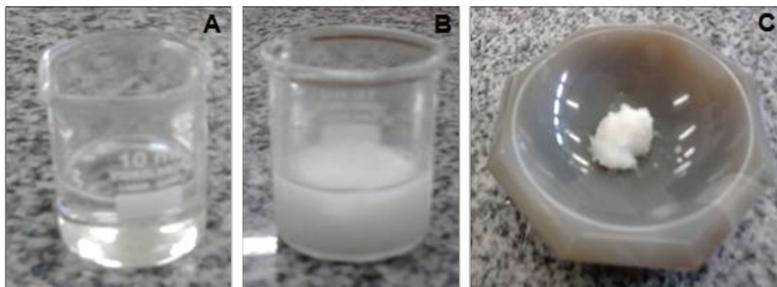


Figura 41: Aspecto da amostra SEDDS 01 com aquecimento (A) e após o resfriamento (B e C).

Os espectros Raman dos solventes empregados são mostrados na Figura 42, na qual é possível verificar que os mesmos apresentam sinais espectrais adequados para sua identificação nas amostras. Vale ressaltar a versatilidade na obtenção dos espectros pela técnica Raman, a qual permitiu caracterizar constituintes puros sólidos (o fármaco), semi-sólidos (o Gelucire[®] 44/14) e líquidos

(os solventes) sem pré-tratamento nenhum e de maneira não destrutiva. As imagens da amostra SEDDS 01 (solvente Transcutol[®]) são mostradas na Figura 43, considerando os três constituintes da amostra.

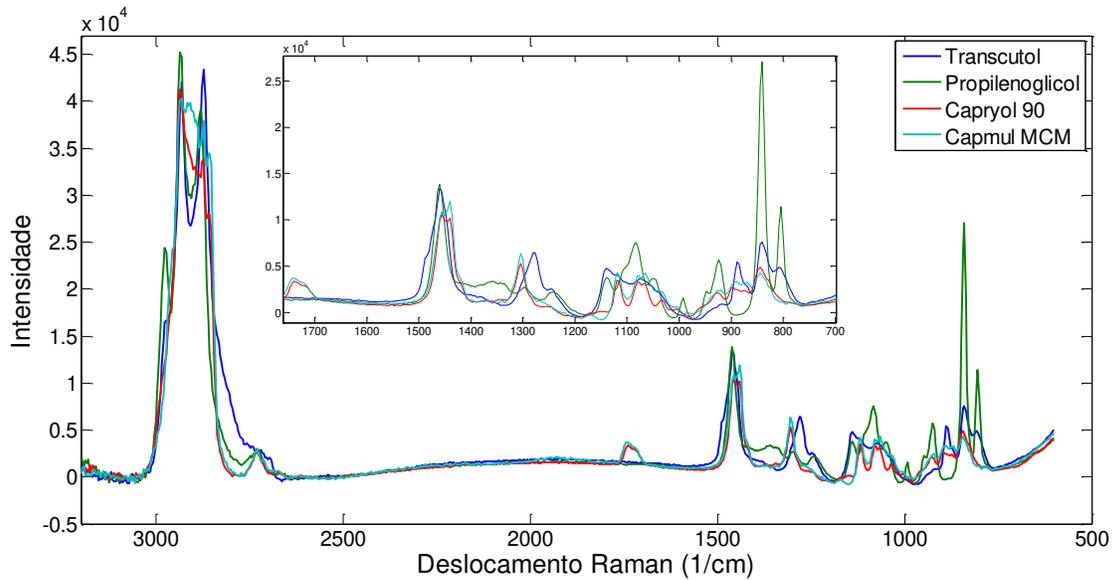


Figura 42: Espectros Raman dos solventes Transcutol[®], propilenoglicol, Capryol[®] 90 e Capmul[®] MCM. *Inset*: Destaque para a região de 1750 – 700 cm^{-1} .

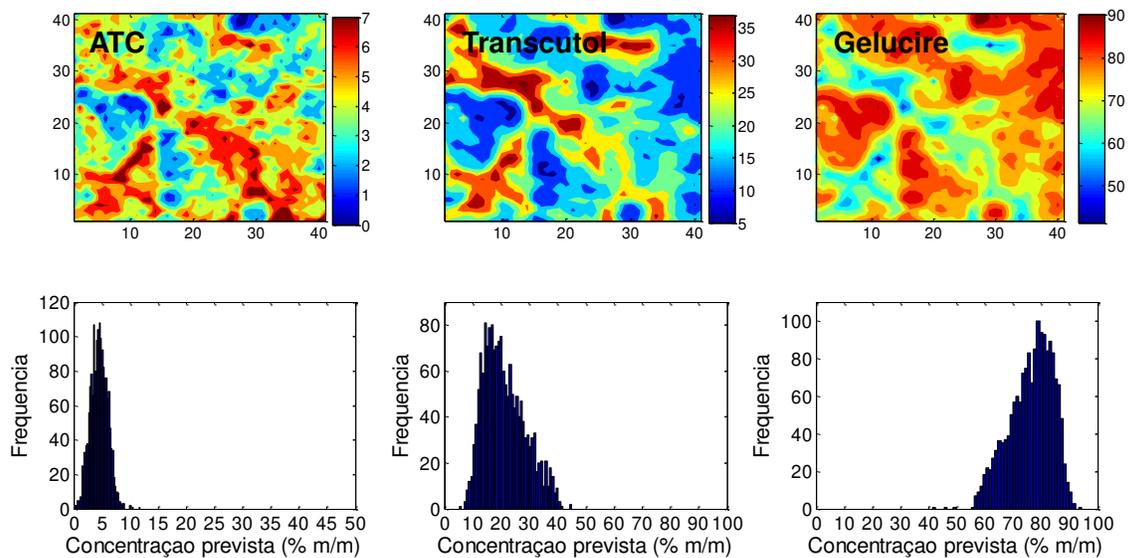


Figura 43: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 01 baseadas na quantificação empregando CLS.

Como é possível observar na Figura 43, a localização do fármaco é a mesma do solvente - o que já era esperado, uma vez que o fármaco foi solubilizado no solvente. Por este motivo, o tratamento mais adequado neste caso seria considerar um sistema formado por 2 constituintes: 1) fármaco + solvente (fármaco solubilizado) e 2) Gelucire® 44/14, utilizando o espectro obtido experimentalmente do fármaco solubilizado no solvente como estimativa do primeiro constituinte nos cálculos CLS. Os resultados utilizando este procedimento são mostrados na Figura 44 para a amostra SEDDS 01.

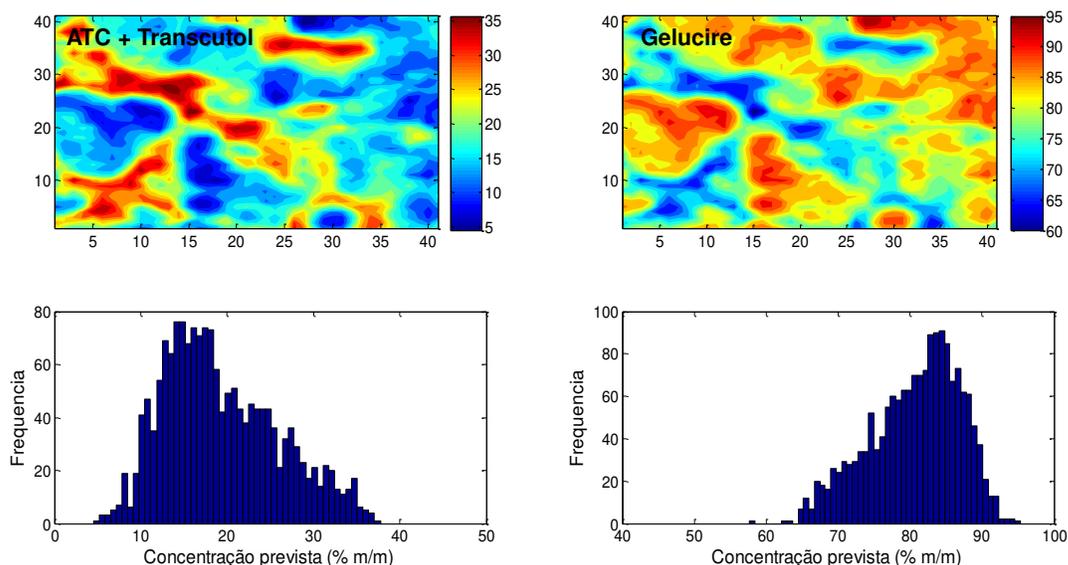


Figura 44: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 01 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em Transcutol® como um único componente da mistura.

De acordo com o preparo da amostra, a concentração esperada do fármaco solubilizado em Transcutol® é de 20,0 % (5,0 % atorvastatina e 15,0 % Transcutol®) e a concentração esperada de Gelucire® 44/14 é de 80,0 %. O mesmo vale para as demais formulações SEDDS. A média prevista para o fármaco solubilizado foi de 19,1 %, com desvio padrão de 6,6 %. O desvio padrão relativo (DPR) foi de 34,2 %. As concentrações previstas nos pixels variaram de 4,5 a 37,8 %. A concentração media prevista para o Gelucire® 44/14 foi de 80,7 % com desvio padrão de 6,3 % (DPR = 7,8%) e as concentrações nos pixels variaram de 57,6 a 95,3 %. Pode ser observado que as imagens dos dois componentes são perfeitamente complementares. O alto valor do desvio padrão –

e, portanto, a faixa larga de valores previstos nos pixels - indicam que a miscibilidade do fármaco solubilizado em Transcutol® com o Gelucire® 44/14 não foi efetiva. Desta maneira, esta amostra pode ser considerada heterogênea. O CLS apresentou valores médios previstos muito próximos aos valores esperados com base no preparo da amostra (erro de -0,9 % para a atorvastatina + Transcutol® e 0,7 % para o Gelucire® 44/14).

As imagens da formulação SEDDS 02 (solvente propilenoglicol) são mostradas na Figura 45.

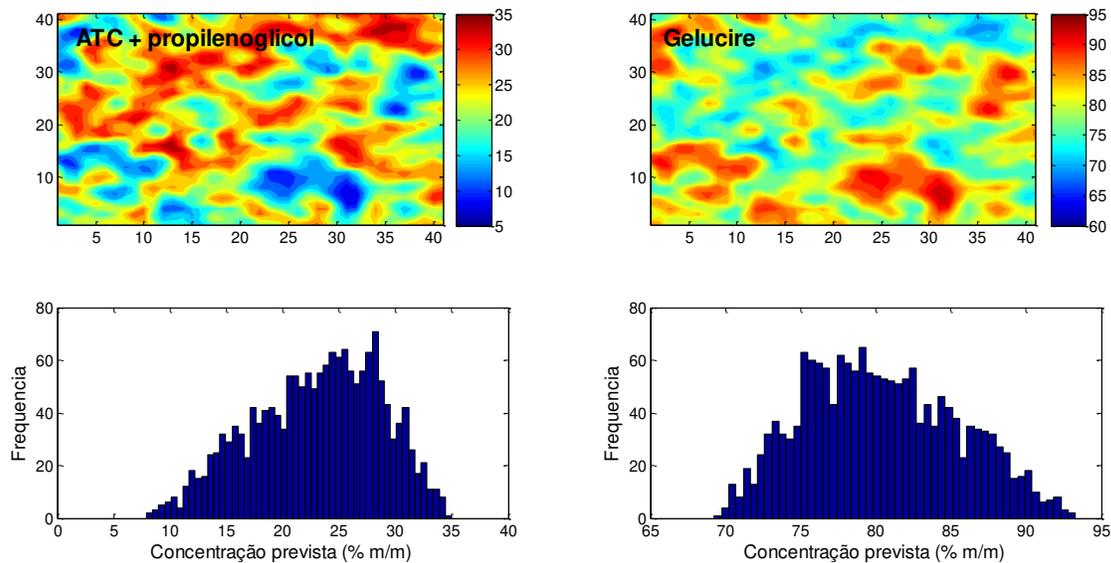


Figura 45: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 02 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em propilenoglicol como um único componente da mistura.

Para esta amostra, a concentração média prevista para o fármaco solubilizado foi de 23,0 %, com desvio padrão de 5,6 % (DPR de 24,3 %). As concentrações previstas nos pixels variaram de 7,9 a 34,9 %. A concentração media prevista para o Gelucire® 44/14 foi de 80,3 % com desvio padrão de 5,0 % (DPR = 6,2%) e as concentrações nos pixels variaram de 69,2 a 93,3 %. O alto valor do desvio padrão indica que a mistura entre o propilenoglicol e o Gelucire® 44/14 também não foi efetiva e esta amostra também pode ser considerada bastante heterogênea. De maneira análoga à amostra SEDDS 01, o CLS apresentou erros de previsão baixos (3,0 % para a atorvastatina + propilenoglicol e 0,3 % para o Gelucire® 44/14).

As imagens da formulação SEDDS 03 (solvente Capryol[®] 90) são mostradas na Figura 46.

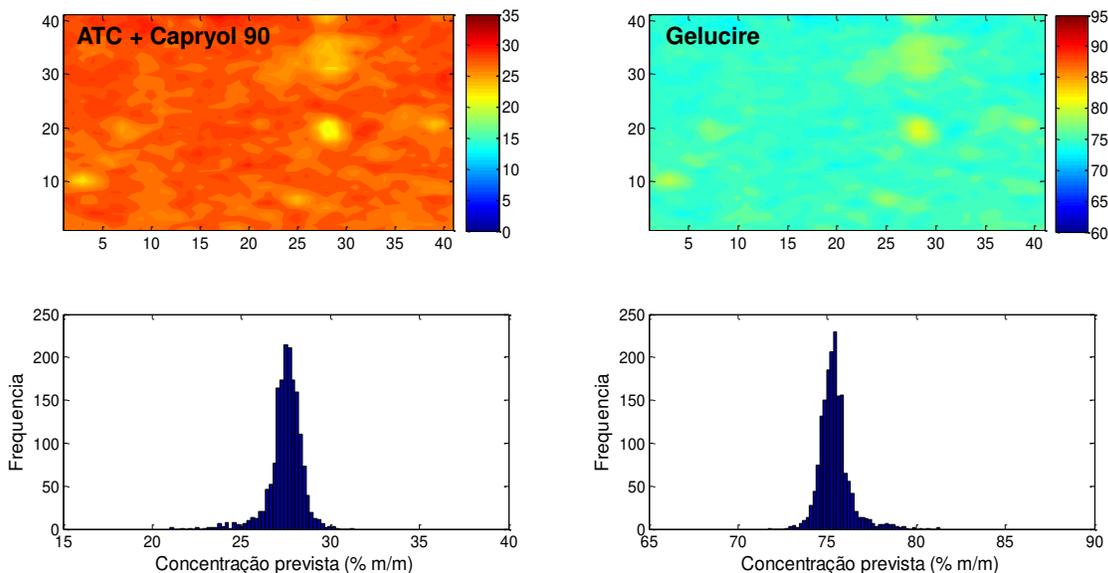


Figura 46: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 03 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em Capryol[®] 90 como um único componente da mistura.

Para esta amostra, a concentração média prevista para o fármaco solubilizado foi de 27,5 %, com desvio padrão de 0,9 % (DPR de 3,3 %). As concentrações previstas nos pixels variaram de 21,0 a 31,3 %. A concentração media prevista para o Gelucire[®] 44/14 foi de 75,4 % com desvio padrão de 0,9 % (DPR = 1,2%) e as concentrações nos pixels variaram de 71,7 a 81,3 %. Comparando-se esta amostra com as duas anteriores, é possível verificar uma melhora considerável na miscibilidade entre os componentes, uma vez que o desvio padrão diminuiu e os histogramas adquiriram formato gaussiano. Existem apenas pequenos aglomerados de Gelucire[®] 44/14, responsáveis pelas caudas nos histogramas. Os erros apresentados pelo método CLS foram superiores àqueles obtidos para as amostras SEDDS 01 e SEDD02 (7,5 % para a atorvastatina solubilizada em Capryol[®] e 4,5 % para o Gelucire[®] 44/14).

As imagens da formulação SEDDS 04 (solvente Capmul[®] MCM) são mostradas na Figura 47.

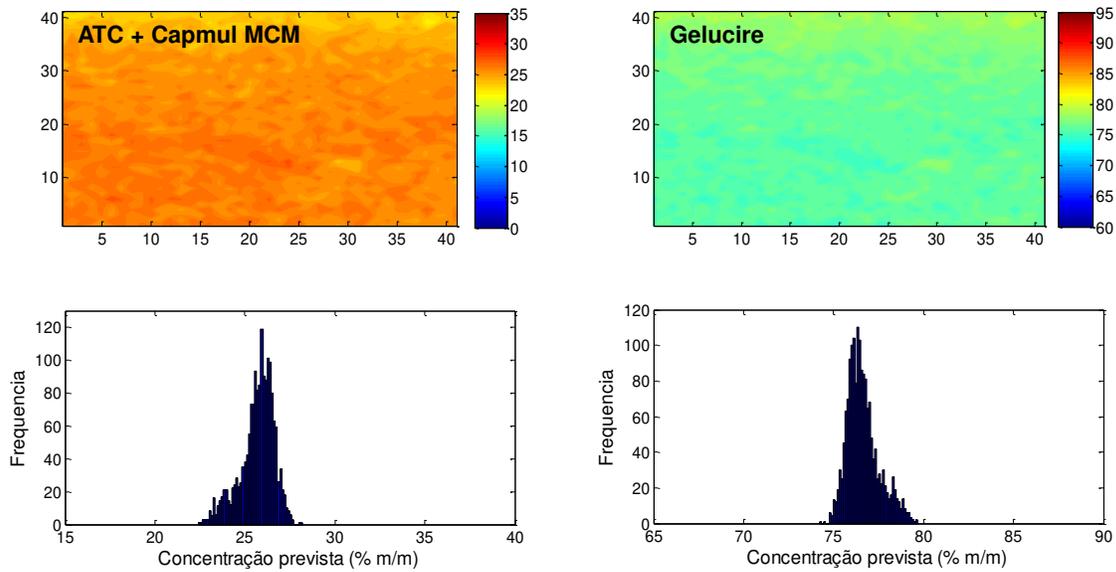


Figura 47: Imagens dos componentes da amostra SEDDS 04 baseadas na quantificação empregando CLS considerando a atorvastatina solubilizada em Capmul[®] MCM como um único componente da mistura.

Para esta amostra, a concentração média prevista para o fármaco solubilizado foi de 25,7 %, com desvio padrão de 0,9 % (DPR de 3,5 %). As concentrações previstas nos pixels variaram de 22,4 a 28,2 %. A concentração media prevista para o Gelucire[®] 44/14 foi de 76,6 % com desvio padrão de 0,9 % (DPR = 1,2%) e as concentrações nos pixels variaram de 74,2 a 79,7 %. Para esta amostra também foi observado um aumento significativo na miscibilidade entre o solvente utilizado e o Gelucire[®] 44/14 e os erros do CLS foram semelhantes àqueles obtidos para a amostra SEDDS 03 (5,7 % para a atorvastatina solubilizada em Capmul[®] MCM e -3,4 % para o Gelucire[®] 44/14).

Com base nos resultados mostrados nas Figuras 44 - 47 é possível verificar claramente que o Gelucire[®] 44/14 apresenta maior afinidade com solventes lipofílicos do que com solventes hidrofílicos. Para confirmar esta tendência, replicatas de todas as formulação SEDDS foram preparadas em dias posteriores e os mesmos resultados foram observados. Assim, para continuação dos estudos foi selecionado o Capmul[®] MCM. A identificação de problemas de miscibilidade entre

os componentes em uma amostra semi-sólida é importante para evitar problemas de estabilidade e até mesmo separação de fases no futuro.

