



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

ANTONIO DIÓGENES PEREIRA DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ANÁLISE
QUANTITATIVA DE GLIBENCLAMIDA COMPRIMIDO UTILIZANDO AS
ESPECTROSCOPIAS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E RAMAN-
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA DE PAT**

RECIFE – PE, 2014

ANTONIO DIÓGENES PEREIRA DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA ANÁLISE
QUANTITATIVA DE GLIBENCLAMIDA COMPRIMIDO UTILIZANDO AS
ESPECTROSCOPIAS DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E RAMAN-
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA DE PAT**

Dissertação de mestrado submetida no Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Miracy Muniz de Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

RECIFE – PE, 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48u

Oliveira, Antonio Diógenes Pereira de.

Utilização de métodos quimiométricos para análise quantitativa de glibenclamida comprimido utilizando as espectroscopias de infravermelho próximo e raman– desenvolvimento e validação de uma estratégia de pat / Antonio Diógenes Pereira de Oliveira. – Recife: O autor, 2014.

99 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Miracy Muniz de Albuquerque.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

Inclui referências.

1. Espectroscopia NIR. 2. Espectroscopia Raman. 3. Quimiometria. 4. Validação. 5. Glibenclamida. I. Albuquerque, Miracy Muniz de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2014-208)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 28 de fevereiro de 2014

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Antonio Diógenes Pereira de Oliveira** defendida nesta data e **APROVADA**, por decisão unânime, pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

(Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Simone da Silva Simões

(Depto. de Química da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB)

Assinatura: _____

Prof.^a Dr.^a Claudete Fernandes Pereira

(Depto. de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a minha família que Deus me concedeu construir,
especialmente a minha querida esposa, a quem tanto admiro e tanto amo, certeza
da presença de Deus na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelos talentos que me deste gratuitamente, aos quais tenho a missão de multiplicá-los.

Agradeço a meus pais Geraldo Vieira de Oliveira e Francisca Jerônimo Pereira de Oliveira por terem acreditado em mim e investido nesta caminhada e a meus irmãos que sempre foram sinônimos de alegria e companheirismo.

À minha esposa, Kátia Raquel de Almeida Oliveira, pelo apoio incondicional e a paciência necessária em tantos momentos.

Ao meu filho, João Gabriel de Almeida Oliveira, pela alegria e responsabilidade que trouxe para minha vida

Ao LAFEPE e a todos os amigos que me ajudaram nesta caminhada, especialmente Fernanda Vera Cruz de Vasconcelos, Severino Granjeiro Junior, Selma Verônica Vieira Ramos, Aila Mota de Santana, Bruno de Sousa Aires, aos estagiários que participaram direta e indiretamente deste trabalho e a todos os amigos que contribuíram para conclusão de mais uma etapa da minha jornada.

Ao meus orientadores professora Miracy, professor Lula e a banca avaliadora pelas contribuições Dra. Claudete e Dra. Simone.

RESUMO

A glibenclamida é uma sulfoniluréia de segunda geração usada no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. É um medicamento que é administrado em baixa dose terapêutica (5mg) na forma de comprimidos, condição em que pequenas variações na concentração do ativo farmacêutico podem influenciar a qualidade do produto. O monitoramento da produção deste produto requer um maior número de amostras analisadas em menor tempo possível, de forma a garantir maior uniformidade em todo o lote produzido ao longo da linha de produção. Este requerimento é possível através da implantação das Tecnologias Analíticas de Processo – PAT, com o uso de metodologias rápidas, exatas e precisas, como a utilização das espectroscopias no infravermelho próximo (NIR) e Raman, associadas à quimiometria. O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar métodos analíticos com uso das espectroscopias NIR e Raman associadas com a calibração multivariada para utilização no monitoramento de processos em uma estratégia de implantação de PAT na indústria farmacêutica. Foram produzidos dois modelos multivariados, PLS e PLS/JK para cada uma das técnicas NIR e Raman, em seguida os modelos foram validados, através de uma proposta que atende a legislação farmacêutica e a aplicação multivariada do método. Os espectros foram pré-processados com 1ª derivada, com filtro Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 13 e 7 pontos para NIR e Raman, respectivamente, considerando parte do espectro original. Os valores obtidos para RMSEP dos modelos estiveram compreendidos entre 0,07 a 0,11 para ambas as técnicas, demonstrando exatidão adequada a sua aplicação no PAT. Parâmetros como sensibilidade, seletividade, precisão, linearidade demonstraram atendimento aos requerimentos da validação, com exceção da robustez para o tempo de exposição da amostra no Raman foi um parâmetro crítico e não pôde ser alterado. Os modelos de calibração obtidos atendem aos requisitos da tecnologia analítica de processo, e encontram-se validados para uso nas rotinas de controle de qualidade.

Palavras-chave: Espectroscopia NIR. Espectroscopia Raman. Quimiometria. Validação. Glibenclamida.

ABSTRACT

Glyburide is a sulfonylurea of the second generation used in the treatment of diabetes mellitus type 2 . It is a medicine which is administered in low therapeutic doses (5 mg) in the form of tablets, condition where small variations in concentration of the active pharmaceutical may influence the quality of the product. Monitoring the production of product require a greater number of samples in the shortest possible time, to ensure greater uniformity throughout the batch produced along the production line. This application is possible through the implementation of Process Analytical Technology - PAT , with the use of rapid , accurate and precise methods such as the use of near infrared spectroscopy (NIR) , and Raman , combined with chemometry . The aim of this study was to develop and validate analytical methods using NIR and Raman spectroscopies combined with multivariate calibration for use in monitoring processes in a deployment PAT strategy in the pharmaceutical industry . Two multivariate models , PLS and PLS / JK were produced for each of the techniques NIR and Raman , followed in the models were validated through a proposal that meets pharmaceutical legislation and multivariate method application. The spectrum was preprocessed with 1st derivative , Savitzky - Golay filter , second order polinomial and window 13 and 7 points for NIR and Raman , respectively , whereas part of the original spectrum. The RMSEP values obtained for the models were in the range from 0.07 to 0.11 for both techniques, demonstrating its proper application in the PAT accuracy, sensitivity parameters as, selectivity , precision, linearity demonstrated compliance with the requirements of validating, except the robustness to the exposure time in the Raman sample was a critical parameter and can not be changed. The calibration models obtained meet the requirements of the analytical process technology , and are validated for use in routine quality control .

Key words: Near – Infrared Spectroscopy. Raman Spectrum Analysis. chemiometry. Validation Studies. Glyburide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de um equipamento por CLAE.	20
Figura 2 – Representação esquemática do espectro eletromagnético	21
Figura 3- Representação esquemática dos modos de vibração molecular	23
Figura 4 – Modos de aquisição de medida utilizados pela espectroscopia NIR: (a) transmitância, (b) transflectância e (c) reflectância difusa	24
Figura 5. Representação esquemática do Espalhamento Rayleigh bem como Espalhamento Raman Stokes e Anti-Stokes.	28
Figura 6. Tipos de ruídos mais importantes na espectroscopia Raman.	30
Figura 7 – Representação esquemática de uma calibração.	34
Figura 8– Organização dos dados na calibração multivariada.....	36
Figura 9 - Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais (λ_1 e λ_2), mostrando os eixos das componentes principais (PC1, PC2).....	38
Figura 10 - Fluxograma apresentando esquema geral para seleção dos métodos de calibração.....	39
Figura 11 - Representação das matrizes de dados (X e Y) na calibração multivariada.....	40
Figura 12 - Loadings versus números das variáveis para os 4 primeiros fatores de um modelo PLS.....	42
Figura 13 - Representação esquemática de amostras em um gráfico de resíduos de concentração studentizado versus influência das amostras	43
Figura 14 - Estrutura química da glibenclamida.	52
Figura 15 - Espectrofotômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR com acessório Tablet Autosampler.....	55
Figura 16. Espectrômetro Raman IdentichcekPerkin Elmer	56
Figura 17. Espectros NIR dos comprimidos de glibenclamida, na faixa espectral de $12.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$	65
Figura 18. Espectro de glibenclamida matéria prima, demonstrando que a região de informação espectral está compreendida entre $7.600 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$	66
Figura 19: Espectros NIR obtidos dos comprimidos de glibenclamida, na faixa espectral que está compreendida entre $7.600 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$	66

Figura 20. Espectros NIR das 71 amostras de comprimidos de glibenclamida pré-processados utilizando-se primeira derivada com filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 13 pontos. Faixa espectral: 7.600-4.000 cm^{-1}	67
Figura 21. Gráfico demonstrando a variância residual versus o número de variáveis latentes na validação cruzada. a) construção do modelo PLS,e b) construção do modelo PLS/JK, ambos para determinação do teor de glibenclamida por NIR.....	69
Figura 22. Gráfico demonstrando a distribuição aleatória dos resíduos em y pelos valores preditivos em y. a) modelo PLS,e b) modelo PLS/JK.	70
Figura 23. Gráfico dos valores previstos pelos valores de referência; a) PLS e b) PLS/JK.	71
Figura 24: Espectros Raman das 72 amostras de comprimidos de glibenclamida. Faixa espectral: 3278 a 200 cm^{-1}	77
Figura 25: Espectros Raman das matérias primas que constituem os comprimidos de glibenclamida. Faixa espectral: 3278 a 200 cm^{-1}	78
Figura 26: Espectros Raman das amostras de comprimidos de glibenclamida. Faixa espectral: 1630 a 200 cm^{-1}	79
Figura 27:Espectros Raman das amostras de comprimidos de glibenclamida pré-processados, utilizando a primeira derivada com filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 7 pontos. Faixa espectral: 16300 a 200 cm^{-1}	79
Figura 28: Gráfico demonstrando a variância residual versus o número de variáveis latentes na validação cruzada. a) construção do modelo PLS,e b) construção do modelo PLS/JK, ambos para determinação do teor de glibenclamida por Raman...	81
Figura 29: Gráficos demonstrando a distribuição aleatória dos resíduos em y pelos valores preditivos em y. a) modelo PLS,e b) modelo PLS/JK, para espectroscopia Raman.....	81
Figura 30: Gráfico dos valores previstos pelos modelos: a) PLS e b) PLS/JK para determinação do teor de glibenclamida em comprimidos versus valores de referência utilizando-se espectrosRaman – Modelo de calibração.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Regiões espectrais do infravermelho.....	22
Tabela 2: Classificação dos testes, segundo sua finalidade	45
Tabela 3. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	46
Tabela 4: Parâmetros experimentais estabelecidos para determinação do teor de glibenclamida.....	57
Tabela 5: Parâmetros cromatográficos da análise da glibenclamida.	61
Tabela 6: Resultados obtidos para validação do método CLAE para quantificação de glibenclamida em comprimidos.	62
Tabela 7: Valores do teor obtidos pelo método de referência para as amostras utilizadas na construção do modelo de calibração multivariada. A) lotes 2011; B) lotes 2012; P) e P') lotes piloto.....	63
Tabela 8: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para determinação do teor de glibenclamida em comprimidos utilizando os espectros NIR pré-processados	68
Tabela 9: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para as figuras de mérito, exatidão e linearidade utilizando os espectros NIR na validação do método analítico.....	72
Tabela 10: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para repetibilidade utilizando os espectros NIR na validação do método analítico.	74
Tabela 11: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para precisão intermediária utilizando os espectros NIR na validação do método analítico.	75
Tabela 12: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para robustez utilizando os espectros NIR na validação do método analítico	76
Tabela 13: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para determinação do teor de glibenclamida em comprimidos utilizando os espectros Raman pré-processados.....	80
Tabela 14: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para as figuras de mérito, exatidão e linearidade utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.....	83

Tabela 15: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para repetibilidade utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.	85
Tabela 16: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para precisão intermediária utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.	86
Tabela 17: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para robustez utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE	16
2.2 TECNOLOGIA ANALÍTICA DE PROCESSO – PAT	17
2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	19
2.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO	21
2.4.1 Espectrometria NIR na Indústria Farmacêutica	25
2.5 ESPECTROMETRIA RAMAN	27
2.5.1 Princípios teóricos básicos	27
2.5.2 Problemas relativos a espectroscopia Raman	29
2.5.3 Instrumentação	30
2.5.4 Aplicação, vantagens e desvantagens	31
2.6 QUIMIOMETRIA	33
2.6.1 Calibração Multivariada	34
2.6.2 Análise de Componentes Principais (PCA)	38
2.6.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	39
2.6.4 PLS e o algoritmo Jack Knife	40
2.6.5 Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado	41
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	43
2.7.1 Categorização dos ensaios quanto sua finalidade para validação de métodos analíticos	45
2.7.2 Estratégia de validação para métodos que empregam calibração multivariada	46
2.8 GLIBENCLAMIDA	51

3 OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1. AMOSTRAS	54
4.2. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NIR	54
4.3. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN.....	55
4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLIBENCLAMIDA POR CLAE	56
4.4.1 Reagentes e Substância Química de Referência.....	57
4.4.2 Equipamentos	57
4.4.3 Procedimento	57
4.5. TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS	58
4.5.1 Pré-processamento	58
4.5.2 Calibração Multivariada.....	59
4.6 VALIDAÇÃO.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	61
5.2 OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PELO MÉTODO POR CLAE	63
5.3 OBTENÇÃO E PRÉ PROCESSAMENTOS DOS ESPECTROS NIR DA GLIBENCLAMIDA	64
5.4.CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NIR	67
5.5 VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NIR	71
5.6 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA USANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN	77
5.7CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA USANDO RAMAN PELO MÉTODO DE PLS.....	80

5.8 VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA USANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN	82
5.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	87
6 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A glibenclamida é um antidiabético oral, dotado de potente ação hipoglicemiante e ótima tolerabilidade. Este medicamento atua sobre as células betas do pâncreas, estimulando a produção de insulina e, conseqüentemente, a normalização do metabolismo dos carboidratos. Sua ação se dá com pequenas concentrações quando comparada a outros fármacos, formulações de 5mg são comumente comercializadas e caracterizam-se por conter o princípio ativo em menos de 5% do conteúdo (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007). A quantificação de Glibenclamida comprimido é feita através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizado tampão fosfato e acetonitrila como fase móvel (BRASIL, 2010b). Tal condição demonstra a criticidade analítica para o controle de qualidade de qualidade do fármaco.

O controle de qualidade na indústria farmacêutica é um componente de um conjunto de ações denominadas de Boas Práticas de Fabricação (BPF), parte fundamental do Sistema de Gestão da Qualidade na indústria de medicamentos (COSTAL, 2013). Tal controle pode ser dividido em duas etapas bem definidas: o controle de qualidade da formulação durante o processo de produção e o controle de qualidade do produto final. Para as duas etapas, há exigência, por parte dos órgãos reguladores, de métodos de análises confiáveis e robustos, de forma que possam ser utilizados na rotina para assegurar a qualidade do produto final (BRASIL, 2010a),.

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica de primeira escolha nos compêndios oficiais para análises quantitativas de teor, de substâncias relacionadas e de produtos de degradação, através da separação física dos compostos e resposta única de um detector. Entretanto, tal método envolve o uso de grandes quantidades de solventes e consumíveis tóxicos ao homem e meio ambiente, além de tempo relativamente longo de análise. (GRANGEIRO JUNIOR, 2011)

O emprego de métodos espectroscópicos como as espectroscopias no infravermelho próximo (NIR) e Raman, surgem como alternativa de fácil execução, com preparo mínimo das amostras, com resultados rápidos, com praticamente

ausência de uso de reagentes e redução de impactos ao meio ambiente, quando comparado com a CLAE. (DAVE, 2007; MARKOPOULOU, 2004)

A espectrofotometria de absorção na região do infravermelho próximo (NIR) está fundamentada na espectroscopia vibracional, cuja radiação eletromagnética utilizada varia de 750 a 2500 nm, originando como resposta espectros que descrevem as características intrínsecas das moléculas de interesse a partir de alterações vibracionais em suas ligações químicas (JAMROGIEWICZ, 2012). Enquanto que a espectroscopia Raman surgiu a partir da descoberta do efeito de espalhamento inelástico da luz em 1928 (GRASSELLI; SNAVELY; BULKIN, 1981).

As duas técnicas NIR e Raman, com elevado grau de seletividade molecular, associado a características analíticas como técnicas não destrutivas, não invasivas e que permitem a análise de vários parâmetros, com pouco ou nenhum preparo da amostra (PASQUINI, 2003), apresentam-se como ferramentas para Tecnologia Analítica de Processo, do inglês *Process Analytical Technology* (PAT), com ganho de tempo, mantendo a segurança analítica requerida pelo processo.

Estratégias de PAT para indústria farmacêutica têm sido incentivadas, desde 2004, com as publicações da Agência Reguladora Americana para Medicamentos e Alimentos (*Food and Drug Administration* - FDA) e da farmacopéia americana (USP) em 2004 com o infravermelho e 2006 com o Raman. O intuito era oferecer direcionamentos para o emprego de métodos rápidos para controle em processos.

A utilização das espectroscopias Raman e NIR requer a associação a métodos quimiométricos (VANKEIRSBILCK *et al*, 2002; THERMO SCIENTIFIC, 2007). Neste contexto, a quimiometria é utilizada para tratar os dados gerados nas leituras das medidas instrumentais. Tal fato colaborou para o desenvolvimento e disseminação do uso do NIR (Infravermelho Próximo) e Raman através da construção de modelos matemáticos, de forma a oferecer um alto grau de confiabilidade aos resultados analíticos, requerendo validação externa posterior para utilização na análise de medicamentos em conformidade com a legislação vigente. (BRASIL, 2003; SIMÕES, 2008; OTTO, 1999)

Desta forma, em vista da necessidade de se analisar o teor de glibenclamida em comprimidos com as vantagens já descritas para análise espectroscópicas, o presente trabalho comparou o desenvolvimento de novas metodologias por NIR e RAMAN associadas à quimiometria.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico deste trabalho está composto pelos seguintes assuntos, didaticamente divididos e aqui apresentados para o melhor entendimento das discussões: Sistema de Gestão da Qualidade, Tecnologia Analítica de Processo – PAT, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopias no infravermelho e Raman, quimiometria e calibração multivariada, e validação de métodos analíticos.

2.1 SISTEMA DE GESTÃO DA QUALIDADE

De acordo com a norma NBR ISO 9000:2008 (2008), a qualidade é entendida como todas as características de uma entidade que lhe confere a capacidade de satisfazer as necessidades explícitas e implícitas. Para essa definição, o emprego da terminologia “de boa qualidade” tem como objetivo exprimir a excelência de um produto ou serviço e o cumprimento das especificações, quantitativas ou qualitativas, determinadas pelas autoridades competentes (SIMÕES, 2008). Na indústria de medicamentos, há requerimentos legais para o atendimento à qualidade deste tipo de produto que é amparada por legislações publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Nesses termos, a publicação em vigor que determina os requerimentos para produção de medicamentos e oferece os subsídios para as inspeções sanitárias é a RDC 17 (2010). Esta resolução estabelece as normas gerais para Boas Práticas de Fabricação (BPF) de produtos farmacêuticos no país.

A preocupação com a qualidade do produto, além das exigências regulamentares, faz com que as empresas adotem estratégias que lhes confirmem segurança ao longo do processo de fabricação. A criação de setores específicos para administrar a qualidade dentro dessas empresas é uma das estratégias gerenciais, sendo dois deles bem conhecidos: o controle de qualidade e a garantia de qualidade (Brasil, 2010a).

O controle de qualidade é o setor responsável pela avaliação do produto farmacêutico em suas várias etapas do processo de fabricação, além dos materiais de partida, como materiais de embalagem e matérias primas. Por outro lado, a garantia da qualidade se ocupa com a administração de todos os subsistemas da qualidade: como gerenciamento de documentos da qualidade, tais como:

investigação de desvios da qualidade, reclamações, treinamentos, documentação técnica e etc.

Neste contexto, o conjunto das ações dos setores de controle e garantia de qualidade asseguram que medicamentos após passar por todas as suas fases de fabricação estarão aptos a serem comercializados. Há que constar que esta estratégia do sistema da qualidade é construída devido impossibilidade de se analisar todas as unidades produzidas de todos os lotes, devendo haver uma amostragem representativa para garantir a liberação do lote em conformidade com a legislação e com o registro do produto junto a ANVISA.

O controle de qualidade através de recursos tecnológicos cada vez mais modernos, tem aumentado a segurança analítica, uma vez que permite elevar a capacidade do número de unidades analisadas em um menor espaço de tempo. Tudo isso, sem que haja prejuízo da sensibilidade e acurácia das ferramentas analíticas, que são pontos de extrema importância na análise de medicamentos.

Desse modo, os laboratórios requerem cuidados estritos com a rotina de trabalho para que a precisão dos seus experimentos não seja afetada, caracterizando sua contribuição na implantação e manutenção do sistema de gestão da qualidade. É parte desta estratégia a utilização de métodos de análise de fármacos e medicamentos que estejam descritos em compêndios oficiais aceitos, ou validados de acordo com a Resolução 899 (2003) da ANVISA – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. No caso dos métodos farmacopeicos, esses requerem apenas uma verificação de forma a confirmar se os mesmos estão adequados ao uso no laboratório como preconizado na RDC 17 (2010).

A importância da manutenção do sistema de gestão da qualidade na indústria farmacêutica é imprescindível para fabricação de medicamentos e deve estar comprovada na prática e documentada em toda sua interface, obedecendo às normas regulamentares instituídas. O controle de qualidade dos medicamentos é parte fundamental deste sistema.

2.2 TECNOLOGIA ANALÍTICA DE PROCESSO – PAT

A Tecnologia Analítica de Processo é definida como sistemas para análises e controle de processos, baseados em medidas frequentes de parâmetros críticos de qualidade ou atributos de desempenho de matérias primas ou produtos

intermediários que promovam a garantia da qualidade dos produtos finais obtidos no fim da cadeia produtiva (MENEZES, 2005)

O uso do PAT na indústria de manufatura é parte do desenvolvimento da engenharia de processos a serviço da garantia da qualidade de produtos, utilizando: a química analítica (técnicas para análise da qualidade do produto), quimiometria (técnicas de modelação com base de dados) e controle de processos (uso inteligente de processo para supervisão e diagnóstico multivariável) (LOPES, 2004). Sua ênfase está na realização de medidas por meio de sensores durante o desenvolvimento dos processos, com intuito de caracterizar as propriedades do material, substituindo técnicas tradicionais (ALCIATURI, 2010).

As tecnologias analíticas de processo nasceram no século XXI para as indústrias do novo milênio e apareceram como mais do que uma simples soma de disciplinas já existentes. O PAT apresenta uma alteração na cultura do uso do laboratório de controle de qualidade para o controle baseado no processo. Aplicações distintas para o PAT já existem em indústrias como na indústria petroquímica: refinação de petróleo que trabalham com produção do tipo contínua; indústria química: como na síntese química, e na indústria farmacêutica: no controle de parâmetros da qualidade em linha fabricação. (MENEZES, 2005).

A implementação do PAT ocorre em três níveis, segundo Menezes (2005):

No primeiro nível pode-se utilizar o PAT para alteração de protocolos de qualidade já existentes, um exemplo é a utilização da espectroscopia no infravermelho para medição de parâmetros de processo, tais como a umidade em sólidos. Nesse caso é possível reduzir custos associados com o controle de qualidade (MENEZES, 2005).

No segundo nível, o uso integrado da análise de dados e monitorização em processos é aplicado à melhoria da operação industrial. Com esta operação é possível, não somente melhorar os custos de controle, mas obter ganhos de rendimento econômico com o processo. A diferença entre estes dois primeiros níveis reside no fato de haver uma intervenção maior do segundo, indo além do monitoramento regulamentar para uma condição onde a aplicação da técnica online, pode definir ou limitar uma etapa do processo, como na aplicação de sondas por infravermelho para definição de tempo de mistura em formas sólidas (MENEZES, 2005).

No terceiro nível, a aplicação está voltada para o desenvolvimento e scale up de novos processos. O uso extensivo nesse nível permite minimizar o tempo associado aos ciclos de investigação e o desenvolvimento de processos e produtos. A utilização das ferramentas de PAT utilizadas no desenvolvimento do produto e do processo garante, em consequência, sua utilização na rotina de fabricação, mantendo as características iniciais dos mesmos, como planejada no desenvolvimento (MENEZES, 2005).

