



GUILHERME POST SABIN

**ESTRATÉGIAS QUIMIOMÉTRICAS APLICADAS AO ESTUDO DE IMAGENS
QUÍMICAS: NOVAS POSSIBILIDADES PARA CARACTERIZAÇÃO DE
PRODUTOS E PROCESSOS FARMACÊUTICOS**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GUILHERME POST SABIN

**ESTRATÉGIAS QUIMIOMÉTRICAS APLICADAS AO ESTUDO DE IMAGENS
QUÍMICAS: NOVAS POSSIBILIDADES PARA CARACTERIZAÇÃO DE
PRODUTOS E PROCESSOS FARMACÊUTICOS**

ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI JESUS POPPI

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

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR GUILHERME POST SABIN, E ORIENTADA PELO PROF.DR. RONEI JESUS POPPI.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Sabin, Guilherme Post (1977-).
Sa13e Estratégias quimiométricas aplicadas ao estudo de
imagens químicas: novas possibilidades para
caracterização de produtos e processos farmacêuticos /
Guilherme Post Sabin. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.

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

1. Imagem química. 2. Quimiometria.
3. Infravermelho próximo. I. Poppi, Ronei Jesus.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Chemometric strategies applied to the study of chemical imaging: new possibilities for the characterization of pharmaceutical products and processes

Palavras-chave em inglês:

Chemical imaging

Chemometrics

Near infrared

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Ronei Jesus Poppi [Orientador]

Marco Flôres Ferrão

Edson Irineu Müller

Fabio Augusto

Celio Pasquini

Data de defesa: 11/03/2013

Programa de pós-graduação: Química

Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu irmão
pelo exemplo de vida e luta,

Aos meus avós
pelo incentivo e torcida,

À minha esposa e minha filha
que sempre estiveram ao meu lado
tornando a minha vida cada dia melhor
por todos os lugares onde estivemos juntos.

O meu amor e dedicação a vocês! ☺

“Honestidade, lealdade, integridade, respeito, dedicação, paixão, idealismo, altruísmo, amizade... são alguns sentimentos e valores que aprendi com pessoas especiais, com quem tive a sorte de conviver.”

“O verdadeiro homem é aquele que tem um ideal e é fiel a ele até o fim”

In memoriam

Ernani Maydana Sabin

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao **Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi**, por sua orientação e amizade. Obrigado pelos ensinamentos e por todas as oportunidades que você me proporcionou ao longo desta tese. Hoje, tenho novas perspectivas, oportunidades e liberdade de escolha profissional!

Agradeço aos **professores do Instituto de Química da Unicamp**, com quem tive a oportunidade de aprender. Em especial aos professores que participaram das minhas bancas de qualificações e da minha defesa: **Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder, Dr. Célio Pasquini, Dr. Fábio Augusto, Dra. Susanne Rath, Dra. Adriana Vitorino Rossi, Dr. Marco Florês Ferrão e Dr. Edson Irineu Müller.**

Em especial, agradeço ao **Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão**, que teve a “visão” de colocar a quimiometria na grade curricular da UNISC quando a disciplina ainda era desconhecida pela grande maioria das universidades. Você fez a diferença!

Aos **colegas do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica**, que contribuíram para dias agradáveis de convívio, parecerias e troca de experiências. Não citarei nomes, pois não quero ser traído pelo esquecimento!

Ao **Instituto de Química** pela estrutura e auxílios na série de eventos nacionais e internacionais que tive a oportunidade de participar.

Aos **funcionários da Coordenação de Pós-Graduação**, pelo pronto atendimento e profissionalismo.

Aos **órgãos de fomento à pesquisa: Capes, CNPq, Fapesp, INCT Bioanalítica e Conicet**, que proveram bolsas de estudo e recursos para pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Alejandro César Olivieri**, pela recepção e orientação nos trabalhos desenvolvidos na Argentina. Aos **colegas da Universidad Nacional de Rosario**, pela receptividade e parcerias científicas.

Aos **profissionais da PerkinElmer**, pelas parcerias e colaborações. Agradeço aos convites e oportunidades de palestrar em workshops e encontros de usuários. Obrigado também pela oportunidade e auxílio para realização do treinamento na Inglaterra.

À **Embu Científica / Acatec**, pela oportunidade de atuar como consultor em quimiometria aplicada, através de regime de dedicação parcial. Obrigado **Sr. Affonso Aquino** e **Felipe Aquino** pela oportunidade de conhecer os maiores centros de pesquisa do nosso país através deste trabalho. Obrigado também pelo suporte em treinamentos na Umetrics, Estados Unidos. Vocês são exemplos de visão e empreendedorismo no desenvolvimento tecnológico do nosso país!

Ao **Centro de Pós-Graduação das Faculdades Oswaldo Cruz**, pela oportunidade de lecionar a disciplina de Quimiometria no Curso de Análise Instrumental Avançada.

À **Souza Cruz S.A.**, pela flexibilidade e incentivo para a elaboração da etapa final do meu doutorado. Meus sinceros agradecimentos ao **José Roberto Pereira da Silva** e ao **Marcos Vinicius Gama Pereira** pela oportunidade de atuar na fronteira do conhecimento analítico provendo recursos e apoio para a realização do meu trabalho e finalização desta tese. Obrigado aos colegas **Lothar Bergter**, **Waldenir Farias Braga**, **Nadir Hermes**, **Fernando Henrique Rosa** pelo incentivo na conclusão desta tese. Muito obrigado à **equipe do Laboratório de Química Aplicada: Fernando Fontanive, Priscila Possamai, Liane Bokowski e Ângela Jandrey**. Valeu a torcida!

A **TODA MINHA FAMÍLIA** que sempre foi a base da minha vida e fonte de inspiração. A ela, ofereço o meu esforço, minha dedicação e meu sucesso!

À minha avó, **Sueli Lia Post**, pela dedicação, motivação, contribuição e, sobretudo, pela grande torcida. Ao meu avô, **Frederico Post**, que não pode esperar a minha defesa e partiu semanas antes de saber da minha volta ao Rio Grande do Sul. Um dia, quem sabe, terei muitas novidades para te contar!!!

Ao meu irmão, **Gustavo Post Sabin**, por tudo que representou na minha vida, sendo sempre um exemplo de dedicação, competência e luta na busca pelos seus ideais. Valeu professor!

Agradeço à minha mãe, **Juçara Post Sabin**, pelo carinho, atenção e dedicação. Obrigado pela sua ajuda, e pelo papel de mãe e pai que você assumiu. A minha vitória é tua também, te amo!

Ao meu pai, **Ernani Maydana Sabin**, que foi um exemplo de idealismo, caráter, competência e dedicação. Pelo seu amor à vida e à família e por todos os seus ensinamentos. A sua luta não foi em vão!

À minha filha, **Renata Rodrigues da Rosa**, por toda sua preocupação, por seu carinho nos momentos difíceis, pela sua compreensão e sacrifício nas minhas escolhas e por compreender que às vezes precisamos ter paciência para obter sucesso. Obrigado, te amo!

À minha esposa, **Janice Magalhães Rodrigues**, que sempre acreditou em mim e lutou ao meu lado, me dando força e incentivo para seguir em frente. A todas as dificuldades e expectativas que pude compartilhar contigo e principalmente pelo teu amor, parceria e compreensão. Você sempre foi a mulher perfeita em todos os momentos. Eu não conseguiria nada sem a tua ajuda, te amo!

SÚMULA CURRICULAR

1- Dados pessoais

Estado Civil: União Estável;

Nacionalidade: Brasileiro;

Data de nascimento: 19/04/1977;

E-mail: gpsabin@gmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9584193081809850>

2- Formação Acadêmica

Doutorado em Ciências / Química Analítica

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas. 3/2009 – 3/2013.

Tese: Estratégias quimiométricas aplicadas ao estudo de imagens químicas: novas possibilidades para caracterização de produtos e processos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi.

Bolsista: CAPES.

Estágio sanduíche: Universidad Nacional de Rosario - Argentina.

Supervisor: Prof. Dr. Alejandro César Olivieri.

Histórico: Quimiometria em Química Analítica: (A); Fundamentos de Química Analítica: (B).

Mestrado em Química / Química Analítica

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria. 8/2004 - 9/2007.

Dissertação: Desenvolvimento e validação de método utilizando SPE e GC-MS para a determinação multirresíduo de pesticidas em água potável.

Orientadores: Prof. Dr. Renato Zanella e Profa. Dra. Martha Bohrer Adaime

Histórico: Métodos Instrumentais em Química Analítica: (A); Química Analítica Avançada: (A-); Análise de Resíduos de Pesticidas: (A); Cromatografia Aplicada: (A-); Seminários em Química: (B+).

Química Industrial / Físico-Química

UNISC - Universidade de Santa Cruz do Sul. 3/1995; 03/1997 - 12/2001.

Monografia: “Determinação de parâmetros físico-químicos de fenóis e ácidos salicílicos p-substituídos e 2-(2’hidroxifenil)benzoxazolas 5’-substituídas, para estudo de correlação quantitativa estrutura-atividade.”

Orientadores: Prof. Dr. Valeriano Antônio Corbellini e Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão.

Média final das disciplinas: 9,0.

Bolsas de iniciação científica:

PIBIC/CNPq e PUIC - Produtos Naturais (2,5 anos).

PUIC - Biotransformação (1 ano).

3- Experiência Profissional

Philip Morris Brasil Indústria e Comércio Ltda. 2002 - 2009.

Técnico de Auditoria da Qualidade Sênior

Principais atividades: Atuei como signatário do Laboratório Central de Auditoria da Qualidade da Philip Morris Brasil e respondi tecnicamente à ISO 17025. Principais responsabilidades: sistema da qualidade, supervisão de resultados, validação de métodos físicos e químicos, organização de ensaios interlaboratoriais para América Latina, desenvolvimento de métodos para estudos especiais e projetos globais da Philip Morris Internacional (PMI), capacitação de pessoal e suporte analítico. Outras atividades: comitê de produtos químicos, assuntos regulatórios (ANVISA), tradução de métodos da PMI, comissão da ABNT para traduções de normas técnicas.

Centro de Pós-Graduação das Faculdades Oswaldo Cruz. 2011.

Professor

Lecionei a disciplina de Quimiometria em nível de pós-graduação do curso de Análise Instrumental Avançada. Conteúdos desenvolvidos: análise exploratória, métodos de classificação, calibração multivariada e tópicos especiais (seleção de

variáveis, análise de imagens, resolução de curvas, etc.). Orientei a aluna Lerys Fernanda G. Freitas no seu trabalho de conclusão de pós-graduação.

Embu Científica. 2011 - 2012.

Consultor em Quimiometria

Trabalhei como consultor para projetos da Umetrics no Brasil. A Umetrics foi fundada pelo cientista sueco Svante Wold, criador do termo “*chemometrics*”, e é líder mundial de mercado na área de quimiometria. Principais atividades: promover reuniões técnicas com o intuito de informar e/ou estudar a viabilidade de projetos com a Umetrics. As atividades foram realizadas em grandes centros de pesquisas como: LNLS, CTBE, CTI, CTC, USP, UNICAMP, UFRGS, UFPE, entre outros. Principais temas: planejamento experimental, otimização de processos e análise multivariada de dados. Os trabalhos foram direcionados para desenvolvimento de processos industriais no mercado nacional e pesquisa aplicada.

Especialista em Pesquisa Analítica II

Souza Cruz S.A. 2012 - atual.

Principais atividades: Coordenação do Laboratório de Química Aplicada para desenvolvimento de novas estratégias analíticas e quimiométricas ao Global Leaf Research da British American Tobacco – BAT. Suporte científico à Área de Serviços Analíticos do Product Centre Americas da Souza Cruz. Interações com grandes centros de excelência como, Max Plank Institute.

4- Produção bibliográfica (2009 – 2013)

Artigos publicados em periódicos

1. GP Sabin, OD Prestes, MB Adaime, R Zanella. **Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction.** J Braz Chem Soc 20 (5) 918-925, 2009.

2. GP Sabin, OD Prestes, ML Martins, MB Adaime, R Zanella. **Analytical response enhancement through the optimization of the splitless injection system in gas chromatography by employing the ideal gas law.** Quim Nova 34 (3) 414-418, 2011.
3. WFC Rocha, GP Sabin, PH Março, RJ Poppi. **Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics.** Chemometr Intell Lab Syst 106 (2) 198-204, 2011.
4. GP Sabin, MC Breitreitz, AM de Souza, P da Fonseca, L Calefe, M Moffa, RJ Poppi. **Analysis of pharmaceutical pellets: An approach using near-infrared chemical imaging.** Anal Chim Acta 706 (1), 113-119, 2011.
5. GP Sabin, WF de Carvalho Rocha, RJ Poppi. **Study of the similarity between distribution maps of concentration in near-infrared spectroscopy chemical imaging obtained by different multivariate calibration approaches.** Microchem J 99 (2), 542-547, 2011.
6. GP Sabin, AM de Souza, MC Breitreitz, RJ Poppi. **Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de spikes em espectroscopia Raman de imagem.** Quim Nova 35 (3), 612-615, 2012.
7. RS Ortiz, KC Mariotti, NV Schwab, GP Sabin, WFC Rocha, EVR de Castro, RP Limberger, P Mayorga, MI Bueno, W Romão. **Fingerprinting of Sildenafil Citrate and Tadalafil Tablets in Pharmaceutical Formulations via X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF).** J Pharm Biomed Anal, 58 (1), 7-11, 2012.
8. MC Breitreitz, GP Sabin, G Polla, RJ Poppi. **Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of Atorvastatin calcium by Raman Image Spectroscopy and Chemometrics.** J Pharm Biomed Anal, 73 (1), 3-12, 2013.
9. LW Hantao, HG Aleme, MP Pedroso, GP Sabin, RJ Poppi, F Augusto. **Multivariate curve resolution combined with gas chromatography to enhance analytical separation in complex samples: A review.** Anal Chim Acta, 731 (6), 11-23, 2012.

10. LF Marcellos, AF Faria, MVN de Souza, MR Almeida, GP Sabin, RJ Poppi, MAL de Oliveira. **Simultaneous analysis of first-line anti-tuberculosis drugs in tablets by UV spectrophotometry compared to capillary zone electrophoresis.** Cent Eur J Chem, 10, 1808-1816, 2012.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

- 1 WFC ROCHA, GP SABIN, PH MARÇO, RJ POPPI. **Quantitative analysis of Piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics.** Congrès Chimométrie, 2009, Paris. Trabalho premiado: "Best Poster Award",
- 2 GP SABIN, WFC ROCHA, RJ POPPI. **Calculation of the similarity between images using fast NIR-CI and chemometrics: application to carbamazepine drug.** In: VII Colloquium Chemiometrium Mediterraneum, poster presentation, 2010, Granada.

Resumos publicados em anais de congressos

1. GP SABIN, RJ POPPI. **Image spectroscopy in near infrared region and chemometrics: a powerfull tool for carbamazepine tablets analysis**, 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, sessão de pôster, 2009, Ribeirão Preto.
2. GP SABIN, RJ POPPI. **Espectroscopia de Imagem e calibração multivariada de dados hiperespectrais para mapeamento de fármacos**, 15º Encontro Nacional de Química Analítica, sessão de pôster, 2009, Salvador.
3. GP SABIN, RJ POPPI. **Resolução multivariada de curvas: aplicação em espectroscopia de imagens hiperespectrais**, 15º Encontro Nacional de Química Analítica, sessão pôster, 2009, Salvador.
4. GP SABIN, MC BREITKREITZ, AM SOUZA, RJ POPPI. **Analysis of pharmaceutical pellets: an approach using near-infrared chemical**

- imaging**. In: 12th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2010, Antwerp.
5. GP SABIN, VA LOZANO, WFC ROCHA, W ROMÃO, RJ POPPI. **Study of the distribution profile of sildenafil citrate in different pharmaceutical formulations using image spectroscopy and chemometrics: a characterization approach**. In: 12th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2010, Antwerp.
 6. GP SABIN, LAF GODOY, PH MARÇO; F AUGUSTO, RJ POPPI. **An alternative algorithm for alignment of two-dimensional comprehensive gas chromatography**. In: 12th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2010, Antwerp.
 7. WFC ROCHA, GP SABIN, RJ POPPI. **Image spectroscopy in near-infrared region and chemometrics methods for validation of models of multivariate calibration for the study of polymorphism in pharmaceutical formulation**. In: 12th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2010, Antwerp.
 8. GP SABIN; RJ POPPI. **Método rápido para obtenção do mapa de distribuição de princípio ativo em medicamento utilizando espectroscopia de imagem e CLS**, sessão de pôster, 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.
 9. WFC ROCHA, GP SABIN, RJ POPPI. **Microespectroscopia no infravermelho próximo: uma poderosa ferramenta para análise de polimórficos na indústria farmacêutica**, sessão de pôster, 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.
 10. M BAPTISTÃO, GP SABIN; RJ POPPI. **Utilização de histogramas de imagens espectroscópicas no estudo de homogeneização de comprimidos de carbamazepina**, sessão de pôster, 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
 11. GP SABIN; PH MARÇO, F AUGUSTO, RJ POPPI. **Desenvolvimento de um algoritmo para correção de dados instrumentais: aplicação em**

- alinhamento de cromatogramas**, sessão de pôster, 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
12. GP SABIN; AM SOUZA; BREITKREITZ, M. C.; RJ POPPI. **Desenvolvimento de um algoritmo para identificação e correção de spikes em espectroscopia Raman de Imagem**, sessão de pôster, 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
13. MC BREITKREITZ, AM SOUZA, GP SABIN; RJ POPPI. **Espectroscopia Raman de Imagem para avaliação de homogeneidade em formulações de Gelucire® 44/14 e Vitamina E**, sessão de pôster, 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
14. AM SOUZA; MC BREITKREITZ, GP SABIN, P FONSECA, L CALEFE, M MOFFA, RJ POPPI. **Espectroscopia Raman de imagem e Mínimos Quadrados Clássicos (CLS) para caracterização de pellets de diclofenaco de sódio**, sessão de pôster, 34a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.
15. LF MARCELLOS, AF FARIA, MVN SOUZA, MR ALMEIDA, GP SABIN, RJ POPPI, MAL OLIVEIRA. **Simultaneous analysis of 4-FDC anti-tuberculosis drugs in tablets by UV spectrophotometry using chemometric approaching**, 13th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2012, Budapest.
16. GP SABIN, RJ POPPI, AC OLIVIERI. **Application of ant colony optimization for selection of variables in second order data**, 13th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2012, Budapest.
17. JC HASHOMOTO, GP SABIN, CA BALLUS, JA LIMA-PALLONE, P EFRAIM, RJ POPPI. **Feasibility of the determination of cocoa solids content in chocolate by near-infrared spectroscopy**, 13th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, poster presentation, 2012, Budapest.

Softwares sem registro ou patente

- 1 GP SABIN. **Algoritmo para alinhamento de matriz: aplicação à cromatograma bidimensional.** Linguagem Matlab, 2010.
- 2 GP SABIN. **Algoritmo para correção de *spikes* em espectroscopia Raman de Imagem.** Linguagem Matlab, 2011.
- 3 GP SABIN. **Algoritmo para alinhamento de matriz: aplicação à superfície bidimensional tempo de retenção x massa/carga.** Linguagem Matlab, 2013.

Sessões coordenadas, seminários, palestras ou workshops

- 1 GP SABIN, RJ POPPI. **Espectroscopia de Imagem e calibração multivariada de dados hiperespectrais para mapeamento de fármacos,** 15º Encontro Nacional de Química Analítica, sessão coordenada, 2009, Salvador.
- 2 GP SABIN. **Aplicações da Espectroscopia de imagem na região do NIR no controle de qualidade de fármacos,** I Encontro de IR, 2010, PerkinElmer, São Paulo.
- 3 GP SABIN. **Aplicações da Espectroscopia de Imagem na região do NIR, Workshop PerkinElmer sobre NIR aplicado ao Agronegócio,** 2010, Embrapa, São Carlos.
- 4 GP SABIN. **Espectroscopia de imagem na região do NIR - princípios e aplicações,** 2010, TP 293 - Análise de Alimentos por Espectrometria, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Unicamp, Campinas.
- 5 GP SABIN, RJ POPPI. **Método rápido para obtenção do mapa de distribuição de princípio ativo em medicamento utilizando espectroscopia de imagem e CLS,** sessão coordenada, 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia.

Destaques e prêmios recebidos

2012 - **Maior produtividade científica no Product Centre Americas / Souza Cruz S.A. / British American Tobacco.** Categoria: Profissionais. Menção Honrosa. Souza Cruz S.A.

2009 - **Best Poster Award.** Congrès Chimimétrie 2009 (Paris). Prêmio de 300 euros da CCCTA e uma licença do software "The Unscrambler" da CAMO.

2003 - **Destaque em Ciência e Tecnologia.** Câmara Municipal de Vereadores de Santa Cruz do Sul. Placa e Menção Honrosa.

2001 - **Exames Nacional de Cursos** – 1º Lugar da Instituição, conceito A.

2001 - **XIV Jornada Brasileira de Iniciação Científica em Química** – 1º Lugar, Associação Brasileira de Química – ABQ. "Uso da análise exploratória (PCA/PLS) de dados dos solos da Bacia do Arroio João Dias, Minas do Camaquã, RS, visando a prospecção de cobre".

2001 - **Prêmio Talento Universitário** – 2º Lugar. Menção Honrosa e 2.500 reais. "Biotransformação da (S)-(+)-Carvona por *Aspergillus niger*: Aplicação da Biotecnologia a Agroindústria Óleo Química.

RESUMO

Estratégias quimiométricas aplicadas ao estudo de imagens químicas: novas possibilidades para caracterização de produtos e processos farmacêuticos.

A indústria farmacêutica está em constante busca por novas tecnologias analíticas capazes de fornecer informações relevantes sobre produtos e processos industriais. Esta tese sugere novas possibilidades no estudo de medicamentos através de imagens químicas obtidas por microespectroscopia na região do infravermelho próximo e as seguintes ferramentas quimiométricas: MLR, CLS, MCR e PLS. Os trabalhos estão divididos em quatro tópicos e contribuem para o avanço analítico neste campo de conhecimento. Na primeira aplicação, foi realizado um estudo da similaridade entre imagens obtidas por técnicas quimiométricas distintas. O trabalho mostra como estimar limites de confiabilidade para a concentração por pixel de imagem. Assim, foi possível diminuir o tempo de aquisição de imagens mantendo a confiabilidade analítica no estudo de comprimidos de carbamazepina. O segundo estudo mostra uma aplicação onde a vantagem de segunda ordem foi requerida. Este estudo traz uma abordagem nova sobre o reconhecimento de padrões de imagem na caracterização de produtos farmacêuticos. Na terceira aplicação, o objetivo foi acompanhar o desenvolvimento industrial de um produto farmacêutico com baixo teor de ativo, auxiliando no processo de decisão em termos de micro-homogeneidade da formulação. O estudo mostrou que a concentração local pode ser explorada como vantagem analítica. Na quarta aplicação, foi abordado pela primeira vez na literatura, o estudo da estrutura de *pellets* farmacêuticos através de informações químicas obtidas por espectroscopia de imagem química na região do infravermelho próximo. Este trabalho abre alternativas para o estudo de medicamentos de entrega controlada.

ABSTRACT

Chemometric strategies applied to the study of chemical imaging: new possibilities for the characterization of pharmaceutical products and processes.

The pharmaceutical industry is constantly searching for new analytical technologies capable of providing relevant information about products and industrial processes. This thesis suggests new possibilities in the study of drugs by using chemical images obtained by microspectroscopy in the near infrared region and the following chemometric tools: MLR, CLS, MCR e PLS. The work is divided into four topics and it contributes to the advancement in the field of analytical knowledge. In the first application, a study was performed about the similarity between images obtained by different chemometric techniques. The work demonstrates how to estimate concentration reliability limits per image pixel. Thus, it was possible to shorten the time of image acquisition while maintaining analytical reliability in the study of carbamazepine tablets. The second study presents an application where the advantage of the second order was required. This study presents a new approach to the recognition of image patterns in the characterization of pharmaceuticals. In the third application, the aim was to follow the industrial development of a pharmaceutical product with a low active content, assisting in the decision about the process in terms of micro-homogeneity of the formulation. The study showed that the local concentration can be exploited for analytical advantage. In the fourth application, addressed in a publication for the first time, is the study of the structure of pharmaceutical pellets through chemical information obtained by near infrared chemical imaging. This work opens up alternatives for the study of controlled delivery drugs.