Foi verificado que a exatidão do CLS foi adequada para este estudo de triagem uma vez que ele permitiu avaliar a miscibilidade dos solventes com o Gelucire® 44/14 de uma maneira rápida, sem a necessidade de construir um conjunto de calibração para cada solvente testado. Além disto, neste estudo, não foi realizada nenhuma correção no método CLS, pois os valores de concentração médios previstos foram muito próximos aos valores esperados. Desta maneira, os cálculos foram realizados empregando apenas os espectros dos componentes puros. Acredita-se que neste caso não ocorreu o problema da ambiguidade de intensidade introduzida pela normalização, devido à similaridade de intensidade entre os espectros dos compostos puros utilizados nos cálculos do CLS. No caso das dispersões sólidas preparadas pelo método da fusão, os componentes puros eram a atorvastatina *crystalina* e o Gelucire® 44/14, os quais apresentaram grande diferença de intensidade espectral, a qual foi eliminada na etapa de normalização. No caso das formulações SEDDS, a atorvastatina *solubilizada* em cada um dos solventes foi considerada como o primeiro componente da formulação e o Gelucire® 44/14 o segundo, sendo as diferenças de intensidade entre eles muito pequenas. A Figura 48 mostra os espectros dos componentes puros da dispersão sólida preparada pelo método da fusão e da formulação SEDDS 03 sem normalizar para comparação das intensidades espectrais.

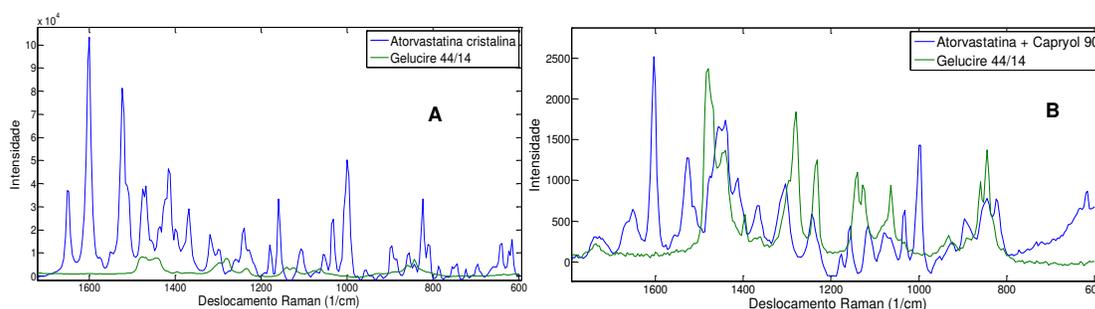


Figura 48: Comparação dos espectros dos componentes puros na dispersão sólida preparada pelo método da fusão (A) e formulação SEDDS 03 (B).

Comparando-se a média das concentrações previstas para as quatro formulações, é possível verificar que existe uma tendência de maior erro na previsão dos constituintes nas formulações mais homogêneas (SEDDS03 e SEDDS04). Este resultado pode ser explicado com base na comparação dos espectros médios de cada amostra (espectro obtido experimentalmente) com os espectros esperados com base no princípio teórico deste método (considerando o sinal em cada número de onda como sendo a soma ponderada dos espectros puros pelas concentrações dos constituintes), calculados matematicamente. Enquanto para as amostras SEDDS 01 e SEDDS02, estes dois espectros se sobrepõe perfeitamente, para as amostras SEDDS03 e SEDDS04 pequenos deslocamentos em alguns números de onda são observados, conforme ilustrado na Figura 49 para amostra SEDDS 03.

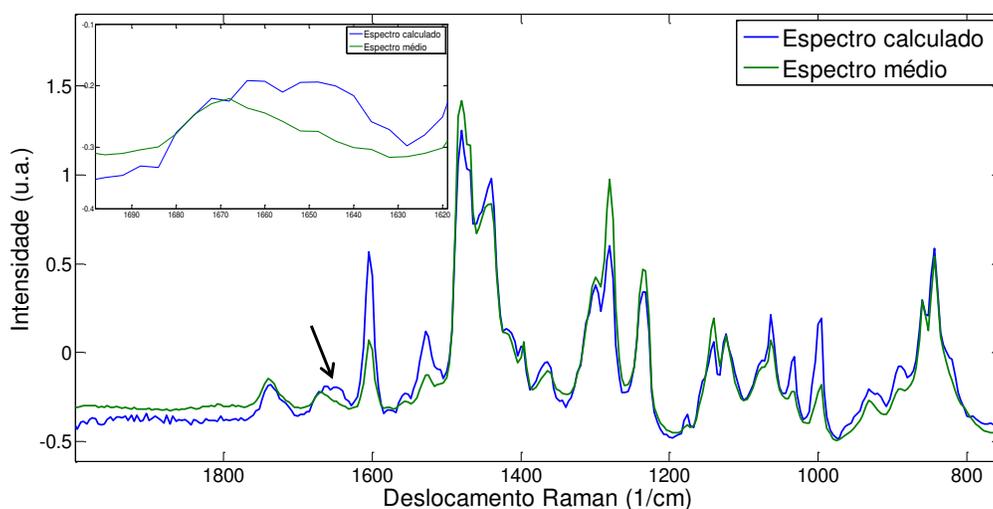


Figura 49: Comparação do espectro médio da formulação SEDDS 03 com o espectro calculado matematicamente com base nas concentrações dos componentes e seus espectros puros.

A Tabela XI apresenta um resumo dos resultados obtidos com o CLS para as amostras SEDDS01- SEDDS04. As concentrações médias experimentais utilizadas para o cálculo dos erros para a atorvastatina solubilizada e o Gelucire® 44/14 são 20,0 e 80,0 %, respectivamente.

Tabela XI: Resumo dos resultados obtidos pelo método CLS para as formulações SEDDS 01-04.

Formulação	Fármaco solubilizado			Gelucire® 44/14		
	Média (%)	Erro (%)	Desvio padrão (%)	Média (%)	Erro (%)	Desvio padrão (%)
SEDDS1	19,1	- 0,9	6,6	80,7	0,7	6,3
SEDDS2	23,0	3,0	5,6	80,3	0,3	5,0
SEDDS3	27,5	7,5	0,9	75,4	- 4,6	0,9
SEDDS4	25,7	5,7	0,9	76,6	-3,4	0,9

Observa-se claramente na Tabela XI que, quanto mais heterogênea a amostra (maiores valores de desvio-padrão, amostras SEDDS 01 e SEDDS02), mais exata é a previsão CLS. Por outro lado, as amostras mais homogêneas (menores valores de desvio-padrão, amostras SEDDS 03 e SEDDS 04) apresentam os maiores desvios dos valores esperados. Isto acontece porque os compostos se comportam de forma independente na mistura heterogênea, enquanto na mistura homogênea, possíveis interações que levam à maior homogeneidade causam os deslocamentos espectrais como aquele mostrado na Figura 49, diminuindo a exatidão do método.

As amostras SEDDS01-SEDDS04 foram submetidas à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), para comparação com as imagens químicas obtidas por Raman. Os resultados são mostrados na Figura 50.

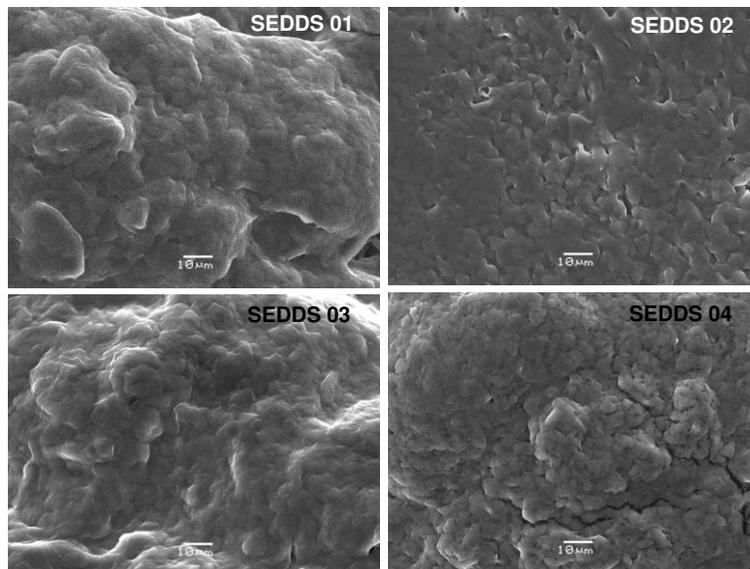


Figura 50: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das formulações SEDDS01-SEDDS04.

A Figura 50 indica que não é possível avaliar a distribuição dos compostos nas formulações com a técnica de microscopia eletrônica de varredura, nem mesmo nas amostras mais heterogêneas. Fica ainda a dúvida de que se o alto vácuo empregado não tenha destruído a estrutura das formulações semi-sólidas. Estes aspectos ressaltam a importância da espectroscopia de imagem na avaliação deste tipo de formulação, pois neste caso, as imagens são geradas por diferenças espectrais e a análise não é invasiva.

Apesar dos erros do CLS para as formulações mais homogêneas serem aceitáveis do ponto de vista analítico (próximos a 5,0 %) e não terem afetado o desempenho geral do CLS para o uso na etapa de triagem, para os estudos posteriores empregando o solvente lipofílico Capmul[®] MCM foi utilizado o PLS, que é um método de calibração multivariada. Assim, qualquer evento espectral não esperado pelo CLS com base nos espectros puros é levado em consideração na etapa de calibração, fornecendo assim, uma previsão mais exata da concentração dos constituintes nos pixels.

2.2. Etapa 2: Desenvolvimento da formulação SEDDS empregando Capmul[®] MCM

Inicialmente, a homogeneidade da amostra SEDDS04 foi confirmada por PLS e, para isto, um conjunto de amostras foi preparado para a calibração. A percentagem de atorvastatina *solubilizada* em Capmul[®] MCM foi variada de 10,0 – 90,0 %, uma vez que a percentagem média esperada era de 20,0 %. De forma complementar, a percentagem de Gelucire[®] 44/14 também foi variada 10,0 – 90,0 % uma vez que a percentagem média esperada era de 80,0 %.

Uma vez que a amostra é uma mistura de dois componentes com as concentrações correlacionadas, pois a soma dos mesmos deve ser 100 %, somente uma variável latente seria esperada. No entanto, o procedimento de validação cruzada sugeriu o uso da segunda variável latente com base no valor de RMSECV e por este motivo esta foi mantida. O RMSECV foi de 2,0 %, o que representa um erro médio de 5,0 %. As duas variáveis latentes descreveram 99,46 % e 99,71 % da variação nas matrizes **X** e **Y**, respectivamente. Os gráficos de concentrações experimentais contra os valores previstos pelo método PLS são mostrados na Figura 51. As imagens dos componentes desta amostra são mostradas na Figura 52.

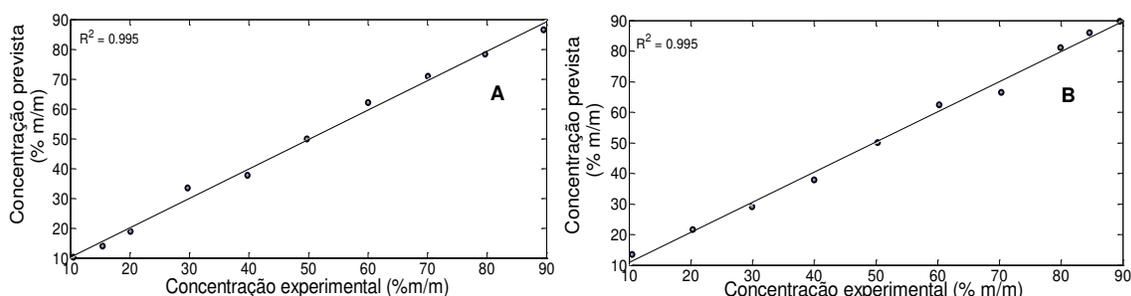


Figura 51: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações previstas pelo método PLS para a atorvastatina solubilizada em Capmul[®] MCM (A) e Gelucire[®] 44/14 (B).

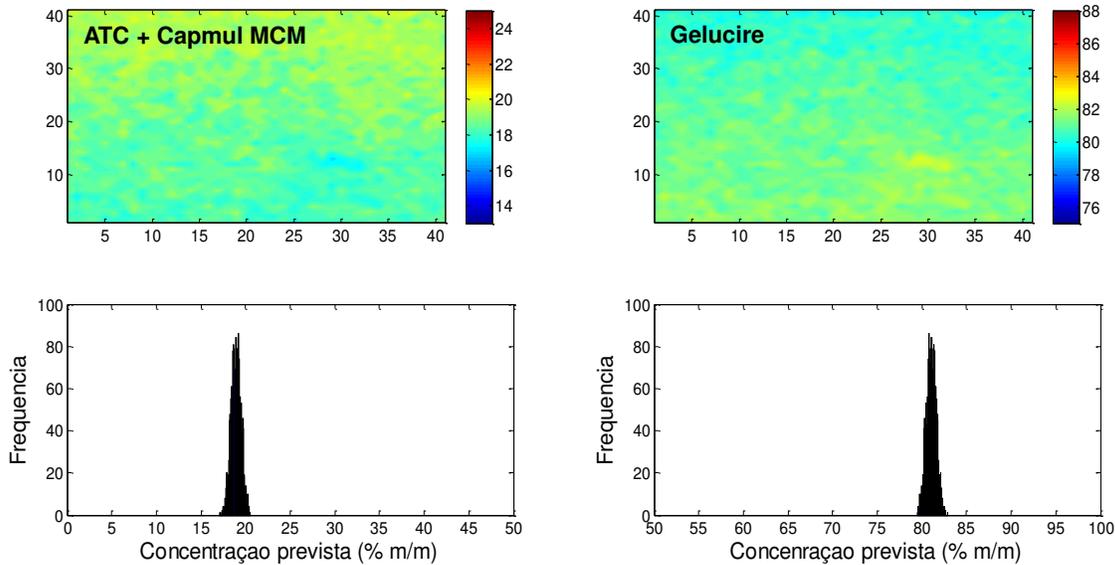


Figura 52: Imagens dos componentes da formulação SEDDS04 baseadas na quantificação empregando PLS.

Como é possível verificar na Figura 51, a concordância entre os valores médios experimentais e aqueles previstos pelo PLS é alta e assim, assume-se que os valores previstos nos pixels estejam corretos. O valor médio previsto pelo PLS para a atorvastatina solubilizada em Capmul[®] MCM foi de 19,0 % com desvio padrão de 0,6 % (DPR = 2,9 %). Os valores previstos nos pixels variaram de 17,1 a 20,5 %. O valor médio previsto para o Gelucire[®] 44/14 foi de 81,1 %, com desvio padrão de 0,6 % (DPR = 0,7 %). Os valores previstos nos pixels variaram de 79,5 a 82,9 %. Comparando-se estes resultados com aqueles fornecidos pelo CLS, pode-se verificar que ambos os métodos indicaram que a miscibilidade do Capmul[®] MCM com o Gelucire[®] 44/14 é alta e assim, pode-se concluir que a formulação SEDDS com este solvente tende a ser bastante homogênea. Além disto, os valores médios previstos pelo PLS foram mais exatos (erros em torno de 1 %) que aqueles fornecidos pelo CLS, apesar dos erros fornecidos pelo CLS (em torno de 6 %) não terem sido altos a ponto de inviabilizar o seu uso.

Após a confirmação da miscibilidade da atorvastatina solubilizada em Capmul[®] MCM com o Gelucire[®] 44/14, foi realizado um estudo para determinar as proporções entre estes componentes que fornecessem supersaturação do

fármaco após diluição em água. As concentrações de atorvastatina+Capmul[®] MCM foram então variadas de 15,0 a 55,0 %, mantendo-se a concentração de atorvastatina constante em 5,0%, conforme mostrado na Tabela VIII. Foram pesadas massas correspondentes a 80 mg do fármaco e adicionadas a 250 mL de água, sob agitação a 37 °C durante 1h, conforme descrito no procedimento experimental. Após este período, foi realizada uma avaliação visual quanto à precipitação do fármaco. Os resultados são mostrados na Tabela XII.

Tabela XII: Resultados da avaliação visual das amostras contendo diferentes proporções de Capmul[®] MCM e Gelucire[®] 441/14 após solubilização em água.

Amostra	Atorvastatina (% m/m)	Capmul MCM (% m/m)	Gelucire 44/14 (% m/m)	Aspecto	Precipitação
1	5,0	15,2	79,8	Límpido	Sim
2	4,9	20,3	74,7	Límpido	Sim
3	5,0	25,0	70,0	Límpido	Sim
4	4,9	30,1	65,0	Límpido	Não
5	5,0	35,0	60,0	Límpido	Não
6	4,9	45,4	49,7	Turvo	Não
7	4,9	54,9	40,2	Turvo	*

*não foi possível avaliar devido à alta turbidez da amostra

Os resultados mostrados na Tabela XII indicam que amostras contendo alta porcentagem de Gelucire[®] 44/14 apresentam aspecto límpido, uma vez que o Gelucire[®] 44/14 sozinho apresenta aspecto límpido em água. Entretanto, foi observada uma pequena quantidade de pó no fundo do erlenmeyer, indicando precipitação do fármaco. No outro extremo, amostras contendo alta porcentagem de Capmul[®] MCM apresentaram aspecto turvo, uma vez que o próprio Capmul[®] MCM apresenta aspecto turvo quando solubilizado em água. Amostras com quantidades intermediárias de Capmul[®] MCM e Gelucire[®] 44/14 apresentaram aspecto límpido sem sinal de precipitação.

Baseado nestes resultados foi selecionada a amostra contendo 5,0 % do fármaco, 30,0 % de Capmul[®] MCM e 65,0 % de Gelucire[®] 44/14. A homogeneidade da amostra com estas novas concentrações dos componentes foi então avaliada por espectroscopia Raman de imagem e PLS. Para este propósito,

outra calibração teve que ser construída, na qual a quantidade de (atorvastatina + Capmul[®] MCM) foi variada de 20,0 a 50,0 % e Gelucire[®] 44/14 de 80 a 50 % (Tabela IX). Para a construção deste modelo, duas variáveis latentes foram utilizadas, explicando 99,0 e 99,3 % da variação nas matrizes **X** e **Y**, respectivamente. O coeficiente de determinação (R^2) do gráfico de concentrações previstas vs concentrações experimentais foi de 0,977 e o RMSECV de 1,5 % (erro médio de 4,3 %). As imagens são mostradas na Figura 53.

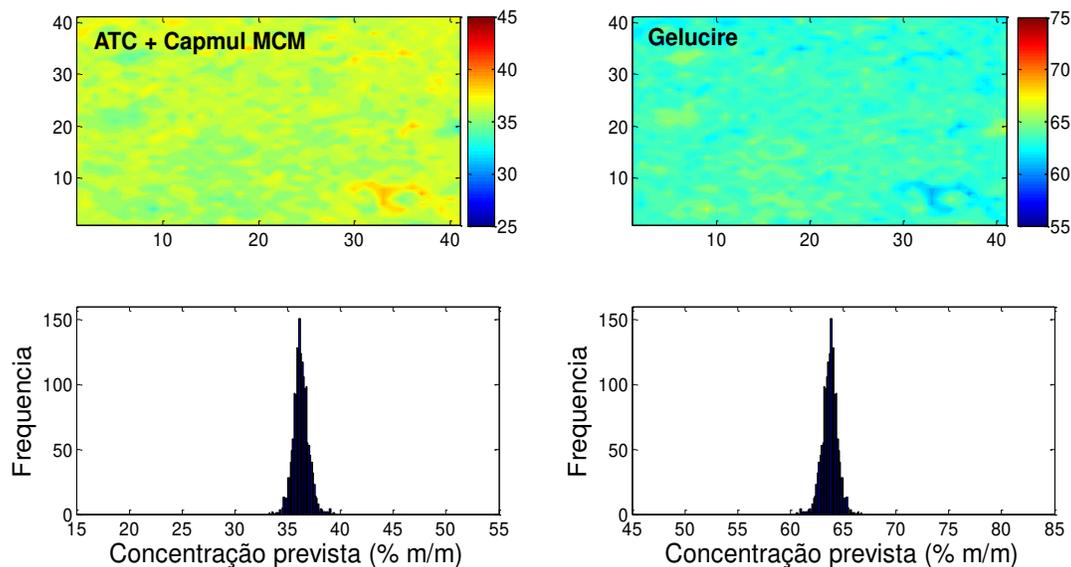


Figura 53: Imagens dos componentes da formulação SEDDS04 com as novas proporções, determinadas após estudo em água.