A Agência Americana para o Controle de Alimentos e Medicamentos (FDA) publicou em 2004 uma diretriz para utilização do PAT com intuito de encorajar o setor industrial farmacêutico a promover a otimização de seus processos através do emprego das ferramentas do PAT, fornecendo bases teóricas sistemática (FDA, 2004). No entanto, a implementação ainda encontra algumas barreiras como a criação de normas mais claras no Brasil e a capacitação de recursos humanos nas disciplinas necessárias, tais como espectroscopia, quimiometria e controle em processo, além da integração entre as mesmas. (ALCIATURI, 2010)

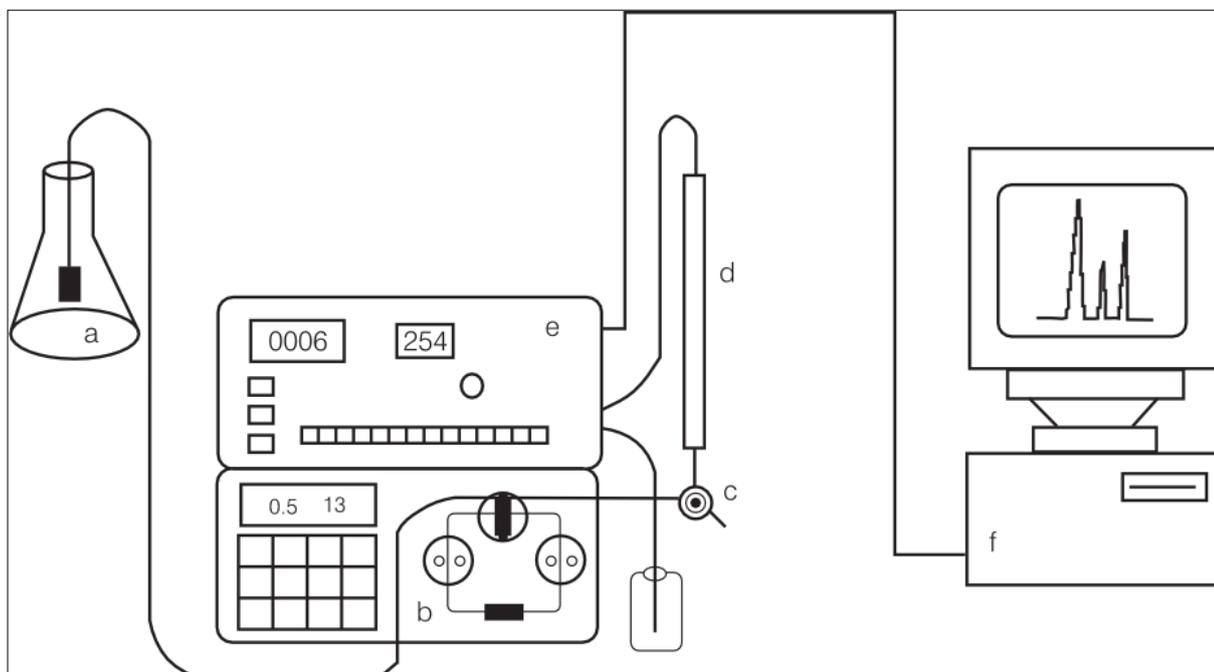
2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação, fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis: a fase móvel (líquida) e a fase estacionária (sólida) contida em uma coluna cilíndrica (CIOLA, 1998). Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem: da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. No tocante às análises farmacêuticas a maioria delas baseia-se no método de separação por partição (BRASIL, 2010b).

O equipamento mais utilizado na obtenção dos cromatogramas é o cromatógrafo a líquido. O mesmo consiste em um reservatório que contém a fase móvel (a), uma bomba (b) com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor (c) para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica (d), um detector (e) e um dispositivo de captura de dados como um

software, integrador ou registrador (F) (BRASIL, 2010b), conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1- Representação esquemática de um equipamento por CLAE.



Fonte: <http://qnint.s bq.org.br/qni/visualizarConceito.php?idConceito=33>

A CLAE é uma metodologia comumente empregada no controle de qualidade de fármacos. Sua popularidade resultou da sua habilidade de efetuar separação, identificação e quantificação de espécies químicas com efetiva velocidade e elevada sensibilidade, quando comparado com outros tipos de cromatografia, como a cromatografia em coluna ou em camada delgada (CCD). Atualmente, esta técnica é usada em diversas áreas da pesquisa farmacêutica, como por exemplo: purificação sintética ou de produtos naturais, caracterização de metabólitos, avaliação de ingredientes ativos, impurezas, produto de degradação, testes de dissolução, em estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos entre outros (SUCHARA, 2007).

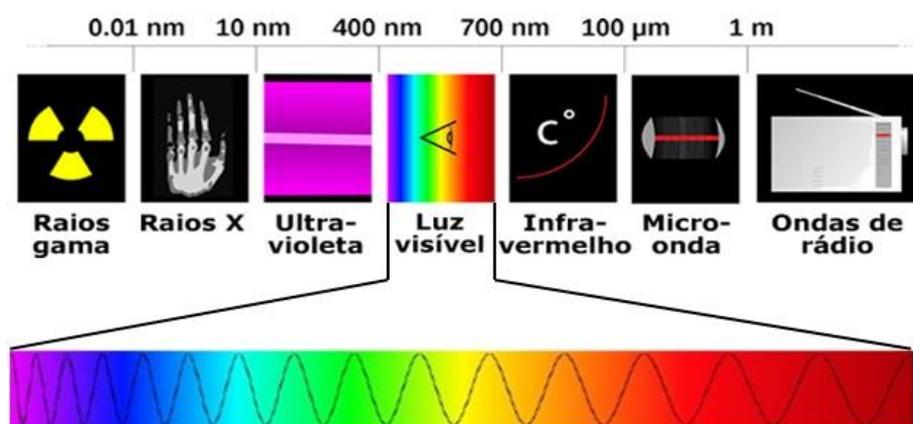
Apesar de ser amplamente empregada na indústria farmacêutica, a cromatografia líquida de alta eficiência apresenta-se como um método analítico lento e oneroso, pois envolve várias etapas analíticas (extração/dissolução da amostra, preparação frequente de reagentes e soluções de calibração, etc.). As análises podem consumir horas, sobretudo na aplicação analítica de produtos farmacêuticos em fase sólida.

2.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

A fundamentação das análises espectrofotométricas está baseada na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas. A espectroscopia de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelho, onde tal classificação é realizada de acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada (BRASIL, 2010b).

A radiação eletromagnética é uma forma de energia que se propaga ora como partículas, ora como ondas podendo ser subdividida em regiões de comprimento de onda característico (Figura 2). O comprimento de onda (λ) é geralmente especificado em nanômetros nm (10^{-9} m), e em alguns casos em micrômetros, μm (10^{-6} m). No caso do infravermelho a radiação eletromagnética pode ser também descrita em termos de número de onda e nesse caso é expressa em cm^{-1} (BRASIL 2010b).

Figura 2 – Representação esquemática do espectro eletromagnético



Fonte: <http://blog.sarmiento.eng.br/?p=134>

A radiação no infravermelho compreende o intervalo de números de onda de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} (SKOOG, et al 2006). O espectro na região do infravermelho é usualmente dividido em infravermelho próximo (do inglês Near Infrared - NIR), infravermelho médio (do inglês Medium Infrared - MIR) e

infravermelho distante (do inglês Far Infrared - FIR). As faixas de comprimento de onda e número de onda para as distintas regiões do infravermelho são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Regiões espectrais do infravermelho

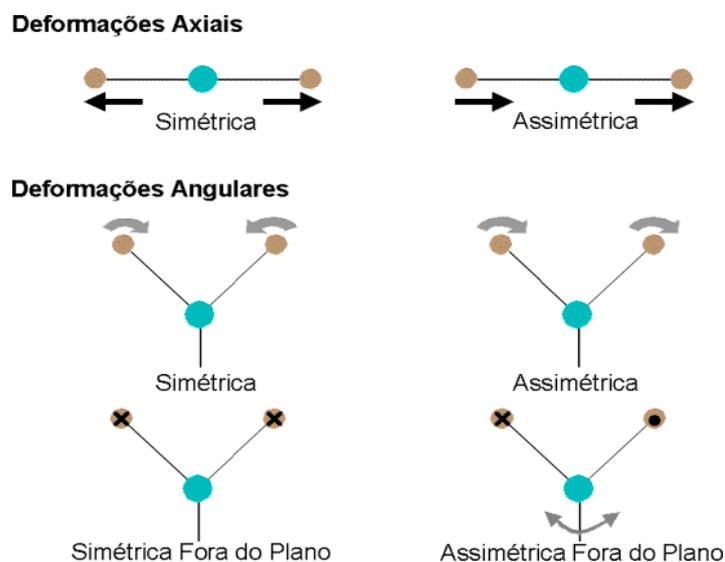
Região	Número de onda (cm-1)	Comprimento de onda (nm)
NIR	12.800 - 4000	780 – 2500
MIR	4000 - 400	2500 – 5000
FIR	200 - 10	5000 – 1.000.000

Fonte: SKOOG, et al 2006

A energia total de toda e qualquer molécula envolve a energia derivada da vibração (energia vibracional devido ao movimento relativo de átomos ou grupos de átomos constituintes da molécula); da rotação (energia rotacional devido à rotação da molécula em torno de um eixo) e normalmente da energia eletrônica gerada pela configuração de elétrons na molécula. As moléculas ao absorverem energia sofrem uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado. A passagem ao estado excitado não é de natureza contínua realizando-se, geralmente, em etapas chamadas de transições (SHARADER, 1995).

Na região do infravermelho ocorrem somente transições de energia vibracional e rotacional por ser a radiação nesta região insuficientemente energética para promover transições eletrônicas. As vibrações induzidas pela radiação infravermelha compreendem estiramentos das ligações interatômicas e variações nos ângulos entre duas ligações (Figura 3). Moléculas homonucleares como O₂, N₂ ou Cl₂ não sofrem variações efetivas no momento de dipolo durante a vibração e rotação e, conseqüentemente, não absorvem na região do infravermelho, ou seja, somente moléculas que apresentam variação no momento dipolo podem absorver energia na região do infravermelho. Ao contrário, moléculas diatômicas heteronucleares (HCl, CO, entre outras) apresentam modos vibracionais de absorção ativos no infravermelho (SKOOG et al, 2006).

Figura 3- Representação esquemática dos modos de vibração molecular

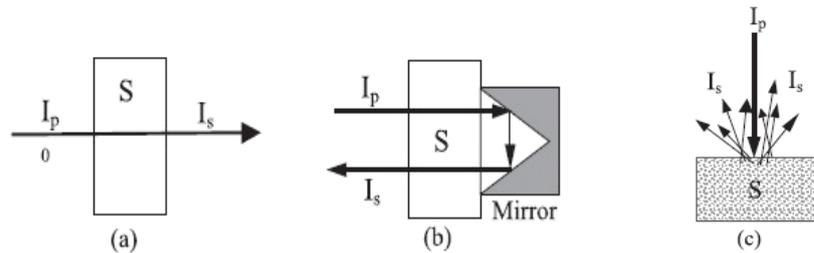


Fonte: <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>

Os espectros no infravermelho próximo (NIR) são caracterizados por bandas de absorção associadas principalmente a sobretons e combinações de modos vibracionais fundamentais de ligações como C-H, N-H, O-H e S-H que aparecem geralmente na região do infravermelho médio (SKOOG et al, 2006). Em geral, as ocorrências na região do NIR provêm de ligações das moléculas em que participa o hidrogênio, o que torna a técnica útil para a análise de compostos orgânicos (LARKIN, 2011). Dessa forma, informações químicas e físicas, de característica qualitativa e quantitativa podem ser obtidas a partir do espectro NIR.

Os espectros no infravermelho podem ser obtidos a partir de amostras em diferentes estados físicos: sólidas, líquidas e gasosas. A qualidade de seus espectros depende do método de preparo da amostra e do tipo de acessório utilizado para a sua obtenção. As medidas podem ser realizadas por reflectância (sólidos, materiais em suspensão ou viscosos), transmitância/absorbância (líquidos ou sólidos) ou transflectância (líquidos) (BLANCO; VILLARROYA, 2002).

Figura 4 – Modos de aquisição de medida utilizados pela espectroscopia NIR: (a) transmitância, (b) transflectância e (c) reflectância difusa



Fonte: PASQUINI, 2003, P. 207.

O modo de transmissão atua obtendo a medida a partir da diminuição da intensidade da radiação em determinados comprimentos de onda quando a radiação passa através da amostra. Já o modo de reflectância é dividido em reflectância difusa e reflectância total atenuada (ATR). A reflectância difusa é a medida da razão da intensidade da luz refletida pela amostra e a luz refletida por uma superfície de referência. A radiação não absorvida é refletida em direção ao detector. Na reflectância total atenuada a radiação infravermelha incide sobre um cristal com alto índice de refração (ZnS, Ge, diamante) sofrendo reflexões sucessivas nas paredes desse elemento. Se a amostra interagir com parte da radiação incidente (onda evanescente) ocorre à atenuação do feixe nos comprimentos de onda de absorção e o sinal é enviado para o detector (SKOOG, et al. 2006; BRASIL, 2010b).

As medidas por ATR são usadas, geralmente, para aquisição dos espectros na região do infravermelho médio. Para o modo de transflectância ocorre a combinação dos modos de transmissão e reflexão. Nesse tipo de medida um espelho ou uma superfície refletora é usada para refletir a radiação transmitida através da amostra, incidindo uma segunda vez pela mesma dobrando assim o caminho óptico. A radiação não absorvida é refletida em direção ao detector (SKOOG, et al. 2006; BRASIL, 2010b).

As bandas de absorção no NIR são tipicamente largas, sobrepostas e bem menos intensas, cerca de 10 a 100 vezes mais fracas que suas bandas fundamentais na região do infravermelho médio (MIR). Entretanto, isso não é uma desvantagem do NIR, visto que já se encontram disponíveis, para uso nessa região, fontes de radiação intensas e detectores de alta eficiência que contribuem para o aumento da resolução de tais sinais. Apesar da baixa absorvidade, a

espectroscopia NIR permite alta profundidade de penetração. Este aspecto constitui uma vantagem analítica, pois permite análises diretas de fortes absorventes e nivela amostras com espalhamento, como os líquidos turvos ou sólidos nos modos de refletância ou transmitância sem necessidade de pré-tratamento (PASQUINI, 2003).

Os espectrofotômetros na região do NIR, comumente são constituídos de fonte de radiação apropriada, monocromador ou interferômetro e detector. Cubetas, fibras ópticas, células de transmissão e acessórios para reflexão difusa são os acessórios mais comuns para aquisição dos espectros. Uma das vantagens do NIR em relação ao MIR é que os instrumentos operados nessa região podem ser construídos utilizando sistemas ópticos semelhantes aos que operam na região do UV-Vis (SKOOG et al, 2006). Em geral, esses instrumentos são mais robustos quando comparados aos que operam na região do MIR, pois sua óptica é menos sensível à umidade do ar. Os instrumentos na região do MIR também são eficientes, entretanto, possuem um custo mais elevado (PASQUINI, 2003).

Além de fornecer muitas informações químicas relevantes, os espectros NIR também se correlacionam com as propriedades físicas das amostras, o que dificulta ainda mais a interpretação direta dos dados obtidos. Logo, o principal problema encontrado com a utilização da espectroscopia NIR é a complexidade de seus espectros, uma vez que, ao contrário dos espectros MIR, onde as bandas de absorção são diretamente interpretadas devido à sua especificidade, os espectros NIR são de difícil interpretação em virtude da sua natureza (sobretons e bandas de combinação de níveis vibracionais de energia) (WILLIAMS; NORRIS, 2001). Diante disso, para que ocorra a utilização analítica das informações desejadas, se faz necessário à utilização de ferramentas quimiométricas para o tratamento dos espectros NIR.

2.4.1 Espectrometria NIR na Indústria Farmacêutica

Tendo em vista os rígidos requisitos da indústria farmacêutica dada à utilização final dos seus produtos e o impacto que esses podem representar na vida dos consumidores, torna-se indispensável a realização de um grande número de análises durante as diferentes fases do processo de produção de medicamentos (BLANCO; VILLARROYA, 2002). Diante disso, a FDA publicou um guia para a indústria farmacêutica em que descreve um quadro regulamentar destinado à

aplicação do PAT (TREVISAN; POPPI, 2006). Tendo sido publicada no mesmo ano, na USP 27, o capítulo que inaugurava a regulamentação da aplicação do infravermelho na área industrial farmacêutica.

Como anteriormente citado, a espectroscopia no infravermelho associada a quimiometria para tratamento dos dados é uma técnica que nos últimos anos vem substituindo os métodos convencionais utilizados para atender as estratégias de PAT. É a espectroscopia na região do infravermelho próximo associada a técnicas quimiométricas para tratamento dos dados (JAMROGIEWICZ, 2012).

A espectrofotometria no infravermelho médio é reconhecida como uma técnica que apresenta a impressão digital de milhares de substâncias orgânicas, sendo utilizada na identificação de compostos e elucidação de estruturas. Já o infravermelho próximo não foi considerado inicialmente como uma técnica analítica com algum valor prático, sendo originalmente uma extensão da região do visível que não foi explorada até 1970. Os primeiros trabalhos que proporcionaram interesse pelo estudo da espectrofotometria no infravermelho próximo como ferramenta de análise na indústria, foram desenvolvidas pelo professor Karl Norris. Após os trabalhos de Karl Norris, a metodologia NIR foi fortemente impulsionada pelo avanço da instrumentação relacionada à técnica e desenvolvimento dos microcomputadores, participando dessa forma do nascimento da Quimiometria (MUÑIZ et al., 2012).

No tocante a indústria farmacêutica, a utilização da espectroscopia NIR tem sido adotada progressivamente nas diferentes etapas do processo de produção, desde a síntese de substâncias ativas e excipientes, até o controle de materiais e matérias-primas, verificação de processos de produção e análise do medicamento como produto final adicionando assim novos atributos a todo o processo de controle e garantia de qualidade (LEITÃO, 2012).

Atualmente a espectroscopia NIR é significativamente recomendada por agências reguladoras como técnica para a identificação, quantificação e controle de parâmetros físicos e químicos, seja da matéria-prima ou do produto final. No entanto a sua aceitação e implementação na indústria farmacêutica, bem como em outros setores industriais, tem sofrido restrições devido às exigências para a sua validação, como aquelas expressas na norma ASTM E 1655 05 e outras normas específicas. Tais exigências giram em torno de adequações para a construção e validação de modelos de calibração multivariada usando espectrometria NIR (SIMÕES, 2008).

2.5 ESPECTROMETRIA RAMAN

A espectrometria Raman teve seu primeiro trabalho científico publicado em 1928 por Chandrasekhara Venkata Raman, um artigo que descrevia a observação experimental do espalhamento inelástico da luz visível, feito este que lhe rendeu o prêmio Nobel de Física em 1930 (RAMAN, KRISHNAN, 1928; MILLEN, DE FARIA, TEMPERINI, 2005). Poucos anos após, centenas de trabalhos foram publicados envolvendo o uso do Raman no estudo de propriedades moleculares, sendo um período de intensa pesquisa, com significativa redução em meados dos anos 60, pois os equipamentos Raman eram muito simples e não apresentavam a mesma tecnologia que já dispunham os espectrômetros no infravermelho, a baixa resolução limitava os avanços nas pesquisas científica com a técnica do Raman. (SANTOS, 2009).

Esta dificuldade foi superada na década de 70, quando o físico norte-americano Theodore Maiman apresentou ao mundo o primeiro laser, uma fonte de monocromática de boa intensidade. Nesse mesmo ano, o físico brasileiro Sérgio Pereira Porto trabalhou na melhoria dos dispositivos e equipamentos usados para medir o efeito. Ao usar os novos lasers, passou-se a obter espectros de amostras sólidas com alta intensidade e qualidade de resolução (EVANS, 2012).

Dos anos 80 até os dias atuais, a espectroscopia Raman tornou-se universal. A técnica tem uma variedade de aplicações em diversas áreas. Isso foi possível principalmente pelo uso de laser no infravermelho próximo e técnicas de transformada de Fourier (espectroscopia Raman FT), que virtualmente eliminou a limitação encontrada para amostras fluorescentes, e ainda pelo uso dos detectores multicanal de alto desempenho, que conduziu a um significativo aumento da sensibilidade da técnica (SANTOS, 2009).

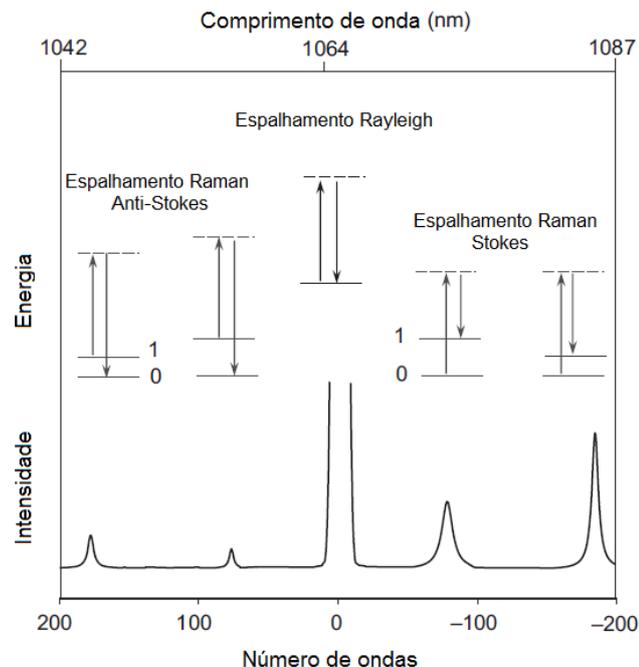
2.5.1 Princípios teóricos básicos

Quando uma molécula é irradiada por uma fonte de luz, a energia pode ser transmitida, absorvida ou espalhada. As análises por espectroscopia Raman são baseadas na incidência de um feixe de luz monocromática de frequência ν_0 sobre uma amostra cujas características moleculares se desejam determinar, examinando-se posteriormente a luz dispersada por essa amostra (ν_s). Para que uma molécula apresente efeito Raman é necessária uma alteração no potencial de polarização da

molécula causada pela radiação incidente e a quantidade de mudança na polarizabilidade determina a intensidade de dispersão do Raman (KALANTRI, SOMANI, MAKHIJA, 2010).

Durante o espalhamento, o sistema sofre colisão com um fóton, o qual não chega a ser absorvido e sim espalhado. Esse espalhamento pode ser elástico (Rayleigh) ou inelástico (Raman). No caso do espalhamento Rayleigh as energias incidente e espalhada tem os mesmos valores, e nenhuma informação vibracional molecular estará nele contida. Já no efeito Raman a energia da radiação inelasticamente espalhada pode ser maior ou menor que a energia incidente, gerando o espalhamento anti-Stokes e Stokes, respectivamente. Comumente, o espalhamento Stokes é o mais utilizado pela maior intensidade de seu sinal em relação ao espalhamento anti-Stokes, pois enquanto o primeiro depende da população do estado vibracional fundamental, o último depende da população de estados vibracionais excitados. Esquemáticamente pode-se representar o espalhamento inelástico e elástico da radiação conforme mostrado na Figura 5 (MILLEN, DE FARIA, TEMPERINI, 2005; KALANTRI, SOMANI, MAKHIJA, 2010).

Figura 5. Representação esquemática do Espalhamento Rayleigh bem como Espalhamento Raman Stokes e Anti-Stokes.



Fonte: modificado de LARKIN (2011).

O espectro Raman de uma determinada molécula consiste de uma série de picos ou faixas, cada um transferido por uma frequência vibracional característica da molécula. Cada molécula tem seu espectro característico, e dessa forma, o espectro Raman pode fornecer uma “impressão digital” de uma substância a partir da qual a composição molecular pode ser determinada. As linhas espectrais são fornecidas em função de frequências denominadas de deslocamentos Raman (“Raman shift”) que são expressas em cm^{-1} (LORINCZ, 2004).

