

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Monitorização de conversão polimórfica em formulações de olanzapina através de espectroscopia vibracional

Cláudia Filipa Abreu Miranda

Dissertação orientada pelo Professor Doutor João Almeida Lopes

Mestrado em

Engenharia Farmacêutica

2019

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Monitorização de conversão polimórfica em formulações de olanzapina através de espectroscopia vibracional

Cláudia Filipa Abreu Miranda

Dissertação orientada pelo Professor Doutor João Almeida Lopes

Mestrado em

Engenharia Farmacêutica

2019

Resumo

Uma forma farmacêutica sólida é uma combinação de uma ou mais substâncias ativas com um conjunto de excipientes, que servem de veículo ao fármaco aumentando a sua estabilidade física e química, assim como, a sua biodisponibilidade final. A substância ativa pode existir sob a forma de vários estados cristalinos e amorfo, e durante o processo de fabrico do medicamento e numa fase posterior de armazenamento, esta fica sujeita a condições extremas como stress mecânico ou térmico, às quais deve resistir. Consequentemente, podem existir transições no estado sólido, tais como: uma interconversão dos vários polimorfos, formação de hidratos ou a produção de um estado amorfo. Estas transformações podem levar a alterações nas propriedades físico-químicas do fármaco, como o ponto de fusão ou solubilidade que, por conseguinte, podem alterar a sua biodisponibilidade. Assim, a existência de técnicas analíticas que permitam a monitorização do estado sólido é crucial para garantir a qualidade do produto final e a sua estabilidade durante o processo de fabrico.

A Olanzapina (OLZ) é um antipsicótico que existe sob a forma de mais de vinte e cinco polimorfos, entre os quais alguns hidratos e formas anidras. A transição entre cada uma das formas pode ocorrer devido a diferentes graus de humidade relativa a que fica sujeito a forma farmacêutica, durante o seu fabrico ou armazenamento. Este fármaco tem valores baixos de solubilidade, e por isso qualquer variação devido a transições polimórficas, pode diminuir ainda mais a sua biodisponibilidade.

Neste trabalho foi avaliada a eficácia de várias técnicas de espectroscopia vibracional como a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), médio (MIR) e Raman, na monitorização da estabilidade da OLZ considerando distintas condições de armazenamento, assim como monitorizando o seu estado num processo de produção de comprimidos. No caso da espectroscopia NIR e Raman, estas são classificadas como técnicas PAT (Tecnologias analíticas de processo), e por isso podem ser potencialmente utilizadas em-linha, para uma monitorização em tempo real das possíveis conversões polimórficas do fármaco.

No delineamento experimental efetuado foram variados quatro parâmetros de processo: a proporção entre duas formas da OLZ (anidra I e dihidratada D), a humidade relativa, o tempo de armazenamento e a força de compressão, de forma a avaliar a influência de cada parâmetro no estado sólido da OLZ. As técnicas referidas foram comparadas considerando-se misturas de pós e correspondentes comprimidos.

Os resultados demonstraram que a espectroscopia NIR é a técnica mais eficiente na avaliação da estabilidade da OLZ, tanto em pós como comprimidos. A sua eficácia foi demonstrada inicialmente através da distinção de diferentes proporções de forma dihidratada D, e posteriormente na diferenciação de acordo com a humidade relativa a que as várias amostras foram expostas no período de armazenamento.

Palavras-chave: Olanzapina; Polimorfismo; Hidratos; Espectroscopia vibracional; Análise multivariada de dados.

Abstract

A pharmaceutical solid dosage form is a combination of one or more active pharmaceutical ingredients (API) and excipients, which are added to the formulation to ensure physical and chemical stability of the formulation, as well as manufacturability and bioavailability of the final product. API can exist in several crystalline states, and during processing and storage, the thermal and mechanical stress can lead to phase transformations such as amorphization, polymorphic conversion or hydration. These transformations can result in differences in important properties such as, physicochemical properties, stability (chemical and physical), solubility and bioavailability. It is therefore important to have analytical tools capable of guarantee the stability of the API during manufacturing and the quality of the final product.

Olanzapine (OLZ) is an antipsychotic that has the ability to undergo conversion into different polymorphic and pseudopolymorphic forms having more than twenty-five polymorphic forms known, among them hydrates. This API has low solubility values, and therefore any variation in it due to polymorphic transitions, may decrease its bioavailability.

In this work, the efficacy of several vibrational spectroscopy techniques such as NIR (Near Infrared Spectroscopy), MIR (Mid Infrared Spectroscopy) and Raman, was evaluated in the monitoring of the stability of OLZ throughout its manufacturing process, and during its storage time. In the case of NIR and Raman, these are classified as PAT tools, and so can be used in-line, for a real-time monitoring of possible polymorphic conversions of the API.

Formulations were designed according to a full factorial design and the factors used in the design were: the ration between the forms of OLZ (anhydrous I and dihydrate D), humidity level, storage time and compression force. The influence of each of the factors on the drug was evaluated through the mentioned techniques.

Results showed that NIR is the most efficient technique to evaluate the stability of OLZ in tablets and powders. This technique is able to distinguish different ratios of dihydrate D form and to monitor the water intake of the OLZ samples after storage at different RH conditions.

Keywords: Olanzapine; Polymorphism; Hydrates; Vibrational spectroscopic; Multivariate data analysis.

À minha mãe,

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Prof. João Almeida Lopes pela oportunidade de realização desta tese, pela orientação prestada ao longo deste ano, por sempre me ter transmitido todas as suas opiniões, críticas, conselhos e por me ter ajudado na resolução de alguns problemas que foram surgindo ao longo trabalho. Agradeço também todas as palavras de motivação e incentivo, pois não teria sido possível de outra forma.

À Dra. Mafalda Sarraguça, por ter disponibilizado o seu tempo na realização das análises MIR e NIR e por todo o seu apoio e orientação no esclarecimento de algumas dúvidas que foram surgindo ao longo do trabalho.

Ao Prof. João Pinto pela integração no laboratório e pela disponibilização de alguns materiais e equipamentos necessários à realização desta tese e agradeço também o seu apoio no esclarecimento de algumas dúvidas.

À Prof. Nídia Lourenço por todo o apoio prestado na utilização do Raman e pela sua disponibilidade.

Ao Prof. Rui Moreira e a todos os estudantes de doutoramento do laboratório de Química por todo o apoio prestado na utilização dos equipamentos e na realização de uma parte do trabalho experimental.

A todos os meus colegas no laboratório por todos os momentos de diversão, convívio, partilha de conhecimento e pela disponibilidade prestada ao longo do ano. Quero agradecer em especial ao Nuno Costa pelo apoio essencial no laboratório, também por todos os momentos de parvoíce proporcionados e por todos os conselhos, críticas e orientações dadas ao longo do ano.

À Diana, à Inês e à Ana pela companhia, momentos de diversão e partilha ao longo deste tempo e por todas as palavras de motivação e incentivo na realização desta tese.

Aos meus amigos, em especial à Lúcia e à Beatriz por me terem apoiado e pelas palavras de incentivo e força que me deram.

Por último, à minha família por serem o meu apoio incondicional, meu suporte em todos os momentos da minha vida e me aturarem quando às vezes não é fácil. Em especial, quero agradecer à minha mãe por ter acreditado sempre em mim, por todo o esforço despendido ao longo do meu percurso académico, por todos os conselhos que me deu e pelo amor incondicional, hoje e sempre.

Índice Geral

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iv
Índice Geral	v
Índice de figuras	vii
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução teórica	1
1.1. Caracterização do estado sólido em fármacos.....	2
1.1.1. Estado cristalino	3
1.1.2. Polimorfismo.....	4
1.1.3. Solvatomorfismo	7
1.1.4. Cristalização.....	9
1.1.5. Fatores que afetam a formação de cristais	12
1.1.6. Transformações de fase no estado sólido.....	12
1.1.7. Tipos de transformações que ocorrem durante o processamento do fármaco	13
1.1.8. Tipos de transformações que ocorrem durante o armazenamento do produto semi-acabado.....	15
1.2. Olanzapina	17
1.2.1. Formas anidras da OLZ.....	18
1.2.2. Formas dihidratadas da OLZ.....	18
1.2.3. Solubilidade da OLZ	19
1.2.4. Transformações polimórficas da OLZ	19
1.3. Técnicas utilizadas para caracterização dos materiais	20
1.3.1. Espectroscopia vibracional	20
1.3.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC).....	26
1.3.3. Ensaio de dissolução.....	27
1.4. Análise Multivariada	29
1.4.1. Análise de componentes principais (PCA).....	30

1.5.	Normalização e pré-processamento espectral	31
1.5.1.	Delineamento experimental (DoE).....	32
2.	Revisão bibliográfica	33
3.	Objetivos	34
4.	Materiais e métodos	35
4.1.	Materiais	35
4.1.1.	Olanzapina.....	35
4.1.2.	Fosfato de cálcio tribásico.....	35
4.1.3.	Celulose microcristalina	35
4.1.4.	Ácido clorídrico.....	36
4.1.5.	Água desmineralizada	36
4.2.	Métodos	36
4.2.1.	Preparação da forma dihidratada D da OLZ	36
4.2.2.	Preparação dos excicadores com HR controlada.....	36
4.2.3.	Preparação das formulações de OLZ	37
4.2.4.	Técnicas usadas para caracterização dos materiais e produtos	39
4.2.5.	Análise multivariada	40
5.	Resultados	41
5.1.	Análise de pós.....	41
5.1.1.	Análise da formulação.....	41
5.1.2.	Análise do efeito da humidade relativa no armazenamento.....	57
5.1.3.	Análise do efeito do tempo de armazenamento	65
5.2.	Análise de comprimidos	72
5.2.1.	Análise do efeito de compressão	72
5.2.2.	Análise do efeito da humidade relativa no armazenamento.....	76
5.2.3.	Ensaio de dissolução.....	79
5.3.	Discussão	85
6.	Conclusão e perspetivas futuras	91
6.1.	Conclusão	91
6.2.	Perspetivas futuras.....	92
7.	Bibliografia	93
	Anexo 1: Delineamento experimental	102
	Anexo 2: Modos vibracionais MIR para as formas dihidratada D e anidra I da olanzapina.....	105

Índice de figuras

Figura 1 - Ilustração representativa da ordem molecular nos sólidos (adaptado de [19])	xi
Figura 2 - Diagrama de energia livre de Gibbs vs Temperatura para um sistema enantiotrópico (a) e monotrópico (b). G :Energia Livre; H: Entalpia; T: temperatura; Liq: fase líquida; f: fusão; t: ponto de transição; m: ponto de fusão. (Adaptado de [27]).	6
Figura 3 - Representação esquemática das principais associações de moléculas de solvente a sólido farmacêuticos (adaptado de [35]).....	8
Figura 4 – Esquema ilustrativo de uma zona metastável de um processo de cristalização (Adaptado de [44]).....	11
Figura 5 - a) Estrutura molecular da OLZ; b) Par racémico que forma uma célula unitária da estrutura cristalina [11]	18
Figura 6 – Sistema de Classificação biofarmacêutico (adaptado de [69]).....	19
Figura 7 – Representação esquemática do interferómetro de Michelson e produção do interferograma a partir da fonte de radiação monocromática (adaptado de [76]).....	23
Figura 8 - Diferentes tipos de dispersão da radiação (adaptado de [84]).....	23
Figura 9 - Esquema-resumo da análise de resultados	41
Figura 10 - Termogramas das formulações CP5 (100% forma anidra I) e Controlo Negativo.....	42
Figura 11 - Termogramas das formulações CP1 (forma dihidratada D), CP2 (82% f.dihidratada D/18% f.anidra I), CP3 (50% f.dihidratada D/50% f.anidra I) e CP4 (18% f.dihidratada D/82% f.anidra I).....	43
Figura 12 - Espetros MIR das formas anidra I (OLZ anidra) e dihidratada D (OLZ dihidratada) individualmente e em diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (82%/18%; 50%/50%; 18%/82%). Regiões espectrais: a) 3700 cm ⁻¹ até 2500 cm ⁻¹ ; b) 1800 cm ⁻¹ até 1300 cm ⁻¹ ; c) 1300 cm ⁻¹ até 900 cm ⁻¹ d) 900 cm ⁻¹ até 600 cm ⁻¹ .Espetros pré-processados com SNV.....	44
Figura 13 - Espetros Raman das formas anidra I (OLZ anidra) e dihidratada D (OLZ dihidratada) individualmente e em diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (82%/18%; 50%/50%; 18%/82%). Espetros pré-processados com SNV.....	46
Figura 14 - Espetros NIR das formas anidra I (OLZ anidra) e dihidratada D (OLZ dihidratada) individualmente e em diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (82%/18%; 50%/50%; 18%/82%). Espetros pré-processados com SNV.....	46
Figura 15 - Termogramas das formulações M1(50%anid./50%dihidr.), M2(18%anid./82%dihidr.), M3(82%anid./50%dihidr.), M4 (100%dihidr.), e M5 (100%anid..) expostas à HR inicial (55%)	48
Figura 16 - Gráfico-resumo com os valores obtidos por DSC de entalpia de vaporização para as formulações M1 a M5 expostas a diferentes humidades relativas e tempos de armazenamento	49
Figura 17 - Diagrama de quartis relativo aos valores de entalpia de vaporização determinados por DSC para as formulações M1 a M5 expostas a diferentes HR	50

Figura 18 - Espectros MIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%). Regiões espectrais: a) 920 cm⁻¹ até 700 cm⁻¹; b) 1750 cm⁻¹ até 1300 cm⁻¹. Espectros pré-processados com SNV..... 51

Figura 19 - Espectros NIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).. Espectros pré-processados com SNV. 52

Figura 20 - Espectros Raman de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).. Espectros pré-processados com SNV. 52

Figura 21 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%). 53

Figura 22 - Loadings do modelo PCA para o componente um obtido a partir de espectros NIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%)..... 54

Figura 23 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros Raman de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%). 55

Figura 24 - Loadings do modelo PCA para o componente três obtido a partir de espectros Raman de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%)..... 55

Figura 25 - Espectros MIR de pós para a formulação M5 exposta a diferentes HR para o tempo de armazenamento de uma semana. Regiões espectrais: a) 920 cm⁻¹ até 700 cm⁻¹; b) 1750 cm⁻¹ até 1300 cm⁻¹. Espectros pré-processados com SNV..... 59

Figura 26 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M1 durante o tempo de armazenamento: uma semana (cima) e um mês (baixo). HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho) 61

Figura 27 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M2 durante o tempo de armazenamento um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho) 62

Figura 28 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M3 durante o tempo de armazenamento: uma semana. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)..... 62

Figura 29 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M3 durante o tempo de armazenamento: um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho) 63

Figura 30 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M5 durante o tempo de armazenamento: uma semana.HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)..... 63

Figura 31 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M5 durante o tempo de armazenamento: um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)	64
Figura 32 – Termogramas da formulação M1 produzida inicialmente (M1 HR ambiente) e exposta a 93% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês.....	66
Figura 33 – Espectros MIR da formulação M1 exposta a 93% durante 2 tempos de armazenamento: uma semana e um mês. Regiões espectralis: 1:950 cm ⁻¹ até 700 cm ⁻¹ e 2:1750 cm ⁻¹ até 1300 cm ⁻¹ . Espectros pré-processados com SNV.....	67
Figura 34 – Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento, misturas iniciais e diferentes HR. Tempos de armazenamento: inicial (verde: 11%; rosa: 75% e 93%), uma semana (castanho), um mês (azul). HR: a) 11%; b)75%; c)93%.....	69
Figura 35 - Termogramas da formulação M1 produzida inicialmente (M1 HR ambiente) e exposta a 11% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês.....	69
Figura 36 - Termogramas da formulação M5 produzida inicialmente e exposta a 11% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês.....	70
Figura 37 - Termogramas da formulação M4 produzida inicialmente e exposta a 11% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês.....	70
Figura 38 – Loadings do modelo PCA para o componente dois obtido a partir de espectros NIR de comprimidos e pós para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento	73
Figura 39 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos e pós para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Forma farmacêutica: pós (vermelho), comprimidos (azul).	73
Figura 40 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Força de compressão: 2Ton (vermelho), 4Ton (azul).	74
Figura 41 - Espectros NIR de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Força de compressão: 2Ton (vermelho), 4Ton (azul)...	75
Figura 42 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros Raman de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Força de compressão: 2Ton (vermelho), 4Ton (azul).	75
Figura 43 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).....	76
Figura 44 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para a formulação M5 durante o tempo de armazenamento: uma semana. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).....	77
Figura 45 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para a formulação M3 durante o tempo de armazenamento: um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).....	77

Figura 46 - Espectros Raman de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho). Espectros pré-processados com SNV.....	78
Figura 47 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros Raman de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).....	78
Figura 48 - Perfis de dissolução das formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).Força de compressão 4Ton.	79
Figura 49 - Perfis de dissolução das formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).Força de compressão 2Ton	80
Figura 50 - Perfis de dissolução das formulações M4 e M5 (M4:100%/0%; M5:0%/100%).Força de compressão 2T/4T	81
Figura 51 - Perfis de dissolução das formulações M1, M2 e M3 com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%); Força de compressão 2T/4T.....	82
Figura 52 - Perfis de dissolução da formulação M3 (82% forma anid./18% forma dihid.) sujeita a diferentes valores de HR, para o tempo de armazenamento de um mês.	84
Figura 53 – Perfis de dissolução da formulação M5 (100% forma anidra) sujeita a diferentes valores de HR, para o tempo de armazenamento de uma semana.	84

Índice de tabelas

<i>Tabela 1 -Tipos de transformações na fase sólida (adaptado de [29]).....</i>	16
<i>Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de forma anidra I da OLZ ([101]–[105])</i>	35
<i>Tabela 3 – Parâmetros utilizados no delineamento experimental e níveis de variação considerados.....</i>	37
<i>Tabela 4 – Composição dos controlos positivos</i>	38
<i>Tabela 5 - Composição do controlo negativo</i>	38
<i>Tabela 6 - Composição das formulações utilizadas.....</i>	38
<i>Tabela 7- Comparação das duas forças de compressão (2T e 4T) a que foram sujeitas as cinco formulações iniciais, com recurso ao valor de f2</i>	81
<i>Tabela 8 - Comparação das cinco formulações iniciais considerando duas forças de compressão constantes, com recurso ao valor de f2.....</i>	83
<i>Tabela 9 - Comparação de duas formulações M3 (considerando um mês de armazenamento) e M5 (considerando uma semana de armazenamento), sujeitas a diferentes valores de HR, com recurso ao valor de f2</i>	84
<i>Tabela 10 – Análise comparativa da eficácia de cada uma das técnicas na monitorização da estabilidade da OLZ após a exposição a diferentes fatores representativos de algumas fases do processo de fabrico e da fase final de armazenamento.....</i>	87
<i>Tabela 11 – Delineamento experimental para os comprimidos de OLZ.....</i>	102
<i>Tabela 12 – Modos vibracionais MIR para as formas dihidratada D e anidra I da olanzapina</i>	105

Lista de abreviaturas

- ATR – Refletância total atenuada
CP – Controlo Positivo
DoE – Delineamento Experimental
DRIFT – Espectroscopia de Infravermelho por Refletância Difusa e com Transformada de Fourier
DSC – Calorimetria Diferencial de Varrimento
EMA – Agência Europeia do Medicamento
FDA – *Food and Drug Administration*
HR – Humidade relativa
MCC – Celulose Microcristalina
MIR - Espectroscopia de Infravermelho Médio
NIR – Espectroscopia de Infravermelho Próximo
OLZ – Olanzapina
PAT – Tecnologias analíticas de processo
PC – Componente Principal
PC – Fosfato de Cálcio
PCA – Análise de Componentes Principais
PLS – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
SA – Substância ativa
SNV – Variação de Padrão Normal
TGA – Análise Termogravimétrica
THF - Tetrahidrofurano

1. Introdução teórica

As formas farmacêuticas sólidas são atualmente as mais usadas na indústria farmacêutica. Devido à sua facilidade de administração, o seu volume de mercado é consideravelmente superior a qualquer outro tipo de forma farmacêutica, e por isso, a produção deste tipo de formas é bastante rentável para a indústria farmacêutica [1].

A via de administração oral é a mais comum para administração de fármacos e os comprimidos são a forma farmacêutica sólida oral por excelência. São definidos como formas farmacêuticas unitárias, constituídos por um ou mais fármacos combinados com excipientes e obtidos através de um processo de compressão [1]. Em conjunto com a substância ativa (SA) são adicionados excipientes que servem de veículo ao mesmo, melhorando as suas propriedades físicas e químicas, como a compressibilidade, taxa de dissolução e desintegração, contribuindo assim, para a estabilidade e biodisponibilidade do fármaco [2], [3]. As propriedades físicas, químicas e biofarmacêuticas da SA são caracterizadas numa fase inicial de desenvolvimento farmacêutico, durante os estudos de pré-formulação. O conhecimento geral deste tipo de características condiciona a fase seguinte no desenvolvimento do medicamento.

O objetivo final de um estudo de pré-formulação é o desenvolvimento de uma forma farmacêutica estável, segura, efetiva e com qualidade. Através da avaliação dos principais parâmetros físico-químicos, que podem afetar o desenvolvimento da forma farmacêutica e o desempenho da mesma, é possível gerar informação útil para uma produção industrial robusta mantendo em cada lote a biodisponibilidade desejável. [4]

Os parâmetros físico-químicos mais relevantes para os estudos de pré-formulação são: a solubilidade, o coeficiente de partição, a taxa de dissolução, polimorfismo e a estabilidade do fármaco. [4]

O polimorfismo refere-se à capacidade do fármaco em existir sob a forma de vários estados cristalinos denominados polimorfos, que são caracterizados por apresentarem diferentes níveis de energia [5],[6].

As variações na organização da rede cristalina do fármaco e conseqüentemente, a sua energia, afetam as propriedades físico-químicas do próprio fármaco, nomeadamente, o seu ponto de fusão, a sua taxa de dissolução e a sua solubilidade, afetando, na prática, a sua biodisponibilidade final [5],[7].

Durante a fase de produção, a SA e excipientes são sujeitos a múltiplas operações unitárias, como por exemplo, aquecimento, moagem ou exposição a solventes, que podem desencadear diferentes tipos de transições de fase entre as várias formas polimórficas do fármaco. A exposição da SA a diferentes condições ambientais, tais como, variações de temperatura, pressão ou humidade relativa, também afetam a sua estabilidade física. As transições de fase mais comuns incluem: a interconversão entre os vários polimorfos, a hidratação/solvatação das formas polimórficas e a amorfização [8], [9].

No caso de fármacos pouco solúveis como a Olanzapina (OLZ), as transições de fase que podem ocorrer são um dos fatores fundamentais a ter em conta durante a pré-formulação, pois podem alterar a biodisponibilidade do fármaco, através da alteração de alguns atributos de qualidade, como a estabilidade ou perfil de dissolução [10].

No processo de cristalização da OLZ podem formar-se pelo menos vinte e cinco formas sólidas diferentes. Por isso a monitorização da forma cristalina ao longo de todo o processo de fabrico da forma farmacêutica, é essencial para assegurar a qualidade do produto final, garantindo as especificações [11].

1.1. Caraterização do estado sólido em fármacos

A um nível macroscópico, os diferentes tipos de moléculas podem agregar-se de várias formas caracterizadas por diferentes estados de energia. As organizações moleculares distintas que um determinado composto pode apresentar são denominadas estados. Os estados sólidos, líquidos e gasosos são os mais comuns na natureza e distinguem-se principalmente em termos do grau de empacotamento das moléculas e da velocidade de movimento das mesmas. A distância intermolecular é outro fator a ser considerado e o mais distintivo entre os vários estados. A conjugação de todos os fatores referidos leva à existência de diferenças na energia potencial de cada estado [12].

A maioria das formas farmacêuticas apresenta-se no estado sólido e a caraterização prévia deste estado e da estrutura do arranjo molecular (p.e., rede cristalina) é fundamental para o futuro desenvolvimento da forma farmacêutica.[13].

Dependendo do estado sólido em que se encontra a SA, diferenças na cor, na morfologia, na estabilidade, na solubilidade, na densidade e conseqüentemente na biodisponibilidade esperada, podem ser observadas [13]. Algumas propriedades físicas, relacionadas com o processo de fabrico da própria forma farmacêutica também podem ser alteradas. Entre elas incluem-se, por exemplo, a capacidade de escoamento do pó e a compressibilidade. Geralmente, os medicamentos são produzidos na forma cristalina mais estável, para diminuir a probabilidade de ocorrência de transições de estado sólido durante o armazenamento. É importante determinar quais os efeitos, tanto do processo de armazenamento como de produção do próprio comprimido, no estado sólido da SA, assim como, a alteração do mesmo devido a variações na temperatura ou interações com excipientes [14],[15], [16] .

Durante o processo de fabrico, tem que se assegurar que a forma cristalina escolhida não é contaminada com outras formas cristalinas existentes para a mesma molécula. Estas transformações que podem ser induzidas no estado sólido, levam a alterações na biodisponibilidade e na estabilidade do próprio fármaco [17], [18].

Assim, a monitorização do estado sólido em que se encontra o fármaco, ao longo do processo, é fundamental para assegurar a qualidade final da forma farmacêutica produzida.

A maioria dos fármacos no estado sólido existe nos estados cristalino (caraterizado por uma organização regular das moléculas em que as mesmas estão ligadas entre si através de forças de ligação fracas como, por exemplo, ligações de hidrogénio ou ligações do tipo *Van der Waals*) e amorfo (no qual não se observa uma organização molecular regular) (Figura 1)[19]. Ao contrário dos compostos cristalinos que possuem uma estrutura ordenada a longas distâncias, os materiais amorfos apenas apresentam uma ordem a curtas distâncias, na ligação a moléculas vizinhas. A solubilidade destes materiais é um pouco maior em relação aos compostos cristalinos, e por isso são usados na indústria farmacêutica, na produção de alguns fármacos. A má estabilidade química

dos sólidos amorfos e a sua tendência para cristalizar levam a que a sua utilização seja bastante menor na indústria farmacêutica, e por isso a maior parte dos medicamentos comercializados são constituídos por SA no estado cristalino [20],[16],[15].

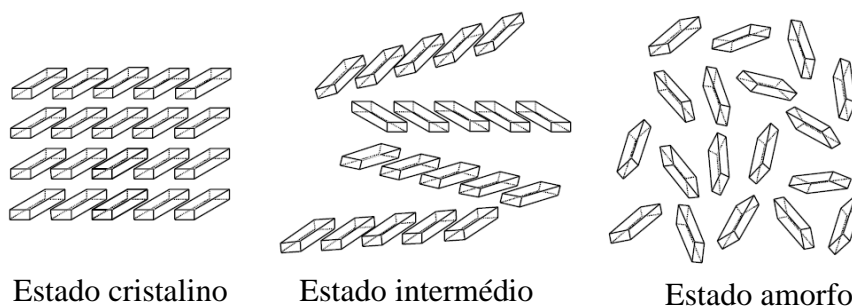


Figura 1 - Ilustração representativa da ordem molecular nos sólidos (adaptado de [19])

1.1.1. Estado cristalino

Os sólidos cristalinos são constituídos por agregados de átomos, moléculas ou iões organizados que formam uma estrutura cristalina regular, que se repete ao longo das três dimensões do espaço. A disposição destes constituintes no espaço é definida pela célula unitária, que é a unidade estrutural mais pequena que constitui o cristal. O empilhamento regular destas unidades ao longo das três dimensões do espaço, compõe a estrutura cristalina. As células unitárias têm todas o mesmo tamanho e o mesmo número de moléculas, espacialmente dispostas da mesma forma. Os parâmetros, ou dimensões das mesmas são definidas por um conjunto de três vetores que representam o comprimento das arestas, e pelo conjunto dos três ângulos definidos entre as mesmas. Cada sólido cristalino pertence a um de sete sistemas cristalinos diferentes que existem, e que se distinguem pelas diferenças relações estabelecidas entre as dimensões da célula unitária e os ângulos individuais característicos da mesma [3], [12]. No caso dos fármacos, existem três sistemas cristalinos mais comuns: o triclinico, o monoclinico e o ortorrômbico. As células unitárias podem distinguir-se em dois tipos de acordo com a posição dos átomos ou moléculas:

- Células unitárias primitivas, ou simples: só os vértices do paralelepípedo estão ocupados por átomos ou moléculas.
- Células unitárias não primitivas:
 - *End-Centered*: os vértices do paralelepípedo e o centro de uma das faces, superior ou inferior, estão ocupados por moléculas;
 - *Face-Centered*: os vértices do paralelepípedo e o centro de cada uma das faces estão ocupados por moléculas;
 - *Body-Centered*: os vértices do paralelepípedo e o centro da célula unitária são ocupados por moléculas.

Esta distinção feita por Bravais em 1850, leva à existência de catorze tipos de células unitárias diferentes a que se dá o nome de redes de Bravais [12][21].

Os sólidos cristalinos mais comuns, no caso dos fármacos, são os polimorfos, os solvatos, co-cristais e os sais. Polimorfos são moléculas que têm a mesma composição

química, no entanto apresentam uma estrutura cristalina diferente. Durante o processo de cristalização, a substância ativa pode formar arranjos cristalinos e/ou conformações diferentes na rede cristalina. A formação de vários polimorfos para uma determinada molécula pode ocorrer devido a várias razões: pode existir um empacotamento ou uma conformação das moléculas diferente na rede cristalina; o padrão de ligações de hidrogénio formadas é diferente; a quiralidade da molécula é diferente; pode ocorrer a formação de tautómeros [3], [21],[22],[23].

Durante o processo de cristalização, as moléculas do solvente podem ser incorporadas na rede cristalina, formando-se solvatos. Quando o solvente é a água, estes compostos designam-se por hidratos. Este tipo de sólidos cristalinos é denominado aduto molecular, visto que é formado por duas ou mais moléculas. O processo de cristalização deste tipo de compostos é mais rápido, visto que o seu empacotamento ao longo da rede cristalina é facilitado por mudanças na conformação das moléculas, induzidas pela molécula adicional, e pode existir a formação de ligações de hidrogénio com moléculas de solvente. A incorporação destas mesmas moléculas na rede cristalina do fármaco leva a diferenças significativas na sua estabilidade, solubilidade e, conseqüentemente, perfis de dissolução. As ligações intermoleculares formadas podem aumentar a estabilidade da rede cristalina, levando a um estado de energia potencial mais baixo, aumentando assim, a estabilidade do próprio fármaco. No caso da solubilidade, a estabilidade termodinâmica de um solvato, é maior no seu próprio solvente, por isso, no caso de um solvente aquoso, a incorporação de um solvato na rede cristalina, levará a um aumento da solubilidade, no entanto, se o sólido cristalino formado for um hidrato, a solubilidade em água irá diminuir. As diferenças referidas podem alterar a forma farmacêutica formada, e influenciam os seus processos de formulação, processamento e armazenamento [3],[23][22].

Os adutos moleculares também podem ter como molécula adicional, um sólido e nesse caso, são denominados co-cristais. A molécula adicional liga-se ao fármaco, geralmente, através de ligações de hidrogénio, e podem melhorar certas propriedades do mesmo, por exemplo, um aumento da sua solubilidade, estabilidade ou as propriedades mecânicas da forma farmacêutica [24], [25].

1.1.2. Polimorfismo

A capacidade que alguns compostos têm de cristalizar sob diferentes formas já é conhecida desde finais do século XVIII. No entanto, só a partir do século XX, e com a evolução de técnicas como a difração de raios-X, foi possível determinar os vários parâmetros característicos da célula unitária. Ao mesmo tempo que estes estudos eram feitos, surgiram os primeiros artigos com referências à existência de várias formas polimórficas da mesma molécula. Robertson, no ano de 1938, determinou a estrutura cristalina dos dois dimorfos do resorcinol, tendo sido descrito que a transição entre as duas formas cristalinas, era induzida pelo efeito da temperatura [26].

De acordo com a definição de McCrone's, o polimorfismo de qualquer elemento ou composto é definido como a sua capacidade de cristalizar em mais do que uma espécie cristalina diferente [26].

O polimorfismo tem tido uma importância fundamental na indústria farmacêutica, visto que, aproximadamente 80% dos fármacos comercializados exibem polimorfismo,

sob determinadas condições experimentais. Em termos económicos, tem existido um interesse elevado no estudo dos polimorfos, devido à sua influência na biodisponibilidade, estabilidade e processamento de alguns fármacos [26],[27].

As diferenças no arranjo tridimensional das moléculas que constituem os diferentes polimorfos, permite aos sólidos cristalinos apresentarem propriedades físicas distintas. O empacotamento das moléculas na estrutura cristalina pode acontecer de várias formas, pois as células unitárias que a constituem têm dimensões, volumes e formas diferentes, levando à formação de sólidos cristalinos de natureza diferente. O processamento dos mesmos a nível industrial para o fabrico da forma farmacêutica final é feito de forma diferente, de acordo com as propriedades físicas que forem alteradas. Podem existir diferenças na densidade, dureza, índice de refração, volume molar, higroscopicidade, pontos de fusão ou entalpia de fusão. A velocidade de dissolução e solubilidade assumem especial importância, pois a biodisponibilidade do fármaco pode ser alterada, tendo consequências potencialmente graves [23],[28].

1.1.2.1. Considerações estruturais sobre o polimorfismo

A estrutura cristalina é construída a partir da propagação, ao longo das três dimensões do espaço, das células unitárias. Durante este processo, existe a formação de várias formas cristalinas diferentes, com níveis de energia diferentes, ou seja, formam-se os diferentes polimorfos da substância.

Em termos estruturais, existem dois tipos de polimorfismo: polimorfismo conformacional e “por empacotamento”. No primeiro tipo, as moléculas são mais flexíveis e podem existir em vários estados conformacionais, permitindo o seu empacotamento na estrutura tridimensional. No segundo tipo, as moléculas apresentam uma estrutura mais rígida, e podem ser empacotadas em diferentes pontos da rede cristalina, formando motivos estruturais diferentes. Por vezes, as estruturas cristalinas podem ter origens mistas, pois o estado conformacional da molécula pode ser afetado pelo tipo de empacotamento e também pode alterá-lo, por isso alguns cristais podem apresentar diferenças em ambos os tipos de polimorfismo [23], [5],[26].

1.1.2.2. Aspetos termodinâmicos

A nível estrutural, os diferentes polimorfos de uma substância vão ter um empacotamento molecular diferente e, por conseguinte, níveis de energia potencial diferentes. Termodinamicamente, apenas o polimorfo com a energia potencial mais baixa a uma determinada temperatura e pressão, é estável nessas condições, sendo que os restantes polimorfos, vão tendencialmente transformar-se na forma mais estável e com a solubilidade mais baixa [12],[29],[30].

Através das suas diferentes propriedades termodinâmicas, os polimorfos podem formar sistemas enantiotrópicos ou monotrópicos de acordo com a sua capacidade de se poderem transformar reversivelmente, uns nos outros [31].

Assim, para um sistema enantiotrópico, pode existir uma transformação reversível entre duas formas polimórficas a uma determinada temperatura de transição estabelecida,

abaixo do ponto de fusão da substância. A esta temperatura de transição, os polimorfos têm a mesma solubilidade e valores de energia livre de Gibbs iguais [31],[32] .

No caso dos sistemas monotrópicos, não se observa qualquer transição reversível entre polimorfos abaixo da temperatura de fusão do sólido [31],[32].

A temperatura de transição pode ser determinada a partir de diagramas que mostram a variação da energia livre de Gibbs em função da temperatura. Os valores das variações de energia livre de Gibbs para um dado sistema, também são indicativos da estabilidade termodinâmica do mesmo. Para variações negativas de energia livre de Gibbs, as transições entre polimorfos ocorrem espontaneamente, para variações nulas deste parâmetro, o sistema encontra-se em equilíbrio e para variações positivas da energia livre, a transição de forma polimórfica não se dá espontaneamente. O polimorfo mais estável terá sempre o valor de energia de Gibbs mais baixo [31].

Na figura 2 (a) está representado um sistema enantiotrópico, observando-se a existência de um ponto de transição (T_t) antes dos pontos de fusão dos dois polimorfos, A e B ($T_{m,A}$ e $T_{m,B}$, respetivamente). Abaixo deste ponto de transição, o polimorfo A é o mais estável, visto que tem energia livre de Gibbs mais baixa. A partir da temperatura de transição, o polimorfo A transforma-se reversivelmente no polimorfo B, pois este tem uma energia livre de Gibbs menor e constitui a fase mais estável [27].

Para um sistema monotrópico (Figura 2 (b)), apenas um dos polimorfos é estável abaixo das temperaturas de fusão. Neste caso, o polimorfo A é sempre o mais estável, pois apresenta valores de energia de livre de Gibbs menores. A interseção das duas curvas de energia livre dos dois polimorfos, A e B, com a curva de energia livre do estado líquido, dá-se a temperaturas abaixo do ponto de transição. Logo, para estes sistemas não podem existir transformações reversíveis no estado sólido, a nenhuma temperatura [27].

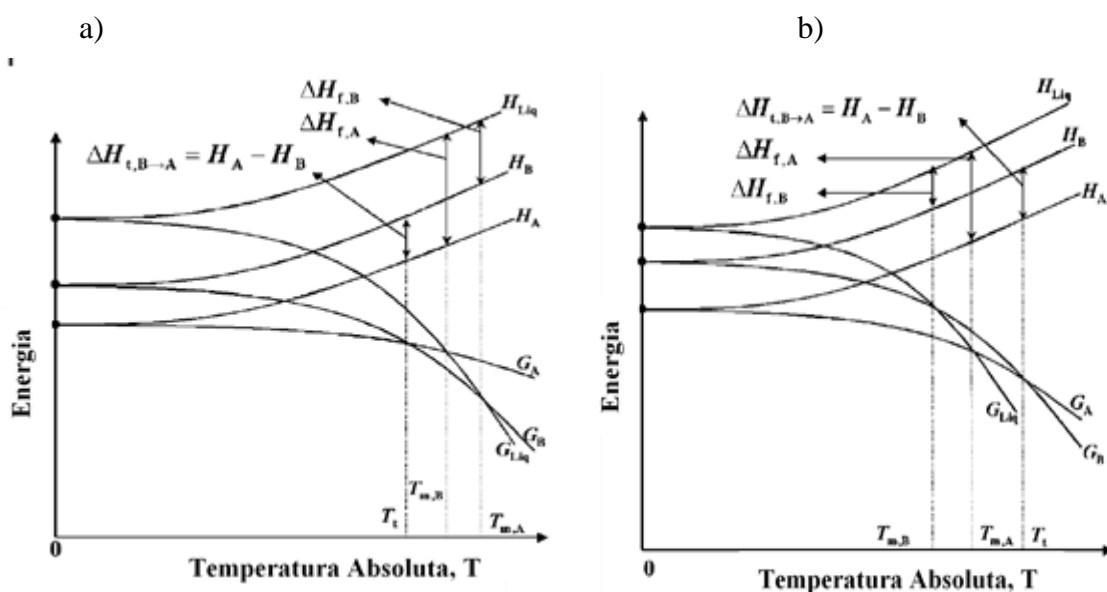


Figura 2 - Diagrama de energia livre de Gibbs vs Temperatura para um sistema enantiotrópico (a) e monotrópico (b). G :Energia Livre; H: Entalpia; T: temperatura; Liq: fase líquida; f: fusão; t: ponto de transição; m: ponto de fusão. (Adaptado de [27]).

A distinção entre enantiotropismo e monotropismo num sistema polimórfico também pode ser feita através de um conjunto de regras termodinâmicas desenvolvidas por Burger e Ramberger, que incluem a regra do calor de transição, regra do calor de fusão e regra da densidade [27],[32].

Os valores de energia livre de Gibbs de um determinado polimorfo influenciam a sua estabilidade e, por conseguinte, a sua solubilidade e biodisponibilidade. O polimorfo mais estável, ou seja, com um valor de energia livre de Gibbs mais baixo, tem uma solubilidade menor, levando a valores de biodisponibilidade também menores. As restantes formas polimórficas denominam-se metastáveis e, por vezes, são preferidas para a produção da forma farmacêutica final. A sua menor estabilidade termodinâmica permite uma maior mobilidade das moléculas na rede cristalina, e por isso, a solubilidade da forma farmacêutica será mais elevada [27],[12],[2],[33],[34],[6]. Consequentemente, a biodisponibilidade do fármaco será mais elevada, assim como, também se verifica uma melhor compressibilidade e uma higroscopicidade menor, no caso da produção da forma farmacêutica final [34].

Estas formas têm tendência a transformarem-se no polimorfo mais estável, no entanto a velocidade de conversão é relativamente baixa, permitindo que os compostos metastáveis ganhem um novo interesse para a indústria farmacêutica. Em alguns casos mais específicos, o uso de formas metastáveis durante, por exemplo ensaios não clínicos, é preferível em relação à forma estável. No caso desta última ter uma solubilidade bastante baixa ou a sua produção a nível industrial ser bastante dificultada, pode ser ponderada a utilização de outra forma polimórfica [30], [34],[35],[34].

1.1.3. Solvatomorfismo

Durante o processo de cristalização da SA, pode ocorrer a incorporação de moléculas de solvente na rede cristalina, de forma estequiométrica ou não estequiométrica. De acordo com o tipo de solvente utilizado, podem-se formar hidratos, quando a água é utilizada no processo, ou solvatos, quando é utilizado outro tipo de solvente. Estes sistemas podem ser designados por pseudopolimórficos, sendo que o termo solvatomorfismo tem sido recentemente mais utilizado [36].

A formação de hidratos é mais usual, visto que a molécula de água forma facilmente ligações de hidrogénio com a maioria das moléculas de SA, que permitem uma estabilização da rede cristalina, levando a que os hidratos sejam formas bastante estáveis em ambientes mais húmidos. Durante o processo de formulação, a forma hidratada da substância é muitas vezes escolhida devido à sua estabilidade, que se mantém também em condições ambiente, e também para se evitar a formação de hidratos durante o processamento. O grau de hidratação da SA tem que ser baixo e estequiométrico, para se formarem ligações de hidrogénio entre as duas moléculas, permitindo assim a manutenção da estabilidade da molécula e da humidade da mesma, durante o processamento do fármaco [35], [37], [38].

1.1.3.1. Análise estrutural das ligações Solvente – Fármaco

A ligação das moléculas de solvente à substância ativa é feita através de interações fracas, que incluem ligações de hidrogénio, ligações van der Waals ou ligações dipolo-

dipolo. A quantidade de solvente que se liga ao fármaco depende da afinidade do mesmo e da morfologia da própria estrutura cristalina. As moléculas de solvente podem ser adsorvidas na superfície do sólido cristalino, ou em regiões desordenadas dentro da própria rede cristalina (Figura 3) [35]. Pode ocorrer também a retenção ou inclusão das moléculas de solvente dentro da estrutura do sólido durante a sua cristalização. No caso específico da formação de solvatos ou hidratos, as moléculas de solvente ligam-se às moléculas de SA durante o processo de cristalização, fazendo parte da estrutura cristalina, formando-se assim um novo estado sólido. A incorporação de solventes pode levar a estados metaestáveis do fármaco, diminuindo a sua estabilidade, no entanto, também pode ter o efeito contrário. Podem formar-se ligações de hidrogénio entre o fármaco e o solvente, que levam ao aparecimento de *clusters*, aumentando a estabilidade do mesmo [35].