A concentração esperada de atorvastatina solubilizada em Capmul[®] MCM era de 35,0 % e a média prevista pelo PLS foi de 36,3 % (erro de 1,3 %) com desvio padrão do histograma de 0,7 %. A concentração prevista nos pixels variou de 33,2 a 39,5 %. A concentração esperada de Gelucire[®] 44/14 era de 65,0 % e a concentração média prevista foi de 63,7 % (erro de -1,3%), com desvio padrão do histograma de 0,7 %. A concentração prevista nos pixels variou de 60,5 a 66,7 %. Com base nos valores de desvio padrão dos histogramas e imagens químicas, pode-se concluir que a homogeneidade da mistura se manteve nesta nova proporção entre os excipientes.

2.3. Solubilidade em água

A quantificação CLAE indicou que a concentração da atorvastatina solubilizada em água era de $0,31 \pm 0,01$ mg/mL, um valor próximo àquele obtido pelo método da fusão. Este valor deve, no entanto, ser comparado com o valor de solubilidade da forma amorfa e não mais com o da forma cristalina, como no caso do método da fusão. A solubilidade da forma amorfa foi determinada em nosso estudo como sendo de $0,25 \pm 0,01$ mg/mL e, conforme esperado, apresenta um valor superior ao da forma cristalina. Desta maneira, a estratégia de preparar uma formulação SEDDS para a atorvastatina com a utilização do Gelucire[®] 44/14 fornece uma condição de supersaturação para o fármaco e ao mesmo tempo permite alcançar formulações mais homogêneas, sem a presença de aglomerados como no método da fusão.

3. Conclusões

Nesta parte do trabalho, foi avaliada a possibilidade de solubilização da atorvastatina antes da sua incorporação ao Gelucire[®] 44/14 como uma maneira de evitar a formação de aglomerados do fármaco. Na etapa de triagem dos solventes, foi verificado que todas as formulações SEDDS apresentaram o mesmo aspecto após o preparo, não sendo possível inferir sobre a homogeneidade por meio de observação visual. No entanto, as imagens químicas mostraram que, enquanto as amostras preparadas com Transcutol[®] e propilenoglicol apresentaram-se bastante heterogêneas, aquelas preparadas com Capryol[®] 90 e Capmul[®] MCM apresentam-se homogêneas. Nesta etapa, as imagens foram geradas empregando o método CLS, o qual não necessitou de nenhuma correção para fornecer valores médios exatos. Acredita-se que isto se deveu ao fato de que, como as intensidades dos espectros considerados puros eram muito próximas, não ocorreu a ambiguidade de intensidade nos cálculos do método CLS. No entanto, foi verificado que pequenos deslocamentos espectrais para as amostras SEDDS03 e SEDDS04 foram responsáveis pelos maiores valores de erros (5,0 – 7,0 %) em relação às formulações SEDDS 01 e SEDDS02 (1,0- 3,0 %).

Estudos de solubilidade em água permitiram selecionar a proporção entre o Capmul[®] MCM (30,0 %) e o Gelucire[®] 44/14 (65,0 %) que fornecessem uma condição de supersaturação para a atorvastatina cálcica. Nesta nova proporção, o aumento de solubilidade alcançado foi equivalente àquele obtido pelo método da fusão. As imagens obtidas por PLS indicaram que a homogeneidade da amostra se manteve nesta proporção. Assim, ao desenvolver uma formulação para a atorvastatina com Gelucire[®] 44/14, é preferível solubilizá-la em um solvente lipofílico adequado antes da incorporação ao Gelucire[®] 44/14 para evitar a formação de aglomerados e ao mesmo tempo conseguir uma condição de supersaturação em água.

A avaliação da miscibilidade entre os compostos em uma formulação semi-sólida é importante para evitar problemas de instabilidade e até mesmo separação de fases. As análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram avaliar características físicas como morfologia das amostras, porém não foi possível avaliar a distribuição dos compostos, nem nas amostras mais heterogêneas. Assim, fica clara a importância da espectroscopia de imagem para o desenvolvimento deste tipo de formulação.

CAPÍTULO 6: DISPERSÕES SÓLIDAS DE ATORVASTATINA EM SOLUPLUS[®]

Nesta parte do trabalho, foi estudado um segundo excipiente para o desenvolvimento de formulações para fármacos pouco solúveis em água, o Soluplus®. Ao contrário do Gelucire® 44/14, ele é um excipiente sólido com aspecto de grânulos e é considerado como pertencente à quarta geração de materiais para o preparo de dispersões sólidas. Analogamente ao Gelucire® 44/14, seu mecanismo de aumento de solubilidade em meio aquoso é micelar. Os estudos foram divididos em três etapas: a primeira etapa foi uma etapa de triagem, na qual foi avaliado o uso de dois solventes, água e etanol, pertencentes à classe III do ICH e, portanto sem risco toxicológico, juntamente com o processo de mistura dos pós (mistura física). Na segunda etapa, a concentração de atorvastatina que poderia ser incorporada na dispersão foi estudada, empregando etanol como solvente. Na terceira etapa foram estudados três possíveis diluentes para a formulação: amido de milho, celulose e lactose, bem como a estratégia de inclusão destes diluentes na dispersão: adição na fase interna (junto com a solução de atorvastatina e Soluplus® em etanol) ou fase externa (mistura após a secagem). Nesta parte da tese foi enfatizado o uso da espectroscopia NIR de imagem com o objetivo de avaliar suas potencialidades, vantagens e desvantagens. Os estudos da terceira etapa também foram conduzidos empregando espectroscopia Raman e os resultados das duas técnicas foram comparados.

1. Procedimento Experimental

1.1. Preparo das amostras

1.1.1. Etapa 1: Estudo Inicial de triagem em etanol, água e mistura física

Para o preparo das dispersões em etanol ou água na etapa de triagem, foi solubilizada uma massa de aproximadamente 500 mg de Soluplus® (BASF) em 50 mL do solvente em um béquer, com agitação até completa solubilização, e em seguida foi adicionada atorvastatina cálcica (250 mg) com agitação. As dispersões

foram secas e trituradas em almofariz, preparou-se um comprimido contendo 250 mg da amostra em prensa de duas toneladas, com superfície lisa e adequada para a obtenção da imagem e que se encaixasse perfeitamente no suporte da cela do equipamento. Para o preparo da mistura física, Soluplus® foi adicionado a um almofariz e triturado até que um pó fino fosse obtido. A atorvastatina cálcica foi adicionada, a mistura foi homogeneizada e foi preparado um comprimido da mesma maneira que para as dispersões sólidas. A concentração de atorvastatina em todas as amostras preparadas nesta etapa foi de 33,3 % (% m/m).

1.1.2. *Etapa 2: Estudo das dispersões em etanol variando a concentração de atorvastatina*

Nesta etapa, a razão atorvastatina:Soluplus® foi variada de 1:0,11 a 1:6,5 (m/m), o que equivale a uma variação de 15,0 a 90,0 % (% m/m) empregando etanol como solvente. As concentrações das amostras são mostradas na Tabela XIII. As amostras foram preparadas da mesma maneira que no estudo inicial, descrito no item anterior.

Tabela XIII: Concentração de atorvastatina e Soluplus® nas dispersões sólidas preparadas em etanol na Etapa 2

Amostra	Razão Atorvastatina:Soluplus: (m/m)	Porcentagem atorvastatina (% m/m)	Porcentagem Soluplus (% m/m)
1	1 : 6,5	15,0	85,0
2	1 : 4 ,0	20,0	80,0
3	1 : 2,0	33,3	66,6
4	1 : 1,5	40,0	60,0
5	1 : 1,0	50,0	50,0
6	1: 0,65	60,0	40,0
7	1: 0,43	70,0	30,0
8	1: 0,25	80,0	20,0
9	1: 0,11	90,0	10,0

1.1.3. Etapa 3: Seleção do diluente

Nesta etapa, a razão atorvastatina:Soluplus® foi mantida fixa em 1:4 (m/m) com base em estudos de solubilização em água e foram estudados três possíveis diluentes para a formulação: amido de milho (Synth), celulose microcristalina 102 (Synth) e lactose (Synth). Foram estudados dois processos de adição do diluente: 1) na fase interna (FI, junto com a atorvastatina e o Soluplus® em etanol, antes da secagem) e 2) na fase externa (FE, no almofariz, após a dispersão ser seca). Nesta etapa, as formulações continham 10,0 % de atorvastatina, 40,0 % de Soluplus® e 50,0 % de cada um dos polímeros. De acordo com o fabricante, as formulações contendo Soluplus® podem necessitar de um desintegrante para garantir a liberação do fármaco e evitar a formação de aglomerados (*lumps*) em meio aquoso¹⁸. Neste trabalho, foi estudada a possibilidade de simplificar a formulação, de maneira a evitar a necessidade da adição do desintegrante.

Adicionalmente, foram preparadas quatro amostras variando-se a concentração de atorvastatina + Soluplus® e de cada um dos polímeros para a correção dos resultados previstos pelo CLS (Tabela XIV).

Tabela XIV: Concentração de atorvastatina + Soluplus® e dos polímeros nas amostras preparadas para correção dos valores previstos por CLS.

Amostra	Atorvastatina + Soluplus (% m/m)	Polímeros (% m/m)
1	71,0	29,0
2	62,0	38,0
3	41,0	59,0
4	38,0	62,0

1.2. Obtenção das imagens

Os espectros NIR foram obtidos empregando-se o espectrofotômetro modelo Spotlight 400N (Perkin Elmer), mostrado na Figura 13. Foram obtidas imagens dos comprimidos colocando-os sobre uma cela de alumínio, em uma área de 16 mm², na faixa espectral de 4000 a 7800 cm⁻¹, com resolução de 16 cm⁻¹, pixel de 50 µm e 32 varreduras por pixel no modo refletância. Foi utilizada

uma superfície de ouro polida como referência para cálculo da reflectância relativa ($R_{\text{relativa}} = R_{\text{amostra}}/R_{\text{referência}}$).

Os estudos da terceira etapa também foram conduzidos empregando espectroscopia Raman. Os espectros Raman foram obtidos empregando-se o equipamento Raman Station 400 (Perkin Elmer), mostrado na Figura 14. Foram obtidas imagens dos comprimidos colocando-os sobre uma cela de alumínio, em uma área de 16 mm², na faixa espectral de 3200 – 600 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e pixel de 100 µm.

1.3. Pré-tratamento dos espectros e tratamento dos dados

Para os espectros Raman foram empregados os pré-processamentos de remoção de *spikes* e normalização dos espectros puros para comprimento unitário. Para os espectros NIR, foram aplicados os pré-processamentos de transformação dos valores de refletância (R) para log 1/R, o qual é proporcional à concentração e correção de espalhamento multiplicativo (*Multiplicative Scattering Correction*, MSC) para remover influências de espalhamento devido à diferenças de tamanho de partícula.

Para o tratamento dos dados e geração das imagens foi enfatizado o uso do método CLS. Os métodos PLS e MCR também foram avaliados e as dificuldades no seu uso foram discutidas. Os cálculos foram realizados em ambiente Matlab 7.8, com PLS Toolbox versão 6.7. Para os cálculos empregando MCR, foi utilizado um algoritmo com interface gráfica para Matlab disponibilizado por Tauler *et al.*⁴⁹ com as seguintes restrições: não negatividade de espectros e concentrações e balanço de massa.

1.4. Teste de solubilidade

Os ensaios de solubilidade em água foram realizados conforme descrito no item 1.4 do Capítulo 3.

2. Resultados e Discussão

Os espectros NIR e Raman do Soluplus® são mostrados na Figura 54 A e B, respectivamente. Como é possível verificar nesta Figura, ambos apresentam sinais adequados para sua utilização analítica.

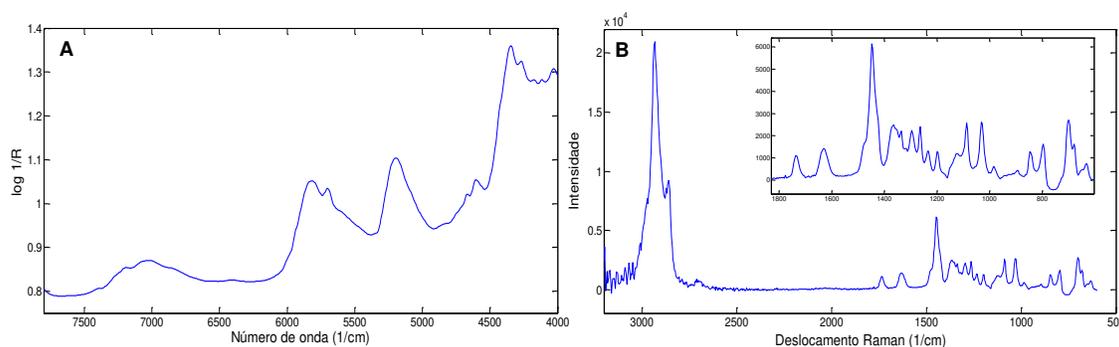


Figura 54: Espectros NIR (A) e Raman (B) do Soluplus®.

2.1. Etapa 1: Triagem dos solventes

O objetivo do estudo inicial de triagem foi avaliar o comportamento da atorvastatina e do Soluplus® em etanol e em água. O etanol foi selecionado, pois o Soluplus® é solúvel neste solvente. A atorvastatina é apenas levemente solúvel em etanol e muito solúvel em metanol. No entanto, enquanto o metanol é classificado como pertencente à classe II do ICH, o etanol é classificado como pertencente à classe III, sendo, portanto, preferível o seu uso. Os resultados indicaram que a atorvastatina apresentava solubilidade suficiente para o preparo da dispersão no volume de etanol utilizado e, por este motivo, este solvente pôde ser utilizado. Considerando que a atorvastatina foi solubilizada em etanol, espera-se que ela esteja na sua forma amorfa após a secagem da dispersão.

A justificativa para a utilização da água como solvente foi que, sendo o Soluplus® solúvel em água e a atorvastatina não, ele recobriria as partículas do fármaco, permitindo carregá-lo em meio aquoso. Como a atorvastatina não foi solubilizada em água, ela permaneceria na sua forma cristalina original (Forma I). A mistura física de pós é o método mais simples de fabricação e, como já foi reportado na literatura que mesmo a mistura física de um fármaco com o

Soluplus® foi suficiente para o aumento de solubilidade do mesmo¹⁶, ela também foi considerada. As imagens da mistura física, dispersão em água e dispersão em etanol são mostradas nas Figuras 55, 56 e 57. Estas imagens foram geradas empregando CLS, sem nenhuma correção, ou seja, utilizando apenas os espectros puros.

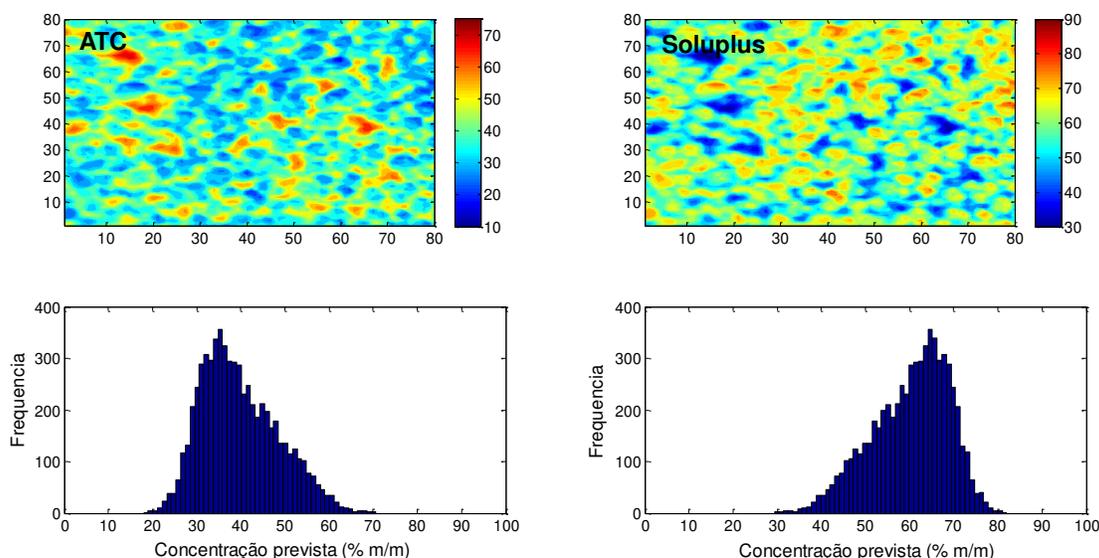


Figura 55: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na mistura física preparada na etapa inicial de triagem.

A média prevista para o fármaco na mistura física foi de 39,7 %, com desvio padrão de 8,7 % (DPR de 22,0 %). As concentrações previstas nos pixels variaram de 18,0 a 70,7 %. A concentração média prevista para o Soluplus® foi de 60,3 % com desvio padrão de 8,7 % (DPR = 14,4 %) e as concentrações nos pixels variaram de 29,3 a 82,0 %. Na Figura 55 é possível identificar os grânulos de Soluplus®, com a atorvastatina nos interstícios.

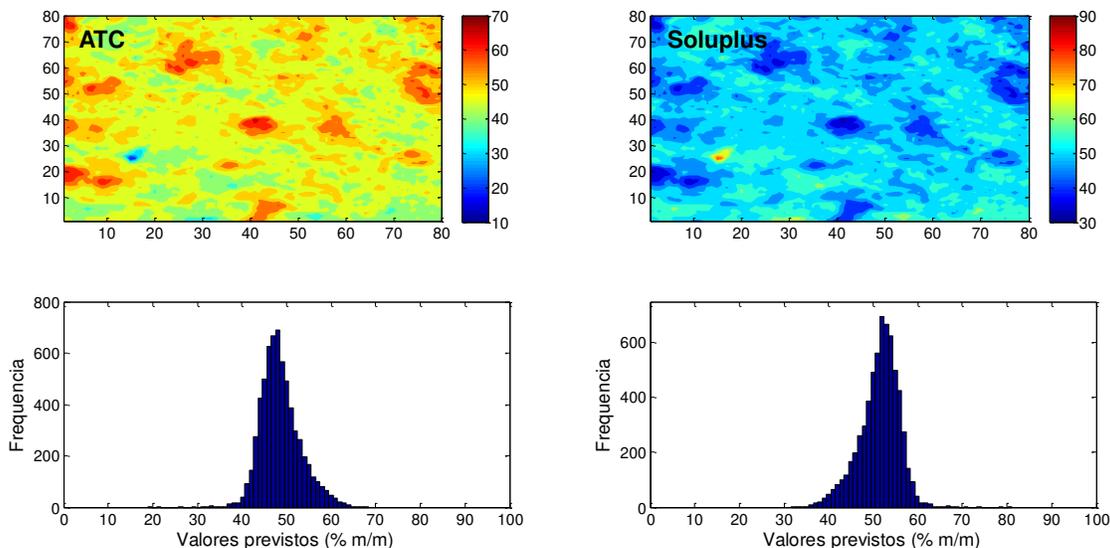


Figura 56: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na dispersão preparada em água na etapa inicial de triagem.

A média prevista para o fármaco na dispersão preparada em água foi de 48,6 %, com desvio padrão de 4,5 % (DPR de 9,3 %). As concentrações previstas nos pixels variaram de 18,8 a 68,4 %. A concentração media prevista para o Soluplus® foi de 51,4 % com desvio padrão de 4,5 % (DPR = 8,7%) e as concentrações nos pixels variaram de 31,6 a 81,2 %. Nesta amostra, já não foi mais possível mais identificar os grânulos de Soluplus®, como na mistura física, uma vez que o mesmo foi solubilizado, enquanto são observados aglomerados de atorvastatina, uma vez que a mesma não é solúvel em água. Vale ressaltar que durante o preparo da amostra, visualmente estes aglomerados não foram observados.