ÍNDICE

LISTAS DE ABREVIATURAS	xxxi
LISTA DE FIGURAS	xxxiii
LISTA DE TABELAS	xxxvii
PREFÁCIO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA DE IMAGENS QUÍMICAS POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA	5
1.1 Aplicações analíticas de imagens hiperespectrais	7
1.2 Espectroscopia vibracional	9
1.3 Espectroscopia de imagem	10
1.4 Novas oportunidades em análise de medicamentos	11
1.5 Ferramentas quimiométricas	13
1.6 Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA SIMILARIDADE ENTRE MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO DE CONCENTRAÇÕES OBTIDOS POR NIR-CI: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS QUIMIOMÉTRICAS EM COMPRIMIDOS DE CARBAMAZEPINA.	21
2.1 Introdução	23
2.2 Parte experimental	25
2.3 Resultados e discussões	30
2.4 Conclusões	36
2.5 Referências Bibliográficas	37
CAPÍTULO 3 - ESTUDO DO PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DO CITRATO DE SILDENAFILA EM DIFERENTES FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM E QUIMIOMETRIA: UMA ABORDAGEM SOBRE A CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS.	39
3.1 Introdução	41
3.2 Parte experimental	45

3.3 Resultados e discussões	46
3.4 Conclusões	54
3.5 Referências Bibliográficas	55
CAPÍTULO 4 - ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM QUÍMICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA: ESTUDO DA MICRO-HOMOGENEIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS COM BAIXO TEOR DE INGREDIENTE ATIVO.	59
4.1 Introdução	61
4.2 Parte experimental	65
4.3 Resultados e discussões	67
4.4 Conclusões	72
4.5 Referências Bibliográficas	72
CAPÍTULO 5 - ANÁLISES DE <i>PELLETS</i> FARMACÊUTICOS: UMA ABORDAGEM UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM QUÍMICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.	75
5.1 Introdução	77
5.2 Parte experimental	82
5.3 Resultados e discussões	84
5.4 Conclusões	92
5.5 Referências Bibliográficas	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS - Alternating Least Squares
ATR - Attenuated Total Reflectance
CLS - Classical Least Squares
FDA - U. S. Food and Drug Administration
FIR - Far Infrared
FT - Fourier Transform
GA - Genetic Algorithm
GMPc - cyclic Guanosine MonoPhosphate
HCA - Hierarchical Cluster Analysis
HPLC - High-performance liquid chromatography
MCR - Multivariate Curve Resolution
MCT - Mercury Cadmium Telluride
MIR - Mid Infrared
MLR - Multiple linear regression
MSC - Multiplicative Scatter Correction
NASA - National Aeronautics and Space Administration
NIPALS - Non-linear Iterative Partial Least Squares
NIR - Near Infrared
NIR-CI - Near Infrared Chemical Imaging
NIRS - Near Infrared Spectroscopy
PASG - Pharmaceutical Analytical Sciences Group
PAT - Process analytical technology
PCA - Principal Component Analysis
PED5 - PhosphodiEsterase type 5
pH - potencial Hidrogeniônico
PLS - Partial Least Squares
PLS-DA - Partial Least Squares- Discriminant Analysis
QbD - Quality by Design
RMSEP - Root Mean Square Error of Prediction

ROI - Region of Interest

SEM - Scanning Electron Microscopy

SNV - Standard Normal Variate

USP - United States Pharmacopeia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aplicações analíticas de imagens hiperespectrais.	8
Figura 2	Representação de imagem hiperespectral	10
Figura 3	Estratégia analítica na obtenção de imagens químicas.	29
Figura 4	Espectros puros dos compostos da formulação. As linhas tracejadas na vertical correspondem aos números de ondas selecionados por GA para MLR.	30
Figura 5	Mapas de distribuição de concentrações de carbamazepina por diferentes algoritmos. A) 61% (m/m); B) 1% (m/m); e C) 1% (m/m) com limite de sensibilidade de 20%.	32
Figura 6	Mapas de distribuição de concentrações de celulose microcristalina e seus respectivos histogramas. A) imagens de celulose com 17% (m/m); B) histogramas de frequência de concentrações.	33
Figura 7	Relação entre o número de varreduras e a variabilidade da imagem por MLR.	34
Figura 8	Mapas de distribuição para todos os compostos.	35
Figura 9	Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura dos compostos puros.	36
Figura 10	Estratégia de obtenção de imagens químicas do citrato de sildenafil por MCR-ALS.	46
Figura 11	Sobreposição dos espectros pré-processados de citrato de sildenafil: padrão (pontilhado) e otimizado por MCR-ALS (linha sólida). Formulações dos produtos de A até F.	48
Figura 12	Mapas de distribuição de concentrações de citrato de sildenafil obtidos por MCR-ALS. Produtos de A até F em replicatas.	50

Figura 13	Histogramas do perfil de distribuição de citrato de sildenafila. Produtos de A até F em replicatas.	51
Figura 14	Histogramas de distribuição de frequência de pixels por faixas de concentração normalizada. Produtos de A até F em replicatas.	53
Figura 15	Imagem química pela abordagem CLS. A, B e C representam os componentes químicos da amostra. As cores representam informações químicas resolvidas.	66
Figura 16	Imagem em % de reflectância média por pixel.	67
Figura 17	Sequência de pré-processamentos. A) espectros brutos; B) espectros da região de interesse; C) espectros em absorbância e suavizados; D) espectros normalizados (SNV).	68
Figura 18	Sobreposição dos espectros puros de compostos presentes no comprimido.	69
Figura 19	Mapas de distribuição de concentrações dos compostos presentes na amostra.	70
Figura 20	Imagens químicas de carbegolina em diferentes processos de homogeneização. Processos nas linhas e replicatas nas colunas.	71
Figura 21	Abordagem por CLS para análise de <i>pellets</i> .	84
Figura 22	Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Imagem do corte transversal de um <i>pellet</i> farmacêutico; e B) Aumento da imagem para observação das camadas.	86
Figura 23	Pré-processamento dos dados espectrais. A) espectros brutos; B) seleção da região de interesse (ROI); C) logaritmo inverso dos valores de reflectância; D) Normalização por SNV.	87
Figura 24	Espectros NIR dos componentes puros.	88

- Figura 25 Imagens químicas do *pellet*. (A) copolímero metacrilato (camada externa): (B) de polivinilpirrolidona (camada interna), (C) soma das duas camadas, D) croscarmelose de sódio; (E) diclofenaco de sódio, (F) carboximetilcelulose, (G) manitol, (H) polietilenoglicol 4000, (I) soma dos compostos do núcleo. 89
- Figura 26 Histogramas das imagens químicas. (A) copolímero metacrilato (camada externa): (B) de polivinilpirrolidona (camada interna), (C) soma das duas camadas, D) croscarmelose de sódio; (E) diclofenaco de sódio, (F) carboximetilcelulose, (G) manitol, (H) polietilenoglicol 4000, (I) soma dos compostos do núcleo. 90
- Figura 27 Avaliação das previsões do CLS. A) concentrações totais da imagem; B) histograma das concentrações totais da imagem. 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de RMSEP em % (m/m)	31
----------	-----------------------------	----

PREFÁCIO

Nesta tese de doutorado, serão apresentados quatro estudos empregando espectroscopia na região do infravermelho próximo e abordagens quimiométricas para obtenção e análise de imagens químicas. No capítulo 1 está apresentada uma introdução sobre a espectroscopia no infravermelho próximo e dos métodos quimiométricos utilizados.

Os temas foram escolhidos de forma a contribuir para avanços em estudos de imagens químicas, mostrando novas possibilidades em abordagens quimiométricas, reconhecimento de padrões em imagens, diagnósticos para desenvolvimento de processos, além de uma aplicação inédita para o estudo de *pellets* projetados para liberação controlada de ingrediente ativo.

Na primeira aplicação foi realizado um estudo de similaridade entre mapas de distribuição de concentrações obtidos por técnicas quimiométricas distintas, com a finalidade de assegurar imagens confiáveis. Para tal, foi proposta uma metodologia para estimar o limite prático de confiança para a concentração de compostos prevista nos pixels. Com isso, foi possível diminuir significativamente o tempo de aquisição de imagens, mantendo a confiabilidade. Através das imagens obtidas, a distribuição de compostos presentes na superfície de comprimidos de carbamazepina foi estudada. Esta aplicação está descrita no capítulo 2 desta tese.

O segundo estudo mostra uma aplicação onde a vantagem de segunda ordem foi requerida. A escolha da ferramenta quimiométrica foi realizada com base nas informações incompletas sobre a composição da amostra, impossibilitando a construção de modelos de regressão de primeira ordem. Este estudo traz uma abordagem nova sobre o reconhecimento de padrões de imagens em produtos de origem farmacêutica, o que pode ser útil para a caracterização de produtos ilegais. O capítulo 3 apresenta essa aplicação.

No terceiro trabalho, apresentado no capítulo 4, foram estudados diversos comprimidos de diferentes lotes de medicamento produzidos na indústria

farmacêutica. O objetivo foi acompanhar o desenvolvimento de um produto farmacêutico com baixo teor de ativo, auxiliando no processo de decisão em termos de micro-homogeneidade. Neste estudo foi verificado que a informação local, provinda da heterogeneidade das imagens, pode ser explorada como vantagem analítica para melhorar a detecção de informações em baixas concentrações.

Na quarta aplicação foi realizado o estudo da estrutura de *pellets* farmacêuticos através de informações químicas obtidas por espectroscopia de imagem química na região do infravermelho próximo. Este trabalho abre alternativas para o estudo de micro-homogeneidade ou ainda para avaliação do processo de ganho de camadas em recobrimentos de *pellets*. Esta última aplicação está descrita no capítulo 5 desta tese.

Por fim, são apresentadas as considerações finais envolvendo algumas perspectivas futuras no estudo de imagens químicas e quimiometria.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo desenvolver estratégias quimiométricas para obtenção de informações de imagens a partir de dados espectrais obtidos por microespectroscopia de mapeamento na região do infravermelho próximo. Os estudos foram direcionados para amostras sólidas de medicamentos.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO À ESPECTROSCOPIA DE IMAGENS QUÍMICAS POR INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA

1.1 Aplicações analíticas de imagens hiperespectrais

No início, era somente luz. Então, em 1666, Isaac Newton demonstrou que a luz “natural” poderia ser decomposta num espectro de cores visíveis. Mais tarde, no começo do século XIX, William Herschel, estudando as relações entre temperaturas e cores, sugeriu que estas propriedades não estavam restritas à região do espectro visível. Assim, surgiram os estudos na região do infravermelho próximo. Hoje, a análise multivariada do espectro de luz é a base para obtenção de informações químicas em espectroscopia vibracional de imagem.

As imagens hiperespectrais tiveram sua origem na Administração Nacional do Espaço e da Aeronáutica (NASA) nos Estados Unidos, na década de 1970. Atualmente, as aplicações analíticas de imagens hiperespectrais abrangem várias áreas de interesse e podem registrar informações do macro ao micro espaço amostral. Para citar alguns exemplos, podemos estudar grandes extensões territoriais por imagens de satélites ou de aeronaves [1], controlar a qualidade de alimentos com câmeras adaptadas em produção [2], ou ainda, estudar estruturas muito pequenas por meio de espectrofotômetros acoplados a microscópios [3] com aplicações em áreas farmacêuticas, forenses, de materiais, entre outras.

Em um levantamento bibliográfico realizado na base da *Web of Science*, o histórico de publicações relacionadas às imagens hiperespectrais, cresceu muito ao longo da primeira década do século XXI. Buscando apenas os termos “*hyperspectral imaging*” (ou “*hyperspectral image*”) e “*chemical imaging*” (ou “*chemical image*”) em títulos de artigos científicos, o número de publicações nos últimos três anos da pesquisa (200 artigos) é de aproximadamente quatro vezes superior se comparado ao mesmo período no início da década. A pesquisa mostra ainda, que aproximadamente 20% do total de publicações estão em áreas bem mais recentes no estudo de imagens hiperespectrais, como: a química, a biológica e a farmacêutica, Figura 1.

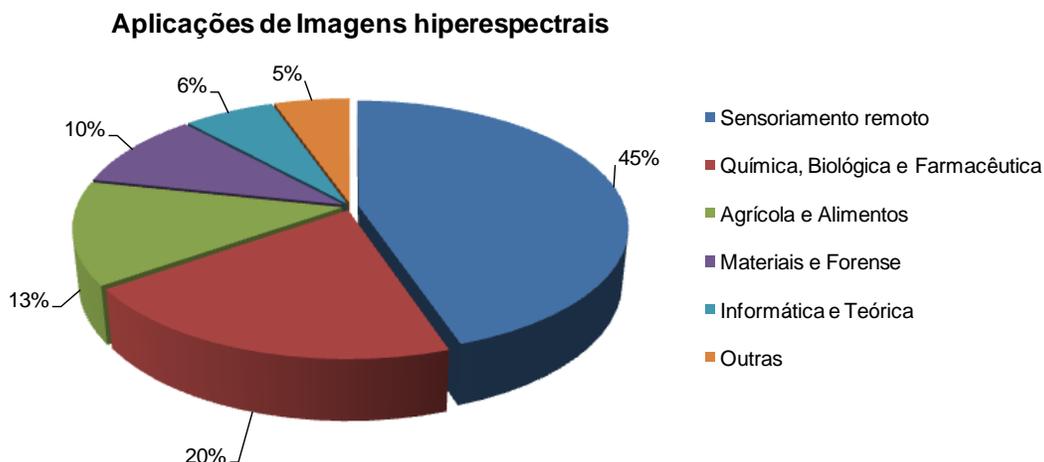


Figura 1 – Aplicações analíticas de imagens hiperespectrais.

Pesquisa realizada na base de dados da Web of Science referente à primeira década deste século.

Dentro das principais áreas de aplicações foram realizadas buscas no banco de dados da *ScienceDirect*. No total, 308 artigos foram classificados quanto às técnicas instrumentais utilizadas. Este levantamento foi feito de forma subjetiva, através da identificação da técnica no resumo ou na metodologia descrita em cada artigo. No sensoriamento remoto [4-6], os equipamentos que operam na região do espectro visível e infravermelho próximo são predominantes. Nos setores de alimentos [7-8] e agrícola [9], as câmeras com arranjo de plano focal também operam nesta região espectral e, em alguns casos, uma fonte de luz ultravioleta auxilia no estudo de compostos fluorescentes. Nas áreas químicas, biológicas e farmacêuticas, as técnicas de microespectroscopia vibracional utilizando as regiões do infravermelho próximo [10], infravermelho médio [11] e espalhamento Raman [12], são as mais utilizadas. Mais recentemente, a técnica vibracional Terahertz [13] de imagem surge de forma promissora, principalmente em análise de fármacos. No campo de estudo envolvendo materiais e ciências forenses, as técnicas analíticas são mais diversificadas, surgindo além das técnicas já mencionadas, a espectrometria de massas [14] e a detecção de raio-X em espectroscopia eletrônica de varredura [14].

1.2 Espectroscopia vibracional

A espectroscopia vibracional [15] abrange a região do espectro eletromagnético compreendida entre 13.000 cm^{-1} e 10 cm^{-1} (correspondendo aos comprimentos de onda $0,76\text{ }\mu\text{m}$ e $1000\text{ }\mu\text{m}$, respectivamente) e, como o próprio nome indica, fornece informações sobre os estados vibracionais de energias das ligações químicas. Esta região do espectro, chamada infravermelho, é subdividida em três regiões: infravermelho distante (FIR, situada entre: $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ou $26\text{-}1000\text{ }\mu\text{m}$), infravermelho médio (MIR, situada entre: $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ou $2,6\text{-}26\text{ }\mu\text{m}$) e infravermelho próximo (NIR, situada entre: $13.000\text{-}4.000\text{ cm}^{-1}$ ou $0,76\text{-}2,6\text{ }\mu\text{m}$), nomeadas assim, em relação à região do visível.

O espectro MIR mostra as absorções de energia nas frequências vibracionais e rotacionais específicas de conjunto de átomos que compõem as moléculas. Neste espectro, as bandas de absorção são numerosas e estreitas caracterizando transições fundamentais nestes níveis de energia e permitindo a identificação de grupos funcionais e moléculas. No entanto, devido à forte absorção, as amostras frequentemente devem ser diluídas para evitar saturação do detector ou devem-se utilizar técnicas como reflexão total atenuada (ATR) tornando o MIR difícil de ser aplicado em muitas situações de análise [15].

Por outro lado, a região do NIR é uma faixa mais estreita que o MIR. Nesta região espectral são registradas bandas de combinação e sobretons de transições provenientes do MIR. Sinais mais largos e sobrepostos dificultam a clara identificação de estruturas químicas e o posicionamento de suas bandas espectrais. Assim, técnicas quimiométricas são necessárias para extrair informações qualitativas e quantitativas das amostras. As análises no NIR podem ser não-destrutivas e, frequentemente, requerem pouco ou nenhum preparo de amostra.

1.3 Espectroscopia de imagem

Na espectroscopia clássica, um espectro reflete a informação da superfície de uma amostra que depende do tamanho da área da amostra atingida pela fonte de energia. No início da década de 1990, sistemas espectroscópicos de imagens químicas tornaram possíveis aquisições de espectros bem localizados e suas posições no espaço, dando origem à chamada espectroscopia de imagem [16]. A localização espacial de espectros identifica espécies químicas na amostra e seu mapa de distribuição de concentrações. Espectroscopia de imagem essencialmente combina espectroscopia molecular e imagem digital [17]. Ela baseia-se na medida de um espectro completo por unidade de superfície da amostra e equivale ao pixel da imagem química desta superfície.

A representação de uma imagem hiperespectral, ou simplesmente imagem espectral, pode ser vista na Figura 2. O cubo espectral é um arranjo tridimensional contendo informação espacial (imagem) nos eixos x e y , e informação espectral (espectro, ou resposta multivariada) no eixo z .

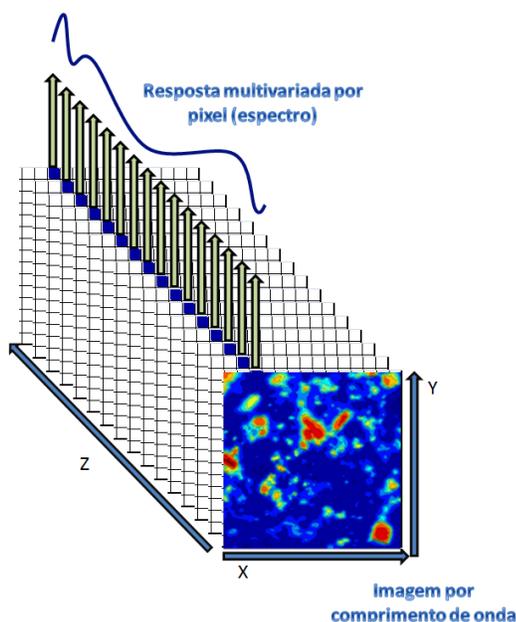


Figura 2 – Representação da imagem hiperespectral.

A técnica de mapeamento mais utilizada até o ano 2000 era o “*point mapping*” [18], que consiste numa espectroscopia clássica com estágio de movimento. Nesta técnica, cada espectro obtido individualmente é reunido para a formação da imagem. Uma evolução deste conceito é a “*line imaging*” [19], que adquire informações espaciais e espectrais simultaneamente, porém ainda necessitando pré-definir posição espacial para a cobertura de toda a área rastreada. Nos últimos doze anos, os detectores ópticos denominados “*focal plane array*” [20], compostos por milhares de elementos formando uma matriz de pixels, tem aumentado sua popularidade devido a possibilidade de fornecerem milhares de espectros (um por pixel) simultaneamente. A principal vantagem é o aumento de eficiência em relação ao tempos de obtenção de imagens. Porém, apresenta desvantagens com relação à focalização de grandes áreas em superfícies irregulares.

1.4 Novas oportunidades em análise de medicamentos

A indústria farmacêutica está em constante busca por novas tecnologias analíticas capazes de caracterizar produtos e aumentar o entendimento sobre processos industriais. Aspectos como a velocidade em que as informações analíticas são adquiridas têm sido cada vez mais valorizados pela indústria, agregando um valor competitivo ao setor. De modo geral, as técnicas espectroscópicas tem despertado grande interesse no setor produtivo, tendo em vista a possibilidade de fornecer informações importantes sobre propriedades de interesse tanto na pesquisa e desenvolvimento de produtos, quanto no monitoramento e diagnósticos de processos. Neste sentido, a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) [21] tem despertado interesse devido a sua versatilidade na obtenção de informações físicas e químicas. Além disso, a NIRS é uma técnica rápida, “limpa” e que fornece informações quantitativas de interesse na área farmacêutica. Devido a estas características, NIRS tem estado em lugar de destaque para programas como tecnologia analítica do processo (PAT), que visa controlar o processo, integrando conhecimentos sobre suas etapas, e conseqüentemente, diminuindo as possibilidades de não conformidades

nos produtos através de conceitos de qualidade por planejamento (Quality by Design - QbD) [22].

Embora a espectroscopia no infravermelho próximo apresente vantagens indiscutíveis para sua aplicação na indústria farmacêutica, algumas desvantagens devem ser mencionadas. Os fenômenos nesta região são de baixa intensidade, limitando a utilização da NIRS para estudos na faixa de porcentagem. Além disso, os espectros obtidos são de difícil interpretabilidade, já que refletem principalmente bandas de combinações e sobretons de informações qualitativamente mais bem interpretáveis na região do infravermelho médio. Por essa razão, a espectroscopia no infravermelho próximo está quase sempre associada a ferramentas quimiométricas capazes de extrair informações, tanto qualitativas quanto quantitativas das propriedades de interesse [23].

Em análise quantitativa tradicional, a homogeneidade da amostra deve ser tal que possibilite uma análise representativa. Assim, as amostras normalmente são gases, soluções homogêneas, ou ainda, amostras sólidas cuidadosamente homogeneizadas. Independente do estado física da mistura, o que se busca neste tipo de abordagem são informações globais sobre a amostra analisada, como por exemplo, a concentração de um analito. No entanto, em amostras heterogêneas existe a possibilidade de se caracterizar uma amostra não apenas por suas propriedades globais, mas também por suas características locais [17].

Na última década, estudos empregando microespectroscopia tem sido realizados através da técnica conhecida como imagem química na região do infravermelho próximo (NIR-CI) [24]. Estes estudos tem apresentado um aumento importante na capacidade de entendimento de diversos aspectos ligados à micro-homogeneidade de produtos farmacêuticos [25].

Nos estudos de cristalização de ingrediente ativo em creme farmacêutico [26], separação de fases em pomadas [26] ou análise de polimorfismo em comprimidos [27] foi possível encontrar uma identificação visual das estruturas obtidas por imagem química. No entanto, muitas vezes a imagem não pode ser

interpretada de forma tão óbvia assim. Em análise de comprimidos, por exemplo, a localização da informação química na superfície de uma amostra é um processo aleatório entre replicatas. Assim, a interpretação das imagens pode ser feita através da análise de histogramas, recuperando o padrão de homogeneidade. Outras possibilidades, como a associações entre compostos da formulação e o padrão de distribuição deixado por um processo, são características que podem ser estudadas.

1.5 Ferramentas quimiométricas

Regressão Linear Múltipla (MLR)

A regressão linear múltipla é utilizada para modelar a relação entre duas ou mais variáveis aleatórias em função de uma ou mais variáveis dependentes (propriedades de interesse) através do ajuste de uma equação linear para os dados observados. Assim, a MLR está baseada em mínimos quadrados [28] de acordo com as equações 1 e 2 a seguir:

$$\mathbf{Y}=\mathbf{X}\mathbf{B}+\mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{B}=(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}^T\mathbf{Y} \quad (2)$$

onde \mathbf{Y} é a matriz de variáveis dependentes, \mathbf{X} é a matriz de variáveis independentes, \mathbf{B} é a matriz de coeficientes de regressão (ou seja, parâmetros do modelo) e \mathbf{E} é a matriz residual (ou erro).

A MLR exige um número de variáveis menor que o número de observações (idealmente 5 observações para cada variável x) e que as variáveis tenham *rank* completo, ou seja, sejam ortogonais. Para que seja possível utilizar MLR para modelar dados instrumentais (muitas variáveis correlacionadas) é necessária uma etapa prévia de seleção de variáveis. Esta seleção pode ser realizada por experiência do químico analítico, ou por métodos adequados como: algoritmo genético, seleção por colônia de formigas, importância da variável na projeção,

razão de seletividade, incerteza de coeficientes, validação cruzada (de variáveis), etc [29-31].

Mínimos Quadrados Clássicos (CLS)

O CLS é um método de quantificação bem conhecido que assume que cada medição é a soma ponderada dos sinais linearmente independentes, de acordo com a seguinte equação [32-34]:

$$\mathbf{X}=\mathbf{CS}^T+\mathbf{E} \quad (3)$$

onde \mathbf{X} é a matriz de resposta (dados instrumentais), \mathbf{C} é a matriz de concentrações e \mathbf{S} é a matriz de espectros puros.

O CLS é uma ferramenta simples e muito robusta desde que todos os espectros puros que constituem a mistura sejam conhecidos. Esta característica torna-se uma abordagem muito importante para a indústria farmacêutica, onde a composição química dos fármacos é, muitas vezes, conhecida completamente. Desta forma, as concentrações \mathbf{C} podem ser facilmente calculadas como segue:

$$\mathbf{C}=\mathbf{XS}^+ \quad (4)$$

onde \mathbf{S}^+ é a pseudo-inversa de \mathbf{S} :

$$\mathbf{S}^+=\mathbf{S}^T(\mathbf{SS}^T)^{-1} \quad (5)$$

Apesar da baixa complexidade matemática para obter a matriz \mathbf{C} , o CLS tem dois inconvenientes importantes: a) o sinal pode ser afetado por variações não-sistemáticas que adicionam erro ao padrão espectral da matriz \mathbf{X} ; b) quando há indisponibilidade de todos os espectros puros, ou seja, a análise de um medicamento cuja a formulação não é totalmente conhecida; c) quando as interações de compostos químicos causam alterações espectrais. Para estes casos, outro método deve ser escolhido.

Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O PLS é um método de regressão multivariada que não requer conhecimento de todos os compostos presentes em uma amostra. Este método apresenta a vantagem de primeira ordem, ou seja, a capacidade de prever o vetor de respostas \mathbf{y} (ou matriz \mathbf{Y}) na presença de interferentes previstos na etapa de calibração [35-37]. O PLS requer um conjunto de dados de calibração composto de várias amostras, abrangendo uma faixa de concentração adequada para construir um modelo de novas previsões. As matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} são decompostas em matrizes menores (escores e pesos) de acordo com as seguintes equações:

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

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

onde: \mathbf{Y} é a matriz de variáveis dependentes (propriedades de interesse) e \mathbf{X} é a matriz de observações (objetos). \mathbf{T} e \mathbf{U} correspondem aos escores de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. \mathbf{P}^T e \mathbf{Q}^T são os pesos (“loadings”) de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente. \mathbf{E} e \mathbf{F} correspondem a matriz de erros de \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente.

O PLS é uma ferramenta muito robusta que reduz as dimensões das variáveis originais \mathbf{X} e \mathbf{Y} mantendo elevada a variância explicada em um número reduzido de variáveis latentes. Ao mesmo tempo, maximiza a relação das matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} de escores através de uma matriz \mathbf{B} de coeficientes.

Resolução de Curvas Multivariadas - Mínimos Quadrados Alternados (MCR-ALS)

O MCR-ALS tornou-se uma ferramenta quimiométrica conhecida que visa à resolução de respostas de componentes múltiplos em misturas desconhecidas, ou seja, não resolvidas. Por um lado, a importância da técnica vem da grande variedade de conjuntos de dados que podem ser analisados por métodos de resolução de curvas, essencialmente, qualquer sistema multicomponente que possa ser descrito por meio de um modelo bilinear [35- 40].

Para o método de MCR, bem como outros métodos de processamento de dados com vantagem de segunda ordem, deve-se primeiro verificar duas condições básicas. A primeira é que o sinal analítico obedeça a uma relação semelhante à lei de Beer, isto é, se os dados espectrais, por exemplo, tem uma relação linear com a concentração, igual à equação 3.

A MCR-ALS é uma ferramenta que deve ser inicializado por uma estimativa inicial de **C** ou **S** e um número de espécies químicas presentes na mistura. Existem várias formas de inicialização, incluindo espectros conhecidos, estimativa de perfis puros, entre outros. Para informar o número de espécies presentes, geralmente utiliza-se decomposição de valores singulares.

A otimização ainda conta com uma série de restrições [41] que direcionam a solução do algoritmo de acordo com as informações fornecidas, como por exemplo: não-negatividade de espectros e/ou concentrações, balanço de massa igual a 100%, deficiência de rank, etc. Por fim, a solução recupera as concentrações **C** e os espectros dos componentes puros **S** para reconstrução de **X** com o mínimo possível de **E**.

A MCR-ALS pode ser utilizada com sucesso em situações onde a informação sobre o sistema é parcial, ou ainda, não há possibilidade de construção de uma curva de calibração através do preparo de um conjunto de amostras, como são observados em muitos casos de imagens químicas. Por outro lado, é preciso eliminar as ambiguidades rotacionais do sistema bilinear, caso contrário a informação pode ser qualitativa ou semi-quantitativa.

Após esta breve abordagem sobre algumas formas de tratamento de dados fica claro que algumas abordagens são matematicamente menos complexas (ex.: CLS) que outras (ex.: MCR-ALS). Muitas vezes, a utilização de ferramentas quimiométricas diferentes fornecem resultados semelhantes e o quimiometrista deve utilizar o princípio da parcimônia, ou seja, a preferência pela explicação mais simples quando os resultados são equivalentes.

1.6 Referências Bibliográficas

- [1] Borengasser M. Hyperspectral remote sensing: principles and applications. CRC Press by Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2008.
- [2] Zude M. Optical monitoring of fresh and processed agricultural. CRC Press by Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2009.
- [3] Salzer R., Siesler H.W. Infrared and Raman Spectroscopic Imaging. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.
- [4] Petus C., et al. Continental Shelf Research, 30 (2010) 379.
- [5] Young-Ling, W., et al. Pedosphere, 20 (2010) 378.
- [6] Galvão L. S., et al. Journal of Photogrammetry & Remote Sensing, 63 (2008) 259.
- [7] Jun W., et al. Journal of Food Engineering, 99 (2010) 314.
- [8] Manley M., et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57 (2009) 8761.
- [9] Okamoto H. e Lee W. S. Computers and Eletronics in Agriculture, 66 (2009) 201.
- [10] Lopes M. B., Wolff J. Anal Chim Acta, 633 (2009) 149.
- [11] Bonnier F., et al. Analyst, 133 (2008) 784.
- [12] Widjaja E., et al. Analytical Chemistry, 82 (2010) 1277.
- [13] Ho L., et al. J. Control. Release, 127 (2008) 79.
- [14] Brewer L. N., et al. Foretic Science International, 179 (2008) 98.
- [15] Steele D., in: J. M. Chalmers; P. R. Griffiths, Handbook of vibrational spectroscopy, vol 1, John Wiley & Sons, London, 2002.
- [16] Geladi P., Grahn H. Multivariate Image Analysis, Wiley, Chichester, 1996.
- [17] de Juan A., Tauler R., Dyson R., Marcolli C., Rault M., Mader M. Trends Anal. Chem. 23 (2004) 70.
- [18] Harthcock M. A., Atkin S. C., Appl. Spectrosc., 42 (1988) 449.