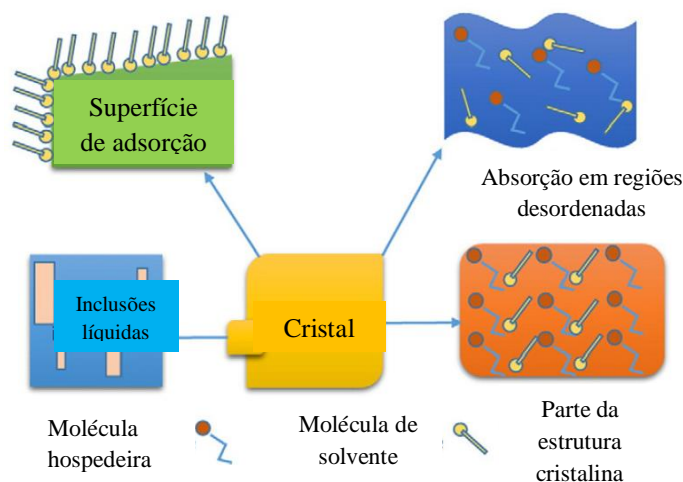


Figura 3 - Representação esquemática das principais associações de moléculas de solvente a sólido farmacêuticos (adaptado de [35])

A molécula de água tem uma estrutura química única constituída por uma região tetraédrica composta por duas regiões de carga positiva e duas regiões de carga negativa. Assim esta molécula pode formar ligações covalentes, ligações de hidrogénio ou ligações van der Waals, com moléculas de SA ou excipientes. Existem várias moléculas com grupos aceitadores de eletrões, do tipo R-OH ou R_1R_2NH , ou dadores de eletrões, como, $R-COO^-$ ou Cl^- , que se ligam facilmente à molécula da água formando ligações de hidrogénio intermoleculares, que permitem um aumento de estabilidade da forma hidratada do fármaco em relação à sua forma anidra [35].

A existência de moléculas de solvente na rede cristalina altera as ligações intermoleculares estabelecidas, afetando as propriedades termodinâmicas do fármaco. Consequentemente a estabilidade, solubilidade e a taxa de dissolução do solvato formado, diferem da forma dessolvatada, alterando também a biodisponibilidade do composto. Algumas propriedades mecânicas do próprio fármaco também são afetadas como a

higroscopicidade ou a processabilidade do mesmo. Assim, o conhecimento dos diferentes solvatos que um fármaco pode ter e das alterações farmacêuticas resultantes da sua formação, é fundamental no processo de desenvolvimento do medicamento [39], [17].

1.1.3.2. Solubilidade

A solubilidade é dependente de vários fatores como, a temperatura, a pressão e o tipo de estado sólido em que se encontra o fármaco. Geralmente, um solvato vai ter uma solubilidade menor no seu próprio solvente, visto tratar-se da fase mais estável. No caso de diferentes tipos de polimorfos, hidratos ou amorfos, a solubilidade num solvente orgânico será maior. Para compostos anidros, a solubilidade em água é normalmente maior que o hidrato correspondente. A energia livre libertada na dissolução da forma cristalina e a interação da mesma com as moléculas de água é menor para o hidrato do que para a forma anidra, visto que o primeiro já tinha estado em contacto com água anteriormente. A inclusão da molécula de água também permite a formação de mais ligações de hidrogénio, estabilizando a própria na estrutura cristalina do fármaco, diminuindo assim, a taxa de dissolução do mesmo. Por vezes a molécula de água pode ter um efeito oposto, afastando as moléculas na rede cristalina, levando a uma maior instabilidade da mesma, resultando numa dissolução mais rápida para alguns hidratos, quando comparado com a forma anidra [39], [36], [37].

1.1.3.3. Estabilidade

Durante a fase de processamento e armazenamento da forma farmacêutica é importante ter conhecimento dos fatores que afetam a sua estabilidade. No caso dos solvatos, é necessário ter em conta o seu potencial para dessolvatar, sendo que este varia muito com o fármaco escolhido. A estabilidade deste tipo de formas sólidas é dependente da temperatura e da pressão parcial próxima do sólido. No caso do solvato estar em solução no próprio solvente, apenas o efeito da temperatura deve ser considerado. O grau de solvatação das moléculas aumenta à medida que a temperatura desce, e estas vão se tornando mais estáveis, por isso os processos de cristalização ocorrem a temperaturas mais baixas [39].

A estabilidade de um hidrato é usualmente representada através de diagramas de fase pressão parcial/ composição. Estes gráficos são construídos a uma temperatura constante e permitem determinar a humidade relativa a partir da qual um hidrato se torna instável e começa a dessolvatar [3], [27].

1.1.4. Cristalização

A compreensão do processo de cristalização é importante durante a fase de pré-formulação e para o desenvolvimento do processo de fabrico [40].

A formação de cristais pode acontecer através de diferentes métodos, tais como: o arrefecimento de uma amostra fundida abaixo do seu ponto de fusão, a suspensão de substâncias menos solúveis numa mistura de solventes, a exposição dos sólidos a diferentes humidades relativas ou a utilização de fluídos supercríticos [26]. O método mais comum e é a utilização de uma solução da substância que se pretende cristalizar, à

qual de aplica uma mudança de fase que permite a formação do sólido. Para a formação dos cristais a partir da solução é necessário que a quantidade de soluto dissolvido seja maior que a quantidade máxima que se consegue dissolver a uma determinada temperatura [2], [40].

Durante o processo de dissolução, existe um ponto em que ocorre um equilíbrio termodinâmico entre a solução e o soluto dissolvido, a condições de temperatura, pH e concentração definidas. A esta condição designa-se solução saturada. Para o processo de cristalização ocorrer, o equilíbrio tem de ser ultrapassado, formando-se uma solução supersaturada. Estas soluções são formadas a partir de mudanças de fase da solução inicial, que permitem aumentar a concentração de soluto ou diminuir a solubilidade da solução. Os vários métodos para a formação de soluções supersaturadas incluem: a evaporação por solvente, a dissolução de uma fase metastável, mudança de temperatura e a adição de solventes, iões ou aditivos com menor solubilidade para precipitar a forma pretendida [40], [41].

A força motriz que permite atingir a cristalização é dada pela diferença entre o potencial químico das moléculas de soluto quando estão em solução supersaturada, em relação às moléculas que se encontram no estado de equilíbrio, ou seja, numa solução saturada. Esta diferença corresponde na prática, ao grau de supersaturação do sistema. Este parâmetro vai determinar as propriedades físicas do fármaco final, visto que tem influência no processo de nucleação e crescimento dos cristais. Também a solubilidade, a temperatura e a velocidade a que se forma a solução supersaturada, influenciam a estrutura cristalina final [42], [43].

O processo de cristalização é representado num gráfico que relaciona a concentração do soluto com a temperatura (Figura 4)[44]. É possível observar a existência de uma zona metastável entre a curva de solubilidade e a curva de super-solubilidade do fármaco. Esta zona corresponde à zona de operacionalidade do processo, na qual se conseguem obter cristais com uma distribuição de tamanho mais uniforme, sem existir um processo de nucleação excessivo. Como o processo de nucleação consome mais energia que o processo de crescimento dos cristais, este último ocorre de forma espontânea na zona metastável, ao contrário do processo de nucleação. A extensão da zona metastável é afetada por fatores como a taxa de arrefecimento, a temperatura, a concentração inicial e a presença de impurezas[42], [44].

A cristalização ocorre assim em duas fases: a nucleação e o crescimento cristalino.

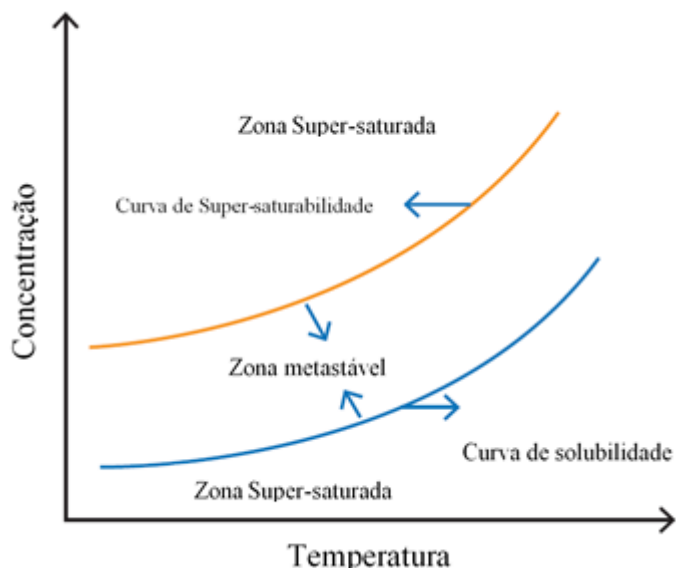


Figura 4 – Esquema ilustrativo de uma zona metástavel de um processo de cristalização (Adaptado de [44])

1.1.4.1. Nucleação

A nucleação corresponde à agregação das moléculas em pequenos núcleos ordenados. Os primeiros núcleos formados designam-se por núcleos críticos que são capazes de existir de forma independente e num estado reversível, ou seja, com igual probabilidade de crescer ou se dissolverem no solvente. A nucleação pode ser dividida em dois tipos: nucleação primária, caracterizada pelo crescimento dos cristais sem existir uma estrutura cristalina já formada, e a secundária na qual, já existem cristais formados. O primeiro tipo é o mais comum e divide-se em dois: a nucleação homogénea e heterogénea. No primeiro caso, a formação dos núcleos iniciais faz-se espontaneamente a partir de uma solução supersaturada enquanto que no segundo caso, o crescimento dos cristais é induzido a partir de partículas que se encontram em solução, como por exemplo, contaminantes e ocorre a níveis de supersaturação mais baixos. Na nucleação heterogénea, a obtenção da forma cristalina pretendida é mais difícil, visto que a presença de um substrato inicial baixa a energia necessária para a formação dos núcleos críticos, tornando a superfície cristalina mais reativa [26], [2],[45].

1.1.4.2. Crescimento dos cristais

Após o processo de nucleação, os núcleos críticos formados evoluem para uma forma cristalina definida. Através de um processo de difusão as moléculas de soluto integram-se na rede cristalina formando várias camadas, sendo este processo condicionado pelo tipo de empacotamento molecular da célula unitária. O crescimento dos cristais pode-se dividir em duas fases principais: o transporte de massa das moléculas de soluto para a superfície do cristal através de difusão ou convecção e a incorporação das mesmas na estrutura cristalina. Estes dois processos só ocorrem se a solução estiver supersaturada. As diferentes faces da estrutura cristalina têm velocidades de crescimento diferentes, afetando a forma final do cristal. De acordo com a intensidade das ligações

intermoleculares estabelecidas na rede cristalina, é definida a face que predomina em relação às outras. A ligação de um solvente na estrutura cristalina pode interferir com as ligações intermoleculares já estabelecidas, levando a uma alteração nas interações entre as várias camadas do cristal. Deste modo, a face com maior crescimento pode ser alterada e a morfologia final do cristal é distinta da que existia inicialmente [2], [41], [45], [46].

1.1.5. Fatores que afetam a formação de cristais

O processo de cristalização é afetado por diversos fatores, que podem ser agrupados em dois grupos distintos: os fatores primários, que afetam diretamente o processo de cristalização, e fatores secundários, que incluem substâncias externas que afetam a formação dos cristais.

A supersaturação e a temperatura são dois dos fatores primários mais importantes para o estado cristalino final. O grau de supersaturação da solução influencia a cinética de nucleação e de crescimento dos cristais. De acordo com a regra de Ostwald, a níveis de supersaturação baixos a forma polimórfica mais estável tem tendência a precipitar, ao contrário do que acontece a níveis mais altos de supersaturação em que se observa a precipitação da forma metaestável. A temperatura tem uma grande influência na forma polimórfica produzida. Por exemplo, no caso de solvatos, a sua estequiometria pode ser alterada com uma mudança na temperatura do sistema. A velocidade de agitação da solução e a velocidade de mistura de soluções de reagentes também são outros fatores primários que afetam o processo.

A influência de substâncias externas na cristalização está relacionada com fatores secundários, como por exemplo, a mudança de solvente ou adição de outras substâncias à solução. Estes fatores podem provocar uma alteração no polimorfo formado, induzindo modificações a nível molecular, através de interações existentes entre o soluto e o solvente. Existem outros fatores secundários que intervêm diretamente no grau de supersaturação do sistema, como é o pH. A solubilidade é também uma propriedade física que tem muita influência no processo de cristalização, visto que o nível de supersaturação depende da solubilidade do polimorfo. Para além disso, a estabilidade termodinâmica e a cinética de transformação das várias formas polimórficas, pode ser determinada a partir dos seus valores de solubilidade [47],[46],[48].

1.1.6. Transformações de fase no estado sólido

O estado sólido em que se encontra a substância ativa influencia a estabilidade e a eficácia do medicamento, sendo que uma alteração pode modificar significativamente os padrões de qualidade do produto final [49]. No caso de fármacos insolúveis, a influência das transições de fase na biodisponibilidade da SA, adquire especial importância, pois essas transformações afetam a sua solubilidade.

A estabilidade do estado sólido é condicionada pelas condições ambientais, durante o processamento e armazenamento, como a temperatura, pressão ou alterações na humidade, que levam a alterações na SA [49].

Assim, a identificação e caracterização da forma cristalina da SA deve ser feita ao longo do seu processamento e é importante garantir que a mesma se mantenha inalterada

[29], [50] . Ao longo do processo de fabrico, existem algumas operações unitárias que potenciam possíveis transformações no estado sólido. O fabrico da forma farmacêutica final pode incluir processos de moagem, granulação, compressão que induzem um stress mecânico e térmico na SA ou uma exposição a solventes pode levar a alterações. Assim, é importante determinar os efeitos causados por esses processos e também, numa fase posterior, durante o armazenamento. A monitorização e deteção de possíveis transformações no estado sólido, deve ser feita a partir de uma fase inicial do processo. A utilização de ferramentas PAT contribui para a eficácia dessa monitorização e torna-se crítica para assegurar a qualidade do produto final [29].

1.1.7. Tipos de transformações que ocorrem durante o processamento do fármaco

As conversões no estado sólido estão representadas na tabela 1 podem ser divididas em quatro mecanismos principais: sólido – sólido, mediado em solução, transformação por fusão e transformação a partir da solução da SA [29].

No caso do mecanismo sólido – sólido, a transição ocorre apenas no estado sólido sem passagem por fases intermediárias líquidas ou gasosas. A cinética destas transições é influenciada por vários fatores ambientais como: a temperatura, pressão, humidade relativa, tamanho e distribuição de partícula ou impurezas [50], [49].

Quando um composto é aquecido acima do seu ponto de fusão e logo de seguida arrefecido para a temperatura ambiente, pode ocorrer uma transição de fase correspondente a uma transição por fusão. A forma polimórfica final vai depender das velocidades de nucleação e crescimento dos cristais, de arrefecimento e da existência de impurezas [49].

Por vezes a SA também pode estar dissolvida ou parcialmente dissolvida num solvente, e o mesmo ser retirado induzindo uma transição que é considerada outro tipo de mecanismo em solução. Este processo pode ocorrer, por exemplo, num processo de granulação por via húmida ou durante uma secagem por aspersão em que a SA é regenerada após a remoção do solvente, no entanto pode não estar na mesma forma cristalina [49].

Este processo é distinto de uma transformação mediada em solução, visto que nesta última, só acontecem transições de uma fase metastável para uma fase estável. Este tipo de transformação ocorre devido à diferença de solubilidade entre as duas fases, formando-se uma solução super-saturada, ocorrendo depois a nucleação e o crescimento de cristais da nova fase sólida [49].

Na tabela 1 [29] estão também referidas as transições de fase que estão associadas a cada mecanismo. Podem ocorrer transformações físicas da SA em que se observa um arranjo molecular distinto da rede cristalina e que estão associadas a processos de amorfização, cristalização ou transições polimórficas. Também existem transformações de fase correspondentes a transformações químicas, tais como, formação de complexos ou incorporação de moléculas de solvente na rede cristalina [49],[17].

O processamento da forma cristalina e a sua transformação através de várias operações unitárias induz stress no sistema. Este stress pode ser de natureza térmica ou mecânica, ou resultante da interação com outros componentes, e resulta numa alteração

do equilíbrio do sistema [17], [18]. A nova fase formada após a transição pode ser estável, apenas durante as condições de stress, tornando-se metastável quando estas condições são removidas. Este processo acontece, por exemplo, durante a compressão, ou seja, quando já não é exercida nenhuma força de compressão, forma-se um composto metastável. As condições de stress também podem induzir a formação de uma fase metastável estabilizada cineticamente, por exemplo, durante a formação de hidratos durante um processo de granulação por via húmida. Por vezes, durante uma operação unitária podem acontecer vários ciclos de stress-relaxamento, sendo que o estado sólido final do fármaco depende do tipo, intensidade e duração de cada stress [17], [18].

1.1.7.1. Stress mecânico

A energia mecânica é utilizada durante muitas operações unitárias e pode levar a transições de fase. Os processos mais comuns incluem a moagem, granulação e a compressão. No caso da **moagem**, a energia é utilizada para uma quebra das partículas e uma diminuição do seu tamanho. É comum, a ocorrência de transições polimórficas ou amorfização associadas a este processo. Os amorfos formados são termodinamicamente metastáveis, pelo que têm tendência a transformarem-se em formas cristalinas hidratadas ou anidras. Durante o processo de **compressão** também se observam transições polimórficas ou uma amorfização do fármaco, que têm como consequência, alterações na sua biodisponibilidade. A força mecânica exercida, provoca deslocamentos na estrutura cristalina, facilitando o processo de nucleação e posterior crescimento dos cristais [49], [51]–[53].

1.1.7.2. Stress térmico

O aumento da temperatura leva a uma maior mobilidade dos átomos e moléculas na estrutura cristalina. A energia térmica do sistema aumenta e leva a uma alteração do estado de energia potencial das moléculas, tendo como consequência a formação de uma rede cristalina com maior simetria. As transformações de fase são comuns em operações unitárias onde existe uma variação da temperatura, como é o caso de um processo de secagem ou de uma fusão no início de um processo de extrusão, e levam a uma transição de uma forma estável para uma forma metastável, ou de uma amorfa para uma forma cristalina. Neste tipo de operações existe um *input* de energia térmica no sistema, no entanto o estado de stress térmico pode também ser criado por uma remoção de energia térmica do sistema. Um exemplo deste caso, é o ciclo de liofilização onde as soluções são congeladas rapidamente antes da secagem [18].

1.1.7.3. Interação com outros componentes

A interação com outros componentes da formulação ou com alguns solventes pode induzir algumas transformações da forma sólida e também algumas mudanças na sua composição química. No caso da exposição a um determinado solvente, a forma metastável do composto é convertida facilmente na sua forma mais estável. Esta rápida conversão está relacionada com o facto do fármaco estar em solução possuindo uma mobilidade maior que facilita as transformações no estado sólido. A este processo dá-se

o nome de transformação de fase mediada em solução, e consiste em três passos: a forma metastável é inicialmente dissolvida em solução até exceder a solubilidade da forma estável e depois ocorre o processo de nucleação e crescimento dos cristais de uma fase mais estável, em simultâneo com a dissolução da fase metastável. Existem várias transformações de fase que ocorrem através deste mecanismo, como por exemplo, amorfização ou transições polimórficas [3], [18].

1.1.8. Tipos de transformações que ocorrem durante o armazenamento do produto semi-acabado

Durante o armazenamento do produto após o seu fabrico, a maioria das potenciais transformações no estado sólido estão relacionadas com a interação com um ambiente mais húmido, assim como, a diferenças de luminosidade e temperatura. De acordo com as propriedades físicas da SA e dos excipientes, a capacidade de absorção do produto e ligação às moléculas de água é variável, tendo como consequência uma variedade maior de potenciais transições de fase [17], [18].

O estado amorfo ou cristalino em que se apresenta a substância ativa influencia a probabilidade de ocorrência de transformações polimórficas. No caso de substâncias amorfas, existe uma maior mobilidade das moléculas na estrutura cristalina, levando a que as interações com as moléculas de água sejam mais frequentes, ou seja, em comparação com substâncias no estado cristalino, as formas amorfas são mais higroscópicas [17], [18],[54].

Durante o processo de armazenamento, uma forma sólida estável pode rapidamente transitar para uma forma metastável ou hidratada, ou vice-versa, devido à exposição a um ambiente mais húmido ou com temperaturas mais elevadas. A cinética destas transformações é muito dependente do tempo de exposição a esse tipo de ambiente e das suas características. As propriedades físicas e mecânicas do produto final são afetadas por estas transformações polimórficas e a função dos restantes componentes da formulação pode também ser comprometida. O tipo de transição mais comum durante o armazenamento são os ciclos de hidratação / desidratação. Por vezes existem determinadas estruturas cristalinas que apresentam uma flexibilidade reticular que permite, por exemplo, que ocorra a desidratação da estrutura durante um processo de secagem e consecutiva rehidratação da mesma durante o armazenamento a HR (Humidades relativas) habituais (60% a 70%). A expansão da rede cristalina durante este processo tem consequências na estabilidade física dos comprimidos, para além de afetar a solubilidade e biodisponibilidade final da substância ativa. Para além das alterações físicas da rede cristalina, a desidratação de um hidrato durante o armazenamento, pode causar alterações nos restantes componentes da formulação, devido às interações das moléculas de água libertadas, com esses compostos [54]–[56].

As características dos excipientes também influenciam a formação de hidratos durante o armazenamento do produto. As características higroscópicas de alguns destes compostos podem alterar o estado sólido da SA e a sua estabilidade física e química. Certos excipientes têm a capacidade de inibir a formação de hidratos, por exemplo devido à formação de ligações de hidrogénio entre o fármaco e o(s) excipiente(s). É o caso de

alguns excipientes amorfos para os quais a absorção de água e a sua inclusão na estrutura cristalina é muito superior, em contraste com um excipiente no seu estado cristalino, para o qual, a existência de uma estrutura com um grau elevado de ordem não permite a inclusão de moléculas no seu interior, ocorrendo apenas a adsorção das moléculas à superfície. Esta ligação ocorre através de interações fracas e depende do tamanho de partícula, da polaridade da superfície e da sua porosidade. Quanto este último fator é mais elevado, as propriedades físicas do sólido são mais afetadas. Assim o conhecimento das propriedades de absorção de água dos excipientes é importante no desenvolvimento da formulação final e durante o processo de fabrico do produto [57], [58].

Tabela 1 -Tipos de transformações na fase sólida (adaptado de [29])

Transformação de fase	Forma sólida produzida	Mecanismo	Operação Unitária
Transformação polimórfica	Forma cristalina A ↔ Forma cristalina B	Sólido – Sólido Mediado em solução Transformação por fusão	Compressão, moagem, Aquecimento, Cristalização Aquecimento acima do ponto de fusão e subsequente arrefecimento
Solvatação	Forma cristalina ↔ Solvato	Sólido – Sólido Mediado em solução	Cristalização, granulação por via húmida, peletização armazenamento em condições húmidas
Dessolvatação	Solvato ↔ Forma amorfa (condições severas de desidratação) Solvato ↔ Forma cristalina (condições suaves de cristalização)	Sólido - Sólido	Secagem em leito fluidizado, secagem por aspersão, liofilização
Amorfização	Forma cristalina ↔ Forma amorfa Solvato ↔ Forma amorfa	Sólido – Sólido Mediado em solução Transformação por fusão	Compressão, moagem, desidratação de hidratos, secagem por aspersão, liofilização
Recristalização	Forma amorfa ↔ Forma cristalina	Sólido - Sólido	Calor, humidade ou cristalização induzida por um plastificante, recristalização após armazenamento

1.2. Olanzapina

A Olanzapina (2-methyl-4-(4-metilpiperazinil)-5H-tieno[3,2-c][1,5]benzodiazepina) é uma molécula derivada da tienobenzodiazepina e pertence ao grupo dos antipsicóticos de segunda geração que é usada no tratamento de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia, transtorno bipolar e outro tipo psicoses [59],[60]. A FDA aprovou o seu uso em 1996 com o nome comercial de Zyprexa®. Pode ser classificada como um antagonista dos recetores de serotonina – dopamina e tem afinidade para os recetores 5-HT_{2a} e D₂ [59],[61],[60]. A OLZ é o primeiro antipsicótico a ser indicado para o tratamento de episódios maníacos agudos e atualmente, é aprovado não só para o tratamento da esquizofrenia, para a qual foi demonstrada a sua elevada eficácia clínica, como também para o tratamento e prevenção de recaídas de fases maníacas de alguns transtornos psicológicos. Para além disso, é o composto mais estudado de todos os antipsicóticos de segunda geração, para o tratamento de transtorno bipolar, tendo diminuído o uso do lítio para esse efeito [60],[62]. Está disponível em forma de comprimidos revestidos, comprimidos orodispersíveis e em pó para suspensão injetável de libertação prolongada. A dose diária recomendada para administração oral varia entre 5 e 20 mg, e por isso qualquer alteração da forma do fármaco ou inclusão de impureza, é crítico para o seu efeito terapêutico, pois a dose administrada tem um valor muito baixo [63].

A OLZ existe em pelo menos vinte e cinco formas sólidas diferentes, nas quais se incluem, polimorfos anidros, hidratados e solvatados e por isso, o processo de produção da forma sólida da SA torna-se complexo devido à existência de um número elevado de formas polimórficas. Todas as formas são constituídas por uma estrutura cristalina com um padrão comum: um bloco estrutural composto por várias unidades diméricas, formadas cada uma, por duas moléculas racémicas simétricas. Os vários pares racémicos são empilhados formando colunas paralelas e estão ligados entre si através de ligações de hidrogénio N10-H...N5 no caso de formas anidras, ou de interações mediadas por solventes no caso de formas hidratadas ou solvatadas. Este tipo de ligações permite a formação de uma estrutural estável. Nos canais formados a partir das colunas paralelas, pode existir a incorporação de moléculas de solvente. A presença de um segundo tipo de molécula contribui para a maior estabilização da estrutura, no entanto pode alterar as propriedades físico-químicas do fármaco e o seu efeito terapêutico final [11],[64]. Na figura 5 ([11]) encontra-se a molécula de OLZ numerada de acordo com o descrito por SM Reutzel-Edens et al.(2003)([11]), juntamente com um exemplo de um par racémico que faz parte da estrutura cristalina.

proporção entre grupos aceitadores de hidrogénio (grupo imina N5 e grupo piperidina N4') que passam a ser dadores e grupo dador (N10-H). Em todos os hidratos as moléculas de água ligam-se através de duas ou três ligações de hidrogénio[11].

1.2.3. Solubilidade da OLZ

Todos os compostos farmacêuticos podem ser agrupados de acordo com uma classificação atualmente usada por várias organizações de saúde e agências regulatórias, que divide os fármacos de acordo com a sua solubilidade e permeabilidade (Figura 6)[69].

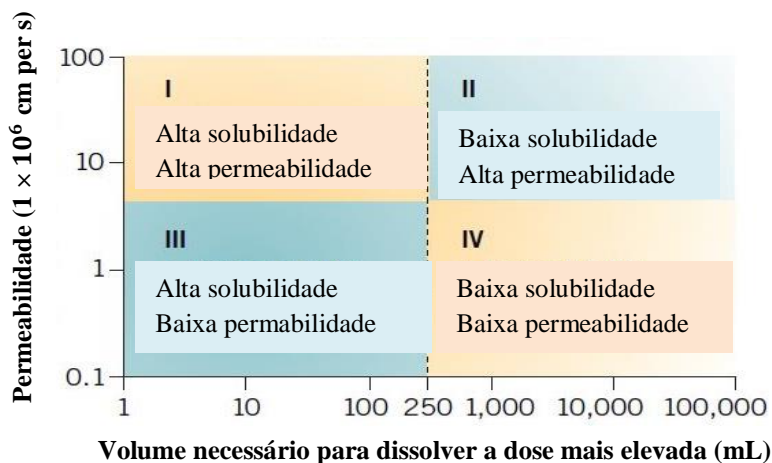


Figura 6 – Sistema de Classificação biofarmacêutico (adaptado de [69])

A OLZ pertence à classe II, ou seja, tem uma elevada permeabilidade através de membranas biológicas devido à sua estrutura hidrofóbica, no entanto apresenta uma baixa solubilidade em água. A velocidade de absorção deste tipo de fármacos é controlada pela velocidade de dissolução nos fluídos gastrointestinais [70]. A administração oral da OLZ permite o início de absorção do fármaco no organismo e são atingidas concentrações máximas após seis horas da dose. O metabolismo de primeira passagem, elimina cerca de 40% da dose administrada antes de atingir a circulação sistémica[71]. Devido aos baixos valores de solubilidade apresentados pelo fármaco (solubilidade em água da forma anidra I tem o valor de 39,88 mg/L a 25°C), qualquer pequena variação na sua solubilidade devido a transições polimórficas, pode atrasar a fração de OLZ presente no comprimido dissolvido no trato gastrointestinal, tendo como consequência um atraso na absorção do próprio fármaco no organismo. Estas alterações têm um impacto negativo no comportamento do doente e na sua resposta ao tratamento.

1.2.4. Transformações polimórficas da OLZ

A existência de um número elevado de formas polimórficas e pseudopolimórficas tem como consequência uma probabilidade maior de alteração do estado sólido em que se encontra o fármaco, durante o seu fabrico. Por isso, quando é feito o delineamento experimental para a obtenção de formulações que contêm OLZ, as suas características físico-químicas têm que ser previamente estudadas e documentadas, existindo também a

determinação prévia das condições ótimas que serão usadas para se obter um sólido com as propriedades desejadas [72]–[74].

No caso da OLZ, a existência de transições no estado sólido já causou efeitos secundários não desejáveis ou alterações na eficácia terapêutica. O armazenamento da forma anidra I da OLZ durante 180 dias, a 93% de humidade relativa provocou um aumento significativo na sua massa, resultando numa transformação polimórfica para a forma dihidratada D. Esta transição teve impacto na curva de dissolução do fármaco, provocando uma redução significativa na velocidade de dissolução da OLZ. Este tipo de transição tem consequências na biodisponibilidade do fármaco, pois devido à sua baixa solubilidade, a sua absorção no organismo é unicamente controlada pela velocidade de dissolução [75].

Assim, uma monitorização eficaz do estado sólido da OLZ durante o seu processo de produção e armazenamento, é fundamental para garantir o efeito terapêutico desejado [75].

1.3. Técnicas utilizadas para caracterização dos materiais

A existência de várias formas sólidas para um composto, leva a que exista um aperfeiçoamento do conhecimento existente sobre o estado sólido e as transformações que podem ocorrer. Ao longo das últimas décadas, as técnicas analíticas existentes têm sido melhoradas de forma a que se obtenha uma caracterização completa dos fármacos e do seu estado sólido [76].

1.3.1. Espectroscopia vibracional

A espectroscopia vibracional é uma das técnicas espectroscópicas mais usadas e é fundamental na investigação e desenvolvimento de qualquer fármaco. Ao longo da última década, o número de artigos onde é referenciado o uso destas técnicas para o estudo e caracterização de polimorfos, tem vindo a aumentar. Os espectros obtidos para cada forma sólida são reprodutíveis e característicos da forma cristalina[76].

Uma das vantagens da espectroscopia vibracional é o facto de poder ser usada para amostras em qualquer estado físico, desde líquidos, sólidos ou gases. A única restrição existente é o método de amostragem utilizado. Por isso, têm sido desenvolvidas várias técnicas mais sensíveis que permitem melhorar o processo de amostragem e analisar amostras com um limite de deteção mais baixo[76],[77].

Este tipo de técnica espectroscópica funciona com base nas vibrações dos átomos na estrutura molecular. Os diferentes padrões de ligações de hidrogénio ou outro tipo de ligações existente na rede cristalina do composto é variável entre as suas várias formas sólidas, resultando em frequências de vibração diferentes. Quando existe uma conversão no estado sólido, as bandas de absorção observadas no espectro sofrem um desvio. Por norma, a distinção entre os vários polimorfos faz-se em zonas de vibração molecular de baixa energia, que refletem alterações do empacotamento molecular do fármaco. Através das variações observadas no espectro, é possível uma caracterização química e molecular do sistema. A identificação inicial da SA nas matérias-primas e no produto final é

necessária para o mesmo ser aprovado pelas entidades reguladoras, e é feita muito vezes através deste tipo de técnicas. A existência de uma impressão digital única de frequências vibracionais, faz com que estas técnicas sejam implementadas nessas fases do controlo de qualidade. Também é possível detetar substâncias que estão em menor concentração através de modelos construídos a partir de várias amostras bem caracterizadas [78], [77].

A espectroscopia vibracional inclui várias técnicas, mas as mais relevantes são as espectroscopias MIR, NIR e Raman. Para as técnicas MIR e Raman, as vibrações moleculares detetadas permitem uma caracterização estrutural do composto, ao contrário da espectroscopia NIR, que através das bandas de combinação e sobreposição obtidas, é uma excelente técnica para uma avaliação quantitativa. Técnicas como NIR, Raman e ATR-MIR são usadas muitas vezes na indústria farmacêutica para monitorização em linha do processo de fabrico e são consideradas ferramentas PAT, pois permitem medições em tempo real do processo e produto, ao longo do fabrico do medicamento, permitindo um melhor controlo do mesmo, assegurando-se assim, o objetivo final de manter a qualidade do produto dentro das especificações. As medições efetuadas são rápidas e não destrutivas e não requerem a preparação da amostra. Ocorrem através de sondas acopladas ao espectrómetro através de cabos de fibra ótica, podendo ser aplicadas diretamente no processo de fabrico para medições contínuas e em tempo real. A monitorização dos parâmetros críticos do processo aumenta a eficácia do mesmo e as alterações a serem efetuadas, podem ser feitas em tempo real [79].

As tecnologias PAT foram introduzidas com o objetivo de obter mais informações sobre o processo de fabrico e de forma a que a qualidade do produto seja assegurada de uma forma mais eficaz. O objetivo da iniciativa PAT lançada pela FDA em 2004 é a implementação destas técnicas *in/at* ou *on-line* para a monitorização de processos de fabrico. A análise de dados resultantes destas técnicas pode ser mais complexa, tendo que se recorrer a métodos de análise multivariada. Nos processos de fabrico convencionais aplicados na indústria, o controlo do processo e da qualidade do produto é feito off-line e através de amostras recolhidas aleatoriamente, obtendo-se informação limitada sobre o mesmo. O objetivo principal das ferramentas PAT é melhorar esse controlo e obter um conhecimento mais alargado do processo. A EMA também incentivou a utilização destas ferramentas e construiu a sua primeira equipa, responsável pela escrita de várias *guidelines* sobre PAT, e também sobre *quality by design* e libertação em tempo real. A utilização destas técnicas na indústria foi referenciada pouco mais tarde, através da publicação das *guidelines* ICH Q8, Q9, Q10 e Q11, que visam encorajar a sua utilização, contribuição para a inovação de processos que prevalece, durante os últimos anos, na indústria farmacêutica [79], [80].

A utilização de técnicas de espectroscopia vibracional tem inúmeras vantagens, como por exemplo, o facto de não serem destrutivas, não existir preparação prévia da amostra, serem rápidas e terem um custo de medição mais baixo [77], [79], [80].

1.3.1.1. Espectroscopia de Infravermelho Médio (MIR)

A espectroscopia de infravermelho é muito usada na indústria, nomeadamente, durante o controlo de qualidade, quando é necessário fazer a identificação ou caracterização da SA, produtos intermediários ou excipientes. Este método também é usado de forma

quantitativa, com a determinação das concentrações de cada espécie nas misturas. Este tipo de técnica envolve a absorção de energia através da incidência de radiação por parte das moléculas, resultando em vibrações moleculares que se observam através de um espectro.

As vibrações moleculares podem ser estimuladas utilizando-se dois mecanismos: a absorção de um feixe de luz e o desvio de fótons [81].

No caso da espectroscopia MIR ocorre a absorção seletiva de radiação eletromagnética por parte de vibrações moleculares com a mesma frequência, provocando uma mudança no dipolo molecular. Parte da radiação é absorvida ou transmitida, resultando num espectro final, que caracteriza o fármaco. A absorção da luz incidente dá-se entre $4000-400\text{ cm}^{-1}$ e de forma a que determinada ligação molecular desta experiência seja detetada, o dipolo molecular deve mudar durante a vibração. As vibrações moleculares ativas em IR, têm que ter um dipolo com distribuição de carga (assimétrico), para existir interação com o campo eletromagnético. Se isso não existir, as moléculas não absorvem a luz infravermelha. Por exemplo, moléculas com dois átomos diferentes, como um grupo carbonilo, são mais ativas em IR, sendo que quase todos os compostos têm espectro IR exceto moléculas diatómicas como os gases N_2 , H_2 ou O_2 [76].

Existem dois métodos principais na espectroscopia por infravermelho: método de transmissão e de refletância [77].

No caso da transmitância, ocorre a absorção do feixe de luz a um número de onda específico e este passa pela amostra até ao detetor. Este método pode ser usada para as amostras em qualquer estado físico, e por isso, tem como principal vantagem, a sua universalidade[77].

No caso de ser mais difícil a utilização de um método de transmitância, a medição faz-se através de refletância, ou seja, o feixe de luz é refletido na superfície da amostra até ao detetor. A refletância pode ser dividida em dois tipos: interna ou externa. O método de refletância total atenuada (ATR) é considerado um método de refletância interna e consiste na utilização de um feixe de luz que penetra uma fração de comprimento de onda para lá da superfície de reflexão, e quando o material que absorve de forma seletiva uma radiação, está em contacto com a superfície de reflexão, o feixe perde energia ao comprimento de onda que o material absorve. A radiação resultante é atenuada durante este processo e é medida no espectrómetro. Esta técnica é muito usada, porque é rápida de utilizar e é não destrutiva e não requiere preparação prévia da amostra[77].

Os espectrómetros de IR podem ser de dois tipos: dispersivos ou de transformada de Fourier. Este último é o mais usado e o que gera melhores resultados.

Em equipamentos deste tipo (Figura 7, [76]) existe um sistema denominado interferómetro, que pode ser do tipo Michelson em que existe um feixe de radiação monocromático que é dividido em dois feixes, através de um divisor de feixe, cada um correspondente a 50% do feixe de radiação original. Um dos feixes será refletido num espelho fixo e outro feixe é refletido num espelho móvel. De seguida, existe a recombinação dos dois feixes no divisor de feixe, e ocorre a interferência entre os dois.

A diferença entre os dois feixes é introduzida antes da recombinação e a intensidade do feixe final formado no interferómetro, pode ser monitorizada e é função da diferença entre os dois feixes. À medida que o espelho móvel se move, é formado um

interferograma, a partir da interferência constitutiva e destrutiva de todas as amplitudes e frequências que chegam ao interferómetro. O interferograma é convertido depois, por um algoritmo de Fourier[76],[82].

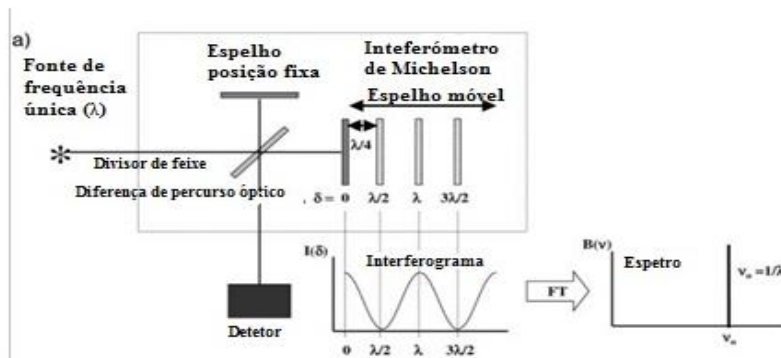


Figura 7 – Representação esquemática do interferómetro de Michelson e produção do interferograma a partir da fonte de radiação monocromática (adaptado de [76])

1.3.1.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é um método de análise não destrutivo, que permite uma caracterização química e estrutural completa das moléculas. É usada para análise de fármacos, de polimorfos, análise quantitativa e monitorização de processos[83].

Os espectros Raman são produzidos devido à dispersão inelástica da radiação monocromática (Figura 8 [84]). Quando esta radiação incide na amostra, parte é absorvida, transmitida ou desviada. A luz pode ser desviada de forma elástica, ou seja, com a mesma frequência da luz incidente (dispersão *Rayleigh*) ou ser desviada com uma frequência diferente (efeito Raman), que ocorre numa percentagem muito pequena e corresponde à energia inelástica. Se a frequência da luz desviada é menor que a incidente denomina-se radiação Stokes. No caso de ser mais elevada denomina-se radiação anti-Stokes. À temperatura ambiente, a radiação Stokes é a mais usual [84].

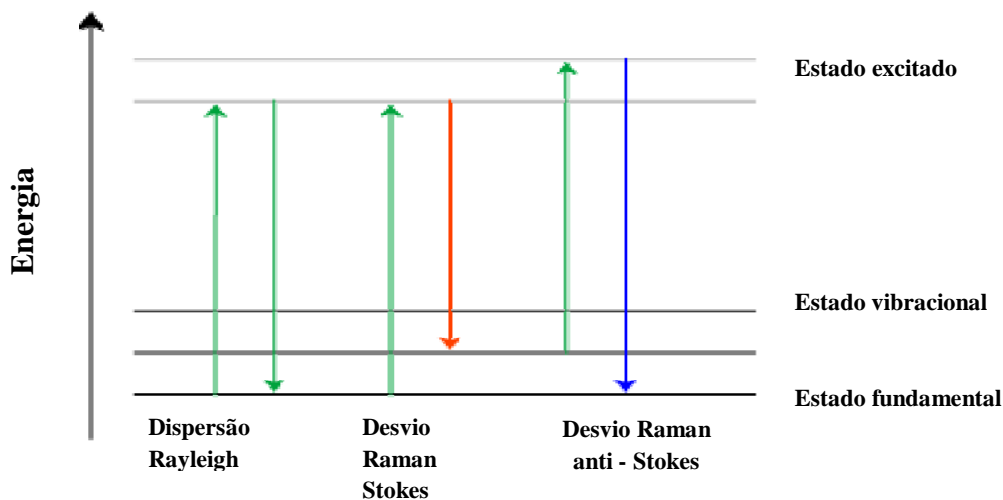


Figura 8 - Diferentes tipos de dispersão da radiação (adaptado de [84])

Normalmente são usados lasers que produzem luz na zona do visível ou do infravermelho, e a energia da luz usada é mais elevada que a energia necessária para atingir um estado vibracional elevado [83].

Quando a radiação atinge a amostra e interage com as moléculas, interage com a nuvem eletrónica. O fóton incidente provoca uma transição da molécula para outro estado de energia. A diferença de energia entre o estado original e este, leva a uma diferença na frequência do fóton emitido em relação à frequência do fóton de excitação. Para a molécula exibir efeito Raman é necessário que exista uma mudança no potencial de polarização da molécula, ou seja, no grau de deformação da nuvem eletrónica. A intensidade do efeito Raman é dependente do grau de polarização da amostra. Por norma, vibrações simétricas, ou seja, correspondentes a ligações entre o mesmo átomo, são mais intensas em Raman, ao contrário do IR em que os grupos polares e assimétricos têm bandas de absorção mais intensas. Esta diferença nas regras de seleção entre a origem das bandas em IR (relacionada com a mudança no momento dipolar) e a origem das bandas em Raman (relacionada com a mudança no polarizabilidade) faz com que as duas técnicas sejam complementares. No caso da espectroscopia MIR, a sua sensibilidade maior para grupos como OH, CH ou NH faz com que o espectro obtido seja dominado por sinais de grupos funcionais e as bandas obtidas são mais largas, devido a alterações nas ligações de hidrogénio. A sensibilidade da espectroscopia Raman para vibrações polarizáveis como C=C, C=N ou grupos aromáticos faz com que no espectro apareçam bandas mais estreitas associadas a diferenças na estrutura cristalina [84],[77],[85],[78], [86].

Para além das diferenças relacionadas com a origem das bandas, a espectroscopia Raman também se distingue da espectroscopia em IR, relativamente à interação da radiação com a amostra, pois no caso da espectroscopia Raman, trata-se de uma técnica de dispersão da radiação e no caso da espectroscopia em IR, são métodos de absorção da radiação em que existe uma comparação com uma referência e o espectro final corresponde à diferença entre o original e a referência. No caso de métodos de dispersão, o espectro resulta apenas da interação da luz monocromática com a amostra e por isso, o processo de amostragem e instrumentação são simplificados [78], [86],[77].