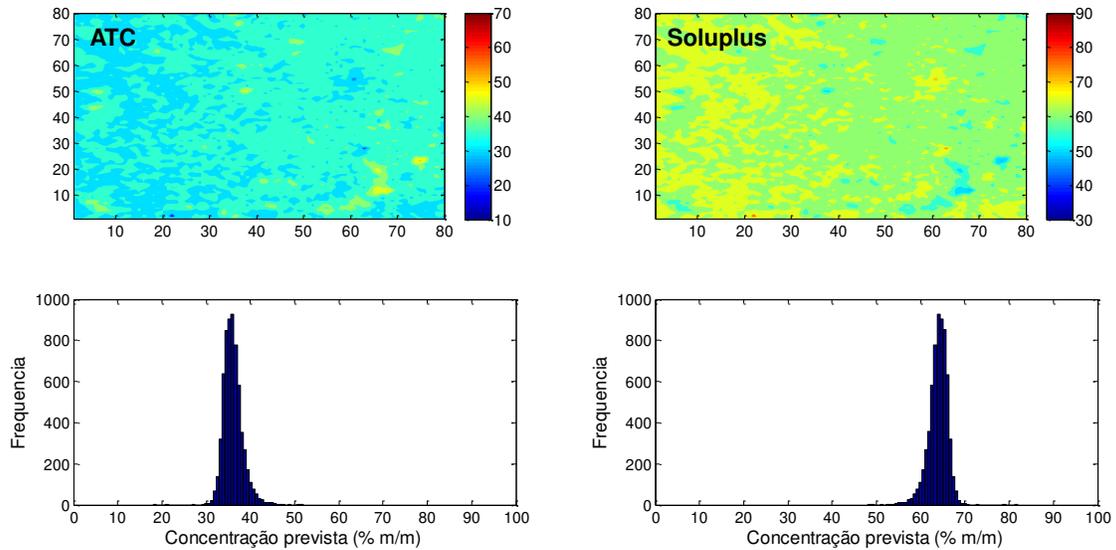


Figura 57: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na dispersão preparada em etanol na etapa inicial de triagem.

A média prevista para o fármaco na dispersão preparada em etanol foi de 36,0 %, com desvio padrão de 2,2 % (DPR de 6,1 %). As concentrações previstas nos pixels variaram de 29,5 a 46,5 %. A concentração media prevista para o Soluplus® foi de 64,0 % com desvio padrão de 2,2 % (DPR = 3,4%) e as concentrações nos pixels variaram de 55,0 a 70,2 %. Nesta amostra é possível verificar que os dois componentes estão bem dispersos e isto se deve, à solubilização dos dois no mesmo solvente.

Comparando-se os resultados apresentados, é possível identificar claramente que a dispersão em etanol foi a mais homogênea (desvio padrão 2,2), seguida da dispersão em água (desvio padrão de 4,5) e a mistura física se mostrou bastante heterogênea (desvio padrão de 8,7). Os resultados mostrados para as três amostras foram confirmados por meio de uma replicata de cada amostra. É possível também verificar que as três imagens são perfeitamente complementares e que a soma dos valores previstos do fármaco e do Soluplus® em todas as amostras foi de 100 %.

2.2. Etapa 2: Estudo de concentração da atorvastatina na dispersão preparada em etanol

Na primeira etapa foi realizada apenas uma avaliação inicial para comparação das dispersões preparadas com os dois solventes, bem como a mistura física dos pós, com uma concentração de atorvastatina e de Soluplus® fixa que permitisse o manuseio da dispersão. Por fornecer resultados mais promissores, o etanol foi selecionado para a continuidade dos estudos e, nesta segunda etapa, a razão entre a atorvastatina e o Soluplus® neste solvente foi estudada com mais detalhes para identificar a concentração máxima do fármaco que poderia ser incluída na dispersão, permitindo alcançar a condição de supersaturação após diluição em água. Para este estudo foram preparadas amostras variando-se a concentração de atorvastatina de 15,0 a 90,0 %, conforme mostrado na Tabela XIII.

Foi observado experimentalmente que a solubilização da atorvastatina em concentrações de até 50,0 % (razão 1:1 m/m) foi completa e assim, a mesma estaria na forma amorfa na dispersão após a secagem. Em concentrações acima de 60,0 % foi observado que a solubilização da atorvastatina em etanol não foi completa, o que geraria uma mistura de polimorfos. Por este motivo, a concentração de atorvastatina que deveria ser utilizada para que apenas a forma amorfa estivesse presente deveria ser inferior a 50,0 %. As imagens das amostras contendo 1, 2, 4 e 5, contendo, respectivamente 15,0, 20,0, 40,0 e 50,0 % de atorvastatina são mostradas nas Figuras 58, 59, 60 e 61. A imagem da amostra contendo 33,3 % já foi mostrada na primeira etapa (Figura 57).

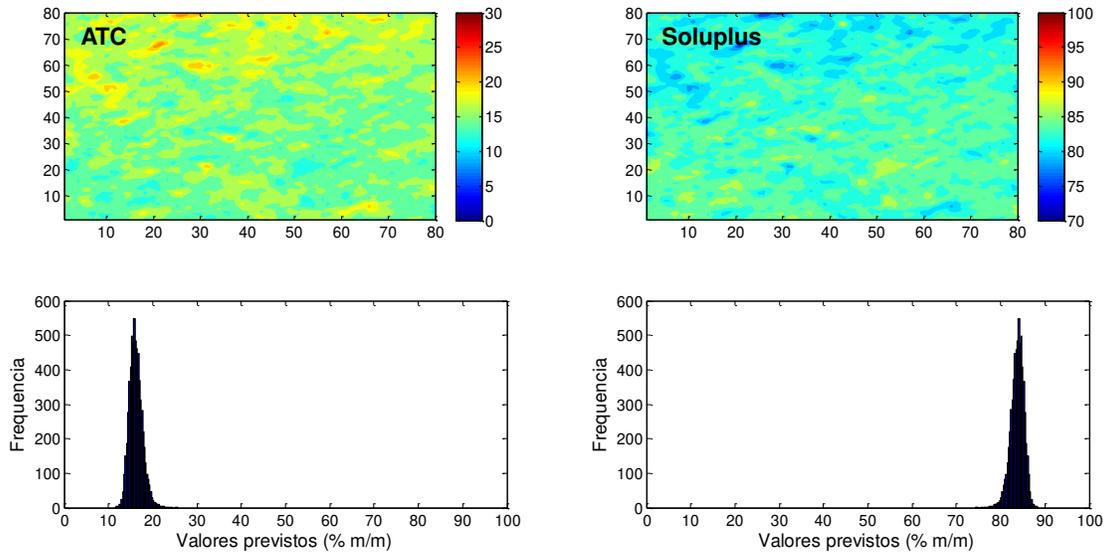


Figura 58: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na amostra 1

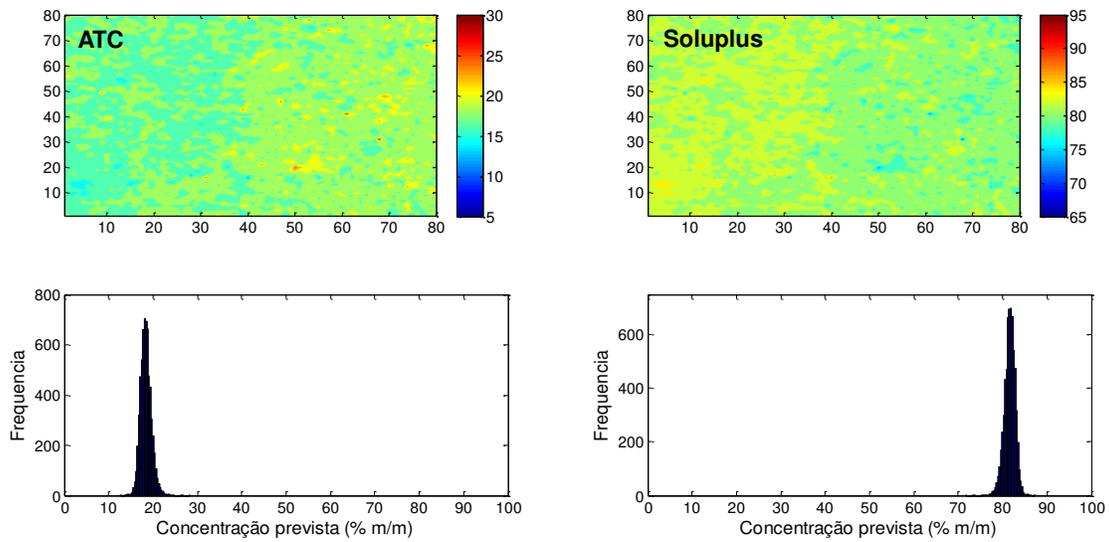


Figura 59: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na amostra 2.

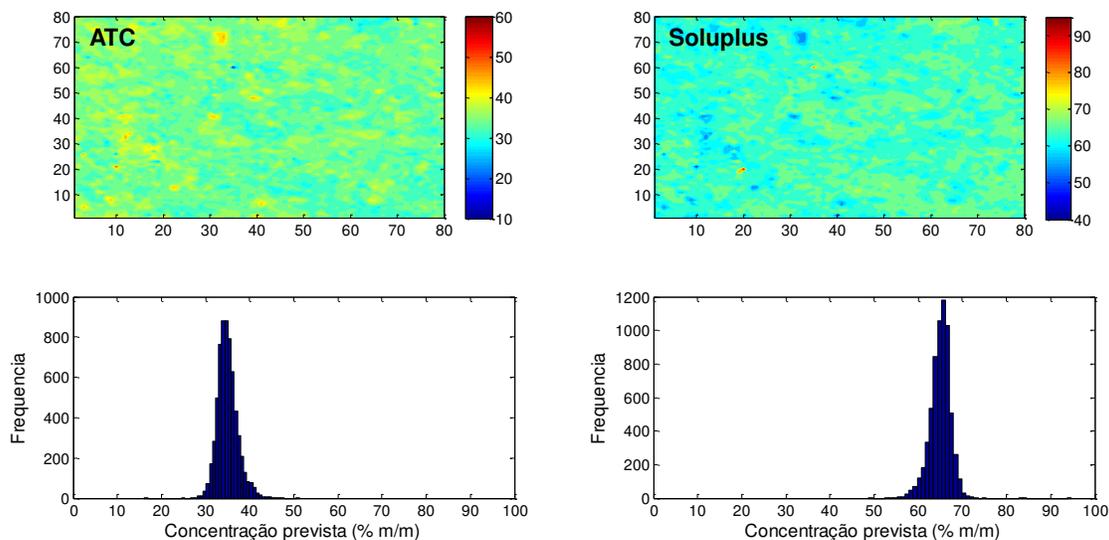


Figura 60: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na amostra 4.

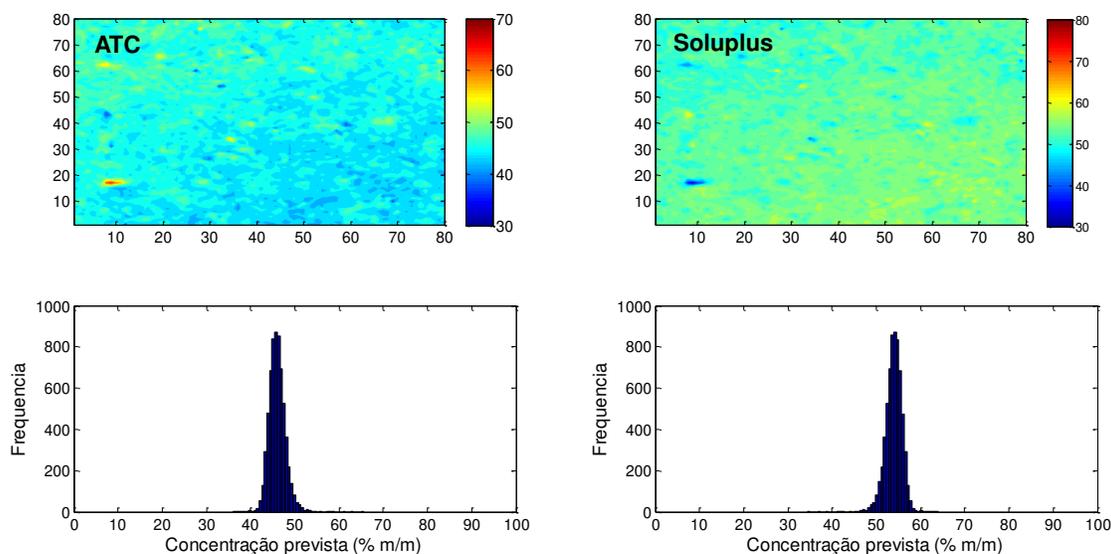


Figura 61: Imagens da atorvastatina e do Soluplus® na amostra 5.

Conforme é possível verificar nas Figuras 58-61, não houve a formação de aglomerados com o aumento da concentração do fármaco; em todas as amostras os dois componentes apresentaram-se bem misturados, mesmo em concentrações mais altas de atorvastatina. Assim, a seleção da proporção entre a atorvastatina e o Soluplus® foi inteiramente baseada nos resultados de estudos de solubilidade destas formulações, uma vez que a homogeneidade não foi um fator

limitante. Também é possível verificar nos histogramas que o CLS apresentou resultados muito próximos aos esperados, com erros de, no máximo, 5,0 %.

2.2.1. Avaliação das amostras em meio aquoso

As dispersões contendo de 15,0 a 50,0 % de atorvastatina foram avaliadas em água de maneira visual. Foi verificado que, para as concentrações de 15,0 e 20,0 % as amostras se dispersaram em menos de 1 h enquanto a amostra contendo 33,3 % demorou mais de 8 h para dispersar completamente em meio aquoso. Nos três casos não foi observada precipitação da atorvastatina no fundo do erlenmeyer, indicando que o Soluplus® consegue carregar o fármaco em meio aquoso nestas proporções. As amostras contendo 40,0 e 50,0 % de atorvastatina não dispersaram em água, mesmo depois de 24h. Com base nestes resultados, foi selecionada a formulação contendo 20,0 % de atorvastatina cálcica e 80,0 % de Soluplus® (razão 1:4 m/m) para os estudos posteriores.

2.3. Etapa 3: Seleção de um diluente

A base da formulação foi selecionada nas duas etapas anteriores, que é o Soluplus® na razão de 4 partes para 1 de atorvastatina em massa, sendo ambos solubilizados em etanol. No entanto, como esta é uma formulação sólida, ela deve conter outros excipientes para que seja possível realizar o processo de produção dos comprimidos, quando for considerada a dosagem do fármaco. O principal deles é um diluente, que tornaria possível a produção de um comprimido em tamanho adequado, um desintegrante (caso necessário) e excipientes minoritários (1-2 %), como por exemplo, lubrificantes. O objetivo desta etapa foi selecionar um diluente para a formulação de modo que ele não alterasse a solubilização da atorvastatina e a abertura da amostra em meio aquoso, evitando assim, a necessidade de adição de um desintegrante.

Foram estudados três diluentes, muito comuns na indústria farmacêutica: amido, celulose microcristalina 102 e lactose, os quais foram adicionados juntamente com a atorvastatina e o Soluplus® em etanol (fase interna) ou misturados em almofariz com o pó da dispersão sólida após a secagem (fase

externa). Sabe-se que a adição de um polímero como diluente na fase interna ou externa tem consequências diferentes na solubilização do medicamento em meio aquoso e isto depende das características do mesmo. Espera-se obter uma formulação homogênea na qual o diluente não altere as características de solubilização da atorvastatina em Soluplus®, alcançada na Etapa 2.

2.3.1. Espectroscopia NIR de imagem

Para o tratamento das imagens, a mistura (atorvastatina + Soluplus®) foi considerada como um único constituinte por dois motivos: 1) devido à alta homogeneidade da atorvastatina na dispersão com Soluplus® em etanol, conforme verificado na etapa anterior e 2) considerando que o fármaco e o Soluplus® são solúveis em etanol e os três diluentes são insolúveis neste solvente, é natural esperar que a localização espacial do fármaco e do Soluplus® seja idêntica, e que a localização do diluente seja complementar. Para justificar esta escolha, são mostradas como exemplos na Figura 62, as imagens dos constituintes da dispersão em amido, adicionado na fase interna considerando os três constituintes de forma separada.

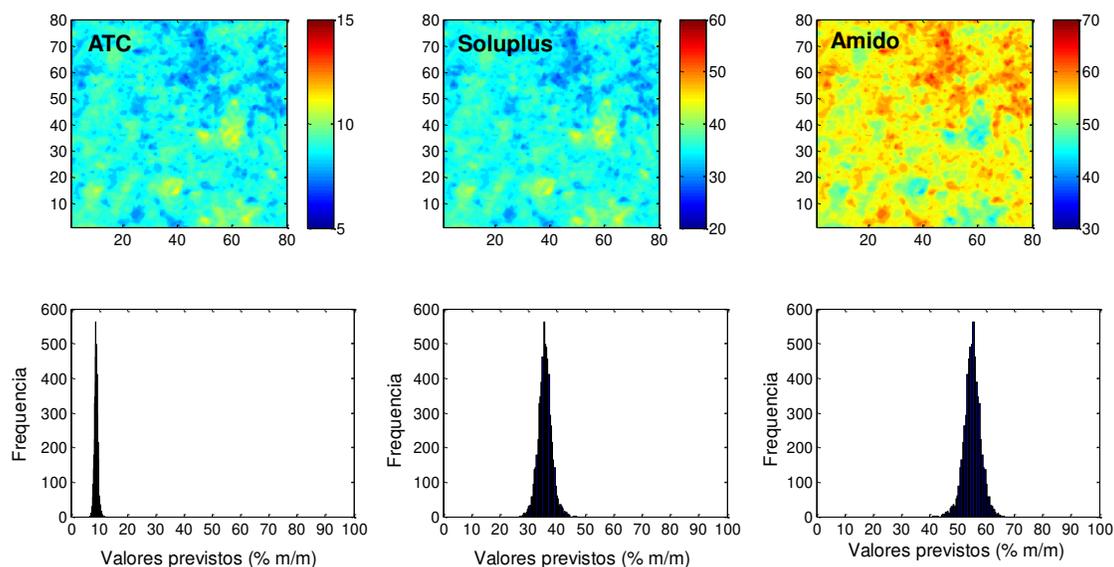


Figura 62: Imagens da atorvastatina, do Soluplus® e do amido considerando os três componentes de forma separada.

Como é possível verificar na Figura 62, a localização do fármaco é a mesma do Soluplus®, indicando que é possível trata-los como um único constituinte.

A concentração de atorvastatina + Soluplus® foi de 50,0 % (10,0 % de atorvastatina e 40,0 % de Soluplus®) e de cada diluente também de 50,0 % (% m/m). A quantidade do diluente foi selecionada de modo a obter um comprimido com uma massa razoável – com 50 % de diluente e porcentagem de atorvastatina é de 10,0 %, o comprimido deve ter a massa de 800 mg para conter a dosagem máxima de atorvastatina (80 mg). Esta massa é comparável aos comprimidos comerciais, os quais pesam até 1,2 g.

As distribuições dos constituintes nas amostras preparadas com amido na fase interna e externa, calculada por CLS sem correção, são mostradas nas Figuras 63 e 64.

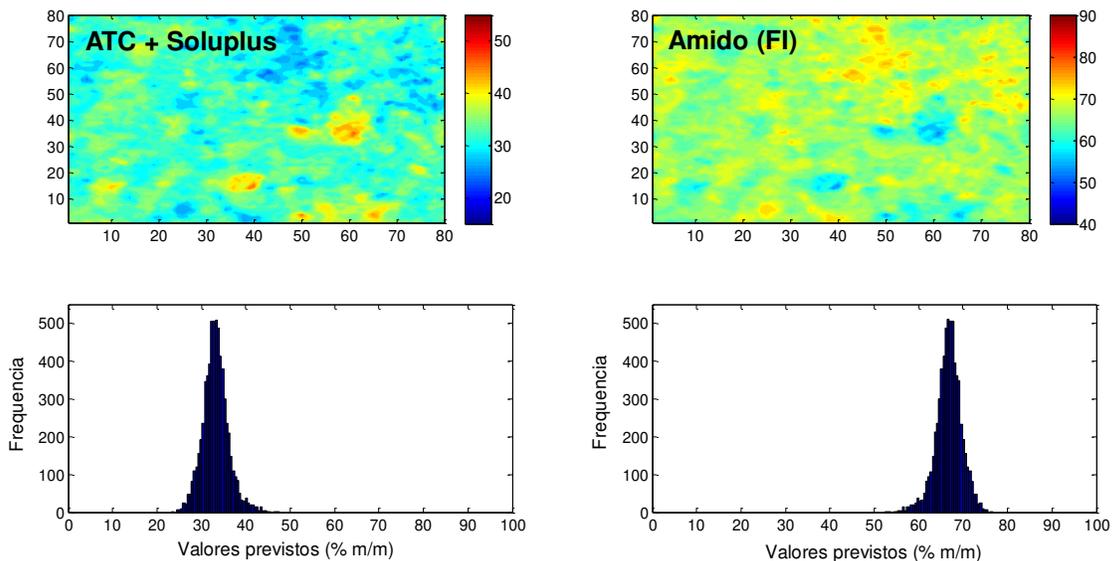


Figura 63: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e do amido (adicionado na fase interna), geradas por CLS sem correção.