- [19] Patterson B. M., Havrilla G. J. *Appl. Spectrosc.* 60 (2006) 1256.
- [20] Tran C. D. *Appl. Spectrosc. Rev.* 38 (2003) 133.
- [21] Lewis E.N., Carroll J.E., Clarke F. *NIR news* 12 (2001) 16.
- [22] U.S. Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry, PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, FDA (CDER), (2004). Acessado em 13/09/2012: www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm.
- [23] Burger J., Geladi P. J. *Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007) 29.
- [24] Reich G., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1109.
- [25] Ravn C., Near-infrared chemical imaging in formulation development of solid dosage forms. Tese de doutorado, University of Copenhagen, Denmark, 2009.
- [26] Carneiro R. L.. Métodos químiométricos aplicados à análise de medicamentos por espectroscopia de imagem. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- [27] Rocha W. F. C., Sabin G. P., Março P. H., Poppi R. J. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 106 (2011) 198.
- [28] Clarke F. *Vib Spectrosc* 34 (2004) 25.
- [29] Koljonen J., Nordling T. M. E., J. T. Alender. J. *Near Infrared Spectrosc.* 16 (2008) 189.
- [30] Allegrini F., Olivieri A. C. *Anal. Chim Acta.* 699 (2011) 18.
- [31] Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikström C., Wold S. *Multi- and Megavariate Data Analysis, Advanced Applications and Method Extensions, Part II.* MKS Umetrics AB, 2006.
- [32] Treado P. J., Nelson M. P., Chalmers J. M., Griffiths P. R. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, vol. 2, John Wiley & Sons, London, 2002.
- [33] Numara J. M. *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001.
- [34] Rowe R. C., Sheskey P. J., Owen S. C. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 5th ed., American Association, 2006.

- [35] Martens H., Naes T. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, 1991.
- [36] Moreira A. B., Dias I. L. T., Oliveira-Neto G., Zagatto E. A. G., Ferreira M. M. C., Kubota L. T. *Talanta* 67 (2005) 65.
- [37] Geladi P., Kowalski B. R. *Anal Chim Acta* 185 (1986) 1.
- [38] de Juan A., Maeder M., Hancewicz T., Tauler R. *J Chemom* 22 (2008) 291.
- [39] Tauler R. *J Chemom* 15 (2001) 627.
- [40] Tauler R. *Chemometr Intell Lab Syst* 30 (1995)133.
- [41] Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R. *Chemometr Intell Lab Syst* 76 (2005) 101.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA SIMILARIDADE ENTRE MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO DE CONCENTRAÇÃO OBTIDOS POR NIR-CI: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS QUIMIOMÉTRICAS EM COMPRIMIDOS DE CARBAMAZEPINA.

2.1 Introdução

Espectroscopia de imagem química no infravermelho próximo (NIR-CI) é uma ferramenta poderosa no fornecimento de uma grande quantidade de informação sobre amostras farmacêuticas. Nesta técnica, o espectro de infravermelho próximo (NIR) pode ser medido em uma ampla faixa de comprimentos de onda a cada ponto predefinido da superfície da amostra equivalente aos pixels da imagem da propriedade de interesse [1].

Assim, esta possibilidade de aumentar a compreensão da qualidade do produto e/ou do processo está de acordo com a chamada Tecnologia Analítica de Processos (PAT), uma iniciativa que visa entender o processo integrando conhecimento sobre suas partes. Além disso, a NIR-CI tem recebido atenção da FDA – Food and Drug Administration - dos Estados Unidos em relação a aplicações farmacêuticas [2]. Uma das principais vantagens do NIR é a possibilidade de trabalhar com reflectância difusa diretamente da superfície da amostra de uma forma rápida e não destrutiva [3].

Existem vários métodos que podem ser usados para prever o teor de constituintes presentes em formulações farmacêuticas e/ou para produzir um mapa de distribuição de concentrações, tais como: resolução de curvas multivariadas (MCR) [4-6], mínimos quadrados parciais (PLS) [7], regressão linear múltipla (MLR) [8] e mínimos quadrados clássicos (CLS) [9]. Estas abordagens diferem nos seus algoritmos, mas tem em comum a capacidade para estimar as espécies presentes nas formulações farmacêuticas. Foram relatadas diferentes aplicações para o estudo de fármacos utilizando NIR-CI e métodos quimiométricos [4,10-12]. Ravn et al. [2] realizou uma comparação de diferentes modelos de calibração multivariada, a fim de obter imagens do ingrediente ativo e de excipientes presentes em formulações farmacêuticas por NIR-CI. Amigo e Ravn [13] estudaram o potencial de modelos CLS e MCR para fornecer informação quantitativa e espacial de todos os ingredientes em um comprimido composto por 5 componentes, sem o desenvolvimento de qualquer modelo prévio de calibração. Também Amigo et al. [12] compararam CLS e PLS utilizando uma biblioteca de

espectros de padrões puros. Clarke et al. [14] relataram a utilização de microscopia NIR-CI para identificação de comprimidos que sofreram problemas durante o processamento e para a investigação de pré-misturas de comprimidos com problemas de dissolução utilizando PCA e PLS.

Neste trabalho, o fármaco carbamazepina foi estudado por NIR-CI. A carbamazepina é um dos medicamentos antiepilépticos mais utilizados no mundo, é prescrito com sucesso para o tratamento psicomotor e crises convulsivas complexas [15]. Produtos farmacêuticos que contêm a carbamazepina como ingrediente ativo apresentam com frequência os seguintes excipientes [16] na formulação: celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, croscarmelose sódica e polividona. A celulose em pó é utilizada como diluente, enquanto o estearato de magnésio é utilizado como lubrificante. Por outro lado, a croscarmelose sódica e o dióxido de silício coloidal são utilizados como desintegrante. O dióxido de silício coloidal é também utilizado como um agente adsorvente de dispersão de líquidos em pós. Em comprimidos, polividona é utilizada como aglutinante para os processos de granulação úmida. Assim, conhecer o comportamento dos excipientes e suas interações podem trazer informações além da análise química convencional, ou seja, do conhecimento exato da composição da formulação farmacêutica.

Há vários trabalhos que demonstram a importância dos estudos de carbamazepina em formulação farmacêutica. Virtanen [17] estudou a uniformidade da mistura do pó de carbamazepina por NIR. Também, Perissutti et al. [18] demonstraram que a dissolução da carbamazepina pode estar associada com a maior superfície de contato entre o fármaco e o meio de dissolução. Neste sentido, a obtenção da imagem química de uma formulação farmacêutica a base de carbamazepina pode ser uma atividade importante na indústria farmacêutica.

Embora várias ferramentas quimiométricas possam ser utilizadas para a construção de modelos de calibração, a concentração referente a cada pixel não é conhecida *a priori*, uma vez que apenas o espectro médio de uma amostra pode ser relacionado com a concentração formulada no comprimido. Assim, é difícil de

verificar se o mapa de concentrações da superfície de uma amostra é confiável, ou qual abordagem quimiométrica gera mapas mais adequados. Uma possibilidade de verificar esta adequação é a realização de um estudo da semelhança entre os mapas de distribuição de concentrações (imagens químicas) obtidos através de diferentes modelos quimiométricos. A similaridade pode ser expressa através do cálculo do coeficiente de correlação (r), obtido no ajuste linear das concentrações estimadas em todos os pixels de uma imagem por dois diferentes métodos quimiométricos, ou seja, a similaridade entre imagens [12].

Neste trabalho, as similaridades das imagens geradas por diferentes abordagens quimiométricas (MCR, MLR, CLS e PLS) foram avaliadas com o intuito de obter um melhor diagnóstico para a informação obtida. Este estudo torna-se importante a medida que sugere como estimar níveis de concentração em que as imagens são confiáveis. O estudo de similaridade foi aplicado a dados adquiridos em condições instrumentais especiais visando velocidade analítica. As imagens de todos os compostos da formulação obtidas por NIR-CI foram comparadas com as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), sendo brevemente discutidas. Algumas observações sobre a uniformidade de mistura foram apontadas.

2.2 Parte experimental

Neste estudo, 45 comprimidos foram preparados com uma composição variada (faixa aproximada: entre 0% e 80% em massa) dos seguintes compostos: carbamazepina (CBZ), celulose microcristalina (CEL), croscarmelose de sódio (CS), dióxido de silício (DS), estearato de magnésio (EM) e polividona (PVD).

Os compostos presentes em cada comprimido foram pesados individualmente em balança analítica de precisão (0,01 mg) diretamente em frascos âmbar, sendo armazenados em dessecador. O conteúdo de cada frasco (equivalente à composição comercial de um comprimido, 280 mg) foi homogeneizado em Vórtex por 2 minutos. Após a homogeneização, as

formulações foram colocadas em pastilhador e prensadas sob uma força de 3 toneladas/cm² por um período de 10 segundos para obtenção dos comprimidos.

As aquisições das imagens foram realizadas através do Spotlight 400N FT-NIR Imaging da PerkinElmer. Este equipamento incorpora um detector (MCT resfriado por nitrogênio líquido) de arranjo linear (16 pixels) e permite o mapeamento da superfície através do movimento da amostra nos eixos x e y, além do ajuste do foco no eixo z. Os parâmetros instrumentais utilizados foram: 8x8 mm (tamanho da imagem), 50 µm (tamanho de pixel), 16 cm⁻¹ (resolução espectral), 7800-4000 cm⁻¹ (faixa espectral) e 2 varreduras. Esta configuração permite rápida aquisição de dados, aproximadamente 13,6 minutos por amostra.

Para criação dos modelos, foi utilizado Matlab 7.8 e PLS toolbox 5.2.1. Cada comprimido foi analisado em ambos os lados, aumentando a área superficial de amostragem (maior representatividade). Para cada imagem, um cubo de dados tridimensional (160x160 pixels e 239 comprimentos de onda) foi obtido e desdobrado para remoção da dimensão espacial, gerando uma matriz de dados por amostra. Os dados originais em reflectância (R) foram convertidos para pseudo-absorbância ($\log_{10} 1/R$) e normalizados pela variação normal padrão (SNV). Em seguida, foram obtidos os espectros médios de 51.200 pixels (número de espectros obtidos em ambos os lados do comprimido) por amostra, para formação do conjunto de 45 espectros representativos das amostras. Diferentes métodos de modelagens simultâneas (modelos com 6 variáveis dependentes) foram avaliados para obtenção dos mapas de distribuição por compostos: mínimos quadrados parciais (PLS), resolução de curvas multivariadas (MCR), mínimos quadrados clássicos (CLS) e regressão linear múltipla (MLR). Os procedimentos utilizados nesta etapa foram: MCR - inicialização do ALS pelas concentrações do planejamento experimental e balanço de massa igual a 100%; e MLR - seleção por algoritmo genético: 7056, 7024, 6480, 6128, 5664, 4928, 4000 cm⁻¹.

Os conjuntos de calibração e validação foram selecionados pela rotina de Kennard-Stone de planejamento. Os modelos de calibração (conjunto de 30 amostras) foram validados (conjuntos de 15 amostras) e utilizados para obter os

mapas de distribuição de concentração em 21 novas amostras. Um estudo da similaridade entre as imagens obtidas através dos quatro modelos diferentes foi realizado. Todos os comprimidos, em diferentes níveis de concentração, foram submetidos à comparação pixel a pixel. A semelhança entre as imagens foi expressa através do coeficiente de correlação (r). Esta comparação foi feita sistematicamente, abrangendo todas as seis combinações possíveis entre os modelos, para todos os compostos da formulação, em todos os níveis de concentração e em diferentes números de varreduras (1, 2, 4, 8 e 16 varreduras).

Um resumo da estratégia analítica pode ser visto na Figura 3. As etapas *a*, *b*, *c*, *d* e *e* indicam cronologicamente o procedimento analítico utilizado. O estudo de similaridade foi obtido a partir das imagens na etapa *e*. A sequência de eventos está resumida nas etapas abaixo:

a) Aquisição e transformações de imagens hiperespectrais.

A imagem é obtida diretamente a partir da superfície do comprimido, e consiste de um hipercubo espectral dos dados brutos, em que os eixos x e y são os coordenados espaciais, característicos da superfície do fármaco e os eixos z são os comprimentos de ondas (λ). Assim, para cada pixel da imagem existe um espectro completo na terceira dimensão. No passo seguinte, para cada amostra, os dados são desdobrados para eliminação da dimensão espacial, o que resulta numa matriz de $(xy.\lambda)$. A informação acerca da posição do pixel é mantida nas linhas da matriz. Com os dados desdobrados, os pré-processamentos são efetuados e um espectro médio da matriz é obtido para representar cada amostra nos modelos quimiométricos.

b) Conjunto de calibração

Nesta etapa, os cubos de dados (representando as amostras) desdobrados, pré-processados e representados pelos espectros médios, um para cada comprimido, são utilizados para obter uma matriz \mathbf{X} que está relacionada com a concentração \mathbf{C} conhecida dos compostos de interesse. Esta matriz foi obtida por planejamento experimental, onde cada amostra da formulação foi construída com independência dos 6 componentes da mistura.

c) Abordagens quimiométricas

Todas as técnicas quimiométricas são utilizadas através de uma abordagem de calibração, da seguinte forma:

- CLS: é iniciado com a estimativa da matriz de espectros puros **S**, considerando as informações das matrizes **X** e **C**. Após, a matriz **C** de uma nova observação pode ser obtida através da função de calibração direta.
- MCR: é inicializado utilizando a matriz **C** com restrições para a otimização por ALS. Neste caso, **C** e **S** são otimizados para minimizar o erro na recuperação de **X**. Assim, após as matrizes **C** e **S** serem otimizadas, uma calibração direta é realizada.
- MLR: é uma calibração inversa utilizando variáveis originais. Uma vez que, o número de variáveis é maior do que o de amostras, uma seleção de variáveis é realizada utilizando algoritmo genético (GA). Esta nova matriz **X** de dimensão muito menor ($n=7$) pode ser utilizada para encontrar **B**_{MLR} de coeficientes.
- PLS: é também uma calibração inversa, porém utiliza um processo iterativo por mínimos quadrados parciais NIPALS para estimar **B**_{PLS}. Desta forma, é possível chegar a matriz **C**, considerando todas as variáveis de **X**.

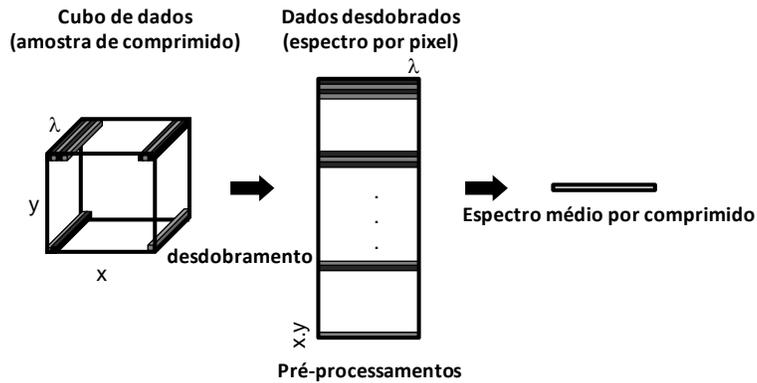
d) Conjunto de validação

Os modelos desenvolvidos devem ser verificados por conjunto de validação externa. Estes modelos mostram a qualidade da previsão sob toda a faixa de concentração das amostras. Trata-se do mesmo procedimento do estágio b, porém com amostras ausentes na etapa de calibração e representativas de acordo com algoritmo de Kennard-Stone.

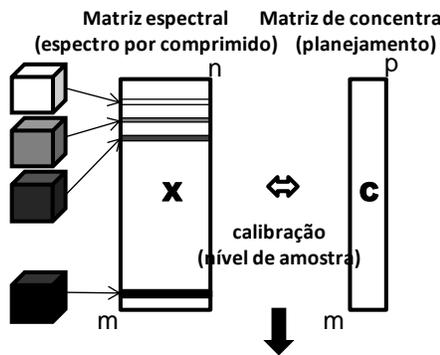
e) Mapas de distribuição de concentrações

Na etapa de previsão de imagens, os dados desdobrados e pré-processados são submetidos aos modelos e utilizados para a previsão da concentração no nível do pixel. Assim, a matriz de concentrações previstas em cada pixel **C** é obtida para cada constituinte presente na formulação farmacêutica. Finalmente, os mapas de concentração são obtidos através do rearranjo dos pixels, formando uma imagem para cada componente na formulação farmacêutica.

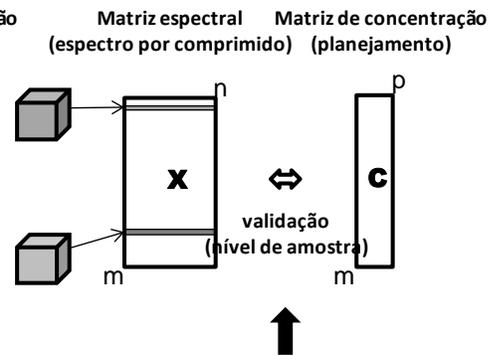
a) Aquisição e transformação da imagem hiperespectral



b) Conjunto de calibração



d) Conjunto de validação



c) Abordagens quimiométricas

CLS	MCR	MLR	PLS
1) $S = (C^T C)^{-1} C^T X$	1) $S^T = C^+ T X$	1) GA	1) NIPALS
2) $X = CS$	2) $C = X S^+$	2) $B_{MLR} = (X^T X)^{-1} X^T C$	2) $B_{PLS} = W(P^T W)^{-1} Q^T$
3) $C = X S^T (S S^T)^{-1}$	3) $C = X S^T (S S^T)^{-1}$	3) $C = X B_{MLR}$	3) $C = X B_{PLS}$

e) Mapas de distribuição de concentração (imagem química)

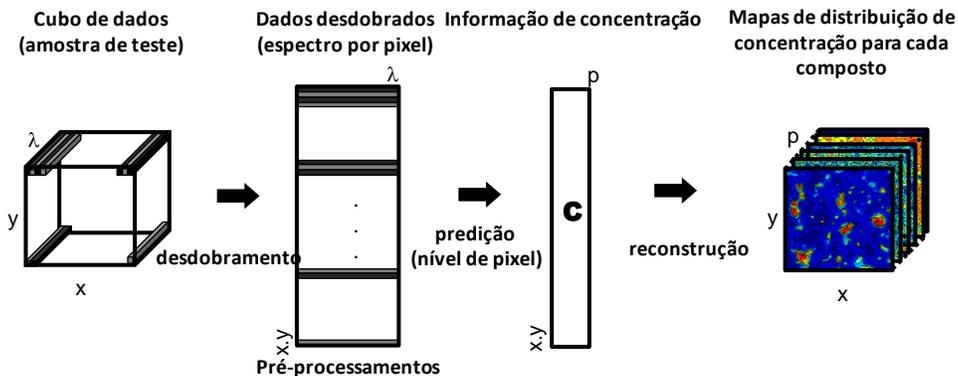


Figura 3 – Estratégia analítica na obtenção de imagens químicas.

2.3 Resultados e discussões

Embora a aquisição de dados espectrais com 2 varreduras possa parecer insuficiente para construção de modelos de quantificação, é preciso observar que os modelos são construídos com uma média de 51.200 pixels, o que garante um grande número de varreduras no espectro médio da amostra. Por outro lado, neste estudo foi notado que o ponto fundamental para construção de modelos mais robustos está relacionado com o aumento da área amostral. Neste caso, o espectro adquirido em uma grande área de observação representa melhor a composição química informada ao modelo, reduzindo o resíduo da regressão.

A Figura 4 mostra a sobreposição dos espectros puros e as variáveis selecionadas para MLR (linhas verticais tracejadas). Foi possível observar que a celulose microcristalina e a croscarmelose de sódio apresentam perfis semelhantes. Por outro lado, a carbamazepina e estearato de magnésio têm maior seletividade espectral.

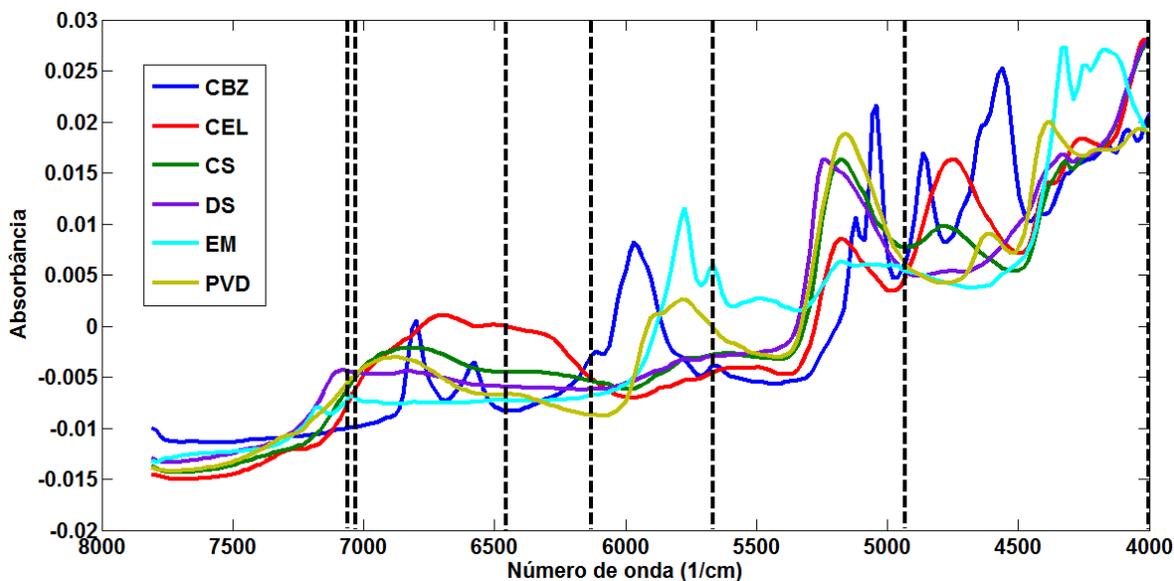


Figura 4 – Espectros puros dos compostos da formulação. As linhas tracejadas na vertical correspondem aos números de ondas selecionados por GA para MLR.

A Tabela 1 mostra a raiz quadrada do erro quadrado médio de previsão (RMSEP), conhecido como erro padrão de previsão, obtido em cada modelo para a quantificação de todos os componentes presentes na formulação farmacêutica. Todos os modelos desenvolvidos têm erros inferiores a 2% para a quantificação da carbamazepina (princípio ativo) e menor que 5% para a previsão dos excipientes. Os resultados foram obtidos com 2 varreduras por pixel.

Tabela 1 - Valores de RMSEP em % (m/m).

	MLR	CLS	PLS	MCR
Carbamazepina (API)	1,9	1,8	1,8	1,8
Celulose microcristalina	4,1	2,7	2,8	2,9
Croscarmelose sódica	3,6	4,0	4,4	4,6
Dióxido de silício	3,3	4,3	4,7	4,5
Estearato de magnésio	2,7	3,4	3,4	3,4
Polividona	4,2	3,9	4,2	4,1

Faixa: aproximadamente entre 0 e 80% (m/m).

Os resultados mostram RMSEP semelhantes para todos os métodos de calibração. No entanto, esta abordagem só mostra a informação global sobre o erro de previsão dos métodos quimiométricos. Para comparar a semelhança entre a concentração prevista pelo modelo de calibração nas imagens, foram considerados os resultados previstos dos 6 compostos para 21 novas amostras obtidas por todos os modelos sugeridos: PLS, CLS, MCR e MLR. O coeficiente de correlação entre imagens mostra que o CLS e o MCR apresentam resultados mais semelhantes, possivelmente porque após o processo de otimização por ALS, os cálculos para a calibração direta ($\mathbf{X}=\mathbf{CS}^T$) são os mesmos nas duas abordagens. Da mesma forma, o PLS proporciona resultados muito semelhantes aos modelos CLS e MCR, provavelmente porque utilizam informações de todas as variáveis tornando o modelo tão robusto quanto os anteriores. Além disso, como há um mínimo de interferentes desconhecidos na formulação proposta, a matriz de coeficientes torna-se muito semelhante. Neste caso, não há vantagem na priorização de informações dos analitos em detrimento dos interferentes, uma

característica do PLS. Por outro lado, embora MLR tenha revelado um RMSEP comparável aos outros modelos, as previsões nos pixels não são tão semelhantes, provavelmente devido ao baixo número de variáveis selecionadas.

Assim, o coeficiente de correlação entre mapas de distribuição de concentrações foi utilizado para verificar as semelhanças entre os resultados usando PLS, CLS, MCR e MLR ao nível do pixel. Em todas as comparações foram observados $r > 0,97$ para PLS, CLS e MCR, traduzindo a grande semelhança entre mapas de distribuição de concentrações. Estas ferramentas quimiométricas têm em comum o uso de todo o espectro, que proporcionando uma melhor robustez para o método. No entanto, quando comparamos as imagens obtidas por MLR com os outros modelos, os resultados mostraram uma redução da semelhança em concentrações mais baixas (abaixo de 20%). Nestes casos, os valores de r estão no intervalo entre 0,9 e 0,4. A Figura 5 apresenta os mapas de distribuição para dois níveis de concentração de carbamazepina (66% e 1%).

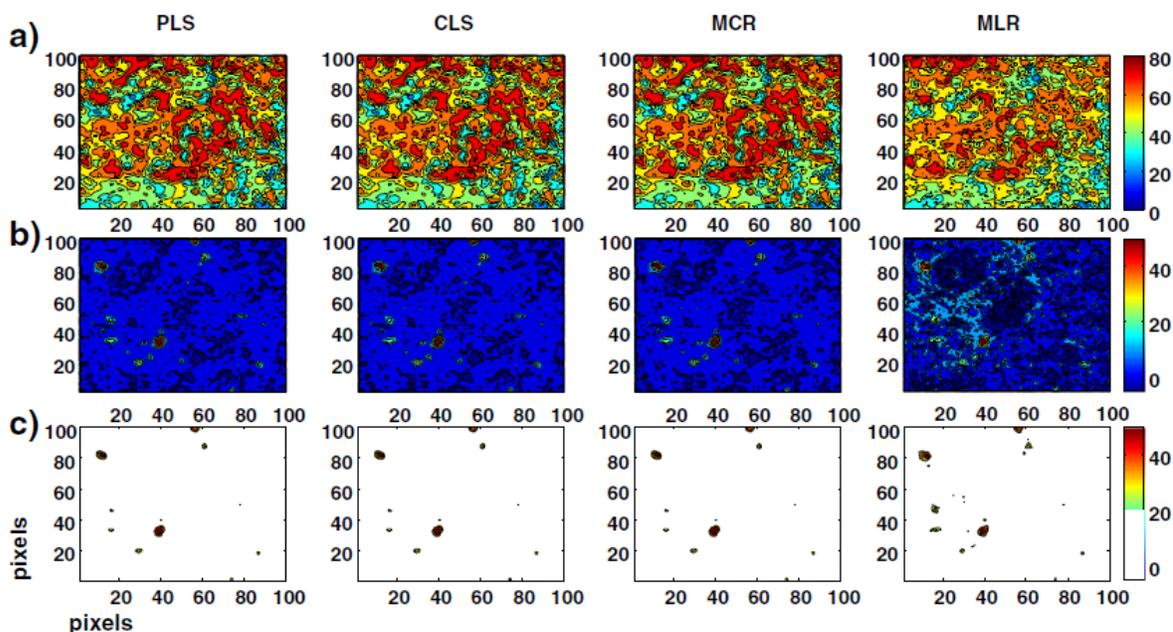


Figura 5 - Mapas de distribuição de concentrações de carbamazepina por diferentes algoritmos. A) 61% (m/m); B) 1% (m/m); e C) 1% (m/m) com limite de sensibilidade de 20%.