Na espectroscopia Raman, o intervalo utilizado está entre 4000-50 cm^{-1} e não é necessária uma preparação prévia da amostra, o que constitui uma vantagem em relação à espectroscopia MIR, e como não é utilizada uma radiação referência, é possível utilizar uma fibra ótica e a medição pode ser feita de forma remota. Adicionalmente, a interferência dos excipientes no espectro final não é tão notória como na espectroscopia MIR, pois no caso da espectroscopia Raman são utilizados filtros que permitem diminuir o seu sinal e obter um espectro correspondente apenas a forma cristalina do composto, permitindo que a espectroscopia Raman seja uma das técnicas mais úteis na distinção de polimorfos [78], [86].

Para a análise de um composto é necessária uma quantidade de amostra muito pequena, no entanto devido ao possível efeito de fluorescência que pode ocorrer e para aumentar o sinal Raman, utiliza-se massas acima do necessário. O efeito de fluorescência constitui uma desvantagem, assim como, o possível aquecimento da amostra durante a obtenção do espectro, podem afetar os resultados obtidos[83], [87].

Atualmente a instrumentação utilizada na espectroscopia Raman tem evoluído de espectrómetros tradicionais para a utilização de sondas, interferómetros, filtros óticos, entre outros, que permitem uma análise remota das amostras em recipientes de vidro ou caixas de Petri, aumentando a facilidade e velocidade das medições e da amostragem. A evolução tecnológica sentida permite uma análise em tempo real das amostras, seja durante a produção ou quando ainda estão armazenadas, levando a que esta técnica seja reconhecida pelas autoridades reguladoras como um método inovador de análise [84], [87].

Os espectrómetros Raman são constituídos por uma fonte de luz laser, normalmente na região do infravermelho próximo (entre 785 e 1050 nm) de forma a minimizar o efeito de fluorescência, um sistema ótico de focagem, que pode ser constituído por um conjunto de espelhos e lentes ou por um cabo de fibra ótica para utilização remota e um espectrógrafo constituído por um elemento dispersante e um detetor. Tal como na espectroscopia MIR, os espectrómetros podem ser dispersivos, em que o espectrógrafo utilizado é monocromático, ou podem ter transformada de Fourier em que é utilizado um interferómetro de Michelson como espectrógrafo [84], [87].

1.3.1.3. Espectroscopia de infravermelho próximo (NIR)

A espectroscopia NIR permite o estudo e caracterização de compostos com base na absorção de energia na zona de infravermelho próximo do espectro eletromagnético, que se situa entre os 12500 – 4000 cm^{-1} . Este intervalo de números de onda situa-se entre o visível e o infravermelho médio e corresponde à zona dos modos de combinação e sobretons das vibrações fundamentais observadas em MIR. A energia utilizada é mais elevada do que a necessária para promover apenas uma transição vibracional fundamental, e mais baixa do que os valores utilizados para promover a transição eletrónica [88],[89].

O espectro obtido é composto essencialmente, por bandas de combinação e sobretons correspondentes ao estiramento das ligações O-H, C-H e N-H que estão presentes em quase todas as substâncias que contêm ligações de hidrogénio. Em comparação com a espectroscopia MIR, as bandas obtidas na espectroscopia NIR são mais largas e por isso, a caracterização estrutural a partir do espectro torna-se mais difícil, sendo esta técnica menos seletiva em comparação com a espectroscopia MIR. Por isso, a interpretação do espectro tem que ser feita com recurso a métodos quimiométricos de forma a extrair a informação relevante do espectro [89].

A espectroscopia NIR permite uma análise quantitativa a partir do espectro, sendo o seu objetivo principal, obter a partir da interação das radiações eletromagnéticas de infravermelho próximo com os constituintes da amostra, proporções ou o teor de cada um deles. Esta técnica é muito sensível às ligações O-H, tornando difícil a sua utilização em amostras aquosas, no entanto, é muito utilizada na deteção de humidade. Tal como na espectroscopia MIR, apenas as ligações que provocam uma mudança no momento dipolar, como o grupo O-H, absorvem a radiação NIR. Após a absorção da radiação, a vibração pode ocorrer em dois modos: estiramento, que é definido como uma mudança contínua na distância interatómica ao longo do eixo de ligação dos dois átomos, ou deformação, que é definido como uma mudança no ângulo de ligação [86].

Tal como na espectroscopia Raman, as características da espectroscopia NIR permitem a sua utilização como técnica PAT. Este tipo de tecnologias tem ganho relevância nas últimas décadas, existindo cada vez mais processos de produção, onde existe a sua integração na monitorização *in* e *on-line*, facilitada também pelo avanço tecnológico nos detetores e tipo de fibra ótica utilizados. Entre as características referidas destacam-se a rapidez na análise das amostras, o seu caráter não destrutivo e não invasivo, a sua utilização quase universal (qualquer molécula que contenha grupos C-H, N-H, S-H ou O-H) e a não existência de preparação das amostras antes da análise. Assim, o uso de técnicas NIR permite uma análise expedita, reproduzível e não invasiva das amostras sólidas com a capacidade de serem avaliadas as propriedades físicas e químicas das moléculas [88].

1.3.2. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

Os métodos de análise térmica, e em particular a técnica DSC, têm sido dos mais utilizados para o estudo dos polimorfos, permitindo fazer a sua identificação e caracterização. Usualmente, esta técnica é a escolhida para os distinguir, numa fase inicial, seguindo-se a utilização de técnicas de análise estrutural, mais complexas.

A análise térmica implica qualquer procedimento experimental em que existe a variação de um parâmetro físico do sistema que é quantificada em função da temperatura.

O tipo de parâmetro físico considerado é variável de acordo com a técnica utilizada. No caso da calorimetria são medidas as variações no calor que entra e sai do sistema, em função da temperatura [90].

O DSC está incluído nas técnicas calorimétricas e consiste no registo da diferença da quantidade de calor necessário para aumentar a temperatura da amostra e da referência, em função da temperatura. Ambas são mantidas à mesma temperatura, e por isso o calor fornecido ao sistema serve para manter o equilíbrio térmico entre as duas. Este método designa-se por *Heat flux DSC* [90].

Geralmente, são utilizados programas de temperatura no calorímetro, que permitem um aumento linear da mesma ao longo do tempo. Isto permite aumentar a temperatura do recipiente que contém a amostra, ao longo do tempo [91].

Os polimorfos são usualmente distinguidos pelo seu ponto de fusão, que é detetado através de DSC. Quando existe uma transformação de fase, a quantidade de calor a que fica sujeita a amostra pode ser maior ou menor em relação à referência, ou seja, a energia necessária manter as duas, à mesma temperatura, é variável se existe uma mudança de fase. O processo pode ser endotérmico ou exotérmico consoante a quantidade de calor que é necessário para aumentar a temperatura. Através da diferença no fluxo de calor que atinge a amostra em relação à referência, esta técnica é capaz de medir a quantidade de calor absorvido ou libertado durante a transição de fase [91].

Existem dois tipos mais comuns de DSC: o *Heat flux DSC* que já foi referenciado e pode ser representado através da equação: $dQ/dt = \Delta T / R$, em que dQ/dt é o fluxo de calor, ΔT é a diferença de temperatura entre o interior e exterior do cadinho e R é a resistência térmica a que fica sujeito o fluxo de calor. Neste tipo de DSC, tanto a amostra como a referência são mantidas dentro de um forno e partilham a mesma fonte de calor. Através de dois termopares, a diferença de temperatura entre a amostra e a referência é

registada e convertida em diferença de fluxo de calor. O segundo tipo de DSC denomina-se *Power compensation DSC* que se distingue do anterior na existência de dois fornos separados, um para a amostra e outro para a referência. As duas são mantidas à mesma temperatura, e o fluxo de calor necessário para medir esse equilíbrio térmico é medido, permitindo que a temperatura e a energia necessárias para um evento térmico como a fusão da substância, sejam facilmente determinadas [91], [92].

Em ambas as técnicas de DSC é essencial manter uma atmosfera inerte através da utilização de um gás inerte, como o azoto, que permite uma transferência de calor mais eficaz entre a célula e o cadinho. Além disso, permite um arrefecimento mais rápido da célula e facilita a remoção de humidade existente que pode danificar o próprio equipamento e prejudicar a leitura [91].

A análise de compostos através de DSC é usualmente utilizada para identificação de polimorfos, pois são distinguíveis através de diferentes pontos de fusão. A sua utilização pode ser feita para vários tipos de material e em várias formas físicas, sendo necessário uma quantidade pequena do mesmo (3 a 5 mg). A análise pode ser feita numa gama alargada de temperaturas e é uma técnica bastante sensível. Esta última característica referida também constitui uma desvantagem pois, qualquer alteração na experiência ou mudança de operador pode desencadear resultados diferentes [92].

1.3.3. Ensaios de dissolução

Os ensaios de dissolução tornaram-se uma das ferramentas mais importantes para a indústria farmacêutica, para avaliação e comparação do desempenho de formas farmacêuticas variadas. A sua utilização abrange todas as fases do ciclo de vida do produto, desde o seu desenvolvimento até à sua comercialização [93].

Este tipo de ensaios permite medir a velocidade e extensão da libertação de um fármaco em condições específicas, e por isso é possível antecipar o desempenho que o mesmo terá *in vivo*. No caso do desenvolvimento de genéricos, os ensaios de dissolução são utilizados como requisito para a comercialização do novo medicamento. Demonstrada a capacidade preditiva do ensaio no que diz respeito ao desempenho do produto, os testes de bioequivalência requeridos pelas entidades reguladoras podem ser minimizados, reduzindo-se substancialmente os custos de desenvolvimento do medicamento [93], [94].

A dissolução de um fármaco faz-se em duas fases: em primeiro lugar ocorre a libertação do fármaco da matriz (desagregação) e de seguida ocorre a dissolução do mesmo em meio líquido. O passo mais lento do processo condicionará a velocidade final da dissolução.

O perfil de dissolução obtido depende das propriedades da SA (propriedades físico-químicas como a sua forma química ou o seu estado sólido (amorfo ou polimorfo)), do delineamento da formulação, do processo de fabrico e do método selecionado para monitorizar a libertação do fármaco. Todos estes fatores devem ser avaliados de modo a se desenvolver um ensaio de dissolução apropriado. O método escolhido deve ser discriminatório e sensível a esses fatores que afetam a velocidade de dissolução [93], [94].

No desenvolvimento do ensaio de dissolução, as principais características que devem ser consideradas são a composição do meio, inclusive o seu pH e o equipamento utilizado,

juntamente com os seus parâmetros operacionais. O conhecimento da correlação existente entre o perfil de libertação do fármaco e a sua absorção oral e o conhecimento da influência destas características no processo de dissolução levou a uma padronização do método segundo as farmacopeias, neste caso, a farmacopeia europeia.

Na escolha do meio de dissolução existem vários fatores a ter em conta que dependem do objetivo final do ensaio [93], [94].

O valor de pH utilizado assume especial importância devido à variabilidade do mesmo no trato gastrointestinal, que influencia a absorção do fármaco. No caso do estômago o pH varia entre 1 e 4 atingindo um valor aproximado de 7,4 no cólon. Esta informação tem que ser tida em conta para determinadas formas farmacêuticas.

Além disso, a manutenção das condições *sink*, permite assegurar que o ensaio de dissolução está a medir as propriedades da libertação do fármaco sem limitações relacionadas com as condições experimentais. Este tipo de condições atinge-se quando o volume escolhido de meio para solubilizar o fármaco é pelo menos três vezes o necessário (que tem em conta a solubilidade da SA no meio à temperatura escolhida).

As características físico-químicas da SA, como a estabilidade ou a solubilidade, assim como, a formulação escolhida, têm um papel importante na seleção do equipamento de dissolução. Existem vários tipos de equipamentos que se distinguem pelo método utilizado. Os dois métodos mais comuns são o método de cestos e o método da pá agitadora. Em ambos existe um vaso cilíndrico que contém o meio de dissolução, cuja temperatura é mantida constante, através da imersão num banho térmico. No caso do método dos cestos, a forma farmacêutica é colocada no interior de um cesto que fica fixo na extremidade de um eixo. A agitação é conseguida através da rotação do cesto, normalmente a uma velocidade de 100 rpm. No método da pá agitadora, as velocidades são tipicamente menores (entre 50 – 75 rpm) e a agitação é conseguida com a rotação da pá. A amostra é colocada diretamente no interior do vaso.

Os vasos utilizados têm um volume variável entre o 500 e 1000 mL. Para fármacos com doses menores, o uso de volumes entre os 100 e os 250 mL é mais recomendado [93], [94],[95].

A amostragem, nos dois métodos, pode ser feita manualmente ou de forma automática, com filtração para eliminar partículas não dissolvidas.

Independentemente do método utilizado, a quantidade de fármaco libertado deve ser monitorizado através de um método analítico. Os métodos mais comuns são espectrofotometria UV/Visível ou HPLC com deteção através de UV. Através destas técnicas obtém-se a concentração do fármaco em solução que é depois convertido na quantidade de fármaco libertado utilizando-se um algoritmo que tem em conta o método de amostragem e se existiu reposição de meio, durante o mesmo [93], [94],[95].

Os resultados do ensaio de dissolução são uma medida do desempenho do produto, e por isso são utilizados para garantir a consistência na sua produção. Ou seja, é possível demonstrar que após alterações no processo de fabrico, no equipamento ou nos excipientes, existe equivalência no perfil de dissolução. A comparação quantitativa dos perfis de dissolução pode ser feita através de modelos independentes ou modelos dependentes. No caso dos modelos dependentes são utilizados modelos matemáticos que representam um caso ideal de dissolução das partículas, e é comparada a qualidade de

ajustamento aos dados e na mudança dos parâmetros obtidos. Geralmente, não se consegue capturar um perfil de dissolução adequado ao que foi obtido experimentalmente. Os modelos independentes implicam a comparação direta entre um perfil de dissolução teste e uma referência, sem qualquer transformação matemática. Os fatores estatísticos f1 e f2 são os mais utilizados. No caso do f1 trata-se de um fator de diferença e calcula a percentagem média de diferença entre os dois perfis. O seu cálculo faz-se através da equação [95]:

Equação 1- Fator estatístico de diferença para comparação de perfis de dissolução

$$f1 = \left\{ \left[\sum_{t=1}^n (R_t - T_t) \right] / \sum_{t=1}^n R_t \right\} \cdot 100\%$$

Em que:

n é o número de pontos no perfil

R_t é a média de libertação da referência no tempo t

T_t é a média de libertação do teste no tempo t

No caso de perfis idênticos obtém-se um valor f1 de zero e no caso de um valor menor que 15%, considera-se que os perfis são semelhantes.

O fator f2 trata-se de um fator de similaridade e é o método mais utilizado e recomendado por entidades reguladoras para demonstrar semelhança nos perfis de dissolução. O seu cálculo faz-se através da equação[95]:

Equação 2 – Fator estatístico de similaridade para comparação de perfis de dissolução

$$f2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

No caso de perfis idênticos obtém-se um valor de f2 de 100, sendo que a similaridade entre perfis é garantida com valores de f2 superiores a 50. Um valor de f2 de 50 corresponde a uma diferença média de 10% entre os perfis [95].

Este tipo de modelos independentes é mais apropriado para comparação de perfis de dissolução que têm mais que quatro pontos e apenas um ou dois no patamar [95].

1.4. Análise Multivariada

Durante as últimas décadas os analistas perceberam que a compreensão do estado sólido apenas com recurso a metodologias univariadas era redutor para detetar determinadas variações em dados espetais. Por isso, a análise multivariada surgiu de forma a se conseguir analisar conjuntos de dados maiores e mais complexos, permitindo um melhor controlo do processo e dos seus produtos [96] .

Durante uma operação unitária ou numa mistura dinâmica em que ocorrem transformações no estado sólido, a identificação ou quantificação de picos caraterísticos de determinadas polimorfos é dificultada devido à sobreposição dos mesmos.

Assim, a quimiometria tem sido atualmente reconhecida como uma ferramenta útil e eficaz para detetar e quantificar transições polimórficas no estado sólido.

A análise multivariada é utilizada para estudar a relação existente entre as várias variáveis e pode ser usada com objetivos distintos que incluem: a análise exploratória dos dados, o agrupamento dos dados em várias classes (discriminação e classificação), criação de modelos de regressão e previsão. De acordo com o objetivo pretendido existem vários tipos de metodologia de análise multivariada que podem ser adotados. Entre as quais destacam-se a análise por componentes principais (PCA), o método hierárquico de análise de *cluster* e outros métodos de classificação, como por exemplo a análise discriminante linear. Também se destacam os métodos que permitem criar modelos de previsão, como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), a regressão linear múltipla (MLR) ou a regressão por componentes principais (PCR). Todas as técnicas mencionadas permitem extrair apenas a informação relevante do conjunto de dados analisado [96].

1.4.1. Análise de componentes principais (PCA)

O PCA é um método estatístico de análise que permite transformar um conjunto de dados de grandes dimensões num subconjunto de dimensões menores, mantendo os padrões e o máximo de informação dos dados originais. É uma ferramenta de minimização dimensional e é considerada uma abordagem não supervisionada visto que é usada como análise exploratória dos dados, não existindo um objetivo inicial na análise, como a construção de modelos de regressão ou a classificação dos dados. O PCA é semelhante aos métodos de *clustering*, pois permite agrupar os dados de forma a se identificarem padrões ou tendências nos mesmos que permitem um conhecimento mais alargado dos componentes do processo e das relações estabelecidas entre si[97].

Em termos matemáticos este método consiste na transformação de uma matriz X que contém M variáveis (comprimentos de onda) representadas nas colunas e N amostras representadas nas linhas, numa matriz mais pequena onde existe uma minimização do número de variáveis ($A \ll M$) que passam a denominar-se componentes principais (PC). O modelo matemático da transformação é dado pela expressão [96]:

$$X = TP^t + E$$

em que T é uma matriz N vs A que contém os *scores*, P é uma matriz M vs A que contém os *loadings* e E é uma matriz N vs M que contém os resíduos do modelo.

Após a aplicação do modelo matemático aos dados, ocorre a transformação de variáveis correlacionáveis entre si em variáveis independentes (componentes principais) que são combinações lineares das variáveis originais. Geometricamente, os componentes principais são representados por vetores ortogonais entre si e resultam de uma projeção geométrica das variáveis originais, numa outra dimensão com o objetivo de captar o máximo de informação possível dos dados com o mínimo de PC's. O primeiro PC contém o máximo de variabilidade espectral possível e à medida que o número de PC's aumenta, a informação captada a partir dos espectros vai sendo menor. A relação ortogonal entre os novos componentes obtidos mantém-se tanto para os *loadings* que são normalizados e ortogonais entre si, como para os *scores* [96].

A determinação do número de PC's é uma das fases mais importantes na construção de um modelo PCA, visto que se o número selecionado é inferior ao necessário o modelo obtido vai ter pouca informação sobre os dados e se ocorrer o contrário, pode existir *overfitting* e inclusão de ruído. Existem várias abordagens que foram sendo adotadas para a determinação do número ideal de PC's entre elas: o critério do valor próprio, a percentagem de variância acumulada, o erro referente ao método de validação cruzada.

Cada PC determinado sequencialmente é obtido de forma a captar a variação remanescente nos dados, que ainda não foi explicada. O processo continua até o número de PC's igualar o número de variáveis originais. Geralmente o número de PC's é muito inferior ao número de variáveis originais e parte da informação presente nos dados originais é explicada na matriz dos resíduos [98].

1.5. Normalização e pré-processamento espectral

A construção de modelos quimiométricos a partir de espectros implica um passo inicial de normalização dos espectros.

De forma a reduzir o ruído e possíveis perturbações no sinal que podem afetar os espectros, são aplicados vários métodos de pré-processamento com o objetivo de melhorar a qualidade do modelo [96].

As derivadas são usadas normalmente para remover variações relacionadas com a linha de base do espectro. É utilizada uma função matemática que permite a derivação dos dados. No caso de dados espectrais, é utilizada uma forma discreta das funções derivada, denominada filtro de Savitsky-Golay. As derivadas mais comuns são a primeira derivada que permite remover o efeito aditivo relacionado com a linha de base e a segunda derivada que para além da remoção já referida, permite remover as diferenças na inclinação da linha de base. Ambas permitem um aumento da resolução espectral, sendo que no caso da aplicação da segunda derivada, esta é utilizada em regiões mais estreitas do espectro, devido a influência do ruído que aumenta com a aplicação da função matemática [96].

A utilização de variação de padrão normal (SNV) também é comumente utilizada com espectros. Para cada espectro é subtraída a média da intensidade desse espectro e esse valor é dividido pelo desvio-padrão. É uma operação semelhante ao *autoscaling*, no entanto aplicada às linhas da matriz. É utilizada para eliminar efeitos de amplitude, nomeadamente causados pelo desvio da radiação na superfície das partículas ou pela diferente composição química das amostras que podem provocar desvios na linha de base do espectro [96].

Os métodos de escalonamento são usados para normalizar variáveis (neste contexto, colunas das matrizes espectrais). São métodos requeridos para análise PCA ou PLS, por exemplo. O centro na média consiste na subtração da média de cada variável permitindo avaliar apenas a sua variabilidade. O *autoscaling* adicionalmente ao centro na média, opera uma divisão pelo desvio-padrão. Assim, para além de existir uma remoção da informação relativa à intensidade absoluta, a variabilidade em cada variável é removida, e todas as variáveis têm a mesma importância antes da construção do modelo. Geralmente, na análise espectral o método mais utilizado é o centro na média.

1.5.1. Delineamento experimental (DoE)

O delineamento experimental é um método estatístico usado para planejar e conduzir experiências assim como analisar e interpretar os resultados obtidos nas mesmas. Através de vários tipos de estatísticas, são conduzidos diversos estudos referentes a um sistema, processo ou produto no qual as variáveis são manipuladas de forma a perceber-se o seu efeito. Este procedimento tem sido muito usado para melhorar a qualidade do produto final e tem múltiplas aplicações. No caso do desenvolvimento de um método quimiométrico como o PCA, o DoE é utilizado para gerar amostras de calibração suficientes de forma a evitar custos elevados associados à sua preparação. Existem vários tipos de delineamento experimental. No caso desta Tese foi utilizado o delineamento fatorial simples em que todos os níveis (X) são combinados com todos os fatores (k) dando origem a um número total de experiências de X^k [96].

2. Revisão bibliográfica

A caracterização de formas polimórficas de OLZ através de técnicas de espectroscopia vibracional foi inicialmente descrita por Ayala et al. (2006). Neste estudo é demonstrada a eficácia destes métodos na caracterização estrutural das duas formas anidras do fármaco [68].

Em estudos recentes (2016) foi demonstrado a eficácia destas técnicas na avaliação da estabilidade da OLZ quando sujeita a diferentes condições de HR. Através de métodos analíticos distintos como TGA, DSC, avaliação do tamanho de partícula, difração raios-X e microscopia, e com a inclusão de espectroscopia vibracional através do DRIFT, foi possível fazer uma caracterização completa do mecanismo de hidratação de duas formas anidras da OLZ (Forma I e II) nos seus respetivos hidratos, quando expostas a determinadas humidades relativas durante um período de tempo. Os resultados obtidos através de difração de raios X ou DRIFT permitiram perceber as alterações que ocorrem a nível estrutural após a hidratação do fármaco e foi possível, através da construção de modelos PLS, determinar a percentagem de forma hidratada existente ao longo do tempo. Através de técnicas termogravimétricas e calorimétricas, determinou-se em que condições de armazenamento é que se dá a hidratação da OLZ, e conseqüentemente, o fármaco deixa de ser estável. Conclui-se que apenas a 93% HR, durante 180 dias, ocorre a hidratação da forma anidra, sendo que no caso, da forma I, dar-se-á a sua conversão em forma dihidratada D. Esta transformação tem um efeito significativo na velocidade de dissolução e conseqüentemente, na biodisponibilidade final da OLZ [75].

A utilização de técnicas de espectroscopia vibracional, como NIR ou Raman, para o estudo do polimorfismo nos produtos farmacêuticos, tem sido frequente ao longo dos últimos anos, pois permitem obter informações sobre a estrutura e conformação molecular dos fármacos.

Em alguns estudos recentes, estas técnicas são usadas para caracterizar e monitorizar diferenças espectrais entre vários polimorfos ao longo de operações unitárias, que envolvem a variação de certas condições ambientais como a temperatura, pressão ou a HR. Hu et al. (2013) caracterizaram as transformações no estado sólido de compostos como o sulfatiazol. Conclui-se que através da espectroscopia NIR e de modelos PCA desenvolvidos a partir dos espectros, que se pode detetar e monitorizar as transições de fase entre os vários polimorfos do composto, durante a moagem da substância ativa ou após a sua exposição a condições de HR distintas das iniciais [89]. A espectroscopia Raman também é utilizada para caracterização estrutural de polimorfos. Pisegna et al. (2014) demonstraram a utilidade deste método para detetar transformações polimórficas em compostos de Spironolactona quando sujeita a pressões elevadas, mimetizando o que acontece num processo de compressão [99].

A utilização de modelos PCA para monitorizar o processo de hidratação de formas polimórficas foi demonstrado por Tia et al. (2008) para a Carbamazepina. Este tipo de análise permite visualizar o processo de transformação dos compostos após a sua dispersão em solvente aquoso. Os resultados deste estudo permitiram confirmar que o uso de modelos PCA permite uma identificação eficaz de padrões a partir de um conjunto de dados espectrais de dimensões elevadas, contribuindo para um conhecimento mais

elaborado de sistemas farmacêuticos, neste caso, aplicado a transformações polimórficas [100].

3. Objetivos

Apesar da recente utilização de técnicas de espectroscopia vibracional, nomeadamente, DRIFT, para caracterização estrutural de conversões polimórficas na OLZ e avaliação da sua estabilidade, em ambientes de armazenamento com HR distintas, existe pouca informação sobre a utilização destas técnicas para monitorização da estabilidade da OLZ em tempo real e possível substituição de métodos de controlo de qualidade *offline*, como a titulação Karl Fischer, habitualmente utilizada para determinação da humidade das amostras. Assim, o objetivo principal desta tese de mestrado é averiguar a eficácia das várias técnicas de espectroscopia vibracional para monitorizar as modificações no estado sólido da OLZ durante o seu processamento no fabrico de comprimidos e para isso, serão cumpridos vários passos:

- Preparação e caracterização das formas anidra I e dihidratada D da OLZ
- Produção de formulações (formas sólidas orais) que englobam as formas polimórficas sintetizadas
- Caracterização das formulações produzidas e avaliação da sua estabilidade recorrendo-se a várias técnicas como NIR, MIR, Raman, ou DSC.
- Avaliação do efeito de exposição a diferentes humidades relativas, na estabilidade do fármaco.
- Comparação das várias técnicas utilizadas e avaliação da sua utilidade para monitorização em tempo real da estabilidade da OLZ, ao longo do seu processo de fabrico e durante o armazenamento das formas farmacêuticas que contêm esta SA.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Olanzapina

A OLZ (massa molecular = 312,435 g/mol, densidade = 1,30 g/cm³; Pharmorgana (China)) é um pó cristalino de cor amarela, que é praticamente insolúvel em água, muito solúvel em diclorometano e solúvel em acetona e n-propanol. A forma anidra I é a mais comum e a mais estável quimicamente. As suas características físico-químicas encontram-se na tabela 2[101]–[104],[105].

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas de forma anidra I da OLZ ([101]–[105])

Propriedades	OLZ anidra I
Nome IUPAC	2-metil-4-(4-metilpiperazina-1-il)-5H-tieno[3,2-c][1,5]benzodiazepina
Fórmula molecular	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S
Massa molecular	312,435 g/mol
Aspeto	Sólido cristalino amarelo
Ponto de fusão	195°C
Solubilidade	39,88 mg/L a 25°C (em H ₂ O)

4.1.2. Fosfato de cálcio tribásico

O fosfato de cálcio tribásico (massa molecular=310,20 g/mol, densidade = 1,51-1,67 g/cm³; Sigma-Aldrich (Alemanha)) é um pó cristalino de cor branca, inodoro, praticamente insolúvel em água e em etanol e solúvel em ácido clorídrico e ácido nítrico diluídos. É um composto resultante de uma mistura de vários fosfatos de cálcio contendo entre 35% e 40% de cálcio. É ligeiramente higroscópico, absorvendo baixas quantidades de água (cerca de 2%), que pode ser superficial ou estar contida nos pequenos poros da estrutura cristalina. Este composto é utilizado frequentemente na indústria farmacêutica, pois tem boas características de escoamento e compressibilidade. Como excipiente vai ser utilizado como aglutinante no processo de compressão direta para formação dos comprimidos de OLZ, sendo também usado como diluente no enchimento de cápsulas. O mecanismo de ligação no caso da compressão é a sua deformação plástica. É compatível com a OLZ e por isso foi integrado na formulação[106].

4.1.3. Celulose microcristalina

A celulose microcristalina (Avicel® PH-101, massa molecular=370,35 g/mol, densidade = 3,14 g/cm³; FMC Corp. (EUA)) é um pó cristalino composto por partículas porosas, inodoro de cor branca, que é parcialmente obtido a partir de um processo de despolimerização da celulose natural. É insolúvel em água, ácidos diluídos e a maioria dos solventes orgânicos e apenas ligeiramente solúvel numa solução de hidróxido de sódio a 5%(m/m). Está disponível em diferentes tamanhos de partícula e diferentes graus de humidade que têm aplicações diferentes. Devido ao seu grau elevado de porosidade, em que cerca de 90-95% da área superficial é interna, trata-se de um composto muito higroscópico, em consequência da penetração da água na sua estrutura e da ligação ao

número elevado de grupos hidroxilo ligados às cadeias de celulose, que também garantem a estabilidade da molécula. Geralmente, o conteúdo em água é menor que 5%(m/m), no entanto este valor varia de acordo com o tipo de classe da MCC. As regiões mais hidrofílicas são as porções amorfas da molécula e por isso, o total de água absorvida é proporcional à porção amorfa da molécula [106].

A MCC é utilizada como aglutinante para compressão direta, devido à sua capacidade plastificante e em granulações por via húmida e como diluente no enchimento de cápsulas. Para além disso, também tem características de desintegrante e lubrificante. A inclusão de moléculas de água nos poros reduz a força de fricção e facilita o deslizamento, diminuindo a adesão do comprimido ao punção. Assim, apesar das características higroscópicas afetarem o processo de compressão em alguns aspetos nomeadamente, na força de compressão aplicada, melhora algumas características da própria molécula. A MCC apresenta uma larga distribuição de tamanho de partícula e uma densidade aparente baixa e por isso, quantidades pequenas do composto podem-se ligar a outras moléculas como a OLZ, que são pouco compressíveis de forma a melhorar o próprio processo. Além disso, é compatível com a substância ativa, sendo selecionada também para a formulação[106], [107].

4.1.4. Ácido clorídrico

Uma solução de ácido clorídrico a pH=1 foi escolhida para meio de dissolução. Esta foi preparada a partir de uma solução de ácido clorídrico concentrado (Fumegante, $\geq 37\%$, Puriss p.a.) da qual se retirou o volume necessário para um balão de 200 mL para formar uma solução de 1M considerando a concentração inicial do ácido clorídrico de 37% (m/m). O volume de 200 mL foi completado com água desmineralizada Millipore. O conteúdo deste balão foi transferido para um balão de 2000 mL perfazendo-se o volume com água desmineralizada Millipore.

4.1.5. Água desmineralizada

A água desmineralizada foi produzida num sistema Mili-Q, Merck, Millipore (EUA).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação da forma dihidratada D da OLZ

OLZ forma anidra I (1g) foi suspensa em água (10 mL) à temperatura ambiente durante sete dias sob agitação antes de uma filtração a vácuo para produzir a forma dihidratada D [11] .

4.2.2. Preparação dos exsicadores com HR controlada

Para se atingir as diferentes condições de HR, foram preparados os exsicadores que contêm soluções salinas saturadas. Foram preparados três exsicadores diferentes utilizando-se os seguintes sais: cloreto de lítio ($11.30 \pm 0.27 \%$, referido no texto como 11 % HR), cloreto de sódio ($75.29 \pm 0.12 \%$, i.e., 75 % HR) e nitrato de potássio ($93.48 \pm 0.55 \%$, i.e., 93 % HR) [100].

4.2.3. Preparação das formulações de OLZ

4.2.3.1. Delineamento experimental

As formulações selecionadas têm uma percentagem fixa de MCC (20%) e de PC (60%) e proporções variáveis das duas formas da OLZ, anidra I e dihidratada D, de forma a totalizar uma percentagem fixa de 20% de fármaco. Através de um desenho fatorial simples foram obtidas todas as experiências, recorrendo-se ao *software* MODDE (versão 10.1, Umetris, Suécia). Os fatores usados (Tabela 3) foram a proporção de forma anidra I/ forma dihidratada D da OLZ (cinco níveis), a humidade relativa (três níveis), o tempo de armazenamento (dois níveis) e a força de compressão (dois níveis) totalizando um total de sessenta experiências. A influência de cada um destes fatores na estabilidade da OLZ vai ser avaliada através das várias técnicas referidas, de modo a se perceber a eficácia das mesmas na monitorização da substância ativa ao longo do processo de fabrico do produto final. Também foram construídas cinco formulações para controlo positivo (Tabela 4) compostas apenas por substância ativa e que contêm as mesmas proporções das duas formas de SA. E adicionalmente foi produzido também um controlo negativo (Tabela 5) apenas composto pelos dois excipientes referidos. Foi definida uma massa total de cada comprimido de 300 mg. Os resultados do delineamento experimental encontram-se no anexo 1. Com cinco níveis de variação considerados para a proporção das duas formas de fármaco, foram obtidas cinco formulações distintas (Tabela 6).

Tabela 3 – Parâmetros utilizados no delineamento experimental e níveis de variação considerados

Componentes da formulação	Nº de níveis de variação	Níveis de variação
OLZ Forma anidra I / OLZ Forma dihidratada D (%)	5	10/10
		4/16
		16/4
		0/20
		20/0
MCC (%)	1	20 (fixo)
PC (%)	1	60 (fixo)
Parâmetros	Nº de níveis de variação	Níveis de variação
Força de compressão (Ton)	2	2/4
Humidade Relativa (%)	3	11/75/93
Tempo de armazenamento (dias)	2	7/30

Tabela 4 – Composição dos controlos positivos

Tipo de mistura	Forma I (anidra) (%)	Forma II (dihidratada D) (%)
CP1	0	100
CP2	18	82
CP3	50	50
CP4	82	18
CP5	100	0

Tabela 5 - Composição do controlo negativo

Excipientes	Quantidade (%)
MCC	20
Fosfato de Cálcio tribásico	80

Tabela 6 - Composição das formulações utilizadas

Formulação	Forma anidra (%)	Forma dihidratada (%)	MCC (%)	PC (%)
M1	10	10	20	60
M2	4	16	20	60
M3	16	4	20	60
M4	0	20	20	60
M5	20	0	20	60

4.2.3.2. Procedimento laboratorial

A produção dos comprimidos e pós foi feita de acordo com as seguintes etapas:

1. Pesagem e mistura num misturador orbital de cada formulação. Colocação da mistura dentro de tubos.
2. Armazenamento dos tubos contendo as misturas de pós a comprimir dentro dos exsicadores às humidades relativas definidas na tabela 3, durante os dois tempos de armazenamentos selecionados.
3. Produção dos comprimidos (300 mg) através de compressão direta numa prensa manual (Lloyd's Instruments K50, UK), com punções de 10 mm de diâmetro considerando as duas forças de compressão escolhidas (2 e 4Ton).

Antes da pesagem das matérias primas, a OLZ foi moída durante 1 minuto num almofariz (o estado sólido foi confirmado antes e depois da moagem de forma a garantir a estabilidade da forma). De seguida fez-se a pesagem da quantidade total de cada

componente considerando, as experiências todas definidas no delineamento, obtendo-se uma massa total para cada formulação de 35,1g. A mistura foi feita num misturador orbital durante 10 min e após isso, foi feita uma divisão por vários tubos considerando as três HR e os dois tempos de armazenamento. As amostras foram utilizadas para produzir comprimidos de 300 mg numa prensa manual com as duas forças de compressão referidas.

Os controlos positivos e negativos foram apenas produzidos na forma de pós.

Todos os materiais produzidos, à exceção dos controlos, foram analisados na forma de mistura de pós e comprimidos. As misturas de pós foram analisadas por DSC, MIR, NIR e Raman. Os comprimidos foram analisados por NIR (dois comprimidos), Raman (dois comprimidos) e ensaios de dissolução (três comprimidos).

4.2.4. Técnicas usadas para caracterização dos materiais e produtos

4.2.4.1. DSC

Os termogramas de DSC foram obtidos num calorímetro Q200 (TA instruments, EUA) calibrado com índio. N₂ seco foi usado com gás de purga (50mL/min). 2 a 3 mg de amostra foram colocados em cadinhos herméticos furados com aquecimento a 10°C/min e entre 0 e 210°C. A opção de furar os cadinhos foi feita por forma a evitar a sua eventual rutura devido à pressão do vapor de água e para prevenir o aparecimento de formas metaestáveis devido à interação do vapor de água com a estrutura cristalina, que podia interferir nos resultados obtidos.

4.2.4.2. MIR

Os pós foram analisados por espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR). Os espetros foram adquiridos utilizando um espectralómetro FTIR System (PerkinElmer Spectrum BX) no modo ATR com um acessório PIKE Technologies GLADI ATR de 4000 a 600 cm⁻¹ e uma resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varrimentos. Os espetros observados na análise de resultados foram pré-processados com SNV e utilizou-se a totalidade do espetro.

4.2.4.3. NIR

Os pós e os comprimidos foram analisados por espectroscopia de infravermelho próximo utilizando-se um equipamento FT-NIR da Thermo Scientific™ Antaris™, equipado com detetor InGaAs (Índium Gálio - Arsénio). O espetro é adquirido com uma sonda de refletância (Sabir, Thermo Nicolet, Madison, EUA) com uma área de iluminação com um diâmetro de 0,5 cm. Cada espetro NIR foi gravado ao longo de uma gama de números de onda entre 10000 e 4000 cm⁻¹, com resolução e número de varrimentos estabelecidos a 8 cm⁻¹ e 32, respetivamente. O equipamento é controlado através do software RESULTS (Thermo Scientific).

4.2.4.4. Raman

Os espetros de Raman foram adquiridos utilizando um Ocean Optics QE-Pro equipado com um laser de frequência 785nm (configurações de aquisição: média de 2

varrimentos e tempo de integração de 7 segundos) operando na faixa de $154,3\text{ cm}^{-1}$ - 1880 cm^{-1} . Os comprimidos foram medidos através de um acessório sem contacto direto com a sonda. O equipamento é controlado através do software SpectraSuite da Ocean Optics.

4.2.4.5. Ensaios de dissolução

Os ensaios de dissolução foram realizados de acordo com o método descrito no Ensaio de Dissolução de Formas Farmacêuticas Sólidas 2.9.3. (FP VIII), aparelho AT7 Sotax® com pá agitadora. Líquido de dissolução: tampão ácido clorídrico pH=1, volume =1000mL. Velocidade de agitação = 50rpm. Temperatura: $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Intervalos de tempo de recolha de amostras de 5mL (em minutos): 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300. A análise das amostras foi efetuada em espectrofotómetro HITACHI® U-1900 a $257,8\text{nm}$ utilizando-se células de quartzo para a leitura. Cada amostra foi substituída por meio de dissolução novo. Três comprimidos de cada formulação foram sujeitos ao ensaio. Todas as experiências de dissolução foram realizadas sob condições de imersão (*sink conditions*).

4.2.5. Análise multivariada

4.2.5.1. PCA

Os espectros NIR e Raman foram analisados através de análise de componentes principais (PCA). Os espectros NIR foram pré-processados com a primeira derivada aplicando o algoritmo de Savitzky-Golay e os espectros Raman foram pré-processados com variação de padrão normal (SNV). Antes da análise de PCA, todos os conjuntos de espectros foram sujeitos a *mean-centring* e utilizou-se a totalidade do espectro para as análises. A análise de PCA foi feita na *PLS toolbox* (versão 8.2.1.Eigenvector Research Inc, Wenatchee WA) para o *Matlab* (versão 8.0).

5. Resultados

A análise de resultados será dividida em várias secções, esquematizadas na figura 9, de acordo com os quatro parâmetros considerados.

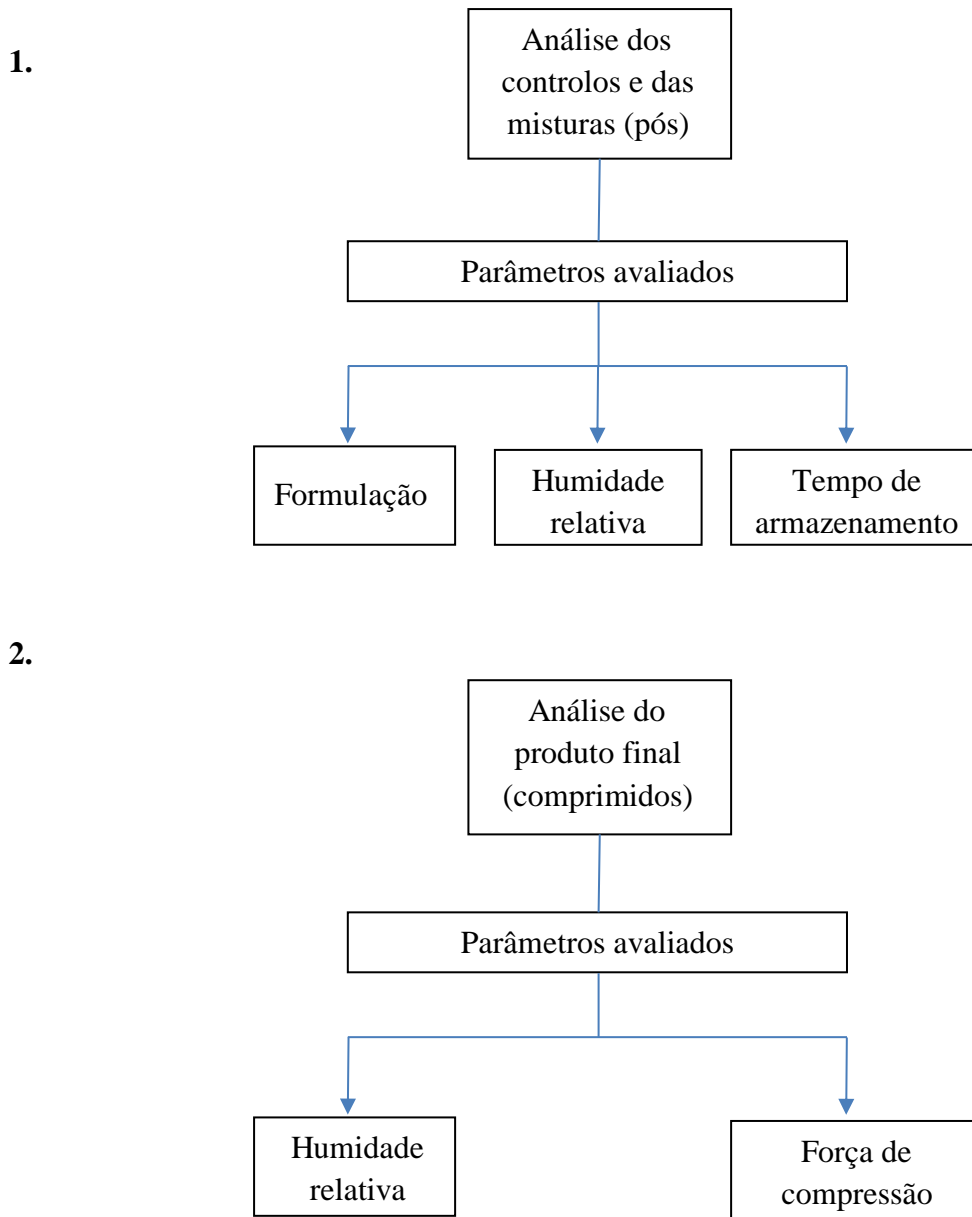


Figura 9 - Esquema-resumo da análise de resultados

5.1. Análise de pós

5.1.1. Análise da formulação

a. Controlos positivos

Inicialmente foi feita uma caracterização dos diferentes controlos produzidos que têm na sua constituição apenas as duas formas de OLZ (anidra I e dihidratada D) em diferentes

proporções. Esta caracterização foi realizada com recurso às técnicas NIR, MIR, Raman e DSC.