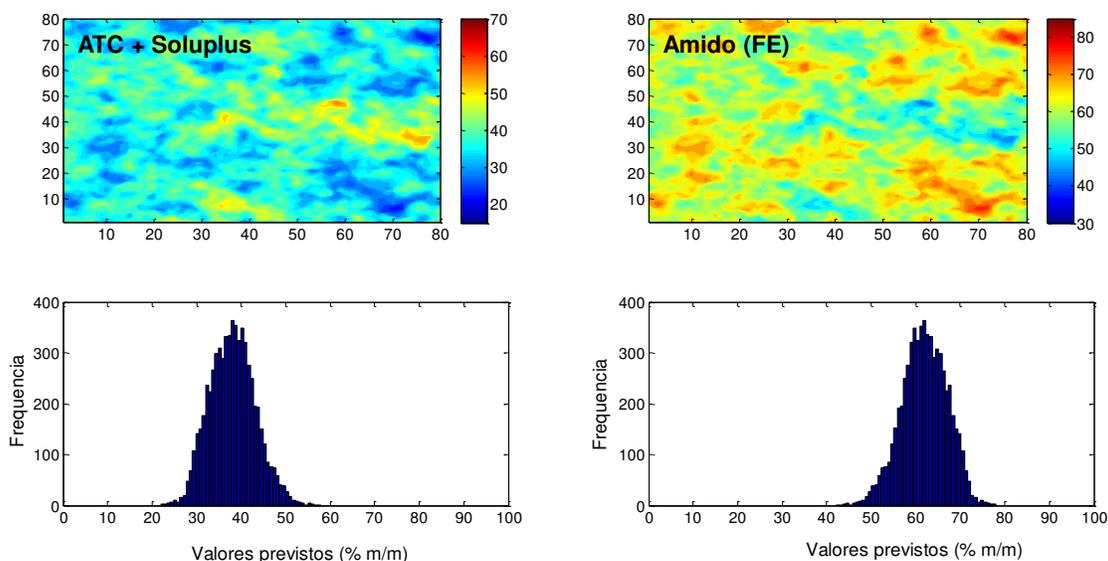


Figura 64: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e do amido (adicionado na fase externa), geradas por CLS sem correção.

Conforme pode ser observado nas Figuras 63 e 64, as imagens são perfeitamente complementares, entretanto os valores médios previstos estão deslocados: na fase interna a média das concentrações de atorvastatina + Soluplus® foi de 33,2 % (erro de -16,8 %) e do amido de 66,8% (erro de 16,8 %); na fase externa a média das concentrações de atorvastatina + Soluplus® foi de 38,1 % (erro de -11,9 %) e do amido de 61,9 (erro de 11,9 %). Para entender o motivo, os espectros esperados (calculados matematicamente com base no princípio do método CLS) foram comparados com os espectros obtidos experimentalmente e foram verificadas diferenças, conforme mostrado na Figura 65.

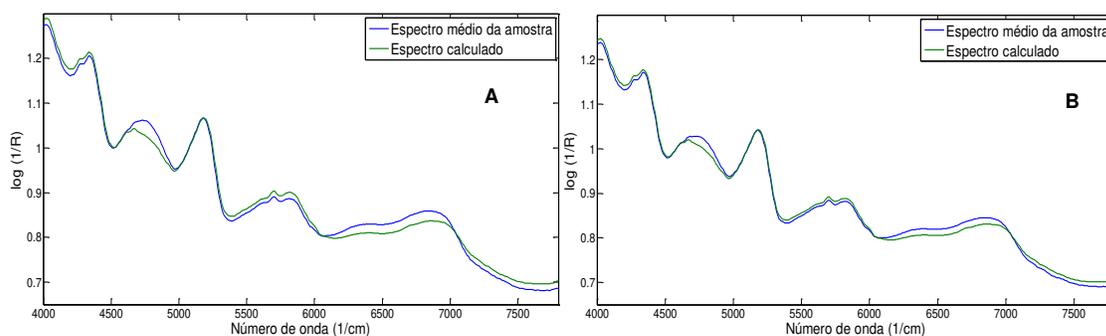


Figura 65: Comparação dos espectros calculados matematicamente com os espectros médios das dispersões de amido em fase interna (A) e fase externa (B).

Estas diferenças foram observadas não só para o amido, mas também para os demais diluentes, tanto com a incorporação na fase interna quanto externa. A Figura 65 mostra que existem diferenças de intensidade e cruzamento entre os espectros reais e calculados. A origem destas diferenças foi estudada mais a fundo por meio da variação de alguns parâmetros: 1) utilização do diluente disperso e seco em etanol como constituinte puro no cálculo CLS; 2) obtenção de imagens dos constituintes na forma de pó (sem comprimir, utilizando a dispersão em etanol da atorvastatina + Soluplus®), para verificar se a compressão era responsável por esta diferença; 3) utilizando a mistura física de pós do fármaco, do Soluplus® e do amido (ao invés de utilizar a dispersão em etanol) e 4) substituindo a atorvastatina pela carbamazepina para verificar se o fármaco em si tem alguma influência nesta diferença.

Foi verificado que em nenhum caso a diferença desapareceu. O resultado do estudo 1 indicou que o espectro do amido após dispersar em etanol e secar é idêntico ao espectro puro, o qual não teve contato com etanol. O estudo 2 indicou que a compressão (com a pressão utilizada) não tem efeito nenhum nos espectros. O estudo 3 mostrou que estas diferenças espectrais também não estão relacionadas à interações entre os constituintes, pois neste estudo foi empregada a mistura dos pós dos compostos, na qual interações físico-químicas que provoquem estas diferenças espectrais são extremamente improváveis. Por este motivo, espera-se que estas diferenças tenham origem física e não química. Finalmente, as diferenças entre o espectro real e calculado para a amostra contendo a carbamazepina ao invés da atorvastatina também se mantiveram, indicando que as mesmas não estão relacionadas ao fármaco.

No caso da espectroscopia NIR, a ambiguidade de intensidade não deve ocorrer, uma vez que os espectros puros apresentam intensidades semelhantes entre si, não sendo necessária, portanto, a sua normalização. Vale ressaltar que a ambiguidade de intensidade foi considerada a principal fonte de erro do método CLS em espectroscopia Raman de imagem, uma vez que os espectros médios experimentais coincidiram exatamente com os espectros calculados matematicamente, ou seja, a princípio deveria se esperar que o CLS fornecesse

resultados exatos. A inexatidão naquele caso foi gerada pelo cálculo matemático e não pelas características da amostra ou de medida experimental. Neste estudo, empregando espectroscopia NIR, foram identificadas diferenças entre os espectros médios experimentais e os espectros esperados (Figura 65). Desta maneira, já se esperava que a previsão do CLS não fosse exata, porém a fonte de inexatidão neste caso deve ser outra.

Outra possibilidade que poderia explicar a falta de exatidão do CLS seria a não linearidade do sinal com a concentração. Em reflectância difusa, normalmente utiliza-se como linearização do sinal a transformação do sinal de reflectância (R) para $\log(1/R)$, o qual pode não ser linear com a concentração em toda a faixa de interesse. Para avaliar a linearidade do sinal, foi realizada uma PCA com um conjunto de amostras contendo os três constituintes em várias proporções e os *scores* na primeira componente principal foram utilizados para construir um gráfico em função da concentração de cada componente. A linearidade do gráfico de *scores* na PC1 vs concentração foi nítida e excluiu-se esta possibilidade também. Desta maneira, pode-se dizer que o sinal medido é linearmente proporcional à concentração, apenas não corresponde à soma dos sinais de cada componente ponderados pelas devidas concentrações, conforme prevê o CLS.

Ao observar as regiões nas quais as diferenças são mais pronunciadas, foi possível concluir que as mesmas são regiões de alta absorção dos polímeros (4800 e 6800 cm^{-1}), nas quais aparecem as vibrações dos grupos OH^{35} , abundantes nas estruturas poliméricas dos mesmos. Para comparação, foi preparada uma amostra que contivesse um polímero sem grupos OH, a polivinilpirrolidona (PVP). Para esta amostra, foi observada excelente concordância entre o espectro calculado e o espectro experimental, sendo o erro de previsão do CLS bastante diminuído ($< 5,0\%$). O PVP não pode ser utilizado como diluente na formulação; esta amostra foi preparada apenas com o intuito de avaliar o comportamento do espectro NIR em relação ao espectro calculado para um polímero com estrutura química muito diferente dos demais.

A explicação para isto deve-se provavelmente ao fato de que, na realidade, o CLS foi desenvolvido para medidas de transmissão de líquidos límpidos, que

não apresentam interações e para os quais a lei de Beer é válida¹⁰⁶. A presença de material particulado que espalha a radiação complica enormemente a sua utilização para líquidos. Em reflectância difusa, muitos fenômenos podem fazer o sinal se comportar de maneira diferente daquela prevista pelo CLS, como por exemplo, o caminho ótico percorrido pela radiação. Enquanto na transmissão o caminho ótico é constante para todo número de onda, na reflectância o caminho ótico pode ser variável. É sabido que, em regiões do espectro onde a amostra absorve fracamente, a radiação penetra mais profundamente e o contrário acontece onde há forte absorção¹⁰⁷. Assim, pode-se dizer que o caminho ótico varia como uma função da absorvidade da amostra¹⁰⁸. O caminho ótico também pode ser variável devido ao espalhamento da radiação que acontece em medidas de reflectância difusa. Este efeito complexo é governado basicamente por dois fatores: o tamanho de partícula do analito e a natureza química da matriz. O sinal espectral é mais intenso para partículas maiores, pois a direção da radiação não é alterada tão frequentemente quanto para partículas menores, e assim, o espalhamento é menor e a absorção é maior¹⁰⁹. Por outro lado, partículas menores alteram a direção da radiação com mais frequência, gerando um espalhamento maior e diminuindo a intensidade do sinal. As diferenças de tamanho de partícula têm efeitos aditivos e multiplicativos nos espectros e podem ser minimizadas por tratamentos matemáticos como MSC (*Multiplicative Scattering Correction*). Em relação à natureza da matriz, sabe-se que uma matriz com índice de refração alto reduz a intensidade das bandas do analito. Uma matriz com alto índice de refração apresenta maior reflexão nas partículas (*front surface reflection*), levando a maior espalhamento e, como o coeficiente de espalhamento varia com o comprimento de onda, este efeito não é uniforme ao longo de todo o espectro¹¹⁰. Por fim, outro fator que poderia afetar caminho ótico efetivo é a compactabilidade do analito e dos componentes da matriz. Desta maneira é plausível que o sinal de $\log 1/R$ em amostras sólidas possa apresentar desvios em relação ao espectro esperado com base na aditividade dos espectros puros, ponderados pelas concentrações dos compostos, que é o princípio do método

CLS. Neste estudo, estes desvios foram mais frequentes para amostras contendo polímeros com muitos grupos OH.

Uma maneira simples de resolver o problema neste caso seria fazer seleção de variáveis e utilizar regiões informativas que obedecem ao princípio do CLS. Este procedimento é válido e eficiente, no entanto, deve-se tomar cuidado de evitar a seleção de bandas que contenham informações não correlacionadas com os compostos da amostra e que possam variar aleatoriamente, como as bandas de água. Encontrar tais regiões pode não ser possível em alguns casos e, por este motivo, outros dois procedimentos foram estudados: 1) a correção de concentrações previstas pelo CLS com base na regressão destas contra os valores experimentais, da mesma maneira que descrito para os estudos empregando espectroscopia Raman e 2) estimando-se os espectros puros dos compostos a partir das misturas por meio da equação 2 e utilizando estes espectros nos cálculos de concentrações por meio do método CLS. Os dois procedimentos requerem o preparo de um conjunto pequeno de amostras, (4 -5), variando-se a concentração dos componentes, que são as amostras mostradas na Tabela XIV.

Para que as duas estratégias funcionassem, seria necessário que as variações observadas nos espectros se repetissem de forma sistemática para amostras de diferentes concentrações. Isto pode ser avaliado por meio dos gráficos dos valores experimentais contra os valores previstos pelo CLS, os quais são mostrados nas Figuras 66, 67 e 68 para as dispersões contendo amido, celulose e lactose, respectivamente.

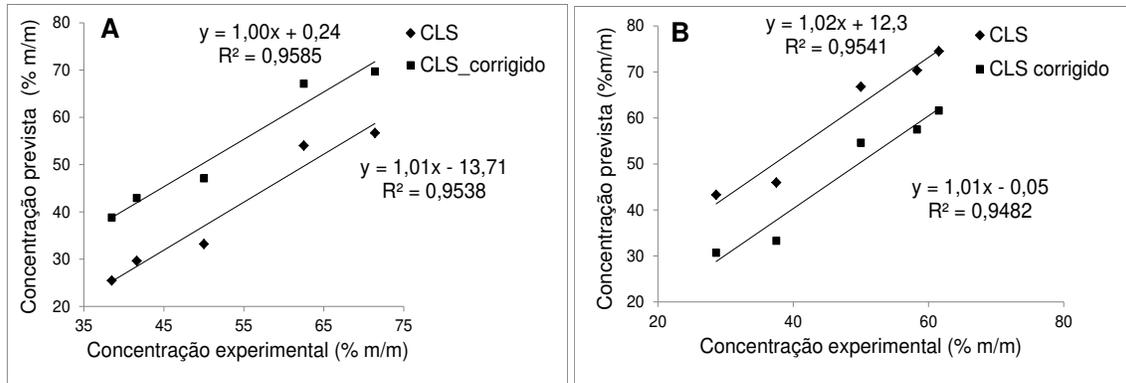


Figura 66: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina + Soluplus® (A) e para o amido (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.

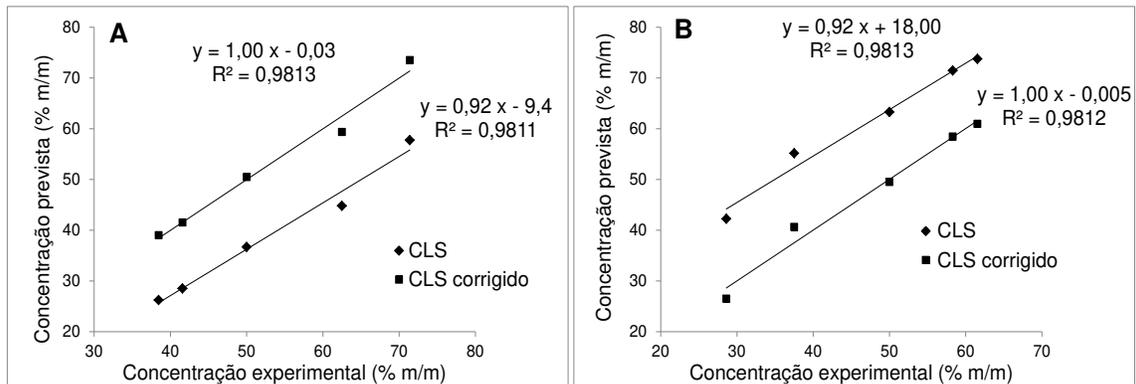


Figura 67: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina + Soluplus® (A) e para a celulose (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.

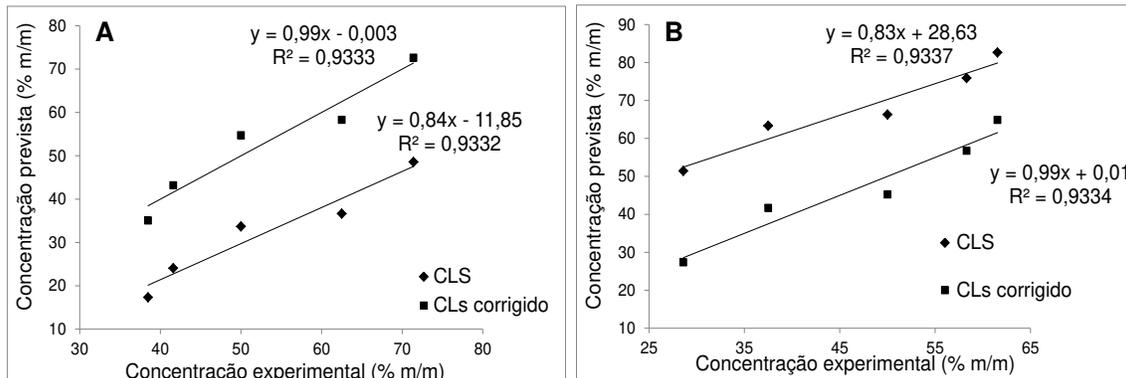


Figura 68: Gráfico de concentrações experimentais vs concentrações médias previstas para a atorvastatina + Soluplus® (A) e para a lactose (B) pelo método CLS antes e após a correção empregando a equação 4.

As Figuras 66 – 68 indicam que os valores previstos apresentam um padrão que pode ser aproximado por uma regressão linear, o que implica que os erros nos valores previstos são sistemáticos, permitindo a sua correção. Assim, o intercepto e na inclinação da reta de regressão entre valores experimentais e previstos foi utilizada para correção. Após a correção, é possível verificar nestas Figuras que o intercepto passa a ser próximo a zero e a inclinação próxima a 1. As imagens da dispersão em amido adicionado na fase interna e externa após a correção são mostradas nas Figuras 69 - 70.

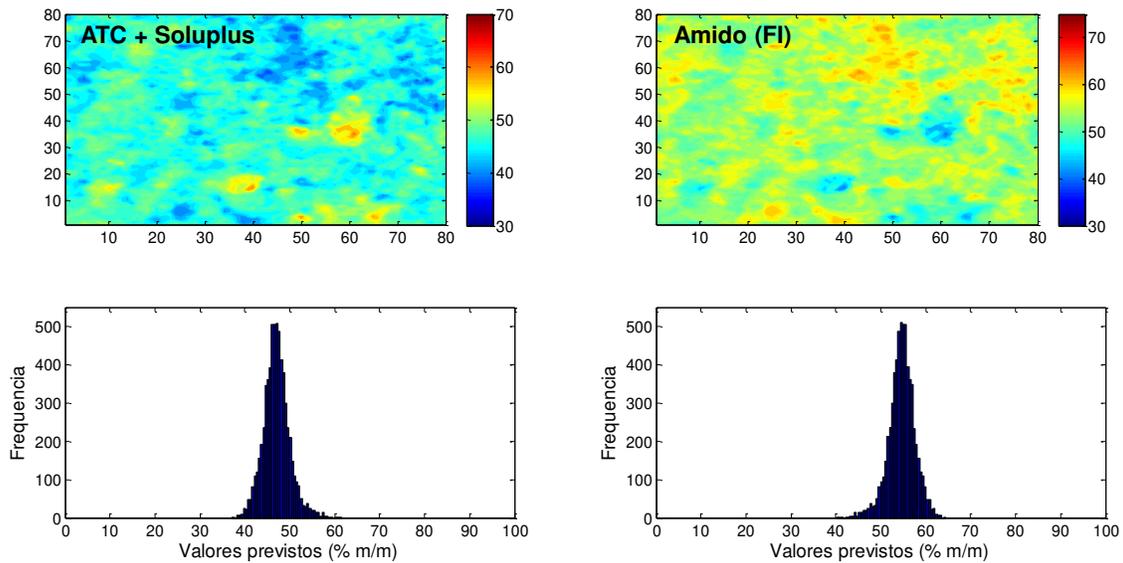


Figura 69: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e do amido, adicionado na fase interna, geradas por CLS após correção.