2.5.2 Problemas relativos a espectroscopia Raman

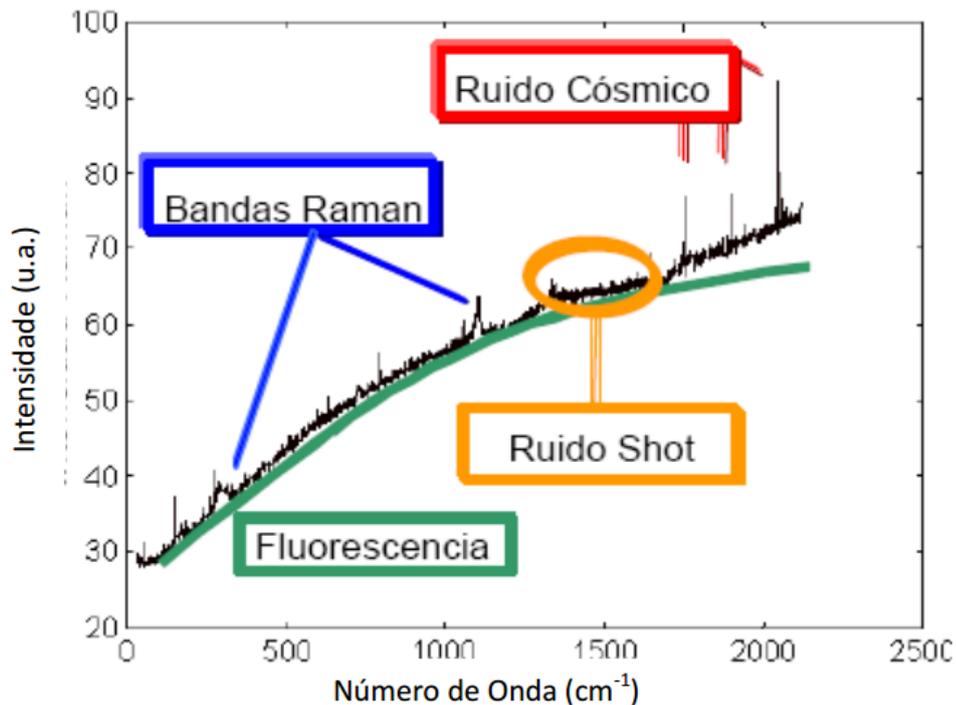
Um dos problemas inerente a aquisição de qualquer sinal é o ruído presente na medida. No caso da obtenção de espectros Raman, os ruídos mais habituais podem ser classificados em cinco grupos diferentes:

- *Ruído shot*: é resultado da natureza aleatória da luz. É inevitável na medida de espectros Raman.
- *Ruído gerado pela amostra*: inclui emissões óticas não desejadas e geradas pela própria amostra, como é o caso da fluorescência. Ao incidir um fóton sobre uma molécula, este é absorvido e a molécula passa a um estado eletrônico excitado, onde permanece por alguns nanos segundos até saltar para um estado de menor energia, liberando um fóton de energia mais baixa que o incidente. Nos espectros Raman, a fluorescência geralmente ocorre como uma curvatura suave da linha de base e pode alcançar uma intensidade que chegue a mascarar a intensidade das bandas Raman. O ruído gerado pela amostra inclui também as mudanças de intensidade Raman devido a mudanças na amostra não relacionadas com a concentração, como variações de temperatura e heterogeneidade, já que a análise realizada em um ponto da amostra pode não ser representativa da amostra por completo.
- *Ruído gerado pelo equipamento*: depende do equipamento utilizado na análise. Inclui ruídos introduzidos pelo detector, como o ruído térmico e o ruído de leitura.
- *Ruído computacional*: se refere ao ruído introduzido no processo de digitalização do sinal de saída do detector.

- *Ruído gerado por fontes externas*: geralmente é causado por alguma fonte de luz externa que contamina o sinal em algum ponto do equipamento. A radiação cósmica advinda da luz solar, por exemplo, gera *spikes* (picos estreitos de intensidade variada) (MEDEIROS, 2010).

Os principais tipos de ruído podem ser observados na Figura 6.

Figura 6. Tipos de ruídos mais importantes na espectroscopia Raman.



Fonte: MEDEIROS, V. M. M. (2010).

2.5.3 Instrumentação

Os equipamentos para espectrometria Raman possuem em comum uma fonte de excitação (*laser*), sistema de iluminação da amostra e espectrômetro apropriado.

As fontes usadas na espectrometria Raman moderna são quase sempre constituídas de *lasers*. O *laser* é um oscilador óptico que emite fótons com propriedades vetoriais e escalares idênticas: alta potência, monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade. A alta intensidade do *laser* é necessária para produzir espalhamento Raman com intensidade suficiente para ser medido com uma

relação sinal-ruído razoável. As fontes no infravermelho próximo (laser de diodo e Nd:YAG, que operam em 785 nm e 1064 nm, respectivamente) possuem duas grandes vantagens sobre os *lasers* de comprimentos de onda menores, como exemplo, podem ser operadas com potências muito maiores sem causar fotodecomposição da amostra e não são enérgicas o suficiente para popular um número significativo de estados excitados eletrônicos que produzem fluorescência, na maior parte das moléculas (SKOOG, 2006; KALANTRI, SOMANI, MAKHIJA, 2010).

A luz do *laser* excitante pode ser distribuída para a amostra através de um sistema óptico convencional de espelhos e de lentes, ou através de cabos de fibras ópticas, podendo estender-se por dezenas de metros. Um sistema de lente foca a luz de excitação sobre a amostra e recolhe a luz dispersa resultante. Uma coleta eficiente do espalhamento da luz é essencial na espectroscopia Raman devido à fragilidade do efeito. A coleção óptica (fibra óptica) deve ser posicionada o mais próximo possível da amostra e deve ter um bom ângulo de abertura. O espalhamento de luz coletado deve ser espectralmente filtrado para remover o espalhamento Rayleigh (KALANTRI, SOMANI, MAKHIJA, 2010).

Depois de capturado e filtrado, o sinal espalhado é então focalizado na entrada do espectrômetro, o qual através de um sistema interno de grades de difração irá separar o sinal espalhado em suas componentes principais, direcionando-as a uma câmera CCD que captura estes sinais separados e envia para o computador sob a forma de espectros (MARTINS, 2008).

2.5.4 Aplicação, vantagens e desvantagens

Recentemente, a espectroscopia Raman tem sido aplicada em diversas áreas como a médica, farmacêutica e de nanotecnologia, para determinar as concentrações e diferenças nas soluções de compostos orgânicos e inorgânicos (ESPINOSA, 2012).

A espectroscopia Raman tem um imenso potencial no campo de produtos farmacêuticos. A rápida identificação de compostos nas análises de misturas de fármacos, excipientes e ingredientes ativos; a identificação de contaminantes; a caracterização de materiais formulados e o entendimento de processos de mistura

envolvidos nas formulações farmacêuticas são agora acessíveis usando a técnica Raman. Em geral, é utilizada para supervisionar o controle de processos de fabricação em grande escala (KALANTRI, SOMANI, MAKHIJA, 2010).

A espectrometria Raman apresenta diversas vantagens sobre outros métodos de identificação e quantificação de substâncias. Dentre esta, pode-se destacar:

- Não exige preparo da amostra. Com isto, há economia de tempo, reagentes e do próprio produto, já que é uma técnica não destrutiva;
- A análise por espectrometria Raman é uma técnica não invasiva. Desta forma, os produtos podem ser analisados diretamente em suas embalagens, tais como plásticos e vidros;
- O tempo de análise é extremamente curto, o que permite um rápido *feedback* do setor de controle de qualidade para o departamento de produção e desenvolvimento;
- Por ser uma técnica de simples manuseio, a exigência é de mínimo treinamento;
- É uma técnica de boa reprodutibilidade;
- Uma vez que a água é um fraco espalhador de Raman, soluções aquosas podem ser usadas sem risco de interferências significativas nos resultados.
- A amostragem para espectroscopia Raman é facilitada através da utilização de fibras ópticas.

No entanto, essa técnica, como qualquer outra apresenta limitações dentre as quais pode-se destacar:

- O custo do equipamento tem sido o maior obstáculo para a adoção da espectroscopia Raman como rotina nas análises farmacêuticas;
- Para certos tipos de *lasers*, a fluorescência da amostra representa uma interferência bastante significativa que, dependendo da amostra, pode ser reduzida através de fotodegradação (*photobleaching*).
- Se a intensidade da excitação do laser for demasiadamente elevada, pode haver decomposição térmica da amostra (VANKEIRSBILCK, et al, 2002; KALANTRI, SOMANI, MAKHIJA, 2010).

2.6 QUIMIOMETRIA

Em virtude dos significativos avanços em *hardware* e *software* ocorridos nos últimos anos, o uso de computadores para analisar dados químicos cresceu significativamente, ao mesmo tempo, em que a aquisição de dados atingiu um ponto sofisticado por conta do interfaceamento de instrumentos de análises a computadores. Esses fatores proporcionaram uma mudança no perfil das informações obtidas, onde tais informações passaram a ser complexas e variadas (FERREIRA *et al*, 1999).

Considerando esses dados de características multivariadas (como exemplo, a intensidade de absorção em mil ou mais comprimentos de onda que é registrado em um único espectro) passou a existir a necessidade de ferramentas igualmente sofisticadas para tratá-los. Nesse contexto surgiu a quimiometria, a qual é definida como uma disciplina química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química com a análise dos dados obtidos, ou seja, a quimiometria é uma disciplina que utiliza ferramentas computacionais, estatísticas e matemáticas para solucionar problemas da química (FERREIRA *et al*, 1999).

A aplicação de métodos quimiométricos teve grande crescimento nos anos 90, século passado, nas mais diversas áreas da química, onde é possível citar como principais ramos da quimiometria: a calibração multivariada, métodos de inteligência artificial, monitoramento e modelagem de processos multivariados, planejamento e otimização de experimentos, processamento de sinais analíticos, reconhecimento e classificação de padrões (BRERETON, 2000). Mais recentemente, a quimiometria tem ganhado espaço na indústria farmacêutica, estando muito associada a espectrometria NIR, na predição das propriedades físico-químicas das amostras, sobretudo para análises usando calibração multivariada (ROCHA, 2010)

A partir do desenvolvimento das ferramentas quimiométricas, tornou-se possível a realização das análises na região do infravermelho próximo ou de dados oriundos da espectroscopia Raman, as quais, sem a utilização de modelos de calibração multivariada não apresentam possibilidades para determinações quantitativas. Desse modo, pode-se afirmar que um equipamento para

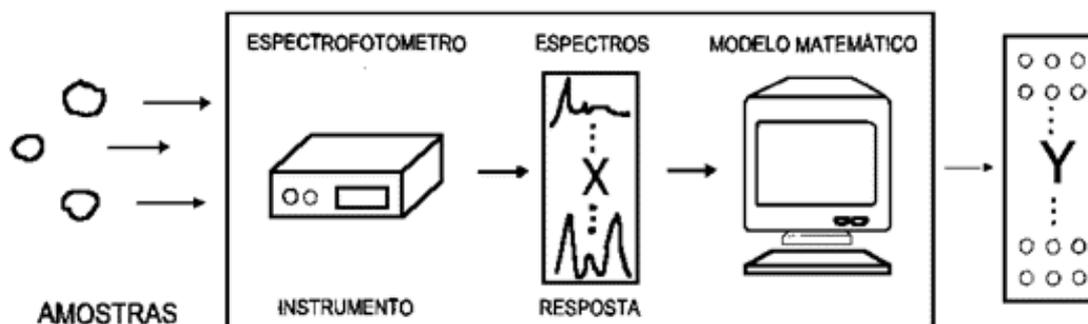
determinações analíticas utilizando NIR baseia-se no *hardware* (instrumento) e *software* (ferramentas quimiométricas) (SIMÕES, 2008; GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

2.6.1 Calibração Multivariada

O objetivo das análises químicas é determinar uma dada característica da amostra em estudo. No entanto, a maioria dos instrumentos de laboratório não produz diretamente tais respostas havendo assim a necessidade da realização de uma calibração.

A calibração consiste basicamente em um procedimento para encontrar uma relação matemática entre a propriedade de interesse e os dados registrados por um instrumento, como por exemplo, absorvância. Uma vez encontrada, essa função matemática poderá ser utilizada para prever a característica desejada da amostra em estudo (FERREIRA *et al*, 1999; CORRER, 2005).

Figura 7 – Representação esquemática de uma calibração.



Fonte: FERREIRA *et al*, 1999, p. 725.

Dentre os tipos de calibração é possível citar as calibrações univariada e calibração multivariada. A calibração univariada é mais comumente empregada e consiste na obtenção de um modelo baseado somente em uma variável medida. Tal calibração é usada quando existe uma variável seletiva que torna possível a previsão desejada. Um exemplo é quando se seleciona um comprimento de onda específico no espectrofotômetro e tal comprimento de onda proporciona um espectro puro, ou seja, com a ausência de sobreposição espectral. O pico gerado neste cromatograma se relaciona com a propriedade de interesse da amostra e sua área

(medida única) permite a uma determinação quantitativa desta propriedade. Por outro lado, a calibração multivariada é utilizada quando não existe uma única variável seletiva, tornando possíveis previsões na presença de sinais analíticos sobrepostos e de interferentes. Como é o caso da utilização da espectroscopia no infravermelho próximo, onde a amostra é submetida a uma radiação na faixa de comprimento de onda (no caso do NIR 780-2500nm), a qual fornecerá um grande número de informações necessitando dessa forma de um tratamento diferente do verificado na calibração univariada. A figura 7 demonstra o fluxo analítico para obtenção dos dados analíticos em calibração multivariada. (FERREIRA *et al*, 1999; BRAGA; POPPI, 2004; SENA, *et al* 2007; VALDERRAMA *et al*, 2009).

O processo geral de calibração consiste basicamente em três etapas: calibração, validação e previsão. Na etapa de calibração, ocorre a construção do modelo matemático, o qual é obtido relacionando-se a matriz de dados das variáveis medidas (matriz \mathbf{X}), por exemplo, espectros no infravermelho ou Raman, com a matriz de dados das propriedades de interesse determinados por um método de referência (vetor \mathbf{Y}), por exemplo, valores percentuais de teor obtidos por CLAE, neste caso, calibração multivariada de primeira ordem. (VALDERRAMA, 2009). Na etapa de validação, o modelo é avaliado utilizando-se ferramentas estatísticas de diagnóstico, como o RMSEC, que será posteriormente discutido. Por fim, na fase de previsão, o modelo validado, utilizando ferramentas estatísticas para validação, e então aplicado para prever propriedades de amostras desconhecidas que possuam a mesma natureza das amostras do conjunto de calibração a partir do seu sinal espectral (FERREIRA *et al*, 1999).

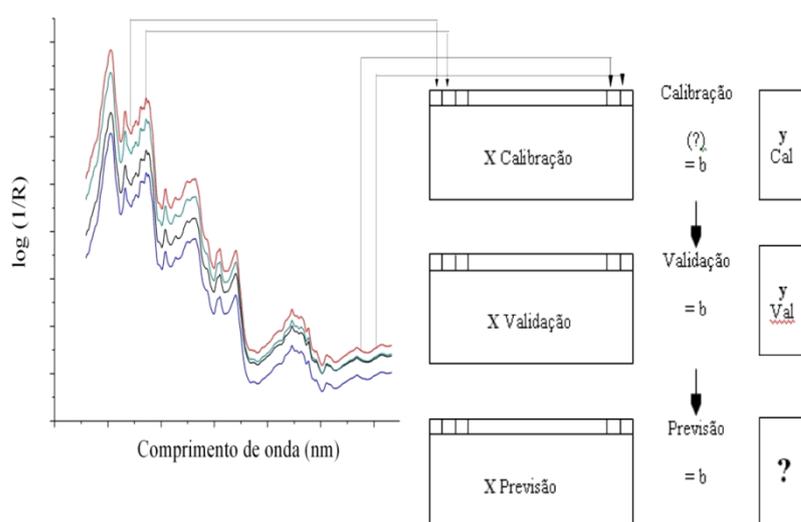
Como já citado, a construção do modelo se inicia com a etapa de calibração, para tal, as amostras utilizadas nesta etapa devem ser cuidadosamente escolhidas para que sejam representativas do processo em estudo. Em geral, o uso de amostras apenas da linha de produção na construção do modelo de calibração multivariada pode resultar em modelos sub-ajustados susceptíveis a erros de previsão por extrapolação. Isto ocorre porque as amostras da linha de produção não cobrem de maneira adequada a faixa de concentração em que podem ser encontradas as amostras desconhecidas. Desse modo, além das amostras da linha de produção para a construção do modelo de calibração multivariada se faz também

necessária a fabricação de lotes em escala piloto os quais têm por objetivo ampliar faixa de concentração da propriedade desejada (SIMÕES, 2008).

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme ilustra a Figura 8. Os valores de absorbância dos espectros, a cada número de onda, correspondem às variáveis independentes (matriz **X**), e as concentrações das amostras definidas pelo método de referência indicam as variáveis dependentes (vetor **y**) (GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

Para a determinação dos fatores que serão empregados na construção do modelo, o ideal seria a utilização de um conjunto-teste de dados durante a etapa de validação do modelo de calibração. Entretanto, na maioria das vezes isto não é possível, por ser um processo demorado e caro. Uma alternativa prática é o método de validação cruzada. Neste método, uma amostra do conjunto de calibração é removida e um novo modelo é construído com os dados restantes. A amostra que foi removida tem seu valor previsto pelo modelo e um erro de calibração é calculado. Esse processo é repetido para cada amostra do conjunto. (FERREIRA et al, 1999).

Figura 8– Organização dos dados na calibração multivariada.



Fonte: GRANGEIRO JÚNIOR, 2011, P. 34.

Uma variedade de métodos de regressão vem sendo utilizada em química analítica para a construção de modelos de calibração multivariada, dentre eles a

literatura destaca: o método clássico de mínimos quadrados (CLS, do inglês *Classical Least-Square*), a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least Square*), a regressão linear múltipla (MLR, *Multiple Linear Regression*) e a regressão por componentes principais (PCR, *Principal Component Regression*) (SIMÕES, 2008).

Uma etapa de grande importância para qualidade do modelo é o pré-processamento que antecede o uso da regressão na construção dos modelos, nesta etapa são minimizadas as contribuições não desejadas dos ruídos que diminuem a capacidade de previsão dos modelos. Um dos pré-processamentos que é muito utilizado é o método da derivada (PIZARRO *et al.*, 2004). A primeira derivada remove os termos constantes (offsets) a todos os comprimentos de onda do espectro, ou seja, o deslocamento da linha de base. A segunda derivada elimina os termos que variam linearmente com a linha de base, normalmente devidos a efeitos de espalhamento. A maior limitação do uso dos métodos derivativos é a diminuição na relação sinal/ruído que se produz quando aumenta o grau da derivada, devido à alta sensibilidade do método a presença de ruído no espectro original. Por isso, antes da diferenciação é comum aplicar-se aos dados algum tipo de suavização. O algoritmo de Savitzky-Golay é largamente utilizado para este fim. (SAVITZKY e GOLAY, 1964). O Filtro de Savitzky-Golay (SG) é um clássico entre os filtros de suavização de sinais analíticos e encontra-se incorporado na maioria dos *softwares* comerciais para tratamento de dados. A suavização consiste em um método utilizado para reduzir matematicamente ruídos aleatórios de alta frequência a fim de aumentar a relação sinal/ruído. Nesses métodos, é selecionada uma janela, a qual contém certo número de pontos. E um polinômio de ordem baixa é ajustado aos pontos dessa janela e utilizado para recalcular o ponto central (BEEBE *et al.*, 1998).

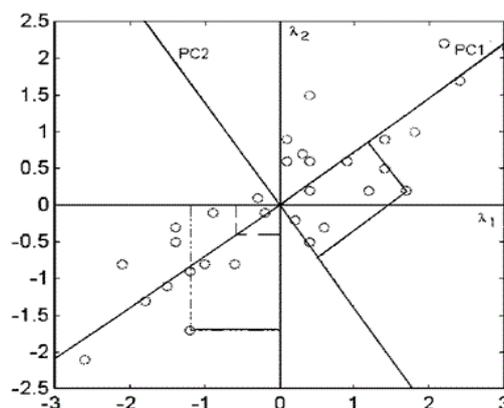
É importante salientar que a escolha da técnica de pré-processamento é uma etapa crítica da modelagem, pois a mesma pode influenciar tanto positiva quanto negativamente no desempenho do modelo. Desse modo, para que se execute um bom pré-processamento é necessário que haja uma interação entre a técnica utilizada e uma verificação dos dados originais, além do conhecimento da natureza dos dados, bem como do processo químico ou físico do sistema em estudo (BEEBE *et al.*, 1998).

2.6.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é a base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados. Na modelagem por PCA, novos sistemas de eixos denominados de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou autovetores são construídos para representar as amostras, onde a natureza multivariada dos dados pode ser observada em poucas dimensões (FERREIRA, 2002; SOUZA, 2013).

A Figura 9 é um exemplo da aplicação da PCA, onde, se tem um gráfico bidimensional de um conjunto de 30 amostras em que cada amostra é representada por um ponto no gráfico. A matriz de dados consiste, neste caso, de duas colunas ($m = 2$) representando as medidas de intensidades registradas para dois comprimentos de onda, λ_1 e λ_2 , nas 30 amostras. Em termos geométricos, a função das componentes principais é descrever a variação ou espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos. Isto é feito definindo novos eixos, componentes principais, que se alinham com os dados. Na figura em questão, os comprimentos de onda (λ_1 e λ_2) não descrevem a maior variação nos dados. No entanto, a PC1 (componente principal 1) tem uma direção tal que descreve o máximo espalhamento das amostras, mais que qualquer uma das duas variáveis originais (FERREIRA *et al*, 1999).

Figura 9 - Gráfico de um conjunto de dados bidimensionais (λ_1 e λ_2), mostrando os eixos das componentes principais (PC1, PC2).



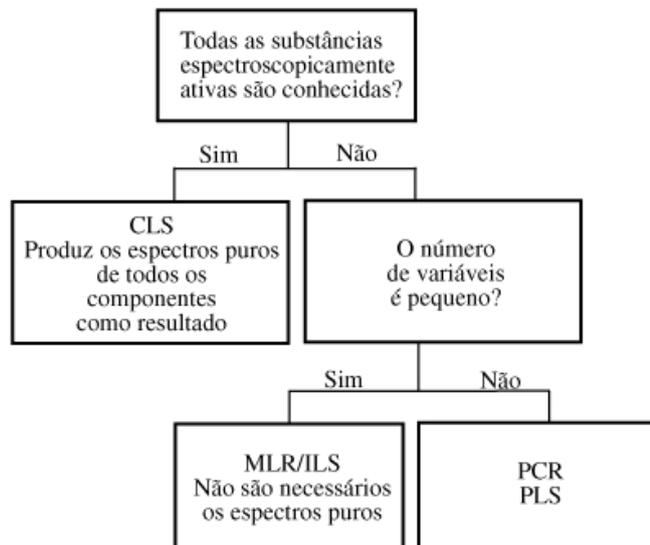
Fonte: FERREIRA *et al*, 1999, p. 726.

As novas coordenadas das amostras no novo sistema de eixos das componentes principais são denominadas *scores*. Cada componente principal é construída a partir da combinação linear das variáveis originais. Os coeficientes da combinação linear (o peso, ou o quanto cada variável antiga contribui) são denominados de *loadings* (FERREIRA *et al*, 1999).

2.6.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Uma vez que se têm disponíveis diferentes métodos para a realização da calibração multivariada, a escolha dos mesmos ocorre através das características das amostras em estudo. Assim sendo, Ferreira *et al* (1999) construiu um fluxograma (Figura 10) mostrando um esquema geral dos métodos de calibração e em que a escolha de cada está baseada.

Figura 10 - Fluxograma apresentando esquema geral para seleção dos métodos de calibração.



Fonte: FERREIRA *et al*, 1999, p. 726.

Dentre os métodos citados a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) é considerada a técnica de regressão mais utilizada para a construção de modelos de calibração multivariada a partir de dados de primeira ordem. Esse método de calibração não requer um conhecimento exato de todos os componentes

presentes nas amostras podendo realizar a previsão das amostras mesmo na presença de interferentes, desde que esses também estejam presentes na ocasião da construção do modelo (BEEBE, 1998).