O termograma da OLZ anidra I (CP5) (Figura 10) apresenta apenas um evento endotérmico resultante da fusão da OLZ que ocorre aos 195,68°C com uma entalpia de $\Delta H = 127 \text{ J/g}$. É apresentado também o termograma correspondente ao controlo negativo constituído apenas por excipientes, no qual não se observa nenhuma transição de fase perto do ponto de fusão da OLZ. Os restantes controlos produzidos (CP1, CP2, CP3 e CP4) já têm na sua constituição a forma hidratada D da OLZ, em diferentes proporções de acordo com a tabela 4 (tabela materiais e métodos). Os termogramas (Figura 11) apresentam dois eventos endotérmicos, o primeiro corresponde a uma banda mais larga resultante da evaporação da água e o segundo corresponde à fusão da OLZ. Após a fase de desidratação, a forma anidra I de OLZ resultante, apresenta alguma estabilidade, pois a linha de base do termograma não é alterada até à fusão final da molécula. O aumento da quantidade de OLZ dihidratada origina valores de entalpia de vaporização mais elevados e temperaturas de evaporação da água, mais próximas de 100°C [64].

A estabilidade da rede cristalina da OLZ, ocorre devido as várias ligações de hidrogénio NH-N estabelecidas entre as unidades diméricas que constituem a estrutura. Apesar de se tratarem de ligações fracas, permitem a formação de uma estrutura rígida que resulta na existência de um ponto de fusão elevado associado a um valor baixo de entalpia de vaporização, observável para a forma anidra I da OLZ. A versatilidade da rede cristalina permite a formação de ligações de hidrogénio com moléculas de solvente que são incorporadas no seu interior. A inclusão destas moléculas permite a estabilização da rede cristalina, tendo como consequência, o aumento da temperatura de desidratação da molécula [75],[64]. Assim, os controlos positivos que contêm mais forma dihidratada D da OLZ (CP1 e 2) e conseqüentemente, uma maior quantidade de água, vão apresentar uma temperatura maior de desidratação, juntamente com entalpias de vaporização mais elevadas.

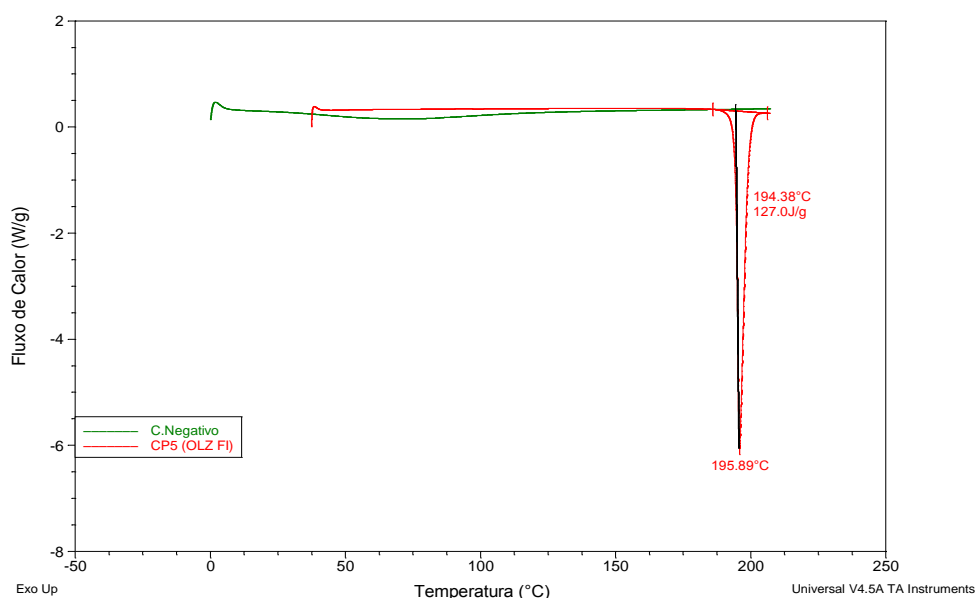


Figura 10 - Termogramas das formulações CP5 (100% forma anidra I) e Controlo Negativo

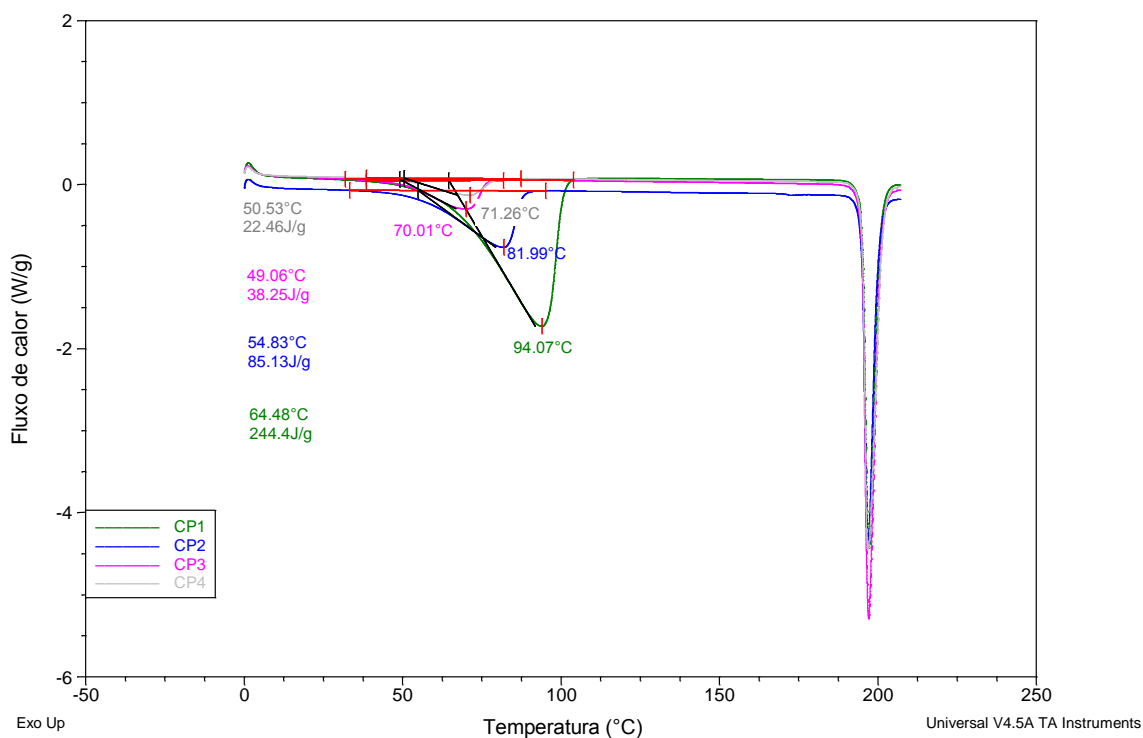
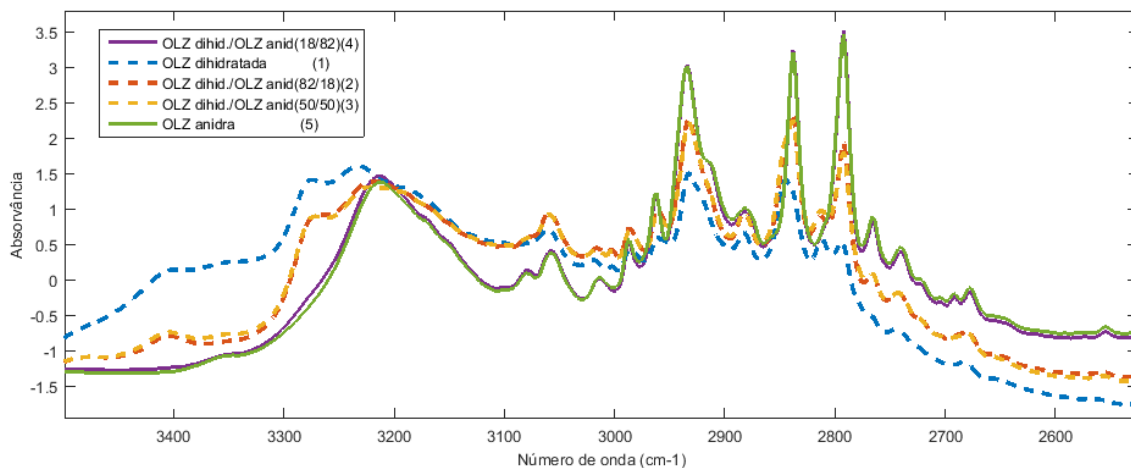


Figura 11 - Termogramas das formulações CP1 (forma dihidratada D), CP2 (82% f. dihidratada D / 18% f. anidra I), CP3 (50% f. dihidratada D / 50% f. anidra I) e CP4 (18% f. dihidratada D / 82% f. anidra I)

A análise estrutural das formas anidra I e dihidratada D da OLZ foi conseguida através de uma análise MIR dos controlos positivos produzidos (figura 12 e anexo 2). A atribuição de bandas, no caso da forma anidra I, foi feita de acordo com uma caracterização estrutural descrita em Ayala et al.(2006) [68] e a tabela com a descrição das bandas obtidas encontra-se no anexo 2.

a)



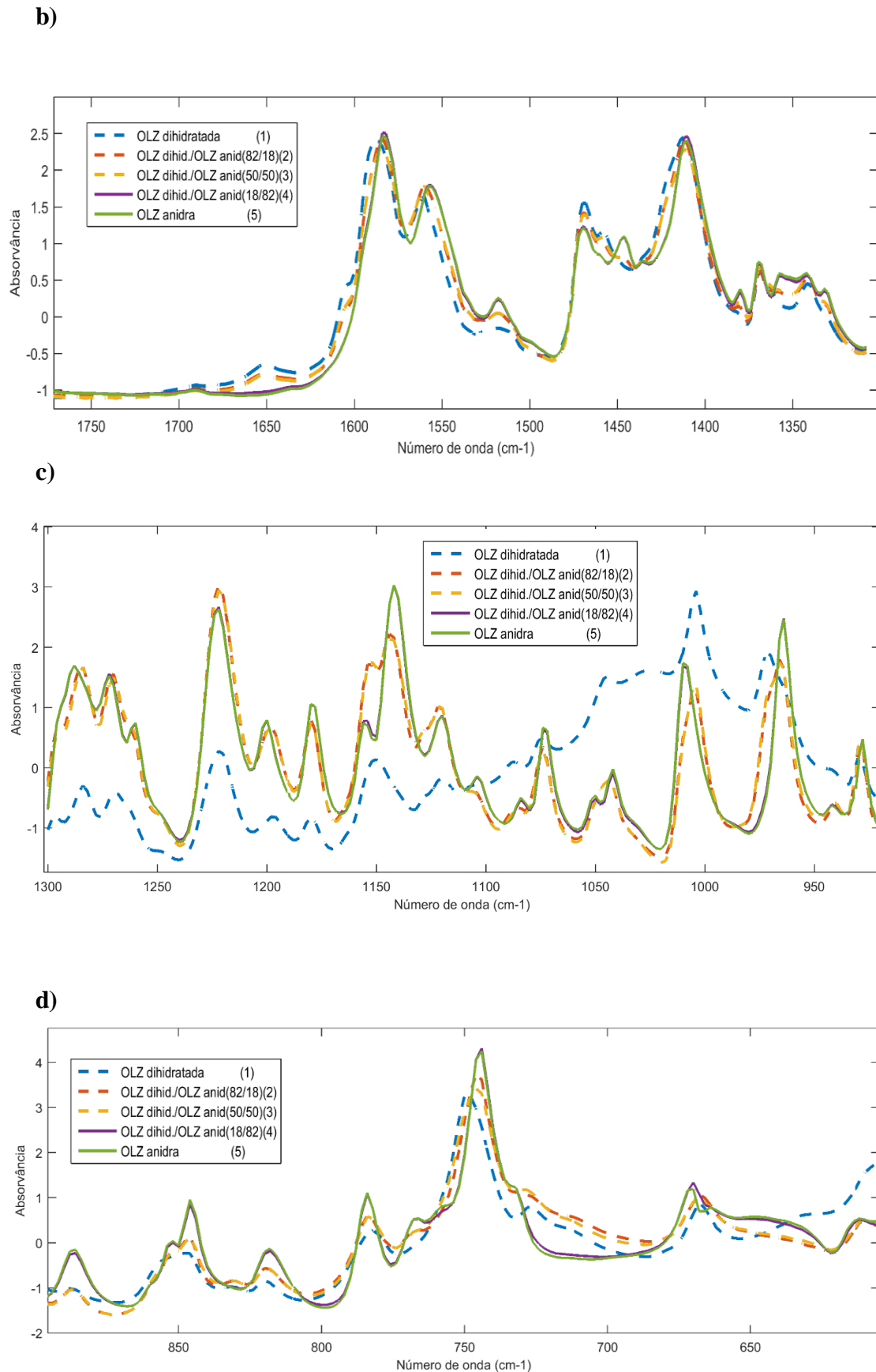


Figura 12 - Espectros MIR das formas anidra I (OLZ anidra) e dihidratada D (OLZ dihidratada) individualmente e em diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (82%/18%; 50%/50%; 18%/82%). Regiões espectrais: a) 3700 cm^{-1} até 2500 cm^{-1} ; b) 1800 cm^{-1} até 1300 cm^{-1} ; c) 1300 cm^{-1} até 900 cm^{-1} d) 900 cm^{-1} até 600 cm^{-1} . Espectros pré-processados com SNV.

Os espectros obtidos para os diferentes controlos positivos que foram produzidos, podem ser agrupados em dois grupos de acordo com o grau de similaridade: o primeiro é constituído pelas formulações CP1, CP2 e CP3 que contêm mais forma dihidratada D (a tracejado no gráfico) e o segundo, pelas formulações CP4 e CP5 (a cheio no gráfico) que têm maior percentagem da forma anidra I. As diferenças entre estes dois grupos de espectros residem no facto das ligações de hidrogénio, que se estabelecem na rede cristalina da OLZ, se alterarem significativamente, aquando da introdução de moléculas de solvente. A estrutura cristalina inicial é alterada, resultando no aparecimento de algumas bandas novas e o desvio de valores de números de onda, para alguns grupos funcionais da molécula.

Aquando da introdução da molécula de água, a ligação de hidrogénio que existe entre o grupo N10-H e o átomo N5 do grupo imina, é quebrada, formando-se uma ligação do tipo $N-H \cdots O_w-H_w \cdots O_w-H_w \cdots N$ (Figura 5a). Para além do átomo N5 do grupo imina, também o átomo N4' do grupo piperidina se torna grupo aceitador de hidrogénios. As ligações de hidrogénio contribuem para a estabilidade da rede cristalina, mantendo-se a existência de vários dímeros agrupados em blocos formando uma estrutura tridimensional em colunas. As novas ligações de hidrogénio formadas são observáveis no espectro da forma dihidratada D entre os 3550 cm^{-1} e os 3000 cm^{-1} , com o aparecimento de duas novas bandas não observáveis na forma anidra I, que correspondem à vibração de estiramento do grupo -OH.

A vibração de estiramento do grupo NH é observável aos 3219 cm^{-1} para todas as formulações. Esta ligação é característica das aminas secundárias heterocíclicas e costuma ser observável por volta dos 3450 cm^{-1} , no entanto o aparecimento a números de onda menores indica que o hidrogénio está envolvido em ligações de hidrogénio, o que é corroborável com o que já foi descrito para a estrutura cristalina da OLZ.

Na região espectral compreendida entre os 1700 cm^{-1} e os 1500 cm^{-1} também são observáveis algumas diferenças nos espectros obtidos. A banda que aparece aos 1587 cm^{-1} para a forma dihidratada D é alterada para os 1584 cm^{-1} para a forma anidra I e corresponde à associação da vibração de estiramento do grupo C=N juntamente com a vibração de deformação angular do grupo NH. A vibração de estiramento do grupo C=C e a vibração de deformação angular do grupo CH do anel aromático, são alteradas de 1555 cm^{-1} na forma anidra I para 1560 cm^{-1} na forma dihidratada D.

Para além do anel aromático R2, o grupo piperazinil (R4) sofre algumas alterações, em algumas vibrações de estiramento do anel, com a introdução de água na estrutura da OLZ. Nomeadamente as bandas observáveis a 1143 cm^{-1} e a 1009 cm^{-1} para a forma anidra I, são alteradas respetivamente para, 1153 cm^{-1} e 1004 cm^{-1} para a forma dihidratada D. Na região abaixo dos 1000 cm^{-1} , as vibrações de estiramento dos grupos funcionais azepina e tiofeno são alteradas de 965 cm^{-1} para 972 cm^{-1} , com a hidratação da molécula. Assim como, a deformação angular fora do plano do grupo CH do anel aromático é também alterada de 745 cm^{-1} para 750 cm^{-1} .

Os controlos positivos foram também analisados com espectroscopia Raman, de modo a comparar as duas análises. Os espectros obtidos podem observar-se na figura 13. A atribuição das bandas encontra-se no anexo 2 e foi realizada de forma equivalente à análise por MIR. De forma geral, é possível verificar que as diferenças espectrais entre as

formas anidra I e dihidratada D não são tão significativas em comparação com os espectros MIR. Assim, esta técnica espectroscópica não é tão sensível à deteção de diferenças de humidade entre duas amostras. As principais variações espectrais observáveis resultam de diferenças estruturais na rede cristalina da OLZ e de diferenças físicas da própria mistura, como por exemplo, a distribuição do tamanho de partícula, originando alterações na linha de base do espectro.

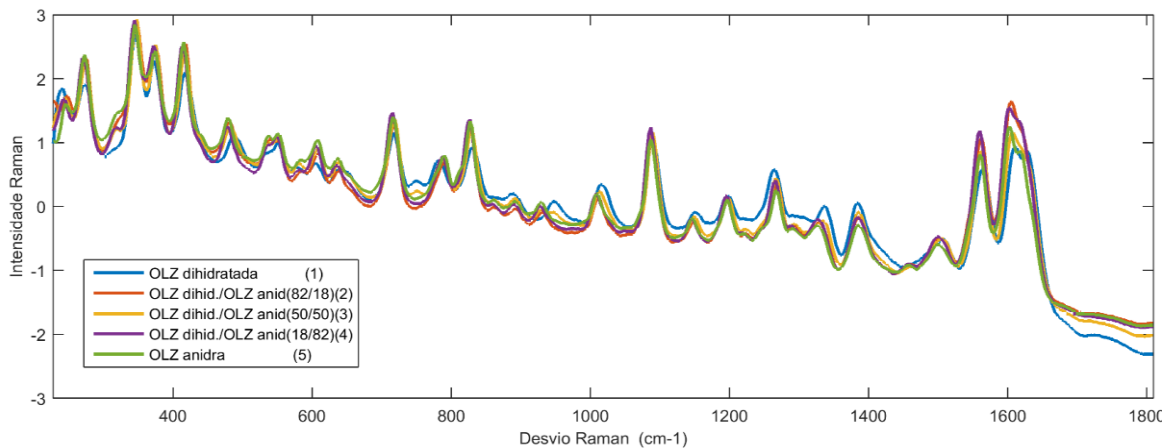


Figura 13 - Espectros Raman das formas anidra I (OLZ anidra) e dihidratada D (OLZ dihidratada) individualmente e em diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (82%/18%; 50%/50%; 18%/82%). Espectros pré-processados com SNV.

As técnicas DSC e MIR permitiram obter uma análise estrutural das duas formas de OLZ. Esta informação foi complementada com a utilização de espectroscopia NIR. Os espectros obtidos encontram-se na figura 14.

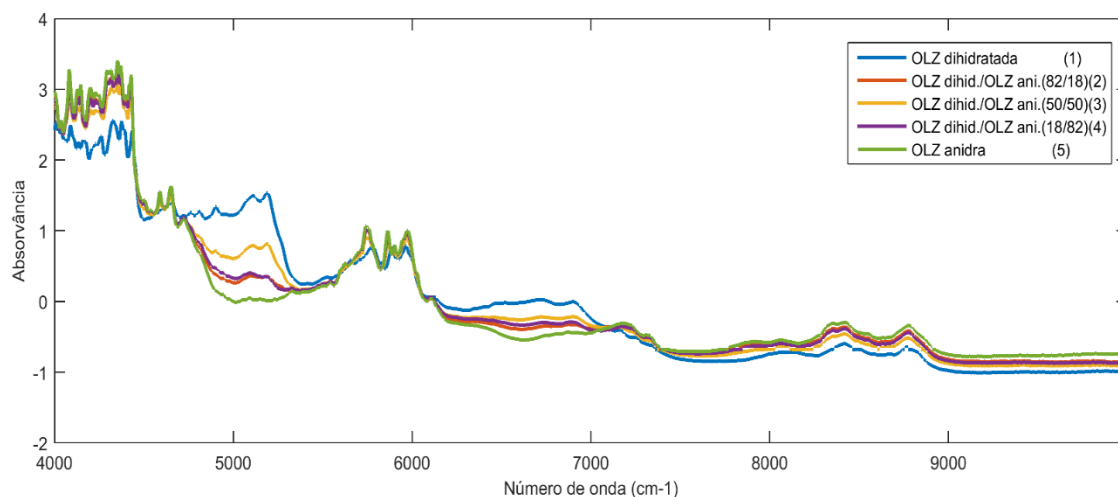


Figura 14 - Espectros NIR das formas anidra I (OLZ anidra) e dihidratada D (OLZ dihidratada) individualmente e em diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (82%/18%; 50%/50%; 18%/82%). Espectros pré-processados com SNV.

De uma forma geral observa-se um comportamento espectral distinto no caso da forma hidratada D (CP1) em relação às restantes amostras que contêm as duas formas da molécula. Os espectros NIR são constituídos por várias zonas distintas, resultantes das combinações e sobreposições resultantes das vibrações dos grupos funcionais constituintes da molécula. A primeira zona corresponde à zona das combinações e situa-se na região espectral abaixo dos 5000 cm^{-1} . É possível observar no espectro a predominância de várias bandas entre os $4400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ que correspondem às combinações das bandas associadas à vibração dos grupos CH e CC. Como o hidrogénio do grupo CH não participa em ligações de hidrogénio, as bandas são mais estreitas e têm grande intensidade. Nesta zona, o espectro da forma dihidratada D da OLZ (CP1) tem valores de absorvância menores e algumas bandas são distintas das restantes formulações, concluindo-se assim, que a estrutura tridimensional do cristal é alterada com a introdução da água, nomeadamente, as vibrações CC e CH dos anéis aromáticos e fora do plano são modificadas com as novas ligações de hidrogénio.

A zona espectral até aos 5000 cm^{-1} corresponde às combinações das bandas dos grupos NH e CC (4730 cm^{-1}) e observa-se também para o espectro da forma dihidratada D (CP1), as combinações resultantes das vibrações da molécula de água (4545 cm^{-1}) e do grupo OH ($5000\text{ cm}^{-1}\text{-}4762\text{ cm}^{-1}$). A introdução da molécula da água é observável também entre os $5300\text{-}5200\text{ cm}^{-1}$, que corresponde à zona de primeiro sobretom das bandas associadas à vibração do grupo OH e entre os $7000\text{ - }6800\text{ cm}^{-1}$ que corresponde à zona de segundo sobretom das bandas associadas ao grupo OH. Para além das vibrações associadas a este grupo, existem também diferenças na zona espectral entre $5900\text{ - }5700\text{ cm}^{-1}$ resultantes da primeiro sobretom das bandas associadas ao grupo CH e entre $9000\text{ - }8300\text{ cm}^{-1}$ associadas à segundo sobretom de bandas deste grupo.

Com muito menor intensidade, observam-se ainda as bandas associadas ao primeiro sobretom do grupo NH, acima dos 7000 cm^{-1} .

b. Misturas iniciais

Após a análise estrutural dos diferentes controlos positivos, foram produzidas cinco formulações diferentes de acordo com o DoE (tabela 6). Estas formulações são constituídas pelas duas formas de OLZ em diferentes proporções, juntamente com dois excipientes adicionais. As cinco misturas produzidas, nesta fase inicial foram analisadas pelas quatro técnicas já referidas: DSC, NIR, MIR e Raman.

Os termogramas obtidos para as misturas iniciais (Figura 15) têm perfis semelhantes aos já obtidos para os controlos positivos (Figura 11). Apresentam os dois eventos endotérmicos já referidos anteriormente, e a proporção existente entre as formas anidra e dihidratada D influencia os valores de entalpia de vaporização e temperatura de evaporação da água. Assim, as misturas que apresentam maior percentagem de forma dihidratada D (M2 e M4) têm valores de entalpia e temperaturas de evaporação mais elevadas, e o oposto acontece para misturas com menor percentagem de forma dihidratada D (M1, M3 e M5). Neste caso, observa-se uma menor diferença entre os dois grupos de misturas, devido à influência dos excipientes, que também contêm uma pequena percentagem de água. Um dos excipientes adicionados é a MCC que tem uma sensibilidade maior à absorção de água e pode influenciar as formulações que contêm fármacos que podem ser alterados de acordo com as condições de humidade relativa [108].

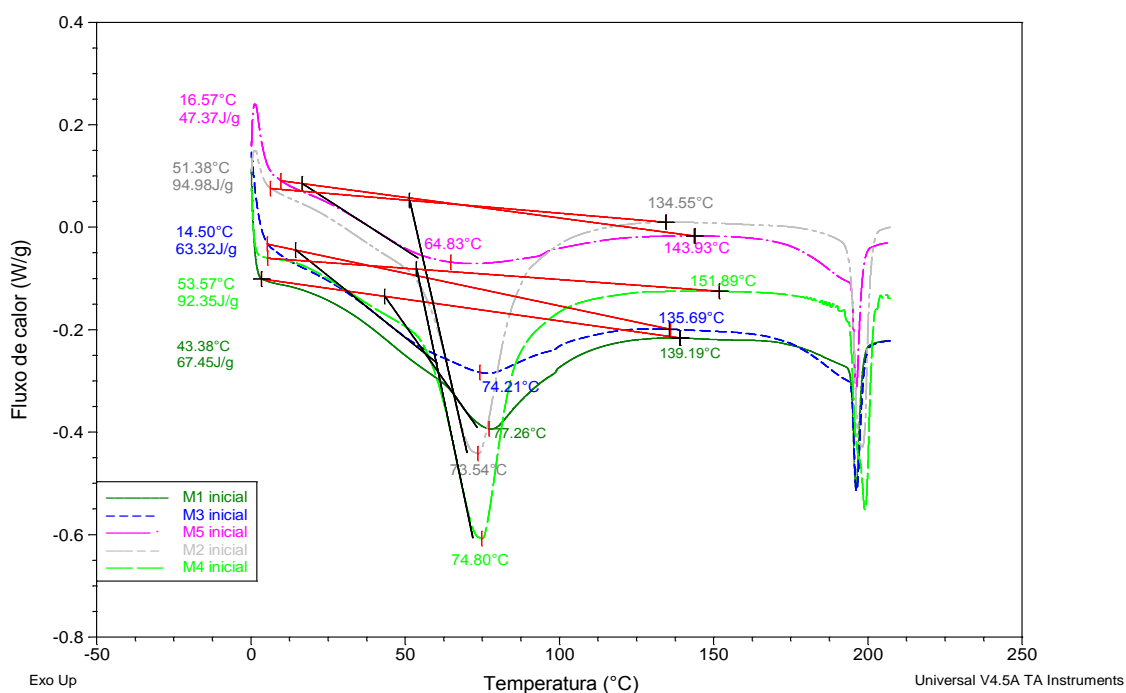


Figura 15 - Termogramas das formulações M1(50%anid./50%dihidr.), M2(18%anid./82%dihidr.), M3(82%anid./50%dihidr.), M4 (100%dihidr.), e M5 (100%anid..) expostas à HR inicial (55%)

As cinco formulações produzidas inicialmente, foram expostas a diferentes condições de humidade relativa durante tempos de armazenamento diferentes, de acordo com a tabela 3. Os diferentes valores obtidos de entalpia de vaporização, estão resumidos no gráfico da figura 16, e através de uma análise de variância (ANOVA) é possível averiguar se entre as cinco formulações produzidas, existe pelo menos uma que contém valores de entalpia significativamente diferentes das restantes.

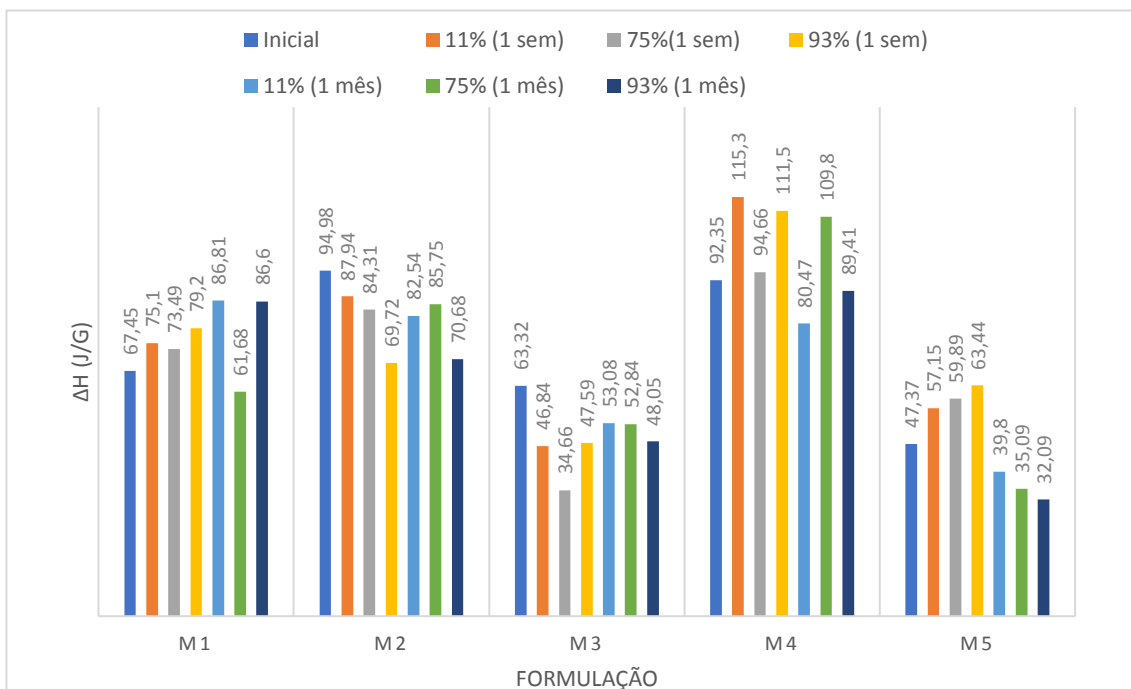


Figura 16 - Gráfico-resumo com os valores obtidos por DSC de entalpia de vaporização para as formulações M1 a M5 expostas a diferentes humidades relativas e tempos de armazenamento

As cinco formulações obtidas correspondem a cinco grupos diferentes e foram comparados através de uma análise de variância, de forma independente do grau de humidade relativa e tempo de armazenamento a que foram sujeitos.

Obteve-se um valor $p = 5,38 \times 10^{-10}$, ou seja, um nível de significância muito elevado indicando diferenças entre as entalpias de vaporização. De notar que o teste ANOVA é sensível mesmo que apenas um dos grupos seja diferente.

Através da análise do diagrama caixa de bigodes apresentado na figura 17, verifica-se que as misturas M3, M4 e M5 são as que têm valores de entalpia mais dispares em relação às restantes, mantendo-se a ordem já observada anteriormente, para os controlos positivos: ΔH_v (M5) < ΔH_v (M3) < ΔH_v (M1) < ΔH_v (M2) < ΔH_v (M4). Ou seja, os valores de entalpia aumentam com a quantidade de OLZ dihidratada D presente na formulação, independentemente da HR a que foram posteriormente sujeitos.

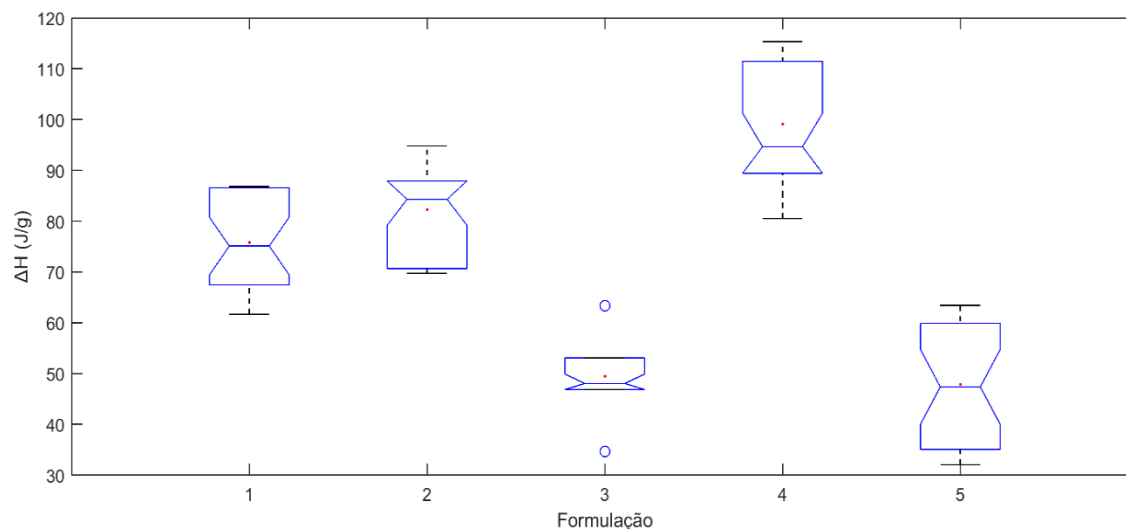


Figura 17 - Diagrama de quartis relativo aos valores de entalpia de vaporização determinados por DSC para as formulações M1 a M5 expostas a diferentes HR

Os espectros MIR obtidos para as misturas iniciais encontram-se na figura 18. As regiões espectrais entre 920 cm^{-1} e 700 cm^{-1} e entre 1750 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} foram selecionadas, pois nas restantes zonas do espectro existem bandas correspondentes aos excipientes que podem mascarar as bandas da OLZ presentes no espectro. As diferenças existentes entre os dois grupos de misturas mantêm-se, apresentado semelhanças ao que já foi observado para os controlos (figura 12). Neste caso, as misturas M2 e M4 têm maior quantidade da forma dihidratada D e as misturas M1, M3 e M5 têm mais forma anidra I. A presença de uma maior quantidade de água é observável no gráfico para a banda associada ao grupo C=N e NH, que aparece a 1584 cm^{-1} para as misturas com mais forma anidra e é alterada para 1587 cm^{-1} para as restantes misturas. As vibrações CH do anel aromático também são alteradas de 1555 cm^{-1} na forma anidra I para 1560 cm^{-1} na forma dihidratada D, assim como as vibrações CH aromáticas fora do plano, que são alteradas de 745 cm^{-1} para 750 cm^{-1} , na forma dihidratada D. A introdução de moléculas de água na estrutura da OLZ é observável também noutras regiões espectrais não referidas, existindo sempre o desvio para números de onda mais elevados, para o caso das misturas maioritariamente constituídas pela forma dihidratada D.

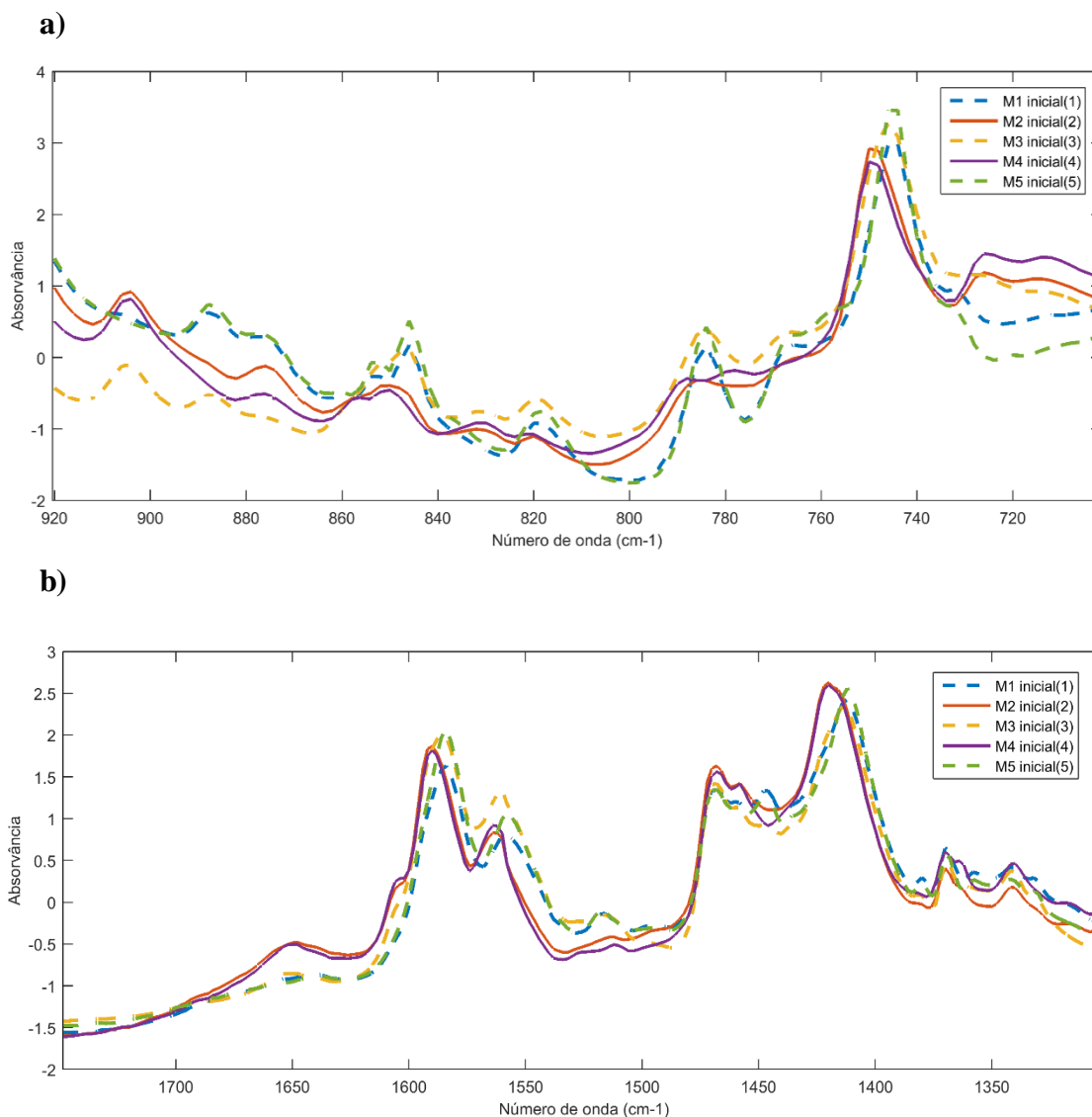


Figura 18 - Espectros MIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%). Regiões espectrais: a) 920 cm^{-1} até 700 cm^{-1} ; b) 1750 cm^{-1} até 1300 cm^{-1} . Espectros pré-processados com SNV.

As cinco misturas iniciais produzidas foram ainda analisadas através de NIR e Raman. O espectro obtido para a espectroscopia NIR (Figura 19) apresenta algumas variações observáveis nas bandas espectrais que permitam inferir a existência de diferenças estruturais na molécula e na estrutura cristalina após a sua hidratação. É observável na primeira região espectral, entre 4400 e 4000 cm^{-1} , a existência de valores de absorvância menores para as misturas M2 e M4, que contêm maior quantidade de forma dihidratada D, indicando que as vibrações CC e CH dos anéis aromáticos e fora do plano do plano são alteradas com a introdução da água na estrutura. A zona do primeiro sobretom das bandas associadas à vibração do grupo OH (entre 5300 e 5200 cm^{-1}) também apresenta diferença, nomeadamente na existência de valores de absorvância maiores para as misturas com maior forma dihidratada D (M2 e M4). Na região dos 5900 a 5700 cm^{-1} , as diferenças observadas resultam da alteração das bandas associadas ao grupo CH.

Para este tipo de espectroscopia, a existência de várias sobreposições e combinações de vibrações de alguns grupos funcionais, como CH, OH e NH, leva à obtenção de espectros complexos, e por isso esta análise foi complementada com recurso à quimiometria para interpretação dos espectros, tentando evidenciar as diferenças entre as misturas.

Em relação aos espectros Raman (Figura 20), as poucas bandas existentes têm pouca intensidade, devido ao efeito de fluorescência que contribui para mascarar este sinal. Assim, os espectros das misturas iniciais obtidos por ambas as técnicas, foram analisados através de PCA.

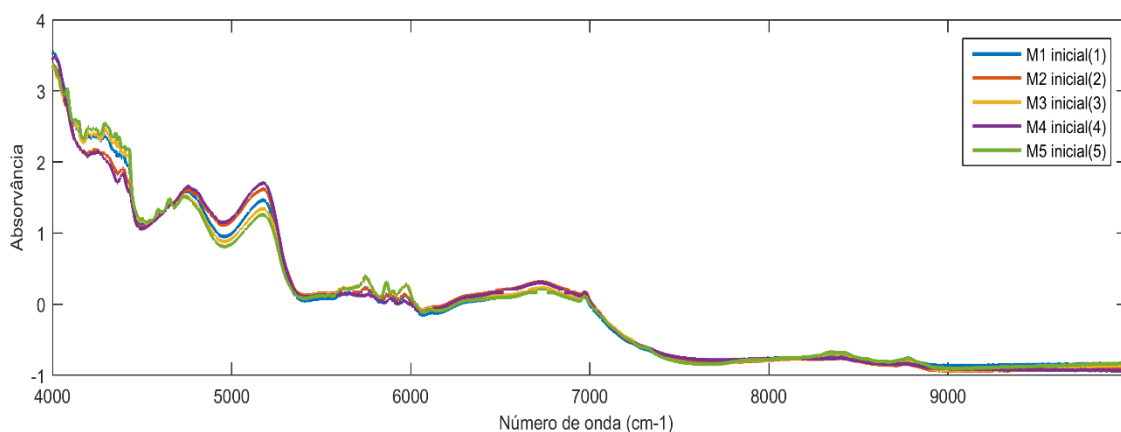


Figura 19 - Espectros NIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%; M4:100%/0%; M5:0%/100%).. Espectros pré-processados com SNV.

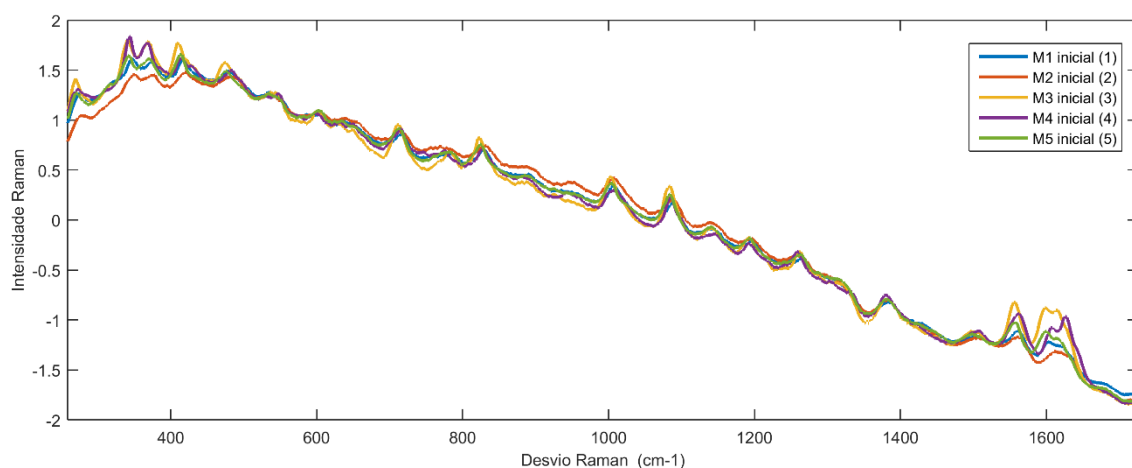


Figura 20 - Espectros Raman de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%; M4:100%/0%; M5:0%/100%).. Espectros pré-processados com SNV.