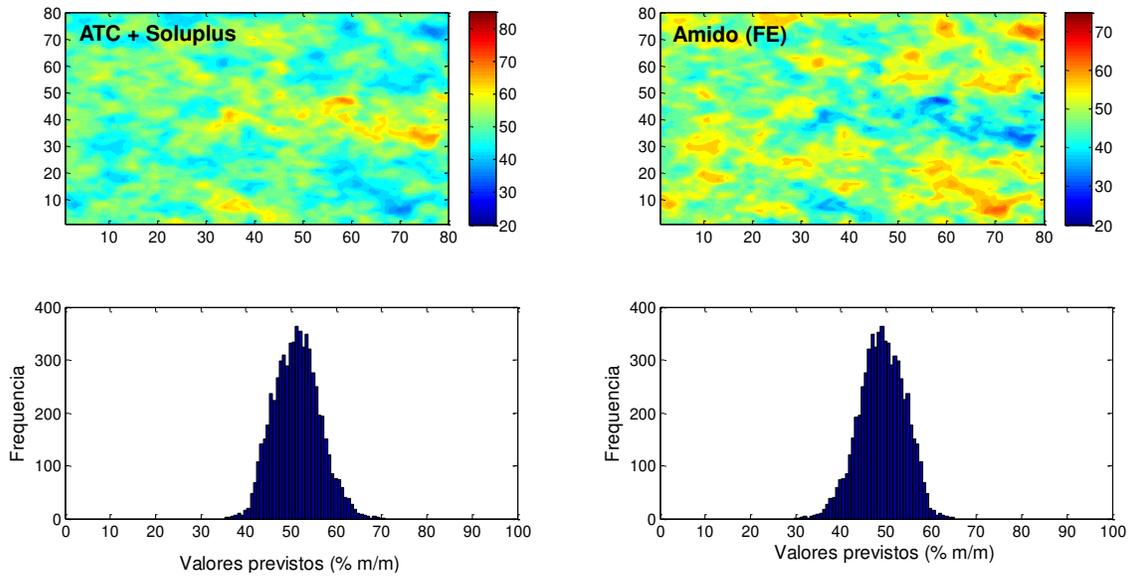


Figura 70: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e do amido, adicionado na fase externa, geradas por CLS após correção.

É possível verificar comparando-se as Figuras (63 e 69) e (64 e 70) que as imagens das dispersões não se alteraram e que a correção ocasionou apenas um deslocamento nos histogramas, os quais passaram a estar centrados nos valores experimentais esperados. Assim, conclui-se que para algumas amostras o CLS pode ser aplicado de forma direta, sem correção (por exemplo, nas amostras da etapa 2), enquanto para outras, o sinal de reflectância difusa não segue o princípio do CLS e que para estas, a regressão entre os valores previstos e experimentais permite encontrar os parâmetros necessários para a correção das concentrações previstas.

Comparando-se as Figuras 69 e 70, é possível verificar que a dispersão com amido em fase externa é mais heterogênea do que a dispersão com amido em fase interna. De fato, enquanto a faixa de valores previstos para o polímero na primeira amostra foi de 40,2 – 64,5 %, para a segunda foi de 29,5 – 65,1 %, indicando que, mesmo o amido sendo insolúvel em etanol, é preferível adicioná-lo na fase interna.

A segunda maneira mencionada que foi utilizada para a correção foi utilizar a equação 2 ($\mathbf{S} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{X}$) colocando-se na matriz \mathbf{X} os espectros das amostras com as concentrações conhecidas para estimar os espectros puros, ao invés de utilizar os espectros puros obtidos experimentalmente. Posteriormente, a

equação 3 ($\mathbf{C} = (\mathbf{SS}^T)^{-1}\mathbf{SX}^T$) foi utilizada colocando-se na matriz \mathbf{X} os espectros obtidos no hipercubo da amostra cuja concentração nos pixels se desejava calcular. Os espectros puros obtidos experimentalmente e aqueles estimados empregando a equação 2 são mostrados na Figura 71.

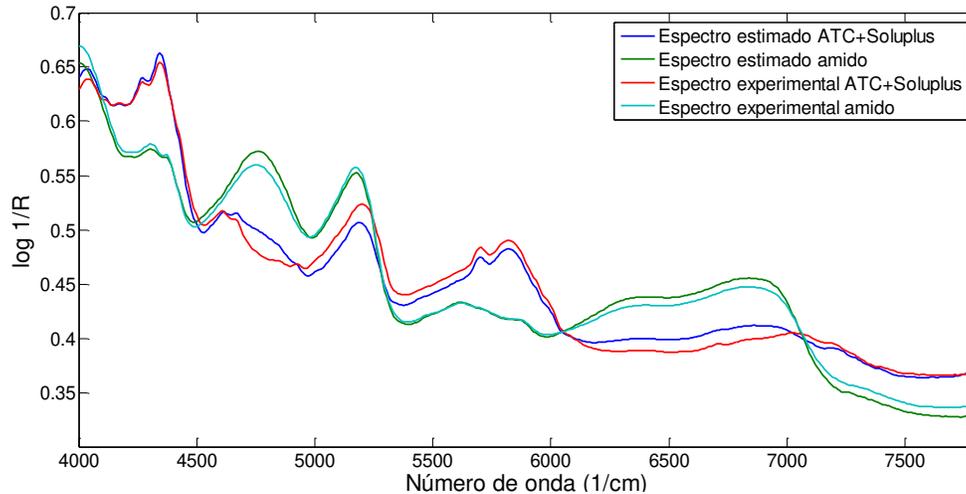


Figura 71: Comparação de espectros dos componentes puros estimados com base na equação 2 e aqueles obtidos experimentalmente.

A Figura 71 mostra que existem diferenças entre os espectros obtidos experimentalmente e aqueles calculados pela equação 2. Os espectros puros calculados com a equação 2 correspondem à solução matemática da equação 3, de modo a retornar as concentrações corretas dos componentes nos pixels. Isto equivale a dizer que as diferenças entre os espectros obtidos experimentalmente e aqueles calculados com base no princípio do CLS (mostradas na Figura 65) foram *incorporadas* aos espectros puros, de modo a resolver matematicamente a equação 3. Como resultado, o valor médio previsto estaria correto e não seria necessária nenhuma correção. Isto foi de fato observado e as imagens obtidas desta maneira foram muito semelhantes àsquelas obtidas com base na correção baseada na regressão. Para exemplificar, é mostrada na Figura 72 a imagem da dispersão em amido na fase interna, a qual é muito semelhante à mostrada na Figura 69, obtida com o procedimento de correção com base na regressão.

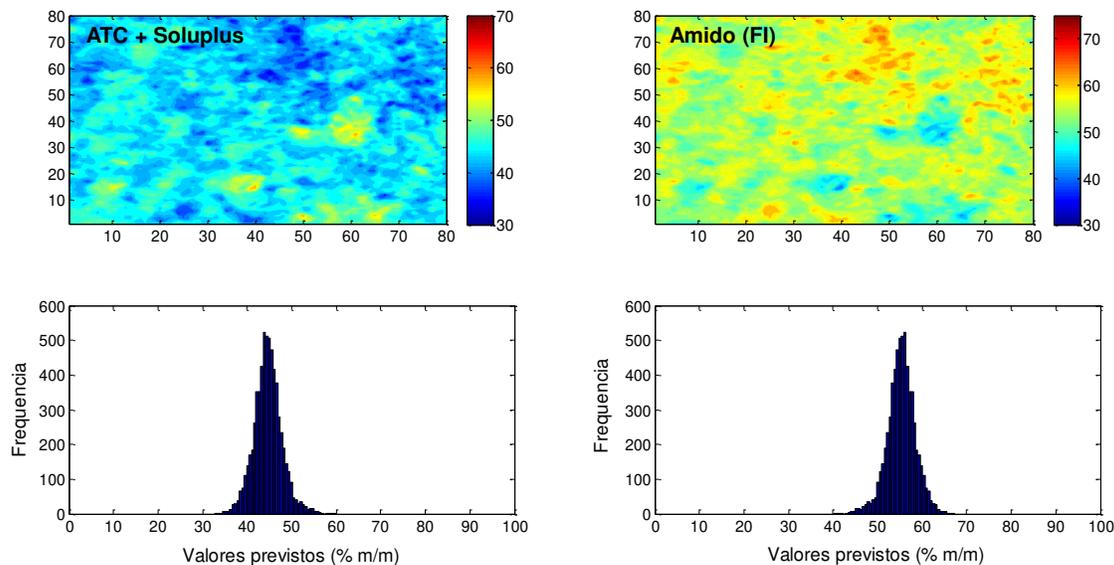


Figura 72: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e do amido, adicionado na fase interna, geradas empregando os espectros puros estimados com base na equação 2.

O procedimento de correção com base na regressão foi aplicado às demais amostras, fornecendo erros aceitáveis ($< 5,0\%$). As imagens das dispersões preparadas empregando celulose na fase interna e externa são mostradas nas Figuras 73 e 74. As imagens das dispersões preparadas empregando lactose na fase interna e externa são mostradas nas Figuras 75 e 76.

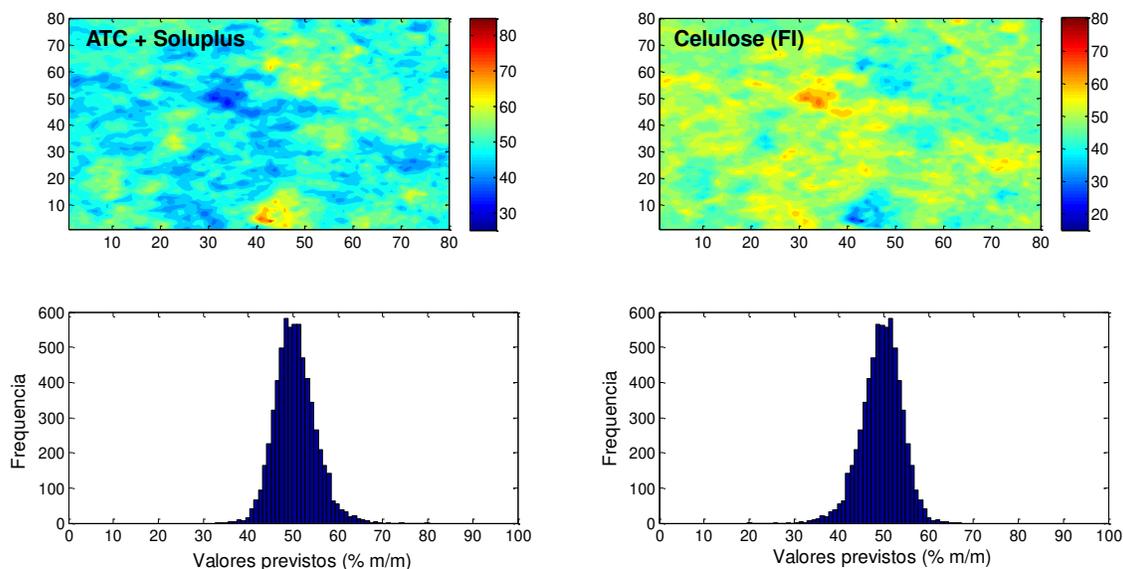


Figura 73: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e da celulose, adicionada na fase interna, geradas por CLS após correção.

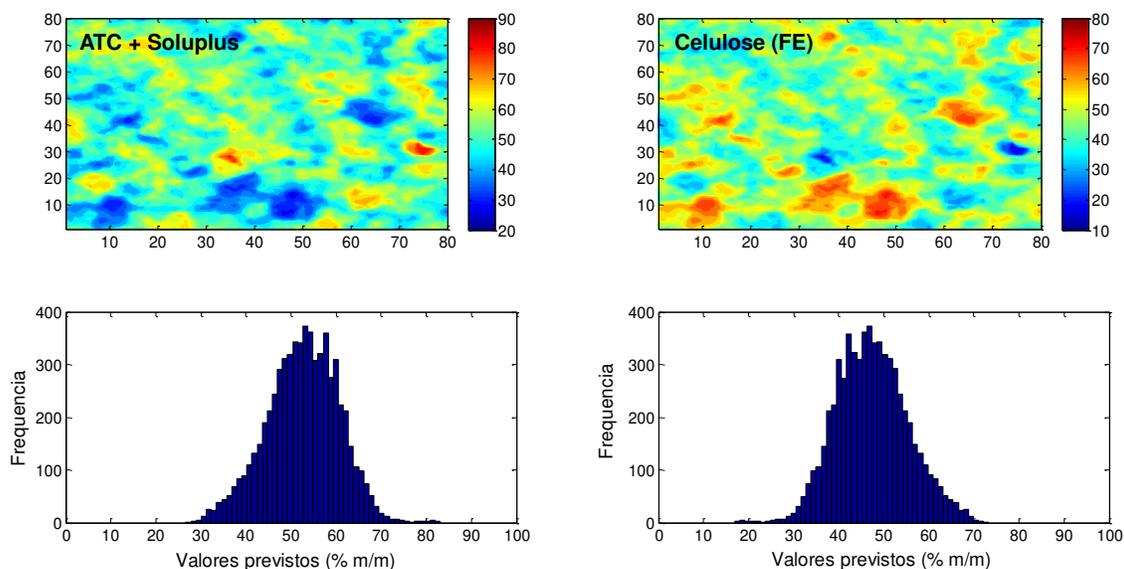


Figura 74: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e da celulose, adicionada na fase externa, geradas por CLS após correção.

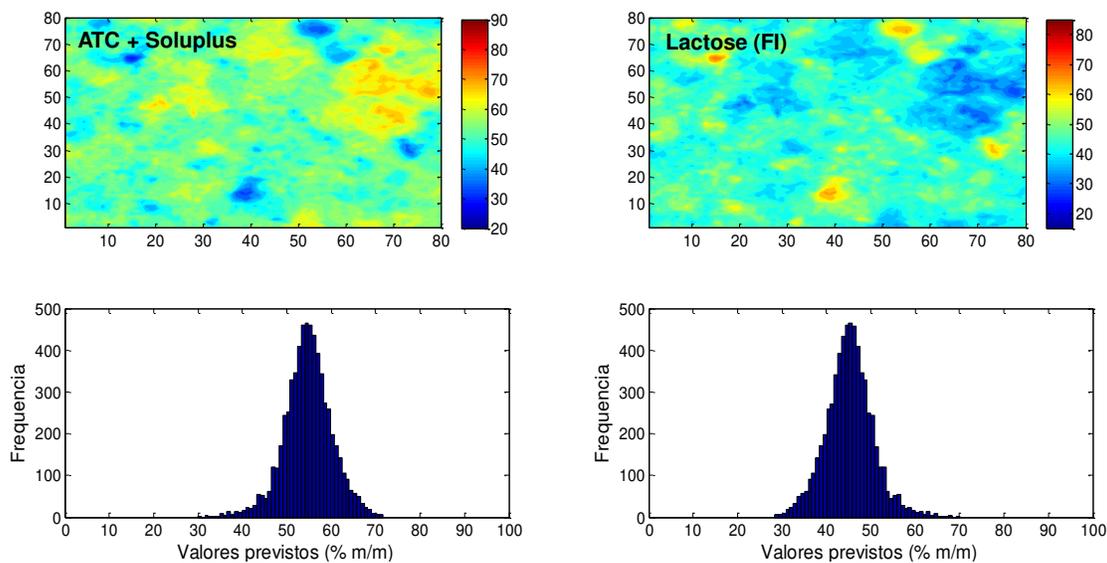


Figura 75: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e da lactose, adicionada na fase interna, geradas por CLS após correção.

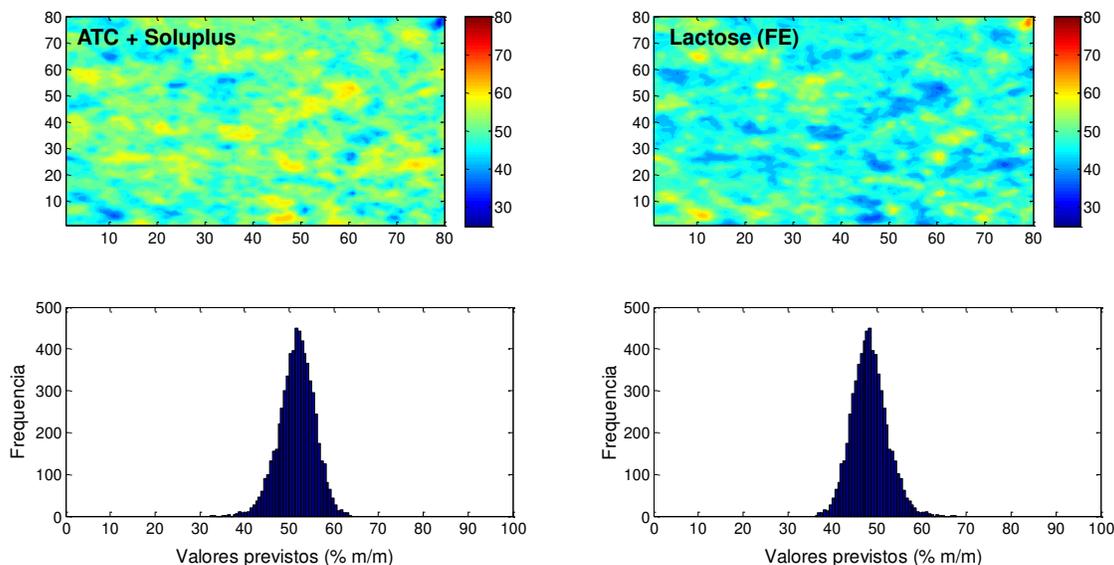


Figura 76: Imagens da atorvastatina + Soluplus® e da lactose, adicionada na fase externa, geradas por CLS após correção.

Observando-se as imagens mostradas nas Figuras 69 - 70 e 73 - 76, é possível verificar que para as dispersões em amido e celulose, a adição do polímero na fase externa produziu uma dispersão mais heterogênea em relação à adição na fase interna. Para a dispersão em lactose, o comportamento inverso foi observado e isto pode ser explicado pelo fato de que a lactose pode ter aglomerado em contato com o etanol. A maior heterogeneidade da amostra contendo celulose na fase externa em relação às demais pode ser explicada pelas características físicas da celulose microcristalina em relação aos demais diluentes (grânulos cristalinos que não se espalham tão bem quanto os demais).

2.3.2. Espectroscopia Raman de imagem

Esta parte do estudo também foi conduzida empregando espectroscopia Raman de imagem. Os espectros Raman dos componentes das amostras (atorvastatina + Soluplus® e cada um dos polímeros – amido, celulose e lactose) são mostrados na Figura 77.

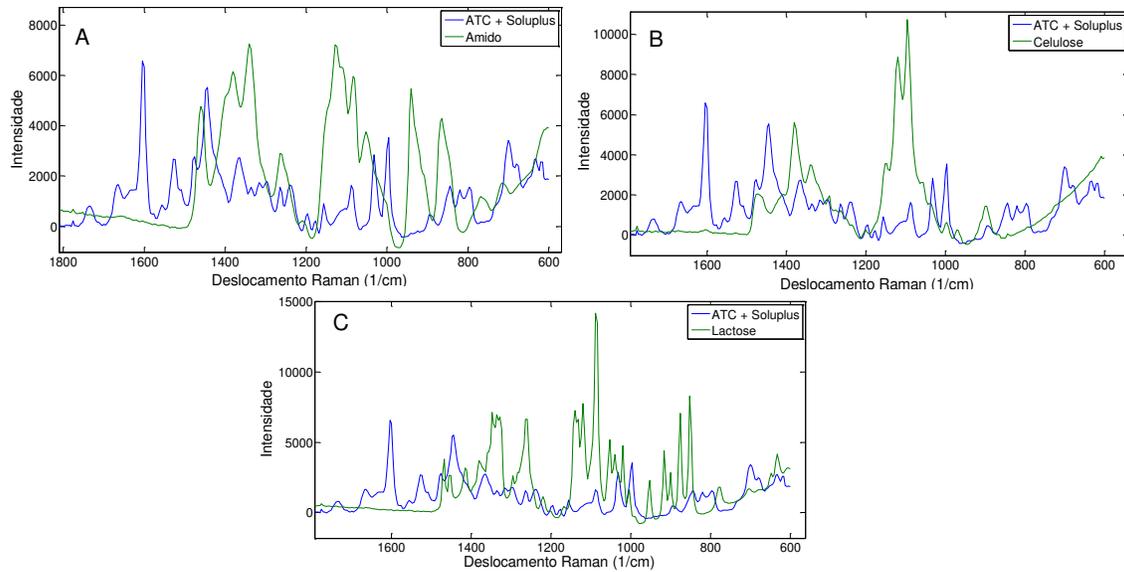


Figura 77: Espectros Raman dos componentes puros das dispersões: atorvastatina + Soluplus® e amido (A), atorvastatina + Soluplus® e celulose (B) e atorvastatina + Soluplus® e lactose (C).