Para construção dos modelos de calibração multivariada, o PLS correlaciona a matriz espectral (matriz \mathbf{X}) com dados de referência (vetor \mathbf{y}) (matrizes representadas na Figura 9), ou por meio de combinações lineares dos dados espectroscópicos (\mathbf{X}) e dos dados de referência (\mathbf{y}), se obtém o número de variáveis latentes necessários para correlacionar os espectros e as concentrações (SIMÕES, 2008).

Figura 11 - Representação das matrizes de dados (X e Y) na calibração multivariada.

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{pmatrix} \qquad \mathbf{y} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix}$$

Variáveis independentes Variável dependente

Fonte: VASCONCELOS, 2011, p. 25.

2.6.4 PLS e o algoritmo Jack Knife

O método de seleção de variáveis utilizando-se o algoritmo Jack Knife, também conhecido por teste de incerteza, foi proposto por Efron(1982) e adaptado por Martens e colaboradores para o contexto da calibração multivariada (MARTENS *et al*, 2000).

Primeiramente, o modelo PLS é calculado utilizando a com validação cruzada, e em seguida a variância associada a cada elemento do vetor dos coeficiente de regressão é estimada de acordo com a equação 1.

$$S_j^2 = \sum_{j=1}^j ((b - b_j)g)^2 \tag{1}$$

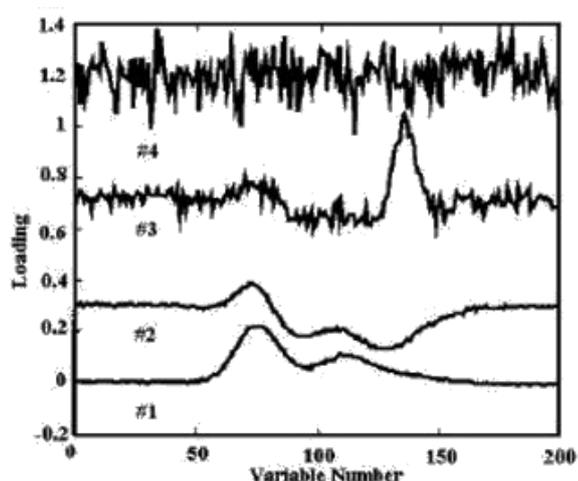
Onde g é um fator de escala definido como $g = \sqrt{\frac{n-1}{n}}$. Depois de estimados os valores de S^2 , aplica-se um teste t a raiz quadrada de S^2 a 99% de confiança estatística. As variáveis que não passaram no teste são ditas não informatizadas e tem o valor do coeficiente de regressão igual a zero (MARTENS *et al*, 2000).

2.6.5 Parâmetros que indicam a qualidade de um modelo multivariado

Alguns parâmetros calculados com os resultados obtidos pelos modelos de calibração multivariada indicam a eficiência do mesmo. Esses parâmetros são utilizados para auxiliar na escolha dos modelos mais adequados para a predição das propriedades desejadas. Alguns parâmetros que podem ser adotados como critérios de avaliação são: o coeficiente de correlação (R), o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC), o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV), o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP) e o número de variáveis latentes (GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

O gráfico de *loadings* é uma ferramenta que pode auxiliar na escolha do número ótimo de variáveis latentes utilizadas na construção do modelo. Os *loadings* devem exibir comportamento semelhante aos espectros dos dados originais por serem contribuições das variáveis originais. Quando os *loadings* começam a apresentar um comportamento aleatório isto pode indicar o número máximo de fatores a ser considerado (NASCIMENTO, 2008). Nesse caso apresentado na figura 12, o número ótimo de fatores seria 3, evitando assim a inclusão de informação irrelevante para o modelo (BEEBE, 1998; MARTENS, 1993).

Figura 12 - Loadings versus números das variáveis para os 4 primeiros fatores de um modelo PLS.



Fonte: BEEBE, 1998

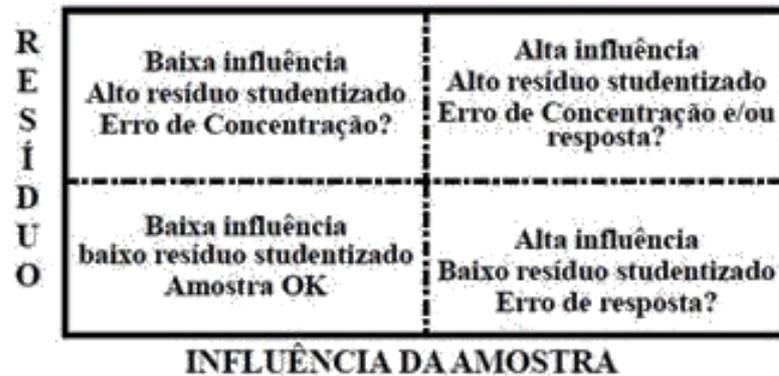
A validação cruzada, citada anteriormente, é uma metodologia também utilizada para a escolha do número de variáveis latentes baseada na avaliação da magnitude dos erros para o conjunto de calibração. O número mais adequado de fatores (variáveis latentes), k , será o correspondente ao menor valor de RMSECV (FERREIRA *et al*, 1999).

A detecção de *outliers* é tão importante quanto à determinação do número de variáveis latentes que serão empregadas no modelo. Para a detecção de *outliers*, utilizam-se duas grandezas complementares: *leverage* e resíduos de *Student*. A *leverage* é uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Um valor de *leverage* pequeno indica que a amostras em questão influencia pouco na construção do modelo de calibração. Por outro, lado se as medidas experimentais de uma amostra são diferentes das outras do conjunto de calibração, ela provavelmente terá uma alta influência no modelo, que pode ser negativa ou positiva. Em geral, estas amostras solitárias estão visíveis no gráfico dos *scores*. A *leverage* pode ser interpretada geometricamente como a distância de uma amostra ao centroide do conjunto de dados (FERREIRA *et al*, 1999).

Análise do gráfico dos resíduos de *student* versus *leverage* (representado esquematicamente na Figura 13, é uma maneira simples para identificação as amostras anômalas. Amostras com altos resíduos, mas com pequena *leverage*

provavelmente têm algum erro nos valores da concentração, que deve ser medida novamente. Amostras com resíduos e *leverage* altos devem sempre ser excluídas e o modelo de calibração reconstruído (BEEBE, 1998; MARTENS, 1993).

Figura 13 - Representação esquemática de amostras em um gráfico de resíduos de concentração studentizado versus influência das amostras



Fonte: BEEBE, 1998.

Uma vez validado e otimizado o modelo está pronto, isto é, o número de fatores k está definido e as amostras anômalas foram detectadas e excluídas. Como resultado, obtém-se o vetor de regressão β (beta), que será então usado para a previsão da concentração, c_{prev} , de novas amostras:

$$C_{\text{prev}} = x_{\text{prev}}^t \beta \quad (2)$$

Onde x_{prev} contém o espectro de uma nova amostra.

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos para uso na indústria de medicamentos é requerimento regulamentar e deve atender ao disposto na regulamentação da ANVISA (BRASIL, 2003). Esta regulamentação apresenta uma guia para validação de métodos analíticos e é tem como objetivo garantir que os ensaios sobre os produtos farmacêuticos ofereçam resultados confiáveis para a avaliação da conformidade destes produtos. Tal conformidade deve ser atestada antes da

comercialização destes produtos, como parte dos requerimentos das Boas Práticas de Fabricação e do sistema de gestão da qualidade. (BRASIL, 2010 a)

Vários compêndios abordam a validação de métodos analíticos, como as farmacopéias Americana e Brasileira (USP 36, 2013, BRASIL, 2010) além de órgãos internacionais como *International Conference on Harmonisation* (ICH), que estabelecem os itens que devem ser avaliados, como especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez.

Para métodos univariados a utilização destes guias é bastante clara e permite com alguma facilidade o desenvolvimento e cumprimento dos requerimentos para a validação. No entanto, com o advento das técnicas de análise multivariadas aplicadas a fármacos e medicamentos as farmacopeias e compêndios oficiais tiveram que complementar os capítulos referentes aos métodos gerais a fim de abranger os conceitos para construção e validação de modelos de calibração multivariada, mais ainda assim a abordagem apresentada é bastante simples e alguns critérios não foram definidos dificultando sua aplicação prática (BRASIL, 2010b)

A *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o *The European Agency for the Medicinal Products* (EMA) e a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), estabelecem guias que definem as características dos procedimentos de calibração multivariada e os parâmetros mínimos para avaliação do método proposto (GRANGEIRO JUNIOR, 2011). Na norma ASTM E1655-05, são definidos os procedimentos para análises quantitativas por espectrofotometria no infravermelho e os parâmetros para validação de um modelo multivariado. (AMERICAN, 2005)

Recentemente a Farmacopéia Americana - USP 36(2013), órgão oficial do setor farmacêutico reconhecida pela ANVISA, no seu capítulo de informações gerais sobre espectrofotometria no infravermelho próximo (1119) reconhece e determina os parâmetros para validação de métodos multivariados utilizando a espectrofotometria no infravermelho. Ainda define a validação de métodos para técnica de Raman a descrição do *Validation of Compendial Procedure* (1225), ressaltando a necessidade de se avaliar algumas características específicas desta técnica analítica como fluorescência da amostra, a linearidade do detector analítico, o laser e a posição da amostra. Estes pontos devem ser observados antes do início da validação como parte da adequação do método para uso. (USP, 2013).

2.7.1 Categorização dos ensaios quanto sua finalidade para validação de métodos analíticos

Segundo a RDC 899(2003) os métodos analíticos são divididos em categorias, sob as quais estão definidos os parâmetros analíticos de validação, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2: Classificação dos testes, segundo sua finalidade

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
IV	Testes de identificação

Fonte: ANVISA RDC 899 (2003)

A categorização de acordo com sua finalidade torna mais racional a definição do conjunto de parâmetros requeridos para cada tipo de ensaio. Esta organização é importante, para que parâmetros essenciais não sejam excluídos do escopo de uma validação, que não existam requerimentos desnecessários à finalidade de um determinado ensaio, ou contraditórios, seja na submissão da documentação para registro de um produto, seja na inspeção da agência reguladora a um órgão regulado. Abaixo estão relacionados os parâmetros para cada categoria (BRASIL, 2003):

Tabela 3. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetros	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: ANVISA RDC 899 (2003)

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão.

. No caso dos ensaios de quantificação, como a determinação da concentração de determinado API em um medicamento ou mesmo na matéria prima, estes são classificados na categoria I e devem ser submetidos aos parâmetros de validação: Especificidade, linearidade, intervalo, precisão repetibilidade intermediária, exatidão e robustez.

2.7.2 Estratégia de validação para métodos que empregam calibração multivariada

A validação de um procedimento analítico que utiliza calibração multivariada pode ser atestada através da determinação de parâmetros também conhecidos como figuras de mérito. Esses parâmetros, dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito e/ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito, podem variar, sendo as principais: exatidão, precisão, sensibilidade, seletividade,

linearidade, razão sinal/ruído, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, intervalos de confiança, teste para erros sistemáticos, extensão da faixa de trabalho ou faixa linear dinâmica. (VALDERRAMA, 2009)

Ressalta-se que a validação de um método de calibração multivariada é dividida em duas partes: a validação interna (em que o conjunto original de calibração serve também como conjunto de validação) e a validação externa. Um exemplo de validação interna é a validação cruzada e já foi discutida anteriormente como parte da avaliação do conjunto de calibração. A validação externa é recomendada por testar amostras não utilizadas na construção do modelo de calibração e segue os principais parâmetros de acordo com sua classificação. (BRAGA; POPPI, 2004)

A seguir estão descritas as definições dos parâmetros de validação para métodos analíticos na categoria I - testes quantitativos para determinação do teor de API em produtos farmacêuticos:

Exatidão: Este parâmetro expressa a concordância entre o valor estimado e o valor de referência. Em calibração multivariada a exatidão é estimada através da raiz quadrada do erro médio de predição (RMSEP):

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (3)$$

onde n é o número de amostras do conjunto de previsão, y_i valor referência pelo modelos e \hat{y}_i valor pelo previsto.

A exatidão de métodos de calibração multivariados é geralmente avaliada de maneira semelhante à descrita para métodos univariados. Amostras de lotes diferentes são avaliadas pelo método multivariado e pelo método de referência. Calculam-se as diferenças entre os resultados obtidos para cada amostra, e em seguida realiza-se um teste-t pareado considerando a média dessas diferenças (GRANGEIRO JÚNIOR, 2011).

Outros parâmetros de interesse para avaliação dos modelos de calibração são o valor do erro médio quadrático padrão de calibração (RMSEC), o valor do erro

médio quadrático padrão de validação cruzada (RMSECV), definidos pelas equações 4 E 5:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{cal} (y_{pred} - y_{ref})^2}{n_{cal} - k - 1}} \quad (4)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{cal} (y_{pred} - y_{ref})^2}{n_{cal}}} \quad (5)$$

Onde n_{cal} é o número de amostras do conjunto de calibração e K é o número ótimo de variáveis latentes. (BRAGA; POPPI, 2004)

Seletividade: Em calibração univariada, os coeficientes de seletividade (f_a , ξ) são fundamentais para conhecer como a quantidade variável de interferentes na amostra pode influenciar na predição. Os interferentes podem ser adequadamente modelados usando dados multivariados. Esta diferença essencial explica porque a estimativa numérica da seletividade em calibração multivariada é obtida de maneira diferente. Vários critérios foram publicados no passado. O critério de seletividade LBOZ enfoca a descrição de qual parte do sinal medido permanece por quantificação, isto é, o NAS, que na ausência de interferentes é apenas a medida do sinal analítico total. A seletividade é calculada de acordo com a seguinte equação: (ROCHA, 2010)

$$SEL = \frac{n \hat{s}_i}{\|x_i\|} \quad (6)$$

Sensibilidade: Segundo Rocha (2010) a sensibilidade expressa a fração de sinal que é acrescida quando a concentração da espécie de interesse tem seu valor elevado em uma unidade. Geralmente é feita uma regressão, pelo método de mínimos quadrados, entre os valores instrumentais em função da concentração (calibração clássica) ou admitindo a concentração como função das medidas instrumentais (calibração inversa) e a sensibilidade em ambos os caso é determinada pela inclinação (coeficiente angular) ou o inverso da inclinação da curva

analítica, respectivamente. O vetor sensibilidade é calculado de acordo com a equação 7:

$$\hat{S}_k^{nas} = \frac{\hat{x}_{A,K}^{nas}}{y_i} \quad (7)$$

Onde o vetor da sensibilidade \hat{S}_k^{nas} deve ser o mesmo das amostras de calibração, o numerador da equação é o vetor do sinal analítico líquido e y_i é o valor de referência da amostra em i . Um único valor da sensibilidade pode ser estimado como:

$$S\hat{E}N = \|\hat{S}_k^{nas}\| \quad (8)$$

Sensibilidade analítica: Apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência, como mostra a equação 9 (VALDERRAMA, 2009)

$$y = \frac{S\hat{E}N}{|\delta x|} \quad (9)$$

Bias: Segundo a IUPAC é atribuído a erros sistemáticos que são calculados pela diferença entre a média da população e o valor de referência e são todas as componentes de erro que não são aleatórias. A norma ASTM 1655-5 recomenda a aplicação de um teste t para amostras de validação com 95% de confiança. Caso o valor encontrado seja maior que o valor crítico para $n-1$ graus de liberdade, em que n é o número de amostras da validação, é um indicativo que erros sistemáticos estão presentes no modelo de calibração multivariada e são significativos. É calculado de acordo com a seguinte equação.

$$bias = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n} \quad (10)$$

Onde n é o número de amostras de validação. Então o desvio padrão da validação é calculado por:

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(y_i - \hat{y}_i) - bias]^2}{n-1}} \quad (11)$$

E finalmente o teste para determinação da significância do bias que avalia as tendências para t calculado inferior a t crítico, com nível de confiança de 95%.

Precisão: É a medida do erro aleatório associado ao método analítico. Expressa a proximidade de uma série de resultados obtidos a partir de diferentes amostras de um produto perfeitamente homogêneo. Em geral a precisão pode obtida em diferentes níveis, tais como: repetibilidade, precisão intermediária, reprodutibilidade (USP 36, 2013).

Repetibilidade: É avaliada em um curto intervalo de tempo, podendo ser realizado de duas maneiras: um mínimo de três amostras em concentrações diferentes cobrindo a faixa útil do modelo de calibração ou em seis replicatas para nível de 100% da concentração. A estatística envolvida na repetibilidade é o DPR (desvio padrão relativo) ou coeficiente de variação (CV) que não pode ser maior que 5%.

Precisão intermediária: Este nível de precisão é obtido a partir da variação de uma determinada condição experimental, como avaliação estatística de uma série de replicata medida por diferentes analistas em dias diferentes.

Reprodutibilidade: É realizado por meio de ensaios interlaboratoriais.

Linearidade : Demonstrar a linearidade de método multivariado utilizando NIR, por exemplo, envolve a demonstração da resposta linear da técnica para amostras distribuídas através de uma faixa definida de calibração. Neste caso o coeficiente de correlação r, não é uma ferramenta adequada para verificação de linearidade, mas é a medida da variação dos dados que é adequadamente modelada pela equação. A melhor maneira de demonstrar a linearidade é através da avaliação estatística dos valores de inclinação e intercepto obtido para o conjunto de validação. (BRASIL, 2010 b)

A faixa de trabalho do modelo de calibração deve ser definida. Um controle deve ser realizado para garantir que resultados fora da faixa não sejam aceitos. O modelo apresenta valores anômalos quando amostras fora da faixa linear são analisadas. (BRASIL, 2010 b)

Intervalo: Intervalo são os níveis extremos de concentração (ou da propriedade de interesse) que podem ser determinados com exatidão, precisão e linearidade. Esse parâmetro geralmente é proveniente dos estudos de precisão e linearidade. Dependendo do tipo de análise realizada, a faixa de concentração varia. A ANVISA preconiza (BRASIL, 2003) intervalos de 80- 120% de cobertura para as análises quantitativas do analito em formas farmacêuticas. Nos métodos multivariados o intervalo adequado vai depender do objetivo do método. É possível determinar propriedades que cobrem grandes intervalos de trabalho, ou em outros casos, variações pequenas. (BLANCO; ACALÁ, 2006)

Robustez: É uma medida da suscetibilidade do método frente a pequenas variações de determinados fatores a que o método pode estar sujeito como, por exemplo, temperatura, umidade, analista etc. O método é dito robusto quando não é afetado por essas pequenas variações. (VALDERRAMA, 2009)

A robustez em calibração multivariada consiste em testar o desempenho do modelo de calibração multivariada frente a alguns tipos de variações e averiguar se essas são ou não significativas. A robustez pode ser realizada, segundo Blanco e Acalá (2006), empregando amostras de vários lotes analisadas em um período de tempo obtido na linha de produção.

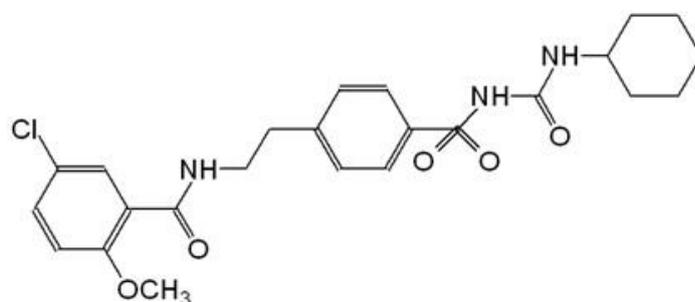
2.8 GLIBENCLAMIDA

O diabetes mellitus é uma doença crônica, classificada clinicamente em tipo I ou tipo II, caracterizada pelo aumento da concentração de glicose no sangue, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não pode utilizar de maneira eficaz a insulina que produz (WHO, 2013).

O diabetes mellitus é um sério problema de saúde pública em praticamente todos os países e implica em elevado impacto socioeconômico, uma vez que tal doença acarreta complicações agudas e crônicas levando os portadores à incapacidade física permanente por cegueira e/ou amputação de membros, modificando assim, a qualidade e a expectativa de vida do indivíduo (NERY *et al*, 2007). A fim de minimizar tais danos e atender a população brasileira acometida por essa doença crônica, os laboratórios públicos, como o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE investem na produção de antidiabéticos, para distribuição através dos programas de saúde pública do Ministério da Saúde. Dentre

os medicamentos utilizados para o tratamento do diabetes produzidos pelo LAFEPE está a glibenclamida (Figura 12), 1-{4-[2-(5-cloro-2-metoxibenzamido)etil] benzenossulfonil}-3-ciclohexiluréia, uma sulfoniluréia de segunda geração. Este hipoglicemiante oral também conhecido como gliburida na América do Norte é usado para o tratamento do diabetes mellitus tipo II, uma vez que atua estimulando a liberação de insulina endógena, não tendo ação em pacientes que não apresentam função residual de células β (USP 36, 2013; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

Figura 14 - Estrutura química da glibenclamida.



Fonte: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/g005.htm>.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), a glibenclamida apresenta-se como um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro e praticamente sem sabor. Onde os comprimidos de tal fármaco devem se encontrar na faixa de 90% a 110% da quantidade declarada de ativo. Desvios na qualidade desse quesito podem ocasionar entre outras alterações, hipoglicemia, o efeito adverso mais comum desse fármaco, a qual se caracteriza por queda da concentração de açúcar a valores muito baixos, ou hiperglicemia, elevação acentuada do açúcar sanguíneo. Essas alterações indesejáveis no nível do açúcar sanguíneo podem acarretar graves sinais e sintomas no paciente diabético (RANG, et. al, 2004). Desse modo, para a eficiência terapêutica deste medicamento é imprescindível um rigoroso controle por parte da indústria farmacêutica na análise do teor de glibenclamida presente nos comprimidos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho estão constituídos por objetivo geral e objetivos específicos, discriminados a seguir:

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar as espectroscopias NIR e RAMAN associadas à calibração multivariada na análise de comprimidos de glibenclamida de 5mg em controle de qualidade de medicamentos como parte do desenvolvimento de uma estratégia de PAT na indústria farmacêutica – Desenvolvimento e validação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o método de análise para glibenclamida comprimidos por CLAE;
- Fabricar lotes pilotos de glibenclamida comprimidos para construção de modelos de calibração e previsão;
- Coletar amostras de glibenclamida comprimidos de lotes industriais para calibração e previsão;
- Desenvolver métodos de calibração multivariada, utilizando às espectroscopias NIR e Raman;
- Comparar métodos de regressão na construção de modelos: PLS e PLS /JK;
- Validar os métodos de calibração multivariada para análise de comprimidos de glibenclamida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada no trabalho e todos os equipamentos, reagentes e acessórios, encontram-se descritos nos itens a seguir:

4.1. AMOSTRAS

Para construção dos modelos de calibração multivariada, foram utilizadas amostras de comprimidos de glibenclamida 5mg de 38 lotes industriais produzidos pelo LAFEPE entre os anos de 2011 e 2012, com teor de princípio ativo (API) variando entre 99 e 102 % do valor nominal (equivalente a 2,97 - 3,06% m/m de princípio ativo por comprimido). Com a finalidade de aumentar a faixa de concentração dos comprimidos, foram utilizadas amostras de comprimidos de glibenclamida de 17 lotes produzidos em escala piloto com teor de API variando entre 1,80 e 4,20% m/m, com incrementos de 0,16% m/m, preparados segundo planejamento de misturas. Na produção dos lotes piloto, a composição, de cada um dos excipientes: celulose, croscarmelose, estearato de magnésio e dióxido de silício, foi mantida constante a fim de preservar as características físicas dos comprimidos. Já a composição da lactose, que é o excipiente majoritário da formulação, foi alterada de modo a complementar a massa total do comprimido de 160 mg. Os 17 lotes foram produzidos em uma planta piloto, localizada no setor de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE no ano de 2012.