No caso dos espectros NIR, obteve-se um modelo PCA com dois componentes principais com uma variância capturada acumulada de 99%. É observável uma separação nos *scores* (Figura 21), para o primeiro componente, de acordo com a quantidade de OLZ

dihidratada D presente nas misturas com a existência de dois grupos de misturas que já tinham sido observados na região MIR: as misturas M2 e M4, que têm um maior grau de hidratação e as misturas M3 e M5, com um menor grau de hidratação. Neste caso a mistura M1 que apresenta, 50% de cada uma das formas, aparece entre os dois grupos.

Os *loadings* (Figura 22) mostra que as principais variações espetrais captadas pelo primeiro componente, situam-se entre os 5000 cm^{-1} e os 4500 cm^{-1} e entre os 5300 cm^{-1} e os 5200 cm^{-1} , que correspondem respetivamente, às combinações resultantes das vibrações da molécula de água e do grupo OH e à zona de primeiro sobretom das bandas associadas ao grupo OH. Também se observam diferenças entre os 5900 cm^{-1} e os 5700 cm^{-1} associadas à zona do primeiro sobretom para o grupo CH, que estão diretamente relacionadas com a estrutura cristalina, que é modificada com a hidratação.

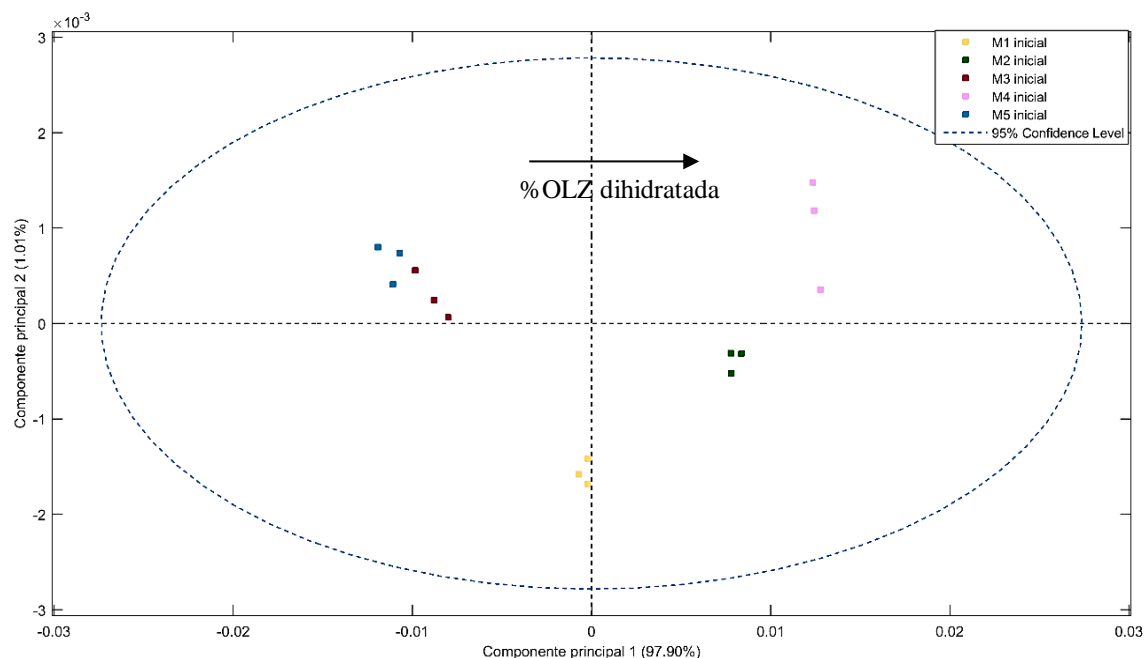


Figura 21 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espetros NIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).

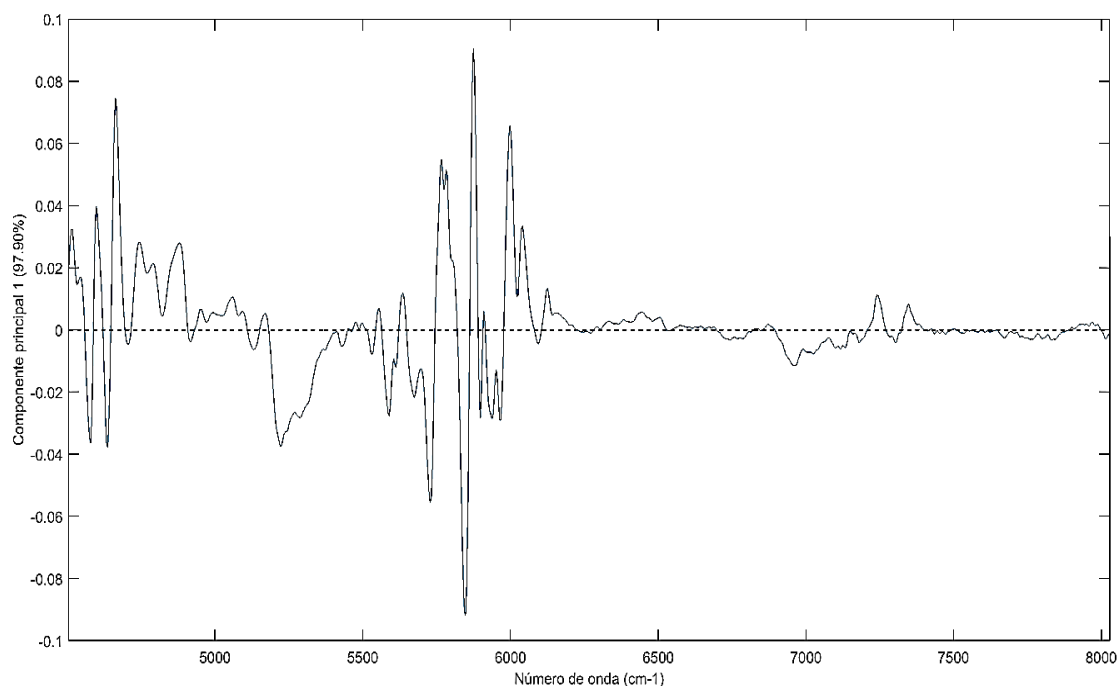


Figura 22 - Loadings do modelo PCA para o componente um obtido a partir de espetros NIR de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).

Para os espetros obtidos por Raman, foi obtido um modelo PCA com quatro componentes principais com variância capturada de 97%. De acordo com a análise feita anteriormente aos controlos positivos, esta técnica não é sensível às variações na quantidade de água nas amostras. Apenas é observável nos *scores* para o terceiro componente (Figura 23), que captura apenas 12% da variância espectral, uma ligeira separação de acordo com a percentagem de forma dihidratada D. Os *loadings* (Figura 24) para o terceiro componente, mostra que as principais variações captadas se situam entre os 1650 cm^{-1} e os 1550 cm^{-1} , que correspondem às vibrações do anel aromático e do grupo CN que participa nas ligações de hidrogénio. Deste modo, a presença de uma maior percentagem de água nas amostras não é detetada diretamente na espectroscopia Raman, no entanto as diferenças estruturais na estrutura cristalina resultantes da hidratação levam a uma ligeira separação das misturas observável para o terceiro componente.

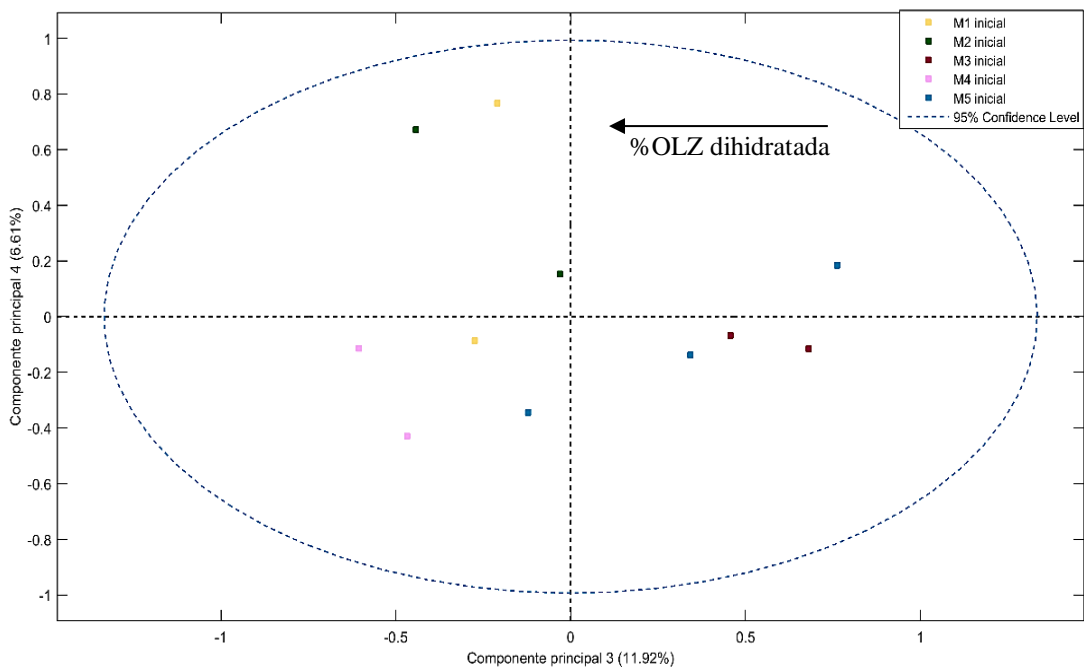


Figura 23 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros Raman de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).

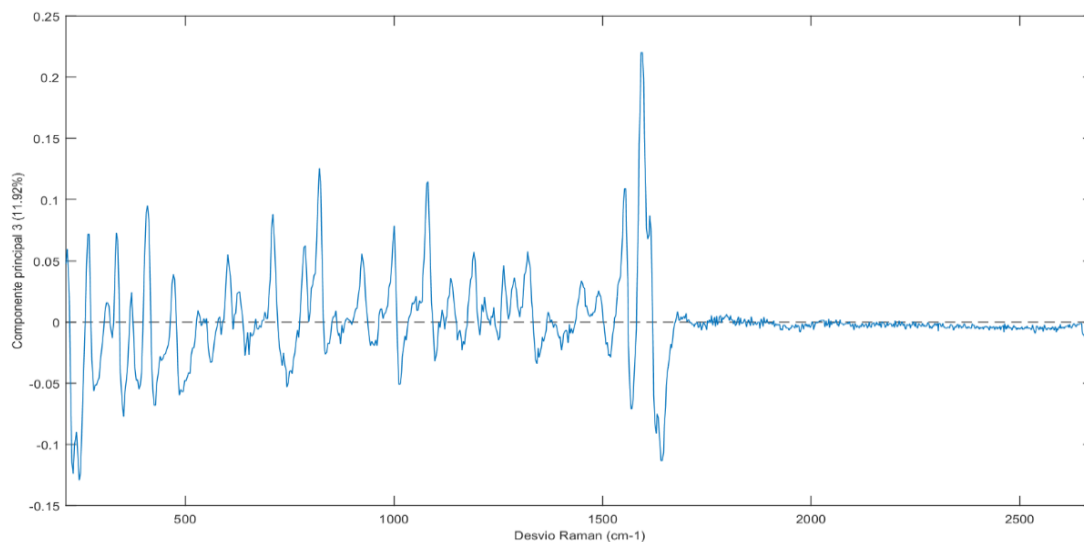


Figura 24 - Loadings do modelo PCA para o componente três obtido a partir de espectros Raman de pós para as formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%;M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).

c. Comparação das técnicas usadas

De modo a analisar as diferenças existentes entre as várias misturas, devido às quantidades variáveis de OLZ anidra I/OLZ dihidratada D usadas em cada uma delas, foi feita uma caracterização inicial das mesmas e só da substância ativa sem os excipientes (controles positivos).

As várias técnicas utilizadas permitiram comparar os perfis térmicos distintos apresentados pelas duas formas polimórficas e também perceber as diferenças estruturais existentes entre ambas. Através da atribuição de bandas feita com recurso a três técnicas espectroscópicas distintas, foi possível obter uma análise completa da estrutura da OLZ anidra I e da sua forma dihidratada D. A caracterização da molécula é importante para se antecipar o possível efeito de exposição a diferentes valores de humidade relativa, na rede cristalina da OLZ e que afetariam a sua estabilidade e biodisponibilidade. Este conhecimento permite o desenvolvimento futuro de condições mais eficazes de produção e armazenamento das formas farmacêuticas, não comprometendo o efeito terapêutico do fármaco.

A análise por DSC permitiu uma distinção clara entre as misturas com maior quantidade de OLZ dihidratada D (M2 e M4) e menor quantidade desta forma (M1, M3 e M5). A diferença torna-se mais notória nos termogramas obtidos para os controles positivos, com a obtenção de valores de entalpia de vaporização e temperaturas de evaporação, bastante diferentes, entre as várias formulações. No caso das misturas, a distinção existente mantém-se após a exposição a diferentes humidades relativas, observando-se através da análise de variância e do diagrama caixa de bigodes, que as misturas M4 (100% forma dihidratada D) e M5 (100% forma anidra I), têm valores médios de entalpia em extremos opostos.

Esta técnica é bastante sensível à percentagem de água retida nas várias formulações, e por isso torna-se muito importante na avaliação da estabilidade da OLZ, quando esta é exposta a humidades relativas diferentes, pois permitir detetar a possível formação de hidratos nessas condições.

Os diferentes graus de hidratação da OLZ existentes nos dois grupos de misturas que foram analisados por DSC, estão em concordância com a análise espectral realizada na zona do infravermelho médio (MIR) e infravermelho próximo (NIR). Ambas as técnicas permitiram a diferenciação das formulações de acordo com a percentagem de forma dihidratada de cada uma delas, sendo que a análise estrutural das duas formas polimórficas foi melhor conseguida através de MIR, pois apresenta bandas mais definidas. Esta técnica permite uma identificação clara da forma dihidratada através das duas bandas adicionadas associadas à vibração do grupo OH, localizadas entre 3550 e 3300 cm^{-1} , que aparecem exclusivamente, nesta forma. Existem também alterações de alguns números de onda característicos de grupos funcionais quando ocorre a hidratação da molécula. As ligações de hidrogénio existentes para a forma dihidratada estabelecem-se entre moléculas de água e com alguns grupos funcionais da molécula, como o grupo NH ou o grupo CN, enfraquecendo as suas ligações, resultando em frequências de vibração menores.

No caso da espectroscopia NIR, obtiveram-se espectros mais difíceis de interpretar, no entanto no caso dos controles positivos, a banda correspondente ao primeiro sobretom da

banda OH permite distinguir de forma clara, os diferentes graus de hidratação dos controlos. Para as misturas, a diferenciação espectral também foi possível, obtendo-se resultados concordantes com os obtidos para os controlos positivos. A influência dos excipientes, que apresentam bandas de combinação e sobreposição em zonas comuns aos grupos funcionais da OLZ, eleva a complexidade dos espectros, obtendo-se bandas mais largas em comparação com o MIR, e por isso a análise tem que ser complementada com a utilização de quimiometria.

As ligações de hidrogénio também influenciam os números de onda do espectro NIR, como é observável para o grupo NH. O hidrogénio está diretamente envolvido na ligação com a água, enfraquecendo a ligação com a azoto, resultando numa diminuição da frequência de vibração desta ligação. Consequentemente, o grupo NH aparece a números de onda maiores com uma intensidade muito menor.

Os espectros obtidos também são passíveis de dividir em dois grupos de acordo com o grau de semelhança, confirmando os resultados já obtidos por DSC. As misturas com maior percentagem de forma dihidratada D têm um comportamento espectral característico dessa forma e o oposto se verifica para as misturas com maior quantidade de forma anidra I.

No caso da espectroscopia Raman não se obteve uma distinção clara das misturas, como nas restantes técnicas, pois esta técnica não é sensível as variações de água nas amostras e por isso a única diferencial espectral que foi possível obter está relacionada com pequenas diferenças estruturais na própria molécula aquando da sua hidratação, e que são detetáveis através de Raman. Assim esta última técnica, não é adequada para ser utilizada durante a monitorização do grau de hidratação da OLZ.

5.1.2. Análise do efeito da humidade relativa no armazenamento

As cinco misturas inicialmente produzidas foram expostas a três humidades relativas diferentes (11%, 75% e 93%) durante dois períodos de tempos de armazenamento diferentes (uma semana e um mês).

De forma avaliar a quantidade de água absorvida pelas misturas nas condições referidas, as mesmas foram analisadas por DSC, após serem retiradas dos exsiccadores. Os valores obtidos de entalpia de vaporização encontram-se resumidos no gráfico de barras da figura 16. Foi feita uma análise de variância (ANOVA) de modo a comparar, de forma geral, a média dos valores de entalpia obtida para HR do ambiente. Obteve-se um valor de $p = 0,97$, ou seja, não existem diferenças significativas na percentagem de água retida nas amostras, quando é variada a HR do ambiente de armazenamento das mesmas.

A influência da HR a que foram armazenadas as amostras apenas existe em algumas misturas, nomeadamente para as formulações M1 e M5 em que se observa uma tendência de aumento da entalpia de vaporização à medida que aumenta a HR, para um tempo de armazenamento de uma semana.

No caso das misturas M2 e M4 observa-se o efeito contrário, ou seja, os valores de entalpia de vaporização diminuem com o aumento da humidade relativa. Assim, apenas para as misturas que apresentam maiores quantidade de forma anidra (M1 e M5), existe uma maior absorção de água quando expostas a meios ambientes mais húmidos. A

formulação M3 também tem na sua constituição mais forma anidra, no entanto, não é observável esta tendência, existindo somente um ligeiro aumento de valores de entalpia, quando comparadas as HR de 11% em relação a 93%. Para as formulações com maior quantidade de forma dihidratada (M2 e M4), a diminuição é mais perceptível para a formulação M2, quando esta é exposta a 93% HR.

A estrutura cristalina rígida da OLZ composta por vários dímeros empilhados, permite a incorporação isolada de moléculas de água, através de ligações de hidrogénio destas moléculas com o grupo imina da OLZ. Para as formulações maioritariamente anidras (M1, M3 e M5), a incorporação das moléculas de água faz-se no interior da estrutura cristalina, permitindo a formação de ligações de hidrogénio mais fortes que estabilizam a molécula, à medida que ocorre a hidratação quando esta é exposta a HR mais elevados.

Quando se trata de uma forma já hidratada (M2 e M4), os locais de ligação das moléculas de água, no interior da estrutura já se encontram ocupados, existindo uma maior competição pela incorporação das mesmas. Assim, ocorre uma interação mais superficial com as moléculas de água, resultando numa menor energia para a remoção das mesmas. Desta forma, as entalpias de vaporização diminuem, no caso de formas mais hidratadas, quando a HR do ambiente é maior.

A análise das misturas, após o armazenamento, na zona média do infravermelho foi executada, escolhendo-se as mesmas regiões espectrais já mencionadas anteriormente (920 cm^{-1} e 700 cm^{-1} e entre 1750 cm^{-1} e 1300 cm^{-1}), de forma a evitar a influência dos excipientes na análise.

Apenas para a formulação M5 (figura 25) se observaram diferenças espectrais resultantes da incorporação de moléculas de água na estrutura da OLZ. O espectro desta mistura após a exposição a 93% HR durante uma semana, apresenta maior semelhança com o espectro da forma dihidratada. Para os restantes espectros, a similaridade é maior com a forma anidra. Este resultado está de acordo com o que foi obtido por DSC, ou seja, o aumento de entalpia de vaporização observado para a mistura M5, com uma HR de 93%, refletiu-se na estrutura da OLZ. Por exemplo, é observável no gráfico o desvio da banda aos 745 cm^{-1} para 750 cm^{-1} , resultante das vibrações CH aromáticas fora do plano.

No caso das misturas restantes, o comportamento espectral não se alterou, mantendo-se o grau de similaridade com a forma polimórfica existente inicialmente, em maior quantidade. Ou seja, para as misturas M2 e M4, os espectros são semelhantes à forma dihidratada e o mesmo acontece para as misturas M1 e M3 em relação à forma anidra.

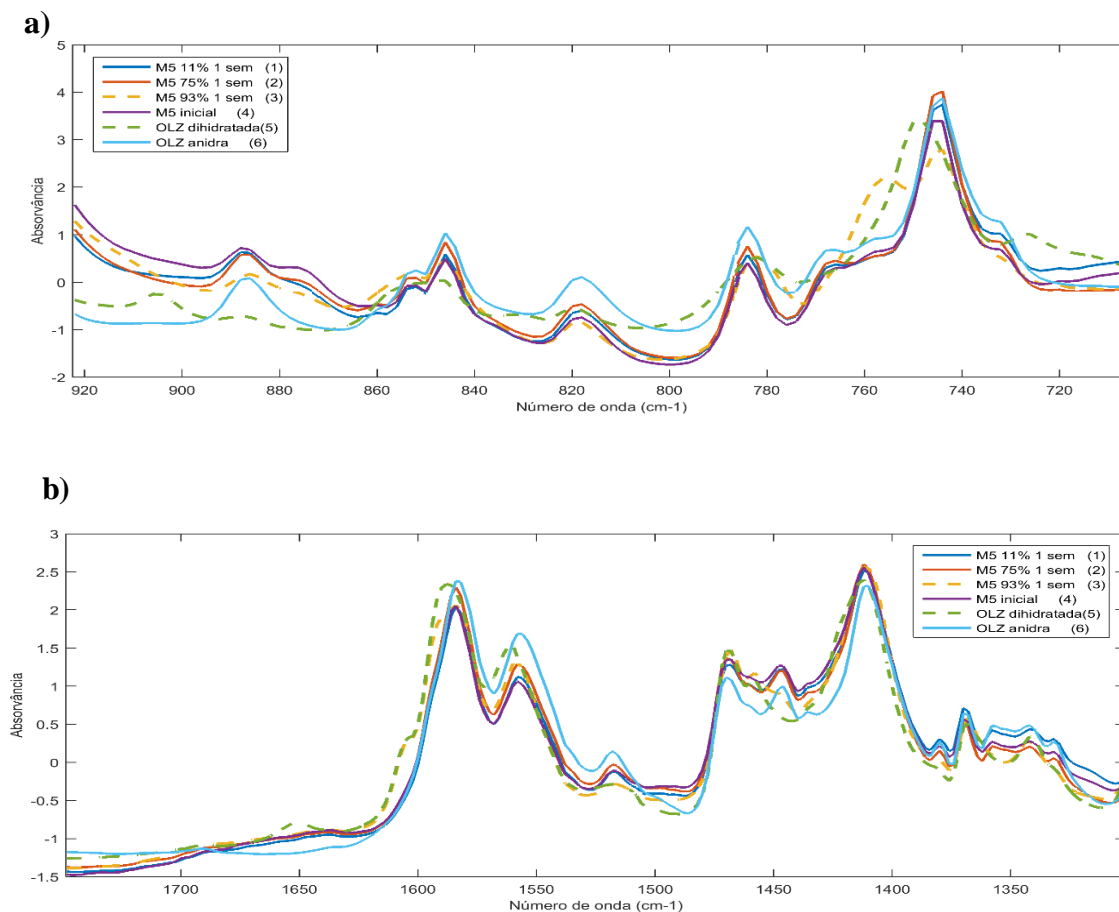


Figura 25 - Espectros MIR de pós para a formulação M5 exposta a diferentes HR para o tempo de armazenamento de uma semana. Regiões espectrais: a) 920 cm^{-1} até 700 cm^{-1} ; b) 1750 cm^{-1} até 1300 cm^{-1} . Espectros pré-processados com SNV.

As mesmas misturas foram também analisadas com espectroscopia NIR, de forma a avaliar a capacidade desta técnica de distinguir diferenças espectrais resultantes da exposição a diferentes HR.

Em relação aos espectros obtidos, não foram detetadas diferenças visuais. Deste modo, foram testados vários modelos PCA para as cinco misturas, separando-se os dois tempos de armazenamento utilizados, de forma a ter em conta a influência apenas da HR ambiente. Apenas as misturas M1, M2, M3 e M5 mostraram uma diferenciação nos scores, de acordo com a HR utilizada.

No caso da mistura M1 (figura 26) e para o tempo de armazenamento de uma semana, obteve-se um modelo PCA com dois componentes principais e 74% de variância capturada. A distinção para o primeiro componente, de acordo com as três HR consideradas é mais clara para esta primeira mistura após a primeira semana. No caso do tempo de armazenamento de um mês, o modelo obtido tem dois componentes principais e um valor semelhante de variância capturada (75%), no entanto a diferença observada entre as amostras é menor, distinguindo-se apenas as amostras armazenadas a 93% HR.

Para a mistura M2 (figura 27) também é observável uma separação das amostras de acordo com a HR, para o primeiro componente principal, sendo que neste caso, as amostras expostas a 93% também são as mais distinguíveis em relação aos restantes

grupos. A variância capturada foi de 92% neste caso, com um total de quatro componentes principais, ou seja, este modelo adapta-se melhor aos dados em comparação com os restantes casos.

As misturas M3 e M5 (figura 28, 29, 30 e 31) são as que apresentam uma menor distinção das amostras de acordo com a HR. No caso da mistura M5, apenas para o tempo de armazenamento de uma semana, é observável uma diferenciação para o primeiro componente, com uma diferença mais clara para as amostras armazenadas a 93%. O mesmo se observa para a mistura M3, que tanto para uma semana como para um mês de armazenamento, apenas para uma das HR existe uma distinção do restante grupo de amostras.

A análise na zona do infravermelho próximo permite assim, a deteção de diferenças existentes nas misturas, resultantes da quantidade de água retida por cada uma delas, de acordo com a HR a que foram expostas. Em relação às misturas M1 e M5, a tendência observada através de DSC, nomeadamente para o tempo de armazenamento de uma semana, foi confirmada com a espectroscopia NIR. O aumento ligeiro das entalpias de vaporização à medida que a HR aumenta, para o tempo de armazenamento de uma semana, influenciou os espectros obtidos sendo estas diferenças observadas nos scores.

Para a mistura M3, não existe uma tendência de aumento dos valores de entalpia com a HR, refletindo-se na pouca distinção observada nos scores, sendo que apenas para os 75% de HR com o tempo de armazenamento de uma semana existe uma maior separação deste grupo de amostras. Este resultado reflete o valor mais baixo de entalpia que já tinha sido obtido através de DSC.

No caso da mistura M2, a tendência decrescente dos valores de entalpia observada por DSC também introduziu diferenças espectrais detetáveis através de PCA.

A espectroscopia Raman também foi utilizada para estas misturas, no entanto não foram encontradas diferenças estruturais que se refletissem no espectro. Através da construção de modelos PCA, também não se observou nenhuma tendência nos resultados obtidos, confirmando-se assim, que em comparação com as restantes técnicas utilizadas, a espectroscopia Raman é a menos sensível a variações de humidade.

Conclui-se assim que a técnica NIR é a mais eficaz na monitorização e controlo de amostras expostas a percentagens de HR distintas.

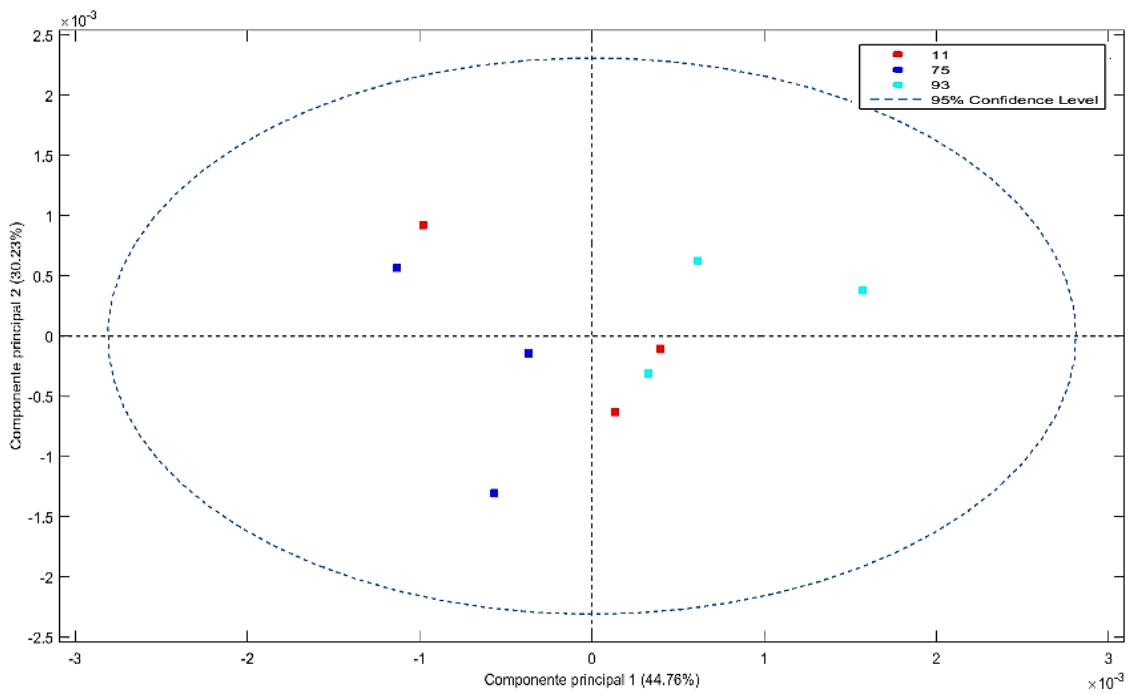
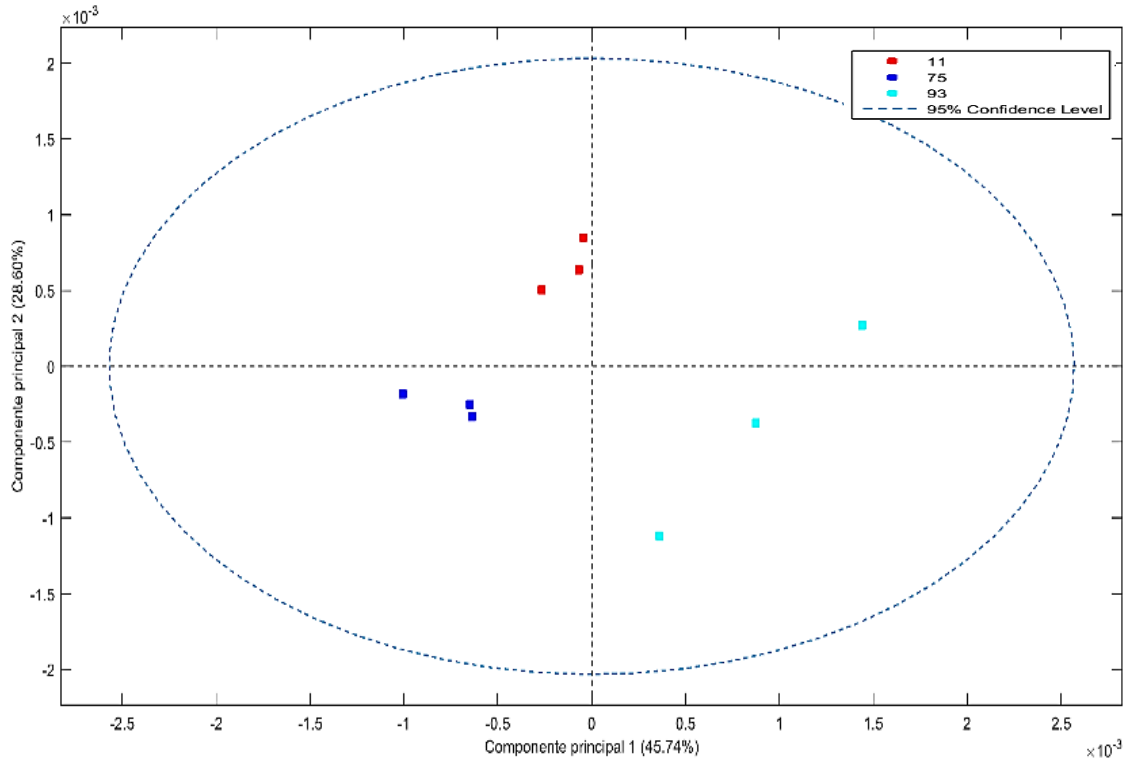


Figura 26 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M1 durante o tempo de armazenamento: uma semana (cima) e um mês (baixo). HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)

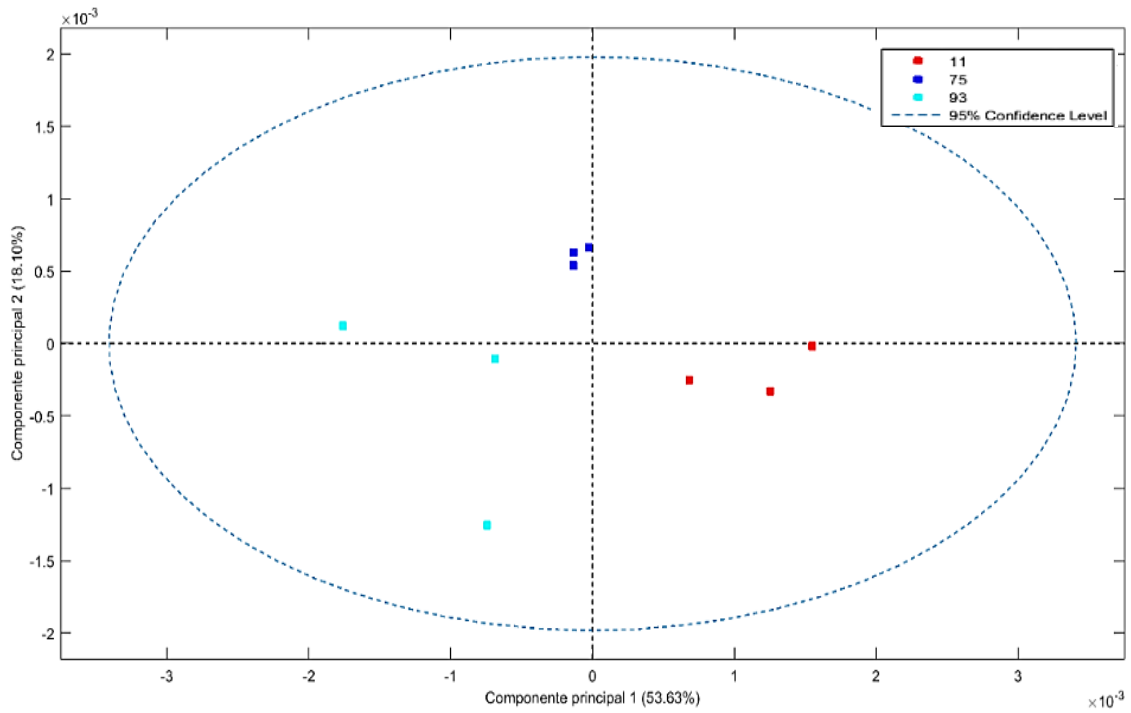


Figura 27 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M2 durante o tempo de armazenamento um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)

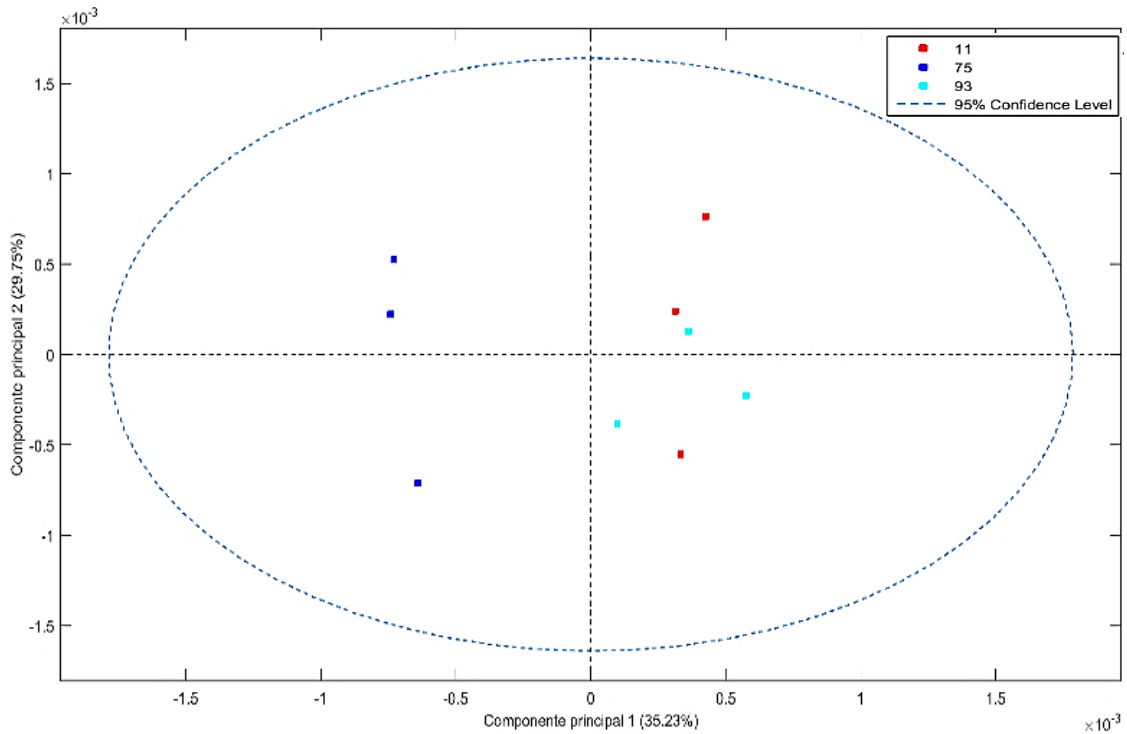


Figura 28 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M3 durante o tempo de armazenamento: uma semana. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)

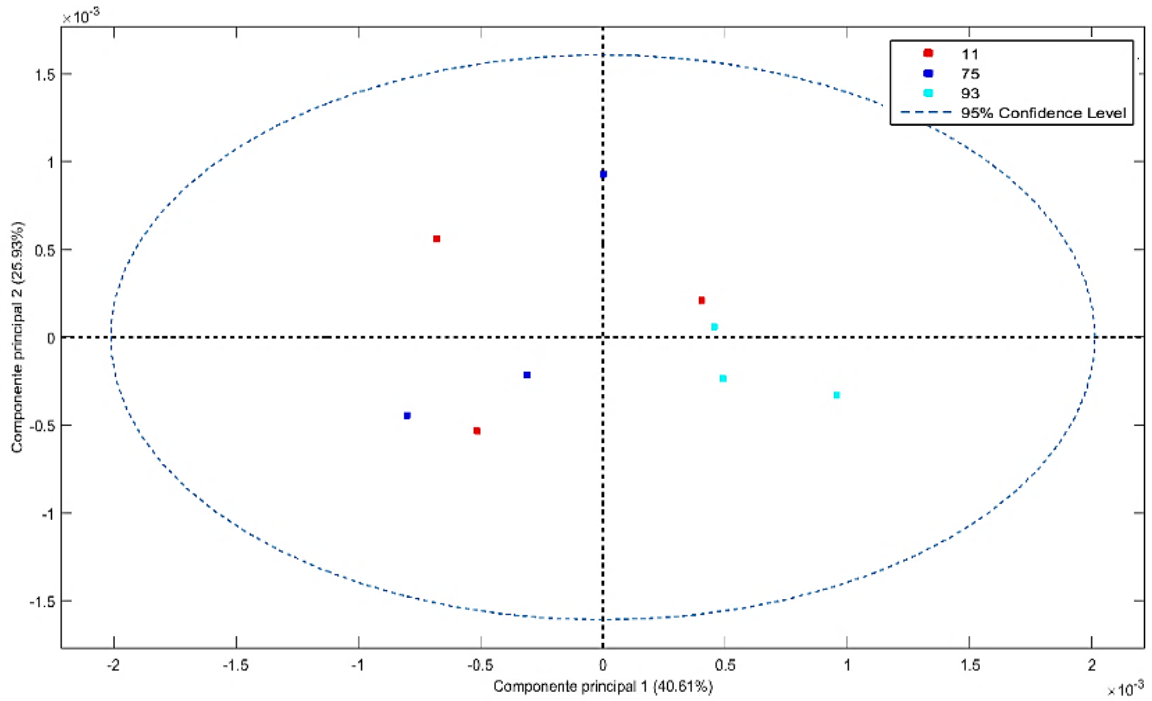


Figura 29 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M3 durante o tempo de armazenamento: um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)

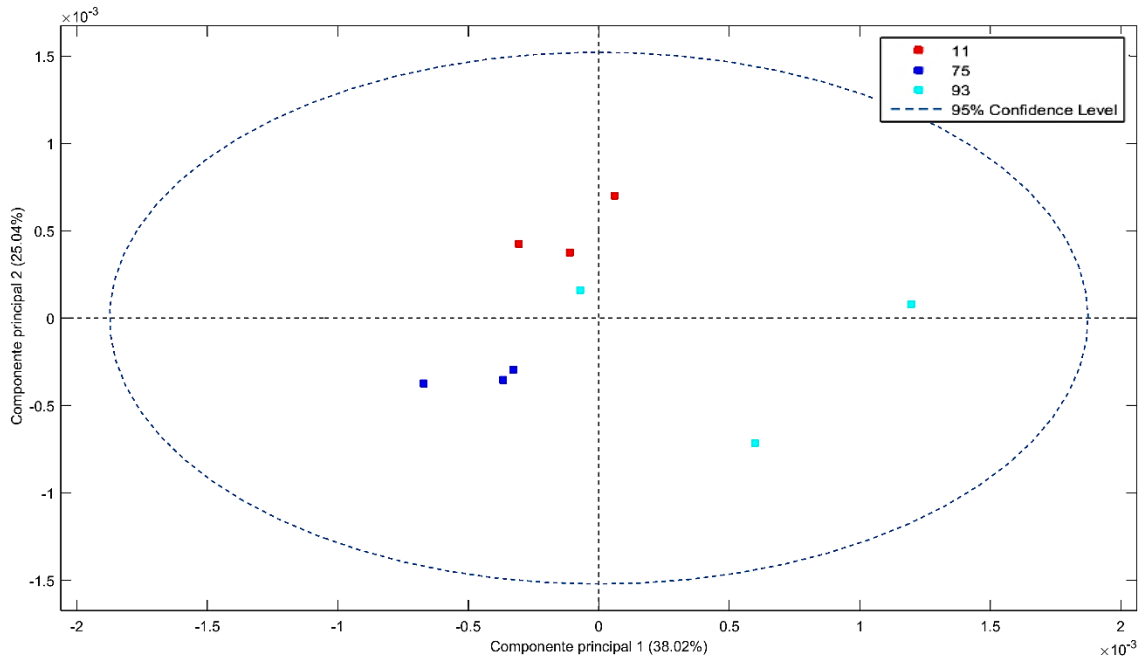


Figura 30 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M5 durante o tempo de armazenamento: uma semana. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)

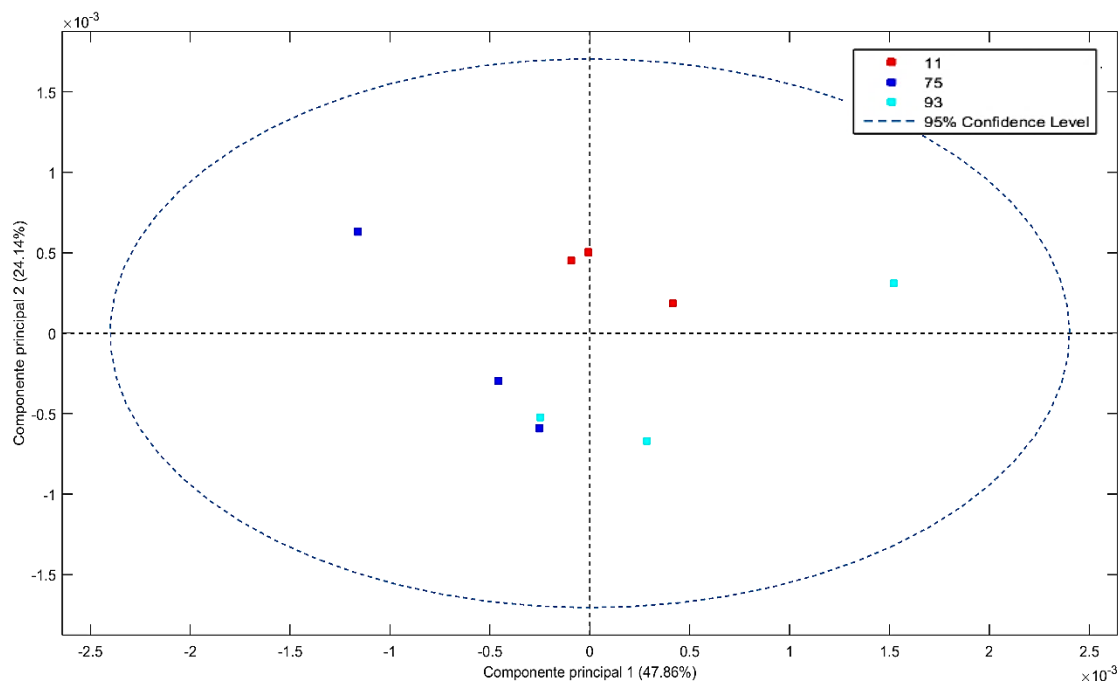


Figura 31 - Scores de modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para a formulação M5 durante o tempo de armazenamento: um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho)

Durante o processo de síntese do fármaco até ao armazenamento da forma farmacêutica final, pode ocorrer interação com moléculas de água, resultando na formação de hidratos. Estima-se que cerca de um terço dos fármacos formem hidratos e por isso o contacto com moléculas de água e o seu possível efeito no medicamento, tem que ser um fator a ser caracterizado durante do processamento. A quantidade de água absorvida por um sólido a determinada HR e temperatura, depende da afinidade química do mesmo e também da área de superfície específica disponível para essa interação. As propriedades físicas e químicas do sólido farmacêutico são dependentes da HR e por isso, o estudo e desenvolvimento de técnicas que permitam monitorizar os efeitos da exposição de amostras a determinadas condições de HR, torna-se fundamental para garantir a estabilidade final do fármaco [109].