É importante observar que as imagens do comprimido mostrando a distribuição de altas concentrações de carbamazepina apresentam grande similaridade (Figura 5A, linha superior), sendo um forte indicativo para exatidão dos modelos de previsão para altas concentrações. No entanto, as imagens do comprimido que mostram a distribuição de baixas concentrações revelam baixa similaridade (Figura 5B, linha central), apontando para a falta de sensibilidade na previsão de pixels com baixas concentrações. Neste sentido, é possível notar que mesmo nas imagens dissimilares, os pixels que apresentam maior concentração de ativo (superior a 20% (m/m)) são detectados em todas as imagens com alta similaridade, (Figura 5C, linha inferior). Assim, é possível observar uma tendência de divergência entre as imagens onde a concentração do fármaco é baixa, sugerindo limite de detectabilidade para MLR.

Outro modo de demonstrar a similaridade entre os resultados obtidos por diferentes métodos quimiométricos é através de mapas de distribuição e seus respectivos histogramas. Para exemplificar isso, os resultados obtidos para um dos excipientes (celulose microcristalina em 17%) são apresentados na Figura 6.

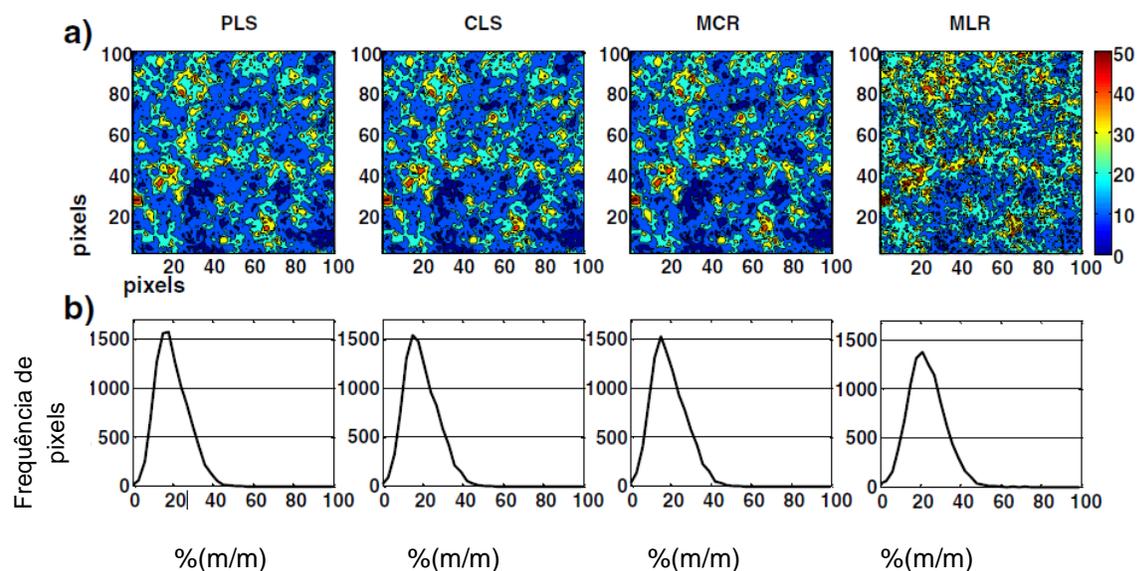


Figura 6 – Mapas de distribuição de concentrações de celulose microcristalina e seus respectivos histogramas. A) imagens de celulose com 17% (m/m); B) histogramas de frequência de concentrações.

É possível observar que a MLR produz maior variabilidade ao nível do pixel. Ao analisar o histograma gerado por MLR, o perfil de distribuição é mais baixo e alargado do que os outros modelos apresentados. Este fato resulta em uma imagem mais dissimilar, como já foi discutido na Figura 5. Outra informação que pode ser extraída para o estudo de similaridade refere-se à homogeneidade de imagem. Gendrin *et al.* [20] descrevem que imagens homogêneas apresentam um formato de pico (curtose alta). Os resultados apresentados na Figura 6B mostram que MLR apresenta a menor curtose e imagens, conseqüentemente, mais heterogêneas. Este fato se deve a menor precisão de resultados no pixel.

A Figura 7 mostra a mesma área do comprimido observada na Figura 6, porém com diferentes números de varreduras e utilizando apenas MLR. É importante notar que a qualidade das imagens é diretamente proporcional ao número de varreduras. Este fato pode ser comprovado pela análise de histogramas onde há um aumento de curtose da esquerda para a direita, Figura 7 na linha inferior. A imagem com 16 varreduras utilizando MLR é similar a imagem com 2 varreduras utilizando PLS, MCR ou CLS. No entanto, o tempo de aquisição de 3 minutos (1 varredura) torna-se 41 minutos (16 varreduras).

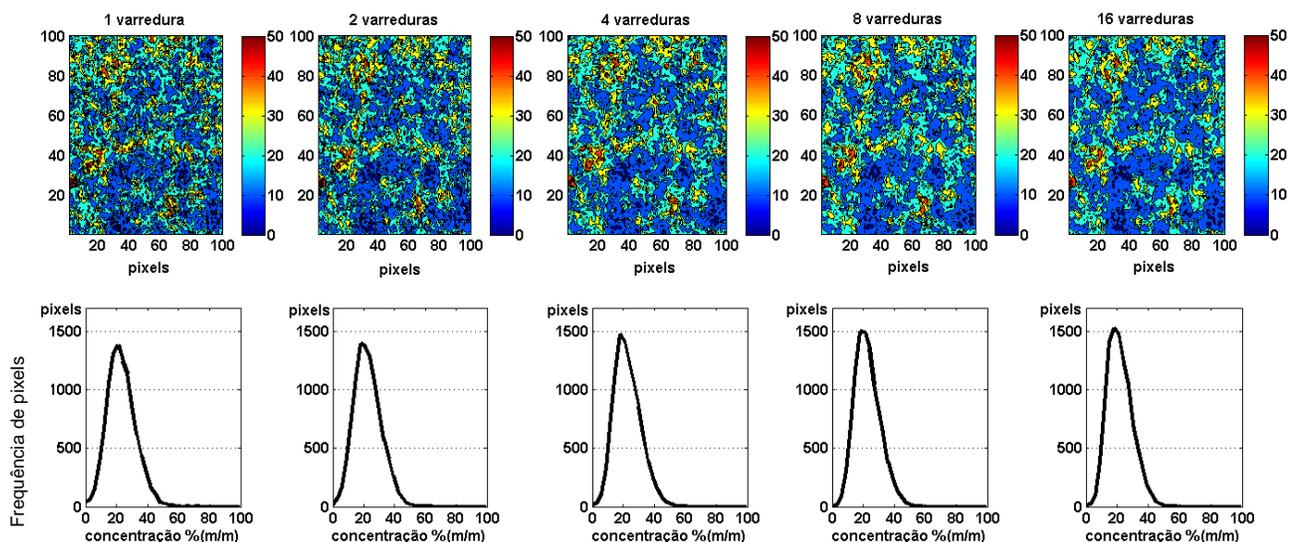


Figura 7 - Relação entre o número de varreduras e a variabilidade da imagem por MLR.

Discutidos os aspectos de similaridade, e visto que o PLS demonstrou bons resultados para estimar as imagens para todos os compostos, na Figura 8, são ilustrados os mapas de distribuição obtidos para todos os compostos de um único comprimido por PLS.

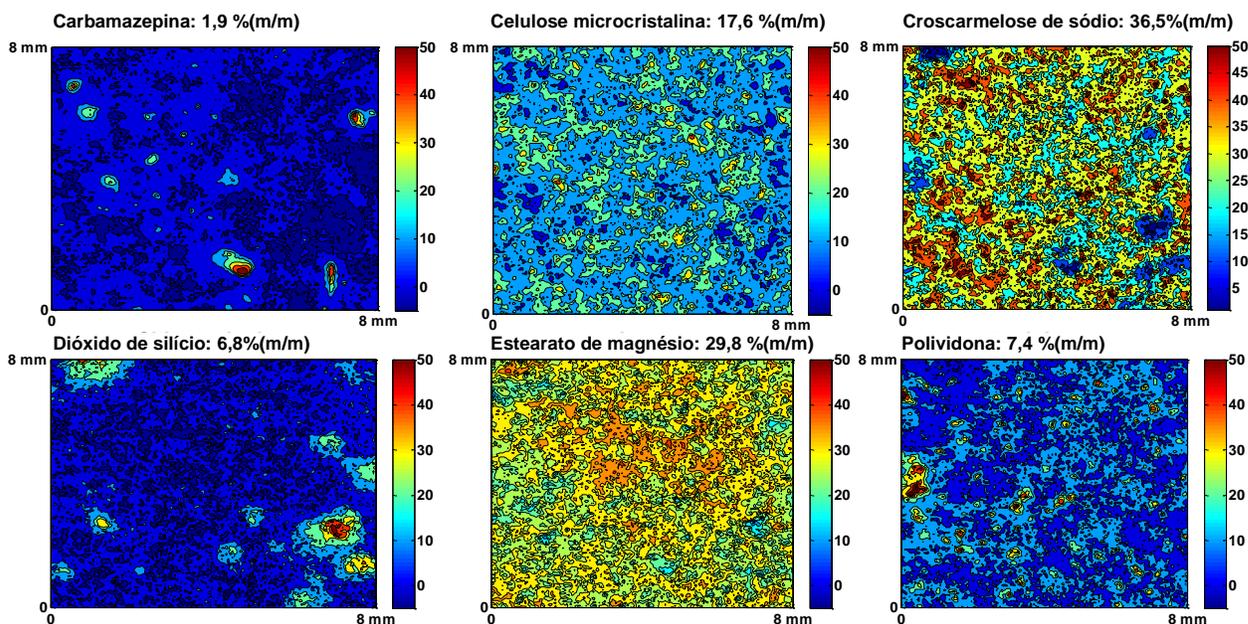
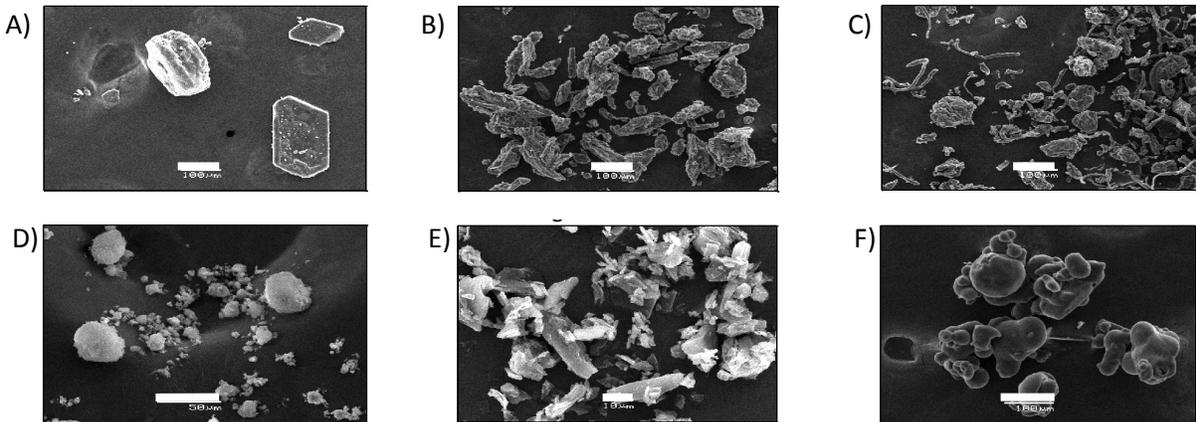


Figura 8 - Mapas de distribuição para todos os compostos.

Analisando simultaneamente os mapas de distribuições de concentrações, Figura 8, e as micrografias dos compostos individuais obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM), Figura 9, alguns apontamentos podem ser feitos. Os cristais de carbamazepina aparecem mais densos e heterogêneos na imagem devido à dimensão e características das partículas. A celulose microcristalina e a croscarmelose sódica são menores e mais fibrosas estando bem distribuídas na superfície. A polividona, mais esférica, apresenta-se na forma de pequenos aglomerados. As partículas de dióxido de silício são muito menores do que o tamanho do pixel, mas foram observados grandes grupos heterogêneos, indicando formação de grandes agregados (possivelmente atração eletrostática entre partículas). O estearato de magnésio, embora também constituído de pequenas partículas, é uniformemente distribuído na superfície.



Escala: A) carbamazepina (100 μm), B) celulose microcristalina (100 μm), C) croscarmelose sódica (100 μm), D) dióxido de silício (50 μm), E) estearato de magnésio (10 μm), F) polividona (100 μm).

Figura 9 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura dos compostos puros.

Através do estudo de espectroscopia de imagem na região do infravermelho próximo foi possível obter rapidamente informações sobre o processo de homogeneização, ou ainda, sobre a característica do produto e da matéria-prima utilizada.

2.4 Conclusões

Neste estudo foram utilizadas diferentes abordagens quimiométricas na obtenção de imagens químicas adquiridas por NIR-CI. Os diagnósticos, baseados na similaridade entre imagens, sugerem limites de confiabilidade para a concentração por pixel de imagem e possibilitam definir uma estratégia de aquisição e análise de dados. Neste trabalho, os métodos quimiométricos que empregaram todas as variáveis no vetor de regressão foram considerados mais robustos. Por outro lado, resultados menos satisfatórios foram encontrados na abordagem MLR, que sofreram seleção de variáveis. Por fim, foi possível atribuir explicações sobre a distribuição de compostos presentes na superfície de comprimidos de carbamazepina, com imagens geradas em apenas 5 minutos de aquisição, tempo relativamente rápido para estudos de NIR-CI em modo de mapeamento em linha.

2.5 Referência Bibliográficas

- [1] Amigo J. M., Cruz J., Bautista M., MasPOCH S., Coello J., Blanco M. Trends Anal. Chem. 27 (2008) 696.
- [2] Ravn C., Skibsted E., Bro R. J. Pharm. Biomed. Anal. 48 (2008) 554.
- [3] Lopes M. B., Wolff J.-C., Bioucas-Dias J. M., Figueiredo M. A. T. Anal. Chim. Acta 641 (2009) 46.
- [4] Gendrin C., Roggo Y., Collet C., J. Pharm. Biomed. Anal. 16 (2008) 151.
- [5] Awa K., Okumura T., Shinzawa H., Otsuka M., Ozaki Y., Anal. Chim. Acta 619 (2008) 81.
- [6] de Juan A., Tauler R., Dyson R., Marcolli C., Rault M., Mader M. Trends Anal. Chem. 23 (2004) 70.
- [7] Rocha W. F. C., Sabin G. P., Março P. H., Poppi R. J. Chemom. Intell. Lab. Syst. 106 (2011) 198.
- [8] Karande A. D., Heng P. W. S., Liew C. V. Int. J. Pharm. 396 (2010) 63.
- [9] Ravn C., Near-infrared Chemical Imaging in Formulation Development of Solid Dosage Forms. Tese de doutorado, University of Copenhagen, Denmark, 2009.
- [10] Reich G. Adv. Drug Deliv. Rev. 57 (2005) 1109.
- [11] Gowen A. A., O'Donnell C. P., Cullen P. J., Bell S. E. J. Eur. J. Pharm. Biopharm. 69 (2008) 10.
- [12] Amigo J. M., Ravn C., Gallagher N. B., Bro R., Int. J. Pharm. 373 (2009) 179.
- [13] Amigo J. M., Ravn C. Eur. J. Pharm. Sci. 37 (2009) 76.
- [14] Clarke F., Vib. Spectrosc. 34 (2004) 25.
- [15] Numara J. M., Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. McGraw-Hill, New York, 2001.
- [16] Rowe R. C., Sheskey P. J., Owen S. C. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th ed. American Pharmaceutical Association, Washington, DC, 2006.
- [17] Virtanen S., Antikainen O., Yliruusi J. Int. J. Pharm. 345 (2007) 108.
- [18] Perissutti B., Newton J. M., Podczek F., Rubessa F. Eur. J. Pharm. Biopharm. 53 (2002) 125.
- [19] Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R. Chemom. Intell. Lab. Syst. 76 (2005) 101.
- [20] Gendrin C., Roggo Y., Spiegel C., Collet C. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68 (2008) 828

CAPÍTULO 3

ESTUDO DO PERFIL DE DISTRIBUIÇÃO DO CITRATO DE
SILDENAFILA EM DIFERENTES FORMULAÇÕES
FARMACÊUTICAS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM E
QUIMIOMETRIA: UMA ABORDAGEM SOBRE A CARACTERIZAÇÃO
DE PRODUTOS.

3.1 Introdução

As patentes são uma forma de proteção jurídica da propriedade intelectual que proporcionam direitos exclusivos para fazer, usar, importar, vender e oferecer para venda a invenção por até 20 anos. A lógica econômica desse mecanismo de proteção é que, os lucros previstos pela licença de produção de um produto patenteado, garantem ao detentor da patente, o reinvestimento em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos [1-4]. Fatores sociais, no entanto, podem eventualmente prevalecer sobre esse aspecto econômico do desenvolvimento, surgindo a possibilidade de violação de patente. Um desses fatores é a grande discrepância tecnológica dos países em desenvolvimento se comparado aos países desenvolvidos, e seu baixo poder aquisitivo para comprar os produtos de última geração fabricados pelos grandes centros econômicos. Desta forma, a quebra de patente pode ocorrer mais cedo em alguns países que em outros, o que favorece um tipo de comercialização ilegal entre países.

O Viagra® é o primeiro medicamento aprovado para tratar a disfunção erétil. O seu mecanismo de ação inibe seletivamente a enzima fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5) responsável pela degradação da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), envolvida no processo de ereção. A maior disponibilidade de GMPc possibilita vasodilatação específica do corpo cavernoso do pênis e promove facilidade de ereção [5-6]. Estima-se que a disfunção erétil afeta entre 48% e 52% dos homens entre 40 e 70 anos. O surgimento deste medicamento causou grandes desdobramentos socioeconômicos, incluindo impacto nos cálculos previdenciários, que não previam o surgimento de alguns padrões de relacionamentos após o sucesso do medicamento.

O citrato de sildenafil (ingrediente ativo do Viagra®) foi registrado na União Européia pela Pfizer em 1991. Hoje em dia, devido à expiração recente da patente no Brasil, pelo menos 10 empresas farmacêuticas estão comercializando este produto no país, a uma fração do preço do Viagra®. Além disso, o contrabando de comprimidos de Viagra® tem representado um problema importante para o

mercado farmacêutico, onde a Polícia Federal brasileira informou um grande número de apreensões, principalmente na região sul do Brasil (Estado do Paraná). No período entre 2007 e 2010, a Polícia Federal informou um grande número de apreensões (371) sendo o mercado de comprimidos falsificados relacionados com o tratamento da disfunção erétil responsável por 80% das apreensões. Portanto, para controlar a qualidade das novas formulações farmacêuticas e distinguir entre comprimidos autênticos e falsificados é necessário o desenvolvimento de ferramentas analíticas mais eficientes. Embora os métodos de análise, utilizando cromatografia [7-10], voltametria [11-13] e determinações colorimétricas [14] foram relatados para análise de comprimidos de Viagra®, estas técnicas são demoradas e requerem extensivo preparo da amostra.

Neste sentido, a espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS), apresenta vantagens, tais como: análise não-destrutiva, maior rapidez, menor custo por amostra e menor consumo de produtos químicos. A técnica tem sido aceita em vários campos da indústria farmacêutica [15,16]. A NIRS, devido as suas características, tem o potencial de fornecer uma compreensão abrangente sobre produtos e processos farmacêuticos e está em conformidade com o fundamento da chamada tecnologia analítica de processos (*Process Analytical Technology*, PAT), iniciativa da *Food and Drug Administration*, FDA) americana [17].

Na última década, uma nova abordagem tem se desenvolvido rapidamente no campo farmacêutico, sendo que as imagens hiperespectrais tem representado uma promessa no fornecimento de informações sobre a distribuição de compostos em formulações farmacêuticas. A combinação de características químicas (espectroscopia molecular) e físicas (imagem digital) foi aplicada com sucesso em diversos campos, como sensoriamento remoto [18,19], astronomia [20,21], agricultura [21,22], indústria alimentícia [23] e farmacêutica [24-26].

Esta capacidade de extrair informações químicas e seu perfil de distribuição na superfície da amostra de fármacos, pode significar uma nova dimensão na caracterização de produtos, ou seja, como os padrões de homogeneidade são

gerados no processo e de que forma estas características podem afetar as propriedades farmacocinéticas dos medicamentos.

No entanto, para mapear a superfície de um medicamento e revelar a distribuição de seu ingrediente ativo e/ou excipientes é preciso transformar dados espectrais em teor de compostos químicos. As análises quantitativas de amostras farmacêuticas utilizando Imagem Química na região do Infravermelho Próximo (*Near Infrared-Chemical Imaging*, NIR-CI) podem ser realizadas através de técnicas como regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares*, PLS) ou PLS para Análise Discriminante (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*, PLS-DA) [24,26,27].

No entanto, essas técnicas de regressão requerem um conjunto completo de amostras de calibração, que devem ser preparadas com o objetivo de construir um modelo robusto, o que requer tempo para que o modelo seja adequadamente desenvolvido e testado. Além disso, existem situações em que simplesmente não é possível desenvolver um modelo robusto por PLS, seja por falta de conhecimento adequado sobre o problema, ou por falta de controle da composição dos interferentes.

Com relação aos propósitos de quantificação, sem a necessidade de um modelo de calibração anterior, a Resolução Multivariada de Curvas por Mínimos Quadrados Alternados (*Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares*, MCR-ALS) pode ser apresentada como uma alternativa promissora pela utilização da chamada vantagem de segunda ordem, isto é, a quantificação de analitos na presença de interferentes desconhecidos. MCR-ALS é um algoritmo que se adapta às exigências para a resolução de imagens [28-31]. Este método decompõe o cubo desdobrado de dados hiperespectrais, a matriz \mathbf{X} ($xy \times \lambda$), para o produto de duas matrizes, \mathbf{C} ($xy \times K$), contendo os perfis de concentração e \mathbf{S}^T ($K \times \lambda$), contendo os perfis espectrais para cada componente K , a Equação 1 mostra a definição acima e a Figura 10 representa como os dados de imagem são utilizados neste trabalho. Neste caso, xy são as dimensões espaciais da imagem e λ o número de variáveis espectrais.

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

onde \mathbf{E} ($xy \times \lambda$) corresponde à matriz de erro experimental.

Para iniciar o processo iterativo do MCR-ALS, é necessária uma estimativa inicial para os perfis espectrais ou para as concentrações. Diferentes métodos tem sido utilizados para esta finalidade, tais como: Análise de Fatores Evolucionários [32-34], determinação da variável ou perfil mais puro [35-38] ou através de espectros de componentes puros [39]. Para que a otimização por ALS convirja a uma solução adequada alguns cuidados devem ser tomados. Para citar alguns: informar o número de espécies presentes na amostra, por exemplo, número de componentes significativos na PCA; informar restrições: não-negatividade de concentração (pois não existe concentração negativa), ou ainda, não negatividade espectral, balanço de massa igual a 100%, etc. Estes fatores, baseados em conhecimento químico, direcionam a solução para uma resposta adequada.

Este trabalho tem como objetivo criar um mapa de distribuição de concentrações (imagens) de citrato de sildenafila em comprimidos de formulações diferentes, em que a composição química de todos os constituintes não é conhecida *a priori*. Para tal, foi utilizado um método empregando MCR-ALS. Além disso, os perfis dos mapas de distribuição de cada comprimido foram avaliados para a obtenção de um reconhecimento de padrão de imagens através da análise de classificação hierárquica não supervisionada dos seus histogramas.

Embora este trabalho tenha sido aplicado à caracterização de produtos ilegais, suas aplicações apontam também para a possibilidade de identificar padrões de distribuição do ingrediente ativo em medicamentos nacionais auxiliando a indústria no desenvolvimento de produtos mais similares ao original. Espera-se que o reconhecimento de padrões de imagens químicas possa caracterizar um produto, ou ainda, a tecnologia de um processo industrial.

3.2 Parte experimental

Neste trabalho, comprimidos de seis formulações diferentes, contendo citrato de sildenafil como ingrediente ativo, foram estudados. Estas formulações (ou produtos) foram nomeadas de A a F. As formulações de A até E foram fornecidas pela Polícia Federal brasileira e correspondem a várias marcas de comercialização proibida no Brasil. A formulação F foi uma amostra autêntica de Viagra® (Pfizer Ltda.). Para cada formulação, foram realizadas 4 aquisições de imagem em comprimidos de um mesmo lote, com o objetivo de ter replicatas autênticas da imagem do produto.

As imagens foram obtidas pela espectroscopia de imagem química na região do infravermelho próximo usando o sistema de imagem Spotlight 400N FT-NIR produzido pela PerkinElmer. Foram utilizados os seguintes parâmetros: tamanho de pixels de 25 μm , 32 varreduras e faixa espectral entre 6500 e 4000 cm^{-1} . O arranjo de dados (80 x 80 pixels e 158 comprimentos de onda) foi obtido diretamente da superfície (4 mm^2) dos comprimidos após a remoção do revestimento com lâmina de barbear. Os dados brutos foram transformados no logaritmo inverso da reflectância (pseudo absorvância) e desdobrados para correção de espalhamento multiplicativo (MSC). Considerando que apenas o citrato de sildenafil é conhecido *a priori*, foi escolhida a técnica de MCR [31] para construção dos mapas de distribuição. A otimização por mínimos quadrados alternados (ALS) foi inicializada pelos pesos (*loadings*) da Análise de Componentes Principais (PCA) usando os dados centrados na média. Após a primeira etapa de otimização, o perfil espectral otimizado mais similar ao espectro do padrão foi substituído pelo espectro do padrão puro (fornecido pela indústria) e submetido novamente ao processo de otimização. Os mapas de distribuição obtidos por MCR foram convertidos a histogramas de frequência de pixels por faixa de concentração. Estes histogramas foram normalizados e analisados por Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Esta técnica foi utilizada para classificação não supervisionada do padrão de homogeneidade de imagens químicas. A análise dos dados foi realizada em Matlab versão 7.8 utilizando

rotinas desenvolvidas em laboratório e algoritmo fornecido por Romà Tauler [31]. A Figura 10 mostra a estratégia utilizada.