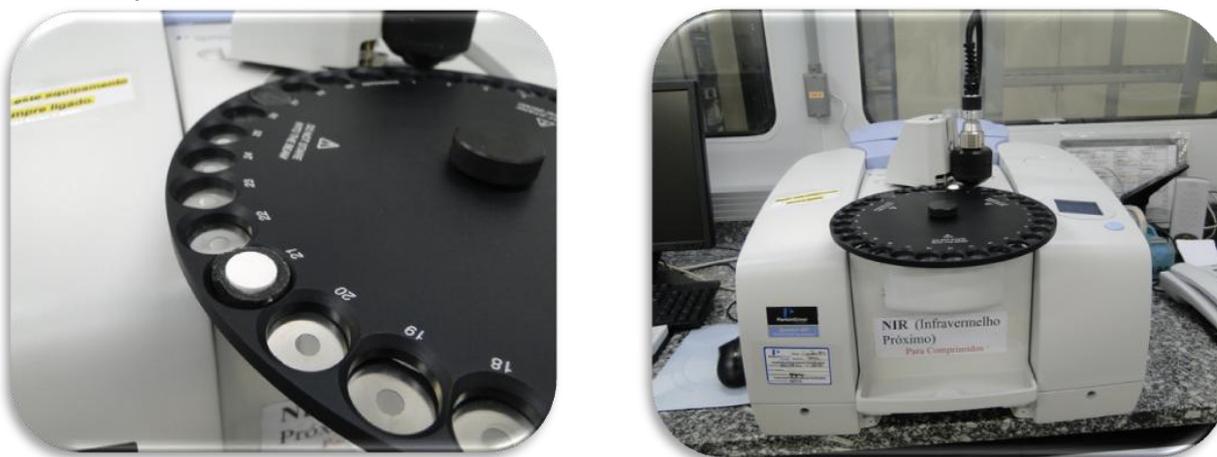
A fim de utilizar uma amostra de comprimidos representativa, foram coletados aleatoriamente 10 comprimidos de glibenclamida de cada lote industrial (38 amostras) e duas amostras de 10 comprimidos cada para cada lote piloto (34 amostras). Os lotes pilotos deram origem dois conjuntos amostrais, o que foi chamado de A e B, totalizando 72 amostras com 10 comprimidos cada (conjunto de dados).

4.2. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS NIR

Os espectros NIR de 10 comprimidos, para cada uma das 72 amostras, foram obtidos, utilizando espectrofotômetro no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), modelo Spectrum 400 da marca Perkin Elmer, na faixa espectral de 12000 –

4000 cm^{-1} . Tal equipamento encontra-se localizado na divisão de físico-química (DIFIQ) da Coordenadoria de Controle de Qualidade (COQUA) do LAFEPE. As medidas espectrais foram realizadas utilizando-se um acessório de reflectância difusa para comprimidos - Tablet Autosampler (Figura 13), com resolução espectral de 8,0 cm^{-1} e média de 32 varreduras. Devido à presença de um sulco de meia dosagem em uma das faces dos comprimidos, seus espectros foram registrados apenas na face não sulcada. Os espectros foram arquivados em formato DX para terem seus dados transferidos para o software The Unscrambler® 9.7. Para construção dos modelos de calibração multivariada foi utilizado o espectro médio dos 10 comprimidos de cada amostra (lotes produção e piloto).

Figura 15 - Espectrofotômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR com acessório Tablet Autosampler



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

4.3. AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN

Para aquisição dos espectros Raman foi utilizado um espectrômetro Raman Pórtatil, modelo Identichack da marca Perkin Elmer, com radiação de excitação em 785 nm (laser de estado sólido), equipado com uma sonda de fibra óptica. Os 10 comprimidos de cada amostra foram acomodados em um carrossel com a parte não sulcada voltada para cima e, utilizando uma sonda de fibra óptica, foram obtidos os espectros Raman na faixa espectral de 3278 a 200 cm^{-1} , com resolução 2,0 cm^{-1} , tempo de exposição de 1,5 s e média de 4,0 varreduras. O caminho óptico utilizado foi de 7,0 mm, sendo ajustado por uso de uma ponteira de teflon. Tais parâmetros foram anteriormente avaliados e selecionados como os mais eficazes. Os espectros

foram salvos em formato GRAMS para leitura posterior no software The Unscrambler® 9.7 (CAMO S.A). Para construção dos modelos de calibração multivariada foram utilizados os espectros Raman obtidos como a média dos espectros dos 10 comprimidos de cada amostra (lotes produção e piloto).

Figura 16. Espectrômetro Raman IdentichackPerkin Elmer



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE GLIBENCLAMIDA POR CLAE

Para a análise do teor de Glibenclamida por CLAE (método de referência), dez comprimidos de cada amostra foram pulverizadas e analisadas utilizando-se cromatógrafo LaChrom Elite® localizado no setor de Pesquisa e Desenvolvimento do LAFEPE. As condições cromatográficas estabelecidas para determinação do teor de glibenclamida está descrita na tabela 2.

Tabela 4: Parâmetros experimentais estabelecidos para determinação do teor de glibenclamida.

Características	Descrição
Fase Estacionária	Coluna C18 (100 x 4,6mm) CHROMOLITH®
Fase Móvel	Solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) e acetonitrila (50:50) (v/v)
Fluxo	1,5 mL/min.
Comprimento de onda	227 nm
Volume de injeção	40 µL
Tempo de corrida	5 min.
Temperatura	25 °C

Fonte: RV 139 rev. 001 - LAFEPE

4.4.1 Reagentes e Substância Química de Referência

Os reagentes utilizados na análise cromatográfica foram: Acetonitrila, fabricado pela J. T. Baker® (lote: 9012-03 válido até 05/2017) e Ácido Acético Glacial fabricado pela Química Moderna® (lote: 00442 válido até 12/2017) foram utilizados como solventes na preparação das amostras para análise cromatográfica. A Substância Química de Referência foi a Glyburide 200mg USP Reference Standard Lote: G1C347

4.4.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nessa etapa experimental foram: balanças analíticas SHIMADZU AW220 e SARTORIUS CP225D, sistema de purificação de água da marca Milli-Q® Gradient e Lavadora Ultra Sônica modelo Unique® Ultra Cleaner USC-1880, todos devidamente calibrados e certificados.

4.4.3 Procedimento

O método cromatográfico foi adaptado da monografia farmacopeica de comprimidos de Glibenclamida e Metformina, teste de dissolução descrito na USP 30 de 2007. O método foi validado, conforme prerrogativas legais (RE 899/2003),

demonstrando a segurança analítica do método de referência que foi a base para as determinações de concentração para todo o estudo que se segue.

- **Preparo do Padrão:** O padrão de glibenclamida utilizado nas análises por CLAE foi o padrão secundário, de teor 100,04%, lote LAFEPE: 16883. A solução padrão de glibenclamida foi preparada pesando-se analiticamente 12,5 mg do padrão de secundário em triplicata. A massa pesada foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, posteriormente adicionou-se 70 mL de acetonitrila, seguido de sonicação por 10 minutos. O volume do balão foi completado com acetonitrila e em seguida filtrado com papel de filtro. Uma alíquota de 2mL do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e a aferição foi realizada com a fase móvel (solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v) e acetonitrila (50:50) obtendo-se uma concentração final de 10 ppm.

- **Preparo das Amostras:** Os 10 comprimidos de cada amostra (72 amostras) foram pulverizadas e utilizados para realização da análise do teor por CLAE. A solução amostra de glibenclamida 5 mg foi preparada pesando-se analiticamente a massa pulverizada correspondente a 12,5 mg de ativo, totalizando 400mg em triplicata, a partir de um *pool* de 10 comprimidos. Após, prosseguiu conforme anteriormente descrito para o preparo da solução padrão.

4.5. TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO DOS DADOS

Para o tratamento quimiométrico dos dados, descrito a seguir, foram utilizados os espectros NIR e Raman dos 10 comprimidos (lotes produção e piloto), totalizando 72 espectros médios para cada região.

4.5.1 Pré-processamento

Em geral, os espectros NIR e Raman das amostras analisadas ao longo deste estudo apresentaram variações sistemáticas de linha de base, espalhamento da radiação, além de ruído aleatório. Para minimizar esses problemas, diferentes estratégias de pré-processamento dos espectros foram avaliadas: (1) Variação Normal Padronizada (SNV); (2) Correção Multiplicativa do Sinal (MSC) e (3) primeira

derivada com filtro Savitzky-Golay e polinômio de segunda ordem, variando-se o tamanho das janelas de 5 a 13 pontos. As variáveis (números de onda) foram centradas na média antes da modelagem.

4.5.2 Calibração Multivariada

Nesse trabalho, foram construídos modelos de calibração multivariada para determinação do teor de glibenclamida em comprimidos utilizando-se os espectros NIR e Raman. Para tanto, foram empregadas as técnicas de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais com coeficientes de regressão significativos calculados pelo algoritmo de Jack-Knife, disponível no programa Unscrambler[®].

Para verificar a existência de amostras anômalas foi avaliado o gráfico dos resíduos versus o *leverage* (influência), tanto em **X** quanto em **y**. As amostras com alto resíduo e alto *leverage* foram excluídas do conjunto de dados. Em seguida, um novo modelo foi construído e os parâmetros como coeficiente de correlação (R) e o RMSECV foram avaliados. Após essa etapa, as amostras foram separadas nos conjuntos de calibração (2/3) e validação externa (1/3) utilizando-se o algoritmo SPXy (do inglês *Sample set Partitioning based on joint X-y distances*) (GALVÃO, et al 2005).

Todos os modelos foram obtidos utilizando validação cruzada completa para definir o número ideal de variáveis latentes (VL). O número de variáveis latentes foi escolhido com base no menor valor de RMSECV e na análise das ferramentas de diagnóstico do modelo (gráfico da variância explicada versus RMSECV, gráfico dos *loadings* e do resíduo dos modelos).

A capacidade preditiva dos modelos foi avaliada através do RMSEP, obtido para o conjunto de previsão. Um teste *F*, em um nível de confiança de 95%, foi utilizado para avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de RMSECV e RMSEP dos modelos PLS e PLS/JK. Os valores de *Fcal* foram obtidos calculando-se a razão entre os valores quadráticos do maior e menor (RMSECV e RMSEP) obtidos pelos modelos. Esses valores de *Fcal* foram comparados com os valores de *Fcrit* (*n*, *n*, 0,95) tabelado. Além dos valores de

RMSECV e RMSEP foram avaliados os coeficientes de correlação (R) e o *bias* para cada modelo.

Para o tratamento quimiométrico dos dados foram utilizados os *softwares* MATLAB® R2010a (1997.10.0.499) e THE UNSCRAMBLER® 9.7 da CAMO S.A. O ambiente MATLAB® R2010a foi utilizado para a execução do algoritmo SPXY. Já o THE UNSCRAMBLER® 9.7 foi utilizado para pré-processamento dos espectros e construção do modelo PLS e PLS/JK.

4.6 VALIDAÇÃO

O método cromatográfico foi validado seguindo os parâmetros da RDC 899/2003, para categoria I, deste modo foram avaliados os parâmetros: seletividade, especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez.

Os modelos de calibração, utilizadas no Infravermelho Próximo e Raman, foram validadas através de figuras de mérito específicas da calibração multivariada e parâmetros de validação da RDC 899 (2003), também da categoria I. Os parâmetros para validação dos modelos de regressão usados nas espectrometrias NIR e Raman foram: exatidão, sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, *bias*, precisão, linearidade e robustez. Os dados obtidos para as figuras de mérito seletividade, sensibilidade e sensibilidade analítica, foram calculados através do algoritmo MVC1 (OLIVIERI; GOICOECHEA; INON, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão discutidos na sequência: apresentação dos dados de validação do método cromatográfico, valores de referência para montagem dos modelos de calibração, processamento dos modelos para técnicas de NIR e Raman, respectivamente, seguindo uma comparação entre ambas as técnicas.

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A metodologia empregada por CLAE para a determinação do teor em comprimidos de glibenclamida 5mg produzidos pelo LAFEPE foi validada segundo parâmetros definidos na RDC 899(2003). A tabela 5 mostra os resultados obtidos para a adequabilidade do método cromatográfico, os quais atendem aos parâmetros de qualidade para o método, conforme descrito pela USP 36 (2013).

Tabela 5: Parâmetros cromatográficos da análise da glibenclamida.

Substância	TR (min)	Área	Nº Pratos teóricos	Assimetria	CV (%)
Glibenclamida	3,553	2900381	3876	1,19	0,41

Fonte: Relatório de validação nº 139 rev. 001 – LAFEPE

A tabela 6 apresenta os dados da validação do método cromatográfico para categoria 1, em conformidade com os parâmetros preconizados na RDC 899 (2003).

Tabela 6: Resultados obtidos para validação do método CLAE para quantificação de glibenclamida em comprimidos.

Método	Parâmetros	Resultados
CLAE	Especificidade (ppm)	96,80
	Seletividade CV (%)	1,013
	Faixa Linear (µg/mL)	5 – 25
	Inclinação	314453,8
	Coeficiente linear	10813,65
	R ²	0,9958
	LQ (ppm)	0,5245
	LD (ppm)	0,3462
	Repetibilidadeppm/CV (%)	97,14/ 0,818
	Precisão dia 1ppm/CV (%)	97,014/ 0,818
	Precisão dia 2ppm/CV (%)	97,947/ 0,863
	Exatidão 50%ppm/CV (%)	5,043/ 1,334
	Exatidão 100%ppm/CV (%)	9,650/ 0,699
	Exatidão 150%ppm/CV (%)	14,283/ 2,539

Fonte: Relatório de validação nº 139 rev. 001 – LAFEPE

O coeficiente de correlação R como mostrado na tabela, demonstra que há correlação linear entre as variáveis X e Y. A realização do teste F para os valores de linearidade apresentou F calculado 0,127; menor que o F tabelado 3,259, tratamento estatístico pela análise de variância (ANOVA), com 95% de confiança. Para repetibilidade foi apresentado como resultado um CV inferior a 5% e a precisão intermediária após aplicação do teste t *student*, apresentou t calculado 1,97 e este foi menor que o t tabelado 2,23 com 95% de confiança. A robustez apresentou para alterações de temperatura do forno, volume do disco e reagentes de marcas diferentes coeficientes de variação (CV) inferiores a 5% e F calculado de 1,60 e de 1,77 inferiores a 3,68 para os dois primeiros ensaios e t calculado 0,19, inferior a 2,23 de t tabelado 2,23 com 95% de confiança. Todos os valores apresentados na tabela atendem aos parâmetros da regulamentação.

5.2 OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PELO MÉTODO POR CLAE

As 72 amostras de comprimidos de glibenclamida originadas da planta piloto e da linha de produção foram submetidas à análise do teor por CLAE como metodologia de referência. As medidas foram realizadas após aquisição dos espectros NIR e Raman, cujos resultados serão apresentados adiante.

Na tabela 7 são mostrados os valores obtidos pelo método de referência para as amostras utilizadas nos conjuntos de calibração e previsão. Para as 72 amostras, foram obtidos valores variando entre 1,72% a 4,12% m/m do teor de princípio ativo por comprimido, equivalente a 57,26 % a 137,47% da quantidade de glibenclamida declarada na embalagem (5 mg).

Tabela 7: Valores do teor obtidos pelo método de referência para as amostras utilizadas na construção do modelo de calibração multivariada. A) lotes 2011; B) lotes 2012; P) e P') lotes piloto.

Lote (Identificação)	Teor (m/m%)	Lote (Identificação)	Teor (m/m%)	Lote (Identificação)	Teor (m/m%)
11041408 (A1)	2,900	11041410 (A2)	2,922	11041411 (A3)	2,974
11041412 (A4)	2,904	11041413 (A5)	2,969	11041414 (A6)	2,933
11050281 (A7)	2,909	11050282 (A8)	2,850	11050283 (A9)	2,896
11050284 (A10)	2,947	11050285 (A11)	2,931	11081412 (A12)	2,946
11081414 (A13)	2,965	11081415(A14)	2,917	11081416 (A15)	2,967
11101455 (A16)	2,933	11101456 (A17)	2,903	11101458 (A18)	2,916
11101491 (A19)	2,969	11101492 (A20)	2,923	11101493 (A21)	2,850
11101494 (A22)	2,871	11101457 (A23)	2,944	11090213 (A24)	2,942
11090214 (A25)	2,896	11081413 (A27)	2,920	11090216 (A28)	2,930
11090215 (A29)	2,912	12081401 (B1)	2,921	12081402 (B2)	2,896
12081403 (B3)	3,004	12081404 (B4)	2,968	12081405 (B5)	2,972
12081406 (B6)	2,954	12081407 (B7)	2,973	12090221 (B8)	2,983
12090222(B9)	2,901	12090223 (B10)	2,903	1208LB501 (PI)	1,718
1208LB501 (PI')	1,741	1208LB502 (PII)	1,950	1208LB502 (PII')	1,881
1208LB503	2,060	1208LB503	2,037	1208LB504	2,211
(PIII)		(PIII')		(PIV)	

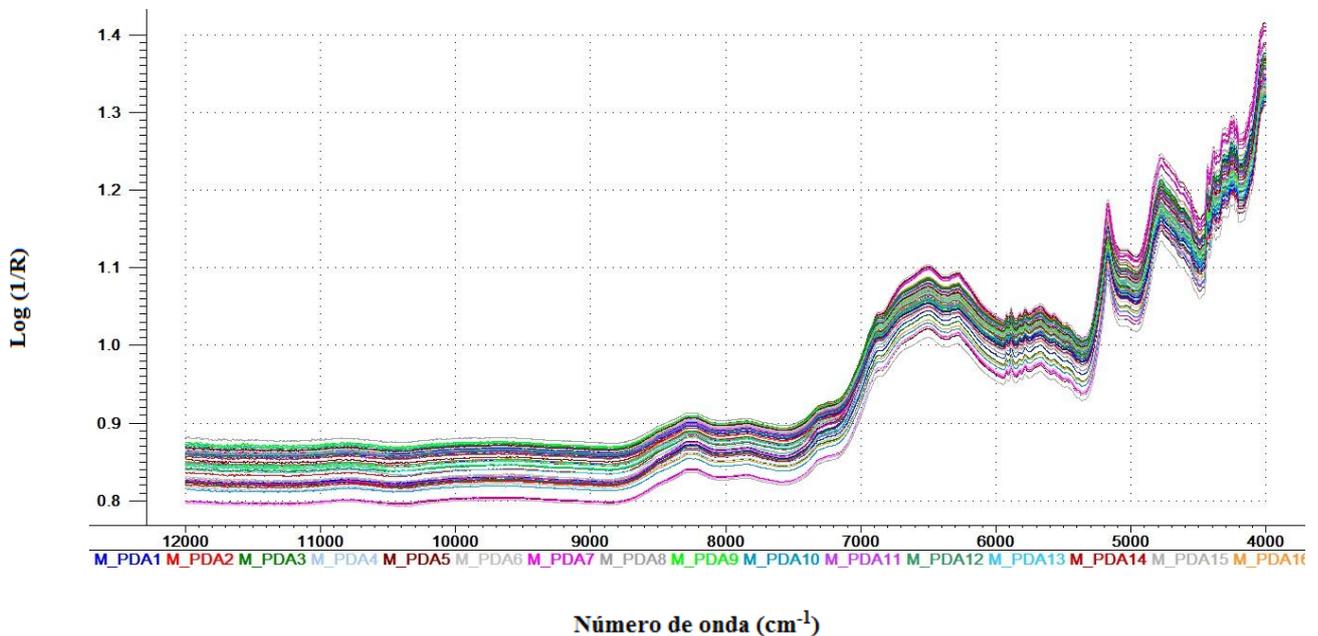
1208LB504 (PIV')	2,246	1208LB505 (PV)	2,442	1208LB505 (PV')	2,351
1208LB506 (PVI)	2,792	1208LB506 (PVI')	2,497	1208LB507 (PVII)	2,677
1208LB507 (PVII')	2,650	1208LB508 (PVIII)	2,773	1208LB508 (PVIII')	2,848
1208LB509 (PIX)	3,032	1208LB509 (PIX')	2,948	1208LB510 (PX)	2,981
1208LB510 (PX')	3,018	1208LB511 (PXI)	3,444	1208LB511 (PXI')	3,185
1208LB512 (PXII)	3,377	1208LB512 (PXII')	3,336	1208LB513 (PXIII)	3,498
1208LB513 (PXIII')	3,557	1208LB514 (PXIV)	3,603	1208LB514 (PXIV')	3,623
1208LB515 (PXV)	3,801	1208LB515 (PXV')	3,799	1208LB516 (PXVI)	3,956
1208LB516 (PXVI')	3,928	1208LB517 (PXVII)	4,048	1208LB517 (PXVII')	4,124

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

5.3 OBTENÇÃO E PRÉ PROCESSAMENTOS DOS ESPECTROS NIR DA GLIBENCLAMIDA

A Figura 17 mostra os espectros médios NIR obtidos dos 72 lotes (produção e piloto) na faixa espectral de 12.000 a 4.000 cm^{-1}

Figura 17. Espectros NIR dos comprimidos de glibenclamida, na faixa espectral de 12.000 – 4.000 cm^{-1}

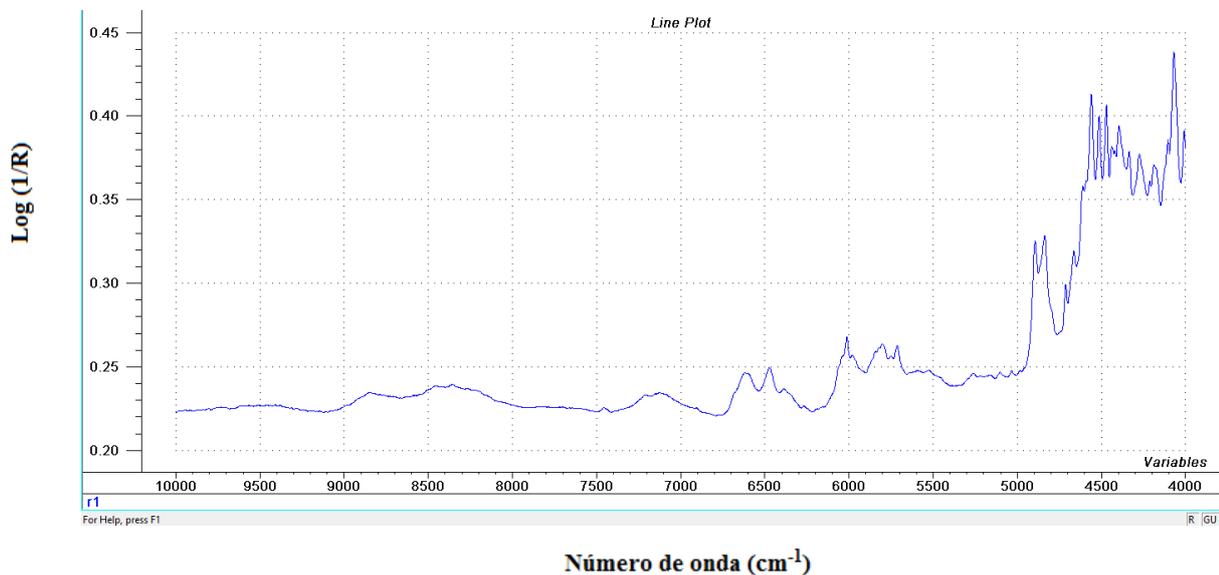


Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Como pode ser observado na figura 17, a faixa espectral do NIR de 12000 a 9000 cm^{-1} , na qual está incluída a região associada ao terceiro sobretom de estiramento de ligações C-H (11200-10500 cm^{-1}), apresentou uma baixa relação sinal/ruído sendo, portanto, descartada na construção dos modelos. A não utilização dessa região teve o intuito de evitar inserção de informação ruidosa acompanhada de variáveis irrelevantes à construção dos modelos de calibração multivariada.

Após a avaliação dos espectros NIR da matéria prima glibenclamida (figura 18), foi possível visualizar que a região entre 9.000 e 7.600 cm^{-1} associada ao segundo sobretom dos modos de estiramento C-H, apesar de demonstrar nos espectros do comprimido a existência de informações possivelmente relevantes (figura 1), essas estão associadas tanto ao ativo quanto aos excipientes, devendo ser descartada da faixa espectral de trabalho, tornando o método mais seletivo.