Para as formulações produzidas, observou-se que apenas para misturas com uma maior quantidade de OLZ anidra se observa uma determinada tendência para uma semana de armazenamento, de aumento das entalpias de vaporização com a HR do ambiente, confirmando a eficácia do DSC na deteção de pequenas diferenças resultantes da quantidade de água absorvida por uma mistura. As frações variáveis de forma anidra I e dihidratada D usadas nestas formulações, resultam em flutuações da humidade do produto final. Para as misturas M2 e M4 este fator teve mais influência, visto que a sua maior percentagem de forma dihidratada D influenciou o perfil térmico obtido após o armazenamento. A diferença existente na absorção de água por parte das várias misturas depende, em grande parte, da sua estrutura cristalina. Como já foi visto anteriormente, a utilização de MIR permitiu uma caracterização inicial das duas formas polimórficas utilizadas e também das várias misturas produzidas. Através desta técnica é possível

atribuir várias bandas que resultam de uma característica estrutural da rede cristalina. De modo a ser estudado o efeito da hidratação das misturas, na sua estrutura, foram construídos vários espectros representativos de cada uma delas. A mistura M5 foi a única que se destacou em relação às restantes, pois foi a única onde se observou uma progressiva aproximação do seu espectro após um armazenamento de uma semana a 93%, ao espectro da forma dihidratada D. A organização molecular da forma anidra I tem semelhanças com a forma dihidratada D, no que diz respeito ao empilhamento dos dímeros na estrutura que ocorre da mesma forma nos dois casos, levando a que esta forma anidra I da OLZ se transforme em dihidratada D. Aquando da sua formação, as moléculas de água ocupam os espaços entre os dímeros, alterando a forma da célula unitária.

O recurso às técnicas NIR e Raman, permitiu avaliar a sua eficácia na monitorização e controlo da estabilidade da OLZ, durante processos que envolvem uma variação da HR do ambiente, como é caso de um processamento que envolva uma granulação por via húmida ou mesmo durante o armazenamento da forma farmacêutica final. Foi possível confirmar a eficácia da espectroscopia NIR na deteção de diferenças na humidade existentes nas amostras, nomeadamente, para o tempo de armazenamento de uma semana, em que se pode observar nos scores obtidos por PCA, uma distinção de três grupos de amostras representativas das três HR utilizadas. As amostras mantidas a 93% têm uma separação mais evidente em relação às restantes, no entanto esta distinção só corroborou os resultados obtidos por MIR no que diz respeito à mistura M5, que apenas continha a forma anidra, e possivelmente, a sua hidratação leva a diferenças estruturais mais facilmente detetáveis por MIR, em comparação com as restantes misturas. É possível inferir destes resultados, que a análise em infravermelho próximo é de facto a mais sensível a mudanças de HR nas amostras, visto que para além da mistura M5, permitiu detetar diferenças estruturais nas misturas M1 e M2, que não foram observadas em espectros MIR.

5.1.3. Análise do efeito do tempo de armazenamento

O armazenamento das cinco formulações produzidas, em três condições de HR diferentes, fez-se em dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês.

Analisando de uma forma geral, não se observa nenhuma tendência nos dados de entalpia referentes a um mês, contrariando o já observado para uma semana (Figura 16). Recorrendo a análise de variância, fez-se uma comparação geral de todas as entalpias de vaporização obtidas para uma semana de armazenamento *versus* um mês de armazenamento e obteve-se um valor de $p=0,5$ indicando que o fator armazenamento não leva a alterações estatisticamente significativas, no teor de água retido pelas amostras. Considerando-se individualmente cada HR, ou seja, comparando, por exemplo, apenas as amostras expostas a 11% durante uma semana *versus* um mês, também não se obtêm valores de p que revelem diferenças significativas entre as duas condições. Apenas para a mistura M1 se nota um ligeiro aumento da entalpia de vaporização, na condição de 93% durante uma semana em comparação com um mês (Figura 32). Esta diferença é confirmada por MIR (Figura 33) em que observa uma aproximação ao espectro da forma dihidratada D para o tempo de armazenamento de um mês. Em relação às restantes misturas, não são observadas quaisquer alterações estruturais detetadas por MIR. De

acordo com estudos anteriores realizados, apenas com as duas formas de OLZ puras, seria esperado um aumento dos valores de entalpia, nomeadamente a 93%, à medida que o tempo de armazenamento aumentasse [75]. No caso da formulação M5, que só é composta apenas pela forma anidra em conjunto com os restantes excipientes, esse aumento esperado, até seria mais significativo em comparação com as restantes formulações. No entanto é observável por DSC, que existe uma diminuição dos valores de entalpia contrariando o que era esperado obter-se. Um dos fatores que pode ter contribuído para este resultado está relacionado com a distribuição do tamanho de partícula. Aquando da produção das misturas, não foi feita uma tamisação das mesmas antes do armazenamento, o que pode ter contribuído para um alargamento da distribuição do tamanho de partícula para esta mistura. As partículas maiores têm uma área superficial específica menor e por isso, a interação com as moléculas de água também é menor, e o oposto ocorre para partículas menores. Assim, existe aumento na variabilidade de percentagens de humidade existentes nas diferentes amostras, resultando em valores de entalpia de vaporização diferentes do esperado.

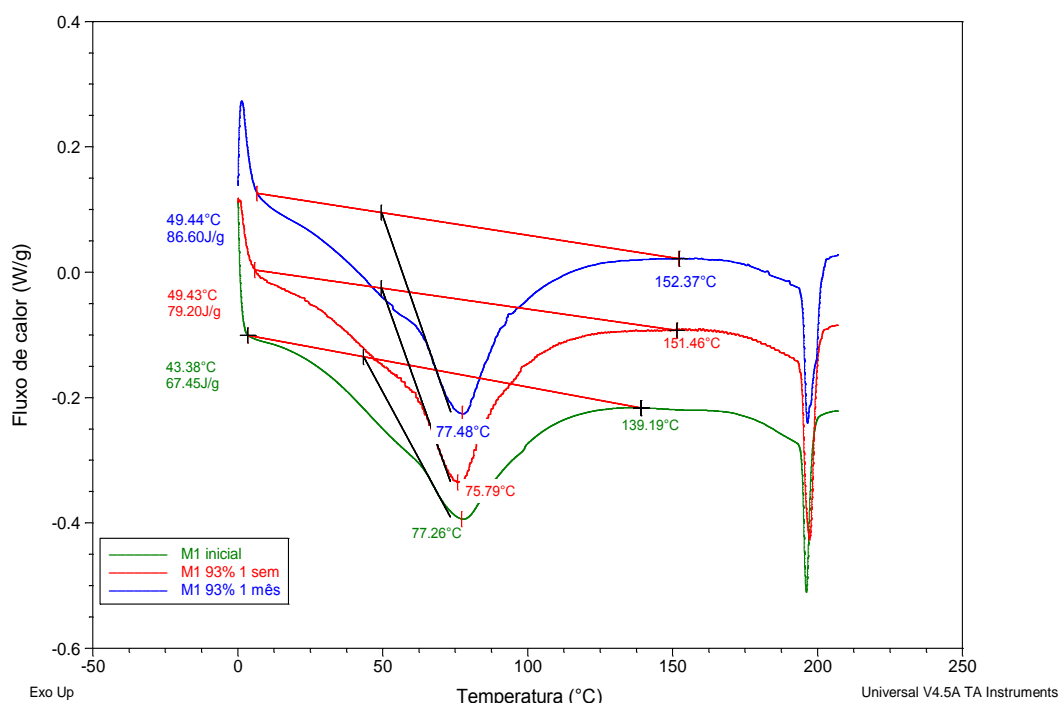


Figura 32 – Termogramas da formulação M1 produzida inicialmente (M1 HR ambiente) e exposta a 93% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês

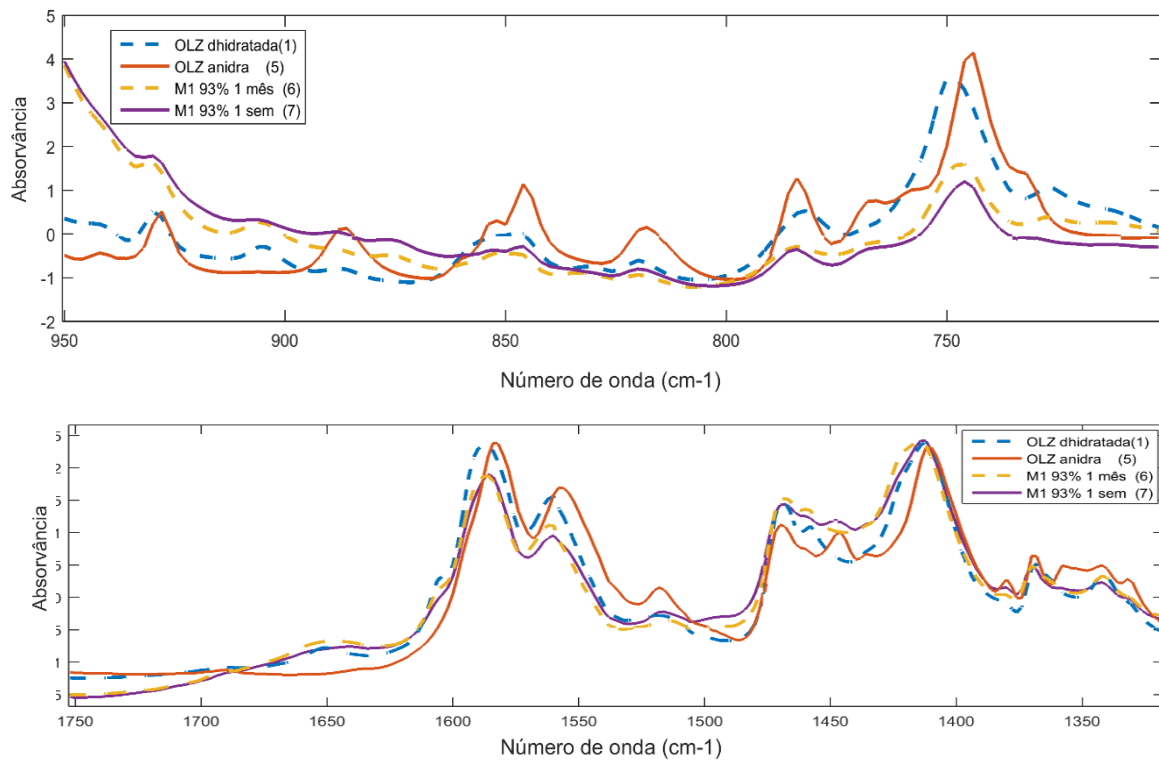
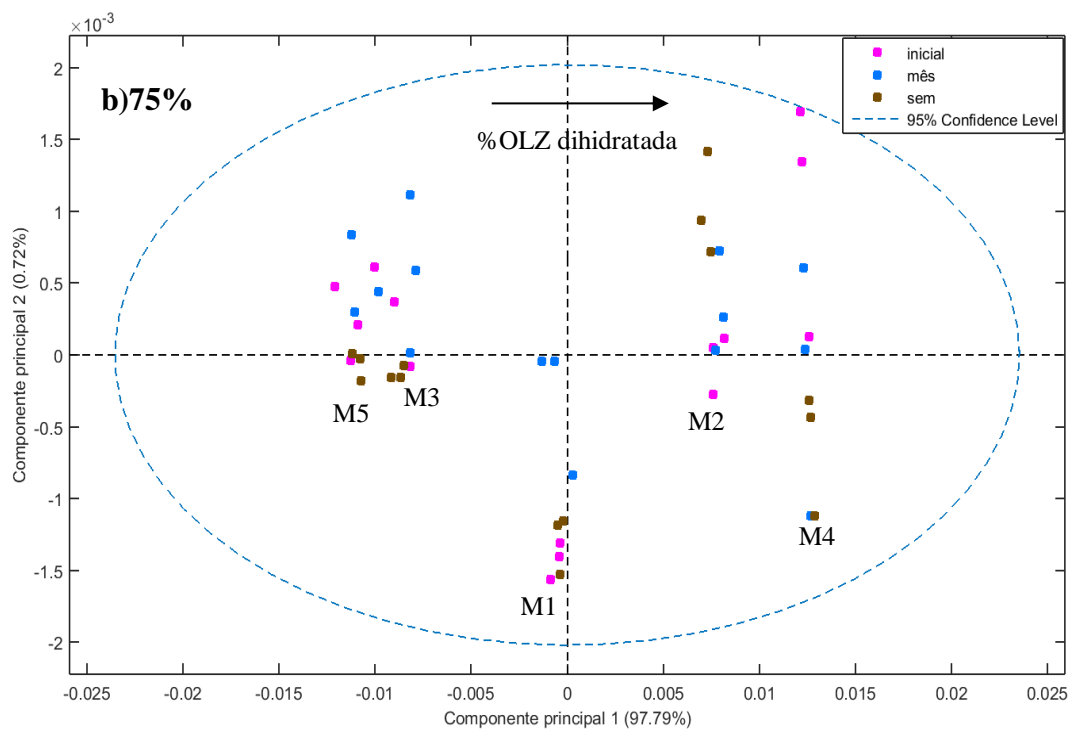
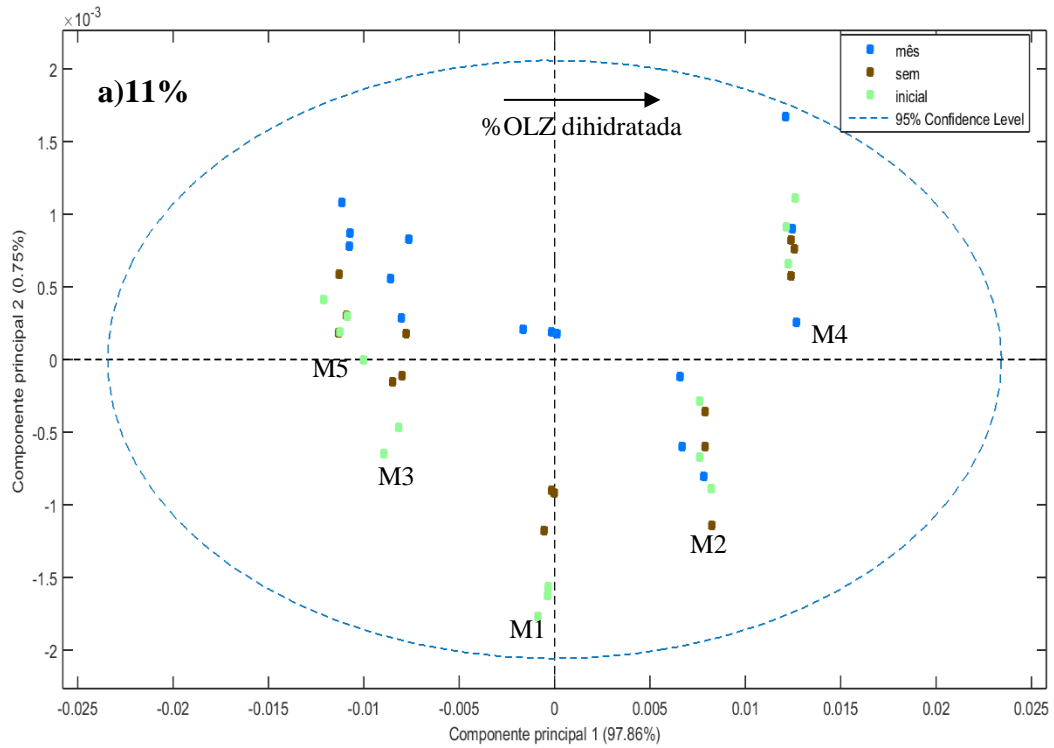


Figura 33 – Espectros MIR da formulação M1 exposta a 93% durante 2 tempos de armazenamento: uma semana e um mês. Regiões espectrais: 1:950 cm^{-1} até 700 cm^{-1} e 2:1750 cm^{-1} até 1300 cm^{-1} . Espectros pré-processados com SNV.

A construção de vários modelos PCA a partir de espectros NIR, permitiu detetar algumas diferenças relacionadas com o tempo de armazenamento, que anteriormente não tinham sido perceptíveis pelas restantes técnicas. Os *scores* da figura 34 correspondem às três HR e em cada um, estão presentes a cinco formulações produzidas. A distinção das formulações faz-se para o primeiro componente, sendo que este captura quase na totalidade, a percentagem de variância no modelo PCA, ou seja, a maior parte da variabilidade existente nos espectros está relacionada com o efeito da formulação, no entanto, é observável uma distinção das amostras para o segundo componente, relacionada com o tempo de armazenamento. É possível confirmar as diferenças já referidas para a formulação M1 armazenada a 93%, observando-se uma separação das amostras para os três tempos considerados.



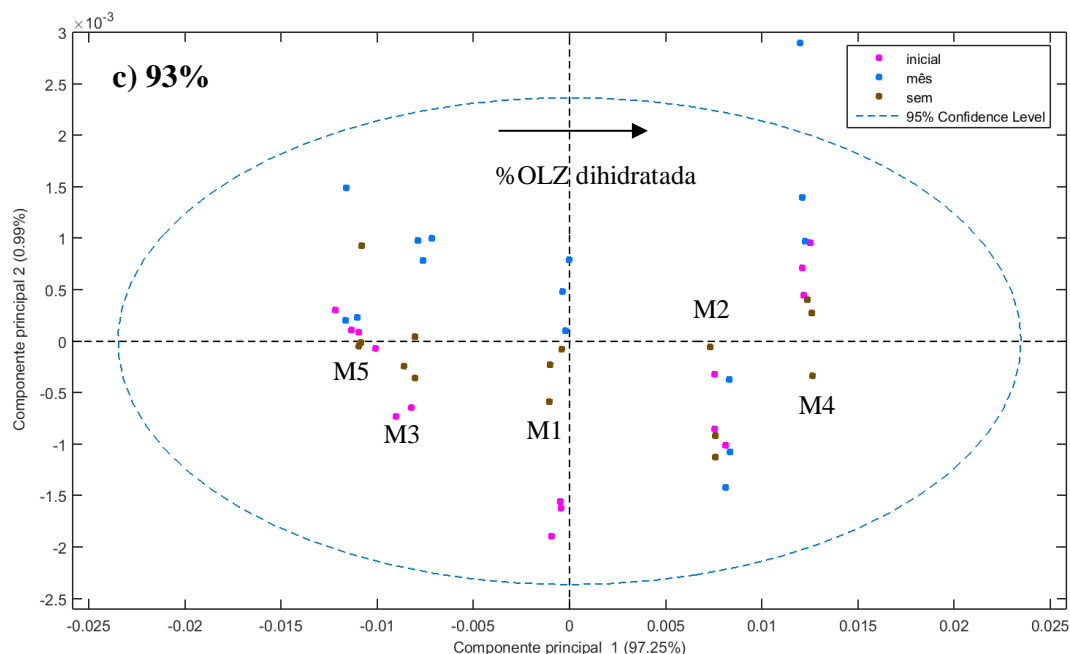


Figura 34 – Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de pós para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento, misturas iniciais e diferentes HR. Tempos de armazenamento: inicial (verde: 11%; rosa: 75% e 93%), uma semana (castanho), um mês (azul). HR: a) 11%; b)75%; c)93%.

No caso da formulação M1, esta diferença também é bastante clara para os 11% de HR, em que a existência de três grupos de amostras, é mais nítida em comparação com outras misturas. Este resultado está em concordância com o já observado através de DSC (Figura 35) com um aumento da entalpia de vaporização para esta mistura.

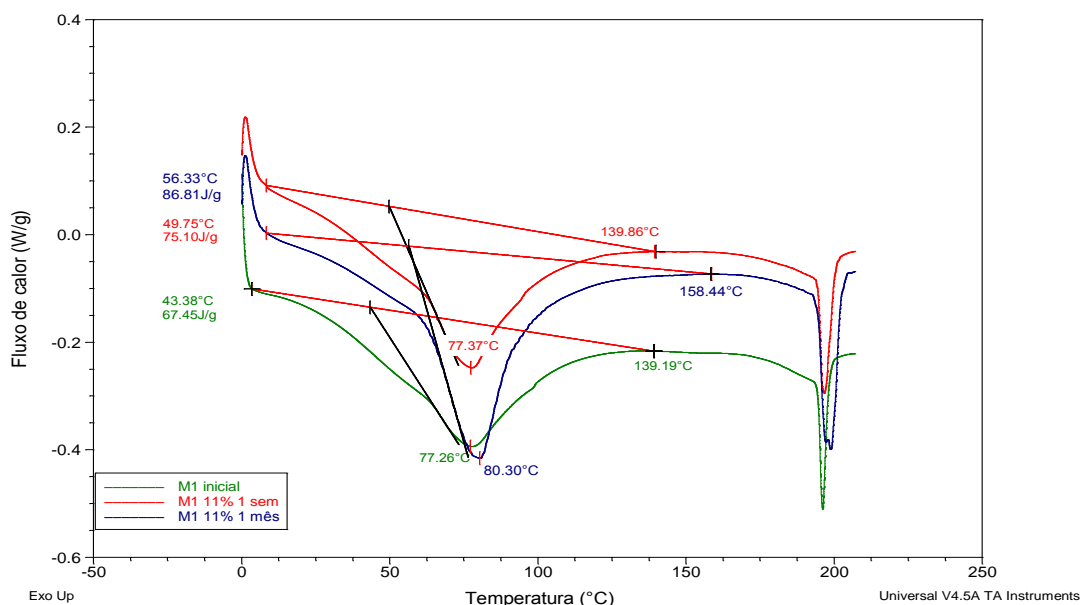


Figura 35 - Termogramas da formulação M1 produzida inicialmente (M1 HR ambiente) e exposta a 11% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês

As misturas M3 e M5 também apresentam uma distinção relacionada com o tempo de armazenamento. No caso da mistura M5 esta distinção é mais perceptível (Figura 36) visto que também tem uma diferença de entalpia, em termos absolutos, maior em comparação com a M3.

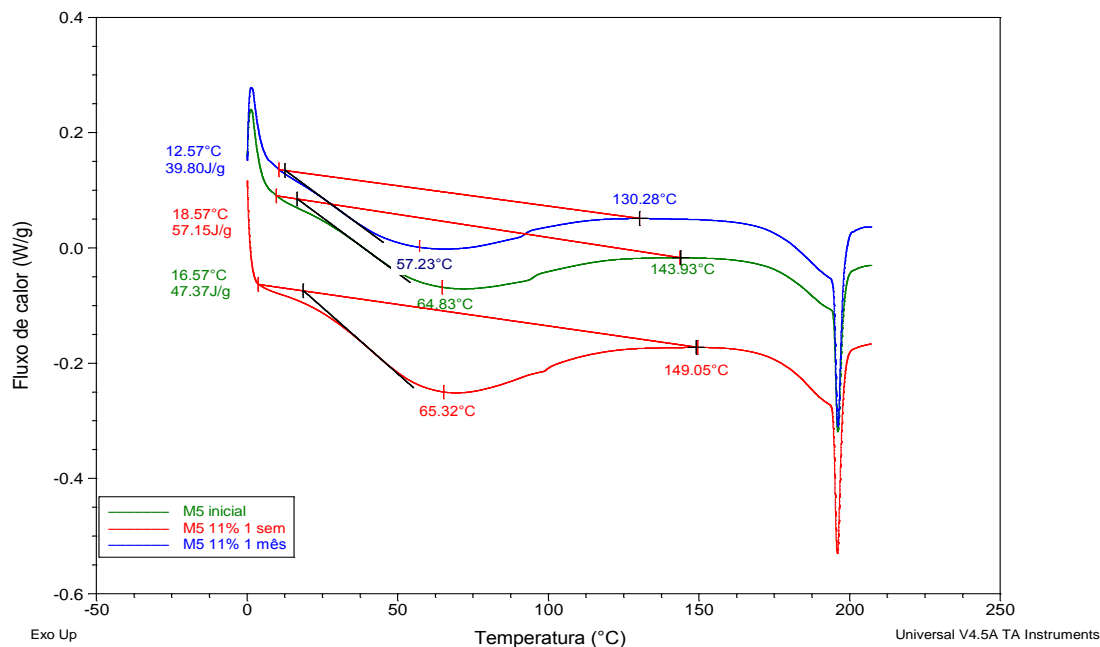


Figura 36 - Termogramas da formulação M5 produzida inicialmente e exposta a 11% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês

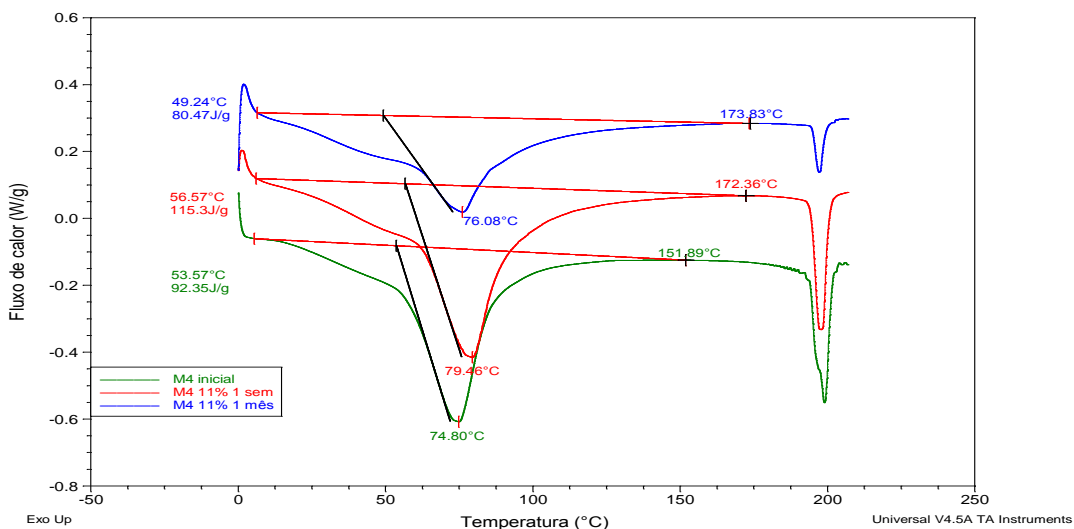


Figura 37 - Termogramas da formulação M4 produzida inicialmente e exposta a 11% durante dois tempos de armazenamento: uma semana e um mês

As misturas M4 e M2 apenas apresentam uma separação de amostras no modelo PCA para o segundo componente, a HR mais elevadas. No caso da formulação M4 existe uma diferença considerável nas entalpias obtidas para uma semana e um mês para a percentagem de HR de 11%, no entanto essa diferença não foi refletida em termos estruturais no espectro NIR.

Esta discrepância entre os resultados obtidos por DSC e a espectroscopia NIR, mantém-se para outras misturas, nomeadamente para formulações com menor quantidade de forma dihidratada D, como é o caso da formulação M5, que também apresenta diferenças entálpicas para outras HR, no entanto, só para 11% é que existe uma distinção por infravermelho próximo.

A existência de uma distribuição mais alargada do tamanho de partícula, que já foi referida anteriormente, em conjunto com a utilização de formulações com várias proporções de forma anidra I e dihidratada D de OLZ, pode ter influenciado os valores de entalpia obtidos para um mês de armazenamento, e por isso quando é feita a sua comparação com os resultados obtidos para uma semana, não se obtém uma relação concordante com análise espectral através de NIR. Para além disso, no caso dos resultados obtidos para um mês de armazenamento, existiu um intervalo temporal maior entre a medição por DSC e por NIR, podendo ter resultado em perdas de água que influenciaram o espectro NIR.

Apesar da disparidade existente em alguns resultados obtidos por NIR e DSC, conclui-se que estas duas técnicas são as mais eficientes a distinguir diferenças em amostras, provenientes da variação do tempo de armazenamento utilizado. Para o caso da espectroscopia NIR, a informação apresentada nos espectros é maioritariamente relacionada com as proporções distintas entre as quantidades de forma anidra e dihidratada, no entanto, é visível nos scores, que para algumas misturas existe a formação de dois grupos de amostras, tendo em conta o segundo componente do modelo. Esta diferenciação não foi conseguida através de MIR nem com a utilização de Raman.

Também é possível observar nos gráficos da figura 34, que para nenhuma das misturas existe distinção para o primeiro componente das misturas iniciais em relação às armazenadas a uma semana e em relação às misturas armazenadas há um mês. Tendo em conta que o primeiro componente permite separar as misturas segundo as proporções de forma anidra I e dihidratada D, conclui-se que para nenhum dos casos existe transformação de uma forma na outra, ou seja, a estabilidade da OLZ é mantida ao longo do tempo de armazenamento.

A existência de técnicas que permitam uma monitorização da forma sólida ao longo do armazenamento, é fundamental para garantir que as características do produto final não são afetadas. Neste caso, estas duas técnicas permitem controlar as diferenças na humidade apresentada pelas amostras, durante o armazenamento, sendo que para o caso da espectroscopia NIR, a sua maior relevância prende-se com o facto de poder ser em tempo real, permitindo uma mais eficiente caracterização dos produtos.

5.2. Análise de comprimidos

5.2.1. Análise do efeito de compressão

Após a produção de várias misturas em forma de pós e do seu armazenamento a diferentes HR, as mesmas foram transformadas em comprimidos, de acordo com o procedimento laboratorial referido. Esta forma farmacêutica constitui o produto final utilizado neste estudo e a sua análise foi feita através de duas técnicas: NIR e Raman. A força de compressão usada neste processo foi variada em dois níveis: 2 e 4 Ton e através da construção de vários modelos baseados nos resultados espectrais obtidos, é possível perceber a capacidade destas técnicas de distinguir diferentes forças de compressão.

Inicialmente, foi feita uma comparação entre os espectros NIR de pós e comprimidos obtidos para a mesma mistura (não mostrado). Visualmente, não foram detetadas diferenças entre os dois grupos de espectros considerados, no entanto recorrendo-se a uma análise PCA, é possível observar nos scores (Figura 39), uma separação clara para o segundo componente, entre os pós e os comprimidos. Este segundo componente tem uma variância capturada de 35%, sendo que o componente maioritário continua a ser o primeiro componente com uma variância de 60%, que separa as amostras de acordo com a quantidade de OLZ dihidratada, ou seja, tem em conta o fator da formulação. Este fator é o que contribui mais para a variabilidade nos espectros, como já foi visto anteriormente, no entanto, para este caso, parte dessa variabilidade está relacionada com alterações em algumas bandas, resultantes do processo de compressão. Analisando os *loadings* (Figura 38) para o segundo componente, observa-se que as regiões espectrais entre os 4500 cm^{-1} e os 4000 cm^{-1} , e entre os 6000 cm^{-1} - 5800 cm^{-1} são as que contribuem mais para as diferenças espectrais observadas nos scores, e correspondem respetivamente, às combinações e primeiros sobretons das ligações CH_x . Deste modo, o processo de compressão originou algumas diferenças na estrutura da rede cristalina, relacionadas, por exemplo, com mudanças nas vibrações das ligações que formam os anéis aromáticos, ou nas ligações do anel aromático com os restantes grupos. Estas alterações resultam numa mudança na rede tridimensional do cristal. A alteração da estrutura cristalina devido ao efeito da compressão já foi estudada para outras moléculas, como é o caso da cafeína, do naproxeno, entre outros [110], [111]. Para algumas destas entidades, observou-se alterações na orientação dos cristais e em alguns parâmetros da célula unitária. Assim, para além do efeito da humidade nas amostras, também tem que ser considerado o stress mecânico que a OLZ pode ser sujeita durante o processamento, nomeadamente, num processo de compressão, e que leva alterações polimórficas. As técnicas espectroscópicas, nomeadamente, a espectroscopia NIR, ganha especial importância, pois permitem detetar estas alterações de forma mais clara que outras técnicas.

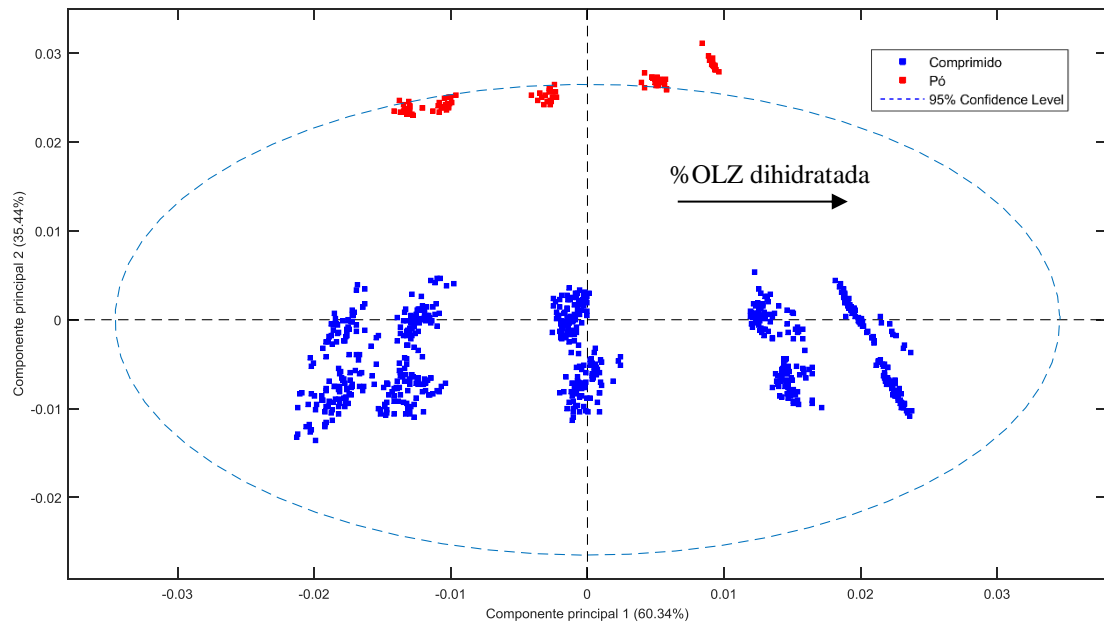


Figura 39 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos e pós para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Forma farmacêutica: pós (vermelho), comprimidos (azul).

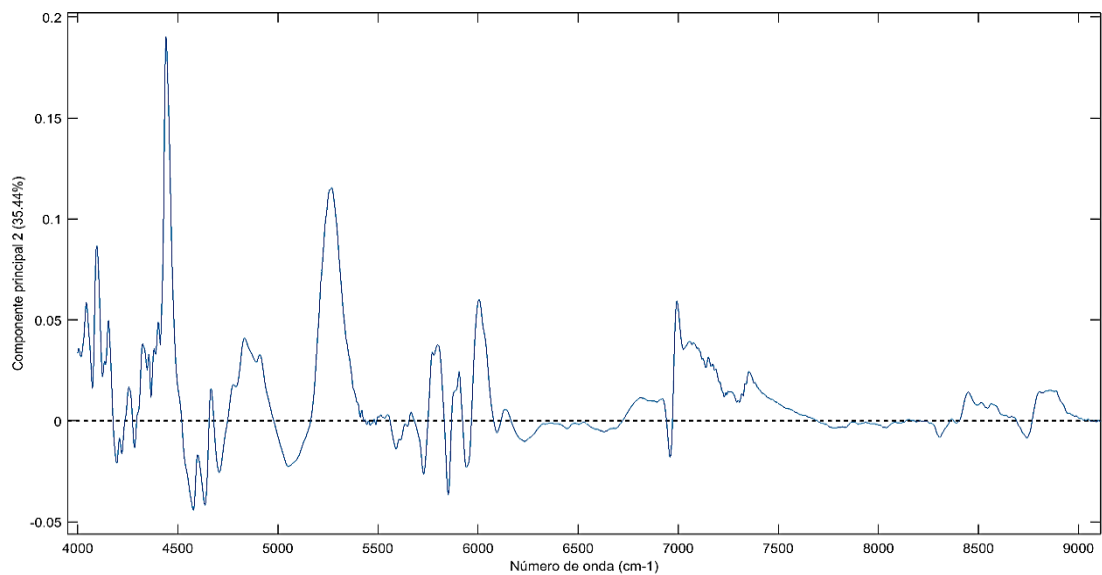


Figura 38 – Loadings do modelo PCA para o componente dois obtido a partir de espectros NIR de comprimidos e pós para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento

De seguida, foi avaliada a capacidade desta técnica de distinguir a utilização de duas forças de compressão na produção destes comprimidos. Para isso construiu-se um modelo PCA, com quatro componentes principais e uma variância capturada de 99%. A distinção das duas forças de compressão observa-se, de uma forma geral, para o segundo componente principal (Figura 40).

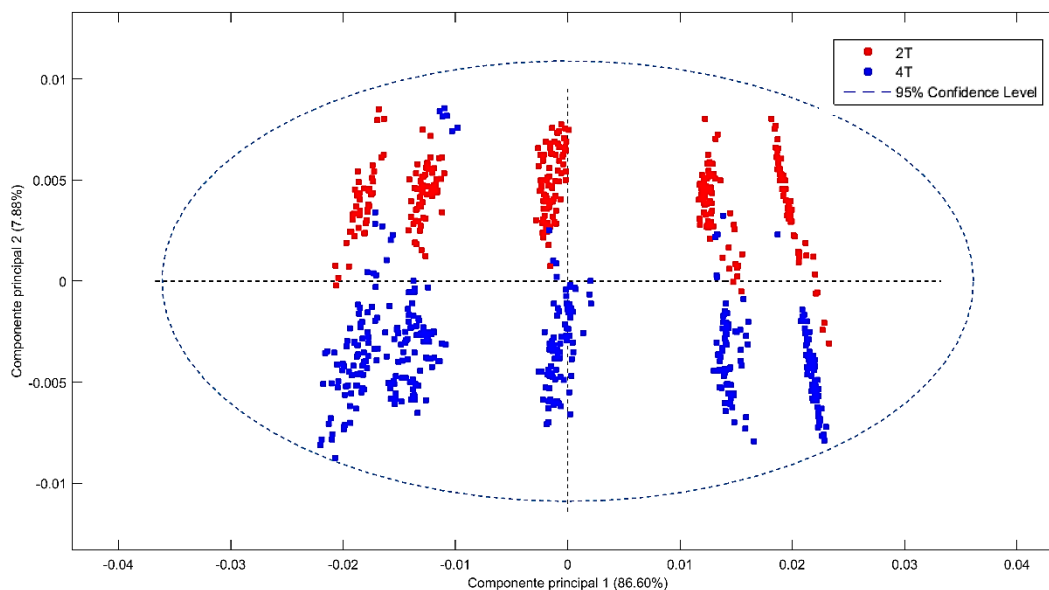


Figura 40 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Força de compressão: 2Ton (vermelho), 4Ton (azul).

A força de compressão afeta várias propriedades físicas dos comprimidos como, a sua dureza, friabilidade, tempo de desagregação ou velocidade de dissolução. Em relação à dureza dos comprimidos, existe, em geral, uma relação direta entre esta propriedade e a força de compressão, isto é, em geral, quanto maior a força de compressão utilizada, maior a dureza dos comprimidos produzidos. Por isso, este parâmetro é utilizado para controlar o processo de fabrico dos comprimidos, e é usado como indicador da força de compressão utilizada.

A variação da força de compressão provoca algumas mudanças no espectro NIR que se refletem na distinção observada nos scores. Ao contrário do que acontece com a monitorização da humidade nas amostras, em que existem alterações em algumas zonas do espectro relacionadas com a molécula de água, a alteração da força de compressão é responsável por diferenças na linha de base do espectro NIR, que podem ser observáveis no espectro (Figura 41). Existe um desvio do espectro para valores de absorvância maiores à medida que aumenta a força de compressão. Assim, esta técnica espectroscópica, pode ser utilizada para monitorizar alterações químicas existentes na estrutura cristalina, como a hidratação da mesma, mas também alterações nas propriedades físicas, como a dureza ou o grau de compactação (p.e. densidade) dos comprimidos.

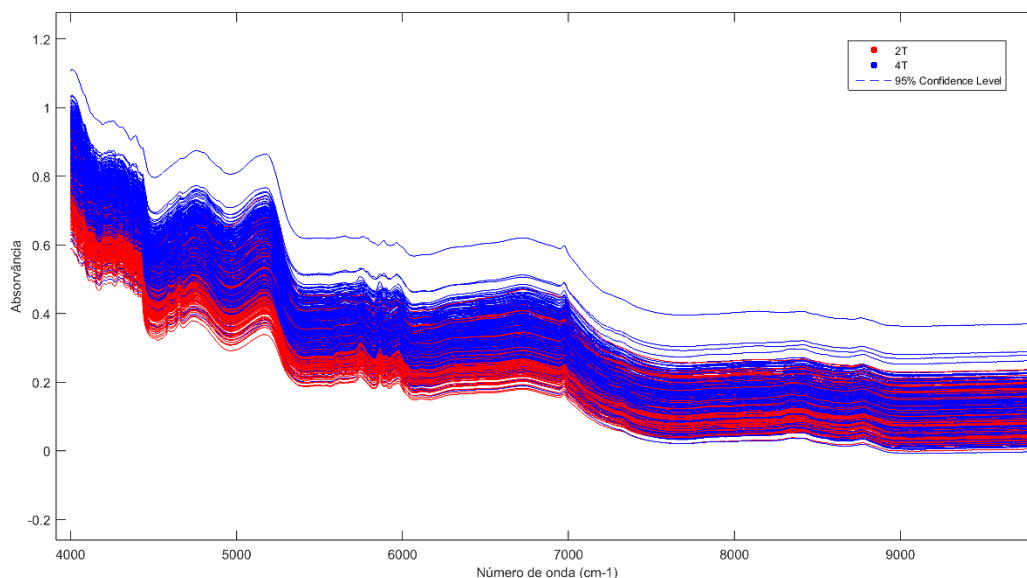


Figura 41 - Espectros NIR de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Força de compressão: 2Ton (vermelho), 4Ton (azul).