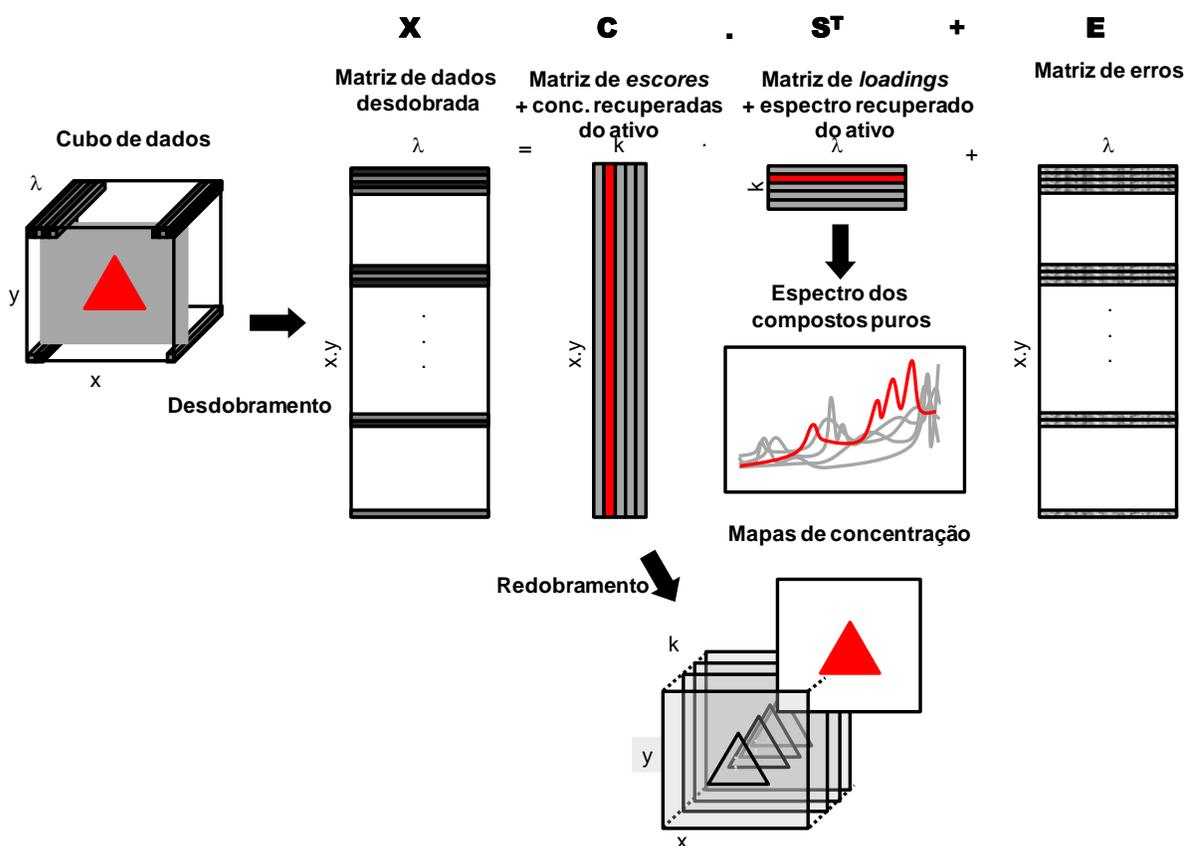


Figura 10 – Estratégia de obtenção de imagens químicas do citrato de sildenafil por MCR-ALS.

É importante notar que apenas a informação do ativo é recuperada, os demais componentes contribuem para a recuperação da matriz X , podendo apresentar alguma ambiguidade rotacional irrelevante para o escopo deste trabalho.

3.3 Resultados e discussões

O primeiro passo no desenvolvimento do método por MCR-ALS foi a inicialização do modelo usando os pesos (*loadings*) obtidos por análise de

componentes principais (PCA). O uso de pesos para a inicialização do MCR-ALS pode ser problemático para a otimização da matriz **C** (concentração), uma vez que a ambiguidade rotacional está presente nesta situação. Em outras palavras, a abordagem quantitativa utilizada na resolução multivariada, Equação 1, é matematicamente a mesma informação qualitativa da matriz **T** (scores) e matriz **P** (loadings), obtida por PCA, Equação 2.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (2)$$

Neste caso, a matriz **C** poderia trazer a informação qualitativa da matriz **T** devido à inicialização do ALS por pesos (loadings), Equação 2. Neste sentido, a utilização da matriz **S**, com perfis espectrais puros e restrições adequadas é frequentemente uma forma para minimizar as ambiguidades e recuperar informações quantitativas de concentração. No entanto, os espectros mais puros podem apresentar número de condição elevado em imagens relativamente homogêneas (isto é, elevada similaridade entre toda a informação espectral), enquanto os pesos **P** são sempre ortogonais com número de condição igual a um. Em MCR-ALS, a matriz **E** (erros) pode ser vista como a falta de ajuste do produto da matriz **C** com a matriz **S** para a recuperação da matriz **X**. Para obter bons resultados, é desejável reduzir a sensibilidade da matriz **E**. Neste sentido, um número condição menor da matriz **S** contribui para maior robustez da matriz **C**.

Devido ao uso de pesos combinados com o espectro puro do citrato de sildenafil para a inicialização de MCR-ALS, uma elevada ortogonalidade foi alcançada. Além disso, os resultados da otimização por MRC-ALS, Figura 11, mostram recuperações excelentes para os espectros de ingrediente ativo para todas as formulações estudadas.

Na Figura 11, os espectros pontilhados foram obtidos diretamente a partir de um padrão de citrato de sildenafil comprimido, enquanto os espectros em traços sólidos foram obtidos por MCR-ALS.

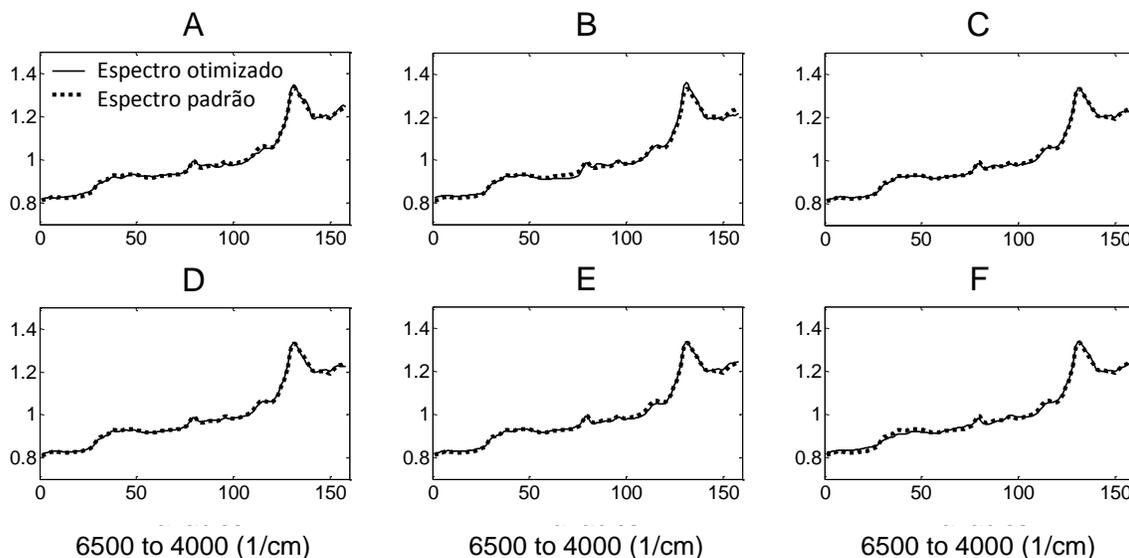


Figura 11 - Sobreposição dos espectros pré-processados de citrato de sildenafil: padrão (pontilhado) e otimizado por MCR-ALS (linha sólida). Formulações dos produtos de A até F.

É pertinente notar que a informação recuperada do processo de otimização de MCR-ALS está altamente correlacionada com o espectro conhecido do padrão de citrato de sildenafil. Além disso, os pesos da PCA garantiram menor correlação entre os perfis do ativo e todos os excipientes, ajudando a aumentar a seletividade dos resultados para a abordagem quantitativa.

Este procedimento é especialmente interessante para análise onde os componentes não são totalmente conhecidos, mas apenas uma parte da informação está disponível, neste estudo: o ingrediente ativo. A falta de ajuste inferior a 1% entre cada resultado de MCR-ALS e a matriz \mathbf{X} original adicionados à boa recuperação dos espectros otimizados de citrato de sildenafil garantem a confiabilidade das imagens obtidas. O cálculo da falta de ajuste foi realizado utilizando a Equação 3:

$$falta\ de\ ajuste\ (\%) = \sqrt{\frac{\sum (x_{ij}^* - x_{ij})^2}{\sum x_{ij}^2}} \times 100 \quad (3)$$

Onde x_{ij} é um elemento da matriz experimental \mathbf{X} e x_{ij}^* é o elemento da matriz \mathbf{X}^* reproduzida pelo MCR-ALS.

Na Figura 12, os mapas de concentração de 4 comprimidos diferentes para cada formulações (A até F) são mostrados. Pode-se observar que no produto A, existe uma série de grandes regiões heterogêneas (em azul), devido ao excipiente com partículas grandes e densas, também observado nos comprimidos por meio de microscopia óptica. Na segunda linha, B, um perfil um pouco diferente surge, pontos menores e mais densos do ativo pode ser visto. Nas próximas duas amostras C e D, as imagens são mais homogêneas e similares. Estas formulações têm características muito semelhantes, apresentam a mesma marca, porém com algumas diferenças visuais de embalagem e lotes distintos. Assim como a formulação A, a formulação E é reconhecida pela homogeneidade baixa, mostrando grandes áreas de ausência de sildenafil. A formulação F, formulação do Viagra®, apresenta um perfil muito homogêneo de concentração. Além disso, é possível observar um padrão de distribuição mais homogêneo entre comprimidos diferentes do fármaco original, ou seja, sugere um melhor controle de qualidade entre comprimidos.

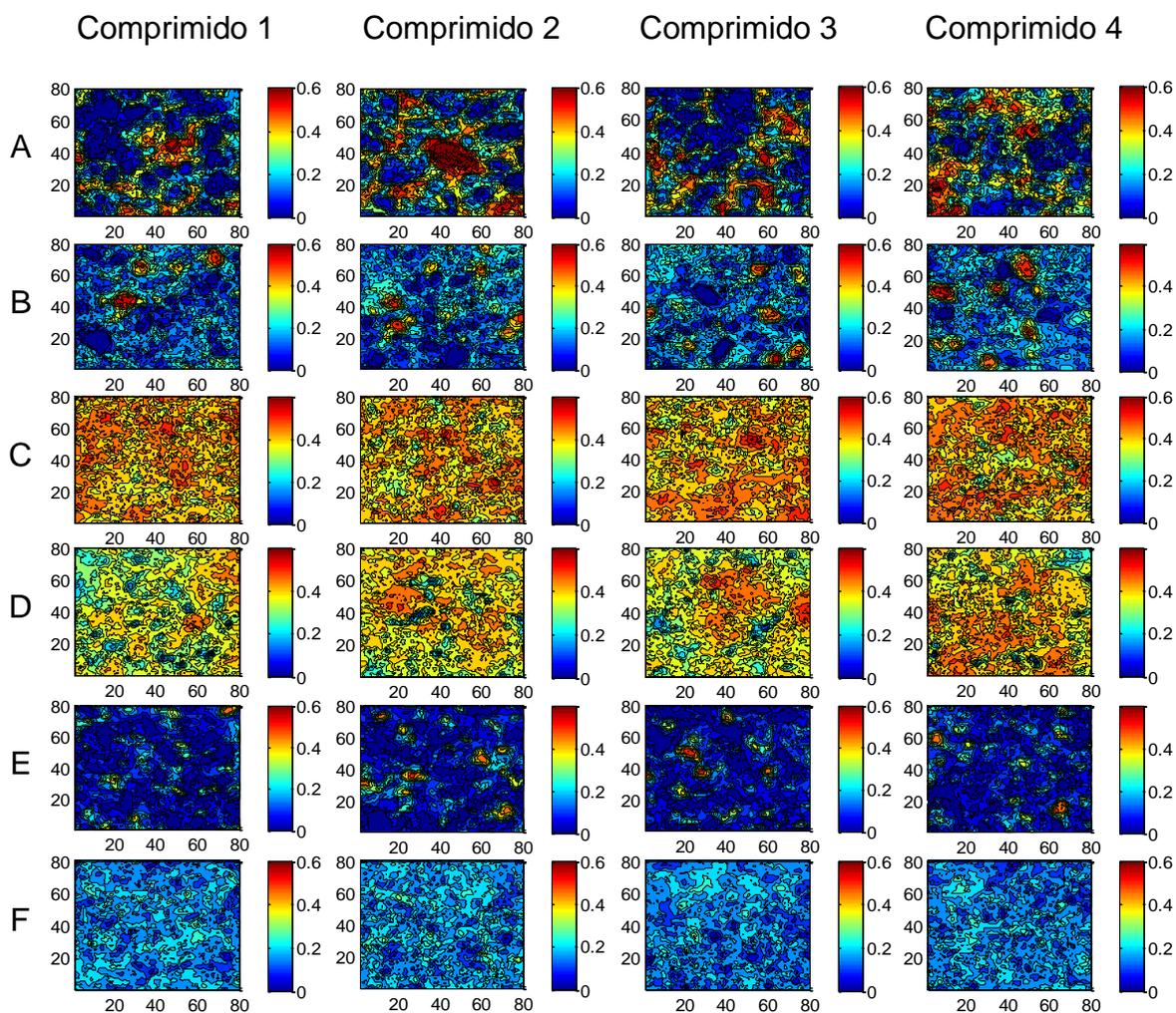


Figura 12 - Mapas de distribuição de concentrações de citrato de sildenafil obtidos por MCR-ALS. Produtos de A até F em replicatas.

As imagens da Figura 12 podem ser traduzidas em histogramas de distribuição de frequências de concentrações. Este tipo de análise dos resultados remove a componente espacial xy da informação adquirida, mas mantém a possibilidade de observar o perfil de distribuição, isto é, a homogeneidade da distribuição do citrato de sildenafil.

Na Figura 13, os histogramas foram normalizados de modo que a concentração média seja igual a um. Assim, torna-se possível analisar o perfil de histogramas, independentemente da sua fração de massa na superfície comprimidos.

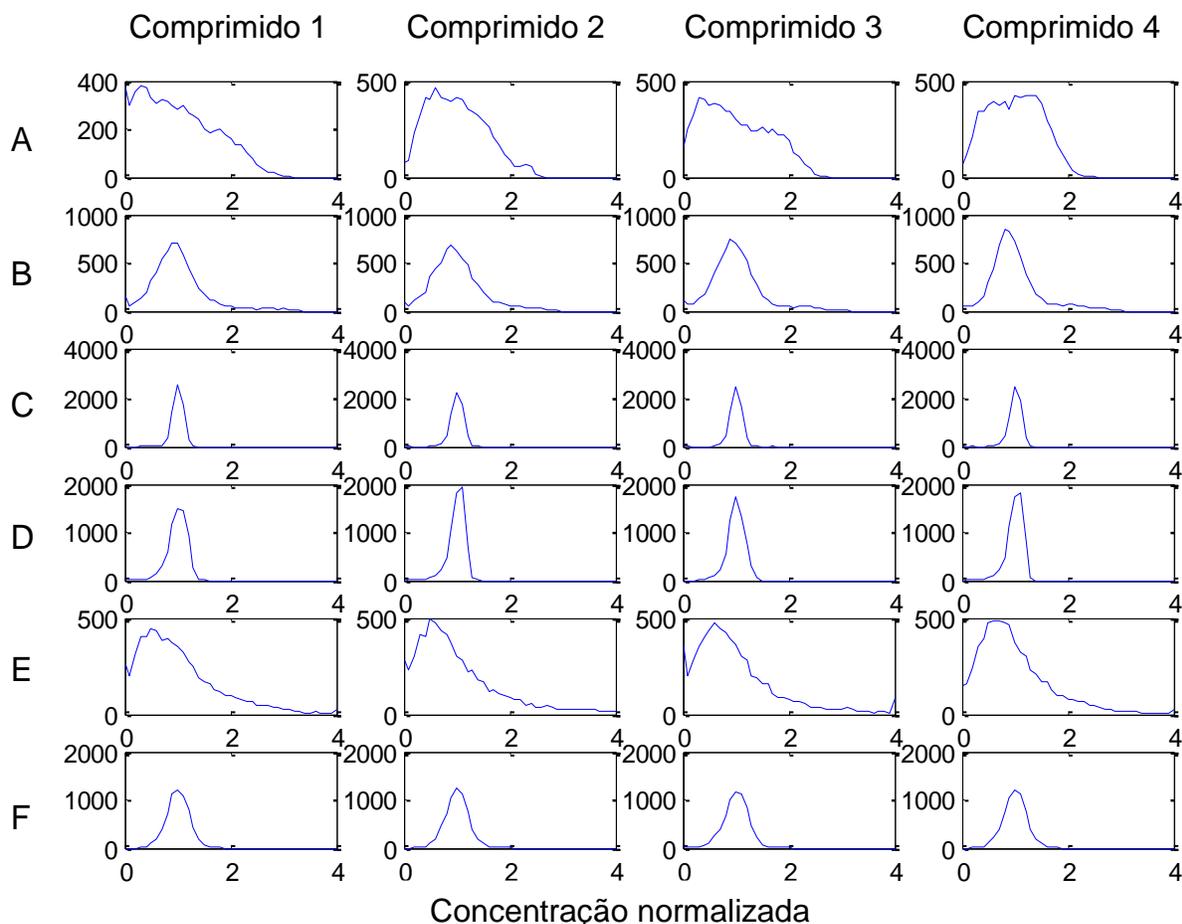


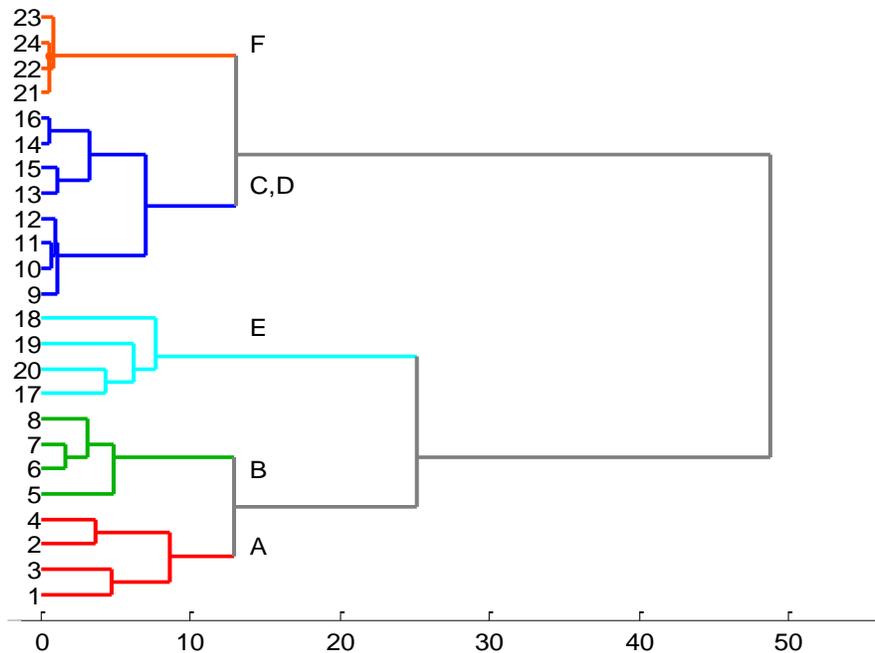
Figura 13 - Histogramas do perfil de distribuição de citrato de sildenafil. Produtos de A até F em replicatas.

O histograma é uma técnica gráfica para mostrar tanto a assimetria como a curtose do conjunto de dados. Neste caso é representado pela distribuição de frequências de concentrações (eixo y) e concentrações normalizadas (eixo x). Curtose é uma medida para saber se a forma de distribuição dos dados é mais pontiaguda (formato de pico) ou plana (achatada) relativamente a uma distribuição normal. Curtose negativa indica uma distribuição plana, chamada platicúrtica. Curtose positiva indica uma distribuição em formato de pico, chamada leptocúrtica. Finalmente, a distribuição normal tem zero de curtose, e diz-se ser mesocúrtica. Na Figura 13, é possível comparar a curtose da distribuição das drogas D e F em mesocúrtica, porque entre as drogas analisadas elas têm uma distribuição da concentração mais homogênea e gaussiana na superfície do fármaco. Para os

fármacos A, B e E a curtose pode ser classificada como platicúrtica, porque são menos homogêneas e visivelmente achatadas se comparadas a uma distribuição gaussiana. Para a droga C a curtose pode ser entendida como leptocúrtica. Porém este não é o único aspecto objetivo para avaliar histogramas.

A assimetria é uma medida da falta de simetria de uma distribuição, ou seja, a área de um lado da mediana é diferente da área da outra metade. A partir da observação da Figura 13, pode-se inferir que, nas formulações A e E, a distribuição das concentrações de citrato de sildenafil na superfície é mais assimétrica, devido à heterogeneidade causada pelas partículas de excipientes nessas formulações. Por outro lado, B, C, D e F têm os mapas de concentrações mais simétricos dentre as formulações estudadas, uma vez que os tamanhos das partículas e/ou os processos de homogeneização são mais homogêneos. Como consequência, é possível aplicar técnicas de classificação de histogramas para agrupar similaridades entre estas características (curtose e assimetria) e estudar homogeneidade de formulação em fármaco.

Com o objetivo de se obter um padrão de reconhecimento da distribuição de concentrações de citrato sildenafil em comprimidos, foi usado um método quimiométrico muito bem estabelecido chamado, Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Este método baseia-se nas distâncias multivariadas entre as amostras usando um procedimento de aglomeração por similaridade. A classificação não supervisionada revela a similaridade de distribuição do ativo em diferentes formulações. Assim, o reconhecimento de imagens e a sua variabilidade é um parâmetro importante para o estudo intra e entre produtos. O dendrograma, Figura 14, mostra os diferentes grupos para cada formulação de droga e sugere um método eficaz para identificar o produto ou o processo de fabricação. Este princípio pode ser útil para identificar um tipo diferente de falsificação, incluindo drogas que apresentam quantitativamente a mesma composição química, mas diferentes processos de homogeneização, ou diferentes características das partículas utilizadas. Estes padrões são identificados a partir de características físicas da imagem química obtida.



Distância ponderada pela variância entre os centros dos dados autoescalados.

Figura 14 - Histogramas de distribuição de frequência de pixels por faixas de concentração normalizada. Produtos de A até F em replicatas.

De acordo com o exposto anteriormente, os histogramas estão centrados na média igual a um. Isso foi feito para evitar que as diferentes concentrações dos fármacos deslocassem os perfis de distribuição dos histogramas e que apenas os parâmetros relacionados à assimetria e a curtose fossem avaliados. Esta avaliação traduz um padrão de heterogeneidade na distribuição do citrato de sildenafil na superfície das amostras, o que caracteriza o produto independente da sua concentração. Os histogramas foram utilizados como objetos (amostras) para subsequente classificação não supervisionada por HCA. Analisando o dendograma na Figura 14 é possível perceber agrupamentos diferentes para cada produto farmacêutico sugerindo ser um método efetivo para caracterização de produtos e/ou processo de fabricação. Observa-se que os comprimidos foram agrupados conforme suas similaridades. Quanto mais próximas as distâncias entre os centros dos grupos, mais parecidos são os conjuntos de imagens. Assim, a Figura 14 mostra os grupos A, B e E menos similares em relação às amostras C,

D e F. Observando as imagens (Figura 12), os histogramas (Figura 13) e os dendogramas (Figura 14), de fato, as três avaliações apontam no mesmo sentido em relação à homogeneidade dos comprimidos. O comprimido F trata-se do medicamento pioneiro na utilização do citrato de sildenafila (Viagra®), apresentando, de longe, a maior similaridade entre imagens. Os comprimidos C e D são de uma mesma marca, mas com embalagens diferentes o que poderia sugerir alteração no processo de fabricação do produto ao longo do tempo. Neste caso, o dendograma mostra diferenças dos dois produtos quando analisados a um nível de similaridade maior (as amostras de 9 à 12 são diferentes das amostras 13 à 16).

3.4 Conclusões

Neste trabalho, foi explorada a técnica de mapeamento químico por espectroscopia no infravermelho próximo em medicamentos onde a composição da formulação não é totalmente conhecida. Em tais casos, é muito difícil de estabelecer um método de calibração apropriado, de modo que apenas a informação do ativo seja considerada independentemente dos excipientes. Os resultados obtidos sugerem uma solução em que a MCR-ALS, através da vantagem de segunda ordem, pode ser aplicada com sucesso. Além disso, as imagens do citrato de sildenafila foram adequadamente exploradas por classificação não-supervisionada de histogramas de suas imagens.

Esta metodologia traz uma abordagem complementar ao reconhecimento de padrões químicos obtido em espectroscopia de infravermelho tradicional, já que é a característica física da imagem que é avaliada. A NIR-CI pode ser útil tanto para desenvolvimento de produtos, onde se pretende alcançar uma homogeneidade adequada ou similar ao medicamento referência, quanto para o reconhecimento de falsificação com mesma composição química. Os estudos de imagens químicas de compostos podem ser uma nova abordagem para controle de qualidade e/ou desenvolvimento de produtos na indústria farmacêutica.

3.5 Referências Bibliográficas

- [1] Tinnemann P., Ozbay J., Saint V. A., Willich S. N. *PLoS ONE* 2010, 5, e14059.
- [2] Tsai, B. H. *Issues Stud.* 46 (2010) 173.
- [3] Rastogi T. *J. Intel. Prop. Rig.* 15 (2010) 302.
- [4] Chapman A. R. *J. Inter. Econ. Law.* 5 (2002) 861.
- [5] Pomara G., Morelli G., Pomara S., Taddei S., Ghiadoni L., Dinelli N., Travaglini F., Dicuio M., Mondaini N., Salvetti A., Selli C. *J. Androl.*, 25 (2004) 625.
- [6] Gousse A. E., Lambert M., Kester R. *Top. Spinal Cord Inj. Rehabil.* 8 (2002) 51.
- [7] Yang Y. J., Song D. M., Jiang W. M., Xiang B. R. *Anal. Letters.* 43 (2010) 373.
- [8] Abourashed E. A., Abdel-Kader M. S., Habib A. A. M. *J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC.* 18 (2005) 372.
- [9] Cai Y., Cai T. G., Shi Y., Cheng X. L., Ma L. Y., Ma S. C., Lin R. C., Feng W. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 33 (2010) 1287.
- [10] Berzas J. J., Rodríguez J., Villaseñor M. J., Contento A. M., Cabello M. P. *Chromatographia.* 55 (2002) 601.
- [11] Tyszczyk K., Korolczyk M. *Bioelectrochem.* 78 (2010) 113.
- [12] Stefan-van S., Raluca-Ioana, van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y. *J. Solid State Electrochem.* 14 (2010) 997.
- [13] Issa Y. M., El-Hawary W. F., Youssef A. F. A., Senosy, A. R. *Spectrochim. Acta A.* 75 (2010) 1297.
- [14] Amin A. S., Moustafa E., El-Dosoky R. M. S. *J. AOAC Intern.* 92 (2009) 125.
- [15] Rocha W. F. C., Rosa A. L., Martins J. A., Poppi R. J. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (2010) 1904.
- [16] Rocha W. F. C., Rosa A. L., Martins J. A., Poppi R. J. *J. Mol. Struct.*, 982 (2010) 73-78.
- [17] US Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry, PAT – A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, FDA (CDER), 2004. Acessado em 13/09/2012:

www.fda.gov/cder/OPS/PAT.htm

- [18] Kokaly R. F., Asner G. P., Ollinger S. V., Martin M. E., Wessman C. A. *Remote Sens. Environ.* 113 (2009) 78.
- [19] Sabins F.F. *Geol. Rev.* 14 (1999) 157.
- [20] Gao B. C., Montes M. J., Davis C. O., Goetz A. F. H. *Remote Sens. Environ.* 113 (2009) 17.
- [21] Verrelst J., Schaepman M. E., Malenovsk Z., Clevers J. G. P. W. *Remote Sens. Environ.* 114 (2010) 647.
- [22] Sommer S., Hill J., Mégier J. *Agric. Ecosyst. Environ.* 67 (1998) 197.
- [23] Gowen A. A., O'Donnell C. P., Cullen P. J., Downey G., Frias J. M. *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 590.
- [24] Gendrin C., Roggo Y., Collet C. *Talanta.* 73 (2007) 733.
- [25] Roggo Y., Edmond A., Chalus P., Ulmschneider M. *Anal. Chim. Acta.* 535 (2005) 79.
- [26] Ravn C., Skibsted E., Bro R. J. *Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 554.
- [27] Amigo J. M., Cruz, J., Bautista, M., Maspoch, S., Coello, J., Blanco, M. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 696.
- [28] de Juan, A., Tauler, R. *Anal.Chim. Acta.* 500 (2003) 195.
- [29] Tauler, R., Smilde, A. K., Kowalski, B. R. J. *Chemom.* 9 (1995) 31.
- [30] Tauler, R. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133.
- [31] Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76 (2005) 101.
- [32] Windig W., Stephenson D. A. *Anal.Chem.* 64 (1992) 2735.
- [33] Gamp H., Maeder M., Meyer C. J., Zuberbuhler A. D. *Talanta.* 33 (1986) 943.
- [34] Maeder M. *Anal. Chem.* 59 (1987) 527.
- [35] Sanchez F. C., Toft J., Vanden Bogaert B., Massart D. L. *Anal. Chem.* 68 (1996) 79.