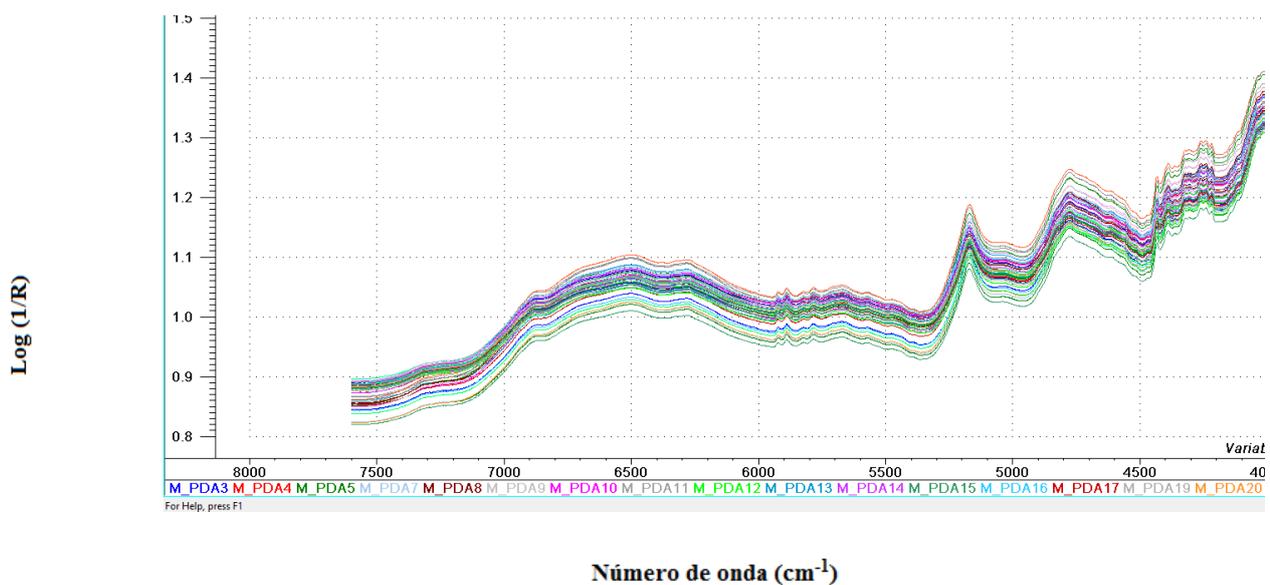
Figura 18. Espectro de glibenclamida matéria prima, demonstrando que a região de informação espectral está compreendida entre 7.600 – 4.000 cm^{-1}



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A região espectral de 7600 a 4000 cm^{-1} foi então adotada como região de trabalho em todo o tratamento quimiométrico, a mesma encontra-se na figura a seguir:

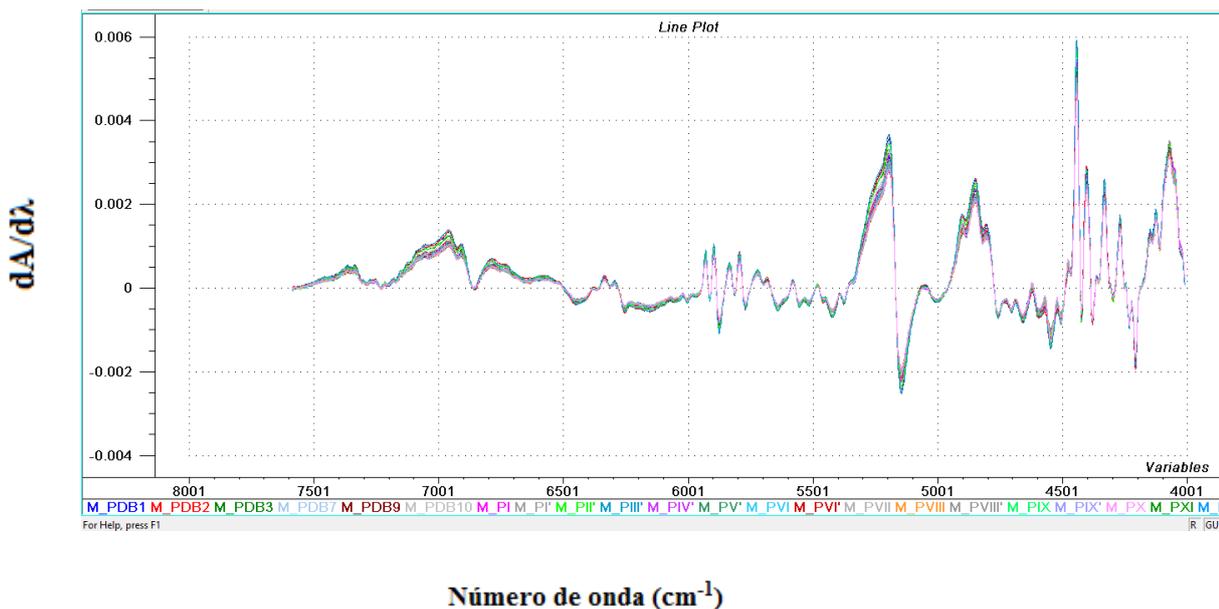
Figura 19: Espectros NIR obtidos dos comprimidos de glibenclamida, na faixa espectral que está compreendida entre 7.600 – 4.000 cm^{-1}



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Como pode ser observado os espectros NIR apresentaram variações de linha de base, para minimizar esse efeito foram avaliados algumas técnicas de pré-processamento (SNV, MSC e primeira derivada). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se a primeira derivada com filtro de Savitzky-Golay (SG), polinômio de segunda ordem. Diferentes tamanhos de janelas foram testados, e foi observado que a partir de certo limite o aumento dos pontos dessas janelas provocava perda de informação. A melhor suavização encontrada para esse método foi utilizando janela de 13 pontos sendo, portanto, utilizada para construção dos modelos. Os espectros pré-processados são mostrados na figura 20.

Figura 20. Espectros NIR das 71 amostras de comprimidos de glibenclamida pré-processados utilizando-se primeira derivada com filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 13 pontos. Faixa espectral: 7.600-4.000 cm^{-1} .



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

5.4. CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NIR

Na construção do modelo de calibração, após realizado o pré-processamento dos espectros, foi avaliada a presença de *outliers* (amostras anômalas) dentre as 72 amostras. A avaliação de *outliers* num conjunto total

permite excluir da calibração e previsão, amostras que poderiam potencialmente distorcer o modelo, aumentando o resíduo e reduzindo a exatidão.

Desse modo, uma amostra anômala foi detectada quando visualizado o gráfico dos resíduos de concentração de *student* versus a influência das amostras para o modelo, a amostra apresentou resultados de *leverage* e resíduos altos concomitantemente, caracterizando-se um *outlier*, sendo o mesmo retirado do conjunto de dados. As 71 amostras restantes foram separadas em conjunto de calibração (51 amostras) e previsão (20 amostras) utilizando-se o algoritmo SPXy.

Em seguida, o conjunto de dados foi submetido técnica de regressão do PLS e PLS com o algoritmo JK a fim de avaliar qual técnica apresentaria melhor capacidade preditiva para determinação do teor de glibenclamida. O modelo MRL/SPA Não foi avaliado, devido a sua impossibilidade de validação utilizando-se o programa MVC1 (OLIVIERI; GOICOECHEA; INON, 2004). Para indústria farmacêutica, a impossibilidade de validação de um método tem como consequência sua impossibilidade de uso na rotina de controle de qualidade. Outro ponto importante, é que softwares comerciais que trabalham acoplados a equipamentos como no caso do NIR, em geral, não apresentam a possibilidade de aplicar o modelo MLR. Desse modo, apenas os resultados obtidos para o PLS e PLS/JK (tabela 8) serão avaliados através das figuras de mérito da calibração multivariada.

Tabela 8: Resultados obtidos pelos modelos PLSe PLS-JK para determinação do teor de glibenclamida em comprimidos utilizando os espectros NIR pré-processados

Modelo	Ncal	R	RMSECV (% m/m)	VL	Npred	R	RMSEP (% m/m)
PLS	51	0,98	0,09	3	20	0,99	0,08
PLS/JK	51	0,98	0,08	3	20	0,99	0,07

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

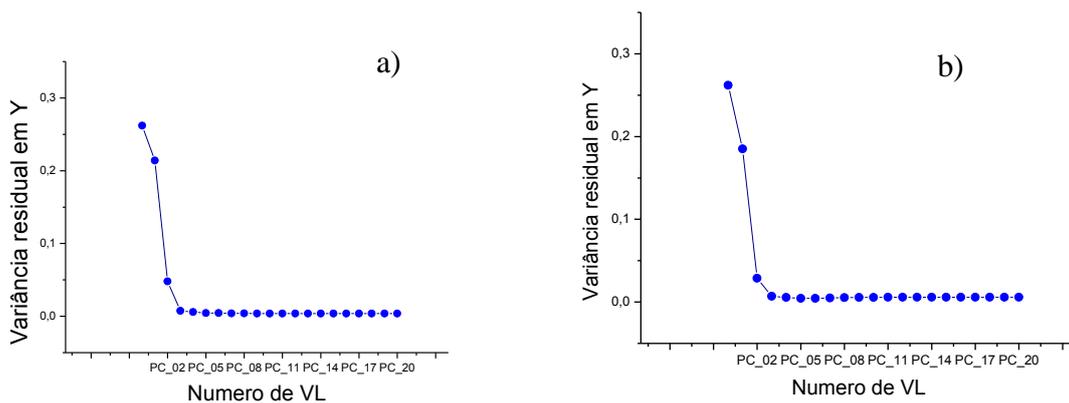
Como podem ser observados, os valores de RMSECV e RMSEP obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK, são muito próximos, não sendo possível deduzir, a princípio, qual o melhor resultado. Aplicando-se o teste F para verificação da variância entre os valores a serem testados, foi obtido um F calculado de 1,26 para os valores de RMSECV, sendo esse inferior ao F tabelado que é de 1,59 (95% de

confiança). Para o RMSEP o valor de F calculado foi 1,30, sendo o F tabelado de 2,16 (95% de confiança).

A verificação estatística demonstra que os valores de RMSECV e RMSEP são estatisticamente semelhantes. Isso significa que os modelos PLS e PLS/JK podem ser utilizadas na validação dos dados.

Afigura 21 mostra a variância residual da calibração em Y versus número de variáveis latentes na construção dos modelos PLS e PLS/JK.

Figura 21. Gráfico demonstrando a variância residual versus o número de variáveis latentes na validação cruzada. a) construção do modelo PLS, e b) construção do modelo PLS/JK, ambos para determinação do teor de glibenclamida por NIR



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

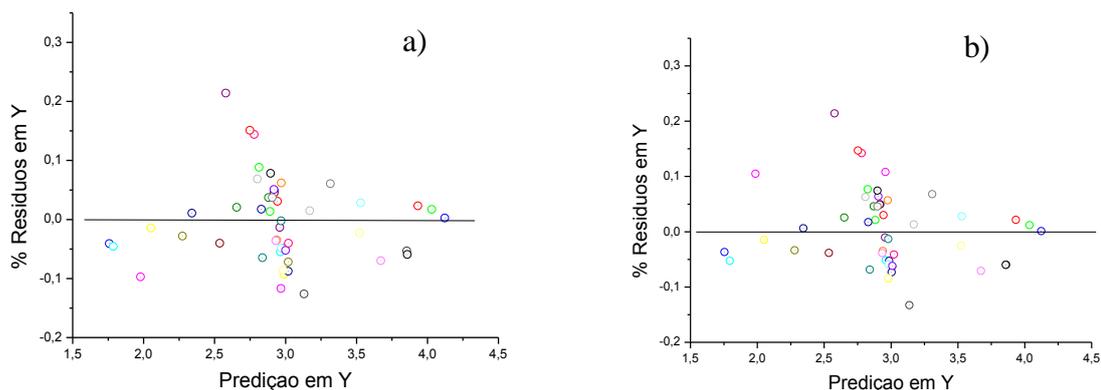
E escolha do número ideal de fatores a ser utilizado na construção do modelo foi realizada na etapa de validação cruzada. Nesta etapa a partir da avaliação do gráfico de variância residual por número de variáveis latentes utilizadas, pode se observar que ao utilizar 3 VL há uma diminuição significativa da variância residual. Dessa forma, passou a ser empregado o número de 3 VL para a construção dos modelos de calibração multivariada para a análise dos comprimidos de glibenclamida.

O número ótimo de variáveis latentes que deve ser usado nos modelos permite modelar o sistema com a quantidade ótima de informação, evitando sub ou

superestimar o modelo, alcançando melhor desempenho nas previsões. O excesso de variáveis latentes no modelo pode adicionar informações irrelevantes como ruídos e interferências. No caso de um número baixo de VL, o modelo pode deixar de explicar informações importantes para o parâmetro de interesse ocasionando sub-ajuste (NASCIMENTO, 2008; GRANGEIRO JÚNIOR, 2011). É possível ainda, verificar a porcentagem de variância explicada pelo modelo para cada componente, como forma de definir o melhor número de variáveis para o modelo. Para os modelos PLS e PLS-JK a primeira componente principal explica, respectivamente, 74% e 64% da variabilidade dos dados espectrais, a PC2 15% e 25%, e a PC3 5% e 7% perfazendo um total de 94% e 96%, respectivamente. A verificação da PC 4, para ambos os modelos, demonstra o acréscimo de 1% na variância explicada pelo modelo na variável X. De forma a evitar a criação de um modelo sobreajustado e mais complexo com a inserção da PC 4 (overfitting), o modelo adotado contempla 3 variáveis latentes.

Os modelos PLS e PLS/JK não apresentaram comportamento tendencioso, o que pode ser comprovado pela distribuição aleatória dos resíduos em y das amostras do conjunto de calibração, como são mostrados na Figura 22.

Figura 22. Gráfico demonstrando a distribuição aleatória dos resíduos em y pelos valores preditivos em y. a) modelo PLS, e b) modelo PLS/JK.

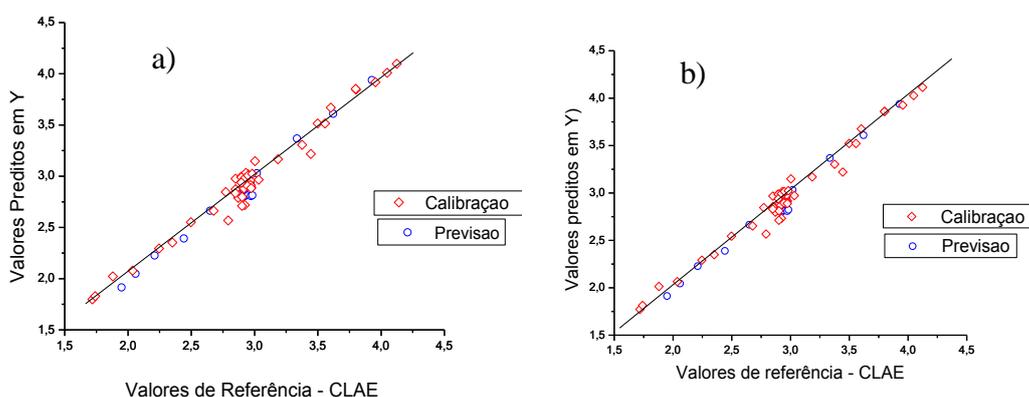


Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A Figura 23a) e b) mostra os valores previstos *versus* os valores de referência para os conjuntos de calibração e previsão respectivamente. Os valores

encontram-se aleatoriamente distribuídos ao longo da linha bissetriz, não sendo observados erros sistemáticos nos modelos (calibração e previsão).

Figura 23. Gráfico dos valores previstos pelos valores de referência; a) PLS e b) PLS/JK.



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Após a avaliação dos modelos de regressão PLS e PLS/JK a previsão do teor de glibenclamida comprimidos, os mesmos serão testados, conforme as orientações da RDC 899 (2003), de forma a atender aos requisitos de validação, para demonstrar a capacidade do método de fornecer resultados seguros.

5.5 VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA UTILIZANDO A ESPECTROSCOPIA NIR

A validação contemplou os parâmetros requeridos para categoria I – análise de teor, seguindo os parâmetros definidos na RDC 899 (2003), guia para validação de métodos analíticos. Além destes, parâmetros complementares foram adicionados à validação por se tratarem de parâmetros importantes quando se utiliza calibração multivariada, figuras de mérito.

A tabela 9 apresenta os principais parâmetros de desempenho dos modelos PLS e PLS/JK desenvolvidos para quantificação de glibenclamida comprimido. As figuras de mérito foram calculadas usando a teoria conhecida como NAS (net analytesignal). Baseado na definição de Lobers, segundo Rocha (2010), o NAS é a parte do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos outros compostos presentes na

amostra. Principalmente, a sensibilidade e seletividade são calculadas por este teorema.

Tabela 9: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para as figuras de mérito, exatidão e linearidade utilizando os espectros NIR na validação do método analítico

Parâmetros da Validação		PLS	PLS/JK
Figuras de mérito para calibração multivariada	Ncal	51	51
	RMSECV	0,09	0,08
	RMSEP	0,08	0,07
	Sensibilidade	0,0011	0,0011
	Sensibilidade analítica	70	68
	Seletividade	0,82	0,87
Exatidão (dados previsão -RMSEP)	Npred	20	20
	Média (%m/m)	2,87	2,87
	Desvio padrão	0,22	0,22
	Tcal	0,21	0,22
	Tcrit	2,02	2,02
Linearidade	Ncal	51	51
	Faixa de concentração (%m/m)	1,80 – 4,20 (60 – 140%)	1,80 – 4,20 (60 – 140%)
	Inclinação (slope)	0,96	0,97
	Bias	-0,001	-0,001
	R	0,98	0,98

Fonte:Diógenes Oliveira, 2014

A sensibilidade indica a extensão da resposta em função de variações na concentração do analito, no presente trabalho os modelos PLS e PLS/JK apresentam o valor de sensibilidade de 0,0011%, considerado um valor baixo, quando comparado a outros trabalhos como Rocha (2010), que, para análise de Nimesulida comprimidos obteve 0,004%. Esse valor baixo se deve ao pré-tratamento aplicado aos dados espectrais.

Um dado mais prático para se entender a sensibilidade é o parâmetro chamado de sensibilidade analítica, pois seu inverso representa a sensibilidade do método para detectar alterações na medida da concentração das amostras (Rocha, 2010). Nesse caso, o valor do inverso da sensibilidade analítica em ambos os modelos é de 0,014 %m/m ou 0,47% de teor (considerando o parâmetro de liberação 3%m/m ou 100% de teor, respectivamente), variações nesse patamar já

são reconhecidas pelo método o que demonstra boa performance para aplicação em controle de processo.

O valor encontrado para seletividade foi de 0,82 e 0,87 respectivamente para PLS e PLS/JK, isto significa que menos de 1% da informação do analito contida no espectro é ortogonal ao espaço de interferentes, ou seja mais de 99% da quantidade do sinal original está sendo usada para o modelo

O RMSECV e RMSEP são valores relacionados à exatidão dos métodos. Nesse estudo ambos os modelos apresentaram valores estatisticamente iguais conforme discutido anteriormente. De forma mais clara, é possível converter os valores para percentagem, no qual o erro atribuído aos modelos variaram em torno de 2,33% a 3,00% do valor declarado na embalagem (5 mg), estando abaixo da variação máxima permitida pela farmacopeia que é de $\pm 10\%$ (BRASIL, 2010b). Considerando-se o range de aprovação da glibenclamida que é de 90% a 110%, pode-se concluir que os valores de exatidão dos modelos PLS e PLS/JK estão dentro de uma faixa de trabalho aceitável, sobretudo quando se pretende que a aplicação da técnica analítica seja em função do controle do processo em tempo real.

No parâmetro linearidade foram avaliados, a princípio, os valores obtidos pelos modelos PLS e PLS/JK para o coeficiente de correlação, que foi de 0,98 para ambos os modelos. Esses valores, porém, não contemplam o requerimento da RDC 899/2003 que prevê 0,99 como valores mínimos para correlação. No entanto, modelos de calibração multivariada não podem ser avaliados sob a mesma óptica da calibração univariada, sendo necessário avaliar o modelo de forma mais sistemática avaliando outros parâmetros para assegurar sua capacidade em prever valores de teor das amostras analisadas.

Segundo a USP 36 (2013) os parâmetros de erros como o RMSEP, RMSEC e RMSECV, a faixa de concentração utilizada, e o valor do *bias* devem ser avaliados em conjunto. No presente trabalho, tal avaliação é aceitável, devido aos valores de erro apresentarem-se dentro de uma margem esperada, ($<10\%$) e a faixa de trabalho para o conjunto de calibração estar distribuídas numa faixa de 60 a 140%, mais ampla do que a requerida pela legislação (80 a 120%). Além desses, o *bias* apresentou valor estatisticamente igual a zero, quando avaliado segundo teste t, indicando que não há tendência nos modelos desenvolvidos.

A precisão dos métodos desenvolvidos foi avaliada com base nos parâmetros repetibilidade, precisão intermediária e robustez. Para o teste de repetibilidade foram avaliadas três concentrações alta, média e baixa conforme mostrado na tabela 10. As determinações foram realizadas com o mesmo analista no mesmo dia e apresentaram valores que, ao serem avaliados de acordo com o teste t de *student*, demonstraram não haver diferença estatisticamente significativa entre os mesmos (95% de confiança). Além disso, os valores para o coeficiente de variação (CV) apresentaram-se abaixo do valor máximo permitido pela RE 899 (2003), que é de 5%.

Tabela 10: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para repetibilidade utilizando os espectros NIR na validação do método analítico.

Parâmetros da Validação		PLS	PLS/JK
Repetibilidade	Concentração 1,8% <i>m/m</i> - 60 % (ref.1,72)	1,84	1,83
		1,78	1,77
		1,85	1,84
	Média (% <i>m/m</i>)	1,82	1,81
	Desvio padrão	0,038	0,039
	CV (%)	2,08	2,185
	Concentração 3,0% <i>m/m</i> - 100 % (ref.3,03)	3,01	3,00
		2,98	2,97
		2,92	2,91
	Média (% <i>m/m</i>)	2,97	2,96
	Desvio padrão	0,046	0,046
	CV (%)	1,54	1,548
	Concentração 4,2% <i>m/m</i> - 140 % (ref.4,05)	3,82	3,79
		3,90	3,88
		3,81	3,78
	Média (% <i>m/m</i>)	3,84	3,82
	Desvio padrão	0,049	0,055
	CV (%)	1,28	1,453

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A tabela 11 apresenta o teste da precisão intermediária, que visa avaliar o método analítico quanto a variabilidade de analistas e dias em que a técnica é utilizada, considerando o mesmo conjunto de amostra. Os desvios padrão relativos foram inferiores a 5% e os valores do teste t de *student* apresentaram abaixo do t crítico, demonstrando valores aceitáveis (BRASIL, 2003).

Tabela 11: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para precisão intermediária utilizando os espectros NIR na validação do método analítico.

Modelo		(1,8 %m/m – 60%)		(3,0 %m/m – 100%)		(4,2 %m/m – 140%)	
PLS	Teor (%m/m)	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2
	1	1,86	1,88	3,01	2,95	3,82	3,79
	2	1,87	1,82	2,98	2,92	3,90	3,74
	3	1,88	1,91	2,92	2,95	3,81	3,77
	Média (%m/m)	1,87	1,87	2,97	2,94	3,84	3,77
	Desvio padrão	0,0086	0,047	0,046	0,017	0,049	0,025
	CV (%)	0,461	2,525	1,54	0,59	1,28	0,67
	Tcalc	0,084				2,39	
	tCrit	2,78				2,78	
PLS/JK		(1,8 %m/m – 60%)		(3,0 %m/m – 100%)		(4,2 %m/m – 140%)	
	Teor (%m/m)	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2
	1	1,84	1,85	3,00	2,900	3,79	3,83
	2	1,85	1,79	2,97	2,961	3,88	3,84
	3	1,85	1,89	2,91	2,976	3,78	3,84
	Média (%m/m)	1,85	1,85	2,96	2,95	3,82	3,84
	Desvio padrão	0,006	0,048	0,046	0,040	0,055	0,009
	CV (%)	0,308	2,588	1,548	1,367	1,452	0,242
	tcalc	0,108		0,407		0,533	
tcrit	2,78		2,78		2,78		

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Já para o teste da robustez foram avaliados dois tipos de alterações, uma avaliando as condições de produção do medicamento, na qual foram utilizados comprimidos produzidos em linha de fabricação e comprimidos produzidos em uma planta piloto, e outra avaliando parâmetros relacionados ao equipamento, nesse caso o número de varreduras para aquisição dos espectros (28, 30 e 32scans).