Conforme é possível verificar na Figura 77, todos os componentes apresentam intensidades e sinais espectrais adequados para seu uso analítico. Assim, eles foram utilizados para a geração das imagens por CLS, sendo necessária uma correção dos valores previstos para que os valores médios se tornassem próximos aos valores esperados. Os valores de desvio padrão dos histogramas de valores previstos pelo CLS foram utilizados para comparação entre as amostras contendo os diferentes polímeros, adicionados em fase interna ou externa. Os resultados foram muito semelhantes aos mostrados anteriormente, obtidos por espectroscopia NIR e são mostrados na Figura 78 de maneira a resumir os resultados.

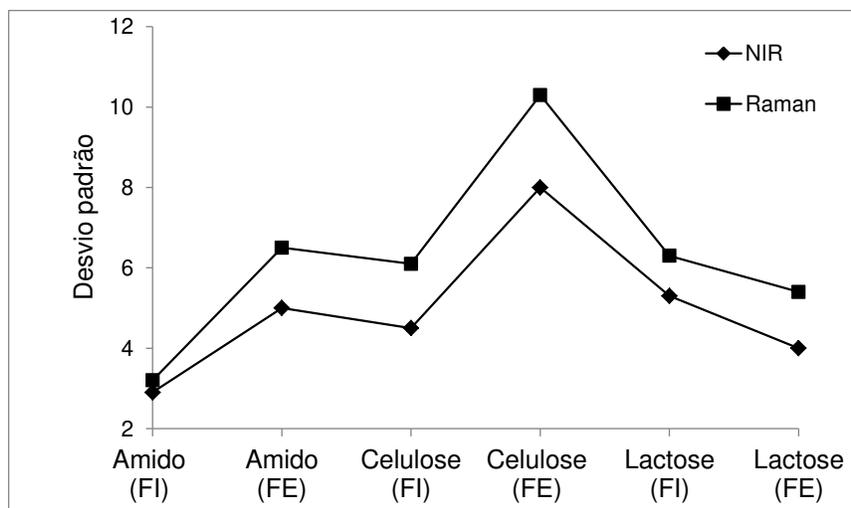


Figura 78: Valores de desvio padrão dos histogramas de distribuição das concentrações dos polímeros nas diferentes dispersões obtidos por espectroscopia NIR e Raman.

Na Figura 78 é possível observar que os valores de desvio padrão obtidos com a espectroscopia Raman são superiores àqueles observados com a espectroscopia NIR, no entanto, as relações entre as amostras se mantiveram.

Diferentemente das amostras semi-sólidas preparadas com o Gelucire® 44/14, especialmente as formulações SEDDS, a existência de micro-heterogeneidades é um fator comum em medicamentos sólidos como comprimidos, pois os excipientes e o fármaco são compactados, e não dissolvidos. Assim, deve-se considerar que cada componente sólido tem partículas em dimensões micrométricas e deve-se avaliar a homogeneidade da formulação em dimensões significativamente maiores que os cristais individuais de cada substância presente na formulação.

A regressão em Mínimos Quadrados Parciais (PLS) também foi avaliada para a geração das imagens destas dispersões. No entanto, apesar da porcentagem de variância explicada nas matrizes X e Y ser próxima a 90 % com apenas uma variável latente, não foi possível realizar o procedimento de validação cruzada com confiabilidade, sendo os valores de RMSECV elevados (> 10,0 %) devido ao número reduzido de amostras (5). Para utilizar este método, um conjunto maior de amostras de calibração seria necessário. Isto evidencia uma

vantagem do procedimento de correção do método CLS, para o qual resultados confiáveis foram obtidos com um número reduzido de amostras.

2.4. Solubilidade em água

A solubilidade em meio aquoso de todas as dispersões foi avaliada por CLAE. Os resultados são mostrados na Tabela XV.

Tabela XV: Resultados da quantificação do fármaco solubilizado em meio aquoso por CLAE nas dispersões sólidas preparadas com diferentes polímeros

Amostra	Concentração de atorvastatina em solução (mg/mL)
DS Amido (FI)	0,27 ± 0,01
DS Amido (FE)	0,30 ± 0,01
DS Celulose (FI)	0,27 ± 0,01
DS Celulose (FE)	0,14 ± 0,01
DS Lactose (FI)	0,09 ± 0,01
DS Lactose (FE)	0,30 ± 0,01

As dispersões com amido e lactose na fase externa apresentaram os maiores valores de concentração do fármaco solubilizado, ambas 0,30 mg mL⁻¹. Os baixos valores de concentração do fármaco solubilizado em água para as amostras contendo celulose em fase externa e lactose em fase interna podem ser explicados pelo fato de que estas duas amostras não abriram completamente e desta maneira, o fármaco não foi liberado para o meio aquoso. Para estas formulações, um desintegrante deve ser utilizado.

Considerando simultaneamente o aumento de solubilidade e a homogeneidade da formulação, a dispersão contendo lactose adicionada na fase externa foi selecionada como formulação mais promissora. Para esta formulação, considerando a faixa de valores previstos para atorvastatina + Soluplus® e lactose e que a razão entre a atorvastatina e o Soluplus® é de 1:4 (m/m), a faixa de

valores de concentração nos pixels para os três constituintes foi de: atorvastatina: 10,0 – 12,0 %; Soluplus®: 30,0 – 48,0 % e lactose: 38,0 – 63,0 %.

2.5. Considerações sobre o uso do MCR

O método de resolução multivariada de curvas também foi estudado para a geração de imagens das dispersões em Soluplus®. Devido à grande homogeneidade das dispersões em etanol, foi necessário utilizar o procedimento de matriz aumentada para os cálculos e, para isto, foram utilizadas cinco amostras, conforme indicado na Figura 7. Caso não fosse utilizado o procedimento de matriz aumentada, a solução do MCR convergia para um conjunto de espectros puros iguais, ou seja, ele interpretava a amostra como sendo formada por um único constituinte, devido à sua alta homogeneidade. No entanto, foi observado que, mesmo com o procedimento de matriz aumentada, a solução fornecida pelo MCR para os espectros puros estimados (matriz **S**) apresentava o problema de ambiguidade rotacional, ou seja, os espectros estimados apresentavam sinais onde não deveriam apresentar. Este problema não foi possível de contornar mesmo utilizando as restrições de não negatividade de concentrações e espectros. Considerando que os valores contidos na matriz **S** estavam errados, os valores de concentração previstos (matriz **C**) também estariam e, por este motivo, acredita-se que não seria correto continuar com o procedimento de obtenção das imagens. A liberdade em alterar a matriz **S** neste caso não foi interessante e não foi necessária para o tratamento dos dados, uma vez que não existem diferenças entre os espectros puros iniciais e aqueles na dispersão. O MCR é um procedimento útil nos casos em que os espectros puros obtidos experimentalmente não representam os espectros puros *na amostra*, como no caso de interações entre os componentes, adsorção de água, etc. No entanto, neste estudo, foi verificado que o CLS (no qual a matriz **S** é fixa) foi suficiente e adequado para o tratamento dos dados.

3. Conclusões

Os estudos com o excipiente Soluplus® na etapa 1 indicaram que dispersões empregando etanol eram mais homogêneas que aquelas preparadas em água e ambas muito mais homogêneas que a mistura física dos pós. Foi verificado na etapa 2 que, apesar da limitada solubilidade do fármaco em etanol, o mesmo pôde ser utilizado em dispersões contendo porcentagens em massa de atorvastatina abaixo de 50,0 % (m/m) em Soluplus® (razão 1:1 m/m de Soluplus®:atorvastatina), sendo que nestas concentrações, apenas a forma amorfa do fármaco estava presente. Foi selecionada a razão 1:4 m/m de atorvastatina:Soluplus® (20,0 % m/m), pois nesta razão, a amostra se apresentou límpida após a dispersão em meio aquoso, sendo o tempo de abertura considerado razoável (< 1h).

Para a continuação dos estudos a razão 1:4 m/m foi mantida e foram avaliados os polímeros amido, celulose e lactose como diluentes principais da formulação. Foi verificado que cada um deles apresenta distribuições diferentes, caso adicionados em fase interna ou externa. Dispersões mais homogêneas foram obtidas com o amido e celulose adicionadas em fase interna e lactose adicionada em fase externa. Estes resultados foram confirmados com espectroscopia Raman. Considerando também a solubilidade em meio aquoso, a dispersão contendo lactose em fase externa foi considerada a mais promissora. Este diluente não interferiu na condição de supersaturação alcançada com o Soluplus® e por este motivo não foi necessária a adição de um desintegrante.

Durante o tratamento de dados, foi possível verificar que, para algumas amostras, o sinal de reflectância no infravermelho próximo pôde ser considerado a soma dos sinais dos compostos puros, ponderados pelas suas concentrações, que é o princípio do método CLS e, nestes casos, o método forneceu resultados exatos sem nenhuma correção. Por outro lado, para outras amostras, foi verificado que o espectro médio real apresentava diferenças em relação ao espectro calculado matematicamente com base no princípio do CLS e, por este motivo, os erros de previsão dos valores médios de concentração foram superiores a 10,0 %.

Acredita-se que isto se deve a aspectos inerentes à espectroscopia de reflectância, como o fenômeno de espalhamento da radiação, os quais não são levados em consideração no método CLS. Considerando que estas diferenças foram sistemáticas, foi possível modelá-las empregando uma regressão linear simples e assim corrigir os valores previstos nos pixels, fazendo com que o método se torne exato (histogramas centrados nos valores esperados), sem alterar a relação entre os valores das concentrações previstas nos pixels.

Outra possibilidade avaliada foi estimar os espectros dos compostos puros a partir de um conjunto e misturas com concentrações conhecidas. Isto faz com que as diferenças espectrais observadas em relação ao espectro calculado matematicamente sejam transferidas para os espectros puros e assim, a solução do CLS também foi exata. Vale ressaltar que esta estratégia não seria possível de aplicar nos dados obtidos por espectroscopia Raman uma vez que, neste caso, os espectros médios experimentais coincidiram com os espectros calculados matematicamente, uma vez que a fonte de inexatidão do CLS era outra. Com um conjunto reduzido de amostras (5) não foi possível construir um modelo PLS confiável, demonstrando uma vantagem do procedimento de correção do CLS.

CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho procurou-se identificar as possibilidades de utilização de espectroscopia vibracional de imagem como ferramenta analítica para auxiliar o desenvolvimento farmacêutico de um produto, tendo como motivação o desenvolvimento de formulações com solubilidade aumentada para a atorvastatina cálcica. As potencialidades e problemas de diferentes métodos para a geração de imagens foram avaliados e discutidos tanto em espectroscopia NIR quanto em espectroscopia Raman de imagem.

Foi demonstrado que, na presença de um sinal específico para cada composto na amostra, o método univariado pode ser utilizado, fornecendo resultados satisfatórios caso não exista nenhuma anormalidade no sinal espectral. Com a presença de um sinal anômalo, os métodos multivariados CLS e PLS se mostraram superiores. Os resultados obtidos por PCA foram de difícil interpretação, pois foi verificado que existiam informações em algumas componentes principais que não descreviam a variação de concentração dos componentes da amostra. Além disto, a interpretação das imagens baseadas em *scores* ao invés de concentrações foi bastante subjetiva. Devido a estes fatos, este método não foi estudado a fundo.

Considerando que durante o desenvolvimento farmacêutico os constituintes puros estão disponíveis e as concentrações médias das amostras preparadas são conhecidas, o método CLS se mostrou bastante interessante. Por ser um método quantitativo e multivariado, simples de ser compreendido e executado, ele foi estudado em detalhes neste trabalho com o intuito de entender suas limitações e como contorná-las. Para algumas amostras, o CLS foi aplicado diretamente (utilizando apenas os espectros puros para os cálculos) e gerou resultados satisfatórios enquanto para outras, os valores previstos não foram exatos. A comparação entre os espectros esperados (calculados em Matlab[®]) com o espectro médio obtido experimentalmente para uma determinada amostra mostrou-se um procedimento interessante para inferir sobre a fonte da inexatidão. Com base na comparação destes espectros, concluiu-se que na espectroscopia Raman, o principal motivo da falta de exatidão foi a ambiguidade de intensidade, gerada na etapa de normalização dos espectros puros. Isto porque o espectro

esperado foi idêntico ao espectro médio da amostra, ou seja, interações e não-linearidades não explicam a falta de exatidão. Para a espectroscopia NIR, acredita-se que a principal contribuição para a falta de exatidão deve-se a eventos físicos que acontecem durante a medida de reflectância, como por exemplo, o espalhamento da radiação.

Independente da fonte de inexatidão, foi verificado que os valores previstos pelo CLS, embora pouco exatos, estavam correlacionados com os valores experimentais e, por este motivo, uma correção através de simples regressão univariada entre os dois valores foi suficiente para diminuir o erro a valores aceitáveis. Outra possibilidade de correção que foi estudada foi utilizar os espectros puros estimados com base em um conjunto de amostras com concentrações conhecidas, ao invés dos espectros puros obtidos experimentalmente. Vale ressaltar que esta estratégia foi válida apenas nos casos em que existiram diferenças entre os espectros experimentais médios e os espectros calculados matematicamente. Desta maneira, sugere-se que ao utilizar o CLS para a geração de imagens químicas, a primeira etapa seja a comparação do espectro esperado (calculado) com aquele realmente obtido para a média da amostra.

A comparação dos resultados obtidos com o procedimento de correção do CLS com o método PLS indicou que a correção foi efetiva e resultados muito próximos foram obtidos. A correção do CLS apresentou a vantagem de necessitar um conjunto pequeno de amostras (4-5, um número típico para a realização de uma calibração univariada) em relação ao PLS, para o qual não foi possível realizar o procedimento de validação cruzada de forma confiável com este número de amostras. No entanto, quando algum constituinte está em concentração minoritária (< 5%), o PLS é o método mais promissor, conforme mostrado no Capítulo 4. O método MCR também foi estudado, porém não apresentou vantagem em relação ao CLS para as amostras estudadas devido ao problema de ambiguidade rotacional.

A espectroscopia de imagem foi fundamental para avaliar a homogeneidade das formulações com os excipientes inovadores Gelucire 44/14[®] e Soluplus[®]. As

dispersões sólidas empregando Gelucire[®] 44/14 preparadas pelo método da fusão apresentaram aglomerados em uma faixa estreita de concentrações, os quais não impactaram na solubilização da atorvastatina. Foi verificado por espectroscopia Raman que a atorvastatina permaneceu na sua forma polimórfica inicial (forma cristalina I), ou seja, não houve transformação para a forma amorfa durante o preparo empregando este método.

Para tentar eliminar os aglomerados observados com o método da fusão, o fármaco foi solubilizado em um solvente orgânico (diclorometano) juntamente com o Gelucire 44/14[®], sendo o solvente evaporado ao final do processo. Este processo de fato levou a formação de uma dispersão mais homogênea, no entanto o solvente orgânico tornou a dispersão enrijecida após a secagem, fazendo com que ela não abrisse em meio aquoso, e, desta maneira, o fármaco não foi liberado. Na proporção de atorvastatina:Gelucire[®] 44/14 utilizada inicialmente houve a formação de uma mistura de polimorfos sendo que o fármaco cristalino permaneceu em concentrações abaixo de 5,0 %. Foi possível quantificá-lo nos pixels por espectroscopia Raman e regressão em mínimos quadrados parciais (PLS), o que é importante, pois a presença de um polimorfo menos solúvel pode levar à variações na dissolução e isto é especialmente impactante para fármacos pertencentes às Classes II e IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutico.

Outra estratégia foi então adotada, a solubilização da atorvastatina em diferentes solventes que não fossem evaporados, ou seja, que permanecessem na dispersão, antes da incorporação no excipiente semi-sólido Gelucire 44/14[®], dando origem à formulações do tipo SEDDS. Foi verificado que, embora todos os solventes estudados apresentassem miscibilidade adequada com o Gelucire[®]44/14 a quente, após o resfriamento os solventes hidrofílicos (Transcutol[®] e propilenoglicol) não se misturavam completamente na matriz semi-sólida do Gelucire[®] 44/14, o que poderia ocasionar separação de fases no futuro. Os dois solventes lipofílicos (Capryol[®] 90 e Capmul[®] MCM) por outro lado, se misturaram de maneira efetiva ao Gelucire[®] 44/14. Após determinação da proporção correta de Gelucire[®] 44/14 e Capmul[®] MCM, uma condição de supersaturação semelhante à obtida com o método da fusão foi alcançada. Desta

maneira, considerando que tanto as dispersões sólidas quanto a formulação SEDDS com Capmul[®] MCM apresentaram solubilidade aumentada em água, seria preferível utilizar a formulação SEDDS ao invés da dispersão sólida para garantir a homogeneidade do produto.

Os estudos com o excipiente Soluplus[®] e espectroscopia NIR de imagem indicaram que a dispersão de atorvastatina utilizando etanol como solvente era mais homogênea do que a dispersão preparada em água e a mistura física dos pós. Apesar da solubilidade limitada da atorvastatina em etanol, na proporção utilizada, este solvente pôde ser utilizado ao invés do metanol. As imagens químicas indicaram que não foram formados aglomerados de atorvastatina quando a concentração foi aumentada e que, a razão fármaco:Soluplus[®] foi determinada pelos ensaios em água. Após a adição dos três diluentes estudados (amido, celulose e lactose) não foram observados pixels contendo apenas um ou outro componente, ou seja, de uma maneira geral, eles estavam bem misturados. As amostras mais homogêneas foram as dispersões preparadas com amido na fase interna e lactose na fase externa e, considerando também a solubilidade em água, a última foi selecionada como mais promissora. As mesmas conclusões em relação à homogeneidade das amostras foram obtidas por espectroscopia NIR e Raman.

Como conclusão geral, este trabalho mostrou como a espectroscopia de imagem pode trazer informações úteis durante o desenvolvimento farmacêutico, as quais não podem ser obtidas nem por meio da espectroscopia vibracional pontual nem por métodos de imagem como microscopia ótica e eletrônica de varredura. Assim, esta é uma ferramenta poderosa para a indústria farmacêutica moderna, especialmente no setor de pesquisa e desenvolvimento.

CAPÍTULO 8: TRABALHOS FUTUROS

Até o momento, não é de nosso conhecimento outros estudos de espectroscopia de imagem com excipientes semi-sólidos da família dos Gelucires[®] e, como o uso destes excipientes tende a crescer no desenvolvimento farmacêutico, esta técnica pode ser de grande valia para a avaliação de formulações desenvolvidas no futuro. Além da detecção de aglomerados ou de diferentes formas polimórficas formadas no processo, a avaliação da distribuição dos componentes em formulações semi-sólidas por espectroscopia de imagem pode prever a separação de fases e evitar que este problema seja identificado apenas após meses de estudo de estabilidade do produto. Além disto, a estabilidade de formulações semi-sólidas em relação à cristalização de fármacos (especialmente na sua forma amorfa) também é um assunto que deve ser estudado e que não foi explorada neste trabalho devido à limitação de tempo.

Desta maneira, acredita-se que esta técnica será muito útil para auxiliar o desenvolvimento de formulações de fármacos ainda mais lipofílicos que a atorvastatina, bem como o desenvolvimento de formulações de liberação modificada, para as quais excipientes semi-sólidos também foram lançados recentemente. Além disto, uma tendência no desenvolvimento farmacêutico são as formulações SEDDS sólidas, sendo que até o presente momento não existe medicamento comercial nesta forma farmacêutica. A formulação SEDDS pode ser solidificada de diferentes maneiras e acredita-se que a espectroscopia de imagem também pode auxiliar para avaliar a eficiência dos processos empregados para a solidificação

O Soluplus[®] é um excipiente muito novo e pouco explorado. Ele pode ser utilizado em processos que não foram descritos nesta tese, como por exemplo, como emulsificante para granulação úmida ou como aglutinante para compressão direta, para o desenvolvimento de novos medicamentos ou a (necessária) reformulação de diversos que já estão no mercado.