[36] Sanchez F. C., Vandeginste B. G. M., Hancewicz T. M., Massart D. L. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1477.

[37] Windig W., Guilment J. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425.

[38] Sabin G. P., Breikreitz M. C., de Souza A. M., da Fonseca P., Calefe L., Moffa M. Poppi R.J. *Anal.Chim. Acta.* 706 (2011) 113.

CAPÍTULO 4

ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM QUÍMICA NA REGIÃO DO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO E QUIMIOMETRIA: ESTUDO DA
MICRO-HOMOGENEIDADE DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS
COM BAIXO TEOR DE INGREDIENTE ATIVO.

4.1 Introdução

As aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) tem despertado interesse na área farmacêutica como meio de quantificação [1,2], identificação [3] e controle de parâmetros físicos [4,5] e químicos [6]. Atualmente, várias instituições, como o Grupo de Ciências Analíticas e Farmacêuticas (PASG) e a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), vêm recomendando metodologias baseadas em espectroscopia de infravermelho próximo como uma alternativa analítica para controle de qualidade dos produtos farmacêuticos, devido às vantagens já conhecidas em relação aos métodos cromatográficos.

A espectroscopia de infravermelho próximo não é uma técnica particularmente sensível [7] devido às características dos fenômenos que são medidos. No entanto, pode ser muito útil para os propósitos das indústrias farmacêuticas. Assim, a sua importância pode estar relacionada tanto a um rápido acompanhamento de processo, quanto ao controle de qualidade das várias etapas da produção de um fármaco [8], possibilitando inclusive a integração de dados de diferentes etapas de um processo farmacêutico [9].

Na espectroscopia de infravermelho próximo, os espectros podem ser obtidos de uma região ampla da amostra, ou em um número pré-definido de regiões discretas da superfície amostral. Nesta segunda abordagem, os espectros são equivalentes aos pixels de uma imagem da propriedade de interesse após abordagem quimiométrica apropriada [10,11].

As chamadas técnicas hiperespectrais, principalmente, de infravermelho médio, infravermelho próximo e Raman são utilizadas para fornecer uma quantidade enorme de informações espectrais a partir da superfície de uma amostra, constituindo mapa de distribuição de concentrações [12,13]. A importância das informações de superfície, juntamente com métodos adequados de análise de dados, abriu vias para novas pesquisas em produtos farmacêuticos, oferecendo excelentes possibilidades para a obtenção de resultados mais informativos sobre produtos [14] ou processos farmacêuticos [8].

Analisando as imagens químicas, é possível verificar a distribuição dos constituintes em comprimidos [15], polimorfismo [16], estudos de segregação em preparações farmacêuticas [14], granulação [5], estudo de pellets [17], entre outros [13,19-23]. Portanto, a espectroscopia de imagem química é uma ferramenta que permite obter informações adicionais sobre formulação farmacêutica. O emprego de NIR-CI vai de encontro às iniciativas das tecnologias analíticas de processos (PAT) [11,23,24], tornando o NIR-CI uma técnica promissora. As novas tecnologias podem ser utilizadas não apenas para monitorar, mas também para otimizar a eficiência no uso de energia, tempo e matéria-prima, contribuindo para a sustentabilidade e menor impacto ambiental. E mais, contemplam de maneira integrada princípios de química analítica, quimiometria, sistemas de gestão da qualidade, entre outros.

Métodos multivariados podem ser adaptados para análise de imagem fornecendo informações locais e globais sobre compostos presentes nas amostras. Conhecer em detalhes como os compostos químicos são distribuídos sobre a superfície de varredura fornece informações valiosas sobre questões essenciais na fabricação e caracterização de produtos farmacêuticos, como a regularidade da composição e, portanto, a homogeneidade, este sendo um ponto importante na fabricação comprimidos com baixo teor de ativo.

A formulação de produtos farmacêuticos é um trabalho científico que envolve desenvolvimento de forma e dosagem adequada para excipientes e ativo, levando em conta as características físicas, químicas e propriedades farmacológicas, vias de administração, processo de fabricação e forma de consumo do produto final. O objetivo da indústria farmacêutica é projetar um produto de qualidade e um processo de fabricação robusto para a produção de medicamentos, assegurando que um produto tenha seus excipientes igualmente distribuídos na forma farmacêutica comercializada.

A tecnologia de mapeamento químico envolve o conhecimento dos fenômenos detectados por NIRS, um sistema de microespectroscopia capaz de varrer a superfície da amostra e a análise multivariada dos dados espectrais para

obtenção dos mapas de distribuição de concentração (imagens químicas) dos compostos presentes na superfície dos comprimidos. As informações obtidas por NIR-CI são úteis a medida que trazem conhecimento adicional sobre a formulação farmacêutica através das características da matéria-prima e do processo de fabricação. Assim, as imagens de ativos e excipientes apresentam grande potencial para a etapa de desenvolvimento de novos produtos.

Em análises quantitativas de amostras farmacêuticas, os métodos de calibração multivariada apresentam vantagem na determinação de compostos na mistura, evitando a separação preliminar [25].

O método utilizado neste trabalho foi regressão dos mínimos quadrados clássicos (CLS). Este método é aplicado para matrizes de dados \mathbf{X} (objetos por variáveis). Assim os dados hiperespectrais $(x.y.\lambda)$ devem ser desdobrados em uma matriz \mathbf{X} $(xy.\lambda)$, onde xy representa as coordenadas espaciais dos pixels antes da análise de dados e λ a dimensão espectral. O processo de desdobramento é ilustrados na Figura 15.

No estudo realizado, todos os espectros dos componentes puros são disponíveis, uma das exigências da calibração direta, e efeitos de interação não são observados. Neste caso, o CLS pode ser aplicado diretamente. O método CLS pressupõe que cada medida é a média ponderada da soma de sinais linearmente independentes, ou seja, o espectro de cada pixel é a soma de todos os espectros de componentes puros ponderada pelas concentrações [12]. Matematicamente, o CLS recupera a matriz \mathbf{X} de dados espectrais da seguinte forma (veja o esquema na Figura 15), Equação 1:

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

onde \mathbf{C} é a matriz contendo a concentração de cada componente, \mathbf{S} é a matriz contendo os espectros de componentes puros e \mathbf{E} é a matriz de erros.

Na Figura 15, as concentrações dos k componentes na amostra são previstas, e os vetores correspondentes são redobrados dando origem a k mapas

de distribuição, que permitem a localização de cada componente. A informação espectral contida em cada pixel deve ser extraída para fornecer um conjunto de imagens que mostra a distribuição química de cada ingrediente na superfície da amostra. Com a adição de informações espaciais, NIR-CI certamente acrescenta um novo potencial analítico às necessidades e desafios de controle de processos e garantia de qualidade farmacêutica.

Neste trabalho foram utilizadas imagens de comprimidos de carbegolina, que é um agonista dopaminérgico derivado do ergot, ou seja, atuam estimulando o cérebro e as células nervosas de forma semelhante à dopamina, uma substância mensageira do sistema nervoso. Grupos de antagonistas da dopamina denominam-se “derivados da ergotamina” porque foi produzido, pela primeira vez, a partir de um tipo de fungo denominado cravagem do centeio (*ergot*) [26]. Atualmente, o comprimido de carbegolina é analisado por HPLC, mostrando através dos cromatogramas a concentração global do fármaco na amostra. Os resultados são utilizados para obter o teor e avaliar a homogeneidade de um lote de medicamento. Esta abordagem necessita uma etapa de extração com solventes e consequente destruição das amostras. Neste sentido, o NIR-CI surge como uma técnica alternativa, obtendo informações locais (ou discretas) da superfície da amostra, com preparo mínimo da amostra, sem uso de solventes e com possibilidade de reanálise. A distribuição de ativos e excipientes em um comprimido pode ser observada através de imagens, dando informações importantes para o processo de formulação. Atualmente, esta técnica tem despertado interesse para novos estudos no desenvolvimento farmacêutico, suportado por diagnósticos visuais de qualidade [16].

Este trabalho tem por objetivo acompanhar o desenvolvimento industrial de um produto farmacêutico com baixo teor de ativo (0,5% m/m), auxiliando no processo de decisão em termos de micro-homogeneidade da formulação. Este estudo aplicado em um caso real de desenvolvimento de produto industrial.

4.2 Parte experimental

Neste trabalho foram estudados comprimidos de carbegolina composto por 98% de diluente, 1,5% de lubrificante e 0,5% do ativo. A forma farmacêutica, um comprimido biconvexo liso, resulta da prensagem da mistura dos componentes. As ordens de misturas e proporções em cada etapa, não estão no escopo da discussão deste trabalho e foram avaliados internamente na indústria.

Para elaboração dos modelos utilizados, foram obtidos espectros de uma área de cada comprimido de componente puro. O espectro médio de cada composto foi utilizado para construção do modelo de previsão de imagens químicas.

As imagens espectrais foram obtidas utilizando um equipamento Spotlight 400N FT-NIR Imaging da PerkinElmer. O sistema foi ajustado com os seguintes parâmetros instrumentais: resolução espacial de 25 μm (para garantir boa resolução de imagem), 8 varreduras por pixel, resolução espectral de 16 cm^{-1} e faixa espectral entre 7800 e 4000 cm^{-1} . A aquisição de dados foi realizada diretamente da superfície da amostra, após o corte transversal da camada convexa do comprimido, a fim de evitar desfocalização. A matriz de dados foi composta por 78.400 espectros (280 x 280 pixels de imagem) e 239 números de ondas por amostra. Os dados brutos foram desdobrados numa matriz **X** com os espectros dos pixels nas linhas e número de ondas nas colunas, transformados em logaritmo inverso da reflectância, suavizados com filtro Savitzky-Golay e normalizados pela variação normal padrão (SNV) para eliminação efeitos causados por propriedades físicas da amostra [15-17]. Considerando que toda a composição do comprimido é conhecida *a priori*, foi escolhida a técnica de CLS para a construção dos mapas de distribuição. Os mapas de distribuição de concentrações obtidos por CLS foram avaliados visualmente em busca de micro-homogeneidade.

Na Figura 15, **C** é a matriz contendo as concentrações dos componentes, **S** é a matriz contendo os espectros de componentes puros e **E** é a matriz de erro. A

concentração dos k componentes na amostra são calculadas, e os vetores correspondentes são redobrados dando origem a k mapas de distribuição, que permitem a localização de cada componente mostrados na Figura 15.

O procedimento de obtenção de imagens descrito anteriormente foi aplicado para 5 lotes de medicamentos produzidos pela indústria. Para cada lote, dez comprimidos foram analisados com o objetivo de avaliar diferentes processos de homogeneização.

A Figura 15 resume a estratégia utilizando CLS.

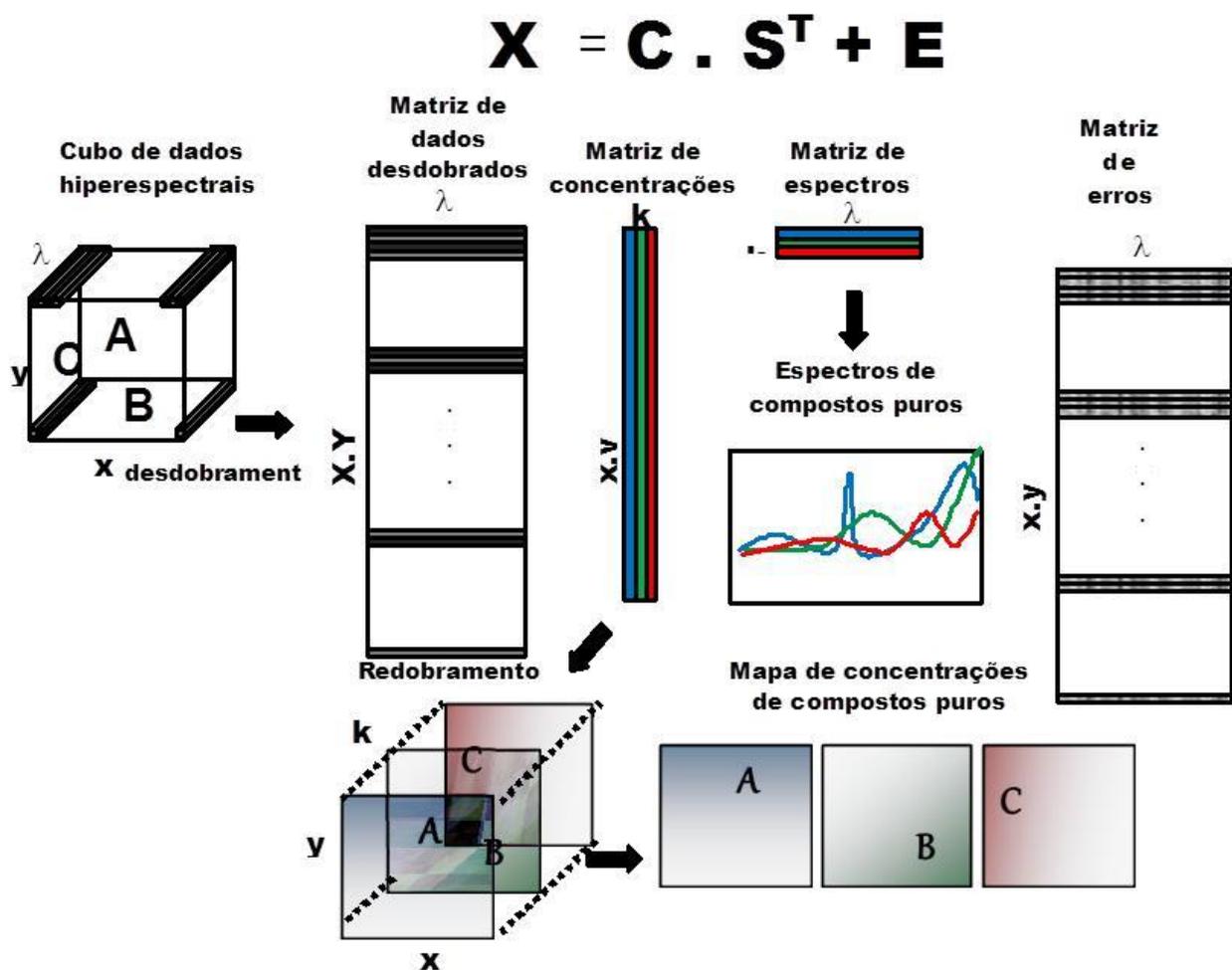


Figura 15 - Imagem química pela abordagem CLS. A, B e C representam os componentes químicos da amostra. As cores representam informações químicas resolvidas.

4.3 Resultados e discussões

A tecnologia NIR-CI pode fornecer imagens químicas importantes para a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. No entanto, para que seja possível alcançar resultados apreciáveis em microespectroscopia NIR, é necessário que se realize uma análise criteriosa dos dados através de pré-processamentos adequados. Estas etapas incluem normalmente a seleção de regiões de interesse (ROI), correção de espalhamento multiplicativo, suavização espectral e normalização. A Figura 16 mostra uma imagem bruta (% de reflectância média por pixel). Esta imagem é proveniente diretamente do software do equipamento e não há informação química apreciável antes de um tratamento de dados adequado.

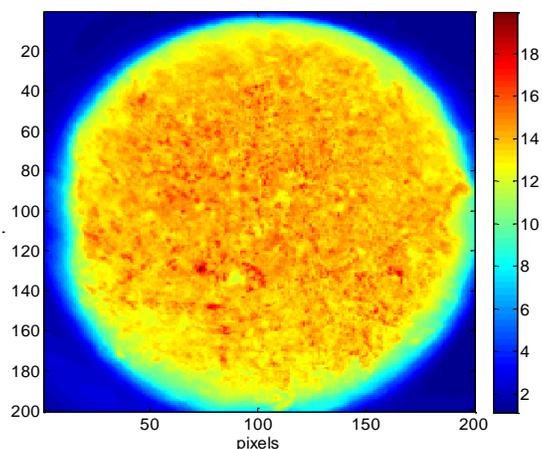


Figura 16 - Imagem em % de reflectância média por pixel.

Assim, para quantificar informações químicas relevantes por ferramentas quimiométricas, é necessário uma série de etapas de pré-processamentos. Neste trabalho, a Figura 17 mostra a sequência de pré-processamentos utilizados para extrair dos dados brutos, obtidos diretamente pelo equipamento, informação relevante para obtenção de imagens químicas.

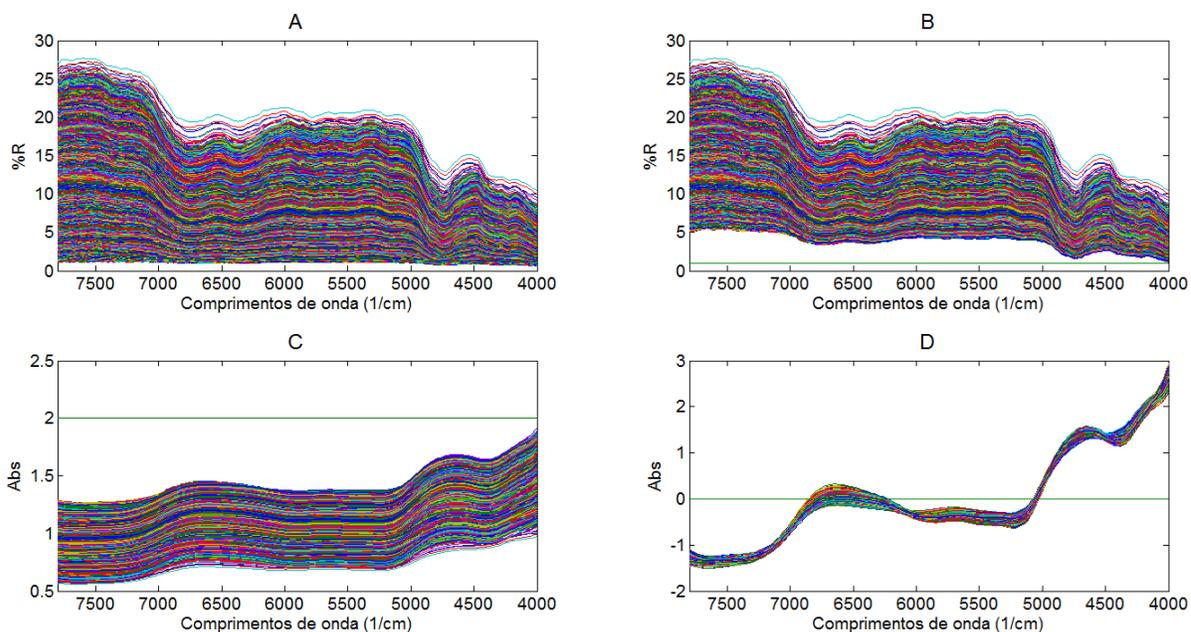


Figura 17 - Sequência de pré-processamentos. A) espectros brutos; B) espectros da região de interesse; C) espectros em absorvância e suavizados; D) espectros normalizados (SNV).

A Figura 17A mostra a sobreposição espectral dos dados brutos obtidos diretamente da superfície da amostra. Neste quadro, é possível observar que existe um forte efeito físico de espalhamento multiplicativo (até 30% de reflectância) devido a irregularidades da superfície da amostra e tamanho de partículas. Ainda na Figura 17A, observa-se uma quantidade significativa de espectros com reflectância muito baixa (menor que 4%, em média) devido aos espectros obtidos fora dos limites da superfície do comprimido. Para limitar a ROI foi necessário a aplicação de um filtro que eliminou espectros com reflectância média menor que 4%. O resultado deste procedimento pode ser observado na Figura 17B, onde um número expressivo de pixels (espectros) foram eliminados da imagem. No próximo passo, Figura 17C, os espectros foram transformados em pseudo-absorvância através do $\log_{10}(1/R)$. Este procedimento é utilizado para permitir uma relação quantitativa do sinal analítico com a concentração dos compostos presentes na formulação. Um alisamento (ou suavização) do sinal espectral também pode ser visualizado na Figura 17C, sendo possível notar uma

perda de informações qualitativa dos esespectros em função da grande janela de alisamento. Este tamanho de janela (51 variáveis) é incomum em alisamentos espectrais, porém esta medida foi tomada com o objetivo de diminuir o ruído espectral, já que nesta formulação de 3 compostos não haviam semelhanças entre os espectros puros, não havendo portanto, prejuízo no poder preditivo dos modelos. Assim, foi possível ganhar em velocidade de aquisição de imagens pelo baixo número de varreduras utilizado. Por último, Figura 17D, foi realizada uma correção do espalhamento (informação física) e normalização através da aplicação de SNV. Após a série de etapas descritas acima, nota-se o surgimento da informação química presente no conjunto de dados. Ou seja, a maior variância passou a ser atribuída ao perfil espectral (característica química) e não ao deslocamento vertical (característica física) dos espectros.

Neste estudo, os compostos puros, presentes na formulação do comprimido, foram analisados pelo mesmo procedimento descrito anteriormente, o que tornou possível a obtenção de um espectro característico de cada composto da amostra. A Figura 18 mostra a sobreposição dos espectros utilizados para a realização da quantificação por CLS. O número de condição da matriz é menor que 10, indicando que é seletiva para a obtenção das imagens químicas dos três compostos da formulação.

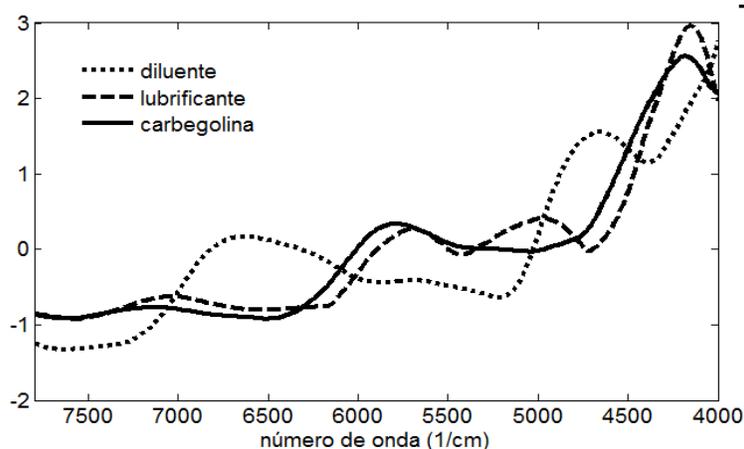


Figura 18 - Sobreposição dos espectros puros de compostos presentes no comprimido.

A partir dos espectros puros \mathbf{S} e da matriz desdobrada \mathbf{X} , foi possível obter a estimativa da matriz de concentrações $\hat{\mathbf{C}}$ através da Equação 2.

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

Esta matriz de concentrações foi redobrada, conforme o esquema mostrado na Figura 15, gerando os mapas de concentração de cada composto, Figura 19.

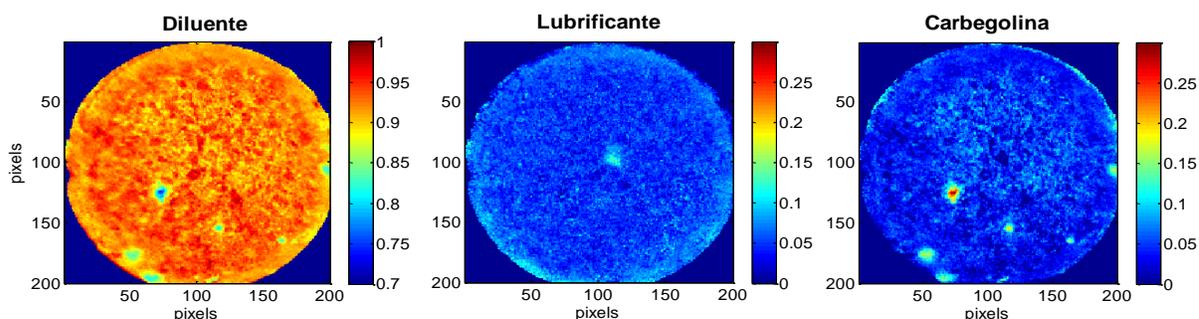


Figura 19 - Mapas de distribuição de concentrações dos compostos presentes na amostra.

É importante notar que as imagens mostram apenas informações químicas da região de interesse (na superfície da amostra). O perfil de distribuição do diluente aparece acima de 90% (ou 0,9 na escala da Figura 19). No entanto, em algumas regiões existem aglomerados de carbegolina, representando concentrações de até 30%. O lubrificante encontra-se homogeneamente distribuído até um limite de aproximadamente 10% em alguns pontos da imagem.

Na Figura 20, cada linha de imagem refere-se a um lote de produção, ou seja, um processo de homogeneização testado pela indústria. Para facilitar a visualização foram mostradas apenas 5 das 10 replicatas (nas colunas, Figura 20). É possível verificar que a última linha de imagem apresenta melhor homogeneidade, revelando qual o processo mais adequado para produção do medicamento.