No primeiro caso, o coeficiente de variação apresentou-se dentro do esperado (CV < 2%), e de acordo com o teste t de *student* não há diferença estatisticamente significativa (95% de confiança) entre os valores obtidos pelos modelos para os lotes produção e piloto. Para avaliação do número de varreduras foi realizado um teste de

variância ANOVA para comparação dos três resultados. Os valores de F calculado ficaram abaixo do F crítico, indicando que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores de teor obtidos utilizando-se espectros com número de scans menor que 32.

Tabela 12: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para robustez utilizando os espectros NIR na validação do método analítico

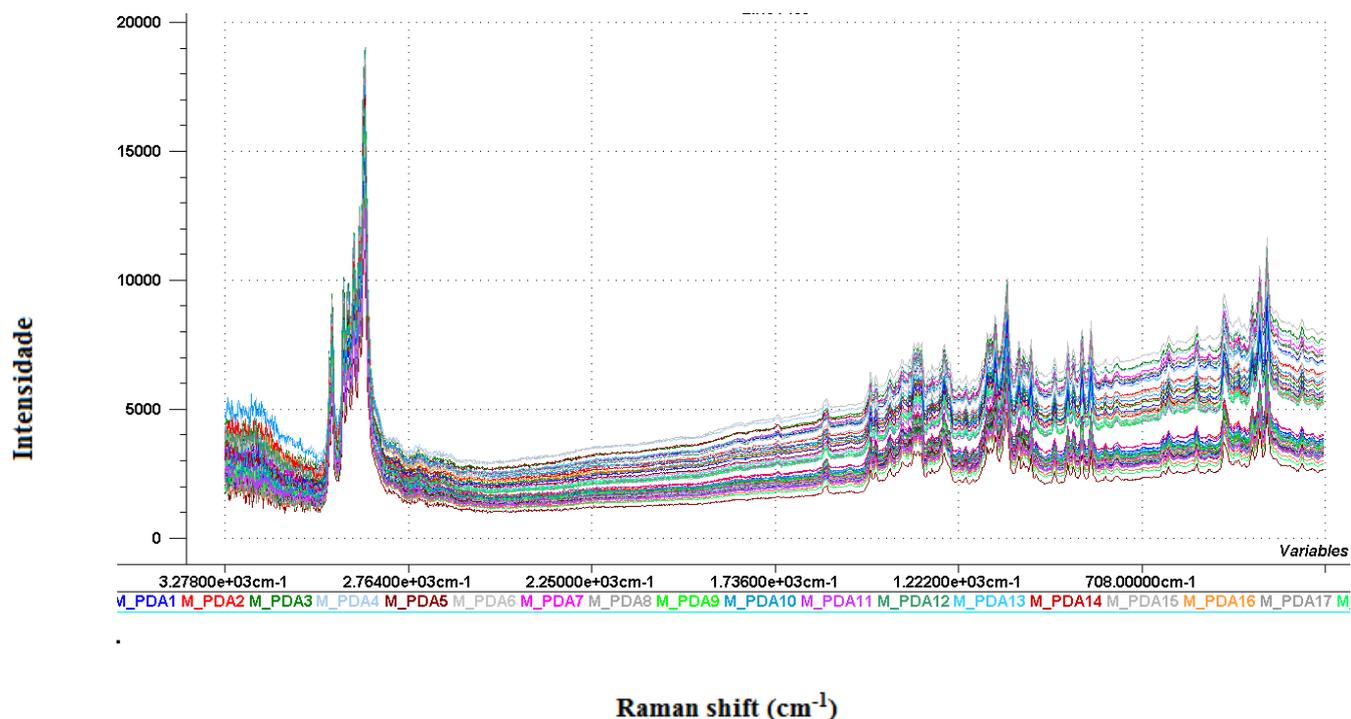
Modelo		N° Varreduras			Produção	
PLS	Teor (%m/m)	28 scans	30 scans	32 scans	Lote produção	Lote piloto
	1	3,07	3,01	3,01	2,99	3,01
	2	3,02	2,98	2,98	3,03	2,98
	3	3,02	2,92	2,92	2,97	2,92
	Média (%m/m)	3,04	2,97	2,97	3,00	2,97
	Desvio padrão	0,0263	0,0474	0,0474	0,027	0,046
	CV (%)	0,8652	1,5942	1,5942	0,928	1,54
		Fcalc: 2,649007			tcalc: 0,904	
		F crit: 5,143253			tcrit: 2,78	
	PLS/JK		N° Varreduras			Produção
Teor (%m/m)		28 scans	30 scans	32 scans	Lote produção	Lote piloto
1		3,061	2,96	3,00	2,979	3,00
2		3,019	3,02	2,97	3,022	2,97
3		3,025	3,06	2,91	2,964	2,91
Média (%m/m)		3,04	3,013	2,96	2,99	2,96
Desvio padrão		0,022	0,050	0,046	0,030	0,046
CV (%)		0,748	1,670	1,548	1,007	1,548
		Fcalc: 2,603897			tcalc:0,895	
		Fcrit: 5,143253			tcrit: 2,78	

Fonte:Diógenes Oliveira, 2014

5.6 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA USANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

A Figura 24 mostra os 72 espectros Raman obtidos, sendo eles a média dos espectros de 10 comprimidos de cada lote (produção e piloto) na faixa espectral de 3278 a 200 cm^{-1} .

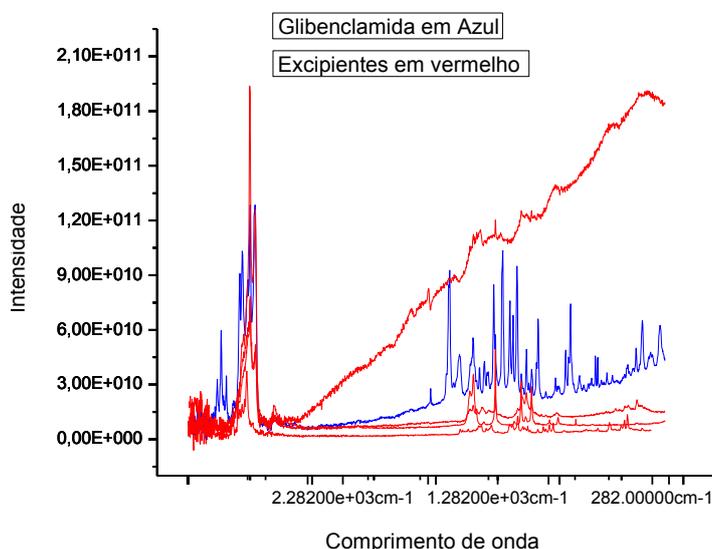
Figura 24: Espectros Raman das 72 amostras de comprimidos de glibenclamida. Faixa espectral: 3278 a 200 cm^{-1}



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A fim de definir a melhor faixa espectral para utilização na construção dos modelos multivariados, foram avaliados os espectros individuais de cada matéria prima que compõem a formulação do comprimido de glibenclamida. Estes gráficos foram sobrepostos na figura 24, onde os espectros dos excipientes aparecem em vermelho e da glibenclamida (API) está em azul.

Figura 25: Espectros Raman das matérias primas que constituem os comprimidos de glibenclamida. Faixa espectral: 3278 a 200 cm^{-1}

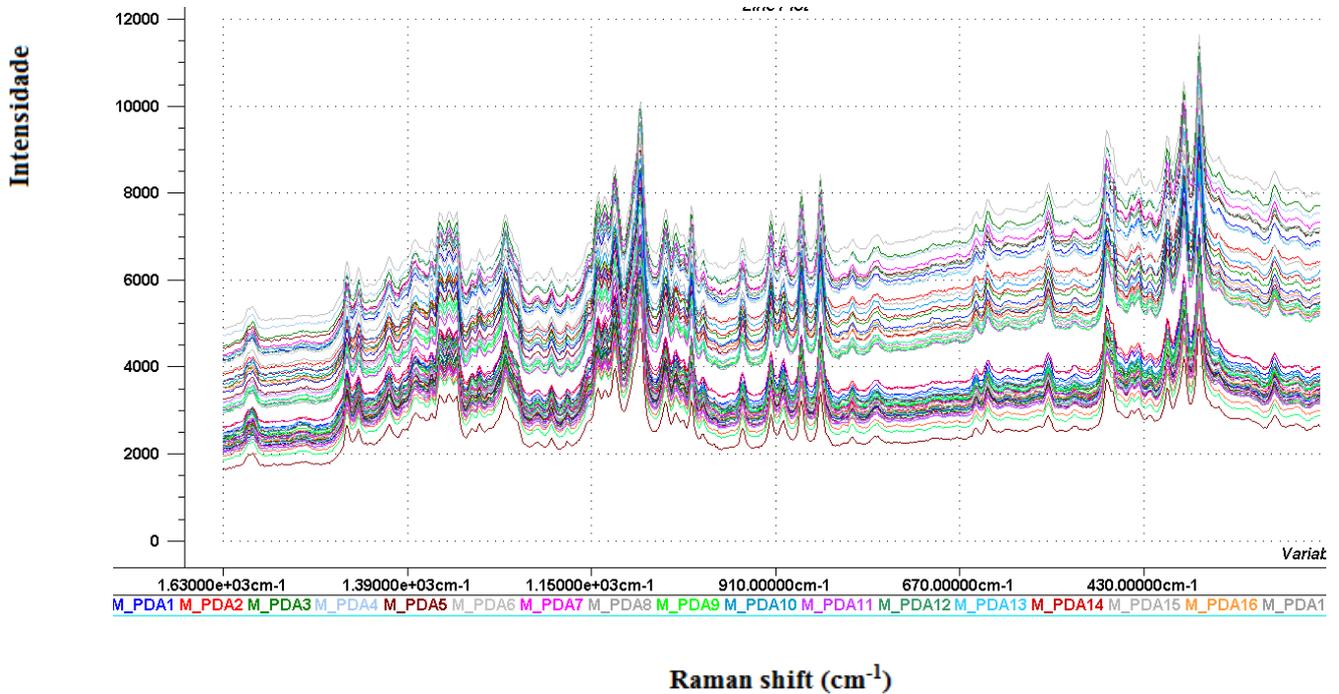


Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

As bandas à esquerda do gráfico, em torno de 2800 cm^{-1} são bandas associadas a ligações C-H bastante comuns entre todos os insumos que constituem o produto glibenclamida comprimido. Por este fato, foi escolhida a região que vai de 1630 a 200 cm^{-1} , Nesta região explora-se com intensidades médias e fortes ligações do tipo C-N, C-O-C, C-Cl e C-C aromático, segundo Sharader (1995). É possível perceber na figura que a área escolhida para elaboração dos modelos, demonstra ser bastante representativa em termos de informações diferentes dos demais excipientes. A região que compreende a faixa espectral de 1630 a 200 cm^{-1} foi, então escolhida por apresentar melhor potencial para construção dos modelos multivariados.

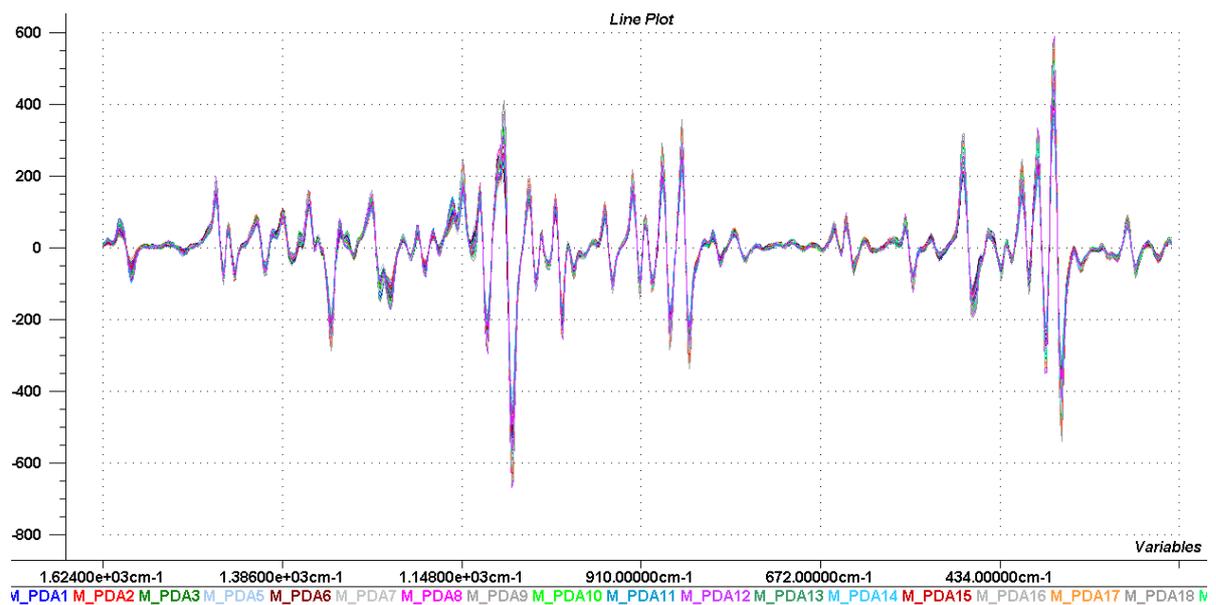
Para minimizar variações na linha de base presente nos espectros Raman (figura 26), foi utilizada como técnica de pré-processamento, a primeira derivada com filtro de Savitzky-Golay (SG). Diferentes tamanhos de janelas foram testados, e o que apresentou melhores resultados foi a suavização com filtro de Savitzky-Golay (SG) e janela de 7 pontos, sendo, portanto, utilizada para construção dos modelos. Os espectros pré-processados são mostrados na figura 27.

Figura 26: Espectros Raman das amostras de comprimidos de glibenclamida. Faixa espectral: 1630 a 200 cm^{-1}



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Figura 27: Espectros Raman das amostras de comprimidos de glibenclamida pré-processados, utilizando a primeira derivada com filtro de Savitzky-Golay, polinômio de segunda ordem e janela de 7 pontos. Faixa espectral: 16300 a 200 cm^{-1}



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

5.7 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA USANDO RAMAN PELO MÉTODO DE PLS

Adotando a mesma estratégia usada para construção dos modelos do NIR para o Raman, foi realizada a avaliação das 72 amostras para detecção de *outliers*, a fim de se verificar amostras anômalas que pudessem promover distorção no modelo reduzindo sua capacidade de previsão.

Duas amostras anômalas foram detectadas e retiradas antes da seleção das amostras de calibração e previsão. Ambas as amostras apresentaram altos *leverage* e resíduo em X e em y. Em seguida, utilizou-se o algoritmo SPX_y, sendo selecionadas 50 amostras para o conjunto de calibração e 20 amostras para o conjunto de previsão.

Da mesma forma que o NIR, calibração dos espectros Raman foi feita usando dois tipos de regressão, os métodos PLS e PLS/JK. Assim, foram calculadas as figuras de mérito (tabela B), onde constam os dados iniciais de avaliação para o segmento da validação.

Tabela 13: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para determinação do teor de glibenclamida em comprimidos utilizando os espectros Raman pré-processados

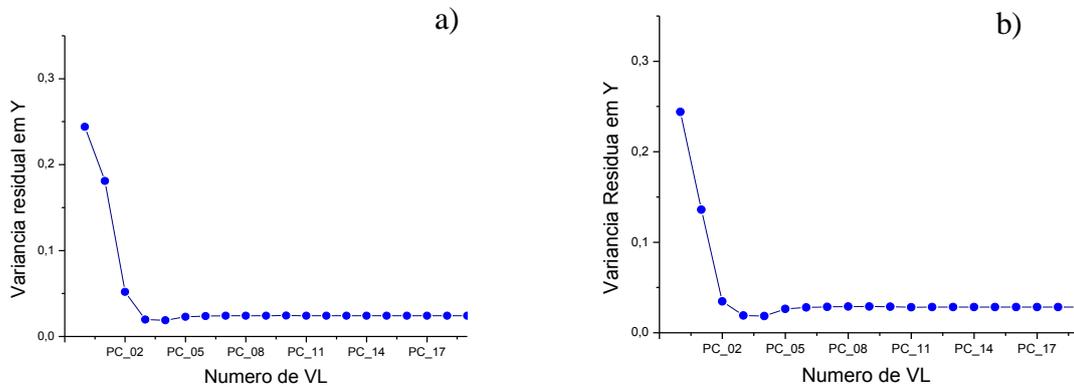
Modelo	Ncal	R	RMSECV (% m/m)	VL	Npred	R	RMSEP (% m/m)
PLS	50	0,96	0,14	3	20	0,97	0,11
PLS/JK	50	0,96	0,14	3	20	0,97	0,11

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Os dois modelos apresentaram valores de RMSECV, RMSEP e número de variáveis usadas para a construção do modelo semelhante.

Para identificação do número ótimo de variáveis foi analisado o gráfico de variância residual *versus* o número de variáveis latentes para os modelos PLS e PLS/JK obtidos através do software The UNSCRAMBLER 9.7.

Figura 28: Gráfico demonstrando a variância residual versus o número de variáveis latentes na validação cruzada. a) construção do modelo PLS, e b) construção do modelo PLS/JK, ambos para determinação do teor de glibenclamida por Raman.

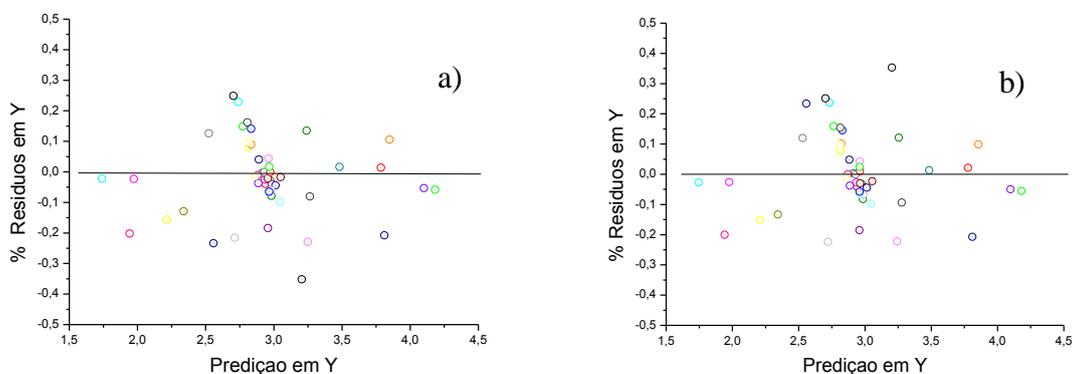


Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Avaliando a porcentagem da variância explicada pelos modelos PLS e PLS/JK em X, tem-se, respectivamente, que a PC1 contribui com 66% e 48%, a PC2 com 25% e 43% e a PC3 com 3% e 4%.

Os modelos PLS e PLS/JK não apresentaram comportamento tendencioso, o que pode ser comprovado pela distribuição aleatória dos resíduos em y das amostras do conjunto de calibração, conforme mostrado na Figuras 29.

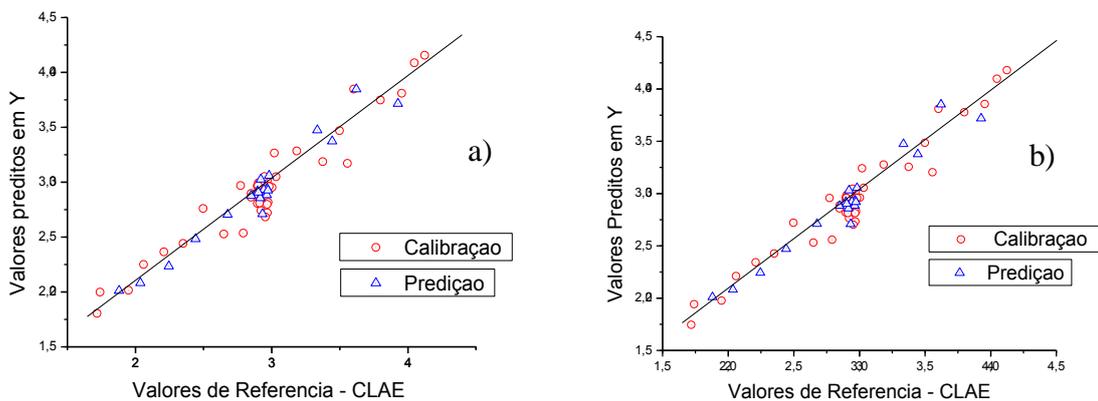
Figura 29: Gráficos demonstrando a distribuição aleatória dos resíduos em y pelos valores preditivos em y. a) modelo PLS, e b) modelo PLS/JK, para espectroscopia Raman



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A Figura 30 mostra os gráficos dos valores previstos *versus* os valores de referência para os conjuntos de calibração e previsão, respectivamente. Os valores encontram-se aleatoriamente distribuídos ao longo da linha bissetriz, não sendo observados erros sistemáticos nos modelos (calibração e previsão).

Figura 30: Gráfico dos valores previstos pelos modelos: a) PLS e b) PLS/JK para determinação do teor de glibenclâmida em comprimidos *versus* valores de referência utilizando-se espectros Raman – Modelo de calibração.



Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Comparando-se os modelos de calibração multivariada obtidos com os espectros Raman (figura 30) e com os espectros NIR (figura 23), pôde-se observar que houve uma maior dispersão das amostras em relação à bissetriz do quadrante para Raman. Essa observação corrobora com os valores de RMSECV e RMSEP obtidos que Raman (tabela 13), os quais foram maiores que para NIR (tabela 8). Entretanto, os valores encontram-se dentro dos limites esperados para aplicação em controle em processo de fabricação, sendo inferiores a 5 %.

Após verificação inicial realizada durante a construção dos modelos, ambos serão avaliados dentro do mesmo escopo de validação que foi proposto para o NIR.

5.8 VALIDAÇÃO EXTERNA DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA USANDO A ESPECTROSCOPIA RAMAN

A validação foi planejada segundo os parâmetros da RDC 899 (2003), acrescentada de figuras de mérito próprias da calibração multivariada, da mesma

forma da estratégia adotada para o NIR. Objetiva-se definir um padrão de validação que demonstre a segurança do método contemplando os requerimentos, mas considerando às especificidades dos métodos de calibração multivariada.

A tabela 14 apresenta os parâmetros iniciais de avaliação dos modelos construídos para quantificação de glibenclamida comprimido usando a espectroscopia Raman. Estes parâmetros são figuras de mérito da calibração multivariada que e parâmetros de validação de métodos analíticos segundo a RDC 899 (2003). Assim como para o NIR os parâmetros de sensibilidade e seletividade foram calculados através do NAS.

Tabela 14: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para as figuras de mérito, exatidão e linearidade utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.

Parâmetros de Validação		PLS	PLS/JK
Figuras de mérito para calibração multivariada	Ncal	50	50
	RMSECV	0,14	0,14
	RMSEP	0,11	0,11
	Sensibilidade	0,0014	0,0014
	Sensibilidade analítica	44	45
	Seletividade	0,93	0,98
Exatidão (dados previsão - RMSEP)	Npred	20	20
	Média (%m/m)	2,89	2,89
	Desvio padrão	0,24	0,24
	Tcal	0,03	0,03
	Tcrit	1,68	1,68
Linearidade	Ncal	50	50
	Faixa de concentração (%m/m)	1,80 – 4,20 (60 – 140%)	1,80 – 4,20 (60 – 140%)
	Inclinação (slope)	0,90	0,97
	Bias	0,002	0,002
	R	0,96	0,96

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A sensibilidade apresentada pelos modelos foi um pouco mais elevada do que no NIR que apresentou 0,0011, entretanto o valor ainda é abaixo. O inverso da sensibilidade analítica foi de 0,022%*m/m* ou 0,74%, demonstrando que o método é sensível a variações na concentração do analito nestas proporções, conforme a medida de concentração adotada.