Por último, os espectros Raman obtidos foram analisados, de forma a avaliar a capacidade desta técnica na distinção das duas forças de compressão utilizadas. Foi obtido um modelo PCA com três componentes principais e um total de variância capturada de 92%. Através da análise dos scores (Figura 42), observa-se que não existe nenhuma distinção resultante da variação do fator em questão. De acordo com estudos anteriores, a distinção de diferentes forças de compressão apenas foi conseguida para comprimidos que apresentavam diferentes espessuras, diâmetros ou massas. Neste caso, todos os comprimidos foram produzidos com o mesmo punção e com a mesma massa, de forma a evitar estas diferenças. Deste modo, as alterações observadas nas ligações na estrutura cristalina devido apenas, à variação da força de compressão, não são suficientes para serem detetadas nos espectros Raman analisados por PCA. ([112]).

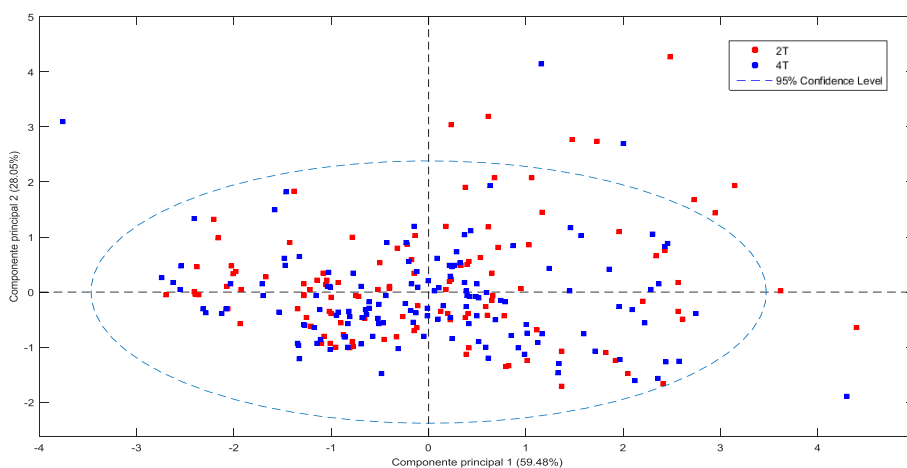


Figura 42 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros Raman de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. Força de compressão: 2Ton (vermelho), 4Ton (azul).

5.2.2. Análise do efeito da humidade relativa no armazenamento

A comparação da eficácia de duas técnicas espectroscópicas, como NIR e o Raman, na monitorização e deteção de alterações espectrais resultantes de diferentes formulações ou de HR distintas utilizadas no armazenamento, foi analisada para as misturas de pós, no entanto torna-se necessário compreender se essas alterações se mantêm no produto final produzido, após o processo de compressão. Assim, foi feita uma análise PCA de todos os espectros NIR obtidos para os comprimidos, apenas para uma força de compressão de 4 Ton. Obteve-se um modelo com quatro componentes principais e 99% de variância capturada. Nos scores (Figura 43), observa-se que apenas existe distinção de acordo com o primeiro componente, das diferentes misturas, sendo que não existe uma separação das amostras de acordo com a HR. A utilização de formulações que diferem na quantidade de OLZ anidra I / OLZ dihidratada D, torna-se o fator mais relevante para a distinção das amostras em NIR, sendo que, para as misturas de pós essa separação também era a mais visível em relação aos outros fatores.

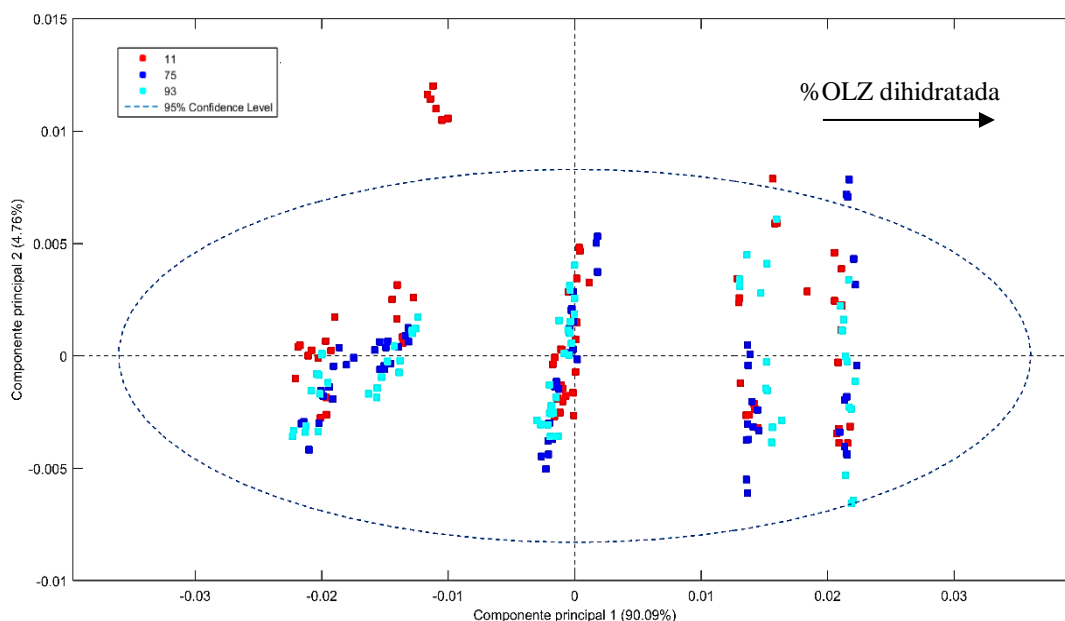


Figura 43 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).

Deste modo, é necessário analisar individualmente cada formulação, de forma a perceber a influência da HR e a eficácia de monitorização da técnica, para cada uma das misturas sem existir a interferência do fator relacionado com a formulação.

Apenas para as misturas M3 e M5 se observa alguma distinção provocada pela variação na HR durante o fabrico nos comprimidos.

No caso da mistura M3 e considerando o tempo de armazenamento de um mês, obteve-se um modelo PCA com cinco componentes principais (Figura 45), e observa-se uma ligeira separação para o segundo componente que representa apenas 18% da variabilidade espectral, das amostras expostas a 75%.

Para a mistura M5, a diferenciação dos três grupos de misturas apenas foi conseguida para o tempo de armazenamento de uma semana (Figura 44). Obteve-se um modelo com um total de dois componentes principais e para o segundo que representa apenas 6% da variabilidade espectral, existe a separação das amostras. Este resultado não é conclusivo acerca das diferenças existentes nesta mistura, pois o valor de variabilidade espectral obtido é muito baixo.

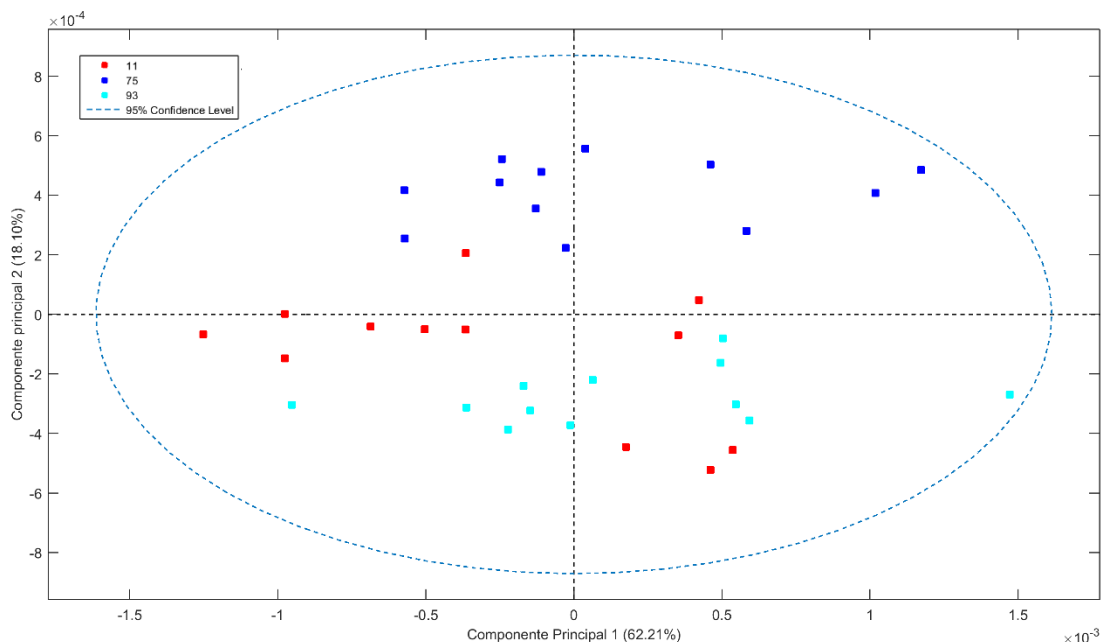


Figura 45 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para a formulação M3 durante o tempo de armazenamento: um mês. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).

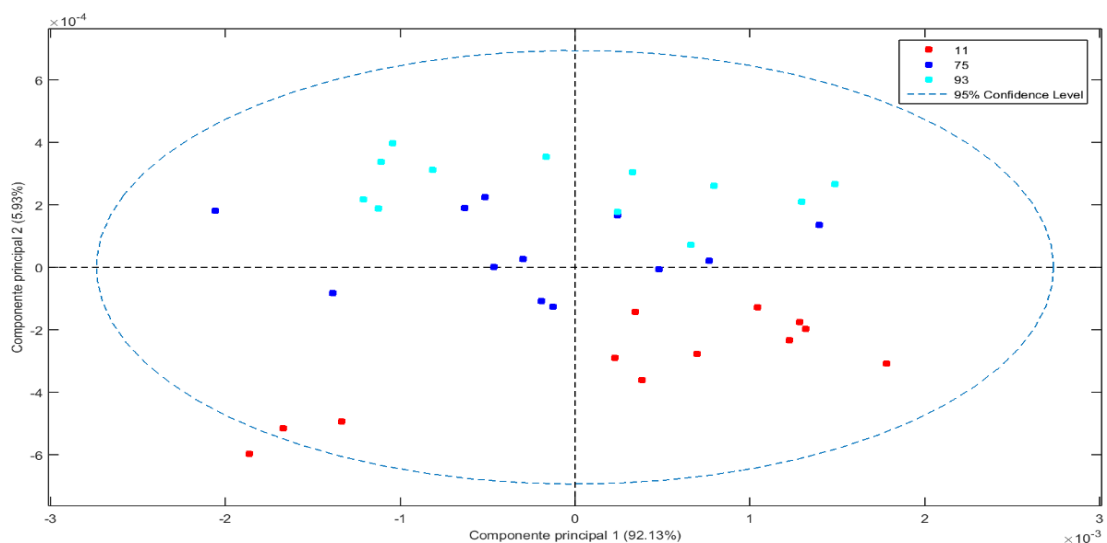


Figura 44 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros NIR de comprimidos para a formulação M5 durante o tempo de armazenamento: uma semana. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).

Os espectros Raman (figura 46) obtidos para os comprimidos produzidos à força de compressão 4 Ton, também foram analisados por PCA. Obteve-se um modelo com quatro componentes principais e um total de variância capturada de 93%. Os scores obtidos para os dois primeiros componentes, encontra-se na figura 47 e é possível observar que não existe qualquer distinção entre as amostras. Este resultado está de acordo com o já observado anteriormente, confirmando que esta técnica é pouco sensível às variações de água nas amostras, não sendo adequada para ser utilizada na monitorização da HR das mesmas.

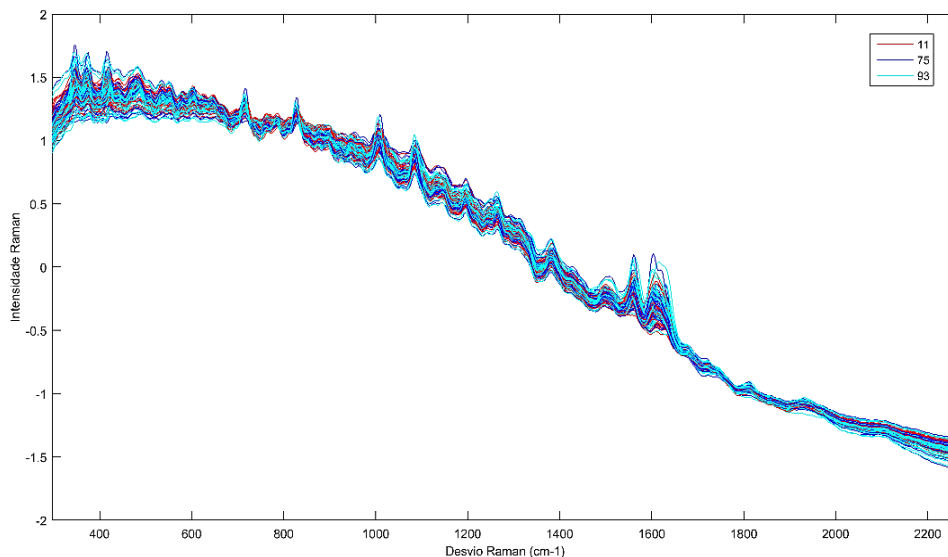


Figura 46 - Espectros Raman de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho). Espectros pré-processados com SNV.

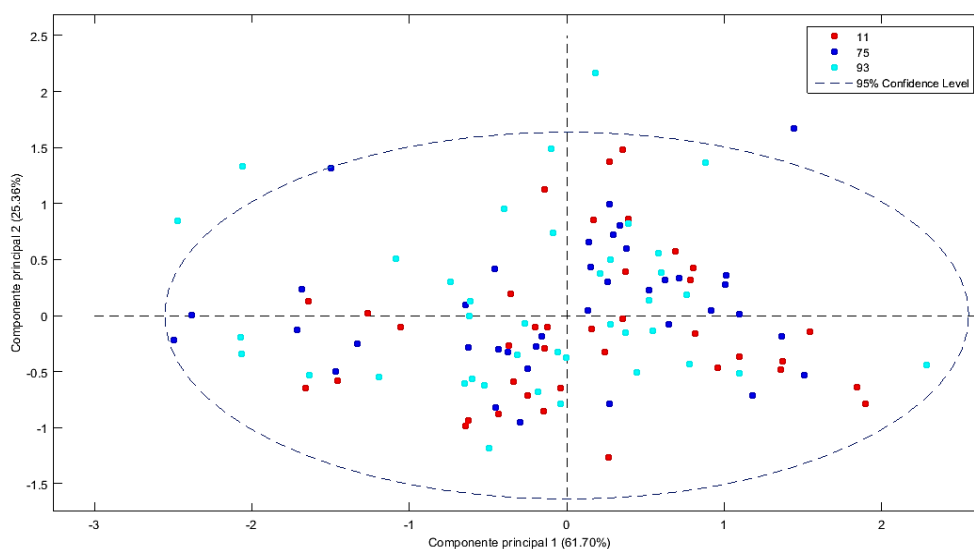


Figura 47 - Scores do modelo PCA obtido a partir de espectros Raman de comprimidos para todas as formulações e para os dois tempos de armazenamento. HR (%): 11 (vermelho), 75 (azul), 93 (azul marinho).

5.2.3. Ensaios de dissolução

Os ensaios de dissolução são utilizados como um requisito para as formas farmacêuticas sólidas de administração oral. Permitem que ao longo das várias fases de desenvolvimento do fármaco e, também para o produto final, seja demonstrado que a taxa de libertação da substância ativa é satisfatória e está dentro dos limites estipulados. Assim, este procedimento pode ser utilizado durante o controlo de qualidade em processo ou final, para monitorizar a estabilidade e assegurar a consistência no desempenho do produto ao longo do tempo e entre lotes, mas também é utilizado numa fase inicial, no desenvolvimento de novas formulações e na previsão da performance *in vivo* do produto (estabelecimento das correlações IVIVC's). Ao longo do processo de produção existem vários fatores críticos que podem influenciar a qualidade final do produto, tais como, alterações na formulação, no processo de fabrico ou condições de armazenamento. [93], [113].

Durante este estudo, foi avaliado, numa primeira fase o efeito da força de compressão e da formulação nos perfis de dissolução da OLZ dos comprimidos. As figuras 48 e 49 mostram os perfis de dissolução das misturas produzidas inicialmente, com a distinção entre as duas forças de compressão.

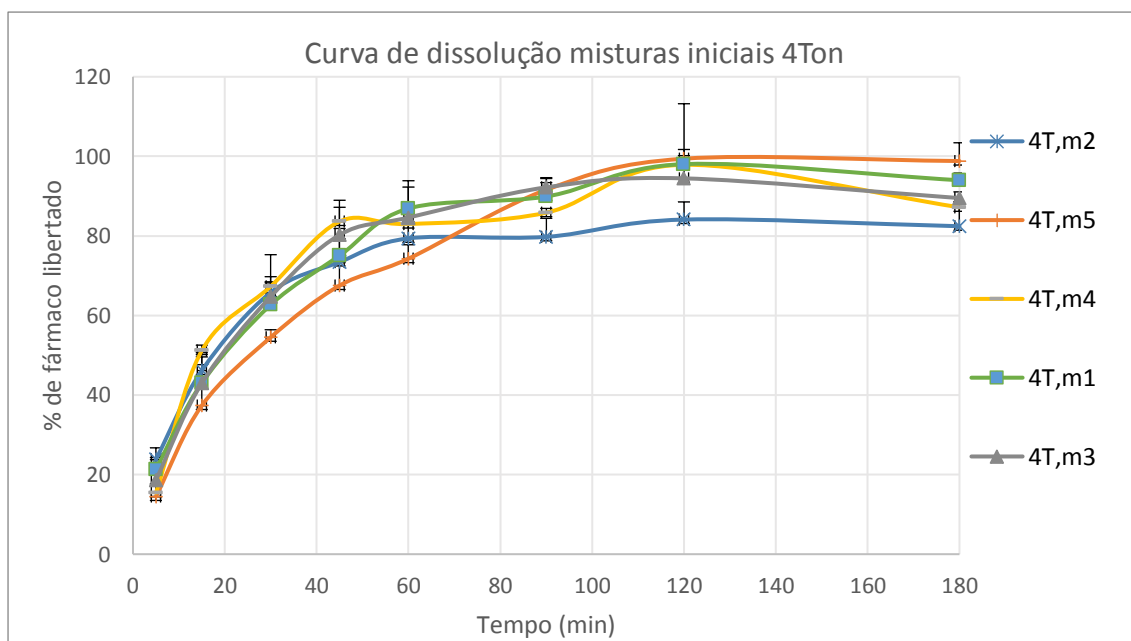


Figura 48 - Perfis de dissolução das formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).Força de compressão 4Ton.

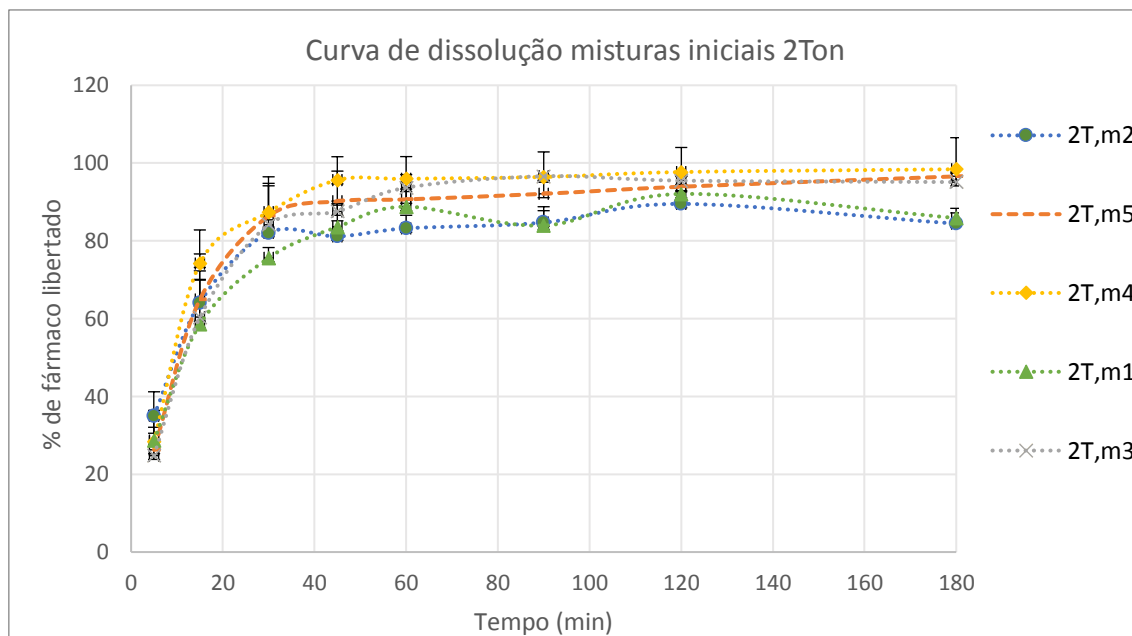


Figura 49 - Perfis de dissolução das formulações iniciais com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%;M4:100%/0%; M5:0%/100%).Força de compressão 2Ton

O teor de fármaco libertado para os comprimidos produzidos a 4 Ton varia entre 84%-100%, enquanto que para 2 Ton o intervalo de valores fica compreendido entre 89%-99%. Em relação aos valores de T50 (Tempo necessário para atingir o teor de libertação de fármaco de 50%), a diferença existente entre as duas forças é mais notória, com uma variação de 10 a 12 minutos para o caso de 2 Ton e 14 a 24 minutos, no caso dos comprimidos produzidos a 4 Ton. Assim, para uma força de compressão maior, a dissolução dos comprimidos é mais lenta. A diminuição da velocidade de dissolução pode ser consequência do aumento da dureza e densidade do comprimido, que levam a uma redução da sua porosidade e consequentemente a uma menor penetrabilidade do solvente, mas também pode estar relacionada com uma desagregação mais lenta dos comprimidos produzidos a 4 Ton. Geralmente, comprimidos produzidos a forças de compressão maiores têm tempos de desagregação maiores e por isso, a sua dissolução acaba por ser retardada. Assim, os ensaios de dissolução deviam ter sido complementados com um estudo de desagregação prévio, de modo a se perceber se a menor velocidade de dissolução está também relacionada com o tempo de desagregação.

Os perfis de dissolução foram comparados através do parâmetro de similaridade f_2 (Tabela 7) e pode ser observado que apenas para dois dos casos (M4 e M5), existem valores menores que cinquenta, indicando que os perfis de dissolução são globalmente semelhantes. Apenas para as duas formulações que contêm uma das formas da OLZ na formulação, existe diferença nos perfis de dissolução das duas forças de compressão (Figura 50). É observável na figura 50 que, nos primeiros cem minutos, a velocidade de dissolução dos comprimidos produzidos a 2 Ton, de ambas as misturas, é superior comparativamente à velocidade de dissolução dos comprimidos produzidos a 4 Ton. A existência na formulação de apenas uma das formas da OLZ, pode gerar diferenças maiores nos perfis obtidos, em comparação com valores intermédios dos dois polimorfos

utilizados, em que esta diferença se mantém, mas de forma menos notória, não sendo estatisticamente significativa.

Tal como referido anteriormente, esta distinção também pode ser consequência de tempos de desagregação diferentes destas duas misturas em relação às restantes.

Tabela 7- Comparação das duas forças de compressão (2T e 4T) a que foram sujeitas as cinco formulações iniciais, com recurso ao valor de f2

Comparação de formulações	f2 (%)
M1 2T vs M1 4T	54,1
M2 2T vs M2 4T	51,7
M3 2T vs M3 4T	51,0
M4 2T vs M4 4T	44,5
M5 2T vs M5 4T	39,1

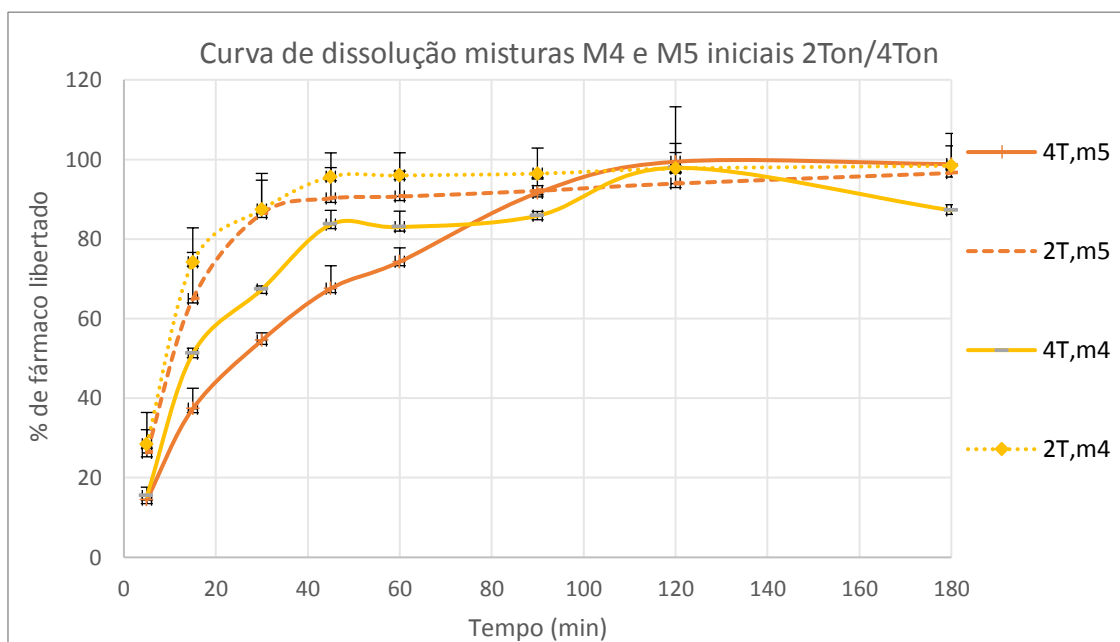


Figura 50 - Perfis de dissolução das formulações M4 e M5 (M4:100%/0%; M5:0%/100%).Força de compressão 2T/4T

O efeito da formulação nos perfis de dissolução também foi estudado, de forma a perceber-se a influência da quantidade de OLZ dihidratada D na velocidade de libertação do fármaco.

Inicialmente, foi feita uma comparação das misturas que contêm apenas uma das formas polimórficas na sua constituição. Para a mistura M4, o teor de fármaco libertado foi de 98% ambas as forças de compressão (4 Ton e 2 Ton) e no caso da mistura M5, os valores variam entre 99% para a força de compressão 2 Ton e 100% no caso dos

comprimidos produzidos a 4Ton. Relativamente à velocidade de dissolução, os valores apresentados para cada uma das misturas têm uma diferença mais notória. No caso da mistura M4, os valores de T50 variaram entre 9 min para os comprimidos produzidos a 2 Ton e 14 min no caso da produção a 4 Ton. A mistura M5 apresenta valores superiores de dissolução. Os comprimidos produzidos a 2 Ton têm um T50 de 10 min e no caso da força de compressão a 4 Ton, o T50 foi de 26 min.

Assim, pode-se concluir que misturas com uma maior quantidade de OLZ dihidratada D têm uma dissolução mais rápida, sendo que esse efeito é mais notório para a força de compressão de 4 Ton. A forma hidratada da OLZ têm uma estabilidade termodinâmica maior, o que pode resultar em comprimidos mais frágeis, com velocidades de dissolução maiores. De acordo com uma regra semi-empírica desenvolvida por Summers et al. (2004) durante os anos 70, os polimorfos mais estáveis, devido à sua densidade de empacotamento das partículas mais elevada, têm uma ligação mais forte entre as partículas, no entanto a deformação necessária para formar o comprimido torna-se mais difícil. Como o aumento da área de superfície de ligação que resulta da deformação das partículas, tem um impacto maior na resistência dos comprimidos que a força de ligação entre as partículas, a estabilidade do composto hidratado resulta em comprimidos mais frágeis [30].

As restantes misturas (M1, M2 e M3) (Figura 51) apresentam perfis de dissolução semelhantes entre si, nomeadamente nos valores de T50 observados. A mistura M2, que tem maior proporção de forma hidratada, apresenta uma velocidade de dissolução maior, à semelhança do que foi observado para a mistura M4, com um T50 de 9 min para a produção a 2 Ton e de 18 min para a produção a 4 Ton. No caso das misturas M1 e M3, a velocidade de dissolução é um pouco maior, em concordância com o observado para a mistura M5, obtendo-se valores de T50 de 12 min para ambas as misturas produzidas a 2 Ton, e de 20 min para ambas as misturas produzidas a 4 Ton. No que diz respeito ao teor de fármaco libertado, as misturas M1 e M3 tem valores próximos do já observado para M4 e M5, com o intervalo de valores entre 94% e 100%, considerando as duas forças de compressão. A mistura M2 tem uma libertação de fármaco um pouco menor, que variou entre 84% para a força de compressão 4 Ton e 89%, considerando-se 2 Ton.

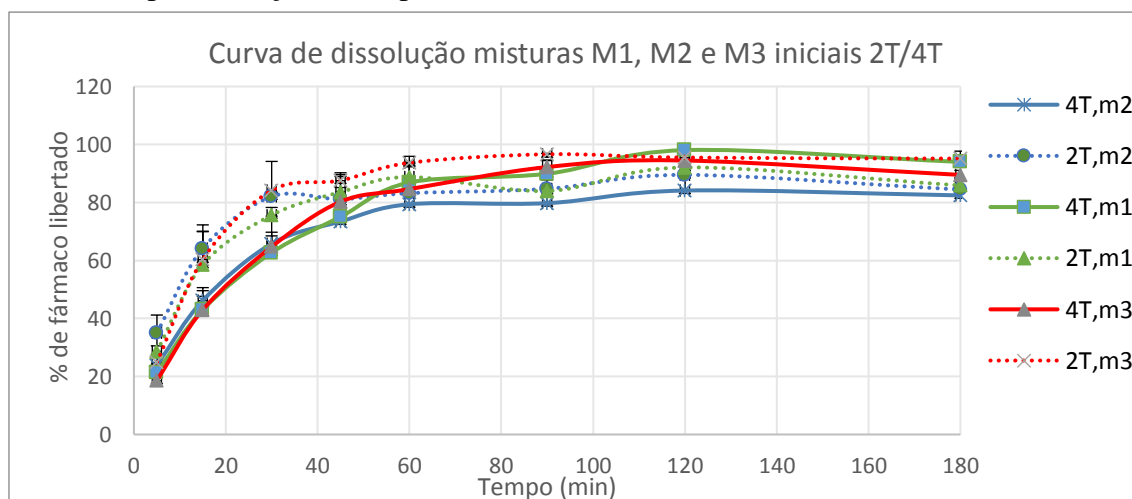


Figura 53 - Perfis de dissolução das formulações M1, M2 e M3 com diferentes proporções forma dihidratada D/forma anidra I (M2:82%/18%; M1: 50%/50%; M3:18%/82%); Força de compressão 2T/4T

Na tabela 8 estão representados os valores de f_2 que permitem a comparação dos perfis de dissolução das várias formulações, e apenas para uma mistura e no caso da força de compressão 4 Ton, se obtêm valores menores que 50, indicando que, globalmente, a quantidade de OLZ dihidratada D existente na formulação, não tem influência na velocidade de dissolução dos comprimidos. As diferenças observadas, neste caso, nos perfis obtidos não são estatisticamente significativas e por isso, conclui-se que a hidratação do fármaco não afetou o ensaio de dissolução.

Tabela 8 - Comparação das cinco formulações iniciais considerando duas forças de compressão constantes, com recurso ao valor de f_2

Comparação de formulações iniciais	4Ton	2Ton
	f_2 (%)	
M1 vs M2	57,0	69,3
M1 vs M3	75,9	60,0
M1 vs M4	63,6	50,7
M1 vs M5	60,0	59,8
M2 vs M3	59,0	56,0
M2 vs M4	58,1	50,5
M2 vs M5	50,0	58,3
M3 vs M4	42,1	62,7
M3 vs M5	56,6	77,6
M4 vs M5	51,5	67,8

Após a avaliação da influência da formulação e da força de compressão nos perfis de dissolução obtidos, foi avaliado o efeito do armazenamento a determinada HR, na velocidade de libertação do fármaco. Através da análise de PCA feita aos comprimidos (capítulo 5.2.2), foram selecionadas duas misturas para as quais se observaram diferenças entre as amostras relacionadas com a HR, e por isso, foi testado se essas diferenças tinham impacto na dissolução do fármaco.

Nas figuras 52 e 53 encontram-se os perfis de dissolução obtidos e é possível observar que em ambos os casos, os perfis são bastante semelhantes entre si. Através do cálculo do fator de similaridade f_2 é possível quantificar a semelhanças observadas. Na tabela 9 encontram-se os valores obtidos para este parâmetro e verifica-se que são todos superiores a 60, confirmando-se que a HR a que foram expostas as amostras não teve influência na velocidade de dissolução da OLZ.

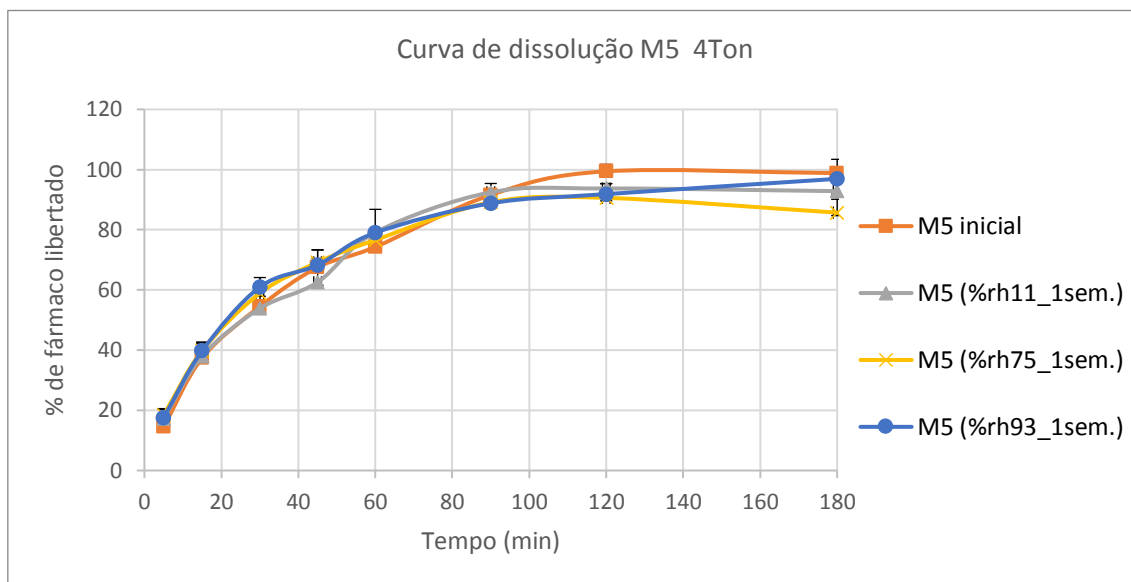


Figura 57 – Perfis de dissolução da formulação M5 (100% forma anidra) sujeita a diferentes valores de HR, para o tempo de armazenamento de uma semana.

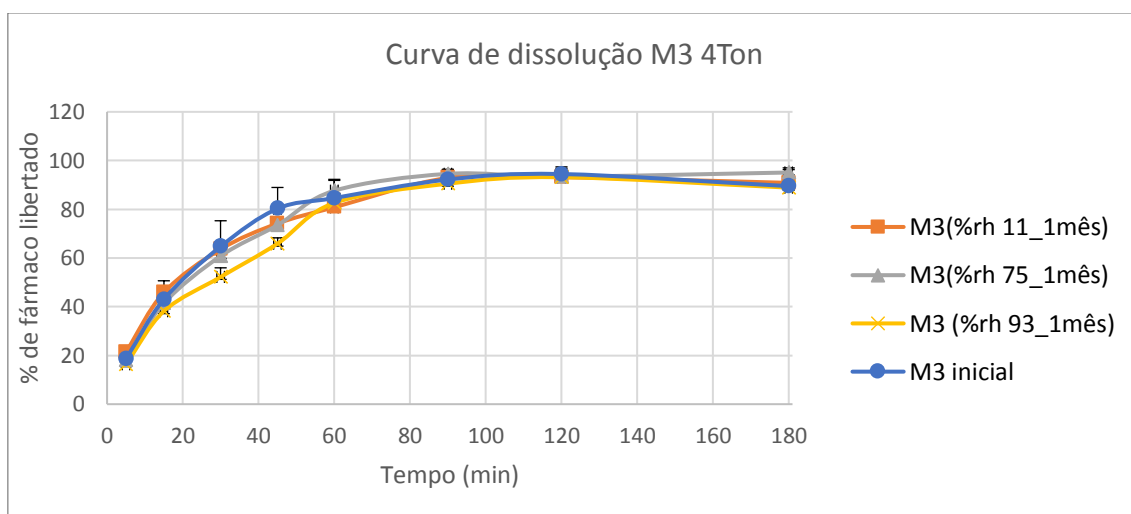


Figura 54 - Perfis de dissolução da formulação M3 (82% forma anid./18% forma dihid.) sujeita a diferentes valores de HR, para o tempo de armazenamento de um mês.

Tabela 9 - Comparação de duas formulações M3 (considerando um mês de armazenamento) e M5 (considerando uma semana de armazenamento), sujeitas a diferentes valores de HR, com recurso ao valor de f2

Comparação de formulações após armazenamento	M3 (1 mês)	M5 (1 sem)
Humidade relativa	f2 (%)	
11% vs 75%	73,4	69,8
11% vs 93%	62,9	72,2
75% vs 93%	65,7	70,6

5.3. Discussão

Cerca de 80% dos fármacos comercializados atualmente exibem polimorfismo e por isso, o estudo das alterações polimórficas observadas em diferentes processos farmacêuticos tem ganho especial importância. Dentro da percentagem observada, a maioria dos fármacos existe sob a forma de hidratos e as alterações na estrutura cristalina provocadas pela incorporação da molécula de água, desencadeiam mudanças na forma farmacêutica final e no próprio fármaco, nomeadamente, na sua solubilidade, tendo consequências na biodisponibilidade final da substância [35], [41], [114]. A existência e aperfeiçoamento de técnicas que permitam a monitorização e controlo da substância ativa ao longo do seu processamento e armazenamento, adquire especial importância quando se tratam de fármacos como o caso da OLZ, pois esta molécula existe sob a forma de pelo menos vinte e cinco polimorfos e uma parte destas substâncias são hidratos, sendo que durante o fabrico da medicamento que irá ser comercializado, existem várias operações unitárias que potenciam a conversão entre as várias formas polimórficas e mesmo durante o armazenamento, podem existir condições de humidade relativa propícias para essa transição. A baixa solubilidade da OLZ também contribui para a importância da implementação destas técnicas na monitorização do seu processo de produção, visto que qualquer transição polimórfica que ocorra e que afeta a sua solubilidade, pode ter consequências mais gravosas para o produto final [11],[64].

A caracterização inicial da substância ativa em diferentes proporções foi conseguida através de várias técnicas que permitiram comparar graus de hidratação distintos das misturas produzidas. A utilização destas técnicas apenas permite uma análise qualitativa, pois a quantificação do grau de hidratação conseguido na produção destas misturas teria que ser feita com recurso à técnica de TGA, que permite obter uma percentagem de perda de massa com o aumento da temperatura. Esse valor foi obtido através de estudos anteriores, concluindo-se que a hidratação completa da OLZ que resulta na formação da forma dihidratada D, é atingida quando existe um aumento de 10,3% na sua massa [75]. Assim, a complementaridade desta técnica em conjunto com o DSC, permitiria uma caracterização completa das formas polimórficas sintetizadas e das misturas após o armazenamento em diferentes condições.

A avaliação da estabilidade da OLZ após a exposição a diferentes HR, foi conseguida inicialmente, tendo em conta apenas a HR, obtendo-se alguma distinção entre as amostras de algumas misturas, nomeadamente as que foram expostas a 93% e contêm uma maior quantidade de forma anidra I. Através da inclusão do fator relacionado com o tempo de armazenamento, observou-se que não existe nenhuma conversão polimórfica ao fim de um mês de armazenamento, ou seja, a OLZ mantém-se estável mesmo em condições de HR mais elevado. De acordo com resultados obtidos anteriormente, a hidratação completa da OLZ ocorre apenas após seis meses de armazenamento, ou seja, em condições usuais de temperatura e HR a que se encontram os produtos finais até à sua expedição, a probabilidade para que ocorram transições no estado sólido durante o período inicial de armazenamento é reduzida [75].

O efeito da força de compressão, da formulação e do armazenamento a uma HR definida, na velocidade de libertação do fármaco, foi estudado através de vários ensaios

de dissolução. Em todos os perfis de dissolução obtidos foram conseguidos valores de teor de fármaco libertado superiores a 80%, sendo que o tempo para a dissolução total variou bastante de acordo com as características da forma farmacêutica. O fator que mais influenciou os perfis obtidos foi a força de compressão, obtendo-se valores de T50 diferentes para os dois tipos de formas farmacêuticas usadas (2 Ton e 4 Ton). Os comprimidos produzidos a uma força de compressão maior têm uma dissolução mais lenta devido às diferenças de dureza e densidade existentes, sendo que esta diferença também pode ser devida a velocidades de desagregação diferentes. As diferenças entre os perfis de dissolução foram avaliadas através do parâmetro f_2 sendo que só para as misturas que contém exclusivamente uma das formas da OLZ (anidra I ou dihidratada D), se observam perfis estatisticamente diferentes. A complementação do ensaio de dissolução com o ensaio de desagregação seria importante para se perceber se a distinção dos dois perfis de dissolução obtidos para estas misturas, resulta de diferenças de desagregação.

A influência da formulação, ou seja, da quantidade de OLZ dihidratada D utilizada nos comprimidos, não provocou diferenças estatisticamente significativas nos perfis de dissolução obtidos, observando-se apenas um ligeiro aumento da velocidade de dissolução dos comprimidos no caso das misturas com mais forma dihidratada D.

O armazenamento da OLZ a diferentes HR, não provocou nenhuma conversão polimórfica da substância ativa, observando-se apenas ligeiras diferenças na análise de PCA feita aos comprimidos, para algumas amostras. Os perfis de dissolução obtidos para as mesmas são bastante semelhantes tal como o previsto, concluindo-se que a HR não influenciou a velocidade de dissolução das formas farmacêuticas.

A comparação das várias técnicas de caracterização utilizadas foi sendo feita nas diferentes secções deste estudo. A avaliação da sua eficácia para monitorizar a estabilidade da OLZ após a exposição a diferentes fatores considerados no delineamento experimental, foi resumida na tabela 10.