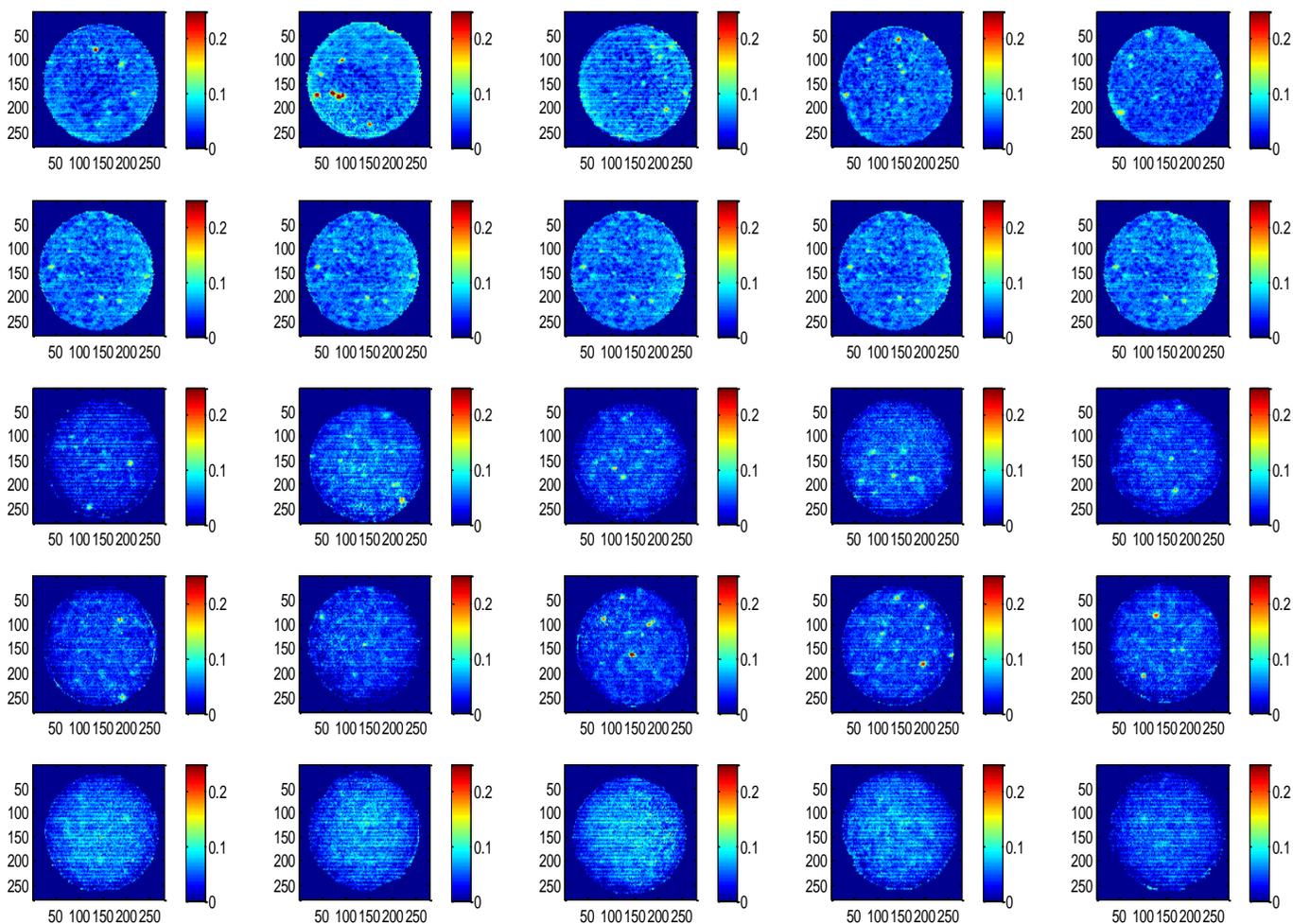


Figura 20 – Imagens químicas de carbegolina em diferentes processos de homogeneização. Processos nas linhas e replicatas nas colunas.

O último lote está mais homogêneo devido ao emprego de uma pequena quantidade de solvente na etapa de mistura. Por outro lado, os 4 primeiros lotes estão com pontos de acúmulo de ingrediente ativo representados por pontos vermelhos nas imagens. A informação de micro-homogeneidade na amostra pode ser visualmente diferenciadas por NIR-CI, no entanto, não são detectadas na análise por HPLC. Por cromatografia, as avaliações sobre homogeneidade são obtidas para caracterizar um lote e não o seu perfil individual de uma amostra.

Embora neste estudo, a tomada de decisão seja visual, os dados de imagens podem ser transformado em histogramas e avaliado por técnicas de

reconhecimento de padrões, como visto no estudo do citrato de sildenafil, Capítulo 3.

Com NIR-CI foi possível obter informações quantitativas de compostos em teores muito baixos para a técnica NIR, 0,5% da massa da amostra. Em amostras heterogêneas, a análise local pode significar ganhos em sensibilidade da técnica analítica, como visto no estudo do limite de sensibilidade, Capítulo 2. Este ponto pode ser outra vantagem na utilização de imagens espectroscópicas.

4.4 Conclusões

A distribuição de ativos e excipiente é uma característica importante devido ao impacto em propriedades farmacocinéticas dos medicamentos. Por outro lado, esta técnica pode trazer benefícios relevantes à indústria farmacêutica em estudos de degradações, aglomerações de excipientes, micro-homogeneidade e todas as relações das imagens com as propriedades de interesse, como por exemplo, estabilidade, entrega controlada, formação de metabólitos, entre outros.

Com os resultados deste estudo, foi possível obter informações químicas e espaciais associadas, ressaltando que o produto apresenta concentração muito baixa de ativo, ou seja, no limite da técnica NIR. Porém, no NIR-CI foi possível observar cada componente do comprimido de forma a melhorar a compreensão do processo e auxiliar pesquisadores na definição de estratégias de fabricação visando o desenvolvimento de novos produtos.

4.5 Referências Bibliográficas

- [1] Broad, N. W., Jee R. D., Moffat A. C., Smith M. R. *Analyst*. 126 (2001) 2207.
- [2] Rocha W., Rosa A., Martins J. A., Poppi R. J. *J. Braz. Chem. Soc.* 21 (2010) 1929.

- [3] Scafi S. H. F., Pasquini C. *Analyst*. 126 (2001) 2218.
- [4] Burger J., Geladi P. *J. Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007) 29.
- [5] Otsuka M. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 82 (2006) 109.
- [6] Ciurczak E.W. *Applied Spectroscopy Reviews*. 23 (1987) 147.
- [7] Alcalá M., Leo J., Ropero J., Blanco M., Romanach R. J. *J. of Pharm Sci.* 97 (12) 5318-5327 2008.
- [8] Blanco M., Alcalá M., Gonzalez J. M., Torras E. *J. of Pharm Sci.* 95 (2006) 2137.
- [9] L. Eriksson E. Johansson N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold. Multi- and Megavariate Data Analysis, Advanced Applications and Method Extensions, Part II. MKS Umetrics AB, 2006.
- [10] Geladi, P. Multivariate image analysis in chemistry and related areas: chemometric image analysis. West Sussex: Wiley Chichester, UK, 1996.
- [11] Hornak J. P. Encyclopedia of imaging science and technology. West Sussex: Wiley UK 2002.
- [12] Amigo J. M., Cruz J., Bautista M., Maspoch S., Coelho J., Blanco M. *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 696.
- [13] Roggo Y., Edmond A, Chalus, P., Ulmschneider, M. *Anal. Chim. Acta.* 535 (2005) 9.
- [14] R. L. Carneiro. Métodos químiométricos aplicados à análise de medicamentos por espectroscopia de imagem. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- [15] Sabin G. P., Rocha W. F. C., Poppi R. J. *Microchemical Journal*. 99 (2011) 542.

- [16] Rocha W. F. C., Sabin G. P., Março P. H., Poppi R. J. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 106 (2011) 198–204.
- [17] Sabin G. P., Breitzkreitz M. C., de Souza A. M., da Fonseca P., Calefe L., Moffa M. Poppi R.J. *Anal.Chim. Acta.* 706 (2011) 113.
- [18] Clark D., Henson M. J., Laplant, F., Sasic, S., Zhang, L., In: Piovonka, D. E., Chalmers, J. M., Griffiths, P.R. *The handbook of vibrational spectroscopy, applications in life, pharmaceutical and natural sciences pharmaceutical applications.* Hoboken: Wiley, 1, 2007.
- [19] Gendrin C., Roggo Y, Collet C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 533.
- [20] Lewis E. N, Dubois J., Kidder L. H., Haber K. S. In: Grahn H., Geladi P., *Techniques and applications of hyperspectral image analysis.* Hoboken: Wiley. 2007.
- [21] Lewis E. N., Schoppelrei J., Lee E., Kidder L. H. *Process analytical technology.* Cambridge: Blackwell, 2005.
- [22] Zhang L., Henson M.J., Sekulic S. S. *Anal. Chim. Acta.* 545 (2005) 262.
- [23] Gendrin C., Roggo Y., Collet, C. *Talanta.* 73 (2007) 733.
- [24] Ravn, C., Skibsted, E., Bro, R. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 554.
- [25] Nevado, J. J. B., Flores, J. R., Llerena, M. J. V. *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 465.
- [26] Musolino N. R. C., Cunha M. B., Bronstein M. D. Carbegolina como alternativa no tratamento clínico de prolactina. Experiência na tolerância/ resistência à bromocriptina. São Paulo v. 44 n. 2 Apr. 2000.

CAPÍTULO 5

ANÁLISES DE *PELLETS* FARMACÊUTICOS: UMA ABORDAGEM UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE IMAGEM QUÍMICA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.

5.1 Introdução

Espectroscopia de imagem química na região do infravermelho próximo (NIR-CI) é uma técnica emergente na indústria farmacêutica em comparação com a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIR) tradicional [1]. Enquanto a espectroscopia NIR obtém um espectro de uma grande área da amostra, NIR-CI acrescenta informações locais gerando um mapa de distribuição de concentrações [1,2]. Esta oportunidade de visualizar a distribuição espacial das espécies químicas ao longo da superfície de uma amostra possibilita o estudo do grau de heterogeneidade química e/ou física e todos os desdobramentos que este tipo de informação pode gerar [2].

Em um experimento NIR-CI, a área da amostra é dividida em pontos discretos e um espectro é adquirido em cada pixel, resultando em um cubo hiperespectral de dados, onde a primeira e a segunda dimensão correspondem às coordenadas espaciais ao passo que a terceira contém o perfil espectral. A informação espectral, contida em cada pixel, deve ser extraída para proporcionar um conjunto de imagens que mostra a distribuição de compostos químicos na presença da matriz da amostra.

A extração da informação de interesse pode ser realizada por vários meios, por exemplo, através da representação gráfica da intensidade de um comprimento de onda específico ou pela razão de altura de bandas, chamadas abordagens univariadas. Eventualmente pode ser útil a utilização de coeficientes de correlação do espectro de referência com os espectros dos pixels formando um mapa de similaridade espectral [3]. Este caso pode ser interessante para definir amostras onde o analito apresente diferenças espectrais importantes. No entanto, em muitos casos são necessários métodos multivariados, como análise de componentes principais (PCA) [4,5], mínimos quadrados clássicos (CLS) [1, 6], resolução de curvas multivariadas (MCR) [7-9] e mínimos quadrados parciais (PLS) [10,11]. Hoje em dia métodos quimiométricos baseados em estatística multivariada são considerados os meios mais adequados para a análise de dados NIR, uma vez que toda a informação espectral é levada em consideração e os

diagnósticos auxiliam na interpretação da qualidade do modelo gerado [4,12]. Estes métodos são aplicados a uma matriz de dados, assim, o cubo hiperespectral de dados (x.y.λ) deve ser desdobrado numa matriz **X** (xy.λ), onde xy representa as coordenadas espaciais dos pixels e λ a dimensão espectral. O processo de desdobramento é ilustrado na Figura 21.

Em situações em que os espectros dos componentes puros estão disponíveis, e efeitos de interação não são observados, o CLS pode ser aplicado diretamente. O CLS é um método bem conhecido de quantificação e assume que cada medição é a soma ponderada dos sinais linearmente independentes, em outras palavras, o espectro de cada pixel é equivalente a soma de todos os espectros de componentes puros ponderados por suas concentrações neste pixel [13]. Matematicamente, o CLS decompõe a matriz **X** de resposta como segue (Equação 1):

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

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

em que **C** é a matriz que contém a concentração de cada componente, **S** é a matriz que contém os espectros dos componentes puros e **E** é a matriz de erros. A concentração dos k componentes na amostra é prevista (Equação 2) e os vetores correspondentes são redobrados dando origem a k mapas de distribuição de concentrações, que permitem a localização de cada um dos componentes, Figura 21.

Com a adição de informações espaciais, a NIR-CI tem o potencial de fornecer aumento da compreensão sobre processos e produtos que está de acordo com as novas estratégias e iniciativas preconizadas no setor [1]. A utilização de NIR-CI na área farmacêutica tem sido descrita para avaliar a homogeneidade do pó durante a mistura [14,15], a distribuição de ingredientes farmacêuticos ativos em comprimidos [13,16] caracterização de polimorfismo [11], composição e aspectos morfológicos de sobre o tempo de liberação de fármacos

[17], revestimento de comprimidos [18], identificação de falsificações [19], caracterização do processo de fabricação [20,21], entre outros.

As formas de medicamentos com entrega controlada de fármacos estão cada vez mais complexas. Assim, estes produtos requerem novos métodos para a visualização rápida e direta da distribuição espacial dos componentes químicos na sua estrutura. Hoje em dia, *pellets* farmacêuticos são comumente encontrados devido às suas vantagens sobre os comprimidos convencionais e a disponibilidade crescente de empresas na produção de novas tecnologias. *Pellets* são pequenas formas esféricas de dosagem multi-unidades, com uma distribuição controlada de tamanhos (tipicamente entre 0,5 e 1,5 mm, para aplicações farmacêuticas) [22,23]. A fabricação de *pellets* está baseada em um dos dois conceitos: a produção de um *pellet* matriz, no qual o medicamento e os excipientes sofrem peletização direta, por exemplo, por extrusão-esferonização ou, alternativamente, a utilização de um núcleo de partida neutro como base para que sejam adicionadas sucessivas camadas de fármacos [24,25]. Os *pellets* esféricos e uniformes apresentam muitas vantagens sobre a utilização de outras formas sólidas, tais como:

- Partículas pequenas deixam rapidamente o estômago, independentemente do estado de alimentação do paciente, reduzindo assim a variabilidade da droga nos perfis plasmáticos, intra e interindivíduos, em relação à dosagem única [26].

- A dispersão uniforme de um fármaco em pequenas unidades de dosagem, reduz o risco de alta concentração de droga local e o seu efeito potencialmente irritante na mucosa gástrica. Além disso, a absorção da droga é maximizada e picos de flutuações no plasma são reduzidos [27].

- *Pellets* oferecem a possibilidade de combinar vários compostos ativos, drogas incompatíveis ou medicamentos com diferentes perfis de liberação na mesma unidade de dosagem [28,29].

- As formas de dosagem com doses diferentes podem ser produzidas a partir do mesmo lote, ajustando o peso dos *pellets* para o enchimento da cápsula.

- Devido à sua morfologia, superfície lisa, distribuição estreita de tamanhos, forma esférica, e baixa friabilidade, *pellets* podem ser facilmente revestidos com substâncias diferentes para diversas finalidades [22].

Quanto ao processo de obtenção, a extrusão / esferonização é uma técnica frequentemente utilizada na indústria de produção de *pellets*. A técnica baseia-se numa aglomeração por compactação. É vantajosa, uma vez que permite a preparação de *pellets* com um teor elevado da droga (até 90%), não requer núcleos inativos como bases para peletização e a reprodutibilidade deste método é muito boa. No pó de extrusão, a mistura de excipientes e do fármaco é umedecida e amassada para obter uma massa plástica, que é transformada em barras ao passar pela extrusora. O extrusado é quebrado em pequenos segmentos e a esferonização ocorre devido às forças de atrito da rotação do disco do esferonizador. Os *pellets* são então secos até atingir o conteúdo de umidade desejado [30,31]. O produto pode ainda ser revestido com vários materiais de recobrimento para alcançar as características de entrega de fármacos desejadas, por exemplo, a utilização de revestimento entérico, que são especialmente adequados para administração de drogas que não são estáveis em fluido gástrico ou pode causar irritação da mucosa gástrica e que são absorvidos no intestino superior [32].

Os *pellets* podem também ser obtidos através da adição de camadas sucessivas empregando um núcleo inerte de partida. Esferas de açúcar são frequentemente utilizadas como material do núcleo uma vez que a sua superfície lisa proporciona a base ideal para construir camadas sucessivas de fármacos e excipientes. A formação de camadas envolve a pulverização de uma solução de fármaco atomizado sobre o núcleo base, utilizando a tecnologia de revestimento por pulverização simples. As gotículas, uma vez aplicadas, entram em contato com o material do núcleo, e espalham-se sobre a superfície. Após, o solvente começa a evaporar e ocorre a formação de uma camada sólida. As camadas

podem ser adicionadas até que uma quantidade ideal de fármaco seja atingida. O produto pode ainda ser revestido com materiais diferentes [24].

No desenvolvimento farmacêutico de *pellets*, é necessário dispor de métodos eficazes de análise para que sejam obtidas as informações físicas e químicas sobre a qualidade do produto em desenvolvimento. Estas informações podem ser utilizadas para entender o desempenho in vivo ou in vitro.

Vários estudos têm mostrado métodos para a determinação da homogeneidade bem como para analisar as camadas de revestimento [33-35]. A microscopia óptica e a microscopia eletrônica de varredura (SEM) são normalmente utilizadas para avaliar as características físicas de seção transversal de *pellets* [36,37]. Embora estas técnicas proporcionem informações de alta resolução importantes para o desenvolvimento de produtos, elas não são capazes de fornecer informações sobre a distribuição química dos componentes ao longo das camadas [38]. Portanto, a fim de superar esta limitação da SEM e da microscopia óptica, novas técnicas são necessárias. Widjaja et al. descreveram o uso de microscopia Raman para a avaliação da dupla camada de microesferas biodegradáveis [38]. Métodos recentes utilizaram espectroscopia Terahertz para a obtenção de imagem química [18,35] trazendo informações adicionais sobre a composição de revestimentos. Em estruturas menores, onde requer alta resolução espacial, a melhor alternativa é a utilização de SEM equipada com detector de raios-X [39].

O objetivo deste trabalho é mostrar a potencialidade de NIR-CI para avaliar a morfologia da seção transversal de um *pellet* de dupla camada, a fim de estimar a distribuição dos componentes ao longo das camadas de revestimento e a composição completa do núcleo.

5.2 Parte experimental

a) Produção de *pellets*

A mistura de pó seco e uniforme (tamanho do lote: 500 g) contendo diclofenaco de sódio e excipientes (carboximetilcelulose, manitol, polietilenoglicol 4000, croscarmelose de sódio) foi obtida através da mistura em um misturador planetário (modelo BPA, Arno, Brasil), durante 10 min. A água foi adicionada durante 30 segundos antes da fase de granulação. A massa úmida foi extrusada a uma velocidade de 50 rpm utilizando um extrusor (modelo EX-130, Zelus, Brasil), equipado com uma peneira de extrusão cilíndrica (espessura: 0,8 mm e diâmetro de perfuração: 1,0 mm). Os extrusados foram esferonizados a 1200 rpm durante 2,5 minutos num esferolizador (modelo ES-230, Zelus, Brasil), com uma placa de fricção sombreada. *Pellets* úmidos foram secos durante 5 horas a 50 °C num forno de leito fluidizado (modelo R-060, Zelus, Brasil).

A fração de *pellets* com 0,85 mm de tamanho foi selecionada para o revestimento, utilizando uma técnica de leito fluidizado com pulverização de fundo e processo de inserção de Wurster (modelo R-060, Zelus, Brasil).

O primeiro revestimento (revestimento protetor) trata-se de uma dispersão que contém a polivinilpirrolidona e o segundo (revestimento entérico) foi uma dispersão contendo copolímero de metacrilato. Citrato de trietila foi utilizado como plastificante. As dispersões de revestimento foram pulverizadas a uma taxa de 7,5 mL min⁻¹ usando uma pressão de ar de atomização de 2,0 bar. A temperatura do ar de entrada foi fixada em 50 °C. Após o revestimento, os *pellets* foram secos a 50 °C durante 15 min.

b) Microscopia eletrônica de varredura

As medições de SEM (Jeol 6360 - LZ) foram realizadas em seção transversal da superfície dos *pellets* num ambiente de alto vácuo, a um potencial de 20 kV. As amostras foram pré-tratadas por pulverização catódica de uma camada de ouro sobre a superfície da amostra, processo chamado metalização.

c) Preparação das amostras

Para aquisição de dados por NIR-CI e SEM, os *pellets* foram seccionados transversalmente, de forma a obter uma superfície lisa e integra. O corte foi realizado com uma lâmina de barbear e um microscópio para auxiliar a operação (Stemi DV4, Carl Zeiss).

d) Espectroscopia de imagem química no infravermelho próximo

As imagens foram obtidas diretamente na seção transversal da superfície do *pellet* utilizando um sistema Spotlight 400N FT- NIR Imaging, PerkinElmer. O mapeamento foi realizado na área de 1400 μ m x 1400 μ m, com uma resolução espacial de 25 μ m, 128 varreduras e faixa espectral entre 7800 e 4000 cm^{-1} . Um cubo de dados (56 x 56 pixels e 239 comprimentos de onda) foi obtido e desdobrado para o pré-processamento através de: 1) eliminação de espectros de elevada transmitância, referente aos dados obtidos na região da célula de quartzo utilizada para apoiar o *pellet*; 2) conversão em logaritmo comum do inverso dos valores de reflectância; 3) variação normal padrão (SNV) para superar os efeitos físicos de espalhamento multiplicativo, normalizar os espectros e corrigir linha de base; 4) primeira derivada usando filtro polinomial de segunda ordem com algoritmo de Savitzky-Golay para acentuar informações espectrais.

Após o pré-processamento, o número de condição da matriz foi determinado para testar a habilidade da matriz **S** ser invertida. A análise dos dados foi realizada por CLS uma vez que todos os compostos puros presentes na amostra são conhecidos previamente. Os espectros de compostos puros (média de 400 pixels) foram obtidos utilizando os mesmos parâmetros instrumentais e submetidos aos mesmos pré-processamentos utilizados para as amostras. As imagens dos compostos individuais e os respectivos histogramas foram estudados a fim de obter informações sobre as características de micro-homogeneidade. Finalmente, para verificar a qualidade do modelo, a imagem das concentrações totais por pixel foi obtida e o histograma correspondente avaliado. Assim, um modelo CLS, deve

produzir uma imagem total homogênea com média centrada em 100% em massa e com desvio idealmente baixo.

A Figura 21 mostra o esquema da análise quimiométrica realizada.

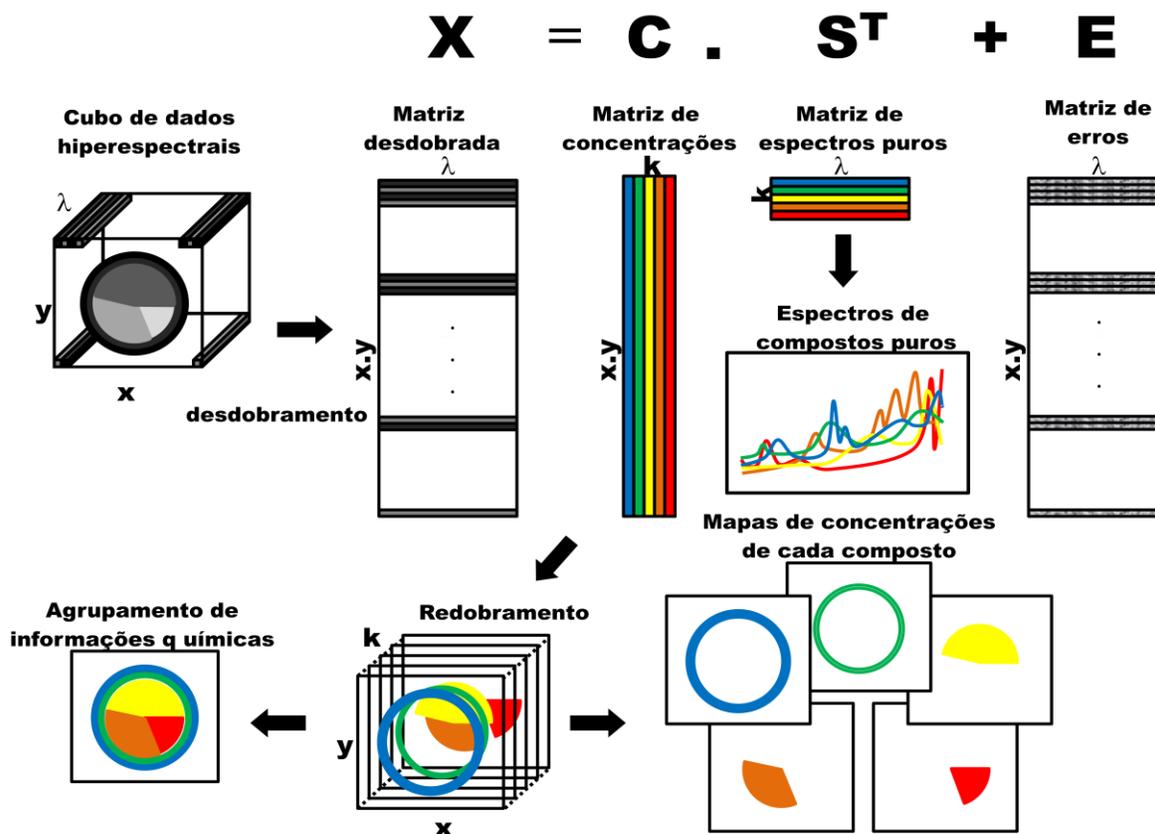


Figura 21- Abordagem por CLS para análise de *pellets*.

5.3 Resultados e discussões

a) Teste de dissolução

O método mais conveniente para obter *pellets* com quantidade elevada de substâncias ativas é o processo de extrusão / esferonização. Portanto, neste trabalho o diclofenaco de sódio foi incorporado no núcleo. A estabilidade das substâncias farmacêuticas alcalinas com polímeros ácidos de revestimento

entérico pode ser comprometida devido à desprotonação do polímero pelo fármaco alcalino, por essa razão, o revestimento de proteção é necessário. Após os dois processos de revestimento, o tamanho dos *pellets* foi determinado utilizando peneiras $\geq 1,0$ mm. O teste de dissolução utilizando inicialmente meio ácido, pH=1,2 (durante 2 horas) e, em seguida, com pH=6,8 (durante 45 minutos), demonstrou que a camada gastro resistente foi eficaz para a liberação de diclofenaco de sódio, uma vez que foi observada apenas 0,8% de liberação em solução ácida e 88,0%, em meio neutro.

b) Microscopia eletrônica de varredura

Os *pellets* foram seccionados para que as morfologias do núcleo e da dupla camada pudessem ser observadas através da SEM. A micrografia (Figura 22) indica que é possível visualizar duas regiões distintas: uma camada de revestimento externo e um núcleo interno. No entanto, não é possível diferenciar entre as duas camadas de revestimento ou distinguir os componentes químicos da formulação do núcleo. A SEM é uma técnica que é normalmente usada para observar a morfologia dos *pellets*, e características físicas tais como a porosidade e as fissuras de superfície. A porosidade de um material sólido pode proporcionar informação útil sobre a desintegração, dissolução e difusão das substâncias ativas. Os poros e fissuras de superfície pode influenciar a deposição do material de revestimento, provocando irregularidades de camadas e, portanto, a variabilidade da biodisponibilidade. A morfologia da superfície pode afetar as propriedades de encapsulamento e fluidez, tendo igual relevância na formação do filme [22,30]. No entanto, tal como observado na Figura 22, as micrografias não trazem informações químicas e, assim, não permitem a identificação de compostos e as suas distribuições espaciais, o que é particularmente importante para estudo das características de entrega controlada dos *pellets*. Portanto, existe uma necessidade de desenvolvimento de métodos de imagens químicas para tal caracterização.