A seletividade apresentou valores próximos aos obtidos pelo NIR, demonstrando que menos de 1% da informação do analito é ortogonal ao espaço dos interferentes. O restante do sinal é seletivo e é utilizado no modelo para determinar a glibenclamida.

O RMSEP apresenta valores de 0,11 para concentração %m/m. Este valor quando avaliado como margem de erro em porcentagem, corresponde a 3,6% de divergência para um valor real. Esta divergência é maior que a do NIR, mas não compromete o uso da técnica para controle em processo. No caso da aplicação industrial pretendida, essa técnica pode ser usada em linha de fabricação com acompanhamento real do processo, abrangendo uma leitura mais ampla por contar com um número de amostras mais significativa, especialmente para o LAFEPE, pois o instrumento é portátil e pode ser utilizado em um intervalo de tempo curto dentro do tempo de compressão total de um lote, possibilitando a verificação mais eficiente da uniformidade de conteúdo dos comprimidos.

Nesse aspecto, considerando a faixa de trabalho de 90-110% de aprovação dos lotes do comprimido de glibenclamida, não parece ser limitador o erro estimado para os modelos. Realizando o cálculo do teste t para os valores de teor obtidos por CLAE com os valores previstos pelos modelos PLS e PLS/JK para as 20 amostras de previsão, o t calculado foi de 0,03, sendo inferior ao t crítico 1,68, demonstrando que não há diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos.

Na validação cruzada, o valor de RMSECV apresentou-se maior do que o do NIR, o que pode ser explicado por uma maior variação dos dados dentro do conjunto de calibração.

Para o teste de linearidade o coeficiente de correlação r foi de 0,96 para ambos os modelos. Da mesma forma que o NIR, o valor de r está abaixo do parâmetro previsto para validação segundo o guia da ANVISA. Avaliando os erros RMSECV e RMSEP, já discutidos, além da faixa linear estudada de 60 a 140%, de acordo como proposto pela USP 36 (2013), podemos avaliar o parâmetro como aceitável. Trabalhos como apresentados por GrangeiroJunior (2011) apresentam valores para análise de comprimidos de zidovudina e lamivudina por NIR em um patamar acima de 0,90, o que permite afirmar que estes dados são aceitáveis para sua aplicação. O *bias* é estatisticamente igual a zero, de acordo com o teste t de *student* (95% de confiança), ratificando a não existências de tendências nos modelos.

No teste de repetibilidade, para três concentrações alta, média e baixa, de acordo com a tabela 15, obteve-se valores para os coeficientes de variação menores que 5% para determinações realizadas com o mesmo analista no mesmo dia. Para esse parâmetro, os modelos também demonstram resultados aceitáveis.

Tabela 15: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para repetibilidade utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.

Parâmetros de Validação		PLS	PLS/JK
Repetibilidade	Concentração 1,8%/m - 60 % (ref.1,72)	2,21	2,19
		2,17	2,17
		2,14	2,14
	Média (%m/m)	2,17	2,167
	Desvio padrão	0,035	0,025
	CV (%)	1,62	1,162
	Concentração 3,0%/m - 100 % (ref.3,03)	2,76	2,76
		2,81	2,79
		2,71	2,70
	Média (%m/m)	2,76	2,750
	Desvio padrão	0,05	0,046
	CV (%)	1,81	1,666
	Concentração 4,2%/m - 140 % (ref.4,05)	3,36	3,36
		3,27	3,27
		3,31	3,31
	Média (%m/m)	3,31	3,313
	Desvio padrão	0,045	0,045
	CV (%)	1,36	1,361

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

A tabela 16 apresenta o teste da precisão intermediária realizado com analistas diferentes em dias diferentes. Nesse caso, os valores obtidos para os coeficientes de variação também foram menores que 5%, demonstrando valores aceitáveis (BRASIL, 2003)

Tabela 16: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para precisão intermediária utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.

Modelo		(1,8 %m/m – 60%)		(3,0 %m/m – 100%)		(4,2 %m/m – 140%)	
PLS	Teor (%m/m)	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2
	1	2,21	2,17	2,76	2,78	3,36	3,30
	2	2,17	2,19	2,81	2,67	3,27	3,26
	3	2,14	2,14	2,71	2,83	3,31	3,40
	Média (%m/m)	2,17	2,17	2,76	2,76	3,31	3,32
	Desvio padrão	0,035	0,025	0,05	0,082	0,045	0,072
	CV (%)	1,62	1,62	1,81	2,96	1,36	2,17
	tcalc	0,27		0,08		0,13	
	tcrit	2,78		3,18		3,18	
PLS/JK		(1,8 %m/m – 60%)		(3,0 %m/m – 100%)		(4,2 %m/m – 140%)	
	Teor (%m/m)	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2	Analista 1 D1	Analista 2 D2
	1	2,19	2,17	2,76	2,77	3,36	3,30
	2	2,17	2,19	2,80	2,65	3,27	3,25
	3	2,14	2,13	2,70	2,81	3,31	3,40
	Média (%m/m)	2,17	2,16	2,75	2,74	3,31	3,32
	Desvio padrão	0,025	0,031	0,050	0,083	0,045	0,076
	CV (%)	1,162	1,412	1,828	3,035	1,361	2,303
	tcalc	0,14		0,18		0,06	
tcrit	2,78		2,78		2,18		

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

Para o teste da robustez (figura 17) foram avaliados dois tipos de alterações, comprimidos produzidos em linha de fabricação e comprimidos produzidos em uma planta piloto, além de alterações referentes à aquisição de espectros, sendo essa um parâmetro relacionado ao equipamento, tempo de exposição ao laser.

Para tipos de diferentes de lotes quanto sua produção, o coeficiente de variação apresentou-se dentro do esperado, e de acordo com o teste t de *student*, não há diferença estatisticamente significativa entre os lotes da produção e piloto. No entanto, o teste de ANOVA para o tempo de exposição ao laser demonstra que a

variância é diferente para os grupos avaliados, o que significa que a diminuição do tempo de exposição promove perda de informação do espectro, sendo este um parâmetro não aplicável para variação.

Tabela 17: Resultados obtidos pelos modelos PLS e PLS-JK para robustez utilizando os espectros Raman na validação do método analítico.

Modelo		Tempo exposição do laser			Tipo de lote	
PLS	Teor (%m/m)	1.0 s	1.25 s	1.5 s	Lote produção	Lote piloto
	1	2,63	2,79	2,80	2,99	3,01
	2	2,69	2,73	2,81	3,03	2,98
	3	2,72	2,72	2,79	2,97	2,92
	Média (%m/m)	2,68	2,75	2,80	3,00	2,97
	Desvio padrão	0,046	0,038	0,010	0,027	0,046
	CV (%)	1,710	1,378	0,357	0,928	1,54
		F calc: 8,954128			tcalc: 0,904	
		Fcrit: 5,143253			tcrit: 2,78	
	PLS/JK		Tempo exposição do laser			Tipo de lote
Teor (%m/m)		1.0 s	1.25 s	1.5s	Lote produção	Lote piloto
1		2,62	2,79	2,79	2,94	3,01
2		2,68	2,72	2,79	2,98	2,98
3		2,71	2,72	2,78	3,01	2,92
Média (%m/m)		2,67	2,74	2,79	2,98	2,97
Desvio padrão		0,045	0,0404	0,006	0,035	0,046
CV (%)		1,71632	1,47319	0,207183	1,18	1,54
tcalc		F calc: 8,309735			tcalc: 0,904	
tcrit		Fcrit: 5,143253			tcrit: 2,78	

Fonte: Diógenes Oliveira, 2014

5.9 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANALÍTICOS

Na avaliação das duas técnicas quantitativas para análises do medicamento glibenclâmida comprimido: as espectroscopias Raman e NIR, foram observadas algumas diferenças sensíveis, segundo os dados apresentados. É importante ressaltar, inicialmente, que esta aplicação não é inovadora para ambas as técnicas, no entanto elas ainda não se encontram no mesmo padrão de uso na área

farmacêutica, no caso do NIR, a técnica mais antiga, foi incorporada à USP 27 em 2004, no *General Chapter* 1119, capítulo que trata da espectroscopia no infravermelho próximo, traz um rico conteúdo para aplicação na indústria farmacêutica, em contrapartida o Raman tem sua primeira publicação na USP 29 em 2006, após a publicação na farmacopéia Britânica de dezembro de 2005. O conteúdo do Raman na USP é menos rico e aborda os aspectos instrumentais como calibração e qualificação dos equipamentos, além de discutir as possíveis interferências do método. Na farmacopéia brasileira, o Raman não está presente, enquanto que o NIR está descrito no item 5.2.1, onde inclui-se conceitos importantes para validação de métodos por esta técnica.

Ambas as técnicas usam dados multivariados para estabelecer um padrão (modelo) necessário para quantificação de um determinado analito, nesse caso a glibenclamida. Na avaliação das metodologias utilizando dois modelos diferentes, sendo eles o PLS e o PLS/JK, é possível verificar que o algoritmo Jack Knife produziu resultado melhores na técnica por NIR, mas muito próximos do PLS, podendo demonstrar semelhança estatística pela comparação feita, como no caso do RMSEP. Esse algoritmo seleciona as amostras que melhor contribuem para construção do modelo, retirando aquelas que contribuem menos, zerando seus coeficientes de regressão. O uso do PLS/JK deve ser avaliado e preferido quando possível, no entanto para o Raman o uso do algoritmo demonstrou valores equivalentes quando comparado com o modelo PLS.

Em se tratando da validação, deve ser ressaltado que ambas as técnicas demonstraram aptidão para uso na área farmacêutica e foram passíveis de validação. É notório que a regulamentação para validação de métodos analíticos encontra-se defasada e não contempla os requerimentos para esse tipo de método (calibração multivariada). A orientação para o setor regulado passou a ser os compêndios oficiais como as farmacopeias brasileira, americana e britânica, por exemplos. Os valores mensurados para exatidão, como o RMSEP, apresentaram-se melhores para a técnica por infravermelho em comparação com o Raman. A sensibilidade e sensibilidade analítica também demonstraram ser melhores para o NIR, mas sem grandes diferenças.

É válido ressaltar que a especificidade não é demonstrada como um resultado analítico na validação, mas pode ser entendida pelo perfil espectral que as amostras assumem repetidamente, em ambas as técnicas, que é único, pois segundo

Sharader (1995), nas espectroscopias vibracionais o espectro vibracional depende da massa de cada átomo, do arranjo espacial da molécula e da força de interação química entre elas, demonstrando um conjunto imenso de possibilidades, que caracteriza a especificidade de um espectro NIR ou Raman, para um conjunto de moléculas. Trabalhos como Rocha (2010) ou Grangeiro Junior (2011) não apresentam ou discutem especificidade para espectroscopia vibracional.

Nos testes estatísticos para verificação da variância e média dos dados de predição frente aos de referência, ambas as técnicas apresentaram resultados inferiores para t calculado em comparação com o t crítico. Esse dado é importante, porque no controle de processo, o trabalho estatístico com médias é comum, em função da quantidade de unidades farmacêuticas produzidas por lote, chegando a patamares superiores a mais de um milhão, em alguns casos. Nesse contexto, se as variâncias de ambos os métodos e a relação de suas médias são estatisticamente semelhantes, permite afirmar que estas técnicas podem substituir a técnica de referência com ganho na amostragem e conseqüentemente na segurança do monitoramento que é naturalmente ampliada para uma condição *at line*, no caso do Raman (TREVISAN; POPPI, 2006)

É importante ressaltar que a técnica Raman apresenta um conjunto maior de interferentes que podem determinar a exatidão do método como cita a USP 36 (2013): fluorescência, calor, absorção característica da matriz e efeitos de polarização. Alguns desses interferentes podem ter dado alguma contribuição para os dados obtidos, mas não impactaram na avaliação geral. Outro ponto de interesse, é que o espectrômetro Raman utilizado nesse estudo não é um equipamento de bancada como o NIR, mas sim um equipamento portátil que pode ter menor sensibilidade, característica da sua instrumentação.

No parâmetro linearidade, os valores não contemplaram o valor regulamentar para ambas as técnicas (RDC 899/2003), no entanto como já discutido, a resolução ainda não dispõe de recomendações específicas para métodos em calibração multivariada. Avaliando-se frente à farmacopeia brasileira, pode-se afirmar que em ambas as técnicas, os valores obtidos para os coeficientes de correlação são aceitáveis no contexto dos dados apresentados para validação, com ressalva de melhores valores para o NIR.

Os parâmetros de repetibilidade para o NIR e Raman demonstram uma segurança analítica superior à técnica de referência (CLAE) que é mais suscetível às

variações dos analistas, diferentemente da simplicidade operacional e o manuseio fácil das amostras que oferecem maior precisão para técnicas avaliadas.

Na robustez proposta, os modelos apresentaram ótimos resultados quando avaliaram amostras de lotes fabricados em unidades de fabricação diferentes, mas na avaliação proposta para variações no equipamento, identificou-se que enquanto para o NIR a alteração do número de varreduras não ocasionou divergência do valor de referência, ou seja, não houve perda de exatidão; para o Raman a alteração no tempo de exposição ao laser para menos, a fim de promover ainda maior redução no tempo de análise, não demonstrou ser uma boa estratégia, haja vista, que nesse caso, há perda de informação devido ao aumento do ruído e diminuição da seletividade, fazendo com que a concentração da amostra diminuísse com a diminuição do tempo de exposição da mesma ao laser. Esse parâmetro é considerado crítico e não pode ser alterado. O teste ANOVA comprova a variância entre os dados e rejeita a hipótese nula para o caso.

Apesar do NIR ter apresentado os melhores resultados, numa perspectiva sistemática, ambas as técnicas foram validadas e têm sua aplicação aprovada para uso.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho utilizou técnicas quimiométricas para desenvolvimento e validação de métodos analíticos a fim de proporcionar ao controle de qualidade de medicamentos, alternativas viáveis de análise de comprimidos com uma perspectiva de menor gasto de tempo, menor custo financeiro por análise, possibilidade de aumento no número de amostras no controle em processo na linha de fabricação, além do menor impacto ambiental, uma vez que estes métodos não utilizam reagentes ou solventes orgânicos na rotina.

Foram produzidos lotes pilotos, assim como foram ainda, coletadas amostras de lotes de produção industrial para construção dos conjuntos de calibração e previsão, que deram origem aos modelos de calibração multivariada para espectroscopias Raman e NIR.

Os modelos de regressão para cada técnica avaliada, PLS e PLS/JK de forma a avaliar a performance das mesmas frente uma validação completa pelas técnicas espectrométricas de infravermelho próximo e Raman.

Os modelos construídos para ambas as técnicas mostram-se adequados ao uso com bons resultados para previsão e foram capazes de obter o status de validados, produzindo resultados consistentes frente aos requisitos regulamentares, com melhores resultados para O PLS/JK no NIR.

O estudo propiciou ainda um modelo de validação que pode ser adotado para validação de métodos analíticos para quantificação de produtos farmacêuticos, categoria I, que concilia o preconizado pela regulamentação RDC 899/2003, os requerimentos farmacopeicos e as figuras de méritos característica dos métodos de calibração multivariada.

Por fim, é possível afirmar que a implantação de estratégias que contemplem a Tecnologia Analítica de Processo são cada vez mais necessárias na indústria de medicamentos, de forma a possibilitar o melhor aproveitamentos dos recursos humanos e materiais envolvidos na produção e garantindo a melhoria contínua dos produtos, objetivo do sistema de gestão da qualidade.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 9000:2008** - Sistema de Gestão da Qualidade: Fundamentos e Vocabulário. Rio de Janeiro, ABNT, 2008.

ALCIATURI C., et al. The application of mathematical and statistical methods in industry, **Rev. Téc. Ing.Univ. Zulia**. Vol. 33, Nº 2, 164 - 168, 2010

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS.**ASTM E1655-05** Standards practices for infrared multivariate, quantitative analysis, vol 03.06. West Conshohocken, Pennsylvania, USA, 2005.

BEEBE, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B.; **Chemometrics: A Practical Guide**; Wiley, New York 1998.

BLANCO, M.; VILLARROYA, I. **NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 21, n. 4, p. 240-250, 2002.

BLANCO, M.; ALCALÁ, M.; Simultaneous quantitation of five active principles in a pharmaceutical preparation: Development and validation of a near infrared spectroscopic method. In: **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p.280-86, 2006.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**. v. 27, n. 6, 1004-1011, 2004.

BRASIL. RDC- nº 17 de Abril de 2010. Dispõe sobre o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para Fabricação de Medicamentos, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010a.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010b.

BRASIL. RDC 899, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003. Disponível

em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em : 20 de maio de 2012.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, In **Analyst** v. 124, p. 2125-2154. 2000.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1998.

CORRER, C.J. et al. Determinação de Ácido Kójico em Produtos Farmacêuticos por Espectroscopia UV-Vis E Processo de Calibração Multivariada. **Acta Farm. Bonaerense**, 2005.

COSTAL, C. S. Z.; TURRIONI, J. B; MARTINS, R.A; Adaptação de um wiki para informatização do sistema de gestão da qualidade. **Gest. Prod.**, São Carlos, v. 20, n. 4, p. 963-978, 2013

DAVE, H. N.; Mashru, R. C.; Thakkar, A. R. "Simultaneous determination of salbutamol sulphate, bromhexine hydrochloride and etofylline in pharmaceutical formulations with the use of four rapid derivative spectrophotometric methods" In: **Analytica Chimica Acta**. v. 597, p.113-20, 2007.

ESPINOSA, J. C. M. et al. Diferenciación de ácido acetilsalicílico utilizando la técnica de Espectroscopía Raman y El análisis de componentes principales. **Acta Universitaria**, v. 22, n.4, 2012.

EFRON, B. **The Jack-knife, the bootstrap and other resampling plans**. Philadelphia, Pennsylvania: Society for Industrial and Applied Mathematics, 1982.

EVANS, L.; **Espectroscopia - Técnica de quase 100 anos ajuda a ciência moderna**. Publicado em março de 2012. Disponível em: <http://www.gem.infis.ufu.br/raman>. Acesso em: 27 jun. 2013.

FDA - Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, **Food and Drug Administration**, **2004**. Disponível em <http://www.fda.gov/cvm/guidance/published.html>. Acessado em jul. 2013

FERREIRA, M. M. C. *et al*; Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**. v. 22, n. 5, p. 724 - 731, jan. 1999.

FERREIRA, M. M. C. Multivariate QSAR. **Journal of the Brazilian Chemical Society**.v.13, n.6, p. 742-753, 2002.

GRANGEIRO JÚNIOR, S. **Aplicação de Métodos Quimiométricos em Análises de Formas Farmacêuticas Sólidas Lamivudina (3TC) + Zidovudina (AZT) Baseados na Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta e do Infravermelho próximo**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

GRASSELLI, J. G.; SNAVELY, M. K. ; BULKIN, B. J. – **Chemical Applications of Raman Spectroscopy**. Editora: Wiley Interscience - United States. 1981

JAMRÓGIEWICZ, M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 66, p. 1-10, jul. 2012.

KALANTRI, P. P.; SOMANI, R. R.; MAKHIJA, D. T. **Raman spectroscopy: A potential technique in analysis of pharmaceuticals**. v. 1, n. 1, p. 1-12, 2010.

LARKIN, P. J. **IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation**. Elsevier, 2011, p. 239.

LEITÃO, T. M. D. **Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas. Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

LOPES, J.A., COSTA, P.F., ALVES T.P., MENEZES J. C.; Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technologies (PAT) applications, **Chemom. Intell. Lab Syst.**, 74, 269-275, 2004.

LORINCZ, A. et al. Raman Spectroscopy for Neoplastic Tissue Differentiation: a pilot study. **Journal of Pediatric Surgery**.v.39, n.6, p.953-956, 2004.

MARKOPOULOU, C.K.; Malliou, E.T.; Koundourellis, J.E. "Chemometric and derivative methods as flexible spectrophotometric approaches for dissolution and assaying tests in multicomponent tablets". In: **IL Farmaco**. v. 59, p.627-36. 2004.

MARTENS, H., MARTENS, M. Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). **Food Quality and Preference** 11: 5, 2000.

MARTENS H.; NAES T.; **Multivariate Calibration**. Wiley, N.York, 1993

MARTINS, M.A.S. **Espectroscopia Raman Diferencial**. Dissertação (Mestrado em Física e Astronomia). Instituto de Pesquisa do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2008.

MEDEIROS, V. M. M. **Utilização da espectroscopia Raman para monitorar a cura de tintas epóxi aplicadas em tanques de armazenamento de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Química) . Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2010.

MENEZES, J. C. *et al*; Tecnologia Analítica de Processos (PAT, ProcessAnalytical Technology). **Revista de Engenharia Química**, Ed. Publindústria. n. 1, set. 2005. Disponível em < <http://www.deb.uminho.pt/engquimica/Num01/EQ01-PAT.pdf>> Acessado em 25 de janeiro de 2014.

MILLEN, R. P.; DE FARIA, D. L.; TEMPERINI, M. L. A. Modelos para dispersão Raman em polímeros conjugados. **Quim.Nova**, v. 28, n. 2, p. 289-295, 2005.

MUÑIZ, G. I. B. *et al*; Background and state of the art of near infrared spectroscopy in the forest sector base. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 4, p. 865-875, dez. 2012.

NASCIMENTO, E. C. L. **Um fotômetro microcontrolado LED-NIR, portátil e de baixo custo para análise screening de gasolinas tipo C**. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

NERY, C. G. C. *et al*; Teste de dissolução para avaliação de liberação de glibenclamida em comprimidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 3, jul./set., 2007.

OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H. C.; INON, F. A.; MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 73 (2004) 189– 197

OTTO, M.; Chemometrics – Statistics and Computer application in **Analytical Chemistry**. Weinheim:, Wiley, 1999.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 198-219, 2003.

PIZARRO, C.; ESTEBAN-DÍEZ, I.; NISTAL, A. J.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Influence of data pre-processing on the quantitative determination of the ash content and lipids in roasted coffee by near infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, 509: 217, 2004.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. The Raman Effect. **Nature** 1928, 121, 501.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. et. al. **Farmacologia**. 5 ed. São Paulo: Editora Elsevier, 2004.

RITCHIE, G. E.; A comparison between validating laboratory and process Near-Infrared spectrophotometers. **Molecular Spectroscopyworkbench** 18 (10) out. 2003

ROCHA, W. F. C. *et al*; Determination and Validation of Nimesulide in Pharmaceutical Formulation by Near Infrared Spectroscopy, **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 21, No. 10. 1929-1936, 2010

SANTOS, F. H.; Espectrofotometria Raman uma contribuição da física nas perícias forenses. **Arte e Ciência**, 2009.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, 36: 1627, 1964.

SENA, M. M. *et al*; Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**. v. 30, n. 1, p. 75-79, 2007.

SHARADER, B. *et al*; **Infrared and raman spectroscopy** : methods and applications / VCH VerlagsgesellschaftmbH, D-69451 Weinheim (Federal Republic of Germany), 1995

SIMÕES, S.S. **Desenvolvimento de métodos validados para a determinação de captopril usando espectrofotometria NIR e calibração multivariada**. Tese (Doutorado em Ciências) Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NEIMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

SOUZA , A. M., *et al*; Experimento Didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial. Parte II. **Química Nova** Vol. 36. No 7, 1057-1065, 2013

SUCHARA, E. A. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluidos biológicos e amostras ambientais por cromatografia líquida e gasosa**. Tese (Doutorado em Química) Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA - **USP, 36** ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2013.

THERMO SCIENTIFIC (formerly Ahura Scientific), White Paper: *Technology Comparison: FTIR, NIR, And Raman For Raw Material Inspection*. 2007. Disponível em: <<http://www.pharmaceuticalonline.com/doc.mvc/FTIR-NIR-Raman-For-Raw-Material-Inspection-0002>> Acesso em: 07 de maio de 2012.

TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Química analítica de processos. **Química Nova**. v. 29, n. 5, p. 1065 - 1071, 2006.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**. v. 32, n. 5, 1278-1287, 2009.

VANKEIRSBILCK, T; *et al.* **Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis**. Elsevier Science B.V., 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993602012086> Acesso em: 25 de maio de 2012.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near-infrared technology**. 2nd ed. Saint Paul: American Association of Cereal Chemistry, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is diabetes? Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acessado em jun. 2013.