Tabela 10 – Análise comparativa da eficácia de cada uma das técnicas na monitorização da estabilidade da OLZ após a exposição a diferentes fatores representativos de algumas fases do processo de fabrico e da fase final de armazenamento

Avaliação da eficácia na monitorização da estabilidade da OLZ		Técnicas utilizadas			
Forma farmacêutica	Fatores	NIR	MIR	Raman	DSC
Pós (controlos positivos)	Formulação	Sim	Sim	Não	Sim
Pós (misturas iniciais)		Sim	Sim	Não	Sim
Pós (misturas finais após armazenamento)	Exposição a diferentes humidades relativas	Sim	Sim	Não	Sim
Comprimidos (produto final após armazenamento)		Sim	N/A	Não	N/A
Pós (misturas finais após armazenamento)	Tempo de armazenamento	Sim	Não	Não	Sim
Comprimidos (produto final após armazenamento)	Força de compressão	Sim	N/A	Não	N/A

N/A: Técnica não testada

Inicialmente a caracterização da OLZ foi feita com recurso a várias técnicas de espectroscopia vibracional, como a espectroscopia NIR, MIR e Raman e a uma técnica de calorimetria, DSC. Esta técnica é utilizada numa fase inicial, para uma primeira distinção dos diferentes polimorfos. A sua eficácia na diferenciação inicial das duas formas da OLZ, foi demonstrada tanto para os controlos positivos que contêm apenas OLZ, como para as misturas iniciais. A exposição das misturas a diferentes valores de HR durante o armazenamento, não gerou diferenças estatisticamente significativas nos valores de entalpia de vaporização, visto que não existiu uma conversão total da OLZ anidra I na sua forma dihidratada D, no entanto observou-se a eficácia desta técnica para detetar as pequenas diferenças na HR absorvida pelas amostras. A técnica DSC é sensível às variações nas percentagens de água absorvida pelas amostras, e por isso a sua utilização torna-se relevante numa primeira análise dos compostos, pois permite avaliar a estabilidade da OLZ, com base nos valores de entalpia de vaporização e de ponto de fusão obtidos, que em conjunto com outras técnicas como o TGA, detetam se existe a transformação da substância ativa na sua forma hidratada.

A comparação das técnicas de espectroscopia vibracional em relação à sua utilidade para monitorizar a estabilidade da OLZ era o principal objetivo deste trabalho.

Em relação às técnicas espectroscópicas que permitem análise dos compostos na zona do infravermelho (NIR e MIR), foi demonstrada a sua eficácia em detetar alterações na

OLZ. Em ambas as técnicas são perceptíveis as diferenças estruturais causadas pela presença de água na rede cristalina. Inicialmente, quando o fator distintivo dos espectros era a formulação, ou seja, as diferentes quantidades de OLZ dihidratada D utilizadas, as diferenças captadas eram mais notórias para ambas as técnicas, no entanto quando foi necessário avaliar as diferenças estruturais resultantes da absorção de pequenas percentagens de água causada pela exposição de uma determinada mistura a um valor de HR, a espectroscopia NIR é uma técnica mais apropriada, visto que permitiu detetar diferenças muito pequenas que não se observaram em MIR.

As duas técnicas de infravermelho referidas, para além de se distinguirem na zona do espectro utilizada, envolvem propósitos diferentes na sua utilização. No caso da espectroscopia MIR, obtiveram-se espectros com bandas mais definidas que permitiram observar as alterações estruturais que aconteceram na molécula na presença de água. A análise estrutural conseguida com infravermelho médio não foi possível ser feita com infravermelho próximo. A obtenção de bandas mais largas resultantes de sobreposições e combinações de vibrações de vários grupos funcionais resulta em espectros mais complexos, interpretáveis essencialmente com recurso a quimiometria. A atribuição individual de cada banda a um grupo funcional não é possível com NIR e por isso, a sua utilização tem como fim uma análise mais quantitativa do espectro, permitindo a construção de modelos PLS e PCA de forma a extrair o máximo de informação possível, relativa à estabilidade da substância ativa. Por oposição, a espectroscopia MIR permite uma análise qualitativa do espectro com a identificação da maioria das alterações nos grupos funcionais existentes.

Para monitorização em-linha da estabilidade da OLZ, o NIR é uma técnica mais eficaz que o MIR, pois permite medições em real dos parâmetros físicos da substância ativa através de sondas acopladas ao espectrómetro, não existindo destruição da amostra nem uma preparação prévia da amostra. No caso da espectroscopia MIR, a aplicação de sondas é um processo mais dispendioso e com uma aplicação prática mais complicada. Por isso a utilização do NIR como técnica PAT tem ganho mais relevância nos últimos anos devido à sua fácil aplicação na indústria, desde o controlo de qualidade de processos até à monitorização da qualidade da substância ativa.

Em conjunto com a espectroscopia NIR, a espectroscopia Raman é outra técnica PAT com aplicação muito comum na monitorização *in-line* de processos farmacêuticos. A utilização desta técnica no controlo da estabilidade da OLZ mostrou-se ineficaz tanto numa fase inicial, em que as amostras se distinguem apenas de acordo com a formulação inicial, como numa fase posterior em existiam pequenas alterações na HR. Em comparação com a análise em IR, a sensibilidade da espectroscopia Raman à molécula de água é muito menor, pois essa técnica requer uma mudança na polarizabilidade das moléculas e por isso apenas vibrações polarizáveis como C=C, C=N são detetáveis. No caso da espectroscopia MIR, a mudança no momento dipolar é necessária para a ocorrência de bandas no espectro e por isso, o grupo OH da molécula de água é mais facilmente detetado.

Uma das principais desvantagens da espectroscopia Raman e que pode ter contribuído para sua baixa eficácia na monitorização da OLZ é o efeito de fluorescência. A irradiação de materiais pode resultar em três fenómenos diferentes: desvio da radiação, absorção da

radiação ou efeito de fluorescência. No caso da espectroscopia Raman, quando o fóton atinge a molécula provocando alterações na energia dos modos vibracionais, ocorre posteriormente o desvio do mesmo fóton com uma energia menor e a diferença entre as energias do estado inicial e o estado virtual que atinge o fóton, corresponde a uma frequência característica do grupo funcional. Por vezes, a energia da radiação incidente é próxima da energia de transição entre dois estados eletrónicos, resultante numa absorção de energia para o estado eletrónico superior. Esta absorção interfere no sinal de Raman e o efeito fluorescência produzido provoca diferenças no espetro obtido. A absorção do fóton provoca a transição da molécula para um estado vibracional excitado num nível eletrónico superior. A transição dessa molécula para um estado vibracional mais baixo no mesmo nível eletrónico e desse nível para o nível eletrónico mais baixo, provoca a emissão de fluorescência que interfere com o sinal Raman. Este efeito é mais demorado que o efeito Raman, requerendo normalmente nanossegundos em oposição aos picossegundos característicos da espectroscopia Raman [88],[115], [116].

A interferência do efeito de fluorescência nos espetros da OLZ é notória ao longo de todos os estudos feitos, resultando numa diminuição da intensidade dos picos, não sendo possível caracterizar estruturalmente a molécula a partir dos espetros nem retirar informação relevante através de quimiometria.

O efeito de fluorescência pode ser evitado utilizando-se radiação com outro comprimento de onda, de forma a garantir que a energia de excitação não é suficiente para provocar uma transição de nível eletrónico. Neste caso, o laser escolhido tem um comprimento de onda de 785 nm próximo da zona infravermelho próximo, portanto seria esperado que a energia não fosse suficiente para provocar fluorescência, no entanto, o tempo de integração aplicado pode ter contribuído para esse fenómeno juntamente com o carácter naturalmente fluorescente da OLZ. A utilização de um espetrómetro com transformada de Fourier que tem um laser com uma radiação correspondente a 1064 nm, permite evitar o efeito de fluorescência, no entanto tem como desvantagem a diminuição do sinal Raman.

Assim, conclui-se que a técnica mais eficiente para monitorizar as alterações na OLZ durante o processo de fabrico e durante o armazenamento é a espectroscopia NIR.

A utilização de técnicas de controlo de processo e de qualidade do produto convencionais, cujas medições são efeitos *offline*, como é o caso do método de titulação de Karl Fischer têm várias desvantagens, que podem ser colmatadas com a substituição por técnicas PAT como o NIR. A titulação de Karl Fischer é um método altamente específico e seletivo para a água e permite determinar a quantidade total de água presente na molécula, tanto superficial como de cristalização, através de uma reação da molécula com iodo na presença de um álcool, uma base e dióxido sulfúrico. Esta técnica envolve a destruição da amostra, requer algum tempo para a sua execução, envolve um consumo elevado de solvente e é necessário conhecimento técnico para ser realizada nomeadamente na escolha dos reagentes e na configuração do teste. Além disso, a reação química que ocorre é de oxidação-redução e por isso qualquer composto que seja quimicamente ativo e reaja com o iodo pode gerar falsos resultados. Por se tratar de um método *off-line*, as amostras a analisar são recolhidas aleatoriamente e a sua análise é feita com um intervalo de tempo considerável desde a sua obtenção, gerando informação

limitada sobre a estabilidade da OLZ. No caso da espectroscopia NIR, as medições em tempo real da HR das amostras sem a sua destruição nem alteração contribuem para a crescente utilização desta técnica da indústria.

Os valores iniciais que são necessários para calibrar o modelo, são gerados através de um método de referência como a titulação de Karl-Fischer que foi previamente validado, e após a calibração inicial é feita uma validação externa do modelo para assegurar que este é capaz de prever a humidade de amostras desconhecidas. Após estes dois passos, a espectroscopia NIR já pode ser usada no processo com atualizações periódicas do conjunto de calibração. Apesar dos custos iniciais elevados de compra e implementação do equipamento, o tempo das análises diminui significativamente, aumentando a rentabilidade do processo [117], [118].

A eficácia da espectroscopia NIR na avaliação da estabilidade da OLZ através da distinção das diferentes proporções de forma dihidratada D utilizadas inicialmente, e posteriormente na diferenciação das amostras de acordo com a HR que foram expostas durante o armazenamento, foi demonstrada. Para uma aplicação na indústria seria necessária ter uma variabilidade de dados para a calibração de modelos de regressão, nomeadamente acrescentando misturas com outras proporções de formas anidra I / dihidratada D, juntamente com um método de referência validado, como o Karl Fischer. Desta forma, seria possível desenvolver métodos robustos e eficazes para substituir os métodos clássicos de controlo de qualidade.

6. Conclusão e perspectivas futuras

6.1. Conclusão

A avaliação da estabilidade da OLZ em diferentes formulações produzidas sob a forma de comprimidos e pós, foi conseguida com recurso a várias técnicas como a espectroscopia NIR, MIR, Raman ou DSC.

Foi observado que apenas as amostras que foram expostas a 93% de humidade relativa e contêm uma maior quantidade de OLZ anidra I, se diferenciam em relação às restantes. O efeito do armazenamento refletiu-se num ligeiro aumento do teor de água das amostras, observado inicialmente por DSC e confirmado através de NIR e MIR. Apesar desta alteração, a estabilidade da OLZ ao fim de um mês mantém-se, não se observando nenhuma conversão polimórfica. Por isso conclui-se, que a OLZ anidra I é adequada para uso farmacêutico, no entanto mantém-se a necessidade de uma monitorização do fármaco durante o seu processamento e no seu armazenamento, pois existe possibilidade de transformação na forma dihidratada D considerando períodos de tempo mais elevados, e uma potencial transição polimórfica tem efeitos indesejados no potencial terapêutico do medicamento.

O perfil de dissolução dos comprimidos após o armazenamento, não foi alterado concluindo-se que a humidade relativa não influenciou a velocidade de dissolução das formas farmacêuticas. A alteração dos perfis de dissolução foi mais visível na comparação de comprimidos com forças de compressão diferentes, concluindo-se que o aumento da mesma, diminui a velocidade de dissolução. Observou-se também que a proporção de forma dihidratada D inicial não provocou diferenças significativas nos perfis de dissolução obtidos.

A utilidade de cada uma das técnicas referidas na monitorização da estabilidade da OLZ, foi avaliada ao longo deste estudo. A caracterização inicial da substância ativa em diferentes proporções foi feita com recurso às várias técnicas. Concluiu-se que o DSC tem uma utilidade maior para uma primeira análise dos compostos, pois é bastante sensível às variações de água absorvida pelas amostras, e por isso qualquer alteração no grau de hidratação das mesmas é logo detetado. Esta técnica, em conjunto com a espectroscopia MIR permite uma análise mais qualitativa das amostras, ao contrário da espectroscopia NIR, que em conjunto com a análise multivariada dos espectros, permite uma análise mais quantitativa.

A utilização de infravermelho próximo mostrou ser mais eficaz numa fase posterior da análise, em que existiam apenas pequenas diferenças da humidade nas amostras causadas pelo armazenamento, e através de modelos PCA foi possível distinguir essas amostras com base na humidade relativa. Em conjunto com a espectroscopia Raman, estas duas técnicas podem ser utilizadas para monitorização em-linha de processos, sendo que o efeito de fluorescência observado nos espectros Raman comprometeu a qualidade dos mesmos, e a baixa sensibilidade do mesmo a variação da humidade não permite a sua utilização neste caso.

Assim conclui-se que a espectroscopia NIR é a técnica mais adequada para uma monitorização em tempo real da estabilidade da OLZ durante o seu processamento e

armazenamento, podendo ser utilizada em substituição de outros métodos clássicos de controlo de qualidade, de forma a garantir a eficácia final do produto.

6.2. Perspetivas futuras

De forma a melhorar o trabalho realizado e continuar a sua aplicação numa fase posterior, apresentam-se de seguida alguns aspetos que podem ser modificados:

- Utilização de uma técnica complementar de análise como o TGA, para a caracterização inicial da forma dihidratada D da OLZ, de forma a adicionar à análise qualitativa conseguida por DSC, uma análise quantitativa que permita a obtenção de um valor da percentagem de massa de água ganha com a hidratação;
- Utilização de outras técnicas de análise estrutural como difração de raios-X de forma a detetar alterações na rede cristalina não observáveis em infravermelho, na análise dos controlos positivos e das misturas após o armazenamento;
- Alteração das condições experimentais, nomeadamente, o tempo de armazenamento e o grau de exposição a uma atmosfera com diferentes valores de humidade relativa;
- Inclusão de um processo de tamisação das matérias-primas após a sua moagem manual, de forma a garantir a uniformidade no tamanho de partícula;
- Realização de um novo delineamento experimental com mais níveis de variação da proporção entre as formas dihidratada D/ anidra I, que permitem a calibração de modelos de regressão, para uma posterior utilização na indústria;
- Análise dos controlos iniciais através de um método clássico de medição da humidade relativa, de forma a desenvolver um método de referência válido.
- Inclusão de ensaios de desagregação antes da realização dos ensaios de dissolução.

7. Bibliografia

- [1] R. C. T. Banker G S, *Modern Pharmaceutics*. 1996.
- [2] M. Aulton, “Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design.”
- [3] Y. Qiu, Y. Chen, G. Zhang, L. Liu, and W. Porter, *Developing solid oral dosage forms. Pharmaceutical theory and practice. Libro*. 2009.
- [4] G. Chaurasia, “a Review on Pharmaceutical Preformulation Studies in Formulation,” vol. 7, no. 6, pp. 2313–2320, 2016.
- [5] T. Adefolaju, “of Health Research Enquiries : Enquirie s :,” *Int. J. Heal. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 99–106, 2011.
- [6] L.-F. Huang and W.-Q. (Tony) Tong, “Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 321–334, Feb. 2004.
- [7] L. F. Huang and W. Q. Tong, “Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 321–334, 2004.
- [8] G. G. Z. Zhang, D. Law, E. A. Schmitt, and Y. Qiu, “Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 371–390, 2004.
- [9] D. R. Heidemann and P. J. Jarosz, “Preformulation studies involving moisture uptake in solid dosage forms.,” *Pharm. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 292–7, Mar. 1991.
- [10] R. Samuel, A. Attard, and M. Kyriakopoulos, “Mental state deterioration after switching from brand-name to generic olanzapine in an adolescent with bipolar affective disorder, autism and intellectual disability: a case study,” *BMC Psychiatry*, vol. 13, no. 1, p. 244, Dec. 2013.
- [11] S. M. Reutzel-Edens, J. K. Bush, P. A. Magee, G. A. Stephenson, and S. R. Byrn, “Anhydrates and Hydrates of Olanzapine: Crystallization, Solid-State Characterization, and Structural Relationships,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 3, no. 6, pp. 897–907, 2003.
- [12] Y. Cui, “A material science perspective of pharmaceutical solids,” *Int. J. Pharm.*, vol. 339, no. 1–2, pp. 3–18, Jul. 2007.
- [13] S. R. Byrn, R. R. Pfeiffer, G. Stephenson, D. J. W. Grant, and W. B. Gleason, “Solid-State Pharmaceutical Chemistry,” *Chem. Mater.*, vol. 6, no. 8, pp. 1148–1158, 1994.
- [14] L. Yu, “Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization.,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 1, pp. 27–42, May 2001.

- [15] D. Q. Craig, P. G. Royall, V. L. Kett, and M. L. Hopton, "The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems.," *Int. J. Pharm.*, vol. 179, no. 2, pp. 179–207, Mar. 1999.
- [16] B. C. Hancock and G. Zografi, "Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems," *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 1, pp. 1–12, Jan. 1997.
- [17] K. R. Morris, U. J. Griesser, C. J. Eckhardt, and J. G. Stowell, "Theoretical approaches to physical transformations of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 1, pp. 91–114, May 2001.
- [18] R. Govindarajan and R. Suryanarayanan, "Processing-induced Phase Transformations and Their Implications on Pharmaceutical Product Quality," in *Polymorphism*, Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006, pp. 333–364.
- [19] A. W. Newman and S. R. Byrn, "Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products," *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 19, pp. 898–905, Oct. 2003.
- [20] L. Yu, "Amorphous pharmaceutical solids: Preparation, characterization and stabilization," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 1, pp. 27–42, 2001.
- [21] S. R. Byrn, G. Zografi, and X. (Sean) Chen, Solid state properties of pharmaceutical materials. .
- [22] S. Datta and D. J. W. Grant, "Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 1, pp. 42–57, 2004.
- [23] S. R. Vippagunta, H. G. Brittain, and D. J. W. Grant, "Crystalline solids," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 1, pp. 3–26, 2001.
- [24] F. LarA-Ochoa and G. Espinosa-Pérez, "Cocrystals Definitions," *Supramol. Chem.*, vol. 19, no. 8, pp. 553–557, Dec. 2007.
- [25] G. R. Desiraju, "Crystal and co-crystal," *CrystEngComm*, vol. 5, no. 82, p. 466, Nov. 2003.
- [26] F. Giordano, Polymorphism in pharmaceutical solids, vol. 71, no. 3. 2001.
- [27] S. Lohani and D. J. W. Grant, "Thermodynamics of Polymorphs," *Polymorph. Pharm. Ind.*, pp. 21–42, 2006.
- [28] G. P. S. Byrn, R. Pfeiffer, M. Ganey, C. Hoiberg, "Pharmaceutical Solids: A Strategic Approach to Regulatory Considerations," *Pharm. Res.*, vol. 12, no. 7, pp. 945–954, 1995.
- [29] A. Heinz, C. J. Strachan, K. C. Gordon, and T. Rades, "Analysis of solid-state transformations of pharmaceutical compounds using vibrational spectroscopy," *J.*

- Pharm. Pharmacol.*, vol. 61, no. 8, pp. 971–988, 2009.
- [30] D. Singhal and W. Curatolo, “Drug polymorphism and dosage form design: A practical perspective,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 335–347, 2004.
- [31] B. Rodríguez-Spong, C. P. Price, A. Jayasankar, A. J. Matzger, and N. Rodríguez-Hornedo, “General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 241–274, Feb. 2004.
- [32] P. Bennema, J. van Eupen, B. M. A. van der Wolf, J. H. Los, and H. Meekes, “Solubility of molecular crystals: Polymorphism in the light of solubility theory,” *Int. J. Pharm.*, vol. 351, no. 1–2, pp. 74–91, 2008.
- [33] D. Singhal, “Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 335–347, 2003.
- [34] R. Censi and P. Di Martino, “Polymorph impact on the bioavailability and stability of poorly soluble drugs,” *Molecules*, vol. 20, no. 10, pp. 18759–18776, 2015.
- [35] A. M. Healy, Z. A. Worku, D. Kumar, and A. M. Madi, “Pharmaceutical solvates, hydrates and amorphous forms: A special emphasis on cocrystals,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 117, pp. 25–46, 2017.
- [36] R. K. Khankari and D. J. W. Grant, “thermochimica acta Pharmaceutical hydrates,” 1995.
- [37] S. Ugarkovic *et al.*, “Solvatomorphism of codeine phosphate sesquihydrate—Vibrational spectroscopy and thermoanalytical characterization,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 63, pp. 460–468, 2012.
- [38] J. Aaltonen, M. Allesø, S. Mirza, V. Koradia, K. C. Gordon, and J. Rantanen, “Solid form screening - A review,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 1, pp. 23–37, 2009.
- [39] I. M. Frank, “The importance of Solvates,” *Bull. At. Sci.*, vol. 32, no. 10, pp. 34–35, 2016.
- [40] B. Shekunov, C. Lai, and C. Lai, “Crystallization: General Principles and Significance on Product Development,” pp. 760–784, Jul. 2013.
- [41] F. Giordano, Polymorphism in pharmaceutical solids, vol. 71, no. 3. 2002.
- [42] D. Murphy and N. Rodríguez-Hornedo, “July 1999 Significance of Controlling Crystallization Mechanisms and Kinetics in,” *Society*, vol. 88, no. 7, pp. 651–660, 1999.
- [43] M. Lenka and D. Sarkar, “Determination of metastable zone width and nucleation kinetics for combined cooling and antisolvent crystallization of L-asparagine monohydrate in water-isopropanol mixture,” *J. Cryst. Growth*, vol. 501, no. May, pp. 66–73, 2018.

- [44] H. Zhu, H. Dai, Y. Peng, X. Lu, and Z. Yang, “Characteristics of metastable zone in the crystallization process: A case study of sparingly soluble hydroxyapatite,” *Desalin. Water Treat.*, vol. 62, no. October, pp. 192–199, 2017.
- [45] A. G. (Alan G. . Jones, *Crystallization process systems*. Butterworth-Heinemann, 2002.
- [46] N. Blagden, M. de Matas, P. T. Gavan, and P. York, “Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 7, pp. 617–630, 2007.
- [47] M. Kitamura, “Controlling factors and mechanism of polymorphic crystallization,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 4, no. 6, pp. 1153–1159, 2004.
- [48] R. M. Bhardwaj, *Control and prediction of solid-state of pharmaceuticals: experimental and computational approaches*. SPRINGER, 2018.
- [49] R. Govindarajan and R. Suryanarayanan, *Processing-induced Phase Transformations and Their Implications on Pharmaceutical Product Quality*. 2006.
- [50] G. Zhang, “Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 3, pp. 371–390, 2004.
- [51] H. G. Brittain, “Effects of mechanical processing on phase composition,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 91, no. 7, pp. 1573–1580, 2002.
- [52] H. K. Chan and E. Doelker, “Polymorphic transformation of some drugs under compression,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 11, no. 2–3, pp. 315–332, 1985.
- [53] A. Juban, S. Briançon, and F. Puel, “Processing-induced-transformations (PITs) during direct compression: Impact of tablet composition and compression load on phase transition of caffeine,” *Int. J. Pharm.*, vol. 501, no. 1–2, pp. 253–264, 2016.
- [54] H. G. Brittain, S. J. Bogdanowich, D. E. Bugay, J. DeVincentis, G. Lewen, and A. W. Newman, “Physical Characterization of Pharmaceutical Solids,” *Pharm. Res.*, vol. 08, no. 8, pp. 963–973, 1991.
- [55] F. Tian, H. Qu, A. Zimmermann, T. Munk, A. C. Jørgensen, and J. Rantanen, “Factors affecting crystallization of hydrates,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 62, no. 11, pp. 1534–1546, Nov. 2010.
- [56] S. Airaksinen *et al.*, “Role of Water in the Physical Stability of Solid Dosage Formulations,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, no. 10, pp. 2147–2165, Oct. 2005.
- [57] S. Airaksinen *et al.*, “Excipient selection can significantly affect solid-state phase transformation in formulation during wet granulation,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 6, no. 2, pp. E311–E322, Jun. 2005.
- [58] M. C. Paisana, M. A. Wahl, and J. F. Pinto, “Effect of polymers in moisture sorption and physical stability of polymorphic olanzapine,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 97, pp. 257–268, 2017.

- [59] O. A. Adegoke, O. E. Thomas, D. M. Makanjuola, and O. O. Adewole, "Spectrophotometric determination of olanzapine after condensation with p-dimethylaminobenzaldehyde," *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 248–257, Jul. 2014.
- [60] M. Narasimhan, T. O. Bruce, and P. Masand, "Review of olanzapine in the management of bipolar disorders.," *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 3, no. 5, pp. 579–87, 2007.
- [61] N. Bhana, R. H. Foster, R. Olney, and G. L. Plosker, "Olanzapine," *Drugs*, vol. 61, no. 1, pp. 111–161, 2001.
- [62] H. Motesafi, S. Zhornitsky, S. Brunelle, and E. Stip, "Comparing Tolerability of Olanzapine in Schizophrenia and Affective Disorders," *Drug Saf.*, vol. 35, no. 10, pp. 819–836, Oct. 2012.
- [63] B. Fulton and K. L. Goa, "Olanzapine," *Drugs*, vol. 53, no. 2, pp. 281–298, Feb. 1997.
- [64] H. Lanza *et al.*, "Thermal behaviour and stability in Olanzapine," *Int. J. Pharm.*, vol. 301, no. 1–2, pp. 33–40, 2005.
- [65] C. Cavallari, B. P.-A. Santos, and A. Fini, "Olanzapine solvates.," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 11, pp. 4046–56, Nov. 2013.
- [66] "Pharmaceutical Formulation of Olanzapine," Sep. 2011.
- [67] M. Tiwari, G. Chawla, and A. K. Bansal, "Quantification of olanzapine polymorphs using powder X-ray diffraction technique," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 3, pp. 865–872, Feb. 2007.
- [68] A. P. Ayala, H. W. Siesler, R. Boese, G. G. Hoffmann, G. I. Polla, and D. R. Vega, "Solid state characterization of olanzapine polymorphs using vibrational spectroscopy.," *Int. J. Pharm.*, vol. 326, no. 1–2, pp. 69–79, Dec. 2006.
- [69] T. B. Clas-, "<TB_2011_9.pdf>," vol. 9, 2011.
- [70] M. Dixit, A. G. Kini, and P. K. Kulkarni, "Enhancing the aqueous solubility and dissolution of olanzapine using freeze-drying," *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 47, no. 4, pp. 743–749, Dec. 2011.
- [71] "Olanzapine Pharmacokinetics - Psychopharmacology Institute." [Online]. Disponível: <https://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/olanzapine/olanzapine-pharmacokinetics/>. [Acedido: 15-Jan-2019].
- [72] N. Djordjević Filijović, M. D. Antonijević, A. Pavlović, I. Vučković, K. Nikolić, and D. Agbaba, "The stress stability of olanzapine: studies of interactions with excipients in solid state pharmaceutical formulations," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 41, no. 3, pp. 502–514, Mar. 2015.
- [73] R. Samuel, A. Attard, and M. Kyriakopoulos, "Mental state deterioration after

- switching from brand-name to generic olanzapine in an adolescent with bipolar affective disorder, autism and intellectual disability: a case study.,” *BMC Psychiatry*, vol. 13, p. 244, Oct. 2013.
- [74] D. Galarneau, “A case of teeth discoloration upon transition from zyprexa to generic olanzapine.,” *Ochsner J.*, vol. 13, no. 4, pp. 550–2, 2013.
- [75] M. C. Paisana, M. A. Wahl, and J. F. Pinto, “Role of moisture on the physical stability of polymorphic olanzapine,” *Int. J. Pharm.*, vol. 509, no. 1–2, pp. 135–148, 2016.
- [76] J. M. Chalmers and G. Dent, *Vibrational Spectroscopic Methods in Pharmaceutical Solid-state Characterization*. 2006.
- [77] A. A. Bunaciu and H. Y. Aboul-Enein, *Vibrational Spectroscopy Applications in Drugs Analysis*, 3rd ed., no. October. Elsevier Ltd., 2016.
- [78] “Understanding Infrared and Raman Spectra of Pharmaceutical Polymorphs | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology.” [Online]. Disponível: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/37183-Understanding-Infrared-and-Raman-Spectra-of-Pharmaceutical-Polymorphs/>. [Acedido: 19-Jan-2019].
- [79] C. Schaefer, C. Lecomte, D. Clicq, A. Merschaert, E. Norrant, and F. Fotiadu, “On-line near infrared spectroscopy as a Process Analytical Technology (PAT) tool to control an industrial seeded API crystallization,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 83, pp. 194–201, Sep. 2013.
- [80] P. R. Wahl, G. Fruhmann, S. Sacher, G. Straka, S. Sowinski, and J. G. Khinast, “PAT for tableting: Inline monitoring of API and excipients via NIR spectroscopy,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 87, no. 2, pp. 271–278, Jul. 2014.
- [81] A. A. Bunaciu, H. Y. Aboul-Enein, and V. D. Hoang, “Vibrational spectroscopy used in polymorphic analysis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 69, pp. 14–22, 2015.
- [82] L.-E. Åmand and C. J. Tullin, “The Theory Behind FTIR analysis Application Examples From Measurement at the 12 MW Circulating Fluidized Bed Boiler at Chalmers.”
- [83] K. A. Esmonde-White, M. Cuellar, C. Uerpmann, B. Lenain, and I. R. Lewis, “Raman spectroscopy as a process analytical technology for pharmaceutical manufacturing and bioprocessing,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 3, pp. 637–649, Jan. 2017.
- [84] P. P. Kalantri, R. R. Somani, and D. T. Makhija, “Raman spectroscopy: A potential technique in analysis of pharmaceuticals,” 2010.
- [85] R. Hilfiker and John Wiley & Sons., *Polymorphism in the pharmaceutical industry*.

Wiley-VCH, 2006.

- [86] “Vibrational Spectroscopy in Pharmaceutical Development.” [Online]. Disponível: <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2011/vibrational-spectroscopy-in-pharmaceutical-development.html>. [Acedido: 15-Jan-2019].
- [87] “Analyzing Polymorphs with Raman Spec.” [Online]. Disponível: <https://www.rdmag.com/article/2007/09/analyzing-polymorphs-raman-spec>. [Acedido: 15-Jan-2019].
- [88] T. De Beer, C. Vervaet, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, and J. P. Remon, “Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes,” *Int. J. Pharm.*, vol. 417, no. 1–2, pp. 32–47, 2010.
- [89] R. Chadha and J. Haneef, “Near-infrared spectroscopy: Effective tool for screening of polymorphs in pharmaceuticals,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 50, no. 7, pp. 565–583, 2015.
- [90] S. Gaisford and M. A. A. O’Neill, *Pharmaceutical isothermal calorimetry*. Informa Healthcare, 2007.
- [91] D. Q. M. Craig, *Characterization of Polymorphic Systems Using Thermal Analysis*. 2006.
- [92] K. KV, A. SR, Y. PR, P. RY, and B. VU, “Differential Scanning Calorimetry: A Review.,” *Res. Rev. J. of Pharmaceutical Anal.*, vol. 3, no. 3, pp. 11–22.
- [93] C. K. Brown, H. P. Chokshi, B. Nickerson, R. A. Reed, B. R. Rohrs, and P. A. Shah, “Acceptable Analytical Practices for Soluble Compounds,” *Pharm. Technol.*, no. December 2004, pp. 56–65, 2004.
- [94] Y. Chen, Z. Gao, and J. Z. Duan, “Dissolution testing of solid products,” *Dev. Solid Oral Dos. Forms Pharm. Theory Pract. Second Ed.*, pp. 355–380, 2016.
- [95] Council of Europe, “Dissolution Test for Solid Dosage Forms,” *Eur. Pharmacopoeia*, pp. 5117–5123, 2014.
- [96] C. E. Miller, “Chemometrics in Process Analytical Chemistry,” in *Process Analytical Technology Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries*, K. A. Bakeev, Ed. Blackwell Publishing, 2005, pp. 228–328.
- [97] J. Lever, M. Krzywinski, and N. Altman, “Points of Significance: Principal component analysis,” *Nat. Methods* 2017 147, Jun. 2017.
- [98] S. Valle, W. Li, and S. J. Qin, “Selection of the Number of Principal Components: The Variance of the Reconstruction Error Criterion with a Comparison to Other Methods †,” 1999.
- [99] G. L. Pisegna, D. F. R. Gilson, and I. S. Butler, “High-pressure infrared and Raman studies of polymorphism in pharmaceutical compounds: Spironolactone, Forms I

- and II,” *J. Mol. Struct.*, vol. 1078, pp. 146–150, Dec. 2014.
- [100] V. H. da Silva, J. L. Gonçalves, F. V. C. Vasconcelos, M. Fernanda Pimentel, and C. F. Pereira, “Quantitative analysis of mebendazole polymorphs in pharmaceutical raw materials using near-infrared spectroscopy,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 115, pp. 587–593, Nov. 2015.
- [101] F. Tian, T. Rades, and N. Sandler, “Visualizing solvent mediated phase transformation behavior of carbamazepine polymorphs by principal component analysis,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 2, pp. 390–4, 2008.
- [102] O. US EPA, “Predictive Models and Tools for Assessing Chemicals under the Toxic Substances Control Act (TSCA).”
- [103] “DailyMed.” [Online]. Disponível: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/index.cfm>. [Acedido: 27-Feb-2019].
- [104] “Human Metabolome Database: Showing metabocard for Olanzapine (HMDB0005012).” [Online]. Disponível: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0005012>. [Acedido: 27-Feb-2019].
- [105] M. Williams, “The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th Edition Edited by M.J.O’Neil, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK ISBN 9781849736701; 2708 pages. April 2013, \$150 with 1-year free access to The Merck Index Online,” *Drug Dev. Res.*, vol. 74, no. 5, pp. 339–339, Aug. 2013.
- [106] “The PubChem Project.” [Online]. Disponível: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Acedido: 27-Feb-2019].
- [107] H. Shane, “Handbook of Pharmaceutical Excipients: Pharmaceutical Excipients,” *Am. Pharm. Assoc.*, p. 7, 2016.
- [108] G. Thoorens, F. Krier, B. Leclercq, B. Carlin, and B. Evrard, “Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review,” *Int. J. Pharm.*, vol. 473, no. 1–2, pp. 64–72, Oct. 2014.
- [109] A. Mihranyan, A. P. Llagostera, R. Karmhag, M. Strømme, and R. Ek, “Moisture sorption by cellulose powders of varying crystallinity,” *Int. J. Pharm.*, vol. 269, no. 2, pp. 433–442, Jan. 2004.
- [110] B. C. Hancock and G. Zografi, “Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 86, no. 1, pp. 1–12, Jan. 1997.
- [111] M. Riippi, V.-P. Tanninen, and J. Yliruusi, “Effect of compression force on the crystal properties of erythromycin acistrate tablets,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, no. 3, pp. 365–371, Nov. 2000.
- [112] O. A. Adeleye, M. N. Femi-Oyewo, and M. A. Odeniyi, “Effect of compression pressure on mechanical and release properties of tramadol matrix tablets,” *Curr.*

Issues Pharm. Med. Sci., 2015.

- [113] D. A. Diaz, S. T. Colgan, C. S. Langer, N. T. Bandi, M. D. Likar, and L. Van Alstine, “Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations?,” *AAPS J.*, vol. 18, no. 1, pp. 15–22, Jan. 2016.
- [114] “Factor Affecting On Drug Dissolution Process | Tablet | Pharmaceutics.” [Online]. Disponível: <http://www.pharmatips.in/Articles/Pharmaceutics/Tablet/Factor-Affecting-On-Drug-Dissolution-Process.aspx>. [Acedido: 27-Feb-2019].
- [115] K. Kogermann, Understanding solid-state transformations during dehydration: new insights using vibrational spectroscopy and multivariate modelling, no. Viikinkaari 11. 2008.
- [116] Horiba Jobin, “Raman Scattering and Fluorescence.”
- [117] “Analyzing Polymorphs with Raman Spec.” [Online]. Disponível: <https://www.rdmag.com/article/2007/09/analyzing-polymorphs-raman-spec>. [Acedido: 27-Fev-2019].
- [118] “Advantages and Limitations of Karl Fischer Titration.” [Online]. Disponível: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Advantages-and-Limitations-of-Karl-Fischer-Titration.aspx>. [Acedido: 27-Fev-2019].
- [119] M. Spitzlei, “Choosing a Method for Measuring your Material’s Moisture Content,” *Powder Bulk Eng.*, pp. 1–9, 2000.
- [120] E. B. Wilson, “The Normal Modes and Frequencies of Vibration of the Regular Plane Hexagon Model of the Benzene Molecule,” *Phys. Rev.*, vol. 45, no. 10, pp. 706–714, May 1934.

Anexo 1: Delineamento experimental

Tabela 11 – Delineamento experimental para os comprimidos de OLZ

Ordem	Exp No	Humidade (%)	Força de compressão (Ton)	API		MCC (mg)	PC (mg)	Tempo de armazenamento	Formulação
				Forma anidra I (mg)	Forma dihidratada D (mg)				
11	1	11	2	30	30	60	180	1 semana	M1
53	2	11	4	12	48	60	180	1 semana	M2
19	3	75	2	12	48	60	180	1 semana	M2
9	4	11	2	0	60	60	180	1 semana	M4
27	5	93	4	60	0	60	180	1 semana	M5
14	6	11	2	12	48	60	180	1 semana	M2
39	7	75	2	12	48	60	180	1 mês	M2
57	8	11	2	60	0	60	180	1 semana	M5
18	9	93	2	60	0	60	180	1 semana	M5
42	10	11	4	48	12	60	180	1 semana	M3
47	11	11	2	30	30	60	180	1 mês	M1
60	12	93	4	12	48	60	180	1 mês	M2
49	13	11	4	60	0	60	180	1 mês	M5
6	14	75	2	0	60	60	180	1 mês	M4
26	15	11	2	48	12	60	180	1 mês	M3
54	16	75	4	0	60	60	180	1 semana	M4
22	17	11	4	30	30	60	180	1 mês	M1
7	18	11	2	60	0	60	180	1 mês	M5

Monitorização de conversão polimórfica em formulações de olanzapina através de espectroscopia vibracional

2	19	11	4	0	60	60	180	1 mês	M4
8	20	11	4	48	12	60	180	1 mês	M3
25	21	75	2	30	30	60	180	1 semana	M1
52	22	75	4	12	48	60	180	1 semana	M2
55	23	93	2	48	12	60	180	1 semana	M3
31	24	75	2	0	60	60	180	1 semana	M4
12	25	93	2	0	60	60	180	1 mês	M4
34	26	11	4	60	0	60	180	1 semana	M5
17	27	75	4	30	30	60	180	1 mês	M1
56	28	75	2	60	0	60	180	1 semana	M5
38	29	11	2	12	48	60	180	1 mês	M2
58	30	75	4	48	12	60	180	1 semana	M3
40	31	93	2	60	0	60	180	1 mês	M5
29	32	75	4	12	48	60	180	1 mês	M2
46	33	75	4	60	0	60	180	1 semana	M5
35	34	11	2	0	60	60	180	1 mês	M4
13	35	75	2	48	12	60	180	1 mês	M3
37	36	11	4	30	30	60	180	1 semana	M1
28	37	75	4	30	30	60	180	1 mês	M1
30	38	93	2	12	48	60	180	1 mês	M2
3	39	75	4	0	60	60	180	1 semana	M4
15	40	75	4	48	12	60	180	1 mês	M3
43	41	93	2	30	30	60	180	1 semana	M1
41	42	93	4	12	48	60	180	1 semana	M2
48	43	11	2	48	12	60	180	1 semana	M3
10	44	93	2	0	60	60	180	1 mês	M4

Monitorização de conversão polimórfica em formulações de olanzapina através de espectroscopia vibracional

16	45	75	4	60	0	60	180	1 semana	M5
1	46	93	2	12	48	60	180	1 mês	M2
21	47	93	4	30	30	60	180	1 semana	M1
50	48	11	4	0	60	60	180	1 mês	M4
59	49	93	4	0	60	60	180	1 semana	M4
20	50	93	4	48	12	60	180	1 semana	M3
36	51	93	2	30	30	60	180	1 mês	M1
4	52	11	4	12	48	60	180	1 mês	M2
33	53	93	4	60	0	60	180	1 mês	M5
44	54	75	2	48	12	60	180	1 semana	M3
51	55	93	2	48	12	60	180	1 mês	M3
5	56	75	2	60	0	60	180	1 semana	M5
32	57	93	4	30	30	60	180	1 mês	M1
23	58	75	2	30	30	60	180	1 semana	M1
24	59	93	4	0	60	60	180	1 mês	M4
45	60	93	4	48	12	60	180	1 mês	M3

Anexo 2: Modos vibracionais MIR para as formas dihidratada D e anidra I da olanzapina

Tabela 12 – Modos vibracionais MIR para as formas dihidratada D e anidra I da olanzapina

Forma anidra I OLZ		Forma dihidratada D OLZ		Modo vibracional
IR	Raman	IR	Raman	
-----	-----	3500	-----	$\nu(\text{OH})$
-----	-----	3400	-----	$\nu(\text{OH})$
3219	-----	3235	-----	$\nu(\text{NH})$
1595	1600	1606	1610	R1 [8a]+ R2 [νCN]
1584	-----	1587	-----	R1 [8a]+ R2 [$\nu(\text{CN})$]+ $\delta(\text{NH})$ + R3 [$\nu(\text{CC})$]
1555	1560	1560	1560	R1 [8b]+ R2 [$\nu(\text{CN})$]+ R3 [$\nu(\text{CC})$]+ $\delta(\text{CH})$
1518	-----	1519	-----	R2 [$\delta(\text{NH})$]+ R3 [$\nu(\text{CC})$]+ Me ⁽¹⁾ [$\delta(\text{CH}_3)$]
-----	1500	-----	1507	R1 [19b]+ R2 [$\delta(\text{NH})$]
1447	-----	-----	-----	R4 [$\delta(\text{CH}_2)$]
1380	1382	-----	1382	R1 [19a]+ R2 [$\delta(\text{NH})$]
1330	1330	1330	1335	R4 [$\omega(\text{CH}_2)$]
1289	1290	1284	1290	R1 [14]+ R4 [$\gamma(\text{CH}_2)$]
1260	1260	1265	1265	R1 [3]+ R2 [ν_{anel}]+ R4 [$\gamma(\text{CH}_2)$]
1202	1195	1202	1195	R4 [$\gamma(\text{CH}_2)$]
1179	-----	1181	-----	R1 [18b]+ R2 [δ_{anel}]+ R3 [$\delta(\text{CH})$]+ $\nu(\text{CC})$ + R4 [$\gamma(\text{CH}_2)$]+ Me ⁽¹⁾ [$\delta(\text{CH}_3)$]
1143	1146	1153	1150	R4 [ν_{anel} + $\gamma(\text{CH}_2)$]+ Me ⁽²⁾ [$\nu(\text{CN})$ + $\rho(\text{CH}_3)$]
1083	-----	1088	-----	R4 [ν_{anel} + $\gamma(\text{CH}_2)$]+ Me ⁽²⁾ [$\rho(\text{CH}_3)$]
1042	1012	1046	1017	R1 [1]
1009	-----	1004	-----	R4 [δ_{anel}]
965	930	972	950	R2 [δ_{anel}]+ R3 [$\nu(\text{CS})$]+ R4 [δ_{anel}]
928	-----	930	-----	R1 [17b]
887	890	905	890	R1 [12]+ R2 [δ_{anel}]
845	830	845	826	R1 [17a]+ R3 [$\omega(\text{CH})$]+ R4 [$\rho(\text{CH}_2)$]
784	790	782	780	R2 [δ_{anel}]+ R4 [δ_{anel}]+ $\rho(\text{CH}^2)$]
745	720	750	720	R1 [11]

Tipos de vibrações: ν : estiramento, δ : deformação angular γ : torção, ρ : balanço. Os *moiety modes* do benzeno estão nomeados de acordo com a notação de Wilson. ([119])