REFERÊNCIAS

-
- ¹ Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research (CDER), Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, Rockville, 2000, disponível em: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/3657gd3.pdf>, acessado em julho/2013.
- ² United States Pharmacopeia/National Formulary USP 30/NF 25, Rockville, 2007.
- ³ N. A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo, H. Lennernäs, A. S Hussain, H. E. Junginger, S. A. Stavchansky, K. K. Midha, V. P. Shah, G. L. Amidon, Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification, *Mol. Pharm.* 1 (2003) 85 - 96.
- ⁴ G. L. Amidon, H. Lennernas, V. O. Shah, J. R Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability, *Pharm. Res.* 12 (1995) 413 - 420.
- ⁵ H. Almeida, Métodos para o incremento da solubilidade de substâncias activas pouco solúveis (BCS – Classe II), Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Portugal (2009).
- ⁶ D. Hauss, Oral lipid-based formulations, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 667-676.
- ⁷ C. Leuner e J. Dressman, Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 47 - 60.
- ⁸ O. Chambin, V. Jannin, Interest of multifunctional lipid excipients: case of Gelucire[®] 44/14, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31 (2005) 527 - 534.
- ⁹ H. Hardung, D. Djuric, S. Ali, Combining HME & solubilization: Soluplus[®] - the solid solution, *Drug Deliv. Technol.* 10 (2010).
- ¹⁰ M. Linn, *In-vitro* characterization of the novel solubility enhancing excipient Soluplus[®], Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Naturais e Tecnologia, Química, Farmacêutica, Biotecnologia e Ciência de Materiais, Universidade Saarlandes, Alemanha (2011).
- ¹¹ W. L. Chiou e S. Riegelman, Pharmaceutical applications of solid dispersions, *J. Pharm. Sci.* 60 (1971) 1281 - 1302.
- ¹² A. T. M. Serajuddin, Solid dispersions of poorly water soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 1058 - 1066.
- ¹³ F. Damian, N. Blaton, L. Naesens, J. Balzarini, R. Kinget, P. Augustijns, G. van der Mooter, Physicochemical characterization of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with polyethylene glycol 6000 and Gelucire 44/14, *Eur. J. Pharm. Sci.* 10 (2000) 311 - 322.

- ¹⁴ A. Karatas, N. Yuksel, T. Baykara, Improved solubility and dissolution rate of Piroxicam using Gelucire 44/14 and Labrasol, *Farmaco* 60 (2005) 777-782.
- ¹⁵ B. Chauhan, S. Shimpi, A. Paradkar, Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (2005) 219 - 230.
- ¹⁶ M. Linn, E. M. Collnot, D. Djuric, K. Hempel, E. Fabian, K. Kolter, C. M. Lehr Soluplus[®] as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 336 – 343.
- ¹⁷ D. T. Smithey, J. C. Fennewald, J. T. Gautschi, S. Ali, Y. Lan, N. Langley, Evaluation of Soluplus[®] spray dried dispersion for poorly soluble compounds, disponível em http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2010/R6081.pdf, acessado em dezembro/2012.
- ¹⁸ Soluplus[®] Technical Information, disponível em: http://www.pharma-ingredients.basf.com/Statements/Technical%20Informations/EN/Pharma%20Solutions/03_090801e_Soluplus.pdf, acessado em julho/2013.
- ¹⁹ J. L. Tang, J. Sun, Z. G He, Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: strategy for improving oral delivery of poorly soluble drugs, *Curr. Drug Ther.* 2 (2007) 85 - 93.
- ²⁰ K. Schamp, S. A. Schreder, J. Dressman, Development of an in-vitro/in-vivo correlation for lipid formulations of EMD 51733, a poorly soluble, lipophilic substance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 62 (2006) 227 - 234.
- ²¹ A. S. Narang, D. Delmarre, D. Gao, Stable drug encapsulation in micelles and microemulsions, *Int. J. Pharm.* 345 (2007) 9 – 25.
- ²² E. T. Cole, D. Cadé, H. Benameur, Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 747 - 756.
- ²³ V. L. Campo e I. Carvalho, Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas, *Quim. Nova* 30 (2007) 425 - 430.
- ²⁴ J. S. Kim, M. S Kim, H. J. Park, S. J. Jin, S. Lee, S. J. Hwang, Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process, *Int. J. Pharm.* 359 (2008) 211 - 219.
- ²⁵ P. J. Kadu, S. S. Kushare, D. D. Thacker, S. G. Gattani, Enhancement of oral bioavailability of atorvastatin calcium by self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS), *Pharm. Dev. Technol.* 16 (2011) 65 - 74.
- ²⁶ Y. M. Yin, F. D. Cui, J. S. Kim, M. K. Choi, B. C. Choi, S. J. Chung, C. K. Shim, D. D. Kim, Preparation, characterization and in-vitro intestinal absorption of a dry emulsion formulation containing atorvastatin calcium, *Drug Delivery* 16 (2009) 30 - 36.

- ²⁷ N. Chieng, T. Rades, J. Aaltonen, An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 618 - 644.
- ²⁸ Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry ANDAs: pharmaceutical solid polymorphism: chemistry, manufacturing, and controls information, Rockville, 2007, disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072866.pdf>, acessado em julho/2013.
- ²⁹ G. Shete, V. Puri, L. Kumar, A. K. Bansal, Solid State characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples, *AAPS PharmSciTech* 11 (2010) 598 - 609.
- ³⁰ L. Yu, S. M. Reutzel, G. A. Stephenson, Physical characterization of polymorphic drugs: an integrated characterization strategy, *PSTT* 3 (1998) 118 - 127.
- ³¹ M. Savolainen, New insights into the amorphous state and related solid-state transformations, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Helsinky, Finlândia (2008).
- ³² P. McArdle, K. Gilligan, D. Cunningham, A. Ryder, Determination of the polymorphic forms of bicifadine hydrochloride by Differential Scanning Calorimetry-Thermogravimetric analysis, X-ray powder diffraction, Attenuated Total Reflectance - Infrared spectroscopy, and Attenuated Total Reflectance - Near-infrared spectroscopy, *Appl Spectrosc.* 59 (2005) 1365–1371.
- ³³ E. W. Ciurczak em: D. A. Burns, E. W. Ciurczak (Eds), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, Marcel Dekker INC., New York, 2001.
- ³⁴ P. Williams, K. H. Norris, *Near infrared technology in the agricultural and food industries*, Amer. Assoc. of Cereal Chemists, St. Paul, 1987.
- ³⁵ J. J. Workman, L. Weyer, *Practical Guide to interpretative Near-Infrared spectroscopy*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2008.
- ³⁶ C. V. Raman and K. S. Krishnan, A new type of secondary radiation, *Nature* 121 (1928) 501 – 502.
- ³⁷ F. J. Holler, D. A. Skoog, S. R. Crouch, *Princípios de análise instrumental*, 5ª ed., Bookman, São Paulo, 2009.
- ³⁸ R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis*, John Wiley & Sons, Columbus, 2000.
- ³⁹ E. Smith e G. Dent, *Modern Raman spectroscopy – a practical approach*, Wiley, Chichester, 2005.
- ⁴⁰ R. C Schweitzer, A. S. Bangalore, P. Treado, The role of chemometrics in chemical image analysis, *Managing the Modern Laboratory*, 5 (2000) 7-13.

-
- ⁴¹ P. Geladi, J. Burger, T. Lestander, Hyperspectral imaging: calibration problems and solutions, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 72 (2004) 209 - 217.
- ⁴² J. M. Amigo, Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 93 – 109.
- ⁴³ B. M. Wise, N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, W. Windig, R. S. Koch, *Chemometrics tutorial for PLS toolbox and Solo*, Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, 2006.
- ⁴⁴ R. Tauler, A. K. Smilde, B. R Kowalski, Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution, *J. Chemom.* 9 (1995) 31 - 58.
- ⁴⁵ L. Zhang, M. J. Henson, S. S Sekulic, Multivariate data analysis for Raman imaging of a model pharmaceutical tablet, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 262 - 278.
- ⁴⁶ A. de Juan e R. Tauler, Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163 - 176.
- ⁴⁷ A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder, Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis, *Trac-Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 70 - 79.
- ⁴⁸ A. de Juan, M. Maeder, T. Hancewicz, R. Tauler, Use of local rank-based spatial information for resolution of spectroscopic images, *J. Chemom.* 22 (2008) 291 - 298.
- ⁴⁹ J. Jaumot, R. Gargallo, A. de Juan, R. Tauler, A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101 - 110.
- ⁵⁰ S. Piqueras, J. Burger, R. Tauler, A. de Juan, Relevant aspects of quantification and sample heterogeneity in hyperspectral image resolution, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 117 (2012) 169 - 182.
- ⁵¹ S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal Component Analysis, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37-52.
- ⁵² G. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, Self-modelling curve resolution of near infrared imaging data, *J. Near Infrared Spectrosc.* 16 (2008) 151 - 157.
- ⁵³ S. Sasic, An in-depth analysis of Raman and near infrared chemical images of common pharmaceutical tablets, *Appl. Spectrosc.* 61 (2007) 239 - 250.
- ⁵⁴ C. Ravn, Near-infrared chemical imaging in formulation development of solid forms, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Copenhagen, Dinamarca (2009).
- ⁵⁵ S. Wold, M. Sjostrom, L. Eriksson, PLS regression: a basic tool of chemometrics *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 109 -130.

- ⁵⁶ R. G. Brereton, Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst*, 125 (2000), 2125 - 2154.
- ⁵⁷ H. Martens e T. Naes, *Multivariate Calibration*, 2^a ed., John Wiley & Sons, Chichester, 1993.
- ⁵⁸ J. J. Andrew, Raman microscopy and imaging, em: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley Online library, 2006, disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a6404/abstract>, acessado em julho/2012.
- ⁵⁹ Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for Industry: PAT: A framework for Innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance*, Rockville, 2004, disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070305.pdf>, acessado em julho/2013.
- ⁶⁰ International Conference of Harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human use (ICH), *Guideline Q8 (R1): Pharmaceutical development*, 2005, disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm128005.pdf>, acessado em julho/2013.
- ⁶¹ S. Sasic, Raman mapping of low-content API pharmaceutical formulations I. Mapping of alprazolam in alprazolam/Xanax tablets, *Pharm. Res.* 24 (2007) 58 - 65.
- ⁶² B. Vajna, I. Farkas, A. Farkas, H. Pataki, Z. Nagy, J. Madarasz and G. Marosi, Characterization of drug-cyclodextrin formulations using Raman mapping and multivariate curve resolution, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 38 - 44.
- ⁶³ A. Docoslis, K. L. Huszarik, G. Z. Papageorgiou, D. Bikiaris, A. Stergiou and E. Georgarakis, Characterization of the distribution, polymorphism, and stability of nimodipine in its solid dispersions in polyethylene glycol by micro-Raman spectroscopy and powder X-ray diffraction, *AAPS J.* 9 (2007) E361 - E370.
- ⁶⁴ N. Furuyama, S. Hasegawa, T. Hamaura, S. Yada, H. Nakagami, E. Yonemochi and K. Terada, Evaluation of solid dispersions on a molecular level by Raman mapping technique, *Int. J. Pharm.* 361 (2008) 12–18.
- ⁶⁵ E. Karavas, M. Georgarakis, A. Docoslis, D. Bikiaris, Combining SEM, TEM, and micro-Raman techniques to differentiate between the amorphous molecular level dispersions and nanodispersions of a poorly water-soluble drug within a polymer matrix, *Int. J. Pharm.* 340 (2007) 76–83.
- ⁶⁶ B. Vajna, H. Pataki, Z. Nagy, I. Farkas and G. Marosi, Characterization of melt extruded and conventional Isoptin formulations using Raman chemical imaging and chemometrics, *Int. J. Pharm.* 419 (2011) 107 - 113.
- ⁶⁷ Z. K. Nagy, M. Sauceau, K. Nyúl, E. Rodier, B. Vajna, G. Marosi and J. Fages, Use of supercritical CO₂-aided and conventional melt extrusion for enhancing the dissolution rate of an active pharmaceutical ingredient, *Poly. Adv. Technol.* 23 (2011) 909 - 918.

- ⁶⁸ T. Sakamoto, T. Matsubara, D. Sasakura, Y. Takada, Y. Fujimaki, K. Aida, T. Miura, T. Terahara, N. Higo, T. Kawanishi, Y. Hiyama, Chemical mapping of tulobuterol in transdermal tapes using microscopic laser Raman spectroscopy, *Pharmazie* 64 (2009) 166 - 171.
- ⁶⁹ A. Belu, C. Mahoney, K. Wormuth, Chemical imaging of drug eluting coatings: combining surface analysis and confocal Raman microscopy, *J. Controlled Release* 126 (2008) 111 - 121.
- ⁷⁰ W. H. Doub, W. P. Adams, J. A. Spencer, L. F. Bushe, M. P. Nelson, P. J. Treado, Raman chemical imaging for ingredient specific particle size characterization of aqueous suspension nasal spray formulation: a progress report, *Pharm. Res.* 24 (2007) 934 - 945.
- ⁷¹ P. Li, S.R. Hynes, T. F. Haefele, M. Pudipeddi, A. E. Royce, A. T. M. Serajuddin, Development of clinical dosage forms for a poorly water-soluble drug II: formulation and characterization of a novel solid microemulsion preconcentrate system for oral delivery of a poorly water-soluble drug, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1750 - 1764.
- ⁷² M. C. Breitzkreitz, G. P. Sabin, G. Polla, R. J. Poppi, Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2013) 3 - 12.
- ⁷³ M. Haaser, M. Windbergs, C.M. McGoverin, P. Kleinebudde, T. Rades, K.C. Gordon, C.J. Strachan, Analysis of matrix dosage forms during dissolution testing using Raman microscopy, *J. Pharm. Sci.* 100 (2011) 4452–4459.
- ⁷⁴ K. C. Gordon, C. M. McGoverin, Raman mapping of pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* 417 (2011) 151-162.
- ⁷⁵ B. Vajna, G. Patyi, Z. Nagy, A. Bódis, A. Farkas, G. Marosi, Comparison of chemometric methods in the analysis of pharmaceuticals with hyperspectral Raman imaging, *J. Raman Spectrosc.* 42 (2011) 1977-1986.
- ⁷⁶ M. C. Breitzkreitz e R. J. Poppi, Trends in Raman chemical imaging, *Biomed. Spectrosc. Imaging* 1 (2012) 159 – 183.
- ⁷⁷ I. W. Levin e R. Bhargava, Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: Integrating Microscopy and Molecular Recognition, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 56 (2005) 429 - 474.
- ⁷⁸ G. Reich, Near infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2000) 1109 -1143.
- ⁷⁹ A. S. El-Hagrasy, H. R. Morris, F. D'Amico, R. A. Lodder, J. K. Drennen III, Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity, *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298 – 1307.

- ⁸⁰ A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Raoult, M. Maeder, Spectroscopic imaging and chemometrics: a powerful combination for global and local sample analysis, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 70 - 79.
- ⁸¹ J. M. Amigo e C. Ravn, Direct quantification and distribution assessment of major and minor components in pharmaceutical tablets by NIR-chemical imaging, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 76-82.
- ⁸² C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, Content uniformity of pharmaceutical solid dosage forms by near infrared hyperspectral imaging: a feasibility study, *Talanta* 73 (2007) 733 - 741.
- ⁸³ J. Cruz e M. Blanco, Content uniformity studies in tablets by NIR-CI, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) 408 - 412.
- ⁸⁴ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Spiegel, C. Collet, Monitoring galenical process development by near infrared chemical imaging: one case study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 828 - 837.
- ⁸⁵ E. N. Lewis, J. E. Carrol, F. Clarke, NIR imaging: a near infrared view of pharmaceutical formulation analysis, *NIR News* 12 (2001) 16-18.
- ⁸⁶ G. P. Sabin, M. C. Breikreitz, A. M. Souza, P. da Fonseca, L. Calefe, M. Moffa, R. J. Poppi, Analysis of pharmaceutical pellets: an approach using near-infrared chemical imaging, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 113 - 119.
- ⁸⁷ A. S. Zidan, Z. Rahman, V. Sayaeeda, A. Raw. L. Yu, M. A. Khan, Crystallinity evaluation of tacrolimus solid dispersions by chemometric analysis, *Int. J. Pharm.* 28 (2012) 341 - 350.
- ⁸⁸ T. Puchert, D. Lochmann, J. C. Menezes, G. Reich, Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) for counterfeit drug identification - a four-stage concept with a novel approach of data processing (Linear Image Signature), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 138 -145.
- ⁸⁹ R. L. Carneiro e R. J. Poppi, Homogeneity study of ointment dosage forms by infrared imaging spectroscopy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 58 (2012) 42 - 48.
- ⁹⁰ A. A. Gowen, C. P. O'Donnell, P. J. Cullen, S. E. J. Bell, Recent applications of chemical imaging to pharmaceutical process monitoring and quality control, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 10 - 23.
- ⁹¹ C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 533 - 553.
- ⁹² C. Ravn, E. Skibsted, R. Bro, Near-infrared chemical imaging (NIR-CI) on pharmaceutical solid dosage forms - Comparing common calibration approaches, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 554 - 561.

- ⁹³ R. Salzer, H. W. Siesler (Eds), Infrared and Raman spectroscopic imaging, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- ⁹⁴ H. F. Grahn, P. Geladi (Eds), Techniques and applications of hyperspectral image analysis, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- ⁹⁵ D. W. Sun (Ed) Hyperspectral imaging for food quality analysis and control, Elsevier, London, 2010.
- ⁹⁶ R. P., Shah, V., Kumar, S. Singh, Liquid chromatography/mass spectrometric studies on atorvastatin and its stress degradation products, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 (2008) 613 - 622.
- ⁹⁷ M. S. Kim, S. J. Jin, J. S. Kim, H. J. Park, H. S. Song, R. H. H. Neubert, S. J. Hwang, Preparation, characterization and in-vivo evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process, Eur. J. Pharm. Biopharm. 69 (2008) 454 - 465.
- ⁹⁸ L. Tessler, J. Aronhime, R. Lifshitz-Liron, D. Maidan-Hanoch, N. Hasson, Novel crystal forms of Atorvastatin hemi-calcium and processes for their preparation as well as novel processes for preparing other forms. US Patent 2009/0143459 A1, 07/ 2009.
- ⁹⁹ D. Lin-Vien, B. N. Colthup, W. Fateley, J. G. Grasselli, The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules, Academic Press, Califórnia, 1991.
- ¹⁰⁰ G. P. Sabin, A. M. de Souza, M. C. Breikreitz, R. J. Poppi, Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de *spikes* em espectroscopia Raman de imagem, Quim. Nova 35 (2012) 612 - 615.
- ¹⁰¹ B. Vajna, I. Farkas, A. Szabó, Z. Zsigmond, G. Marosi, Raman microscopic evaluation of technology dependent structural differences in tablets containing imipramine model drug, J. Pharm. Biomed. Anal. 51 (2010) 30-38.
- ¹⁰² European Medicines Agency, ICH Topic Q3C (R4) Impurities: Guidelines for Residual Solvents, disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002674.pdf, acessado em julho/2013.
- ¹⁰³ Website da empresa Gattefosse, <http://www.gattefosse.com>, acessado em Janeiro/2011
- ¹⁰⁴ Website da empresa Abitec, <http://www.abiteccorp.com>, acessado em Janeiro/2011.
- ¹⁰⁵ C. W. Pouton, Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system, Eur. J. Pharm. Sci. 29 (2006) 278 - 287.

- ¹⁰⁶ H. Mark e J. Workman, Classical Least Squares, Part II: Mathematical theory continued, Spectroscopy on-line, disponível em <http://www.spectroscopyonline.com/spectroscopy/article/articleDetail.jsp?id=676255> acessado em Novembro/2012.
- ¹⁰⁷ M. F. Ferrão, C. W. Carvalho, E. I. Muller, C. U. Davanzo, Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS, Ciênc. Tecnol. Aliment. 24 (2004) 333 - 340.
- ¹⁰⁸ M. U. Lucato, Análise quantitativa por técnicas de reflectância e fotoacústica no infravermelho médio com transformada de Fourier e utilização de calibração multivariada, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2005.
- ¹⁰⁹ D. L. Wetzel, Near infrared reflectance analysis: sleeper among spectroscopic techniques, Anal. Chem. 55 (1983) 1165 - 1176.
- ¹¹⁰ M. L. E. TeVrucht, P. R. Griffiths, Quantitative investigation of matrices for diffuse reflectance infrared Fourier transform spectrometry, Talanta 38 (1991) 839 - 849.