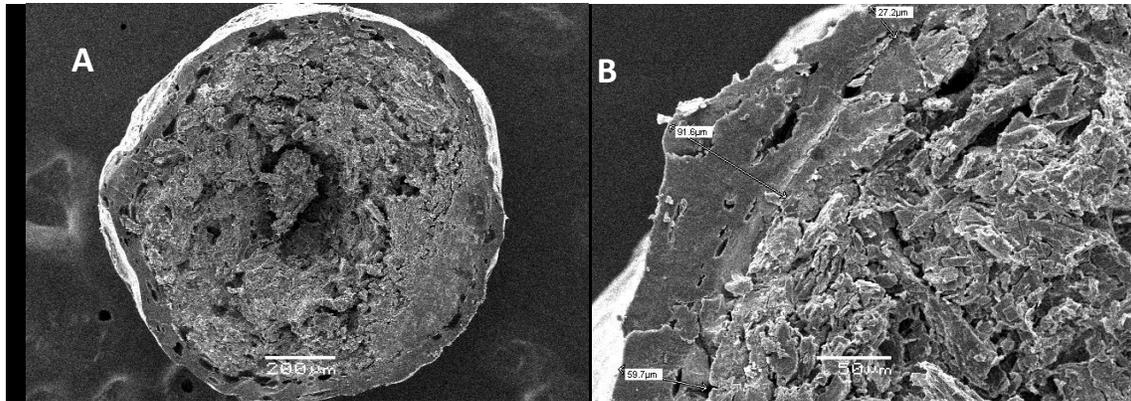


Figura 22 - Microscopia Eletrônica de Varredura. A) Imagem do corte transversal de um *pellet* farmacêutico; e B) Aumento da imagem para observação das camadas.

c) Espectroscopia de imagem química no infravermelho próximo

O pré-processamento é um passo essencial para a obtenção de imagens através da microespectroscopia NIR. Um excelente trabalho mostrando a importância do pré-processamento de dados foi publicado por Burger e Geladi [40].

A Figura 23A mostra a sobreposição dos espectros brutos da área de aquisição. É possível observar que os espectros estão distribuídos por uma ampla faixa de valores de reflectâncias devido à grande influência de efeitos físicos, uma característica de medidas de reflectância, mais acentuadas em microscopia NIR. No primeiro estágio de pré-processamento (Figura 23B), foi realizada a remoção dos espectros espaciais (pixels) de valores de baixa reflectância, característicos da região externa ao perímetro delimitado pela amostra, ou seja, da região de interesse (ROI). Como resultado, todos os espectros de reflectância que apresentaram valores médios menores do que 3%, foram substituídos por uma linha constante (valor da reflectância = 1). O próximo passo (Figura 23C) mostra os valores para o logaritmo comum do inverso da reflectância (pseudo absorbância). Este procedimento foi utilizado para permitir a correlação dos espectros com a concentração. Por fim, o SNV e a primeira derivada de Savitzky-

Golay foram realizados (Figura 23D, apenas SNV é mostrado para fins de clareza). É possível observar que utilizando SNV, a variabilidade física foi removida e as propriedades químicas tornam-se mais claras e úteis na geração de imagens.

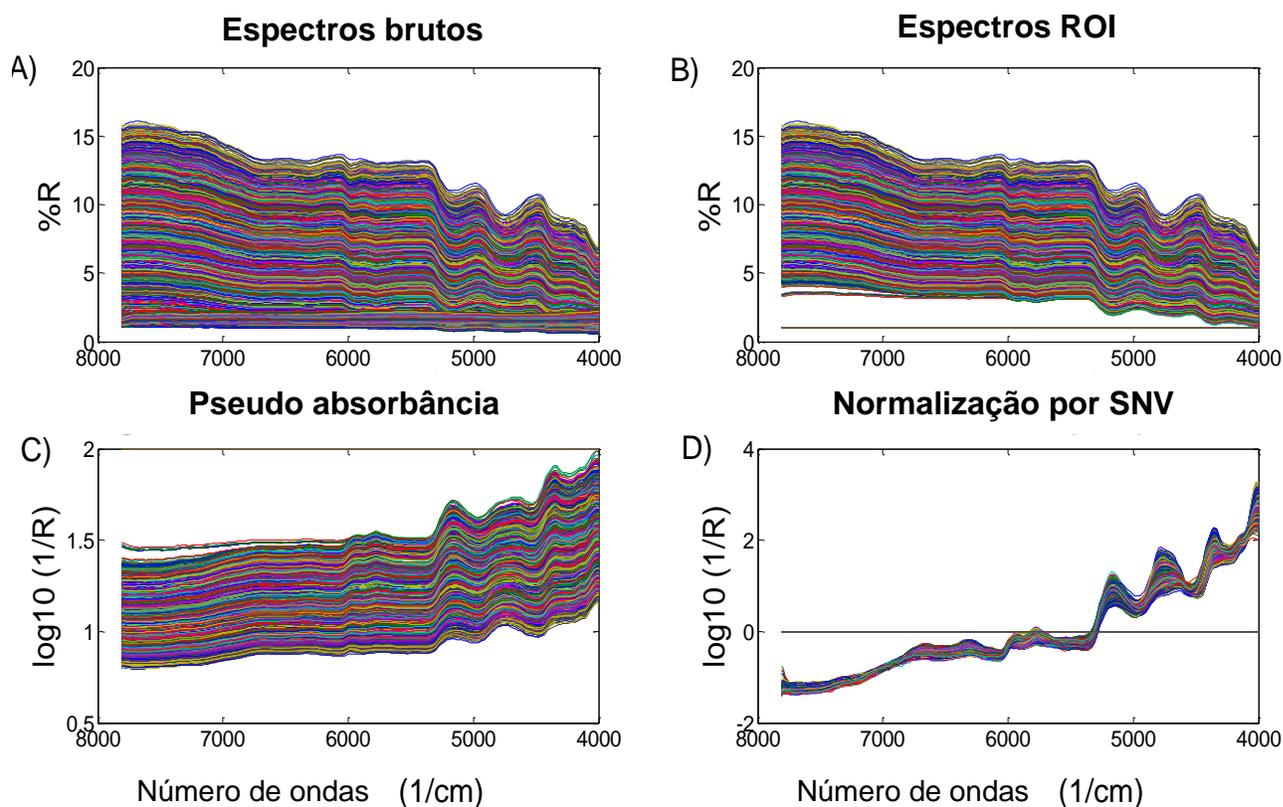


Figura 23 - Pré-processamento dos dados espectrais. A) espectros brutos; B) seleção da região de interesse (ROI); C) logaritmo inverso dos valores de reflectância; D) Normalização por SNV.

O SNV tem sido frequentemente utilizado como um pré-processamento para NIR-CI em vários trabalhos [13,41]. Por outro lado, a correção de espalhamento multiplicativo (MSC) é por vezes utilizado como alternativa para o SNV. Estas duas abordagens são utilizadas para reduzir os efeitos, principalmente, do tamanho de partícula e são consideradas equivalentes em muitos casos [42]. Neste trabalho, o MSC não foi avaliado porque este procedimento é realizado por colunas da matriz de dados e, conseqüentemente, seria influenciada por pixels fora da ROI. É importante notar que pixels não informativos (fora da ROI) foram

igualados a zero e o modelo CLS pode ser aplicado normalmente. Para cálculos CLS, foi necessária a utilização dos espectros dos componentes puros, mostrados na Figura 24. Cada composto foi representado por uma média de 400 pixels. Observa-se que os espectros têm bandas de absorção que permitiram a separação química dos compostos nas imagens. Se as respostas dos componentes tendem a colinearidade, **S** pode ser instável, em outras palavras, os valores previstos podem ser facilmente influenciados frente a pequenas alterações espectrais, ruídos ou outras interferências. Neste caso, as estimativas de valores de concentração podem não ser precisas. A fim de avaliar se as respostas dos componentes puros são linearmente independentes, o número de condição foi calculado. Segundo a literatura [43], estima-se que um bom valor prático para o número de condição é 30. Neste trabalho, verificamos que o número de condição é 13, indicando que não há colinearidade importante de acordo com esse propósito.

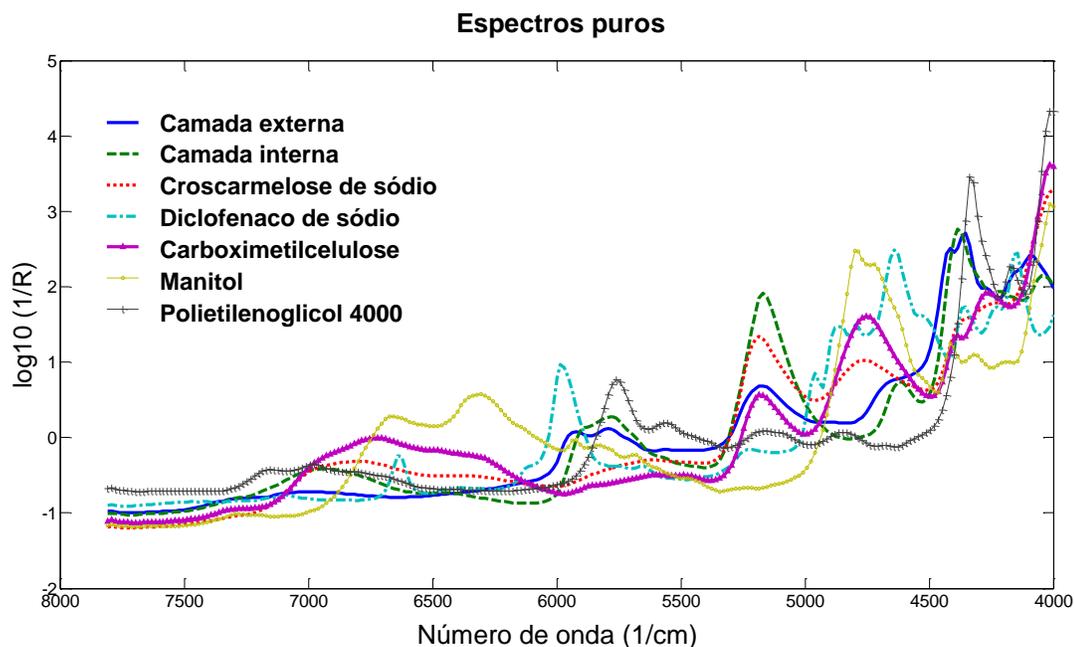


Figura 24 – Espectros NIR dos componentes puros.

A Figura 25 mostra os resultados da NIR-CI, distribuição das camadas de revestimento e os componentes do núcleo do *pellet*. As escalas de cores do mapa foram modificadas para melhor interpretação das imagens de concentrações.

Além disso, a Figura 26 mostra os histogramas dos componentes do pellet ilustrados na Figura 25. A observação conjunta das Figuras 25 e 26 pode ser útil para o melhor entendimento das imagens.

As concentrações exatas de cada componente no *pellet* não são conhecidas, no entanto, os histogramas individuais foram utilizados para proporcionar uma ideia da heterogeneidade da distribuição de cada componente. Figuras 25A e 25B mostram as duas camadas separadamente e a Figura 25C mostra as duas camadas em conjunto (soma das Figuras 25A e 25B) e indica que há um revestimento bem definido sobre o núcleo.

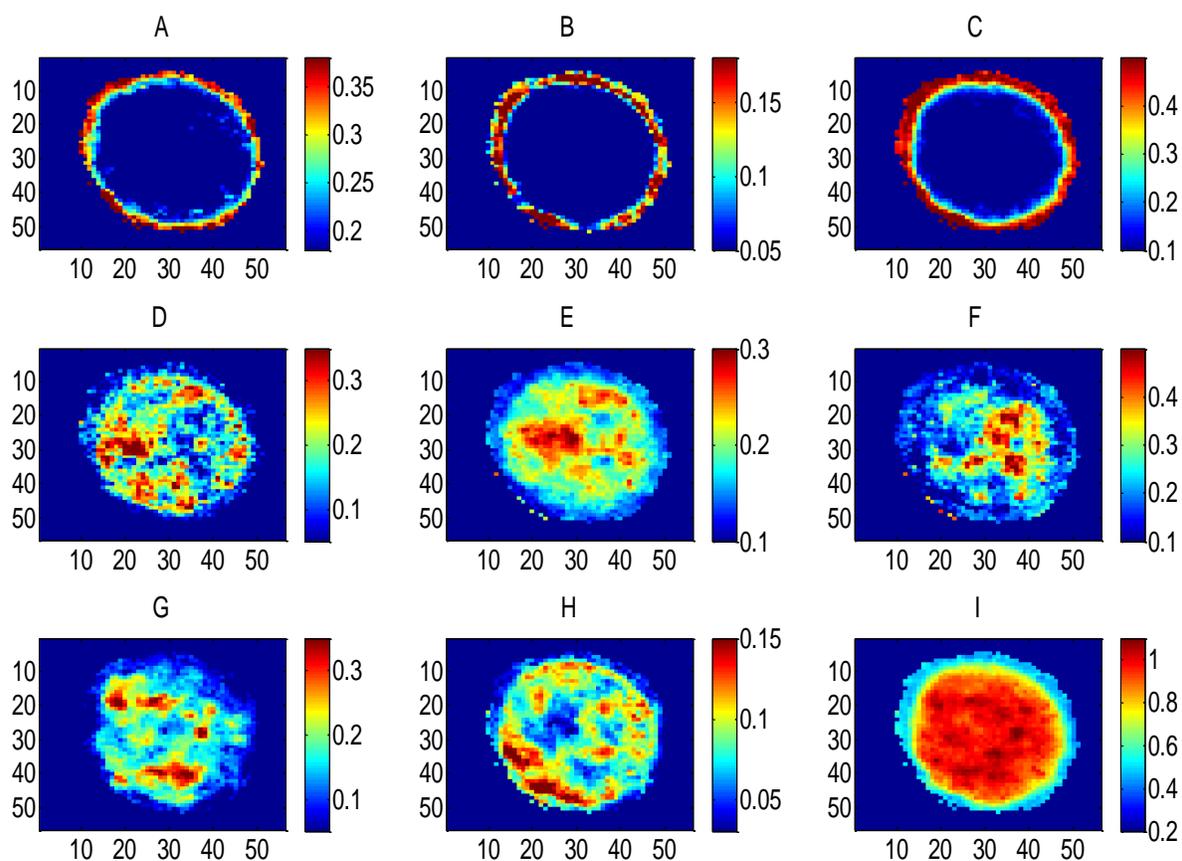


Figura 25 - Imagens químicas do *pellet*. (A) copolímero metacrilato (camada externa): (B) de polivinilpirrolidona (camada interna), (C) soma das duas camadas, (D) croscarmelose de sódio; (E) diclofenaco de sódio, (F) carboximetilcelulose, (G) manitol, (H) polietilenoglicol 4000, (I) soma dos compostos do núcleo.

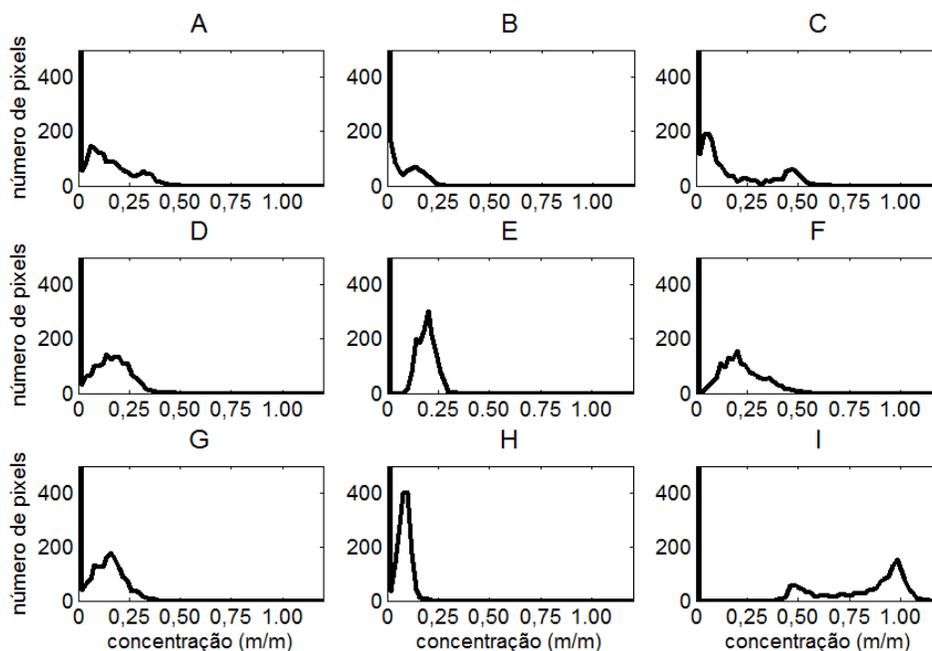


Figura 26 – Histogramas das imagens químicas. (A) copolímero metacrilato (camada externa): (B) de polivinilpirrolidona (camada interna), (C) soma das duas camadas, D) croscarmelose de sódio; (E) diclofenaco de sódio, (F) carboximetilcelulose, (G) manitol, (H) polietilenoglicol 4000, (I) soma dos compostos do núcleo.

Os dados mostrados até agora, vão de encontro com os resultados de dissolução, mostrados anteriormente. Espera-se que o revestimento gastro-resistente seja homogêneo ao longo dos *pellets*, para evitar a liberação de diclofenaco sódio em solução ácida, tal como observado. No entanto, observou-se também que os componentes das duas camadas estão presentes simultaneamente em alguns pixels (Figuras 25A e 25B), com a indicação de possível miscibilidade parcial. No entanto, sabe-se que num experimento NIR-CI, pixels não são células isoladas de amostra, ou seja, existe um gradiente de interferência sobre os pixels vizinhos mais próximos [44]. Portanto, ao nível de pixel, apenas uma informação quantitativa limitada pode ser alcançada. Este fato pode também ser observado pelos respectivos histogramas das camadas (Figura 26A e 26B), onde é demonstrada a heterogeneidade das imagens. Da mesma

forma, a distribuição química dos compostos no núcleo dos *pellets* também foi revelada (Figuras 25D-25H). A ideia de heterogeneidade destas imagens pode ser vista nas Figuras 26C-26G. Nota-se que a maior homogeneidade (alta curtose) está representada na Figura 26G, um componente líquido. Os histogramas podem também ser utilizados para avaliar a imagem total dos constituintes do *pellet*. Uma vez que a concentração dos componentes em cada pixel não pode ser conhecida com antecedência, a precisão das previsões CLS foi avaliada pela soma de todos os valores previstos. Como os espectros foram adquiridos por mapeamento da superfície de uma mesma amostra e as imagens individuais derivam do mesmo conjunto de espectros, as imagens devem ser complementares e todos os compostos devem somar 1 (ou 100% em massa). A Figura 27A mostra a imagem da concentração total e a Figura 27B mostra o histograma correspondente. Como esperado, a concentração média da ROI é centrada em 1 (com um desvio padrão de 0,05) e a região filtrada é zero, indicando a alta qualidade da previsão obtida por CLS.

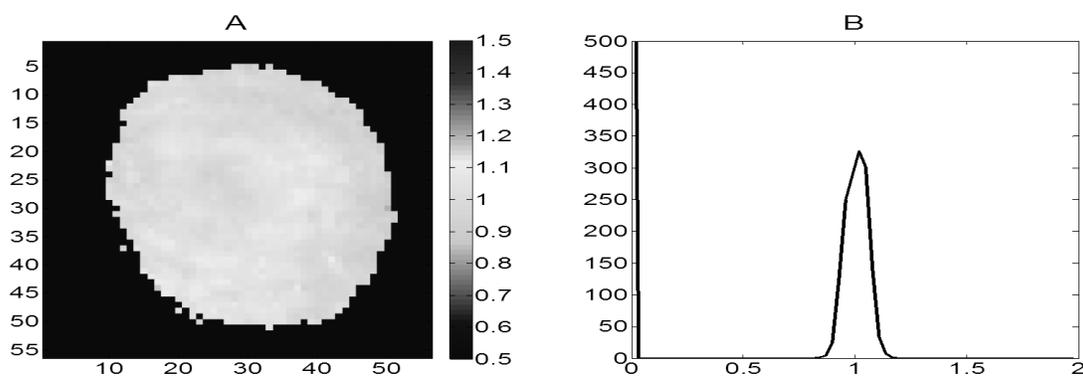


Figura 27 - Avaliação das previsões do CLS. A) concentrações totais da imagem; B) histograma das concentrações totais da imagem.

5.4 Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a NIR-CI foi capaz de fornecer informações químicas sobre a distribuição das camadas de revestimento, e da composição do núcleo do *pellet*. No entanto, a informação obtida num dado pixel pode ser influenciada pela composição química dos pixels vizinhos. Mesmo assim, a NIR-CI traz informações relevantes e é complementar as micrografias obtidas por SEM. A análise dos dados por CLS mostrou ser uma abordagem simples e adequada neste tipo de estudo onde todos os constituintes são conhecidos e efeitos de interação não são observados. A abordagem aqui descrita pode ser útil para a indústria farmacêutica durante o desenvolvimento de um novo produto. A estrutura das camadas e distribuição dos componentes do núcleo pode abrir um novo campo de estudo da relação quantitativa imagem-propriedade para estudo de medicamentos com entrega controlada de ativo.

5.5 Referências bibliográficas

- [1] Ravn C., Skibsted E., Bro R., *J. Pharm. Biomed.* 48 (2008) 554.
- [2] Reich G., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1109.
- [3] Cairós C., Amigo J. M., Watt R., Coello J., MasPOCH S. *Talanta* 79 (2009) 657.
- [4] de Juan A., Tauler R., Dyson R., Marcolli C., Rault M., Maeder M. *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 70.
- [5] Lopes M.B., Wolff J-C., *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 149.
- [6] Amigo J. M., Ravn C., *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 76.
- [7] de Juan A., Maeder M., Hancewicz T., Tauler R. *J. Chemometr.* 22 (2008) 291.
- [8] Gendrin C., Roggo Y., Collet C.. *J. Near Infrared Spectrosc.* 16 (2008) 151.
- [9] Awa K., Okumura T., Shinzawa H., Otsuka M., Ozaki Y. *Anal. Chim. Acta* 619 (2008) 81.

- [10] Zhao N., Zidan A., Tawakkul M., Sayeed V.A., Khan M. *Int. J. Pharm.* 401 (2010) 25.
- [11] Rocha W.F.C., Sabin G.P., Março P.H., Poppi R.J. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 106 (2011) 198.
- [12] Gendrin C., Roggo Y., Collet C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 533.
- [13] Amigo J.M., Cruz J., Bautista M., MasPOCH S., Coelho J., Blanco M. *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 696.
- [14] El-Hagrasy A.S., Morris H.R., D'Amico F., Lodder R.A., Drennen J.K. *J. Pharm. Sci.* 90 (2001) 1298.
- [15] Lyon R.C., Lester D.S., Lewis E.N., Lee E., Lawrence X.Y., Jefferson E.H., Hussain A.S., *AAPS PharmSciTech.* 3 (2002) 1.
- [16] Koeler F.W., Lee E., Kidder L.H., Lewis E.N. *Spectrosc. Eur.* 14 (2002) 12.
- [17] Lewis E.N., Carroll J.E., Clarke F., *NIR News* 2 (2001) 16.
- [18] Maurer L., Leuenberger H.. *Int. J. Pharm.* 370 (2009) 8.
- [19] Puchert T., Lochmann D., Menezes J.C., Reich G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 138.
- [20] Gowen A.A., O'Donnell C.P., Cullen P.J., Bell S.E.J. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 10.
- [21] Gendrin G., Roggo Y., Spiegel C., Collet C., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 828.
- [22] Dukić-Ott A., Thommes M., Remon J.P., Kleinebudde P., Vervaet C., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 38.
- [23] Efentakis M., Koutlis A., Vlachou M., *AAPS PharmSciTech.* 1 (2000) 1.
- [24] Macconnell E.L., Macfarlane C.B., Basit A., *Int. J. Pharm.* 380 (2009) 67.
- [25] Trivedi N.R., Rajan M.G., Johnson J.R., Shukla A.J., *Ther. Drug Carrier Syst.* 24 (2007) 1.
- [26] Krämer J., Blume H. Biopharmaceutical aspects of multiparticulates, in: I. Ghebre-Sellassie (Ed.), *Multiparticulate oral Drug Delivery*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel and Hong Kong, 1994, 307.

- [27] Santos H. M. M., Veiga F. J. B., Pina M. E. T., Sousa J. J. M. S., *Braz. J. Pharm. Sci.* 42 (2006) 309.
- [28] Santos H. M. M., Veiga F. J. B., Pina M. E. T., Sousa J. J. M. S., *Braz. J. Pharm. Sci.* 40 (2004) 455.
- [29] Abdul S., Chandewar A. V., Jaiswal S. B., *J. Control. Release* 147 (2010) 2.
- [30] Rahman A., Ahuja A., Baboota S., Bali V., Saigal N., Ali J., *Curr. Drug Deliv.* 6 (2009) 122.
- [31] Häring A., Vetchý D., Janovská L., Krejcová K., Rabiřsková M., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34 (2008) 28.
- [32] Dukić-Ott A., De Beer T., Remon J. P., Baeyens W., Foreman P., Vervaet C., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 302.
- [33] Lee M. J., Seo D. Y., Lee H. E., Wang I.C., Kim W.S., Jeong M.Y., Choi G.J., *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 66.
- [34] Mozina M., Tomazevic D., Lebenc S., Pernus F., Likar B., *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 156.
- [35] Ho L., Cuppok Y., Muschert S., Gordon K. C., Pepper M., Shen Y., Siepmann F., Siepmann J., Taday P. F., Rades T., *Int. J. Pharm.* 382 (2009) 151.
- [36] Larsen C.C., Sonnergaard J.M., Bertelsen P., Holm P., *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 191.
- [37] Nastruzzi C., Cortesi R., Esposito E., Genovesi A., Spadoni A., Vecchio C., Menegatti E., *AAPS PharmSciTech.* 1 (2000) 1.
- [38] E. Widjaja, W.L. Lee, S.C. Loo, *J. Anal. Chem.* 82 (2010) 1277–1282.
- [39] S. Ensslin, K.P. Moll, K. Paulus, K. Mäder, *J. Control. Release* 128 (2008) 149–156.
- [40] Burger J., Geladi P., *J. Near Infrared Spectrosc.* 15 (2007) 29
- [41] Cruz J., Bautista M., Amigo J. M., Blanco M., *Talanta* 80 (2009) 473.
- [42] Dhanoa M. S., Lister S. J., Sanderson R., Barnes R. J., *J. Near Infrared Spectrosc.* 2 (1994) 43.

[43] Næs T., Isaksson T., Fearon T., Davies T., *Multivariate Calibration and Classification*, NIR Publications, UK, 2002.

[44] Geladi P., J. *Near Infrared Spectrosc.* 16 (2008) 357.

Considerações finais

Estudos de imagens químicas estão em pleno desenvolvimento. O sucesso deste campo de estudo depende de novas tecnologias analíticas (mais rápidas e precisas) e da capacidade de processamento de dados. Um conjunto de dados de imagens hiperespectrais com poucos megapixels requer uma capacidade de processamento incomum para computadores atuais. Assim, para atender às novas necessidades, como filmes multivariados monitorando processos, é preciso imaginar a enorme barreira tecnológica que será preciso enfrentar, ou a simplificação de algoritmos deverá ser alvo de estudos.

Nesta tese foi possível mostrar diferentes estratégias quimiométricas para obtenção de imagens químicas. Uma série de novas necessidades está surgindo, e com isso, novas abordagens precisam ser levadas em consideração. Problemas como a confiabilidade das imagens, sensibilidade analítica, velocidade de aquisição, devem ser estudados com novas perspectivas pela quimiometria.

Por outro lado, após obter imagens confiáveis, é necessário buscar novas abordagens para converter imagens em informações relevantes. É preciso um novo olhar sobre a heterogeneidade de compostos, assim como estabelecer associações entre substâncias ou efeitos de processos baseados em tratamento de imagens dos produtos.

Por fim, a indústria farmacêutica poderá ser beneficiada por um novo campo de estudos onde a relação quantitativa imagem-propriedade poderá ser utilizada no entendimento de ações terapêuticas, processos de degradação, propriedades físicas, entre outras características.